



**HAL**  
open science

**Recherche de conditions alternatives à l'utilisation de solvants chlorés en Chromatographie Liquide Non-Aqueuse à Polarité Inversée de Phases. Application à l'analyse des lipides présents dans les milieux complexes**

Dorra Hmida

► **To cite this version:**

Dorra Hmida. Recherche de conditions alternatives à l'utilisation de solvants chlorés en Chromatographie Liquide Non-Aqueuse à Polarité Inversée de Phases. Application à l'analyse des lipides présents dans les milieux complexes. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COMUE); Université de Tunis El Manar, 2016. Français. NNT : 2016SACLS189 . tel-01424200

**HAL Id: tel-01424200**

**<https://theses.hal.science/tel-01424200v1>**

Submitted on 2 Jan 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLS189

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE TUNIS EL MANAR  
ET DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°571

Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Ecole Doctorale de Mathématiques, Informatique, Sciences et Technologies de la  
matière

Spécialité de doctorat : Chimie

Par

**Mme Dorra HMIDA**

Recherche de conditions alternatives à l'utilisation de solvants chlorés en  
Chromatographie Liquide Non-Aqueuse à Polarité Inversée de Phases.  
Applications à l'analyse des lipides présents dans les milieux complexes.

**Thèse présentée et soutenue à Tunis, le 22 juillet 2016 :**

**Après avis des rapporteurs :**

M. Jaloul Bouajila, Maître de conférences HDR, Université Paul Sabatier Toulouse 3  
M. Mohamed Beji, Professeur, Université de Tunis

**Composition du Jury :**

M. Mohamed Lotfi Efrit	Professeur, Université Tunis El Manar	Président du Jury
M. Mohamed Beji	Professeur, Université de Tunis	Rapporteur
M. Alain Tchapla	Professeur émérite, Université Paris-Sud	Examinateur
Mme Sylvie Héron	Maître de conférences HDR, Université Paris-Sud	Directrice de thèse
M. Manef Abderrabba	Professeur, Université Tunis Carthage	Directeur de thèse
M. Fathi Moussa	Professeur, Université Paris-Sud	Invité

## *Dédicaces*

*Je tiens à dédier cette thèse*

*A mes parents Leila Achour et Moncef Hmida,*

*Sans eux je ne serai pas arrivée là*

*A mon frère Kais Hmida et ma belle-sœur Mouna Lioua*

*A tous ceux qui me sont chers*

## Remerciements

Dans cet avant-propos, je souhaite en premier lieu exprimer ma reconnaissance envers les personnes et les organismes qui ont participé au bon déroulement et à la valorisation de cette thèse de doctorat.

Ces travaux de thèse ont été réalisés en cotutelle entre le Laboratoire d'Etudes Techniques et Instruments d'Analyse Moléculaire (LETIAM) de l'université Paris-Saclay sous la direction de madame **Sylvie HERON**. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et le témoignage de ma haute considération de m'avoir accordé cette confiance et m'avoir guidé dans le monde de la recherche. A travers ses qualités professionnelles, elle m'a transmis de précieuses connaissances ainsi qu'une rigueur scientifique qui me seront très utiles dans mon avenir professionnel.

Je souhaite également remercier mon co-directeur de thèse Monsieur **Manef ABEDRRABBA**, directeur du Laboratoire Matériels, Molécules et Applications (LMMA), IPEST La Marsa qui a accepté encore une fois de diriger ma thèse de doctorat. Merci pour son soutien, ses conseils pertinents et son aide précieuse qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Mes remerciements s'adressent à :

Monsieur **Lotfi EL EFRITT**, Professeur à l'université Tunis El Manar, pour avoir aimablement accepté de présider le jury de ma thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

Monsieur **Mohamed BEJI**, Professeur à l'université de Tunis, pour avoir aimablement accepté d'être le rapporteur de ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de mon grand respect.

Monsieur **Jaloul BOUJILA**, Maître de conférences HDR à l'université Paul Sabatier Toulouse 3, en reconnaissance de l'honneur qu'il m'accorde en acceptant de juger ce travail en tant que rapporteur. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

Monsieur **Fathi MOUSSA**, qui m'a accepté au sein de son équipe du LETIAM. Merci pour ses recommandations pour ma thèse, ses suggestions et le soutien dont j'ai bénéficié tout au long de mon séjour au sein de son équipe.

Monsieur **Didier CHARBONNEAU** et Monsieur **Olivier MERCIER** de la société **INTERCHIM** pour le don de colonnes, ce qui nous a permis de réaliser ce travail.

Monsieur **Rodolphe PENNANEC** de la société **SEDERE** pour le don de lampe pour le Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière.

Madame **Nouha FARES** et Madame **Samira SIFI** de l'Office National de l'Huile de la Tunisie (**ONH**) pour nous avoir fourni les échantillons d'huiles d'olive pour notre étude.

Monsieur **Alain TCHAPLA**, pour son aide dans mon travail, ses encouragements, ses suggestions et tous les bons moments qu'on a pu partager tout au long de mon séjour au LETIAM.

Madame **Marine DE PERSON**, pour son expérience en LC/MS, sa disponibilité pour me former et sa gentillesse.

Monsieur **Jean BLETON**, pour son expérience en GC/MS dont j'ai bénéficié et tous ses encouragements et suggestions.

Madame **Myriam BONOSE**, pour ses conseils, sa bonne humeur et tous les bons moments partagés ensemble au LETIAM.

Monsieur **Philippe MEJANELLE**, Madame **Yvonne PAOLI**, pour l'ambiance agréable au quotidien.

Tous les thésards du LETIAM : **Arnaud Wenceslas Geoffroy TAMBA SOMPILA**, **Arnold Murphy Elouma NDINGA**, **Aurélien LO**, **Naira PEREZ VASQUEZ**, **Pierre GUIBAL**, **Sanaz KEYKHOSRAVI**, pour tous les moments partagés ensemble.

Mademoiselle **Noura KHEMIRI**, pour son aide précieuse dans la partie calcul théorique et sa disponibilité.

Tous les thésards du Laboratoire Matériaux, Molécules et Applications (LMMA), IPEST La Marsa. Combien leur gentillesse m'a soutenu et aidée.

Enfin, c'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux et toutes celles qui à leurs manières m'ont aidé à mener à bien ce travail. Je désire exprimer ma profonde gratitude.

## Liste des abréviations

AcMe : Acétone.

AcOEt : Acétate d'éthyle.

AG : Acide gras.

Ag : Argent.

As : Surface moléculaire du soluté sur la silice.

BEH: Acquity UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$  (50x2.1mm, 1.7 $\mu\text{m}$ ).

BuOH: Butanol.

C18\_2: Uptisphere Strategy C18-2 100Å (100x2.1mm, 1.7 $\mu\text{m}$ ).

CAD : Détecteur d'aérosol chargé.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CG : Chromatographie en phase gazeuse.

CE : Commission Européenne.

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Chlorure de méthylène.

CHCl<sub>3</sub>: Chloroforme.

CLPI : Chromatographie liquide à polarité de phases inversée.

CLPN : Chromatographie liquide à polarité normale de phases.

COI : Conseil Oléique International.

Core-shell : Particules superficiellement poreuses.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

DAG : Diacylglycérols.

DEDL : Détecteur évaporatif à diffusion de lumière.

dp : Diamètre de particules.

$E_0$  : Energie d'adsorption du soluté par unité de surface de silice.

EBH: Ethyl-bridged hybrid.

EI : Impact électronique.

EtOH : Ethanol.

FAME : Fatty Acid Methyl Ester.

FID : Détecteur à ionisation de flamme.

FPP : Phase stationnaire totalement poreuse.

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse.

h : Hauteur réduite.

H<sub>2</sub>O : Eau.

HALO : Halo C18 (50x2.1mm, 2.7 $\mu$ m).

HEPT : Hauteur équivalente à un plateau théorique.

HPLC : Chromatographie liquide haute performance.

UHPLC-APCI-MS : Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse à ionisation chimique à pression atmosphérique.

HPT: Technologies de particules hybrides.

HSS: Acquity UPLC HSS C18 1,8  $\mu$ m (50x2.1mm, 1.8 $\mu$ m).

iPrOH: iso-Propanol.

IR : Infrarouge.

ISIS: Nucleodur C18 Isis 1.8 $\mu$ m (50x2mm, 1.8 $\mu$ m).

k : facteur de rétention.

KINETEX: Kinetex C18 1,7 $\mu$ m 100 Å (50x2.1mm, 1.7 $\mu$ m).

LBL : Couche par couche.

LC : Chromatographie en phase liquide.

LEC : Longueur équivalente de chaîne.

MCM: Mobile composite of matter.

MeCN: Acétonitrile.

MeOH : Méthanol.

MS : Spectrométrie de masse.

N : Nombre de plateaux théoriques.

NARP : Non aqueous reversed phase.

Nbre: Nombre.

NC : Nombre de carbone.

NDL : Nombre de doubles liaisons.

NP : Nombre de partition.

PGC : Phase stationnaire pyrocarbone.

R : constante des gaz parfaits.

RI : Indice de réfraction.

RPLC : Chromatographie liquide à polarité inversé de phases.

SCP : Particules à noyau solide.

SCP: Particules à noyau fusionnée.

SFC : Chromatographie en phase super critique.

SOS : Sphère sur sphère.

SPP : Superficial porous particules.

$t_0$  est le temps de rétention du composé non retenu pour une colonne donnée.



TAG : Triacylglycérols.

TEOS: 1,2-bis triethoxysilyéthane.

THF : Tétrahydrofurane.

TPP : Phase stationnaire totalement poreuse.

$T_r$  : Temps de rétention.

UHPLC-DAD: Chromatographie liquide ultra haute performance couplé à un détecteur à barrettes de diodes.

UHPLC-DEDL: Chromatographie liquide ultra haute performance couplé à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière.

UHPLC-ESI-MS: Chromatographie liquide haute performance couplé à un spectromètre de masse à source électrospray.

UV : Ultra-violet.

$V_0$  : Volume d'un groupement méthylène estimé à 0.168.

$V_a$  : quantité de solvant adsorbée par gramme de silice.

$X_d$  : Modélise l'interaction du solvant avec un soluté basique (Dioxane).

$X_e$  : Modélise l'interaction du solvant avec un soluté acide (Ethanol).

$X_n$  : Modélise l'interaction du solvant avec un soluté polaire (Nitrométhane).

$\delta_{di}$  : La somme des énergies de dispersion de London et de Debye.

$\delta_h$  : Les énergies d'interactions de liaison hydrogène.

$\delta_p$  : Les énergies d'interactions dipôle-dipôle.

$\delta_t$  : Paramètre de solubilité total défini par Hansen.

$\Delta H_l^\ominus$  : l'enthalpie molaire de vaporisation.

$\Delta V_n$ : Volume d'un groupement méthylène.

$\alpha_{H_2O}$  : Sélectivité méthylène dans l'eau pure.

$\alpha_s$  : Sélectivité méthylène dans la phase mobile étudiée.

$\beta$  : Activité de la silice.

$\delta$  : Paramètre de solubilité d'Hildebrand.

$\varepsilon^0$  : Energie d'adsorption du solvant par unité de surface de silice.

$\varepsilon^0$  : La force éluante du solvant.

$\varphi$  : Fraction volumique.

$\omega_{1/2}$  : est la largeur à mi-hauteur.

## Liste de figures

### Chapitre I

**Figure 1** : Réaction d'estérification entre le glycérol et les acides gras.

### Chapitre II

**Figure 1** : Représentation tétraédrique de  $\text{SiO}_4$ .

**Figure 2** : Principe du greffage de la silice.

**Figure 3** : Mécanisme de greffage d'un mono et trialkoxysilane à la surface de la silice.

**Figure 4** : Interaction entre un organosilane et une surface de silice.

**Figure 5** : Mécanisme de silylation par ouverture du pont siloxane.

**Figure 6** : Courbe de Van Deemter pour l'acétophénone obtenus sur des colonnes Acquity BEH C18, 1.7 $\mu\text{m}$ , 10cm x 2.1mm ; XBridge C18, 3.5  $\mu\text{m}$ , 15cm x 4.6mm ; XBridge C18, 5 $\mu\text{m}$ , 25cm x 4.6mm.

**Figure 7** : Silice poreuse 0.5 $\mu\text{m}$ .

**Figure 8** : Image de particules mésoporeuse SBA-15.

**Figure 9** : Préparation du matériau EBH.

**Figure 10**: Noyau Halo 5  $\mu\text{m}$ .

**Figure 11**: Représentation graphique des différents types de particules core-shell.

**Figure 12** : Représentation schématique de la formation des particules du noyau de silice par l'approche couche par couche.

### Chapitre III

**Figure 1**: Paramètres de solubilité totaux de Hansen, Hildebrand et Hoy.

**Figure 2 :** Valeurs des forces éluantes pour différentes phases stationnaires.

**Figure 3 :** Triangle de sélectivité de Snyder.

**Figure 4 :** Classifications des valeurs de  $P'$  et  $X_i^0$ .

## Chapitre IV

**Figure 1:** Chaîne UHPLC-DEDL.

**Figure 2 :** Chaîne UHPLC-ESI-MS.

**Figure 3 :** Schéma d'une source ESI-MS.

**Figure 4:** Chaîne GC-MS.

## Chapitre V

**Figure 1 :** Variation de  $\log k$  des TAG saturés en fonction du nombre de carbone pour le mélange binaire MeCN/BuOH à 25°C.

**Figure 2 :** Variation de  $\log k$  des palmitate d'alkyle en fonction du nombre de carbone pour le mélange binaire MeCN/BuOH à 25°C.

**Figure 3:** Variation de la force éluante en fonction du pourcentage du solvant fort calculée à partir des TAG saturés.

**Figure 4 :** Variation de la force éluante en fonction du pourcentage du solvant fort calculée à partir des palmitates d'alkyle saturés.

**Figure 5 :** Comparaison de la variation de force éluante en fonction du pourcentage du solvant fort calculée à partir des palmitates d'alkyle et des TAG saturés.

**Figure 6:** Explication de l'obtention des différentes conditions à l'isoélucance.

**Figure 7:** Facteurs de rétention des TAG pour des différentes phases mobiles isoélucantes.

## Chapitre VI

**Figure 1** : Variation de N en fonction de k pour les 6 colonnes.

## Chapitre VII

**Figure 1** : Détermination de la position de LLLn et LLL.

**Figure 2** : Détermination de la position d'OLnLn et OOO.

**Figure 3** : Détermination de la position d'OLL et OOL.

**Figure 4** : Détermination de la position de PPLn et PPP.

**Figure 5** : Détermination de la position de PPL et PLL.

**Figure 6** : Détermination de la position de POLn.

**Figure 7** : Variation de  $\ln k$  en fonction de NP.

**Figure 8** : Variation de  $\ln k$  en fonction de DBN.

**Figure 9** : Variation de  $\ln k$  en fonction de CN.

**Figure 10** : Détermination du tr d'OPuPu.

**Figure 11** : Détermination du tr de LPuPu et LLPu.

**Figure 12** : Détermination du tr de PPUu.

**Figure 13** : Détermination du tr de SPuPu.

**Figure 14**: Détermination du tr de  $\alpha$ EPuPu.

**Figure 15** : Détermination du tr d'OLPu.

**Figure 16** : Variation de  $\ln k = f(NP)$ .

**Figure 17** : Variation de  $\ln k = f(DBN)$ .

**Figure 18** : Variation de  $\ln k = f(CN)$ .

## Liste des tableaux

### Chapitre I

**Tableau 1:** Noms et abréviations des acides gras saturés et insaturés.

**Tableau 2 :** Nombre de triacylglycérols contenant n acides gras différents.

### Chapitre IV

**Tableau 1 :** Noms et géométrie des colonnes utilisées.

**Tableau 2 :** Solvants utilisés en UHPLC.

**Tableau 3 :** Listes des standards et de leurs formules abrégées.

**Tableau 4 :** Listes des huiles ou graines analysées.

### Chapitre V

**Tableau 1:** Compositions isoéluotropiques correspondant à une force éluante égale à 3.

**Tableau 2 :** Nombre de pics observés dans chacune des huiles dans les 12 conditions isoéluantes.

**Tableau 3 :** Détermination de  $R_s$  et  $r$ .

### Chapitre VI

**Tableau 1 :** Détermination de  $k(SO)$  pour chaque colonne.

**Tableau 2 :** Nombre de pics et temps de rétention du TAG le plus retenu pour les différentes colonnes.

**Tableau 3:** Valeurs de  $r$  pour les meilleurs systèmes chromatographiques.

## Chapitre VII

**Tableau 1** : huile d'*Aleurites fordii*.

**Tableau 2** : huile d'*Aquilegia vulgaris*.

**Tableau 3** : Huile de *Borago officinalis*.

**Tableau 4** : Huile de *Calendula officinalis*.

**Tableau 5** : Huile de *catalpa ovata*.

**Tableau 6** : Huile de *Jacaranda mimosifolia*.

**Tableau 7** : Huile de *Linum*.

**Tableau 8** : Huile de *Pinus koraiensis*.

**Tableau 9** : Huile de *Punica granatum*.

**Tableau 10** : Huile de *Ribes nigrum*.

**Tableau 11** : Identification de l'huile de *Punica granatum* par CPG/SM.

**Tableau 12**: Détermination statistique des TAG probables pour l'huile de *Punica granatum*.

**Tableau 13** : Identification de l'huile *Punica granatum* par UHPLC/MS.

**Tableau 14**: TAG de l'huile de *Linum*.

**Tableau 15** : Détermination de tr théorique de LLLn.

**Tableau 16** : Détermination de tr théorique de LLL.

**Tableau 17** : Détermination de tr théorique d'OOLn et OOO.

**Tableau 18** : Détermination de tr théorique d'OLL et OOL.

**Tableau 19** : Détermination de tr théorique d'OPuPu.

**Tableau 20** : Détermination de tr théorique de LPuPu et LLPu.

**Tableau 21** : Détermination de tr théorique de PPUu.

**Tableau 22** : Détermination de tr théorique de SPuPu.

**Tableau 23** : Détermination de tr théorique d'OLPu.

**Tableau 24** : Identification des TAG présents dans les différentes huiles.

## **Chapitre VIII**

**Tableau 1** : Identification des TAG présents dans l'huile d'olive.

### **Annexe 2**

**Tableau 1** : Détermination des TAG probable dans l'huile d'*Aleurites fordii*.

**Tableau 2** : Détermination des TAG probable dans l'huile d'*Aquilegia vulgaris*.

**Tableau 3** : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Borago officinalis*.

**Tableau 4** : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Calendula officinalis*.

**Tableau 5** : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Catalpa ovata*.

**Tableau 6** : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Jacaranda mimosifolia*.

**Tableau 7** : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Linum*.

**Tableau 8** : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Pinus koraiensis*.

**Tableau 9** : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Punica granatum*.

**Tableau 10** : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Ribes nigrum*.



## Liste des chromatogrammes

### Chapitre V

**Chromatogramme 1** : Huile de Calophyllum, MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 68/32 à 25°C.

**Chromatogramme 2** : Huile de Calophyllum, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

**Chromatogramme 3** : Huile de bois de Chine, MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 68/32 à 25°C.

**Chromatogramme 4** : Huile de bois de Chine, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

**Chromatogramme 5** : Huile de pépins de Cassis, MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 68/32 à 25°C.

**Chromatogramme 6** : Huile de pépins de Cassis, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

**Chromatogramme 7** : Huile de soja, MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 68/32 à 25°C.

**Chromatogramme 8** : Huile de soja, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

**Chromatogramme 9** : Huile de Pistacia Lentiscus, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

**Chromatogramme 10** : Huile d'Olive, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

**Chromatogramme 11** : Huile de Pinus Koraiensis, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

**Chromatogramme 12** : Huile de Grenade, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

**Chromatogramme 13** : Huile de Babassu, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

### Chapitre VI

**Chromatogramme 1** : Huile de Calophyllum, BEH.

**Chromatogramme 2**: Huile de Calophyllum, HSS.

**Chromatogramme 3** : Huile de Calophyllum, ISIS.

**Chromatogramme 4** : Huile de Calophyllum, C18 :2.

**Chromatogramme 5** : Huile de Calophyllum, Kinetex.

**Chromatogramme 6** : Huile de Calophyllum, Halo.

**Chromatogramme 7** : Huile d'olive, BEH.

**Chromatogramme 8** : Huile d'olive, HSS.

**Chromatogramme 9** : Huile d'olive, ISIS.

**Chromatogramme 10** : Huile d'olive, C18 :2.

**Chromatogramme 11** : Huile d'olive, Kinetex.

**Chromatogramme 12** : Huile d'olive, Halo.

**Chromatogramme 13** : Huile de pépins de cassis, BEH.

**Chromatogramme 14** : Huile de pépins de cassis, HSS.

**Chromatogramme 15** : Huile de pépins de cassis, ISIS.

**Chromatogramme 16** : Huile de pépins de cassis, C18 :2.

**Chromatogramme 17** : Huile de pépins de cassis, Kinetex.

**Chromatogramme 18** : Huile de pépins de cassis, Halo.

**Chromatogramme 19** : Huile de Calophyllum, MeCN/BuOH 74/26, BEH.

**Chromatogramme 20** : Huile de Calophyllum, MeCN/BuOH 69/31, HSS.

**Chromatogramme 21** : Huile de Calophyllum, MeCN/BuOH 74/26, ISIS.

**Chromatogramme 22**: Huile d'olive, MeCN/BuOH 74/26, BEH.

**Chromatogramme 23**: Huile d'olive, MeCN/BuOH 69/31, HSS.

**Chromatogramme 24**: Huile de pépins de cassis, MeCN/BuOH 74/26, HSS.

**Chromatogramme 25**: Huile de pépins de cassis, MeCN/BuOH 79/21, HSS.

## Chapitre VII

**Chromatogramme 1** : Analyse de l'huile d'*Aquilegia vulgaris* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 2** : Analyse de l'huile de *Calendula officinalis* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 3** : Analyse de l'huile de *Catalpa ovata* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 4** : Analyse de l'huile de *Jacaranda mimosifolia* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 5**: Analyse de l'huile de *Punica granatum* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 6**: Analyse de l'huile de *Ribes nigrum* UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 7**: Analyse de l'huile de *Borago officinalis* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 8**: Analyse de l'huile d'*Aleurites fordii* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 9**: Analyse de l'huile de *Linum* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 10**: Analyse de l'huile de *Pinus koraiensis* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 11**: Analyse de l'huile de *Glycine max* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 12** : Analyse de l'huile d'*Aleurites fordii* par CPG/SM.

**Chromatogramme 13** : Analyse de l'huile d'*Aquilegia vulgaris* par CPG/SM.

**Chromatogramme 14** : Analyse de l'huile de *Borrago officinalis* par CPG/SM.

**Chromatogramme 15** : Analyse de l'huile de *Calendula officinalis* par CPG/SM.

**Chromatogramme 16** : Analyse de l'huile de *Catalpa ovata* par CPG/SM.

**Chromatogramme 17** : Analyse de l'huile de *Jacaranda mimosifolia* par CPG/SM.

**Chromatogramme 18** : Analyse de l'huile de *Linum* par CPG/SM.

**Chromatogramme 19** : Analyse de l'huile de *Pinus koraiensis* par CPG/SM.

**Chromatogramme 20** : Analyse de l'huile *Punica granatum* par CPG/SM.

**Chromatogramme 21** : Analyse de l'huile de *Ribes nigrum* par CPG/SM.

**Chromatogramme 22**: Analyse de l'huile de *Punica granatum* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 23** : Analyse de l'huile de *linum* par UHPLC/DEDL.

**Chromatogramme 24** : Huile de *punica granatum* identifiée.

**Chromatogramme 25** : Huile d'*aquilegia vulgaris* identifiée.

**Chromatogramme 26** : Huile de *calendula officinalis* identifiée.

**Chromatogramme 27** : Huile de *catalpa ovata* identifiée.

**Chromatogramme 28** : Huile de *jacaranda mimosifolia* identifiée.

**Chromatogramme 29** : Huile de *punica granatum* identifiée.

## Chapitre VIII

**Chromatogramme 1** : Huile d'olive, MeCN/BuOH 74/26, d=0.25ml/min, ACQUITY UPLC BEH C18 (2x50 x 2.1mm, 1.7µm).

**Chromatogramme 2** : Identification des TAG à ECN 42.

**Chromatogramme 3** : Huile d'olive, MeCN/BuOH 74/26, d=0.25ml/min, ACQUITY UPLC BEH C18 (50 x 2.1mm, 1.7µm).

**Chromatogramme 4** : Huile d'olive, MeCN/BuOH 74/26, d=0.6ml/min, ACQUITY UPLC BEH C18 (50 x 2.1mm, 1.7µm).

## Annexe 1

**Chromatogramme 1** : Huile de calophyllum, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Chromatogramme 2** : Huile de calophyllum, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 3** : Huile de calophyllum, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 4** : Huile de calophyllum, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Chromatogramme 5** : Huile de calophyllum, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Chromatogramme 6** : Huile de calophyllum, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

**Chromatogramme 7** : Huile de calophyllum, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

**Chromatogramme 8** : Huile de calophyllum, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

**Chromatogramme 9** : Huile de calophyllum, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

**Chromatogramme 10** : Huile de calophyllum, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

**Chromatogramme 11** : Huile de calophyllum, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

**Chromatogramme 12** : Huile de calophyllum, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

**Chromatogramme 13** : Huile de soja, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Chromatogramme 14** : Huile de soja, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 15** : Huile de soja, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 16** : Huile de soja, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Chromatogramme 17** : Huile de soja, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Chromatogramme 18** : Huile de soja, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

**Chromatogramme 19** : Huile de soja, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

**Chromatogramme 20** : Huile de soja, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

**Chromatogramme 21** : Huile de soja, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

**Chromatogramme 22** : Huile de soja, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

**Chromatogramme 23** : Huile de soja, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

**Chromatogramme 24** : Huile de soja, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

**Chromatogramme 25** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Chromatogramme 26** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 27** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 28** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Chromatogramme 29** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Chromatogramme 30** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

**Chromatogramme 31** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

**Chromatogramme 32** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

**Chromatogramme 33** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

**Chromatogramme 34** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

**Chromatogramme 35** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

**Chromatogramme 36** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

**Chromatogramme 37** : Huile d'olive, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Chromatogramme 38** : Huile d'olive, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 39** : Huile d'olive, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 40** : Huile d'olive, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Chromatogramme 41** : Huile d'olive, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Chromatogramme 42** : Huile d'olive, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

**Chromatogramme 43** : Huile d'olive, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

**Chromatogramme 44** : Huile d'olive, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

**Chromatogramme 45** : Huile d'olive, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

**Chromatogramme 46** : Huile d'olive, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

**Chromatogramme 47** : Huile d'olive, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

**Chromatogramme 48** : Huile d'olive, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

**Chromatogramme 49** : Huile de babassu, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Chromatogramme 50** : Huile de babassu, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 51** : Huile de babassu, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 52** : Huile de babassu, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Chromatogramme 53** : Huile de babassu, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Chromatogramme 54** : Huile de babassu, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

**Chromatogramme 55** : Huile de babassu, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

**Chromatogramme 56** : Huile de babassu, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

**Chromatogramme 57** : Huile de babassu, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

**Chromatogramme 58** : Huile de babassu, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

**Chromatogramme 59** : Huile de babassu, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

**Chromatogramme 60** : Huile de babassu, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

**Chromatogramme 61** : Huile de bois de chine, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Chromatogramme 62** : Huile de bois de chine, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 63** : Huile de bois de chine, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 64** : Huile de bois de chine, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Chromatogramme 65** : Huile de bois de chine, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Chromatogramme 66** : Huile de bois de chine, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

**Chromatogramme 67** : Huile de bois de chine, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

**Chromatogramme 68** : Huile de bois de chine, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

**Chromatogramme 69** : Huile de bois de chine, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

**Chromatogramme 70** : Huile de bois de chine, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

**Chromatogramme 71** : Huile de bois de chine, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

**Chromatogramme 72** : Huile de bois de chine, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

**Chromatogramme 73** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Chromatogramme 74** : Huile de pépins de cassis, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 75** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 76** : Huile de pépins de cassis, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Chromatogramme 77** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Chromatogramme 78** : Huile de pépins de cassis, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

**Chromatogramme 79** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

**Chromatogramme 80** : Huile de pépins de cassis, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

**Chromatogramme 81** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

**Chromatogramme 82** : Huile de pépins de cassis, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

**Chromatogramme 83** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

**Chromatogramme 84** : Huile de pépins de cassis, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

**Chromatogramme 85** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Chromatogramme 86** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 87** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 88** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Chromatogramme 89** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Chromatogramme 90** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

**Chromatogramme 91** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

**Chromatogramme 92** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

**Chromatogramme 93** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

**Chromatogramme 94** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

**Chromatogramme 95** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

**Chromatogramme 96** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

**Chromatogramme 97** : Huile de grenade, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Chromatogramme 98** : Huile de grenade, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.



**Chromatogramme 99** : Huile de grenade, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Chromatogramme 100** : Huile de grenade, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Chromatogramme 101** : Huile de grenade, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Chromatogramme 102** : Huile de grenade, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

**Chromatogramme 103** : Huile de grenade, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

**Chromatogramme 104** : Huile de grenade, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

**Chromatogramme 105** : Huile de grenade, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

**Chromatogramme 106** : Huile de grenade, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

**Chromatogramme 107** : Huile de grenade, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

**Chromatogramme 108** : Huile de grenade, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

# Sommaire

Remerciements .....	3
Liste des abréviations.....	5
Liste des figures .....	10
Liste des tableaux .....	13
Liste des chromatogrammes.....	16
Sommaire .....	25
Introduction générale.....	29
Chapitre I. les triacylglycerols .....	33
I. Introduction.....	34
II. Les triacylglycerols.....	34
II.1. Généralités .....	34
II.2. Méthodes de séparation des TAG .....	41
II.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	41
II.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	42
II.2.3. Chromatographie en phase super critique (SFC) .....	43
II.2.4. Chromatographie en phase liquide.....	44
II.2.5. Chromatographie d'argentation .....	48
III. Conclusion .....	49
IV. Références bibliographiques .....	50
Chapitre II. les phases stationnaires.....	56
I. Introduction.....	57
II. La silice.....	57
II.1. Propriétés des silices.....	57
II.2. Méthode de synthèse de la silice .....	58
II.3. La silice greffée .....	59
II.3.1. Différents types de greffons .....	59
II.3.2. Différents types de greffage .....	60
III. Les phases stationnaires totalement poreuses .....	63

III.1. Les phases stationnaires totalement poreuses en 5 $\mu$ m .....	64
III.2. Les phases stationnaires totalement poreuses en 3 $\mu$ m .....	65
III.3. Les phases stationnaires totalement poreuses sub-2 $\mu$ m .....	65
III.4. Analyse des triacylglycerols par les phases stationnaires totalement poreuses sub-2 $\mu$ m .....	67
IV. Les phases stationnaires à particules superficiellement poreuses .....	68
IV.1. Principe et méthodes de fabrication .....	68
IV.2. Les différents types de Core-shell.....	70
V. Conclusion .....	72
VI. Références bibliographiques .....	73

<b>Chapitre III. Choix de la composition de la phase mobile en HPLC. Echelles de polarité des solvants et force éluante .....</b>	<b>80</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>81</b>
<b>II. Interactions intermoléculaires.....</b>	<b>81</b>
<b>III. Paramètres de solubilité .....</b>	<b>83</b>
<b>III.1. Paramètres de solubilité d'Hildebrand .....</b>	<b>83</b>
<b>III.2. Paramètres de solubilité partiels de Hansen .....</b>	<b>84</b>
<b>III.3. Application du concept de paramètre de solubilité à la chromatographie de Schoenmakers .....</b>	<b>86</b>
<b>III.4. Classement de Snyder.....</b>	<b>86</b>
<b>IV. Echelle de force éluante basée sur la sélectivité méthylène .....</b>	<b>91</b>
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>93</b>
<b>VI. Références bibliographiques .....</b>	<b>95</b>

<b>Chapitre IV. Partie expérimentale .....</b>	<b>98</b>
<b>I. Chromatographie en phase liquide .....</b>	<b>99</b>
<b>I.1. Appareillage.....</b>	<b>99</b>
<b>I.1.1. UHPLC-DEDL .....</b>	<b>99</b>
<b>I.1.2. UHPLC-ESI-MS .....</b>	<b>104</b>
<b>I.2. Solvants .....</b>	<b>107</b>
<b>I.3. Solutés .....</b>	<b>107</b>
<b>I.4. Méthodologie de travail.....</b>	<b>111</b>

<b>II. Chromatographie en phase gazeuse .....</b>	<b>112</b>
<b>II.1. Appareillage .....</b>	<b>112</b>
<b>II.2. Mode opératoire .....</b>	<b>114</b>
<b>III. Références bibliographiques .....</b>	<b>116</b>

**Chapitre V. Etablissement d'échelles de force éluante en mode NARP. Détermination**

<b>des meilleures conditions pour l'analyse des TAG de différentes huiles.....</b>	<b>117</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>118</b>
<b>II. Détermination du diagramme de force éluante .....</b>	<b>119</b>
<b>II.1. Principe.....</b>	<b>119</b>
<b>II.2. Démarche expérimentale .....</b>	<b>121</b>
<b>II.3. Exploitation des résultats.....</b>	<b>122</b>
<b>III. Comparaison des conditions isoéluantes.....</b>	<b>130</b>
<b>III.1. Choix des huiles.....</b>	<b>130</b>
<b>III.2. Choix de la valeur de force éluante de travail.....</b>	<b>131</b>
<b>III.3. Comparaison des chromatogrammes obtenus dans des conditions isoéluantes .....</b>	<b>134</b>
<b>IV. Conclusion.....</b>	<b>144</b>
<b>V. Références bibliographiques.....</b>	<b>146</b>

**Chapitre VI. choix de phases stationnaires pour la séparation des triacylglycérols dans des conditions isoéluantes n'utilisant pas les solvants chlorés.....**

<b>des conditions isoéluantes n'utilisant pas les solvants chlorés.....</b>	<b>148</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>149</b>
<b>II. Choix des conditions opératoires .....</b>	<b>149</b>
<b>II.1. Choix des colonnes.....</b>	<b>149</b>
<b>II.2. Choix des huiles .....</b>	<b>150</b>
<b>III. Détermination de la meilleure colonne .....</b>	<b>151</b>
<b>III.1. Efficacité .....</b>	<b>155</b>
<b>III.2. Rétention.....</b>	<b>156</b>
<b>III.3. Pouvoir de séparation.....</b>	<b>157</b>
<b>IV. Conclusion.....</b>	<b>163</b>

<b>Chapitre VII. Mise au point des conditions analytiques pour la caractérisation d'huiles de graines contenant des acides gras isomères géométriques et de position en C18:2 et C18:3.....</b>	<b>164</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>165</b>
<b>II. Choix des huiles .....</b>	<b>165</b>
<b>III. Séparation par UHPLC/DEDL.....</b>	<b>166</b>
<b>IV. Démarche d'identification des TAG constituant ces huiles.....</b>	<b>168</b>
<b>IV.1. Détermination des Esters Méthyliques obtenus après tranestérification et analyse par CPG/SM.....</b>	<b>172</b>
<b>IV.2. Détermination de l'abondance statistique des TAG .....</b>	<b>185</b>
<b>IV.3. Identification des huiles par UHPLC/MS.....</b>	<b>189</b>
<b>IV.4. Identification des TAG par les règles de Goiffon.....</b>	<b>192</b>
<b>IV.4.1. Utilisation des règles de Goiffon pour l'identification de l'huile de <i>Punica granatum</i> .....</b>	<b>202</b>
<b>IV.4.2. Identification d'autres huiles.....</b>	<b>211</b>
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>216</b>
<b>VI. Références bibliographiques .....</b>	<b>217</b>
<b>Chapitre VIII. Mise au point d'une méthode d'analyse rapide des TAG présents dans l'huile d'olive pour contrôler leur appellation de qualité.....</b>	<b>219</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>220</b>
<b>II. Recherche du système chromatographique à utiliser .....</b>	<b>221</b>
<b>III. Identification des TAG par UHPLC-ESI-MS .....</b>	<b>223</b>
<b>IV. Optimisation du temps d'analyse.....</b>	<b>225</b>
<b>V. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>227</b>
<b>VI. Références bibliographiques .....</b>	<b>228</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>230</b>
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>233</b>
<b>Annexe 2 .....</b>	<b>252</b>

## Introduction générale

Les huiles végétales sont constituées essentiellement de triacylglycérols (TAG) et leurs propriétés sont liées à la nature des acides gras estérifiant le glycérol. La connaissance de leur composition en TAG permet ou a permis le développement de connaissances dans de multiples domaines. Citons par exemple : l'établissement des différentes voies de la biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne par élongation et désaturation des acides linoléique et linoléique pour les différentes familles de végétaux ; les études de leur métabolisation chez les animaux et chez les hommes et leur conséquence sur la nutrition et la santé, en fonction de leur structure ; ou encore leur rôle de marqueur de qualité, largement utilisé dans les industries agroalimentaires pour contrôler la pureté et détecter les adultérations des huiles d'appellation contrôlée.

L'analyse de ces TAG peut être effectuée directement par chromatographie en phase gazeuse capillaire (CGC) suivie d'une détection FID, mais plus généralement couplée à la spectrométrie de masse. Cela nécessite d'utiliser des modes d'injection particuliers évitant les discriminations à l'injection des composés peu volatils mais aussi l'utilisation de phases stationnaires très stables aux hautes températures et du dihydrogène comme gaz vecteur pour accélérer les vitesses d'analyse. Ces raisons font que la CGC, bien que possible pour l'analyse des TAG est comparativement aux autres techniques séparatives moins utilisée. De fait, la chromatographie en phase gazeuse capillaire ne sert, le plus souvent, qu'à déterminer la composition primaire en acide gras des huiles suite à la transésterification des TAG. Pour avoir l'information directe de la composition en TAG, les techniques les plus adaptées sont la chromatographie en phase liquide, en phases sub ou super critique. Comme les TAG sont des composés hydrophobes, leur analyse s'effectue essentiellement par chromatographie à polarité inversée de phases en milieu non aqueux (NARP-LC, NARP-SbFC ou NARP-SFC). Pour une même phase stationnaire, les sélectivités obtenues dans ces trois modes sont différentes et complémentaires. Jusqu'à ce jour, il apparaît que la NARP-LC permet de meilleures séparations pour les TAG polyinsaturés que la NARP-SbFC.

Le choix du système chromatographique à utiliser est primordial.

En ce qui concerne la phase stationnaire, il en existe plus de 900 sur le marché de caractéristiques différentes, telles que la nature chimique et le type du greffage, la nature du matériau sur lequel le greffage est effectué, ainsi que le diamètre et la dispersité des particules. Depuis peu de nouvelles générations de phases stationnaires partiellement ou totalement poreuses à petits diamètres de particules sont venues s'ajouter. Ces caractéristiques permettent d'améliorer l'efficacité d'une manière remarquable. En parallèle, l'adaptation des géométries des particules et des colonnes a permis respectivement un gain de temps et de consommation de solvants.

Une fois la phase stationnaire choisie, il faut choisir une phase mobile, qui, de manière générale pour l'analyse des TAG, est constituée d'un mélange binaire non aqueux (solvant faible et solvant fort). Ce choix va dépendre de la nature des TAG à séparer mais aussi du type de détection utilisé. Classiquement l'emploi de solvants chlorés comme solvant fort conduit aux meilleures sélectivités pour l'analyse des TAG polyinsaturés. Cependant, pour des questions d'environnement il est de moins en moins recommandé de les utiliser et les applications les employant deviennent de plus en plus restreintes. Quelques études ont été menées pour proposer une alternative à leur emploi en utilisant des solvants hydroxylés à très haute température (supérieures à 100°C). Par contre, peu d'études ont investigué le domaine 20-90°C en élargissant le choix de binaires non aqueux possibles. Certaines, prometteuses en terme de sélectivité ont été effectuées à des températures sub-ambiantes mais elles posent le problème de la solubilité des TAG à basse température dont les conséquences sont encore très mal maîtrisées.

Une fois le système chromatographique mis au point (phase stationnaire, phase mobile, température et mode isocratique ou de gradient d'élution fixés), l'identification des espèces séparées est le dernier défi à relever. Classiquement, les TAG ne comportant pas de chromophores UV dans des zones spectrales où la phase mobile n'absorbe pas, leur détection passe par l'utilisation, soit d'un détecteur à indice de réfraction, soit de détecteurs évaporatifs à diffusion de lumière (DEDL) et plus récemment d'un détecteur d'aérosol chargé (Corona CAD). Cependant, aucun de ces détecteurs ne donne d'information structurale sur les composés séparés en chromatographie. L'utilisation des détecteurs de spectrométrie de masse à pression atmosphérique est venue combler ce vide et sont de plus en plus employés pour l'analyse des TAG. Cependant il convient de remarquer que la spectrométrie de masse, aussi performante soit elle pour identifier les structures moléculaires, montre actuellement ses limites dans le cas de la discrimination des TAG isomères géométriques d'insaturations.

Le travail effectué au cours de cette thèse a pour objectif de résoudre ces différents problèmes pour proposer au final :

\* un système permettant la séparation et l'identification de TAG de structures très proches, présents dans différentes huiles très peu étudiées à l'heure actuelle.

\* un système permettant l'analyse quantitative la plus rapide possible des huiles d'olive pour en vérifier sa dénomination par rapport aux normes internationales de qualité.

Dans le premier chapitre de ce travail, bibliographique, nous allons d'une part présenter le bilan des différentes caractéristiques des TAG que l'on peut trouver dans les huiles que nous avons choisi d'analyser, et d'autre part faire une synthèse des méthodes d'analyse chromatographique des TAG, incluant leur détection.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit sera consacré aux différentes phases stationnaires greffées que l'on trouve actuellement sur le marché en se focalisant essentiellement sur les phases stationnaires superficiellement et totalement poreuses de petits diamètres de particules et leurs apports dans le cadre de l'analyse des triacylglycérols.

Dans le troisième chapitre de cette thèse, nous passerons en revue les solvants déjà utilisés pour la séparation des TAG. La manière de choisir le mélange binaire à utiliser sera évoquée. A cet effet, nous présentons les différentes échelles de force éluante décrites dans la littérature en détaillant plus précisément celle basée sur la sélectivité méthylène que nous avons établie puis utilisée dans la suite de ce travail.

Les échantillons, le matériel et les conditions expérimentales choisies pour ce travail constituent le chapitre quatre, partie expérimentale.

Le cinquième chapitre, premier chapitre de nos résultats, décrit la démarche que nous avons utilisée pour établir un diagramme de force éluante en mode NARP-LC. Nous y avons reporté la comparaison du potentiel séparatif observé à l'utilisation de phases mobiles binaires de différentes compositions à différentes températures et proposé des conditions isoéluantes permettant de ne plus utiliser les solvants chlorés comme solvant fort pour la séparation des TAG. Il y est reporté le choix raisonné des meilleures conditions expérimentales à utiliser lors de l'analyse de ces mélanges complexes. Elles se sont avérées tout à fait compétitives, voire meilleures, d'un point de vue séparation que celles préconisées auparavant.



Dans le chapitre suivant, après avoir testé différentes silices greffées de petits diamètres de particules, qu'elles soient superficiellement ou totalement poreuses, nous montrons que le «meilleur» système chromatographique n'est pas le même pour toutes les huiles ; il dépend de la nature des TAG à séparer.

Le chapitre sept fait l'objet de l'analyse de triacylglycérols polyinsaturés, isomères de position sur une même chaîne, présents dans des huiles de graines particulières. Il y est montré que le système chromatographique proposé permet de meilleures séparations que celles décrites actuellement dans la littérature. Nous y montrons les limites de la spectrométrie de masse quant à l'identification structurale précise des TAG isomères. Pour palier à ce défaut nous décrivons la méthodologie qui nous a permis d'identifier les TAG polyinsaturés isomères, en complément des informations données par la spectrométrie de masse, en utilisant les lois de rétention chromatographiques. Ces dernières relient la rétention des TAG à leur structure.

L'huile d'olive étant une ressource importante pour la Tunisie, nous avons orienté la dernière partie de notre travail dans ce domaine. Nous avons mis au point de nouvelles conditions alternatives à celles précédemment optimisées pour leur analyse dans le cadre du contrôle de la certification de qualité de leur appellation d'origine contrôlée. Nous avons proposé des conditions d'analyse très rapide de cette huile, pouvant, avec des études quantitatives supplémentaires en cours de développement, remplacer éventuellement les méthodes certifiées actuellement utilisées pour l'analyse des huiles d'olive en Tunisie.

Le manuscrit s'achève par une conclusion générale faisant une synthèse des différents travaux réalisés et des résultats obtenus.

# Chapitre I: Les triacylglycérols

## I. Introduction

## II. Les triacylglycérols

### II.1. Généralités

### II.2. Méthode de séparation des TAG

#### II.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

#### II.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

#### II.2.3. Chromatographie en phase super critique (SFC)

#### II.2.4. Chromatographie en phase liquide

#### II.2.5. Chromatographie d'argentation

## III. Conclusion

## I. Introduction

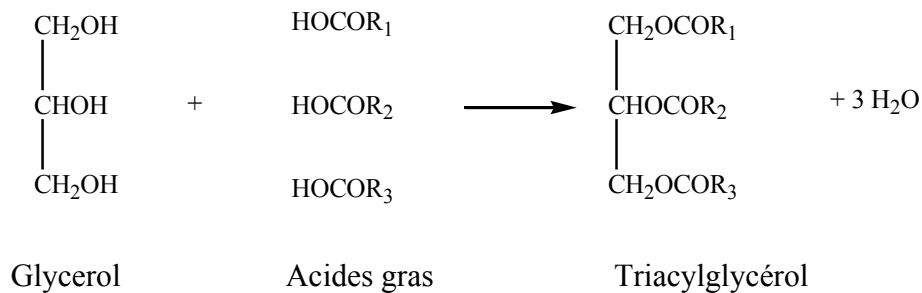
Une huile ou un beurre végétal est constitué majoritairement de triglycérides d'acides gras, accompagnés de substances lipidiques non glycéridiques comme les phytostérols, les alcools terpéniques, les alcools gras, les hydrocarbures saturés ou insaturés et des vitamines.

On peut trouver aussi dans les huiles une quantité de lipides complexes comme les phospholipides et les glycolipides.

## II. Les triacylglycérols

### II.1. Généralités

Les triacylglycérols ou triglycérides (TAG) sont composés d'une molécule de glycérol dont les 3 fonctions alcool sont estérifiées par 3 acides gras semblables ou différents.



**Figure 1:** Réaction d'estérification entre le glycérol et les acides gras.

Les principaux acides gras que l'on peut trouver constituant les TAG sont reportés dans le tableau 1.

**Tableau 1:** Noms et abréviations des acides gras saturés et insaturés [1].

Symbole (nomenclature normalisée)	Symbole (nomenclature oméga)	Structure chimique	Nom systématique de l'acide	Nom commun de l'acide	Abréviation
<b>Acide gras saturés</b>					
C4 :0	C4 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	Butanoïque	Butyrique	Bu
C6 :0	C6 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Hexanoïque	Caproïque	Co
C8 :0	C8 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	Octanoïque	Caprylique	Cy
C10 :0	C10 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	Décanoïque	Caprique	C
C12 :0	C12 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	Dodécanoïque	Laurique	La
C14 :0	C14 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	Tétradécanoïque	Myristique	M
C15 :0	C15 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH	Pentadécanoïque	Pentadecylique	Pt
C16 :0	C16 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	Hexadécanoïque	Palmitique	P
C16 :0 iso	C16 :0iso	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	Méthyl-14- pentadécanoïque	isopalmitique	iP
C17 :0 iso	C17 :0iso	CH <sub>3</sub> CH(CH <sub>3</sub> )(CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH	Méthyl-15- hexadécanoïque	isomargarique	iM
C17 :0 anteiso	C17 :0anteiso	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	Méthyl-14- hexadécanoïque	Anteismargarique	aM
C17 :0	C17 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> COOH	Heptadécanoïque	Margarique	Ma
C18 :0	C18 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	Octadécanoïque	Stéarique	S
C19 :0 cy	C19 :0 cy	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH-CH (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH CH <sub>2</sub>	9-10 methylene octadecanoïque	Dihydrosterculique	Ds
C20 :0	C20 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COOH	Eicosanoïque	Arachidique	A ou Ar
C22 :0	C22 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>20</sub> COOH	Docosanoïque	Béhénique	Be
C24 :0	C24 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> COOH	Tétracosanoïque	Lignocérique	Lg
C26 :0	C26 :0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>24</sub> COOH	Hexacosanoïque	Cérotique	Ce
<b>Acides gras monoinsaturés</b>					
C12 :1 (9c)	C12 :1 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	cis-9-dodécanoïque	laurooléique	Lo

C14 :1 (9c)	C14 :1 ω-5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	cis-9-tétradécénoïque	myristoléique	Mo
C16 :1 (5c)	C16 :1 ω-11	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	cis-5-hexadécénoïque	Kochique	Pp
C16 :1 (9c)	C16 :1 ω-7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	cis-9-héxadécénoïque	Palmitoléique	Po
C17 :1 (9c)	C17 :1 ω-8	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	cis-9-heptadécénoïque	Margaroléique	Mo
C18 :1 (6c)	C18 :1 ω-12	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	trans-6-octadécénoïque	Petroselinique	Pe
C18 :1 (6t)	C18 :1 ω-12	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	trans-6-octadécénoïque	Pétrosélaidique	Pl
C18 :1 (9c)	C18 :1 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	cis-9-octadécénoïque	Oléique	O
C18 :1 (9t)	C18 :1 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	trans-9-octadécénoïque	Elaidique	E
C18 :1 (11c)	C18 :1 ω-7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	cis-11-octadécénoïque	Asclépique ou cis Vaccénique	As
C18 :1 (11t)	C18 :1 ω-7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	trans-11-octadécénoïque	Vaccénique	V
C19 :1 (cy-9)	C19 :1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> C=CH (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH CH <sub>2</sub>	9-10 methylene octadécénoïque	Sterculique	St
C20 :1 (5c)	C20 :1 ω-15	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH	cis-5-eicosénoïque	Limnanthique	Li
C20 :1 (9c)	C20 :1 ω-11	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	cis-9-eicosénoïque	Gadoléique	Ga
C20 :1 (11c)	C20 :1 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	cis-11-eicosénoïque	Gondoïque	Go
C22 :1 (11c)	C22 :1 ω-11	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	cis-11-docosénoïque	Cétoléique	Cq
C22 :1 (13c)	C22 :1 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOH	cis-13-docosénoïque	Erucique	Er
C22 :1 (13t)	C22 :1 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOH	trans-13-docosénoïque	Brassidique	Br
C24 :1 (15c)	C24 :1 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH	cis-15-tétracosénoïque	Nervonique	N
<b>Acides gras polyinsaturés</b>					
C18 :2 (5c,9c)	C18 :2 ω-8	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	cis,cis-5,9-octadécadiénoïque	Taxoleique	Ta
C18 :2 (5c,11c)	C18 :2 ω-8	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	cis,cis-5,11- octadécadiénoïque	Ephedrenique	Ep
C18 :2 (9c,12c)	C18 :2 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	cis,cis-9,12- octadécadiénoïque	Linoléique	L
C18 :2 (9t,12t)	C18 :2 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	trans,trans-9,12- octadécadiénoïque	Linoelaidique	Le

C18 :2 (9c,11t)	C18 :2 ω-7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CHCH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	cis,trans-9,11-octadécadiénoïque	Ruménique	Ru
C18 :2 (9t,11t)	C18 :2 ω-7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CHCH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	trans,trans-9,11-octadécadiénoïque	Linoléique conjugué trans trans: CLAtt	Lt
C18 :2 (9c,11c)	C18 :2 ω-7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CHCH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	cis,cis-9,11-octadécadiénoïque	Linoléique conjugué cis cis:CLAcc	Lc
C18 :2 (9c,13t)	C18 :2 ω-5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CHCH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	cis,trans-9,13-octadécadiénoïque	Aquilegique	Aq
C18 :2 (10t,12c)	C18 :2 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	trans,cis-10,12-octadécadiénoïque	Homorumenique	Hr
C18 :3 (3t,9c,12c)	C18 :3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CH-CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH-CH <sub>2</sub> COOH	trans,cis,cis-3,9,12 octadécatriénoïque	Caleique	Cl
C18 :3 (5c,9c,12c)	C18 :3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH=CH-CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	cis,cis,cis-5,9,12-octadécatriénoïque	Pinolenique	Pi
C18 :3 (5t,9c,12c)	C18 :3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH=CH-CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Trans,cis,cis-5,9,12-octadécatriénoïque	Columbinique	Cb
C18 :3 (6c,9c,12c)	C18 :3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	cis,cis,cis-6,9,12-octadécatriénoïque	γ-linoléique	γLn
C18 :3 (8c, 10t,12c)	C18 :3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	Cis,trans,cis-8,10,12-octadécatriénoïque	Jacarique	Ja
C18 :3 (8t, 10t,12c)	C18 :3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	Trans,trans,cis-8,10,12-octadécatriénoïque	Calendique	Cd
C18 :3 (8t, 10t,12t)	C18 :3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	Trans,trans,trans-8,10,12-octadécatriénoïque	β Calendique	βCd

C18 :3 (9c,11t,13t)	C18 :3 ω-5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	Cis,trans,trans-9,11,13-octadécatriénoïque	α-éléostéarique	αE
C18 :3 (9t,11t,13t)	C18 :3 ω-5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	Trans,trans,trans-9,11,13-octadécatriénoïque	β-éléostéarique	βE
C18 :3 (9c,11t,13c)	C18 :3 ω-5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	Cis,trans,cis-9,11,13-octadécatriénoïque	Punicique	Pu
C18 :3 (9t, 11t,13c)	C18 :3 ω-5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	Trans,trans,cis-9,11,13-octadécatriénoïque	Catalpique	Ct
C18 :3 (9c,12c,15c)	C18 :3 ω-3	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	cis,cis,cis-9,12,15-octadécatriénoïque	Linolénique ou α-linolénique	Ln ou αLn
C18 :4 (5c,9c,12c,15c)	C18 :3 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CH-CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cis,cis,cis,cis-5,9,12,15-octadécatétraénoïque	Pinolenidonique	Po
C18 :4 (6c,9c,12c,15c)	C18 :3 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CH-CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cis,cis,cis,cis-6,9,12,15-octadécatétraénoïque	Stearidonique	So
C20 :2 (5c,11c)	C20 :2 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cis,cis-5,11 eicosadiénoïque	Keteeleronique	Ke
C20 :2 (11c,14c)	C20 :2 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	Cis,cis,-11,14 eicosadiénoïque	HomoAsclepique	Dh ou Ha
C20 :3 (5c,11c,14c)	C20 :3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cis,cis,cis-5,11,14 eicosatriénoïque	Sciadopinolenique	Sc
C20 :3 (7c,11c,14c)	C20 :3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> COOH	Cis,cis,cis-7,11,14 eicosatriénoïque	Bis HomoPinolenique	Hp
C20 :3 (8c,11c,14c)	C20 :3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	Cis,cis,cis-8,11,14 eicosatriénoïque	Homo γ Linolenique	Hy
C20 :4 (5c,8c,11c,14c)	C20 :4 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-eicosatétraénoïque	Arachidonique	Ao
C20 :4 (5c,9c,12c,15c)	C20 :4 ω-5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cis,cis,cis,cis-5,9,12,15-eicosatétraénoïque	Coniferonique	Cn

C20 :4 (5c,11c,14c,17c)	C20 :4 ω-3	CH <sub>3</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cis,cis,cis,cis-5,11,14,17-eicosatétraénoïque	Juniperonique	J
C20 :5 (5c,8c,11c,14c,17c)	C20 :5 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cis,cis,cis,cis,cis-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque	EPA	EP
C22 :5 (4c,7c,10c,13c,16c)	C22 :5 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CH-CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> COOH	Cis,cis,cis,cis,cis-4,7,10,13,16-docosapentaénoïque	DPA	DP
C22 :5 (4c,8c,12c,15c,19c)	C22 :5 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> (CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cis,cis,cis,cis,cis-4,8,12,15,19-docosapentaénoïque	Cuplanodonique	Cu
C22 :6 (4c,7c,10c,13c,16c,19c)	C22 :6 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CH-CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>2</sub> COOH	Cis,cis,cis,cis,cis,cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque	DHA	DH



Les TAG homogènes contiennent un seul type d'acide gras ( $R_1=R_2=R_3$ ). Les TAG mixtes, contiennent deux ou trois résidus d'acides gras différents ( $R_1\neq R_2\neq R_3$ ) et sont nommés en fonction de la position de ces derniers sur le résidu glycérol.

Si un ou plusieurs des groupements alkyles ( $R_1, R_2, R_3$ ) présentent une insaturation, on parle alors de TAG insaturés. En revanche, si aucun groupement alkyle ne présente une insaturation, on parle de TAG saturés [2].

La composition des huiles en TAG est un marqueur de qualité largement utilisé dans l'industrie pour contrôler la pureté de l'huile [3].

En effet, les propriétés des TAG sont liées à la nature des acides gras estérifiant le glycérol. La diversité des TAG est dépendante de :

- La nature des acides gras et leurs positionnements.
- Leur degré d'insaturation (saturés, mono-, di ou tri-insaturés, acétylénique...), de la configuration et de la position de la ou des doubles liaisons (cis ou trans, conjuguées, séparées par un ou plusieurs groupements méthylène).
- La longueur de la chaîne carbonée.
- Et de manière plus rare, de la présence et de la position de groupement fonctionnel (alcool, époxyde, carbonyle...) ou de cycles hydrocarbonés (cyclopropyl cyclopropènyl, cyclopentyl, cyclopentényl)

C'est ainsi qu'on assiste à une grande diversité de TAG isomères, tels que les isomères de constitution, les isomères de position, isomères géométriques et les isomères optiques.

Le tableau 2 met en évidence le nombre d'isomères possibles de TAG d'une huile renfermant n acides gras. Il donne le nombre maximum d'isomères obtenus par calcul à partir de leur abondance en acides gras.

**Tableau 2 :** Nombre de triacylglycérols contenant n acides gras différents.

<b>Nombre de triacylglycérols</b>			
<b>Nombre d'acides gras</b>	<b>Sans distinction des isomères de position</b>	<b>Sans distinction des isomères optiques</b>	<b>En tenant compte de tous les isomères</b>
<b>n</b>	<b><math>(n^3+3n^2+2n)/6</math></b>	<b><math>(n^3+n^2)/2</math></b>	<b><math>n^3</math></b>
<b>1</b>	1	1	1
<b>2</b>	4	6	8
<b>3</b>	10	18	27
<b>4</b>	20	40	64
<b>5</b>	35	75	125
<b>10</b>	220	550	1000

Vu le nombre important de TAG, il existe une difficulté pour les analyser. Le développement de méthodes d'analyses des TAG a attiré beaucoup d'attention au cours de ces dernières décennies. Il existe différentes méthodes décrites dans la littérature.

## **II.2. Méthodes de séparation des TAG**

Différentes techniques ont été utilisées pour l'analyse des TAG telles que :

- ❖ L'analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)
- ❖ L'analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)
- ❖ L'analyse par Chromatographie en phase Super Critique (SFC)
- ❖ L'analyse par Chromatographie en phase Liquide (LC)
- ❖ L'analyse par Chromatographie d'argentation

### **II.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

#### ❖ **Analyse directe des TAG par CPG:**

L'analyse directe des TAG en CPG peut se faire avec des colonnes capillaires revêtues de polysiloxane polaire contenant un pourcentage important de groupements phényle (50-65%) à une température élevée (370-400°C). Ces colonnes polaires thermo-résistantes ont été un outil puissant en combinaison avec la CPG à haute température pour résoudre le problème de séparation des TAG en fonction du degré d'insaturation et de nombre de carbone (NC) [4-5].

Un grand nombre de détecteurs a été couplé avec la CPG. La spectrométrie de masse est devenue un outil précieux pour l'identification des TAG. La GC-MS en mode ionisation par impact électronique (EI) est la combinaison la plus utilisée pour l'identification des TAG.

En revanche, pour l'analyse des TAG fortement insaturés tel que les huiles de poissons, la GC-MS ne peut pas être recommandée due à la dégradation thermique et la polymérisation des molécules à haute température [6].

#### ❖ Analyse indirecte des TAG par CPG :

L'approche indirecte par trans estérification (en général par trans méthylation) est la plus commune pour l'analyse des TAG à partir des acides gras correspondant.

Les procédés utilisés pour l'analyse indirecte des TAG sont basés sur l'analyse des esters méthyliques correspondant obtenus par saponification des glycérides et l'isolation des acides gras.

Le choix des procédés pour l'obtention des esters méthyliques est basé sur la nature des acides gras formant les TAG [7].

Les analyses sont effectuées en utilisant des colonnes capillaires en verre ou en gel de silice fondue, de diamètre interne entre 0.2-0.8 mm, de longueur de colonne 25 à 100 m et la phase stationnaire est à base de polyéthylène type glycol [8].

### **II.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

#### ❖ CCM par argentation :

Cette méthode a été développée en 1962. Elle est basée sur la capacité des liaisons oléfiniques à former un complexe  $\pi$  avec les ions argent, ce qui permet la séparation des substances avec différents degrés d'insaturations. La couche mince est formée de gel de silice contenant de 5 à 25% de nitrate d'argent. La solution de glycéride est déposée sur la plaque en utilisant l'éther ou un mélange benzène-chloroforme-méthanol comme éluant.

Dans ces conditions, les TAG saturés migrent en premier suivis des TAG par ordre d'insaturation croissant [9].

Après séparation, les TAG peuvent être révélés par Ultra-Violet (UV) et peuvent être récupérés quantitativement par élution des bandes respectives [9].

### II.2.3. Chromatographie en phase super critique (SFC)

L'analyse par chromatographie en phase super critique nécessite l'utilisation d'un fluide ou mélange de fluides portés au-delà du point critique.

La SFC possède des caractéristiques propres liées aux propriétés des fluides utilisés.

L'état supercritique est atteint à une pression et une température données, appelées valeurs critiques. Par exemple, ces valeurs sont de 7,3 MPa et 31°C pour le dioxyde de carbone pur, qui est le fluide le plus utilisé en SFC, en raison de sa nature non-toxique, sa nature chimique non agressive et de son faible coût par rapport à la plupart des solvants organiques [10].

L'état supercritique nécessite le maintien de la sortie de la colonne à une pression supérieure à celle critique, qui est obtenue par un régulateur de contre-pression située après la colonne. Ce régulateur de contre-pression peut être un simple tube capillaire (régulateur de contre-pression passif) ou d'un appareil permettant la modification de ce paramètre [11].

L'utilisation de CO<sub>2</sub> à l'état gazeux à la place de solvants non polaires est devenue très populaire parce que l'état gazeux du dioxyde de carbone, permet par la suite la collecte de fractions concentrées sans utilisation d'énergie supplémentaire pour éliminer le solvant [10-11].

D'autre part, le caractère non polaire du dioxyde de carbone favorise la solubilité de composés hydrophobes dans la phase mobile.

Pour ces composés, la SFC peut remplacer la chromatographie liquide à polarité inversée de phases (RPLC), en utilisant des phases stationnaires alkyle [11].

Des modificateurs sont classiquement ajoutés au CO<sub>2</sub> pour favoriser la solubilité du composé et pour induire des changements de sélectivité en raison de leurs interactions spécifiques supplémentaires telles que des liaisons hydrogène ou dipôle-dipôle tel que (méthanol, éthanol, isopropanol). A faible pourcentage (2%) cela permet également le masquage de certains sites d'adsorption hautement polaires sur la phase stationnaire. D'autre part, cet ajout induit également une grande adsorption du solvant sur la phase stationnaire, entraînant des changements de polarité importants de cette phase. Ce phénomène d'adsorption agit sur les performances de rétention et de séparation, probablement dans une plus large mesure que ce qu'elle pourrait faire en HPLC.

Les valeurs critiques varient selon la composition de la phase mobile, donc en fonction de la proportion et la nature de l'agent modificateur ajouté au dioxyde de carbone [MeOH, MeCN, EtOH, hexane]. Elles augmentent généralement lors de l'ajout des modificateurs et devraient être adaptées à maintenir la miscibilité entre le dioxyde de carbone et l'agent modificateur, afin d'éviter une séparation de phases (la séparation du fluide supercritique en deux phases, l'une de dioxyde de carbone gazeux et une de modificateur liquide).

Pour éviter ces inconvénients, une température inférieure à celle critique peut être utilisée. L'état fluide est alors appelé sub-critique. En outre, dans cet état sub-critique la compressibilité du fluide est réduite, limitant ainsi la variation de densité de fluide entre l'entrée et la sortie de la colonne, en raison de la chute de pression [11].

Cette chromatographie est très compétitive avec la chromatographie en phase liquide dont nous développons le potentiel dans la partie suivante de ce chapitre. La séparation des TAG principalement saturés ou de faible nombre d'insaturations est meilleure en SFC qu'en HPLC. Par contre il s'avère que les performances de la HPLC sont meilleures que celles de la SFC pour la séparation des TAG polyinsaturés.

#### **II.2.4. Chromatographie en phase liquide**

L'analyse des TAG en chromatographie en phase liquide se fait principalement en Chromatographie Liquide à Polarité de Phases Inversée (CLPI). Comme les TAG sont hydrophobes, toutes les analyses se font en milieu non aqueux (NARP: Non Aqueous Reversed Phase).

Pour séparer les TAG en NARP, plusieurs phases stationnaires ont été utilisées.

Des silices greffées par des chaînes  $C_{18}$  avec des diamètres de particules 5  $\mu\text{m}$  ont été largement utilisées pour séparer les TAG [12-13]. Les silices  $C_{18}$  monofonctionnelles hautement greffées ou greffées polyfonctionnelles (plus couramment respectivement appelées monomériques à haute densité de greffage, ou polymériques) sont celles qui assurent la meilleure séparation des TAG isomères. Il semblerait que les silanols résiduels jouent aussi un rôle dans ces séparations.

Des colonnes de type  $C_{18}$  de longueur 15 à 30 cm et ayant un diamètre interne 4-5 mm ont été connectées en série afin d'améliorer la séparation des TAG. L'augmentation de la longueur de colonne est limitée par la pression en tête de colonne et des temps d'analyses plus longs [14].

Bien que de bonnes séparations aient été obtenues en utilisant des particules de diamètres 5  $\mu\text{m}$ , l'utilisation de phases stationnaires de diamètre des particules de 4 ou 3  $\mu\text{m}$  voire moins de 2  $\mu\text{m}$  a amélioré l'efficacité chromatographique [15,16]. Au cours des 10 dernières années, un grand nombre de phases stationnaires de particules sub-2  $\mu\text{m}$  a été commercialisé et mis en œuvre pour la séparation des TAG [17,18].

Ces améliorations technologiques substantielles telles que l'apparition de ces supports innovants et une instrumentation de pointe, ont servi à la chromatographie en phase liquide haute performance classique pour l'améliorer, ce qui a permis d'avoir des analyses plus rapides et des gains d'efficacité [19,20].

L'apparition récente de phases stationnaires pelliculaires (SPP: Superficial Porous Particules) a permis de franchir une nouvelle étape en améliorant la performance de la séparation des paires critiques de TAG en un temps d'analyse court [18, 21-23].

Une fois la phase stationnaire choisie, la composition de la phase mobile est un facteur important pour l'amélioration des séparations en NARP-LC. Le choix du modificateur organique et de sa composition (mélange binaire ou ternaire de modificateurs) dépend de la nature des TAG à séparer et du système de détection utilisé.

La plupart des études a été réalisée en utilisant comme solvant organique faible l'acétonitrile et un modificateur organique fort [24]. Bien que plusieurs modificateurs organiques forts aient été utilisés, l'acétone est le plus souvent utilisée en raison de son effet d'amélioration des séparations des TAG par nombre de partition (NP) différent. De ce point de vue, l'acétone est très compétitive tout comme le dichlorométhane; chacun de ces deux modificateurs présentant des avantages pour la séparation de certaines paires critiques de TAG que l'autre modificateur sépare moins bien. Cependant, ils ne peuvent pas être utilisés avec un détecteur UV en raison de leur forte absorption à des longueurs d'ondes de 200-237 nm. L'hexane, le n-propanol, l'éthanol, le méthyl terbutyl éther et le chloroforme ont aussi été proposés comme modificateurs organiques forts et ont apporté de bonnes séparations des mélanges complexes [25-32]. Enfin il faut citer l'utilisation de propionitrile comme solvant faible à la place de l'acétonitrile qui a conduit de très belles séparations. Son seul inconvénient étant sa toxicité.

La plupart des études en RP-HPLC pour l'analyse des TAG a été effectuée avec des colonnes à température ambiante [25-33]. Des études ont montré qu'en augmentant la température, la résolution et le temps de rétention diminuent en particulier pour le même nombre de partition

[33]. Bien que l'analyse à des températures plus basses que la température ambiante conduise à une meilleure séparation des TAG, le problème de la diminution de solubilité des TAG à basse température reste limitant pour ces études [34,35].

Différents détecteurs sont cités dans les publications.

Le détecteur à indice de réfraction (RI) est un détecteur très utilisé pour l'analyse des mélanges simples de TAG dans des conditions isocratiques d'élution [36]. Il présente certains inconvénients tels qu'une faible réponse différentielle des TAG par rapport aux phases mobiles utilisées et une faible stabilité en raison de sa forte sensibilité au changement de température et de pression; de plus, il n'est pas adapté pour une élution en gradient [36].

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) n'a pas été très utilisé car soumis à des lacunes impliquant une faible sensibilité. Ceci est dû au fait que ce type de détecteur n'est compatible qu'avec de très faibles quantités de phase mobile [37,38].

La détection par infrarouge (IR) a aussi été utilisée pour l'analyse des TAG [39]. L'absorption dans la région UV (200-237 nm) prévoit une détection très sensible des TAG et une bonne stabilité du détecteur qui peut être utilisé en gradient d'élution [24, 25, 27]. Dans ces deux derniers cas il faut que la phase mobile soit compatible avec cette détection c'est-à-dire quelle n'absorbe pas dans la zone où les TAG absorbent. Ceci est loin d'être souvent le cas. Des interfaces avec dépôt de l'éluat sur une couche mince, évaporation de la phase mobile puis analyses spectrales ont été développées mais elles sont très chères et de fait très peu utilisées.

Les détecteurs formant des aérosols tels que le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) [40] et le détecteur d'aérosol chargé (Corona CAD) [41] sont plus intéressants car ce sont des détecteurs pseudo-universels qui peuvent être utilisés en combinaison avec une analyse en gradient. La seule condition de leur emploi est que la phase mobile utilisée soit beaucoup plus volatile que les solutés à analyser. Ce qui est le cas des TAG lourds, mais devient moins vrai pour les TAG légers comme par exemple la triacétine ou la tributyrine. Ceci dit, ces deux détecteurs sont beaucoup plus sensibles que tous les détecteurs précédemment mentionnés.

L'utilisation de la Spectrométrie de Masse (MS) en couplage avec l'HPLC a été beaucoup développée ces dernières années. Bien que ce système de détection et d'identification ait été décrit à la fin des années 1970, son utilisation pour l'analyse des TAG ne s'est répandue qu'au milieu des années 1980 [42].

La combinaison de l'HPLC et de la MS fournit des informations sur la structure des TAG.

Le couplage de la chromatographie liquide haute performance à la spectrométrie de masse en mode ionisation chimique à pression atmosphérique HPLC-APCI-MS a été largement utilisé pour l'analyse des TAG [13,43].

La présence de la molécule protonée  $[M + H]^+$  et les ions fragments caractéristiques  $[M+H-R\text{COOH}]^+$  permet de fournir une identification des TAG correspondants.

Bien que la HPLC-MS offre une sensibilité importante, elle présente certains inconvénients:

- Les ions fragments des TAG varient selon la masse moléculaire, les degrés d'insaturation et la position de l'insaturation, ce qui rend nécessaire l'étalonnage pour une analyse quantitative. Compte tenu de l'indisponibilité de certains standards mixtes en particuliers des standards ayant différents isomères de structures, les facteurs de réponse sont estimés par comparaison avec des spectres de graisses et d'huiles déjà connues [44,45].
- Le couplage HPLC-MS est limitatif pour l'identification des TAG isomères qui ne diffèrent que par la position de la double liaison. L'utilisation de lois de rétention chromatographiques s'avère alors indispensable pour résoudre ce problème [46].

Dans le cas où l'on ne possède pas le couplage avec la SM, l'identification des pics est un défi compliqué à résoudre. En effet, les standards purs sont relativement peu disponibles et de nombreuses paires de TAG ne sont pas résolues surtout dans les milieux complexes [47].

Le paramètre qui explique la séparation des TAG en chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée (RP-HPLC) est le nombre de partition (NP) [48].

Il est déterminé par la formule suivante:

$$NP = NC - 2 * NDL$$

Avec NC : nombre de carbone.

NDL : nombre total de doubles liaisons présentes sur les 3 acides gras.

Plusieurs lois permettent d'identifier les différents TAG présents sur un chromatogramme (règles de Goiffon). La variation de  $\log \alpha = f(NC)$ ,  $\log \alpha = f(NP)$  ou  $\log \alpha = f(NDL)$  permettent d'établir la rétention des TAG mixtes à partir des TAG homogènes [49,50]. Le développement de phases stationnaires de RPLC de plus en plus élaborées et l'optimisation de la composition de la phase mobile et de la température d'analyse ont permis de séparer de plus en plus de TAG de même nombre de partition au cours de ces vingt dernières années.



### **II.2.5. Chromatographie d'argentation**

Malgré son potentiel pour fournir une information sur la structure des TAG, la chromatographie par argentation a été moins utilisée que la RP-HPLC.

C'est une technique qui sépare les TAG selon leur degré d'insaturation et la configuration des doubles liaisons. La base de la séparation des TAG est la capacité des électrons  $\pi$  des doubles liaisons à interagir avec les ions argent pour former un complexe stable. A l'origine deux alternatives ont été mises en œuvre : soit l'ajout en pré-colonne de sels d'Argent dans la phase mobile soit la fixation de sels d'argent sur la phase stationnaire. Très rapidement la première alternative a été mise de côté pour des questions de détection.

Dans la deuxième alternative les ions argent sont déposés sur la phase stationnaire soit par imprégnation du support de gel de silice avec un sel d'argent (généralement le nitrate d'argent) soit en liant, par échange d'ions l'argent sur une phase stationnaire échangeuse de cations. Les colonnes de gel de silice imprégnées de nitrate d'argent ont été les premières à être mises au point pour la séparation des TAG [51,52].

Les colonnes imprégnées d'ions argent nécessitent une préparation minutieuse afin de parvenir à des résultats reproductibles [53]. La principale difficulté avec ce type de colonne est la libération d'ions argent par la phase stationnaire ce qui entraîne une durée de vie courte des colonnes en raison de la formation d'un précipité de nitrate d'argent. Cela entraîne aussi des encrassements des détecteurs évaporatifs et donc leur perte de sensibilité au cours du temps.

La séparation des TAG sur des résines macro-réticulaires nécessite l'utilisation de phases mobiles fortement polaires pour permettre l'élution des composés ayant un grand nombre d'insaturations [54].

### III. Conclusion

La NARP-LC offre un certain nombre d'avantages par rapport à la SFC ou la CPG.

En revanche, l'identification des TAG séparés s'avère une tâche complexe si de nombreux acides gras sont impliqués et qu'ils ne sont différents que par leurs positions sn-stéréoscopique.

La détermination de la fraction triglycéridique comporte encore certaines difficultés, à savoir la séparation et l'identification des TAG isomères de même NC, même NP et même ND.

L'utilisation de solvants chlorés nécessaires pour la séparation de ces TAG pose à terme un problème environnemental et il conviendrait de trouver un solvant fort de substitution plus « vert » qui conserve la sélectivité obtenue avec le dichlorométhane.

#### IV. Références bibliographiques

- [1] C. Cuvelier, J.F. Cabaraux, I. Dufranse, J.L. Hornick, L. Istasse, Acides gras : nomenclature et sources alimentaires, *Ann. Méd. Vét.*, 148 (2004) 133-140.
- [2] B. Nikolova-Damyanova, in: *Advances in Lipid Methodology*, Four, W.W. Christie (Ed.). The Oily Press, Dundee (1997), 193-251.
- [3] E. Christopoulou, M. Lazaraki, M. Komaitis, K. Kaselimis, Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for detection of adulteration of olive oils with vegetable oils, *Food Chemistry*, 84 (2004) 463-474.
- [4] N. R. A. Filho, E. Carrilho, E. M. Langas, Fast quantitative analysis of soybean oil in olive oil by high-temperature capillary gas chromatography, *J. of the American Oil Chemists' Society*, 70 (1993) 1051-1053.
- [5] M.T. Rodriguez-Estrada, N. Frega, E. Lercker, Applications on Thermostable Polar Capillary GC Columns, *Grasas Aceites*, 53 (2002) 76-83.
- [6] C. Ruiz-Samblas, L. Cuadros-Rodriguez, A. González-Casado, F.P. R. García, P. de la Mata-Espinosa, J.M. Bosque-Sendra, Multivariate analysis of HT/GC-(IT)MS chromatographic profiles of triacylglycerol for classification of olive oil varieties, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2093-2103.
- [7] J. Ruiz-Gutierrez, A. Cert, J.J. Rios, Determination of phospholipid fatty acid and triacylglycerol composition of rat caecal mucosa, *J. Chromatogr. B.* 575 (1992) 1-6.
- [8] L. G. Mendoza, J. Gonzalez-Alvarez, C. F. Gonzalo, P. Arias-Abrodo, B. Altava, S. V. Luis, M. I. Burguete, M. D. Gutiérrez-Alvarez, Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters of milk fat by an ionic liquid derived from L-phenylalanine as the stationary phase, *Talanta* 143 (2015) 212-218.
- [9] I. Marekov, R. Tarandjiiska, S. Panayotova, N. Nikolova, Evaluation of argentation TLC-densitometry for the determination of trans fatty acids in butterfat, *J. of planar chromatography*, 14 (2001) 384-390.

- [10] J. W. Lee, T. Uchikata, A. Matsubara, T. Nakamura, E. Fukusaki, T. Bamba, Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry to lipid profiling of soybean, *J. of Bioscience and Bioengineering*, 113 (2012) 262-268.
- [11] E. Lesellier, A. Latos, A. Lopes de Oliveira, Ultra high efficiency/ low pressure supercritical fluid chromatography with superficially porous particles for triglyceride separation, *J. Chromatogr. A*, 1327 (2014) 141-148.
- [12] A. Carelli, A. Cert, Comparative study of the determination of triacylglycerol in vegetable oils using chromatographic techniques, *J. Chromatogr.* 630 (1993) 213-222.
- [13] F. Saliu, F. Modugno, M. Orlandi, M. P. Colombini, HPLC-APCI-MS analysis of triacylglycerols (TAGs) in historical pharmaceutical ointments from the eighteenth century, *Anal. Bioanal Chem.* 401 (2011) 1785-1800.
- [14] A. Stolyhwo, H. Colin, G. Guiochon, Analysis of Triglycerides in Oils and Fats by Liquid Chromatography with the Laser Light Scattering Detector, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 1342-1354.
- [15] V.K.S. Shukla and F. Spener, High-performance liquid chromatography of triglycerides of Flacourtiaceae seed oils containing cyclopentenyl fatty acids (chaulmoogric oils), *J. Chromatogr. A*, 348 (1985) 441-446.
- [16] K. Aitzetmiiller and M. Gronheim, Gradient Elution HPLC of Fats and Oils with Laser Light Scattering Detection, *Fat Sci. Technol.*, 5 (1993) 164-168.
- [17] M. Lisa, M. Holcapek, Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1198 (2008) 115-130.
- [18] J. La Nasa, E. Ghelardi, I. Degano, F. Modugno, M. P. Colombini, Core shell stationary phases for a novel separation of triglycerides in plant oils by high performance liquid chromatography with electrospray-quadrupole-time of flight mass spectrometer, *J. Chromatogr. A*, 1308 (2013) 114-124.

- [19] D. Guillarme, D.T.T. Nguyen, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Recent developments in liquid chromatography—Impact on qualitative and quantitative performance, *J. Chromatogr. A*, 1149 (2007) 20–29.
- [20] L. Novakova, D. Solichova, P. Solich, Advantages of ultra-performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 2433–2443.
- [21] S. Momchilova, K. Tsuji, Y. Itabashi, B. Nikolova-Damyanova, A. Kuksis, Resolution of triacylglycerol positional isomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1033-1036.
- [22] S. Momchilova, Y. Itabashi, B. Nikolova-Damyanova, A. Kuksis, Regioselective separation of isomeric triacylglycerols by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Stationary phase and mobile phase effects, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2578-2583.
- [23] C. Baiocchi, C. Medana, F. Dal Bello, V. Giancotti, R. Aigotti, D. Gastaldi, Analysis of regioisomers of polyunsaturated triacylglycerols in marine matrices by HPLC/HRMS, *Food Chemistry*, 166 (2015) 551-560.
- [24] M.J. Lerma-Garcia, R. Lusardi, E. Chiavaro, L. Cerretani, A. Bendini, G. Ramis-Ramos, E.F. Simo-Alfonso, Use of triacylglycerol profiles established by high performance liquid chromatography with ultraviolet–visible detection to predict the botanical origin of vegetable oils, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 7521-7527.
- [25] L.J.R. Barron, G. Santa-Maria, HPLC Analysis of complex mixtures of triglycerides using gradient elutions and an ultraviolet detector, *Chromatographia*, 28(3/4) (1989) 183-188.
- [26] J.D. Baty, N.W. Rawle, Analysis of triacylglycerols by combined high-performance liquid chromatography and gas—liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 196 (1987) 395-402.
- [27] K. Aitzetmiiller, M. Grönheim, Separation of highly unsaturated triacylglycerols by reversed phase HPLC with short wavelength UV detection, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 15 (1992) 219-226.

- [28] B. Herslöf, A.J.P. Kindmark, HPLC of triglycerides with gradient elution and mass detection, *Lipids*, 20 (1985) 783-789.
- [29] P. Mata-Espinosa, J. M. Bosque-Sendra, L. Cuadros-Rodriguez, Olive oil quantification of edible vegetable oil blends using triacylglycerols chromatographic fingerprints and chemometric tools, *Talanta*, 85 (2011) 177-182.
- [30] S. Héron, A. Tchapla, Choix des phases stationnaires et mobiles pour la séparation en chromatographie en phase liquide de triglycérides de corps gras, *Analisis*, 22 (1994) 114-126.
- [31] S. Héron, A. Tchapla, Utilisation d'un modèle d'interaction moléculaire pour l'optimisation de la séparation des triglycérides de corps gras en CLPI, *OCL 1* (1994) 219-228.
- [32] S. Héron, J. Bleton, A. Tchapla, Mechanism for separation of triacylglycerols in oils by liquid chromatography: identification by mass spectrometry in: J.-L. Sebedio, E.G. Perkins (Eds.), *New trends in lipid and lipoprotein analyses*, AOCS Press, Champaign, Illinois, (1995), 205-231.
- [33] L.J.R. Barron, G. Santa-Mafia, J.C. Diez-Masa, Influence of Bonded-Phase Column Type, Mobile Phase Composition, Temperature and Flow-Rate in the Analysis of Triglycerides by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, 10 (1987) 3193-3212.
- [34] G.W. Jensen, Improved separation of triglycerides at low temperatures by reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 204 (1981) 407-411.
- [35] G. Sempore and J. Bezar, Qualitative and quantitative analysis of peanut oil triacylglycerols by reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 366 (1986) 261-282.
- [36] G.N. Jham, B. Nikolova Damyanova, M. Viera, R. Natalino, A.C. Rodrigues, Determination of the triacylglycerol composition of coffee beans by reverse-phase high performance liquid chromatography, *Phytochem. Anal.* 14 (2003) 310-314.
- [37] H. Veening, P.P.H. Tock, J.C. Kraak, H. Poppe, Microbore high-performance liquid chromatography with a moving-wire flame ionization detector, *J. Chromatogr. A*, 352 (1986) 345-350.

- [38] K.V.V. Nurmela, L.T. Satama, Quantitative analysis of triglycerides by high-performance liquid chromatography using non-linear gradient elution and flame ionization detection, *J. Chromatogr. A*, 435 (1988) 139-148.
- [39] K. Payne-Wahl, G. F. Spencer, R. D. Plattner, R. O. Butterfield, High-performance liquid chromatographic method for quantification of free acids, mono-, di- and triglycerides using an infrared detector, *J. Chromatogr. A*, 209 (1981) 61-66.
- [40] S. Héron, M.G. Maloumbi, M. Dreux, E. Verette, A. Tchaplà, Method development for a quantitative analysis performed without any standard using an evaporative light-scattering detector, *J. Chromatogr. A*, 1161 (2007) 152-156.
- [41] P. de la Mata Espinosa, J.M. Bosque Sendra, L. Cuadros Rodriguez, Quantification of Triacylglycerols in Olive Oils Using HPLC-CAD, *Food Anal. Methods* 4 (2011) 574-581.
- [42] W.C. Byrdwell, E. A. Emken, Analysis of Triglycerides Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, *Lipids* 30 (1995) 173-175.
- [43] M. Holcapek, M. Lisa, P. Jandera, N. Kabatova, Quantitation of triacylglycerols in plant oils using HPLC with APCI-MS, evaporative light-scattering, and UV detection, *J. of Separation Science*, 28 (2005) 1315-1333.
- [44] H. Leskinen, J.P. Suomela, H. Kallio, Quantification of triacylglycerol regioisomers in oils and fat using different mass spectrometric and liquid chromatographic method, *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 21 (2007) 2361-2373.
- [45] F. Saliu, I. Degano, M.P. Colombini, Identification of triacylglycerols in archaeological organic residues by core-shell reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1346 (2014) 78-87.
- [46] A. W. G. Tamba Sompila, M. G. Maloumbi, J. Bleton, A. Tchaplà, S. Héron, Identification des triacylglycérols en HPLC. Comment se passer du couplage HPLC-SM ? Dans quel cas la chromatographie est-elle encore indispensable ?, *OCL*, 21 (2014) A601-A607.

- [47] C. Maniongui, J. Gresti, M. Bugaut, S. Gauthier and J. Bezard, Determination of bovine butterfat triacylglycerols by reversed-phase liquid chromatography and gas chromatography *J. Chromatogr. A*, 543 (1991) 81-103.
- [48] R.D. Plattner, G.F. Spenser, R. Kleiman, Triglyceride separation by reverse phase high performance liquid chromatography, *J. of the American Oil Chemists' Society* 54 (1977) 511-515.
- [49] J. P. Goiffon, C. Reminiac, M. Olle, Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des corps gras. I- Recherche des meilleures conditions opératoires. Cas de l'huile de soja, *Rev. Fr. Corps Gras*, 4 (1981)167-170.
- [50] J. P. Goiffon, C. Reminiac, D. Furon, Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des corps gras. II- Grandeurs de rétention des triglycérides, *Rev. Fr. Corps Gras*, 5 (1981)199-207.
- [51] E.C. Smith, A.D. Jones, E.W. Hammond, Investigation of the use of argentation high-performance liquid chromatography for the analysis of triglycerides, *J. Chromatogr. A*, 188 (1980) 205-212.
- [52] B.S.J. Jeffrey, Silver-complexation liquid chromatography for fast, high-resolution separations of triacylglycerols, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68 (1991) 289-293.
- [53] E.W. Hammond, Chromatographic techniques for lipid analysis, *Trends Anal. Chem.*, 8 (1989) 308-313.
- [54] W.W. Christie, Silver ion and chiral chromatography in the analysis of triacylglycerols *Prog. Lipid Res.*, 13 (1994) 9-1.



## **Chapitre II : Les phases stationnaires**

- I. Introduction**
- II. La silice**
  - II.1. Propriétés des silices**
  - II.2. Méthode de synthèse de la silice**
  - II.3. La silice greffée**
    - II.3.1. Différents types de greffons**
    - II.3.2. Différents types de greffages**
- III. Les phases stationnaires totalement poreuses**
  - III.1. Les phases stationnaires totalement poreuses en 5 $\mu$ m**
  - III.2. Les phases stationnaires totalement poreuses en 3 $\mu$ m**
  - III.3. Les phases stationnaires totalement poreuses en sub-2 $\mu$ m**
  - III.4. Analyse des triacylglycerols par les phases stationnaires totalement poreuses en sub-2 $\mu$ m**
- IV. Les phases stationnaires à particules superficiellement poreuses**
  - IV.1. Principe et méthodes de fabrication**
  - IV.2. Les différents types de Core-shell**
- V. Conclusion**
- VI. Références bibliographiques**

## **I. Introduction**

Il existe sur le marché un grand nombre de phases stationnaires pour la chromatographie en phase liquide. Le matériau de base qui constitue généralement la phase stationnaire est la silice.

Le choix d'une phase stationnaire pour une analyse donnée nécessite la connaissance préalable de la nature du support, de son type de greffage et de ses caractéristiques associées.

Sur le marché, il existe des phases stationnaires ayant différentes caractéristiques (types de greffage, tailles des pores, diamètre de particules...). Ces caractéristiques influencent l'amplitude de séparation que peut procurer une phase stationnaire donnée.

Au cours de cette dernière décennie, un nombre important de phases stationnaires a été commercialisé permettant d'obtenir de meilleures performances cinétiques (par l'augmentation du débit) par rapport à la chromatographie « classique ».

L'introduction sur le marché de nouvelles phases stationnaires superficiellement poreuses ou totalement poreuses avec de petits diamètres de particules a été très prometteuse. En effet, la réduction du diamètre des particules constituant la phase stationnaire a permis d'augmenter l'efficacité d'une manière remarquable. En parallèle, l'adaptation de la géométrie des particules et des colonnes a permis respectivement un gain de temps et de solvant.

Les différents types de greffage des phases stationnaires proposées jusqu'à aujourd'hui ainsi que l'apport des nouvelles phases stationnaires (poreuses et partiellement poreuses) fait l'objet de ce chapitre.

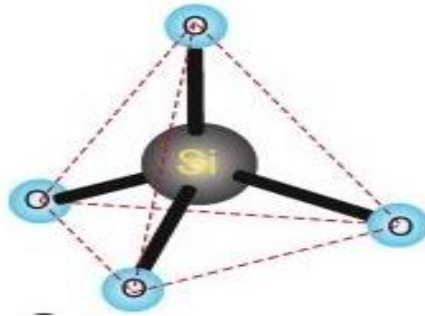
## **II. La silice**

La silice utilisée en chromatographie est une silice amorphe et poreuse. Elle est hydroxylée et hydratée appelée « gel de silice ». Sa formule est  $\text{SiO}_2, x\text{H}_2\text{O}$  [1-2].

### **II.1. Propriétés des silices**

À l'échelle atomique, la silice s'organise suivant un réseau formé de tétraèdres  $\text{SiO}_4$  liés chacun par leurs sommets (figure 1). La surface du gel se compose de deux types de fonctions chimiques : les ponts siloxanes  $\text{Si-O-Si}$  et les groupements silanols  $\text{Si-OH}$ . Les ponts

siloxanes constituent la structure interne du réseau de silice [1-2]. Les silanols constituent une partie de la structure externe de la silice.



**Figure 1:** Représentation tétraédrique de  $\text{SiO}_4$  [3].

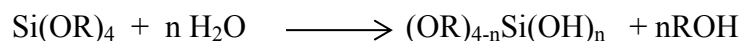
## II.2. Méthode de synthèse de la silice

En chromatographie, les premières silices employées possédaient une forme irrégulière [4]. Ce type de silice s'est avéré limitant en termes de pureté et résistance mécanique.

L'apparition de particules de silice sphérique est due au développement de la technique «sol-gel». La préparation de la silice par sol-gel se fait en 2 étapes [5].

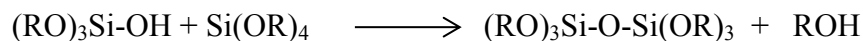
La première étape consiste d'abord à réaliser un sol (suspension colloïdale) par hydrolyse d'alkoxysilanes qui se condensent par la suite et polymérisent en poly-alkoxysiloxanes suivant les étapes :

- **Hydrolyse:**

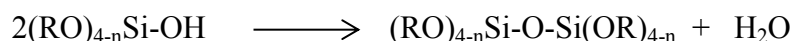


- **Condensation :**

- ❖ Hétérocondensation



- ❖ Homocondensation



L'utilisation de la silice vierge comme support de chromatographie s'avère délicate dues aux équilibres lents d'adsorption peu compatibles avec la réalisation d'un gradient d'élution. Par

ailleurs, compte tenu de l'adsorption par les silanols et siloxanes de surface de quantité différente des traces d'eau présentes en quantité différente d'un solvant organique à un autre, la répétabilité des analyses isocratiques sur de tels supports est pratiquement impossible sauf à utiliser des solvants iso-hydriques ce à quoi pratiquement plus aucun analyste ne fait attention de nos jours.

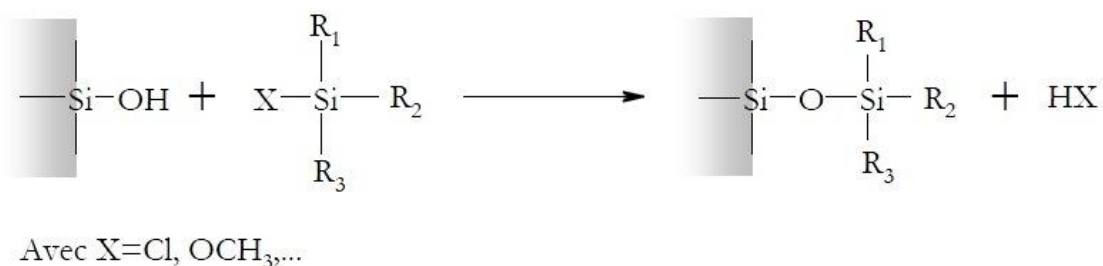
D'un autre point de vue, la présence en surface de 3 types de groupement silanols en abondance différente offre la possibilité de greffage.

## II.3. La silice greffée

### II.3.1. Différents types de greffons

Le greffage consiste à substituer un groupement silanol par un groupement alkyle en général qui procurera à la phase stationnaire un caractère hydrophobe.

Quatre types de liaisons de greffage ont été envisagés : Si-C, Si-O-Si, Si-N et Si-O-C. Celui reposant sur la création de pont siloxane s'avère le plus souvent utilisé. La réalisation de ce pont est obtenue par l'action d'un groupement partant X (Cl, OCH<sub>3</sub>...) d'un silane quadri substitué sur un groupement silanol du gel de silice. Cela est représenté figure 2 :



**Figure 2** : Principe du greffage de la silice.

Il existe différents types de greffons qui diffèrent par la longueur de la chaîne alkyle (ajout de chaîne hydrocarbonée ayant 1 à 34 atomes de carbone) ou par l'ajout d'un groupement fonctionnel (cycle, hétéroatome...) [6-8]. Le greffage de la silice avec une chaîne alkyle de 18 atomes de carbone est le plus couramment utilisé.

L'ajout d'hétéroatomes ou de cycles permet d'engendrer des sélectivités supplémentaires par le développement d'interactions particulières [9].

La présence ou l'absence d'eau au cours de la synthèse, combinée à la fonctionnalité du greffon permet d'obtenir différentes morphologies de greffage : en monocouche, en poly-couches orientées, en poly-couches désorganisées.

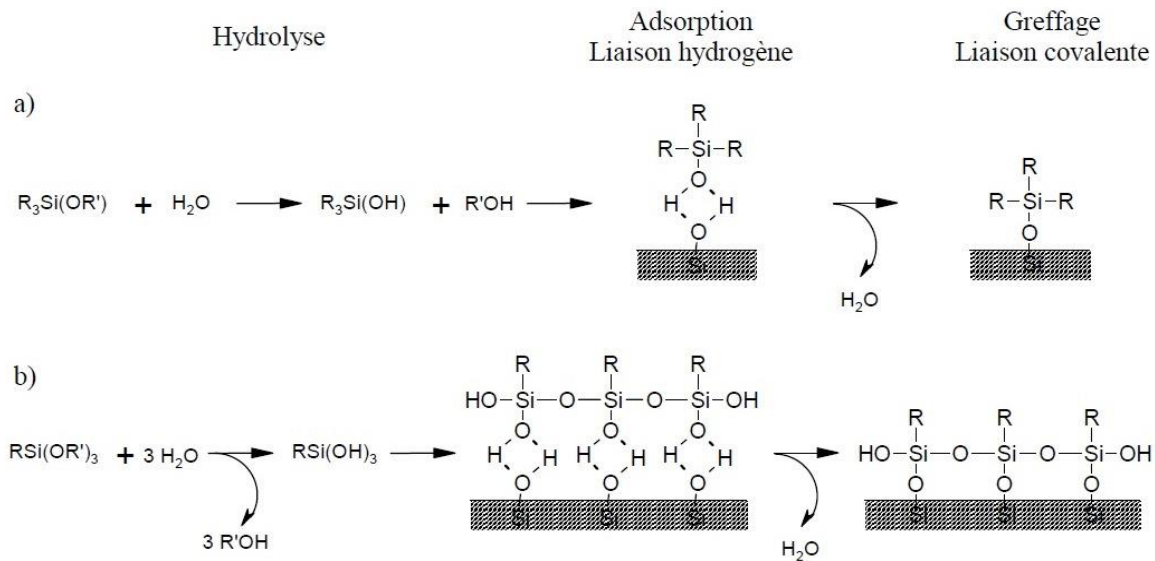
### **II.3.2. Différents types de greffage**

Il existe différentes méthodes pour modifier chimiquement la surface de la silice telle que la réaction entre une molécule organique et les fonctions de surface de silice, la chloration de la surface de silice suivie de la modification de la liaison Si-Cl par un réactif fonctionnel approprié, ou encore l'hydrosilylation suivie du greffage.

Dans la plupart des cas, un recouvrement optimal, c'est-à-dire maximal et homogène, est recherché.

Peu de travaux récents sont consacrés aux mécanismes de greffage proprement dit. Il est généralement admis que le greffage d'une molécule organique sur la silice a lieu via son interaction avec les silanols de surface. Dans certaines études, un mécanisme de fonctionnalisation par ouverture des ponts siloxanes est proposé [10-11].

Le mécanisme de greffage «classique» des sol-gels consiste tout d'abord à hydrolyser des groupements alcoxy du silane. Celui-ci peut alors se condenser sur lui-même et/ou peut simultanément s'adsorber par liaisons hydrogènes sur la surface de la silice. A la fin, il y aura une condensation entre le silane hydroxylé et les groupements silanols de la silice pour former une surface greffée en monocouche plus ou moins dense [12-13].



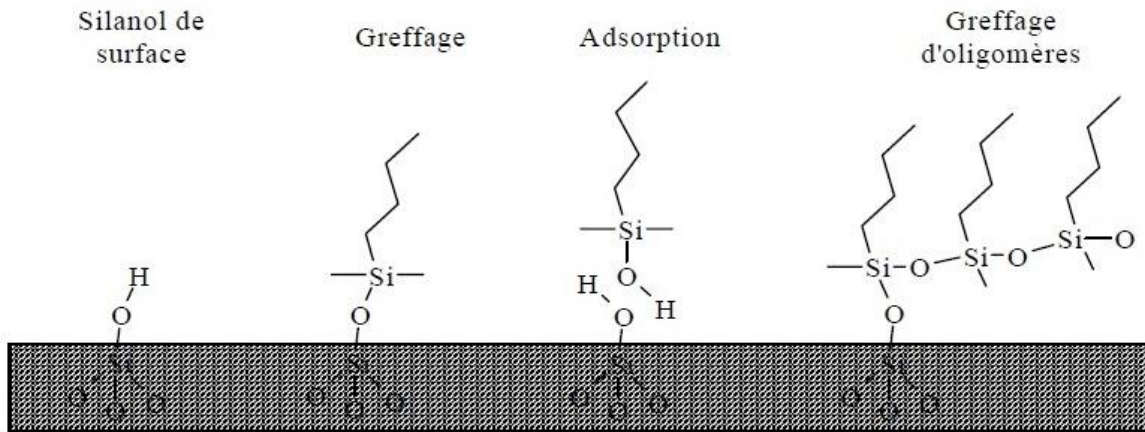
**Figure 3:** Mécanisme de greffage d'un mono (a) et trialkoxysilane (b) à la surface de la silice [13].

Pour les silanes multifonctionnels, les fonctions qui n'ont pas réagi sont généralement hydroxylées par l'eau présente dans le milieu. Ces groupements hydroxyles sont à nouveau susceptibles d'induire des condensations ultérieures. Ainsi, les silanes polyfonctionnels s'accrochent non seulement à la surface, mais peuvent aussi se réticuler. On parle alors de polymérisation «horizontale» par rapport à la surface de la silice (figure 3b) ou de morphologie en monocouche dense.

Ils peuvent aussi conduire à des structures totalement anarchiques de couches tridimensionnelles sur la surface : on parle alors de polymérisation «verticale» [13] ou de morphologie en polycouches désorganisées.

Cependant, lors de la réaction avec des silanes multifonctionnels, un grand nombre d'interactions entre molécules est possible. Les différents techniques de caractérisation ont permis de montrer que les molécules s'adsorbent, se condensent et interagissent avec les silanols de surface de différentes manières [14].

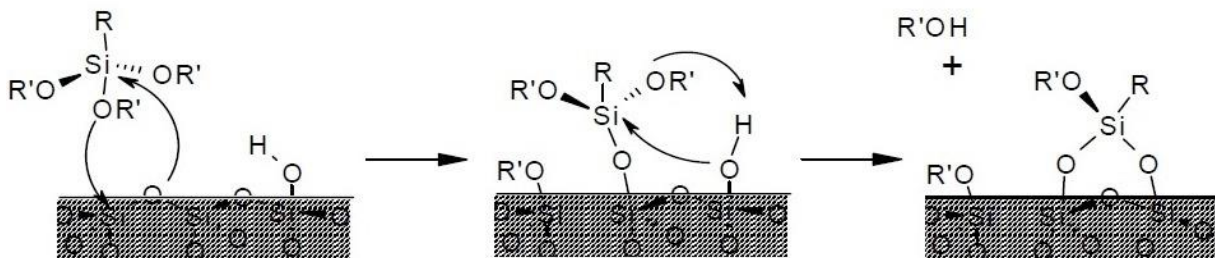
Dans la plupart des cas, la proportion de molécules réellement liées à la surface n'est pas connue et une forte saturation du recouvrement peut être due, soit à l'adsorption compacte d'une monocouche d'organosilane, soit à la polymérisation verticale des molécules (greffage d'oligomères conduisant à des polycouches orientées) (figure 4) [15].



**Figure 4** : Interaction entre un organosilane et une surface de silice [14].

Mécanisme par ouverture de ponts siloxane :

Le mécanisme classique fait intervenir de l'eau qui peut provenir du solvant ou de la couche d'hydratation de la silice. Lorsque la réaction est réalisée en milieu organique totalement anhydre sur une surface parfaitement déshydratée, l'absence d'eau empêche l'hydrolyse du silane. La réaction doit alors se produire directement entre la surface et les groupements réactifs de l'organosilane.



**Figure 5** : Mécanisme de silylation par ouverture du pont siloxane.

Il y aura une ouverture des ponts siloxanes selon le mécanisme représenté par la figure 5. L'ouverture se fait suite à une attaque nucléophile d'un atome d'oxygène du pont siloxane et d'un oxygène du groupe alcoxy du silane. Ce mécanisme a lieu en milieu apolaire et anhydre [11-12].

Le choix du silane qui réagit, la densité du greffage, l'orientation des molécules en surface et l'épaisseur de la couche greffée sont directement liés à la morphologie du dépôt recherché

(polymérisation horizontale, polymérisation verticale, recouvrement dense...) [16-18]. Toutefois, on trouve dans la littérature plusieurs paramètres facilement modifiables (état de surface, polarité du solvant...) qui influencent fortement les réactions de greffages de la silice.

Comme cela a été évoqué dans l'introduction, la porosité des phases ainsi que le diamètre de ces particules sont aussi des paramètres très importants à considérer pour les séparations chromatographiques.

### **III. Les phases stationnaires totalement poreuses**

Les phases stationnaires totalement poreuses (appelées TPP : Totally Porous Particle ou FPP : Fully Porous Particle) existent sur le marché depuis de très nombreuses années [25-31].

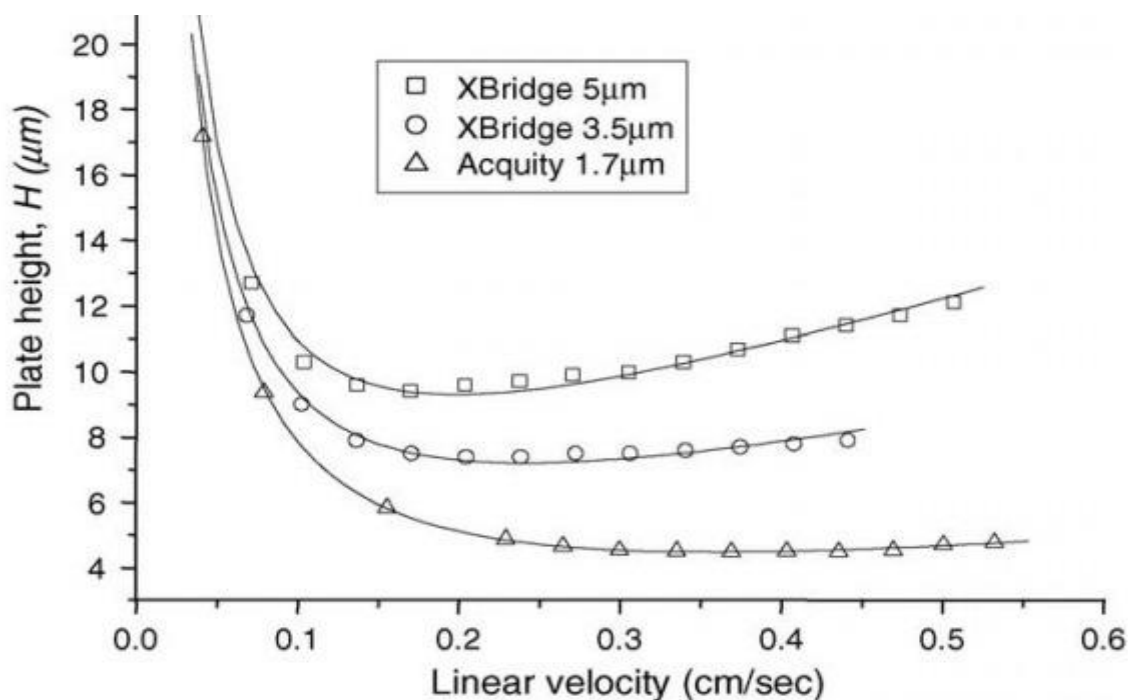
Elles diffèrent par la taille des particules utilisées.

Les phases stationnaires classiques sont constituées de particules de 5 voire 3  $\mu\text{m}$ , mais récemment il y a eu introduction d'une nouvelle génération de particules de diamètres inférieurs à 2  $\mu\text{m}$ , appelées sub 2 $\mu\text{m}$ .

Halász et al. ont été parmi les premiers à démontrer que des séparations chromatographiques rapides pouvaient théoriquement être effectuées en utilisant des petits diamètres de particules [19]. Knox et Giddings ont montré que les petits diamètres de particules induisent une augmentation de l'efficacité et de la vitesse optimale. Par conséquent des séparations efficaces peuvent être réalisées avec réduction du temps d'analyse. Cependant, la diminution de ce temps est limitée par la pression limite acceptable par le système chromatographique [20-24].

Les courbes d'efficacité correspondant à des phases stationnaires de différents diamètres de particules sont données Figure 6.





**Figure 6** : Courbe de Van Deemter pour l'acétophénone obtenus sur des colonnes Acquity BEH C18, 1.7μm, 10cm x 2.1mm ; XBridge C18, 3.5 μm, 15cm x 4.6mm ; XBridge C18, 5μm, 25cm x 4.6mm [37].

### III.1. Les phases stationnaires totalement poreuses en 5μm

L'analyse des triacylglycérols (TAG) utilisant des colonnes remplies de particules de 5 μm a été largement étudiée :

Neff et al. ont analysé l'huile de soja sur un support ODS 5μm en RP-HPLC en utilisant deux détecteurs : un Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière (DEDL) et un Détecteur à Ionisation de Flamme (FID) [38]. Des travaux légèrement antérieurs dressaient l'état des lieux en 1994 [39-40] d'où il ressortait que pour la plupart des huiles et corps gras la phase mobile permettant la séparation la plus performante était un mélange MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 68/32 (%v/%v) percolant à 25°C une colonne de 250x4.6 mm remplie par une silice greffée C18 en monocouche dense (Kromasil 5-C18) ou en polycouches (Brownlee 5 ODS).

Par la suite, Mottram et al. ont étudié la séparation de différents isomères de position des TAG de différentes huiles végétales (soja, graines de pavot, colza, noisettes, mais, olive, onagre, pépins de cassis) en Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse à Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (HPLC-APCI-MS) en utilisant une colonne Supelcosil LC-18 (25cm x 4.6mm, 5μm) [41].

L'analyse des TAG de margarine en RP-HPLC-APCI-MS a été menée avec une colonne ODS (25cm x 4.6mm, 5 $\mu$ m) [42].

D'autres huiles possédant des TAG de structure particulière ont été analysés en utilisant des phases stationnaires de silice greffée C<sub>18</sub> de 5 $\mu$ m tel que : les huiles de graines d'arachide, de *pinus koraiensis*, de *ricinodendron heudelotii*... [43-46].

### **III.2. Les phases stationnaires totalement poreuses en 3 $\mu$ m**

L'introduction sur le marché de supports à base de particules de 3 $\mu$ m a permis d'améliorer les séparations des TAG.

L'analyse de régioisomères de TAG présents dans des matrices marines par HPLC-HRMS en utilisant 2 colonnes Luna C18(2) (Phenomenex) (150mm x 2.1mm, 3 $\mu$ m) a été étudiée par Baiocchi et al. [47].

Plusieurs études ont été développées pour l'analyse des TAG présents dans différentes huiles végétales en HPLC en utilisant une phase stationnaire en 3 $\mu$ m: soja, arachide, pépins de raisin, noisettes, maïs, olive [48].

### **III.3. Les phases stationnaires totalement poreuses sub-2 $\mu$ m**

Le développement des applications chromatographiques en utilisant des phases stationnaires sub-2 $\mu$ m est en plein essor. La réduction de la taille des particules conduit à améliorer l'efficacité et permet l'utilisation de plus petites colonnes pour accélérer l'analyse.

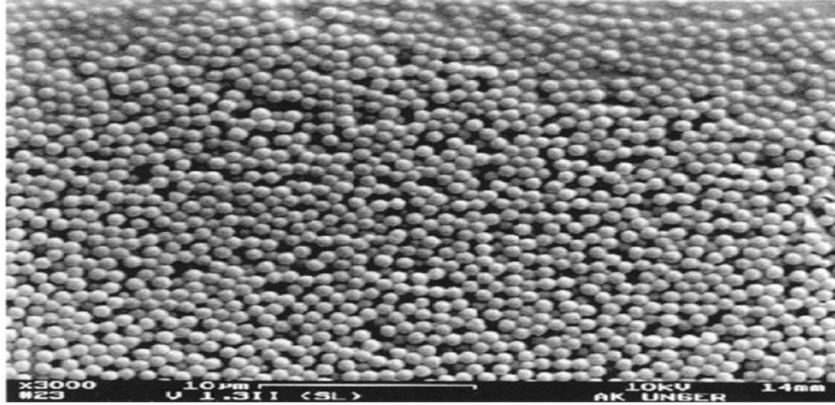
Il existe différents types de matériaux pour les phases stationnaires sub-2 $\mu$ m.

#### **❖ Les phases stationnaires totalement poreuses sub-2 $\mu$ m en matériau MCM**

MCM (Mobile Composite of Matter) est un tamis moléculaire mésoporeux contenant un réseau hexagonal uniforme de pores de diamètres variant de 15 à 100 Å. MCM est un matériau largement utilisé. La synthèse de MCM-41 implique l'utilisation d'une solution de silicate et une longue chaîne n-alkyle de sels d'ammonium à température élevée. Son application en chromatographie liquide est réputée prometteuse en raison de sa grande surface [49]. Cependant, des problèmes ont été rencontrés lors de leur utilisation pour la séparation de

biomolécules. En outre, ce matériau ne pouvait pas résister à des fortes pressions en raison de la faiblesse de sa structure poreuse [49].

Des récentes recherches ont été développées en vue d'améliorer la résistance du matériau en modifiant l'approche synthétique [50-51].

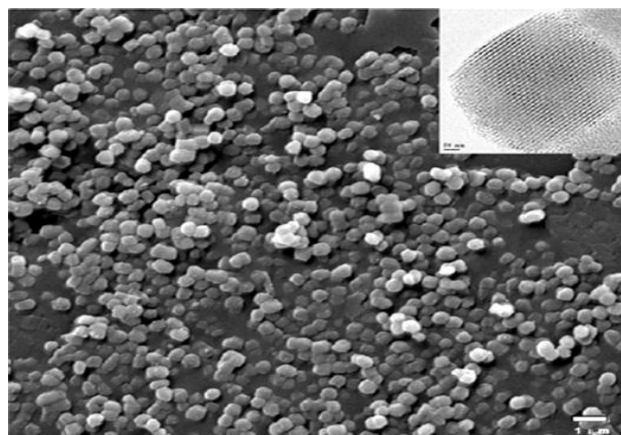


**Figure 7** : Silice poreuse 0.5µm [50].

#### ❖ Les phases stationnaires totalement poreuses sub-2 µm en matériau SBA

Le matériau SBA est une silice mésoporeuse ordonnée possédant une structure bien définie. SBA sub-2 µm est très utilisé en chromatographie en phase liquide à cause de sa plus grande taille de pores. En effet, les pores des pores sont plus épais, donc, plus robustes que les sub-2 µm MCM-41 [52-54].

Les particules de SBA -15 sphériques pourraient atteindre 400 nm et les mésopores 12 nm [54].



**Figure 8** : Image de particules mésoporeuses SBA-15 [54].

### ❖ Les phases stationnaires totalement poreuses sub-2 µm en matériau hybride

Le matériau Ethyl-bridged hybrid (EBH) développé par Waters est préparé par la technologie de particules hybrides (HPT) et par co-condensation du 1,2-bis triéthoxysilyéthane avec le TEOS schématisé par la figure 9 [55].

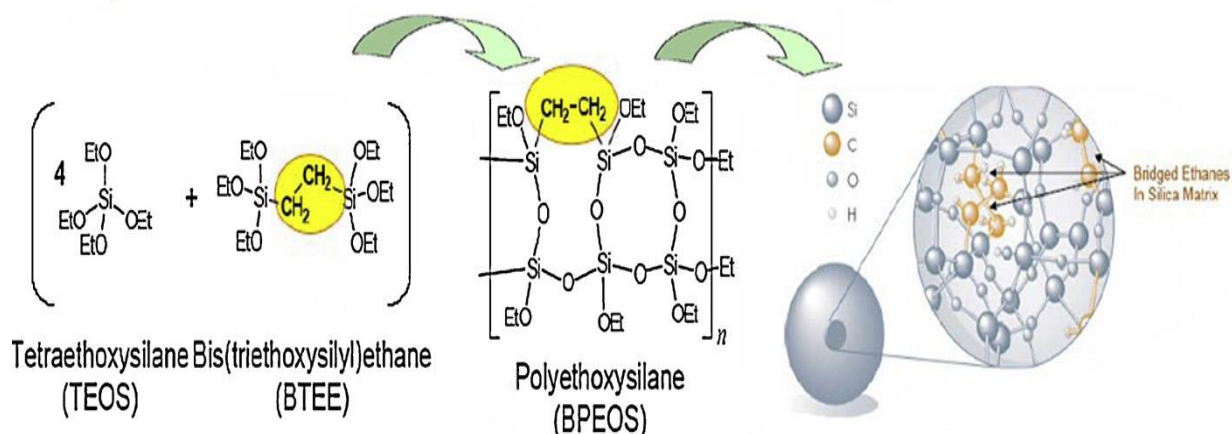


Figure 9 : Préparation du matériau EBH [55].

Ce matériau présente plusieurs avantages tels qu'une excellente résistance mécanique et chimique et une stabilité dans un environnement de pH élevé par rapport aux autres supports à base de silice [56-57].

### III.4. Séparation des triacylglycerols avec les phases stationnaires totalement poreuses sub-2µm

Plusieurs analyses des triacylglycérols (TAG) ont été réalisées en utilisant des phases stationnaires de particules sub-2µm. L'analyse de TAG d'huiles d'autruche a été réalisée en UPLC-DAD avec une colonne ACQUITY BEH C<sub>18</sub> (2.1x 100 x 50mm, 1.7 µm) [58]. D'autres analyses de TAG tel que le lait de vache ont été réalisées en utilisant un support totalement poreux en sub-2µm [59].

#### IV. Les phases stationnaires à particules superficiellement poreuses

##### IV.1. Principe et méthodes de fabrication

Les phases stationnaires pelliculaires encore appelées à particules superficiellement poreuses, sont des phases stationnaires avec un noyau solide et une coquille poreuse aussi connues comme ayant un noyau condensé ou microsphère superficiellement poreuse. Cette coquille poreuse peut être à base du même matériau ou de différents matériaux ayant des structures différentes [60-61].

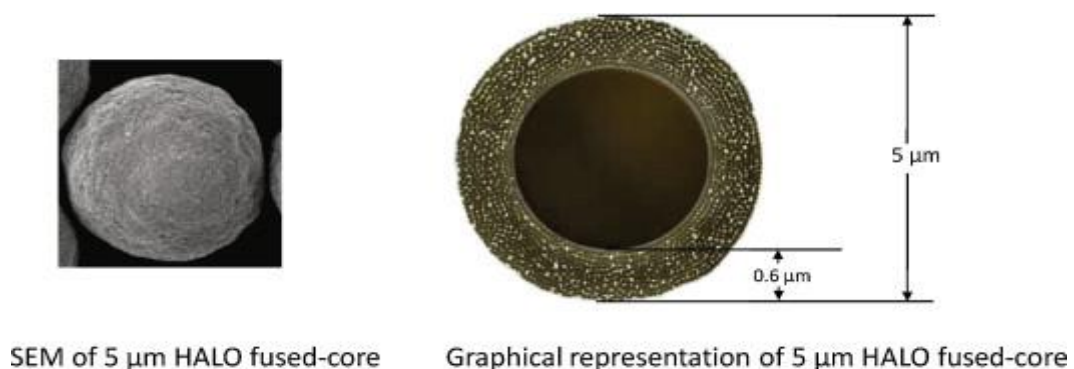
Cette morphologie de particules initialement nommée pelliculaire a été également nommée superficiellement poreuse (superficially porous particles: SPP), à noyau fusionné (fused core particles), particules avec noyau solide (Solid Core Particles: SCP) ou encore core-shell [62].

Le concept a été introduit il y a plus de 40 ans par Horváth et al. [62], la préparation de matériaux avec des particules de taille grande ( $20\mu\text{m}$ ) ayant été décrite à cette époque [63-64].

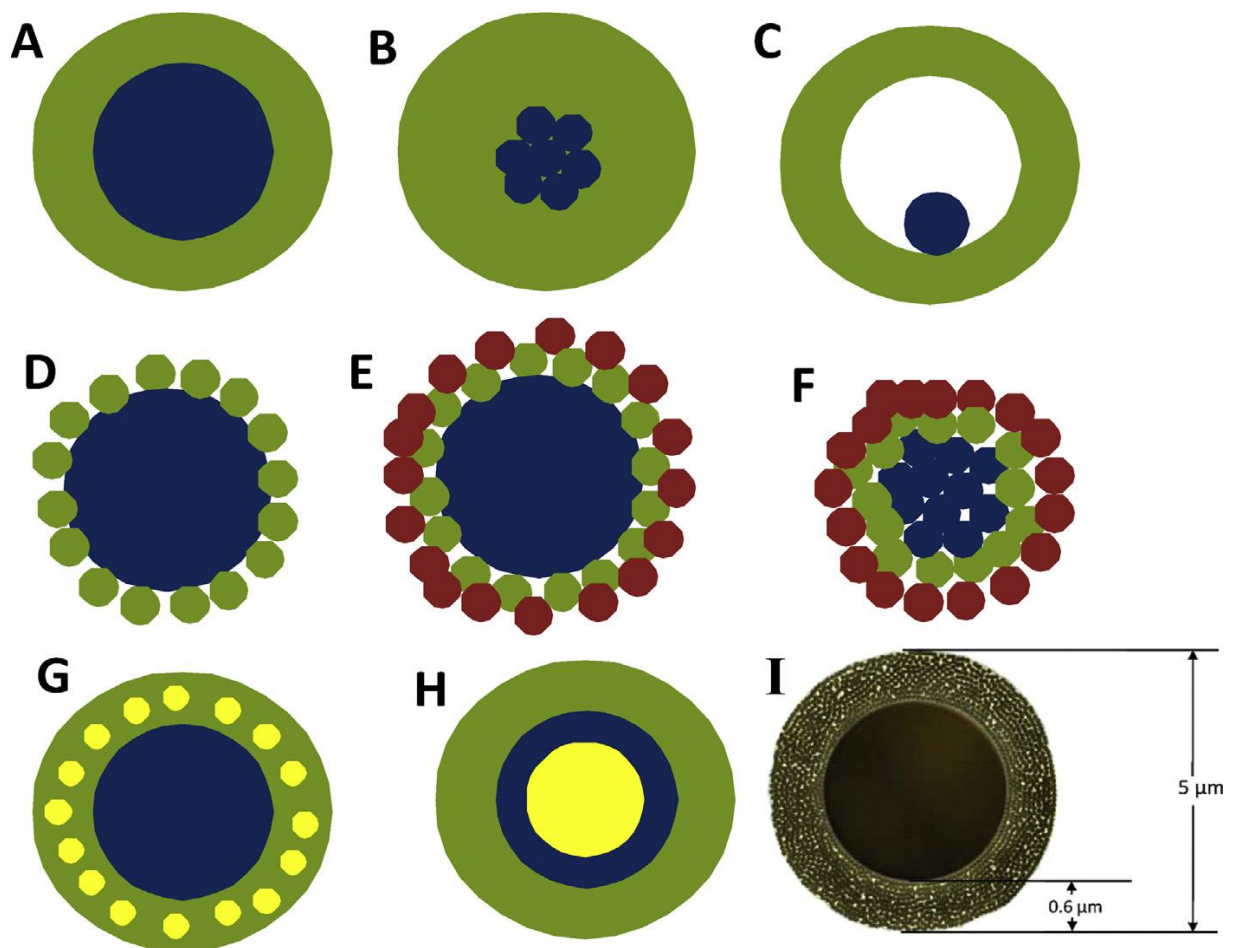
L'idée initiale a été d'améliorer les performances cinétiques pour l'analyse de grosses biomolécules telles que les protéines. Ces phases permettent d'améliorer l'efficacité de la colonne en raccourcissant le chemin de diffusion longitudinale améliorant ainsi la cinétique de transfert de matière [23, 32-36].

D'autre part, la porosité plus élevée provoque une augmentation de la surface et par conséquent elle améliore considérablement la capacité de charge et réduit la contre-pression.

Les différents types de noyau Core-shell sont représentés par les figures 10 et 11.



**Figure 10:** Noyau Halo 5  $\mu\text{m}$  [60].



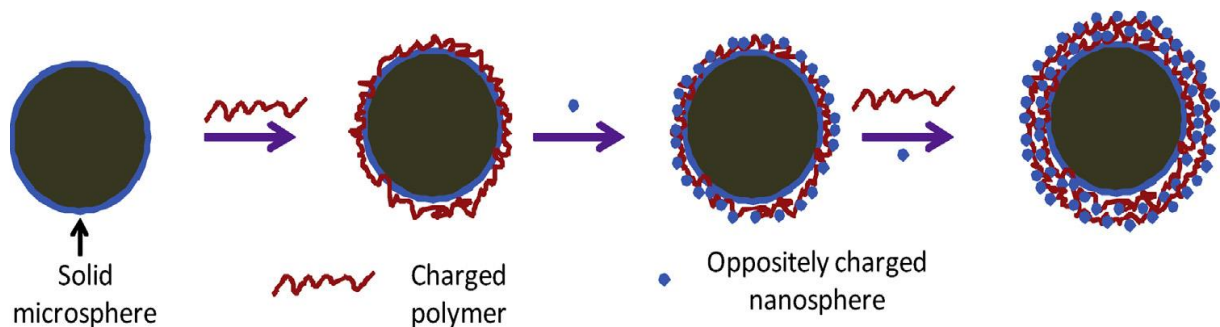
**Figure 11:** Représentation graphique des différents types de particules core-shell [61].

Les particules core-shell sont généralement synthétisées en 2 étapes : les particules du noyau sont synthétisées en premier et par la suite la coquille est formée sur la particule du noyau par différentes méthodes en fonction du type de matériau, du noyau, de l'enveloppe et de leurs morphologies [65].

La première génération de particules pelliculaires est de type Zipax [66].

Kirkland et al. ont rapporté dans leurs études la préparation de ce type de particules par un procédé de co-pulvérisation mais avec l'inconvénient de former des microsphères totalement poreuses qui ne pouvaient pas être efficacement séparées des particules partiellement poreuses [67]. Plusieurs autres approches ont été utilisées par la suite pour améliorer la qualité des particules. Un grand nombre de particules silice core-shell est maintenant préparé par une approche de couche par couche (LBL : Layer By Layer) [66,68]. Des microparticules avec des charges de surfaces adaptées sont utilisées comme noyau et des couches alternatives de

charges opposées sont construites sur les particules fondamentales. La représentation est donnée figure 12 [69].



**Figure 12** : Représentation schématique de la formation des particules du noyau de silice par l'approche couche par couche [69].

Une synthèse en un seul lot de particules core-shell offre des avantages sur le temps de réaction, un contrôle plus facile de la qualité des particules et la réduction du coût des matériaux.

Ahmed et al. ont rapporté la synthèse monotope de microsphères de silice core-shell avec le procédé sphère-sur-sphère (SOS) d'un seul précurseur 3-mercaptopropyltriméthoxysilane (MPTMS) [70]. La morphologie SOS n'a pas changé de manière significative par la suite [71].

#### IV.2. Les différents types de Core-shell

Le développement de colonnes Poroshell, Halo et Kinetex a attiré l'attention sur l'utilisation de ce type de matériau [72-75].

En 2007, des phases stationnaires nommées Halo sont commercialisées en 2.7  $\mu\text{m}$  (1.7  $\mu\text{m}$  pour le noyau et 0.5  $\mu\text{m}$  pour la coque poreuse) conduisant à une hauteur réduite de 1.4 [72].

la hauteur réduite  $h$  s'exprime comme suit :

$$h = \frac{H}{d_p}$$

Avec  $H$  : Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT).

$d_p$  : Diamètre des particules.

Plus la valeur de  $h$  est faible, meilleure est l'efficacité.

En 2009, un autre matériau en silice core-shell de taille moyenne 2.5  $\mu\text{m}$  a été mis sur le marché sous le nom de Kinetex, avec une valeur de  $h = 1.1$  [74].

Plusieurs études comparatives ont portés sur les différents types de particules core-shell et la performance de la phase stationnaire.

Gritti et Guiochon ont comparé la performance de différentes colonnes core-shell pour la séparation des peptides : sur des Kinetex C18 2.6  $\mu\text{m}$ , BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$  et Halo C18 2.7  $\mu\text{m}$  [76]. Ils ont constaté qu'en augmentant la vitesse linéaire, la capacité de la colonne Kinetex était constante alors que celle des deux autres colonnes diminuait d'environ 20%. Les colonnes Kinetex offrent une meilleure résolution pour la séparation des biomolécules de taille moléculaire d'environ 4 nm [76]. Une autre étude effectuée par Olah et al. a comparé la performance cinétique sur Ascentis Express et Kinetex. Les résultats indiquent que la colonne Kinetex offre un transfert de matière plus rapide [77].

Le transfert de-matière cinétique pourrait également être influencé par l'épaisseur de la coque. Il a été montré que le temps est réduit de moitié si l'épaisseur de la coque est réduite de 350 à 150nm [69].

#### ❖ **Sub- 2 $\mu\text{m}$ core-shell**

C'est un matériau qui a été développé par Kinetex avec un noyau ayant un diamètre de 1.25  $\mu\text{m}$  et une épaisseur de coque de 0.23 $\mu\text{m}$  [78]. Cette technologie implique un procédé sol-gel incorporant des techniques de nanostructuration pour générer une enveloppe poreuse dure. Les avantages de l'utilisation de ce type de matériau est la faible pression même à débit élevé. Kinetex a commercialisé ce type de matériau avec des chaînes de silice greffée en C<sub>8</sub> et C<sub>18</sub>.

La comparaison de la colonne Kinetex C<sub>18</sub> 1.7  $\mu\text{m}$  et Waters BEH 1.7  $\mu\text{m}$  pour la séparation des peptides a été étudié par Fekete et al. Cette étude montre une amélioration d'environ 50% de l'efficacité de la colonne en faveur de la colonne Kinetex [78].

#### ❖ **Application à l'analyse des TAG**

L'analyse des TAG a été étudiée sur différentes colonnes core-shell.

Saliu et al. ont utilisé des colonnes Zorbax Eclipse C<sub>18</sub> (4.6mm x 12.5mm, 5 $\mu\text{m}$ ) et Poroshell (3mm x 50mm, 2.7 $\mu\text{m}$ ) pour l'analyse des TAG présents dans des résidus organiques par HPLC-ESI-Q-ToF [79].



Les mêmes colonnes ont été étudiées par La Nasa et al. pour l'analyse des TAG présents dans des huiles végétales (soja, lin, tung, carthame, tournesol, olive, noix, ricin, amande, graines de pavot) par HPLC-ESI-Q-ToF [80].

A notre connaissance, comparativement aux silices greffées totalement poreuses, et ce quel qu'en soit leur diamètre de particule, aucune étude comparative en fonction de la nature de la greffe n'a été conduite sur des silices superficiellement poreuses pour optimiser le choix de la phase stationnaire en fonction de la nature des TAG à analyser. De même il nous semble qu'aucune étude d'équivalence entre une silice greffée totalement poreuse et une silice greffée superficiellement poreuse pour la séparation des TAG n'ait été publiée.

## **V. Conclusion**

Les nombreuses méthodes de greffage, les différentes longueurs de greffes conduisent à trouver sur le marché un grand panel de phases stationnaires superficiellement poreuses pouvant présenter des séparations aussi bien similaires que différentes. C'est pourquoi nous serons amenés à tester différentes phases stationnaires superficiellement poreuses au cours de nos travaux sur les triacylglycérols dans le but de mettre au point des méthodes de leur analyse, soit très rapides, soit très performantes sans employer par ailleurs de solvants chlorés.

## VI. Références bibliographiques

- [1] L. T. Zhuravlev, The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model, *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 173 (2000) 1-38.
- [2] L. T. Zhuravlev, Surface characterization of amorphous silica- a review of work from the former USSR, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 74 (1993) 71-90.
- [3] D. Shamiryanyan, T. Abell, F. Lacopi, K. Maex, Low-k dielectric materials, *materialstoday*, 7 (2004) 34-39.
- [4] F. C. Leinweber, U. Tallarek, Chromatographic performance of monolithic and particulate stationary phases: Hydrodynamics and adsorption capacity, *J. Chromatogr. A*, 1006 (2003) 207-228.
- [5] G. Cerveau, R. J. P. Corriu, E. Framery, Sol-gel chemistry : evidence of redistribution at silica induced by NaOH as catalyst during ageing, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Series IIC – Chemistry*, 4 (2001) 79-83.
- [6] C. M. Bell, L. C. Sander, S. A. Wise, Temperature dependence of carotenoids on C<sub>18</sub>, C<sub>30</sub> and C<sub>34</sub> bonded stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 757 (1997) 29-39.
- [7] C. Stella, S. Rudaz, J-L. Veuthey, A. Tchaplal, Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part II, *Chromatographia*, 53 (2001) 132-140.
- [8] H. Glatz, C. Blay, H. Engelhardt, W. Bannwarth, New Fluorous Reversed Phase Silica Gels for HPLC Separations of Perfluorinated Compounds, *Chromatographia*, 59 (2004) 567-570.
- [9] C. Stella, S. Rudaz, J. L. Veuthey, A. Tchaplal, Silica and Other Materials as Supports in Liquid Chromatography. Chromatographic Tests and their Importance for Evaluating these Supports. Part I, *Chromatographia*, 53 (2001) 113-131.
- [10] P. M. Price, J. H. Clark, D. J. Macquarrie, Modified silicas for clean technology, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (2000) 101-110.
- [11] J. Blumel, Reactions of Ethoxysilanes with Silica: A Solid State NMR Study, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995) 2112-2113.
- [12] P. Sutra, F. Fajula, D. Brunel, P. Lentz, G. Daelen, J. B. Nagy, <sup>29</sup>Si and <sup>13</sup>C Mas-NMR characterization of surface modification of micelle- templated silicas during the grafting of

organic moieties and end-capping, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 158 (1999) 21-27.

[13] U. Johansson, A. Holmgren, W. Forsling, R. L. Frost, Adsorption of silane coupling agents onto kaolinite surfaces, *Clay Minerals*, 34 (1999) 239-246.

[14] M. W. Daniels, L. F. Francis, Silane Adsorption Behavior, Microstructure, and Properties of Glycidoxypropyltrimethoxysilane-Modified Colloidal Silica Coatings, *J. Colloid and Interface Sci.*, 205 (1998) 191-200.

[15] R. Denoyel, J. C. Glez, P. Trens, Grafting  $\gamma$ -aminopropyl triethoxysilane onto silica: consequence on polyacrylic acid adsorption, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 197 (2002) 213-223.

[16] E. F. Vansant, P. Van Der Voort, K. C. Vrancken, Characterization and chemical modification of the silica surface, *Studies in Surface and Catalysis*, ed Amsterdam (1995).

[17] D. Brunel, A. Cauvel, F. D. Renzo, F. Fajula, B. Fubini, B. Onida, E. Garrone, Preferential grafting of alkoxysilane coupling agents on the hydrophobic portion of the surface of micelle-templated silica, *New J. Chem.*, 24 (2000) 807-813.

[18] K. D. Behringer, J. Blumel, Reactions of Etoxysilanes with Silica: A Solid State NMR Study, *J. Liquid Chromatogr. And Related Technologies*, 19 (1996) 2753-2765.

[19] I. Halasz, R. Endeke, J. Asshauer, Ultimate limits in high-pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 112 (1975) 37-60.

[20] M. Martin, G. Eon, G. Guiochon, Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography: I. theoretical analysis, *J. Chromatogr. A*, 99 (1974) 357-376.

[21] J. H. Knox, Practical Aspects of LC Theory, *J. Chromatographic Sci.* 15 (1977) 352-364.

[22] H. Poppe, Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 3-21.

[23] S. Fekete, E. Olah, J. Fekete, Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles, *J. Chromatogr. A*, 1228 (2012) 57-71.

[24] S. Fekete, J. L. Veuthey, D. Guillarme, Comparison of the most recent chromatographic approaches applied for fast and high resolution separations: Theory and practice, *J. Chromatogr. A*, 1408 (2015) 1-14.

[25] D. Guillarme, J. L. Veuthey, R. M. UHPLC in life sciences, *R. Soc. Chem.*, ESC Chromatography Monographs No. 16 (2012).

[26] V. G. Dongre, P. P. Karmuse, P. P. Rao, A. Kumar, Development and validation of UPLC method for determination of primaquine phosphate and impurities, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46 (2008) 236-242.

- [27] R. Toporisic, A. Mlakar, J. Hvala, I. Prisljan, L. Zupancic-Kralji, Identification of new enalapril maleate on oxidation in the presence of magnesium monoperoxyphthalate, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52 (2010) 294-299.
- [28] P. B. Phapale, H. W. Lee, M. S. Lim, E. H. Kim, S. D. Kim, J. Park, M. lee, S. K. Hwang, Y. R. Yoon, Rapid determination of finasteride in human plasma by UPLC-MS/MS and its application to clinical pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 1718-1723.
- [29] H. K. Mayer, G. Fiechter, E. Fischer, A new ultra-pressure chromatography method for the determination of biogenic in cheese, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3251-3257.
- [30] H. Liu, Z. Du, Q. Yuan, A novel rapid method for simultaneous determination of eight active compounds in silymarin using a reversed-phase UPLC-UV detector, *J. Chromatogr. A*, 877 (2009) 4159-4163.
- [31] K. Ganzler, J. Fekete, Facts and myths about columns packed with sub-3 $\mu$ m and sub-2 $\mu$ m particles, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (2010) 56-64.
- [32] G. Guiochon, F. Gritti, Shell particles, trials, tribulations and triumphs, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1915-1938.
- [33] S. Deridder, G. Demset, Effective theory expressions for the effective diffusion in chromatographic beds filled with porous, non-porous and porous-shell particles and cylinders. Part II: Numerical verification and quantitative effect of solid core on expected B-term band broadening, *J Chromatogr. A*, 1218 (2011) 46-56.
- [34] F. Gritti, G. Guiochon, Repeatability of the efficiency of columns packed with sub-3 $\mu$ m core-shell particles: Part I. 2.6 $\mu$ m Kinetex-C<sub>18</sub> Particles in 4.6 mm and 2.1 mm x 100 mm column formats, *J. Chromatogr. A*, 1252 (2012) 31-44.
- [35] F. Gritti, G. Guiochon, Repeatability of the efficiency of columns packed with sub-3 $\mu$ m core-shell particles: Part II. 2.7  $\mu$ m Halo-ES-Peptide-C<sub>18</sub> particles in 4.6 mm and 2.1 mm x 100 mm column formats, *J Chromatogr. A*, 1252 (2012) 45-55.
- [36] F. Gritti, G. Guiochon, Repeatability of the efficiency of columns packed with sub-3  $\mu$ m core-shell particles: Part III. 2.7  $\mu$ m Porshell 120 EC-C18 particles in 4.6 mm and 2.1 mm column formats, *J. Chromatogr. A*, 1252 (2012) 56-66.
- [37] A. De Villiers, F. Lestremau, R. Szucs, S. Gélébart, F. David, P. Sandra, Evaluation of ultra performance liquid chromatography part I. Possibilities and limitations, *J. Chromatogr. A*, 1127 (2006) 60-69.
- [38] W. E. Neff, G. R. List, W. C. Byrdwell, Quantitative composition of high palmitic and stearic acid soybean oil triacylglycerols by reversed phase high performance liquid

chromatography: Utilization of evaporative light scattering and flame ionization detectors, *J. Liquid Chromatography & Related Technologies*, 22 (1999) 1649-1662.

[39] S. Héron, A. Tchaplà, Choix de la colonne et de la phase mobile pour la séparation en HPLC d triglycérides de corps gras, *Analisis*, 22 (1994) 114-126.

[40] S. Héron, A. Tchaplà, Fingerprints of triacylglycerols from oils and fats by HPLC isocratic elution and evaporative light scattering ELSD SEDEX 45 Ed : Sédéré, Alfortville, France (1994).

[41] H. R. Mottram, S. E. Woodbury, R. P. Evershed, Identification of Triacylglycerol Positional Isomers Present in Vegetable Oils by High Performance Liquid Chromatography/ Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11 (1997) 1240-1252.

[42] W. G. Byrdwell, W. E. Neff, G. R. List, Triacylglycerol Analysis of Potential Margarine Base Stocks by High-Performance Liquid Chromatography with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry and Flame Ionization Detection, *J. Agri. Food Chemistry*, 49 (2001) 446-457.

[43] A. Acheampong, N. Leveque, A. Tchaplà, S. Héron, Simple complementary liquid chromatography and mass spectrometry approaches for the characterization of triacylglycerols in Pinus koraiensis seed oil, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 5087-5100.

[44] A. O. Cherif, N. Leveque, M. B. Messaouda, H. Kallel, F. Moussa, An electrospray ionisation-mass spectrometry screening of triacylglycerols in developing cultivated and wild peanut kernels (*Arachis hypogaea* L.), *Food Chemistry*, 138 (2013) 1095-1100.

[45] A. O. Cherif, N. Leveque, M. B. Messaouda, H. Kallel, A. Tchaplà, F. Moussa, NARP-HPLC/MS<sup>5</sup> and silver cationization fingerprinting of triacylglycerols in wild and cultivar Tunisian peanut kernels, *LWT-Food Science and Technology*, 57 (2014) 236-242.

[46] A. W. G. Tamba Sompila, M. G. Maloumbi, J. Bleton, A. Tchaplà, S. Héron, Identification des triacylglycérols en HPLC. Comment se passer du couplage HPLC-SM ? Dans quel cas la chromatographie est-elle encore indispensable ? *OCL* 21 (2014) A601-607.

[47] A. Baiocchi, C. Medana, F. D. Bello, V. Giancotti, R. Aigotti, D. Gastaldi, Analysis of regioisomers of polyunsaturated triacylglycerols in marine matrices by HPLC/HRMS, *Food Chemistry*, 166 (2015) 551-560.

[48] M. J. Lerma-Garcia, R. Lusardi, E. Chiavaro, L. Cerretani, A. Bendini, G. Ramis-Ramos, E. F. Simo-Alfonso, Use of triacylglycerol profiles established by high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection to predict the botanical origin of vegetable oils, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 7521-7527.

- [49] K.W. Gallis, J. T. Araujo, K. J. Duff, J. G. Moore, C. C. Landry, The use of mesoporous silica in liquid chromatography, *Adv. Mater.*, 11 (1999) 1452-1455.
- [50] G. Buchel, M. Grun, K. K. Unger, A. Matsumoto, T. Kazuo, Tailored syntheses of nanostructured silicas: Control of particule morphology, particle size and pore size, *Supramolecular Science*, 5 (1998) 253-259.
- [51] Y. Li, S. Cheng, P. Dai, X. Liang, Y. Ke, Large-pore monodispersed mesoporous silica spheres : synthesis and application in HPLC, *Chemical Communications*, (2009) 1085-1087.
- [52] X. Liu, L. Li, Y. Du, Z. Guo, T. T. Ong, Y. Chen, S. C. Ng, Y. Yang, Synthesis of large pore-diameter SBA-15 mesostructured spherical silica and its application in ultra-high-performance-liquid-chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7767-7773.
- [53] J. Zhao, F. Gao, Y. Fu, W. Jin, P. Yang, D. Zhao, Biomolecule separation using large pore mesoporous SBA-15 as a substrate in high performance liquid chromatography, *Chemical Communications*, (2002) 752-753.
- [54] R. Tian, J. Sun, H. Zhang, M. Ye, C. Xie, J. Dong, J. Hu, D. Ma, X. Bao, H. Zou, Large-pore mesoporous SBA-15 silica particles with submicrometer size as stationary phases for high-speed CEC separation, *Electrophoresis*, 27 (2006) 742-748.
- [55] L. Novakova, D. Solichova, P. Solich, Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel, *J. Separation Science*, 29 (2006) 2433-2443.
- [56] K. D. Patel, A. D. Jerkovich, J. C. Link, J. W. Jorgenson, In-Depth Characterization of Slurry Packed Capillary Columns with 1.0- $\mu\text{m}$  Nonporous Particles Using Reversed-Phase Isocratic Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 5777-5786.
- [57] J. A. Anspach, T. D. Maloney, L. A. Colon, Ultrahigh-pressure liquid chromatography using a 1-mm id column packed with 1.5- $\mu\text{m}$  porous particles, *J. Separation Science*, 30 (2007) 1207-1213.
- [58] Y. Zhaou, Y. Xue, G. C. Chen, A. J. Zhang, Z. F. Chen, X. Liao, L. S. Ding, Rapid separation and characterisation of triacylglycerols in ostrich oil by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Food Chemistry*, 141 (2013) 2098-2102.
- [59] Q. Zhou, B. Gao, X. Zhang, Y. Xu, H. Shi, L. L. Yu, Chemical profiling of triacylglycerols and diacylglycerols in cow milk fat by ultra-performance convergence

chromatography combined with a quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Food Chemistry*, 143 (2014) 199-204.

[60] J. J. De Stefano, S. A. Schuster, J. M. Lawhorn, J. J. Kirkland, Performance characteristics of new superficially porous particles, *J. Chromatogr. A*, 1258 (2012) 76-83.

[61] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1357 (2014) 36-52.

[62] C. Horvath, S. R. Lipsky, Column Design in High Pressure Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 109-116.

[63] C. Horvath, S. R. Lipsky, Rapid analysis of ribonucleosides and bases at the picomole level using pellicular cation exchange resin in narrow bore columns, *Analytical Chemistry*, 41 (1969) 1227-1234.

[64] J. J. Kirkland, Controlled surface porosity supports for high-speed gas and liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 41 (1969) 218-220.

[65] R. G. Chaudhuri, S. Paria, Core/Shell Nanoparticles : Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications, *Chemical Reviews*, 112 (2012) 2373-2433.

[66] G. Guiochon, F. Gritti, Shell particles, trials, tribulations and triumphs, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1915-1938.

[67] J.J. Kirkland, superficially porous silica microspheres for the fast high-performance liquid chromatography of macromolecules, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 1239-1245.

[68] W. Tong, X. Song, C. Gao, Layer-by-layer assembly of microcapsules and their biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 41 (2012) 6103-6124.

[69] J. O. Omamogho, J. P. Hanrahan, J. Tobin, J. D. Glennon, Structural variation of solid core and thickness of porous shell of 1.7  $\mu\text{m}$  core-shell silica particles on chromatographic performance: Narrow bore columns, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1942-1953.

[70] A. Ahmed, H. Ritchie, P. Myers, H. Zhang, One-pot synthesis of spheres-on-sphere silica particles from a single precursor for fast HPLC with low back pressure, *Advanced Materials*, 24 (2012) 6042-6048.

[71] A. Ahmed, W. Abdelmagid, R. Harald, P. Myers, H. Zhang, Investigation on synthesis of spheres-on-spheres silica particles and their assessment for high performance liquid chromatography applications, *J. Chromatogr. A*, 1270 (2012) 194-203.

[72] J.J. De Stefano, T.J. Langlois, J.J. Kirkland, Characteristics of Superficially-Porous Silica Particles for Fast HPLC: Some Performance Comparisons with Sub-2- $\mu\text{m}$  Particles, *J. Chromatogr. Sci.*, 46 (2008) 254-260.

- [73] F. Gritti, A. Cavazzini, N. Marchetti, G. Guiochon, Comparaison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C<sub>18</sub>-bonded silica materials, *J. Chromatogr. A*, 1157 (2007) 289-303.
- [74] F. Gritti, I. Leonardis, D. Shock, P. Stevenson, A. Shalliker, G. Guiochon, Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C<sub>18</sub>, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1589-1603.
- [75] X. Wang, W. E. Barber, P. W. Carr, A practical to approach to maximizing peak capacity by using long columns packed with pellicular stationary phases for proteomic research, *J. Chromatogr. A*, 1107 (2006) 139-151.
- [76] F. Gritti, G. Guiochon, Performance of columns packed with the shell Kinetex-C<sub>18</sub> particles in gradient elution chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1604-1615.
- [77] E. Olah, S. Fekete, J. Fekete, K. Ganzler, Comparative study of new shell-type, sub-2 $\mu$ m fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3642-3653.
- [78] S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete, Simultaneous determination of polysorbate 20 and unbound polyethylene-glycol in protein solutions using new core-shell reversed phase column and condensation nucleation light scattering detection, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 6258-6266.
- [79] F. Saliu, I. Degano, M. P. Colombini, Identification of triacylglycerols in archaeological organic residues by core-shell reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1346 (2014) 78-87.
- [80] J. La Nasa, E. Ghelardi, I. Degano, F. Modungo, M. P. Colombini, Core shell phases for a novel separation of triglycerides in plant oils by high performance liquid chromatography with electrospray-quadrupole-time of flight mass spectrometer, *J. Chromatogr. A*, 1308 (2013) 114-124.



## **Chapitre III : Choix de la composition de la phase mobile en HPLC.**

### **Echelles de polarité des solvants et force éluante.**

- I. Introduction**
- II. Interactions intermoléculaires**
- III. Paramètres de solubilité**
  - III.1. Paramètres de solubilité d'Hildebrand**
  - III.2. Paramètres de solubilité partiels d'Hansen**
  - III.3. Application du concept de paramètre de solubilité à la chromatographie de Schoenmakers**
  - III.4. Classement de Snyder**
- IV. Echelle de force éluante basée sur la sélectivité méthylène**
- V. Conclusion**
- VI. Références bibliographiques**

## **Chapitre III : Choix de la composition de la phase mobile en HPLC.**

### **Echelles de polarité des solvants et force éluante.**

#### **I. Introduction**

En chromatographie en phase liquide, le phénomène chromatographique est basé sur des compétitions d'interactions soluté – phase stationnaire, soluté – phase mobile et phase stationnaire - phase mobile. Une fois la phase stationnaire choisie, de nombreuses possibilités s'offrent à nous pour le choix de la composition de la phase mobile (nature des solvants, mélanges binaires, ternaires voire quaternaires).

Afin de mieux appréhender cette problématique, différents auteurs ont proposé des classements des solvants conduisant à la notion de force éluante. Ces classements définissent les propriétés des solvants ou mélange de solvants utilisables, basés essentiellement sur les interactions moléculaires mises en jeu.

C'est pourquoi dans un premier temps nous allons faire un rappel théorique concernant ces interactions avant de passer en revue les principaux classements de solvants existants. Ils permettent d'arriver à la notion de force éluante et isoéluante qui est une thématique importante dans ce travail.

#### **II. Interactions intermoléculaires**

Il existe des forces d'interactions entre molécules non chargées. Ces forces se réfèrent aux interactions de Van Der Waals. En général, les énergies mises en jeu dans ce type d'interactions sont beaucoup plus faibles que les énergies mises en jeu lors des réactions chimiques. Ce sont elles qui contrôlent les séparations en chromatographie.

Les interactions de Van der Waals sont la somme de 4 types d'interactions relatives à 4 types de forces différentes. Ce sont:

### **Forces de London:**

Les forces de dispersion ou forces de London sont des forces intermoléculaires de faible énergie créées par des dipôles instantanés. Les forces de London existent du fait que la densité électronique des molécules est probabiliste: il y a une forte chance à tout moment pour que celle-ci ne soit pas équitablement répartie à travers la molécule, ce qui crée un léger moment dipolaire. Les moments dipolaires vont varier très rapidement au cours du temps. Ainsi à chaque distribution inhomogène se crée un moment dipolaire instantané qui peut interagir avec les moments dipolaires instantanés des molécules voisines et une force s'exerce développant une énergie d'interaction entre les molécules.

### **Forces de Debye :**

Ce sont les forces intermoléculaires résultantes de l'interaction entre un dipôle permanent et un dipôle induit. Les forces de Debye expriment l'effet d'induction. Elles apparaissent essentiellement avec des molécules polarisables. Cette polarisabilité résulte de la déformation du nuage électronique suite à la présence d'un champ électrique. Ce champ électrique peut être externe ou généré par une molécule polaire.

### **Forces de Keesom :**

Elles concernent les forces d'interaction entre deux dipôles permanents. L'énergie mise en jeu est liée au carré des moments dipolaires des molécules.

### **Forces de Liaison Hydrogène :**

Elles sont la résultante de l'interaction qui se produit lorsqu'un atome d'Hydrogène est lié de façon covalente à un atome électronégatif (exemple F, N et O) et interagit simultanément avec les électrons n d'un atome électronégatif voisin (ou dans certains cas particuliers avec un système  $\pi$  d'un cycle aromatique).

La polarité des molécules ou des solvants est la résultante de tous ces types d'interactions. Il y a donc eu la nécessité de les classer afin de les comparer et de les choisir.

Différents classements ont été proposés.

### III. Paramètres de solubilité

#### III.1. Paramètres de solubilité d'Hildebrand

Hildebrand a cherché à comprendre et modéliser la solubilité des non électrolytes.

L'hypothèse de base dans ce concept est qu'il existe une corrélation entre la densité d'énergie de cohésion et la solubilité.

C'est la base de la définition originale de Hildebrand et Scott [1-3].

$$\delta = \sqrt{-E/V} \quad (1)$$

Avec :

E : Energie moléculaire de cohésion nécessaire pour transformer une mole de l'état liquide pur à l'état gazeux idéal.

V : Volume molaire

Et qui s'écrit aussi:

$$\Leftrightarrow \delta = \sqrt{(\Delta H_l^g - RT) / V} \quad (2)$$

Avec :

- $\Delta H_l^g$  = l'enthalpie molaire de vaporisation
- R = constante des gaz parfaits

Cette équation définit le paramètre de solubilité selon Hildebrand [1].

Pour que deux solvants 1 et 2 soient miscibles, il faut que  $\delta_1 \sim \delta_2$  et donc que leurs enthalpies molaires soient voisines ou identiques.

Le paramètre de solubilité  $\delta$  permet ainsi de comprendre la miscibilité ou non d'un corps pur dans un autre. Il est directement relié à la structure des molécules et donc indirectement à leur polarité. Plus sa valeur sera élevée, plus la molécule sera polaire.

Cependant, des solvants de même paramètre de solubilité se sont avérés ne pas dissoudre le même composé alors que des solvants de paramètre de solubilité différent dissolvent le même composé.

Par conséquent ce concept ne suffit pas pour rendre compte de l'effet relatif des solvants sur un même soluté. De nouvelles méthodes ont été proposées.

### III.2. Paramètres de solubilité partiels de Hansen

L'équation de Hildebrand ne tient compte que de la somme des forces d'interactions entre les molécules. De manière générale, la plus grande contribution à l'énergie de Van der Waals provient des forces de London. Cependant, cette énergie dépend aussi des interactions dues aux groupements polaires et aux liaisons hydrogènes.

Hansen a suggéré de scinder en trois le paramètre du modèle de Hildebrand, permettant de tenir compte des interactions polaires par  $\delta_p$ , de liaison hydrogène par  $\delta_h$  et de la somme des interactions de dispersion et d'induction par  $\delta_{di}$  (Figure 1).

$$\delta_t^2 = \delta_{di}^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (3)$$

Avec  $\delta_t$  = paramètre de solubilité total défini par Hansen

$\delta_{di}$  = représente la somme des énergies de dispersion de London et de Debye

$\delta_p$  = représente les énergies d'interactions dipôle-dipôle

$\delta_h$  = représente les énergies d'interactions de liaison hydrogène

Ainsi, pour que 2 solvants soient miscibles l'un dans l'autre il faut que les 2 valeurs de  $\delta_t$  soient voisines mais aussi que l'énergie des forces dominantes soit la même dans les 2 composés, c'est-à-dire que le paramètre de solubilité partiel dominant soit le même.

Le paramètre de solubilité  $\delta_t$  défini par Hansen est très proche de  $\delta$  défini par Hildebrand mais n'est pas identique.

L'inconvénient du système de Hansen repose sur le fait qu'il est tridimensionnel ce qui pose une difficulté pour le visualiser [5].

Les valeurs numériques du système de Hansen ont été corrigées à chaque fois que cela a été nécessaire pour être en harmonie avec les résultats expérimentaux [4,5].

Solvents	H-B*	Solubility parameters**			
		$\delta_T$	$\delta_{Ho}$	$\delta_{Hi}$	$\delta_{Hs}$
<i>1 Ketones</i>					
Acetone	M	10.62	9.63	9.88	9.78
2-Butanone	M	9.97	9.44	9.29	9.29
Diethyl ketone	M	9.46	9.04	8.80	8.85
Mesityl oxide	M	9.59	9.19	9.00	9.24
Methyl isobutyl ketone	M	8.73	8.60	8.41	8.31
Isophorone	M	9.27	9.39	9.09	9.73
Di-(isobutyl) ketone	M	7.68	8.07	7.82	8.26
Acetaldehyde	M	11.26	9.88	10.32	9.88
Butyraldehyde	M	9.97	9.09	9.00	8.36
<i>2 Nitrogen Compounds</i>					
Acetonitrile	P	13.83	12.12	11.88	11.93
Propionitrile	P	12.03	10.76	10.80	10.61
Butyronitrile	P	11.05	10.17	10.51	9.97
Nitroethane	P	12.33	11.24	11.10	11.10
2-Nitropropane	P	10.86	10.07	9.92	10.07
Nitrobenzene	P	11.70	11.00	10.02	10.85
Ethylene diamine	S	12.90	12.37	12.32	12.37
Pyridine	S	11.53	10.61	10.71	10.66
Morpholine	S	11.28	10.80	10.80	10.51
N-Methyl-2-pyrrolidone	M	11.96	11.59	11.29	11.20
n-Butylamine	S	9.32	8.65	8.70	9.09
Diethylamine	S	8.50	8.07	8.02	7.97
<i>3 Alcohols</i>					
Methanol	S	15.37	14.52	14.47	14.47
Ethanol	S	12.89	12.76	12.71	12.96
3-Hydroxy propionitrile	S	15.11	15.16	15.20	15.16
Allyl alcohol	S	12.28	12.56	11.78	12.56
1-Propanol	S	11.61	12.17	11.88	11.98
2-Propanol	S	11.07	11.44	11.49	11.49
1-Butanol	S	10.70	11.59	11.39	11.29
2-Butanol	S	10.28	11.10	10.80	10.85
Isobutanol	S	10.44	11.24	10.51	11.10
Benzyl alcohol	S	11.51	12.03	12.08	11.64
Cyclohexanol	S	10.73	10.90	11.39	10.95
1-Pentanol	S	10.04	10.85	10.90	10.61
2-Ethyl-2-butanol	S	8.94	10.36	10.51	10.36
Diacetone alcohol	M	9.67	9.78	9.19	10.17
Cellosolve	M	10.70	10.71	10.51	11.49
Butyl cellosolve	M	9.43	9.88	9.48	10.17
2-Ethyl-1-hexanol	S	8.59	10.17	9.48	9.88
1-Octanol	S	8.69	10.32	10.32	10.27

**Figure 1:** Paramètres de solubilité totaux de Hansen, Hildebrand et Hoy [4].

Comme cela a été dit précédemment, ce concept a été proposé pour la recherche de bons solvants pour différents corps purs et polymères.

### III.3. Application du concept de paramètre de solubilité à la chromatographie de Schoenmakers

Plus tard, Schoenmakers [6] l'a appliqué à la chromatographie en phase liquide pour laquelle les polarités des deux phases (stationnaire et mobile) sont très différentes.

Pour cela, il a défini  $\delta_L$  le paramètre de solubilité de la phase mobile, et  $\delta_S$  celui de la phase stationnaire.

La rétention d'un soluté est alors définie par :

$$\ln k_i = \frac{V_i}{RT} (\delta_S + \delta_L - 2\delta_i)(\delta_S - \delta_L) + \ln\left(\frac{n_L}{n_S}\right) \quad (4)$$

Où  $\delta_i$  est le paramètre de solubilité du soluté. Il doit être intermédiaire entre  $\delta_L$  et  $\delta_S$ .

Par conséquent, pour une phase stationnaire et un soluté donnés ( $\delta_S$  et  $\delta_i$  fixés), on peut moduler la rétention en jouant sur la nature de la phase mobile ( $\delta_L$ ).

A partir de ce concept, Schoenmakers a travaillé sur le concept d'isoéluance. Deux phases mobiles sont isoéluantes si elles conduisent à des rétentions voisines pour le même soluté. C'est ainsi que l'on arrive à calculer des proportions (fractions volumiques) de solvants organiques ( $\varphi$ ) dans l'eau qui conduisent à des phases mobiles aqueuses isoéluantes.

Isoéluance entre MeOH/H<sub>2</sub>O et MeCN/H<sub>2</sub>O:  $\varphi_{\text{MeCN}} = 0.78 \varphi_{\text{MeOH}}$

Isoéluance entre MeOH/H<sub>2</sub>O et THF/H<sub>2</sub>O:  $\varphi_{\text{THF}} = 0.62 \varphi_{\text{MeOH}}$

Ce concept présente aussi des limites dans la mesure où on ne regarde pas l'influence de la phase mobile sur la phase stationnaire et qu'il ne tient pas compte du phénomène entropique.

### III.4. Classement de Snyder

Dans le cas de la Chromatographie Liquide à Polarité Normale de Phases (CLPN) (ou adsorption sur des surfaces polaires), Snyder a proposé une équation empirique décrivant la rétention des solutés dépendant du soluté, de la phase stationnaire et de la phase mobile :

$$\log k_i = \log V_a + \beta(E_0 - A_s \cdot \varepsilon^0) + D_{es} \quad (5)$$

Avec :

$V_a$  : quantité de solvant adsorbée par gramme de silice

$\beta$  : Activité de la silice

$E_0$  : Energie d'adsorption du soluté par unité de surface de silice

$A_s$  : Surface moléculaire du soluté sur la silice

$D_{es}$  : Terme d'effet secondaire

$\varepsilon^0$  : Energie d'adsorption du solvant par unité de surface de silice.

En Chromatographie Liquide à Polarité Inversée de Phases (CLPI), la formule précédente devient pour un soluté donné, et deux phases mobiles  $S_1$  et  $S_2$  [10]

$$\log k_{S1} - \log k_{S2} = V_n(\varepsilon^0_{S2} - \varepsilon^0_{S1}) \quad (6)$$

Avec :

$k$  : facteur de rétention du soluté dans les deux phases mobiles  $S_1$  et  $S_2$ .

$V$  : Volume moléculaire du soluté au contact de la phase stationnaire

$\varepsilon^0$  : Energie libre de transfert du soluté de la phase mobile à la phase stationnaire.  $\varepsilon^0$  est aussi appelée la force éluante du solvant. C'est un paramètre qui tient compte des interactions entre la phase stationnaire et la phase mobile.

Des séries éluotropiques classant de nombreux solvants ont été définies sur différents adsorbants CLPN, tels que la silice ou l'alumine (ou encore en CLPI (sur C18)).



Eluotropic values for three stationary phases [ 36 ]			
Solvent	Eluotropic values ( $\epsilon^\circ$ )		
	Alumina	C <sub>18</sub>	Silica
acetone	0.56	8.8	0.53
acetonitrile	0.65	3.1	0.52
chloroform	0.40		0.26
cyclohexane	0.04		
cyclopentane	0.05		
dimethylformamide		7.6	
dimethyl sulfoxide	0.62		
1,4-dioxane	0.56	11.7	0.51
ethyl acetate	0.58		0.48
1,2-dichloroethane		0.49	
ethyl ether	0.38		0.43
heptane	0.01		0.00
hexane	0.01		0.00
isooctane	0.01		
isopropyl alcohol	0.82	8.3	0.6
methanol	0.95	1.0	0.7
methyl <i>tert.</i> -butyl ether	0.35		0.48
2-butanone	0.51		
4-methyl-2-pentanone	0.43		
dichloromethane	0.42		0.30
pentane	0.00		0.00
propyl alcohol	0.82		
pyridine	0.71		
tetrahydrofuran	0.45	3.7	0.53
toluene	0.29		0.22
trichlorotrifluoroethane			0.02
<i>o</i> -xylene	0.26		

**Figure 2 :** Valeurs des forces éluantes pour différentes phases stationnaires [7].

Ce classement couramment utilisé en CLPN ne permet cependant pas d'expliquer des sélectivités différentes pour des solvants de force éluante proche. C'est ainsi que Snyder a repris le concept de Rohrschneider qui a caractérisé la polarité des phases de chromatographie en phase gazeuse à partir des constantes de distribution gaz-liquide [8].

Il a défini alors une polarité P' à partir des interactions avec 3 solutés tests:

L'éthanol qui permet de juger du caractère accepteur de protons (Xe), le dioxane du caractère donneur de protons (Xd) et le nitrométhane des interactions dipôle-dipôle (Xn).

$$X_d + X_e + X_n = 1 \quad (7)$$

Avec :

$X_d$  : modélise l'interaction du solvant avec un soluté basique (Dioxane)

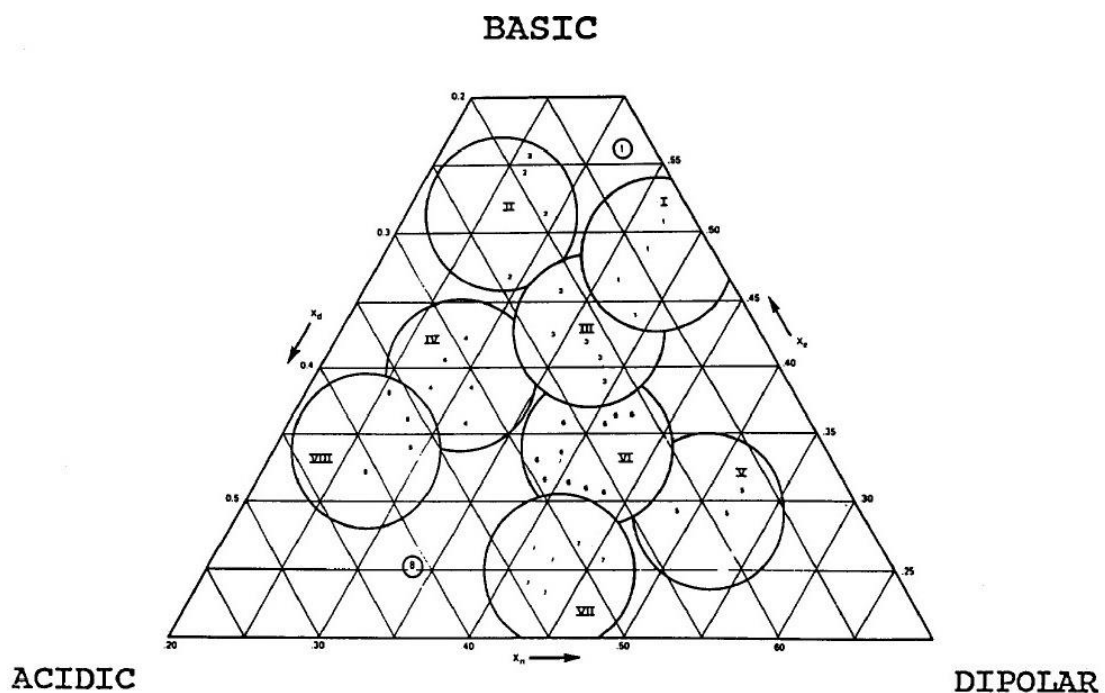
$X_e$  : modélise l'interaction du solvant avec un soluté acide (Ethanol)

$X_n$  : modélise l'interaction du solvant avec un soluté polaire (Nitrométhane)

Il affirme que les différences d'interactions de dispersion ne sont pas importantes pour des solutions dans des solvants polaires (CLPN) et que la sélectivité du solvant peut être représentée d'une manière adéquate par les 3 paramètres  $X_i$  [7,9].

Les valeurs de  $X_i$  ont été classées en 8 groupes de sélectivité. Les solvants sont alors regroupés selon leurs polarités et sélectivités.

La représentation graphique est « le triangle de sélectivité » ou « triangle de Snyder »



**Figure 3 :** Triangle de sélectivité de Snyder.

Les solvants qui se trouvent dans les 3 coins du triangle sont supposés présenter principalement une seule sorte de sélectivité. Alors que les solvants qui se trouvent au milieu du triangle sont capables d'établir les 3 types d'interactions.

Une liste détaillée des valeurs de  $X_i$  et  $P'$  des solvants est regroupée dans la figure 4.

Un triangle a aussi été défini pour les solvants constituant la phase mobile en Chromatographie Liquide à Polarité Inversée de phases (CLPI) [10].

Solvent	Group	$P'$	$x_c$	$x_d$	$x_n$
ethyl bromide	—c	—	—	—	—
hexafluorobenzene	—c	—	—	—	—
nonylphenol oxyethylate	III <sup>c</sup>	—	0.38	0.22	0.40
perfluorohexane	—a	0.84	—	—	—
n-hexane	—a	0.1	—	—	—
isooctane	—a	0.1	—	—	—
cyclohexane	—a	0.2	—	—	—
carbon disulfide	—a	0.3	—	—	—
n-decane	—a	(2.19)	(0.22)	(0.39)	(0.39)
squalene	—a	0.4	—	—	—
carbon tetrachloride	—a	1.2	—	—	—
triethylamine	I <sup>b</sup>	1.6	—(0.26)	—(0.40)	—(0.34)
		1.9	0.56	0.12	0.32
		(2.2)	(0.66)	(0.08)	(0.26)
butyl ether	I	2.1	0.44	0.18	0.38
isopropyl ether	I	2.4	0.48	0.14	0.38
toluene	VII	2.4	0.25	0.28	0.47
p-xylene	VII	2.5	0.27	0.28	0.45
benzene	VII	2.7	0.23	0.32	0.45
chlorobenzene	VII	2.7	0.23	0.33	0.44
bromobenzene	VII	2.7	0.24	0.33	0.43
ethyl ether	I	2.8	0.53	0.13	0.34
iodobenzene	VII	2.8	0.24	0.35	0.41
dichloromethane	V (VII)	3.1	0.29	0.18	0.53
		(4.3)	(0.27)	(0.33)	(0.40)
fluorobenzene	VII	3.2	0.24	0.32	0.45
ethoxybenzene	VII	3.3	0.28	0.28	0.44
n-octanol	II	3.4	0.56	0.18	0.25
phenyl ether	VII	3.4	0.27	0.32	0.41
chloroethane	V <sup>c</sup>	3.5	0.30	0.21	0.49
isopentanol	II	3.7	0.56	0.19	0.26
anisole	VII	3.8	0.27	0.29	0.43
n-butanol	II	3.9	0.59	0.19	0.25
isopropanol	II	3.9	0.55	0.19	0.27
tetrahydrofuran	III	4.0	0.38	0.20	0.42
n-propanol	II	4.0	0.54	0.19	0.27
chloroform	VIII <sup>b</sup>	4.1	0.25	0.41	0.33
		(4.3)	(0.31)	(0.35)	(0.34)
tert-butanol	II	4.1	0.56	0.20	0.24
benzyl ether	VII	4.1	0.30	0.28	0.42
ethanol	II <sup>c</sup>	4.3	0.52	0.19	0.29
diiodomethane	not classified	4.3	0.28	0.37	0.35
ethyl acetate	Via	4.4	0.34	0.23	0.43
nitrobenzene	VII	4.4	0.26	0.30	0.44
2,6-lutidine	III	4.5	0.45	0.20	0.36
bis-(2-ethoxyethyl) ether	Via	4.6	0.37	0.21	0.43
trimesyl phosphate	Via	4.6	0.36	0.23	0.41
2-butanone	Via	4.7	0.35	0.22	0.43
cyclohexanone	Via	4.7	0.36	0.22	0.42
dioxane	Via <sup>c</sup>	4.8	0.38	0.24	0.40
benzotrile	Vib	4.8	0.31	0.27	0.42
acetophenone	Via	4.8	0.33	0.26	0.41
2-picoline	III	4.9	0.44	0.21	0.36
quinoline	III	5.0	0.41	0.23	0.36
acetone	Via	5.1	0.35	0.23	0.42
methanol	II	5.1	0.48	0.22	0.31

Table 2 (continued)

Solvent	Group	$P'$	$x_c$	$x_d$	$x_n$
nitroethane	VII	5.2	0.28	0.29	0.43
di(ethylene glycol)	III	5.2	0.44	0.23	0.33
pyridine	III	5.3	0.41	0.22	0.36
methoxyethanol	III	5.5	0.38	0.24	0.38
cyano morpholine	Via	5.5	0.35	0.25	0.40
tri(ethylene glycol)	III	5.6	0.42	0.24	0.34
benzyl alcohol	IV	5.7	0.40	0.30	0.30
acetonitrile	Vib	5.8	0.31	0.27	0.42
tetramethylurea	III	6.0	0.42	0.19	0.39
acetic acid	IV	6.0	0.30	0.31	0.30
methylformamide	III	6.0	0.41	0.23	0.36
nitromethane	VII	6.0	0.28	0.31	0.40
tetramethylguanidine	I	6.1	0.47	0.17	0.35
propylene carbonate	Vib	6.1	0.31	0.27	0.42
aniline	Vib	6.3	0.32	0.32	0.36
dimethylformamide	III	6.4	0.39	0.21	0.40
formylmorpholine	Via	6.4	0.36	0.24	0.39
N,N-dimethylacetamide	III	6.5	0.41	0.20	0.39
butyrolactone	Via	6.5	0.34	0.26	0.40
tris-cyanoethoxypropane	Vib	6.6	0.32	0.27	0.41
N-methyl-2-pyrrolidinone	III	6.7	0.40	0.21	0.39
oxydipropionitrile	Vib	6.8	0.31	0.29	0.40
tetrahydrothiophene-1,1-dioxide	Vib	6.9	0.33	0.28	0.39
ethylene glycol	IV <sup>c</sup>	6.9	0.43	0.29	0.28
dimethyl sulfoxide	III	7.2	0.39	0.23	0.39
hexamethyl phosphoric acid triamide	I	7.4	0.47	0.17	0.37
m-cresol	VIII	7.4	0.38	0.37	0.25
trifluoroethanol	VIII	7.6	0.40	0.33	0.27
tetrafluoropropanol	VIII	8.6	0.34	0.36	0.30
hexafluoroisopropanol	VIII	8.7	0.45	0.27	0.27
dodecafluoroheptanol	VIII	8.8	0.33	0.40	0.27
formamide	IV <sup>c</sup>	9.6	0.36	0.33	0.30
water	VIII <sup>c</sup>	10.2	0.37	0.37	0.25

Figure 4 : Classifications des valeurs de  $P'$  et  $X_i^0$ .

#### IV. Echelle de force éluante basée sur la sélectivité méthylène

Afin de prendre en compte l'effet de la phase stationnaire en CLPI, l'équation 8 ci-dessous a été appliquée à 2 solutés de même groupement polaire mais de volume hydrocarboné différent.

Ainsi, pour 2 composés homologues:

$$\log \alpha_{S2} - \log \alpha_{S1} = \Delta V_n (\varepsilon_{S1}^0 - \varepsilon_{S2}^0) \quad (8)$$

Avec :

$\alpha$  sélectivité entre deux homologues, appelée sélectivité méthylène

$\Delta V_n$  volume d'un groupement méthylène

En CLPI, la force éluante de l'eau pure est par définition nulle. L'eau étant prise comme référence, l'équation (8) se transforme en équation (9) pour obtenir la force éluante des mélanges hydro-organiques [10].

$$\varepsilon^0 = (\log \alpha_{H_2O} - \log \alpha_S) / V_0 \quad (9)$$

Avec:

$\varepsilon^0$  : force éluante de la phase mobile considérée

$\alpha_{H_2O}$  : sélectivité méthylène dans l'eau pure

$\alpha_S$  : sélectivité méthylène dans la phase mobile étudiée

$V_0$  : Volume d'un groupement méthylène estimé à 0.168 [11].

Plusieurs études ont montré que la force éluante de mélanges de solvants est dépendante de la nature de la phase stationnaire en phase inversée (CLPI) mais qu'elle varie aussi avec la longueur des greffons ou la nature de la phase (C1, C6, C8, C12, C14, C18, phényle, pyrocarbone, PGC) [12-13].

Divers solvants miscibles à l'eau ont été testés sur des phases stationnaires en C<sub>18</sub> tels que MeOH/H<sub>2</sub>O, MeCN/H<sub>2</sub>O, THF/H<sub>2</sub>O, AcMe/H<sub>2</sub>O et EtOH/H<sub>2</sub>O [11, 13,14].

La variation de la sélectivité méthylène dans le mélange MeOH/H<sub>2</sub>O est approximativement linéaire en fonction du pourcentage du solvant organique pour des silices greffées de manière monomérique par des chaînes alkyles (par exemple en C<sub>8</sub>, C<sub>14</sub> et C<sub>18</sub>.....). Par ailleurs, la valeur de la force éluante dans l'eau pure est égale à zéro. Donc, la détermination de la force éluante pour tous les mélanges MeOH/H<sub>2</sub>O revient, pour une longueur de greffe donnée, à la détermination de la sélectivité méthylène d'une composition donnée. Par la suite le diagramme obtenu sera une droite passant par l'origine [11-13]. Pour déterminer la force éluante pour des chaînes différentes de C<sub>18</sub> il conviendra préalablement de déterminer la sélectivité méthylène dans l'eau pure sur le support greffé en question.

Puisque le mécanisme d'interactions moléculaires est le même pour les silices greffées par des chaînes alkyle de longueur de chaîne différentes C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> et C<sub>18</sub> [15], la variation de  $\log k = f(n_C)$  est donc approximativement linéaire pour les différentes compositions de phases mobiles MeOH/H<sub>2</sub>O sur chacune de ces greffes.

Différents greffages en C<sub>18</sub> ont aussi été étudiés tout comme des greffages en C<sub>22</sub> et C<sub>30</sub> en milieu non aqueux, avec des phases mobiles composées d'un solvant organique faible (MeOH, MeCN, propionitrile ou nitrométhane) et d'un solvant organique fort, tel que des solvants chlorés, acétone, THF ou propan-2-ol [16-17]. Pour certains de ces mélanges la force éluante a été déterminée en prenant comme référence la valeur de la sélectivité méthylène de l'acétonitrile pur.

D'autres mélanges binaires non aqueux ont été comparés de la même manière sur C<sub>18</sub>, tels que MeCN/THF, MeCN/AcOEt, MeCN/CHCl<sub>3</sub> ou MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [11,13, 18].

Comme la sélectivité varie avec la température [15,19], il en est de même pour la force éluante. Ceci a été montré en utilisant un mélange binaire H<sub>2</sub>O/MeOH sur une phase stationnaire pyrocarbone et en mode NARP sur PGC à haute température [20-21].

Par contre une telle détermination concernant l'effet de température sur la force éluante en mode NARP n'a jamais été réalisée sur des silices greffées en C<sub>18</sub>.

La détermination d'une échelle de force éluante en chromatographie liquide à polarité inversée de phases en milieu non aqueux (NARP) semble donc primordiale pour optimiser des séparations dans ces milieux.

L'optimisation des séparations en NARP peut se baser sur 3 étapes :

- Le choix d'un solvant faible qui va jouer sur la sélectivité
- Le choix d'un solvant fort qui va permettre d'éluer les solutés
- Le choix d'un troisième solvant, si nécessaire, pour moduler la séparation [9].

## V. Conclusion

Pour une phase stationnaire donnée, l'objectif majeur en chromatographie liquide est le choix d'une phase mobile permettant d'obtenir les meilleures séparations et sélectivités possibles.

Un classement des solvants en fonction de leur potentiel d'élution est donc nécessaire afin de maîtriser les séparations en chromatographie.

Le choix de la phase mobile peut se baser sur les différentes notions telles que la notion de force éluante détaillée précédemment mais aussi sur les paramètres de solubilité. Dans la première alternative les phases mobiles sont comparées en fonction de leur sélectivité hydrophobe donc implicitement en tenant compte de la nature de la phase stationnaire utilisée; dans le second cas les phases mobiles sont comparées à rétention identique donc en tenant compte du partage du soluté entre les deux phases du système chromatographique. Dans le premier cas l'isoéluance implique des rétentions différentes dans les deux phases mobiles. Dans le deuxième cas l'isoéluance implique des sélectivités différentes dans les deux phases mobiles. Dans la mesure où dans ce travail nous nous intéressons à la séparation de TAG constitués en grande partie d'homologues et d'isologues, nous avons privilégié pour choisir les phases mobiles l'échelle d'isoéluance déduite de la sélectivité méthylène car elle privilégie la séparation d'homologues.

Il a été montré que la force éluante des mélanges MeCN/BuOH à haute température est équivalente à celle des mélanges MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à température ambiante, sur une phase pyrocarbone [21].

Dans la mesure où les mélanges MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à température ambiante s'avèrent ceux offrant les meilleures sélectivités et résolutions pour l'analyse des TAG sur silice greffée C<sub>18</sub> [22,23], il nous a semblé intéressant de déterminer la force éluante de différents mélanges non aqueux, tels que MeCN/AcMe, MeCN/AcOEt et MeCN/BuOH à température élevée (domaine 25 - 80°C) sur de tels supports afin de trouver éventuellement des conditions alternatives

isoéluantes moins polluantes (remplacement du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , solvant chloré, par un solvant fort oxygéné) donnant les sélectivités les plus similaires sur de tels supports.

## VI. Références bibliographiques

- [1] J.H.Hidelbrand, R.L.Scott., Regular Solutions, *Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ* (1962), 20-23.
- [2] J.H.Hidelbrand, R.L.Scott, Regular and related solutions, *Van Nostrand-Reinhold, Princeton, NJ* (1970).
- [3] J.H.Hidelbrand, R.L.Scott, Solubility of Non-Electrolytes, (3<sup>rd</sup> Edn) *Dover Publications, New York*, (1964).
- [4] Z. L. Sun, M. C. Liu, Z. D. Hu, Relation between Retention Behavior and Molecular Structure in HPLC. Correlation between Solubility Parameter and Molecular Properties, *Chromatographia*, 38 (1994) 599-608.
- [5] J. Roire, Les Solvants, Collection "Contribution à la connaissance des peintures et des industries de dispersion", Editeur: EREC (Puteaux), (1988).
- [6] R.Tijssen, H. A. H. Billiet, P.J. Schoenmakers, Use of the solubility parameter for predicting selectivity and retention in chromatography, *J. of Chromatography*, 122 (1976) 185-203.
- [7] V. J. Barwick, Strategies for solvent- a literature review, *Trends in analytical chemistry*, 16 (1997) 293-309.
- [8] R.J. Lewis, L.B. Rogers and R.E. Pauls, Solvent selectivity in reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of isomers of polystyrene oligomers, *J. Chromatogr.*, 264 (1983) 339-354.
- [9] L.R. Snyder, Classification of the Solvent Properties of Common Liquids, *J. Chromatogr. Sci.*, 16 (1978) 223-234.
- [10] J.L. Glajch, J.J. Kirkland, K.M. Squire and J.M. Minor, optimization of solvent strength and selectivity for reversed-phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique, *J. Chromatogr.*, 199 (1980) 57-59.



- [11] H. Colin, G. Guiochon, Z. Yun, J.C. Diez-masa, P. Jandera, Selectivity for Homologous Series in Reversed-phase LC: III. Investigation of Non-specific Selectivity, *J.Chromatogr. Sci.*, 21 (1983), 179-184.
- [12] H.Colin, G. Guiochon, Selectivity for homologous Series in Reversed Phase Liquid Chromatography. I. Theory, *J. Chrom. Sci.*, 18 (1980) 54-63.
- [13] S. Heron, A. Tchaplá, Validité d'une notion de force éluante tenant compte de la nature de la silice greffée en chromatographie en phase liquide aqueuse et non aqueuse, *Analisis*, 25 (1997), 257-262.
- [14] H. Colin, G. Guiochon, Comparison of some packings for Reversed-Phase High-Performance Liquid-Solid Chromatography, *J. Chromatogr.* 158 (1978) 183-205.
- [15] A.Tchaplá, S.Heron, E.Lesellier, H.Colin, General view of molecular interaction mechanisms in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 656 (1993), 81-112.
- [16] M. Lisa, M. Holčápek, H. Sovová, Comparaison of various types of stationary phases in non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry of glycerolipids in blackcurrant oil and its enzymatic hydrolysis mixture, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 8371-8378.
- [17] T. Řezanka, J. Lukavský, L. Širistová, K. Šigler, Regioisomer separation and identification of triacylglycerols containing vaccenic and oleic acids, and  $\alpha$ - and  $\gamma$ - linolenic acids, in thermophilic cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Tolypothrix* sp, *Phytochemistry* 78 (2012) 147-155.
- [18] M. Martin, G. Thévenon, A. Tchaplá, Comparison of retention mechanisms of homologous series and triglycerides in non-aqueous reversed phase liquid chromatography, *J.Chromatogr.*, 452 (1988) 157-173.
- [19] S.Héron, A.Tchaplá, Reversible solvent and temperature induced "monomeric-like" - "polymeric-like" transitions in alkyl bonded silica. *Chromatographia*, 36 (1993) 11-18.
- [20] H. Colin, J.C. Diez-Masa, G. Guiochon, T. Czajkowska, I. Miedziak, The role of the temperature in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography using Pyrocarbon containing adsorbents, *J. Chromatogr.*, 167 (1978) 41-65.

[21] A. Hazotte, D. Libong, P. Chaminade, High-temperature micro liquid chromatography for lipid molecular species analysis with evaporative light scattering detection, *J. Chromatogr. A*, 1140 (2007) 131-139.

[22] S.Héron, A.Tchapla, Choix de la colonne et de la phase mobile pour la séparation en HPLC de triglycérides de corps gras. *Analisis*, 22 (1994) 114-126.

[23] S.Héron, A.Tchapla, Fingerprints of triacylglycerols from oils and fats by HPLC isocratic elution and evaporative light scattering detection ELSD SEDEX 45 Ed: Sédéré, Alfortville, France (1994).

## **Chapitre IV : Partie expérimentale**

### **I. Chromatographie en phase liquide**

#### **I.1. Appareillage**

##### **I.1.1. UHPLC-DEDL**

##### **I.1.2. UHPLC-ESI-MS**

#### **I.2. Solvants**

#### **I.3. Solutés**

#### **I.4. Méthodologie de travail**

### **II. Chromatographie en phase gazeuse**

#### **II.1. Appareillage**

#### **II.2. Mode opératoire**

### **III. Références bibliographiques**

## I. Chromatographie en Phase Liquide

### I.1. Appareillage

#### I.1.1. UHPLC-DEDL

Les analyses ont été réalisées en utilisant une chaîne UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) de la marque Agilent Technologies représentée sur la figure 1.



**Figure 1:** Chaîne UHPLC-DEDL.

La chaîne est composée de différents compartiments de la marque Agilent Technologies 1200 Series. Elle se compose d'un réservoir de solvants, d'une pompe binaire de modèle G1312B bin Pump SL, d'un système d'injection automatique G1367C Hip-ALSSL et d'un four de la marque Agilent Technologies 1200 Series. Lors des analyses en dessous de la température ambiante, on a utilisé un four externe qui permet de thermostatier en dessous de la température ambiante, ce que le four Agilent ne permet pas. Ce four, utilisé pour les « basses » températures, est de marque « CROCO-CIL ».

La chaîne contient un détecteur UV G1365C MWD SL mais lors des analyses on a utilisé un Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière (DEDL) SEDEX 85 SEDERE LT-ELSD extérieur à la chaîne qui a été relié via une interface 35900E.

La chaîne est pilotée par un système d'acquisition « chem station ».

Dans tous les systèmes de chromatographie en phase liquide, on trouve les mêmes éléments.

**a. Réservoir de solvants :**

C'est un compartiment qui contient les différents solvants utilisés comme phase mobile et qui sont reliés à la pompe. Ici la pompe est binaire, nous avons 2 voies utilisables.

**b. Pompe :**

Elle permet de faire une programmation de la composition de la phase mobile. Elle peut fonctionner suivant un mode isocratique, c'est-à-dire avec une composition constante de la phase mobile tout au long de l'analyse, ou bien en mode gradient où il y a une évolution de la composition de la phase mobile au cours de l'analyse.

**c. Système d'injection :**

L'injection doit se faire en un temps très bref pour ne pas perturber le régime d'écoulement dans la colonne. La difficulté consiste à introduire en tête de colonne un volume d'échantillon en maintenant constante la pression. Pour cela, on utilise une vanne haute pression à plusieurs voies (vanne à boucle d'injection).

Ce type de vanne peut être utilisé manuellement ou commandé par un passeur automatique d'échantillons (ce qui est notre cas).

Le principe de fonctionnement de ces vannes est le suivant :

L'échantillon est introduit avec une seringue dans la boucle en position de chargement (load) puis il est mis en contact avec la phase mobile en faisant une rotation de la vanne pour la mettre en position (inject).

Ce système permet d'éviter les variations brusques de pression dans la colonne.

**d. Colonne**

Les colonnes contenant la phase stationnaire utilisée lors des analyses en chromatographie liquide sont des colonnes en acier inoxydable. Au cours de notre étude nous avons utilisé des

colonnes de diamètre intérieur 2.1mm, de longueur 5 ou 10 cm et de différents diamètres de particules.

On trouvera dans le tableau 1 la liste des différentes colonnes utilisées au cours de notre étude.

Les capillaires de connexion utilisés pour relier l'injecteur à la colonne et la colonne au détecteur ont été choisis les plus courts et les plus étroits possibles afin de réduire les volumes morts extra-colonne.

**Tableau 1 :** Noms et géométrie des colonnes utilisées.

Désignation	Nom	Fabriquant	Numéro de série	L(cm)	dc(cm)	dp(µm)	V <sub>g</sub> (ml)	V <sub>0</sub> (ml)	Porosité(%)
<b>Halo1</b>	Halo C18	Advanced Materials Technology	USKL002723	5	0,21	2,7	0,173	0,109	63,1
<b>Halo2</b>	Halo C18	Advanced Materials Technology	USKL002725	5	0,21	2,7	0,173	0,108	62,5
<b>Kinetex 1</b>	Kinetex 1,7u C18 100A	Phenomenex	565730-79	5	0,21	1,7	0,173	0,133	76,8
<b>Kinetex 2</b>	Kinetex 1,7u C18 100A	Phenomenex	571654-29	5	0,21	1,7	0,173	0,133	76,6
<b>HSS 1</b>	Acquity UPLC HSS C18 1,8 µm	Waters	0121310601 55	5	0,21	1,8	0,173	0,0985	56,9
<b>HSS 2</b>	Acquity UPLC HSS C18 1,8 µm	Waters	0121310601 22	5	0,21	1,8	0,173	0,099	57,4
<b>BEH 1</b>	Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm	Waters	019031082157 89	5	0,21	1,7	0,173	0,144	83,3
<b>BEH 2</b>	Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm	Waters	019031082157 90	5	0,21	1,7	0,173	0,145	83,6
<b>C18-2</b>	Uptisphere strategy 100Å C18-2	Interchim	mfg #141847 C18 HQ100-1,7-8066	10	0,21	1,7	0,346	0,223	64,5
<b>Isis 2</b>	Nucleodur C18 Isis 1.8µm	Macherey-Nagel	E10102238	5	0,2	1,8	0,157	0,107	68,2
<b>Isis 3</b>	Nucleodur C18 Isis 1.8µm	Macherey-Nagel	E10102239	5	0,2	1,8	0,157	0,107	68,4

#### **e. Phases stationnaires :**

Il existe sur le marché de nombreuses phases stationnaires (cf chapitre II).

En chromatographie liquide à polarité inversée de phases (RPLC), la greffe utilisée est la plupart du temps une chaîne alkyle.

Dans notre étude, on a utilisé des phases stationnaires greffées avec 18 atomes de carbone (C<sub>18</sub>), excepté pour la Nucléodur C18 ISIS dont le greffage est mixte : des chaînes C<sub>18</sub> mais aussi des chaînes en C<sub>11</sub> comportant deux groupements hydroxyles (OH) en position 10 et 11.

Les phases Acquity UPLC HSS C18, Acquity UPLC BEH C18, Uptisphere Strategy C18-2 et Nucleodur C18 ISIS sont constituées de particules entièrement poreuses nommées (FPP : Full Porous Particles).

Les phases Halo C18 et Kinetex C18 sont des particules avec une coquille poreuse entourant un noyau non poreux. Elles sont appelées superficiellement poreuses (superficially porous particles : SPP), noyau fusionné (fused core particles), particules à noyau solide (Solid core particles : SCP) ou encore core-shell.

#### **f. Détecteur :**

Au cours de nos analyses, comme les triacylglycérols ne présentent pas de chromophore exploitable avec les différents solvants utilisés, on a utilisé un détecteur évaporatif à Diffusion de Lumière (DEDL). Il fonctionne en 3 grandes étapes :

- Nébulisation
- Evaporation
- Détection

Le principe consiste à mesurer l'intensité de la lumière diffusée par le composé élué rendu à l'état de particules solides après nébulisation et évaporation du solvant.

Le flux de l'éluant est nébulisé et les gouttelettes formées dans le nébuliseur sont entraînées par le flux de gaz. Les gouttelettes de phase mobile sont alors évaporées [1-2].

Les composés non volatils présents dans la vapeur du solvant sont portés par le flux de gaz dans la région de détection.



Dans cette zone, un faisceau de lumière croise la vapeur de particules. Les particules éclairées dévient la lumière en fonction de leur taille. L'intensité de la lumière est liée à la masse du composé élué. La lumière est détectée par la suite par le photomultiplicateur fixé à un angle donné de la lumière incidente.

Son mécanisme est traduit par la relation empirique :

$$A = a.m^b$$

Avec :

- A= Surface du pic chromatographique.
- m= La masse du composé.
- a= Facteur de réponse.
- b= Indice de réponse mesuré à partir de la pente de la courbe  $\log A = f(\log m)$ .

a et b dépendent de :

- La taille moyenne, la forme et la distribution des particules.
- La nature, la volatilité et la concentration de l'analyte.
- La nature de la phase mobile.
- La nature du gaz de nébulisation et son débit [1-2].

### **I.1.2. UHPLC-ESI-MS**

L'analyse a été réalisée en utilisant une chaîne UHPLC UltiMate 3000 system (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) représentée par la figure 2.

Les modules sont les mêmes que ceux décrits en UHPLC-DEDL.



**Figure 2 :** Chaîne UHPLC-ESI-MS.

Une deuxième pompe Hewlett Packard 1050 Series (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) est connectée à l'aide d'un connecteur en T et utilisée pour pomper le nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>) en post-colonne avec un débit de 0.15 mL/min.

Le détecteur utilisé est un spectromètre de masse Orbitrap Exactive (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) équipé d'une source électrospray (H-ESI). La température du capillaire est de 250°C et sa tension est de 82V. Le gaz utilisé est l'azote à un débit de 5 (unité arbitraire). La source ESI a été utilisée en mode positif et pour les analyses en mode fragmentation (HCD), l'énergie de collision était fixée à 50 eV.

Au cours des analyses, la gamme de masse utilisée est 545-1025 m/z.

Les chromatogrammes ont été enregistrés avec Xcalibur (Woburn, MA, USA).

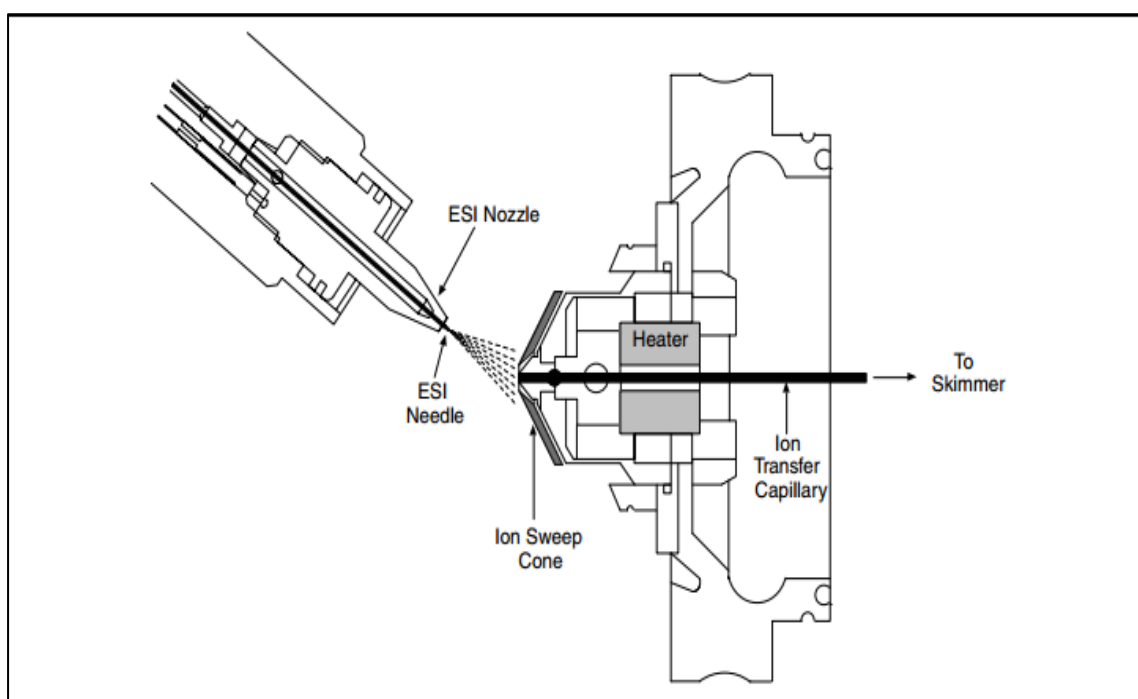
- **Principe d'une source électrospray (ESI) :** Une source électrospray permet de générer des ions en phase gazeuse sous l'effet d'un champ électrique à partir d'analytes qui se trouvent en solution à pression atmosphérique (figure 3).

Le phénomène de génération des ions produits sous l'effet d'un champ électrique intense est comme suit :

Tout d'abord, il y a production de gouttelettes chargées à partir d'analytes en solution par l'application d'une haute tension sur un capillaire métallique. Ensuite, les gouttelettes chargées fissionnent en gouttelettes plus petites appelés gouttelettes filles par explosions coulombiennes [3].

A la fin, il y a une émission des ions désolvatés en phase gazeuse.

L'application d'un champ électrique intense à la pointe du capillaire provoque une polarisation du liquide et une séparation des charges positives et négatives [3].



**Figure 3** : Schéma d'une source ESI-MS [3].

## I.2. Solvants

Tous les solvants utilisés sont des solvants de qualité HPLC. Ils proviennent de différents fournisseurs.

**Tableau 2** : Solvants utilisés en UHPLC.

Solvant	Fournisseur
Acétonitrile (MeCN)	J. T. Baker
Acétone (AcMe)	Merck
iso-Propanol (iPrOH)	Merck
Butanol (BuOH)	Merck
Acétate d'éthyle (AcOEt)	Merck
Chloroforme (CHCl <sub>3</sub> )	Merck
Méthanol (MeOH)	Merck

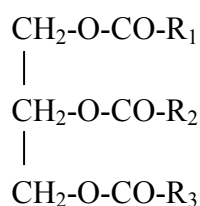
Ces solvants nous ont permis d'effectuer les différentes analyses en UHPLC, soit en mode isocratique, soit en mode gradient. Les mélanges ont toujours été réalisés avec la pompe afin de garder les erreurs de composition constante pour les différentes analyses.

## I.3. Solutés

Au cours de notre étude nous avons utilisé deux types de solutés. En premier lieu, nous avons utilisé une série de standards qui nous ont permis d'effectuer différents tracés. Ces standards sont des palmitates d'alkyle ou d'alkényle et des triacylglycérols (TAG) saturés et insaturés.

Les différents standards sont regroupés dans le tableau 3.

La formule générale d'un TAG est :



Si  $R_1 = R_2 = R_3$  il s'agit d'un TAG homogène

Si  $R_1 \neq R_2 \neq R_3$  il s'agit d'un TAG mixte

Et la formule abrégée des palmitates est:  $C_{15}COOR$

**Tableau 3 :** Listes des standards et de leurs formules abrégées.

Nom	Symbole	Formule abrégée
<b>Triglycérides insaturés</b>		
<b>Trilinoléine</b>	LnLnLn	$C_{18} :3 C_{18} :3 C_{18} :3$
<b>Trilinoléine</b>	LLL	$C_{18} :2 C_{18} :2 C_{18} :2$
<b>Trioléine</b>	OOO	$C_{18} :1 C_{18} :1 C_{18} :1$
<b>Triglycérides saturés</b>		
<b>Tricaproïne</b>	CoCoCo	$C_6 :0 C_6 :0 C_6 :0$
<b>Tricapryline</b>	CyCyCy	$C_8 :0 C_8 :0 C_8 :0$
<b>Tricaprine</b>	CCC	$C_{10} :0 C_{10} :0 C_{10} :0$
<b>Trilaurine</b>	LaLaLa	$C_{12} :0 C_{12} :0 C_{12} :0$
<b>Trimyristine</b>	MMM	$C_{14} :0 C_{14} :0 C_{14} :0$
<b>palmitates insaturés</b>		
<b>Palmitate de linoléyle</b>		$C_{15}COOC_{18} :2$
<b>Palmitate d'oléyle</b>		$C_{15}COOC_{18} :1$
<b>palmitate saturés</b>		
<b>Palmitate de myristyle</b>		$C_{15}COOC_{14}$
<b>Palmitate de palmityle</b>		$C_{15}COOC_{16}$

<b>Palmitate de stéaryle</b>	C15COOC18
<b>Palmitate d'arachidyle</b>	C15COOC20
<b>Palmitate de béhényle</b>	C15COOC22

En deuxième lieu, nous avons analysé différentes huiles d'origines végétales qui ont été soit achetées dans le commerce, soit fournies par l'Office National de l'Huile de la Tunisie (ONH).

Ces différentes huiles analysées sont regroupées dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Listes des huiles ou graines analysées.

<b>Code</b>	<b>Nom</b>	<b>Origine</b>
<b>Huiles « classiques »</b>		
<b>Calophyllum</b>	Calophyllum	Laboratoire de recherche Pierre Fabre
<b>Soja</b>	Soja <i>Glycine max</i>	Achetée au supermarché
<b><i>Pistacia Lentiscus</i></b>	<i>Pistacia Lentiscus</i>	Tunisie
<b>Huiles d'Olive</b>		
<b>ONH1- 11</b>	Huile d'olive	ONH
<b>Olive t1-t10</b>	Huile d'olive	ONH
<b>COI 13, 165, 162, 268, 141</b>	Huile d'olive	ONH
<b>Huiles avec des TAG particuliers</b>		
<b>Bois de Chine</b>	Bois de Chine (Tung) <i>Aleurites fordii</i>	Laverdure (Paris, France)
<b>Pépins de Cassis</b>	Pépins de Cassis <i>Ribes nigrum</i>	Laboratoire de recherche Pierre Fabre
<b>Grenade</b>	Grenade <i>Punica granatum</i>	Aroma-zone Paris, France
<b>Babassu</b>	Babassu <i>Orbignya oleifera</i>	Aroma-zone Paris, France

<i>Pinus Koraiensis</i>	<i>Pinus Koraiensis</i>	R.L. Wolff (ISTAB, Univ. Bordeaux I, Talence, France)
<i>Jacaranda mimosifolia</i>	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	Graines achetées chez Babygraines, France, extraite au LETIAM.
<i>Calendula officinalis</i>	<i>Calendula officinalis</i>	Graines achetées chez Babygraines, France, extraite au LETIAM.
<i>Catalpa ovata</i>	<i>Catalpa ovata</i>	Graines achetées chez Babygraines, France, extraite au LETIAM.
<i>Aquilegia Vulgaris</i>	<i>Aquilegia Vulgaris</i>	Graines achetées chez Babygraines, France, extraite au LETIAM.
<i>Cryptomeria japonica</i>	<i>Cryptomeria japonica</i>	Graines achetées chez Babygraines, France, extraite au LETIAM.
<i>Callistephus chinensis</i>	<i>Callistephus chinensis</i>	Graines achetées chez Babygraines, France, extraite au LETIAM.

Certaines huiles citées dans le tableau 4, ont été extraites à partir de graines en utilisant la méthode Folch.

L'huile est extraite à l'aide de la méthode de Folch [4] et modifiée par Bligh et Dyer [5]. Les graines sont mises dans l'eau bouillante pendant cinq minutes pour inactiver les phospholipases [6], ensuite elles sont finement broyées à l'aide d'un mortier. L'extraction est faite par un mélange chloroforme/méthanol (2:1 v:v) à raison de 5 ml pour 1g de tissus frais. L'eau de fixation est ajoutée à la fin de l'extraction pour éliminer les extraits non lipidiques. Le broyat est centrifugé à 3000 t/min pendant 15 minutes, la phase supérieure hydroalcoolique contient les substances non lipidiques et la phase inférieure organique renferme les lipides. Cette dernière est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur, le solvant est ensuite évaporé sous un courant d'azote [4-6].

## I.4. Méthodologie de travail

### a. Conditions opératoires

Pour analyser ces huiles, on a préparé des solutions dans un mélange MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50/50 v/v pour les analyses à température les plus «élevées» (25, 43, 63 et 85°C) et pour les plus basses températures (20, 15, 10°C) les solutions ont été préparées dans un mélange AcMe/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50/50 v/v afin de minimiser les problèmes d'insolubilité à «basse» température.

Ces analyses ont été réalisées sur la chaîne UHPLC à des débits que l'on précisera dans le chapitre résultats.

### b. Détermination de t<sub>0</sub>

Dans la littérature il existe différentes méthodes pour déterminer le temps de rétention du composé non retenu (t<sub>0</sub>) [7-8].

Dans notre étude on a utilisé la méthode de la double pesée. C'est une méthode qui consiste à équilibrer la colonne par deux solvants de masses volumiques très différentes (MeCN et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

#### Mode opératoire :

On a équilibré les différentes colonnes pendant une demi-heure dans un solvant (MeCN puis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) puis on pèse la colonne sur une balance de précision.

Pour le calcul de V<sub>0</sub> on utilise la formule suivante :

$$V_0 = \frac{m_1 - m_2}{\rho_1 - \rho_2}$$

Avec :

m<sub>1</sub> la masse de la colonne remplie de MeCN

m<sub>2</sub> la masse de la colonne remplie de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

ρ<sub>1</sub> la masse volumique de MeCN (1.3266 g/cm<sup>3</sup>)

ρ<sub>2</sub> la masse volumique de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.7857 g/cm<sup>3</sup>)



Pour la détermination de  $V_G$  on utilise la formule suivante :

$$V_G = \Pi \frac{d_c^2}{4} L$$

Et pour la porosité  $\varepsilon$  on utilise :

$$\varepsilon_T = \frac{V_0}{V_G}$$

Et

$$t_0 = \frac{V_0}{D}$$

Avec  $D$  = débit de la phase mobile

Les valeurs obtenues pour les différentes colonnes sont regroupées dans le tableau 1 au début de ce chapitre.

## **II. Chromatographie en phase gazeuse**

### **II.1. Appareillage**

Pour analyser les différentes huiles, nous les avons transestérifiées en effectuant une méthanolyse basique suivie d'une analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Le système utilisé est de la marque Thermo Scientific, Chromatographe Trace GC Ultra, il est représenté sur la figure 4.



**Figure 4:** Chaîne GC-MS.

La chaîne se compose de :

- Système d'injection manuel
- Colonne Simplicity-Wax 30m\*0.25mm\*0.25  $\mu\text{m}$
- Four
- Détecteur Mass DSQ II
- Système d'acquisition

Les appareils de chromatographie en phase gazeuse sont généralement équipés de différents compartiments qui sont :

**a. Système d'injection :**

Il permet d'introduire l'échantillon à analyser. L'injection peut se faire d'une manière manuelle avec une seringue ou à l'aide d'un passeur automatique d'échantillons.

Il existe trois principaux modes d'injections: split, splitless et on-column.

Au cours de nos analyses, nous avons utilisé le mode split.

L'injection en mode split est utilisée pour les échantillons concentrés. L'échantillon est vaporisé et mélangé avec le gaz vecteur, puis le mélange est divisé en deux parties.

La plus petite partie arrive vers la colonne, alors que la grande partie est évacuée.

Ce mode d'injection permet d'injecter des petites quantités d'échantillons concentrés sans dilution préalable.

**b. Colonne :**

La colonne utilisée est une colonne polaire, Simplicity-Wax de géométrie 30m x 0.25mm x 0.25µm.

**c. Four :**

Il permet de réaliser la programmation de température lors de l'analyse. Il est équipé d'un système de refroidissement rapide.

**d. Détecteur :**

Le détecteur utilisé au cours de nos analyses est un spectromètre de masse.

Une partie de l'échantillon est transformée en ions.

Ionisation : L'échantillon est porté à l'état gazeux ou liquide, il est ionisé dans la source de l'appareil.

Séparation : Les ions sont séparés par l'analyseur selon le rapport m/z.

Détection : Après séparation, les ions terminent leur trajet vers le détecteur.

## **II.2. Mode opératoire**

**a. Préparation des échantillons :**

On a utilisé le protocole de W.W. Christie adapté [9] pour la trans-estérification des huiles d'olive listées dans le tableau 4.

Dans un flacon de 2 ml, 1 mg de corps gras est mélangé à 40µL de tétrahydrofurane (THF) et 60 µL d'une solution de méthylate de sodium 0.2M dans l'hexane.

Le mélange est doucement agité pendant 15 minutes à température ambiante puis neutralisé par 10 µL d'acide sulfurique (1N) et 180 µL d'eau.

Les esters méthyliques d'acides gras formés sont extraits par 240  $\mu\text{L}$  d'Hexane. L'échantillon est centrifugé pendant 1 minute pour faciliter la séparation.

La phase hexanique est récupérée et diluée avec 200  $\mu\text{L}$  d'Hexane [9].

## **b. Analyse en GC/MS**

Les différentes caractéristiques de la méthode d'analyse sont :

- Programmation de la température :
  - Température initiale : 40°C
  - Température Finale : 250°C
  - Pente : 10°C /min
- Mode : Split
- Gaz vecteur : Hélium avec un débit de 1.3 ml/min
- Température de la source : 250°C
- Gamme de masse : De 35 à 500 m/z (2 scans/ seconde)
- Température de l'injecteur : 250°C

### III. Références bibliographiques

- [1] S. Héron, M.G. Maloumbi, M. Dreux, E. Verette, A. Tchaplà, Method development for a quantitative analysis performed without any standard using an evaporate light-scattering detector, *J. Chromatogr. A*, 1161 (2007) 152-156.
- [2] C. S. Young, J. W. Dolan, Success with Evaporative Light-Scattering Detection, *LC-GC Europe*, (2003) 2-5.
- [3] I. Manisali, D. D. Y. Chen, B. B. Schneider, Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future, *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (2006) 243-256.
- [4] J. Folch, M. Lees, G.M. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 497-509.
- [5] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem. Physiol*, 37 (1959) 911-917.
- [6] R. Douce, Identification et dosage de quelques glycerophosphospatides dans des souches normales et tumorales de scosoneres cultives in vitro, *C. R. Academic Science*, 259 (1964) 3066-3068.
- [7] A. M. Krstulovic H. Colin, G. Guiochon, Comparison of Methods Used for Determination of Void Volume in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 54 (1982) 2438-2443.
- [8] F. Riedo, E. Sz. Kovats, Adsorption from liquid mixture and liquid chromatography, *J. of Chromatography*, 239 (1982) 1-28.
- [9] W. W. Christie, Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis, *Advances in Lipid Methodology- Two*, (1993) 69-111.

## **Chapitre V : Etablissement d'échelles de force éluante en mode NARP.**

### **Détermination des meilleures conditions pour l'analyse des TAG de différentes huiles.**

- I. Introduction**
- II. Détermination du diagramme de force éluante**
  - II.1. Principe**
  - II.2. Démarche expérimentale**
  - II.3. Exploitation des résultats**
- III. Comparaison des conditions isoéluantes**
  - III.1. Choix des huiles**
  - III.2. Choix de la valeur de la force éluante de travail**
  - III.3. Comparaison des chromatogrammes obtenus dans des conditions isoéluantes**
- IV. Conclusion**
- V. Références bibliographiques**

## I. Introduction

Comme cela a été dit précédemment, l'analyse des triacylglycérols se fait en milieu non aqueux (NARP) en utilisant comme phase mobile un solvant faible associé à un solvant fort. La séparation optimale est très souvent obtenue en utilisant comme solvant fort un solvant chloré.

L'objectif de la première partie de notre travail a été de rechercher des solvants forts alternatifs aux solvants chlorés tout en gardant des sélectivités proches de celles obtenues avec ces solvants.

Pour cela, nous avons étudié différents solvants forts, détaillés plus loin dans le manuscrit. Nous avons aussi associé au choix de la composition de phase mobile une étude à température variable (dans un domaine de 25°C à 85°C) et testé une nouvelle génération de phases stationnaires à base de silice greffée C<sub>18</sub> sub 2µm ou pelliculaires.

Pour effectuer la comparaison, il existe trois façons de procéder:

- Soit, pour une phase stationnaire fixée, prendre une phase mobile de même composition volumétrique binaire solvant fort - solvant faible mais constituée d'une paire de solvants différents. L'inconvénient de cette méthode est qu'avec de très grandes probabilités les valeurs et l'étendue des facteurs de rétention des solutés seront très différentes, ce qui rend la comparaison difficile.
- Soit trouver des conditions de phases stationnaires isoéluantes: c'est-à-dire en changeant de phase stationnaire connaître la (ou les) composition(s) spécifique(s) binaire(s) de phase mobile qui doi(ven)t la percoler pour que cela conduise à l'obtention de facteurs de rétention voisins pour chacun des solutés pour chaque nouveau couple phase stationnaire-phase mobile utilisé quand on passe d'un système chromatographique à un autre [1]. Pour cela il faut préalablement connaître deux paramètres thermodynamiques p et q du nouveau système chromatographique utilisé. L'obtention de ces deux paramètres peut être le fruit d'une recherche bibliographique ou doit être conduite expérimentalement. Ceci n'a pas été l'objet du travail que nous avons effectué dans cette thèse.
- Enfin, pour une phase stationnaire fixée, travailler dans des conditions isoéluantes. Pour cela elle devra être percolée par une phase mobile de

composition volumétrique solvant fort - solvant faible différente de la composition initiale et constituée par une paire de solvants différents. La composition de ce nouveau binaire sera telle qu'elle conduise à l'obtention de facteurs de rétention voisins pour chacun des solutés pour chaque nouvelle phase mobile utilisée. Par contre les sélectivités relatives seront différentes. Cette méthodologie correspond à la démarche de P.J. Schoenmakers, jusqu'à présent essentiellement utilisée en milieu aqueux [2].

Dans la suite de notre travail, nous avons repris la démarche de Schoenmakers en l'appliquant aux milieux non aqueux (NARP).

Nous avons donc déterminé la force éluante de différentes phases mobiles binaires non aqueuses à différentes températures et établi un diagramme de force éluante. Un tel diagramme permettra de déterminer facilement la composition de phase mobile à utiliser pour garder les rétentions sensiblement constantes lors d'un changement de composition de phase mobile, tout en conduisant à des sélectivités différentes. Il permettra de comparer le potentiel séparatif des différentes phases mobiles conduisant à des conditions isoéluantes et par suite de sélectionner simultanément le meilleur couple [phase stationnaire - phase mobile] et la meilleure température d'analyse, pour un mélange donné en fonction du critère de choix principal à prendre en compte pour l'analyse à effectuer. Ce critère de choix pourra être par exemple : soit la séparation optimale de la paire de pics la moins bien séparée, soit la meilleure séparation globale de l'ensemble des pics d'un mélange ou encore le temps d'analyse le plus court possible en gardant une sélectivité minimale pour une paire de pics donnée.

## **II. Détermination du diagramme de force éluante**

### **II.1. Principe**

Comme décrit dans le chapitre précédent, la détermination de la force éluante  $\varepsilon_0$  d'une phase mobile est basée sur la détermination de la sélectivité méthylène. Elle s'obtient à partir de la formule suivante:

$$\varepsilon^0 = (\log \alpha_{référence} - \log \alpha) / \Delta Vn \quad (1)$$



Avec :

- $\log \alpha_{\text{référence}}$  = logarithme de la sélectivité méthylène du solvant utilisé comme référence
- $\Delta V_n$  = volume d'un groupement méthylène = 0.168 d'après les travaux de Colin et al [3].

Afin d'avoir une force éluante positive, la référence utilisée dans la littérature pour les mélanges hydro-organiques est la sélectivité méthylène de la phase mobile la plus rétentive, donc dans le solvant faible pur à savoir l'eau.

Dans notre travail, nous aurons à analyser des triacylglycérols (TAG) qui sont insolubles dans l'eau. Travaillant en chromatographie liquide à polarité inversée de phases en milieu non aqueux (NARP) le solvant le plus rétentif, à savoir le solvant faible, est l'acétonitrile (MeCN). Nous avons donc choisi comme référence la sélectivité méthylène dans ce solvant (MeCN) pour établir l'échelle des forces éluantes en NARP.

La force éluante sera alors déduite par analogie de la formule (1) en utilisant la formule (2) suivante:

$$\varepsilon^0 = (\log \alpha_{\text{MeCN}} - \log \alpha) / \Delta V_n \quad (2)$$

Par la suite, pour pouvoir comparer les résultats avec la littérature et obtenir une échelle de force éluante continue entre les milieux partiellement aqueux et les milieux non aqueux nous avons effectué un décalage d'origine. Pour cela, à chacune des valeurs de  $\varepsilon_0$  déterminée par la formule (2) nous rajouterons une valeur égale à 2.75 qui est égale à la valeur de la force éluante de l'acétonitrile pur [4].

En conclusion, la détermination de la force éluante revient à obtenir des valeurs numériques de sélectivité méthylène sous la forme mathématique  $\log \alpha$  qui n'est autre que le logarithme de la sélectivité méthylène. Cela correspond à déterminer la pente de la variation de  $\log k$  en fonction du nombre d'atomes de carbones d'une série homologue.

## II.2. Démarche expérimentale

Nous avons déterminé le diagramme de force éluante à différentes températures (25, 43, 63 et 85°C). Ces valeurs ont été choisies car elles conduisent à un écart constant en  $1/T$ . Elles correspondent à un domaine où les phases stationnaires sont stables et dans lequel les triacylglycérols sont encore suffisamment solubles dans les différentes phases mobiles.

Pour ces différentes températures, nous avons utilisé différents mélanges binaires.

Comme solvant faible, nous avons le choix selon la littérature entre l'acétonitrile ou le méthanol qui ont été généralement utilisés pour l'analyse des TAG en NARP [3, 5,6]. Dans notre étude nous avons choisi l'acétonitrile parce qu'il permet d'obtenir de meilleures sélectivités que le méthanol [7,8].

Pour le solvant fort :

- nous avons utilisé l'acétone (AcMe), l'iso-Propanol (iPrOH) et l'acétate d'éthyle (AcOEt) qui ont déjà été utilisés dans d'autres études principalement dédiées à un ou deux types d'huiles [5,6 et références du chapitre bibliographique 3]. Aucune généralisation n'a été effectuée sur un plus grand panel d'huiles constituées par des TAG de structures variables.

- enfin, nous avons aussi testé le butanol (BuOH) comme solvant fort. Le choix de ce solvant a été fait suite aux travaux d'Aurélien Hazotte qui a obtenu à haute température (températures supérieures à 100°C) des rétentions équivalentes à celles obtenues avec les solvants chlorés à température ambiante [9]. Cette étude ayant été réalisée sur une phase stationnaire en carbone graphite poreux, nous avons voulu voir le comportement de ce modificateur polaire sur la séparation en utilisant pour notre part un support en silice greffée.

De précédentes études effectuées au laboratoire ont montré que des mélanges MeCN / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> offraient les meilleures séparations [7, 8, 10]. Nous avons donc utilisé ce mélange comme référence de base à 25°C.

Nous avons injecté des TAG saturés (CoCoCo, CyCyCy, CCC, LaLaLa et MMM), homologues qui nous ont permis de tracer le diagramme de force éluante.

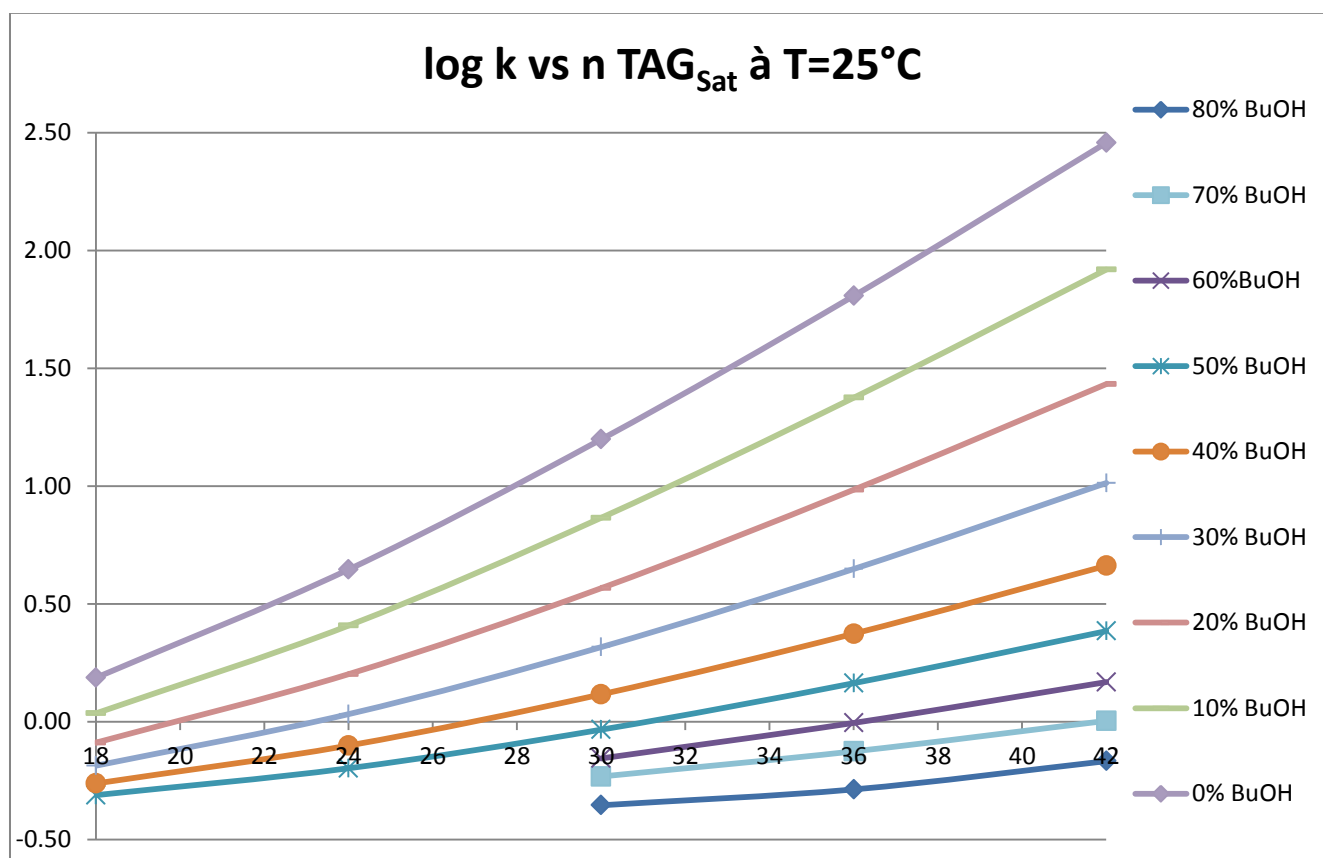
En parallèle nous avons injecté une deuxième série homologue: les palmitates de n-alkyle (POR), constituants majeur des cires, (C15COOC14, C15COOC16, C15COOC18, C15COOC20, C15COOC22). Ces deux séries homologues ont été injectées dans les mêmes conditions de composition de phase mobile et de température afin de pouvoir discuter de

l'influence éventuelle de la nature des standards pris en référence pour l'établissement de ce diagramme.

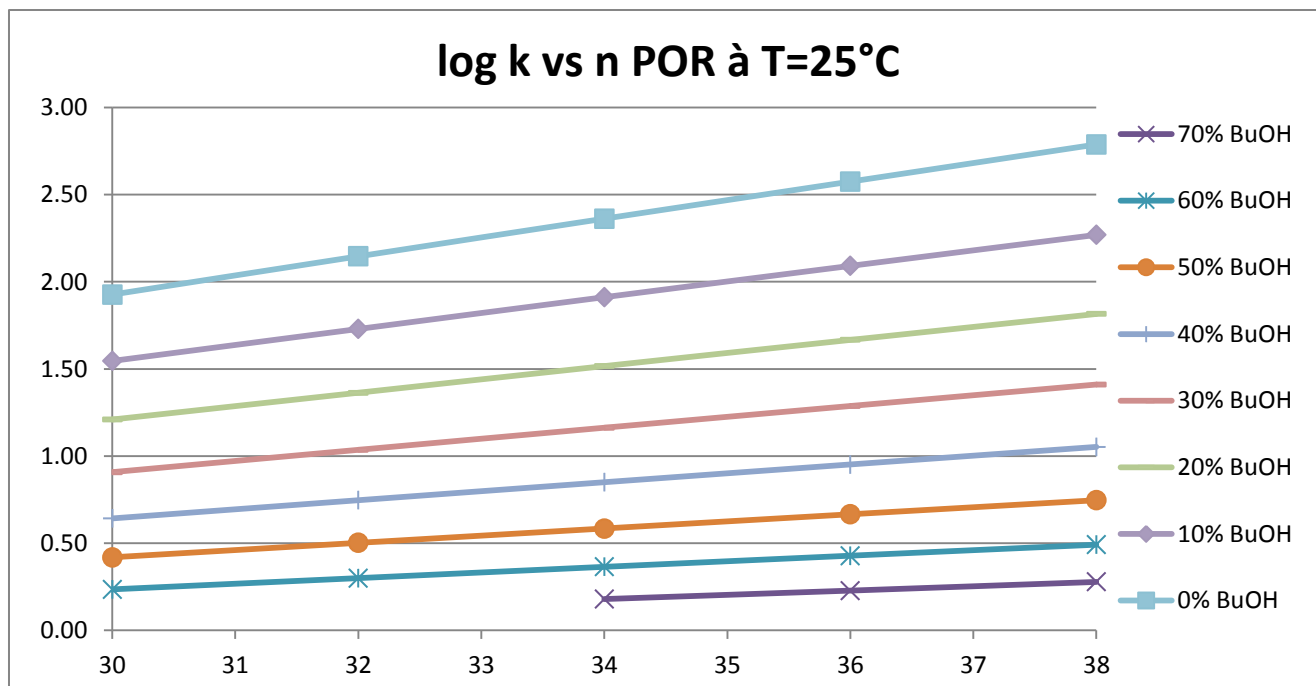
### II.3. Exploitations des résultats

Ces analyses nous ont permis de tracer, en premier lieu, la variation de  $\log k$  en fonction de  $n$  (nombre d'atomes de carbone) pour les TAG et les palmitates de  $n$  alkyle pour les 4 mélanges binaires sélectionnés: MeCN/AcMe, MeCN/iPrOH, MeCN/AcOEt et MeCN/BuOH à différentes températures (25, 43, 63 et 85°C).

Les figures 1 et 2 représentent respectivement un exemple de la variation de  $\log k = f(n)$  pour les TAG et les palmitates d'alkyle pour les binaires MeCN/BuOH de 100/0 à 20/80 (%v/v) réalisée à 25°C.



**Figure 1** : Variation de  $\log k$  des TAG saturés en fonction du nombre de carbone pour le mélange binaire MeCN/BuOH à 25°C.



**Figure 2 :** Variation de log k des palmitate d'alkyle en fonction du nombre de carbone pour le mélange binaire MeCN/BuOH à 25°C.

Ce type de tracé a été effectué pour toutes les combinaisons phases mobiles binaires – température étudiées.

La pente des courbes  $\log k = f(n)$  représente le logarithme de la sélectivité méthylène.

En effet, entre deux homologues qui diffèrent par un seul groupement  $\text{CH}_2$ , la pente est donnée comme suit:

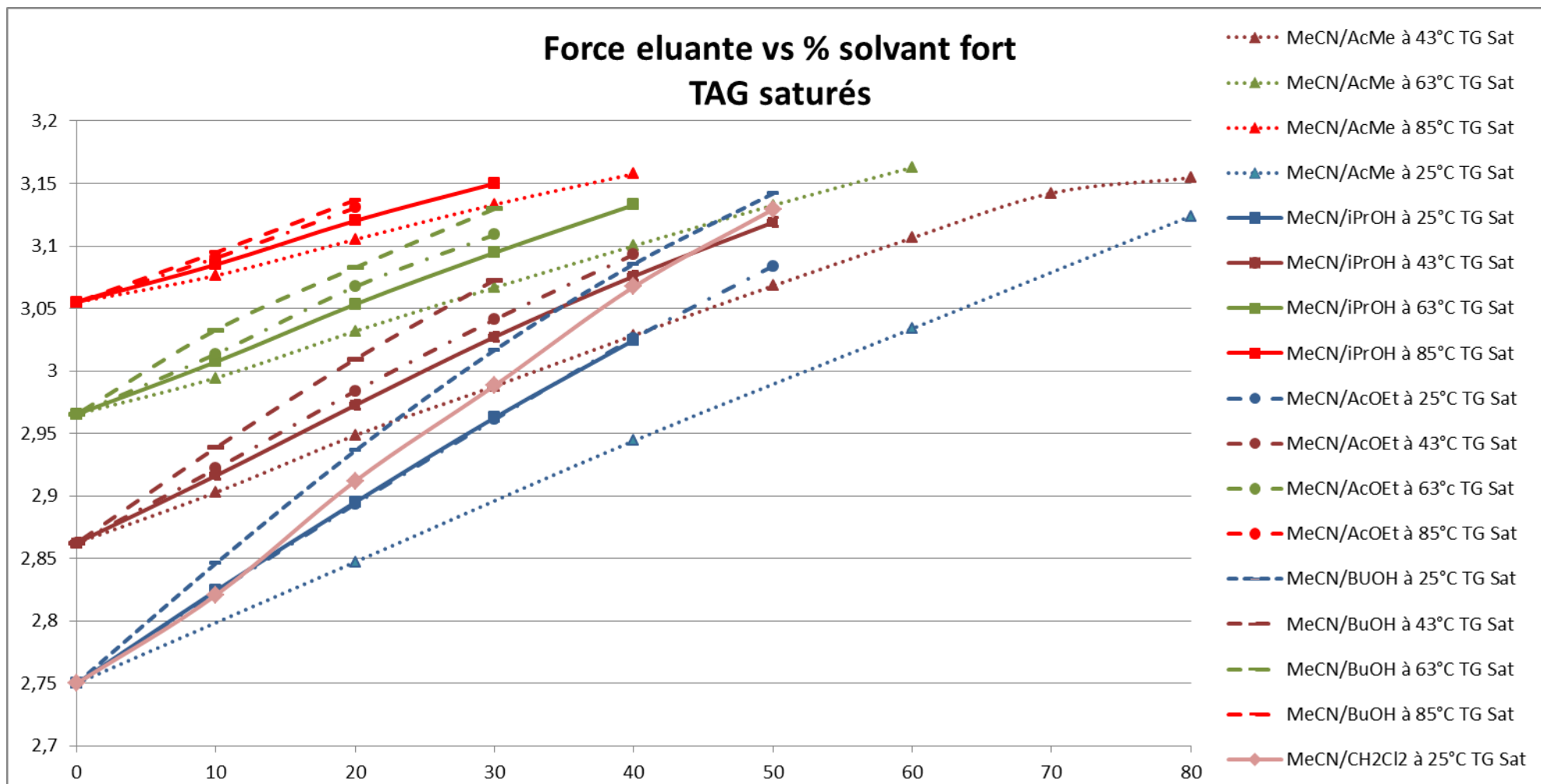
$$Pente = \frac{\log k_2 - \log k_1}{(n_1 + 1) - n_1} \quad (3)$$

$$Pente = \log \frac{k_2}{k_1} / 1 \quad (4)$$

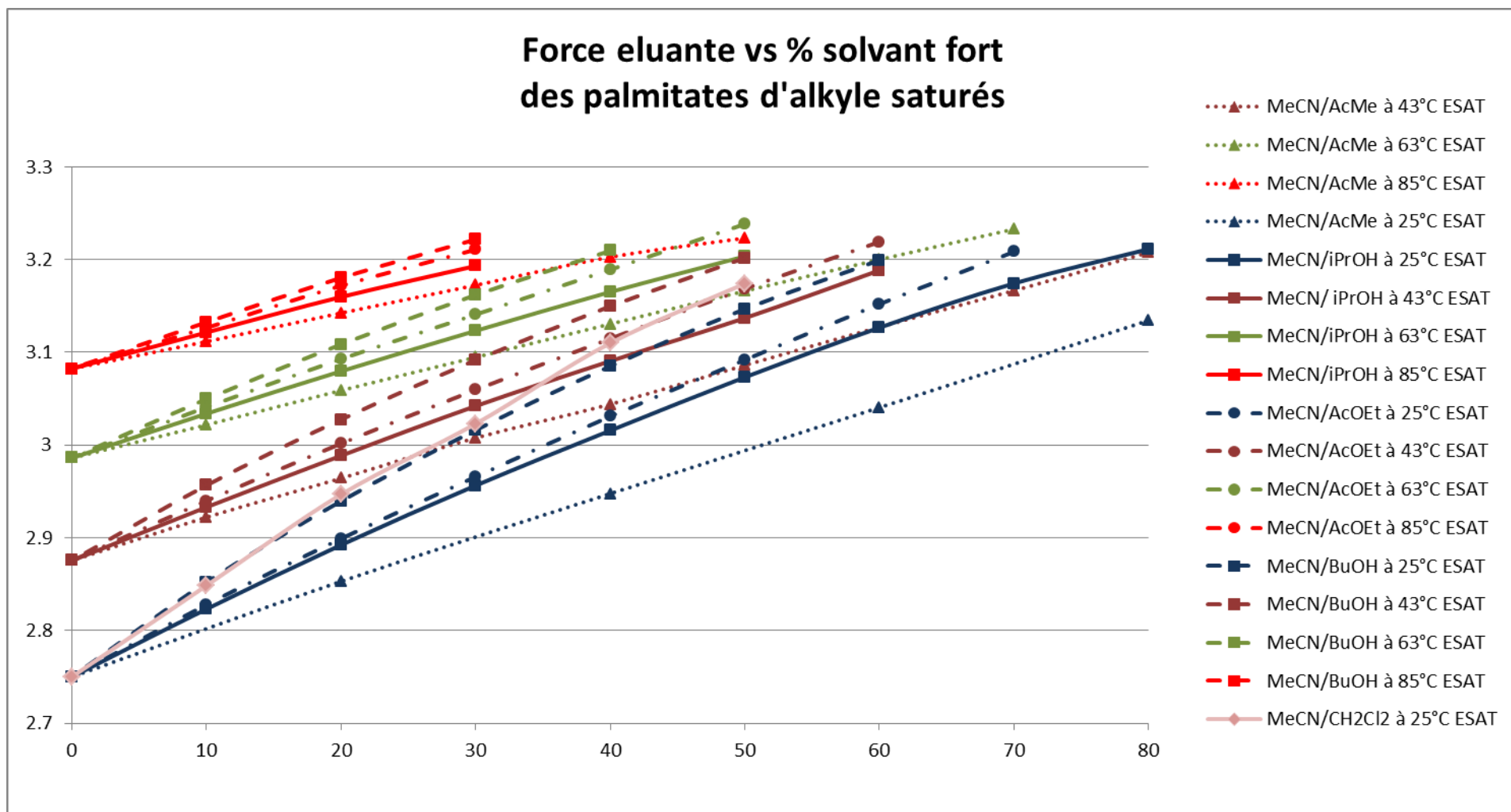
$$Pente = \log \alpha \quad (5)$$

Une fois cette détermination faite, nous avons déterminé la force éluante pour les différentes compositions de phase mobile à différentes températures en utilisant la formule (2) citée précédemment. Nous avons tracé la variation de la force éluante en fonction du pourcentage du solvant fort pour les différentes compositions de phase mobile à différentes températures pour les TAG et les palmitates d'alkyle.

Les 2 graphes obtenus sont représentés sur les figures 3 et 4.



**Figure 3:** Variation de la force éluante en fonction du pourcentage du solvant fort calculée à partir des TAG saturés.



**Figure 4 :** Variation de la force éluante en fonction du pourcentage du solvant fort calculée à partir des palmitates d'alkyle saturés.

Le diagramme de force éluante en fonction du pourcentage du solvant fort se présente sous la forme de 4 fuseaux différents. Un fuseau a été observé pour chaque température (25, 43, 63 et 85°C) conformément à ce que l'équation (2) laissait prévoir puisque la valeur initiale correspond pour chaque binaire à la même sélectivité de l'acétonitrile pur à la température à laquelle la détermination a été faite.

Comme attendu, l'élévation de la température augmente la force éluante. Les 4 fuseaux se décalent vers les valeurs de force éluante de plus en plus haute en fonction de la température à laquelle  $\epsilon_0$  a été déterminée, en conformité avec la théorie chromatographique puisque la sélectivité méthylène diminue avec la température [11].

Les solvants forts étudiés n'ayant pas les mêmes propriétés physico-chimiques (énergies de cohésion de Van der Waals), il est normal que dans un fuseau donné à une température donnée les tracés pour chacun des modificateurs organiques ne se superposent pas.

Le tracé correspondant au binaire MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à 25°C présente la pente la plus importante; l'effet du chlorure de méthylène sur l'augmentation de la force éluante est donc plus important que celui des autres solvants forts.

L'isopropanol (-) et l'acétate d'éthyle (- · -) ont une force éluante très proche à 25 °C, la différence s'accroissant avec l'augmentation de température. Les mélanges constitués d'acétate d'éthyle deviennent alors plus éluants que ceux contenant de l'isopropanol. Il sera donc intéressant de comparer les sélectivités de ces deux phases mobiles dans la suite de ce travail.

Il faut beaucoup moins de butanol que d'acétone pour obtenir une même force éluante. Le butanol est donc le solvant le plus fort et l'acétone le moins fort des 4.

Quelle que soit la température, le classement est le suivant:

Force éluante croissante: acétone < iso propanol ~ acétate d'éthyle < butanol.

La figure 5 superpose le diagramme obtenu à partir des triacylglycérols et celui obtenu à partir des palmitates d'alkyle.

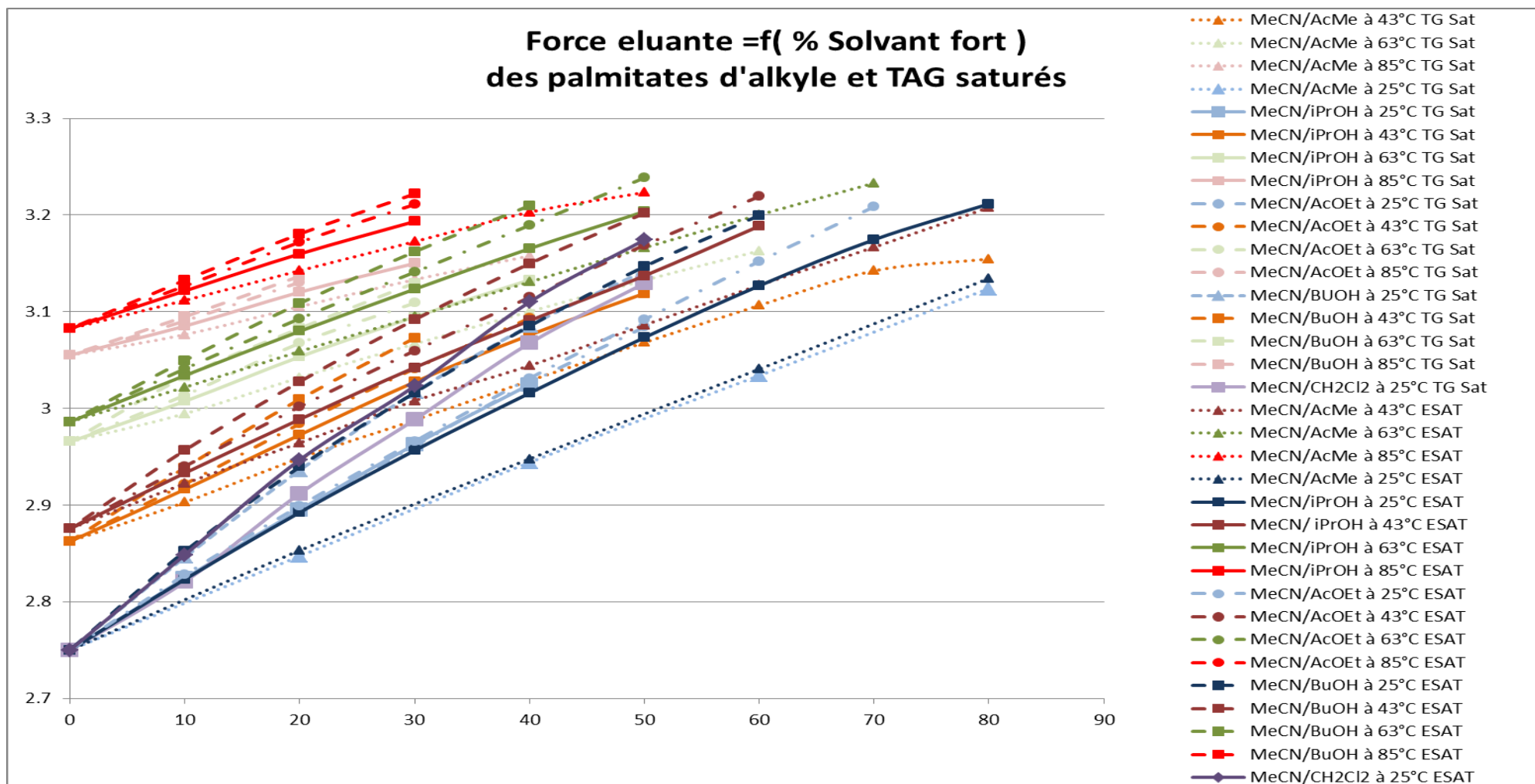
Les fuseaux de variation de la force éluante à 25°C sont presque superposables, mais l'écart s'accroît quand la température augmente et on enregistre une force éluante plus élevée pour les palmitates d'alkyle que pour les triacylglycérols.



Les valeurs des  $n_c$  des deux types de sonde sont différentes. En conséquence, la sélectivité méthylène est plus faible pour les palmitates d'alkyle que pour les triacylglycérols car pour les esters le  $\alpha$  est un  $\alpha_{out}$  alors que pour les TAG c'est un  $\alpha_{in}$  [12].

Dans ce cas la force éluante calculée est, à même température, plus forte pour les palmitates d'alkyle que pour les TAG.

On a donc deux alternatives : soit on prend la moyenne des 2 valeurs, soit on prend celle issue des TAG. Nous avons choisi la deuxième alternative car cela correspondra beaucoup plus à des longueurs de chaînes des TAG que l'on a à séparer en NARP.



**Figure 5 :** Comparaison de la variation de force éluante en fonction du pourcentage du solvant fort calculée à partir des palmitates d'alkyle et des TAG saturés.

### III. Comparaison de conditions isoéluantes

Comme cela a été montré par Colin *et al* [3], si on garde une force éluante constante, le changement de la nature du solvant fort conduit à des modifications de sélectivité.

Nous allons donc utiliser le diagramme de force éluante mis au point ci-dessus pour comparer des séparations obtenues dans les différents mélanges binaires testés.

Comme cela a été montré dans le chapitre bibliographique sur l'analyse des triacylglycérols, les différents solvants forts étudiés ont été proposés pour la séparation de corps gras et d'huiles de composition très différente. Parmi toutes ces études, dans les années 1990-2000, il a été démontré qu'en général, à 25°C, le meilleur binaire à utiliser est un binaire MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Par suite l'optimisation de la composition du seul binaire MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> qui doit respectivement percoler 3 types de phases stationnaires différentes (à savoir: des silices greffées C<sub>18</sub> en monocouche dense ou polycouches verticales désorganisées ou enfin C<sub>22</sub> en monocouche) pour obtenir la meilleure séparation, en fonction de la structure de leurs TAG constitutifs (saturés, monoinsaturés, polyinsaturés conjugués ou alternés), a été menée [7,8]. Cependant, aucune étude systématique n'a été effectuée afin de déterminer la nature, la composition du mélange binaire et la température optimisées auxquelles il faut travailler. En effet, ces conditions sont différentes en fonction de la catégorie d'huiles ou de corps gras (c'est-à-dire possédant des TAG de structure différente) dont on veut déterminer la composition.

Un de nos objectifs a donc été de faire cette comparaison.

#### III.1. Choix des huiles

Nous avons choisi d'analyser plusieurs huiles complémentaires d'un point de vue de la composition en TAG. Elles sont réparties en 3 groupes.

Les huiles de calophyllum, d'olive, de soja et de Pistacia Lentiscus contiennent principalement des TAG constitués d'acides gras «classiques»: P, Po, S, O, L, Ln. Ces 4 huiles constituent donc un premier groupe d'huiles.

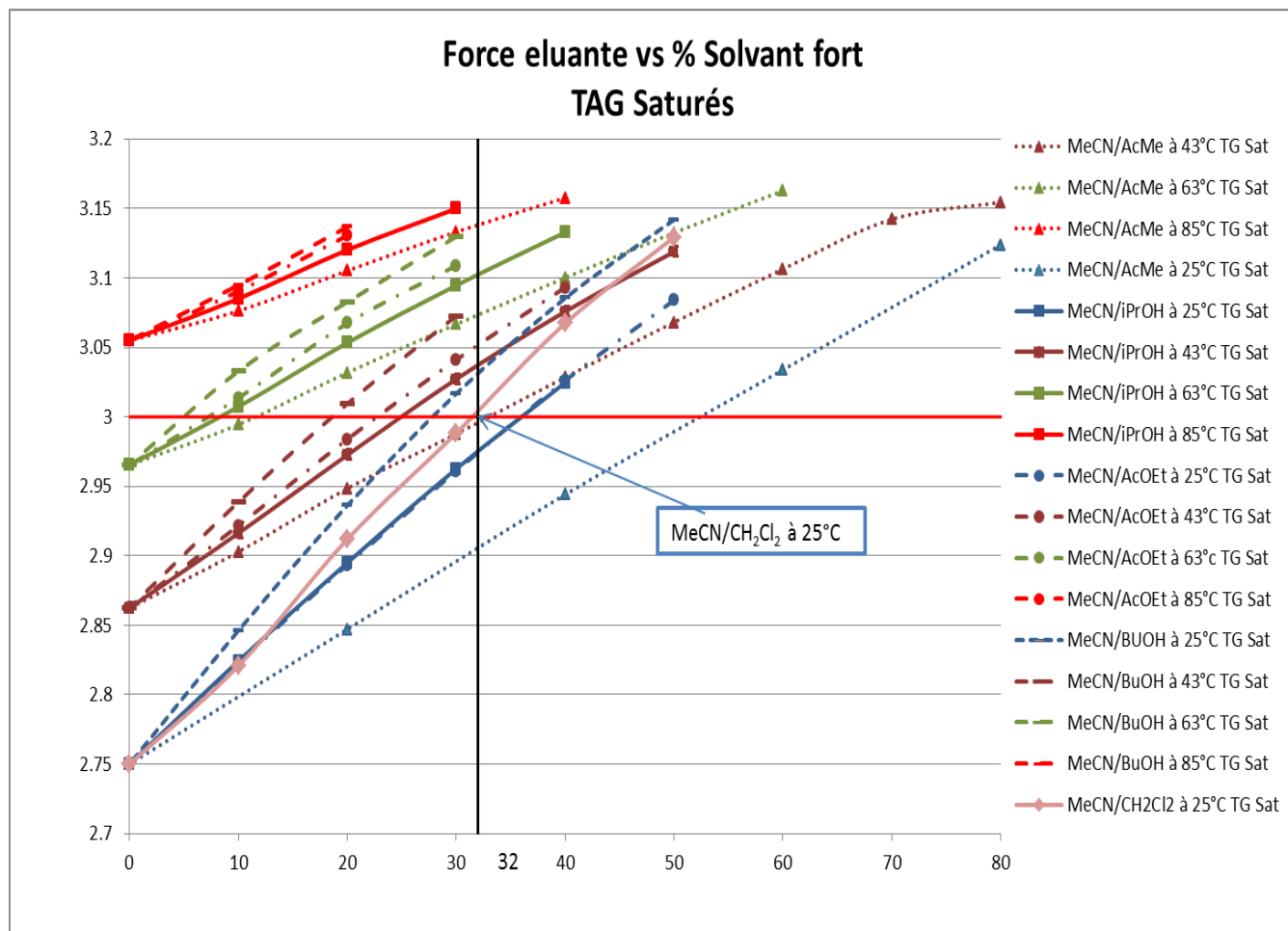
Les huiles de pépins de cassis, bois de Chine, Pinus Koraiensis et grenade constituent une seconde catégorie. Les TAG principaux sont majoritairement constitués d'acides gras polyinsaturés en C18:3, les 3 doubles liaisons étant situées à différents endroits de la chaîne.

Enfin, l'huile de Babassu constituée de TAG saturés.

### III.2. Choix de la valeur de force éluante de travail

De précédentes études effectuées au laboratoire ont montré que le mélange MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 68/32 à 25°C offrait de très bonnes séparations pour de nombreuses huiles [4, 7, 10].

Nous avons donc pris la force éluante de ce mélange en référence.



**Figure 6:** Explication de l'obtention des différentes conditions à l'isoéluance.

La figure 6 permet de montrer que l'on obtient alors pour ce mélange binaire une force éluante égale à 3,015 donc ~3.0. Les valeurs des facteurs de rétention des TAG les moins retenus sont de l'ordre de 4-5 ce qui permet d'avoir des conditions acceptables pour l'ensembles des TAG de toutes les huiles aussi bien du point de vue séparation que temps d'analyse.

A 85°C tous les binaires ont une force éluante plus élevée. Aucun d'entre eux n'est donc équivalent au mélange MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à 25°C. Dans la suite de notre travail, nous avons donc

utilisé les mélanges binaires correspondant à l'intersection des fuseaux obtenus à 25, 43 et 63°C avec l'horizontale rouge tracée pour une valeur de  $\epsilon_0=3$ . Ces valeurs sont reportées dans le tableau suivant.

**Tableau 1:** Compositions isoéluotropiques correspondant à une force éluante égale à 3.

<b>Phase mobile</b>	<b>Composition (%V/%V)</b>	<b>Température (°C)</b>
<b>MeCN/AcMe</b>	50/50	25
<b>MeCN/iPrOH</b>	66/34	25
<b>MeCN/AcOEt</b>	66/34	25
<b>MeCN/BuOH</b>	74/26	25
<b>MeCN/AcMe</b>	69/31	43
<b>MeCN/iPrOH</b>	77/23	43
<b>MeCN/AcOEt</b>	79/21	43
<b>MeCN/BuOH</b>	83/17	43
<b>MeCN/AcMe</b>	92/08	63
<b>MeCN/iPrOH</b>	94/06	63
<b>MeCN/AcOEt</b>	95/05	63
<b>MeCN/BuOH</b>	96/04	63

Afin de travailler dans les meilleures conditions, nous avons choisi de travailler au débit optimum.

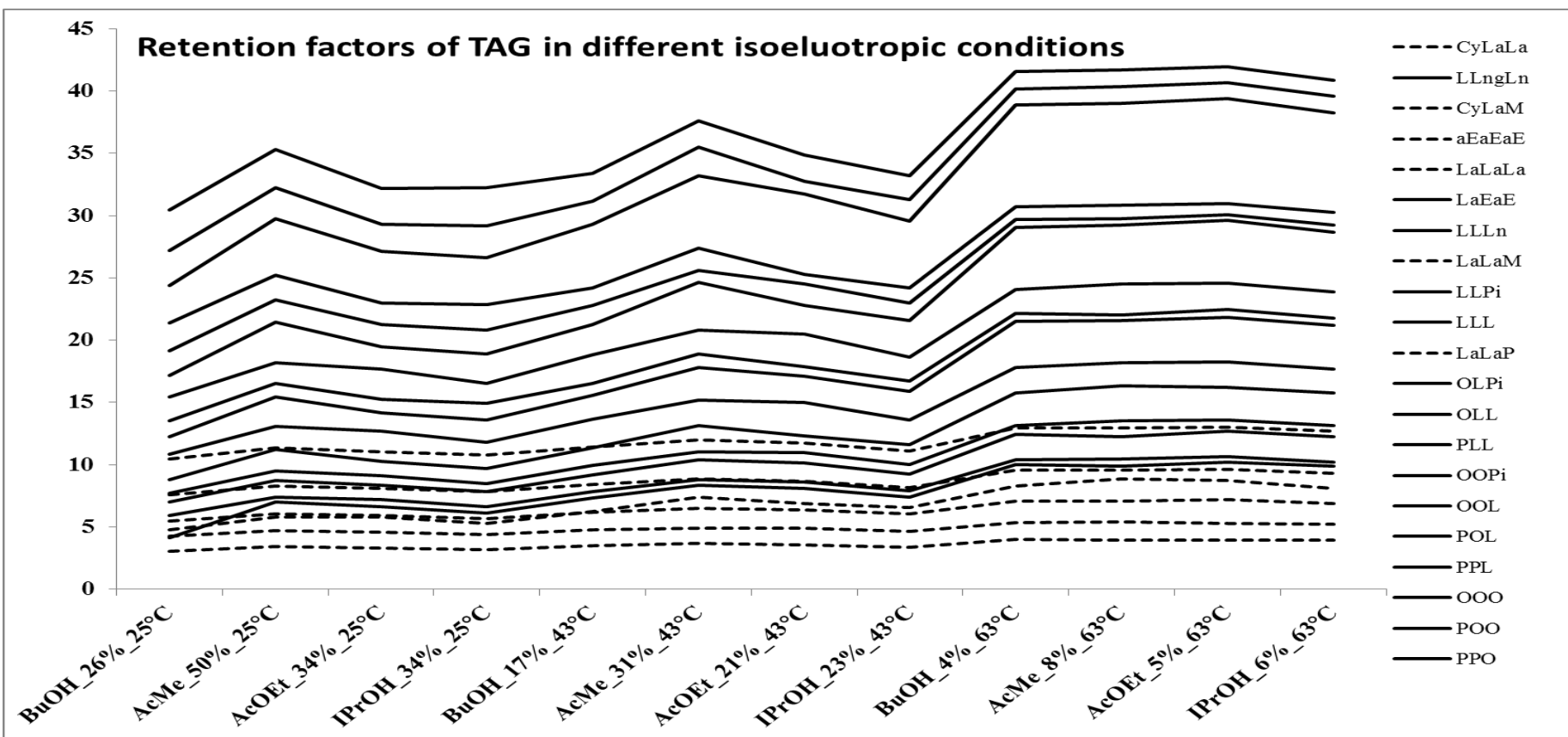
Une étude préliminaire sur l'efficacité des systèmes (non montré ici) nous a permis de voir que plus le TAG avait un facteur de rétention élevé, plus le débit optimum se décalait vers les fortes valeurs.

Ainsi, un débit de 0.15 mL/min a été retenu pour analyser les huiles possédant des TAG polyinsaturés et un débit de 0.25 mL/min pour les huiles possédant des TAG classiques, plus retenus, afin de gagner en temps d'analyse.

Chacune des huiles précédemment listées a été injectée dans ces différentes conditions.

Les différents chromatogrammes sont regroupés en Annexe 1.

Pour chacune de ces conditions, nous avons reporté les facteurs de rétention  $k$  des différents TAG constitutifs des huiles analysées. Cette variation est représentée sur la figure 7.



**Figure 7:** Facteurs de rétention des TAG pour des différentes phases mobiles isoéluantes.

Pour un TAG donné, globalement les 12 valeurs de facteurs de rétention obtenus dans les 12 conditions isoéluantes sont proches les unes des autres. A 63°C les valeurs sont légèrement plus grandes que pour les autres températures. En fait, à cette température les pourcentages nécessaires en solvant fort sont inférieurs à 10 % et ne sont pas des valeurs entières (exemple 5.3%). Nous avons ainsi arrondi à l'unité la plus proche (8, 6, 5 ou 4% voir tableau 1) ce qui peut donc expliquer les légères différences observées.

La différence observée entre les facteurs de rétention pour les TAG insaturés (tracés en traits pleins) est plus accentuée que pour les TAG saturés (tracés en pointillés). Cela est accord avec la définition de la force éluante qui est basée sur la détermination du logarithme de la sélectivité méthylène, donc sur des TAG saturés et qui conduit à de subtiles modifications de rétention pour les solutés polaires ou polarisables lorsqu'on change de modificateur organique.

Par conséquent, l'échelle de force éluante établie est particulièrement bien adaptée à l'étude de la rétention des TAG présents dans les huiles ou graisses.

### **III.3. Comparaison des chromatogrammes obtenus dans des conditions isoéluantes**

Afin de comparer les 9 huiles dans les 12 conditions, nous avons utilisé différents critères qualifiant la totalité du chromatogramme.

Les 12 conditions étant isoéluotropes, les temps d'analyse sont du même ordre de grandeur ce qui permet la comparaison.

Le premier critère de comparaison est le dénombrement des pics et des épaulements.

Les résultats sont reportés dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Nombre de pics observés dans chacune des huiles dans les 12 conditions isoéluantes.

Huiles	Solvant fort	BuO H	AcMe	AcOE t	iPrO H	BuO H	AcMe	AcOE t	iPrO H	BuO H	AcMe	AcOE t	iPrO H
	<b>Pourcentage du solvant fort</b>	<b>26%</b>	<b>50%</b>	<b>34%</b>	<b>34%</b>	<b>17%</b>	<b>31%</b>	<b>21%</b>	<b>23%</b>	<b>4%</b>	<b>8%</b>	<b>5%</b>	<b>6%</b>
	<b>Température</b>	<b>25°C</b>	<b>25°C</b>	<b>25°C</b>	<b>25°C</b>	<b>43°C</b>	<b>43°C</b>	<b>43°C</b>	<b>43°C</b>	<b>63°C</b>	<b>63°C</b>	<b>63°C</b>	<b>63°C</b>
<b>Calophyllum</b>	nbre de pics	<b>20</b>	16	17	18	17	14	14	14	13	13	13	13
	nbre d'épaulements	<b>0</b>	3	0	2	2	0	0	2	1	0	1	1
<b>Soja</b>	nbre de pics	<b>19</b>	14	16	18	17	16	15	16	17	16	15	15
	nbre d'épaulements	<b>0</b>	0	3	1	2	0	1	0	2	0	1	1
<b>Pistacia Lentiscus</b>	nbre de pics	<b>16</b>	13	15	<b>16</b>	11	12	12	12	12	12	12	12
	nbre d'épaulements	<b>1</b>	3	1	1	6	0	0	4	0	0	0	0
<b>Olive</b>	nbre de pics	<b>17</b>	14	16	16	12	13	13	13	12	11	12	12
	nbre d'épaulements	<b>2</b>	2	3	3	6	1	0	2	0	1	0	0
<b>Pépins de Cassis</b>	nbre de pics	<b>24</b>	23	23	<b>24</b>	21	21	21	21	20	20	20	21
	nbre d'épaulements	<b>0</b>	1	0	0	1	1	0	1	1	2	1	0
<b>Bois de Chine</b>	nbre de pics	<b>24</b>	11	23	23	18	17	18	20	11	10	10	11
	nbre d'épaulements	<b>0</b>	3	0	0	2	0	0	0	0	1	1	1
<b>Pinus Koraiensis</b>	nbre de pics	<b>15</b>	14	<b>15</b>	14	14	13	13	<b>15</b>	11	10	11	11
	nbre d'épaulements	<b>1</b>	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1
<b>Grenade</b>	nbre de pics	<b>21</b>	15	20	17	13	12	12	12	10	8	10	9
	nbre d'épaulements	<b>0</b>	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<b>Babassu</b>	nbre de pics	<b>17</b>	15	16	16	16	16	14	16	11	7	11	11
	nbre d'épaulements	<b>0</b>	1	0	0	1	0	0	0	2	5	2	1



On peut constater que pour 6 huiles parmi les 9 (calophyllum, soja, olive, bois de Chine, grenade, babassu), la phase mobile MeCN/BuOH 74/26 à 25°C donne le maximum de pics.

On remarque que, quelle que soit la nature de la phase mobile (MeCN/BuOH, MeCN/iPrOH, MeCN/AcMe et MeCN/AcOEt), à 63°C on a systématiquement moins de pics que pour les analyses à 25 ou 43°C. On perd la séparation des TAG ayant le même nombre de partition (NP) (Annexe 1). Si l'objectif est la séparation des TAG par nombre de partition, l'augmentation de température permet d'y répondre. Si par contre on recherche la séparation optimale il faudra s'orienter vers des analyses à 43 ou 25°C.

Pour les huiles de Pistacia Lentiscus et de pépins de cassis, 2 phases mobiles (MeCN/BuOH 74/26 à 25°C et MeCN/iPrOH 66/34 à 25°C) donnent le même nombre de pics maximum pour chaque huile.

Pour l'huile de Pinus Koraiensis, 3 phases mobiles donnent le même nombre de pics maximum: MeCN/BuOH 74/26 à 25°C, MeCN/AcOEt 66/34 à 25°C et MeCN/iPrOH 77/23 à 43°C.

Par conséquent, pour chacune de ces trois huiles nous avons besoin d'ajouter un critère de choix supplémentaire pour comparer les 2 ou 3 chromatogrammes correspondants et retenir le meilleur.

Le critère que nous avons retenu est  $R_{s_{min}}$ , la résolution minimum [13] définie comme suit :

$$R_{s_{min}} = S_{min} \frac{\sqrt{N}}{2} \quad (6)$$

Avec 
$$S = \frac{t_2 - t_1}{t_2 + t_1} \quad (7)$$

N= nombre de plateaux théoriques

$t_1$  et  $t_2$  les temps de rétention de 2 composés successifs.

Pour une huile donnée, à même nombre de pics, le chromatogramme retenu est celui qui présente la valeur la plus grande pour  $R_{s_{min}}$ , correspondant à la meilleure séparation de la paire de pics la moins bien séparée.

Enfin, pour comparer les chromatogrammes ayant le même nombre de pics et la même valeur de  $R_{s_{min}}$ , nous avons ajouté un troisième critère qui est la valeur de  $r$  donnée par l'équation 8.

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{R_{s_{i+1}}}{R_s} = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{S_{i+1}}{S_s} \quad (8)$$

$r$  est un critère appelé produit des résolutions normalisées. Il traduit la régularité de l'espacement des pics dans un chromatogramme. Plus la valeur de  $r$  est élevée, meilleure est la répartition des pics dans le chromatogramme.

Les résultats pour les 3 huiles concernées sont reportés dans le tableau 3 ci-dessous

**Tableau 3 : Détermination de  $R_s$  et  $r$ .**

Huiles	Phase mobile	n	$R_s$ min	r
<b>Pistacia Lentiscus</b>	MeCN/BuOH 74/26, 25°C	16	1	0.18
	MeCN/iPrOH 66/34, 25°C	16	1	0.04
<b>Pépins de Cassis</b>	MeCN/BuOH 74/26, 25°C	24	0.8	0.02
	MeCN/iPrOH 66/34, 25°C	24	0.6	0.01
<b>Pinus Koraiensis</b>	MeCN/BuOH 74/26, 25°C	15	0.8	0.03
	MeCN/AcOEt 66/34, 25°C	15	0.8	0.04
	MeCN/iPrOH 77/23, 43°C	15	0.8	0.03

Pour l'huile de pépins de Cassis,  $R_s=0.8$  pour MeCN/BuOH 74/26 à 25°C et  $R_s=0.6$  pour le mélange binaire MeCN/iPrOH 66/34 à 25°C, donc la phase mobile contenant le butanol est la meilleure.

Pour l'huile de Pistacia lentiscus et de Pinus koraiensis, les valeurs de  $R_{s_{min}}$  obtenues sont les mêmes. Il est donc intéressant de prendre en compte le critère  $r$ .

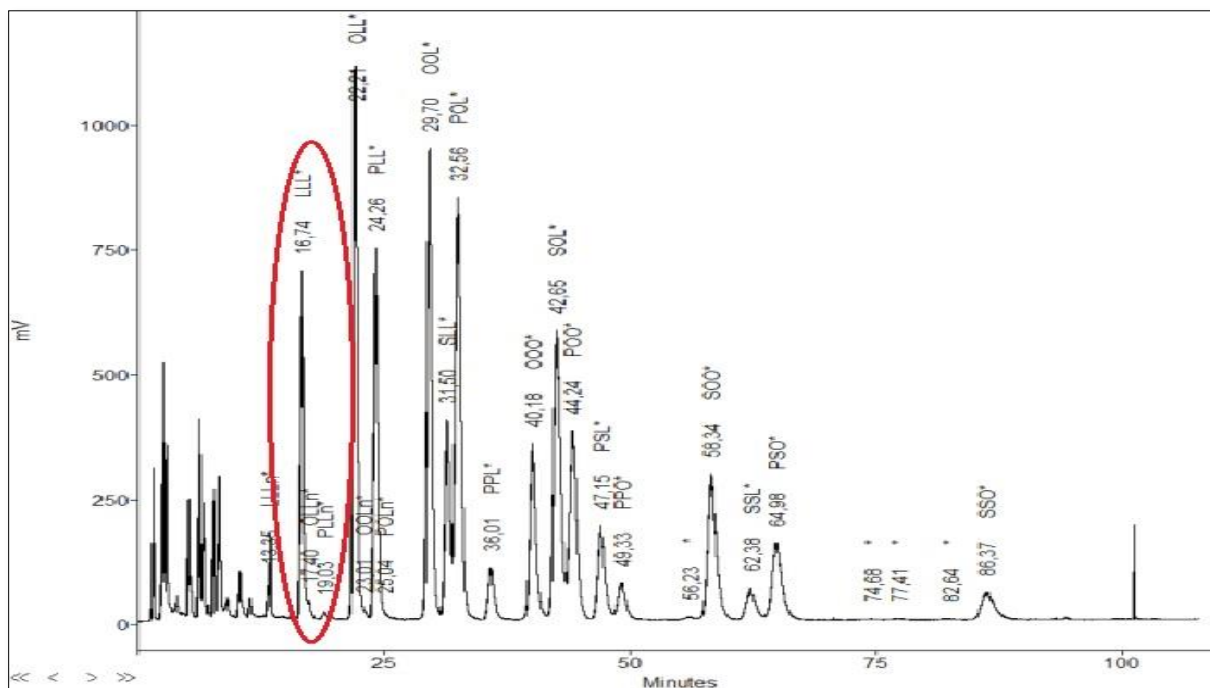
Pour l'huile de Pistacia,  $r=0.18$  pour MeCN/BuOH 74/26 à 25°C et  $r=0.04$  pour MeCN/iPrOH 66/34 à 25°C. Donc on peut affirmer que le mélange binaire MeCN/BuOH 74/26 à 25°C présente le meilleur chromatogramme.

Pour l'huile de *Pinus koraiensis*, on a pour les 3 chromatogrammes trois valeurs de  $r$  très faibles, très proches entre elles ( $r = 0.03$  ou  $0.04$ ) et donc pas discriminantes. On peut donc aussi choisir le mélange contenant du butanol pour l'analyse de cette huile.

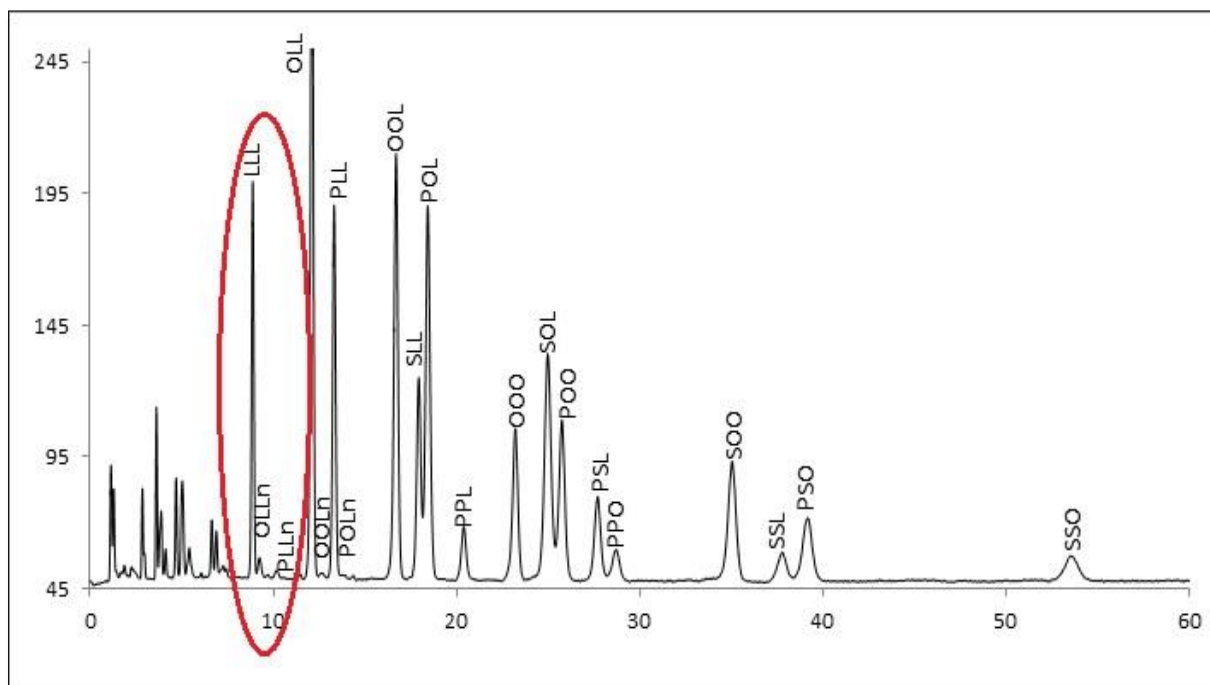
Parmi les différents mélanges binaires étudiés, on peut donc conclure que quelle que soit la nature de l'huile, le meilleur mélange est **MeCN/BuOH 74/26 à 25°C**. Il donne les meilleures conditions pour une séparation de triacylglycerols de structures différentes.

Afin de voir si le butanol peut remplacer le chlorure de méthylène comme solvant fort, nous avons comparé les chromatogrammes de quelques huiles dans les 2 mélanges à l'isoéluance.

Pour l'huile de calophyllum, OLLn est mieux séparé de LLL avec le butanol (chromatogramme 2) comme solvant fort, qu'avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (chromatogramme 1).

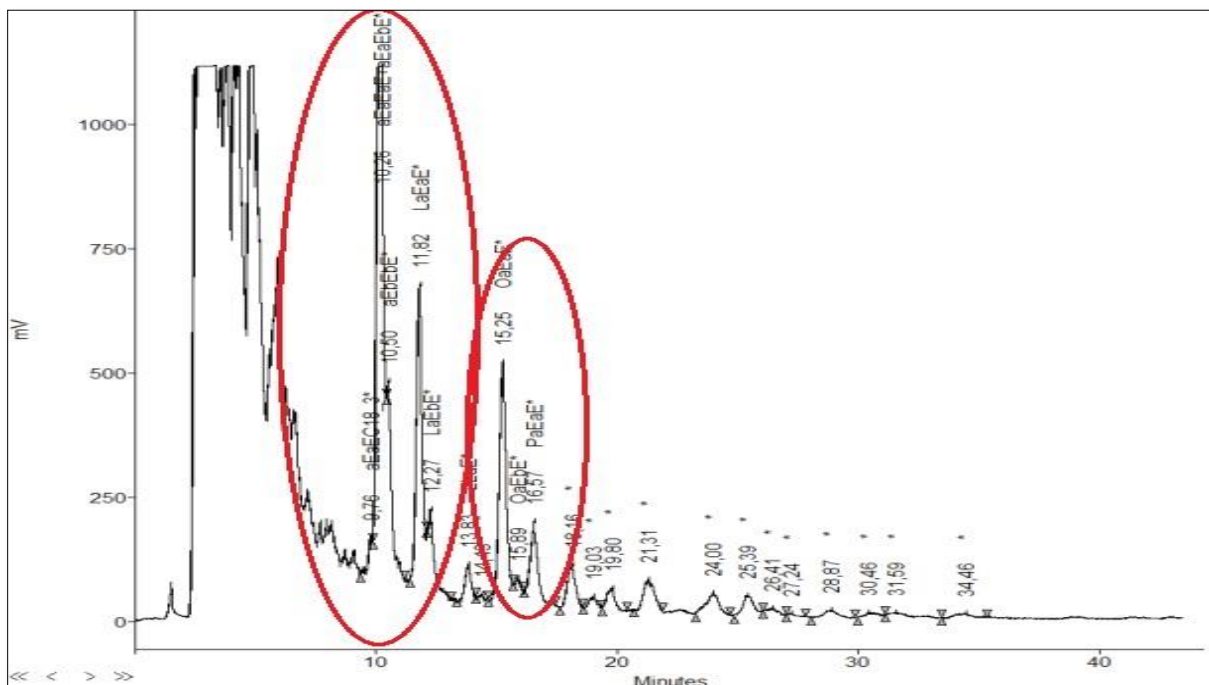


**Chromatogramme 1 :** Huile de Calophyllum, MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 68/32 à 25°C.

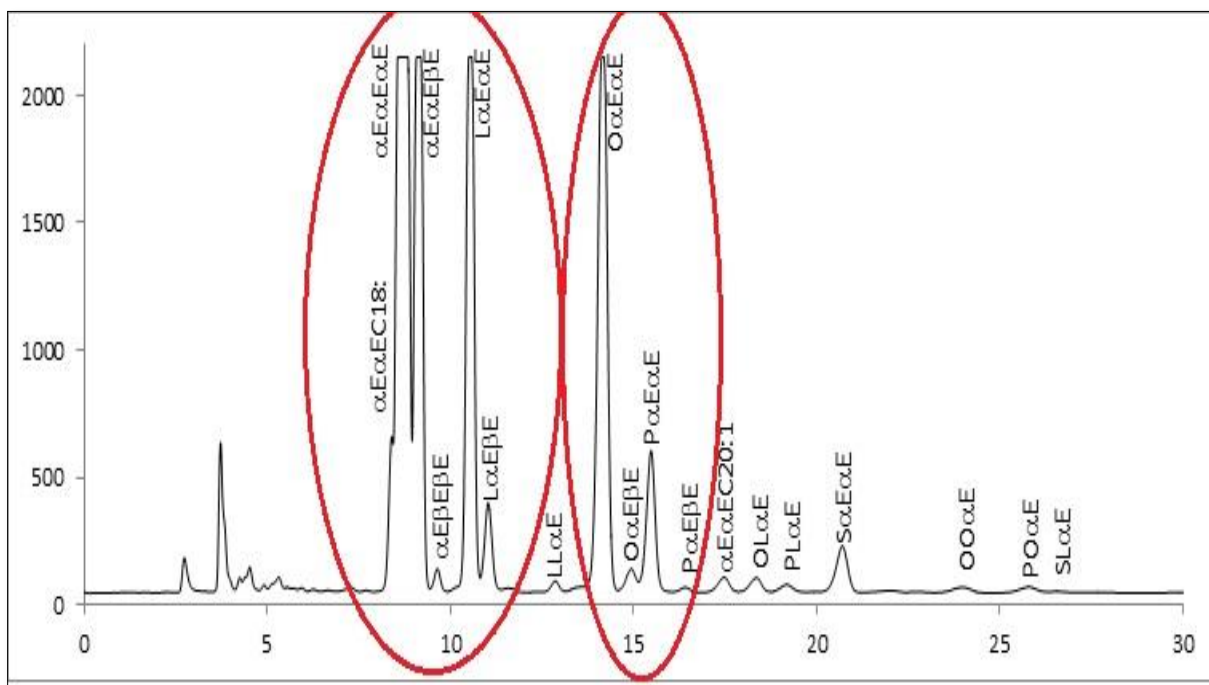


**Chromatogramme 2 :** Huile de Calophyllum, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

Pour l'huile de bois de Chine, les paires  $\alpha E\alpha E\alpha E/\alpha E\alpha E\beta E$ ,  $\alpha E\alpha E\beta E/\alpha E\beta E\beta E$ ,  $L\alpha E\alpha E/L\alpha E\beta E$ ,  $O\alpha E\alpha E/O\alpha E\beta E$ , ou encore  $P\alpha E\alpha E/P\alpha E\beta E$  sont mieux séparées avec une phase mobile contenant du BuOH (chromatogramme 4) que du  $CH_2Cl_2$  (chromatogramme 3).

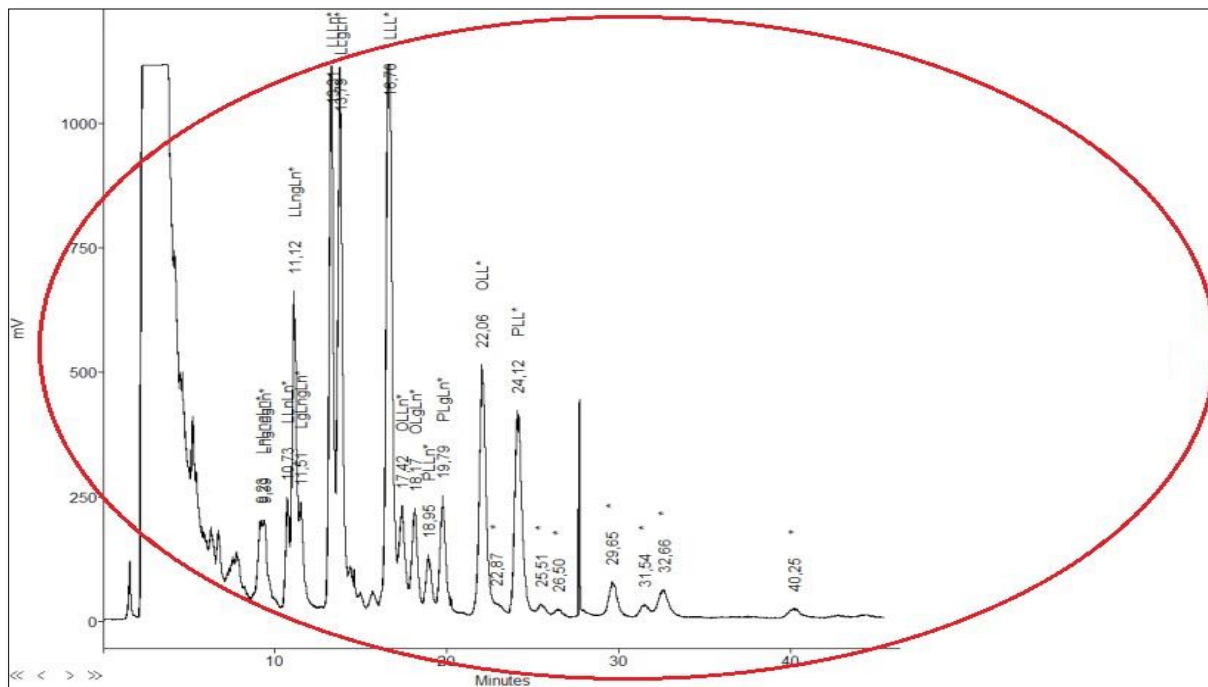


**Chromatogramme 3 :** Huile de bois de Chine, MeCN/ $CH_2Cl_2$  68/32 à 25°C.

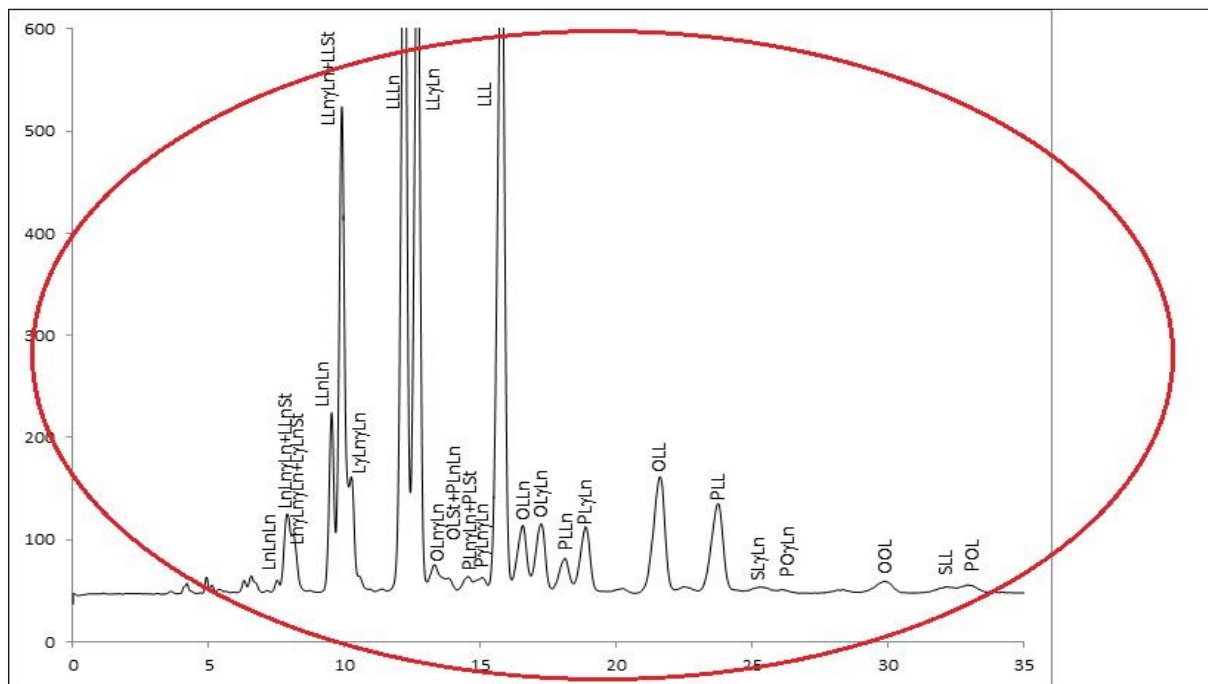


**Chromatogramme 4 :** Huile de bois de Chine, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

Dans l'huile de pépins de Cassis, nous avons globalement un meilleur éclatement entre les différents composés avec une phase mobile contenant BuOH (chromatogramme 6) que  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (chromatogramme 5).

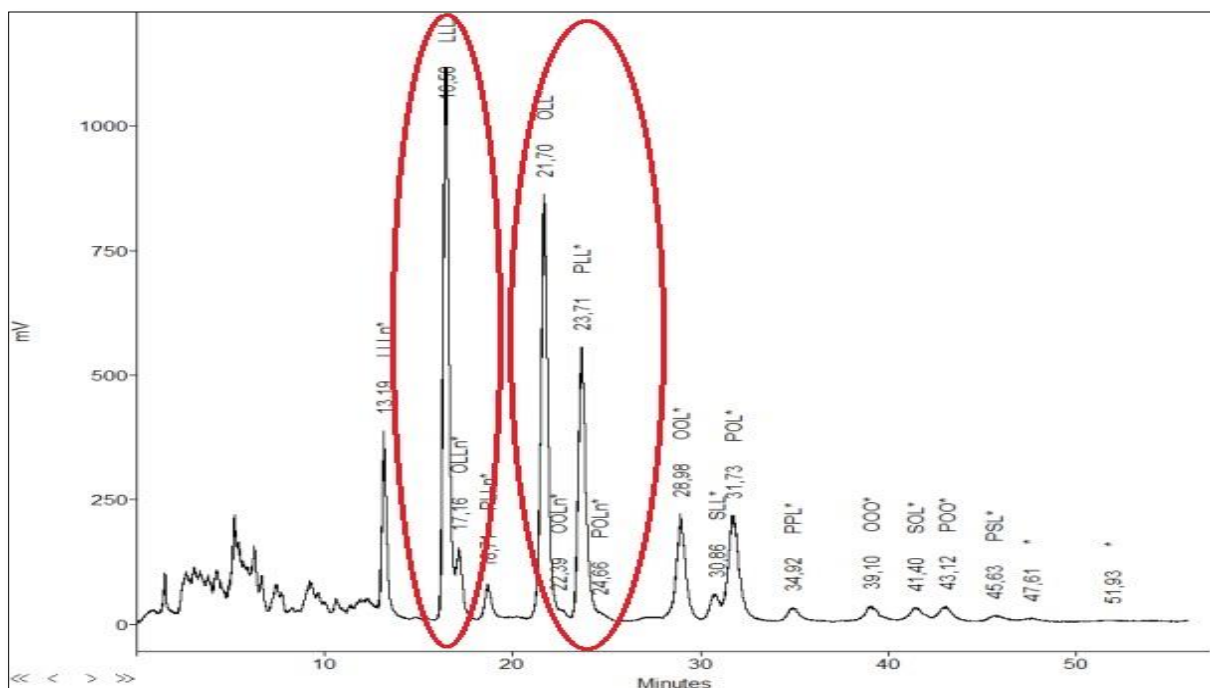


**Chromatogramme 5 :** Huile de pépins de Cassis, MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 68/32 à 25°C.

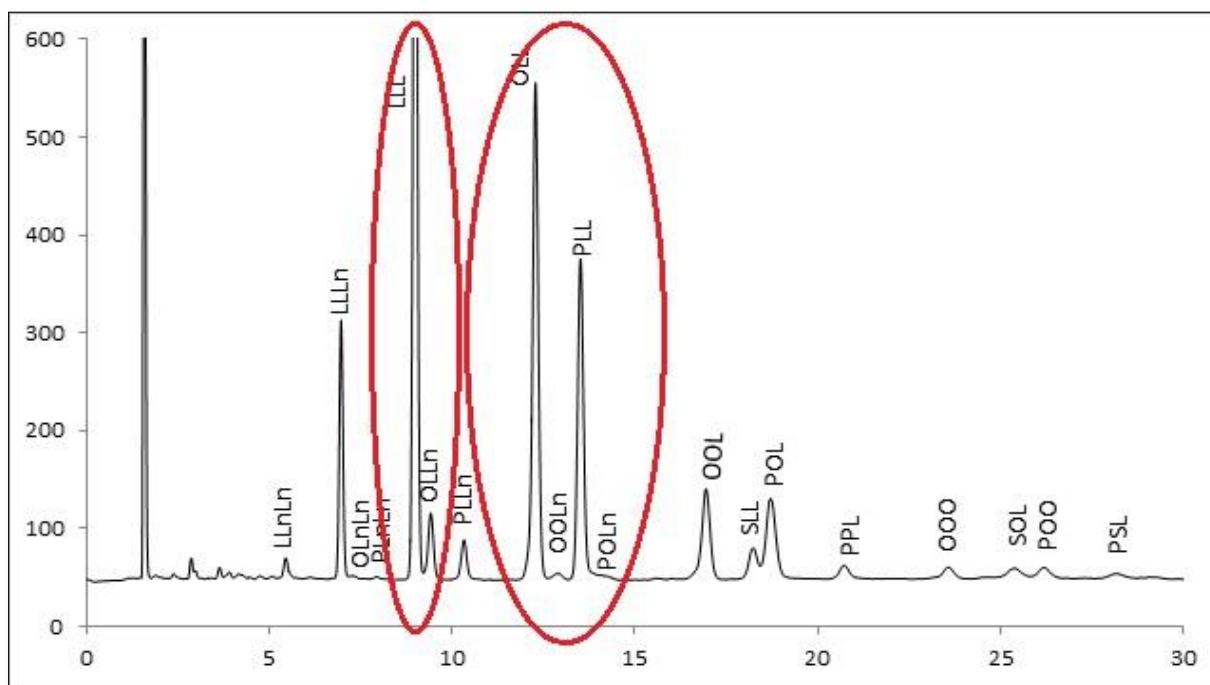


**Chromatogramme 6 :** Huile de pépins de Cassis, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

De même pour l'huile de Soja, les paires LLL/OLLn, OLL/OOLn et PLL/POLn sont nettement mieux séparées avec MeCN/BuOH (chromatogramme 8) qu'avec MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (chromatogramme 7).



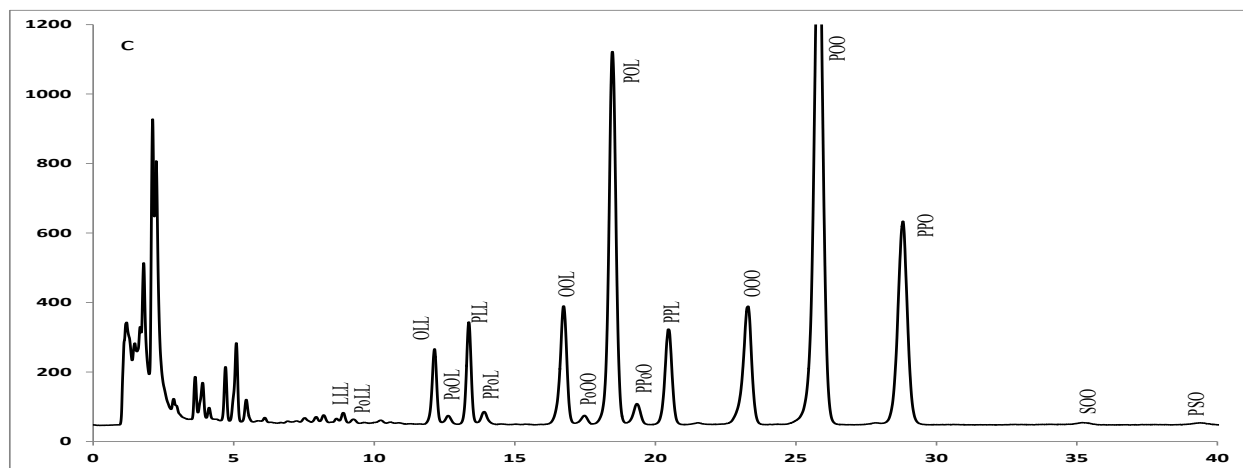
**Chromatogramme 7** : Huile de soja, MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 68/32 à 25°C.



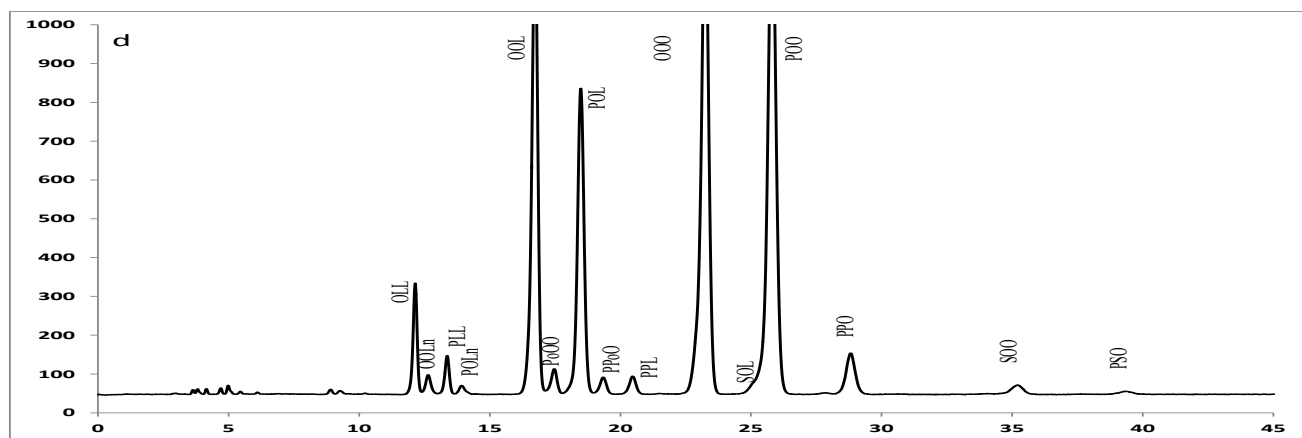
**Chromatogramme 8** : Huile de soja, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.

Avec le BuOH comme solvant fort les séparations obtenues sont très compétitives, voire meilleures qu'avec le chlorure de méthylène.

Les chromatogrammes des autres huiles étudiées en MeCN/BuOH sont donnés ci-dessous.



**Chromatogramme 9** : Huile de Pistacia Lentiscus, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.



**Chromatogramme 10** : Huile d'Olive, MeCN/BuOH 74/26 à 25°C.





#### IV. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons établi dans un premier temps un diagramme de force éluante basée sur la détermination des sélectivités méthylènes de différents TAG. Différents solvants forts et différentes températures ont été envisagés.

Cette échelle de force éluante établie est valable avec des phases stationnaires en C<sub>18</sub>.

En deuxième lieu, en se servant de ce diagramme, nous avons comparé les différentes conditions isoéluantes aux meilleures conditions obtenues avec le solvant chloré : chlorure de méthylène. Une large gamme d'huiles végétales ayant différentes variétés de TAG a été utilisée.

Finalement, l'analyse de ces huiles dans ces conditions isoéluotropiques conduit à proposer le mélange **MeCN/BuOH 74/26 à 25°C** comme étant le meilleur système pour séparer les TAG et éviter ainsi l'utilisation des solvants chlorés.

## V. Références bibliographiques

- [1] S. Héron, D. Charbonneau, P. Albisson, G. Estievenart, S. Groni, A. Tchaplá, A new methodology to determine the isoeluotropic conditions on ultra-performance flash purification stationary phases from analytical reversed liquid chromatography stationary phase, *J. Chromatogr. A*, 1397 (2015) 59-72.
- [2] R.Tijssen, H. A. H. Billiet, P.J. Schoenmakers, Use of the solubility parameter for predicting selectivity and retention in chromatography, *J. of Chromatography*, 122 (1976) 185-203.
- [3] H. Colin, G. Guiochon, Z. Yuj, J.C. Diez-Masa, J. Jandera, Selectivity for Homologous series in Reversed-Phase LC- III. Investigation of non-specific Selectivity, *J. Chrom. Sci.*, 21 (1983) 179-184.
- [4] S. Héron, A. Tchaplá, Validité d'une notion de force éluante tenant compte de la nature de la silice greffée en chromatographie en phase liquide aqueuse et non aqueuse, *Analisis*, 25 (1997), 257-262.
- [5] M. Lisa, M. Holčapek, H. Sovova, Comparaison of various types of stationary phases in non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry of glycerolipids in blackcurrant oil and its enzymatic hydrolysis mixture, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 8371-8378.
- [6] T. Řezanka, J. Lukavsky, L. Siristova, K. Sigler, Regioisomer separation and identification of triacylglycerols containing vaccenic and oleic acids, and  $\alpha$ - and  $\gamma$ - linolenic acids, in thermophilic cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Tolypothrix* sp, *Phytochemistry* 78 (2012) 147-155.
- [7] S. Héron, A. Tchaplá, Choix des phases stationnaires et mobiles pour la séparation en chromatographie en phase liquide de triglycérides de corps gras, *Analisis*, 22 (1994) 114-126.
- [8] S. Héron, J. Bleton, A. Tchaplá, Mechanism for separation of triacylglycerols in oils by liquid chromatography: identification by mass spectrometry in: J.-L. Sebedio, E.G. Perkins (Eds.), *New trends in lipid and lipoprotein analyses*, AOCS Press, Champaign, Illinois, (1995), 205-231.

- [9] A. Hazotte, D. Libong, P. Chaminade, High-temperature micro liquid chromatography for lipid molecular species analysis with evaporative light scattering detection, *J. Chromatogr. A*, 1140 (2007) 131-139.
- [10] S. Héron, A. Tchapla, Utilisation d'un modèle d'interaction moléculaire pour l'optimisation de la séparation des triglycérides de corps gras en CLPI, *OCL 1* (1994) 219-228.
- [11] A. Tchapla, S. Héron, H. Colin, G. Guiochon, Role of Temperature in the Behavior of Homologous Series in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1443-1448.
- [12] A. Tchapla, S. Héron, Property-structure relationship of solute-stationary phase complexes occurring in a molecular mechanism by penetration of eluite in bonded alkyl chains in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 684 (1994) 175-188.
- [13] P.J. Schoenmakers, Optimization of chromatographic selectivity, a guide to method development, *Journal of chromatography library*, vol 35, Elsevier, Amsterdam, (1986).

# **Chapitre VI : Choix de phases stationnaires pour la séparation des triacylglycérols dans des conditions isoéluantes n'utilisant pas les solvants chlorés.**

- I. Introduction**
- II. Choix des conditions opératoires**
  - II.1. Choix des colonnes**
  - II.2. Choix des huiles**
- III. Détermination de la meilleure colonne**
  - III.1. Efficacité**
  - III.2. Rétention**
  - III.3. Pouvoir de séparation**
- IV. Conclusion**

## **I. Introduction**

L'optimisation d'un système chromatographique passe par l'optimisation du choix des phases qui le composent: la phase stationnaire et la phase mobile.

Dans la première partie de notre travail, décrite dans le chapitre précédent, nous avons montré que le mélange MeCN/BuOH pouvait remplacer les phases mobiles à base de solvants chlorés.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser au choix de la phase stationnaire.

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre «phases stationnaires», l'utilisation de nouvelles générations de phases stationnaires à très petit diamètre de particules totalement poreuses (sub-2 $\mu$ m) ainsi que celles superficiellement poreuses est de plus en plus d'actualité.

Nous avons mis à profit cette nouvelle génération de phases stationnaires dans le cas de séparations de TAG possédant des acides gras en C18:3 isomères de position.

Parmi 6 colonnes (phases stationnaires) disponibles, ayant des caractéristiques structurales différentes les unes des autres, on se propose, dans un premier temps, de faire le choix de la colonne permettant d'obtenir les meilleures séparations.

Une fois cette colonne trouvée, nous avons analysé différentes huiles de graines ayant des TAG stéréoisomères possédant des résidus C18:3 isomères de position. Ceci fera l'objet du chapitre suivant.

## **II. Choix des conditions opératoires**

### **II.1. Choix des colonnes**

Les phases stationnaires que nous avons utilisées au cours de notre étude se divisent en deux catégories: les phases stationnaires totalement poreuses de petit diamètre de particules (FPP) et les phases stationnaires superficiellement poreuses (SPP).

Etant donné les mélanges complexes que nous avons à analyser, nous avons choisi de travailler avec des colonnes de 10 cm (ou 2x5 cm) afin d'avoir un maximum d'efficacité :

#### **Colonnes remplies de phases stationnaires totalement poreuses (FPP)**

- Uptisphere Strategy C18-2 100Å (100x2.1mm, 1.7 $\mu$ m) (C18\_2)

C'est la colonne prise en référence qui nous a permis d'établir le diagramme d'isoéluance présenté dans le chapitre précédent.

Dans des études précédentes, il a été montré que les silices greffées C<sub>18</sub> monofonctionnelles à haute densité de greffage ou celles polyfonctionnelles étaient les meilleures du point de vue de la sélectivité pour la séparation des TAG. Compte tenu des phases sub 2µm totalement poreuses disponibles sur le marché, nous en avons choisi une de chaque catégorie, à savoir respectivement :

- Acquity UPLC HSS C18 1,8 µm (2\*50x2.1mm, 1.8µm). (**HSS**)
- Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm (2\*50x2.1mm, 1.7µm). (**BEH**)
- Nucleodur C18 Isis 1.8µm (2\*50x2mm, 1.8µm). (**ISIS**)

Dans ce dernier cas, le recouvrement est polymérique avec des chaînes C<sub>18</sub> et des groupements 7,8 dihydroxy octyle permettant d'avoir des sélectivités particulières.

### **Colonnes remplies de phases stationnaires superficiellement poreuses (SPP)**

- Halo C18 (2\*50x2.1mm, 2.7µm). (**HALO**)
- Kinetex C18 1,7µm 100A (2\*50x2.1mm, 1.7µm). (**KINETEX**)

Nous avons choisi 2 fournisseurs différents et deux diamètres de particules différents.

## **II.2. Choix des huiles**

Notre objectif étant de trouver un système chromatographique permettant d'analyser une large gamme de TAG. Nous avons choisi 3 huiles nous servant de référence:

- Huile de calophyllum: C'est une huile qui contient une large gamme de TAG classiques, combinaisons d'acide gras tel que P, S, O, L. Cela permet d'avoir une bonne idée de la séparation de TAG ayant des nombres de partition NP allant de 40 à 52.
- Huile d'olive: C'est une huile qui contient des TAG de combinaisons d'acides gras tels que P, Po, S, O et L et qui présente un important intérêt économique en Tunisie.
- Huile de pépins de cassis: C'est une huile riche en TAG possédant des acides gras en C18:3 tels que (Ln, γLn). Ces TAG sortent en début de chromatogramme, donc leur séparation nécessite des conditions chromatographiques un peu différentes de celles à utiliser pour des TAG classiques.

⇒ L'analyse systématique de ces 3 huiles va nous permettre d'étudier les différentes colonnes du point de vue rétention et sélectivité par rapport à une large gamme de TAG (classiques et particuliers).

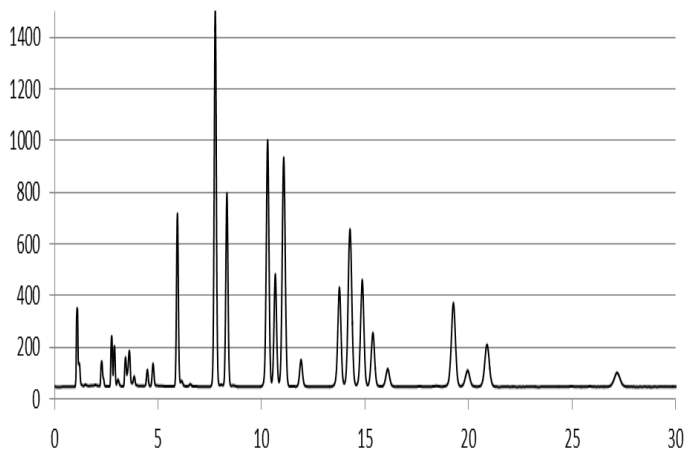
### **III. Détermination de la meilleure colonne**

Nous avons analysé les 3 huiles (calophyllum, olive et pépins de cassis) sur les 6 colonnes dans les conditions MeCN/BuOH 74/26 (v/v) à T=25°C. Ces conditions correspondent aux conditions iso-éluotropiques à MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> donnant la meilleure séparation (voir le chapitre précédent).

Les chromatogrammes obtenus sont représentés par les chromatogrammes 1 à 18.

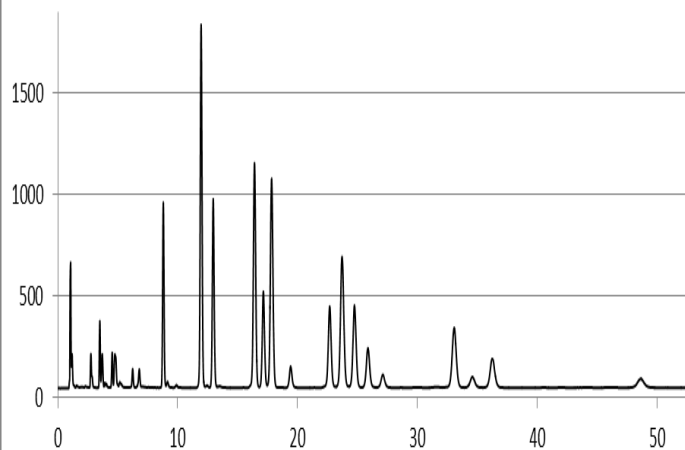


Calophyllum\_MeCN/BuOH74/26\_25\_BEH



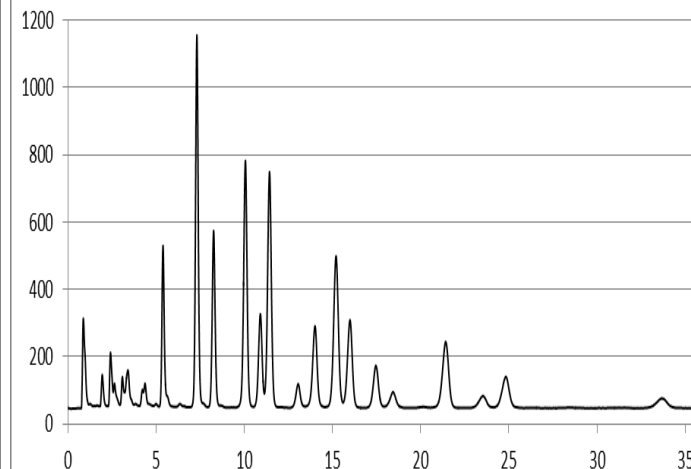
**Chromatogramme 1: Huile de calophyllum, BEH**

Calophyllum\_MeCN/BuOH74/26\_25\_HSS



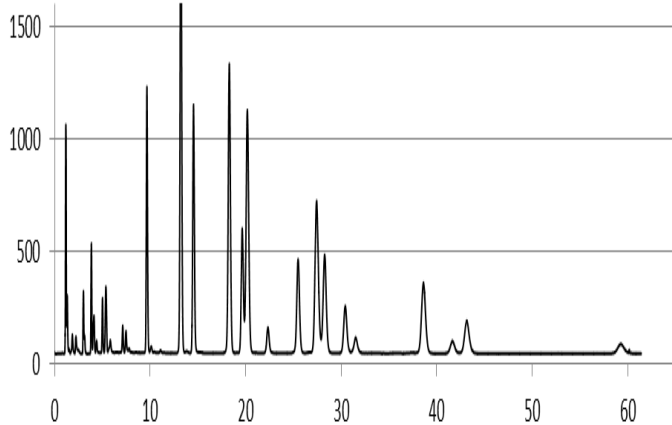
**Chromatogramme 2: Huile de calophyllum, HSS**

Calophyllum\_MeCN/BuOH74/26\_25\_ISIS



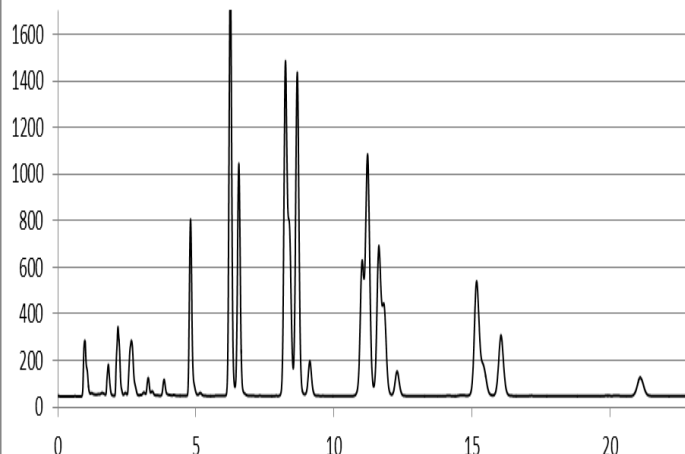
**Chromatogramme 3: Huile de calophyllum, ISIS**

Calophyllum\_MeCN/BuOH74/26\_25\_C18:2



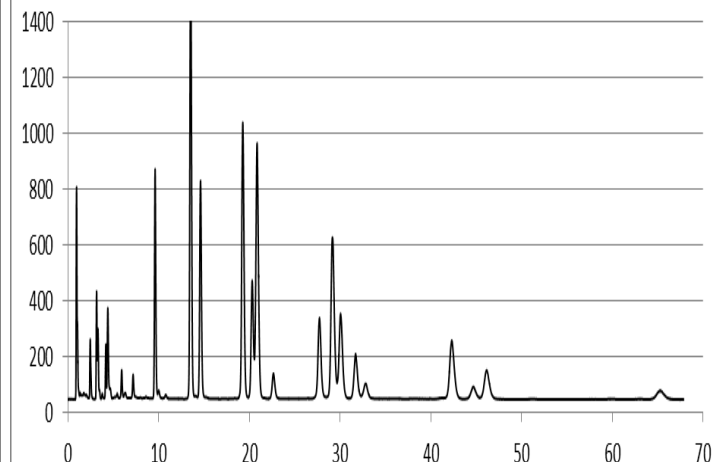
**Chromatogramme 4: Huile de calophyllum, C18:2**

Calophyllum\_MeCN/BuOH74/26\_25\_Kinetex



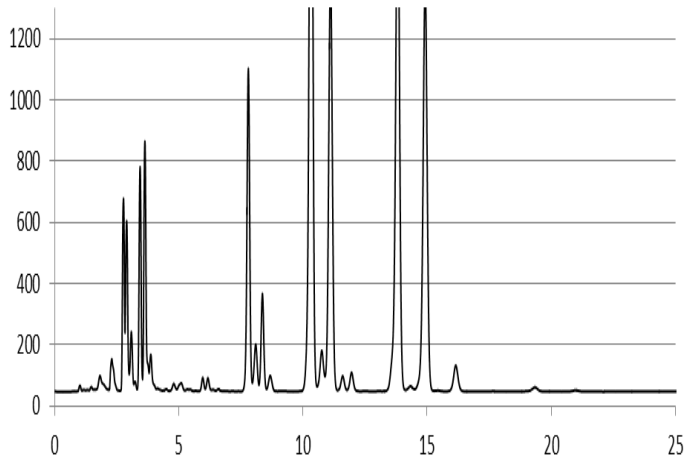
**Chromatogramme 5: Huile de calophyllum, Kinetex**

Calophyllum\_MeCN/BuOH74/26\_25\_Halo



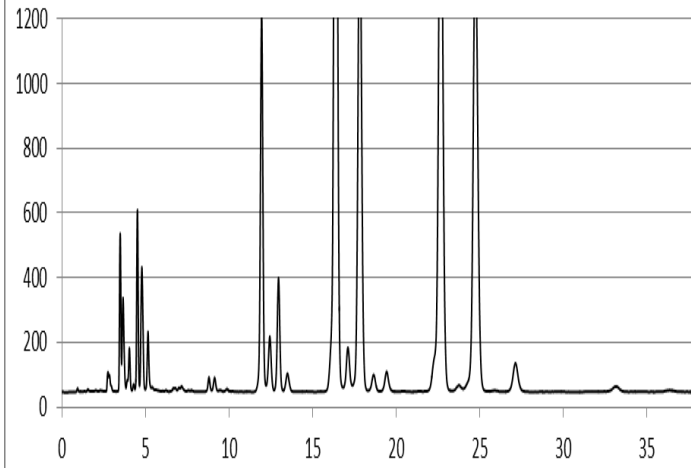
**Chromatogramme 6: Huile de calophyllum, Halo**

Olive\_MeCN/BuOH74/26\_25\_BEH



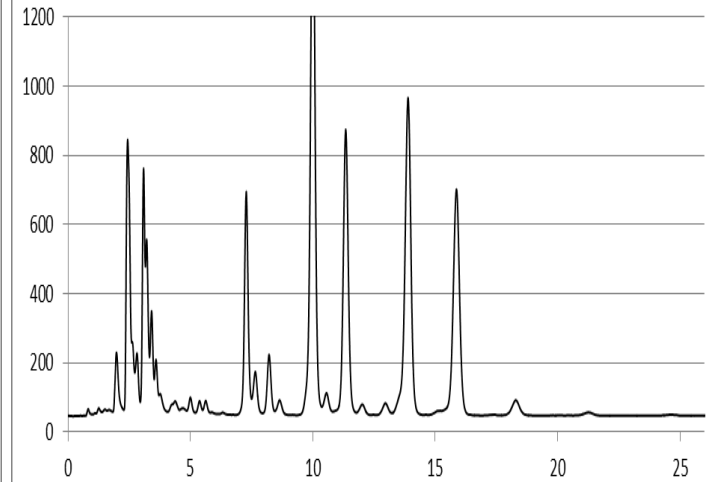
**Chromatogramme 7 : Huile d'olive, BEH**

Olive\_MeCN/BuOH74/26\_25\_HSS



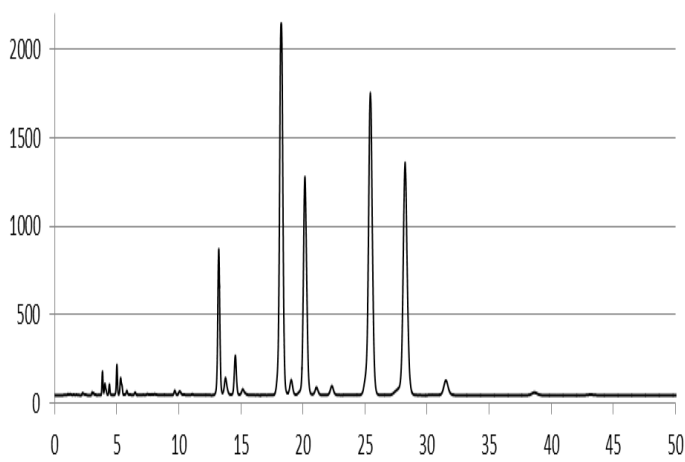
**Chromatogramme 8 : Huile d'olive, HSS**

Olive\_MeCN/BuOH74/26\_25\_ISIS



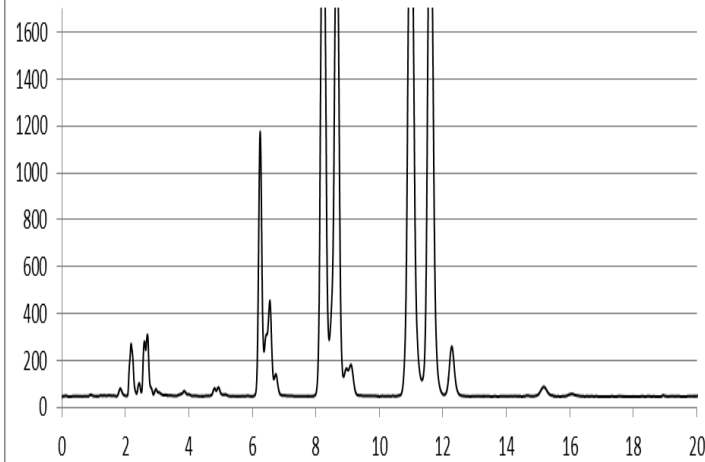
**Chromatogramme 9 : Huile d'olive, ISIS**

Olive\_MeCN/BuOH74/26\_25\_C18:2



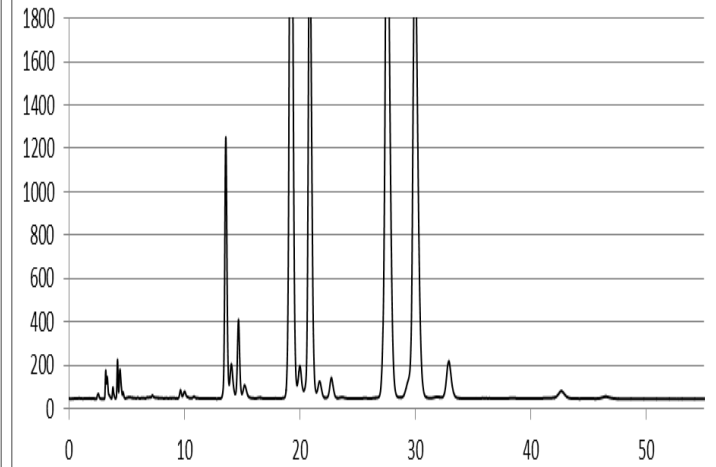
**Chromatogramme 10 : Huile d'olive, C18 :2**

Olive\_MeCN/BuOH74/26\_25\_Kinetex



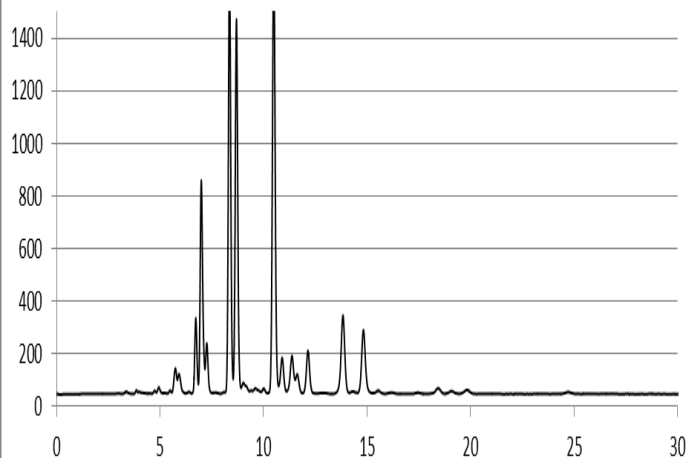
**Chromatogramme 11 : Huile d'olive, Kinetex**

Olive\_MeCN/BuOH74/26\_25\_Halo



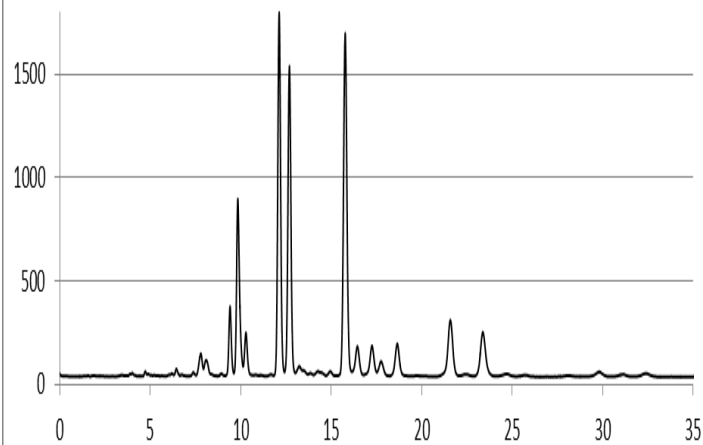
**Chromatogramme 12 : Huile d'olive, Halo**

Pépins de Cassis\_MeCN/BuOH74/26\_25\_BEH



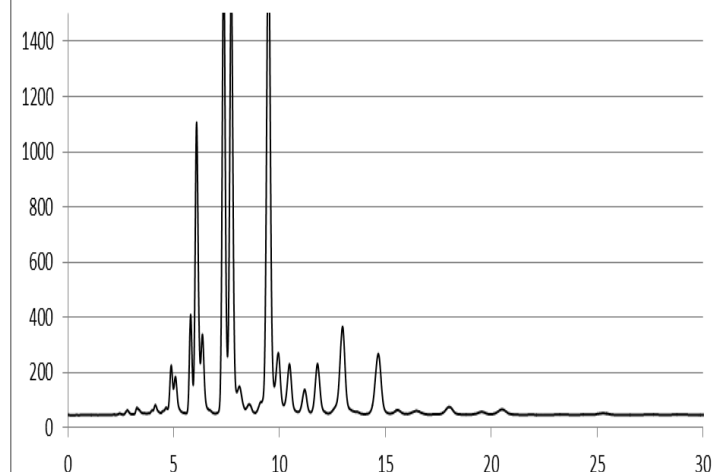
**Chromatogramme 13 : Huile de pépins de cassis, BEH**

Pépins de Cassis\_MeCN/BuOH74/26\_25\_HSS



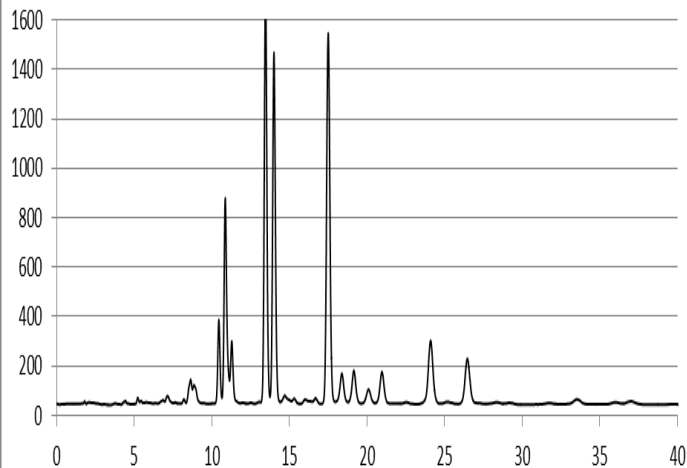
**Chromatogramme 14 : Huile de pépins de cassis, HSS**

Pépins de Cassis\_MeCN/BuOH74/26\_25\_ISIS



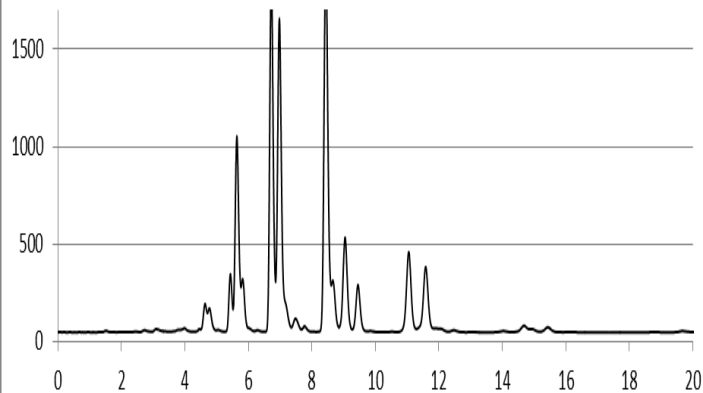
**Chromatogramme 15 : Huile de pépins de cassis, ISIS**

Pépins de Cassis\_MeCN/BuOH74/26\_25\_C18:2



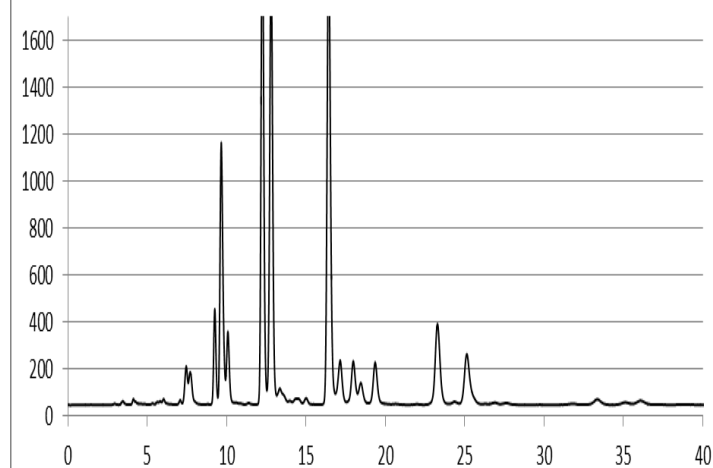
**Chromatogramme 16 : Huile de pépins de cassis, C18 :2**

Pépins de Cassis\_MeCN/BuOH74/26\_25\_Kinetex



**Chromatogramme 17 : Huile de pépins de cassis, Kinetex**

Pépins de Cassis\_MeCN/BuOH74/26\_25\_Halo



**Chromatogramme 18 : Huile de pépins de cassis, Halo**

Pour choisir la meilleure colonne, nous avons comparé les 6 chromatogrammes d'une même huile en se basant sur 3 grandeurs chromatographiques: Efficacité, rétention et sélectivité.

### III.1. Efficacité

En premier lieu, nous avons déterminé le nombre de plateaux théoriques N en fonction de la rétention sur les différentes colonnes.

Avec:

$$N = 5.54 \times \left( \frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right)^2 \quad (1)$$

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (2)$$

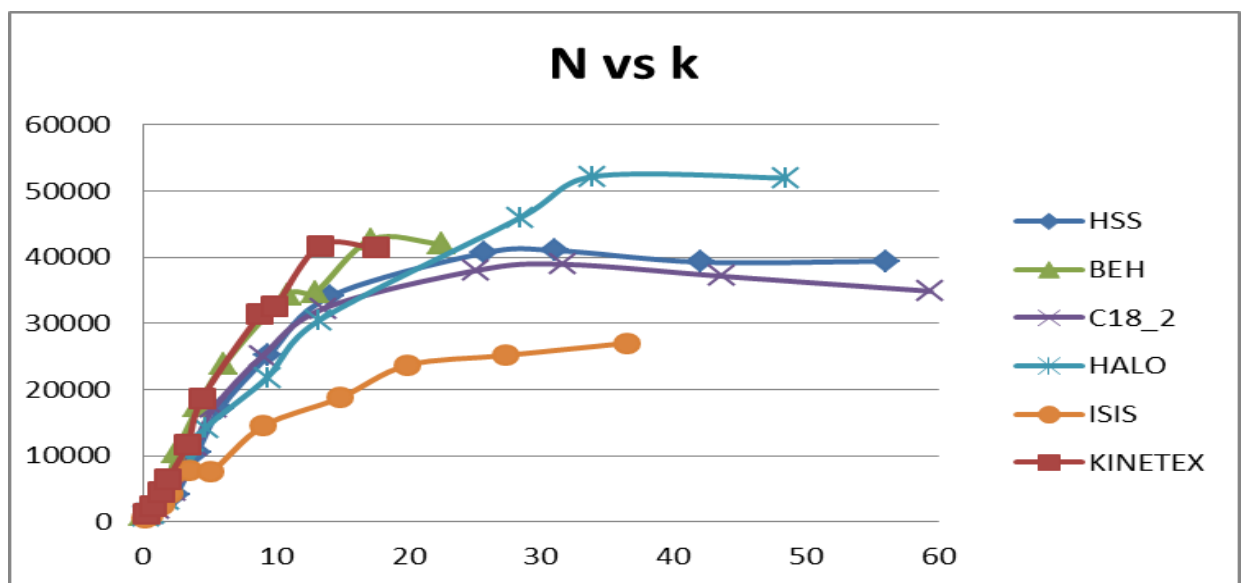
Où  $t_r$  est le temps de rétention d'un TAG donné.

$\omega_{1/2}$  est la largeur à mi-hauteur d'un pic relatif à un TAG donné.

$t_0$  est le temps de rétention du composé non retenu pour une colonne donnée.

Il a été obtenu pour chaque colonne par la méthode de la double pesée (détaillée dans le chapitre partie expérimentale).

La variation du nombre de plateaux théoriques N en fonction du facteur de rétention k pour les 6 colonnes est donnée ci-dessous :



**Figure 1** : Variation de N en fonction de k pour les 6 colonnes.

Pour comparer les efficacités, il faut se placer aux valeurs de  $k$  à partir de laquelle  $N$  est constant, c'est-à-dire  $k = 20$  (Figure 1).

Etant donné que les colonnes sont de même longueur 10 cm, les nombres de plateaux sont comparables.

Dans les conditions testées, la colonne ISIS C18 est la moins efficace, délivrant beaucoup moins de plateaux que les autres colonnes.

Les quatre colonnes C18\_2, HSS, BEH et KINETEX offrent un nombre de plateaux équivalent tandis que la colonne HALO est la plus efficace pour des forts  $k$ .

En conclusion, dans l'ordre du nombre croissant de plateaux théoriques:

$$\text{ISIS} \ll \text{C18}_2 \approx \text{HSS} \approx \text{KINETEX} \approx \text{BEH} < \text{HALO}.$$

Nous n'avons pas comparé les colonnes en calculant la hauteur réduite  $h$

$$h = \frac{L}{d_p * N} \quad (3)$$

où:

$N$  est le nombre de plateaux théoriques.

$L$  longueur de la colonne

$d_p$  est le diamètre des particules de la phase stationnaire.

Car une telle étude ne peut se faire qu'avec les phases stationnaires totalement poreuses et n'est pas théoriquement valide pour les phases stationnaires superficiellement poreuses pour lesquelles le paramètre  $d_p$  n'est pas représentatif de l'ensemble de la particule.

### III.2. Rétention

A partir des chromatogrammes des différentes huiles, nous avons comparé le temps d'analyse pour les 6 différentes colonnes:

- Huile de calophyllum: chromatogrammes 1 à 6:

Les colonnes HSS, Halo et C18\_2 présentent un temps d'analyse très long (supérieur à 50 min).

La colonne ISIS permet une analyse de l'huile de calophyllum en un temps moyen (35 min).

En revanche, les deux colonnes BEH et Kinetex conduisent à un temps d'analyse réduit (25 min).

- Huile d'olive : chromatogrammes 7 à 12 :

Les colonnes HSS, Halo et C18\_2 présentent un temps d'analyse très long (supérieur à 35 min), tandis que pour les analyses effectuées en utilisant les colonnes BEH, Kinetex et ISIS, les temps d'analyses sont proches de 25 min.

- Huile de pépins de cassis : chromatogrammes 13 à 18 :

Les colonnes HSS, Halo et C18\_2 présentent un temps d'analyse très long (supérieur à 35 min). Ce temps est plus court pour les colonnes BEH, ISIS et Kinetex.

Ces observations peuvent se traduire de manière numérique en calculant le facteur de rétention du composé le plus retenu (SSO) sur les différentes colonnes.

**Tableau 1** : Détermination de k(SSO) pour chaque colonne.

Colonne	<b>KINETEX</b>	<b>BEH</b>	<b>ISIS</b>	<b>HALO</b>	<b>HSS</b>	<b>C18_2</b>
k (SSO)	18	22	38	48	58	60

En conclusion, dans l'ordre du pouvoir rétentif croissant:

KINETEX  $\approx$  BEH < ISIS < HALO < HSS  $\approx$  C18\_2.

### III.3. Pouvoir de séparation

Afin de tenir compte de la variabilité de ces phases stationnaires et de pouvoir discuter de la séparation, nous avons testé deux autres phases mobiles, une plus éluante MeCN/BuOH 69/31 et une moins éluante MeCN/BuOH 79/21 que celle «iso-éluante» testée en référence MeCN/BuOH 74/26.

Pour chacune des conditions, le nombre de pics dénombrés et le temps de rétention du dernier pic ont été déterminés et reportés dans le Tableau 2.

**Tableau 2** : Nombre de pics et temps de rétention du TAG le plus retenu pour les différentes colonnes.

Huiles	Colonnes		Phases mobiles		
			MeCN/BuOH	MeCN/BuOH	MeCN/BuOH
			79/21	74/26	69/31
<b>Calophyllum</b>	<b>C18_2</b>	tr (SSO) min	115.4	59.3	32.7
		nombre de pics	20	20	20
	<b>HSS</b>	tr (SSO) min	96.4	48.7	26.8
		nombre de pics	20	20	20
	<b>Halo</b>	tr (SSO) min	139	65.3	33.8
		nombre de pics	18	18	18
	<b>Isis</b>	tr (SSO) min	69.9	33.3	15.8
		nombre de pics	20	20	18
	<b>BEH</b>	tr (SSO) min	51	27.2	15.8
		nombre de pics	20	20	18
	<b>Kinetex</b>	tr (SSO) min	40.7	21.2	
		nombre de pics	18	18	
<b>Huile d'Olive</b>	<b>C18_2</b>	tr (SOO) min	72.6	38.6	24.7
		nombre de pics	16	15	18
	<b>HSS</b>	tr (SOO) min	59.3	33.2	18.8
		nombre de pics	19	19	19
	<b>Halo</b>	tr (SOO) min	87.1	46.6	24.9
		nombre de pics	17	16	19
	<b>Isis</b>	tr (SOO) min	48.2	21.3	13.6
		nombre de pics	19	18	18
	<b>BEH</b>	tr (SOO) min	34.8	19.4	12.5
		nombre de pics	19	19	18
	<b>Kinetex</b>	tr (SOO) min	28.4	16.1	
		nombre de pics	16	14	
<b>Pépin de cassis</b>	<b>C18_2</b>	tr (POL) min	62.1	37	22
		nombre de pics	24	24	21
	<b>HSS</b>	tr (POL) min	56.5	32.4	19.3
		nombre de pics	25	25	21
	<b>Halo</b>	tr (POL) min	69.3	36	20.3
		nombre de pics	24	24	21
	<b>Isis</b>	tr (POL) min	36.9	20.5	11.9
		nombre de pics	23	23	19
	<b>BEH</b>	tr (POL) min	32.8	24.9	12.4
		nombre de pics	24	24	22
	<b>Kinetex</b>	tr (POL) min	26.3	15.5	
		nombre de pics	22	22	

Pour chacune des huiles, nous pouvons donc extraire les conditions chromatographiques pour lesquelles on obtient un nombre de pics maximum associé à un temps d'analyse minimum. Ces conditions sont données dans le tableau 3 où nous avons aussi reporté le calcul de  $r$ , produit des résolutions normalisées, qui a été défini dans le chapitre précédent.

**Tableau 3:** Valeurs de  $r$  pour les meilleurs systèmes chromatographiques.

Huile	Colonne	Composition de la phase mobile	$r$
<b>Calophyllum</b>	BEH	MeCN/BuOH 74/26	0.005
	HSS	MeCN/BuOH 69/31	0.014
	ISIS	MeCN/BuOH 74/26	0.048
<b>Olive</b>	BEH	MeCN/BuOH 74/26	0.01
	HSS	MeCN/BuOH 69/31	0.026
<b>Pépins de cassis</b>	HSS	MeCN/BuOH 74/26	0.014

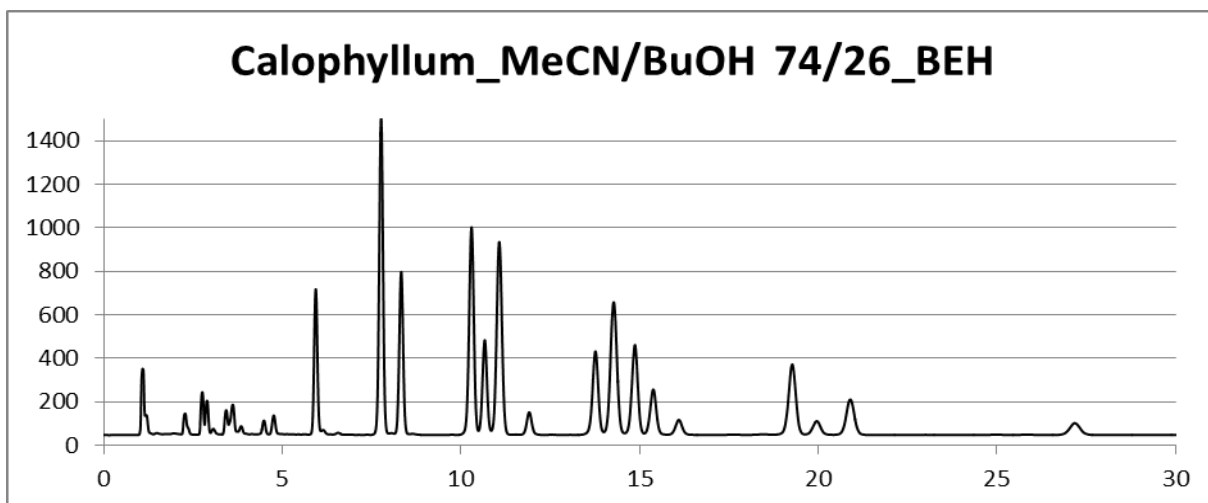
Huile de calophyllum:

Pour un nombre de pics maximum dénombré, ici 20, et un temps d'analyse minimum, les deux meilleurs systèmes sont Acquity UPLC BEH C18 percolée par MeCN/BuOH 74/26 (v/v) et l'Acquity UPLC HSS C18 percolée par MeCN/BuOH 69/31 (v/v)). Les chromatogrammes sont donnés chromatogramme 19 et 20. La colonne ISIS C18 percolée par MeCN/BuOH 74/26 (v/v) offre aussi de bonnes séparations (Chromatogramme 21).

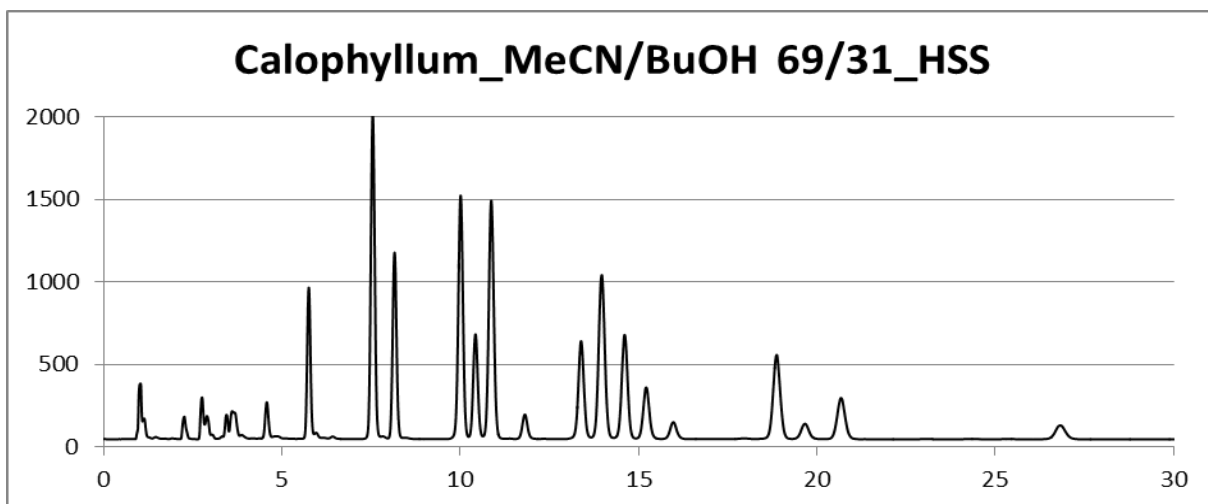
Comme indiqué par les valeurs de  $r$ , les pics sont répartis de manière plus homogène sur la colonne ISIS ( $r = 0.048$ ) que sur la colonne BEH ( $r = 0.005$ ) ou la colonne HSS ( $r = 0.014$ ).

Les deux derniers systèmes donnent des séparations très proches avec une grande sélectivité entre les TAG de nombre de partition différent mais aussi de très bonnes séparations entre les TAG de même NP. Pour la colonne ISIS C18, la sélectivité globale est très différente car il n'y a pas regroupement des TAG par NP, les pics sont répartis de manière plus homogène le long de l'ensemble du chromatogramme.

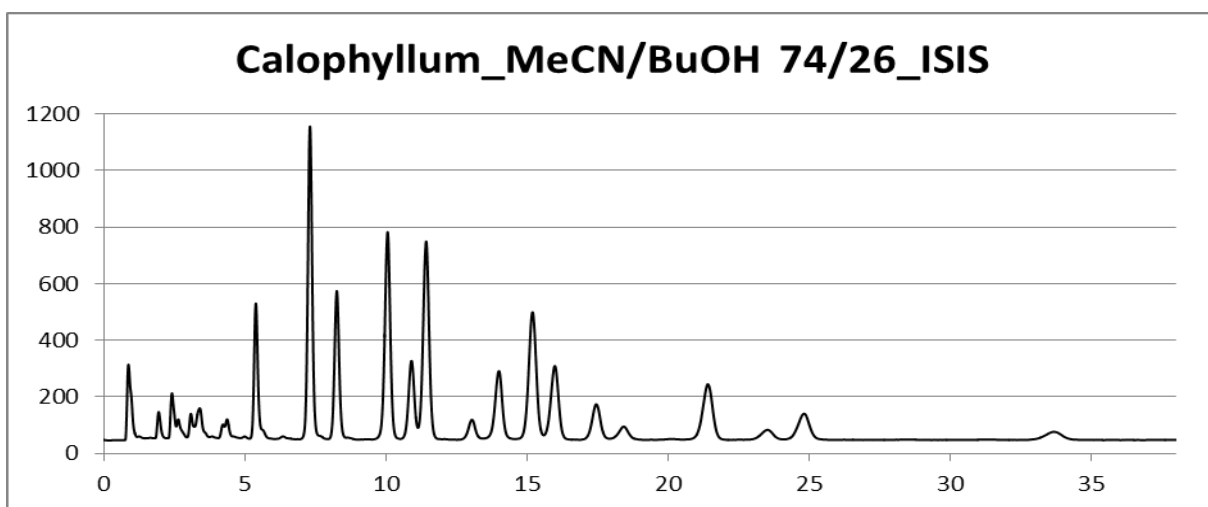




**Chromatogramme 19** : Huile de Calophyllum, MeCN/BuOH 74/26, BEH.



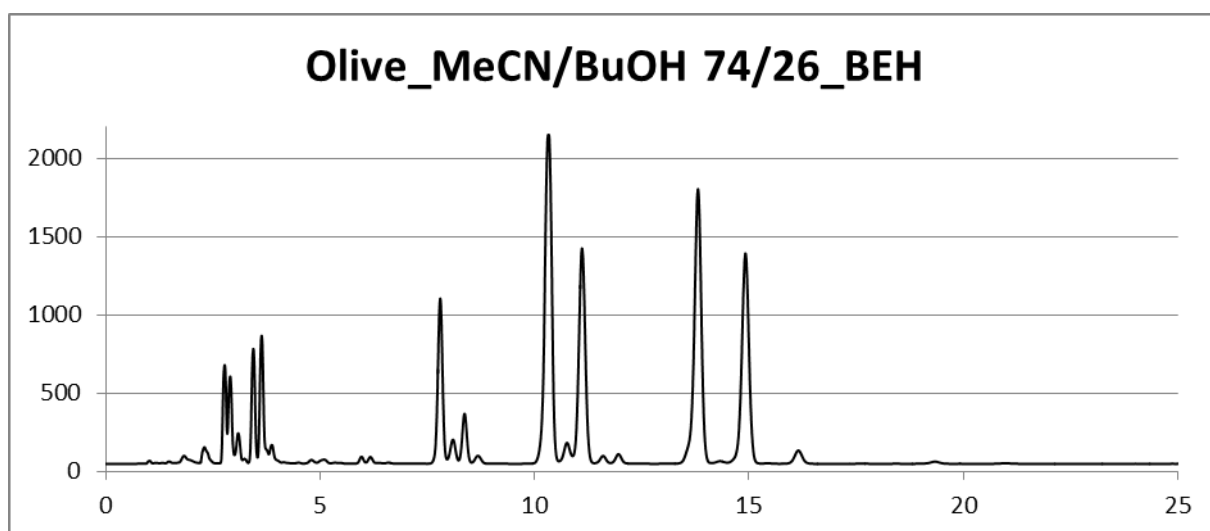
**Chromatogramme 20** : Huile de Calophyllum, MeCN/BuOH 69/31, HSS.



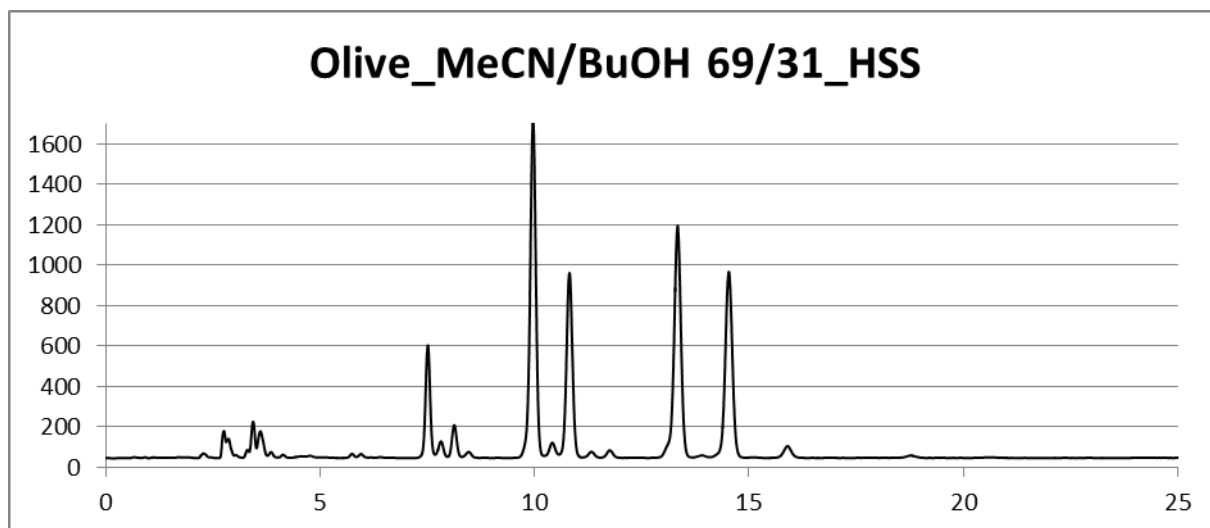
**Chromatogramme 21** : Huile de Calophyllum, MeCN/BuOH 74/26, ISIS.

Huile d'olive :

Les conclusions que l'on vient d'établir pour l'huile de calophyllum s'appliquent pour l'huile d'olive. Une telle constatation est cohérente, dans la mesure où l'huile d'olive contient les mêmes TAG que l'huile de calophyllum mais sur une gamme plus restreinte de NP. Les deux meilleurs chromatogrammes sont donnés par les chromatogrammes 22 et 23. Sur la colonne ISIS on perd un pic, dû à l'étalement des pics plus grand et un recouvrement des zones de NP successifs.



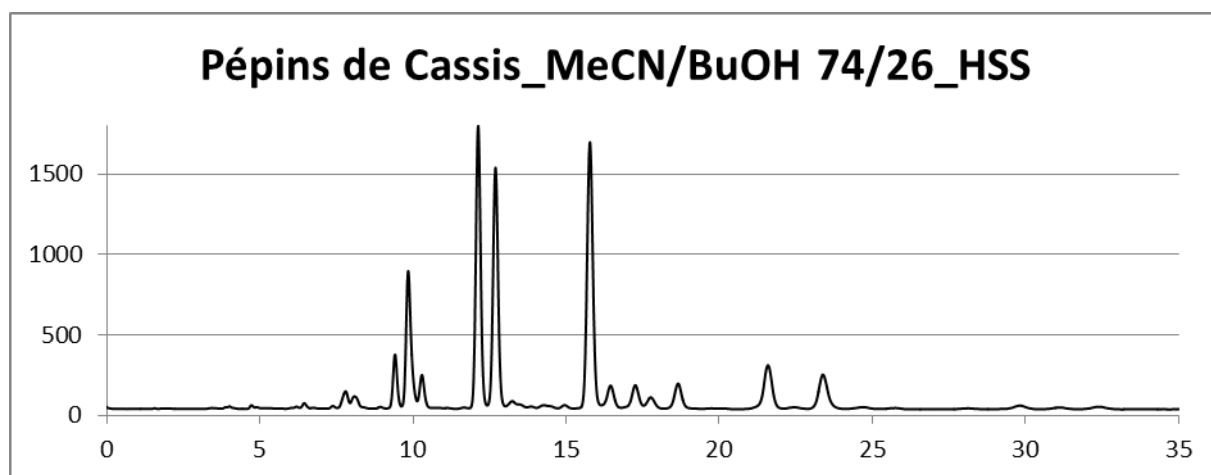
**Chromatogramme 22:** Huile d'olive, MeCN/BuOH 74/26, BEH.



**Chromatogramme 23:** Huile d'olive, MeCN/BuOH 69/31, HSS.

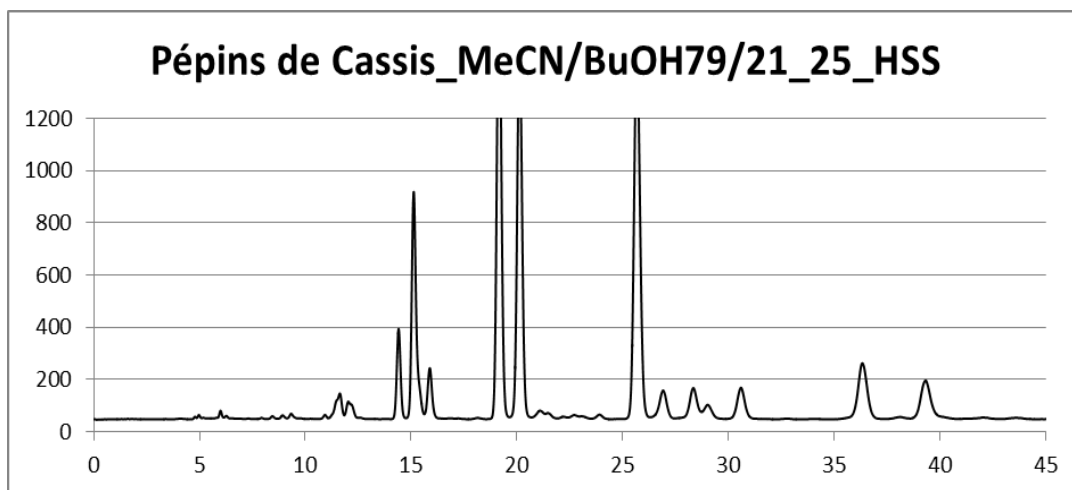
Huile de pépins de cassis:

Pour un nombre de pics maximum dénombré, ici 25, et un temps d'analyse minimum, le système Acquity UPLC HSS C18 sous MeCN/BuOH 74/26 sort du lot (chromatogramme 24).



**Chromatogramme 24:** Huile de pépins de cassis, MeCN/BuOH 74/26, HSS.

Dans la suite du travail, nous nous sommes intéressés à la séparation des TAG contenant différents acides gras isomères en C18:3. La rétention de ces TAG est relativement faible par rapport à l'ensemble des TAG de l'huile de calophyllum prise en référence. Comme nous avons montré ci-dessus que la colonne Acquity UPLC HSS C18 offrait de meilleures séparations, nous avons choisi de la garder et de travailler avec une phase mobile moins éluante afin de maximaliser la séparation des TAG avec des C18:3. Par conséquent le système Acquity UPLC HSS C18 percolé par MeCN/BuOH 79/21 a été retenu pour les travaux suivants.



**Chromatogramme 25:** Huile de pépins de cassis, MeCN/BuOH 79/21, HSS.

#### IV. Conclusion

Dans le cas de cette présente étude, la comparaison des différentes colonnes à notre disposition n'a pas fait ressortir une spécificité intéressante des phases superficiellement poreuses. Comme attendu, elles offrent une perte de charge un peu plus faible que les phases totalement poreuses mais ne sont pas les meilleures du point de vue séparation.

La colonne ISIS présente une sélectivité très particulière comparativement aux autres phases testées. Etant donné qu'elle est aussi la moins efficace dans ces conditions, nous ne l'avons pas sélectionné pour la suite du travail.

Pour la séparation de TAG classiques, c'est-à-dire pour un grand nombre d'huiles, nous proposons le système Acquity UPLC BEH C18 percolé par MeCN/BuOH 74/26 (v/v).

Pour la séparation de TAG contenant des acides gras en C18:3, c'est le système Acquity UPLC HSS C18 percolé par MeCN/BuOH 79/21 qui a été sélectionné.

Les deux colonnes BEH et HSS offrent une efficacité du même ordre de grandeur, par contre la colonne HSS est bien plus rétentive que la BEH, ce qui au final est intéressant pour la séparation des TAG avec des acides gras en C18 :3.

**Chapitre VII: Mise au point des conditions analytiques pour la caractérisation d'huiles de graines contenant des acides gras isomères géométriques et de position en C18:2 et C18:3**

**V. Introduction**

**VI. Choix des huiles**

**VII. Séparation par UHPLC/DEDL**

**VIII. Démarche d'identification des TAG constituant ces huiles**

**IV.1. Détermination des Esters Méthyliques obtenus après tranestérification et analyse par CPG/SM**

**IV.2. Détermination de l'abondance statistique des TAG**

**IV.3. Analyse des huiles par UHPLC/DEDL**

**IV.4. Identification des huiles par UHPLC/MS**

**IV.5. Identification des huiles par les règles de Goiffon**

**IV.5.1. Utilisation des règles de Goiffon pour l'identification de l'huile de *Punica granatum***

**IV.5.2. Identification d'autres huiles**

**IX. Conclusion**

**X. Références bibliographiques**

## I. Introduction

Comme nous l'avons déjà montré précédemment chapitres V et VI de notre travail, dans le cadre de l'analyse des TAG, les systèmes chromatographiques constitués avec des phases mobiles composées par un mélange binaire MeCN/BuOH offrent de très bonnes sélectivités. Il nous a donc semblé intéressant de mettre à profit cette observation pour analyser des huiles contenant des TAG difficiles à séparer. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés aux huiles de graines possédant des acides gras poly-insaturés, isomères de position.

Le défi à relever pour l'analyse de ces échantillons était double: la séparation des TAG contenant différents acides gras en C<sub>18</sub>:3 isomères de position mais aussi leur identification. En effet, la spectrométrie de masse ne permet pas de différencier en routine des composés insaturés ou poly-insaturés ayant la même masse moléculaire due à une même formule brute et qui ne diffèrent, à nombre total de doubles liaisons égal, que par leur répartition au sein d'une même chaîne.

## II. Choix des huiles

Les graines retenues pour ce travail ont été choisies en fonction de la présence en quantité importante dans leur composition, d'au moins un acide gras poly-insaturé conjugué, méthylène alterné ou polyméthylène alterné, sur une chaîne en C<sub>18</sub> mais aussi de la quantité d'huile pouvant en être extraite. Cette étape d'extraction a été menée par la méthode de Folch et décrite dans la partie expérimentale.

Cinq graines ont été choisies de telle manière que l'acide gras poly-insaturé soit différent d'une graine à une autre [1]. Quatre possèdent des AG appartenant à la famille des acides gras conjugués isomères, de configuration différente: dont deux de la famille série  $\omega$ 6 et deux de la famille  $\omega$ 5. La dernière possède un acide gras polyméthylène alterné de la famille  $\omega$ 6.

Ces huiles sont répertoriées ci-dessous; elles sont associées à l'acide gras poly-insaturé présent en quantité importante dans leur composition [1] sans tenir compte ici des autres isomères qui y sont présents en faible quantité.

- ✓ Huile d'*Aquilegia vulgaris* (Ranunculaceae) de Colombine : Acide Columbinique (5E, 9Z, 12Z,  $\omega$ 6 C<sub>18</sub>:3) (56.1-60%) [1].
- ✓ Huile de *Calendula officinalis* (Asteraceae): Acide Calendique (8E, 10E, 12Z,  $\omega$ 6 C<sub>18</sub>:3) (53-62.2%) [1].
- ✓ Huile de *Catalpa ovata* (Bignoniaceae): Acide Catalpique (9E, 11E, 13Z  $\omega$ 5 C<sub>18</sub>:3) (42.2%) [1].

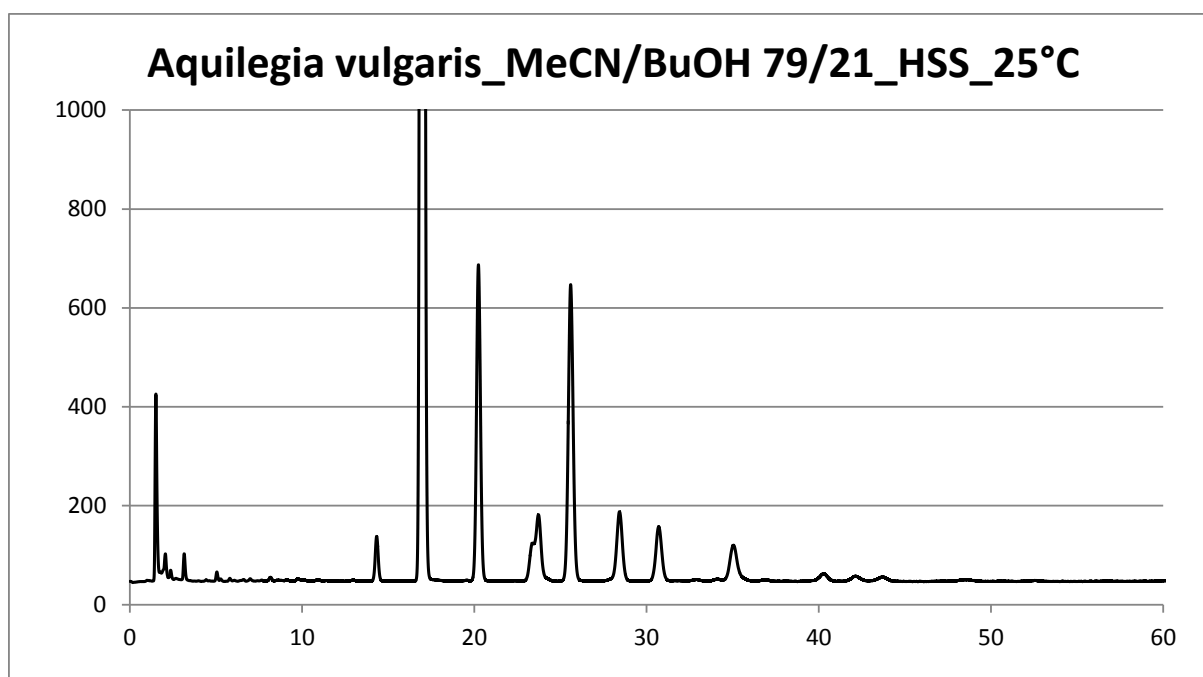
- ✓ Huile de *Jacaranda mimosifolia* (Bignoniaceae): Acide Jacarique (8Z, 10E, 12Z, ω6 C18:3)- (36%) [1].
- ✓ Huile de *Punica granatum* (Punicaceae) de Grenade: Acide Punicique (9Z, 11E, 13Z, ω5 C18:3), (84%) [1].

### III. Séparation par UHPLC/ DEDL

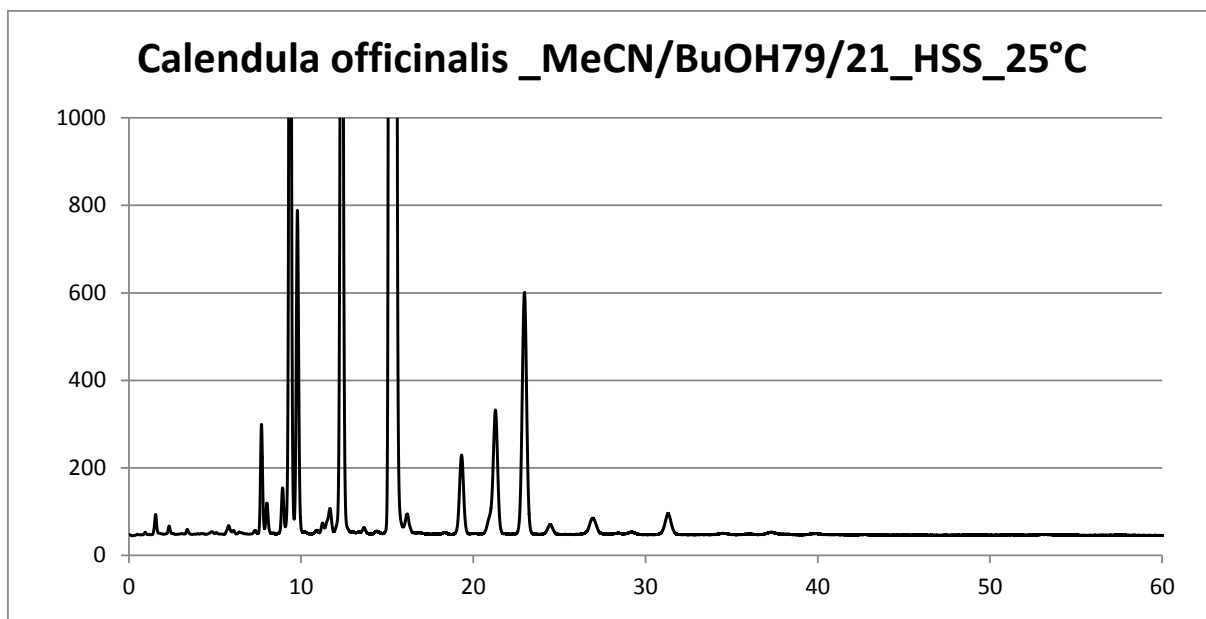
Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, le système chromatographique composé de la colonne Acquity UPLC HSS C18 et de la phase mobile MeCN/BuOH 79/21 à 25°C offre les meilleures séparations des TAG isomères constitués par les différents acides gras isomères en C18:3 présents dans les huiles de *Pinus koraiensis* et de *Borrigo officinalis*.

Bien qu'elles ne soient pas composées des mêmes acides gras mais d'isomères, ces conditions ont été reprises pour l'analyse des 5 huiles de graine de la présente étude.

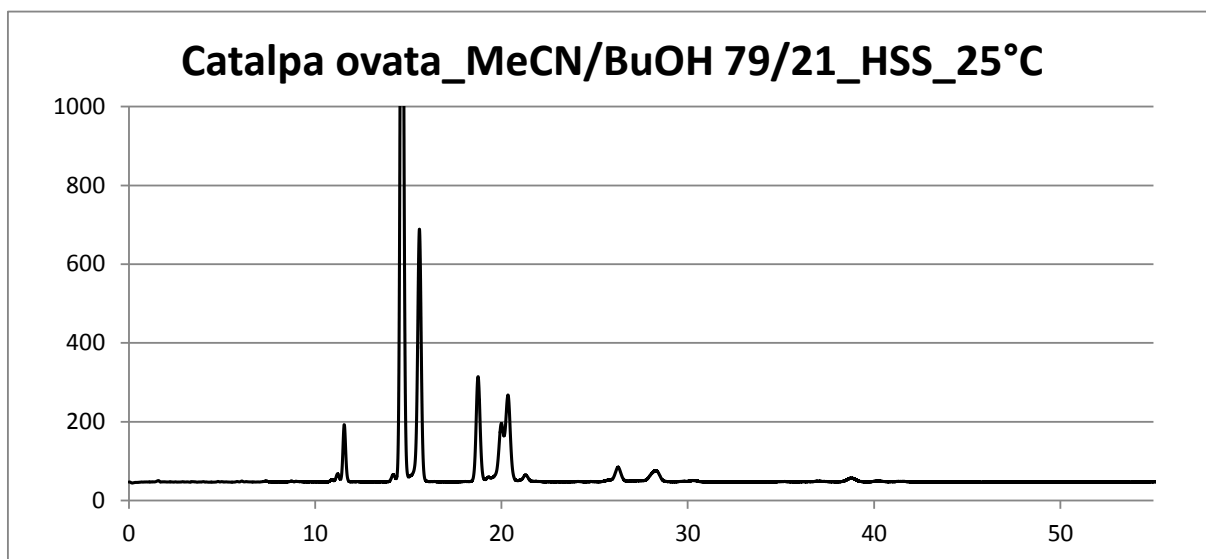
Les chromatogrammes sont donnés ci-dessous:



**Chromatogramme 1** : Analyse de l'huile d'*Aquilegia vulgaris* par UHPLC/DEDL.

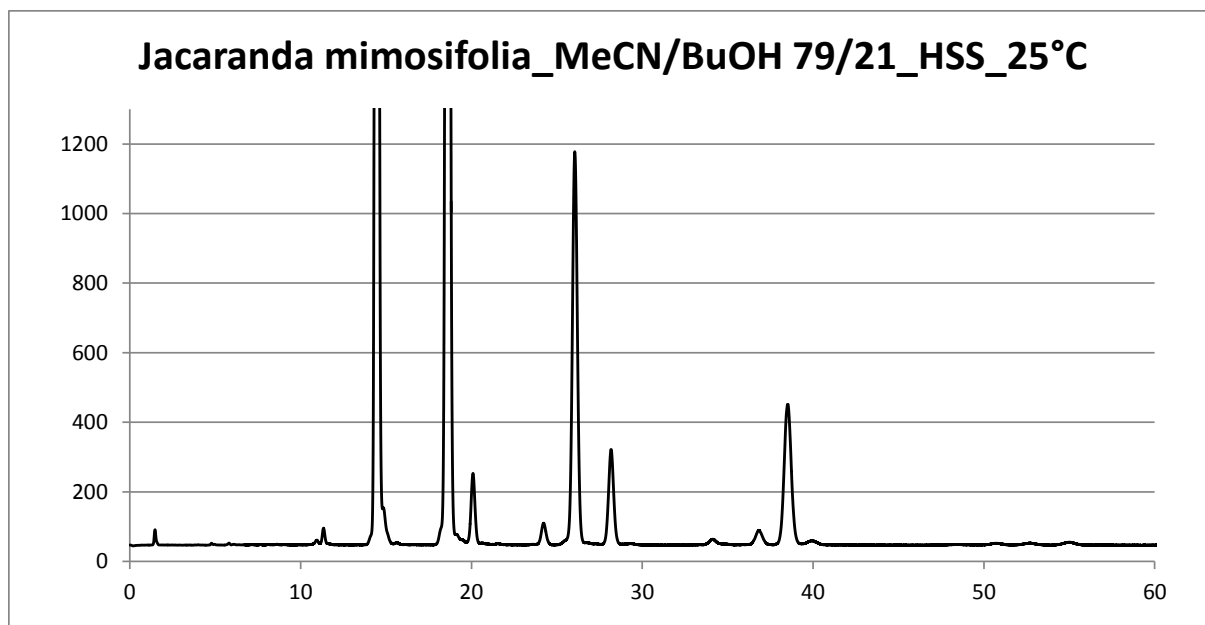


**Chromatogramme 2** : Analyse de l'huile de *Calendula officinalis* par UHPLC/DEDL.

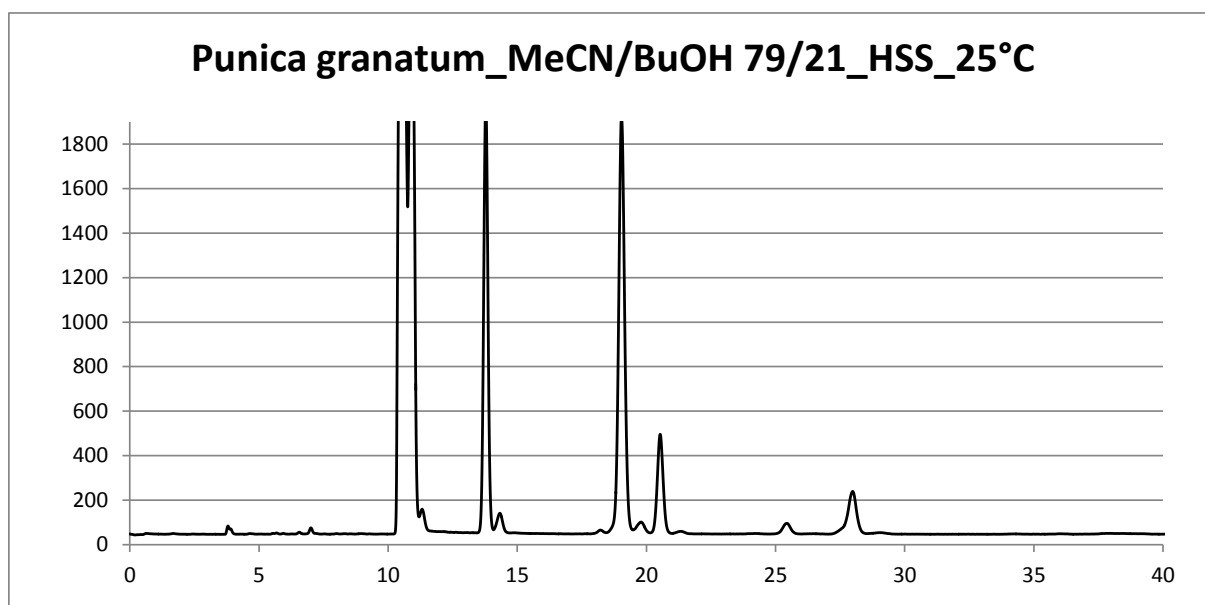


**Chromatogramme 3** : Analyse de l'huile de *Catalpa ovata* par UHPLC/DEDL.





**Chromatogramme 4** : Analyse de l'huile de *Jacaranda mimosifolia* par UHPLC/DEDL.



**Chromatogramme 5**: Analyse de l'huile de *Punica granatum* par UHPLC/DEDL.

#### IV. Démarche d'identification des TAG constituant ces huiles

Comme déjà évoqué, une identification des TAG isomères géométriques est impossible en routine par le seul couplage UHPLC-SM. La spectrométrie de masse ne permettant pas la différenciation de la position géométrique des doubles liaisons le long d'une même chaîne hydrocarbonée.

Nous avons donc adopté la démarche suivante en quatre étapes:

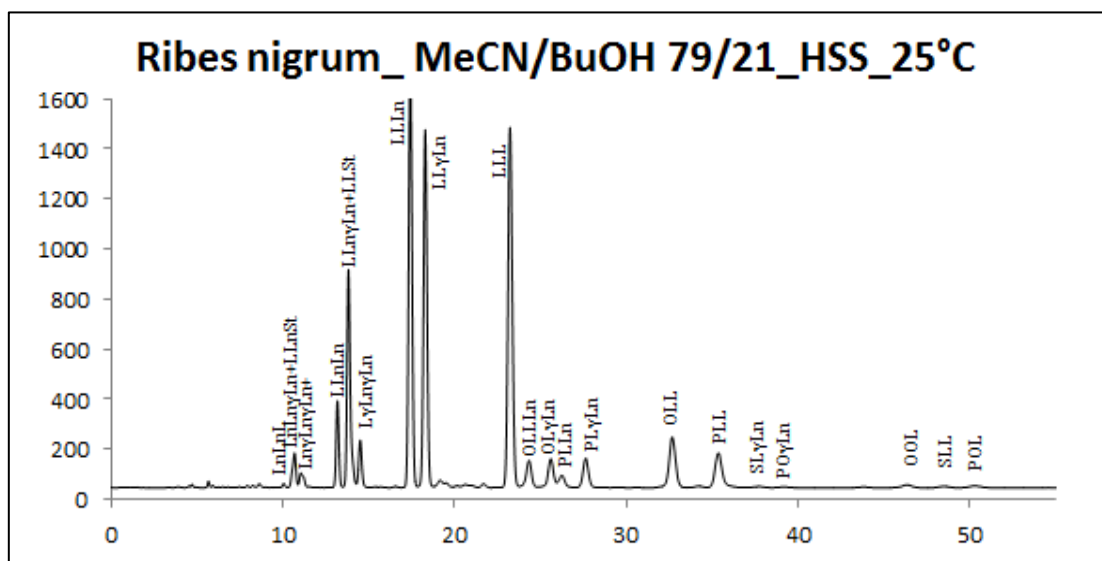
- ✓ Transestérification des TAG pour l'analyse par CPG-SM des esters méthyliques formés, détermination de leur longueur équivalente de chaîne (LEC) et détermination de la composition primaire en acide gras des graines.
- ✓ Calcul des % théoriques de TAG attendus à partir des % d'esters méthyliques identifiés.
- ✓ Analyse par UHPLC-SM pour l'identification du nombre de C et du nombre de doubles liaisons dans chacune des chaînes de chaque TAG. Détermination de la formule semi-développée des TAG.
- ✓ Utilisation de lois de rétentions chromatographiques pour assurer l'identification.

La synthèse des informations recueillies au cours de ces différentes étapes nous a permis de proposer une identification pour chacun des TAG constituant les huiles analysées.

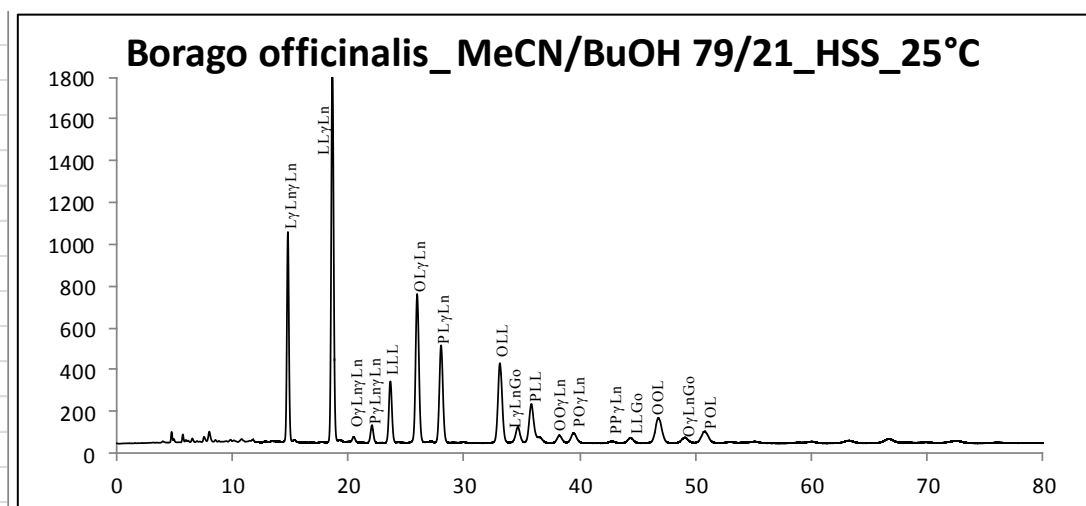
Afin de faciliter l'identification des TAG constitutifs de ces huiles nous nous sommes servis aussi des cinq huiles suivantes, disponibles au laboratoire, dont la composition en TAG a déjà été établie, car possédant dans leur structure des acides gras poly-insaturés majoritaires mais se trouvant comme minoritaires dans les cinq huiles de graine de la présente étude. L'huile de soja a été rajoutée afin de calibrer les chromatogrammes par rapports aux TAG classiques qui sont présents dans la plupart des huiles (TAG formés par les acides gras P, O, L, Ln et S).

- ✓ Huile de *Ribes nigrum* (Saxifragaceae): de pépins de cassis: Acide  $\gamma$  Linoléinique (6Z, 9Z, 12Z,  $\omega$ 6 C18:3) (~14 %) et Acide linoléinique (9Z, 12Z, 15Z,  $\omega$ 3 C18:3) (~14 %) [2].
- ✓ Huile de *Borrago officinalis* (Boraginaceae):de bourrache: Acide  $\gamma$  Linoléinique (6Z, 9Z, 12Z,  $\omega$ 6 C18:3) (17.6-25 %) [3].
- ✓ Huile d'*Aleurites fordii* (Euphorbiaceae): huile de bois de Chine ou huile de Tung: Acide  $\alpha$ -Eléostéarique (9Z, 11E, 13E,  $\omega$ 5 C18:3) (67.7 %) et Acide  $\beta$ -Eléostéarique (9E, 11E, 13E,  $\omega$ 5 C18:3) (11.3 %) [4].
- ✓ Huile de Lin (*Linum*): Acide Linoléinique: (9Z, 12Z, 15Z,  $\omega$ 3 C18:3) (9.8-67.8 %) [5].
- ✓ Huile de *Pinus koraiensis* (Pinaceae) de pignon de pin coréen: Acide Pinoléique (5Z, 9Z, 12Z,  $\omega$ 6 C18:3) (15 %) [6].
- ✓ *Glycinum max* (Fabaceae) : soja [7].

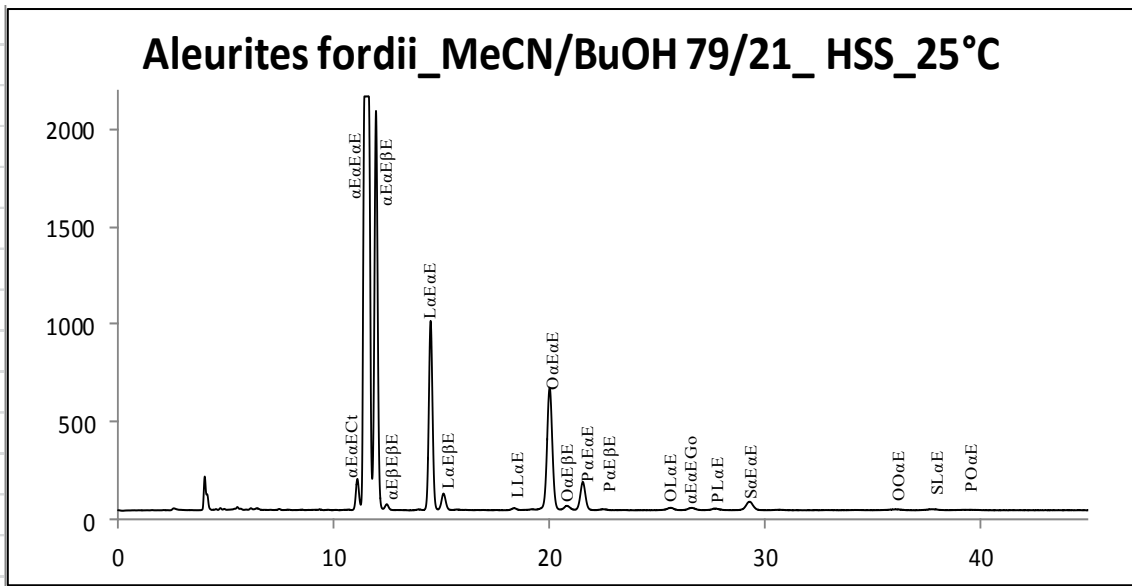
Les chromatogrammes obtenus sont donnés ci-dessous.



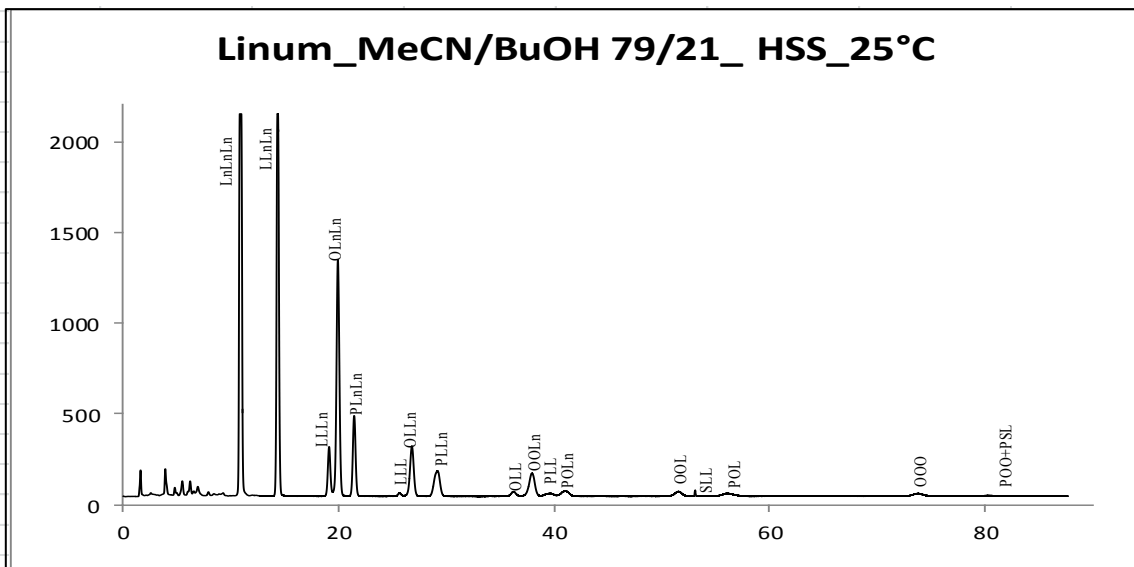
**Chromatogramme 6:** Analyse de l'huile de *Ribes nigrum* UHPLC/DEDL.



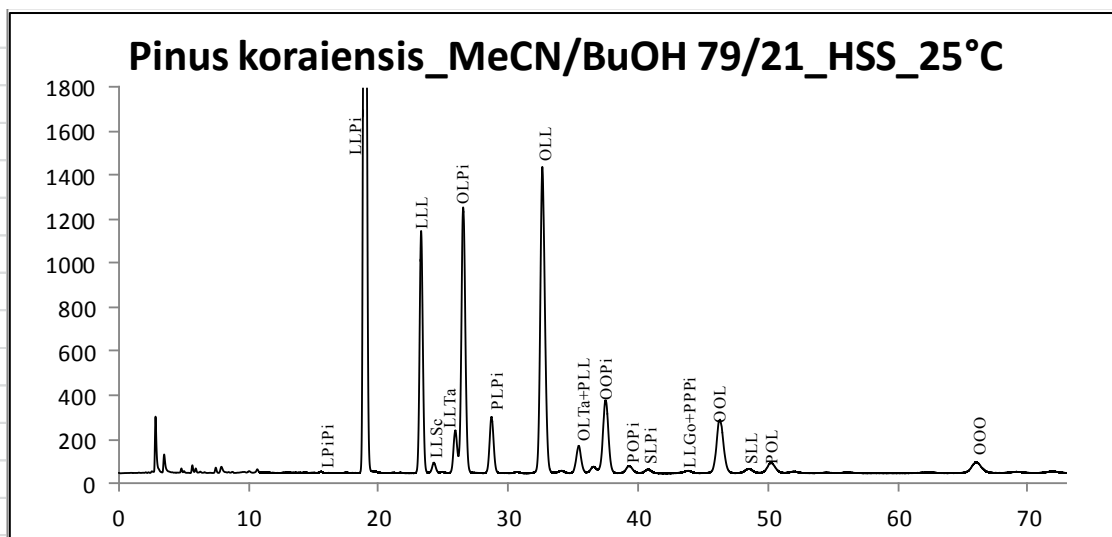
**Chromatogramme 7:** Analyse de l'huile de *Borrago officinalis* par UHPLC/DEDL.



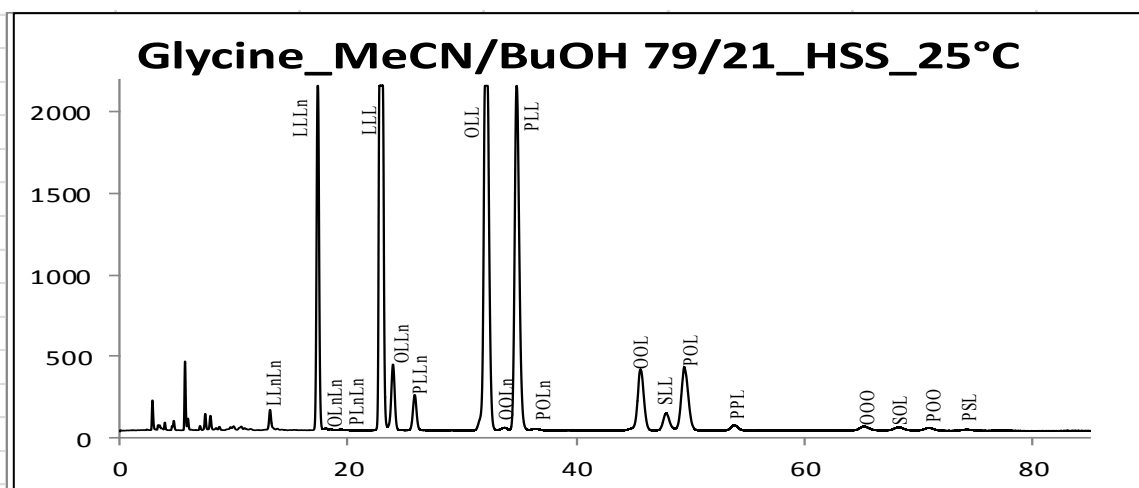
**Chromatogramme 8:** Analyse de l'huile d'*Aleurites fordii* par UHPLC/DEDL.



**Chromatogramme 9:** Analyse de l'huile de *Linum* par UHPLC/DEDL.



**Chromatogramme 10:** Analyse de l'huile de *Pinus koraiensis* par UHPLC/DEDL.



**Chromatogramme 11:** Analyse de l'huile de *Glycine max* par UHPLC/DEDL.

#### IV.1. Détermination des Esters Méthyliques obtenus après transestérification et analyse par CPG/SM

Pour chacune des huiles, nous avons analysé les esters méthyliques obtenus après transestérification et nous avons déterminé la composition des FAME : Fatty Acid Methyl Ester par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CPG/SM.

Les conditions d'analyse sont décrites dans la partie expérimentale.

L'identification des FAME a été réalisée à l'aide de la banque de données de SM combinée à l'abondance de l'AG correspondant par rapport à ce qui est décrit dans la littérature.

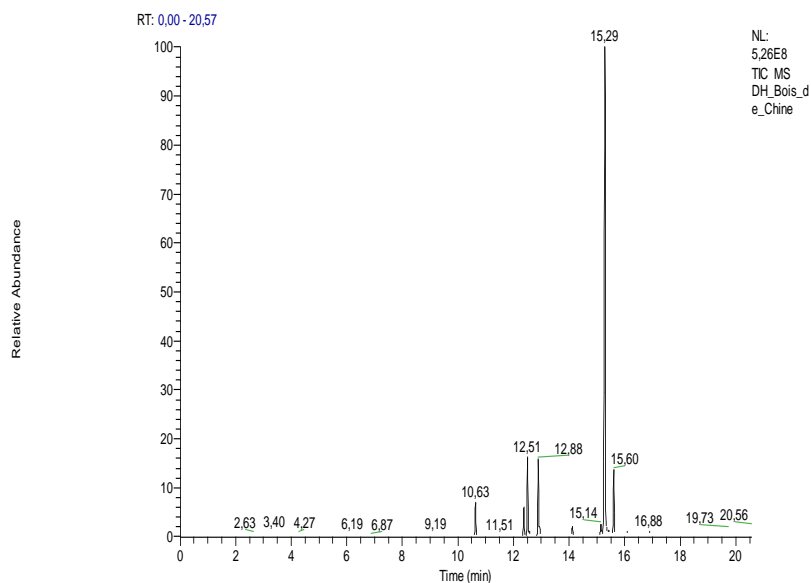
Les Longueurs Equivalentes de Chaines (LEC) sont obtenues en calculant le nombre de carbone équivalent au nombre de carbone saturé de chaîne obtenus en traçant  $\log k = f(NC)$  pour les esters méthyliques en prenant les saturés en référence (exemple : LEC de P = 16, LEC de S = 18) [8, 9].

Ces résultats sont regroupés dans les tableaux de 1 à 11 et les chromatogrammes correspondants 12 à 21.

✓ Huile d'*Aleurites fordii*

**Tableau 1** : huile d'*Aleurites fordii*.

LEC 1	LEC 2	LEC expérimentale	Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Abréviation
R.L. Wolff et al. [8]	W.W.Christie et al. [9]				Notre travail E. Ucciani [1] T. Tagaki et al. [10] P. Blaise et al. [4]				
		16	10.63	C16:0	3.06	3.6	2.6	2.9	P
		18	12.39	C18:0	2.77	2.7	2.13	2.9	S
18.23	18.16	18.16	12.52	C18:1 (Z9)	7.67	8	6.57	5.8	O
18.27	18.23	18.24	12.58	C18:1 (Z11)	0.82		0.36		As
18.65	18.58	18.64	12.88	C18:2 (Z9,Z12)	7.38	10.9	7.07	7.4	L
		18.68	12.93	C18:2 (E9,E12)	1.13				C18:2a
		20	13.99	C20:0	0.23				Ar
20.17	20.14	20.17	14.11	C20:1 (Z11)	0.96		0.54		Go
		21.5	15.14	C18:3 (Z9,Z11,Z13 ou Z8,Z10,Z12)	1.66				C18:3x
		21.7	15.29	C18:3 (Z9,E11,E13)	65.55	85.7	67.69	44.4	$\alpha$ E
		21.87	15.42	C18:3 (E9,E11,Z13)	0.94		0.17	1	Ct
		22.11	15.6	C18:3 (E9,E11,E13)	7.83		11.27	32.9	$\beta$ E
				C18:3(Z9,E11,Z13)			1.33	2.7	Pu
							0.11		Ln
					Total 100				

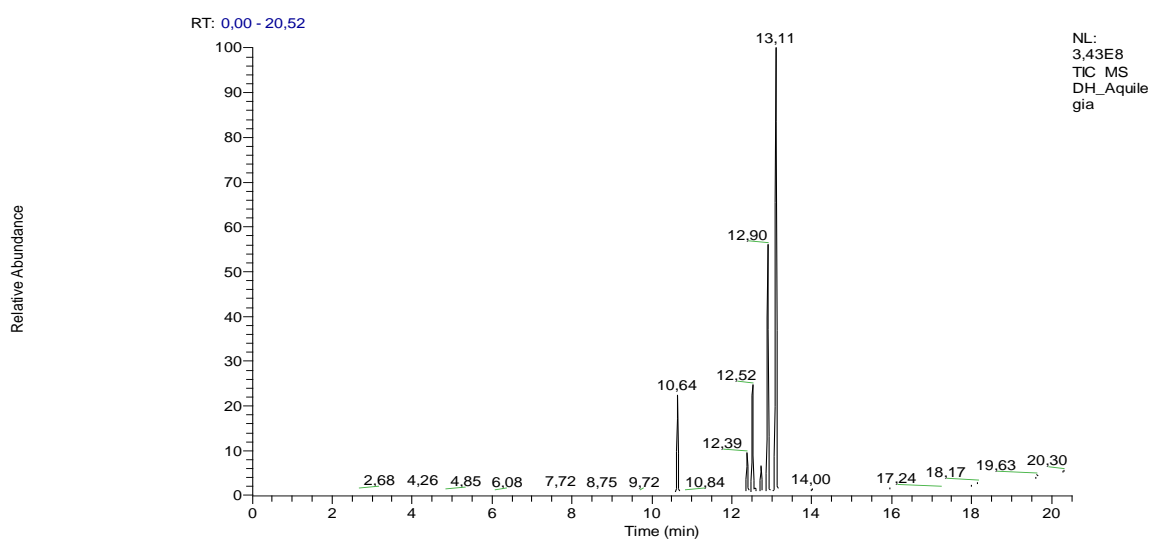


**Chromatogramme 12** : Analyse de l'huile d'*Aleurites fordii* par CPG/SM.

✓ Huile d'*Aquilegia vulgaris* :

**Tableau 2** : huile d'*Aquilegia vulgaris*.

LEC 1	LEC 2	LEC expérimentale	Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Abréviation
R.L.Wolff et al. [8]	W.W.Christie et al. [9]							
				C10:0		0-0.1		C
				C12:0		0-0.1		La
				C14:0		0-0.1		My
		16	10.64	C16:0	8.78	7.3-8	7.6	P
				C16:1 (Z9)		0-0.3		Po
		18	12.39	C18:0	3.92	2-2.8	2.7	S
18.23	18.16	18.16	12.52	C18:1 (Z9)	10.4	5.1-6	5.1	O
				C18:1 (Z7)			0.3	$\alpha$ O
18.27	18.23	18.24	12.58	C18:1 (Z11)	0.66	0-0.4	0.1	As
				C18:2 (Z5,Z9)		0-1.6		Ta
		18.43	12.73	C18:2 (Z9,E13)	2.53		1.4	Aq
18.65	18.58	18.64	12.9	C18:2 (Z9,Z12)	25.69	24-25.3	25.3	L
		18.9	13.11	C18:3 (Z6,Z9,E13)	48.03	56.1-60	56.1	Cb
				C18:3 (Z3,Z6,Z9)			0.1	$\delta$ Ln
				C18:3 (Z9,Z12,Z15)		0-0.2		Ln
				C18:4 (Z3,Z6,Z9,Z12)		0-0.2	0.2	$\alpha$ St
				C20:0		0-0.1	0.1	Ar
				C20:1 (Z11)		0-1		Go
					Total 100			



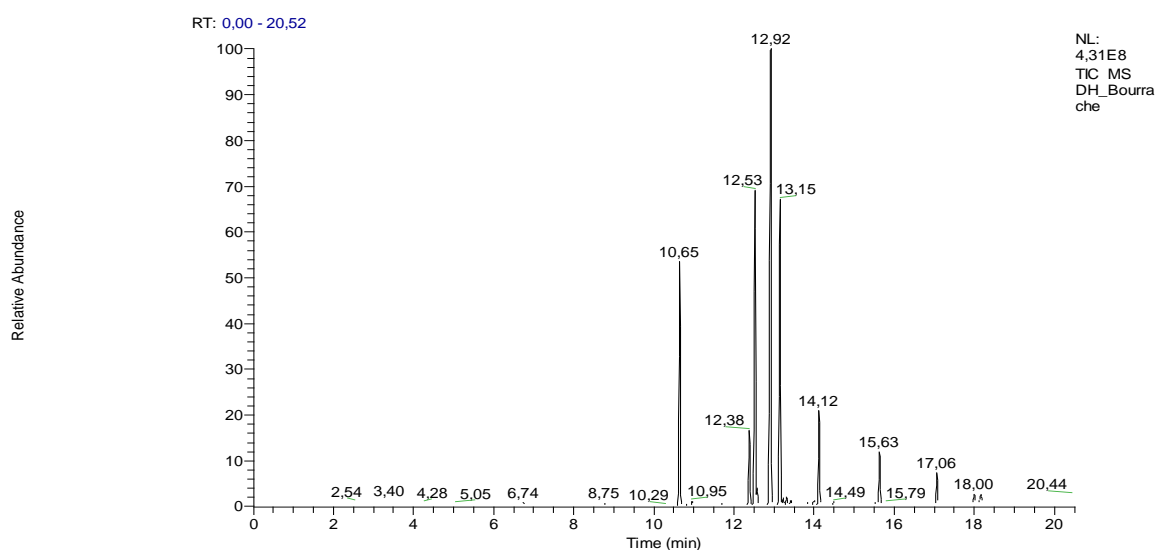
**Chromatogramme 13** : Analyse de l'huile d'*Aquilegia vulgaris* par CPG/SM.



✓ Huile de *Borrigo officinalis*

**Tableau 3 : Huile de *Borrigo officinalis*.**

LEC 1	LEC 2	LEC expérimentale	Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Aire (%)	Abréviation
R.L.Wolff et al. [8]	W.W.Christie et al. [9]					Notre travail	E. Ucciani [1]
			6.74	C12:0	0.13		La
			8.75	C14:0	0.11	0-0.1	M
		16	10.65	C16:0	12.81	10-12.0	P
16.27	16.25	16.21	10.83	C16:1 (Z9)	0.05	0.1-0.4	Po
	16.37	16.35	10.95	C16:1 (Z11)	0.26		?
			11.51	C17:0	0.08		Ma
		18	12.38	C18:0	4.51	2.8-5.7	S
18.23	18.16	18.16	12.53	C18:1 (Z9)	19.32	14.5-21.3	O
18.27	18.23	18.24	12.58	C18:1 (Z11)	0.79		As
18.65	18.58	18.64	12.9	C18:2 (Z9,Z12)	32.27	34.5-39	L
18.91	18.85	18.95	13.15	C18:3 (Z6,Z9,Z12)	17.37	17.6-25	γLn
		19.04	13.22	C18:3	0.4		C18:3a
		19.15	13.31	C18:3	0.47		C18:3b
19.26	19.18	19.29	13.42	C18:3 (Z9,Z12,Z15)	0.36	0.1-1	Ln
		20	13.99	C20:0	0.38		Ar
20.17	20.14	20.17	14.12	C20:1 (Z11)	5.18		Go
20.69	20.56	20.67	14.5	C20:2 (Z11,Z14)	0.22		Pd
		22	15.5	C22:0	0.17		Be
22.16	22.11	22.17	15.63	C22:1 (Z13)	3.16		Er
		24	16.92	C24:0	0.08		Lg
24.15		24.2	17.06	C24:1 (Z15)	1.87		Ne
Total 100							

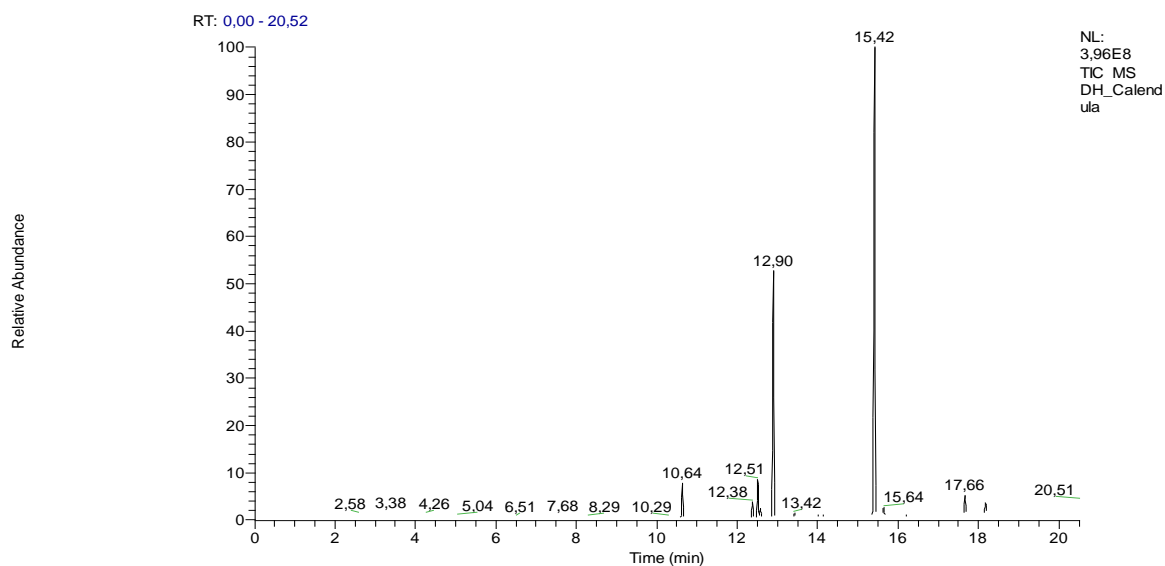


**Chromatogramme 14 : Analyse de l'huile de *Borrigo officinalis* par CPG/SM.**

✓ Huile de *Calendula officinalis*

**Tableau 4** : Huile de *Calendula officinalis*.

LEC 1	LEC 2	LEC expérimentale	Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Abréviation
R.L.Wolff et al. [8]	W.W.Christie et al. [9]				Notre travail E. Ucciani [1] T. Tagaki et al. [10] F.Dulf et al. [12]				
				C14:0				0.15	My
		16	10.64	C16:0	3.77	2.4-5	2.4	5.5-9.5	P
		18	12.38	C18:0	1.78	1.2-2	1.22	1.2-2	S
18.23	18.16	18.16	12.51	C18:1 (Z9)	4.25	4-5.5	3.95	5.7-14	O
18.27	18.23	18.24	12.58	C18:1 (Z11)	1.35		0.47		As
18.65	18.58	18.64	12.9	C18:2 (Z9,Z12)	29.31	28-34	27.92	22-29	L
19.26	19.18	19.29	13.42	C18:3 (Z9,Z12,Z15)	0.54	0-0.7	0.7	0.06-0.15	Ln
		20	13.99	C20:0	0.38	0-0.2	0.24	0.4-1.1	Ar
20.17	20.14	20.17	14.12	C20:1 (Z11)	0.39	0-0.3	0.33	0.1-0.58	Go
			15.14	C18:3(Z9,Z11,Z13) ou (Z8,Z10,Z12)					C18:3x
		21.87	15.42	C18:3 (E8,E10,Z12)	56.91	53-62.2	62.17	45.7-54.6	Cd
			15.51	C18:3					C18:3x
		22.17	15.64	C18:3 (E8,E10,E12)	1.32		0.24	0.3-0.7	βCd
					Total 100				

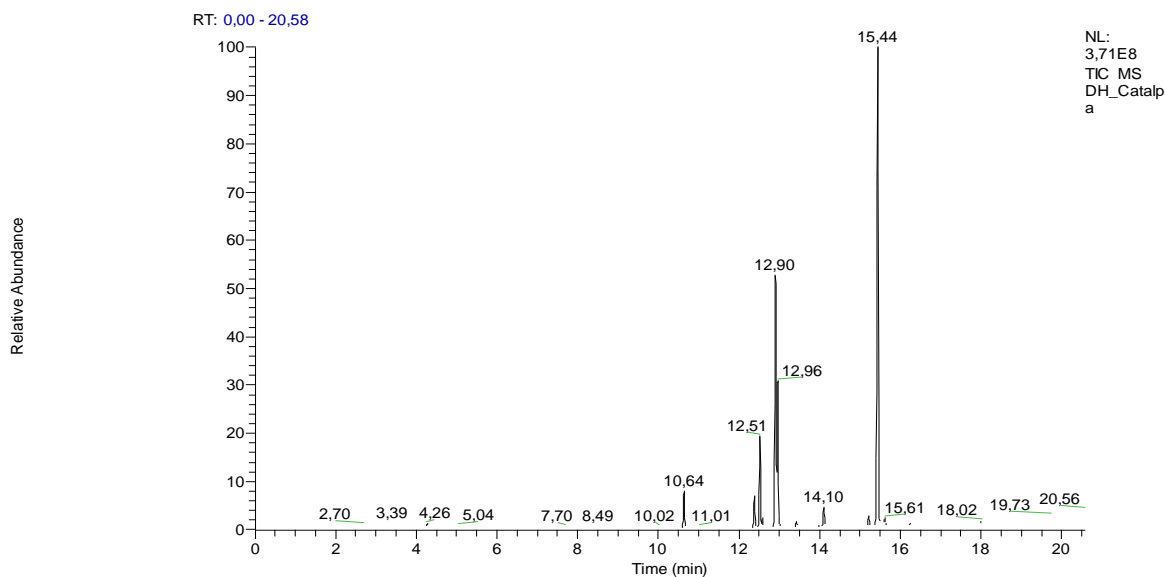


**Chromatogramme 15** : Analyse de l'huile de *Calendula officinalis* par CPG/SM.

✓ Huile de *catalpa ovata*

**Tableau 5** : Huile de *catalpa ovata*.

LEC 1	LEC 2	LEC expérimentale	Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Abréviation
R.L.Wolff et al. [8]	W.W.Christie et al. [9]					Notre travail	E. Ucciani [1]	T. Tagaki et al. [10]	S.Özgül-Yücel et al. [13]
		16	10.64	C160	3.42	2.8	2.77	5.3	P
		16.21	10.83	C16:1 (Z9)	t				Po
		17	11.52	C170	t				
		18	12.38	C180	2.91	2.7	2.65	2.8	S
18.23	18.16	18.16	12.51	C18:1 (Z9)	8.67	7.7	7.71	13.7	O
18.27	18.23	18.24	12.58	C18:1 (Z11)	1.01		0.97		As
18.65	18.58	18.64	12.9	C182 (Z9,Z12)	24.02	40	28.28	41.7	L
		18.68	12.93	C182 (E9,E12)	14.07		7.35		C182a
				C182 (Z9,E12)			0.91		
19.26	19.18	19.29	13.42	C183 (Z9,Z12,Z15)	0.49	0.6	0.56	2.1	Ln
		20	14.1	C200	1.82	0.2	0.23	1.1	Ar
		21.59	15.21	C183(Z9,E11,Z13)	0.92		t		Pu
		21.87	15.42	C183 (E9,E11,Z13)	45.3	42.2	42.25	14.9	Ct
				C183 (Z9,E11,E13)				4.1	αE
		22.11	15.61	C183 (E9,E11,E13)	0.77	0.5	0.55	8.5	βE
				C20:1 (Z11)		0.4	0.42	1.6	Go
				C20:1 (Z9)				0.3	Ga
				C220				1.1	Be
					Total 100				

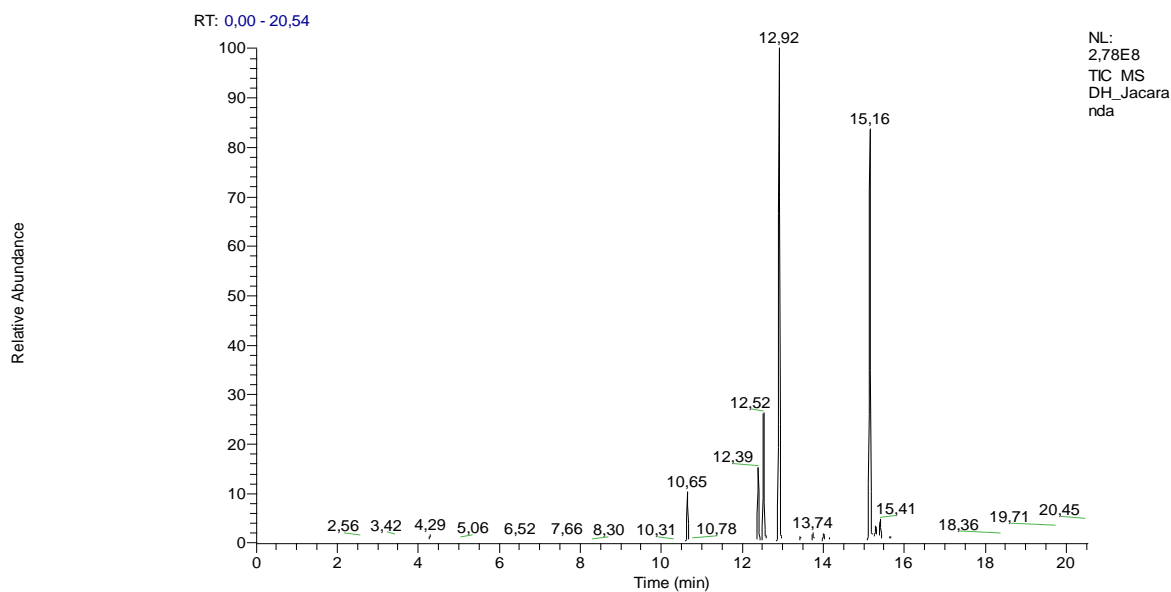


**Chromatogramme 16** : Analyse de l'huile de *Catalpa ovata* par CPG/SM.

✓ Huile de *Jacaranda mimosifolia*

**Tableau 6** : Huile de *Jacaranda mimosifolia*.

LEC 1	LEC 2	LEC expérimentale	Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Abréviation
R.L.Wolff et al. [8]	W.W.Christie et al. [9]				Notre travail E. Ucciani [1] J.Miranda et al. [14]			
		16	10.65	C16:0	3.5	4	3.7	P
		18	12.39	C18:0	5.93	4	5.7	S
18.23	18.16	18.16	12.52	C18:1 (Z9)	10.36	12	12.8	O
18.27	18.23	18.24	12.59	C18:1 (Z11)	1.05			As
18.65	18.58	18.64	12.92	C18:2 (Z9,Z12)	39.24	44	41.6	L
19.26	19.18	19.29	13.43	C18:3 (Z9,Z12,Z15)	0.34		0.4	Ln
		19.69	13.74	C18:2 (E10,Z12)	0.65		0.7	18:2b
		20	14.01	C20:0	0.6		0.5	Ar
20.17	20.14	20.17	14.13	C20:1 (Z11)	0.34			Go
		21.5	15.16	C18:3 (Z8,E10,Z12)	34.02	36	32.8	Ja
		21.7	15.3	C18:3 (Z9,E11,E13)	1.79			αE
		21.7	15.41	C18:3 (E8,E10,Z12)	1.86		1.4	Cd
		21.87		C18:3 (E8,E10,E12)			0.3	βCd
		22	15.65	C22:0	0.33			Be
					Total 100			

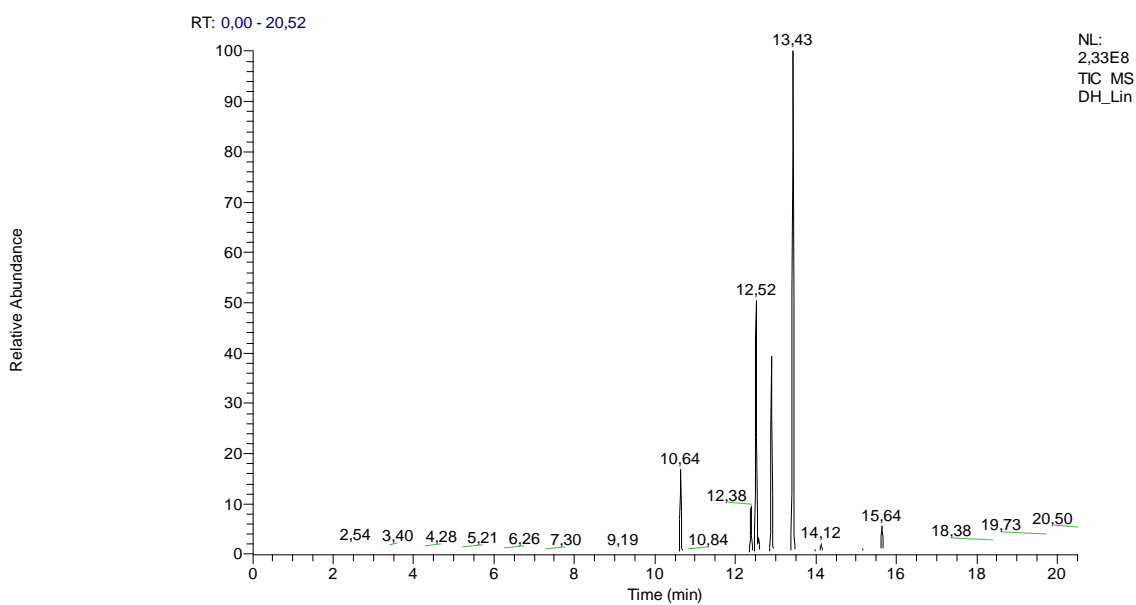


**Chromatogramme 17** : Analyse de l'huile de *Jacaranda mimosifolia* par CPG/SM.

✓ Huile de *Linum*

**Tableau 7** : Huile de *Linum*.

LEC 1	LEC 2	LEC expérimentale	Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Aire (%)	Abréviation
R.L.Wolff et al. [8]	W.W.Christie et al. [9]				Notre travail E. Ucciani [1]		
		16	10.64	C16:0	6.55	4.7-7.5	P
		18	12.38	C18:0	3.87	1.5-2.3	S
18.23	18.16	18.16	12.52	C18:1 (Z9)	22.09	21.9-22.5	O
18.27	18.23	18.24	12.58	C18:1 (Z11)	1.73		As
18.65	18.58	18.64	12.9	C18:2 (Z9,Z12)	16.5	15.4-28.1	L
19.26	19.18	19.29	13.43	C18:3 (Z9,Z12,Z15)	45.43	39.8-64.8	Ln
		20	14	C20:0	0.25		Ar
20.17	20.14	20.17	14.12	C20:1 (Z11)	0.84		Go
		22	15.51	C22:0	0.19		Be
22.16	22.11	22.17	15.64	C22:1 (Z13)	2.55		Er
					Total 100		

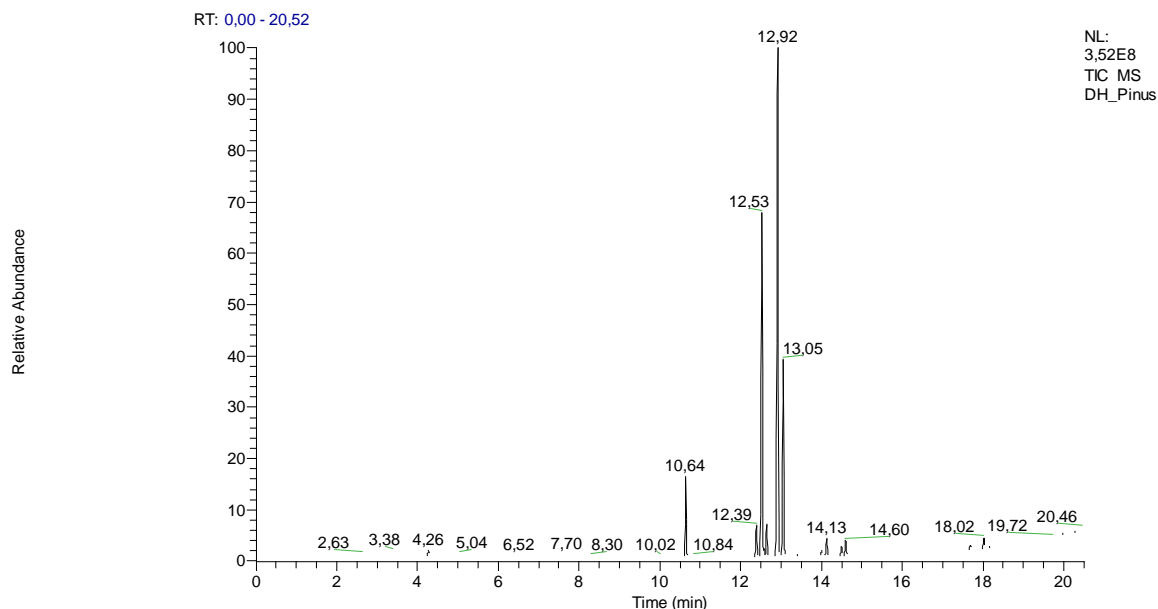


**Chromatogramme 18** : Analyse de l'huile de *Linum* par CPG/SM.

✓ Huile de *Pinus koraiensis*

**Tableau 8 :** Huile de *Pinus koraiensis*.

LEC 1	LEC 2	LEC expérimentale	Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Abréviation
R.L.Wolff et al. [8]	W.W.Christie et al. [9]				Notre travail E. Ucciani [1] Acheampong et al. [6] R.L.Wolff et al. [8]				
		16	10.64	C16:0	5.76	4.9-5.1	4.2	4.2	P
16.27	16.25	16.21	18.83	C16:1 (Z9)	t		t	0.1	Po
				C17:0			t	t	Ma
				C17:1 (Z9)			t		Mo
		18	12.39	C18:0	2.45	2-2.1	1.8	1.82	S
18.23	18.16	18.16	12.53	C18:1 (Z9)	27.87	26.3-27	24	24.06	O
18.27	18.23	18.24	12.58	C18:1 (Z11)	0.85	0-0.2	1	1.46	As
18.43		18.31	12.64	C18:2 (Z5,Z9)	2.49	1.9-2.3	1.8	1.8	Ta
18.65	18.58	18.64	12.9	C18:2 (Z9,Z12)	42.39	43.6-46.7	48.4	48.38	L
				C20:2 (Z5,Z11)			t	0.1	Ke
				C20:3 (Z7,Z11,Z14)			t	t	Hp
18.91		18.83	13.05	C18:3 (Z5,Z9,Z12)	14.35	14.5-15	14.9	14.92	Pi
19.26	19.18	19.29	13.42	C18:3 (Z9,Z12,Z15)	t		0.2	0.17	Ln
			13.74	C18:2 (E10,Z12)	t				
		20	14	C20:0	0.46	0.3-0.7	t		Ar
20.17	20.14	20.17	14.13	C20:1 (Z11)	1.38	1-1.7	1	1.03	Go
20.69	20.56	20.67	14.5	C20:2 (Z11,Z14)	0.7	0.5-0.6	0.5	0.49	Dh
20.83		20.8	14.6	C20:3 (Z5,Z11,Z14)	1.3	0.8-1.3	0.9	0.9	Sc
				C22:0			t		Be
Total 100									

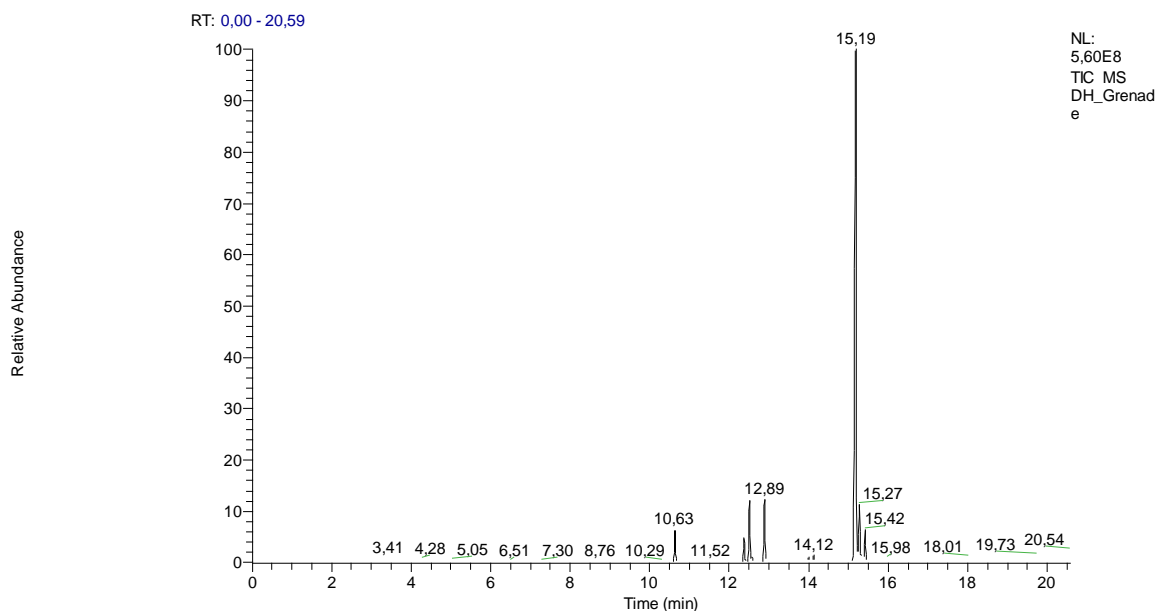


**Chromatogramme 19 :** Analyse de l'huile de *Pinus koraiensis* par CPG/SM.

✓ Huile de *Punica granatum*

**Tableau 9 : Huile de *Punica granatum*.**

LEC 1	LEC 2	LEC expérimentale	Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)	Abréviation
R.L.Wolff et al. [8] W.W.Christie et al. [9]		Notre travail E. Ucciani [1] T. Tagaki et al. [10] Özgül-Yücel et al. A.Khoddami et al. [15]								
		16	10.63	C160	2.94	5	2.25	2	4.5	P
			11.52	C170	0.08					Ma
		18	12.38	C180	2.29	3	1.77	1.6	2.5	S
18.23	18.16	18.16	12.51	C18:1 (Z9)	5.93	3	3.98	3.7	7.6	O
18.27	18.23	18.24	12.57	C18:1 (Z11)	0.84		0.35			As
18.65	18.58	18.64	12.89	C182 (Z9,Z12)	6.21	3	4.23	3.3	6.6-8.7	L
		20	13.99	C200	0.47		0.42	3	0.3	Ar
2017	2014	2017	14.12	C20:1 (Z11)	0.69		0.54	0.1		Go
				C20:1 (Z9)					0.65	Ga
		21.59	15.21	C183 (Z9,E11,Z13)	69.4	84	82.99	57.3	75.2-78.2	Pu
				C183 (E9,E11,E13)				21.1		βE
				C183 (Z9,Z12,Z15)				0.1		Ln
		21.7	15.27	C183 (Z9E11E13)	6.5	2	3.16			αE
		21.75	15.33	C183 (Z8,E10,E12)	0.89					C18_3e
		21.87	15.42	C183 (E9,E11,Z13)	3.76		0.2	7.6		Ct
					Total 100					

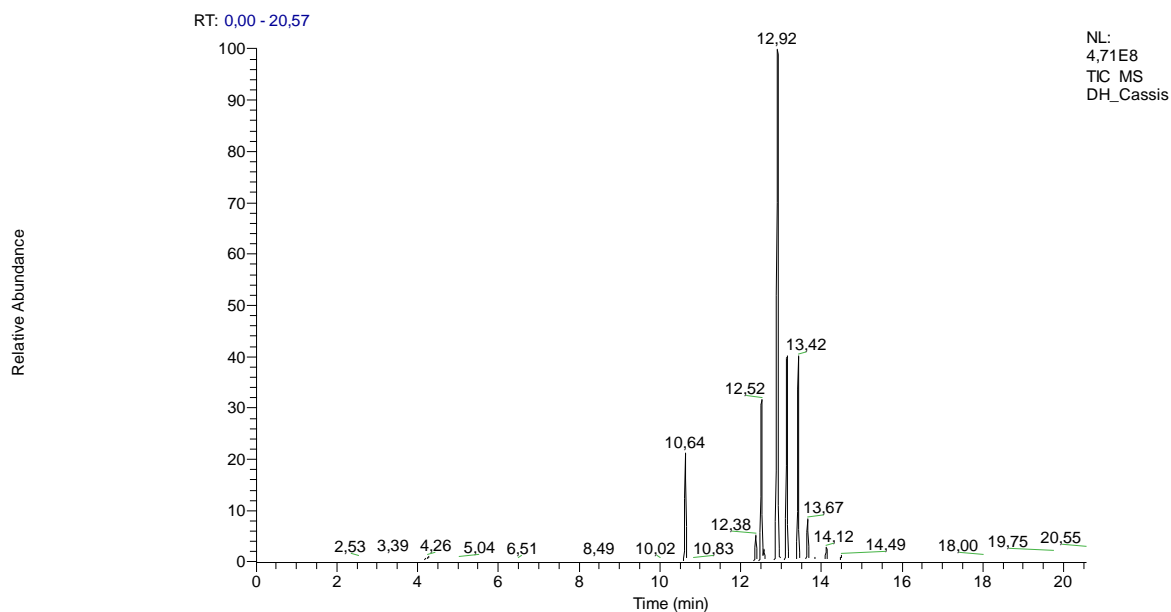


**Chromatogramme 20 : Analyse de l'huile *Punica granatum* par CPG/SM.**

✓ Huile de *Ribes nigrum*

**Tableau 10** : Huile de *Ribes nigrum*.

LEC 1	LEC 2	LEC expérimentale	Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Aire (%)	Abréviation
R.L.Wolff et al. [8]	W.W.Christie et al. [9]					Notre travail E. Ucciani [1]	
		16	10.64	C16:0	7.25	6.4-6.5	P
16.27	16.25	16.21	10.83	C16:1 (Z9)	0.15		Po
			11.52	C17:0	t		Ma
		18	12.38	C18:0	1.77	1.3-1.5	S
18.23	18.16	18.16	12.52	C18:1 (Z9)	11.61	9.5-11.1	O
18.27	18.23	18.24	12.57	C18:1 (Z11)	1.16		As
18.65	18.58	18.64	12.92	C18:2 (Z9,Z12)	45.87	47.7-48	L
18.91	18.85	18.95	13.15	C18:3 (Z6,Z9,Z12)	14.35	16-17	γLn
		19.15	13.31	C18:3	0.4		C18:3b
19.26	19.18	19.29	13.42	C18:3 (Z9,Z12,Z15)	14.56	12.4-13	Ln
19.53	19.45	19.6	13.67	C18:4 (Z6,Z9,Z12,Z15)	2.89	2.6-3.5	St
20.17	20.14	20.17	14.12	C20:1 (Z11)	t		Go
20.69	20.56	20.67	14.5	C20:2 (Z11,Z14)	t		Dh
Total 100							



**Chromatogramme 21** : Analyse de l'huile de *Ribes nigrum* par CPG/SM.



Pour certaines huiles on a trouvé des AG «mineurs» dont la configuration n'est pas déterminée.

Pour les identifier nous avons déterminé expérimentalement les LEC de chaîne de chacun des acides afin de tenir compte de petites dérives éventuelles d'une analyse GC à l'autre conduisant pour un même FAME à une valeur de temps de rétention très légèrement différente mais à des valeurs de LEC invariantes. Les valeurs obtenues sont légèrement différentes de celles obtenues sur Carbowax 20M, phase stationnaire analogue à celle que nous avons utilisée mais pas strictement identiques. Il faut d'ailleurs remarquer que les valeurs de LEC reportées dans la littérature sur cette phase sont légèrement différentes selon la publication considérée [9] et très différentes de celles sur Silar 10CP et OV1 [10]. Elles nous ont permis de repérer les AG mineurs analogues d'une huile à une autre tel que : l'acide Calendique majoritaire dans l'huile de *Calendula officinalis* a une LEC de 21.87 et l'acide Catalpique majoritaire dans l'huile de *Catalpa ovata* a aussi une LEC de 21.87. Dans les huiles d'*Aleurites fordii*, *Punica granatum* et *Jacaranda mimosifolia* il y a un C18 :3 de LEC 21.87 on ne sait donc pas si c'est du catalpique ou du calendique.

Par contre la littérature permet de trancher :

Dans *Aleurites fordii* c'est du Ct et dans *Punica granatum* et *Jacaranda mimosifolia* c'est du Cd. Dans les huiles de *Catalpa ovata* et *Aleurites fordii*, il y a le même C18 :2 non identifié de LEC 18.68. Après l'étude bibliographique, il y a de fortes présomptions pour que ce soit du C18 :2 E9E12.

Dans l'huile d'*Aleurites fordii* il y a un C18 :3 de LEC 21.50. D'après la littérature [4, 10], Pu a été trouvé. Or dans l'huile *Punica granatum* Pu l'AG majoritaire a une LEC de 21.59 et dans l'huile de *Jacaranda mimosifolia* Ja l'AG majoritaire a une LEC de 21.52. Donc le C18 :3 d'*Aleurites fordii* ne peut pas être du Pu mais à la rigueur du Ja ou vu sa LEC légèrement inférieure à celle de Ja plus vraisemblablement soit du C18 :3 Z9Z11Z13 soit du C18:3 Z8Z10Z12.

Dans l'huile de *Calendula officinalis* avec une LEC de 22.17 il y a un C18 :3 non identifié qui d'après la littérature doit être du  $\beta$ Cd. Il n'y a aucune confusion possible avec le  $\beta$ E de LEC 22.11 dont on est certain de la présence dans *Aleurites fordii* et *Catalpa ovata* d'après la littérature.

Dans l'huile de *Jacaranda mimosifolia* avec une LEC de 19.69 il y a un C18 :2. D'après la littérature cela correspond à C18 :2 E10Z12 [14].

De même le C18 :3 de LEC 20.75 dans les huiles de *Punica granatum* et *Jacaranda mimosifolia* a de fortes chances d'être du C18 :3 Z8E10E12.

Il y a 2 acides gras polyinsaturés qui ont été repérés en quantité mineure et dont la stéréochimie n'a pas été déterminée ou reportée dans la littérature. Ce sont un C18 :3 de LEC 19.04 dans l'huile de *Borrigo officinalis* et un autre C18 :3 de LEC 19.15 dans les huiles de *Borrigo officinalis* et *Ribes nigrum*.

Les valeurs théoriques des LEC de certains FAME comparées à la valeur déterminée expérimentalement a permis de conforter leur authentification. Pour cela, la méthode de calcul des LEC théoriques due à Wolff a été appliquée [8]. Elle nécessite la connaissance des LEC de composés parfaitement identifiés en utilisant par exemple les formules similaires à celles données ci-dessous:

$$\text{LEC (C18 :2 Z5Z9)} = \text{LEC (C18 :1 Z5)} + \text{LEC (C18 :1 Z9)} - 18.$$

$$\text{LEC (C18 :3 Z5Z9Z12)} = \text{LEC (C18 :2 Z5Z9)} + \text{LEC (C18 :2 Z9Z12)} - \text{LEC (C18 :1 Z9)}.$$

$$\text{LEC (C18 :4 Z5Z9Z12Z15)} = \text{LEC (C18 :3 Z5Z9Z12)} + \text{LEC (C18 :3 Z9Z12Z15)} - \text{LEC (C18 :2 Z9Z12)}.$$

Enfin nous avons vérifié que l'ordre d'élution que nous avons observé pour les deux séries C18 :3 8, 10, 12 et C18 :3 9, 11, 13 est le même c'est-à-dire ZEZ<ZEE<EEZ<EEE. Il est conforme aux résultats reportés dans la littérature pour ce type d'isomères sur ce type de phase stationnaire. Cela permet aussi de prédire que l'isomère ZZZ sort avant ces quatre isomères.

Enfin la série C18 :3 9, 11, 13 est moins retenue que la série C18 :3 8, 10, 12 ce qui conduit globalement à l'ordre suivant : Ja<Pu<αE<Cd<Ct<βE<βCd.

#### **IV.2. Détermination de l'abondance statistique des TAG**

A partir de la composition obtenue par CPG/SM, un calcul statistique basé sur une distribution aléatoire des acides gras sur les trois carbones du glycérol a été effectué [16-17]. Il donne l'abondance probable des TAG observables. Il est important de noter que la répartition naturelle ne suit pas systématiquement cette distribution au hasard; un TAG dont le pourcentage est statistiquement très abondant peut en réalité être minoritaire ou absent. Par contre si le calcul attribue un faible pourcentage à un TAG, ce dernier ne peut pas être expérimentalement un TAG majoritaire ou très abondant [6, 18].

Les tableaux 1 à 10 correspondant à chaque huile sont regroupés en annexe 2.

Pour chaque huile, les TAG attendus sont classés par nombre de partition croissant et pour un même NP, nous avons classés les TAG par pourcentage de probabilité décroissante.

Notre hypothèse d'attribution s'est basée sur trois critères:

- ✓ la position du pic chromatographique par rapport aux TAG classiques qui l'entourent et qui sont présents dans les huiles de lin et de soja,
- ✓ leur abondance (%A)
- ✓ et la valeur de l'abondance théorique des TAG attendus calculée.

Dans un premier temps l'hypothèse d'attribution a été conduite en considérant tous les TAG dont l'abondance théorique est supérieure à 1%. Dans le cas où tous les TAG d'une huile ne sont pas identifiés suite à cette première étape, nous avons considéré dans un deuxième temps tous les TAG dont l'abondance théorique est comprise entre 0.1 et 1% pour identifier les TAG mineurs encore non indexés.

Cette hypothèse doit ensuite être confortée par la vérification de la position au sein du chromatogramme du TAG considéré en fonction de sa structure:

- ✓ soit par comparaison avec celle d'un TAG standard injecté dans les mêmes conditions,
- ✓ soit par coélution avec un TAG parfaitement connu d'une huile de référence lors d'une analyse en dopage des deux huiles.
- ✓ soit à l'aide des lois de rétention chromatographiques des TAG.

L'attribution d'une structure à chaque TAG consiste à faire la synthèse de ces différentes informations. Afin de ne pas être trop général, nous avons décidé de poursuivre l'explication de notre démarche en la développant, en particulier, pour une huile.

Dans la suite de ce chapitre nous illustrerons notre travail d'identification des TAG dans le cas particulier de l'huile de *Punica granatum*. Il sera suivi par une synthèse relative aux éventuelles particularités que nous avons eues à gérer pour les autres huiles étudiées.

✓ **Huile de *Punica granatum***

Les FAME obtenus par CPG/SM sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 11** : Identification de l'huile de *Punica granatum* par CPG/SM.

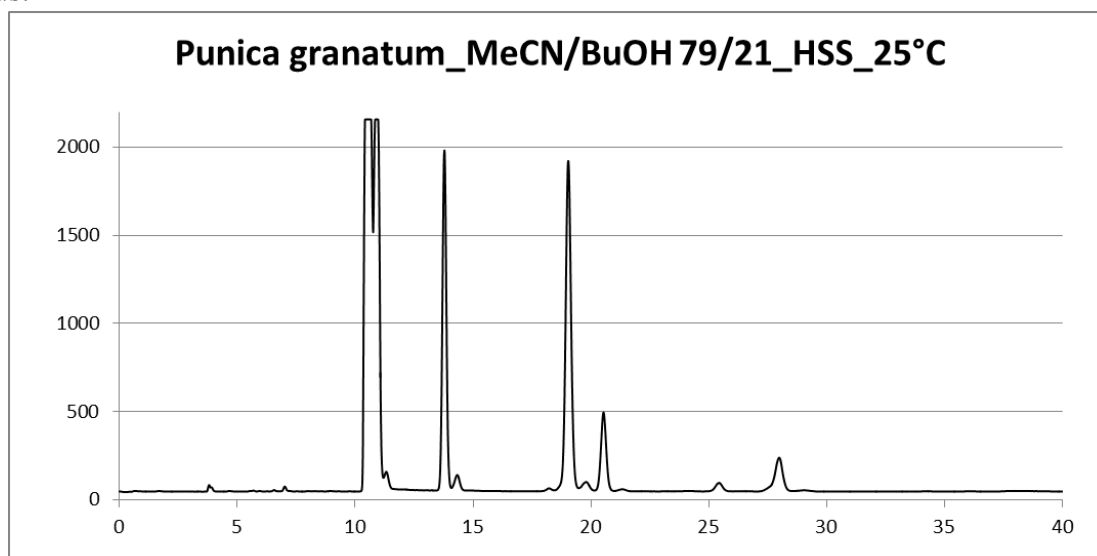
Tr (min)	Attribution structurale	Aire (%)	Abréviation
		<b>Notre travail</b>	
10.63	C16:0	2.94	P
11.52	C17:0	0.08	Ma
12.38	C18:0	2.29	S
12.51	C18:1 (Z9)	5.93	O
12.57	C18:1 (Z11)	0.84	As
12.89	C18:2 (Z9,Z12)	6.21	L
13.99	C20:0	0.47	Ar
14.12	C20:1 (Z11)	0.69	Go
15.21	C18:3(Z9,E11,Z13)	69.4	Pu
15.27	C18:3 (Z9E11E13)	6.5	αE
15.33	C18:3 (Z8,E10,E12)	0.89	C18_3e
15.42	C18:3 (E9,E11,Z13)	3.76	Ct
		Total 100	

A partir de cette composition en acide gras obtenu pour *Punica granatum*, nous avons déduit par un calcul statistique la composition des TAG probables (Tableau 12).

**Tableau 12:** Détermination statistique des TAG probables pour l'huile de *Punica granatum*.

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	33.43%	33.97%	54	9	36	PuPuPu
	9.39%	9.55%	54	9	36	PuPuαE
	5.43%	5.52%	54	9	36	PuPuCt
	1.29%	1.31%	54	9	36	PuPuC18_3e
	1.02%	1.03%	54	9	36	PuαECt
	0.88%	0.89%	54	9	36	PuαEαE
	0.29%	0.30%	54	9	36	PuCtCt
	0.24%	0.24%	54	9	36	PuαEC18_e
	0.14%	0.14%	54	9	36	PuαECT
	8.97%	9.12%	54	8	38	LPuPu
	1.68%	1.71%	54	8	38	LPuαE
	0.97%	0.99%	54	8	38	LPuCt
	0.23%	0.23%	54	8	38	LPuαE
	8.57%	8.71%	54	7	40	OPuPu
	4.25%	4.32%	52	6	40	PPuPu
	1.61%	1.63%	54	7	40	OPuαE
	1.21%	1.23%	54	7	40	AsPuPu
	0.93%	0.94%	54	7	40	OPuCt
	0.80%	0.82%	54	7	40	LLPu
	0.80%	0.81%	52	6	40	PPuαE
	0.46%	0.47%	52	6	40	PPuCt
	0.23%	0.23%	54	7	40	AsPuαE
	0.22%	0.22%	54	7	40	OPuC18_e
	0.13%	0.13%	54	7	40	AsPuCt
	0.11%	0.11%	52	6	40	PPuC18_e
	0.12%	0.12%	53	6	41	MaPuPu
	3.31%	3.36%	54	6	42	SPuPu
	1.53%	1.56%	54	6	42	OLPu
	1.00%	1.01%	56	7	42	PuPuGo
	0.76%	0.77%	52	5	42	PLPu
	0.62%	0.63%	54	6	42	SPuαE
	0.36%	0.36%	54	6	42	SPuCt
	0.22%	0.22%	54	6	42	AsLPu
	0.19%	0.19%	56	7	42	PuαEGo
	0.14%	0.15%	54	6	42	OLαE
	0.11%	0.11%	56	7	42	PuCtGo
	0.73%	0.74%	54	5	44	OOPu
	0.73%	0.74%	52	4	44	POPu
	0.68%	0.69%	56	6	44	PuPuAr
	0.59%	0.60%	54	5	44	SLPu
	0.21%	0.21%	54	5	44	OAsPu
	0.18%	0.18%	50	3	44	PPPu
	0.18%	0.18%	56	6	44	LPuGo
	0.13%	0.13%	56	6	44	PuαEAr
	0.10%	0.10%	52	4	44	PAsPu
	0.57%	0.57%	54	4	46	SOPu
	0.28%	0.28%	52	3	46	PSPu
	0.17%	0.17%	56	5	46	OPuGo
	0.12%	0.12%	56	5	46	LPuAr
	0.12%	0.12%	56	4	48	OPuAr
	0.11%	0.11%	54	3	48	SSPu
<b>Total</b>	<b>98.38%</b>	<b>100.00%</b>				

Le chromatogramme obtenu en UHPLC-DEDL dans les conditions optimisées est redonné ci-dessous.



**Chromatogramme 22:** Analyse de l'huile de *Punica granatum* par UHPLC/DEDL.

### IV.3. Identification par UHPLC/MS

Nous avons ensuite analysé l'huile en utilisant les mêmes conditions chromatographiques avec un système UHPLC/MS afin d'identifier la structure de chaque pic.

Nous avons effectué les analyses par UHPLC/MS en mode ESI avec ajout post colonne d'ions argent. La cationisation par l'argent offre l'avantage d'améliorer la sensibilité d'un facteur 100 pour les TAG [6].

Pour chaque pic chromatographique, les TAG ont été identifiés à partir de leurs ions positifs obtenus en mode ESI:  $[M+Ag]^+$  et  $[M+Ag+AgNO_3]^+$ .

L'argent a deux isotopes d'abondance similaire  $^{107}Ag$  (52%) et  $^{109}Ag$  (48%). Par conséquent,  $[M+Ag]^+$  forme un doublet de rapport d'abondance 1:1 et  $[M+Ag+AgNO_3]^+$  forme un triplet de rapport d'abondance 1:2:1 facilement reconnaissable.

Les ions  $[TAG+Ag]^+$  ont été sélectionnés et fragmentés pour obtenir les ions fragments des diacylglycérols correspondants  $[DAG-H+Ag]^+$ . La différence entre  $[TAG+Ag]^+$  et  $[DAG-H+Ag]^+$  donne la masse du fragment expulsé, ce qui permet de déterminer la structure du TAG dont ils proviennent.

Pour un TAG formé de 3 acides gras identiques (XXX), par fragmentation un seul ion fragment XX est obtenu.

Par exemple, à  $t_r = 10.84$  min, le TAG possible est C18 :3C18 :3C18 :3 et on obtient un seul ion fragment de masse 595.5 correspondant au fragment C18 :3C18 :3 (Tableau 13) et une perte d'une chaîne C18 :3, ce qui authentifie la structure.

Pour un TAG de type XXY deux fragments XX et XY sont obtenus. Par exemple à  $t_r = 14.41$  min, nous avons C18 :2C18 :3C18 :3 et on obtient les 2 fragments de masse 595.5 pour C18 :3C18 :3 correspondant à la perte d'une chaîne C18 :2 et 597.5 pour le fragment C18 :2C18 :3 correspondant à la perte d'une chaîne C18 :3.

De même, pour un TAG de type XYZ, les 3 fragments correspondants, XY, XZ et YZ sont obtenus. Tel est le cas du pic à  $t_r = 29.23$  min correspondant à C16:0C18:2C18:3 et pour lequel obtient les fragments C18:2C18:3 (597.5); C16:0C18:2 (575.5) et C16:0C18:3(573.5)

Si dans le cas précédent le TAG isomère C18 :1C18 :3C18 :4 de même masse moléculaire 1152-1154 était coélué à 14.41 min avec le TAG : C18:2C18:3C18:3 (ce qui est impossible puisqu'on n'observe pas de FAME en C18:4), on observerait en plus du fragment de masse 597.5 deux autres fragments aux masses 593.5 et 599.5 qui permettraient de l'identifier.

L'identification des TAG et des fragments correspondants (résultats du HCD) sont regroupés dans le Tableau 13.

**Tableau 13** : Identification de l'huile *Punica granatum* par UHPLC/MS.

Tr (min)	[M+Ag] <sup>+</sup>	[M+Ag+AgNO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	TAG possibles	Résultats du HCD	[DAG-H+AG] <sup>+</sup>	Fragment perdu	Conclusion
10.84	979-981	1150-1152	C18:3C18:3C18:3	595.5	C18:3C18:3	C18:3	C18:3C18:3C18:3
11.31	979-981	1150-1152	C18:3C18:3C18:3	595.5	C18:3C18:3	C18:3	C18:3C18:3C18:3
11.61	979-981	1150-1152	C18:3C18:3C18:3	595.5	C18:3C18:3	C18:3	C18:3C18:3C18:3
14.41	981-983	1152-1154	C18:2C18:3C18:3	597.5	C18:2C18:3	C18:3	C18:2C18:3C18:3
				595.5	C18:3C18:3	C18:2	
15	981-983	1152-1154	C18:2C18:3C18:3	597.5	C18:2C18:3	C18:3	C18:2C18:3C18:3
				595.5	C18:3C18:3	C18:2	
20.13	983-985	1154-1156	C18:2C18:2C18:3	599.5	C18:2C18:2	C18:3	C18:2C18:2C18:3
				597.5	C18:2C18:3	C18:2	+ C18:1C18:3C18:3
			C18:1C18:3C18:3	599.5	C18:1C18:3	C18:3	
				595.5	C18:3C18:3	C18:1	
20.93	983-985	1154-1156	C18:2C18:2C18:3	599.5	C18:2C18:2	C18:3	C18:1C18:3C18:3
					C18:2C18:3	C18:2	
			C18:1C18:3C18:3	599.5	C18:1C18:3	C18:3	
				595.5	C18:3C18:3	C18:1	
21.77	957-959	1128-1130	PC18:3C18:3	595.5	C18:3C18:3	C16:0	PC18:3C18:3
				573.5	PC18:3	C18:3	
29.23	959-961	1130-1132	PC18:2C18:3	597.5	C18:2C18:3	C16:0	PC18:2C18:3
				575.5	PC18:2	C18:3	
				573.5	PC18:3	C18:2	
29.53	985-987	1156-1158	C18:2C18:2C18:2	599.5	C18:2C18:2	C18:2	C18:2C18:2C18:2
			SC18:3C18:3	595.5	C18:3C18:3	C18:0	+SC18:3C18:3
				601.5	SC18:3	C18:3	+C18:1C18:2C18:3
			C18:1C18:2C18:3	601.5	C18:1C18:2	C18:3	
				599.5	C18:1C18:3	C18:2	
				597.5	C18:2C18:3	C18:1	



On constate que nous avons des composés de même structure telle que: C18:3C18:3C18:3 à différents temps de rétention:  $t_r=10.84$  min,  $t_r=11.31$  min et  $t_r=11.61$  min.

Il s'agit de 3 composés stéréoisomères.

La spectrométrie de masse montre ici ses limites, dans la mesure où elle nous donne la structure générale mais elle ne permet pas d'identifier les stéréoisomères qui sont séparés par chromatographie.

Pour résoudre ce problème, en complément de la Spectrométrie de Masse, nous allons nous servir de lois chromatographiques, les règles de Goiffon [19-20].

#### **IV.4. Identification des TAG par les règles de Goiffon**

Pour identifier les TAG dans une huile, il existe des lois de rétention reliant la variation du logarithme du facteur de rétention  $k$  en fonction de nombre de partition (PN), du nombre de doubles liaisons (DBN) ou encore du nombre d'atomes de carbone (CN):  $\ln k = f(\text{PN})$ ;  $\ln k = f(\text{DBN})$  et  $\ln k = f(\text{CN})$ . Elles permettent de déterminer la rétention de TAG mixtes à partir de TAG homogènes [19-20].

Ainsi, quand on change un résidu X par Y [XXX-XXY-XYX-YYY], la variation  $\ln k = f(\text{NP})$ ,  $\ln k = f(\text{DBN})$  ou  $\ln k = f(\text{CN})$  pour cette série de TAG est linéaire.

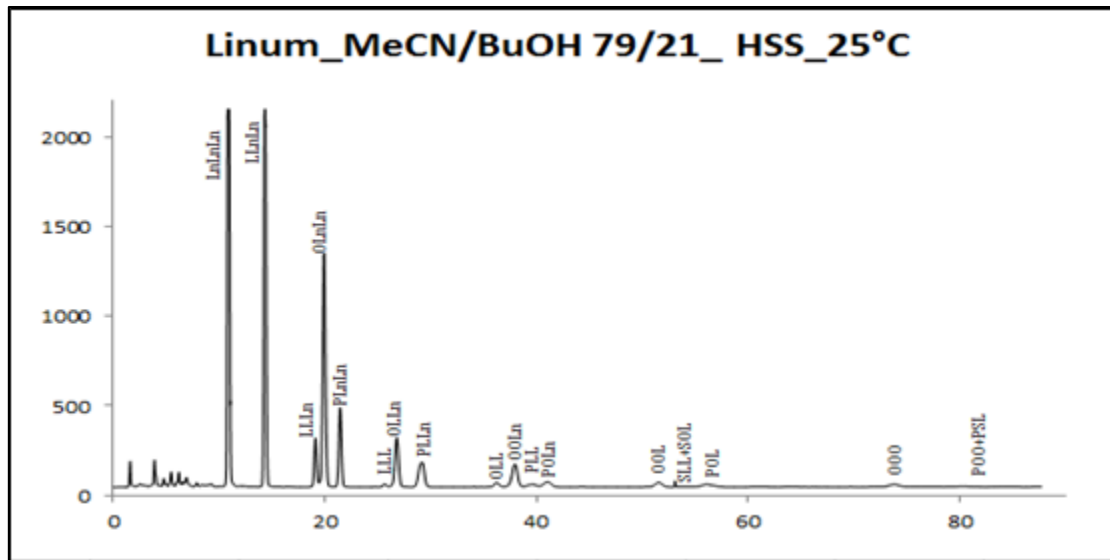
De même pour les deux séries [XXX-XXY-XYX-YYY] et [ZXX-ZXY-ZYY] on change un AG X par un AG Y. Ainsi cela donne des droites parallèles quelle que soit la nature de l'acide gras X, Y, Z qui constitue le TAG [19-20].

Avant d'utiliser ces lois pour l'identification des TAG dans les huiles de graines, nous allons présenter la démarche dans le cas d'une huile dont on connaît déjà la composition : l'huile de *Linum*. Les diagrammes ainsi établis à partir de TAG «classiques» (formés avec les AG: P, S, O, As, L et Ln) nous permettrons de calibrer la zone chromatographique occupée et de travailler ensuite sur les autres huiles possédant en plus de ces 6 AG communs, des AG différents.

Le chromatogramme de l'huile de *Linum* et sa composition statistique sont donnés ci-dessous.

**Tableau 14:** TAG de l'huile de *Linum*

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	9.38%	9.54%	54	9	36	LnLnLn
	10.22%	10.39%	54	8	38	LLnLn
	13.68%	13.91%	54	7	40	OLnLn
	4.06%	4.13%	52	6	40	PLnLn
	3.71%	3.77%	54	7	40	LLn
	1.07%	1.09%	54	7	40	AsLnLn
	9.94%	10.11%	54	6	42	OLLn
	2.95%	3.00%	52	5	42	PLLn
	2.40%	2.44%	54	6	42	SLnLn
	0.78%	0.79%	54	6	42	AsLLn
	0.52%	0.53%	56	7	42	LnLnGo
	0.45%	0.46%	54	6	42	LLL
	6.65%	6.77%	54	5	44	OOLn
	3.94%	4.01%	52	4	44	POLn
	1.80%	1.84%	54	5	44	OLL
	1.74%	1.77%	54	5	44	SLLn
	1.58%	1.61%	58	7	44	LnLnEr
	1.04%	1.06%	54	5	44	OAsLn
	0.58%	0.59%	50	3	44	PPLn
	0.53%	0.54%	52	4	44	PLL
	0.38%	0.38%	56	6	44	LLnGo
	0.31%	0.31%	52	4	44	PAsLn
	0.15%	0.16%	56	6	44	LnLnAr
	0.14%	0.14%	54	5	44	AsLL
	2.42%	2.46%	54	4	46	OOL
	2.33%	2.37%	54	4	46	SOLn
	1.43%	1.46%	52	3	46	POL
	1.15%	1.17%	58	6	46	LLnEr
	0.69%	0.70%	52	3	46	PSLn
	0.51%	0.51%	56	5	46	OLnGo
	0.38%	0.38%	54	4	46	OAsL
	0.32%	0.32%	54	4	46	SLL
	0.21%	0.22%	50	2	46	PPL
	0.18%	0.19%	54	4	46	SAsLn
	0.15%	0.15%	54	4	46	PLnGo
	0.12%	0.12%	58	6	46	LnLnBe
	0.11%	0.11%	56	5	46	LLnAr
	0.11%	0.11%	52	3	46	PAsL
	0.07%	0.07%	56	5	46	LLGo
	0.04%	0.04%	56	5	46	AsLnGo
	0.01%	0.02%	54	4	46	AsAsL
	1.54%	1.56%	58	5	48	OLnEr
	1.08%	1.10%	54	3	48	OOO
	0.96%	0.98%	52	2	48	POO
	0.85%	0.86%	54	3	48	SOL
	0.46%	0.46%	56	4	48	PLnEr
	0.28%	0.29%	50	1	48	PPO
	0.25%	0.26%	54	3	48	OOAs
	0.25%	0.26%	52	2	48	PSL
	0.21%	0.21%	58	5	48	LLEr
	0.20%	0.21%	54	3	48	SSLn
	0.18%	0.19%	56	4	48	OLGo
	0.15%	0.15%	56	4	48	OLnAr
	0.15%	0.15%	52	2	48	POAs
	0.12%	0.12%	58	5	48	AsLnEr
	0.09%	0.09%	56	4	48	SLnGo
	0.09%	0.09%	58	5	48	LLnBe
	0.57%	0.58%	54	2	50	SOO
	0.56%	0.57%	58	4	50	OLEr
	0.34%	0.34%	52	1	50	PSO
	0.27%	0.27%	58	4	50	SLEr
	0.17%	0.17%	56	3	50	PLEr
	0.12%	0.13%	56	3	50	OOGo
	0.11%	0.12%	58	4	50	OLnBe
	0.09%	0.09%	54	2	50	SOAs
	0.37%	0.38%	58	3	52	OOEr
	0.22%	0.23%	56	2	52	POEr
	0.10%	0.10%	54	1	52	SSO
	0.10%	0.10%	58	3	52	SLEr
	0.09%	0.09%	62	5	52	LnErEr
	0.13%	0.13%	58	2	54	SOEr
<b>Total</b>	<b>98.31%</b>	<b>100.00%</b>				



**Chromatogramme 23** : Analyse de l'huile de *linum* par UHPLC/DEDL.

✓ **Variation de  $\ln k = f(NP)$**

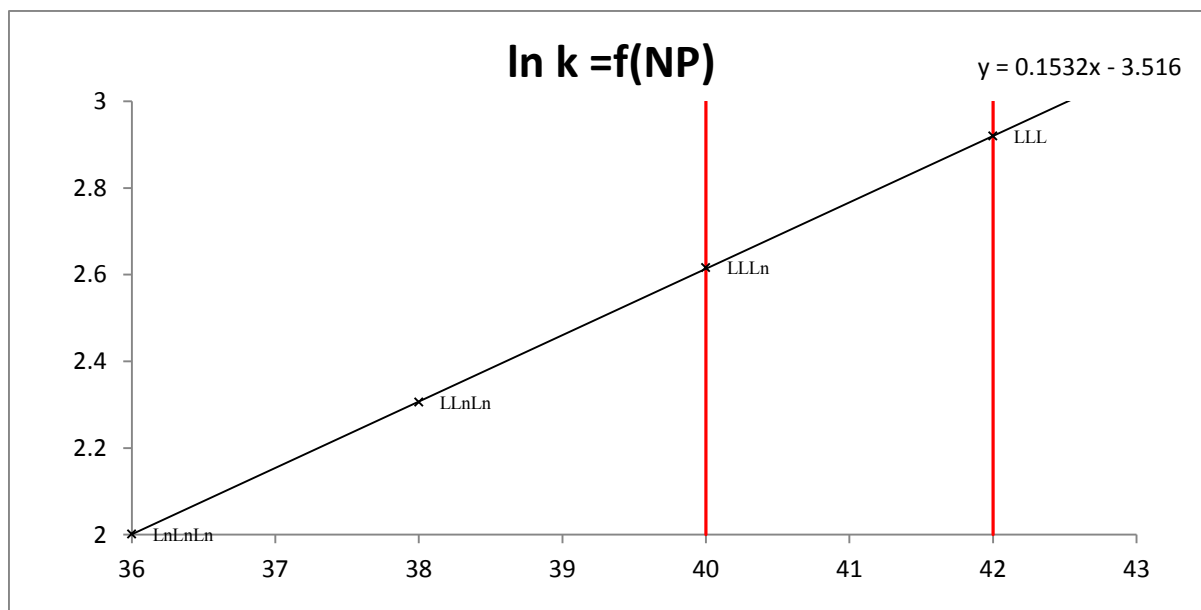
Nous allons déterminer dans un premier temps la position au sein du chromatogramme des TAG de type XXY et XYY contenant les résidus «classiques» Ln, L, O et P.

✓ **Détermination de la série où Ln est remplacé par L:**

On observe un pic important à  $t_r=11.08$  min. Ce pic correspond à LnLnLn (NP=36) puisqu'il n'y a qu'une seule probabilité de TAG à NP=36. De même le pic à  $t_r=14.55$  min correspond à LLnLn (NP=38).

A partir de ces 2 TAG LnLnLn et LLnLn on peut déduire la position de LLLn (NP=40).

On trace la droite  $\ln k = f(NP)$  pour LnLnLn-LLnLn. L'extrapolation à NP = 40 nous permet de déduire  $\ln k$  de LLLn. L'équation de la droite ainsi obtenue est:  $\ln k = 0.1532 \cdot NP - 3.516$ .



**Figure 1** : Détermination de la position de LLLn et LLL

**Tableau 15** : Détermination de tr théorique de LLLn.

TAG	Ln k	k	Tr (min)
LLLn	2.61	13.63	19.31

Sur le chromatogramme 23, on a bien un pic intense à  $t_r = 19.36$  min donc il s'agit bien de LLLn.

De la même manière l'extrapolation à  $NP = 42$  nous permet de déduire LLL (figure 1).

**Tableau 16** : Détermination de tr théorique de LLL.

TAG	Ln k	k	Tr (min)
LLL	2.92	18.51	25.76

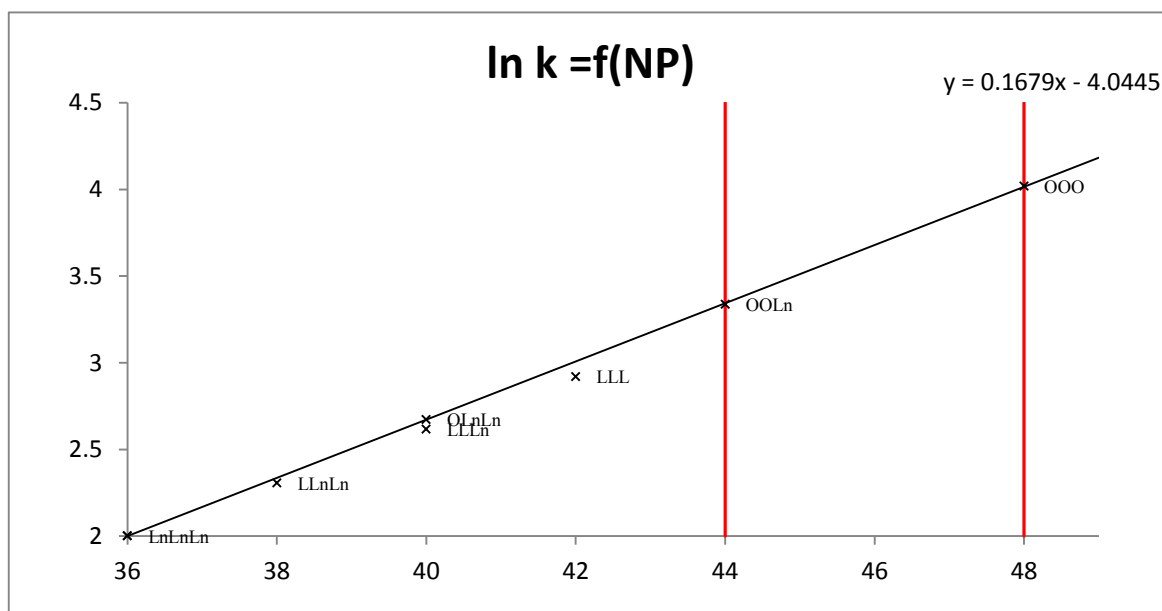
Sur le chromatogramme 23, on a bien un pic à  $t_r = 25.77$  min qui correspond donc à LLL.

L'injection du standard LLL confirme aussi l'attribution.

✓ **Détermination de la série où Ln est remplacé par O:**

On a un pic intense à  $t_r = 19.76$  min, zone de  $NP = 40$ . D'après le tableau 23 de probabilités des TAG, on devrait avoir OLnLn ( $NP = 40$ ) à 13.68%.

En traçant  $\ln k = f(NP)$  pour OLnLn et LnLnLn, nous allons pouvoir déterminer les rétentions des TAG contenant Ln et O.



**Figure 2** : Détermination de la position d’OLnLn et OOO.

La droite LnLnLn-OLnLn a pour équation  $\ln k = 0.1679.NP - 4.0445$  (figure 2).

On peut déduire le temps de rétention d’OOLn de  $NP=46$  et celui d’OOO de  $NP = 48$ .

**Tableau 17** : Détermination de  $t_r$  théorique d’OOLn et OOO.

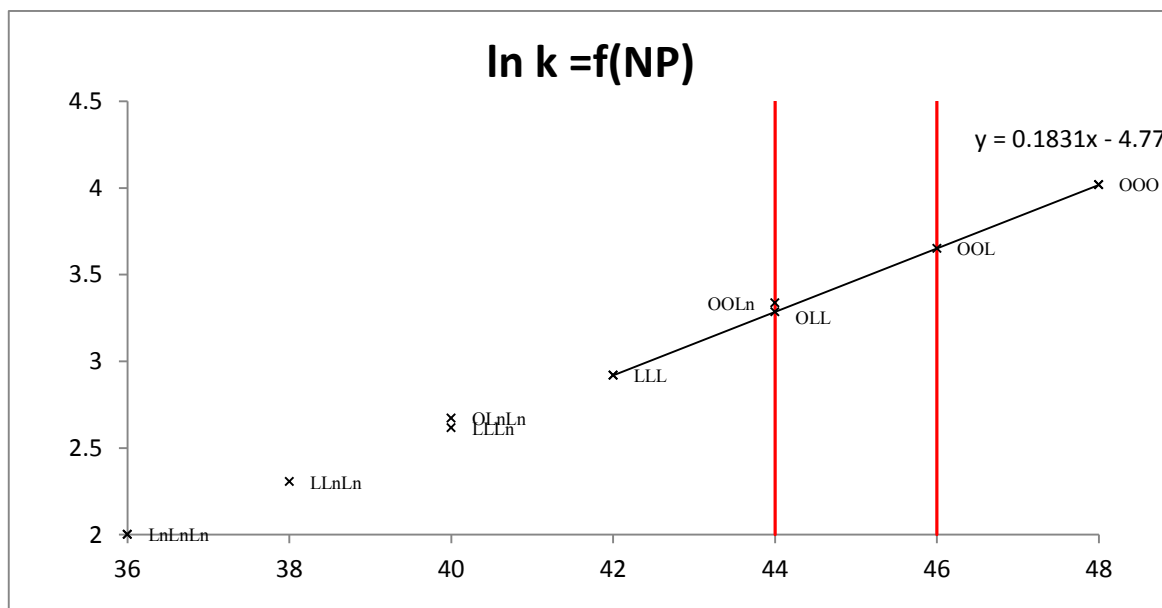
	<b>Ln k</b>	<b>k</b>	<b>Tr (min)</b>
<b>OOLn</b>	3.34	28.31	38.7
<b>OOO</b>	4.01	55.41	74.5

Or nous avons bien un pic à  $t_r=38.45$  min et un à  $t_r=74.69$  min.

Donc, on peut affirmer que le temps de rétention d’OOLn est 38.45 min et celui d’OOO est 74.69 min. Ce dernier, tout comme LLL a pu être confirmé par l’injection du standard OOO.

✓ **Détermination de la série où L est remplacé par un O :**

A partir de la position de OOO et LLL on peut en déduire celles des TAG contenant les acides gras O et L : OLL ( $NP=44$ ) et OOL ( $NP=46$ ) (figure 3).



**Figure 3** : Détermination de la position d'OOL et OOL.

**Tableau 18** : Détermination de tr théorique d'OOL et OOL.

TAG	Ln k	k	Tr (min)
<b>OOL</b>	3.29	26.75	36.6
<b>OOL</b>	3.65	38.57	52.2

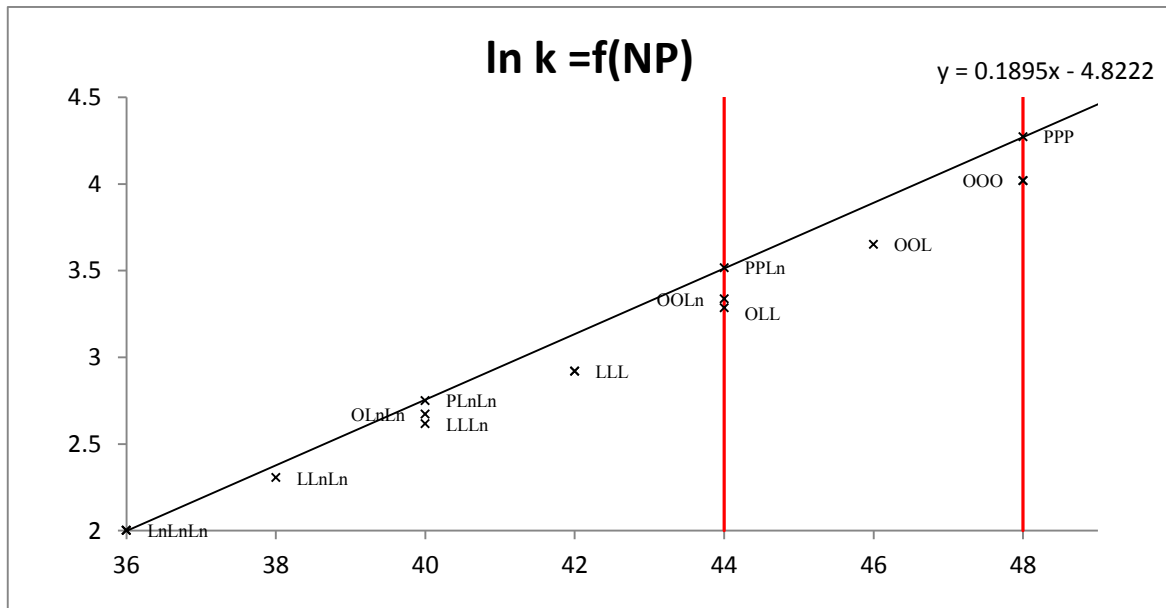
Nous avons un pic à  $tr=36.58$  min donc il s'agit bien de OOL.

On a aussi un pic à  $tr=52.10$  min donc, il s'agit bien de OOL.

✓ **Détermination de la série où Ln est remplacé par P :**

On a un pic à  $tr=21.96$  min dans une zone de  $NP=40$ . Or d'après le tableau des TAG probables, pour  $NP=40$  on peut avoir plusieurs TAG possibles:  $OLnLn$ ,  $LLnLn$  (déjà identifiés),  $PLnLn$ , et  $AsLnLn$ . Au vu des pourcentages, ce pic correspond à  $PLnLn$ .

On va donc chercher la position de  $PPLn$  et  $PPP$  à partir de  $LnLnLn$  et  $PLnLn$  (figure 4).



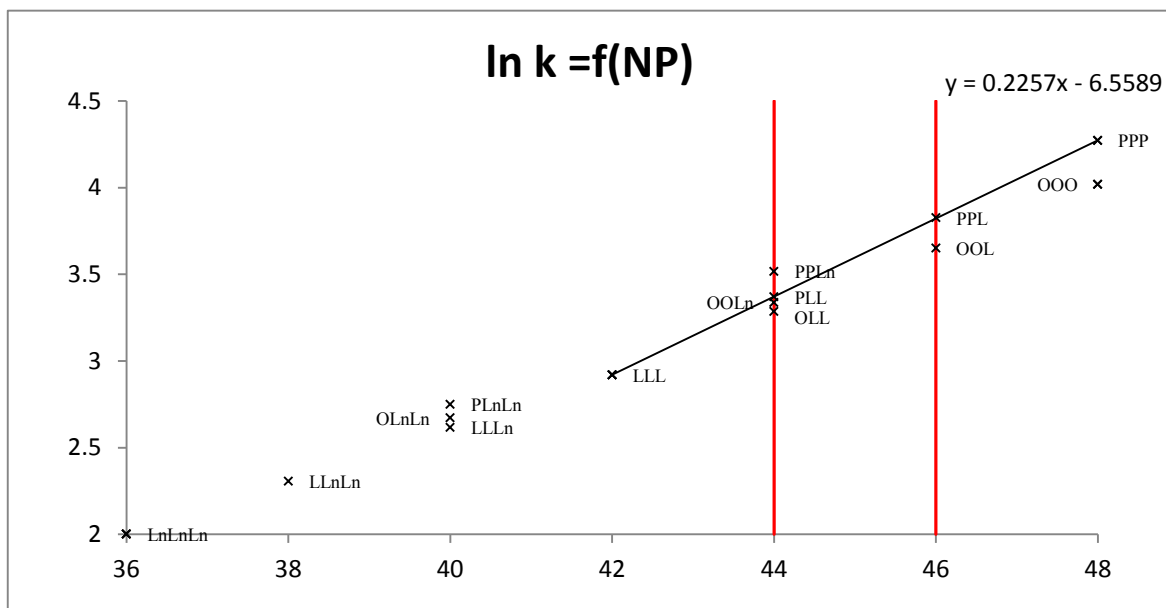
**Figure 4** : Détermination de la position de PPLn et PPP.

De la même manière que précédemment, on peut obtenir les temps de rétention de PPLn et PPP : Pour PPLn,  $t_r = 45.74$  min et pour PPP,  $t_r = 95.86$  min.

PPP ne fait pas partir de l'huile de *Linum* mais la connaissance de sa rétention nous servira par la suite.

✓ **Détermination de la série où L est remplacé par P :**

À partir de LLL et PPP on peut déduire la position de PLL et PPL (figure 5).



**Figure 5** : Détermination de la position de PPL et PLL.

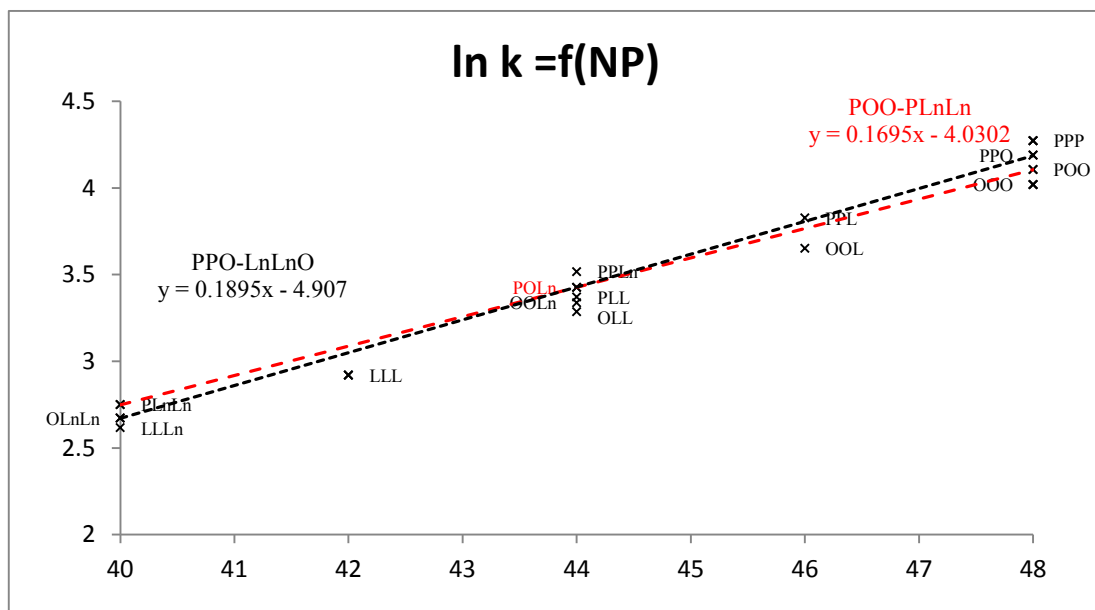
En procédant de la même façon, les temps de rétention obtenus pour PLL et PPL sont respectivement de 39.67 min et 61.83 min.

Nous allons maintenant chercher à déterminer la position des TAG de type XYZ.

La position des TAG XYZ a été confirmée en traçant les deux droites XXZ-XYZ-YYZ et XYY-XYZ-ZZX. Nous allons procéder ainsi pour positionner PSL, POL, PSLn, SOL, POLn, PLLn et OLLn.

✓ **Détermination de la position de POLn :**

POLn (NP=44) appartient aux deux séries [POO – PLnLn] et [PPO – LnLnO]. Il peut donc être déterminé à partir de l'intersection de ces 2 droites [POO-PLnLn] (d'équation  $\ln k = 0.1695 \cdot NP - 4.0302$ ) et [PPO-LnLnO] (d'équation  $\ln k = 0.1895 \cdot NP - 4.907$ ) et la verticale à NP=44 (figure 6).

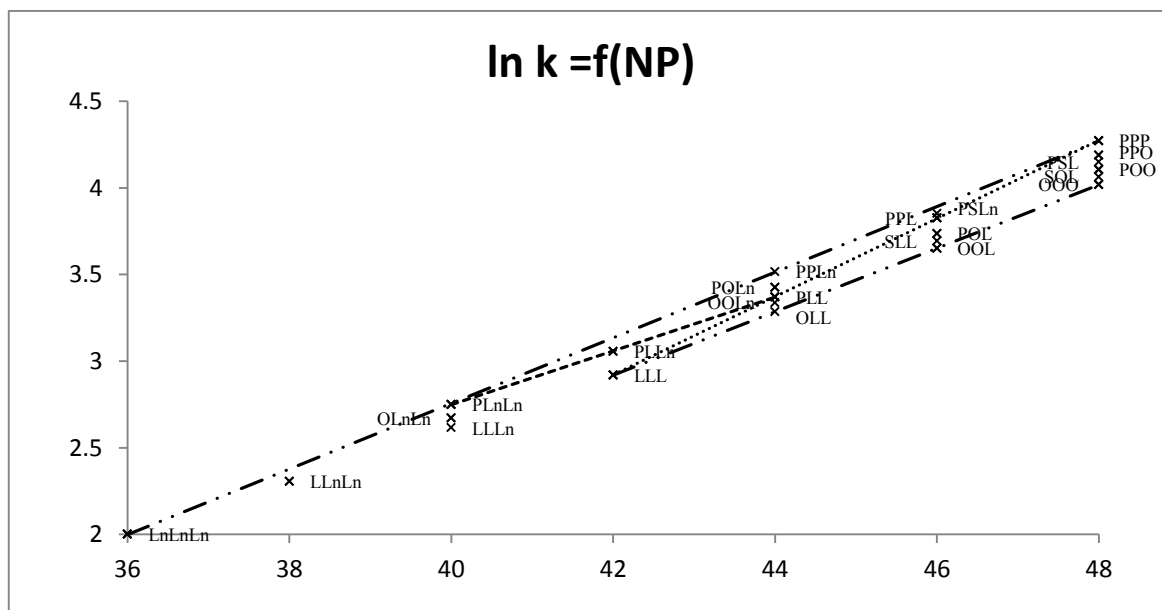


**Figure 6 :** Détermination de la position de POLn.

On peut déduire que POLn est à  $t_r = 41.88$  min.

De la même manière, nous avons déduit la position de PSL, POL, PSLn, SOL, PLLn et OLLn (figure 7).





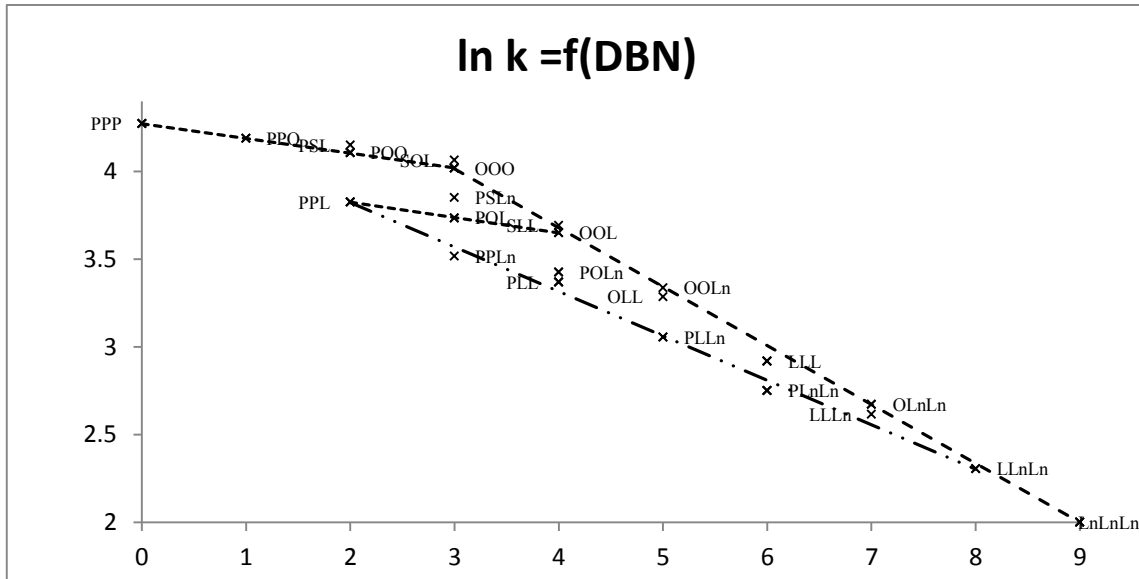
**Figure 7** : Variation de ln k en fonction de NP.

✓ **Variation de ln k =f(DBN) et ln k =f(CN)**

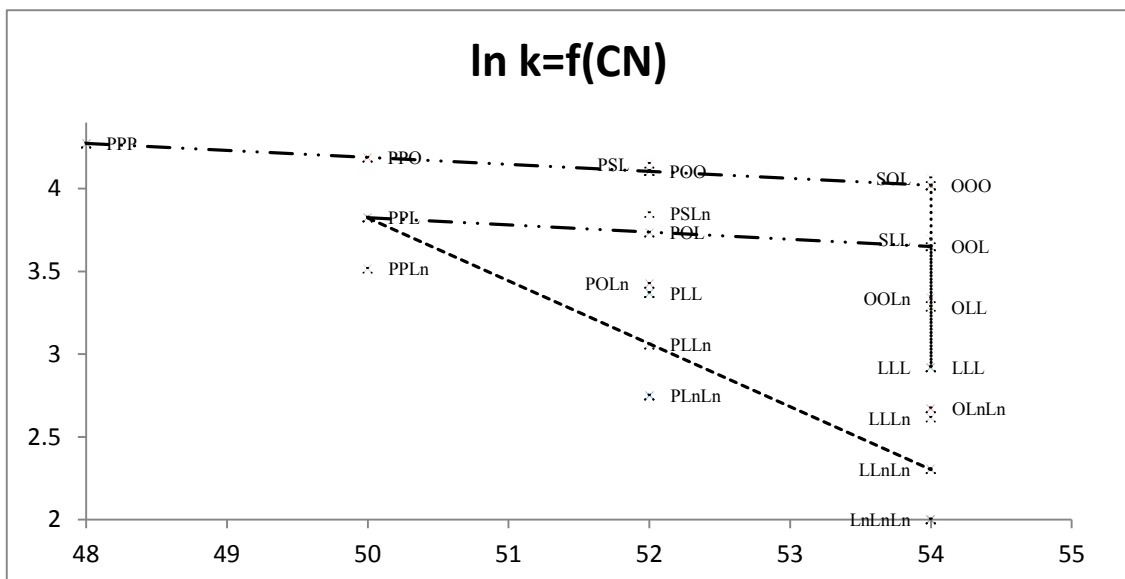
Dans un second temps, nous avons tracé ln k =f(DBN) (figure 8) et ln k =f(CN) (figure 9).

Ces deux graphes sont complémentaires du premier et permettent d'éclater les TAG de manière différente. Cela est particulièrement vrai pour des TAG qui ont le même NP mais des NC différents, qui se trouvent sur une verticale sur le graphe ln k =f(NP) et qui forment une droite oblique sur le graphe ln k = f(DBN), comme par exemple PPP, PPO, POO et OOO (figure 8).

Ces diagrammes nous ont permis de valider les identifications précédentes.



**Figure 8** : Variation de ln k en fonction de DBN.



**Figure 9** : Variation de ln k en fonction de CN.

#### IV.4.1. Utilisation des règles de Goiffon pour l'identification de l'huile de *Punica granatum*

Les graphes établis ci-dessus vont nous permettre d'avoir une base pour positionner les TAG de l'huile de *Punica granatum*.

D'après le tableau de résultats des analyses en UHPLC/SM (Tableau 13), le premier pic est un C18 :3C18 :3C18 :3.

Or d'après le tableau des TAG probables dans l'huile de *Punica granatum* (Tableau 12), le pic majoritaire à NP=36 devrait être PuPuPu (33.43%).

Donc, on va faire l'hypothèse qu'il s'agit de PuPuPu et attribuer les TAG possédant du Pu avec les lois chromatographiques.

##### ✓ Série PuPuPu-OOO

La série PuPuPu-OOO nous permet de déduire OPuPu (NP=40) dont l'abondance statistique est de 8.57% correspondant au cinquième pic le plus abondant attendu sur le chromatogramme

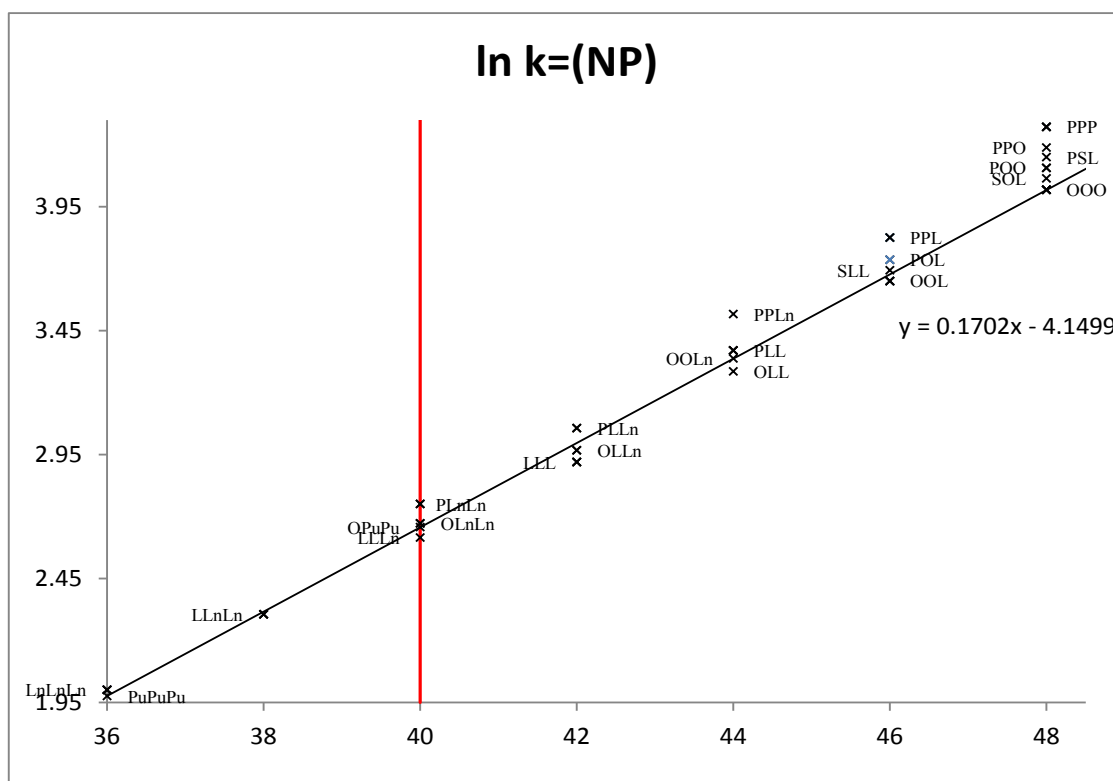


Figure 10 : Détermination du tr d'OPuPu.

L'intersection de la droite PuPuPu-OOO d'équation  $\ln k = 0.1702 \cdot NP - 4.1499$  et la verticale à  $NP=40$  nous permet de déduire OPuPu.

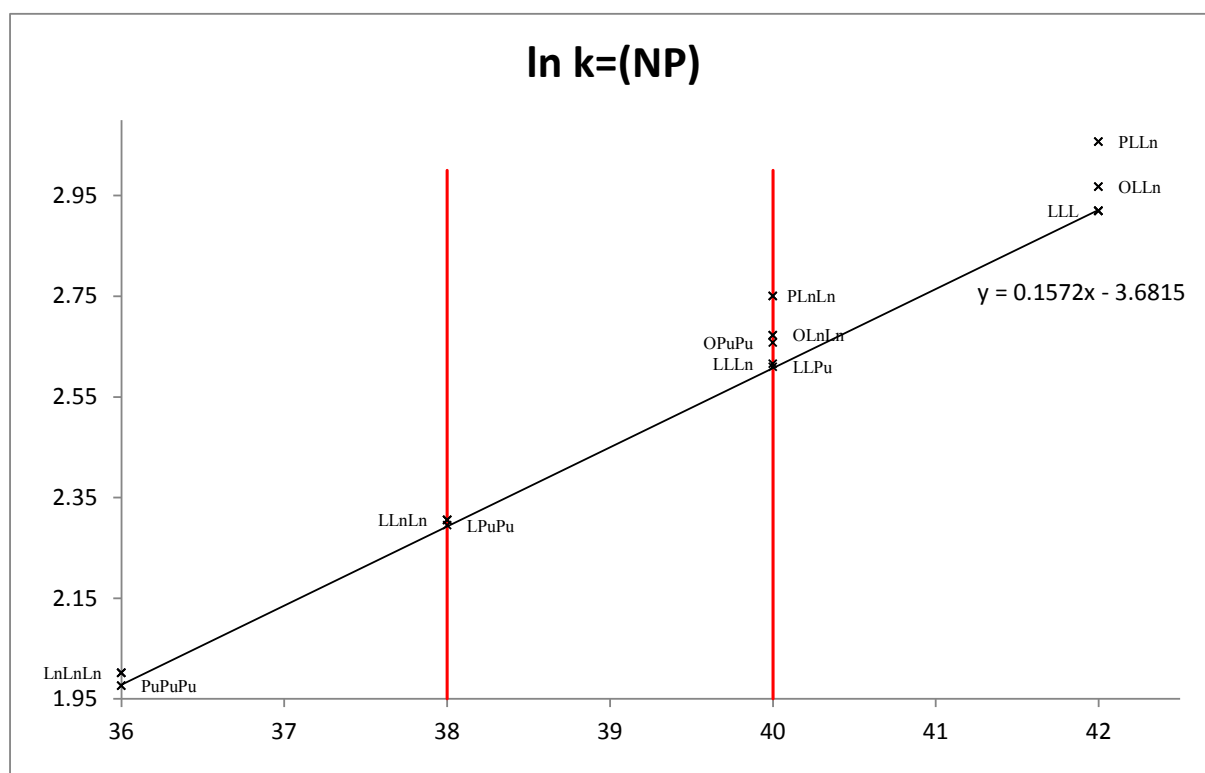
**Tableau 19** : Détermination de  $t_r$  théorique d'OPuPu.

TAG	Ln k	k	Tr (min)
<b>OPuPu</b>	2.66	14.27	20.16

Sur le chromatogramme UHPLC-DEDL à  $t_r = 20.13$  min on a un pic assez intense et qui selon les résultats de LC/MS devrait correspondre à C18 :1C18 :3C18 :3. Donc, il s'agit bien d'OPuPu.

✓ **Vérification de la série PuPuPu-LLL**

La série PuPuPu-LLL va nous permettre de déduire la position de LPuPu qui est présent à 8.97% et de LLPu à 0.80% (Tableau 12).



**Figure 11** : Détermination du  $t_r$  de LPuPu et LLPu.

D'après la variation de  $\ln k = f(NP)$ , l'intersection de la droite PuPuPu-LLL et la verticale à  $NP=38$  nous permet de déduire le temps de rétention de LPuPu ( $NP=38$ ). De la même manière, nous avons déduit le temps de rétention de LLPu à  $NP=40$ .

**Tableau 20** : Détermination de  $t_r$  théorique de LPuPu et LLPu.

TAG	$\ln k$	k	Tr (min)
<b>LPuPu</b>	2.29	9.90	14.38
<b>LLPu</b>	2.61	13.55	19.21

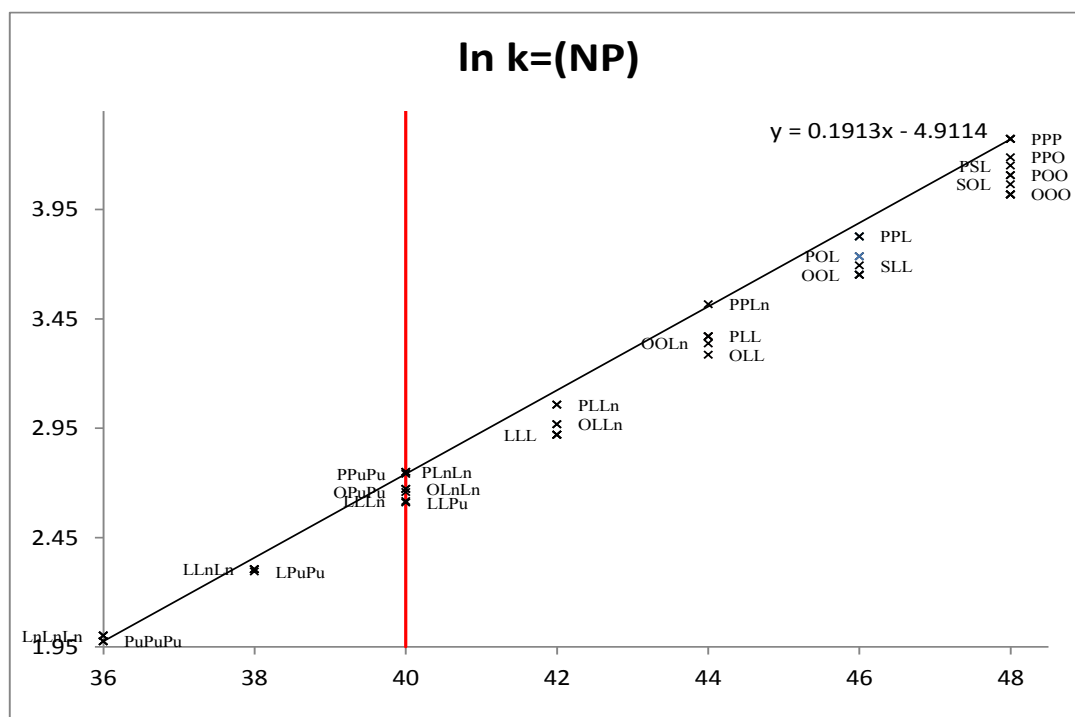
Nous avons un pic à  $t_r=14.41$  min et qui selon les résultats de LC/MS correspond à C18 :2C18 :3C18 :3. Donc, il s'agit de LPuPu.

De même, à  $t_r= 19.25$  min, nous avons LLPu.

L'ensemble de ces résultats valide l'attribution de la structure PuPuPu au premier pic sortant.

✓ **Vérification de la série PuPuPu-PPP**

La série PuPuPu-PPP, nous permet de positionner PPUu (NP=40) et qui est statistiquement attendu à 4.25% (Tableau 12).



**Figure 12** : Détermination du  $t_r$  de PPUu.

L'intersection de la droite PuPuPu-PPP et la verticale à NP=40 nous permet de déduire la rétention de PPUu.

**Tableau 21** : Détermination de tr théorique de PPUu.

TAG	Ln k	k	Tr (min)
PPuPu	2.74	15.50	21.78

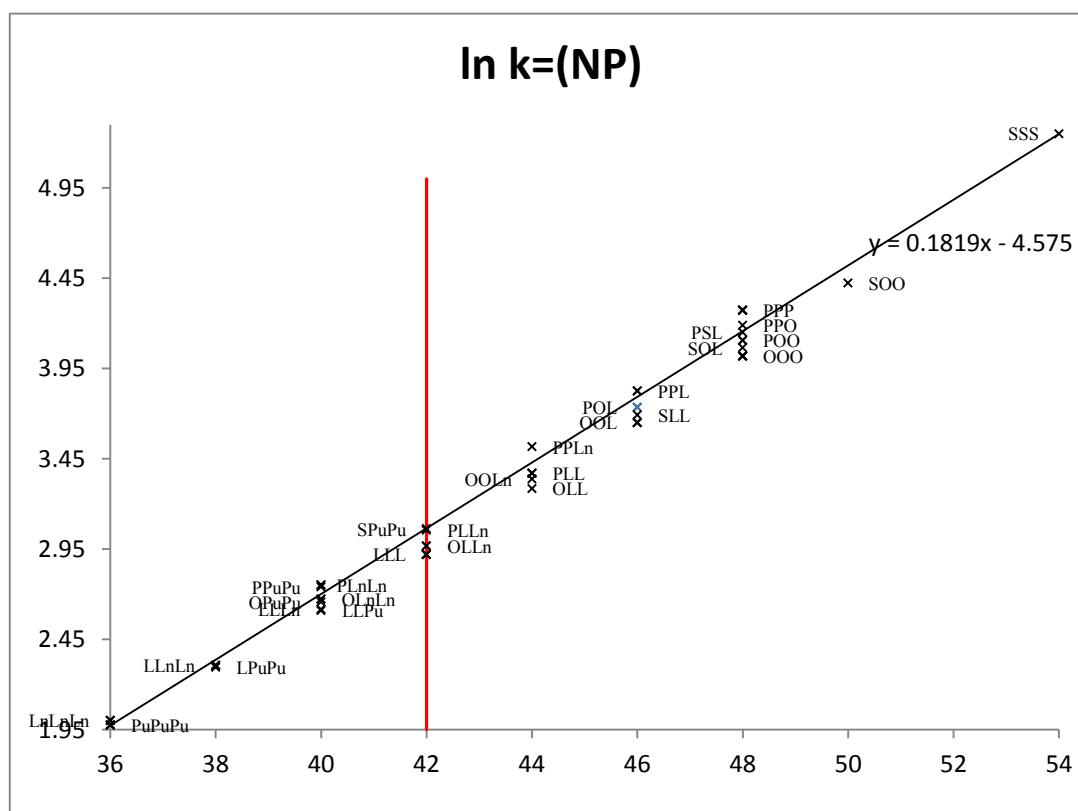
Sur le chromatogramme à tr= 21.77 min, nous avons un pic et qui selon les résultats de LC/MS correspond à PC18 :3C18 :3.

Donc, à tr=21.77 min, nous avons PPUu.

✓ **Vérification de la série PuPuPu- SSS**

En traçant la série PuPuPu-SSS, on peut déduire le temps de rétention de SPUu.

En effet, SPUu est l'intersection de la droite PuPuPu et SSS d'équation  $\ln k = 0.1819 \cdot NP - 4.575$  et la verticale à NP=42.



**Figure 13** : Détermination du tr de SPUu.

A partir de la figure 13, on peut déduire le temps de rétention de SPuPu.

**Tableau 22** : Détermination de  $t_r$  théorique de SPuPu.

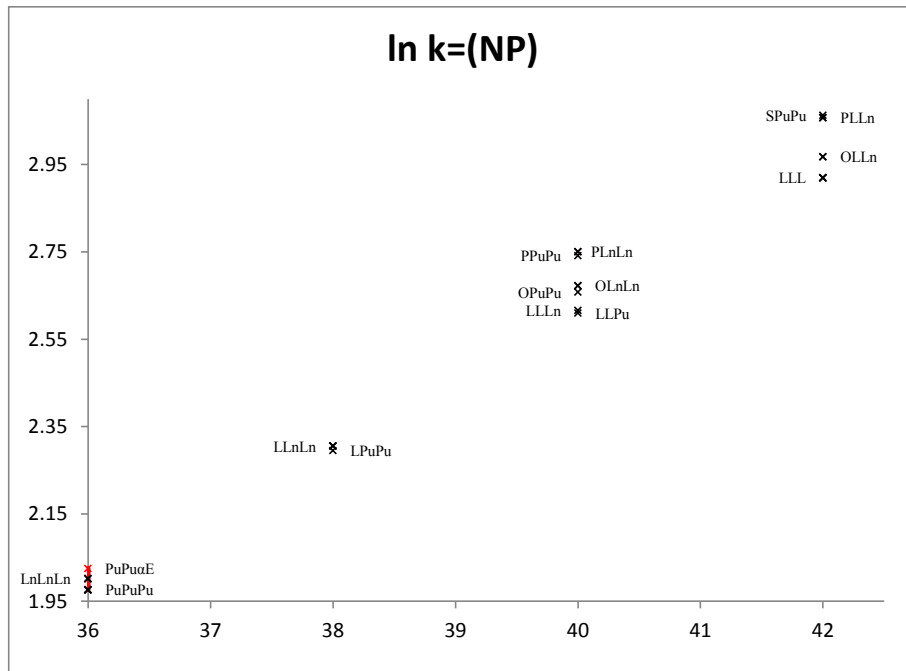
TAG	Ln k	k	Tr (min)
SPuPu	3.06	21.43	29.61

Nous observons un pic à  $t_r = 29.53$  min et qui selon les résultats de LC-MS correspond à SC18:3C18:3.

Donc, il correspond bien à SPuPu.

✓ **Série PuPuPu-  $\alpha E\alpha E\alpha E$**

Sur le chromatogramme UHPLC - DEDL, nous avons un pic intense à  $t_r = 11.31$  min et qui selon les résultats de LC-MS correspond aussi à C18:3C18:3C18:3. En fonction de la composition en acide gras, parmi toutes les combinaisons possibles de NP 36, sortant donc au début du chromatogramme, il y a 9 structures possibles dont l'abondance statistique est supérieure à 0.14% dont trois sont supérieures à 5% (tableau 12). Parmi ces dernières la plus abondante correspond à PuPu $\alpha E$  avec un taux de 9.39%. La linéarisation de PuPuPu et le supposé PuPu $\alpha E$  nous a permis de trouver le temps de rétention de  $\alpha E\alpha E\alpha E$ . Ce dernier correspond au temps de rétention du TAG majoritaire de l'huile d'*Aleurites fordii* injectée en dopage avec l'huile de *Punica granatum* de structure  $\alpha E\alpha E\alpha E$ . Cela nous a permis d'attribuer la structure PuPu $\alpha E$  au TAG sortant à 11.31min.



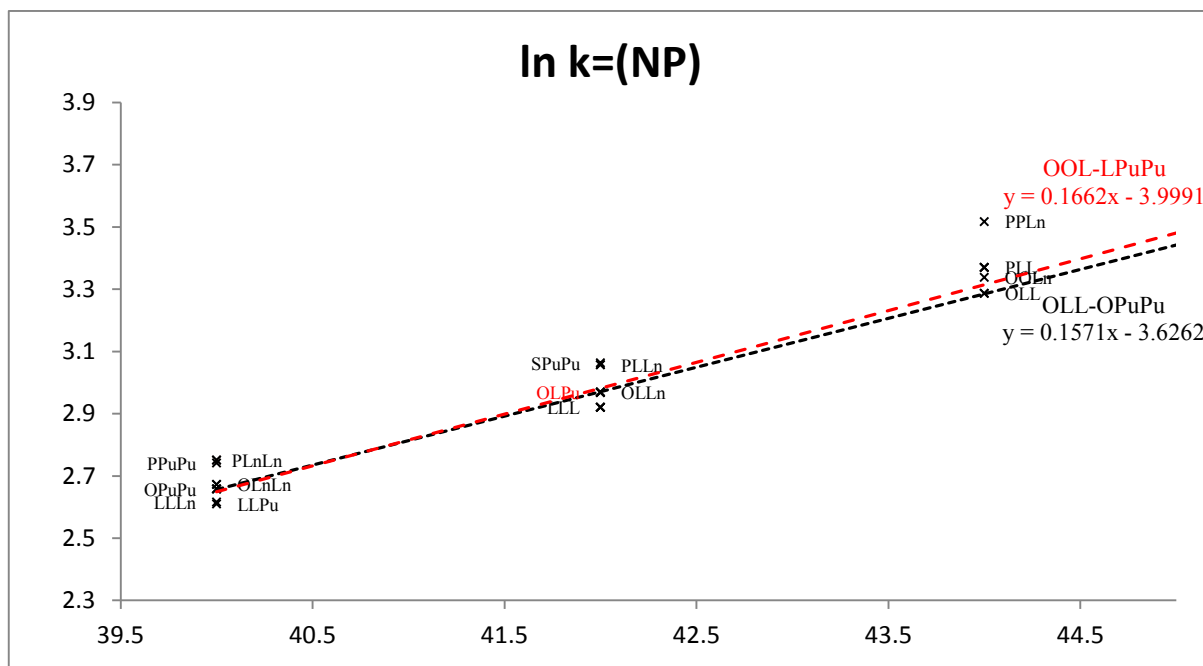
**Figure 14:** Détermination du tr de  $\alpha$ EPuPu.

Nous allons déterminer maintenant, la position des TAG de type XYZ avec la même démarche que précédemment : XYZ se trouve être à l'intersection des deux droites XXZ-XYZ-YYZ et XYY-XYZ-ZZX.

#### ✓ Détermination de la position d'OLPu

OLPu peut être déterminé à partir de l'intersection des droites OLL-OPuPu et OOL-LPuPu à NP=42.





**Figure 15** : Détermination du tr d'OLPu.

**Tableau 23** : Détermination de tr théorique d'OLPu.

TAG	Ln k	k	Tr (min)
<b>OLPu</b>	2.97	19.53	27.10

Or sur le chromatogramme, nous avons un pic à  $t_r = 27.01$  min et qui selon les résultats de LC-MS correspond à C18 :1C18 :2C18 :3.

Donc, il s'agit bien d'OLPu.

De la même manière, on peut déterminer la position des différents autres TAG de type XYZ présent dans l'huile de *Punica granatum* : PPUuE, PLPu, LαEPu, OPUuE et OPUct.

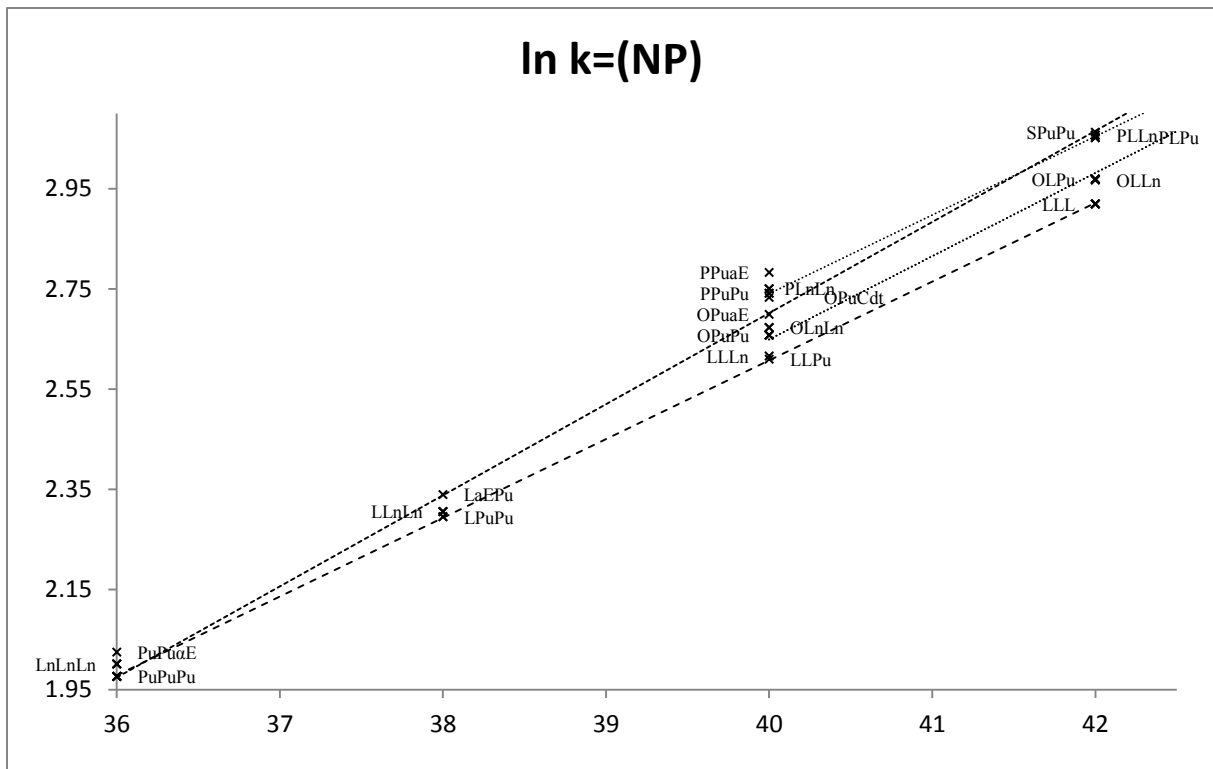


Figure 16 : Variation de  $\ln k = f(NP)$ .

Comme précédemment, nous avons fait le tracé de  $\ln k = f(DBN)$  (Figure 17) et de  $\ln k = f(CN)$  (Figure 18) pour confirmer la position de TAG ayant le même NP.

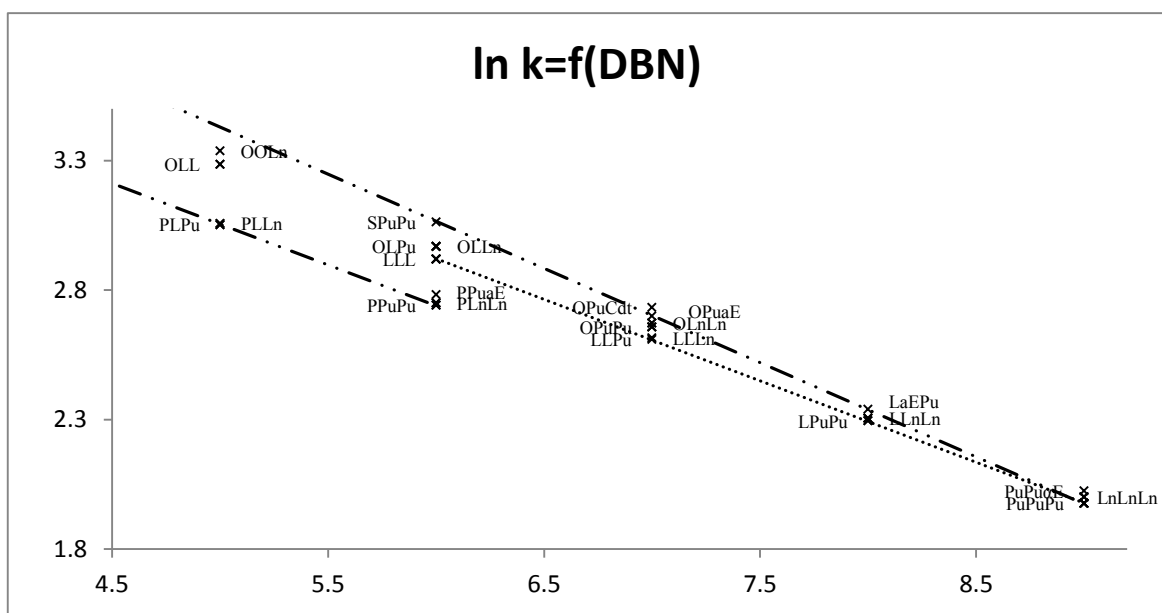


Figure 17 : Variation de  $\ln k = f(DBN)$ .



#### IV.4.2. Identification d'autres huiles

Nous avons procédé de la même manière pour identifier les TAG des autres huiles:

- ✓ Huile d'*Aquilegia vulgaris*
- ✓ Huile de *Calendula officinalis*
- ✓ Huile de *Catalpa ovata*
- ✓ Huile de *Jacaranda mimosifolia*

La difficulté réside dans le fait que l'on peut avoir des AG non séparés par GC/MS alors que leurs homologues en TAG sont séparés par chromatographie liquide.

Par exemple: Cd et Ct sont respectivement l'acide Calendique et l'acide Catalpique. Ces deux AG ne sont pas séparés par GC alors que les TAG homogènes correspondant CtCtCt et CdCdCd le sont par LC. En effet le calcul statistique d'abondance des TAG présente deux TAG de NP 36 respectivement CdCdCd (18.13%) et CdCdβE (1.27%) pour l'huile de *Calendula officinalis* et un seul TAG de NP 36: CtCtCt (8.40%) pour l'huile de *Catalpa ovata* dont les temps de rétention sont bien différents: 13.37min pour CdCdCd et 12.79 min pour CtCtCt. L'analyse d'un mélange de ces deux huiles présente indubitablement les deux pics bien séparés. Il est à remarquer que le TAG de structure CdCdβE n'a pas été observé dans l'huile de *Calendula*.

L'analyse GC-MS des FAME de l'huile de *Calendula officinalis* ne permet d'authentifier qu'un seul C18 :2 correspondant à l'acide Linoléique L. Or l'analyse LC-MS présente pour chaque TAG comportant un résidu C18 :2 deux structures différentes. Une correspond aux structures LXX ou LXY alors que l'autre plus retenue correspond à une combinaison avec un C18 :2 non identifié : C18 :2 NIXX ou C18 :2 NIXY. De la même manière la SM distingue deux structures C18:2C18:2C18:2 dont l'une correspond à LLL et l'autre à C18:2NI C18:2NI C18:2NI comme démontré avec les lois de rétention. L'examen bibliographique des LEC montre qu'aucun C18 :2 ne coélué avec L sur cette phase stationnaire. Le plus proche est C18 :2 8Z11Z et présente un ΔLEC de 0.08 largement suffisante pour que deux pics soient observés. On ne peut donc que faire l'hypothèse d'un C18:2 dont une double liaison est Z l'autre est E et dont la position de la double liaison Z est plus petit qu'en 9 ou en 12.

Les résultats de l'ensemble des huiles identifiées sont regroupés dans le tableau 24.

**Tableau 24** : Identification des TAG présents dans les différentes huiles.

<b>k</b>	<b>TAG</b>	<i>Aquilegia vulgaris</i>	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Catalpa ovata</i>	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	<i>Punica granatum</i>
5.2	CdCdC18:3ox		I			
6.3	LLnC18:3ox		I			
6.7	LCdC18:3ox		M			
6.7	C18:1oxLnCd		M			
7	C18:2xC18:3oxCd		I			
7	C18:1oxCdCd		I			
7.2	PuPuPu					M
7.6	PuPuαE					M
7.8	LnJaJa				s	
7.9	PuαECt					s
8.1	JaJaJa				I	
8.2	PuPuCt					s
8.3	LnCtCt			s		
8.6	LnCdCd		s			
8.7	CtCtCt			I		
9.1	CdCdCd		M			
9.9	LPuPu					I
10.4	LαEPu					s
10.6	LLnCt			s		
10.6	LJaJa				M	
10.7	CbCbCb	s				
11	LαEJa				s	
11.1	LCdJa				s	
11.2	LCtCt			M		
11.6	LCdCd		M			
11.9	C18:2aCtCt			I		
12	C18:2bJaJa				s	
12.1	C18:2xCdCd		s			
12.8	LCbCb	M				
13.6	LLPu					s
14	LLJa				M	
14.3	OPuPu					I
14.4	LLCt			I		
14.5	LLαE				s	
14.6	LLCd		I		s	
14.6	OC18:3xC18:3x		-			
15.1	OαEPu					s
15.2	OPuCt					s
15.3	OJaJa				I	
15.3	LC18:2aCt			I		
15.5	LLCb	I				
15.5	PPuPu					I
15.5	OPuβE			-		
15.6	AqCbCb	I				

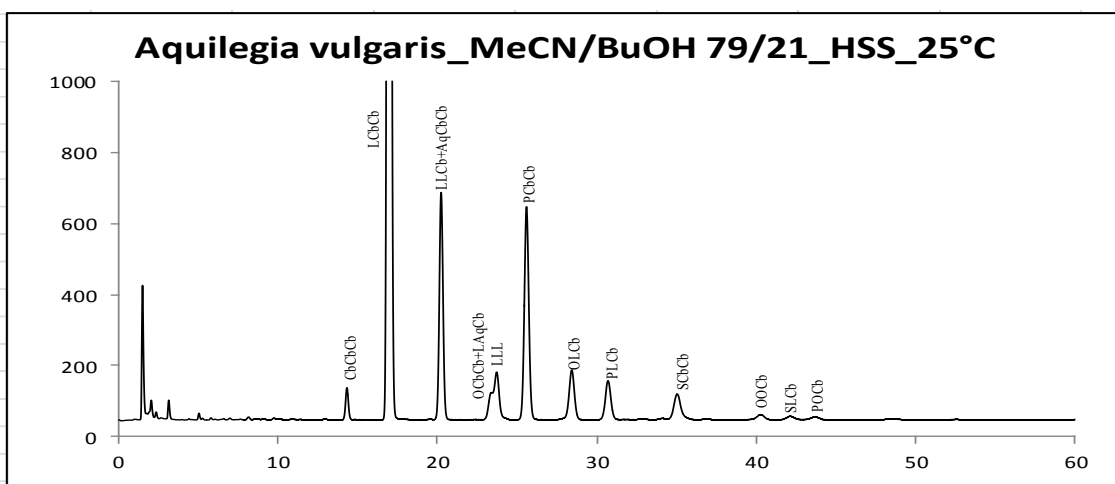
15.9	LC18:2βE				-		
16.1	OCtCt				I		
16.4	PαEPu						s
16.5	C18:2C18:2Ct				s		
16.6	LLβCd			I			
16.6	OCdCd			I			
18.2	PCdCd			I			
18.5	LAqCb	s					
18.5	OCbCb	s					
18.5	LLL	s		s		I	
18.5	OLC18:3x			-			
19.5	OLPu						s
20.2	PCbCb	I					
20.6	OLJa					M	
20.6	OLCt				s		
21.1	OLCd			s			
21.2	PLPu						s
21.4	SPuPu						I
21.8	PLJa					I	
22.2	OLCb	I					
22.5	PLCt				s		
22.8	OC18:2Ct				s		
24.4	PLCb	s					
25.2	OC18:2xβCd			s			
26.7	OLL					s	
27.9	SCbCb	s					
29.9	OOct				s		
30.3	SLJa					s	
30.3	OOJa					I	
31.2	OLC18:2b					s	
32.2	OOcb	s					
33.2	POCd						
33.7	SLCb	s					
35	POCb	s					

M majoritaire

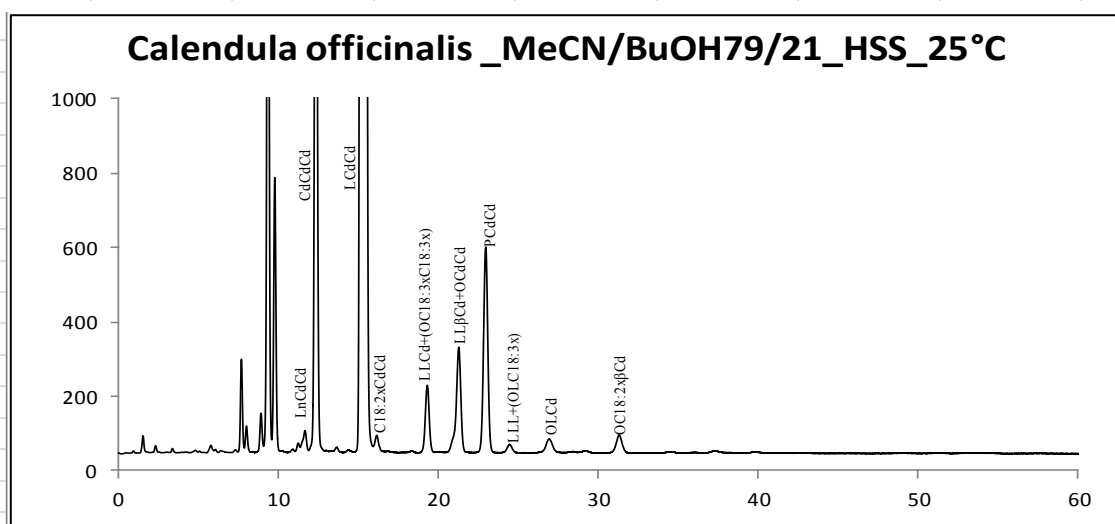
I intermédiaire

s petit (small)

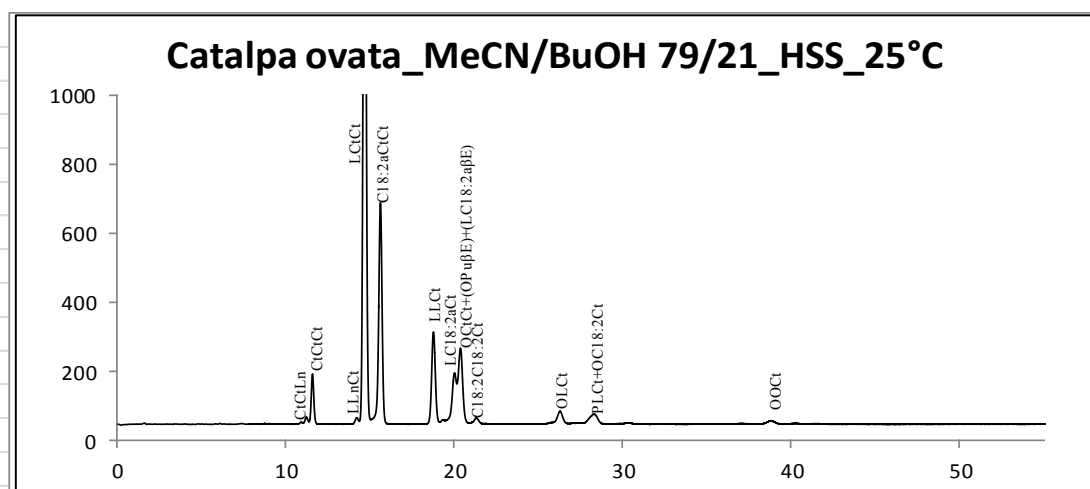
- présent mais coélué avec un autre composé.



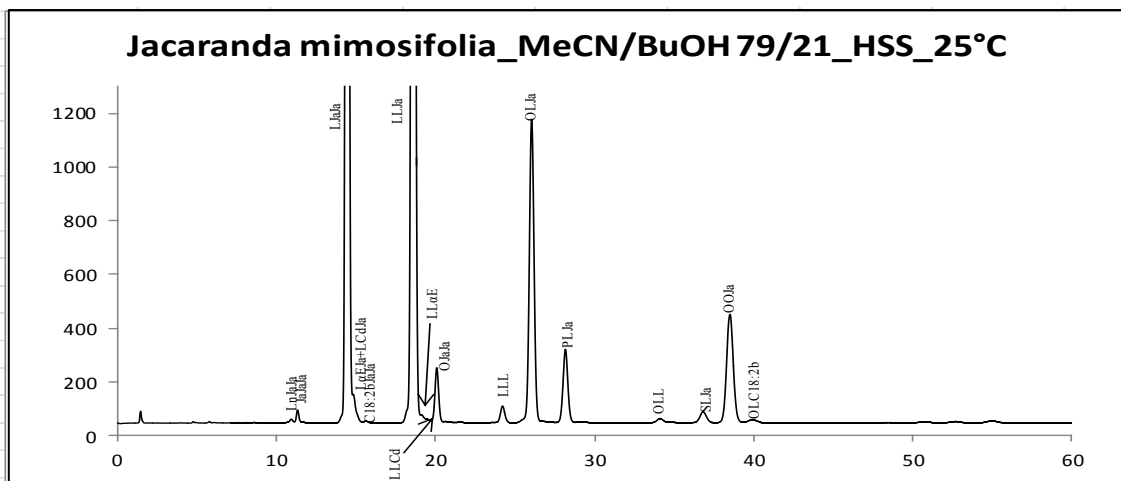
**Chromatogramme 25 :** Huile d'*aquilegia vulgaris* identifiée.



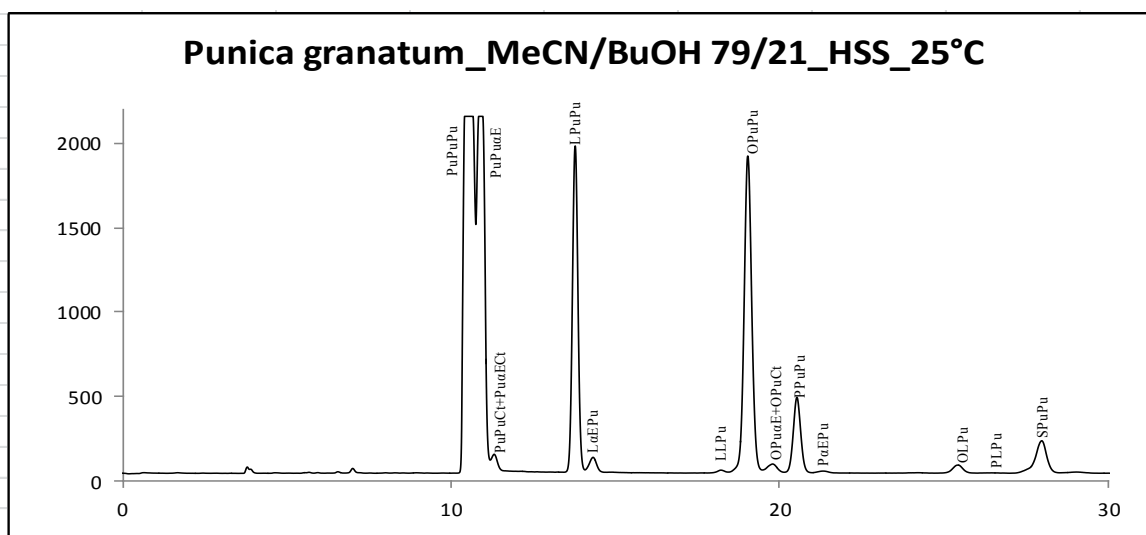
**Chromatogramme 26 :** Huile de *calendula officinalis* identifiée.



**Chromatogramme 27 :** Huile de *catalpa ovata* identifiée.



**Chromatogramme 28 :** Huile de *jacaranda mimosifolia* identifiée.



**Chromatogramme 29 :** Huile de *punica granatum* identifiée.



## V. Conclusion

La difficulté de ce travail a été de trouver des conditions permettant de séparer des TAG isomères géométriques et de positions par chromatographie en phase liquide. Le mélange binaire acétonitrile- butanol 79-21 à 25°C a permis de relever ce défi, et ceci sans utiliser de modificateur organique chloré. L'autre difficulté, qui a été surmontée, a consisté à identifier ces isomères de positions en C18:3 puisque la LC/MS ne permet pas d'identifier ces composés isobares. Nous y sommes parvenus en combinant les informations de la CPG, de la détermination des LEC des FAME, et des résultats de la littérature pour cerner au mieux la composition primaire en acide gras de chacune des huiles utilisées. Ensuite par une série d'hypothèses combinant la connaissance de la structure globale de chaque TAG, grâce à la SM, l'abondance statistique du TAG considéré, sa place sur le chromatogramme, grâce à l'utilisation des lois de rétention chromatographiques tous les TAG de chaque huile ont été identifiés. La coinjection deux à deux de plusieurs huiles nous a permis de conforter nos hypothèses et conclusions. Enfin la comparaison des résultats en CPG et UHPLC a permis d'identifier dans l'huile d'*Aleurites fordii* un C18:2 correspondant à la structure E9E12 présent aussi dans l'huile de *Catalpa ovata* mais aussi, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, la présence d'un C18:3 qui est un isomère de l'acide Punicique (soit Z9Z11Z13 soit Z8Z10Z12). Ce n'est pas l'acide Punicique car les LEC ne correspondent pas et on n'a pas un pic chromatographique à un temps correspondant aux structures des TAG avec un Pu potentiel.

Pratiquement tous les TAG dont l'abondance théorique est supérieure à 1% ont été observés. Les pourcentages en aire sont différents des pourcentages statistiques mais les TAG majoritaires correspondent aux TAG majoritaires observés sur les chromatogrammes.

Finalement, dans cette partie de ce travail de thèse, nous avons réussi à séparer et identifier des huiles contenant des TAG dont la composition, n'a jamais été décrite à ce jour à notre connaissance. Le bilan final en est dressé ci-dessous :

- ✓ 14 TAG dont 8 jamais décrits dans l'Huile d'*Aquilegia vulgaris*
- ✓ 19 TAG dans l'Huile de *Calendula officinalis*
- ✓ 15 TAG dans l'Huile de *Catalpa ovata*
- ✓ 17 TAG dans l'Huile de *Jacaranda mimosifolia*
- ✓ 15 TAG dans l'Huile de *Punica granatum*

## VI. Références bibliographiques

- [1] E. Ucciani, Nouveau dictionnaire des huiles végétales : Composition en acide gras, Technique et documentation-Lavoisier, (1995).
- [2] A. M. Bakowska-Barczak, A. Schieber, P. Kolodziejczyk, Characterization of Canadian Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Seed Oils and Residues, *J. Agric. Food Chem.*, 57 (2009) 11528-11536.
- [3] L. Mondello, M. Beccaria, P. Donato, F. Cacciola, G. Dugo, P. Dugo, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the analysis of triacylglycerols in *Borrage officinalis*, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 688-692.
- [4] P. Blaise, R. Wolff, M. Farines, Etude régiospécifique de triacylglycérols d'huiles végétales par clivage chimique et RMN <sup>13</sup>C haute résolution, *OCL*, 4 (1997) 135-141.
- [5] C. Bickert, W. Luhs, W. Friedt, Variation for fatty acid content and triacylglycerol composition in different *Linum* species, *Industrial Corps and Products*, 2 (1994) 229-237.
- [6] A. Acheampong, N. Leveque, A. Tchaplal, S. Heron, Simple complementary liquid chromatography and mass spectrometry approaches for the characterization of triacylglycerols in *Pinus koraiensis* seed oil, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 5087-5100.
- [7] M. Lísa, M. Holčapek, Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1198-1199 (2008) 115-130.
- [8] R. L. Wolff, C. C. Bayard, Fatty Acid Composition of Some Pine Seed Oils, *JAOCS*, 72 (1995) 1043-1046.
- [9] W.W. Christie, Chap 8, *Lipid Analysis* 3<sup>rd</sup> Ed, The Oily Press, (2003) Bridgewater, England.
- [10] T. Tagaki, Y. Itabashi, Occurrence of Mixtures of Geometrical Isomers of Conjugated Octadecatrienoic Acids in Some Seed Oils: Analysis by Open-Tubular Gas Liquid Chromatography and High Performance Liquid Chromatography, *LIPIDS*, 16 (1981) 546-551.

- [11] M. Demirbükler, L. G. Blomberg, N. U. Olsson, M. Bergqvist, B. G. Herslöf, F. A. Jacobs, Characterization of Triacylglycerols in the Seeds of *Aquilegia vulgaris* by Chromatographic and Mass Spectrometric Methods, *LIPIDS*, 27 (1992) 436-440.
- [12] F. V. Dulf, D. Pamfil, A. D. Baciuc, A. Pintea, Fatty acid composition of lipids in pot marigold (*Calendula officinalis* L.) seed genotypes, *Chemistry Central Journal*, 7-8 (2013) 1-11.
- [13] S. Özgül-Yücel, Determination of Conjugated Linoleic Acid Content of Selected Oil Seeds Grown in Turkey, *JAACS*, 82 (2005) 893-897.
- [14] J. Miranda, A. Fernández-Quintela, I. Churrua, J. Ayo, C. García-Marzo, R. Dentin, M. P. Portillo, The presence of the trans-10, cis-11, sequence does not have a body fat-lowering effect of jacaric acid, a conjugated linolenic acid isomer, *Food Chemistry*, 129 (2011) 21-27.
- [15] A. Khoddami, Y. B. C. Man, T. H. Roberts, Physico-chemical properties and fatty acid profile of seed oils from pomegranate (*Punica granatum* L.) extracted by cold pressing, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (2014) 553-562.
- [16] M. L. Blank, O. S. Privett, Evaluation of mathematical distribution methods for the determination of triglyceride composition, *Lipids*, 1 (1966) 27-30.
- [17] C. Jr. Merritt, M. Vajdi, S. G. Kayser, J. W. Halliday, M. L. Bazinet, Validation of computational methods for triglyceride composition of fats oils by liquid chromatography and mass spectrometry, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59 (1982) 422-432.
- [18] M. A. M. Zeitoun, W. E. Neff, E. Selke, T. L. Mounts, Analyses of vegetable oil triglyceride molecular species by reversed phase high performance liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, 14 (1991) 2685-2698.
- [19] J. P. Goiffon, C. Reminiac, M. Olle, Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des corps gras. I- Recherche des meilleures conditions opératoires. Cas de l'huile de soja, *Rev. Fr. Corps Gras*, 4 (1981) 167-170.
- [20] J. P. Goiffon, C. Reminiac, D. Furon, Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des corps gras. II- Grandeurs de rétention des triglycérides, *Rev. Fr. Corps Gras*, 5 (1981) 199-200.

## **Chapitre VIII : Mise au point d'une méthode d'analyse rapide des TAG présents dans l'huile d'olive pour contrôler leur appellation de qualité**

- I. Introduction**
- II. Recherche du système chromatographique à utiliser**
- III. Identification des TAG par UHPLC-ESI-MS**
- IV. Optimisation du temps d'analyse**
- V. Conclusion et perspectives**
- VI. Références bibliographiques**

## I. Introduction

Bien que la culture des olives pour en fabriquer de l'huile devienne très répandue dans le monde et sur tous les continents, sa production dans la région méditerranéenne reste incontestablement la plus importante (97% de la production mondiale) [1-2]. Elle constitue une ressource économique conséquente pour cette région.

L'importance de cette production oléique et sa valeur financière lui confèrent une cible privilégiée pour les fraudeurs [3]. C'est pour cela que plusieurs institutions internationales tels que le Conseil Oléique International (COI), la Commission Européenne (CE) ou encore le *Codex Alimentarius* imposent des normes strictes pour contrôler la qualité de l'huile d'olive dans le monde.

Parmi les méthodes proposées par ces commissions internationales, on trouve la détermination de la composition en triacylglycérols par chromatographie liquide haute performance, méthode reconnue comme étant la meilleure pour déterminer l'authenticité de l'huile d'olive [1, 4]. La norme de qualification validée par le COI impose l'utilisation de la chromatographie liquide haute performance en milieu non aqueux à polarité inversée de phases (NARP-HPLC) avec une phase mobile constituée de mélanges acétonitrile/acétone ou propionitrile et une détection par indice de réfraction (RI) [5].

Comme attendu et décrit dans les chapitres précédents l'ordre d'éluion des TAG s'ordonne, dans ces conditions, par nombre de partition (NP) croissant appelé par le COI Nombre de Carbone Equivalent ( $ECN = NC - 2 * NDB$ ) [6].

La méthode officielle du COI exige le respect de quatre règles [5] :

- L'éluion chromatographique doit être effectuée jusqu'à ECN 52 inclus.
- La séparation des classes de TAG entre ECN 42 et ECN 52 doit être effectuée sans avoir un chevauchement entre les différentes classes.
- La détermination expérimentale de la somme des aires de pics correspondant à ECN 42 et le calcul du pourcentage en aire de tous les TAG d'ECN 42. Ceci représente en fait un bilan quantitatif en normalisation interne par classe sans détermination des coefficients de réponse de chacun des TAG. De manière générale, cette méthode est celle couramment utilisée pour analyser des mélanges complexes constitués par un grand nombre de composés.
- La détermination du critère de qualification:  $\Delta ECN 42$ , qui s'obtient en faisant la différence entre le pourcentage expérimental obtenu ci-dessus et la somme des

pourcentages d'abondance théoriques des TAG d'ECN 42, calculés à partir de la composition en acide gras obtenue par chromatographie en phase gazeuse [5], de la même manière que celle décrite dans le chapitre précédent concernant l'analyse des huiles des graines possédant des acides gras polyinsaturés particuliers.

Cette valeur de  $\Delta$ ECN 42 permet d'évaluer l'authenticité de la dénomination de qualité de l'huile d'olive (extra vierge, vierge, raffinée, olive de grignons raffinée, lampante). Par exemple, la valeur de  $\Delta$ ECN 42 doit être inférieure à  $|0.2|$  pour une huile d'olive vierge [5]. Une valeur plus grande que la valeur de référence définie pour chaque dénomination de qualité d'huiles d'olive témoigne de la présence d'une adultération.

A l'heure actuelle, la méthode officielle propose une séquence analytique très longue [4, 7-8]. En effet, la méthodologie décrite recommande l'utilisation d'un système chromatographique classique HPLC, avec une colonne remplie de silice greffée  $C_{18}$  de géométrie 250 x 4.6 mm, garnie de particules de diamètres 5  $\mu$ m. Ces conditions chromatographiques conduisent à des analyses d'environ 60 minutes et à une consommation importante de solvant par échantillon.

Il est classiquement reconnu que l'UHPLC que nous avons utilisée dans tout ce travail de thèse permet, soit d'augmenter les séparations par augmentation d'efficacité, soit d'accélérer les analyses sans perdre en efficacité [9]. C'est ce deuxième aspect que nous envisageons dans ce chapitre.

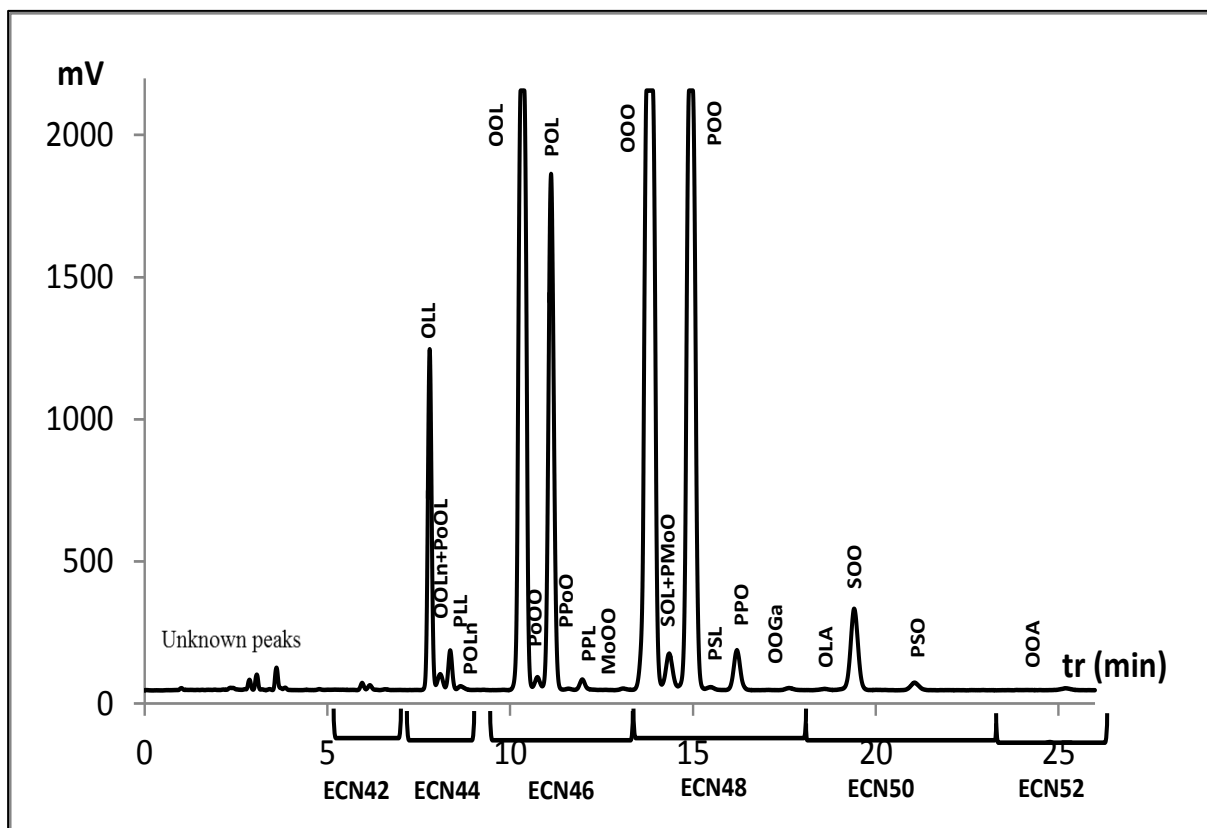
En partant des conditions de travail mises au point dans les chapitres précédents, c'est-à-dire du choix du nouveau système d'analyse des TAG en NARP, nous avons donc cherché à voir s'il permettait de proposer une séquence beaucoup plus rapide pour ce type d'analyse et donc au final moins coûteuse.

## **II. Recherche du système chromatographique à utiliser**

Comme nous l'avons montré dans le chapitre V où nous avons testé différentes compositions de mélanges binaires, le mélange MeCN/BuOH a été retenu comme étant le meilleur pour séparer les TAG des huiles.

L'étape suivante a consisté à choisir la phase stationnaire de travail. Nous avons pour cela utilisé les conclusions du chapitre VI dans lequel nous avons testé différentes phases stationnaires.

Au final, dans le cas de l'huile d'olive, c'est le système Acquity UPLC BEH C18 percolé par MeCN/BuOH 74/26 v/v à 25°C qui a été retenu. Dans un premier temps nous avons travaillé à longueur réduite identique ( $l = L/dp$ ) pour pouvoir comparer, à potentiel séparatif identique les séparations obtenues entre la méthode COI et celle que nous proposons. Le chromatogramme est donné ci-dessous.



**Chromatogramme 1** : Huile d'olive, MeCN/BuOH 74/26,  $d=0.25\text{ml/min}$ , ACQUITY UPLC BEH C18 (2x50 x 2.1mm, 1.7 $\mu\text{m}$ ).

En moins de 30 minutes nous obtenons une très bonne séparation des classes ECN 42 à ECN 52 comme préconisé dans la norme du COI. La résolution de la plupart des TAG majeurs et mineurs est supérieure à 1.4 et pour les paires les moins séparées  $R_S$  est supérieure à 1.

Afin de nous assurer qu'il n'y a pas superposition des TAG d'ECN différents, nous avons par sécurité, utilisé le couplage UHPLC-ESI-MS pour l'identification, en parallèle des études en UHPLC-DEDL. Les diagrammes  $\ln k = f(\text{NP})$  et  $\ln k = f(\text{NDL})$  ont affiné les attributions.

### III. Identification des TAG par UHPLC-ESI-MS

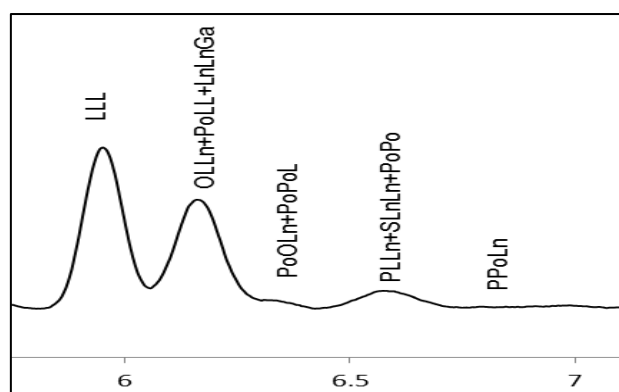
Le système UHPLC-ESI-MS a été utilisé avec ajout d'argent en post-colonne. Cet ajout permet d'améliorer la sensibilité de détection des TAG par un facteur 100 [10-11].

Comme cela a déjà été décrit dans le chapitre VII précédent, pour chaque TAG on a obtenu les adduits  $[\text{TAG}+\text{Ag}]^+$  et  $[\text{TAG}+\text{Ag}+\text{AgNO}_3]^+$ . Les ions  $[\text{TAG}+^{107}\text{Ag}]^+$  ont été sélectionnés et fragmentés afin d'obtenir les rapports  $m/z$  des différents diacylglycérols  $[\text{DAG-H}]^+$  (Tableau 1).

Afin d'identifier certains TAG de même masse qui coéluent (comme par exemple la paire de TAG de même  $m/z = 961$  à  $t_r=8.6$  min et celle de  $m/z = 965$  à 14.9 min (tableau 1)), on a, tout comme précédemment, combiné les résultats obtenus en UHPLC-MS par fragmentation avec les lois de rétention chromatographiques de Goiffon [12-13].

Cette méthode nous a permis de confirmer l'identification de 9 TAG différents ayant un ECN=42 [10, 14] (chromatogramme 2) et d'identifier au total 34 TAG présents dans l'huile d'olive (Tableau 1).

De même cela nous a permis de montrer que les conditions proposées ne conduisent pas à une superposition des TAG d'ECN différents, en particulier de l'ECN 42 avec les autres.



**Chromatogramme 2** : Identification des TAG à ECN 42.



**Tableau 1** : Identification des TAG présents dans l'huile d'olive.

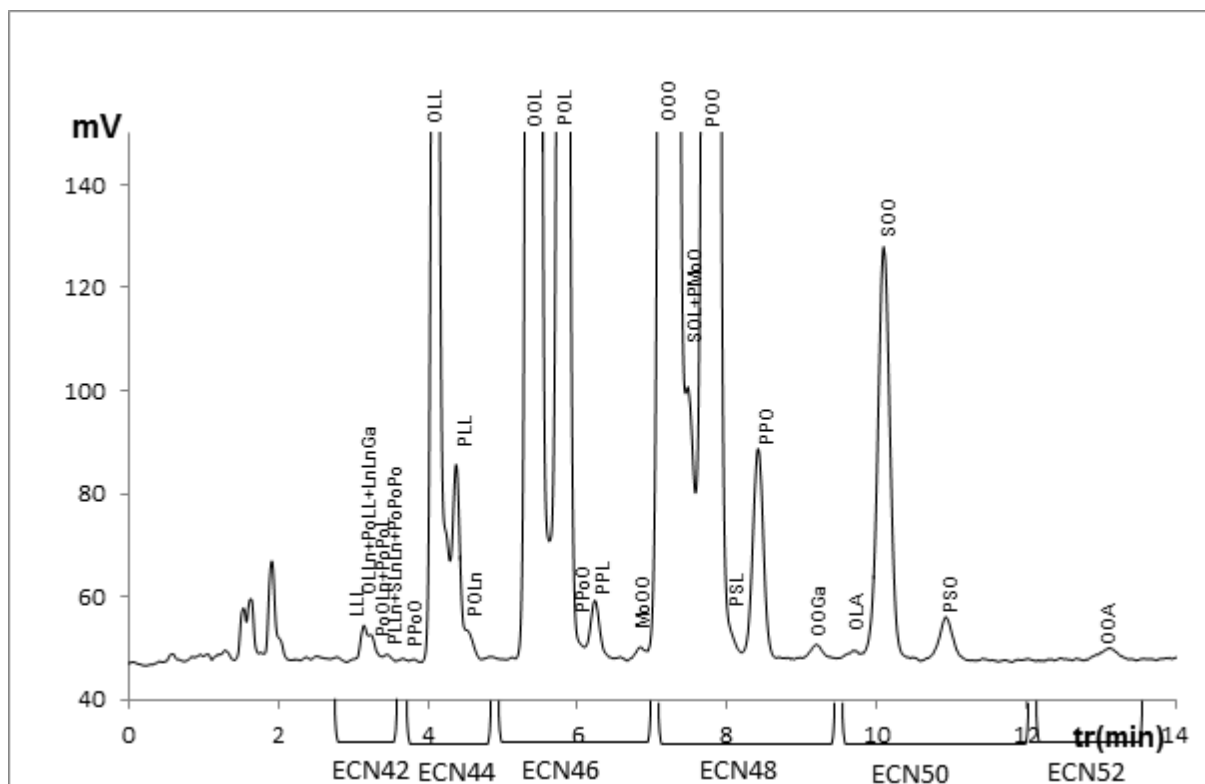
tr (min)	Facteur de rétention k	Masse de l'adduit	[DAG-H] <sup>+</sup>			ECN	Nature du TAG	Conclusion
		(TAG+107Ag) <sup>+</sup>						
5.9	4.1	985	599.5			ECN42	C18:2C18:2C18:2	LLL
6.1	4.3	985	601.5	599.5	597.5	ECN42	C18:1C18:2C18:3	OLLn
6.1	4.3	959	573.5	599.5		ECN42	PoC18:2C18:2	PoLL
6.1	4.3	1011	595.5	627.5		ECN42	C18:3C18:3C20:1	LnLnGa
6.3	4.4	959	575.5	571.5	599.5	ECN42	PoC18:1C18:3	PoOLn
6.3	4.4	933	547.5	573.5		ECN42	PoPoC18:2	PoPoL
6.5	4.6	959	597.5	575.5	573.5	ECN42	PC18:2C18:3	PLLn
6.5	4.6	985	595.5	601.5		ECN42	SC18:3C18:3	SLnLn
6.7	4.8	933	549.5	573.5	571.5	ECN42	PPoC18:3	PPoLn
7.7	5.6	987	601.5	599.5		ECN44	C18:1C18:2C18:2	OLL
8.1	6	987	603.5	599.5		ECN44	C18:1C18:1C18:3	OOLn
8.3	6.2	961	601.5	599.5		ECN44	PC18:2C18:2	PLL
8.6	6.4	961	577.5	573.5	599.5	ECN44	PC18:1C18:3	POLn
8.6	6.4	961	549.5	575.5	573.5	ECN44	PPoC18:2	PPoL
10.3	7.9	989	603.5	601.5		ECN46	C18:1C18:1C18:2	OOO
10.7	8.2	963	575.5	603.5		ECN46	PoC18:2C18:2	PoOO
11.1	8.6	963	577.5	575.5	601.5	ECN46	PC18:1C18:2	POL
11.6	9	937	549.5	577.5	575.5	ECN46	PPoC18:1	PPoO
11.9	9.3	937	551.5	575.5		ECN46	PPC18:2	PPL
12.4	9.7	911	551.5	549.5		ECN46	PPPo	PPPo
12.6	9.9	977	591.5	589.5	601.5	ECN46	MaC18:1C18:2	MaOL
13.1	10.3	977	589.5	603.5		ECN46	MoC18:1C18:1	MoOO
13.7	10.8	991	603.5			ECN48	C18:1C18:1C18:1	OOO
14.3	11.3	991	605.6	603.5	601.5	ECN48	SC18:1C18:2	SOL
14.3	11.3	951	563.5	577.5	589.5	ECN48	PMoC18:1	PMoO
14.9	11.8	965	577.5	603.5		ECN48	PC18:1C18:1	POO
14.9	11.8	965	577.5	575.5	605.6	ECN48	PoSC18:1	PoSO
15.5	12.4	965	579.5	575.5	603.5	ECN48	PSC18:2	PSL
16.2	13	939	551.5	577.5		ECN48	PPC18:1	PPO
17.6	14.2	1019	603.5	631.5		ECN48	C18:1C18:1Ga	OOGa
18.6	15	1019	601.4	633.5	631.5	ECN50	C18:1C18:2A	OLA
19.4	15.7	993	605.6	603.5		ECN50	SC18:1C18:1	SOO
21.1	17.2	967	579.5	577.5	605.6	ECN50	PSC18:1	PSO
25.2	20.7	1021	603.5	633.5		ECN52	C18:1C18:1A	OOA

#### IV. Optimisation du temps d'analyse

Afin de gagner en temps d'analyse, nous avons envisagé de modifier aussi bien la longueur de la colonne que le débit de phase mobile.

Nous avons utilisé une seule colonne ACQUITY UPLC BEH C18 (50 x 2.1mm, 1.7 $\mu$ m) ce qui nous a permis, en passant de 10 à 5 cm, de diminuer comme attendu le temps d'analyse par deux (temps d'analyse observé 15 min) (chromatogramme 3).

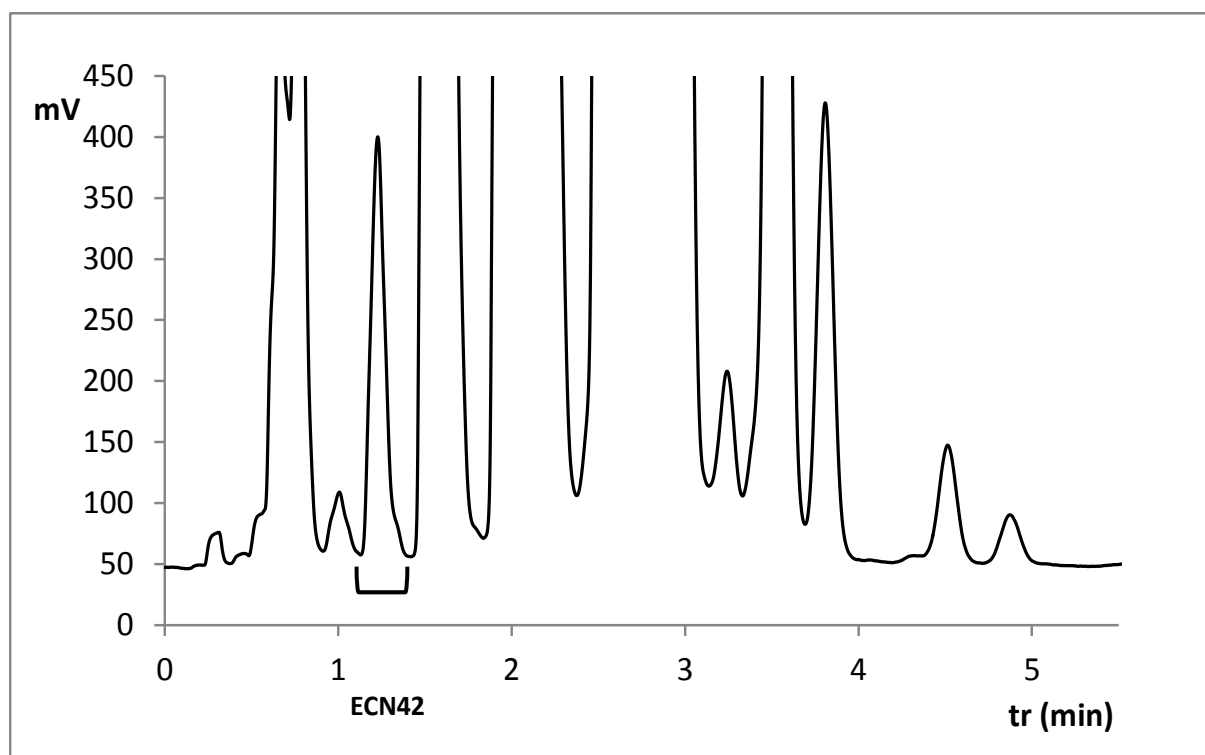
Comme attendu nous observons une perte de séparation. Mais, par rapport à nos objectifs, la séparation en classes des ECN reste effective, ce qui est en adéquation avec la norme du COI.



**Chromatogramme 3** : Huile d'olive, MeCN/BuOH 74/26, d=0.25ml/min, ACQUITY UPLC BEH C18 (50 x 2.1mm, 1.7 $\mu$ m).

La méthode officielle du COI n'impose pas une séparation des TAG à l'intérieur d'un même groupe d'ECN. Nous avons donc cherché à diminuer encore plus le temps d'analyse. Comme prévu par la théorie, nous avons choisi, pour cela, d'augmenter le débit de travail. Différents débits ont été testés (résultats non montrés ici). Un débit de 0.6 mL/min permet de garder la séparation entre le groupe de TAG ayant un ECN 42 et les autres et d'avoir une analyse en 5 min, conduisant à 2.7 mL de solvant consommé par échantillon à analyser (chromatogramme 4). Le calcul de  $\Delta$ ECN42 comme proposé dans la méthode COI est ainsi toujours possible.

Par sécurité, l'analyse de l'huile d'olive dans ces dernières conditions a été menée en UHPLC-ESI-MS afin de confirmer l'identification des TAG dans chacun des massifs et la non interférence d'autres TAG dans le massif d'ECN 42.



**Chromatogramme 4:** Huile d'olive, MeCN/BuOH 74/26, d=0.6ml/min, ACQUITY UPLC BEH C18 (50 x 2.1mm, 1.7 $\mu$ m).

## V. Conclusion et perspectives

Le travail effectué tout au long de la thèse sur le choix de la phase mobile, des phases stationnaires et de la température d'analyse a permis de proposer ici un système conduisant à l'analyse des TAG de l'huile d'olive en 5 min.

Afin de proposer cette méthode comme une alternative à celle d'une durée de 60 min utilisée par le COI pour le contrôle de la qualité des huiles d'olive, différentes étapes restent encore à effectuer.

Le détecteur utilisé dans la norme est un détecteur à indice de réfraction. Pourrait-on le remplacer par un autre du type DEDL, Corona ou un Spectromètre de Masse ?

Pour répondre à cette question, il faut déterminer pour chacun de ces trois types de détecteurs :

- leur gamme de linéarité,
- la réponse des différents TAG pour savoir s'ils répondent de la même manière,
- déterminer s'il est possible de travailler en aire sans faire trop d'approximation ; (de fait ce qui est fait avec le détecteur à indice de réfraction),
- enfin d'analyser différentes huiles de référence pour voir si on les différencie par le calcul de  $\Delta\text{ECN}_{42}$  comme décrit dans la méthode du COI.

Une fois ces questions résolues il sera possible de déterminer si la méthode de qualification proposée peut être adaptée quel que soit le type de détecteur utilisé ou impose un détecteur à indice de réfraction.

Cela fait l'objet d'études complémentaires, en cours, que nous n'avons pas eu le temps de terminer dans le temps imparti pour ce travail de thèse. L'ensemble de ces résultats n'est donc pas décrit ici.

## VI. Références bibliographiques

- [1] J. Harwood, R. Aparicio, Handbook of Olive Oil, Analysis and Properties, *Springer Science & Business Media, LLC* (2000).
- [2] B. Karray, Enjeux de la filière oléicole en Tunisie et axes de développement dans le nouveau contexte politique, *les notes d'analyse de CIHEAM*, N°66 (2012).
- [3] H. Jabeur, A. Zribi, J. Makni, A. Rebai, R. Abdelhedi, M. Bouaziz, Detection of Chemlali Extra-Virgin Olive Oil Adulteration Mixed with Soybean Oil, Corn Oil, and Sunflower Oil by using GC and HPLC, *J. Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014) 4893-4904.
- [4] R. Aparicio, R. Aparicio-Ruiz, Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques, *J. Chromatogr. A*, 881 (2000) 93-104.
- [5] International Olive Council, Determination of the difference between actual and theoretical content of triacylglycerols with ECN 42, COI/T.20/Doc. No. 20 Rev. 2 (2008). Madrid, Spain.
- [6] European Commission Regulation (EEC) No 2568, On the characteristics of olive oil and olive-residue and on the relevant methods of analysis, *The Official Journal of the European Union*, L248 (1991) 1-83.
- [7] M. Beccaria, E. Moret, G. Purcaro, L. Pizzale, A. Cotroneo, P. Dugo, L. Mondello, L. S. Conte, Reliability of the  $\Delta$ ECN42 limit and global method for extra virgin olive oil purity assessment using different analytical approaches, *Food Chemistry*, 190 (2016) 216-225.
- [8] R. Aparicio, M. T. Morales, R. Aparicio-Ruiz, N. Tena, D. L. Garcia-Gonzalez, D, Authenticity of olive oil: Mapping and comparing official methods and promising alternatives, *Food Research International*, 54 (2013) 2025-2038.
- [9] S. Fekete, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Comparison of the most recent chromatographic approaches applied for fast and high resolution separations: Theory and practice, *J. Chromatogr. A*, 1408 (2015) 1-14.
- [10] A. Acheampong, N. L. Leveque, A. Tchaplal, S. Héron, Simple complementary liquid chromatography and mass spectrometry approaches for the characterization of triacylglycerols in *Pinus koraiensis* seed oil, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 5087-5100.
- [11] N. L. Leveque, S. Héron, A. Tchaplal, Regioisomer characterization of triacylglycerols by non-aqueous reversed-phase liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry using silver nitrate as a postcolumn reagent, *J. Mass Spectrometry*, 45 (2010) 284-296.

[12] J. P. Goiffon, C. Reminiac, M. Olle, Application à la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des corps gras. I- Recherche des meilleures conditions opératoires. Cas de l'huile de Soja, *Revue Française des Corps Gras*, 4 (1981) 167-170.

[13] J. P. Goiffon, C. Reminiac, D. Furon, Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des corps gras. II-Grandeurs de rétention des triglycérides, *Revue Française des Corps Gras*, 5 (1981) 199-207.

[14] A. Tamba Sompila, M. G. Maloumbi, J. Bleton, A. Tchaplà, S. Héron, Identification des triacylglycerols en HPLC. Comment se passer du couplage HPLC-SM ? Dans quel cas la chromatographie est-elle encore indispensable ? *OCL*, 21 (2014) A601-A607.

## Conclusion générale

Le premier objectif de ce travail a été de proposer des conditions d'analyse des triacylglycérols (TAG) en chromatographie en phase liquide à polarité inversée de phases en milieu non aqueux (NARP-LC) en utilisant des solvants alternatifs aux solvants chlorés.

Nous avons élargi la gamme de mélanges binaires susceptibles d'être utilisés en établissant un diagramme de force éluante basée sur la détermination des sélectivités méthylène, de la température ambiante jusqu'à 85°C. Cette échelle de force éluante est valable pour des phases stationnaires en C<sub>18</sub>. Les mélanges étudiés ont tous utilisé l'acétonitrile comme solvant faible, alors que le solvant fort était l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'iso-propanol ou encore le butanol à 4 températures différentes : 25, 43, 63 et 85°C. Leur potentiel séparatif a été comparé à celui du mélange binaire optimal MeCN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à 25°C couramment utilisé pour l'analyse des TAG. Ce diagramme nous a servi pour comparer les séparations dans les différents mélanges binaires étudiés dans des conditions isoéluentes au meilleur binaire MeCN / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à 25°C pris comme référence.

Neuf huiles végétales ont été utilisées. Elles ont été choisies afin de couvrir la très large gamme de structures de TAG que l'on rencontre dans les huiles végétales classiques; ce sont les huiles de calophyllum (*Calophyllum inophyllum*), soja (*Glycine max*), pistache (*Pistacia lentiscus*), olive (*Olea europea*), pépins de cassis (*Ribes nigrum*), bois de Chine ou de Tung (*Aleurites fordii*), pignon de pin coréen (*Pinus koraiensis*), grenade (*Punica granatum*) et de babassu (*Orbignya martiana*).

La comparaison des chromatogrammes obtenus dans les conditions isoéluentes a nécessité l'utilisation en cascade de différents critères de jugement de la qualité de la séparation chromatographique. Cela a conduit à proposer un mélange MeCN/BuOH 74/26 (v/v) à 25°C comme étant le meilleur système pour séparer les TAG en remplacement de systèmes à base de solvants chlorés.

Une fois la composition de phase mobile et la température sélectionnées, nous avons, dans un second temps, comparé différentes phases stationnaires parmi la nouvelle génération de phases stationnaires de petits diamètres de particules partiellement ou totalement poreuses permettant d'obtenir de bonnes séparations des TAG classiques contenant des acides gras tels

que P, S, L, O mais aussi des TAG contenant des acides gras isomères de positions et de stéréochimie en C18:3.

Cette étude nous a permis de proposer deux systèmes chromatographiques basés sur l'utilisation de deux phases stationnaires totalement poreuses de très petits diamètres de particules ; celles partiellement poreuses n'amenant pas, dans notre cas, d'amélioration significative :

La colonne Acquity UPLC BEH C18 percolée par MeCN/BuOH 74/26 (v/v) à 25°C pour séparer les TAG classiques.

La colonne Acquity UPLC HSS C18 percolée par MeCN/BuOH 79/21 à 25°C a été retenue pour la séparation de TAG contenant des acides gras isomères en C18:3.

Ce dernier système a été mis à profit pour la séparation des TAG des huiles de graines suivantes : *Aquilegia Vulgaris*, *Calendula Officinalis*, *Catalpa Ovata*, *Jacaranda Mimosifolia*, et *Punica Granatum*. Les TAG constituant l'huile de ces graines ont la particularité de posséder des mélanges différents de différents acides gras en C18:2 et C18:3 isomères de position. Le système chromatographique proposé permet de bien éclater la plupart de ces TAG.

L'étape suivante a consisté à identifier les TAG ainsi séparés. Le seul couplage de la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse ne permet pas cette identification. En effet, la spectrométrie de masse ne permet pas de différencier en routine des composés insaturés ou poly-insaturés ayant la même masse moléculaire due à une même formule brute et qui ne diffèrent à nombre total de doubles liaisons égal que par leur répartition au sein d'une même chaîne.

La démarche a donc consisté à faire la synthèse des informations amenées par la mise en œuvre de différentes techniques ou calculs :

- la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse des esters méthyliques obtenus après transestérification des TAG,
- le calcul complémentaire de leur longueur équivalente de chaîne (LEC) pour leur identification comparative d'une huile à une autre,
- le calcul statistique des abondances des TAG attendus,



- le couplage de la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse pour l'obtention de la masse molaire des TAG, du nombre de carbone et du nombre de doubles liaisons des acides gras constituant ces TAG,
- puis la combinaison de toutes ces données à l'information obtenue par l'utilisation de lois de rétention chromatographiques (log k en fonction du nombre de partition, du nombre de carbone ou du nombre de doubles liaisons).

Un tableau récapitulatif de l'ordre d'élution des TAG a pu ainsi être proposé. Il permettra l'identification ultérieure d'un très grand nombre de TAG et la qualification d'un très grand nombre d'huiles et de graines.

L'huile d'olive étant une ressource importante pour la Tunisie, nous avons modifié, en conservant le potentiel séparatif requis, les conditions précédemment optimisées à son analyse. Le système chromatographique constitué d'une colonne Acquity UPLC BEH C18 percolée par MeCN/BuOH à 25°C s'est avéré très bien adapté. L'optimisation de quelques paramètres nous a permis de proposer le système Acquity UPLC BEH C18 percolé par MeCN/BuOH 74/26 (v/v) à 25°C à un débit de 0.6 ml/min pour obtenir l'analyse de cette huile en 5 min. Ces conditions d'analyse rapide respectent les consignes qualitatives imposées par l'organisme «Conseil Oléique International (COI)» qui fait référence dans ce cas. Les études quantitatives complémentaires pour valider nos conditions sont en cours de développement et n'ont pas pu être présentées dans ce travail. Son objectif final étant de proposer notre méthode rapide comme alternative à la méthode officielle actuellement utilisée.

## Annexe 1

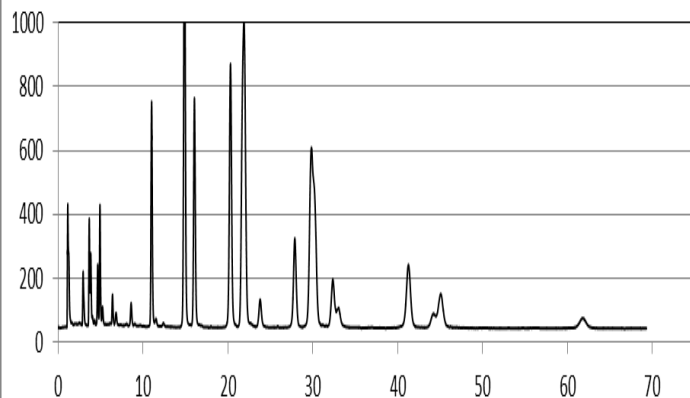
Les chromatogrammes obtenus aux différentes compositions isoéluantes sont présentés ci-dessous.

Phase mobile	Composition (%V/%V)	Température (°C)
MeCN/AcMe	50/50	25
MeCN/iPrOH	66/34	25
MeCN/AcOEt	66/34	25
MeCN/BuOH	74/26	25
MeCN/AcMe	69/31	43
MeCN/iPrOH	77/23	43
MeCN/AcOEt	79/21	43
MeCN/BuOH	83/17	43
MeCN/AcMe	92/08	63
MeCN/iPrOH	94/06	63
MeCN/AcOEt	95/05	63
MeCN/BuOH	96/04	63

Liste des huiles analysées.

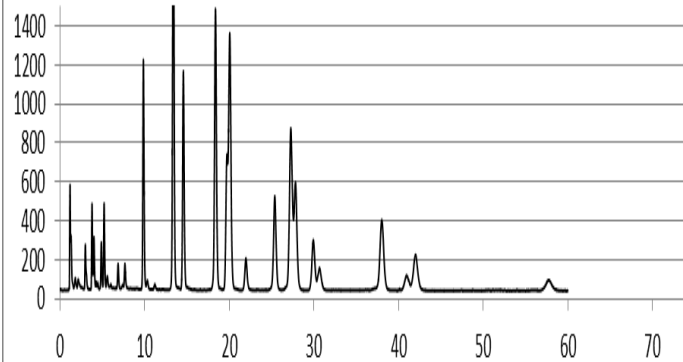
Huile	d (mL/min)
Calophyllum	0.25
Soja	0.25
Pistacia Lentiscus	0.25
Olive	0.25
Babassu	0.15
Bois de Chine	0.15
Pépins de Cassis	0.15
Pinus Koraiensis	0.15
Grenade	0.15

**Calophyllum\_MeCN/AcMe 50/50\_25°C**



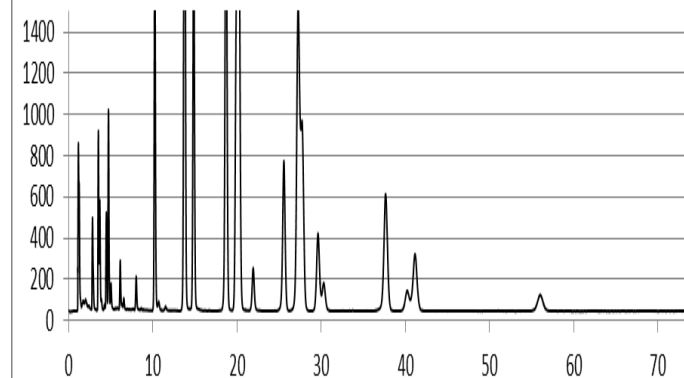
**Chromatogramme 1** : Huile de calophyllum,  
MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Calophyllum\_MeCN/iPrOH 66/34\_25°C**



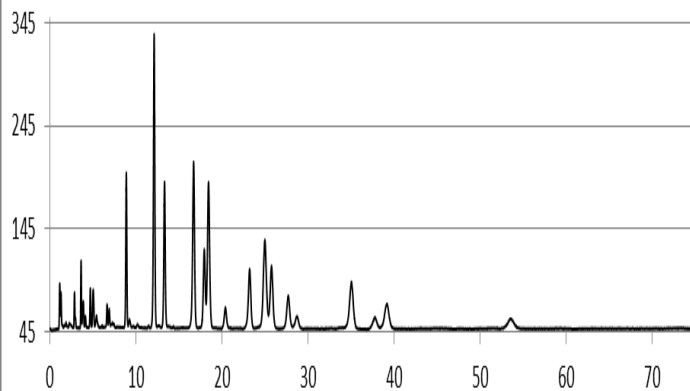
**Chromatogramme 2** : Huile de calophyllum,  
MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

**Calophyllum\_MeCN/AcOEt 66/34\_25°C**



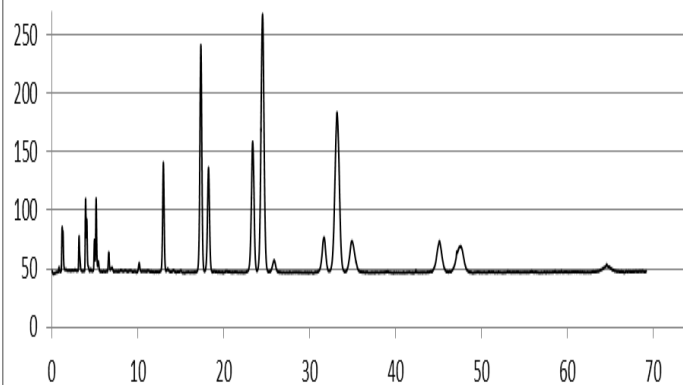
**Chromatogramme 3** : Huile de calophyllum,  
MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Calophyllum\_MeCN/BuOH 74/26\_25°C**



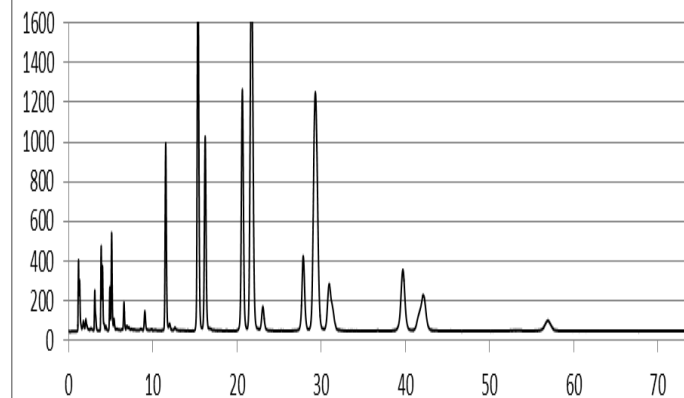
**Chromatogramme 4** : Huile de calophyllum,  
MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Calophyllum\_MeCN/AcMe 69/31\_43°C**



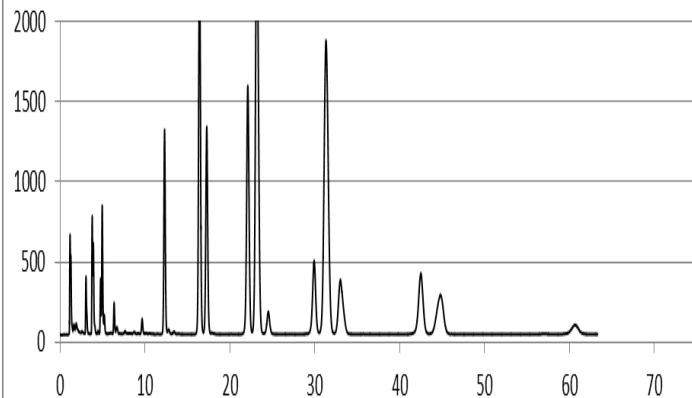
**Chromatogramme 5** : Huile de calophyllum,  
MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Calophyllum\_MeCN/iPrOH 77/23\_43°C**



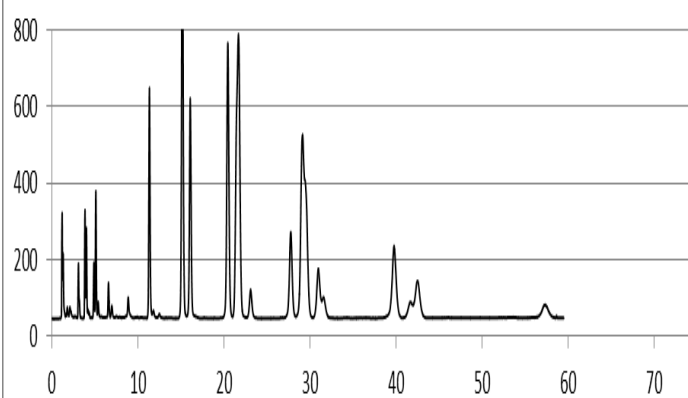
**Chromatogramme 6** : Huile de calophyllum,  
MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

Calophyllum\_MeCN/AcOEt 79/21\_43°C



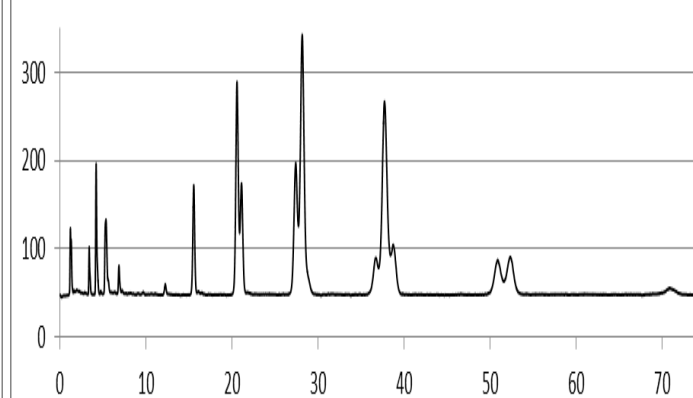
**Chromatogramme 7** : Huile de calophyllum,  
MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

Calophyllum\_MeCN/BuOH 83/17\_43°C



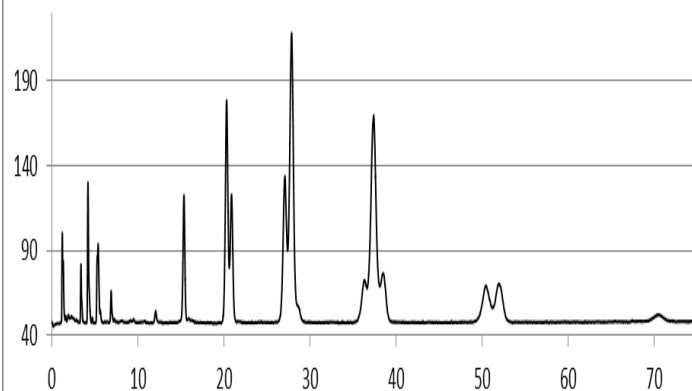
**Chromatogramme 8** : Huile de calophyllum,  
MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

Calophyllum\_MeCN/AcMe 92/08\_63°C



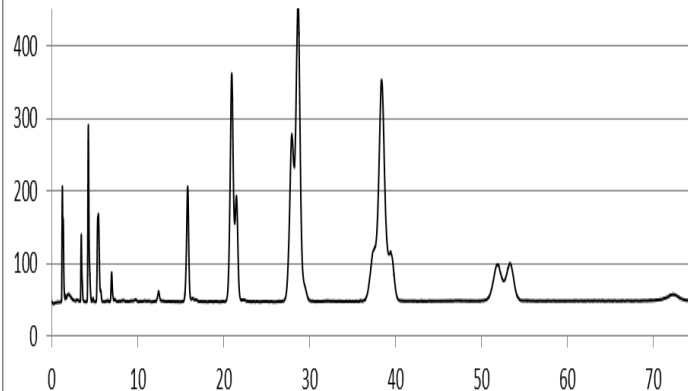
**Chromatogramme 9** : Huile de calophyllum,  
MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

Calophyllum\_MeCN/iPrOH 94/06\_63°C



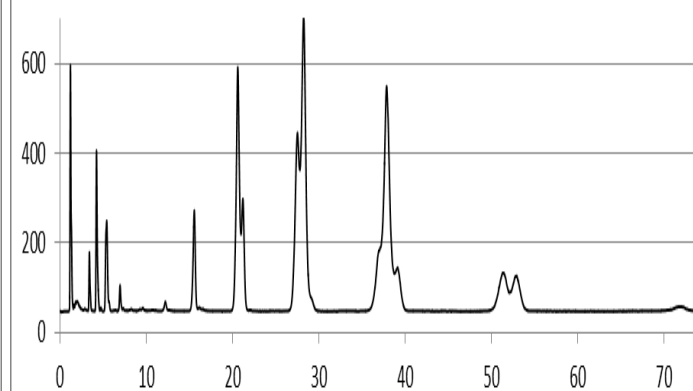
**Chromatogramme 10** : Huile de calophyllum,  
MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

Calophyllum\_MeCN/AcOEt 95/05\_63°C



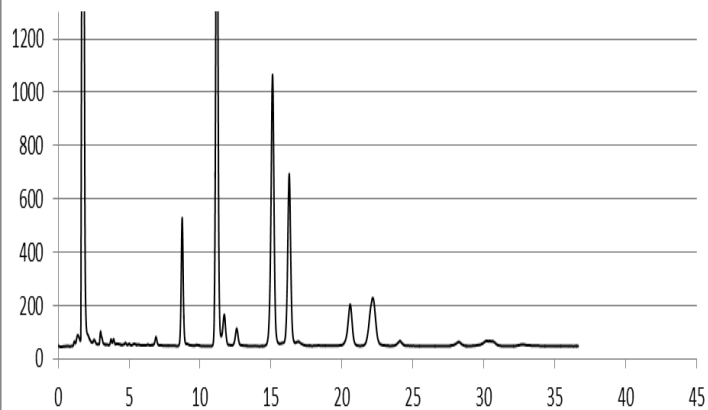
**Chromatogramme 11** : Huile de calophyllum,  
MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

Calophyllum\_MeCN/BuOH 96/04\_63°C



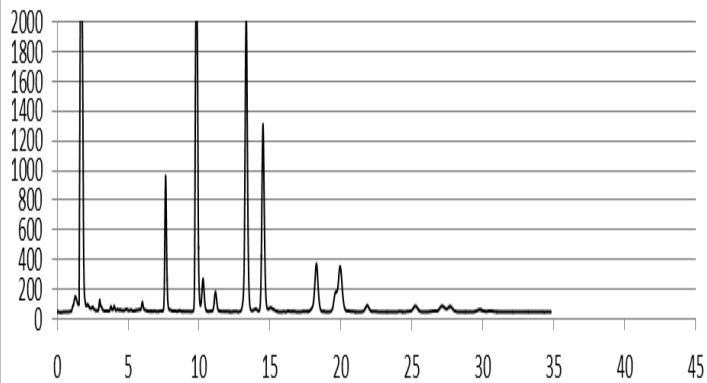
**Chromatogramme 12** : Huile de calophyllum,  
MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

Soja\_MeCN/AcMe 50/50\_25°C



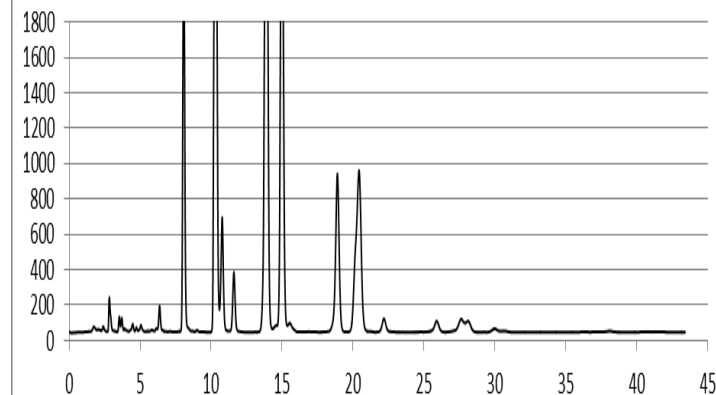
**Chromatogramme 13** : Huile de soja, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

Soja\_MeCN/iPrOH 66/34\_25°C



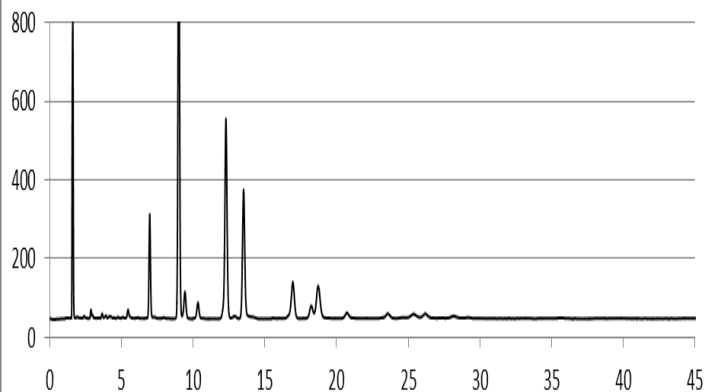
**Chromatogramme 14** : Huile de soja, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

Soja\_MeCN/AcOEt 66/34\_25°C



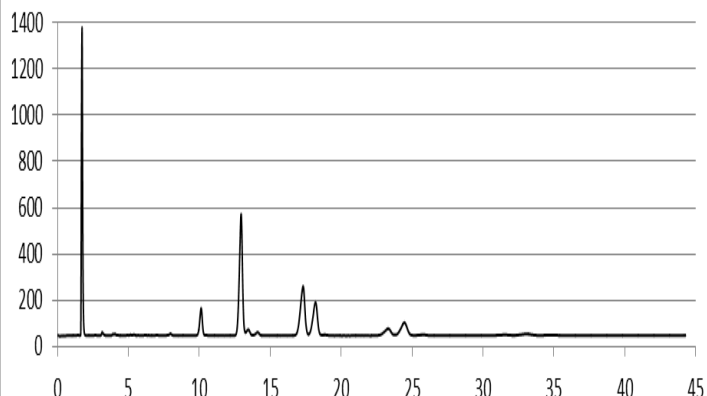
**Chromatogramme 15** : Huile de soja, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

Soja\_MeCN/BuOH 74/26\_25°C



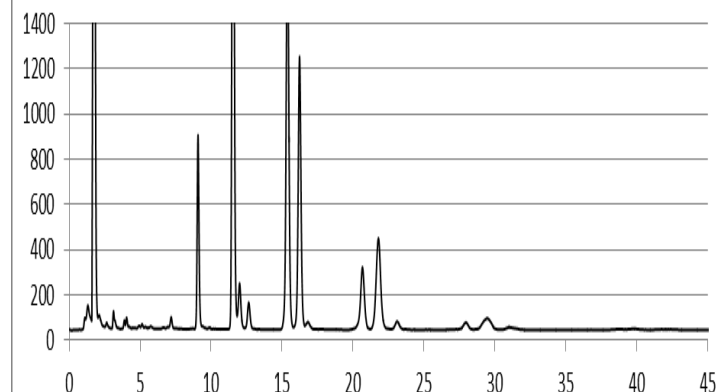
**Chromatogramme 16** : Huile de soja, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

Soja\_MeCN/AcMe 69/31\_43°C



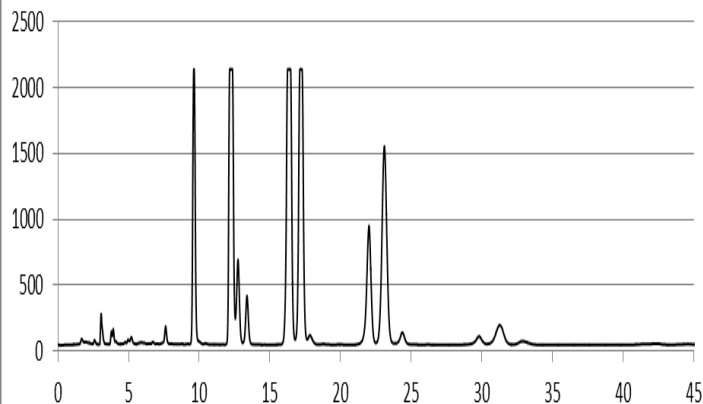
**Chromatogramme 17** : Huile de soja, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

Soja\_MeCN/iPrOH 77/23\_43°C



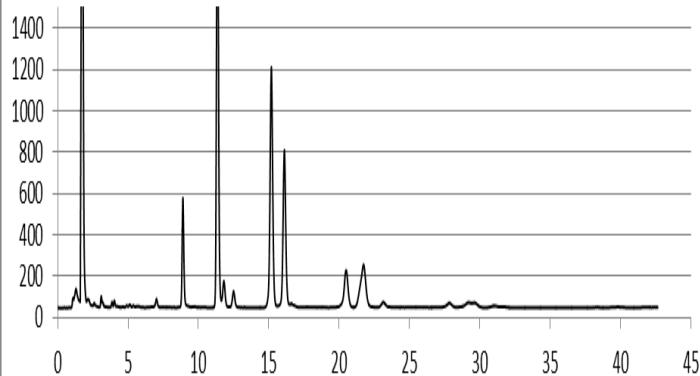
**Chromatogramme 18** : Huile de soja, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

Soja\_MeCN/ AcOEt 79/21\_43°C



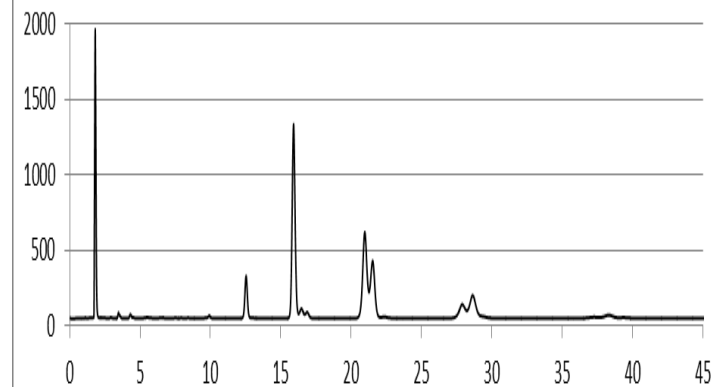
**Chromatogramme 19** : Huile de soja,  
MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

Soja\_MeCN/BuOH 83/17\_43°C



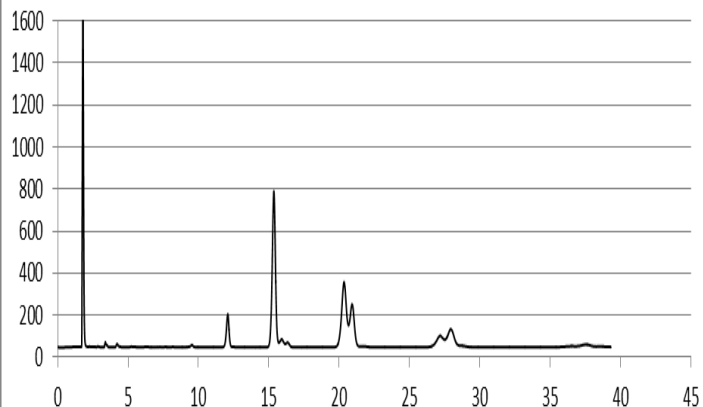
**Chromatogramme 20** : Huile de soja,  
MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

Soja\_MeCN/AcMe 92/08\_63°C



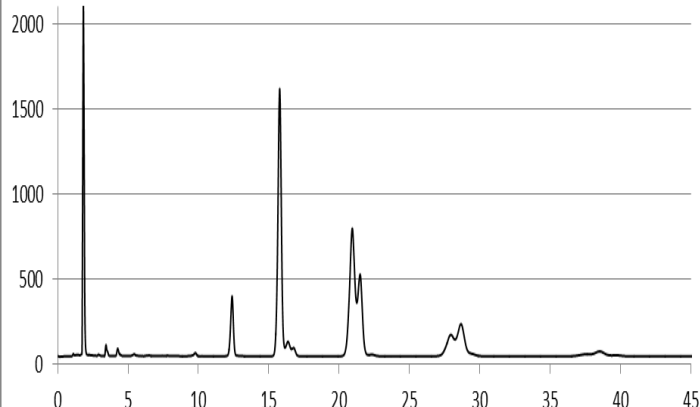
**Chromatogramme 21** : Huile de soja,  
MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

Soja\_MeCN/iPrOH 94/06\_63°C



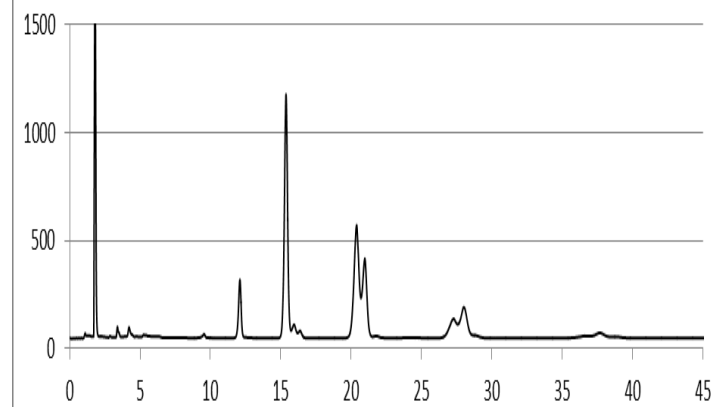
**Chromatogramme 22** : Huile de soja,  
MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

Soja\_MeCN/AcOEt 95/05\_63°C



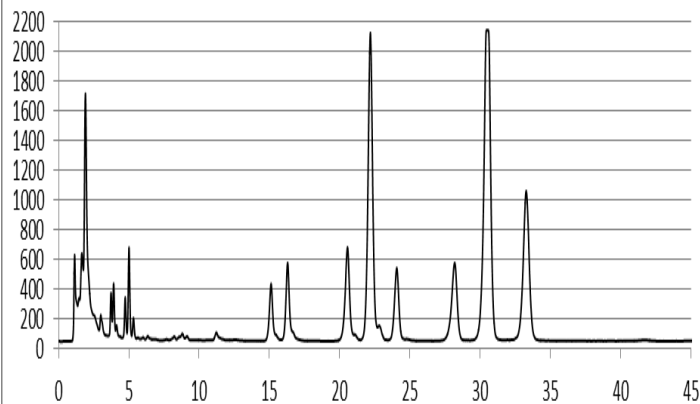
**Chromatogramme 23** : Huile de soja,  
MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

Soja\_MeCN/BuOH 96/04\_63°C



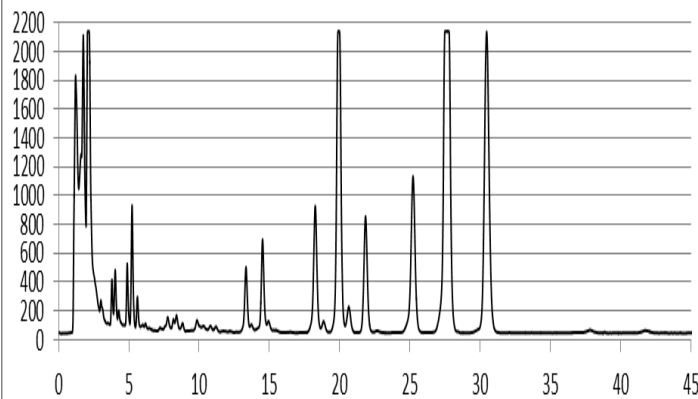
**Chromatogramme 24** : Huile de soja,  
MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

**Pistacia Lentiscus\_MeCN/AcMe 50/50\_25°C**



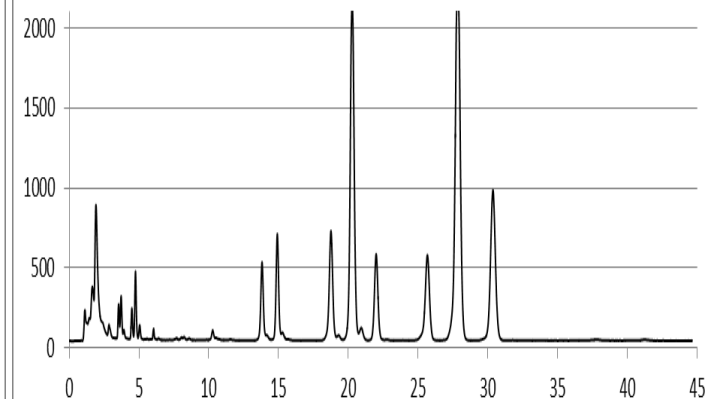
**Chromatogramme 25** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

**Pistacia Lentiscus\_MeCN/iPrOH 66/34\_25°C**



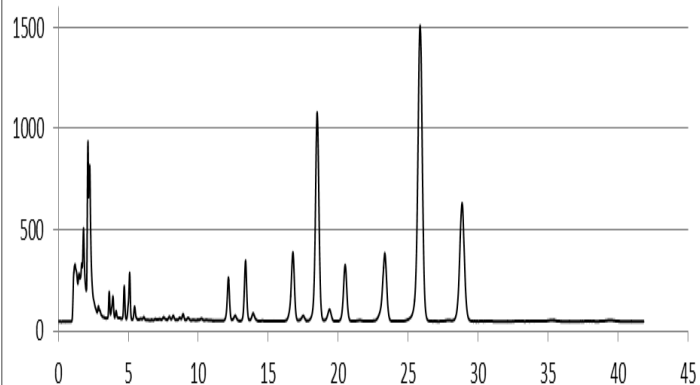
**Chromatogramme 26** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

**Pistacia Lentiscus\_MeCN/AcOEt 66/34\_25°C**



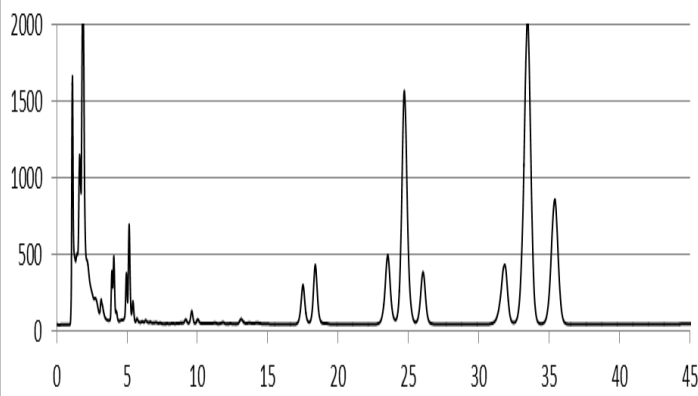
**Chromatogramme 27** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

**Pistacia Lentiscus\_MeCN/BuOH 74/26\_25°C**



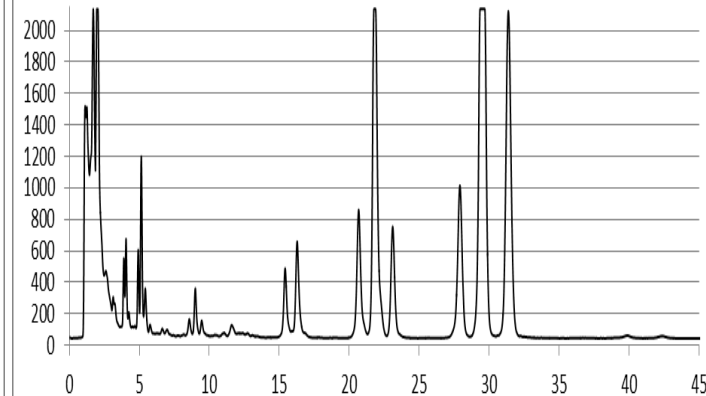
**Chromatogramme 28** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

**Pistacia Lentiscus\_MeCN/AcMe 69/31\_43°C**



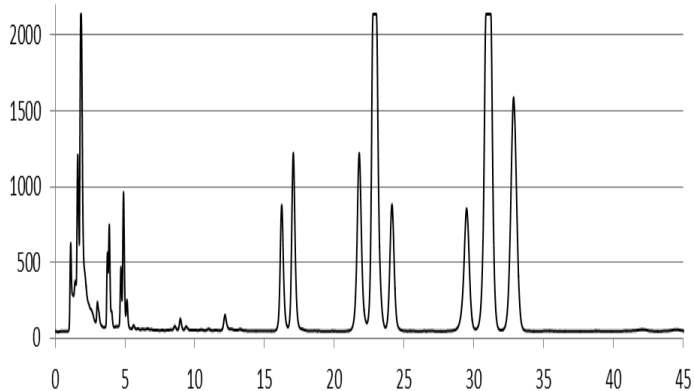
**Chromatogramme 29** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

**Pistacia Lentiscus\_MeCN/iPrOH 77/23\_43°C**



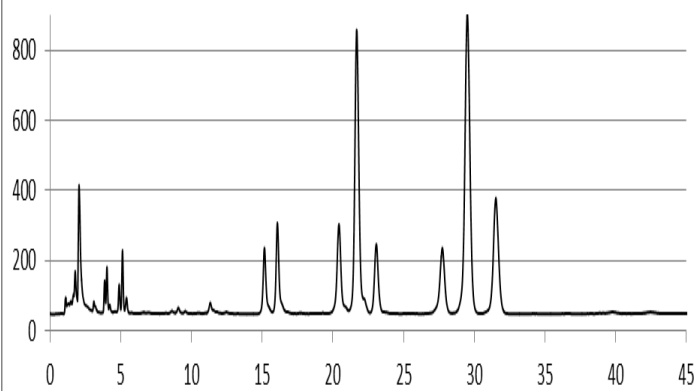
**Chromatogramme 30** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

Pistacia Lentiscus\_MeCN/AcOEt 79/21\_43°C



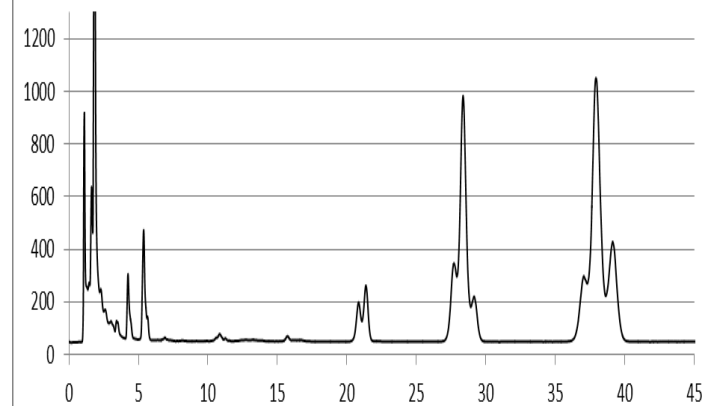
**Chromatogramme 31** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

Pistacia Lentiscus\_MeCN/BuOH 83/17\_43°C



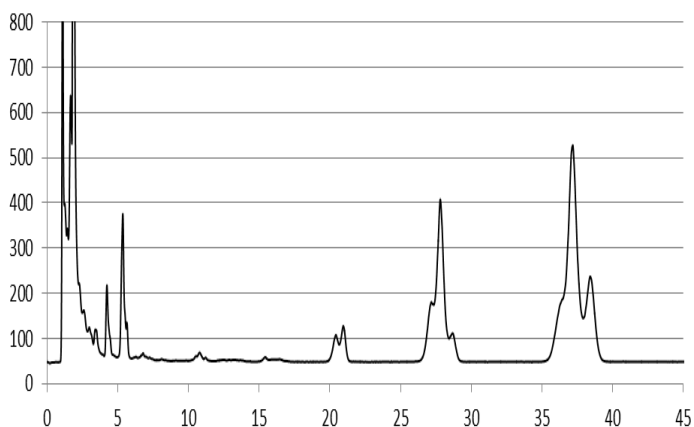
**Chromatogramme 32** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

Pistacia Lentiscus\_MeCN/AcMe 92/08\_63°C



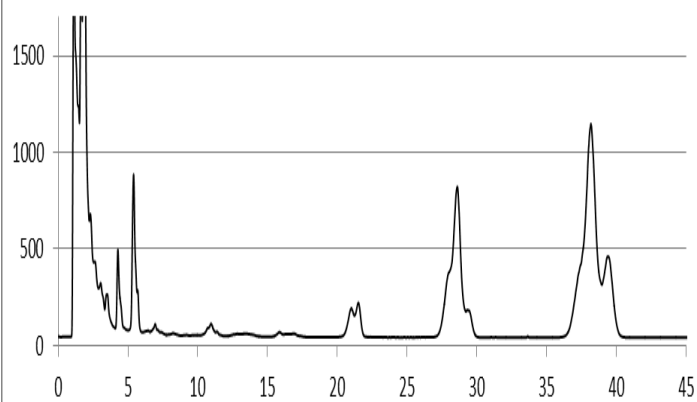
**Chromatogramme 33** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

Pistacia Lentiscus\_MeCN/iPrOH 94/06\_63°C



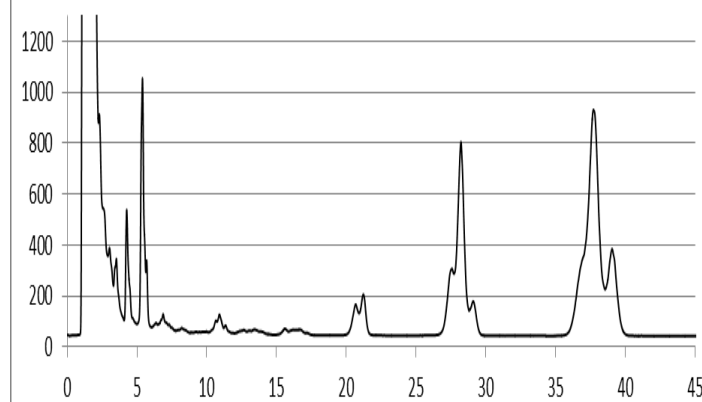
**Chromatogramme 34** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

Pistacia Lentiscus\_MeCN/AcOEt 95/05\_63°C



**Chromatogramme 35** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

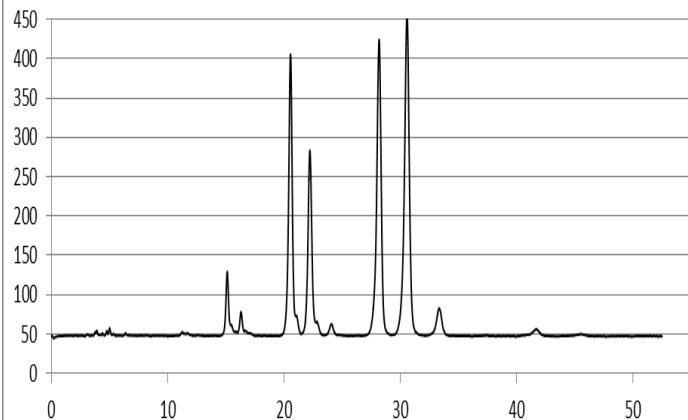
Pistacia Lentiscus\_MeCN/BuOH 96/04\_63°C



**Chromatogramme 36** : Huile de pistacia lentiscus, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

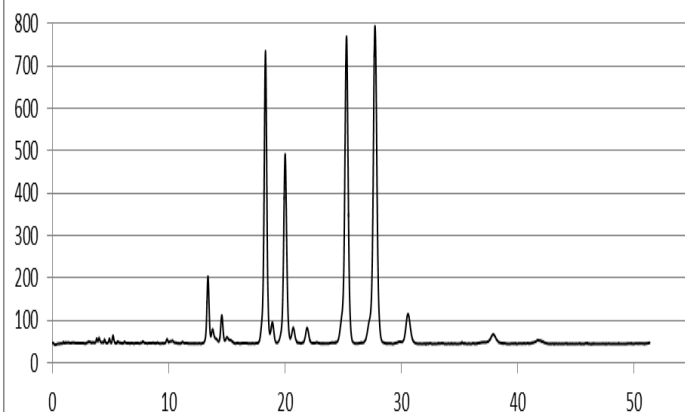


Olive\_MeCN/AcMe 50/50\_25°C



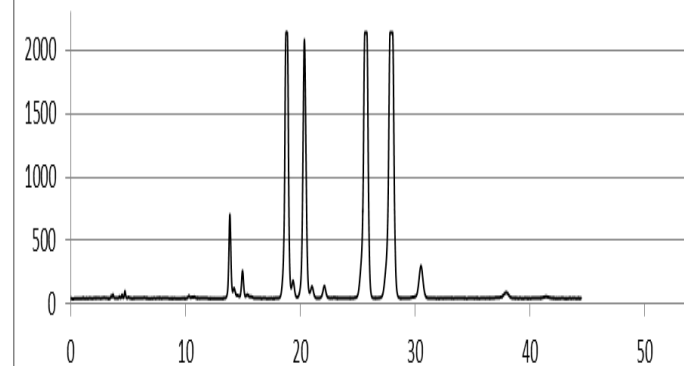
**Chromatogramme 37** : Huile d'olive,  
MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

Olive\_MeCN/iPrOH 66/34\_25°C



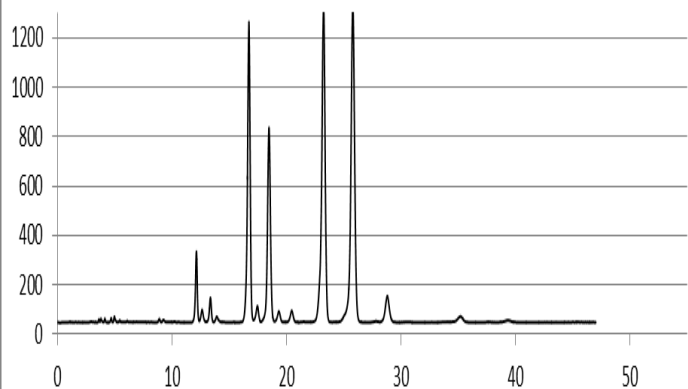
**Chromatogramme 38** : Huile d'olive,  
MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

Olive\_MeCN/AcOEt 66/34\_25°C



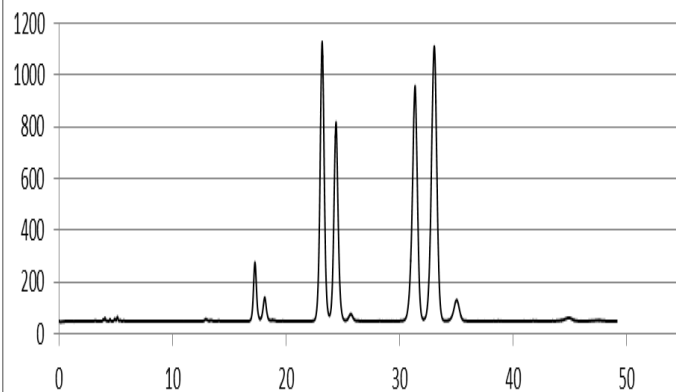
**Chromatogramme 39** : Huile d'olive,  
MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

Olive\_MeCN/BuOH 74/26\_25°C



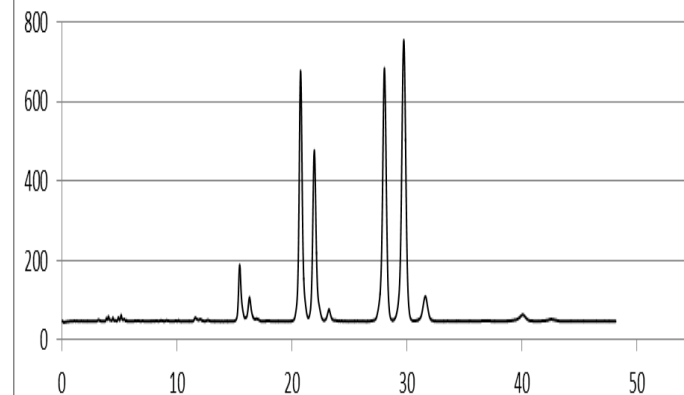
**Chromatogramme 40** : Huile d'olive,  
MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

Olive\_MeCN/AcMe 69/31\_43°C



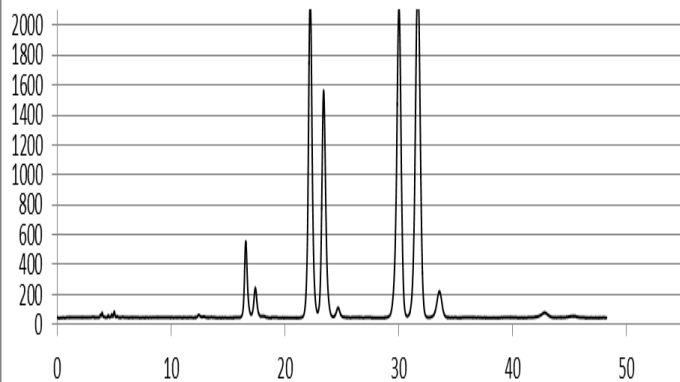
**Chromatogramme 41** : Huile d'olive,  
MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

Olive\_MeCN/iPrOH 77/23\_43°C



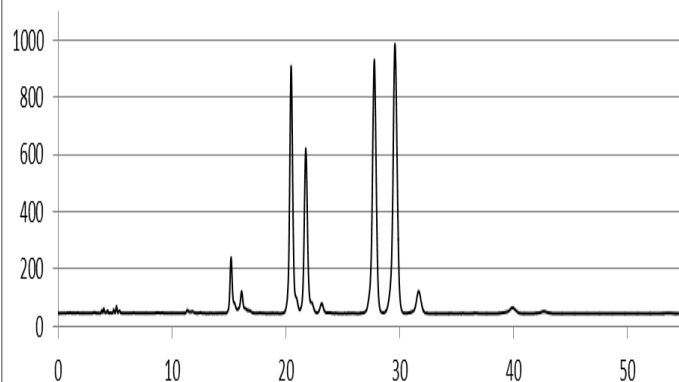
**Chromatogramme 42** : Huile d'olive,  
MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

Olive\_MeCN/AcOEt 79/21\_43°C



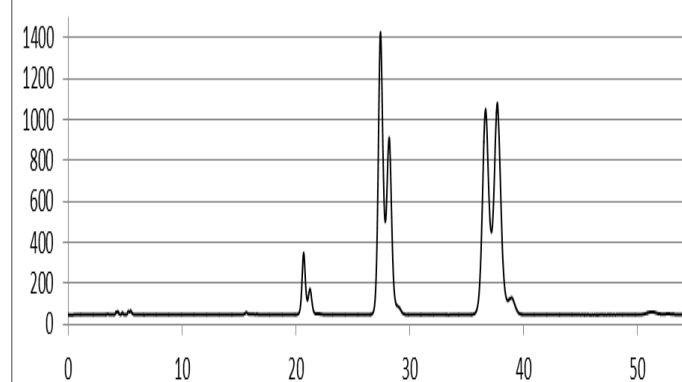
**Chromatogramme 43** : Huile d'olive,  
MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

Olive\_MeCN/BuOH 83/17\_43°C



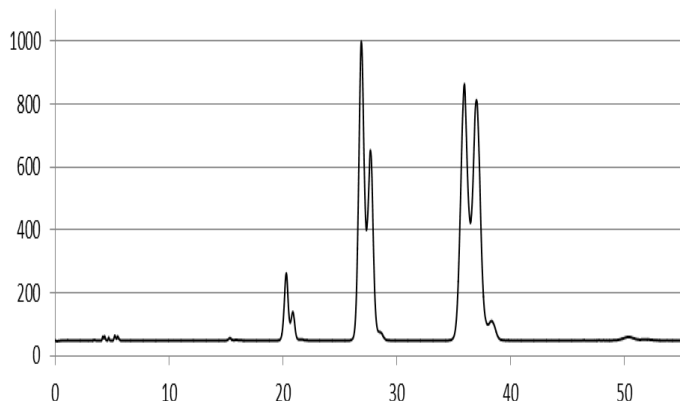
**Chromatogramme 44** : Huile d'olive,  
MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

Olive\_MeCN/AcMe 92/08\_63°C



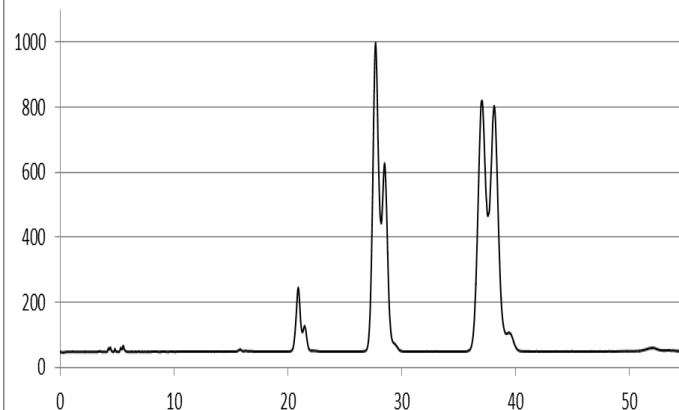
**Chromatogramme 45** : Huile d'olive,  
MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

Olive\_MeCN/iPrOH 94/06\_63°C



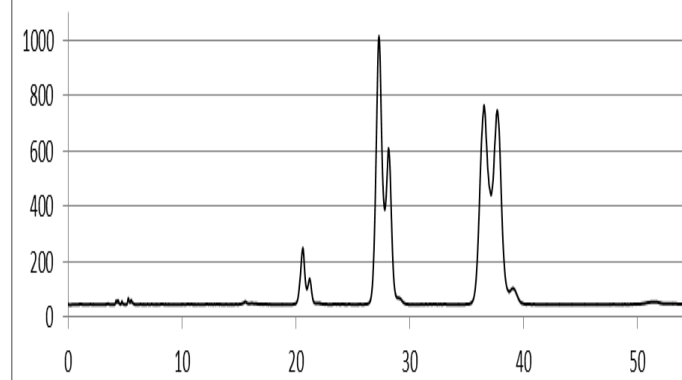
**Chromatogramme 46** : Huile d'olive,  
MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

Olive\_MeCN/AcOEt 95/05\_63°C



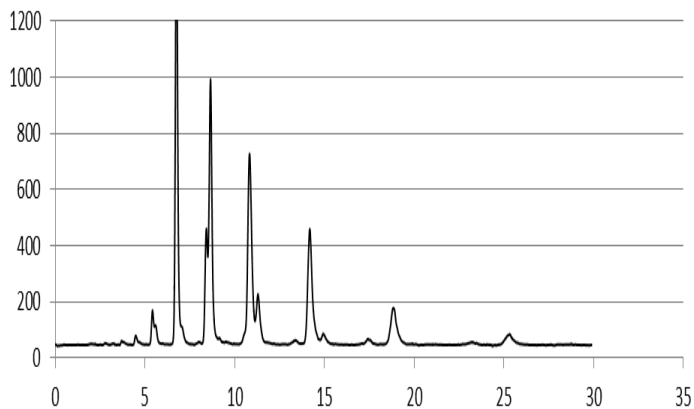
**Chromatogramme 47** : Huile d'olive,  
MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

Olive\_MeCN/BuOH 96/04\_63°C



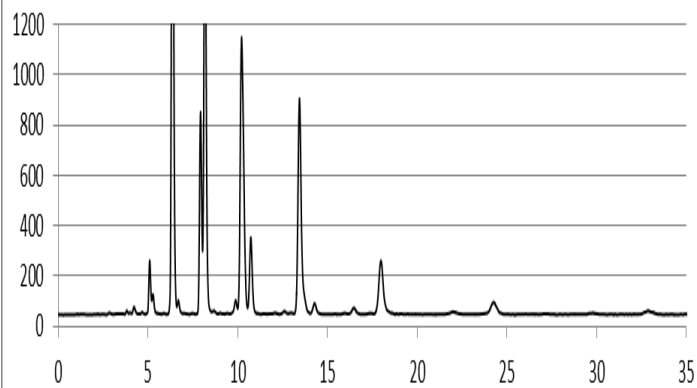
**Chromatogramme 48** : Huile d'olive,  
MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

Babassu\_MeCN/AcMe 50/50\_25°C



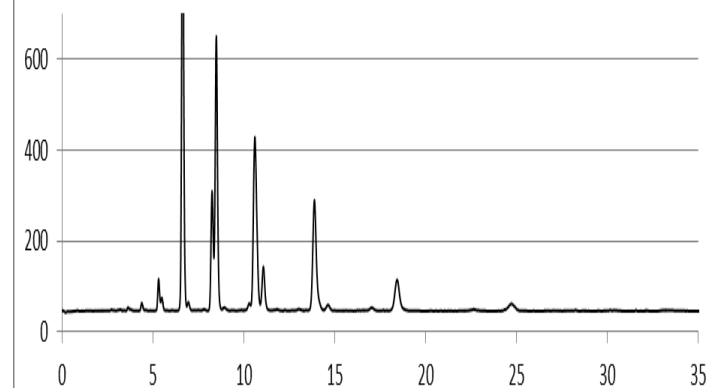
**Chromatogramme 49** : Huile de babassu,  
MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

Babassu\_MeCN/iPrOH 66/34\_25°C



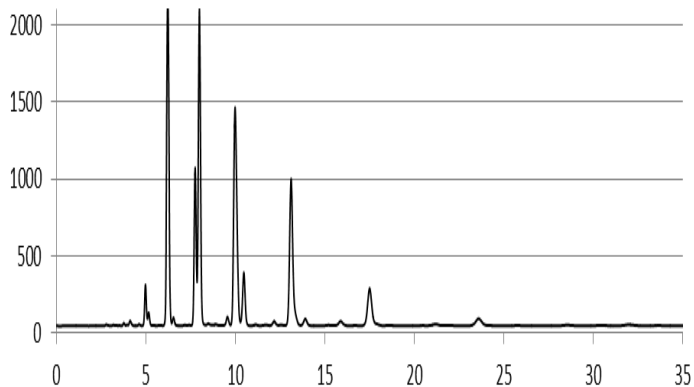
**Chromatogramme 50** : Huile de babassu,  
MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

Babassu\_MeCN/AcOEt 66/34\_25°C



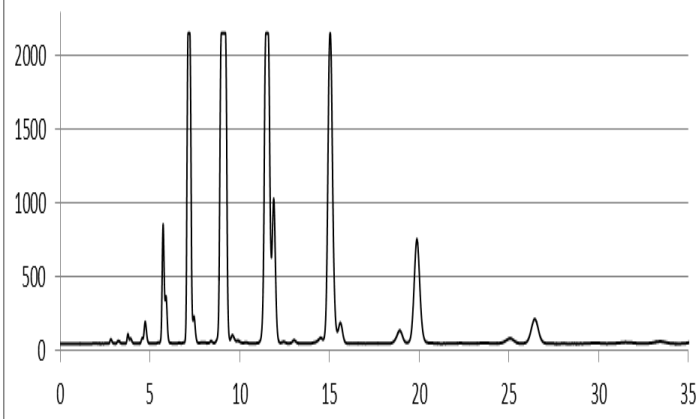
**Chromatogramme 51** : Huile de babassu,  
MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

Babassu\_MeCN/BuOH 74/26\_25°C



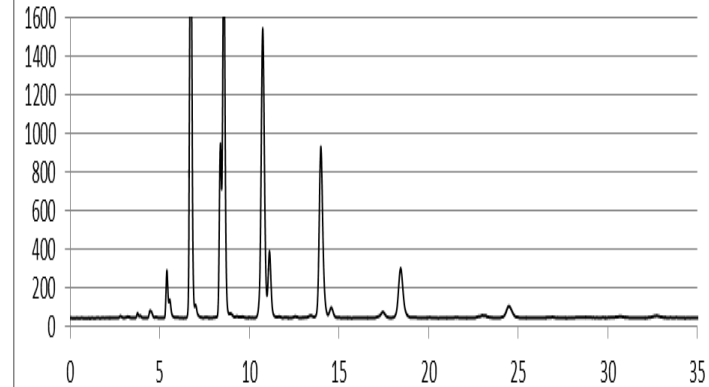
**Chromatogramme 52** : Huile de babassu,  
MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

Babassu\_MeCN/AcMe 69/31\_43°C

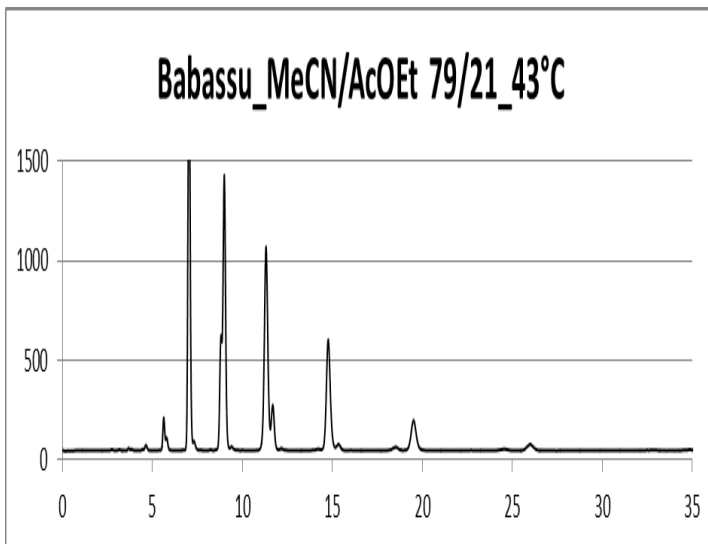


**Chromatogramme 53** : Huile de babassu,  
MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

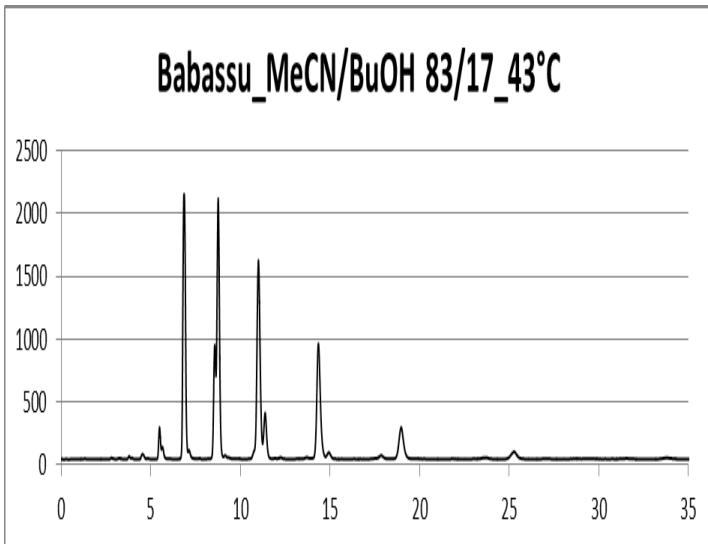
Babassu\_MeCN/iPrOH 77/23\_43°C



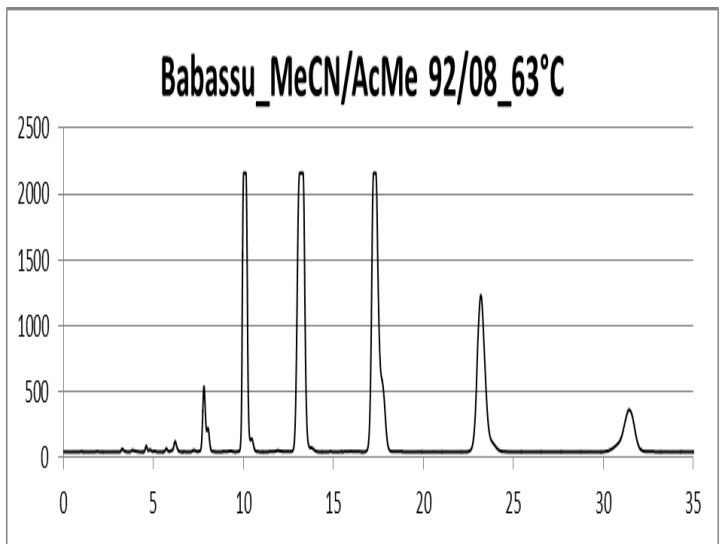
**Chromatogramme 54** : Huile de babassu,  
MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.



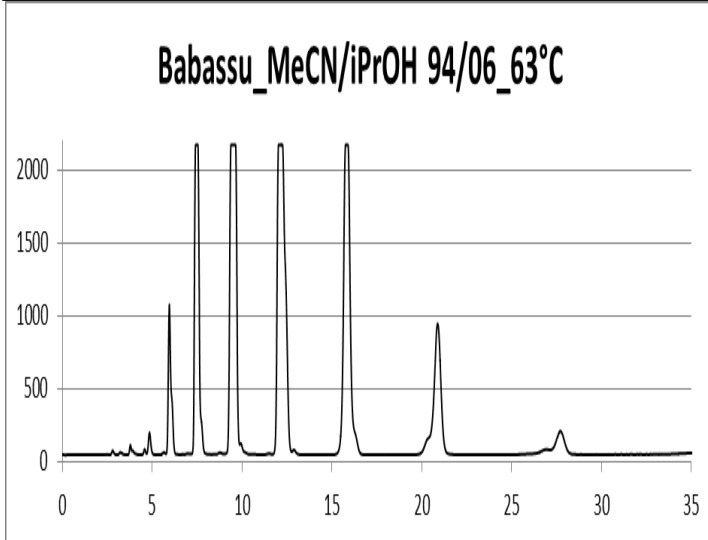
**Chromatogramme 55** : Huile de babassu, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.



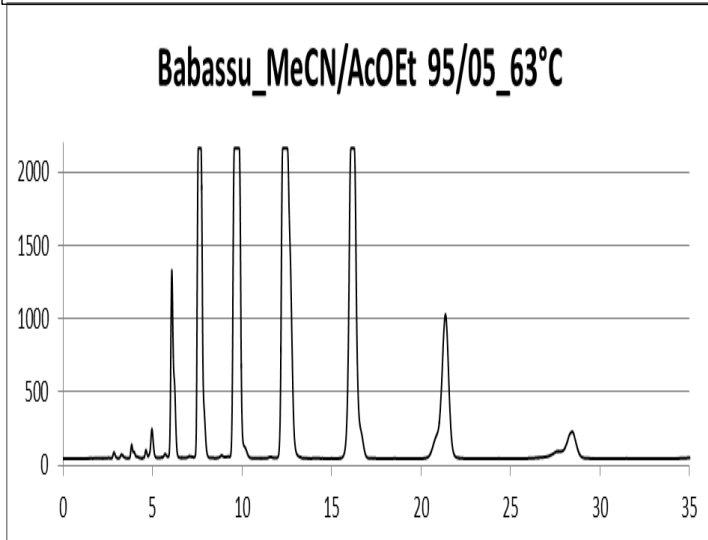
**Chromatogramme 56** : Huile de babassu, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.



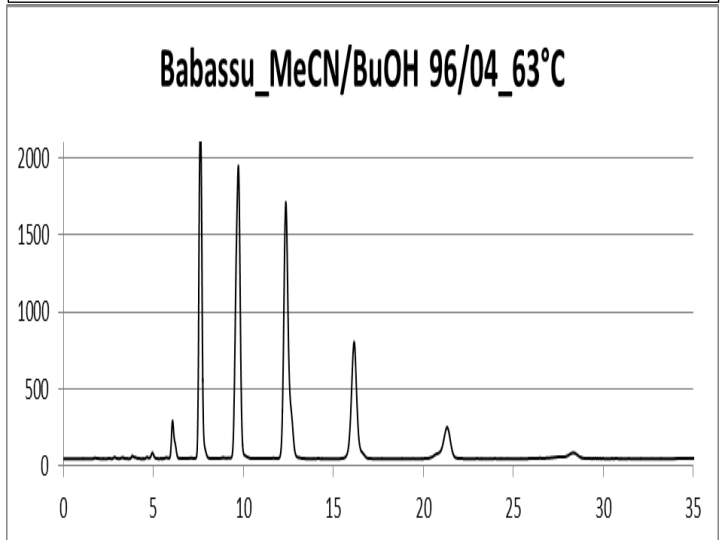
**Chromatogramme 57** : Huile de babassu, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.



**Chromatogramme 58** : Huile de babassu, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

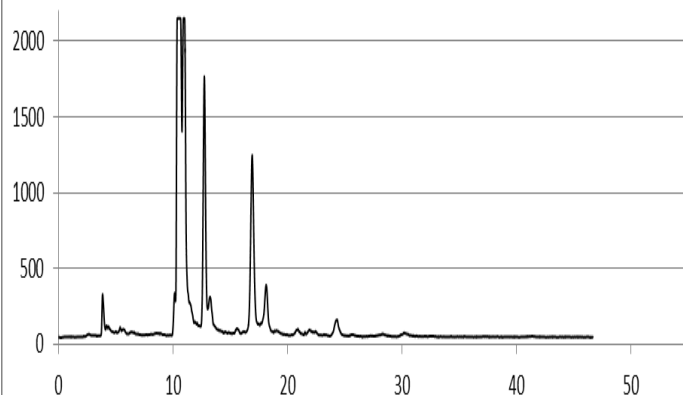


**Chromatogramme 59** : Huile de babassu, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.



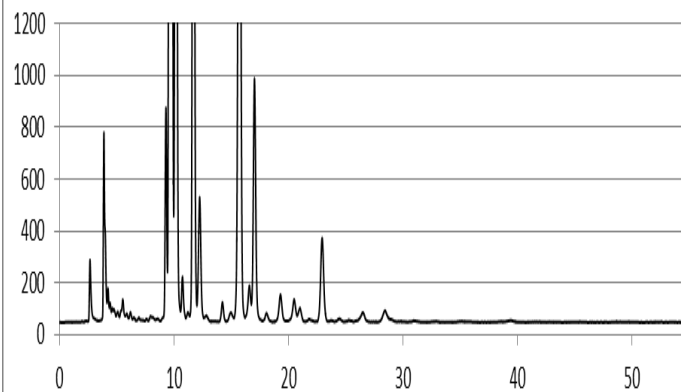
**Chromatogramme 60** : Huile de babassu, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

Bois de Chine\_MeCN/AcMe 50/50\_25°C



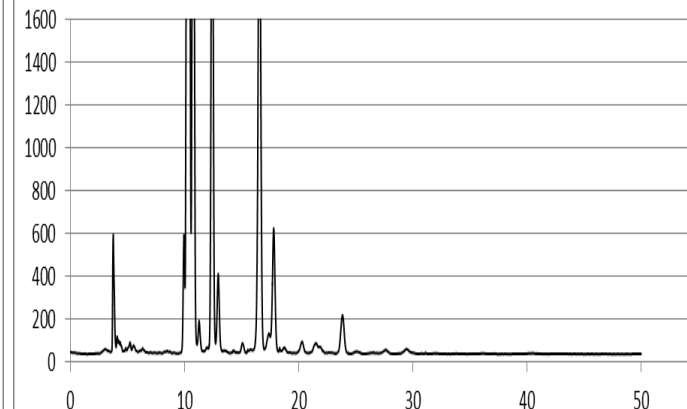
**Chromatogramme 61** : Huile de bois de chine, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

Bois de Chine\_MeCN/iPrOH 66/34\_25°C



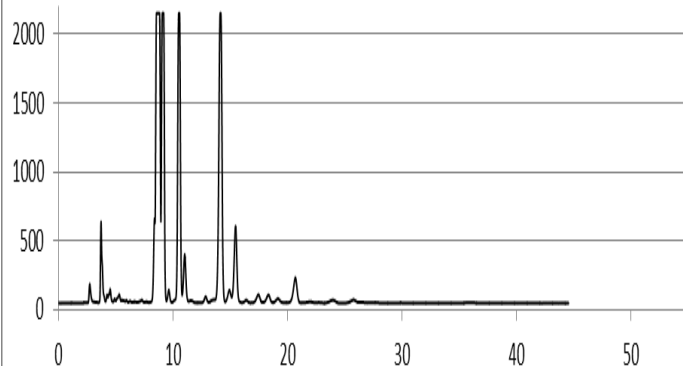
**Chromatogramme 62** : Huile de bois de chine, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

Bois de Chine\_MeCN/AcOEt 66/34\_25°C



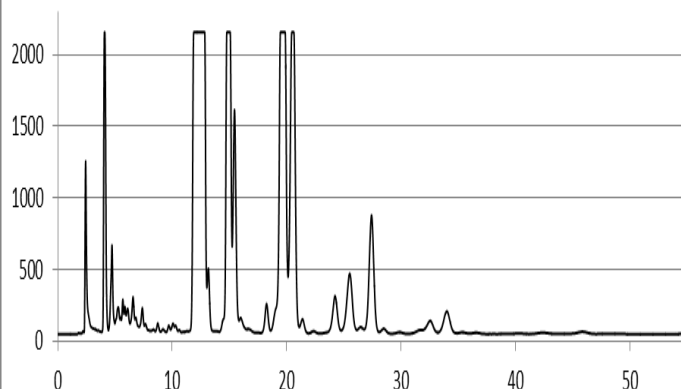
**Chromatogramme 63** : Huile de bois de chine, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

Bois de Chine\_MeCN/BuOH 74/26\_25°C



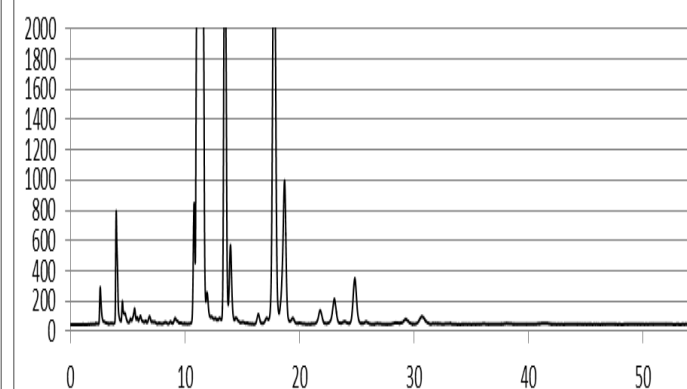
**Chromatogramme 64** : Huile de bois de chine, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

Bois de Chine\_MeCN/AcMe 69/31\_43°C



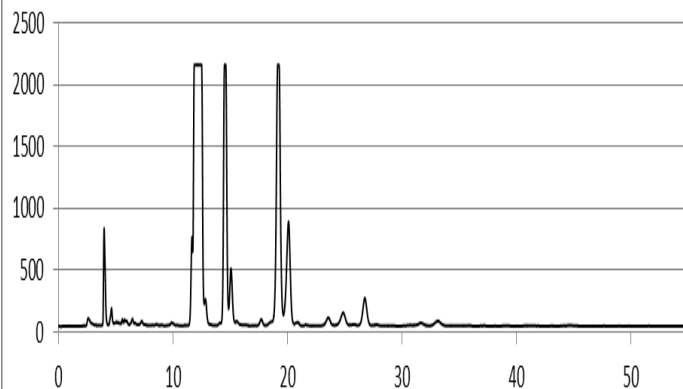
**Chromatogramme 65** : Huile de bois de chine, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

Bois de Chine\_MeCN/iPrOH 77/23\_43°C



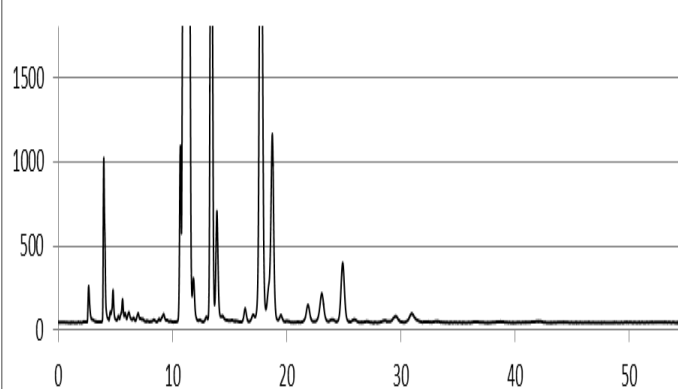
**Chromatogramme 66** : Huile de bois de chine, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

Bois de Chine\_MeCN/AcOEt 79/21\_43°C



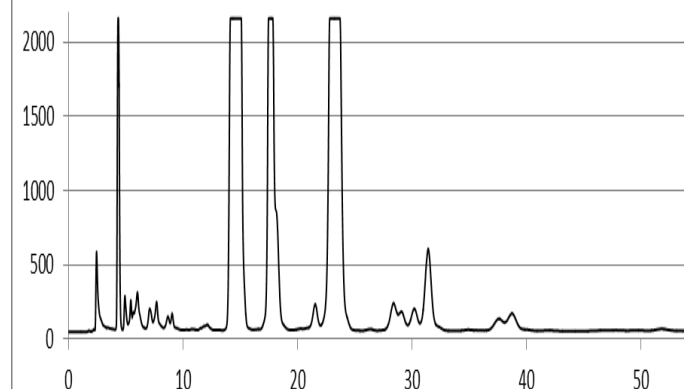
**Chromatogramme 67** : Huile de bois de chine, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

Bois de Chine\_MeCN/BuOH 83/17\_43°C



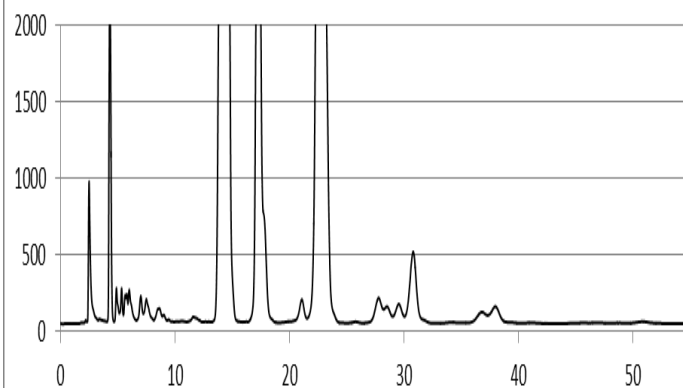
**Chromatogramme 68** : Huile de bois de chine, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

Bois de Chine\_MeCN/AcMe 92/08\_63°C



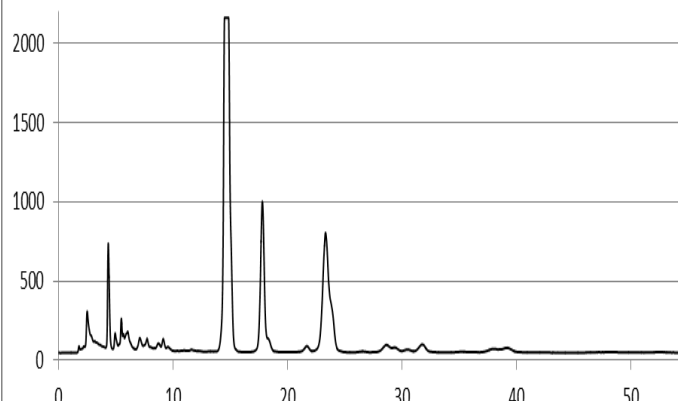
**Chromatogramme 69** : Huile de bois de chine, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

Bois de Chine\_MeCN/iPrOH 94/06\_63°C



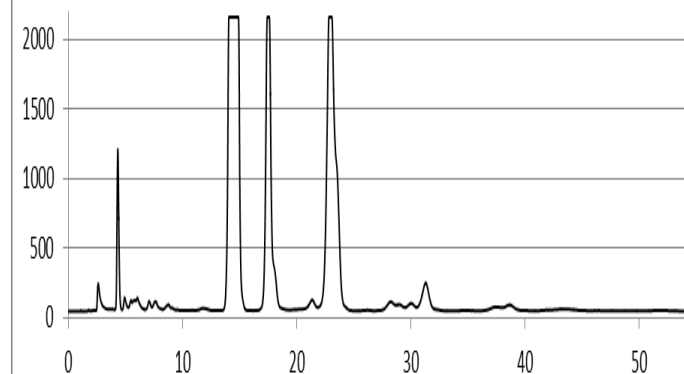
**Chromatogramme 70** : Huile de bois de chine, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

Bois de Chine\_MeCN/AcOEt 95/05\_63°C



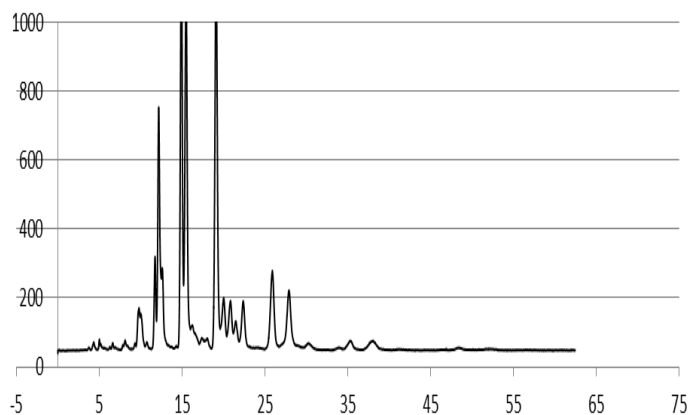
**Chromatogramme 71** : Huile de bois de chine, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

Bois de Chine\_MeCN/BuOH 96/04\_63°C



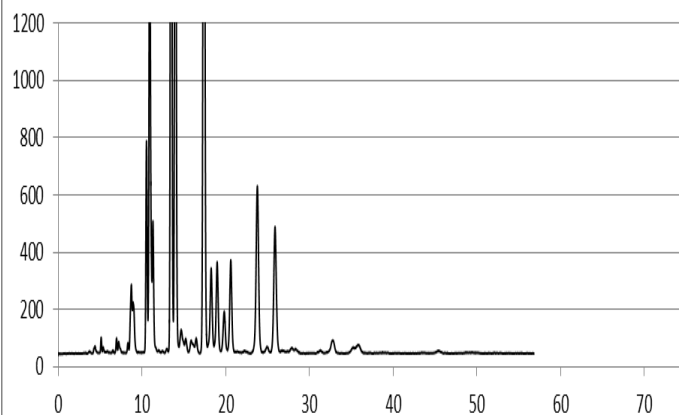
**Chromatogramme 72** : Huile de bois de chine, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

Pépins de Cassis\_MeCNAcMe 50/50\_25°C



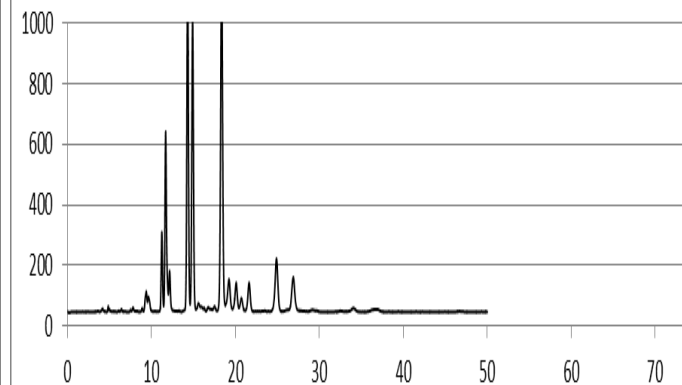
**Chromatogramme 73** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/iPrOH 66/34\_25°C



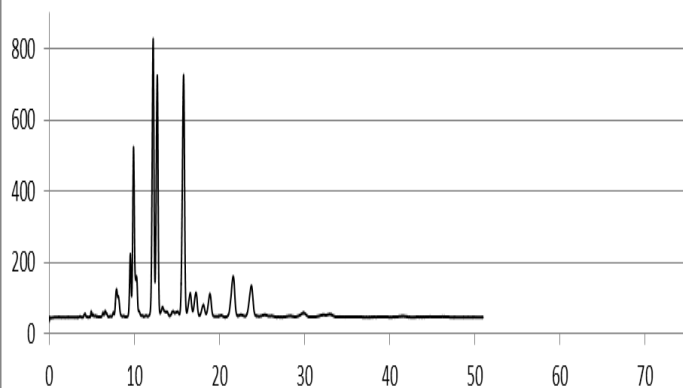
**Chromatogramme 74** : Huile de pépins de cassis, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/AcOEt 66/34\_25°C



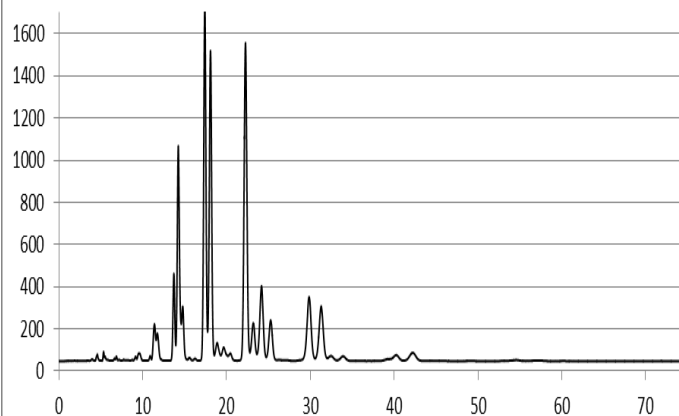
**Chromatogramme 75** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/BuOH 74/26\_25°C



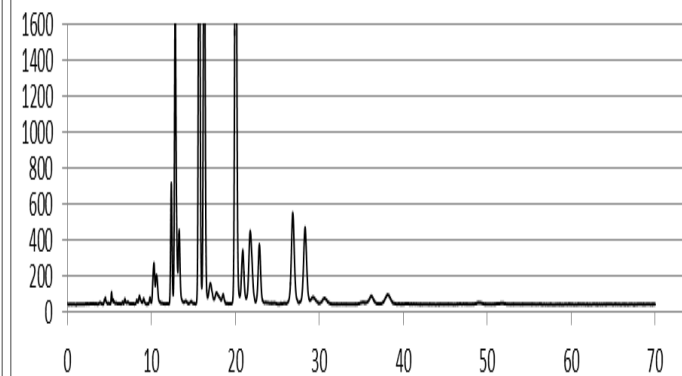
**Chromatogramme 76** : Huile de pépins de cassis, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/AcMe 69/31\_43°C



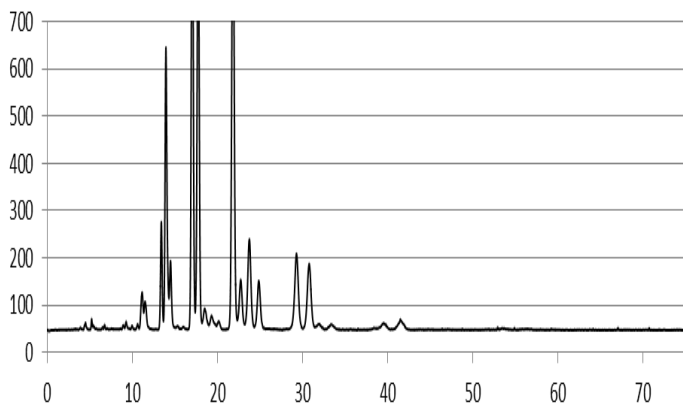
**Chromatogramme 77** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/iPrOH 77/23\_43°C



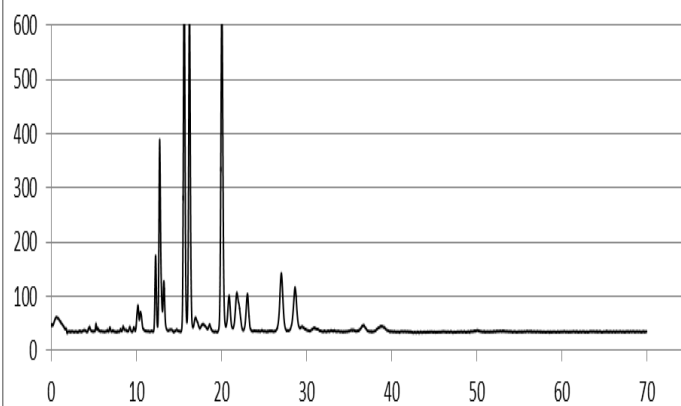
**Chromatogramme 78** : Huile de pépins de cassis, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/AcOEt 79/21\_43°C



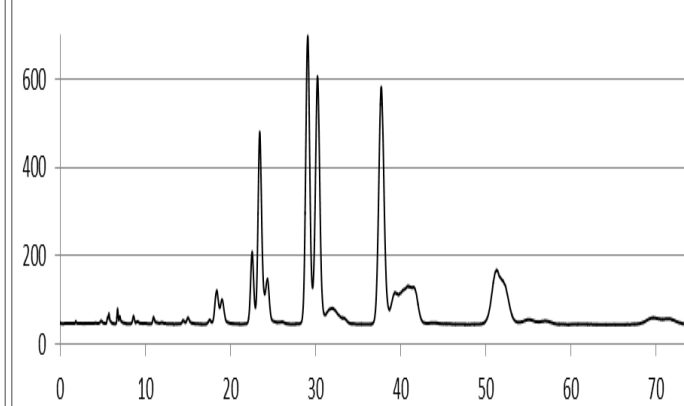
**Chromatogramme 79** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/BuOH 83/17\_43°C



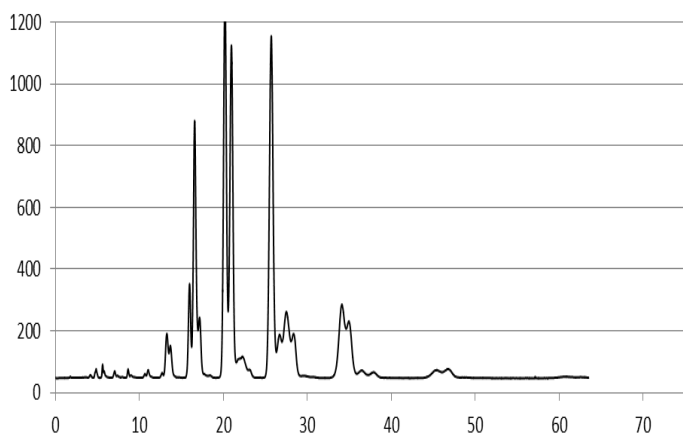
**Chromatogramme 80** : Huile de pépins de cassis, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/AcMe 92/08\_63°C



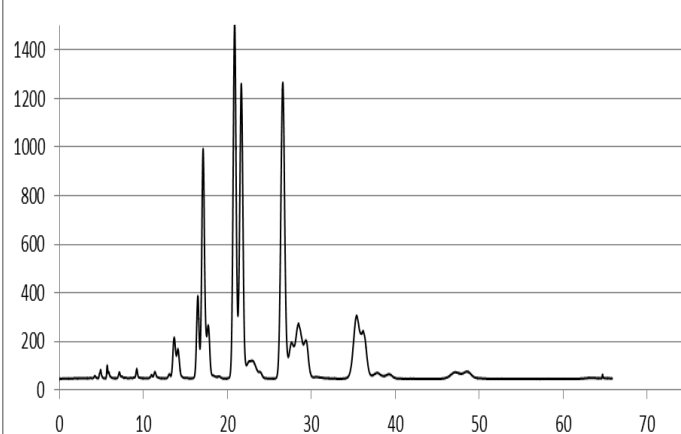
**Chromatogramme 81** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/iPrOH 94/06\_63°C



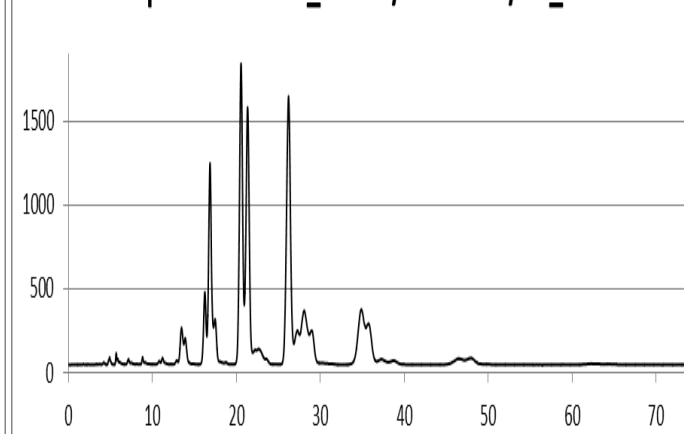
**Chromatogramme 82** : Huile de pépins de cassis, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/AcOEt 95/05\_63°C



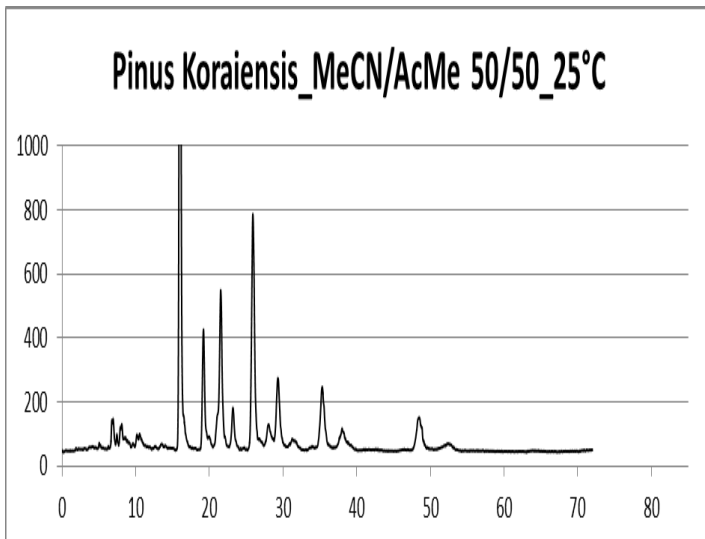
**Chromatogramme 83** : Huile de pépins de cassis, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

Pépins de Cassis\_MeCN/BuOH 96/04\_63°C

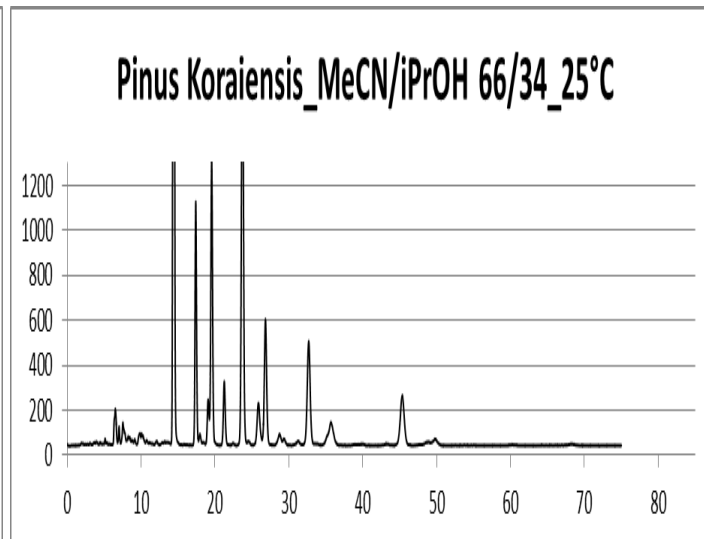


**Chromatogramme 84** : Huile de pépins de cassis, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

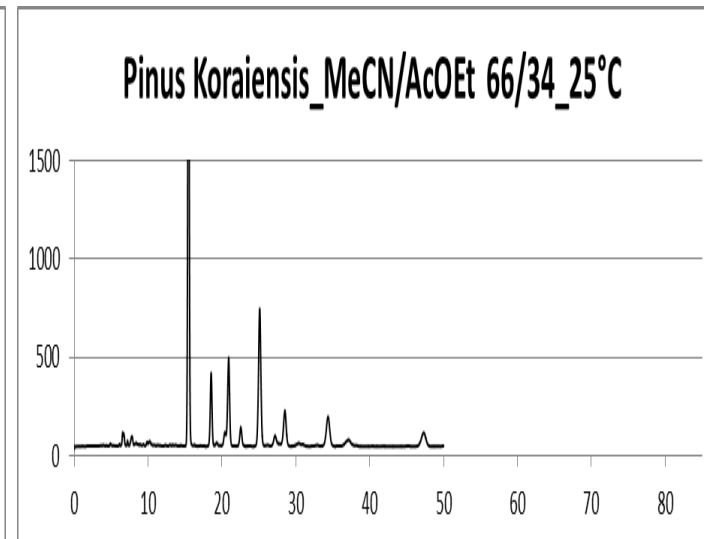




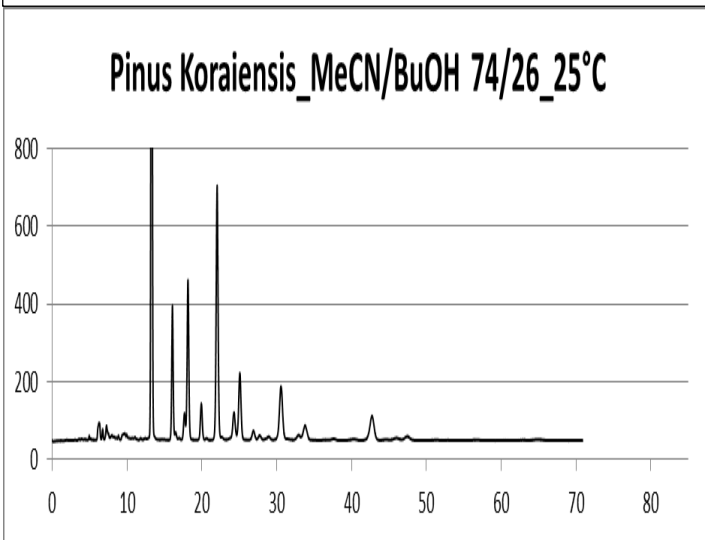
**Chromatogramme 85** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcMe 50/50, 25°C.



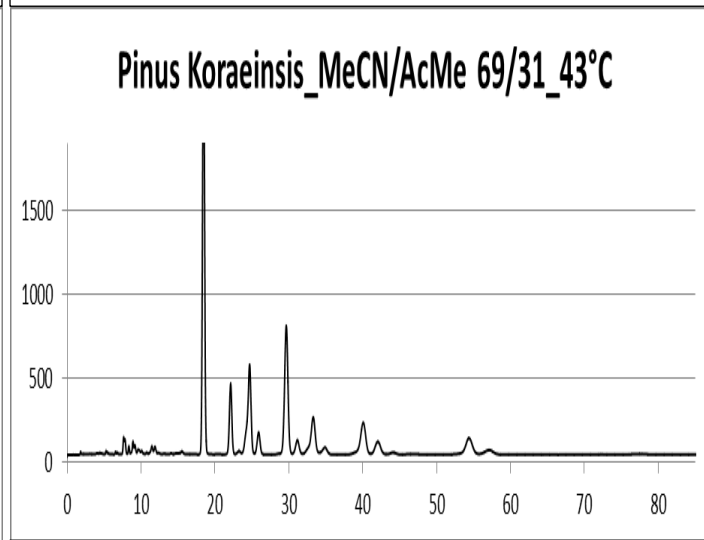
**Chromatogramme 86** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.



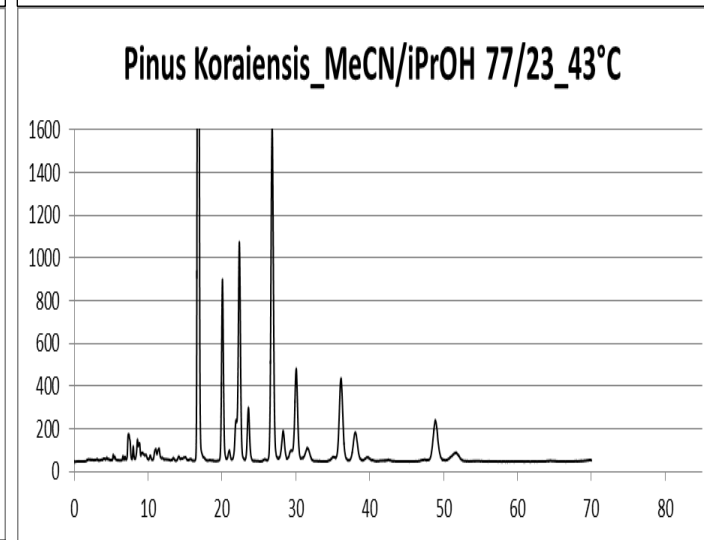
**Chromatogramme 87** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.



**Chromatogramme 88** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

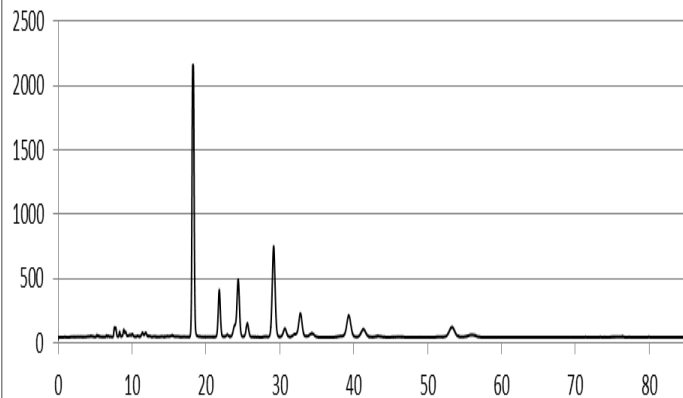


**Chromatogramme 89** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcMe 69/31, 43°C.



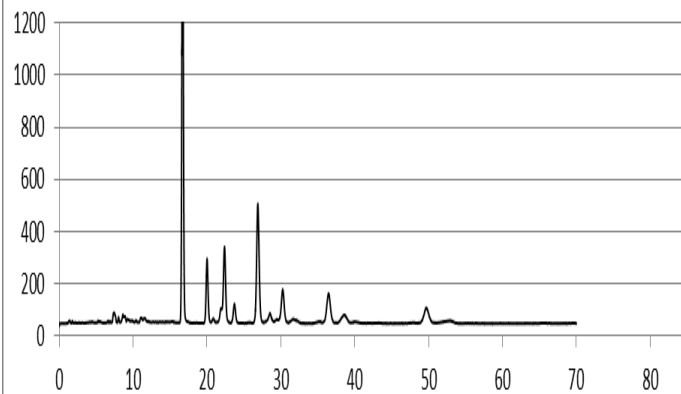
**Chromatogramme 90** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

**Pinus Koraiensis\_MeCN/AcOEt 79/21\_43°C**



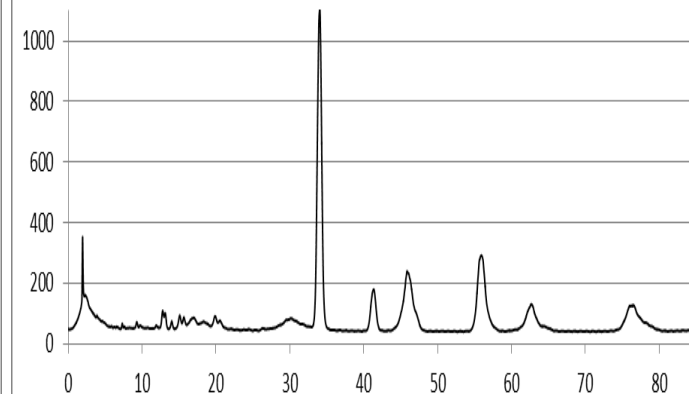
**Chromatogramme 91** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

**Pinus Koraiensis\_MeCN/BuOH 83/17\_43°C**



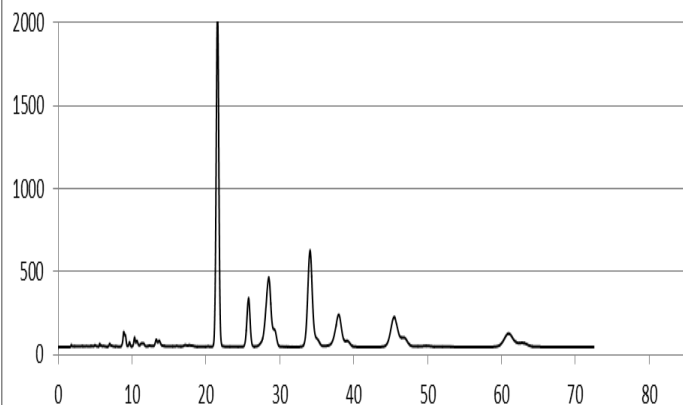
**Chromatogramme 92** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

**Pinus Koraiensis\_MeCN/AcMe 92/08\_63°C**



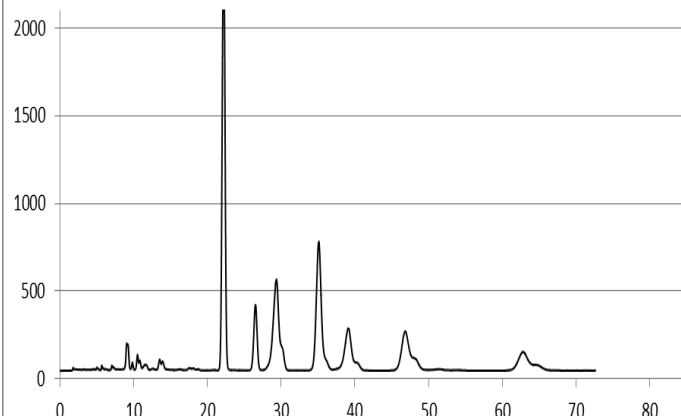
**Chromatogramme 93** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

**Pinus Koraiensis\_MeCN/iPrOH 94/06\_63°C**



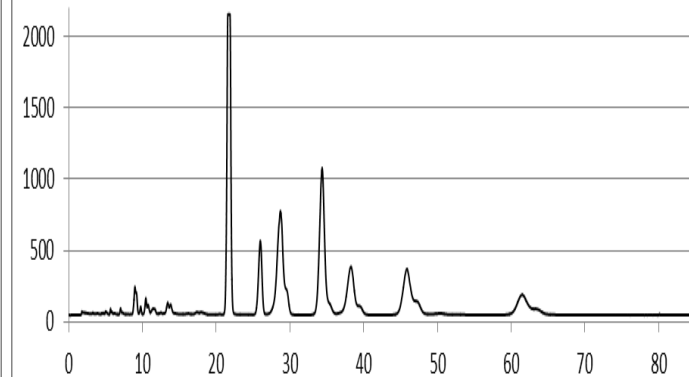
**Chromatogramme 94** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

**Pinus Koraiensis\_MeCN/AcOEt 95/05\_63°C**



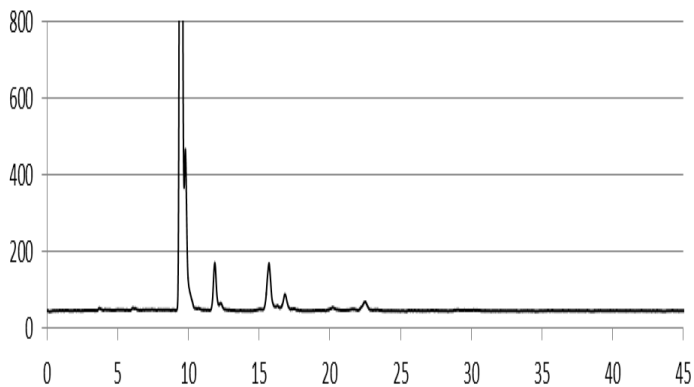
**Chromatogramme 95** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

**Pinus Koraiensis\_MeCN/BuOH 96/04\_63°C**



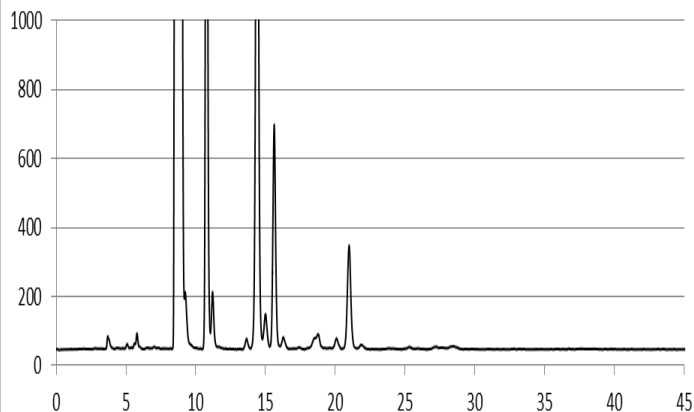
**Chromatogramme 96** : Huile de pinus koraiensis, MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

Grenade\_MeCN/AcMe 50/50\_25°C



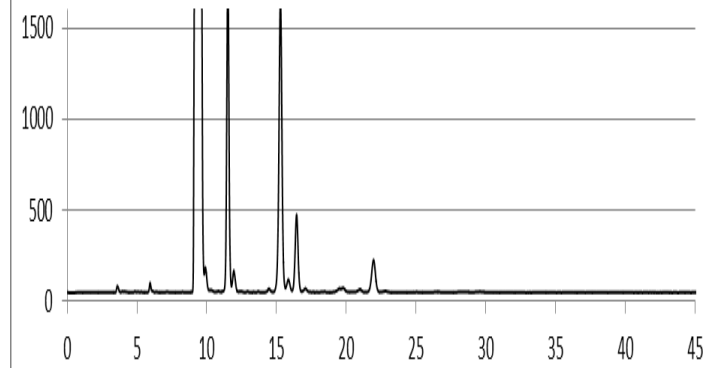
**Chromatogramme 97** : Huile de grenade,  
MeCN/AcMe 50/50, 25°C.

Grenade\_MeCN/iPrOH 66/34\_25°C



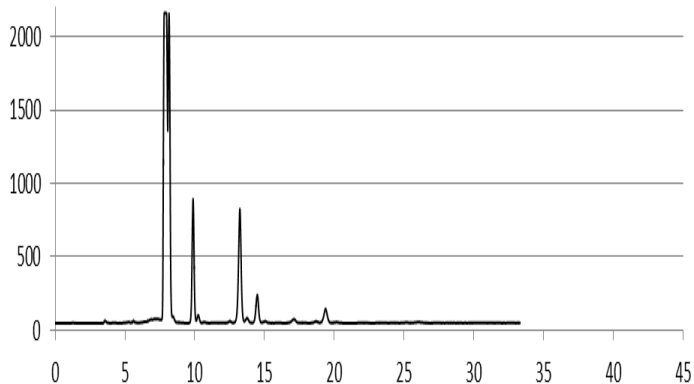
**Chromatogramme 98** : Huile de grenade,  
MeCN/iPrOH 66/34, 25°C.

Grenade\_MeCN/AcOEt 66/34\_25°C



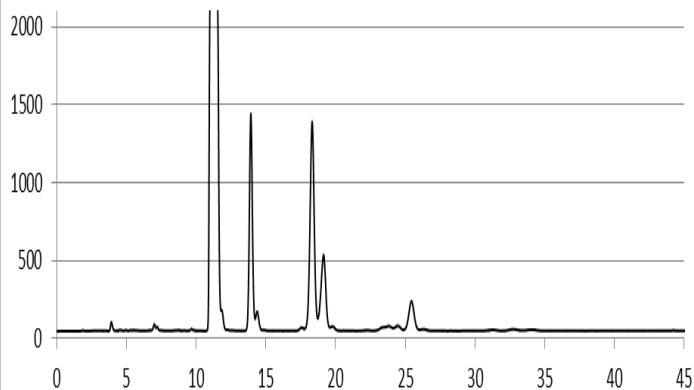
**Chromatogramme 99** : Huile de grenade,  
MeCN/AcOEt 66/34, 25°C.

Grenade\_MeCN/BuOH 74/26\_25°C



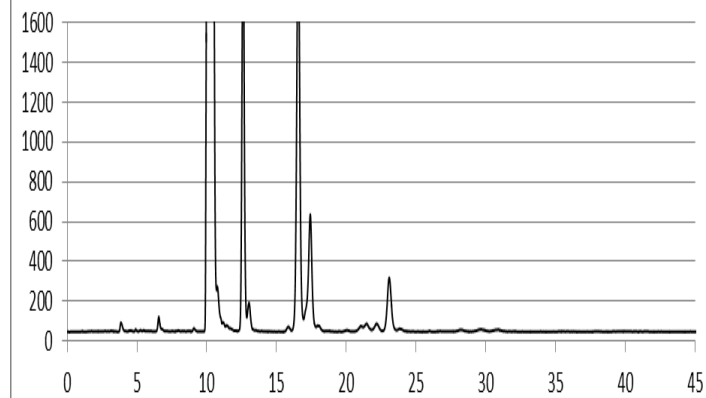
**Chromatogramme 100** : Huile de grenade,  
MeCN/BuOH 74/26, 25°C.

Grenade\_MeCN/AcMe 69/31\_43°C



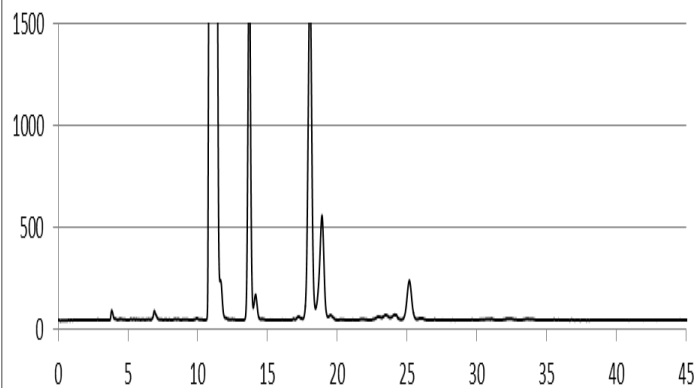
**Chromatogramme 101** : Huile de grenade,  
MeCN/AcMe 69/31, 43°C.

Grenade\_MeCN/iPrOH 77/23\_43°C



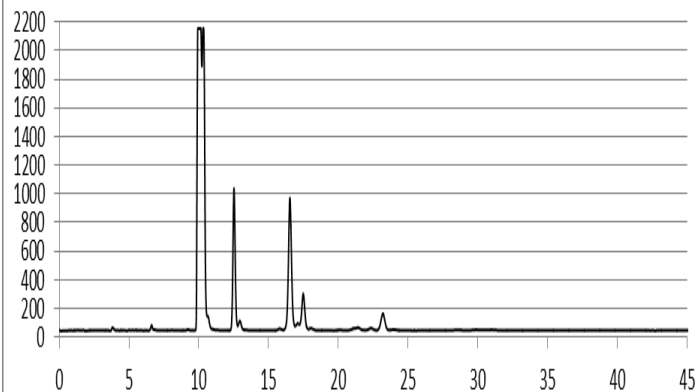
**Chromatogramme 102** : Huile de grenade,  
MeCN/iPrOH 77/23, 43°C.

Grenade\_MeCN/AcOEt 79/21\_43°C



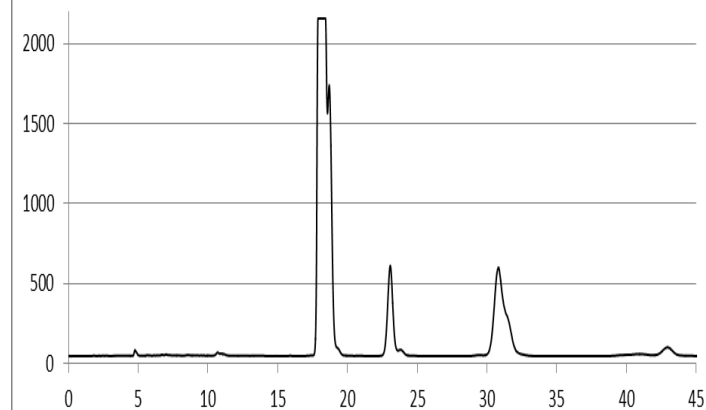
**Chromatogramme 103** : Huile de grenade,  
MeCN/AcOEt 79/21, 43°C.

Grenade\_MeCN/BuOH 83/17\_43°C



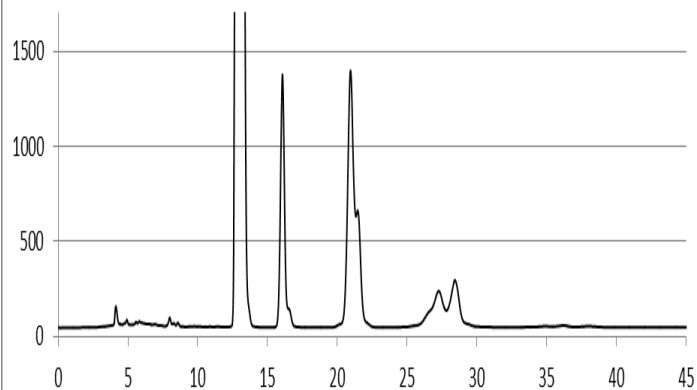
**Chromatogramme 104** : Huile de grenade,  
MeCN/BuOH 83/17, 43°C.

Grenade\_MeCN/AcMe 92/08\_63°C



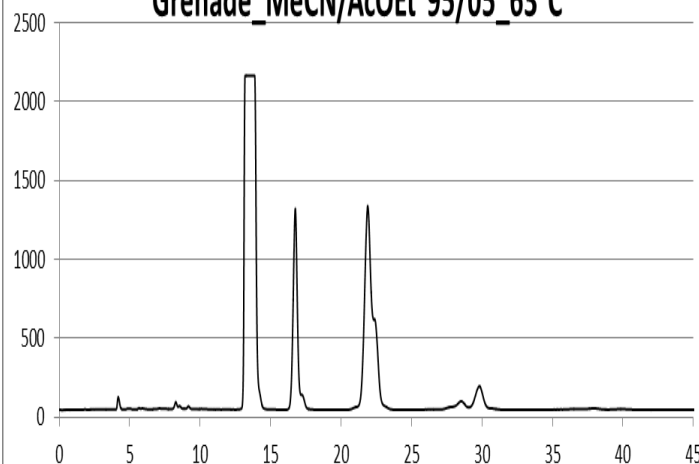
**Chromatogramme 105** : Huile de grenade,  
MeCN/AcMe 92/08, 63°C.

Grenade\_MeCN/iPrOH 94/06\_63°C



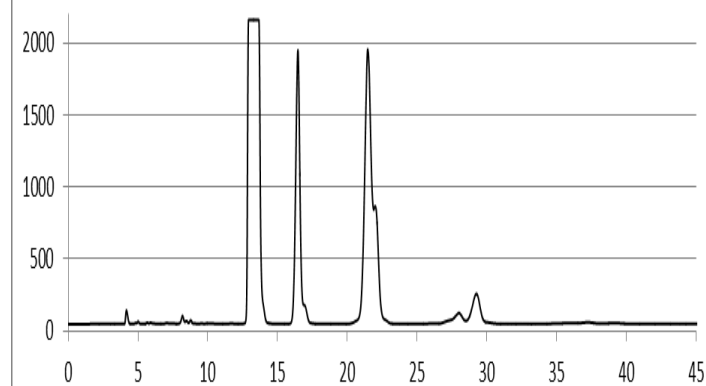
**Chromatogramme 106** : Huile de grenade,  
MeCN/iPrOH 94/06, 63°C.

Grenade\_MeCN/AcOEt 95/05\_63°C



**Chromatogramme 107** : Huile de grenade,  
MeCN/AcOEt 95/05, 63°C.

Grenade\_MeCN/BuOH 96/04\_63°C



**Chromatogramme 108** : Huile de grenade,  
MeCN/BuOH 96/04, 63°C.

## **Annexe 2**

Tableaux de probabilités des TAG déterminés par un calcul statistique à partir de la composition d'acide gras de chaque huile obtenus par analyse en chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse CPG/MS.

✓ Huile d'*Aleurites fordii*

Tableau 1 : Détermination des TAG probable dans l'huile d'*Aleurites fordii*.

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	28.17%	29.13%	54	9	36	$\alpha$ E $\alpha$ E $\alpha$ E
	10.09%	10.44%	54	9	36	$\alpha$ E $\alpha$ E $\beta$ E
	2.14%	2.21%	54	9	36	183 $\alpha$ E $\alpha$ E
	1.21%	1.25%	54	9	36	$\alpha$ E $\alpha$ ECt
	1.21%	1.25%	54	9	36	$\alpha$ E $\beta$ E $\beta$ E
	0.51%	0.53%	54	9	36	P $\alpha$ E $\beta$ E
	0.29%	0.30%	54	9	36	$\alpha$ E $\beta$ ECt
	9.51%	9.84%	54	8	38	L $\alpha$ E $\alpha$ E
	2.27%	2.35%	54	8	38	L $\alpha$ E $\beta$ E
	1.46%	1.51%	54	8	38	L? $\alpha$ E $\alpha$ E
	0.48%	0.50%	54	8	38	LJ $\alpha$ E
	0.35%	0.36%	54	8	38	L? $\alpha$ E $\beta$ E
	0.27%	0.28%	54	8	38	L $\alpha$ ECt
	0.14%	0.14%	54	8	38	L $\beta$ E $\beta$ E
	9.89%	10.23%	54	7	40	O $\alpha$ E $\alpha$ E
	3.94%	4.08%	52	6	40	P $\alpha$ E $\alpha$ E
	2.36%	2.44%	54	7	40	O $\alpha$ E $\beta$ E
	1.07%	1.11%	54	7	40	LL $\alpha$ E
	1.06%	1.09%	54	7	40	As $\alpha$ E $\alpha$ E
	0.94%	0.97%	52	6	40	P $\alpha$ E $\beta$ E
	0.50%	0.52%	54	7	40	O183 $\alpha$ E
	0.33%	0.34%	54	7	40	LL? $\alpha$ E
	0.28%	0.29%	54	7	40	O $\alpha$ ECt
	0.25%	0.26%	54	7	40	As $\alpha$ E $\beta$ E
	0.20%	0.21%	52	6	40	PP $\alpha$ E
	0.14%	0.15%	54	7	40	O $\beta$ E $\beta$ E
	0.13%	0.13%	54	7	40	LL $\beta$ E
	0.11%	0.12%	52	6	40	P $\alpha$ ECt
	3.57%	3.69%	54	6	42	S $\alpha$ E $\alpha$ E
	2.23%	2.30%	54	6	42	OL $\alpha$ E
	1.24%	1.28%	56	7	42	$\alpha$ E $\alpha$ EGo
	0.89%	0.92%	52	5	42	PL $\alpha$ E
	0.85%	0.88%	54	6	42	S $\alpha$ E $\beta$ E
	0.34%	0.35%	54	6	42	OL? $\alpha$ E
	0.30%	0.31%	56	7	42	$\alpha$ E $\beta$ EGo
	0.27%	0.28%	54	6	42	OL $\beta$ E
	0.24%	0.25%	54	6	42	AsL $\alpha$ E
	0.18%	0.19%	54	6	42	S183 $\alpha$ E
	0.14%	0.14%	52	5	42	PL? $\alpha$ E
	0.11%	0.11%	52	5	42	PL $\beta$ E
	0.10%	0.11%	54	6	42	S $\alpha$ ECt
	1.16%	1.20%	54	5	44	OO $\alpha$ E
	0.92%	0.95%	52	4	44	PO $\alpha$ E
	0.80%	0.83%	54	5	44	SL $\alpha$ E
	0.30%	0.31%	56	6	44	$\alpha$ E $\alpha$ EAr
	0.28%	0.29%	56	6	44	L $\alpha$ EGo
	0.25%	0.26%	54	5	44	OAs $\alpha$ E
	0.18%	0.19%	50	3	44	PP $\alpha$ E
	0.14%	0.14%	54	5	44	OO $\beta$ E
	0.13%	0.13%	54	5	44	OLL
	0.12%	0.13%	54	5	44	SL? $\alpha$ E
	0.11%	0.11%	52	4	44	PO $\beta$ E
	0.10%	0.10%	52	4	44	PAs $\alpha$ E
	0.10%	0.10%	54	5	44	SL $\beta$ E
	0.84%	0.86%	54	4	46	SO $\alpha$ E
	0.33%	0.34%	52	3	46	PS $\alpha$ E
	0.29%	0.30%	56	5	46	O $\alpha$ EGo
	0.13%	0.13%	54	4	46	OOL
	0.12%	0.12%	54	4	46	P $\alpha$ EGo
	0.10%	0.11%	52	3	46	POL
	0.10%	0.10%	54	4	46	SO $\beta$ E
	0.09%	0.09%	54	4	46	SAs $\alpha$ E
	0.15%	0.16%	54	3	48	SS $\alpha$ E
	0.10%	0.11%	56	4	48	S $\alpha$ EGo
	0.09%	0.10%	54	3	48	SOL
<b>Total</b>	<b>96.68%</b>	<b>100.00%</b>				

✓ Huile d'*Aquilegia vulgaris*

**Tableau 2 :** Détermination des TAG probable dans l'huile d'*Aquilegia vulgaris*.

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	0.14%	0.14%	54	10	34	CbCbαSt
	11.08%	11.30%	54	9	36	CbCbCb
	0.15%	0.15%	54	9	36	LCbαSt
	17.71%	18.07%	54	8	38	LCbCb
	1.75%	1.79%	54	8	38	AqCbCb
	9.44%	9.63%	54	7	40	LLCb
	7.13%	7.27%	54	7	40	OCbCb
	6.01%	6.13%	52	6	40	PCbCb
	1.87%	1.90%	54	7	40	AqLCb
	0.46%	0.47%	54	7	40	AsCbCb
	7.60%	7.75%	54	6	42	OLCb
	6.40%	6.53%	52	5	42	PLCb
	2.64%	2.70%	54	6	42	SCbCb
	1.68%	1.71%	54	6	42	LLL
	0.75%	0.77%	54	6	42	OAcCb
	0.63%	0.65%	52	5	42	PAqCb
	0.50%	0.51%	54	6	42	AqLL
	0.49%	0.50%	54	6	42	AsLCb
	2.82%	2.87%	54	5	44	SLCb
	2.58%	2.63%	52	4	44	POCb
	2.02%	2.06%	54	5	44	OLL
	1.71%	1.74%	52	4	44	PLL
	1.53%	1.56%	54	5	44	OOCb
	1.09%	1.11%	50	3	44	PPCb
	0.40%	0.41%	54	5	44	OAcL
	0.34%	0.34%	52	4	44	PAqL
	0.28%	0.28%	54	5	44	SAqCb
	0.20%	0.20%	54	5	44	OAcCb
	0.17%	0.17%	52	4	44	PAcCb
	0.13%	0.13%	54	5	44	AsLL
	1.37%	1.40%	52	3	46	POL
	1.13%	1.16%	54	4	46	SOCb
	0.96%	0.97%	52	3	46	PSCb
	0.81%	0.83%	54	4	46	OOL
	0.75%	0.77%	54	4	46	SLL
	0.58%	0.59%	50	2	46	PPL
	0.15%	0.15%	54	4	46	SAqL
	0.14%	0.14%	52	3	46	POAc
	0.10%	0.11%	54	4	46	OAcL
	0.60%	0.62%	54	3	48	SOL
	0.51%	0.52%	52	2	48	PSL
	0.28%	0.28%	52	2	48	POO
	0.23%	0.24%	50	1	48	PPO
	0.21%	0.21%	54	3	48	SSCb
	0.11%	0.11%	54	3	48	OOO
	0.20%	0.21%	52	1	50	PSO
	0.12%	0.12%	54	2	50	SOO
	0.11%	0.11%	54	2	50	SSL
<b>Total</b>	<b>98.02%</b>	<b>100.00%</b>				

✓ Huile de *Borago officinalis*

**Tableau 3 : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Borago officinalis*.**

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	0.53%	0.57%	54	9	36	$\gamma$ Ln $\gamma$ LnLn
	2.93%	3.17%	54	8	38	L $\gamma$ LnLn
	0.16%	0.17%	54	8	38	L $\gamma$ Ln18:3b
	0.13%	0.15%	54	8	38	L $\gamma$ Ln18:3a
	0.12%	0.13%	54	8	38	L $\gamma$ LnLn
	5.45%	5.90%	54	7	40	LL $\gamma$ Ln
	1.75%	1.90%	54	7	40	O $\gamma$ LnLn
	1.16%	1.26%	52	6	40	P $\gamma$ LnLn
	0.15%	0.16%	54	7	40	LL18:3b
	0.13%	0.14%	54	7	40	LL18:3a
	0.11%	0.12%	54	7	40	LLL
	6.52%	7.06%	54	6	42	OL $\gamma$ Ln
	4.33%	4.68%	52	5	42	PL $\gamma$ Ln
	3.38%	3.65%	54	6	42	LLL
	0.47%	0.51%	56	7	42	$\gamma$ Ln $\gamma$ LnGo
	0.41%	0.44%	54	6	42	S $\gamma$ LnLn
	0.27%	0.29%	54	6	42	AsL $\gamma$ Ln
	0.18%	0.19%	54	6	42	OL18:3b
	0.15%	0.16%	54	6	42	OL18:3a
	0.14%	0.15%	54	6	42	OLLn
	0.12%	0.13%	52	5	42	PL18:3b
	0.10%	0.11%	52	5	42	PL18:3a
	6.06%	6.56%	54	5	44	OLL
	4.02%	4.35%	52	4	44	PLL
	2.59%	2.80%	52	4	44	PO $\gamma$ Ln
	1.95%	2.11%	54	5	44	OO $\gamma$ Ln
	1.75%	1.89%	56	6	44	L $\gamma$ LnGo
	1.52%	1.65%	54	5	44	SL $\gamma$ Ln
	0.86%	0.93%	50	3	44	PP $\gamma$ Ln
	0.29%	0.31%	58	7	44	$\gamma$ Ln $\gamma$ LnEr
	0.25%	0.27%	54	5	44	AsLL
	0.16%	0.17%	54	5	44	OAs $\gamma$ Ln
	0.11%	0.11%	52	4	44	PAs $\gamma$ Ln
	0.10%	0.11%	52	4	44	16:1OL
	4.81%	5.21%	52	3	46	POL
	3.63%	3.92%	54	4	46	OOL
	1.63%	1.76%	56	5	46	LLGo
	1.60%	1.73%	50	2	46	PPL
	1.42%	1.53%	54	4	46	SLL
	1.07%	1.15%	58	6	46	L $\gamma$ LnEr
	1.05%	1.13%	56	5	46	O $\gamma$ LnGo
	0.91%	0.99%	54	4	46	SO $\gamma$ Ln
	0.69%	0.75%	54	4	46	P $\gamma$ LnGo
	0.61%	0.65%	52	3	46	PS $\gamma$ Ln
	0.30%	0.32%	54	4	46	OAsL
	0.20%	0.21%	52	3	46	PAsL
	0.17%	0.18%	60	7	46	$\gamma$ Ln $\gamma$ LnNe
	0.13%	0.14%	56	5	46	L $\gamma$ LnAr
	1.95%	2.11%	56	4	48	OLGo
	1.70%	1.83%	54	3	48	SOL
	1.44%	1.56%	52	2	48	POO
	1.29%	1.40%	54	3	48	PLGo
	1.12%	1.22%	52	2	48	PSL
	0.99%	1.07%	58	5	48	LLEr
	0.96%	1.03%	50	1	48	PPO
	0.72%	0.78%	54	3	48	OOO
	0.64%	0.69%	58	5	48	O $\gamma$ LnEr
	0.63%	0.68%	60	6	48	L $\gamma$ LnNe
	0.42%	0.46%	56	4	48	P $\gamma$ LnEr



	0.24%	0.26%	56	4	48	S $\gamma$ LnGo
	0.21%	0.23%	48	0	48	PPP
	0.14%	0.15%	58	5	48	$\gamma$ LnGoGo
	0.12%	0.13%	56	4	48	LLAr
	0.12%	0.13%	52	2	48	POAs
	0.11%	0.12%	54	3	48	SS $\gamma$ Ln
	1.19%	1.28%	58	4	50	OLEr
	0.79%	0.85%	56	3	50	PLEr
	0.77%	0.84%	54	2	50	POGo
	0.67%	0.73%	52	1	50	PSO
	0.59%	0.63%	60	5	50	LLNe
	0.58%	0.63%	56	3	50	OOGO
	0.51%	0.55%	54	2	50	SOO
	0.45%	0.49%	56	3	50	SLGo
	0.38%	0.41%	60	5	50	O $\gamma$ LnNe
	0.26%	0.28%	58	4	50	LGoGo
	0.26%	0.28%	52	1	50	PPGo
	0.25%	0.27%	58	4	50	P $\gamma$ LnNe
	0.22%	0.24%	50	0	50	PPS
	0.20%	0.21%	54	2	50	SSL
	0.17%	0.19%	60	5	50	$\gamma$ LnGoEr
	0.15%	0.16%	58	4	50	S $\gamma$ LnEr
	0.14%	0.15%	56	3	50	OLAr
	0.70%	0.76%	60	4	52	OLNe
	0.47%	0.51%	56	2	52	POEr
	0.47%	0.50%	58	3	52	PLNe
	0.35%	0.38%	58	3	52	OOEr
	0.32%	0.34%	60	4	52	LGoEr
	0.28%	0.30%	58	3	52	SLEr
	0.27%	0.29%	56	2	52	SOGO
	0.18%	0.20%	54	1	52	PSGo
	0.16%	0.17%	58	3	52	OGoGo
	0.16%	0.17%	54	1	52	PPER
	0.12%	0.13%	54	1	52	SSO
	0.10%	0.11%	56	2	52	PGoGo
	0.10%	0.11%	62	5	52	$\gamma$ LnGoNe
	0.28%	0.30%	58	2	54	PONe
	0.21%	0.23%	60	3	54	OONe
	0.19%	0.21%	60	3	54	OGoEr
	0.19%	0.20%	62	4	54	LGoNe
	0.17%	0.18%	58	2	54	SOEr
	0.16%	0.18%	60	3	54	SLNe
	0.13%	0.14%	58	2	54	PGoEr
	0.11%	0.12%	56	1	54	PSEr
	0.10%	0.10%	62	4	54	LErEr
	0.11%	0.12%	64	4	56	LErNe
	0.11%	0.12%	62	3	56	OGoNe
	0.10%	0.11%	60	2	56	SONe
<b>Total</b>	92.42%	100.00%				

✓ Huile de *Calendula officinalis*

Tableau 4 : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Calendula officinalis*.

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	18.13%	18.58%	54	9	36	CdCdCd
	1.27%	1.30%	54	9	36	CdCdβCd
	0.51%	0.52%	54	9	36	LnCdCd
	0.26%	0.27%	54	9	36	CdCd183
	0.26%	0.27%	54	9	36	CdCd183a
	28.02%	28.70%	54	8	38	LCdCd
	1.31%	1.34%	54	8	38	LCdβCd
	0.52%	0.54%	54	8	38	LLnCd
	0.27%	0.27%	54	8	38	LCd183
	0.27%	0.27%	54	8	38	LCd183a
	14.43%	14.78%	54	7	40	LLCd
	4.07%	4.17%	54	7	40	OCdCd
	3.60%	3.69%	52	6	40	PCdCd
	1.29%	1.32%	54	7	40	AsCdCd
	0.34%	0.34%	54	7	40	LLβCd
	0.19%	0.19%	54	7	40	OCdβCd
	0.17%	0.17%	52	6	40	PCdβCd
	0.14%	0.14%	54	7	40	LLLn
	4.19%	4.29%	54	6	42	OLCd
	3.71%	3.80%	52	5	42	PLCd
	2.48%	2.54%	54	6	42	LLL
	1.70%	1.74%	54	6	42	SCdCd
	1.33%	1.36%	54	6	42	AsLCd
	0.37%	0.38%	56	7	42	GoCdCd
	0.10%	0.10%	54	6	42	OLβCd
	0.09%	0.09%	52	5	42	PLβE
	1.75%	1.80%	54	5	44	SLCd
	1.08%	1.10%	54	5	44	OLL
	0.96%	0.98%	52	4	44	PLL
	0.54%	0.55%	52	4	44	POCd
	0.39%	0.40%	56	6	44	LGoCd
	0.36%	0.36%	56	6	44	ArCdCd
	0.34%	0.35%	54	5	44	AsLL
	0.30%	0.31%	54	5	44	OOCd
	0.24%	0.24%	50	3	44	PPCd
	0.19%	0.20%	54	5	44	OAsCd
	0.17%	0.17%	52	4	44	PAsCd
	0.45%	0.46%	54	4	46	SLL
	0.37%	0.38%	56	5	46	LCdAr
	0.28%	0.28%	52	3	46	POL
	0.25%	0.26%	54	4	46	SOCd
	0.23%	0.23%	52	3	46	PSCd
	0.16%	0.16%	54	4	46	OOL
	0.12%	0.13%	50	2	46	PPL
	0.10%	0.10%	56	5	46	LLGo
	0.10%	0.10%	54	4	46	OAsL
	0.13%	0.13%	54	3	48	SOL
	0.12%	0.12%	52	2	48	PSL
<b>Total</b>	<b>97.60%</b>	<b>100.00%</b>				

✓ Huile de *Catalpa ovata*

Tableau 5 : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Catalpa ovata*.

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	8.40%	8.69%	54	9	36	CtCtCt
	0.51%	0.53%	54	9	36	PuCtCt
	0.43%	0.45%	54	9	36	CtCtβE
	0.28%	0.29%	54	9	36	LnCtCt
	13.37%	13.83%	54	8	38	LCtCt
	7.83%	8.10%	54	8	38	L?CtCt
	0.54%	0.56%	54	8	38	LPuCt
	0.46%	0.47%	54	8	38	LCtβE
	0.32%	0.33%	54	8	38	L?PuCt
	0.29%	0.30%	54	8	38	LLnCt
	0.27%	0.28%	54	8	38	L?CtβE
	0.17%	0.18%	54	8	38	L?LnCt
	8.31%	8.59%	54	7	40	LL?Ct
	7.09%	7.33%	54	7	40	LLCt
	4.82%	4.99%	54	7	40	OCtCt
	2.43%	2.52%	54	7	40	L?L?Ct
	1.91%	1.97%	52	6	40	PCtCt
	0.56%	0.58%	54	7	40	AsCtCt
	0.20%	0.20%	54	7	40	OPuCt
	0.17%	0.17%	54	7	40	LL?Pu
	0.17%	0.17%	54	7	40	OCtβE
	0.14%	0.15%	54	7	40	LLPu
	0.14%	0.15%	54	7	40	LL?βE
	0.12%	0.13%	54	7	40	LLβE
	0.11%	0.11%	54	7	40	OLnCt
	0.09%	0.09%	54	7	40	LL?Ln
	5.12%	5.29%	54	6	42	OLCt
	3.00%	3.10%	54	6	42	OL?Ct
	2.20%	2.28%	54	6	42	LLL?
	2.02%	2.09%	52	5	42	PLCt
	1.62%	1.68%	54	6	42	SCtCt
	1.29%	1.34%	54	6	42	LL?L?
	1.25%	1.30%	54	6	42	LLL
	1.18%	1.22%	52	5	42	PL?Ct
	0.60%	0.62%	54	6	42	AsLCt
	0.35%	0.36%	54	6	42	AsL?Ct
	0.25%	0.26%	54	6	42	L?L?L?
	0.10%	0.11%	54	6	42	OLPu
	1.72%	1.78%	54	5	44	SLCt
	1.59%	1.64%	54	5	44	OLL?
	1.36%	1.40%	54	5	44	OLL
	1.01%	1.05%	56	6	44	ArCtCt
	1.01%	1.04%	54	5	44	SL?Ct
	0.92%	0.95%	54	5	44	OOCT
	0.73%	0.75%	52	4	44	POCt
	0.63%	0.65%	52	4	44	PLL?
	0.54%	0.55%	52	4	44	PLL
	0.47%	0.48%	54	5	44	OL?L?
	0.22%	0.22%	54	5	44	OAsCt
	0.19%	0.19%	54	5	44	AsLL?
	0.18%	0.19%	52	4	44	PL?L?
	0.16%	0.16%	54	5	44	AsLL
	0.14%	0.15%	50	3	44	PPCt
	1.07%	1.11%	56	5	46	LArCt
	0.63%	0.65%	56	5	46	L?ArCt
	0.62%	0.64%	54	4	46	SOCT
	0.53%	0.55%	54	4	46	SLL?
	0.49%	0.51%	54	4	46	OOL
	0.46%	0.47%	54	4	46	SLL
	0.39%	0.40%	52	3	46	POL
	0.29%	0.30%	54	4	46	OOL?
	0.25%	0.25%	52	3	46	PSCt
	0.23%	0.23%	52	3	46	POL?
	0.16%	0.16%	54	4	46	SL?L?
	0.11%	0.12%	54	4	46	OAsL
	0.39%	0.40%	56	4	48	OArCt
	0.33%	0.35%	56	4	48	LL?Ar
	0.33%	0.34%	54	3	48	SOL
	0.28%	0.29%	56	4	48	LLAr
	0.19%	0.20%	54	3	48	SOL?
	0.15%	0.16%	54	3	48	PArCt
	0.13%	0.13%	52	2	48	PSL
	0.10%	0.11%	54	3	48	SSCt
	0.10%	0.10%	56	4	48	L?L?Ar
	0.21%	0.21%	56	3	50	OLAr
	0.13%	0.13%	56	3	50	SArCt
	0.12%	0.12%	56	3	50	OL?Ar
<b>Total</b>	<b>96.68%</b>	<b>100.00%</b>				

✓ Huile de *Jacaranda mimosifolia*

Tableau 6 : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Jacaranda mimosifolia*.

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	3.94%	4.10%	54	9	36	JaJaJa
	0.65%	0.67%	54	9	36	JaJaCd
	0.62%	0.65%	54	9	36	JaJaαE
	0.12%	0.12%	54	9	36	LnJaJa
	13.62%	14.17%	54	8	38	LJaJa
	1.49%	1.55%	54	8	38	LJaCd
	1.43%	1.49%	54	8	38	LJaαE
	0.27%	0.28%	54	8	38	LLnJa
	0.23%	0.23%	54	8	38	18_2JaJa
	15.71%	16.34%	54	7	40	LLJa
	3.60%	3.74%	54	7	40	OJaJa
	1.22%	1.26%	52	6	40	PJaJa
	0.86%	0.89%	54	7	40	LLCd
	0.83%	0.86%	54	7	40	LLαE
	0.52%	0.54%	54	7	40	L18_2Ja
	0.39%	0.41%	54	7	40	OJaCd
	0.38%	0.39%	54	7	40	OJaαE
	0.36%	0.38%	54	7	40	AsJaJa
	0.16%	0.16%	54	7	40	LLLn
	0.13%	0.14%	52	6	40	PJaCd
	0.13%	0.13%	52	6	40	PJaαE
	8.30%	8.63%	54	6	42	OLJa
	6.04%	6.28%	54	6	42	LLL
	2.80%	2.92%	52	5	42	PLJa
	2.06%	2.14%	54	6	42	SJaJa
	0.84%	0.87%	54	6	42	AsLJa
	0.45%	0.47%	54	6	42	OLCd
	0.44%	0.45%	54	6	42	OLαE
	0.30%	0.31%	54	6	42	LL18_2
	0.23%	0.23%	54	6	42	SJaCd
	0.22%	0.23%	54	6	42	SJaαE
	0.15%	0.16%	52	5	42	PLCd
	0.15%	0.15%	52	5	42	PLαE
	0.14%	0.14%	54	6	42	O18_2Ja
	0.12%	0.12%	56	7	42	GoJaJa
	4.79%	4.98%	54	5	44	OLL
	4.75%	4.94%	54	5	44	SLJa
	1.62%	1.68%	52	4	44	PLL
	1.10%	1.14%	54	5	44	OOJa
	0.74%	0.77%	52	4	44	POJa
	0.49%	0.50%	54	5	44	AsLL
	0.27%	0.28%	56	6	44	LGoJa
	0.26%	0.27%	54	5	44	SLCd
	0.25%	0.26%	54	5	44	SLαE
	0.22%	0.23%	54	5	44	OAsJa
	0.21%	0.22%	56	6	44	ArJaJa
	0.16%	0.16%	54	5	44	OL18_2
	0.13%	0.13%	50	3	44	PPJa
	2.74%	2.85%	54	4	46	SLL
	1.26%	1.31%	54	4	46	OOL
	1.25%	1.30%	54	4	46	SOJa
	0.85%	0.89%	52	3	46	POL
	0.48%	0.50%	56	5	46	LArJa
	0.42%	0.44%	52	3	46	PSJa
	0.26%	0.27%	54	4	46	OAsL
	0.16%	0.16%	56	5	46	LLGo
	0.14%	0.15%	50	2	46	PPL
	0.13%	0.13%	54	4	46	SAsJa
	0.11%	0.12%	58	6	46	JaJaBe
	1.45%	1.50%	54	3	48	SOL
	0.49%	0.51%	52	2	48	PSL
	0.36%	0.37%	54	3	48	SSJa
	0.28%	0.29%	56	4	48	LLAr
	0.26%	0.27%	58	5	48	LJaBe
	0.15%	0.15%	54	3	48	SAsL
	0.13%	0.13%	56	4	48	OArJa
	0.11%	0.12%	52	2	48	POO
	0.11%	0.12%	54	3	48	OOO
	0.41%	0.43%	54	2	50	SSL
	0.19%	0.20%	54	2	50	SOO
	0.15%	0.16%	58	4	50	LLBe
	0.15%	0.15%	56	3	50	OLAr
	0.13%	0.13%	52	1	50	PSO
	0.11%	0.11%	54	1	52	SSO
<b>Total</b>	<b>96.15%</b>	<b>100.00%</b>				

✓ Huile de *Linum*

**Tableau 7 : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Linum*.**

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	9.38%	9.54%	54	9	36	LnLnLn
	10.22%	10.39%	54	8	38	LLnLn
	13.68%	13.91%	54	7	40	OLnLn
	4.06%	4.13%	52	6	40	PLnLn
	3.71%	3.77%	54	7	40	LLLn
	1.07%	1.09%	54	7	40	AsLnLn
	9.94%	10.11%	54	6	42	OLLn
	2.95%	3.00%	52	5	42	PLLn
	2.40%	2.44%	54	6	42	SLnLn
	0.78%	0.79%	54	6	42	AsLLn
	0.52%	0.53%	56	7	42	LnLnGo
	0.45%	0.46%	54	6	42	LLL
	6.65%	6.77%	54	5	44	OOLn
	3.94%	4.01%	52	4	44	POLn
	1.80%	1.84%	54	5	44	OLL
	1.74%	1.77%	54	5	44	SLLn
	1.58%	1.61%	58	7	44	LnLnEr
	1.04%	1.06%	54	5	44	OAsLn
	0.58%	0.59%	50	3	44	PPLn
	0.53%	0.54%	52	4	44	PLL
	0.38%	0.38%	56	6	44	LLnGo
	0.31%	0.31%	52	4	44	PAsLn
	0.15%	0.16%	56	6	44	LnLnAr
	0.14%	0.14%	54	5	44	AsLL
	2.42%	2.46%	54	4	46	OOL
	2.33%	2.37%	54	4	46	SOLn
	1.43%	1.46%	52	3	46	POL
	1.15%	1.17%	58	6	46	LLnEr
	0.69%	0.70%	52	3	46	PSLn
	0.51%	0.51%	56	5	46	OLnGo
	0.38%	0.38%	54	4	46	OAsL
	0.32%	0.32%	54	4	46	SLL
	0.21%	0.22%	50	2	46	PPL
	0.18%	0.19%	54	4	46	SAsLn
	0.15%	0.15%	54	4	46	PLnGo
	0.12%	0.12%	58	6	46	LnLnBe
	0.11%	0.11%	56	5	46	LLnAr
	0.11%	0.11%	52	3	46	PAsL
	0.07%	0.07%	56	5	46	LLGo
	0.04%	0.04%	56	5	46	AsLnGo
	0.01%	0.02%	54	4	46	AsAsL
	1.54%	1.56%	58	5	48	OLnEr
	1.08%	1.10%	54	3	48	OOO
	0.96%	0.98%	52	2	48	POO
	0.85%	0.86%	54	3	48	SOL
	0.46%	0.46%	56	4	48	PLnEr
	0.28%	0.29%	50	1	48	PPO
	0.25%	0.26%	54	3	48	OOAs
	0.25%	0.26%	52	2	48	PSL
	0.21%	0.21%	58	5	48	LLEr
	0.20%	0.21%	54	3	48	SSLn
	0.18%	0.19%	56	4	48	OLGo
	0.15%	0.15%	56	4	48	OLnAr
	0.15%	0.15%	52	2	48	POAs
	0.12%	0.12%	58	5	48	AsLnEr
	0.09%	0.09%	56	4	48	SLnGo
	0.09%	0.09%	58	5	48	LLnBe
	0.57%	0.58%	54	2	50	SOO
	0.56%	0.57%	58	4	50	OLEr
	0.34%	0.34%	52	1	50	PSO
	0.27%	0.27%	58	4	50	SLEr
	0.17%	0.17%	56	3	50	PLEr
	0.12%	0.13%	56	3	50	OOGO
	0.11%	0.12%	58	4	50	OLnBe
	0.09%	0.09%	54	2	50	SOAs
	0.37%	0.38%	58	3	52	OOEr
	0.22%	0.23%	56	2	52	POEr
	0.10%	0.10%	54	1	52	SSO
	0.10%	0.10%	58	3	52	SLEr
	0.09%	0.09%	62	5	52	LnErEr
	0.13%	0.13%	58	2	54	SOEr
<b>Total</b>	<b>98.31%</b>	<b>100.00%</b>				

✓ Huile de *Pinus koraiensis*

Tableau 8 : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Pinus koraiensis*.

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	0.30%	0.31%	54	9	36	PiPiPi
	2.62%	2.75%	54	8	38	LPiPi
	0.15%	0.16%	54	8	38	TaPiPi
	7.74%	8.11%	54	7	40	LLPi
	1.72%	1.81%	54	7	40	OPiPi
	0.91%	0.95%	54	7	40	LTaPi
	0.36%	0.37%	52	6	40	PPiPi
	0.30%	0.32%	56	8	40	LPiSc
	10.17%	10.67%	54	6	42	OLPi
	7.62%	7.99%	54	6	42	LLL
	2.10%	2.21%	52	5	42	PLPi
	1.34%	1.41%	54	6	42	TaLL
	0.60%	0.63%	54	6	42	OTaPi
	0.45%	0.47%	56	7	42	LLSc
	0.31%	0.33%	54	6	42	AsLPi
	0.20%	0.21%	56	7	42	OPiSc
	0.16%	0.17%	56	7	42	LPiDh
	0.15%	0.16%	54	6	42	SPiPi
	0.12%	0.13%	52	5	42	PTaPi
	0.12%	0.13%	54	6	42	OLLn
	15.02%	15.76%	54	5	44	OLL
	3.34%	3.51%	54	5	44	OOPi
	3.11%	3.26%	52	4	44	PLL
	1.77%	1.85%	54	5	44	OTaL
	1.38%	1.45%	52	4	44	POPi
	0.89%	0.94%	54	5	44	SLPi
	0.59%	0.62%	56	6	44	OLSc
	0.50%	0.53%	56	6	44	LPiGo
	0.46%	0.48%	54	5	44	AsLL
	0.36%	0.38%	52	4	44	PTaL
	0.24%	0.25%	56	6	44	LLDh
	0.20%	0.21%	54	5	44	OAsPi
	0.14%	0.15%	50	3	44	PPPi
	0.12%	0.13%	54	5	44	PLSc
	0.11%	0.11%	56	6	44	OPiDh
	9.88%	10.36%	54	4	46	OOL
	4.08%	4.28%	52	3	46	POL
	1.32%	1.39%	54	4	46	SLL
	0.74%	0.78%	56	5	46	LLGo
	0.60%	0.63%	54	4	46	OAsL
	0.59%	0.62%	54	4	46	SOPi
	0.58%	0.61%	54	4	46	OOTa
	0.42%	0.44%	50	2	46	PPL
	0.33%	0.35%	56	5	46	OPiGo
	0.32%	0.33%	56	5	46	OLDh
	0.24%	0.25%	52	3	46	POTa
	0.19%	0.20%	56	5	46	OOSc
	0.17%	0.18%	56	5	46	OPiAr
	0.16%	0.16%	54	4	46	SLTa
	0.12%	0.13%	52	3	46	PAsL
	0.12%	0.13%	52	3	46	PSPi
	2.16%	2.27%	54	3	48	OOO
	1.74%	1.82%	54	3	48	SOL
	1.34%	1.41%	52	2	48	POO
	0.98%	1.03%	56	4	48	OLGo
	0.36%	0.38%	52	2	48	PSL
	0.28%	0.29%	50	1	48	PPO
	0.25%	0.26%	56	4	48	LLAr
	0.20%	0.21%	54	3	48	PLGo
	0.20%	0.21%	54	3	48	OOAs
	0.11%	0.12%	56	4	48	OPiAr
	0.11%	0.11%	56	4	48	LLDh
	0.10%	0.11%	56	4	48	OODh
	0.10%	0.11%	54	3	48	SOTa
	0.57%	0.60%	54	2	50	SOO
	0.33%	0.34%	56	3	50	OLAr
	0.32%	0.34%	56	3	50	OOGO
	0.24%	0.25%	52	1	50	PSO
	0.14%	0.15%	56	3	50	OLB
	0.13%	0.14%	54	2	50	POGo
	0.11%	0.11%	56	2	52	OOAr
<b>Total</b>	<b>95.33%</b>	<b>100.00%</b>				

✓ Huile de *Punica granatum*

Tableau 9 : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Punica granatum*.

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	33.43%	33.97%	54	9	36	PuPuPu
	9.39%	9.55%	54	9	36	PuPuαE
	5.43%	5.52%	54	9	36	PuPuCt
	1.29%	1.31%	54	9	36	PuPuC18_3e
	1.02%	1.03%	54	9	36	PuαECt
	0.88%	0.89%	54	9	36	PuαEαE
	0.29%	0.30%	54	9	36	PuCtCt
	0.24%	0.24%	54	9	36	PuαEC18_e
	0.14%	0.14%	54	9	36	PuαECt
	8.97%	9.12%	54	8	38	LPuPu
	1.68%	1.71%	54	8	38	LPuαE
	0.97%	0.99%	54	8	38	LPuCt
	0.23%	0.23%	54	8	38	LPuαE
	8.57%	8.71%	54	7	40	OPuPu
	4.25%	4.32%	52	6	40	PPuPu
	1.61%	1.63%	54	7	40	OPuαE
	1.21%	1.23%	54	7	40	AsPuPu
	0.93%	0.94%	54	7	40	OPuCt
	0.80%	0.82%	54	7	40	LLPu
	0.80%	0.81%	52	6	40	PPuαE
	0.46%	0.47%	52	6	40	PPuCt
	0.23%	0.23%	54	7	40	AsPuαE
	0.22%	0.22%	54	7	40	OPuC18_e
	0.13%	0.13%	54	7	40	AsPuCt
	0.11%	0.11%	52	6	40	PPuC18_e
	0.12%	0.12%	53	6	41	MaPuPu
	3.31%	3.36%	54	6	42	SPuPu
	1.53%	1.56%	54	6	42	OLPu
	1.00%	1.01%	56	7	42	PuPuGo
	0.76%	0.77%	52	5	42	PLPu
	0.62%	0.63%	54	6	42	SPuαE
	0.36%	0.36%	54	6	42	SPuCt
	0.22%	0.22%	54	6	42	AsLPu
	0.19%	0.19%	56	7	42	PuαEGo
	0.14%	0.15%	54	6	42	OLαE
	0.11%	0.11%	56	7	42	PuCtGo
	0.73%	0.74%	54	5	44	OOPu
	0.73%	0.74%	52	4	44	POPu
	0.68%	0.69%	56	6	44	PuPuAr
	0.59%	0.60%	54	5	44	SLPu
	0.21%	0.21%	54	5	44	OAsPu
	0.18%	0.18%	50	3	44	PPPu
	0.18%	0.18%	56	6	44	LPuGo
	0.13%	0.13%	56	6	44	PuαEAr
	0.10%	0.10%	52	4	44	PAsPu
	0.57%	0.57%	54	4	46	SOPu
	0.28%	0.28%	52	3	46	PSPu
	0.17%	0.17%	56	5	46	OPuGo
	0.12%	0.12%	56	5	46	LPuAr
	0.12%	0.12%	56	4	48	OPuAr
	0.11%	0.11%	54	3	48	SSPu
<b>Total</b>	<b>98.38%</b>	<b>100.00%</b>				

✓ Huile de *Ribes nigrum*

Tableau 10 : Détermination des TAG probable dans l'huile de *Ribes nigrum*.

	Probabilité	Probabilité normalisée	NC	DBN	NP	Nom
	0.36%	0.41%	54	10	34	LmγLnSt
	0.18%	0.21%	54	10	34	LLnSt
	0.18%	0.20%	54	10	34	γLmγLnSt
	0.11%	0.13%	54	10	34	LStSt
	1.16%	1.31%	54	9	36	LLnSt
	1.14%	1.29%	54	9	36	LγLnSt
	0.91%	1.03%	54	9	36	LnLnγLn
	0.90%	1.02%	54	9	36	LmγLmγLn
	0.31%	0.35%	54	9	36	LnLnLn
	0.30%	0.33%	54	9	36	γLmγLmγLn
	5.75%	6.50%	54	8	38	LLmγLn
	2.92%	3.30%	54	8	38	LLnLn
	2.83%	3.20%	54	8	38	LγLmγLn
	1.82%	2.06%	54	8	38	LLSt
	0.29%	0.33%	54	8	38	OLnSt
	0.29%	0.33%	54	8	38	OγLnSt
	0.18%	0.21%	52	7	38	PLnSt
	0.18%	0.20%	52	7	38	PγLnSt
	0.16%	0.18%	54	8	38	LLn18_3?
	0.16%	0.18%	54	8	38	LγLn18_3?
	9.19%	10.39%	54	7	40	LLLn
	9.06%	10.24%	54	7	40	LLγLn
	1.46%	1.65%	54	7	40	OLmγLn
	0.92%	1.04%	54	7	40	OLSt
	0.91%	1.03%	52	6	40	PLmγLn
	0.74%	0.84%	54	7	40	OLnLn
	0.72%	0.81%	54	7	40	OγLmγLn
	0.58%	0.65%	52	6	40	PLSt
	0.46%	0.52%	52	6	40	PLnLn
	0.45%	0.51%	52	6	40	PγLmγLn
	0.25%	0.29%	54	7	40	LL18_3?
	0.15%	0.16%	54	7	40	LLmγLn
	9.65%	10.92%	54	6	42	LLL
	4.65%	5.26%	54	6	42	OLLn
	4.59%	5.19%	54	6	42	OLγLn
	2.91%	3.29%	52	5	42	PLLn
	2.86%	3.24%	52	5	42	PLγLn
	7.33%	8.29%	54	5	44	OLL
	4.58%	5.18%	52	4	44	PLL
	2.32%	2.62%	52	3	46	POL
	1.85%	2.10%	54	4	46	OOL
	1.12%	1.26%	54	4	46	SLL
	0.57%	0.64%	54	3	48	SOL
	0.35%	0.40%	52	2	48	PSL
	0.29%	0.33%	52	2	48	POO
	0.18%	0.21%	50	1	48	PPO
	0.16%	0.18%	54	3	48	OOO
<b>Total</b>	<b>88.42%</b>	<b>100.00%</b>				



**Titre :** Recherche de conditions alternatives à l'utilisation de solvants chlorés en Chromatographie Liquide Non-Aqueuse à Polarité Inversée de Phases. Applications à l'analyse des lipides présents dans les milieux complexes.

**Mots clés :** Triacylglycerols polyinsaturés, Butanol, UHPLC-MS, optimisation chromatographique, huile d'olive

**Résumé :** Déterminer la composition en triacylglycérols des huiles végétales est un défi important à relever aussi bien en biologie végétale que dans le domaine médical ou celui de l'industrie agro-alimentaire. La chromatographie en phase liquide à polarité inversée de phases en milieu non aqueux (NARP-LC) est la méthode la plus utilisée, avec cependant une utilisation récurrente de solvants chlorés.

Le premier objectif de ce travail a été de proposer des conditions analytiques alternatives n'utilisant pas de solvants chlorés. Pour ce faire, nous avons établi le diagramme de force éluante sur phases stationnaires en C18 des phases mobiles binaires constituées d'acétonitrile comme solvant faible et de divers solvants forts (acétone, iso-propanol, acétate d'éthyle, butanol) à quatre températures différentes (25, 43, 63 et 85°C).

La comparaison dans des conditions iso-éluantes de l'analyse de 9 huiles de graines contenant une large gamme de TAG nous a permis de montrer que le mélange MeCN/BuOH 74/26 à 25°C est le meilleur choix, en terme de sélectivité pour l'analyse des TAG. Ce qui répond à notre premier objectif.

Dans un second temps, nous avons comparé le potentiel séparatif des phases stationnaires de nouvelle génération à petit diamètre de particules, partiellement ou totalement poreuses. L'optimisation des conditions chromatographiques nous a permis de décrire deux systèmes chromatographiques, très performants, en termes d'efficacité et de rapidité.

Le premier permet la séparation de TAG contenant des acides gras polyinsaturés isomères de position en C18 : 3 et C18 : 2. L'identification de ces isomères particuliers a été réalisée grâce à la synthèse d'informations complémentaires, obtenues en GC/MS, LC/MS ainsi que l'utilisation de lois de rétention chromatographiques. En outre, ce travail nous a permis de proposer un tableau récapitulatif regroupant un très grand nombre de TAG, qui n'ont jamais été décrits à notre connaissance.

Le second permet une analyse rapide de l'huile d'olive, en moins de 5 min, tout en respectant les consignes qualitatives imposées par l'organisme «Conseil Oléique International (COI)». Comparée aux méthodes officielles couramment utilisées, elle mérite d'être proposée comme méthode de référence pour le contrôle de qualité de l'appellation de ces huiles.

**Title :** Search for alternative conditions for the use of chlorinated solvents in non-aqueous Reversed Phases liquid chromatography. Application to the analysis of the lipids present in complex media.

**Keywords :** Polyunsaturated triacylglycerols, Butanol, UHPLC-MS, chromatographic optimization, olive oil.

**Abstract:** The determination of triacylglycerols in vegetable oils is an important challenge in plant biology, in the medical field, and in food industry. Nowadays, non-Aqueous Reversed Phase Liquid Chromatography (NARP-LC) using chlorinated solvents is commonly used for this purpose.

The first objective of this work was to develop alternative analytical conditions that can avoid using chlorinated solvents. In a first step, by using C18 stationary phases, we have established the eluotropic solvent strength scale as a function of temperature of several binary mobile phases consisting of acetonitrile as weak solvent and various strong solvents including acetone, isopropanol, ethyl acetate, and butanol. The comparison of the results obtained under iso-eluotropic conditions for nine seed oils containing a wide range of TAG enabled us to show that the MeCN/BuOH (74/26, v/v) mixture operating at 25 °C are the best mobile phase conditions for TAG analysis, in terms of selectivity, thus avoiding the use of chlorinated solvents.

In a second step, we compared the separation of TAGs on new generation of fully or partially porous stationary phase particles of small diameter. After optimizing the separating conditions, the obtained data allowed us to propose two highly efficient chromatographic systems.

The first system enables the efficient separation of C18:3 and C18:2 positional isomers of C18 polyunsaturated fatty acids containing TAG.

For the identification of these TAG isomers, it was necessary to combine the data obtained by GC-MS and LC-MS as well as the data obtained by the application of some chromatographic retention laws. Taken together, these results allowed us to provide a list containing a large number of TAG unknown to date.

The second system allows rapid analysis of olive oil in less than 5 min. This system obeying the guidelines of the International Olive Council can be proposed as a candidate reference method for rapid quality control of olive oils.

