



HAL
open science

Apport des solvants alternatifs pour la cartographie du lipidome par chromatographie

Nolwenn Prache

► **To cite this version:**

Nolwenn Prache. Apport des solvants alternatifs pour la cartographie du lipidome par chromatographie. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS052 . tel-01827239

HAL Id: tel-01827239

<https://theses.hal.science/tel-01827239>

Submitted on 2 Jul 2018

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 : 2017SACLS052

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 571

Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Par

Mme Nolwenn Prache

Apport des solvants alternatifs pour la cartographie du lipidome par chromatographie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 07/03/2017 :

Composition du Jury :

M. VAN DER REST Guillaume	Professeur, Université Paris-Sud	Président
M. CARDINAEEL Pascal	Professeur, Université de Rouen	Rapporteur
M ^{me} MENET Marie-Claude	Maître de conférences, Université Paris Descartes	Rapporteur
M. VIAL Jérôme	Maître de conférences, ESPCI Paris	Examineur
M. CHAMINADE Pierre	Professeur, Université Paris-Sud	Codirecteur de thèse
M. THIEBAUT Didier	Directeur de recherche, ESPCI Paris	Codirecteur de thèse

COLLABORATION

❖ UNITÉ INTERDISCIPLINAIRE LIPIDES: SYSTÈMES ANALYTIQUES ET BIOLOGIQUES

Lip(Sys²), Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Faculté de Pharmacie, Univ. Paris-Sud, Université Paris Saclay
Adresse : Lip(Sys)², Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry

❖ LABORATOIRE DES SCIENCES ANALYTIQUES, BIOANALYTIQUES ET MINIATURISATION

LSABM, UMR 8231 Chimie Biologie Innovation CNRS—ESPCI, Université PSL, ESPCI Paris
Adresse : LSABM ESPCI Paris, 10 rue Vauquelin 75231, Paris Cedex 05, France

ENCADREMENT

Ce projet de thèse a été réalisé sous la direction du Professeur PIERRE CHAMINADE (Lyp(Sys)², Faculté de Pharmacie de Paris-Sud) et le Docteur DIDIER THIEBAUT (LSABM, ESPCI Paris) ;

FINANCEMENT

Ce projet a été financé par une allocation du DIM Analytics et de la région Ile de France.



Remerciements

Je souhaite, tout d'abord, exprimer ma gratitude au Docteur MARIE-CLAUDE MENET ainsi qu'au Professeur PASCAL CARDINAEL, d'avoir accepté de juger la qualité de mes travaux en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également au Docteur JEROME VIAL ainsi qu'au Professeur GUILLAUME VAN DER REST pour avoir accepté d'examiner ces travaux.

Je tiens, également, à remercier la région Ile de France ainsi que le DIM Analytics pour le financement de ce projet de thèse, s'inscrivant dans le cadre d'une collaboration entre l'Unité Interdisciplinaire Lipides : Systèmes Analytiques et Biologiques (Lip(Sys)²) à la Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud et le laboratoire des Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation (LSABM) à l'ESPCI Paris.

J'adresse ma plus sincère reconnaissance au Professeur PIERRE CHAMINADE et au Docteur DIDIER THIEBAUT qui m'ont fait l'honneur d'encadrer cette thèse. Je tenais à vous remercier sincèrement pour la confiance que vous m'aviez accordée au cours de ces trois ans.

Je tiens aussi à remercier SONIA ABREU et PATRICK SASSIAT pour votre aide, votre disponibilité et vos précieux conseils. Sans vous, le « bricolage » n'aurait pas eu le même impact.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur VALERIE PICHON pour m'avoir accueillie au LSABM et m'avoir donné l'occasion de m'investir dans cette expérience enrichissante, ainsi qu'au Professeur ARLETTE BAILLET GUFFROY pour votre aide, vos conseils et votre sympathie.

Je tiens à remercier le Docteur SANA TFAILI, le Docteur ALESSIA QUATELA, le Docteur MANUEL MOUSSA ainsi que STEPHANIE et GUILLAUME pour votre temps, votre bonne humeur, votre soutien sans faille, tous ces échanges scientifiques et personnels qui font de ces trois ans de doctorat une expérience inoubliable

A tous les membres des laboratoires Lip(Sys)² et LSABM, je vous remercie sincèrement pour votre accueil et pour tous les bons moments partagés.

Résumé

Mots clés : Lipides, Solvants alternatifs, Chromatographie

Le développement du concept de chimie analytique « verte » représente l'une des préoccupations majeures du tout début du 21^{ème} siècle ; elle a amené les différents acteurs du domaine à s'interroger sur le bien-fondé du développement de méthodes ayant un impact sur l'environnement et sur l'homme.

Dans le domaine de l'analyse des lipides, les séparations par classe nécessitent de travailler sur une très large gamme de polarité, conséquence directe de la diversité des structures et des solubilités mises en jeu. La chromatographie en phase normale (NPLC) permet de réaliser l'élution des composés par ordre de polarité croissante. La mise en solution des classes lipidiques nécessite le recours à des mélanges de solvants incluant le chloroforme, le n-heptane, dichlorométhane. Les solvants organiques classiquement utilisés en NPLC, bien que performants, soulèvent aussi de nombreux problèmes liés à leur toxicité pour l'homme et l'environnement, leur volatilité, ou encore leur origine quand ils sont issus des hydrocarbures fossiles.

Une des voies envisagée est la substitution de ces solvants par des solvants alternatifs, tels ceux proposés par les différents acteurs de la chimie verte. L'intérêt suscité par ces solvants est prometteur en termes de réduction de l'utilisation de solvants avec un impact significatif sur l'environnement. Les propriétés de la chromatographie en phase dioxyde de carbone supercritique sont semblables à la NPLC et offrent également une alternative verte à cette méthode.

Ce travail a mis en évidence que des méthodes de séparation pourraient être développées avec des solvants alternatifs au n-heptane, au méthanol et au chloroforme. Leur utilisation est compatible avec la chromatographie liquide et la chromatographie supercritique et offre une meilleure sélectivité en termes de séparation des classes de lipides. La compatibilité de solvants alternatifs avec ELSD et la spectrométrie de masse a également été évaluée, ce qui a montré que l'absence de pureté suffisante pourrait être un problème. Cependant, ce problème a également été observé avec l'utilisation de solvants commerciaux, qui présentaient des impuretés telles que des acides gras, des polymères et des antioxydants.

Abstract

Keywords: Lipids, Alternative Solvents, Chromatography

Green analytical chemistry development represents one of the main issues of the 21st century. Many investigators in analytical chemistry are actually involved in the development of well-established analytical methods that prevent irreversible damage to humans and environment.

In the domain of lipid analysis, structural diversity as well as difference in solubility of these compounds is leading to work with a very large polarity range to separate lipids by classes. The normal-phase liquid chromatography (NPLC) allows realising the elution of compounds in order of increasing polarity. The solubilisation of lipid classes requires the use of a mixture of several solvents, among them chloroform, n-heptane, dichloromethane. Moreover, organic solvents traditionally used in NPLC, although well performing are raising different problems due to their original source, i.e. fossil hydrocarbons, volatility and toxicity for humans and environment.

One of the ways to avoid such solvents is the substitution with alternative solvents, as proposed by various players in green chemistry. The interest raised by these solvents, is promising in terms of reduction of solvent use with a significant environmental impact. The properties of supercritical fluid chromatography using CO₂ are similar to NPLC and also offer a green alternative to this method.

This work has highlighted that separation methods could be developed with alternative solvents to n-heptane, methanol and chloroform. Their use is compatible with liquid and supercritical chromatography and offer better selectivity in terms of separation of lipid classes. The compatibility of alternative solvents with ELSD and mass spectrometry was also evaluated, which showed that the unavailability of sufficient purity could be an issue. However, this problem was also observed with the use of commercial solvents, which presented impurities such as fatty acids, polymers and antioxidants.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
CHAPITRE I : ANALYSE DES LIPIDES	9
I. Définition et rôle des lipides.....	11
1. Classification / Notion et définition des classes lipidiques.....	12
1.1. Acyles gras.....	12
1.2. Glycérolipides.....	13
1.3. Glycérophospholipides	14
1.4. Sphingolipides	14
1.5. Saccharolipides	15
1.6. Polycétides.....	16
1.7. Prénols	17
1.8. Stérols	17
2. Extraits lipidiques	18
II. Analyse des lipides par chromatographie.....	19
1. Applications et limites d'utilisation de la GC.....	19
2. Solubilité des lipides et domaine d'application de la LC et la SFC.....	19
2.1. NPLC	20
2.2. HILIC.....	21
2.3. RPLC	21
2.5. SFC	23
3. Séparation par classe, série d'homologue ou d'espèces moléculaires	23
3.1. Séparation par classe de lipide.....	23
3.2. Séparation par série d'homologues ou d'espèces moléculaires	24
3.3. Analyse globale par chromatographie bidimensionnelle	24
4. Principaux détecteurs utilisés pour l'analyse de lipides en chromatographie.....	25
4.1. Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière et le détecteur à aérosol chargé	25
4.2. Le spectromètre de masse	26
4.2.1. Source d'ionisation	26
4.2.2. Analyseurs	27
III. La lipidomique.....	27
Références bibliographiques chapitre I.....	29
CHAPITRE II : LES SOLVANTS ALTERNATIFS	35
I. Généralités sur la chimie verte	37
II. Les solvants alternatifs	39
1. Agrosolvants	39
1.1. Agrosolvants issus de la filière bois.....	39
1.1.1. D-limonène	39
1.1.2. α -pinène	40
1.2. Agrosolvants issus de la fermentation	40
1.2.1. Lactate d'éthyle.....	40
1.2.2. Acétate d'isoamyle (ou isopentyle)	41
1.2.3. 2-méthyltétrahydrofurane	41
1.3. Agrosolvant issus de la filière oléagineuse	42
1.3.1. Esters méthyliques d'acides gras	42
1.3.2. Glycérol et ses dérivés	42
2. Solvants alternatifs non issus de sources renouvelables	42
2.1. Liquides ioniques.....	42
2.2. Cyclopentyl methyl éther.....	43

2.3. Dioxyde de carbone supercritique	43
2.4. Hexaméthylsiloxane	44
III. Compatibilité des solvants avec la NPLC-ELSD	44
1. Viscosité	45
2. Volatilité	45
3. Polarité.....	45
4. Pureté des solvants alternatifs.....	47
IV. Alternatives aux solvants conventionnels en NPLC.....	47
1. Alternatives au n-heptane	47
2. Alternatives au chloroforme	48
3. Alternative à la NPLC : la SFC	48
Références bibliographiques chapitre II	49
CHAPITRE III : APPAREILLAGE ET METHODES	51
I. Chromatographie en phase liquide	53
1. Système.....	53
1.1. Pompe	53
1.2. Vanne 6 voies – 2 positions	53
1.3. Pré-colonne	54
1.4. Injection	54
1.5. Contrôle de la température.....	54
1.6. Volume de délai du système	54
1.7. Détection UV	55
1.8. Détection par diffusion de la lumière.....	55
1.9. Détection par spectrométrie de masse.....	55
2. Colonnes, phase stationnaire et phase mobile.....	56
2.1. Phase stationnaire	56
2.2. Phase mobile.....	56
II. Chromatographie en phase supercritique	57
1. Système.....	57
1.1. Pompage	57
1.2. Module d'injection.....	58
1.3. Contrôle de la température.....	58
1.4. Régulation de la pression.....	58
1.5. Détection UV	58
1.6. Détection par diffusion de la lumière.....	58
2. Colonnes, phase stationnaire et phase mobile.....	59
2.1. Phase stationnaire	59
2.2. Phase mobile.....	59
2.2.1. Choix de la phase supercritique	59
2.2.2. Choix des modificateurs polaires.....	59
III. Méthodes spécifiques.....	60
1. Purification des solvants apolaires.....	60
1.1. n-heptane.....	60
1.2. HMDS.....	60
2. Méthode de désactivation/activation de la silice vierge.....	60
3. Caractérisation des impuretés dans le n-heptane	61
PARTIE II : RESULTATS.....	63
CHAPITRE IV : APPORT DES SOLVANTS ALTERNATIFS POUR LA SEPARATION DE CLASSES LIPIDIQUES PAR NPLC-ELSD.....	65
INTRODUCTION.....	67
ALTERNATIVE SOLVENTS FOR IMPROVING THE GREENNESS OF NORMAL PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF LIPID CLASSES	69

1. Introduction.....	69
2. Materials and methods	71
2.1. Chemicals.....	71
2.2. Sample preparation	72
2.3. Apparatus	72
2.4. Deactivation/re-activation method.....	74
2.5. Statistics	74
3. Results and discussion	74
3.1. Screening of alternative solvents	74
3.2. Adsorption chromatography	76
3.3. Screening of pure solvents under isocratic conditions.....	78
3.4. Contributions of alternatives solvents to chloroform on the separation	79
3.5. Contribution of HMDS on the separation.....	81
3.6. Green ternary gradient development for elution of polar classes of lipids	83
4. Conclusion	84
Appendix A. Supplementary data	86
References.....	87
CONCLUSION.....	91
CHAPITRE V : APPORT DES SOLVANTS ALTERNATIFS POUR LA SEPARATION DE CLASSES LIPIDIQUES EN NPLC-MS	93
INTRODUCTION.....	95
EVALUATION OF ALTERNATIVE SOLVENTS FOR LIPID CLASSES SEPARATION BY NORMAL PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY	96
1. Introduction.....	96
2. Materials and methods	97
2.1. Chemicals.....	97
2.2. Sample preparation for LC-MS coupling	98
2.3. Apparatus	98
2.3.1. NPLC conditions.....	98
2.3.2. MS conditions.....	100
3. Results and discussion	100
3.1. Compatibility of HMDS with ESI source.....	100
3.2. Compatibility of alternative solvent with APCI source	102
3.2.1. Direct infusion of HMDS	102
3.2.2. Direct infusion of lipid standards.....	102
3.3. LC-APCI-MS coupling.....	103
3.3.1. HMDS as weak solvent.....	103
3.3.2. n-heptane as a weak solvent.....	104
4. Conclusion	107
References.....	108
Figures	110
CONCLUSION.....	115
CHAPITRE VI : APPORT DES SOLVANTS ALTERNATIFS POUR LA SEPARATION DE LIPIDES EN SFC-ELSD.....	117
INTRODUCTION	119
EVALUATION OF ALTERNATIVE SOLVENTS FOR NON-POLAR LIPID CLASSES SEPARATION BY SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY AND EVAPORATIVE LIGHT-SCATTERING	
DETECTION.....	120
1. Introduction.....	120
2. Materials and methods	122
2.1. Chemicals.....	122

2.2 Sample preparation	123
2.3 Apparatus	123
3. Results and discussion	124
3.1. Compatibility between alternative solvents and stationary phases.....	125
3.1.1. Diol column	125
3.1.2. EP column.....	127
3.1.3. C18 column.....	127
3.2. Impact of alternative solvents on the retention mechanism on C18 phase	128
3.2.1. Evaluation of eluting strength.....	128
3.2.2. Evaluation of the selectivity.....	130
3.3. Alternative solvents and lipid analysis	131
4. Conclusion	132
Supplementary data.....	132
References.....	133
Figures	136
CONCLUSION.....	141
CHAPITRE VII : MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DES IMPURETES PRESENTES	
DANS LES SOLVANTS UTILISES POUR LA NPLC	143
INTRODUCTION	145
EVIDENCE OF IMPURITIES IN THE SOLVENTS USED FOR NPLC.....	147
1. Introduction.....	147
2. Materials and methods	148
2.1. Chemicals.....	148
2.2. Sample preparation	149
2.3. Apparatus	149
2.3.1. LC-ELSD applications.....	149
2.3.1.1. NPLC-ELSD.....	149
2.3.1.2. Pre-concentration and fractionation of impurities	150
2.3.2. LC-APCI-MS.....	150
2.4. Deactivation/re-activation method.....	151
2.5. Fractionated impurities identification.....	151
2.5.1. GC-MS.....	151
2.5.2. Direct infusion on APCI-LTQ-Orbitrap	151
2.5.3. Vibrational spectroscopy: Raman microspectrometry	151
2.6. n-heptane purification.....	152
3. Results and discussion	152
3.1. Evidence of system peaks occurring during the chromatographic analysis of lipids....	152
3.2. Identification of the cause of the interferences	153
3.2.1. System.....	153
3.2.2. Solvents.....	153
3.2.3. Screening of n-heptane qualities	156
3.2.3.1. NPLC-ELSD.....	156
3.2.3.2. Direct infusion of commercial n-heptane.....	156
3.2.3.3. LC-APCI-MS.....	157
3.3. Investigation of impurities' identity.....	157
3.3.1. Direct infusion of fractionated samples	158
3.3.2. Raman spectroscopy	158
3.3.3. GC-MS.....	159
3.4. Purification of n-heptane	160
4. Conclusion	160
Supplementary data.....	162
References.....	163
Figures	165

CONCLUSION.....	175
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE.....	177
ANNEXES.....	181
ANNEXE I : ACTIVATION DE LA SILICE VIERGE.....	183
I. Ajustement de la teneur en eau des solvants	183
II. Retour à l'équilibre entre deux injections	184
III. Activation de la silice	185
1. Activation par les solvants.....	185
2. Activation par séchage thermique.....	185
3. Développement d'une méthode de désactivation/activation.....	188
3.1. Protocole n°4	188
3.2. Adaptabilité de la méthode	189
ANNEXE II : STRUCTURES DES LIPIDES ET COMPOSES CHIMIQUES ETUDIES.....	191
ANNEXE III : STRUCTURES DES SOLVANTS ALTERNATIFS	195
ANNEXE IV : PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS	196

Liste des figures

Figure I.1: Structure des principales classes d'acyles gras.....	13
Figure I.2: Structure des principales classes de glycérolipides.....	13
Figure I.3: Structure des principales classes de glycérophospholipides.....	14
Figure I.4: Structure des principales classes de sphingolipides.....	15
Figure I.5 : Structure des principales classes des saccharolipides.....	16
Figure I.6 : Structure des principales classes des polycétides.....	16
Figure I.7 : Structure des principales classes des prénoles.....	17
Figure I.8 : Structure des principales classes de stérols.....	18
Figure I.9 : Paramètres de solubilité (δ) des phases stationnaires (δ_s), des lipides (δ_A) et des phases mobiles (δ_M) [12].....	20
Figure I.10: Zone de polarité couverte par la RPLC (rouge), la NARP (jaune), l'HILIC (vert) et la NPLC (bleu).....	22
Figure III.1 : Schéma général du système HPLC.....	53
Figure III.2 : Schéma d'utilisation de la vanne 6 voies - deux positions.....	54
Figure IV.1:NP-HPLC chromatograms of the separation of non-polar lipid classes (CE, TG, ST, FA, DG, and MG). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150 × 2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5 mL/min, column temperature 40°C, binary linear gradient from 100% solvent A to 60% solvent A with a slope of 1%/min. Solvent A: n-heptane and solvent B: chloroform (a), IA (b), 2-MeTHF (c) and CPME (d). Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG), stigmaterol (ST), palmitic acid (FA), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG), 1-stearoyl-rac-glycerol (MG) and dead volume (*).	80
Figure IV.2:NP-HPLC chromatograms of the separation of non-polar lipid classes (CE, TG, ST, FA, DG, and MG). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150 × 2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5 mL/min, column temperature 40°C, binary linear gradient from 100% solvent A to 60% solvent A with a slope of 1%/min. Solvent A: HMDS and solvent B: IA (a), 2-MeTHF (b) and CPME (c). Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG), stigmaterol (ST), palmitic acid (FA), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG), 1-stearoyl-rac-glycerol (MG) and dead volume (*).	82
Figure IV.3:NP-HPLC chromatograms of the separation of 10 lipid classes (CE, TG, ST, FA, DG, MG, MGDG, DGDG, PE and PC). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150 × 2.1 mm, 5 μ m, 150 A), flow-rate 0.5 mL/min, column temperature 40°C, ternary gradient composed by (A): HMDS, (B): (a) IA; (b) 2-MeTHF; or (c) CPME, (C): ethanol:water (95:5, v:v). Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG), stigmaterol (ST), palmitic acid (FA), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG), 1-stearoyl-rac-glycerol (MG), galactosyl diglyceride (MGDG), digalactosyl diglyceride (DGDG), L-phosphatidylethanolamine (PE), L-phosphatidylcholine (PC) and dead volume (*).	83
Figure V.1: Mass spectra of pure HMDS (A) and twice distilled HMDS (B) in positive ion mode by direct infusion, APCI source.....	110
Figure V.2: Mass spectra of pure HMDS (A) and twice distilled HMDS (B) in negative ion mode by direct infusion, APCI source.....	111
Figure V.3: Mass spectra of TG in positive ion mode. Solvent: H/IA (B) and HMDS/IA (A) by direct infusion, APCI source.....	112
Figure V.4: Mass spectra of pure HMDS in negative (A) and positive (B) ion mode by LC-MS coupling, APCI source.....	113
Figure V.5: TICs of the separation of 10 lipid classes (CE, TG, ST, FA, DG, MG, MGDG, DGDG, PE and PC) by NPLC-APCI-MS. HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, ternary gradient composed by (a): n-heptane, (b): (V.5.D,H) IA; (V.5.B, F) 2-MeTHF; or (V.5.C,G) CPME or (V.5.A,E) EA:C (70:30, v:v), (C): ethanol:water (95:5, v:v). The APCI-MS conditions: acquisitions were performed in negative (V.5.A, B, C, D) and positive (V.5.E, F, G, H) ion mode, nebulizer gas: 8; curtain gas: 8; nebulizer current: +/-5; temperature: 300°C; declustering potential: +/-60V;	

	focusing potential: +/-320V; entrance potential: +/-9; mass range: 215-1500. Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG), stigmasterol (ST), palmitic acid (FA), methyl stearate (FAME), Glucosylceramides (GluCer), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG), 1-stearoyl-rac-glycerol (MG), galactosyl diglyceride (MGDG), digalactosyl diglyceride (DGDG), L- α -phosphatidylethanolamine (PE), L- α -phosphatidylcholine (PC).	114
Figure VI.1:	Chromatographic profile of ipriflavone elution on a Princeton SFC Diol column (3.0 x 100 mm; 3 μ m). SFC conditions: flow-rate 1mL/min, outlet pressure 150 bar, column temperature 50°C, mobile phase: CO ₂ :modifier (95:5, %:%). Modifiers were: methanol (A), ethanol (B), 2-propanol (C), 2-MeTHF (D), CPME (F) and IA (E).....	136
Figure VI.2:	Impact of modifier proportion on the variation of log k values on a 4,6 x 100 mm Princeton SFC 2-ethylpyridine 5 μ m column (VI.2.A) and a 4,6 x 150 mm Kinetex Core-shell™ C18 2,6 μ m column (VI.2.B). SFC conditions: flow-rate 1mL/min, outlet pressure 150 bar, column temperature 50°C, mobile phase: CO ₂ :modifier (95:5, %:%). Modifiers were: methanol (red), ethanol (green), 2-propanol (grey), 2-MeTHF (light blue), CPME (blue) and IA (yellow).	137
Figure VI.3:	Impact of modifier proportion on the variation of log k values of ipriflavone (VI.3.A) and warfarin (VI.3.B) on a 4,6 x 150 mm Kinetex Core-shell™ C18 2,6 μ m column. SFC conditions: flow-rate 1mL/min, outlet pressure 150 bar, column temperature 50°C, mobile phase: CO ₂ :modifier (95:5, %:%). Modifiers were: methanol (red), ethanol (green), 2-propanol (grey), 2-MeTHF (light blue), CPME (blue) and IA (yellow).	138
Figure VI.4:	Impact of modifier proportion on the variation of α values on a 4,6 x 150 mm Kinetex Core-shell™ C18 2,6 μ m column. SFC conditions: flow-rate 1mL/min, outlet pressure 150 bar, column temperature 50°C, mobile phase: CO ₂ :modifier (95:5, %:%). Modifiers were: methanol (red), ethanol (green), 2-propanol (grey), 2-MeTHF (light blue), CPME (blue) and IA (yellow).	139
Figure VI.5:	SFC chromatograms of the separation of 7 lipids (CE, TG ₁ , TG ₁ , TG ₁ , CO, FA, FAME). SFC conditions: 4.6 x 150 mm Kinetex Core-shell™ C18 2.6 μ m, flow-rate 2.0mL/min, outlet pressure 180 bar, column temperature 60°C, gradient modifier started with 10% modifier (1.5 min) to 20% modifier (8min) with a slope of 20%/min. Modifiers evaluated are Methanol (VI.6.D), IA (VI.6.A), CPME (VI.6.C) and 2-MeTHF (VI.6.B). Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG ₁), Glyceryl tristearate (TG ₂); Glyceryl triarachidate (TG ₃); cholesterol (CO), palmitic acid (FA), and methyl stearate (FAME).....	140
Figure VII.1:	Highlight of impurities presence by comparison of chromatograms corresponding to a lipid classes' separation (VII.1.A.) and a blank test (VII.1.B). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, ternary gradient composed by (a): H ₁ , (b): EA:C (70:30, v:v), (c): ethanol:water (95:5, v:v). Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG), stigmasterol (ST), palmitic acid (FA), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG), 1-stearoyl-rac-glycerol (MG), galactosyl diglyceride (MGDG), digalactosyl diglyceride (DGDG), L- α -phosphatidylethanolamine (PE), L- α -phosphatidylcholine (PC), impurity 1(X ₁), impurity 2(X ₂), impurity 3(X ₃), impurity 4(X ₄) and * dead volume.....	165
Figure VII.2:	Highlight of impurities presence by comparison of chromatograms obtained during the reconditioning of the column (VII.2.A), the first elution after the reconditioning step (VII.2.B), three repetitions of ternary gradient elution performed in the same condition (VII.2.C). Reconditioning step condition: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), column temperature 40°C, flow-rate 1.0mL/min (isocratic mode), volume of H ₁ : 100V ₀ . Ternary gradient conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, ternary gradient composed by (a): H ₁ , (b): EA:C (70:30, v:v), (c): ethanol:water (95:5, v:v). Peak annotation: impurity 1(X ₁), impurity 2(X ₂), impurity 3(X ₃), and impurity 4(X ₄).	166
Figure VII.3:	Impact of the equilibration time on the presence and area of impurities. Chromatograms were obtained after an equilibration time of: 0 min (VII.3.A); 5min (VII.3.B); 10 min (VII.3.C); 20 min (VII.3.D) and 30 min (VII.3.E). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, ternary	

- gradient composed by (a): H₁, (b): EA:C (70:30, v:v), (c): ethanol:water (95:5, v:v). Peak annotation: impurity 1(X₁), impurity 2(X₂), impurity 3(X₃), and impurity 4(X₄)..... 167
- Figure VII.4: Impact of the B solvent on the presence and elution time of impurities. HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μm, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, ternary gradient composed by (a): H₁, (b): Chloroform (VII.4.A) or dichloromethane (VII.4.B) or EA (VII.4.C); (c): ethanol:water (95:5, v:v). 168
- Figure VII.5: Highlight of impurities by a screening of different quality of n-heptane. Chromatograms were obtained with H₁ (VII.5.A), H₂ (VII.5.B), H₃ (VII.5.C), H₄ (VII.5.D), H₅ (VII.5.E), H₆ (VII.5.F), H₇ (VII.5.G), H₈ (VII.5.H), H₉ (VII.5.I) and H₁₀ (VII.5.J). HPLC conditions : Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μm, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, binary linear gradient from 100% solvent a to 20% solvent a with a slope of 5%/min. Solvent a is H_x and solvent B is chloroform. 169
- Figure VII.6: Mass spectra of commercial n-heptane performed in positive and negative ion mode. Three batches of the same HPLC grade were evaluated. Mass spectra VII.6.A (positive) and VII.6.D (negative) correspond to direct infusion of H1. Mass spectra VII.6.B (positive) and VII.6.E (negative) correspond to direct infusion of H2. Mass spectra VII.6.C (positive) and VII.6.F (negative) correspond to direct infusion of H2. The APCI-MS conditions are: infusion flow-rate: 10μL/min; capillary temp: 300°C; S.lens RF level: 60%; temp: 300°C; sheath Gas Flow Rate (arb): 40; aux gas flow rate (arb): 5; sweep gas flow rate (arb): 5; discharge current: 5μA and discharge voltage: 2.84 kV, analyzer: FTMS; mass range: from 50 to 1000; resolution: 30000; full scan 170
- Figure VII.7: TICs of ternary gradient elution performed with NPLC-APCI-MS. HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μm, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, ternary gradient composed by (a): H₁, (b): EA:C (70:30, v:v), (c): ethanol:water (95:5, v:v). The APCI-MS conditions: acquisitions were performed in negative (VII.7.A) and positive (VII.7.B) ion mode, nebulizer gas: 8; curtain gas: 8; nebulizer current: +/-5; temperature: 300°C; declustering potential: +/-60V; focusing potential: +/-320V; entrance potential: +/-9; mass range: 215-1500. Peak annotation: impurity 1(X₁), impurity 2(X₂), impurity 3(X₃), and impurity 4(X₄). 171
- Figure VII.8: Mass spectra of polydimethylcyclsiloxanes present in commercial n-heptane performed in positive ion mode. The APCI-MS conditions are: infusion flow-rate: 10μL/min; capillary temp: 300°C; S.lens RF level: 60%; temp: 300°C; sheath Gas Flow Rate (arb): 40; aux gas flow rate (arb): 5; sweep gas flow rate (arb): 5; discharge current: 5μA and discharge voltage: 2.84 kV, analyzer: FTMS; mass range: from 0 to 2000; resolution: 30000; full scan. 172
- Figure VII.9: Assignment of characteristic vibrational bands for the fractionated impurities. Spectra A and B were observed for all X_n samples. Spectrum C was only observed for X₅. 173
- Figure VII.10: Highlight of impurities presence by comparison of chromatograms corresponding to commercial n-heptane (VII.10.A.) and a purified n-heptane test (VII.10.B). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μm, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, ternary gradient composed by (a): commercial H₁ (VII.10.A) or purified H₁ (VII.10.B.), (b): EA:C (70:30, v:v), (c): ethanol:water (95:5, v:v). Peak annotation: impurity 1 (X₁), impurity 2 (X₂), impurity 3 (X₃), impurity 4 (X₄), impurity 5 (X₅) and impurity 6 (X₆). 174
- Figure AI.1 : Superposition de trois chromatogrammes correspondant aux injections de nitrobenzène (0,25g/L) par NP-HPLC-UV. Conditions HPLC : colonne Inertsil SIL-150A (150 x 2,1 mm, 5 μm, 150A), débit 0,5mL/min, température du four 40°C, phase mobile n-heptane sous conditions isocratique. V_{injection} = 1 μL, Détection UV : λ = 254 nm. Les chromatogrammes présentés sur la figure A correspondent au protocole 1 et ceux sur la figure B correspondent au protocole 2. 187
- Figure AI.2 : Superposition de trois chromatogrammes correspondant aux injections de nitrobenzène (0,25g/L) par NP-HPLC-UV. Conditions HPLC : colonne Inertsil SIL-150A (150 x 2,1 mm, 5 μm, 150A), débit 0,5mL/min, température du four 40°C, phase mobile : n-heptane en conditions isocratique, V_{injection} = 1μL, détection UV : λ= 254nm, activation : protocole n°4. 188

Figure AI.3 : (A) Elution du nitrobenzène avec la colonne Inertsil (violet) et la colonne Nucléodur (rose) par NP-HPLC-UV. (B) Superposition de trois chromatogrammes correspondant aux injections de nitrobenzène (0,25g/L) par NP-HPLC-UV réalisé avec de l'HMDS comme solvant faible. Conditions HPLC : colonne Inertsil SIL-150A (150x2,1 mm, 5 µm, 150A), colonne Nucléodur 100A (150x2,0 mm, 5 µm, 100A) débit 0,5mL/min, température du four 40°C, phase mobile n-heptane (A) ou HMDS (B) sous conditions isocratique. $V_{\text{injection}} = 1 \mu\text{L}$, détection UV : $\lambda = 254 \text{ nm}$, activation : protocole n°4.....	190
Figure AII.1: Acylated steryl glucoside (ASG)	191
Figure AII.2: Cholesteryl tripalmitate (CE).....	191
Figure AII.3: Cholesterol (CO).....	191
Figure AII.4: 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG).....	191
Figure AII.5: Digalactosyldiacylglycerol (DGDG)	192
Figure AII.6: Palmitic acid (FA).....	192
Figure AII.7: Methyl stearate (FAME).....	192
Figure AII.8: Glucosylceramide (GluCer).....	192
Figure AII.9: 1-stearoyl-rac-glycerol (MG).....	192
Figure AII.10: Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG).....	193
Figure AII.11: L- α -phosphatidylethanolamine (PE).....	193
Figure AII.12: L- α -phosphatidylcholine (PC)	193
Figure AII.13: Stigmasterol (ST).....	193
Figure AII.14: Glyceryl tripalmitate (TG ou TG ₁)	194
Figure AII.15: Glyceryl tristearate (TG ₂)	194
Figure AII.16 : Glyceryl triarachidate (TG ₃)	194
Figure AII.17 : Warfarin	194
Figure AII.18 : Ipriflavone	194
Figure A.III.1: Hexamethyldisiloxane (HMDS).....	195
Figure A.III.2: Isopentyl acetate (IA)	195
Figure A.III.3: Cyclopentyl methyl ether (CPME).....	195
Figure A.III.4: 2-methyltetrahydrofuran (2-MeTHF).....	195

Liste des tableaux

Tableau II.1 : Propriétés physico-chimiques des solvants conventionnels et alternatifs.	46
Tableau III.1 : Valeurs utilisées pour le couplage LC-MS ou introduction directe des échantillons en ESI ou APCI.....	55
Tableau III.2 : Spécifications générales du dioxyde de carbone de qualité 4.5 (Messer).....	59
Table IV.1: Ternary gradient composition.	73
Table IV.2: Physical and chemical properties of non-polar solvents and of solvents of medium polarity.	77
Table IV.3: Effect of mobile phase solvent on retention factor, peak height, signal to noise ratio and LOD for CE and MG under isocratic conditions.....	81
Table IV.4: Resolution values of lipid standards for each composition of ternary gradient.	84
Table IV.S1: Retention time, coefficient of variation of retention time, resolution and time corrected resolution criterion of lipid standards for each composition of binary gradient using n-heptane as weak solvent.....	86
Table IV. S2: Retention time, coefficient of variation of retention time, resolution and time corrected resolution criterion of lipid standards for each composition of binary gradient using HMDS as weak solvent.....	87
Table V.1: Ternary gradient composition.....	99
Table V.2: Optimization of source, gas and compounds parameters for ESI and APCI in direct infusion and LC-MS coupling.....	99
Table V.3: Vapor pressure; viscosity; surface tension; dielectric constant; dipole moment of n-heptane; HMDS and water.....	100
Table V.4: Adducts encountered in positive and negative ion mode for the lipid classes' under consideration. The molecular mass (M) of the lipid specie (for monomolecular standards) or the most intense ion (for natural standards) is provided together with the m/z of the detected ions and the corresponding adduct.	106
Table VI.1: Physical and chemical properties of alternative and conventional solvents.....	126
Table VI.2: $\log k_w$, S, ϕ_0 values obtained for ipriflavone and warfarin with each modifier tested.....	129
Table VI.S1: R_s and t _{ne} values of lipid standards for each composition of mobile phase (CO ₂ :modifier).	132
Table VII.1: Ternary gradient composition.	150
Table VII.2: Time elution, area, peak height and width (at the base) values for each peak impurity according to the equilibration time.....	155
Table VII.S1: Calculated and found m/z values of impurities observed by direct infusion on APCI-LTQ-Orbitrap in negative and positive ion mode.	162
Tableau AI.1 : Teneurs en eau dans les solvants commerciaux.....	183
Tableau AI.2 : Protocoles d'activation de la silice réalisés à un débit de 1mL/min.	185
Tableau AI.3 : Plan d'expériences et résultats.	187

Abréviations

CHROMATOGRAPHY

2D: Bidimensional chromatography
C18: Octadecyl column
EP: 2-ethylpyridine column
GC: Gas chromatography
HILIC: Hydrophilic interaction chromatography
HPLC: High pressure liquid chromatography
LC: Liquid chromatography
NARP: Non-aqueous reversed-phase
NPLC: Normal-phase liquid chromatography
PARP: Partially aqueous reversed-phase
PGC: Porous graphite carbon column
RPLC: Reversed-phase liquid chromatography
SFC: Supercritical fluid chromatography
V₀: Dead volume

DETECTOR

APCI: Atmospheric pressure chemical ionisation
API: Atmospheric pressure ion source
APPI: Atmospheric pressure photoionisation
CAD: Charged aerosol detector
CUR: Curtain gas
DAD: Diode array detector
DP: Declustering potential
ELSD: Evaporative light scattering detector
EP: Entrance potential
ESI: Electrospray ionisation source
FP: focusing potential
IS: Turbolonspray Voltage
LOD: Limits of detection
m/z: mass to charge ratio
MS: Mass spectrometry
NC: Nebulizer current
NEB: Nebulizer gas
TQ: Triple quadrupole mass spectrometer

SOLVENTS

2-MeTHF: 2-Methyltetrahydrofuran

BHT: Butylhydroxy toluene
CMR: Carcinogenic, mutagenic, or toxic for reproduction
CO₂: Carbon dioxide
CPME: Cyclopentyl methyl ether
EA:C: Ethyl acetate:chloroform
EL: Ethyl lactate
HMDS: Hexamethyldisiloxane
IA: Isopentyl acetate
IL: Ionics liquids
IPA: 2-propanol
THF: Tetrahydrofuran

LIPID CLASSES

DGs: Diglycerides
FAMEs: Fatty acid methyl esters
FAs: Fatty acids
MGs: Monoglycerides
PLs: Phospholipids
SEs: Steryl esters
STs: Sterols
TGs: Triglycerides

ANALYSED COMPOUND

ASG: acylated steryl glucoside
CE: Cholesteryl palmitate
CO: Cholesterol
DG: 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol
DGDG: digalactosyldiacylglycerols
FA: Palmitic acid
FAME: methyl stearate
GluCer: Glucosylceramide
MG: 1-stearoyl-rac-glycerol
MGDG: monogalactosyldiacylglycerols
PC: L- α -phosphatidylcholine
PE: L- α -phosphatidylethanolamine
ST: Stigmasterol
TG and TG₁: Glyceryl tripalmitate
TG₂: Glyceryl tristearate
TG₃: Glyceryl triarachidate

Introduction générale

Les lipides sont des molécules biologiques possédant une grande diversité structurale. Cette variabilité structurale est liée aux différences de motifs principaux qui définissent les huit grandes familles de lipides, aux différences de nature et de nombre de groupements fonctionnels (notion de classe) ainsi qu'aux variations de longueur de chaînes carbonées et à la présence et position des insaturations (notion d'espèce moléculaire). Les lipides sont impliqués dans le métabolisme, l'homéostasie de l'organisme ainsi que dans certaines maladies. Pour décrire l'ensemble des perturbations subies par un réseau métabolique, il est nécessaire d'avoir accès aux informations liées aux espèces moléculaires. Atteindre ce niveau d'information implique de travailler avec plusieurs modes séparatifs hautement discriminants.

L'examen de la littérature montre que les séparations par classe de polarité des lipides sur silice ou sur les phases greffées polaires utilisées en chromatographie liquide en phase normale (NPLC) exploitent un nombre limité de solvants. Ces derniers étant choisis pour permettre, grâce à leur miscibilité, de couvrir l'ensemble de la gamme de polarité nécessaire, via l'utilisation de gradients ternaires ou quaternaires de composition. L'utilisation de solvants conventionnels, bien que performants, comme le n-heptane, le chloroforme, le dichlorométhane ou encore le tétrahydrofurane (THF) pose des problèmes en termes de toxicité pour l'homme et de risque pour l'environnement mais aussi en termes de volatilité ou de mode de production. Afin de limiter l'utilisation de solvants à impact environnemental important ou présentant des potentialités toxiques dans le cadre du laboratoire, la substitution de ces derniers par des solvants alternatifs, tels ceux proposés par les différents acteurs de la chimie verte, a été envisagée.

Le développement du concept de chimie analytique « verte » représente l'une des préoccupations majeures du tout début du 21^{ème} siècle ; elle a amené les différents acteurs du domaine à s'interroger sur le bien-fondé du développement de méthodes analytiques ayant un impact sur l'environnement et sur l'homme notamment via l'émergence de nouveaux solvants tels les solvants agrosourcés.

L'objectif de ce travail doctoral est de proposer des alternatives issues de la chimie verte, en termes de toxicité et de voies de production, aux solvants classiquement utilisés pour la séparation de classe lipidique permettant d'obtenir des séparations comparables et efficaces.

Ce manuscrit se présente en deux grandes parties qui sont l'étude bibliographique suivie des travaux personnels.

La première partie introduit les méthodes d'analyses (séparation, détection) de référence pour les lipides (classes, espèces moléculaires) en mettant l'accent sur les méthodes permettant l'analyse de classe lipidique comme la NPLC, et plus particulièrement la chromatographie

d'adsorption, la chromatographie en phase dioxyde de carbone (CO₂) supercritique (SFC) ainsi que les détecteurs adaptés à l'analyse de lipides comme le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (ELSD), le détecteur d'aérosol chargé (CAD) et la spectrométrie de masse (MS). L'utilisation de solvants alternatifs en chimie analytique, et plus particulièrement en chromatographie, est limitée. Outre l'intérêt que de tels solvants peuvent présenter dans le cadre de la séparation elle-même, les solvants alternatifs représentent, en termes de diminution de solvants à impact environnemental important ou présentant un caractère toxique, une réelle alternative pour le domaine de l'analyse des lipides. Une autre possibilité est d'exploiter le CO₂ supercritique dont la faible polarité peut être modulée par sa masse volumique, en augmentant la pression de travail, et par ajout de solvants polaires en particulier le méthanol. Cette partie bibliographique permet de mettre en avant le potentiel des solvants alternatifs associé à des techniques d'analyses de référence, qui seront utilisées et développées au cours de ce projet.

La seconde partie de ce mémoire illustre les quatre principales études réalisées au cours de ce développement analytique.

Le premier aspect de ce travail a permis de proposer des alternatives réalistes aux solvants classiquement utilisés en chromatographie d'adsorption, en ciblant principalement les solvants issus de la chimie verte. Les solvants alternatifs sélectionnés n'ayant jamais été utilisés en chromatographie liquide (LC) pour l'analyse de lipides, il a été nécessaire de s'assurer de la compatibilité (en termes de pureté, viscosité, miscibilité) de ces derniers avec le système chromatographique couplé à un ELSD. L'intérêt des solvants alternatifs a aussi été évalué pour des séparations de lipides neutres utilisant des gradients binaires (impliquant un ou deux solvants alternatifs) qui ont permis d'estimer le potentiel de ces solvants d'un point de vue chromatographique. Les analyses ont été complexifiées avec le développement de gradients ternaires intégralement alternatifs permettant d'obtenir des séparations efficaces et comparables à celles obtenues avec des solvants conventionnels.

Le second aspect de ce travail doctoral concerne l'utilisation des solvants alternatifs en MS. Il est important de rappeler que le lipidome représente des centaines de milliers d'espèces moléculaires de lipides. Compte-tenu de la complexité et diversité structurale de ces derniers, le couplage avec un spectromètre de masse s'avère incontournable. Les solvants alternatifs n'ayant jamais été utilisés en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS), une évaluation de leur compatibilité avec les sources électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) a été réalisée. L'apport de l'ionisation des solvants alternatifs pour l'analyse de lipides a ensuite été évalué par confrontation avec des analyses de référence obtenues avec des solvants conventionnels.

L'intérêt des solvants alternatifs de polarité intermédiaire en tant que modificateurs polaires en SFC a été évalué dans un troisième volet. Leur comportement en mélange avec le CO₂ supercritique a été évalué via l'utilisation de composés modèles afin de déterminer leur force éluante sur différentes phases stationnaires classiques de la SFC de même que leur sélectivité et l'incidence de leur présence dans la phase mobile sur la qualité de la détection que ce soit par absorptiométrie dans l'ultraviolet (UV) ou par diffusion de la lumière. L'impact de ce type de phases mobiles pour la séparation de différentes familles de lipides a aussi été étudié notamment en termes de polarité des familles pouvant être éluées, sélectivité, efficacité et résolution des séparations afin de comparer avec les résultats obtenus en NPLC.

Enfin, l'évaluation des capacités chromatographiques des solvants alternatifs repose sur une comparaison des séparations avec celles obtenues avec des solvants conventionnels. Des séparations modèles ont été développées au préalable avec un gradient ternaire utilisant des solvants conventionnels. Des impuretés ont été mises en évidence. Ces composés interférant au niveau de la séparation rendent l'identification et la quantification des classes lipidiques délicates (coélution avec les acides gras, les monoglycérides ainsi que les phospholipides). L'utilisation de plusieurs techniques analytiques a été nécessaire pour incriminer le n-heptane comme source principale de cette contamination mais aussi pour procéder à la caractérisation des impuretés observées (acides gras, phthalates, agent antioxydant, polymère). Différents degrés de pureté ont été testés ainsi que différents lots et fournisseurs. Pour l'ensemble d'entre eux, il a été possible d'observer un phénomène d'accumulation d'impuretés sur la colonne, perturbant l'adsorption et l'identification de nos solutés. La mise en cause du n-heptane ainsi que l'identification des impuretés est un point de plus en faveur de la substitution de ce solvant.

En dernier lieu, une discussion générale clôt ce manuscrit.

Partie I : Etude bibliographique

CHAPITRE I : ANALYSE DES LIPIDES

Les lipides représentent l'un des trois principaux constituants organiques de l'alimentation avec les protéines et les glucides. L'origine des lipides est aussi bien animale que végétale. Classiquement, les lipides sont définis comme un groupe de composés d'origine naturelle qui ont en commun d'être insolubles dans l'eau et d'être solubles dans les solvants organiques [1, 2] tels que le chloroforme, les éthers et les alcools.

I. Définition et rôle des lipides

Définir les lipides en se basant uniquement sur leur solubilité dans les solvants n'est pas totalement exact. En effet, les récents travaux dans le domaine montrent que cette définition exclut les lipides amphiphiles dont le large domaine hydrophile leur permet d'être partiellement hydrosolubles [3, 4]. Selon la définition proposée par Christie, les lipides correspondent « aux acides gras et à leurs dérivés ainsi qu'aux substances apparentées aux acides gras soit par leurs propriétés biochimiques soit par leurs propriétés fonctionnelles » [1]. En 2005, l'ILCNC (International Lipid Classification and Nomenclature Committee) développe un système de classification globalisée des lipides en se basant sur la définition proposée par Fahy et al [4]. Ces derniers décrivent les lipides comme de « petites molécules hydrophobes ou amphiphiles provenant de la condensation de thioesters (acides gras (FAs), glycérolipides, glycérophospholipides (PLs), sphingolipides, saccharolipides et polycétides) ou d'unités isoprènes (phénols et stérols (STs)) respectivement à partir de carbanions et de carbocations ». Les lipides résultant de la condensation des FAs avec des alcools par une liaison ester sont divisés en deux groupes : les lipides simples s'hydrolysant au maximum sous deux formes (FAs, STs ou glycérolipides) ; les lipides complexes, tels que les glycérophospholipides et les glycosphingolipides, s'hydrolysant eux en plus de trois produits. Les lipides, simples ou complexes, représentent une famille hétérogène de composés en termes de structure et de fonctionnalité, ce qui exprime la pluralité des origines et rôles biologiques de ces composés. D'une part les phospholipides (PLs), les glycolipides, les sphingolipides et les STs sont impliqués dans la constitution de la membrane cytoplasmique permettant de maintenir l'intégrité des structures cellulaires [5]. D'autre part les lipides jouent un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique en termes de source d'énergie (FAs) et de stockage (triglycérides, (TGs)) pour l'organisme [6] tandis que d'autres sont impliqués dans des voies de signalisation en tant que 2nd messagers comme les céramides [7]. Enfin certains lipides, tels que les stéroïdes, possèdent une fonction hormonale.

Il existe différents schémas de classification des lipides se basant d'une part sur les différentes définitions des lipides, mais tenant aussi compte, pour certains, de leurs voies de

biosynthèses ou encore de propriétés physico-chimiques facilitant leur analyse. Le point commun de ces classifications est la notion de regroupement par classe lipidique.

1. Classification / Notion et définition des classes lipidiques

Le consortium LIPID Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS), via la base de donnée du même nom [8], classe les lipides selon 8 grandes catégories : les acyles gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides, les saccharolipides, les polycétides, les prénoles et les STs [4]. Cette classification intègre les différences ainsi que les différentes voies de production des lipides qu'il s'agisse d'extraits animaux ou végétaux [9]. Ces huit grandes catégories se distinguent les unes des autres par leurs différences de motifs structuraux au niveau de la chaîne principale du lipide. Chaque catégorie se divise ensuite en classes, en fonction de la nature et du nombre des groupements polaires. Enfin au sein de chaque classe, on retrouve des sous-classes triées, cette fois-ci, en fonction de la structure des chaînes acyles fixées sur la chaîne principale (ramification, longueur des chaînes carbonées, présence et position d'insaturation, présence d'hétéroatomes) permettant ainsi d'accéder aux espèces moléculaires.

1.1. Acyles gras

Les acyles gras constituent une catégorie hétérogène de molécules réparties dans différentes classes. Les FAs et dérivés présentent une succession de groupements méthylène ainsi qu'un acide carboxylique terminal. A cette classe s'ajoute les éicosanoïdes, composés dérivant de l'acide arachidonique ; les esters d'acides gras comprenant les mono- et diesters de cire ainsi que les lactones ; les octadécanoïdes dérivant d'acides gras à 18 atomes de carbone ou encore les docosanoïdes dérivant de l'acide docosahexaénoïque (22 atomes de carbones et un carbocycle insaturé). Le groupement carboxylique peut-être substitué par différents groupements définissant ainsi la classe des alcools gras (-OH), des aldéhydes gras (-CH=O), des amides gras (-CONH₂), des nitriles gras (-C≡N) ou encore des éthers gras (-C-O-R). Les structures des principales classes d'acyles gras sont présentées dans la figure I.1.

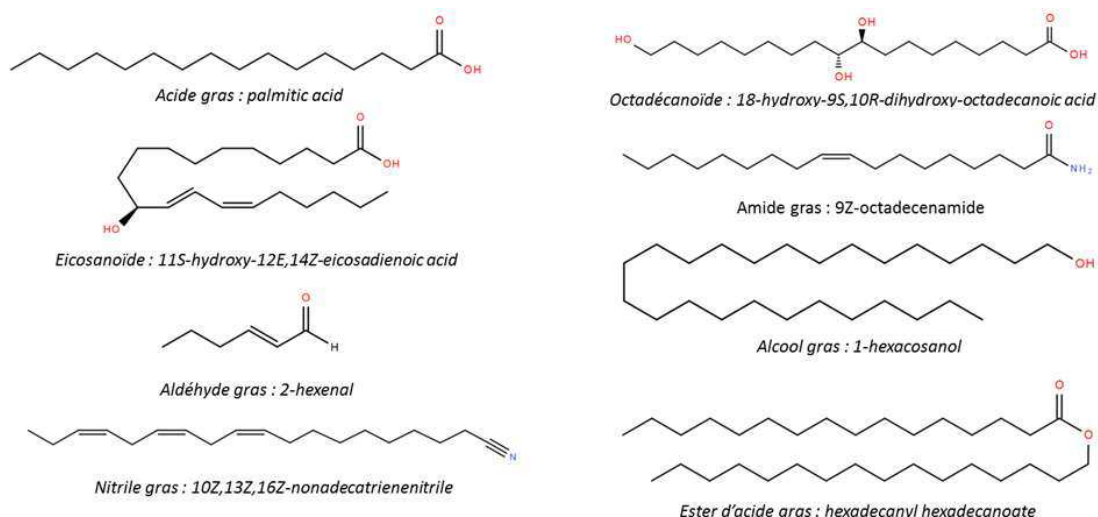


Figure 1.1: Structure des principales classes d'acyles gras.

1.2. Glycérolipides

Les glycérolipides se composent d'un assemblage d'esters d'acides gras et de glycérol. Ce dernier peut être estérifié soit par un acide gras (monoglycérides (MGs)), par deux acides gras (diglycérides (DGs)) soit par trois acides gras (TGs). Les autres classes des glycérolipides sont caractérisées par la présence d'un ou plusieurs résidus sucre fixés au glycérol par une liaison glycosidique comme les mono- et digalactosyldiacylglycérols (respectivement MGDG et DGDG). La nomenclature des glycérolipides est basée sur le système de numérotation stéréospécifique (sn), c'est-à-dire, les groupements acyles sont précédés du numéro du carbone (sn-1, sn-2, ou sn-3) du squelette du glycérol sur lequel se trouve la liaison ester, suivi de sn-glycérol. Les structures des principales classes de glycérolipides sont présentées dans la figure 1.2.

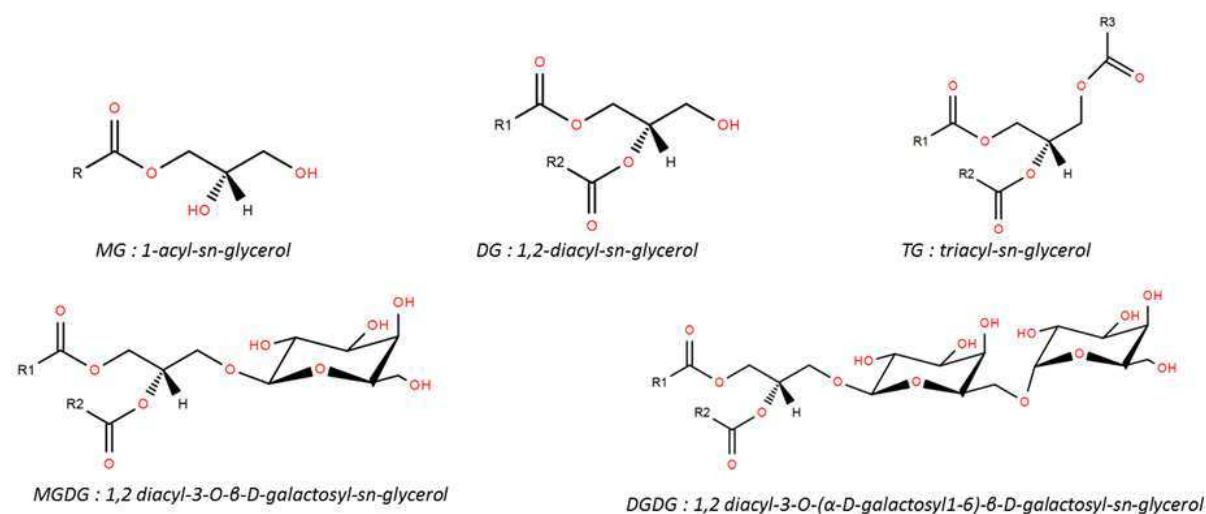


Figure 1.2: Structure des principales classes de glycérolipides.

1.3. Glycérophospholipides

Les PLs, également appelés phospholipides, ont pour caractéristique commune une structure de base le sn-glycérol 3 phosphate. Les groupements hydroxyles du glycérol (position sn-1 et sn-2) sont estérifiés par différents substituants. L'acide phosphorique est estérifié par un deuxième alcool qui peut être un alcool aminé ou un polyol sans azote. Les glycérophospholipides se différencient en plusieurs classes distinctes en fonction de la nature : phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS) et l'acide phosphatidique (PA). Dans le cas des glycérophosphoglycérols (PG) et glycérophosphoglycérophosphates (PGP), un deuxième groupement glycérol s'ajoute au motif principal, tandis que pour les glycérophosphoglycérophosphoglycérols (cardiolipines CL), on retrouve un troisième motif de glycérol généralement acylé aux positions sn-1' et sn-2'. Les structures des principales classes de glycérophospholipides sont présentées dans la figure I.3.

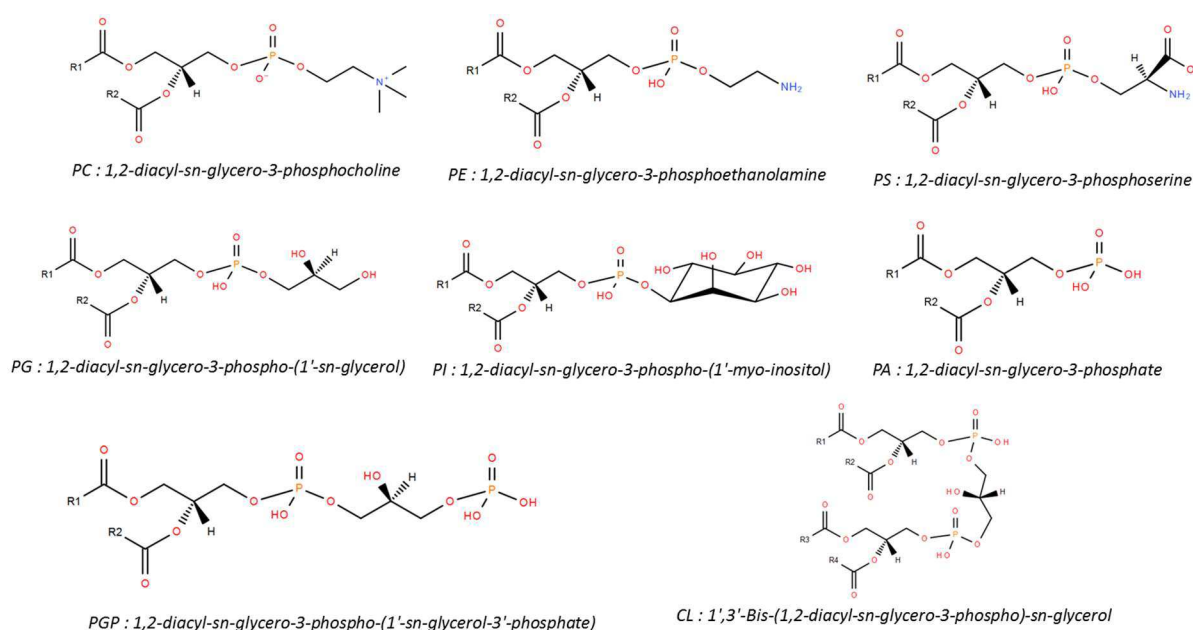


Figure I.3: Structure des principales classes de glycérophospholipides.

1.4. Sphingolipides

Les sphingolipides constituent une catégorie complexe de composés qui possèdent une structure composée d'une base sphingoïde (et non d'un glycérol) et d'un acide gras à longue chaîne. En premier lieu, on considère les bases sphingoïdes et leurs dérivés simples. Les céramides possèdent une base sphingoïde avec un acide gras amidé. Les phosphosphingolipides sont caractérisés par l'estérification de l'alcool primaire de la sphingosine par la partie phosphate de la phosphocholine. Les glycosphingolipides possèdent des liaisons glycosidiques

(les cérébrosides et les gangliosides). On distinguera les glycosphingolipides neutres (un ou plusieurs sucres non chargés) des glycosphingolipides acides (groupes fonctionnels fixés à des sucres neutres ou des résidus de sucre chargés) et des glycosphingolipides basiques et enfin des glycosphingolipides amphotères. Ces liaisons entre groupe de tête peuvent être d'autre nature et permettent ainsi de distinguer les phosphono- et les arseno-sphingolipides. Les structures des principales classes de sphingolipides sont présentées dans la figure I.4.

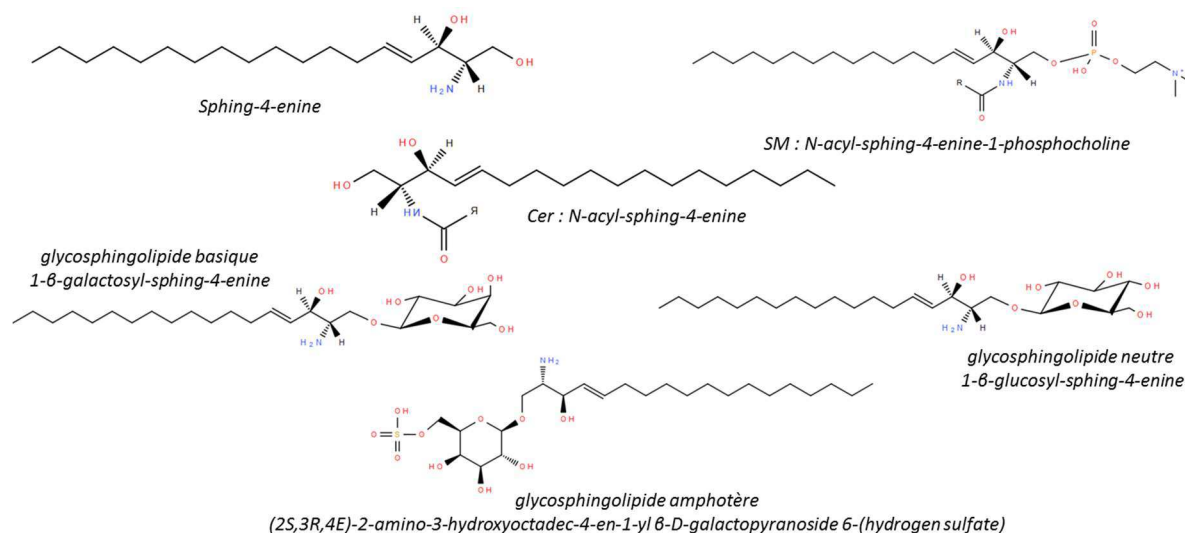


Figure I.4: Structure des principales classes de sphingolipides.

1.5. Saccharolipides

Les saccharolipides, ou glycolipides, sont caractérisés par un assemblage de chaînes acyles sur des mono- ou polysaccharides. En effet le groupement glycérol de la chaîne principale, classiquement retrouvé dans les glycérolipides et glycérophospholipides, est substitué par un squelette de sucre. On retrouve, à nouveau, une répartition en différentes classes en fonction de la nature des sucres impliqués dans la chaîne principale (sucres aminés, tréhalose, etc.) mais aussi en fonction de la présence ou non de glycanes. Les structures des principales classes de saccharolipides sont présentées dans la figure I.5.

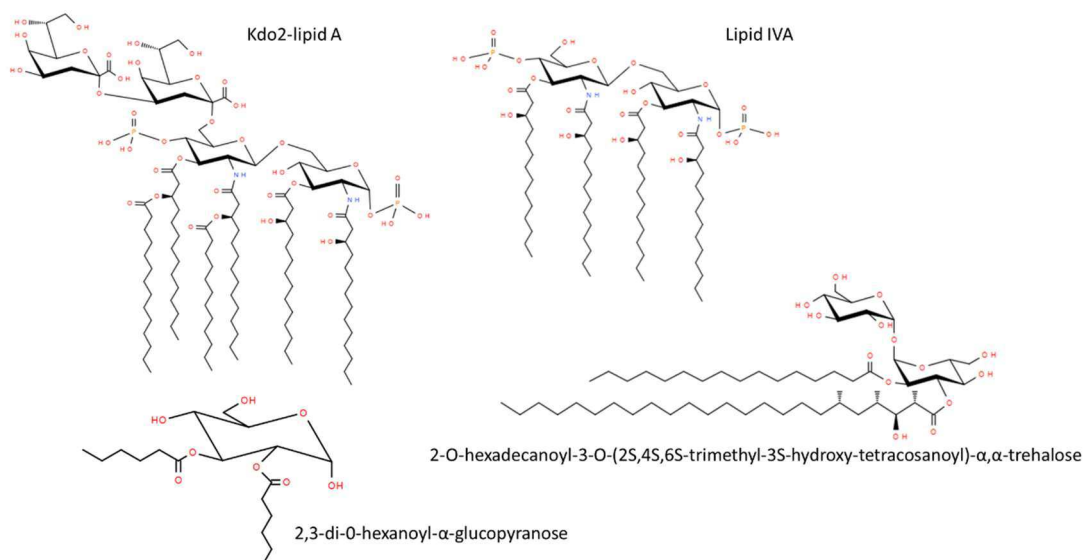


Figure I.5 : Structure des principales classes des saccharolipides.

1.6. Polycétides

Les polycétides constituent, d'un point de vue structural, une famille diverse. Ils sont synthétisés par condensation itérative de sous-unités acétyle et propionyle. De nombreux polycétides sont des molécules cycliques dont les squelettes peuvent être modifiés par différents processus comme la glycosylation, la méthylation, l'hydroxylation, ou encore par oxydation. Ils se répartissent en trois classes principales : les macrolides, les polycétides aromatiques et les polycétides non ribosomiques. Les structures des principales classes de polycétides sont présentées dans la figure I.6.

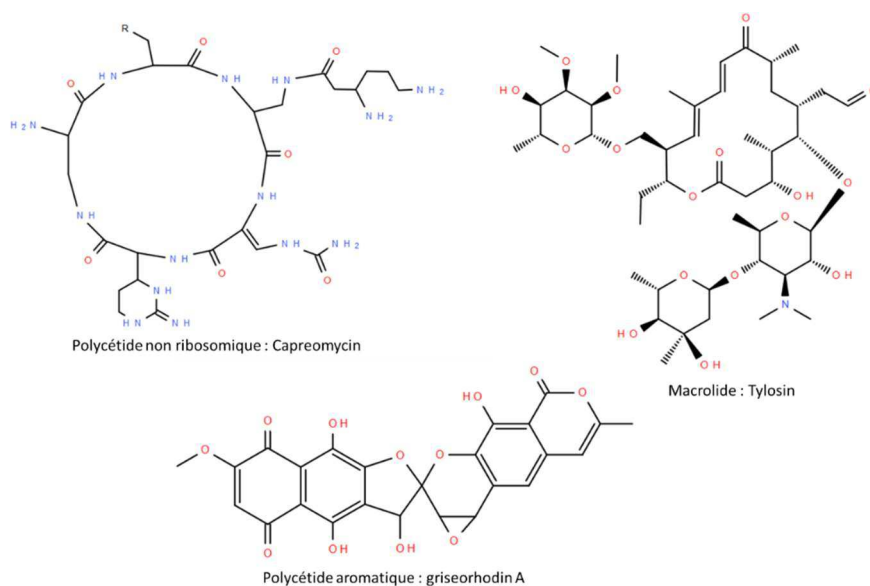


Figure I.6 : Structure des principales classes des polycétides.

1.7. Prénols

Les prénols sont synthétisés à partir d'unités isoprènes tels que le diphosphate d'isopentényle et le diphosphate de diméthylallyle. Les différentes classes de prénols ont en commun une addition successive d'unités isoprènes et se distinguent par leurs groupes fonctionnels, mais aussi par la structure basique de leurs squelettes hydrocarbonés. On distingue les isoprénoïdes simples, des polyterpènes (structure contenant plus de quarante atomes de carbone). Les quinones et les hydroquinones représentent une autre classe principale (un groupement isoprénoïde attaché à un noyau quinonoïde d'origine non isoprénoïde). Les structures des principales classes de prénols sont présentées dans la figure I.7.

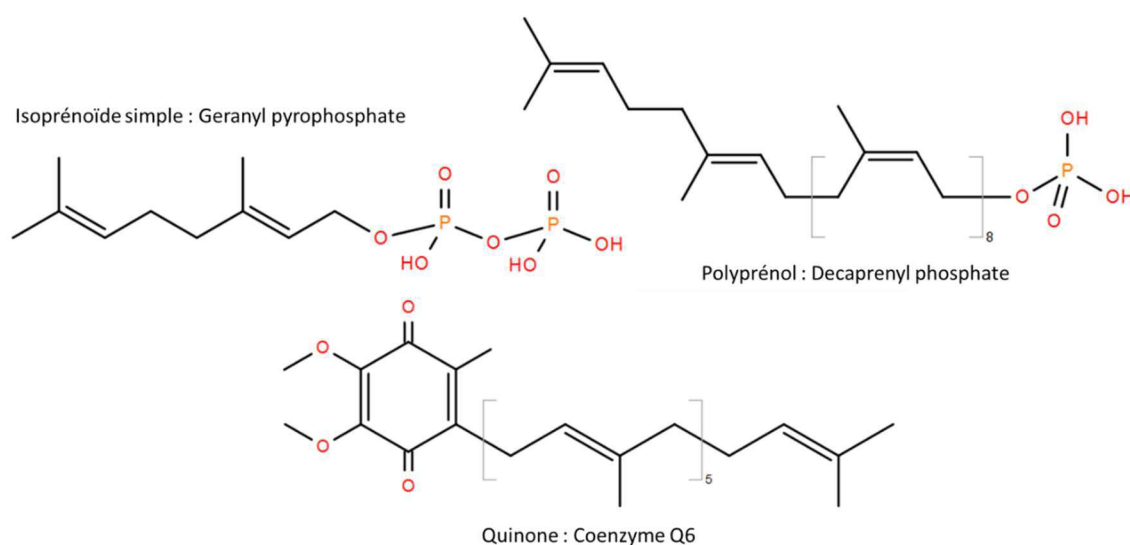


Figure I.7 : Structure des principales classes des prénols.

1.8. Stérols

Les STs sont des lipides dérivant d'un noyau stérane, hydroxylé sur le carbone n°3. Les STs se différencient selon le nombre de chaînes latérales, le nombre et la position des insaturations présentes. On distinguera, en termes de classe, le cholestérol (CO) et ses dérivés (comme les esters de cholestérol), des stéroïdes (noyau stérane, hydroxylé sur le carbone n°3), les sécostéroïdes, (ouverture du noyau tétracyclique) ainsi que les acides biliaires et leurs conjugués. Les structures des principales classes de stérols sont présentées dans la figure I.8.

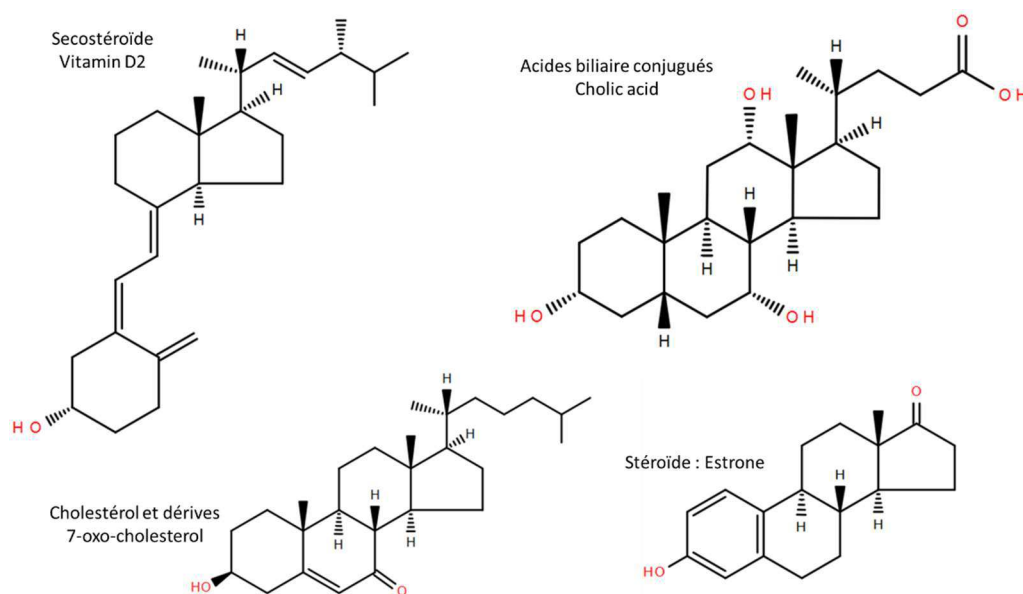


Figure 1.8 : Structure des principales classes de stérols.

2. Extraits lipidiques

Les classes et sous-classes de lipides se différencient donc par leurs motifs structuraux principaux (acide carboxylique, glycérol, noyau stérane, base sphingoïde) ainsi que par la nature et le nombre de groupements polaires rattachés à ce squelette principal. Au sein de chaque sous classe, les espèces moléculaires se différencient les unes des autres par : le nombre total de carbone (la somme des atomes de carbone contenus dans les chaînes d'acides gras), la longueur de chaîne alkyle sur l'acide gras, la position de l'acide gras sur la tête polaire (squelette principal), le nombre total de doubles liaisons, la position des doubles liaisons sur la chaîne alkyle de l'acide gras. La base de données LIPID MAPS référence aujourd'hui plus de 40000 structures de lipides différentes [10]. En plus de cette vaste diversité structurale, les échantillons lipidiques biologiques présentent aussi des différences en termes de classes de lipides présentes. Les compositions en lipides des extraits varient en fonction que celui-ci soit d'origine végétale ou animale.

Les extraits les plus fréquemment étudiés sont issus de plasma ou sérum, des tissus animaux, des cellules, des tissus végétaux ou encore du lait et des urines [11]. En fonction de l'origine des extraits lipidiques, des différences de compositions de classes ont été observées. Par exemple, les MGDG, les DGDG, les TGs et les PLs ne sont pas représentés de la même façon qu'il s'agisse de tubercule de pomme de terre, de pomme, de soja ou de blé [12]. Il en va de même pour les extraits d'origine animale. En fonction de l'organe dont est issu l'extrait, des différences, en termes de classes présentes et leurs proportions, seront observées selon qu'il s'agisse de foie, de cœur ou de plasma [12].

En fonction de la nature de l'information recherchée et des espèces présentes, plusieurs techniques analytiques peuvent être utilisées. Les techniques analytiques les plus couramment associées sont le couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse haute résolution ainsi que la spectroscopie de résonance magnétique. On retrouve aussi les techniques séparatives avec la LC, qui est la plus représentée, ainsi que la chromatographie sur couche mince et la chromatographie en phase gazeuse (GC) et plus récemment la SFC [3, 11, 13, 14]. Dans le cadre de séparation de composés, la chromatographie reste la méthode de référence.

II. Analyse des lipides par chromatographie

Il est possible de séparer les lipides de différentes façons : par classe, par séries d'homologues ou bien par espèces moléculaires [12] en utilisant plusieurs techniques comme la GC, la LC ou la SFC. Le choix de la méthode repose dans un premier temps sur la compatibilité des lipides avec la méthode.

1. Applications et limites d'utilisation de la GC

La limitation première de la GC repose sur l'utilisation de températures élevées, qui s'avèrent difficilement compatibles avec des composés thermosensibles comme les PLs [15]. La GC a été la méthode de choix pour l'analyse des acides gras et plus particulièrement des esters d'acides gras méthylés (FAMES) [16-18]. L'analyse directe des lipides en GC sous leur forme native est peu décrite dans la littérature à l'exception des TGs [19-21]. En effet, pour pouvoir être volatilisés lors de l'injection, les composés doivent posséder une pression de vapeur saturante suffisante. Ce dernier aspect n'est pas applicable à tous les lipides et il est courant de procéder à une étape de dérivation. Différentes méthodes sont utilisées pour la dérivation des FAMES à partir de matrices contenant des TGs, des PLs ou encore les esters de stérol (SEs). La transestérification directe [22] ainsi que la saponification à partir de matrices, animale ou végétale, [23, 24] suivie d'une estérification sont les processus les plus largement utilisés. Bien que s'agissant de méthodes quantitatives, elles entraînent une perte d'information structurale : conversion non-quantitative des FAs en FAMES, modification de la structure des FAs ou encore formation d'artefacts de non-FAMES. En raison des limites existantes, l'utilisation de la GC s'est considérablement moins développée que la LC ou la SFC.

2. Solubilité des lipides et domaine d'application de la LC et la SFC

Dans le domaine de l'analyse des lipides, la diversité des structures et des solubilités mises en jeu amène à travailler avec une très large gamme de polarité de solvants et de phases stationnaires. L'utilisation de la LC et de la SFC pour la séparation des lipides permet de couvrir

différentes zones de solubilité. En utilisant la représentation adaptée du travail de Schoenmakers [25] proposée par Tchaplá [12], on peut ainsi définir les conditions chromatographiques permettant une bonne distribution (ni trop vers la phase stationnaire, ni trop vers la phase mobile) des solutés, le paramètre de solubilité de ces derniers devant se situer dans la zone des limites de polarité du système phase stationnaire/phase mobile choisi.

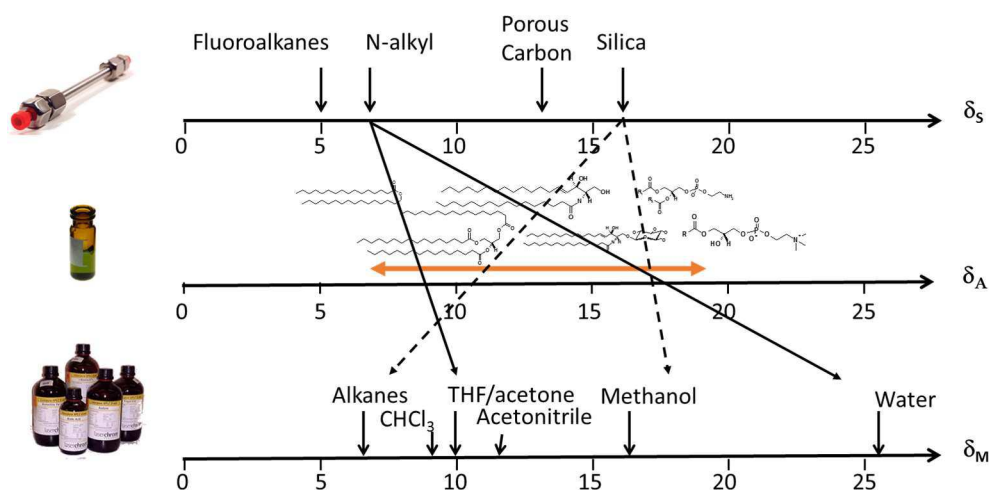


Figure I.9 : Paramètres de solubilité (δ) des phases stationnaires (δ_s), des lipides (δ_A) et des phases mobiles (δ_M) [12].

Si on applique à ce schéma (Figure I.10), les zones de polarité couvertes par la chromatographie liquide à polarité de phase inversée (RPLC) ou de NPLC, ou encore la chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) on observe que chacun des modes disponibles couvre une zone de polarité qui lui est propre, ne couvrant pas intégralement la gamme d'éluion des classes lipidiques du fait de leur grande diversité de polarité. Par extension, la SFC peut être considérée comme une alternative à la NPLC et donc permettre de couvrir une zone d'éluion similaire.

2.1. NPLC

En NPLC, le système chromatographique se compose d'une phase stationnaire polaire et d'une phase mobile apolaire. La phase stationnaire est soit une silice vierge ou bien une silice greffée par des groupements aminopropyle, nitro, diol ou bien avec un groupement alcool polyvinylique polymérisé lié à des particules de silice (PVA-Sil®). La phase mobile se compose principalement de solvants organiques apolaires (alcanes) en mélange avec des solvants peu ou polaires (solvants chlorés, alcools) [26]. En NPLC, les lipides sont séparés par classe de polarité, résultant des interactions entre leur partie polaire (ou tête polaire) et la phase stationnaire. La NPLC, incluant la chromatographie d'adsorption, permet l'éluion des lipides

les moins polaires allant des SEs (composés apolaires) jusqu'au glycérolipides (MGDG, DGDG) [27-29]. L'ajout d'une certaine quantité d'eau dans la phase mobile peut, toutefois, permettre d'étendre l'élution jusqu'aux PLs et ainsi couvrir l'intégralité de la gamme de polarité des lipides [27, 30-39].

2.2. HILIC

Le mode HILIC est approprié pour la séparation de composés hydrophiles et ionisables [11]. Il représente une alternative aux modes NPLC et RPLC. Cette stratégie utilise une grande diversité des phases stationnaires y compris les phases polaires couramment utilisées en NPLC (silice vierge ou greffée par des groupements polaires de type amine, amide ou diol) associées à une phase mobile hydro-organique proche de celles utilisées en RPLC [12, 13]. Le mode HILIC permet de s'intéresser aux lipides moyennement polaires et polaires [40-44]. La limite de ce mode concerne les lipides les plus apolaires comme les SEs ainsi que les TGs [45].

2.3. RPLC

En RPLC, le système chromatographique se compose d'une phase stationnaire apolaire et d'une phase mobile polaire. La phase stationnaire est une silice greffée par des chaînes alkyles (préférentiellement C8 ou C18), des groupements cyano (-CN) ou phényle. La phase mobile, se compose généralement d'eau auquel on ajoute un solvant organique pour accélérer l'élution [26]. Appliquée aux lipides, la RPLC permet de séparer les lipides en fonction de leur volume hydrocarboné par des interactions apolaires entre les lipides et la phase stationnaire. Ces interactions concernent principalement les chaînes carbonées des FAs ou groupement acyles [12]. Il existe deux méthodes principales en RPLC pour la séparation des lipides : non aqueuse en phase inverse (NARP-LC) pour les classes de lipides apolaires ($\delta < 10 \text{ cal}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$) comme les FAs et les glycérolipides ; et partiellement aqueuse en phase inverse (PARP-LC) pour les classes lipidiques polaires ($\delta > 13 \text{ cal}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$) comme les PLs [12].

2.4. La chromatographie d'argentation

Cette méthode est basée sur la capacité des ions argent à former des complexes faibles et réversibles, de transfert de charge, avec des composés organiques insaturés. Deux types de phases stationnaires sont proposés pour l'analyse de lipides : la première comprend un gel de silice imprégné d'ions argent et une seconde où les ions argent sont liés à une résine échangeuse d'ions [46]. Elle permet d'obtenir des informations structurales concernant le nombre, la configuration et dans une certaine mesure, la position de la double liaison (s) dans les dérivés ou résidus de FAs [47].

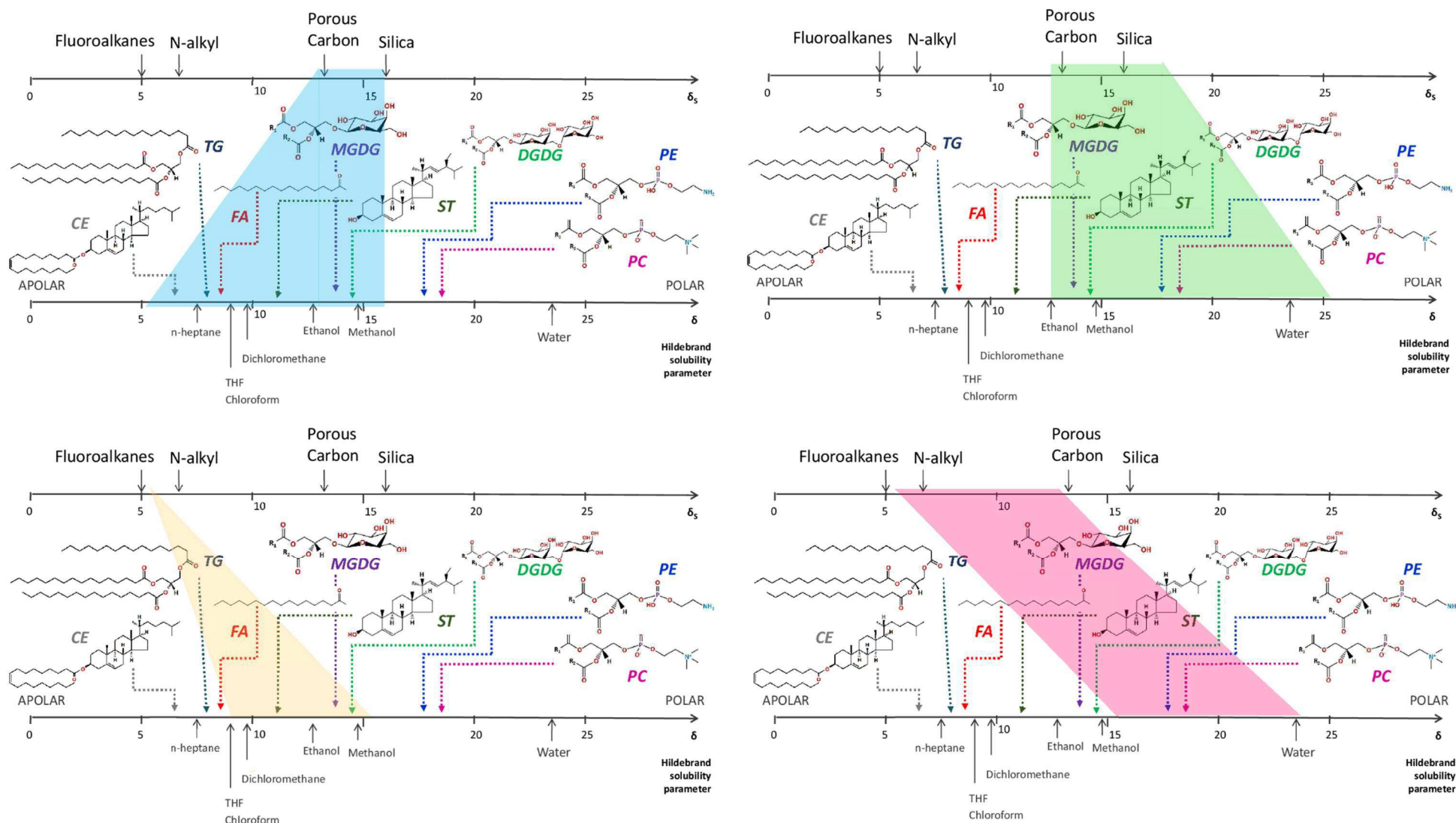


Figure I.10: Zone de polarité couverte par la RPLC (rouge), la NARP (jaune), l'HILIC (vert) et la NPLC (bleu).

Les limites de cette technique concernent : le manque de stabilité de la phase stationnaire (perte des ions argent), la reproductibilité des analyses mais aussi la gamme de polarité balayé par ce système. La phase stationnaire utilisée dans cette technique présente une polarité intermédiaire ($9 \text{ cal}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$) ne permet pas de s'intéresser aux lipides les plus polaires [12].

2.5. SFC

Le CO_2 supercritique a une polarité comprise entre celle de l'hexane et du dichlorométhane [26] permettant l'élution des lipides apolaires comme les SEs et les TGs ainsi que des lipides moyennement polaires. Utilisé pur, le CO_2 supercritique ne permet pas l'élution des composés les plus polaires comme les PLs cependant sa force éluante peut être modulée par l'ajout de modificateur polaire comme le méthanol et ainsi permettre l'élution de ces derniers.

3. Séparation par classe, série d'homologue ou d'espèces moléculaires

Les mécanismes mis en jeu dans les différents modes chromatographiques cités ci-dessus ne permettent pas de séparer les lipides selon les mêmes critères structuraux.

3.1. Séparation par classe de lipide

La NPLC permet de réaliser des séparations de classes lipidiques par ordre de polarité croissante, chaque classe étant éluee sous un seul pic [27, 30-39, 48, 49]. L'utilisation de gradient d'élution permet de traiter une large gamme de polarité des lipides allant des SEs aux PLs. Différentes phases stationnaires polaires sont utilisés tels que la diol [38, 48, 50] la cyano [32], ou encore la PVA-Sil® [27, 32, 37]. Elles sont présentées comme des alternatives à la silice vierge en particulier pour l'analyse des lipides polaires car moins rétentives que la silice vierge. La silice vierge reste, cependant, la phase stationnaire de choix pour séparer les lipides non polaires, neutres et polaires en une seule et même analyse chromatographique [30, 33-35, 39, 49]. De nombreuses applications utilisant le mode HILIC ont été décrites pour la séparation de classes lipidiques polaires comme les glycérophospholipides et les sphingolipides [15-19]. L'utilisation du mode HILIC pour l'analyse globale de lipides par classe (allant des SEs aux lysophosphocholines) comprend des limites. En effet, la séparation des classes les moins polaires (SEs, TGs et CO) est moins efficace, de même certaines classes se retrouvent éluees au volume mort de la colonne [20, 21]. En SFC, plusieurs phases stationnaires ont été testées allant des phases greffées de RPLC (-C18, -ODS ou $-\text{Ag}^+$) [51-57] ou celles utilisées en NPLC (silice, diol) [52, 58] mais aussi des phases spécifiques à la SFC comme la 2-ethylpyridine (EP) [56, 58, 59]. De nombreuses applications ont été décrites pour la séparation

de classes lipidiques polaires comme allant des glycérolipides aux lysophospholipides [58-60] mais aussi pour des classes lipidiques moins polaires comme les TGs [53-55], les FAMES [52] ainsi que les FAs [51, 56]. Concernant la séparation par classe lipidique allant des SEs aux lysophosphocholines, Lisa and al. proposent une méthode Ultra High-Pressure-SFC-ESI-MS permettant la séparation de 24 classes lipidiques (incluant les lipides polaires et non polaires) en moins de 6 minutes [61]. Les mécanismes de séparation (la théorie solvophobe, le mécanisme de partage) en RPLC ne se prêtent pas à la séparation de lipides issus de différentes classes. Par contre, la RPLC est adaptée à la séparation d'espèces d'une classe lipidique ou pour la séparation d'espèces moléculaires.

3.2. Séparation par série d'homologues ou d'espèces moléculaires

Afin d'analyser des espèces moléculaires, les mécanismes de rétention doivent pouvoir séparer les lipides en fonction de la longueur de la chaîne carbonée portée par les groupements acyles, de la présence d'insaturations ou encore de leur position. Le mode NPLC ne permet pas ce type de séparation contrairement à la RPLC et la SFC. Les analyses de TGs sont aussi bien réalisées en NARP [62-65] qu'en PARP [66, 67]. L'analyse sur carbone graphite poreux (PGC) est utilisée pour la séparation d'espèces moléculaires de DGDG [68], de céramides [69-71], de glycosphingolipides [72], mais aussi de cires et de FAMES [73]. Dans le domaine de l'analyse des lipides, on retrouve peu d'applications concernant la séparation d'espèces moléculaires par SFC. Les principales applications concernent majoritairement l'analyse de TGs [74-76], de céramides [73] ou encore de cires [74]. La chromatographie d'argentation est employée pour la séparation d'espèces moléculaires de FAs, de FAMES ou encore de TGs [77]. Les applications les plus fréquentes dans la littérature concernent la séparation de formes cis et trans de FAMES [78] ainsi que les isomères de position des FAs et des TGs [79-81].

Au travers de ces différentes techniques chromatographiques, il est possible de traiter l'échantillon du point de vue global ou bien de s'intéresser à la séparation de classe, ou aux espèces moléculaires présentes au sein d'une classe. Dès lors que l'on souhaite procéder à une caractérisation globale des lipides (par classe et espèces moléculaires par exemple) présents dans un extrait, un seul mode séparatif, bien que performant, s'avère insuffisant.

3.3. Analyse globale par chromatographie bidimensionnelle

Les systèmes multidimensionnels en mode intégral (LCxLC, SFCxLC ou encore SFCxSFC) présentent l'avantage de pouvoir séparer, dans notre cas, les lipides selon deux caractéristiques. Si les modes séparatifs utilisés sont complémentaires (« orthogonaux ») des capacités de pics intéressantes peuvent être espérées. La chromatographie bidimensionnelle

(2D) peut être réalisée en mode en ligne ou hors-ligne. Chacun des deux modes présentent des avantages et inconvénients et sera utilisé en fonction de la nature de chaque mode chromatographique utilisé. En effet, la chromatographie 2D en mode hors-ligne permet l'optimisation complète de la séparation (résolution) de chaque dimension et s'avère intéressante dès lors que les phases mobiles de 1^{ères} et 2^{èmes} dimensions ne sont pas miscibles [82-85]. Par contre, elle présente des inconvénients en termes de temps d'analyse et de répétabilité des analyses. La chromatographie 2D en mode en ligne [86, 87] présente l'avantage de pouvoir être automatisée et donne de meilleurs résultats en termes de répétabilité des analyses. Dans la plupart des cas utilisant des couplages LCxLC pour l'analyse de lipides, le mode HILIC ou NPLC a été utilisé, en 1^{ère} dimension d'analyse, afin de séparer les lipides par classe puis, via une 2^{ème} dimension d'analyse, de séparer les espèces moléculaires par RPLC [82, 85-87]. Les analyses ainsi réalisées permettent de réaliser une caractérisation globale (des lipides non polaires aux lipides polaires) des extraits lipidiques. Les couplages RPLCxRPLC concernent majoritairement la caractérisation d'une seule classe lipidique : les TGs [83, 84, 88]. Le couplage SFCxRPLC a, quant à lui, été utilisé pour l'analyse de dérivés de FAs [51].

Du fait de l'absence de groupements chromophores sur les lipides, la détection par spectrométrie UV/visible n'est pas envisageable. Pour l'analyse des lipides en LC et SFC, plusieurs détecteurs dits universels peuvent être utilisés/envisagés.

4. Principaux détecteurs utilisés pour l'analyse de lipides en chromatographie

4.1. Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière et le détecteur à aérosol chargé

Le principe de fonctionnement de l'ELSD [89] et du CAD [90] est proche et repose sur deux premières étapes communes : la nébulisation de l'effluent chromatographique en gouttelettes, à l'aide d'un gaz inerte tel que l'azote, et l'évaporation du solvant par passage dans un tube chauffé afin d'obtenir des particules de solutés. L'étape de détection diffère entre les deux appareils. Dans le cas de l'ELSD, les particules de solutés passent dans une cellule d'écoulement éclairée par une source lumineuse. Un photomultiplicateur quantifie la lumière diffusée par le soluté et transforme cette lumière en signal électrique mesurable. Dans le cas du CAD, les particules de soluté sont chargées par transfert de charge depuis des molécules de diazote chargées par décharge corona, le signal obtenu correspondant au nombre de charges.

Ces deux détecteurs sont adaptés à l'analyse de lipides. Aucune étape de dérivation n'est nécessaire, ils sont compatibles avec une très large gamme de solvants et de modificateurs organiques. La réponse du signal de l'ELSD et du CAD est, cependant, liée à la composition de la phase mobile notamment dans le cas de gradient d'élution. En effet, plus la phase mobile

sera enrichie en solvant organique (plus volatil que les phases aqueuses), plus la réponse sera importante. Par conséquent afin de procéder à la quantification des lipides, il est nécessaire de réaliser une calibration propre à chaque classe de lipides, séparément, des différences de réponse pouvant être observées en fonction du temps d'éluion du composé et de donc de la composition de la phase mobile correspondant à ce temps [91]. Pour les faibles concentrations, il est préférable d'utiliser le CAD qui s'avère plus précis et plus sensible que l'ELSD [92].

Pour ces deux détecteurs, l'identification structurale des lipides est complexe. L'identification des lipides repose uniquement sur leur temps de rétention et est donc dépendante de la disponibilité des standards. Pour permettre l'étude structurale des lipides, l'utilisation de la spectrométrie de masse est essentielle.

4.2. Le spectromètre de masse

La MS est basée sur la séparation des ions par des champs électriques et magnétiques. Un couplage LC-MS est classiquement composé de quatre éléments : d'une interface permettant l'entrée de l'effluent chromatographique ; d'une source d'ionisation ; d'un analyseur de masse ainsi que d'un détecteur. Dans la source d'ions, les molécules organiques non chargées sont ionisées en mode positif ou négatif. Ensuite, les ions sont analysés ou séparés sur la base de leur rapport masse/charge (m/z) avant d'être finalement détectés. Il existe de nombreuses combinaisons (source d'ionisation et type d'analyseur) de spectromètre de masse facilitées par la commercialisation de chambres d'ionisation interchangeables qui permettent d'adapter le mode d'ionisation en conservant le même instrument.

4.2.1. Source d'ionisation

Le choix de la méthode d'ionisation à utiliser pour l'analyse de lipides par LC-MS joue un rôle important sur la nature de l'information attendue, sachant que les lipides ne s'ionisent pas tous de la même façon ni avec la même efficacité [93]. Les techniques d'ionisation douces sont majoritairement utilisées dans le domaine des lipides [3, 11, 13]. Parmi elles, on retrouve les techniques d'ionisation douces à pression atmosphérique (API), comme par exemple l'APCI, la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) et l'ESI.

Parmi les méthodes d'API, l'ESI est devenue la méthode de choix pour le profilage des mélanges de lipides complexes via l'analyse des différentes classes, sous-classes et espèces moléculaires issus d'extraits biologiques [94, 95]. Elle représente la source d'ionisation la plus utilisée lors de couplage RPLC-MS. L'ESI permet, en mode positif, l'ionisation d'une large gamme de lipides allant des lipides les moins polaires (SEs, DGs et TGs) [93, 96] à l'analyse

des lipides polaires (PLs et sphingolipides). Utilisée en mode négatif, elle permet d'obtenir de meilleurs résultats pour certains PLs [3].

Concernant les deux autres méthodes de l'API (APCI et APPI), l'APCI permet l'analyse des lipides non-polaires (TGs, SEs et FAs) [7, 97]. L'APPI est utilisée pour sa capacité à ioniser les lipides apolaires comme les FAs, les SEs, les MGs, les DGs et les TGs [98-100] avec une efficacité supérieure à celle de l'ESI et l'APCI [100, 101].

4.2.2. Analyseurs

Les principaux types d'analyseur pouvant être utilisé pour l'analyse des lipides sont les suivants : des triples quadripôles (TQ) ou des trappes ioniques (IT) ainsi que des spectromètres de masse haute résolution tels que les MS à transformée de Fourier (FT-MS, MS Orbitrap), MS quadripolaire à temps de vol (Q-TOF). Ces analyseurs de masse ont des caractéristiques différentes, comprenant la gamme de m/z qu'ils peuvent couvrir, la précision de masse et la résolution possible. Les instruments de masse haute résolution couramment utilisés dans le domaine de l'analyse des lipides permettent d'atteindre des résolutions comprises entre 10000 et 1000000 associées à une précision en masse exacte de l'ordre de 1 à 5 ppm. L'avantage majeur de la haute-résolution est qu'elle permet l'identification complète ou partielle de composés possédant la même masse nominale via l'accès à la masse exacte.

III. La lipidomique

L'importance des lipides dans le métabolisme est incontestable. Par ailleurs, les troubles du métabolisme lipidique ont des retentissements tels que l'obésité, la stéatose, l'athérosclérose pour citer les pathologies les plus répandues. Il a été montré dans certains cas qu'une perturbation du métabolisme lipidique pouvait contribuer au développement de certaines maladies comme Alzheimer ou Parkinson [14]. Il est également possible de citer des maladies génétiques avec accumulation de lipides telles les maladies de Gaucher, Fabry, Niemanpick et Tay-Sachs. Afin de décrire l'ensemble des perturbations d'un réseau métabolique, liées à un état physiologique ou pathologique, il est nécessaire d'accéder aux informations liées aux espèces moléculaires en termes d'identification et de quantification.

Bien qu'appartenant au cadre général de la métabolomique, la lipidomique représente un champ d'investigation particulier en raison de spécificités fonctionnelles et métaboliques des lipides de même que leurs propriétés physico-chimique [14]. Elle a été définie comme la « caractérisation complète des espèces moléculaires lipidiques ainsi que leurs rôles biologiques en lien avec l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme et le fonctionnement

des lipides, incluant aussi la régulation des gènes » [102]. Le développement des outils analytiques ainsi que les récents progrès en instrumentation ont favorisé l'essor de la lipidomique. Du point de vue du nombre de données collectées, l'analyse lipidomique représente un changement majeur d'échelle par rapport à l'analyse des lipides dite conventionnelle et implique un traitement chimiométrique de ces données.

Une analyse lipidomique débute avec l'extrait des lipides issus d'un échantillon biologique (tissu, cellule, etc.). En fonction du type d'information attendu, plusieurs approches analytiques sont possibles [13]:

- L'analyse non-ciblée : l'objectif ici est d'analyser l'intégralité des lipides présents dans un extrait lipidique sans connaître, au préalable, les ions moléculaires et leur fragmentation.
- L'analyse en « mise au point » (focused) : Cette stratégie d'analyse est utilisée pour des lipides possédant des similitudes structurales. Il est alors possible d'étudier des lipides au sein d'une même classe. Cette méthode utilise différents modes d'analyse : perte de neutre, ion-produit et ion-précurseur, lorsqu'un fragment spécifique de la classe de lipide est connu. Pour séparer des espèces moléculaires au sein d'une classe lipidique, le développement d'une séparation en chromatographie liquide haute performance (HPLC) s'avère utile en particulier pour distinguer les espèces isobares.
- L'analyse ciblée : cette stratégie concerne les molécules dont les informations sur les ions parents ainsi que leurs fragmentations sont connues. L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS^2) est nécessaire. Les modes SRM (selected reaction monitoring) et MRM (multiple reaction monitoring) sont largement utilisés afin de détecter les ions parents recherchés avec les ions fragments spécifiques.
- Shotgun : cette méthode se dispense de l'utilisation de technique séparative et propose ainsi un gain important de temps. L'analyse est réalisée par introduction directe de l'échantillon, préalablement extrait, dans la source MS. Les ions sont séparés en fonction de leurs différences de propriétés d'ionisation, ils sont ensuite séparés selon leur rapport m/z soit nativement soit après formation d'adduits avec des cations ou anions présents dans l'échantillon. Cette approche est surtout utile pour identifier les composants majoritaires. La technique shotgun peut être utilisée dans la cadre d'une analyse ciblée, non ciblée ou mise au point car il est tout à fait possible de paramétrer l'appareillage dans le but d'analyser tout ou une partie du lipidome [94].

Références bibliographiques chapitre I

- [1] W.W. Christie, What is a Lipid? in: A.L. Library (Ed.), The American Oil Chemists' Society, 2013.
- [2] W.W. Christie, X. Han, Chapter 1 - Lipids: their structures and occurrence, in: Lipid Analysis (Fourth edition), Woodhead Publishing, 2012, pp. 3-19.
- [3] A.a. Carrasco-Pancorbo, N. Navas-Iglesias, L. Cuadros-Rodriguez, From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28 (2009) 263-278.
- [4] E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, A comprehensive classification system for lipids, *Journal of lipid research*, 46 (2005) 839-862.
- [5] A.A. Farooqui, W.-Y. Ong, T. Farooqui, Lipid mediators in the nucleus: Their potential contribution to Alzheimer's disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801 (2010) 906-916.
- [6] M. Beller, K. Thiel, P.J. Thul, H. Jäckle, Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus, *FEBS letters*, 584 (2010) 2176-2182.
- [7] W.C. Byrdwell, Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids, *Lipids*, 36 (2001) 327-346.
- [8] The LIPID MAPS Lipidomics Gateway, <http://www.lipidmaps.org/>, in.
- [9] E. Fahy, S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J.O. Wakelam, E.A. Dennis, Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids, *Journal of lipid research*, 50 (2009) S9-S14.
- [10] M. Sud, E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E.A. Dennis, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, Lmsd: Lipid maps structure database, *Nucleic acids research*, 35 (2007) D527-D532.
- [11] T. Cajka, O. Fiehn, Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 61 (2014) 192-206.
- [12] D. Libong, S. Héron, A. Tchaplá, P. Chaminade, Lipid analysis with the corona CAD, in.
- [13] N. Navas-Iglesias, A.a. Carrasco-Pancorbo, L. Cuadros-Rodriguez, From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28 (2009) 393-403.
- [14] M.R. Wenk, The emerging field of lipidomics, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (2005) 594-610.
- [15] M. Li, Z. Zhou, H. Nie, Y. Bai, H. Liu, Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (2011) 243-249.
- [16] W.W. Christie, X. Han, Chapter 8 - Gas chromatographic analysis of fatty acid derivatives, in: Lipid Analysis (Fourth edition), Woodhead Publishing, 2012, pp. 159-180.
- [17] C.A. Martin, C.C. de Oliveira, J.V.I. Visentainer, M. Matsushita, N.E.z. de Souza, Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for the gas chromatographic analysis of trans fatty acids, *Journal of Chromatography A*, 1194 (2008) 111-117.
- [18] J. Blasko, R. Kubinec, I. Ostrovsky, E. Pavlikova, J. Krupcik, L. Sojak, Chemometric deconvolution of gas chromatographic unresolved conjugated linoleic acid isomers triplet in milk samples, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 2757-2761.
- [19] K.i. Ichihara, C. Kohsaka, N. Tomari, T. Kiyono, J. Wada, K. Hirooka, Y. Yamamoto, Fatty acid analysis of triacylglycerols: Preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography, *Analytical biochemistry*, 495 (2016) 6-8.
- [20] J.J. Myher, A. Kuksis, L. Marai, P. Sandra, Identification of the more complex triacylglycerols in bovine milk fat by gas chromatography - mass spectrometry using polar capillary columns, *Journal of Chromatography A*, 452 (1988) 93-118.
- [21] T. Rezanka, H. Rezankova, Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis, *Analytica Chimica Acta*, 398 (1999) 253-261.
- [22] G. Lepage, C.C. Roy, Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction, *Journal of lipid research*, 27 (1986) 114-120.
- [23] L.G.I. Mendoza, J. Gonzalez-Alvarez, C.F.n. Gonzalo, P. Arias-Abrodo, B.n. Altava, S.V. Luis, M.I. Burguete, M.D. Gutierrez-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.
- [24] L.D. Metcalfe, A.A. Schmitz, J.R. Pelka, Rapid Preparation of Fatty Acid Esters from Lipids for Gas Chromatographic Analysis, *Analytical Chemistry*, 38 (1966) 514-515.
- [25] P.J. Schoenmakers, *Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development*, Elsevier, 1986.
- [26] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Chromatographie en phases liquide et supercritique*, Masson Paris, 1991.
- [27] F.S. Deschamps, P. Chaminade, D. Ferrier, A. Baillet, Assessment of the retention properties of poly(vinyl alcohol) stationary phase for lipid class profiling in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 928 (2001) 127-137.
- [28] F. Donot, G. Cazals, Z. Gunata, D. Egron, J. Malinge, C. Strub, A. Fontana, S. Schorr-Galindo, Analysis of neutral lipids from microalgae by HPLC-ELSD and APCI-MS/MS, *Journal of Chromatography B*, 942 (2013) 98-106.
- [29] J.o.M. Rocha, P.J. Kalo, V. Ollilainen, F.X. Malcata, Separation and identification of neutral cereal lipids by normal phase high-performance liquid chromatography, using evaporative light-scattering and electrospray mass spectrometry for detection, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3013-3025.
- [30] W.W. Christie, Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection, *Journal of Lipid Research*, 26 (1985) 507-512.
- [31] W.W. Christie, Separation of lipid classes by high-performance liquid chromatography with the "mass detector", *Journal of Chromatography A*, 361 (1986) 396-399.
- [32] W.W. Christie, R. Anne Urwin, Separation of lipid classes from plant tissues by high performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases, *Journal of High Resolution Chromatography*, 18 (1995) 97-100.
- [33] F.D. Conforti, C.H. Harris, J.T. Rinehart, High-performance liquid chromatographic analysis of wheat flour lipids using an evaporative light scattering detector, *Journal of Chromatography A*, 645 (1993) 83-88.
- [34] M. Graeve, D. Janssen, Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: Application to exceptional marine lipids, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 1815-1819.
- [35] R. Homan, M.K. Anderson, Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 708 (1998) 21-26.
- [36] D.G. McLaren, P.L. Miller, M.E. Lassman, J.M. Castro-Perez, B.K. Hubbard, T.P. Roddy, An ultraperformance liquid chromatography method for the normal-phase separation of lipids, *Analytical Biochemistry*, 414 (2011) 266-272.
- [37] J. Nordbäck, E. Lundberg, W.W. Christie, Separation of lipid classes from marine particulate material by HPLC on a polyvinyl alcohol-bonded stationary phase using dual-channel evaporative light-scattering detection, *Marine Chemistry*, 60 (1998) 165-175.
- [38] J.S. Perona, V. Ruiz-Gutierrez, Quantification of major lipid classes in human triacylglycerol-rich lipoproteins by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection, *Journal of Separation Science*, 27 (2004) 653-659.
- [39] L.M. Rodriguez-Alcala, J. Fontecha, Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3063-3066.
- [40] M. Schwalbe-Herrmann, J. Willmann, D. Leibfritz, Separation of phospholipid classes by hydrophilic interaction chromatography detected by electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 5179-5183.
- [41] C. Zhu, A. Dane, G. Spijksma, M. Wang, J. Van der Greef, G. Luo, T. Hankemeier, R.J. Vreeken, An efficient hydrophilic interaction liquid chromatography separation of 7 phospholipid classes based on a diol column, *Journal of Chromatography A*, 1220 (2012) 26-34.
- [42] A. Anesi, G. Guella, A fast liquid chromatography-mass Spectrometry methodology for membrane lipid profiling through hydrophilic interaction liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1384 (2015) 44-52.

- [43] M. Holčápek, E. Cífková, B. Červená, M. Lísa, J. Vostálová, J. Galuszka, Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1377 (2015) 85-91.
- [44] E. Cífková, R. Hájek, M. Lísa, M. Holčápek, Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry of (lyso)phosphatidic acids, (lyso)phosphatidylserines and other lipid classes, *Journal of Chromatography A*, 1439 (2016) 65-73.
- [45] M. Holčápek, E. Cífková, B. Červená, M. Lísa, J. Vostálová, J. Galuszka, Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1377 (2015) 85-91.
- [46] S. Momčilova, B. Nikolova Damyanova, Stationary phases for silver ion chromatography of lipids: Preparation and properties, *Journal of Separation Science*, 26 (2003) 261-270.
- [47] S. Momčilova, B. Nikolova-Damyanova, Stationary phases for silver ion chromatography of lipids: Preparation and properties, *Journal of Separation Science*, 26 (2003) 261-270.
- [48] K.C. Arnoldsson, P. Kaufmann, Lipid class analysis by normal phase high performance liquid chromatography, development and optimization using multivariate methods, *Chromatographia*, 38 (1994) 317-324.
- [49] T. Seppänen-Laakso, I. Laakso, H. Vanhanen, K. Kiviranta, T. Lehtimäki, R. Hiltunen, Major human plasma lipid classes determined by quantitative high-performance liquid chromatography, their variation and associations with phospholipid fatty acids, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 754 (2001) 437-445.
- [50] C. Silversand, C. Haux, Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 703 (1997) 7-14.
- [51] I. Francois, P. Sandra, Comprehensive supercritical fluid chromatography x reversed phase liquid chromatography for the analysis of the fatty acids in fish oil, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4005-4012.
- [52] Y. Hirata, I. Sogabe, Separation of fatty acid methyl esters by comprehensive two-dimensional supercritical fluid chromatography with packed columns and programming of sampling duration, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (2004) 1999-2003.
- [53] 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, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113 (2011) 262-268.
- [54] E. Lesellier, J. Bleton, A. Tchaplá, Use of Relationships between Retention Behaviors and Chemical Structures in Subcritical Fluid Chromatography with CO₂/Modifier Mixtures for the Identification of Triglycerides, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 2573-2580.
- [55] E. Lesellier, A. Tchaplá, Retention Behavior of Triglycerides in Octadecyl Packed Subcritical Fluid Chromatography with CO₂/Modifier Mobile Phases, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 5372-5378.
- [56] S. Qu, Z. Du, Y. Zhang, Direct detection of free fatty acids in edible oils using supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry, *Food Chemistry*, 170 (2015) 463-469.
- [57] P. Sandra, A. Medvedovici, Y. Zhao, F. David, Characterization of triglycerides in vegetable oils by silver-ion packed-column supercritical fluid chromatography coupled to mass spectroscopy with atmospheric pressure chemical ionization and coordination ion spray, *Journal of Chromatography A*, 974 (2002) 231-241.
- [58] H.S.H. Yip, M. Ashraf-Khorassani, L.T. Taylor, Feasibility of Phospholipids Separation by Packed Column SFC with Mass Spectrometric and Light Scattering Detection, *Chromatographia*, 65 (2007) 655-665.
- [59] T. Uchikata, A. Matsubara, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba, Development of oxidized phosphatidylcholine isomer profiling method using supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1250 (2012) 205-211.
- [60] T. Yamada, T. Uchikata, S. Sakamoto, Y. Yokoi, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba, Supercritical fluid chromatography/Orbitrap mass spectrometry based lipidomics platform coupled with automated lipid identification software for accurate lipid profiling, *Journal of Chromatography A*, 1301 (2013) 237-242.

- [61] M. Lísa, E. Cífková, M. Holčapek, Lipidomic profiling of biological tissues using off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2015) 5146-5156.
- [62] D. Hmida, M. Abderrabba, A. Tchaplá, S. Heron, F. Moussa, Comparison of iso-elutotropic mobile phases at different temperatures for the separation of triacylglycerols in Non-Aqueous Reversed Phase Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography B*, 990 (2015) 45-51.
- [63] 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, *Journal of Chromatography A*, 1198-1199 (2008) 115-130.
- [64] M. Lisa, M. Holcapek, H. Sovova, Comparison 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, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 8371-8378.
- [65] M. Martin, G.r. Thevenon, A. Tchaplá, Comparison of retention mechanisms of homologous series and triglycerides in non-aqueous reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 452 (1988) 157-173.
- [66] S.S. Bird, V.R. Marur, M.J. Sniatynski, H.K. Greenberg, B.S. Kristal, Serum Lipidomics Profiling Using LC-MS and High-Energy Collisional Dissociation Fragmentation: Focus on Triglyceride Detection and Characterization, *Analytical Chemistry*, 83 (2011) 6648-6657.
- [67] U. Schwab, T. Seppänen-Laakso, L. Yetukuri, J. Gren, M. Kolehmainen, D.E. Laaksonen, A.-L. Ruskeep, H. Gylling, M. Uusitupa, M. Ore, Triacylglycerol fatty acid composition in diet-induced weight loss in subjects with abnormal glucose metabolism - the GENOBIN study, *PLoS One*, 3 (2008) e2630.
- [68] F.S. Deschamps, K. Gaudin, A. Baillet, P. Chaminade, Wheat digalactosyldiacylglycerol molecular species profiling using porous graphitic carbon stationary phase, *Journal of Separation Science*, 27 (2004) 1313-1322.
- [69] K. Gaudin, P. Chaminade, D. Ferrier, A. Baillet, Use of principal component analysis for investigation of factors affecting retention behaviour of ceramides on porous graphitized carbon column, *Chromatographia*, 50 (1999) 470-478.
- [70] A.I. Hazotte, D. Libong, P. Chaminade, High-temperature micro liquid chromatography for lipid molecular species analysis with evaporative light scattering detection, *Journal of Chromatography A*, 1140 (2007) 131-139.
- [71] C. West, G. Cilpa, K. Gaudin, P. Chaminade, E. Lesellier, S. Groupe de chimie Analytique de Paris, Modelling of ceramide interactions with porous graphite carbon in non-aqueous liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1087 (2005) 77-85.
- [72] S. Roy, A. Delobel, K. Gaudin, D. Touboul, D.P. Germain, A. Baillet, P. Prognon, O. Laprevote, P. Chaminade, Liquid chromatography on porous graphitic carbon with atmospheric pressure photoionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry for the analysis of glycosphingolipids, *Journal of Chromatography A*, 1117 (2006) 154-162.
- [73] F.S. Deschamps, K. Gaudin, E. Lesellier, A. Tchaplá, D. Ferrier, A. Baillet, P. Chaminade, Response enhancement for the evaporative light scattering detection for the analysis of lipid classes and molecular species, *Chromatographia*, 54 (2001) 607-611.
- [74] S. Brossard, M. Lafosse, M. Dreux, J. Becart, Abnormal composition of commercial waxes revealed by supercritical fluid chromatography, *Chromatographia*, 36 (1993) 268-274.
- [75] E. Lesellier, A. Tchaplá, Subcritical Fluid Chromatography with Organic Modifiers on Octadecyl Packed Columns: Recent Developments for the Analysis of High Molecular Organic Compounds, *CHROMATOGRAPHIC SCIENCE SERIES*, 75 (1997) 195-222.
- [76] E. Lesellier, A. Tchaplá, Separation of vegetable oil triglycerides by subcritical fluid chromatography with octadecyl packed columns and CO₂/modifier mobile phases, *Chromatographia*, 51 (2000) 688-694.
- [77] R.E. McDonald, M.M. Mossoba, New techniques and applications in lipid analysis, *The American Oil Chemists Society*, 1997.
- [78] A. Baillet, L. Corbeau, P. Rafidison, D. Ferrier, Separation of isomeric compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography using Ag⁺ complexation: Application to cis-trans fatty acid methyl esters and retinoic acid photoisomers, *Journal of Chromatography A*, 634 (1993) 251-256.

- [79] R. Adlof, Analysis of triacylglycerol and fatty acid isomers by low-temperature silver-ion high performance liquid chromatography with acetonitrile in hexane as solvent: limitations of the methodology, *Journal of Chromatography A*, 1148 (2007) 256-259.
- [80] G. Dobson, W.W. Christie, B. Nikolova-Damyanova, Silver ion chromatography of lipids and fatty acids, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671 (1995) 197-222.
- [81] B. Nikolova-Damyanova, Retention of lipids in silver ion high-performance liquid chromatography: Facts and assumptions, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 1815-1824.
- [82] S. Wang, J. Li, X. Shi, L. Qiao, X. Lu, G. Xu, A novel stop-flow two-dimensional liquid chromatography - mass spectrometry method for lipid analysis, *Journal of Chromatography A*, 1321 (2013) 65-72.
- [83] S. Kadivar, N. De Clercq, B.P. Nusantoro, T.T. Le, K. Dewettinck, Development of an offline bidimensional high-performance liquid chromatography method for analysis of stereospecific triacylglycerols in cocoa butter equivalents, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (2013) 7896-7903.
- [84] P. Dugo, O. Favoino, P.Q. Tranchida, G. Dugo, L. Mondello, Off-line coupling of non-aqueous reversed-phase and silver ion high-performance liquid chromatography - mass spectrometry for the characterization of rice oil triacylglycerol positional isomers, *Journal of Chromatography A*, 1041 (2004) 135-142.
- [85] M. Lisa, E. Cifkova, M. Holcapek, Lipidomic profiling of biological tissues using off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5146-5156.
- [86] M. Li, X. Tong, P. Lv, B. Feng, L. Yang, Z. Wu, X. Cui, Y. Bai, Y. Huang, H. Liu, A not-stop-flow online normal-/reversed-phase two-dimensional liquid chromatography - quadrupole time-of-flight mass spectrometry method for comprehensive lipid profiling of human plasma from atherosclerosis patients, *Journal of Chromatography A*, 1372 (2014) 110-119.
- [87] H. Nie, R. Liu, Y. Yang, Y. Bai, Y. Guan, D. Qian, T. Wang, H. Liu, Lipid profiling of rat peritoneal surface layer by an online NP/RP 2D LC-QToF-MS system, *Journal of lipid research*, (2010) jlr. D007567.
- [88] P. Dugo, T. Kumm, M.L. Crupi, A. Cotroneo, L. Mondello, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in the analyses of triacylglycerols in natural lipidic matrixes, *Journal of Chromatography A*, 1112 (2006) 269-275.
- [89] J.M. Charlesworth, Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 50 (1978) 1414-1420.
- [90] R.W. Dixon, D.S. Peterson, Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 2930-2937.
- [91] P. Chaminade, The evaporative light scattering and charged aerosol detector, in: W. Book (Ed.) *Charged Aerosol Detection for Liquid Chromatography and Related Separation Techniques*.
- [92] R.G. Ramos, D. Libong, M. Rakotomanga, K. Gaudin, P.M. Loiseau, P. Chaminade, Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of *Leishmania* membrane phospholipids, *Journal of Chromatography A*, 1209 (2008) 88-94.
- [93] R.C. Murphy, *Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular analysis of complex lipids*, Royal Society of Chemistry, 2014.
- [94] X. Han, R.W. Gross, Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples, *Mass spectrometry reviews*, 24 (2005) 367-412.
- [95] M. Pulfer, R.C. Murphy, Electrospray mass spectrometry of phospholipids, *Mass spectrometry reviews*, 22 (2003) 332-364.
- [96] X. Han, R.W. Gross, Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytical biochemistry*, 295 (2001) 88-100.
- [97] W.C. Byrdwell, APCI-MS lipid analysis, *Oily Press Lipid Library*, 16 (2003) 171-253.
- [98] R. Karuna, A. von Eckardstein, K.M. Rentsch, Dopant assisted-atmospheric pressure photoionization (DA-APPI) liquid chromatography - mass spectrometry for the quantification of 27-hydroxycholesterol in plasma, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 261-268.

- [99] A. Leinonen, T. Kuuranne, R. Kostianen, Liquid chromatography/mass spectrometry in anabolic steroid analysis - optimization and comparison of three ionization techniques: electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization, *Journal of mass spectrometry*, 37 (2002) 693-698.
- [100] M. Gaudin, L. Imbert, D. Libong, P. Chaminade, A. Brunelle, D. Touboul, O. Laprèvote, Atmospheric pressure photoionization as a powerful tool for large-scale lipidomic studies, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 23 (2012) 869-879.
- [101] S.-S. Cai, J.A. Syage, Comparison of atmospheric pressure photoionization, atmospheric pressure chemical ionization, and electrospray ionization mass spectrometry for analysis of lipids, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 1191-1199.
- [102] F. Spener, M. Lagarde, A. Géloën, M. Record, Editorial: what is lipidomics?, *European journal of lipid science and technology*, 105 (2003) 481-482.

CHAPITRE II : LES SOLVANTS ALTERNATIFS

L'outil analytique retenu pour réaliser une séparation des classes d'un mélange de lipides est la chromatographie liquide en phase normale et plus particulièrement la chromatographie d'adsorption qui permet d'éluer les composés par ordre de polarité croissante. L'examen de la littérature montre que ce type de séparation exploite un nombre limité de solvants organiques. De plus, la mise en solution des classes lipidiques nécessite le recours à des mélanges de solvants incluant notamment le chloroforme (souvent désigné comme le solvant des lipides). Les solvants organiques classiquement utilisés en chromatographie d'adsorption (n-heptane, dichlorométhane, THF, etc.), bien que performants, soulèvent aussi de nombreux questionnements liés à leur toxicité pour l'homme et l'environnement, leur volatilité, ou encore leur origine quand ils sont issus des hydrocarbures fossiles. Notre approche est d'étendre le choix de solvants disponibles tout en évitant l'utilisation de solvants à risques comme les solvants chlorés ou les alcanes. Une des voies envisagée est la substitution de ces solvants par des solvants alternatifs, tels ceux proposés par les différents acteurs de la chimie verte.

I. Généralités sur la chimie verte

La chimie verte est un concept lancé au début des années 1990, et introduit par les chimistes américains Paul Anastas et John C. Warner. Il s'applique à différents domaines comme la chimie organique, la biochimie, mais aussi la chimie analytique. Ce concept se base sur 12 principes [1] :

- 1) Prévention : il vaut mieux produire moins de déchets qu'investir dans l'assainissement ou l'élimination des déchets.
- 2) L'économie d'atomes : les synthèses doivent être conçues dans le but de maximiser l'incorporation des matériaux utilisés au cours du procédé dans le produit final.
- 3) Lorsque c'est possible, les méthodes de synthèse doivent être conçues pour utiliser et créer des substances faiblement ou non toxiques pour les humains et sans conséquences sur l'environnement.
- 4) Les produits chimiques doivent être conçus de manière à remplir leur fonction primaire tout en minimisant leur toxicité.
- 5) Lorsque c'est possible, il faut supprimer l'utilisation de substances auxiliaires (solvants, agents de séparation, ...) ou utiliser des substances inoffensives. Des méthodes non conventionnelles d'activation peuvent être utilisées : utilisation de l'eau comme solvant, de fluides supercritiques, chauffage par micro-ondes, remplacement par des liquides ioniques, etc.

- 6) Les besoins énergétiques des procédés chimiques ont des répercussions sur l'économie et l'environnement dont il faut tenir compte et qu'il faut minimiser. Il faut mettre au point des méthodes de synthèse dans les conditions de température et de pression ambiantes.
- 7) Lorsque la technologie et les moyens financiers le permettent, les matières premières utilisées doivent être renouvelables plutôt que non renouvelables.
- 8) Lorsque c'est possible, toute déviation inutile du schéma de synthèse (utilisation d'agents bloquants, protection/déprotection, modification temporaire du procédé physique/chimique) doit être réduite ou éliminée.
- 9) Les réactifs catalytiques sont plus efficaces que les réactifs stœchiométriques. Il faut favoriser l'utilisation de réactifs catalytiques les plus sélectifs possibles.
- 10) Les produits chimiques doivent être conçus de façon à pouvoir se dissocier en produits de dégradation non nocifs à la fin de leur durée d'utilisation, cela dans le but d'éviter leur persistance dans l'environnement.
- 11) Des méthodologies analytiques doivent être élaborées afin de permettre une surveillance et un contrôle en temps réel et en cours de production avant qu'il y ait apparition de substances dangereuses.
- 12) Les substances et la forme des substances utilisées dans un procédé chimique devraient être choisies de façon à minimiser les risques d'accidents chimiques, incluant les rejets, les explosions et les incendies.

De façon générale, la chimie verte correspond à une utilisation de techniques et de méthodologies ayant pour objectif de réduire ou d'éliminer l'usage et la génération de produits (matières premières, intermédiaire, réactif, solvant) potentiellement dangereux pour la santé humaine ou l'environnement. L'application de ce concept à la chimie analytique concerne l'intégralité de la démarche analytique : nécessité ou non de traitement de l'échantillon, choix de la méthode d'analyse, type d'instrumentation [2, 3]. Cela se traduit par la réduction de la quantité de solvants utilisés pour le traitement de l'échantillon avec le développement de techniques d'extraction miniaturisées sur phase solide comme la SPME (Solid-Phase Microextraction) ou la MEPS (microextraction by packed Sorbent). La réduction de la quantité des solvants est aussi rendue possible par le redimensionnement des colonnes chromatographiques (diminution de la longueur des colonnes, utilisation de particules de type sub-2- μm ou fused-core), le développement de techniques plus rapides (ultrahigh pressure liquid chromatography UHPLC ou fast chromatography) mais aussi par l'utilisation de systèmes

miniaturisés (nanoLC ; microLC utilisation des micro-débits) [4, 5]. Enfin le remplacement des solvants toxiques par des alternatives issues de la chimie verte reste un point crucial.

II. Les solvants alternatifs

Il n'existe pas de solvant vert universel. L'aspect « vert » d'un solvant se détermine en fonction de son origine, de son procédé de fabrication ainsi que sa toxicité pour l'homme et l'environnement. Il faut tenir compte de l'application dans laquelle il intervient ainsi que du solvant qu'il est amené à remplacer. Le domaine le plus actif en termes de remplacement de solvants est la synthèse organique ainsi que l'extraction liquide-liquide [6]. De nombreux exemples ont été décrits dans la littérature notamment les agrosolvants [6, 7] qui présentent le plus de compatibilité avec les 12 principes de la chimie verte.

1. Agrosolvants

Agrosolvant se dit d'un solvant provenant de matières renouvelables transformées ou non, dont la majeure partie de la molécule finale est d'origine naturelle [7]. Ils se définissent par rapport à la matière première dont ils sont issus : bois, céréales, plante oléagineuse.

1.1. Agrosolvants issus de la filière bois

Il s'agit principalement d'hydrocarbures terpéniques monocycliques et bicycliques obtenus à partir de conifères, de plantes aromatiques ou bien d'écorces de fruits. Les hydrocarbures terpéniques sont considérés comme des alternatives vertes aux hydrocarbures issus de la filière pétrole. Les principaux solvants issus de ce processus sont le D-limonène et l' α -pinène.

1.1.1. D-limonène

Le D-limonène est un monoterpène monocyclique et composant majoritaire des huiles essentielles d'écorces d'agrumes [8]. La principale source de D-limonène est l'industrie du jus d'orange (la production annuelle de jus d'orange se chiffre à plus de 50 millions de tonnes). Ce solvant renouvelable est impliqué dans plusieurs applications telles que les insecticides, les cosmétiques, et ainsi que dans l'industrie alimentaire. Comme tous les hydrocarbures terpéniques, le D-limonène est un liquide incolore d'odeur caractéristique. Il est pratiquement insoluble dans l'eau mais est soluble dans les solvants organiques. Le D-limonène est un solvant inflammable et toxique pour les milieux aquatiques [9]. Bien que classé en tant que substance « generally recognized as safe » par la Food and Drug Administration [10], le D-limonène présente des risques de mortalité pour l'homme en cas d'ingestion ou de pénétration par les

voies respiratoires [9]. Ce dernier n'est pas classé « cancérigène, mutagène, reprotoxique » (CMR) [11]. Le D-limonène est notamment utilisé comme une alternative à l'hexane pour l'extraction de graisses à partir d'huile de riz ou d'olives par extraction Soxhlet [12, 13], les résultats obtenus étant équivalents à ceux obtenus avec des solvants classiques.

1.1.2. α -pinène

Il s'agit d'un monoterpène bicyclique issu de sources renouvelables (bois, écorces et feuilles de conifères ; plantes aromatiques). Il est le composant majoritaire de l'huile de térébenthine dont il est extrait par distillation fractionnée [14, 15]. Il est utilisé dans les additifs alimentaires et les parfums. L' α -pinène est un liquide incolore d'odeur caractéristique. Il est considéré comme insoluble dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques [16]. Tout comme le D-limonène, l' α -pinène est un solvant inflammable, irritant et pouvant s'avérer mortel pour l'homme en cas d'ingestion ou de pénétration dans les voies respiratoires. Contrairement au D-limonène, l' α -pinène ne présente pas de risque avéré pour les milieux aquatiques. L' α -pinène n'est pas classé CMR. Bien que moins utilisé que le D-limonène, l' α -pinène a aussi été utilisé en tant que solvant remplaçant le n-hexane pour l'extraction de lipides (méthode Soxhlet) provenant de microalgues [17]. Les résultats obtenus montrent que l' α -pinène et le D-limonène donnent des résultats similaires et meilleurs que ceux obtenus avec l'hexane.

1.2. Agrosolvants issus de la fermentation

Les agrosolvants issus de céréales ou d'autres plantes riches en sucre (betterave, sucre de canne, maïs) sont obtenus après un processus de fermentation des matières premières [7]. Les principaux solvants issus de ce processus sont le bioéthanol, le lactate d'éthyle (EL), l'acétate d'isoamyle ou isopentyle (IA) et le 2-méthyltétrahydrofurane (2-MeTHF) [7]. Concernant la polarité mise en jeu par l'éthanol, ce solvant ne sera pas étudié comme alternative viable au n-heptane et au chloroforme.

1.2.1. Lactate d'éthyle

Il s'agit d'un solvant polaire protique dérivant de l'acide lactique obtenu après fermentation de carbohydrates (glucose, maltose, sucrose et lactose) et de maïs. L'EL est un liquide incolore d'odeur douce. Il est miscible avec l'eau et les solvants organiques [18, 19]. Ce solvant présente un très faible impact environnemental compte tenu de sa biodégradabilité et de sa non-toxicité [6]. Il est utilisé comme agent de revêtement de surface (bois, polystyrène et métaux) mais aussi en tant que décapant (polyuréthane, surface métallique) notamment grâce à

ces propriétés d'élimination des graisses, huiles et adhésifs. Il est aussi utilisé dans les préparations pharmaceutiques (excipient de dissolution et de dispersion de molécules actives), dans les additifs alimentaires et les parfums. Le EL est un solvant inflammable et irritant (yeux, voies respiratoires) mais ne présente aucun risque avéré de toxicité pour l'homme et l'environnement [20]. L'EL n'est pas classé CMR.

1.2.2. Acétate d'isoamyle (ou isopentyle)

L'IA est l'un des esters à chaîne courte les plus largement utilisés dans l'industrie alimentaire en raison de son odeur caractéristique de banane et de poire [21]. Différents procédés peuvent être utilisés pour l'obtenir : synthèse verte à partir d'alcool isoamylique [22], soit par synthèse enzymatique [23, 24]. L'IA est un liquide incolore d'odeur caractéristique. Il est peu soluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques. Il est utilisé dans la fabrication de produits tels que les laques et vernis, les additifs alimentaires ainsi que les parfums. L'IA est un solvant inflammable ne présentant aucun risque avéré pour l'homme et l'environnement [25].

1.2.3. 2-méthyltétrahydrofurane

Le 2-MeTHF est solvant étheré aprotique issu de sources renouvelables (maïs, canne à sucre) [26]. Le 2-MeTHF peut être synthétisé par hydrogénation catalytique du furfural ou bien à partir de l'acide lévulinique. Il s'agit d'un liquide incolore avec une odeur caractéristique d'éther. Il possède les propriétés chimiques du THF et physiques du toluène et est placé entre le THF et l'éther diéthylique en termes de polarité [27]. Au contact de l'air, le 2-MeTHF peut former des peroxydes et nécessite l'ajout d'un stabilisant comme le butylhydroxy-toluène (BHT). Il est peu soluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques. Le 2-MeTHF est fréquemment utilisé en remplacement du THF ou de l'éther diéthylique dans les réactions de synthèse de composés organométalliques. Ce solvant est inflammable, irritant (yeux, voies respiratoires) et peut s'avérer nocif pour l'homme en d'ingestion [28]. Le 2-MeTHF ne présente pas de risque pour l'environnement. Le 2-MeTHF est utilisé en remplacement du THF dans les réactions de synthèse de composés organométalliques [29] et en tant que substitut de dichlorométhane dans les réactions biphasiques, car il offre une séparation de phase élevée à l'interface eau-organique [27].

1.3. Agrosolvant issus de la filière oléagineuse

Enfin, les agrosolvants issus de la filière oléagineuse sont obtenus à partir d'huile végétale (colza, tournesol, soja, ...). Les principaux solvants sont les FAMES ainsi que le glycérol et ses dérivés [7].

1.3.1. Esters méthyliques d'acides gras

Il s'agit de mélanges de plusieurs esters méthyliques avec différentes longueurs de chaîne alkyle. Les FAMES sont obtenus par la transestérification (réaction des TGs avec du méthanol) des huiles végétales. Ces solvants présentent une biodégradabilité élevée ainsi qu'une faible toxicité [6]. Ils sont utilisés comme solvants et adjuvants phytosanitaire mais aussi pour le nettoyage de surface. En fonction de la répartition des longueurs de chaînes d'acides gras et/ou du nombre d'insaturations, la couleur du mélange peut aller de l'incolore au jaune brun. Ils sont quasiment insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques. Ces mélanges ne sont pas inflammables mais considérés comme combustibles.

1.3.2. Glycérol et ses dérivés

Le glycérol est obtenu par transestérification des huiles végétales mais aussi en tant que sous-produit de saponification d'huiles végétales [30]. Il est utilisé dans l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire. Il se présente sous la forme d'un liquide incolore, visqueux et inodore. Le glycérol est considéré comme un solvant non-toxique et biodégradable [6, 31]. Il est soluble dans les solvants organiques (exceptés le benzène et le chloroforme) et miscible avec l'eau et les alcools [32]. Ce solvant n'est pas inflammable et ne présente pas de risque avéré pour l'homme et l'environnement [33].

Les solvants agrosourcés ne sont pas la seule alternative possible, on retrouve aussi dans la littérature des exemples de solvants dits « solvants verts ». Parmi eux, on retrouve les liquides ioniques (IL), le cyclopentyl methyl éther (CPME), le CO₂ supercritique ainsi que l'hexaméthylsiloxane (HMDS).

2. Solvants alternatifs non issus de sources renouvelables

2.1. Liquides ioniques

Par définition, les IL sont des milieux liquides dont la température de fusion est inférieure à 100 °C, issus d'une association entre cations et anions [34]. En jouant sur la nature du cation ou l'anion, il est possible de modifier les propriétés du solvant (masse volumique, viscosité, structure en phase liquide, polarité) [34]. Parmi les IL les plus récents, on retrouve des

associations entre les N,Ndialkylimidazolium, les alkylphosphonium ou les alkylpyridinium et différents anions inorganiques (Cl⁻, PF₆⁻...) ou organiques (triflate, tosylate, phénylphosphonate, bistriflylimide...). L'atotoxicité des IL n'est pas démontrée [35]. Leur classement en tant que solvants verts est lié à leur volatilité négligeable (absence d'émission de composés organiques volatils) à température ambiante ainsi qu'à leur très bonne stabilité thermique (peu de dégradation ou de perte) [36]. Ceci explique en partie la raison pour laquelle ils appartiennent à la catégorie dite de « la chimie verte ». Leurs applications dans le domaine de la chimie sont variées : réactions de synthèse organique et de catalyse, extraction et séparation biphasiques, électrolytes, solvants de synthèse de matériaux nanostructurés [37].

2.2. Cyclopentyl methyl éther

Le CPME est un éther hydrophobe. Il est obtenu à partir de la méthylation du cyclopentanol ou bien par addition du méthanol sur le cyclopentène. Il s'agit d'un liquide incolore d'odeur caractéristique d'éther. Il est peu miscible à l'eau mais il est soluble dans les solvants organiques [38]. Tout comme le THF et le 2-MeTHF, le CPME est susceptible de former des peroxydes. Le CPME présente une plus grande résistance à la formation de peroxydes que le THF et le 2-MeTHF mais il nécessite néanmoins l'ajout d'un stabilisant comme le BHT [39]. Il est utilisé en remplacement de solvants comme le THF, méthyl tert-butyle éther, l'éther diéthylique pour la synthèse de composés organométalliques, nucléophiles ainsi que les extractions liquide-liquide. Le CPME est un solvant inflammable et irritant (yeux, voies respiratoires) mais il ne présente pas de risque avéré pour l'homme et l'environnement [40]. Le CPME est utilisé comme co-solvant, en remplacement des solvants de polarité moyenne (toluène, la méthylisobutylcétone et le dichlorométhane), pour la déshydratation des pentoses lignocellulosiques en furfural [41]. Les auteurs ont observé une augmentation de la conversion sélective et une réduction du temps de réaction. Une autre application est la purification des protéines membranaires [42]. Le CPME et le 2-MeTHF sont utilisés en remplacement du mélange chloroforme:méthanol. Les auteurs ont observé que le 2-MeTHF et le CPME dissolvent efficacement les membranes lipidiques ; cela pourrait être avantageux pour notre application.

2.3. Dioxyde de carbone supercritique

Parmi les fluides supercritiques, le CO₂ est quasiment le seul fluide utilisé en chromatographie [43]. Les paramètres critiques, facilement réalisables, pour ce composé pur sont de 31,1°C et 73,8 bar. A l'état supercritique, le CO₂ est un fluide sans odeur, atoxique, ininflammable et non corrosif [44]. Il est peu soluble dans l'eau et est miscible avec les solvants

organiques [45]. Il est accessible à partir de l'industrie pétrolière. Lorsque le fluide est ramené à pression atmosphérique (détente ou réchauffement), le CO₂ revient à l'état gazeux. Ce point associé au bon pouvoir solvant de ce fluide, permet l'extraction sélective de composés apolaires non volatils sans utilisation de solvants. L'une des applications les plus connues du fluide supercritique est l'extraction de la caféine du houblon dans l'industrie agroalimentaire. Le CO₂ supercritique est atoxique et possède un faible impact environnemental.

2.4. Hexaméthylsiloxane

L'HMDS est un solvant siliconé obtenu à partir de l'hydrolyse du chlorure de triméthylsilyle. Ce liquide incolore, peu volatil est très peu soluble dans l'eau [46]. L'HMDS possède des propriétés similaires avec les alcanes [47, 48]. Tout comme les hydrocarbures, il est inflammable et toxique pour les organismes aquatiques [46]. Les propriétés de ce solvant sont une faible tension de surface, une faible viscosité, une faible réactivité et une plus faible émission de composés organiques volatils que l'hexane ou le n-heptane. L'HMDS est utilisé en tant qu'étalon interne en résonance magnétique nucléaire et en tant que revêtement de surface hydrophobe par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (industrie des semi-conducteurs). Son utilisation dans l'industrie pharmaceutique concerne les pansements liquides en tant qu'excipient. Sa première application en LC a montré un comportement similaire avec celui de l'hexane pour la séparation de composés aromatiques [48]. L'HMDS n'est pas référencé comme un solvant alternatif mais il ne présente aucun risque avéré pour la santé humaine et n'est pas classé CMR.

Les solvants présentés ci-dessus respectent en partie les 12 principes de la chimie verte. Les solvants alternatifs, utilisés au cours de ce projet, devront donc proposer une alternative en termes de toxicité au n-heptane et au chloroforme. Ils devront aussi posséder des propriétés physico-chimiques compatibles avec la chromatographie d'adsorption et être compatibles avec différents détecteurs (UV, ELSD, MS). Ils devront posséder des forces éluantes comparables aux solvants classiques afin de mener à bien la séparation. Il n'existe pas à ce jour de solvants respectant l'intégralité des 12 principes de la chimie verte. De plus, les solvants « verts » partagent certaines propriétés des solvants classiques comme l'inflammabilité. Néanmoins, ils présentent de réels avantages en matière de ressources et de faible toxicité.

III. Compatibilité des solvants avec la NPLC-ELSD

A l'exception du CO₂ supercritique, les solvants alternatifs ont peu été utilisés en chromatographie [48, 49].

1. Viscosité

L'EL, les FAMES (soyate de méthyle), le glycérol ainsi que les IL présentent des viscosités élevées (égales ou supérieures à celle de l'isopropanol) s'avérant incompatibles avec le système de pompage en termes de pertes de charges occasionnées (tableau II.1). De plus, la viscosité d'un solvant étant inversement proportionnelle aux coefficients de diffusion, plus elle est élevée moins bonne sera l'efficacité de la séparation ainsi que la résolution (phénomène de dispersion). Le D-limonène et l' α -pinène présentent eux des viscosités plus élevées que le n-heptane et le chloroforme mais elles restent compatibles avec l'instrumentation (tableau II.1). Enfin l'IA, le CPME, le 2-MeTHF et l'HMDS présentent des viscosités comparables aux n-heptane et au chloroforme.

2. Volatilité

L'utilisation d'un ELSD implique que ces solvants soient suffisamment volatils pour ne pas interférer avec la détection des composés d'intérêt. Tous les solvants listés ci-dessus présentent une volatilité inférieure à celle du chloroforme mais restent compatibles avec la détection des lipides à l'exception des IL qui présentent une volatilité nulle. Un deuxième aspect concerne la température d'ébullition des solvants. Afin que l'évaporation des solvants de l'aérosol formé dans la chambre de nébulisation soit optimale, ces températures ne doivent pas être trop élevées. Le D-limonène, l' α -pinène, l'IA, l'EL présentent une température d'ébullition élevée pouvant limiter la sensibilité de la réponse de l'ELSD. Il en est de même pour les FAMES et le glycérol.

3. Polarité

Afin de pouvoir se substituer au n-heptane et au chloroforme, les solvants alternatifs doivent posséder des forces éluantes similaires à ces solvants. En termes de constante diélectrique et de coefficient de partage n-octanol/eau, le D-limonène, l' α -pinène et l'HMDS présentent des similitudes avec le n-heptane. Les FAMES possèdent des polarités proches des hydrocarbures. Le glycérol possède une constante diélectrique et un paramètre de solubilité situés entre le méthanol et l'eau, donc très différent des précédents.

Compte tenu de ces valeurs, le glycérol ne peut pas se substituer au n-heptane et au chloroforme. De même la polarité des liquides ioniques a été estimée autour de celles des alcools à chaînes courtes, cela les rend donc trop éluants pour remplacer le chloroforme ou le n-heptane. Par contre, l'IA, le CPME et le 2-MeTHF présentent des valeurs de constante diélectrique et de coefficient de partage similaires au chloroforme.

Tableau II.1 : Propriétés physico-chimiques des solvants conventionnels et alternatifs.

	<i>n</i> -heptane [32]	Chloroforme [32]	Méthanol [32]	D-limonène [32]	α -pinène [32]	EL [19]	IA [32]	2-MeTHF [26, 28]	FAME (Soyate de méthyle)	Glycérol [32, 50]	IL [34, 35, 37]	CPME [38, 39]	HMDS [46-48]
Masse moléculaire g/mol	100,2	119,38	32,04	136,24	136,24	118,13	130,19	86,14	-	92,09	-	100,16	162,38
Température d'ébullition °C	98,4	61,2	64,10	176,7	156,1	154	142,5	80	333	290	-	106	101
Densité g/cm ³ (20°C)	0,68	1,49	0,79	0,8446	0,8592	1,0302	0,8726	0,85	0,882	1,26	1 à 1,6	0,86	0,76
Constante diélectrique	1,93	4,79	32,70	2,3	2,75	13,1	4,8	6,97	42,2	41,14	>10	4,76	2,3
Solubilité dans l'eau %/m (20°C)	<0,01	0,82	∞	0,08	Insoluble	∞	0,2	14	Insoluble	∞	∞	1,1	Insoluble
Solubilité de l'eau dans le produit %/m (20°C)	0,013	0,056	∞	0,04	Insoluble	∞	1	4,4	Insoluble	∞	∞	0,3	Insoluble
Tension de surface dyne/cm (20°C)	20,35	27,2	22,95	27,1		30,3	24,7	Inconnu	31,6	63,4	-	25,17	15,9
Pression de vapeur saturante hPa (20°C)	47,33	211,18	123	1,2mm	3,8mm	3	4,5	Inconnu	2mm	0,0033 (50°C)	Négligeable	59,90 (25°C)	20
CMR	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Viscosité cP (20°C)	0,41	0,57	0,54	0,923 (25°C)	1,4	2,4	0,87	0,60 (25°C)	3,61	1410	10 à 500	0,55	0,49
Coefficient de partage (<i>n</i> -octanol/eau)	4	2	-0,82	4,58	4,044	-	2,7 (35°C)	1,26	-	-	-	1,59 (20°C)	> 4,0 (25°C)
UV cut off	200	245		250	250	-	300	300	-	-	-	300	220
Paramètre de solubilité cal ^{1/2} ·cm ^{-3/2} Hildebrand	7,4	9,21	14,50	-	-	10	7,8	8,52	-	16,5	-	8,4	Inconnu
Stabilisant	-	0,6% d'éthanol	200 ppm d'éthanol	-	-	-	-	150 à 400 ppm de BHT	-	-	-	50ppm de BHT	-

4. Pureté des solvants alternatifs

Ces solvants n'ont jamais été utilisés en NPLC-ELSD pour l'analyse de lipides. Ils ne sont pas disponibles commercialement en qualité chromatographie à l'exception du 2-MeTHF (Carlo Erba). Les puretés disponibles sont de 96% (α -pinène), 97% (D-limonène), 98% (HMDS, IA, EL) et supérieure à 99% (CPME, 2-MeTHF et glycérol). La commercialisation des FAMEs est restreinte et les puretés disponibles sont inférieures à 95%.

IV. Alternatives aux solvants conventionnels en NPLC

1. Alternatives au n-heptane

Compte tenu des observations faites dans la partie III., les alternatives envisageables pour la substitution du n-heptane en NPLC-ELSD sont le D-limonène, l' α -pinène, et l'HMDS. Une autre application intéressante concerne l'utilisation du D-limonène en chromatographie à contre-courant. Il est utilisé en tant que remplaçant du n-heptane [49]: les auteurs montrent que le D-limonène est une alternative possible au n-heptane en termes de propriétés de solvant, mais notent que la grande différence de masse volumique entre le D-limonène et n-heptane était problématique pour leur application. Le D-limonène et l' α -pinène possèdent des propriétés physico-chimiques proches, des comportements similaires en termes d'extraction liquide-liquide. Le troisième candidat est l'HMDS. Ce solvant hydrophobe présente des similitudes avec les alcanes. L'HMDS a été utilisé comme alternative à l'hexane pour la séparation de composés aromatiques en phase normale [48]. Les auteurs ont observé que l'HMDS est un solvant plus apolaire que certains solvants organiques courants dans la chromatographie d'adsorption (méthyl-t-butyle éther et le dichlorométhane). En outre, une augmentation du pourcentage de HMDS dans la phase mobile (40% à 100%) entraîne une augmentation du facteur de rétention (k) et ainsi qu'une amélioration de la résolution (R_s). Les valeurs de k étant plus élevées avec 100% d'HMDS qu'avec 100% d'hexane. L'utilisation d'un solvant plus faible que le n-heptane pourrait être intéressant afin d'améliorer la séparation des lipides non polaires.

L'utilisation d'HMDS et du D-limonène en tant que phase mobile en LC laisse penser que ces solvants seront compatibles avec le système HPLC. Les limites d'utilisation de HMDS, du D-limonène et de l' α -pinène concernent leur pureté et leur compatibilité avec l'ELSD. En effet, l'utilisation de solvants de qualité non HPLC implique la présence d'impuretés organiques qui pourraient interférer avec la détection des classes de lipides pendant la séparation. La présence de résidus non-volatils pourrait être aussi problématique. Aucun des solvants n'existe en qualité HPLC et le coût d'achat rend l'HMDS et le D-limonène plus attractifs que l' α -pinène

(80€/L_{HMDS} et 152€/L_{D-limonène} contre 269€/L _{α -pinène}) pour des propriétés similaires. Seuls l'HMDS et le D-limonène seront évalués en tant que substituant au n-heptane pour la séparation de classes lipidiques par NPLC-ELSD.

2. Alternatives au chloroforme

Compte tenu des observations faites dans la partie III, les alternatives possibles au chloroforme sont le CPME, l'IA et le 2-MeTHF. Le choix de l'IA repose sur ces similitudes avec l'acétate d'éthyle en termes de propriétés physico-chimiques. L'acétate d'éthyle a été utilisé pour remplacer le dichlorométhane en LC pour l'analyse de lipides [51]. L'IA est plus intéressant que son homologue car il présente une volatilité plus faible et il ne provoque pas une irritation aux yeux. Un avantage de ce solvant est sa miscibilité avec l'eau qui est essentielle pour l'établissement du gradient ternaire. Ses inconvénients sont liés à sa viscosité élevée et sa température d'ébullition qui pourrait perturber le processus de nébulisation et de vaporisation lors de la détection.

3. Alternative à la NPLC : la SFC

L'utilisation de fluides supercritiques comme phases mobiles en chromatographie présente des avantages liés à leurs propriétés physiques intermédiaires entre celles des liquides et des gaz. Ils possèdent une viscosité environ 10 fois plus faible que les liquides tout en ayant des masses volumiques du même ordre de grandeur que les liquides. La polarité du CO₂ supercritique dépend de son état physique (pression, température et masse volumique). En SFC, le domaine de masse volumique utilisé pour ce fluide, le place en termes de paramètre de solubilité entre le pentane et le toluène. En s'intéressant à la constante diélectrique de ce fluide pour des masses volumiques usuelles, on remarque qu'elle est inférieure ou voisine à celles des alcanes. Compte tenu de ses propriétés physico-chimiques et de son faible impact sur l'homme et l'environnement, l'utilisation du CO₂ supercritique en SFC est présentée comme alternative verte à la NPLC.

Afin d'adapter la solubilité des composés polaires dans le CO₂ et donc d'augmenter la force d'éluante de la phase mobile, le CO₂ supercritique est généralement mélangé avec une petite quantité d'un solvant polaire, appelé modificateur. En particulier, dans le domaine de l'analyse des lipides, le méthanol est le solvant le plus utilisé comme un modificateur polaire grâce à sa faible viscosité et forte polarité [8, 11, 13]. Ce solvant est avéré toxique pour l'homme (par ingestion, inhalation et contact cutané). Le remplacement de ce solvant par les solvants alternatifs de milieux de polarité retenus en NPLC pourrait permettre de limiter l'utilisation de solvant toxique.

Références bibliographiques chapitre II

- [1] P.T. Anastas, J.C. Warner, Principles of green chemistry, Green chemistry: Theory and practice, (1998) 29-56.
- [2] S. Armenta, S. Garrigues, M. De la Guardia, Green analytical chemistry, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 27 (2008) 497-511.
- [3] M. Tobiszewski, A. Mechlinska, J. Namiesnik, Green analytical chemistry - theory and practice, Chemical Society Reviews, 39 (2010) 2869-2878.
- [4] J. Plotka, M. Tobiszewski, A.M. Sulej, M. Kupska, T. Gorecki, J. Namiesnik, Green chromatography, Journal of Chromatography A, 1307 (2013) 1-20.
- [5] C.J. Welch, N. Wu, M. Biba, R. Hartman, T. Brkovic, X. Gong, R. Helmy, W. Schafer, J. Cuff, Z. Pirzada, Greening analytical chromatography, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 29 (2010) 667-680.
- [6] Y. Gu, F. Jérôme, Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry, Chemical Society Reviews, 42 (2013) 9550-9570.
- [7] INRS, ED4230 - Les agrosolvants (2015).
- [8] A. Mohammad, S. Chemat, V. Tomao, F. Chemat, Limonene as Green Solvent for Extraction of Natural Products, in: Green Solvents I, Springer Netherlands, 2012, pp. 175-186.
- [9] D-limonene MSDS No. 183164, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, Sigma-Aldrich, 2015, pp. 1-8.
- [10] Food and Drug Administration, Code of Federal Regulations, chap. 21 Food and Drugs, in: Health and Human services (Ed.), 2016.
- [11] d-Limonène - Fiche toxicologique 227, in: INRS (Ed.) Fiche toxicologique, 2010.
- [12] M. Virot, V. Tomao, C. Ginies, F. Visinoni, F. Chemat, Green procedure with a green solvent for fats and oils determination: Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation, Journal of Chromatography A, 1196-1197 (2008) 147-152.
- [13] M. Virot, V. Tomao, C. Ginies, F. Chemat, Total Lipid Extraction of Food Using d-Limonene as an Alternative to n-Hexane, Chromatographia, 68 (2008) 311-313.
- [14] C. Dejoye Tanzi, M. Abert Vian, C. Ginies, M. Elmaataoui, F. Chemat, Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae, Molecules, 17 (2012) 8196-8205.
- [15] S. Bertouche, V. Tomao, K. Ruiz, A. Hellal, C. Boutekedjiret, F. Chemat, First approach on moisture determination in food products using alpha-pinene as an alternative solvent for Dean-Stark distillation, Food Chemistry, 134 (2012) 602-605.
- [16] Alpha pinène - MSDS N.147524, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, 2010.
- [17] C.D. Tanzi, M.A. Vian, F. Chemat, New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process, Bioresource technology, 134 (2013) 271-275.
- [18] Ethyl lactate MSDS N. E34102, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, 2014.
- [19] C.S.M. Pereira, V.M.T.M. Silva, A.E. Rodrigues, Ethyl lactate as a solvent: properties, applications and production processes - a review, Green Chemistry, 13 (2011) 2658-2671.
- [20] Lactate d'éthyle - Fiche toxicologique 240, in INRS (Ed.) Fiche toxicologique, 2001.
- [21] S. Torres, A. Pandey, G.R. Castro, Banana flavor: insights into isoamyl acetate production, Cell, 549 (2010) 776.
- [22] A. Wolfson, D. Saidkarimov, C. Dlugy, D. Tavor, Green synthesis of isoamyl acetate in glycerol triacetate, Green Chemistry Letters and Reviews, 2 (2009) 107-110.
- [23] S.H. Krishna, S. Divakar, S.G. Prapulla, N.G. Karanth, Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from Rhizomucormiehei, Journal of Biotechnology, 87 (2001) 193-201.
- [24] S.n. Torres, M.D. Baigorã, S.L. Swathy, A. Pandey, G.R. Castro, Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by Bacillus licheniformis S-86 esterase, Food Research International, 42 (2009) 454-460.
- [25] Isopentyl acetate - MSDS N. 79857, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, 2015.
- [26] R. Aul, B. Comanita, A green alternative to THF, Manufacturing chemist, May, (2007) 33-34.
- [27] D.F. Aycock, Solvent Applications of 2-Methyltetrahydrofuran in Organometallic and Biphasic Reactions, Organic Process Research & Development, 11 (2007) 156-159.
- [28] 2-Methyltetrahydrofuran MSDS N. 155810, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, 2016.

- [29] A. Kadam, M. Nguyen, M. Kopach, P. Richardson, F. Gallou, Z.-K. Wan, W. Zhang, Comparative performance evaluation and systematic screening of solvents in a range of Grignard reactions, *Green Chemistry*, 15 (2013) 1880-1888.
- [30] M. Pagliaro, R. Ciriminna, H. Kimura, M. Rossi, C. Della Pina, From glycerol to value-added products, *Angewandte Chemie International Edition*, 46 (2007) 4434-4440.
- [31] A. Wolfson, C. Dlugy, Y. Shotland, Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities, *Environmental Chemistry Letters*, 5 (2007) 67-71.
- [32] V. Sedivec, J. Flek, *Handbook of analysis of organic solvents*, E. Horwod; Wiley, 1975.
- [33] Glycerol MSDS N. G7893, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, 2016.
- [34] G. Moutiers, I. Billard, *Les liquides ioniques: des solvants pour l'industrie*, Techniques de l'ingénieur. Sciences fondamentales, (2005).
- [35] D. Zhao, Y. Liao, Z. Zhang, Toxicity of ionic liquids, *Clean-soil, air, water*, 35 (2007) 42-48.
- [36] T.P.T. Pham, C.-W. Cho, Y.-S. Yun, Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review, *Water research*, 44 (2010) 352-372.
- [37] S. Mallakpour, M. Dinari, Ionic liquids as green solvents: progress and prospects, in: *Green Solvents II*, Springer, 2012, pp. 1-32.
- [38] Cyclopentyl methyl ether MSDS N.675970, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, 2012.
- [39] K. Watanabe, N. Yamagiwa, Y. Torisawa, Cyclopentyl methyl ether as a new and alternative process solvent, *Organic Process Research & Development*, 11 (2007) 251-258.
- [40] K. Watanabe, The Toxicological Assessment of Cyclopentyl Methyl Ether (CPME) as a Green Solvent, *Molecules*, 18 (2013) 3183-3194.
- [41] M.J.C. Molina, R. Mariscal, M. Ojeda, M.L. Granados, Cyclopentyl methyl ether: A green co-solvent for the selective dehydration of lignocellulosic pentoses to furfural, *Bioresource technology*, 126 (2012) 321-327.
- [42] S.-J. Tenne, J. Kinzel, M. Arlt, F. Sibilla, M. Bocola, U. Schwaneberg, 2-Methyltetrahydrofuran and cyclopentylmethylether: Two green solvents for efficient purification of membrane proteins like FhuA, *Journal of Chromatography B*, 937 (2013) 13-17.
- [43] G. Guiochon, A. Tarafder, Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 1037-1114.
- [44] D. Thiébaud, *Chromatographie en phase supercritique*, Techniques de l'ingénieur Chromatographie et techniques séparatives, base documentaire : TIB385DUO (2016).
- [45] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Chromatographie en phases liquide et supercritique*, Masson Paris, 1991.
- [46] Sigma-Aldrich, HMDS, MSDS No. 205389, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, Sigma-Aldrich, 2015, pp. 1-8.
- [47] C.P. Co, MSDS - PSF- 0.65cSt HMDS Silicone Fluid in, 2014, pp. 1-4.
- [48] N.D. Danielson, C.L. Goldhammer, J.R. Bowser, P.F. Gavin, Hexamethyldisiloxane as a mobile phase component for normal phase liquid chromatography, *Chromatographia*, 43 (1996) 647-653.
- [49] K. Faure, E. Bouju, P. Suchet, A. Berthod, Use of Limonene in Countercurrent Chromatography: A Green Alkane Substitute, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 4644-4650.
- [50] Glycerol, in: INERIS (Ed.), 2011.
- [51] M. Graeve, D. Janssen, Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: application to exceptional marine lipids, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1815-1819.

CHAPITRE III : APPAREILLAGE ET METHODES

I. Chromatographie en phase liquide

1. Système

Le système HPLC (Figure III.1) est constitué d'une pompe quaternaire (Hewlett-Packard HPLC 1050 pump), d'un dégazeur à hélium (Hewlett-Packard HPLC 1050) et d'un injecteur automatique (Hewlett-Packard HPLC 1050 autosampler). Le système peut être couplé avec un détecteur UV, ELSD ou bien un TQ-MS.

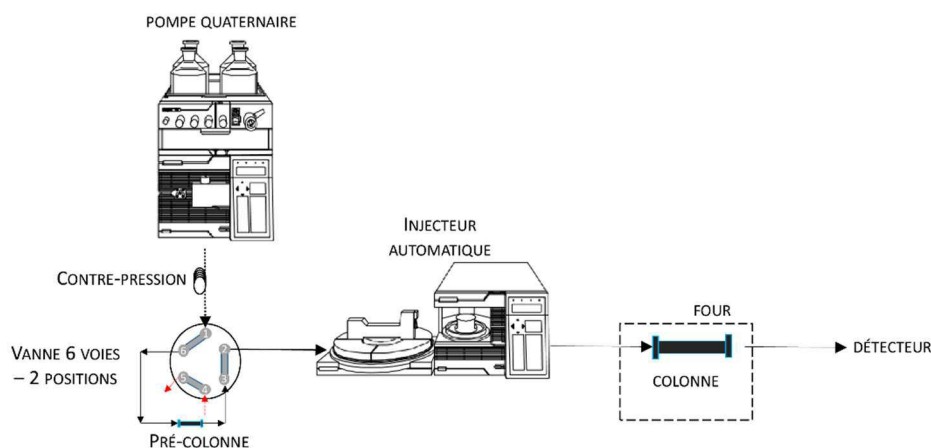


Figure III.1 : Schéma général du système HPLC

1.1. Pompe

Le débit est fixé à 0,5 mL/min. Le facteur de compressibilité de la pompe est ajusté pour être compatible avec le n-heptane ($120 \cdot 10^{-6}$ /bar). Une contre-pression (tube en inox de dimension 10 m x 0,16 mm) est ajoutée entre la sortie de la pompe et l'entrée de la phase mobile dans la vanne 6 voies. Cet ajout permet au système de maintenir constant le pompage du n-heptane ou bien de l'HMDS.

1.2. Vanne 6 voies – 2 positions

La présence d'impuretés dans les solvants apolaires commerciaux a nécessité la mise en place d'un système permettant de piéger les impuretés présentes dans le n-heptane (ou l'HMDS) afin de ne pas perturber la séparation des classes lipidiques.

Comme décrit dans le chapitre VII, on observe un phénomène de préconcentration d'impuretés lors de la phase d'équilibre de la colonne chromatographique (100% n-heptane). Afin de limiter ce phénomène et permettre l'identification des lipides, il est nécessaire de capter les impuretés du n-heptane en amont de la colonne dédiée à la séparation. L'utilisation d'une vanne 6 voies (Figure III.2) reliée à un commutateur de position permet d'orienter la phase mobile en position A ou B en fonction de l'étape d'analyse (équilibre de la colonne

chromatographique ou séparation des classes lipidiques). L'utilisation de la voie A correspond à la phase d'équilibre tandis que la voie B est utilisée lors de la séparation des lipides.

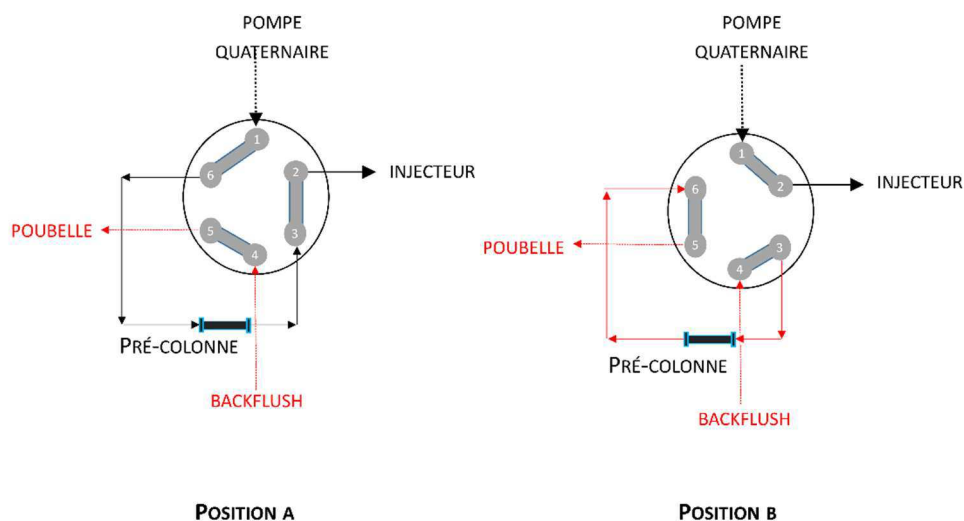


Figure III.2 : Schéma d'utilisation de la vanne 6 voies - deux positions.

En position A, la phase mobile (n-heptane ou HMDS) est dirigée vers une pré-colonne, puis vers l'injecteur et vers la colonne chromatographique. En passant dans la pré-colonne (silice vierge activée), les impuretés, présentes dans le n-heptane, sont adsorbées sur la phase stationnaire. Cette pré-colonne permet donc de fixer les impuretés et permet ainsi de limiter l'effet de concentration sur la colonne chromatographique. En position B, la phase mobile est dirigée directement vers l'injecteur et la colonne chromatographique (sans passer par la pré-colonne). Un backflush de la pré-colonne peut être réalisé simultanément afin de désorber les composés fixés et être ainsi réutilisable pour la prochaine étape d'équilibre.

1.3. Pré-colonne

Les pré-colonnes utilisées sont : une colonne Nucléosil SI (100 x 4,6 mm, 50Å, 10µm) ainsi qu'une colonne Inertsil SIL-150A (150 x 4,6 mm; 5 µm). La silice vierge est au préalable désactivée et séchée afin de pouvoir piéger les impuretés présentes dans les solvants apolaires utilisés au cours de cette thèse.

1.4. Injection

Le passeur automatique a été programmé pour injecter 5µL.

1.5. Contrôle de la température

La température de la colonne est fixée à 40°C grâce à un dispositif de contrôle thermostatique (Crococil, Cluzeau, Ste. Foy la Grande, France).

1.6. Volume de délai du système

Ce volume a été estimé en suivant l'augmentation de la réponse du détecteur UV (longueur d'onde de travail fixée à 270 nm) lorsque l'on fait passer la phase mobile de 100% méthanol à un mélange de méthanol comprenant 0,5% d'acétone. Le volume de délai a été estimé à 1,25 mL.

1.7. Détection UV

Les mesures ont été réalisées sur un Applied Biosystems 785A Programmable Absorbance Detector (ThermoFisher scientifique, France). La longueur d'onde de travail a été fixée à 254 nm. Les résultats ont été traités grâce au logiciel Azur.

1.8. Détection par diffusion de la lumière

Les mesures ont été réalisées avec un DDL 31 ELSD (Eurosep, Cergy, France). La température de la chambre de nébulisation est fixée à 30°C. Le gain du photomultiplicateur est fixé à 600 mV. La pression de gaz nébuliseur (air filtré à l'aide d'une cartouche) est fixée à 2,0 bars. La température du tube évaporateur a été fixée à 45°C pour l'ensemble des mesures. Les séparations impliquant de l'IA comme solvant B sont réalisées à 50°C afin de favoriser le processus de nébulisation et d'évaporation. Les résultats ont été traités grâce au logiciel Azur.

1.9. Détection par spectrométrie de masse

Les mesures ont été réalisées avec un API 3000 TQ-MS équipé d'une source ESI et APCI. Pour l'intégralité des mesures effectuées, les modes positif et négatif ont été utilisés. Les résultats ont été analysés grâce au logiciel Analyst software (ABI Sciex, USA), qui permet aussi le contrôle de l'instrument. Les valeurs des paramètres concernant la source, le gaz ainsi que les composés ont été sélectionnées en fonction du type de source (ESI ou APCI) et du type d'analyse (introduction directe ou couplage LC-MS). Ces valeurs sont détaillées dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Valeurs utilisées pour le couplage LC-MS ou introduction directe des échantillons en ESI ou APCI.

Paramètres	Source	ESI	APCI	
		Infusion	Infusion directe de HMDS pur et des standards de lipides	Couplage LC-MS
Source et gaz	Nebulizer gas (NEB)	1 à 15	1 à 15	8
Source et gaz	Curtain gas (CUR)	6 à 15	6 à 15	8
Source et gaz	Turbolonspray Voltage (IS)	-5500V	-	-

Source et gaz	Nebulizer current (NC)	-	+/- 0 à 5	
Source et gaz	Température	0 à 500°C	50 à 500°C	300°C
Source et gaz	Position latérale	-10 à +10 mm	-6 à +6 mm	
Source et gaz	Position horizontale	5 à 15 mm	-	
Composés	Débit	10 µL/min	10 µL/min	0,5 mL/min
Composés	Declustering potential (DP)	+/-0 à 200V	+/-0 à 200V	+/-60V
Composés	Focusing potential (FP)	+/-50 à 400V	+/-50 à 400V	+/-320V
Composés	Entrance potential (EP)	+/-2 à 15V	+/-2 à 15V	+/-9
	Gamme de masse	50 à 1000	50 à 1000	215 à 1500

2. Colonnes, phase stationnaire et phase mobile

2.1. Phase stationnaire

La séparation des classes lipidiques a été réalisée avec une colonne Inertsil SIL-150A (GL Sciences Inc.) de dimensions : 150 x 2,1 mm ; 5 µm. Le volume mort (V_0) de cette colonne est de 0,49 mL.

2.2. Phase mobile

Les solvants conventionnels utilisés pour cette étude sont de qualité HPLC : le n-heptane (Chromasolv®, $\geq 99\%$) et l'éthanol (Chromasolv®, absolute, $\geq 99,8\%$) proviennent de chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), le chloroforme et l'eau (HPLC grade) proviennent de chez VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Le chloroforme est stabilisé avec 0,6 % d'éthanol.

Les solvants alternatifs proviennent tous de chez Sigma-Aldrich : HMDS (pureté $\geq 98\%$) ; D-limonène (pureté $\geq 97\%$) ; IA (Reagent grade, pureté $\geq 98\%$) ; CPME (Reagent Plus grade, pureté $\geq 99,5\%$) et 2-MeTHF (Reagent Plus grade, pureté $\geq 99,9\%$). Le CPME et le 2-MeTHF sont stabilisés respectivement avec 50 ppm et 150 - 400 ppm de BHT, nécessaire pour limiter la formation de peroxydes. Les solvants sont utilisés sans purification préalable à l'exception de l'HMDS qui a nécessité une double distillation. Un dégazage à l'hélium est utilisé pendant les analyses.

II. Chromatographie en phase supercritique

1. Système

Le système (Figure III.3) se compose d'un module de pompage (une pompe pour le CO₂ supercritique et une pompe pour le modificateur) et de régulation de la pression Berger SFC, d'un four thermorégulé (Hewlett Packard 5890, series II gas chromatograph), d'un module d'injection ainsi que deux détecteurs : un spectrophotomètre UV à barrette de diodes (DAD) et un ELSD. Ce système permet d'utiliser des colonnes remplies (LC ou SFC). Le logiciel Berger SFC 3D ChemStation a été utilisé pour le contrôle du système et l'acquisition de signaux du DAD.

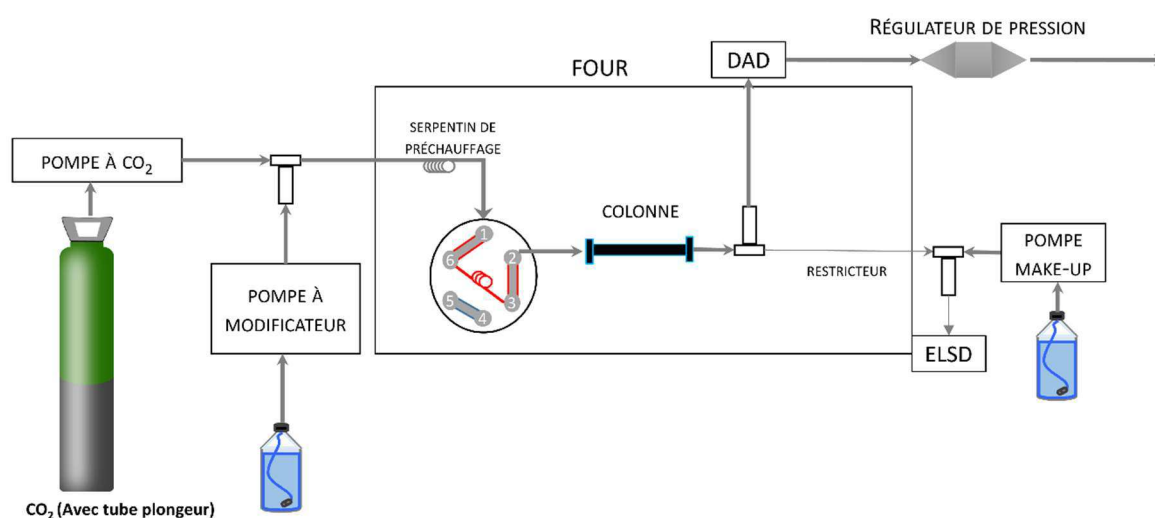


Figure III. 3 : Schéma général du système SFC

Une division du débit de l'effluent a été réalisée entre le DAD (placé sur le flux principal de dioxyde de carbone) et l'ELSD. Le maintien de la pression jusqu'au nébuliseur de l'ELSD est effectué à l'aide d'une restriction : Un restricteur linéaire a été utilisé (tube de silice fondue de diamètre interne 25 μm). La longueur du restricteur permet de régler le débit de l'effluent. Une longueur de 40 cm permettant d'obtenir un débit gazeux de 100 mL/min (à 150 bar et 50°C). Afin de limiter la précipitation des solutés suite à la dépressurisation du CO₂ supercritique, ce capillaire est thermostaté à 50°C. Dans certains cas, l'utilisation de l'ELSD implique l'ajout d'un solvant post-colonne. Un connecteur en « T » a été placé entre celui servant à la division de l'effluent en sortie de colonne et l'entrée de l'ELSD. Ce nouveau connecteur permet d'introduire un solvant sous pression ; il se mélange alors à l'effluent dirigé vers le capillaire de nébulisation de l'ELSD.

1.1. Pompage

Le fluide est pompé à l'état liquide (à 5°C pour le CO₂) afin d'éviter le phénomène de cavitation dans le corps de la pompe. L'ajout éventuel de modificateur polaire est effectué à l'aide d'une seconde pompe chromatographique.

1.2. Module d'injection

L'injection est effectuée à l'aide d'une vanne Rheodyne 7413 munie d'une boucle interne actionnée par un système pneumatique. Le temps durant lequel la boucle reste en position injection est fixé à 0,5 seconde.

1.3. Contrôle de la température

La température de la colonne est régulée par un four GC Hewlett Packard (5890, series II gas chromatograph) et fixée à 50°C.

1.4. Régulation de la pression

La pression gouverne, avec la température, la masse volumique du fluide supercritique et par conséquent sa force éluante. La régulation de pression est effectuée au moyen d'un régulateur de pression programmable (SFC FCM 1200) qui permet de réaliser des gradients de pression à débit de fluide constant. Utilisé avec les colonnes remplies, ce régulateur est placé en aval de la colonne et du DAD. Dans le cas d'une détection en phase gazeuse placée en dérivation du flux principal du fluide supercritique, la pression est maintenue par un restricteur qui se situe en amont du détecteur. Un restricteur linéaire a été utilisé pour réaliser le couplage avec l'ELSD. Le connecteur en T permet de transférer 10% de l'effluent de la colonne vers l'ELSD, et environ 90% vers le DAD.

1.5. Détection UV

Un spectrophotomètre UV à barrette de diodes (Hewlett-Packard HPLC 1050) est utilisé avec une cellule haute pression d'un volume de 6 µL pour des colonnes de diamètre interne égal à 4,6 mm. Les longueurs d'onde de travail sont fixées à 220, 254 et 280 nm.

1.6. Détection par diffusion de la lumière

Les mesures ont été réalisées avec un DDL 31 ELSD (Eurosep, Cergy, France). La température de la chambre de nébulisation est fixée à 40°C. Le gain du photomultiplicateur est fixé à 600 mV. La pression de gaz nébuliseur (air filtré à l'aide d'une cartouche) est fixée à

2,0 bars. La température du tube évaporateur a été fixée à 50°C pour l'ensemble des mesures. Les résultats ont été traités grâce au logiciel Azur.

Une pièce en T a été utilisée afin de relier l'effluent sortant du restricteur et l'effluent provenant d'une pompe HPLC X-LC™ (JASCO) vers l'entrée de l'ELSD. Le solvant utilisé pour ces mesures est l'éthanol. Le débit a été fixé 0,35 mL/min.

2. Colonnes, phase stationnaire et phase mobile

2.1. Phase stationnaire

La SFC met en œuvre des phases stationnaires spécifiques ainsi que la majorité des colonnes remplies de la LC (à l'exception des phases stationnaires fonctionnant uniquement avec un éluant aqueux). Pour cette étude, trois phases ont été utilisées : une colonne Princeton SFC 2-ethylpyridine (4,6 x 100 mm ; 5µm), une colonne Princeton SFC Diol column (3,0 x 100 mm ; 3µm) (Princeton Chromatography) et une colonne Kinetex Core-shell™ C18 (4,6 x 150 mm ; 2,6 µm) (Phenomenex).

2.2. Phase mobile

2.2.1. Choix de la phase supercritique

Du CO₂ de qualité 4,5 ; de teneur en CO₂ de 99,995% (Messer France, Saint Denis, France) a été utilisé. Les spécifications sont disponibles dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Spécifications générales du dioxyde de carbone de qualité 4.5 (Messer)

Impuretés	Ppm (v/v)
O ₂	<=10
CO	<=1
H ₂ O	<=5
N ₂	<=25
CH ₄	<=5

2.2.2. Choix des modificateurs polaires

Trois alcools à chaîne courte ont été utilisés comme modificateurs conventionnels de SFC : le méthanol (HPLC-Plus, ≥ 99,9%), l'éthanol (HPLC-Plus, ≥ 99,9%) et le 2-propanol (HPLC-Plus, ≥ 99,5%) produits par Carlo Erba Reagent (Val de Reuil, France). Le méthanol est stabilisé avec moins de 200 ppm d'éthanol.

Les trois solvants alternatifs utilisés comme modificateurs sont fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) : l'IA (de qualité Reagent®, 98%) ; le CPME (de qualité

ReagentPlus®, $\geq 99,5\%$) et le 2-MeTHF (de qualité ReagentPlus®, $\geq 99,9\%$). Le CPME et le 2-MeTHF sont stabilisés avec respectivement 50 ppm et 150 à 400 ppm de BHT. Aucune étape de purification n'a été réalisée avant leur utilisation en SFC. Un dégazage aux ultrasons est effectué pour tous les solvants (conventionnels et alternatifs) avant leur utilisation.

III. Méthodes spécifiques

1. Purification des solvants apolaires

1.1. n-heptane

La purification du n-heptane commercial est réalisée sur une colonne de silice vierge (150 x 20,0 mm ; 5-20 μ m Lichroprep Si 60). Une pompe HPLC (LC-6A pump, Shimadzu) est utilisée afin de faire circuler le n-heptane à un débit de 8 mL/min. Une première fraction est éliminée (environ 10% du volume final). Des profils chromatographiques du n-heptane purifié sont réalisés par NPLC-ELSD afin de contrôler l'efficacité de l'étape de purification.

1.2. HMDS

La purification de l'HMDS a été réalisée par distillation à pression atmosphérique. La température d'ébullition de l'HMDS est de 101°C. Cette purification consiste en deux distillations successives de HMDS.

Les principales impuretés perturbant la réponse de l'ELSD sont éliminées lors de la montée de température (de température ambiante à 101°C). La première fraction (environ 15%) est éliminée car elle contient la majorité des impuretés de l'HMDS. Lorsque l'on a récupéré l'intégralité de l'HMDS, on observe une diminution de la température (stabilisation autour de 55°C). Le résidu encore présent dans le ballon a un aspect huileux et est lui aussi éliminé (approximativement 5% du volume initial). L'HMDS, ainsi purifié, est distillé une seconde fois. A nouveau, la première fraction (10%) est éliminée. A la fin de la deuxième distillation, on remarque l'absence de résidus huileux dans le ballon. Pour limiter le risque de contamination entre deux distillations, la verrerie est lavée à l'isopropanol, puis à l'acétone et est séchée à l'étuve (50°C) pendant 2 heures.

2. Méthode de désactivation/activation de la silice vierge

La désactivation de la colonne consiste à faire passer 20 V_0 d'éthanol absolu sur la silice vierge afin d'éluer les impuretés et lipides polaires encore présents sur la phase stationnaire. Un second lavage est réalisé avec du 2,2-diméthoxypropane (100 V_0). Ce solvant en réagissant avec

l'eau adsorbée sur la silice forme du méthanol et de l'acétone qui sont plus facilement éliminables. Le débit utilisé pour les lavages est de 0,25 mL/min pour l'éthanol et 0,5 mL/min pour le 2,2-diméthoxypropane. Ensuite, la colonne est placée dans un four et thermostatée à 100°C. Le séchage de l'adsorbant dure une heure sous flux d'azote. Après retour à température ambiante, la colonne est placée dans un montage HPLC et thermostatée à 40°C. L'adsorbant est conditionné avec un solvant apolaire (n-heptane ou HMDS). Le débit est fixé à 1 mL/min. Le contrôle du reconditionnement est réalisé par le suivi de la ligne de base (ELSD).

3. Caractérisation des impuretés dans le n-heptane

Dans le cadre de l'étude portant sur les impuretés du n-heptane, plusieurs instruments et colonnes chromatographiques ont été utilisés afin d'identifier l'origine de la contamination ainsi que la caractérisation des impuretés. Le détail de ces instruments est décrit dans la partie matériel et méthodes du chapitre VII (pages 148 à 152).

Partie II : Résultats

**CHAPITRE IV : APPORT DES SOLVANTS
ALTERNATIFS POUR LA SEPARATION DE
CLASSES LIPIDIQUES PAR NPLC-ELSD**

INTRODUCTION

Comme indiqué précédemment, la NPLC permet de réaliser des séparations de classes lipidiques par ordre de polarité croissante couvrant une très large gamme de polarité.

L'examen de la littérature montre que ce type de séparation nécessite l'utilisation de gradient ternaire impliquant généralement un alcane, un solvant de polarité intermédiaire (chloroforme, THF, dichlorométhane) et un mélange hydro-organique. Afin de limiter l'utilisation de solvants présentant des risques pour l'homme et l'environnement, la substitution du n-heptane et du chloroforme par les nouveaux solvants proposés par la chimie verte a été envisagée.

Il n'existe pas de solvant idéal parmi les solvants dits verts. Les alternatives aux solvants apolaires restent dangereuses pour les milieux aquatiques et la plupart des solvants commerciaux proposés conservent un caractère inflammable. Le point commun de ces alternatives est de proposer une toxicité faible pour l'homme ainsi qu'une limitation des émissions de composés organiques volatils. Dans le cadre de cette étude, le D-limonène et l'HMDS ont été sélectionnés pour leurs similitudes avec le n-heptane. Il en est de même pour le CPME, l'IA et le 2-MeTHF qui ont été choisis comme remplaçants du chloroforme.

En chromatographie d'adsorption, l'activité du support dépend du nombre de groupement silanols libres et non recouverts par une molécule d'eau et donc par conséquent de l'eau résiduelle présente dans la phase mobile. Afin de mener à bien l'évaluation des solvants alternatifs en NPLC-ELSD, l'utilisation de silice vierge comme phase stationnaire a nécessité le développement d'une méthode de contrôle de l'activité du support. Cette dernière permet à chaque changement de la composition du gradient binaire ou ternaire de ramener l'adsorbant dans un état activé contrôlé et reproductible. De même, le retour à l'équilibre entre deux injections a nécessité la mise au point d'une méthode de rinçage adaptée à toutes les compositions de gradient étudiées. Le développement de ces méthodes est donné en annexe I.

En premier lieu, la compatibilité des solvants alternatifs avec la chromatographie liquide et la détection par diffusion de la lumière a été testée. L'investigation de ces solvants a permis de montrer qu'ils étaient adaptés à l'analyse en termes de viscosité et de pureté. La non-disponibilité d'une qualité HPLC pour les solvants alternatifs n'a pas été un frein pour leur utilisation sauf pour l'HMDS et le D-limonène. Une double distillation a été réalisée pour ces solvants et s'est avérée insuffisante dans le cas du D-limonène.

La comparaison des facteurs de rétentions obtenus pour les SEs et les TGs en conditions isocratiques a permis de montrer que HMDS possède une force éluante plus faible que le n-

heptane. Ce point a été confirmé lors de la réalisation de gradients binaires. Ces derniers composés d'un ou de deux solvants alternatifs permettent de séparer six classes de lipidiques, caractéristiques des lipides apolaires et peu polaires. Ils offrent une sélectivité différente tout en permettant l'obtention de séparations efficaces et comparables aux séparations conventionnelles.

L'utilisation de ces solvants, en gradient ternaire, pour la séparation de dix classes lipidiques incluant les SEs, les STs, les glycérolipides, les FAs ainsi que les PLs met en évidence le potentiel de ces solvants.

Ces travaux sont synthétisés dans une publication qui regroupe les divers aspects présentés ci-dessus, ainsi que l'apport des solvants alternatifs pour la séparation de classes lipidiques par NPLC-ELSD.

ALTERNATIVE SOLVENTS FOR IMPROVING THE GREENNESS OF NORMAL PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF LIPID CLASSES

Journal of Chromatography A, 1464 (2016), 55-63

Authors

Nolwenn Prache^{a,b}, Sonia Abreu^a, Patrick Sassi^b, Didier Thiébaud^b, Pierre Chaminade^{a,*}

^a UMR 8231 Chimie Biologie Innovation CNRS – ESPCI, LSABM, ESPCI Paris PSL Research University, F-75005 Paris, France

^b Lip(Sys)-2, Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92290 Châtenay-Malabry, France.

* Corresponding author. Tel: +33(0)140794648; Fax: +33(0)140794776
E-mail address: didier.thiebaud@espci.fr

Abstract

An evaluation of solvents alternative to n-heptane (D-limonene and hexamethyldisiloxane) and chloroform (cyclopentyl methyl ether, 2-methyltetrahydrofuran and isopentyl acetate) was developed for lipid classes separation of non-polar cholesteryl ester to highly polar phospholipids by high-performance liquid chromatography on bare silica stationary phase and evaporative light-scattering detection. Screening of alternative solvents was used to estimate their compatibility with liquid chromatography and evaporative light-scattering detection and to evaluate their chromatographic selectivity. This work shows that n-heptane can be advantageously replaced by hexamethyldisiloxane. An increase of non-polar lipids retention is observed with hexamethyldisiloxane as weak solvent. Chloroform, which is largely used for lipid analysis, might be replaced efficaciously by cyclopentyl methyl ether, 2-methyltetrahydrofuran or isopentyl acetate. Aside from offering a different selectivity, the gradients composed by one or both alternative solvents gave efficient and comparable or even better separations than those obtained with conventional solvents.

Keywords

Lipids, Alternative solvents, Normal-phase liquid chromatography, Evaporative light scattering detector

1. Introduction

In recent years, the development of lipidomics i.e. the extensive characterization of lipids and the understanding of their biological interrelationships in biological pathways provides a new and positive momentum to lipid analysis [1,2]. Among the analytical platforms usable for structural characterization of lipid structures, mass spectrometry offers the widest possibilities [3–5]. Direct infusion, imaging and hyphenation with separation techniques are frequently used

in analysis of lipids. When coupled with mass spectrometry, liquid chromatography (LC) of lipids [6] is performed either in Normal-Phase, Reversed-Phase or hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). In most applications, the use of Normal-Phase liquid chromatography (NPLC) is nowadays far less frequent than Reversed-Phase or HILIC and recent developments in column and stationary phases technology are much more targeted over these two later techniques than the former. Applications have been also developed with supercritical fluid chromatography [7–10] as it is often references as a green separation technique [11–13]. However, when applied to lipid analysis, NPLC offers some determining advantages such as gathering lipids presenting the same polar group (i.e. that belong to the same lipid class) into a single peak [14–28]. Gradient elution allows handling the huge polarity range of lipids from the non- polar sterol esters to the partially hydro-soluble phospholipids [14,15,17,19,21–29].

NPLC method coupled to an evaporative light scattering detection (ELSD), or the more recently introduced Corona[®] Charged Aerosol Detector (CAD), remains a highly valuable technique for the rapid assessment of a total lipid extract. ELSD and CAD are particularly well fitted for lipid detection: no necessary derivatization step is required; it is compatible with gradient elution and with a large range of solvents [30–34]. Different polar stationary phases, such as diol [18,20,25], cyano [19], or polymerized polyvinyl alcohol bonded on silica particles (PVA-Sil[®]) [19,22,23] were also reported to be an alternative to silica especially for polar lipids analysis. Bare silica remains the preferred stationary phase to separate non-polar, neutral and polar lipids from many classes in the same chromatographic analysis [14–17,21,24,26,27]. The majority of ternary elution system is still inspired of elution scheme of Christie [14]. Non-polar lipids are eluted with hydrocarbons, as iso-octane or hexane. An aqueous solvent mixture is used to elute phospholipids. Miscibility between the two phases requires the use of at least one solvent of medium polarity such as chloroform. Common organic solvents are chromatographically well performing but their use is problematic due to their origin, i.e. fossil hydrocarbons, volatility and human and environmental toxicity. Some authors have tried to substitute chloroform by dichloromethane to limit the toxicity of the mobile phase [21], or substitute dichloromethane and tetrahydrofuran (THF) by ethyl acetate to preserve high-performance liquid chromatography (HPLC) systems [26].

Green solvents are mainly used in organic synthesis or as organic phase in extraction methods. Applications of those solvents as mobile phase in LC are limited especially to replace conventional solvents in normal phase [11,12]. Most of non-polar solvents possess an important toxic impact on aquatic environment, may be fatal if swallowed and enters airways and are

more or less flammable. Unfortunately, most green alternative solvents share at least one characteristic. A recent classification method based on physic-chemical properties of solvents offers a ranking of green solvents [35]. Several solvents were suggested in replacing hexane. D-limonene is frequently cited to replace non-polar solvents, i.e. alkanes, in green applications because of very close chemical properties [36–41]. Although classified as green solvent, D-limonene is harmful for human health and toxic for aquatic environment [42]. In agreement with our goal, hexamethyldisiloxane (HMDS) will be also evaluated. This alternative solvent is not referred as green solvent but it poses no risk for human health. Usually used in nuclear magnetic resonance and in coatings technology, this hydrophobic solvent presents some similarities with non-polar solvents. First application in LC showed a similar behaviour with hexane for separation of aromatic compounds [43].

In order to replace chlorinated solvent such as chloroform, we have focused on alternative solvents of medium polarity. Ethyl acetate has been used to replace dichloromethane [26]. It should be noted that physico-chemical properties of ethyl and isoamyl or isopentyl acetate (IA) are close. IA is preferred because it presents a lower volatility and it does not cause eyes irritation. Moreover, it can be produced by green processes [44–46]. Ethereal solvents seem to have close properties with chlorinated solvent: 2-methyltetrahydrofuran (2-MeTHF) and cyclopentyl methyl ether (CPME). Both are commercially available in replacement of chloroform:methanol mixture, dichloromethane or ethereal solvents. Unlike chloroform, these alternatives are not suspected of carcinogenicity [47].

Ideally, chemical properties of alternatives solvent should be similar to conventional solvents. It should be noted that they are not available in HPLC grade and they have never been used as modifier solvent in adsorption chromatography for lipid classes analysis. In a first step, compatibility of alternative solvents with LC and ELSD has been evaluated. The second step will consist of an evaluation of selectivity in terms of NPLC separation of lipid classes between common organic solvents and alternative solvents.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

n-heptane (Chromasolv[®], ≥99%) and ethanol (Chromasolv[®], absolute, ≥99.8%) for HPLC were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). HPLC-grade chloroform and water were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Chloroform stabilized with 0.6 % ethanol was used instead of amylene stabilized chloroform.

All alternative solvents were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France): HMDS with a purity $\geq 98\%$; D-limonene with a purity $\geq 97\%$; IA was Reagent grade 98%; CPME was Reagent Plus grade $\geq 99.5\%$ and 2-MeTHF was Reagent Plus grade $\geq 99.9\%$.

CPME and 2-MeTHF were stabilized respectively with 50 ppm and 150–400 ppm of butylated hydroxytoluene (BHT) to limit formation of peroxides. The solvents were used without a prior distillation step except HMDS for which a double distillation was necessary.

Nitrobenzene with a purity of 99% was purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Standards of lipids were purchased from Sigma. The following standards were used during the development method: Cholesteryl palmitate (CE); Glycerol tripalmitate (TG); 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG) and 1-stearoyl-rac-glycerol (MG); Stigmasterol (ST), Palmitic acid (FA), galactosyl diglyceride (MGDG), digalactosyl diglyceride (DGDG), 1-phosphatidylethanolamine (PE) and 1-phosphatidylcholine (PC). CE was 98% grade. MGDG, DGDG and ST were approximately 95% grades. Others standards were 99% grade.

2.2. Sample preparation

Standards were prepared in a n-heptane/chloroform (1:1) mixture, at a concentration of 5 mg/mL. Samples were evaporated to dryness under nitrogen gas at room temperature and dissolved in n-heptane prior to analysis at a concentration of ca. 0.25 mg/mL during the development method.

2.3. Apparatus

The HPLC instrumentation consisted of a Hewlett-Packard HPLC 1050 system (Agilent, France). The separation of lipids was performed on a 150×2.1 mm column packed with $5 \mu\text{m}$ Inertsil SIL-150A (GL Sciences Inc.) supplied by Interchim (Montluçon, France). The column dead volume (V_0) was 0.49 mL. Helium was used as sparging gas during the analysis. The gradient delay volume was measured with an Applied Biosystems 785A Programmable Absorbance Detector (ThermoFisher scientific, France) at 270 nm by observing the rise in the baseline while running a mobile phase from 100% methanol to methanol with 0.5% acetone. The gradient delay was 1.25 mL.

Screening of pure solvents was performed for each solvent under isocratic conditions. When changing mobile phases, a deactivation/re-activation method was used prior to inject the target compound. The first 5 min of the elution scheme was designed to elute the solute, while the last 10 min regenerated the column prior the next injection. Limits of detection (LOD) were also evaluated to CE for weak solvents and to MG for strong solvents.

Screening of solvents with binary gradients was developed to separate neutral lipids (CE, TG, FA, ST, DG and MG). Unless described in the text, all binary gradients started with 100% solvent A to 60% solvent A with a slope of 1%/min. An exhaustive set of experiments was realized by combining A and B solvents except HDMS/chloroform which was not considered. Solvent A was n-heptane or HMDS and solvent B was chloroform or CPME or 2MeTHF or IA. The first 40 min of the elution scheme was designed to separate the compounds, while the last 10 min regenerated the column prior to injection of the next sample.

Lipid classes ranging in polarity from cholesteryl ester to phosphatidylcholine were eluted by a ternary gradient. A combination of three solvent mixtures was used: solvent A was HMDS, solvent B was CPME or IA or 2-MeTHF and solvent C was ethanol:water (95:5, v/v). As final step, an eluent composed of A–B mixture (50:50, v/v) was used to flush-out water. The return at 100% solvent A has to be progressive (step from 50 to 60 min) to foster the re-equilibration of the column with eluent A (30 min) prior to the next injection. Table IV.1 presents the optimal solvent program for total lipid class analysis.

For all the experiments, the flow rate was set at 0.5 mL/min and a sample volume of 5 μ L was injected for all experiments. Pure lipid standards were identified individually to confirm retention times. The column temperature was set at 40°C with a thermostatically controlled oven (Crococil, Cluzeau, Ste. Foy la Grande, France). Detection was performed with a DDL 31 ELSD (Eurosep, Cergy, France). The drift tube was set at 45°C excepted when IA is used in the composition of elution scheme. IA possesses a high boiling point, which probably disturbs the evaporation process. To improve the lipid signal, the drift tube should be set at 50°C when IA is used in the composition of the mobile phase. The nebulizer was set at 35°C and air pressure at 2.0 bars.

Table IV.1: Ternary gradient composition.

Time (min)	%A ¹	%B ²	%C ³
0	100	0	0
12	88	12	0
13	86	12	2
20	81	15	4
22	80	15	5
30	70	20	10
40	45	20	35
42	45	20	35
50	50	50	0
60	0	0	0

¹ A: HMDS.

² B: IA or 2-MeTHF or CPME.

³ C: ethanol:water (95:5, v/v).

2.4. Deactivation/re-activation method

It consisted in deactivation of the adsorbent, elimination of bound water, drying of the adsorbent by heating and reconditioning of the column by weak solvent. Deactivation step consists of a washing of the column with absolute ethanol (20 V_0) to remove polar impurities or polar class of lipids that were not eluted during the analysis. A second washing was performed with 2,2-dimethoxypropane (100 V_0). It was used to react with residual water. The flow rate was set at 0.5 mL/min. Next, the adsorbent was dried by heating in an oven at 100 °C for one hour under nitrogen stream. To finish, reconditioning of the column was performed by a flushing with the weakest solvent (100 V_0) used in the mobile phase, i.e. n-heptane or HMDS in the case of alternative solvents investigated in this study. The flow rate was set at 1.0 mL/min.

2.5. Statistics

To control the efficiency of the activation/deactivation method, a statistical test was performed on the nitrobenzene retention factor (k). The reproducibility of this method was evaluated by replicate injections of nitrobenzene standard: analysis was repeated on 11 (separated) days ($n = 3$ injections/day) over the course of approximately 5 months. First of all, homogeneity of variances was evaluated by Cochran's C test. Confidence intervals on the overall mean were also estimated. Those two tests were performed with a risk = 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Screening of alternative solvents

D-limonene and HMDS have been selected as substitutes of n-heptane. Their chemical properties are presented in Table IV.2. D-limonene is a monoterpene hydrocarbon found as the major essential oil component of citrus peels [38]. The major source of D-limonene is the orange juice industry (annual production of orange juice counts more than 50 million tons). This renewable solvent is involved in several applications such as insecticide, cosmetics, and food industry. D-limonene appears as a good alternative to n-heptane because of its properties that should be compared to non-polar solvents in terms of polarity and solvating properties. For example, it is used as an alternative to toluene in the Dean-Stark distillation [39], to hexane for extraction of fats and oil from rice [41] or olive seeds by Soxhlet extraction [40]; the results obtained being equivalent to those obtained with conventional solvents. Another interesting application in chromatography was proposed in Counter Current Chromatography to replace n-heptane [36]: the authors showed that D-limonene is a possible alternative to n-heptane in terms of solvent properties but the significant difference of density between D-limonene and n-

heptane was problematic for their application. HMDS is a silicone solvent that possesses similar properties with the alkanes. A major application of HMDS is for plasma enhanced chemical vapour deposition, i.e. hydrophobic treatments of surfaces. Properties of this solvent are a low surface tension, a low viscosity, a low reactivity and this alternative gives off a lowest quantity of volatile organic compounds than hexane or n-heptane. HMDS has been used as a modifier solvent in hexane for normal phase separation of aromatic compounds [43]. The authors observed that HMDS was a weakest polar solvent than some common organic solvents in adsorption chromatography (methyl t-butyl ether, n-butyl ether and dichloromethane). In addition, an increase of the amount of HMDS from 40% to 100% in the mobile phase caused an increase of k values and an improvement of the resolution (Rs). k values were higher with mobile phase composed of 100% HMDS than hexane. The use of a weaker solvent than n-heptane might be interesting to improve the separation of non-polar lipids.

Previous applications of HMDS and D-limonene as a mobile phase in LC showed that they should be compatible with HPLC pumping system. Limits concern their purity and compatibility with ELSD. In fact, the use of non-HPLC grade solvents implies the presence of organic impurities that could interfere with lipid classes detection during the separation. Presence of non-volatile residue could be also problematic with ELSD.

Aspirants to replacement of the chloroform are: IA, CPME and 2-MeTHF. Chemical properties of those solvents were available in Table IV.2.

IA is one of the most widely used short-chain esters in the food industries because of its characteristic banana and pear flavour [52]. Different processes could be employed to obtain IA: greener synthesis from isoamyl alcohol [44] or by enzymatic synthesis [45,46]. One advantage of this solvent is its miscibility with water that is essential for establishment of ternary gradient. Its drawbacks are related to its high viscosity and its boiling temperature that could disturb the nebulization and vaporization processes when required for the detection. 2-MeTHF is an aprotic ether solvent derived from renewable resources (corncoobs and bagasse) [53]. It is placed between THF and diethyl ether in solvent polarity scale [54]. 2-MeTHF is used in replacement of THF in organometallic reactions [55] and as a substitute of dichloromethane in biphasic reactions because it offers a high phase separation at the organic-water interface [54]. 2-MeTHF forms peroxides when exposed to oxygen if no stabilizer is present. CPME is a hydrophobic ether solvent which possesses a low capability to form peroxides: it is more stable than THF and 2-MeTHF [51]. CPME is used as greener co-solvent in replacement of solvents of medium polarity (toluene, methyl isobutyl ketone and dichloromethane) for the dehydration of lignocellulosic pentoses to furfural [56]. Authors observed an increase of selective

conversion and a reduction of reaction time. 2-MeTHF and CPME are considered as two green renewable solvents. Another application is the purification of membrane proteins [57]. CPME and 2-MeTHF are used in replacement of chloroform:methanol mixture. Authors observed that 2-MeTHF and CPME efficiently dissolve lipid membranes; this could be advantageous for our application.

Those three alternatives have never been used as mobile phase for lipid classes analysis. Thus, it was necessary to perform an evaluation of their compatibility with chromatographic system. Moreover, they are not available in HPLC grade like the non-polar alternative solvents.

3.2. Adsorption chromatography

To study the real efficiency of alternative solvents to be used in adsorption chromatography for lipid class analysis, activation of silica column must be the same at the beginning of each new elution gradient scheme.

Trace amount of water in the mobile phase are known to influence retention on bare silica columns and/or to provoke poorly reproducible separations if the activation of the surface of the silica sorbent is not properly controlled [58]. In order to normalize the stability of the adsorbent, silica column must be flushed with drying solvents or dried by thermal process [59]. In order to reduce the time-consuming activation step, instead of the flushing method, another deactivation/re-activation method has been developed (part 2.4).

To access the efficiency of the activation method regarding the stability of the separations, a statistical test was applied to the nitrobenzene k values. The mean k value was 1.96. The day over day variances were found homogeneous with at risk of 5%. The coefficient of variation was 3.95%. Deactivation/re-activation method was validated as an efficient and necessary process to obtain repeatable separations. As the activation of silica influence retention and as solvents themselves are not isohydric, it was mandatory to achieve the same hydration level of silica when comparing the different solvents. Deactivation-reativation method was used before each series of chromatograms when at least one solvent was changed. This step was not needed between each chromatogram. Indeed, the time allowed for reequilibration of the column between two analyses was long enough to provide good repeatability of the separations as it is shown in Sections 3.4 and 3.5.

Table IV.2: Physical and chemical properties of non-polar solvents and of solvents of medium polarity.

Parameter	n-heptane [48]	D-limonene [48]	HMDS [43,49,50]	Chloroform [48]	CPME [51]	IA [48]	2-MeTHF [51]
Molecular weight g/mol	100.20	136.24	162.38	119.38	100.16	130.20	86.14
Density (20°C) g/ml	0.68	0.84	0.76	1.49	0.86	0.87	0.85
Solubility parameter cal ^{1/2} cm ^{-3/2}	7.40	unknown	unknown	9.21	8.40	unknown	8.52
Dielectric constant (20°C)	1.93	2.30	2.20	4.79	4.76	4.80	6.97
Solubility in water (20°C) % w/w	<0.01	practically insoluble	Insoluble	0.82	1.10	~0.20	14.00
Solubility of water in the solvent (20°C) % w/w	0.013	practically insoluble	unknown	0.056	0.30	~1	4.40
Viscosity (20°) cP	0.41	0.92 (25°C)	0.49	0.57	0.55	0.87	0.60 (25°C)
Surface tension dyne/cm	20.35	27.10	15.90	27.20	25.17	24.70	unknown
Vapour pressure (20°C) hPa	47.33	1.60	20	211.18	59.90 (25°C)	6.00	unknown
Boiling point °C	98.40	176.70	101	61.20	106.00	142.50	80.00
Stabilization	–	–	–	0.6% ethanol	150–400 ppm of BHT	none	50 ppm of BHT

3.3. Screening of pure solvents under isocratic conditions

To evaluate the potential replacement of n-heptane by alternative solvents (D-limonene and HMDS), a comparison of lipid classes elution was performed using ELSD in order to monitor lipids standards. Lipid classes concerned were: cholesteryl ester, triglyceride, fatty acids, sterol, monoglyceride and phospholipids like PE and PC. First assays showed that the quality of alternative solvents was not compatible with ELSD. Thus, a double distillation of the two alternative solvents was carried out in order to remove non-volatile impurities. In spite of double distillation, purity of D-limonene was still not acceptable: the baseline signal obtained was too high and noisy (data not shown). Finally, screening could only be done on n-heptane and HMDS. Data obtained are presented in Table IV.3.

Purified HMDS appeared to be fully compatible with HPLC and ELSD. At a flow-rate of 0.5 mL/min, the pressure drop observed with HMDS, was 20% higher compared to n-heptane. This point is interesting because pumping systems can have some difficulties to pump solvents of low viscosity such as n-heptane.

Lipids elution is quite similar with n-heptane or HMDS despite the use of 100% HMDS provided an increase of retention time of non-polar lipids. CE k values were 2.00 (n-heptane) and 3.04 (HMDS). TG was eluted as a broad peak, k being 22.26 (n-heptane) and 28.28 (HMDS). The others lipid classes were never eluted under isocratic conditions.

As far as we know, the influence of solvents on ELSD response is not clearly understood. The nebulization process is influenced by solvent properties such as density, surface tension and viscosity [60] which determine the primary aerosol characteristics at the nebulizer outlet, but partial solvent evaporation in the drift tube and possible droplets coalescence during the aerosol transportation are thought to modify the droplets distribution [61]. It is thus difficult to draw some definitive conclusions about the intensity of response provided by different solvents as it also depends on the nebulizer and drift tube geometry. Additionally, the peak shape influences the detector response and the signal recorded for the same solute under different chromatographic conditions is also problematic to compare.

Thus, instead of comparing absolute intensities, it was decided to evaluate the usability of the alternative solvents with ELSD on the basis of their signal to noise ratio (S/N) and peak height (h). ELSD is constrained by the volatility and the purity of modifier solvents. They must be more volatile than the analytes and they must be free of impurities or non-volatile particles.

LOD were calculated as $LOD = 3 \times S/N$ where S is the signal and N the noise. Estimation of LOD was carried out for CE. LOD value obtained with 100% HMDS was ca. 6 times higher than in n-heptane (Table IV.3). HMDS is a weak solvent comparable to n-heptane. Quality of HMDS available for our experiments was not compatible with ELSD. The double distillation performed with laboratory's facilities has led to obtain an acceptable LOD value. To improve this value, an industrial system of purification might be necessary. According to its solvent strength, HMDS is efficient for lipids analysis in its elution window.

Compatibility of alternative solvents to chloroform with the chromatographic system and the ELSD has also been evaluated. Concerning the ELSD response, results are similar for CPME, 2MeTHF and IA and they provide lower LOD than those obtained with chloroform (Table IV.3).

Contrary to HMDS, they have never been used in LC despite their physical properties (Table IV.2) are compatible with chromatographic pump. Pressure drop observed is different for each alternative solvent. To compare with chloroform, pressure drop is reduced than 13% (CPME), 25% (2-MeTHF) and it increased than 50% with IA. For each of investigated solvents, detection response was suitable without any prior distillation and LOD were ca. 2–3 times lower than with chloroform.

To compare solvent strength between pure solvents (chloroform and alternative solvents), elution of different lipid classes was also performed. Most of neutral lipids (CE, TG, FA, ST, and MG) were eluted as a single peak near the dead volume of the column. The first lipid to be retained was MG. At the opposite, phospholipids (PE and PC) could not be eluted from the column under isocratic conditions. Higher k values obtained for MG (Table IV.3) show that alternative solvents were providing a stronger eluting strength than chloroform. According to k values, CPME and IA possess similar solvent strength. 2-MeTHF seems to be more eluent than the others.

3.4. Contributions of alternatives solvents to chloroform on the separation

Commercial standards of lipid classes were used during this development. In a first series of measurements, n-heptane was kept as weak solvent. Medium strength solvents were chloroform, IA, CPME and 2-MeTHF. According to the results gained from the screening of pure solvents, binary gradients were developed for the analysis of major neutral lipid classes: CE, TG, FA, ST, DG and MG. Chromatograms obtained are presented in figure IV.1.

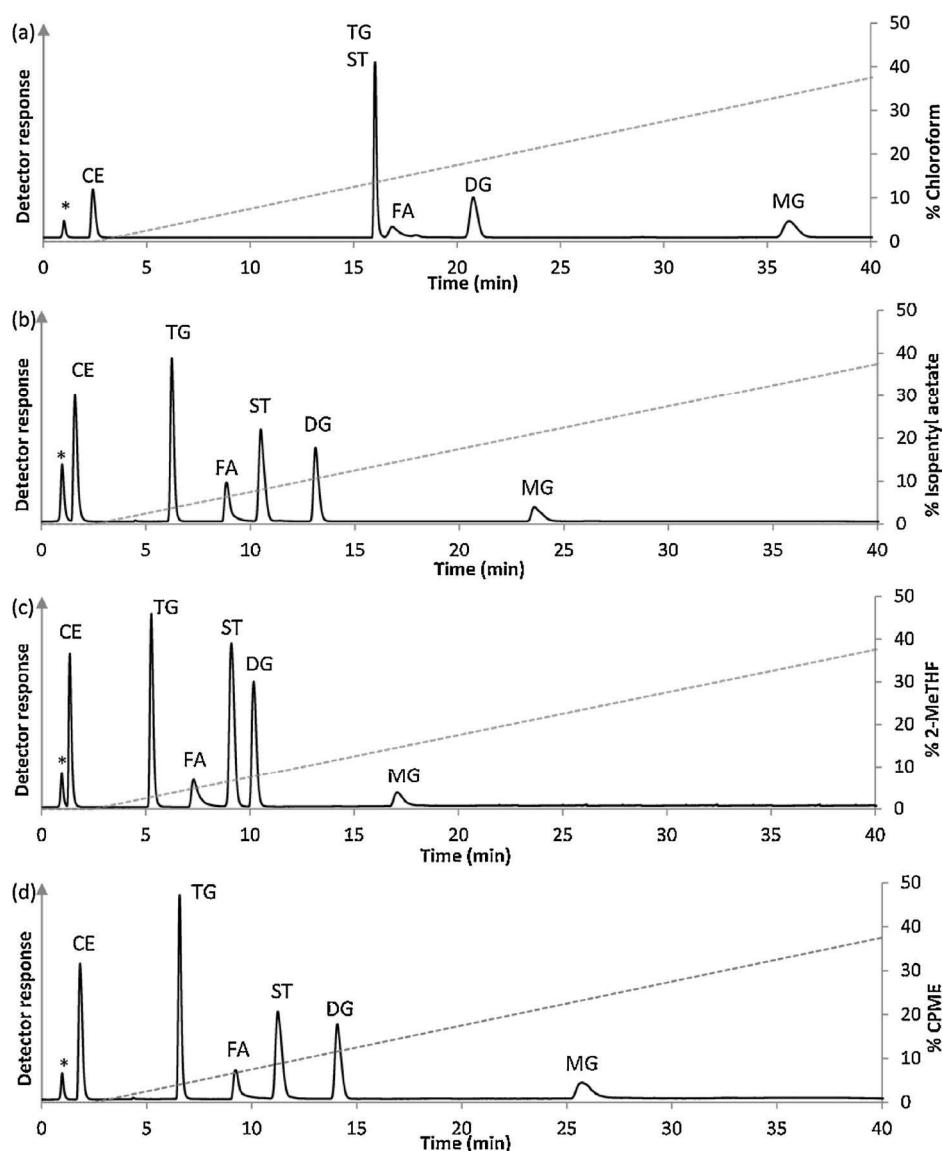


Figure IV.1: NP-HPLC chromatograms of the separation of non-polar lipid classes (CE, TG, ST, FA, DG, and MG). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150×2.1 mm, $5\mu\text{m}$, 150A), flow-rate 0.5 mL/min, column temperature 40°C , binary linear gradient from 100% solvent A to 60% solvent A with a slope of 1%/min. Solvent A: *n*-heptane and solvent B: chloroform (a), IA (b), 2-MeTHF (c) and CPME (d). Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG), stigmasterol (ST), palmitic acid (FA), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG), 1-stearoyl-rac-glycerol (MG) and dead volume (*).

It must be noted that analyses were possible with all solvents under investigation: IA, CPME and 2-MeTHF. Differences between chromatograms obtained with chloroform and those obtained with alternative solvents are noticeable. The elution order of lipid classes is altered as sterols are eluted before fatty acids with a *n*-heptane-chloroform gradient while they appear after fatty acids with gradients using alternative solvents. Solutes-solvent interactions developed by chloroform are thought to be different. With *n*-heptane as weak solvent, IA, CPME and 2-MeTHF gave the same order of lipid classes' elution.

According to the retention times of solutes, the eluotropic strength of the alternative solvents on silica column was: chloroform < CPME < IA < 2-MeTHF. Medium strength solvents investigated during this work appear as a valuable alternative to chloroform as n-heptane-chloroform gradient did not yield triacylglycerol and sterol to be resolved. Retention and R_s data are reported in Table IV.S1 (see Supplementary data). In order to provide a practical assessment of the corresponding chromatograms, the time corrected resolution criterion t_{ne} has been calculated for each of them. This criterion allowed to take into account the analysis duration and the R_s value [62].

The values of t_{ne} were obtained from the Eq. (1):

$$t_{ne} = t_{max} / R_{Smin}^2 \quad (1)$$

where t_{max} is the retention time of the last eluted solute and R_{Smin} the minimum peak resolution (or R_s calculated for the most critical pair of peaks). As expected, n-heptane-chloroform gradient implied higher t_{ne} value (Table IV.S1).

Table IV.3: Effect of mobile phase solvent on retention factor, peak height, signal to noise ratio and LOD for CE and MG under isocratic conditions.

Compound	CE				Compound	MG			
Solvent	k	h (mV)	S/N	LOD (ng)	Solvent	k	h (mV)	S/N	LOD (ng)
n-heptane	1.04	1609	1195	3.4	Chloroform	2.69	296	41	92.9
					IA	0.65	161	83	46.7
HMDS	2.04	304	37	20.2	CPME	0.66	182	70	54.7
					2-MeTHF	0.37	586	102	36.8

Each n-heptane alternative solvent gradient permitted the separation of the six lipid classes with a sufficient minimal R_s value. CPME provided the most favourable t_{ne} result. It is worth to note that the retention of CE which was sufficiently different from the dead time of the column, together with the quasi-ideal TG/FA, FA/ST, ST/DG selectivities and R_s . Whatever is the alternative solvent in use, it can be concluded these conditions appeared satisfactory and offer more flexibility to adapt the chromatographic conditions to lipid classes analysis.

3.5. Contribution of HMDS on the separation

The use of HMDS as weak solvent was assessed by performing gradient elution using the medium strength alternative solvents previously mentioned. Chromatograms are presented in figure IV.2.

As expected from the results presented above, the separation of six lipid classes is also possible with binary gradient composed by HMDS and solvents alternative to chloroform. The use of HMDS in association with alternative solvents to chloroform gave the same elution orders than those obtained with previous gradients. Retention and R_s data are reported in Table IV.S2 (see Supplementary data). Chromatograms appeared to be repeatable as relative standard deviation of retention times were lower than 3.5%.

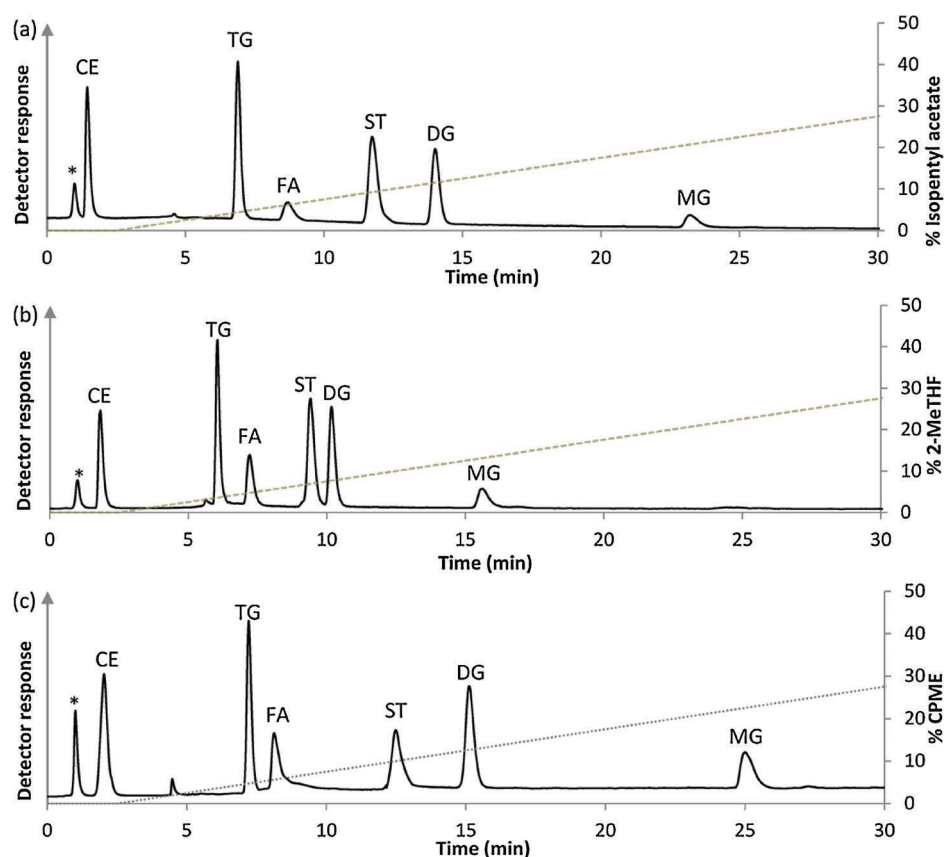


Figure IV.2: NP-HPLC chromatograms of the separation of non-polar lipid classes (CE, TG, ST, FA, DG, and MG). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150×2.1 mm, $5 \mu\text{m}$, 150A), flow-rate 0.5 mL/min, column temperature 40°C , binary linear gradient from 100% solvent A to 60% solvent A with a slope of 1%/min. Solvent A: HMDS and solvent B: IA (a), 2-MeTHF (b) and CPME (c). Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG), stigmasterol (ST), palmitic acid (FA), 1,2-dipalmitoyl-*rac*-glycerol (DG), 1-stearoyl-*rac*-glycerol (MG) and dead volume (*).

According to t_{ne} values, the gradients using HMDS as weak solvent gave more efficient separation when compared with n-heptane (Tables IV.S1 and IV.S2). Gradients composed by HMDS-alternative solvent allowed having an adequate R_s ($R_{s\text{min}} > 2$) for the couple dead time-CE. A global increase of retention times of lipid classes was also observed.

Analysis time was in accordance with solvent strength of CPME, 2-MeTHF and IA reported above (Table IV.S1). Overall, HMDS-CPME and HMDS-2-MeTHF gradients gave comparable separations according to t_{ne} values (Table IV.S2). Separation obtained with HMDS-IA gradient was less effective than the others. In spite of a higher solvent strength, CE was more retained with 2-MeTHF than IA. R_s was also higher between CE and the signal occurring at the

deadtime with 2-MeTHF than IA (Table IV.S2). The opposite trend was observed from the elution of TG. Differences observed between each chromatogram, in terms of retention time, reflect the interactions developed by alternative solvents to chloroform.

All binary gradients gave adequate separation for non-polar lipid classes but elution strength of those mobile phases was too weak to elute polar lipids such as glycerolipids (MGDG, DGDG) and phospholipids (PE, PC).

3.6. Green ternary gradient development for elution of polar classes of lipids

The last step was to develop a separation of lipid classes with a wider polarity range, which also meant an extension of the previous binary gradient to more polar solvents. As phospholipids are typically eluted with a variable amount of water in the mobile phase, a ternary gradient, which end with a solvent mixture containing water and an alcohol, had to be developed. Despite Isopropanol (IPA): water is the most used mixture [14–17,19–21,24,26,28], ethanol was preferred to IPA in order to be coherent with green alternative solvent.

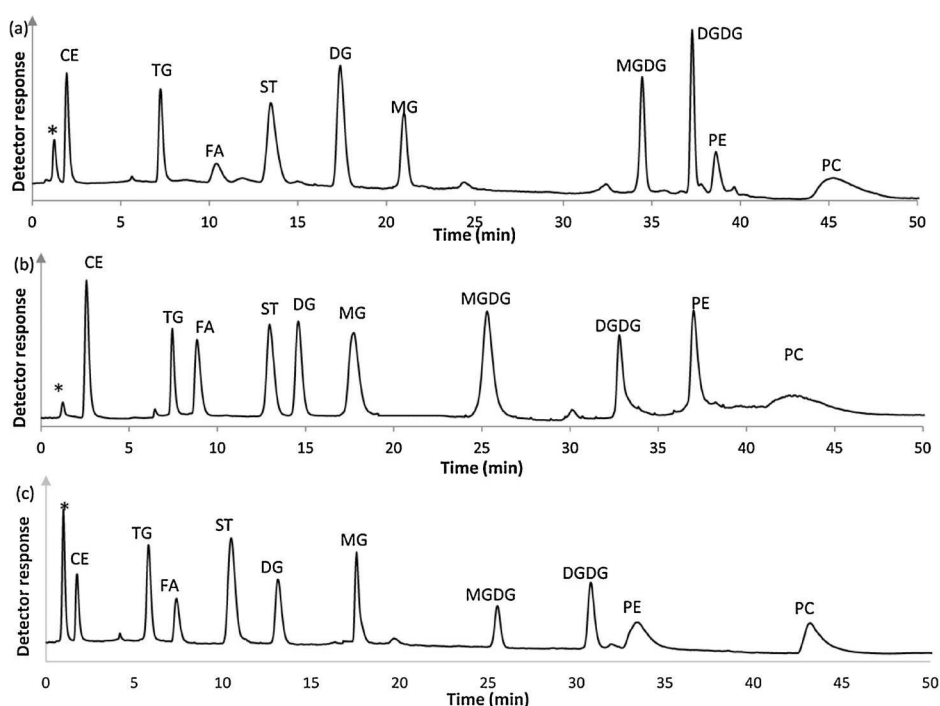


Figure IV.3: NP-HPLC chromatograms of the separation of 10 lipid classes (CE, TG, ST, FA, DG, MG, MGDG, DGDG, PE and PC). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150×2.1 mm, $5 \mu\text{m}$, 150 Å), flow-rate 0.5 mL/min, column temperature 40°C , ternary gradient composed by (A): HMDS, (B): (a) IA; (b) 2-MeTHF; or (c) CPME, (C): ethanol:water (95:5, v:v). Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG), stigmaterol (ST), palmitic acid (FA), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG), 1-stearoyl-rac-glycerol (MG), galactosyl diglyceride (MGDG), digalactosyl diglyceride (DGDG), L-phosphatidylethanolamine (PE), L-phosphatidylcholine (PC) and dead volume (*).

As it can be seen in figure IV.3 showing the chromatograms obtained with HMDS/CPME or IA or 2-MeTHF/ethanol:water ternary gradient. Water used in the mobile phase caused a decrease of retention of non-polar lipids, which is counterbalanced by a rise of the reconditioning time.

The acquisition time was 60 min, followed by a 30-min reconditioning program. R_s values are reported in Table IV.4. To control the real effect of each solvent on the separation, no pH modifier such as triethylamine-formic acid was used. As remarked by Deschamps et al. [63,64], the consequence of this absence was that phospholipids were eluted as broad peaks.

All target lipid classes investigated were resolved with enough selectivity to avoid lipid class overlap (Table IV.4). This procedure is adapted for a separation in a single run of a complex lipid sample and could be optimized to reduce analysis time.

Table IV.4: Resolution values of lipid standards for each composition of ternary gradient.

	HMDS/IA/Ethanol:water	HMDS/CPME/Ethanol:water	HMDS/2-MeTHF/Ethanol:water
t_0	–	–	–
	2.22	2.34	4.85
CE	9.03	12.24	8.28
TG	4.53	3.18	2.24
FA	3.35	4.88	5.46
ST	3.65	3.76	2.09
DG	4.04	8.22	3.23
MG	17.20	15.54	5.56
MGDG	3.82	8.26	5.74
DGDG	4.55	2.16	4.50
PE	3.42	5.57	2.60
PC	–	–	–

4. Conclusion

HMDS, CPME, 2-MeTHF and IA are compatible with LC and ELSD. The commercial unavailability of convenient purity grade solvents has not been a barrier to the development of lipid classes chromatography excepted for D-limonene. HMDS possesses physico-chemical properties close to n-heptane. Preliminary screening (isocratic conditions) showed that HMDS generated an increase of lipids retention times. This fact has also been observed with binary gradient. Screening is designed to select solvents that are adapted in terms of viscosity, purity and volatility to lipid classes analysis. Binary gradients composed by one or both alternative solvents gave efficient and comparable separation but offered different selectivity compared with n-heptane/chloroform gradient. Finally, ten classes of lipids including cholesteryl ester,

sterols, glyceroglycolipids and phospholipids were analysed by using solvents of far less toxicity than conventional ones. The resulting chromatogram compares favourably with most of those based on classical chromatography solvents.

Acknowledgment

Nolwenn Prache PhD Thesis is funded by a grant of Region Ile de France, DIM Analytics.

Appendix A. Supplementary data

Table IV.S1: Retention time, coefficient of variation of retention time, resolution and time corrected resolution criterion of lipid standards for each composition of binary gradient using n-heptane as weak solvent.

Weak solvent		n-heptane										
Strong solvent	IA			CPME			2-MeTHF			Chloroform		
Lipid classes	tr (min)	CV (%)	Rs	tr (min)	CV (%)	Rs	tr (min)	CV (%)	Rs	tr (min)	CV (%)	Rs
t_0	0.99	1.72	-	0.99	1.25	-	0.99	1.31	-	1.00	1.19	-
			1.84			2.20			1.61			5.95
CE	1.40	2.44		1.41	2.90		1.36	3.35		2.75	3.29	
			16.49			23.40			14.6 1			42.68
TG	6.10	3.82		6.80	1.31		5.27	1.51		15.60	1.51	
			6.94			5.41			4.77			2.01
FA	8.77	2.68		8.59	2.75		7.3	1.09		16.72	1.09	
			3.45			5.18			3.54			
ST	10.36	3.49		11.04	3.39		9.11	1.70		Coeluted with TG		4.83
			5.52			5.09			2.46			
DG	12.97	1.91		13.85	3.30		10.18	3.02		20.55	1.70	
			15.18			13.34			11.2 6			15.12
MG	23.33	2.66		25.16	2.32		17.06	3.50		35.89	0.86	
			-			-			-			-
t_{nc} (min)	6.89			5.20			6.58			∞		

Table IV. S2: Retention time, coefficient of variation of retention time, resolution and time corrected resolution criterion of lipid standards for each composition of binary gradient using HMDS as weak solvent.

Weak solvent			HMDS								
Strong solvent			IA			CPME			2-MeTHF		
	tr (min)	CV (%)	Rs	tr (min)	CV (%)	Rs	tr (min)	CV (%)	Rs		
t ₀	1.00	1.93	-	1.00	0.40	-	1.00	0.70	-		
			2.04			2.90			2.85		
CE	1.66	1.00		1.98	1.60		1.83	2.11			
			14.24			11.24			14.87		
TG	6.66	1.85		7.14	2.77		6.05	1.51			
			3.49			2.26			3.36		
FA	8.22	3.52		8.15	2.74		7.22	1.09			
			5.74			6.32			4.96		
ST	11.40	1.09		12.44	2.48		9.42	3.39			
			4.76			4.24			1.75		
DG	13.78	1.83		15.21	1.69		10.17	3.30			
			14.54			14.51			9.80		
MG	23.26	1.30		25.14	1.62		15.62	2.32			
			-			-			-		
t _{nc} (min)		5.61			4.95			5.10			

References

- [1] U. Loizides-Mangold, On the future of mass-spectrometry-based lipidomics, *Febs Journal*, 280 (2013) 2817-2829.
- [2] M.R. Wenk, The emerging field of lipidomics, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (2005) 594-610.
- [3] M. Holcapek, R. Jirasko, M. Lisa, Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques, *Journal of Chromatography A*, 1259 (2012) 3-15.
- [4] M. Li, Z. Zhou, H. Nie, Y. Bai, H. Liu, Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (2011) 243-249.
- [5] D. Guillarme, J. Ruta, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397 (2010) 1069-1082.
- [6] T. Cajka, O. Fiehn, Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 61 (2014) 192-206.
- [7] P. Sandra, A. Medvedovici, Y. Zhao, F. David, Characterization of triglycerides in vegetable oils by silver-ion packed-column supercritical fluid chromatography coupled to mass spectroscopy with atmospheric pressure chemical ionization and coordination ion spray, *Journal of Chromatography A*, 974 (2002) 231-241.
- [8] T. Yamada, T. Uchikata, S. Sakamoto, Y. Yokoi, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba, Supercritical fluid chromatography/Orbitrap mass spectrometry based lipidomics

platform coupled with automated lipid identification software for accurate lipid profiling, *Journal of Chromatography A*, 1301 (2013) 237-242.

[9] E. Lesellier, A. Latos, A.L. de Oliveira, Ultra high efficiency/low pressure supercritical fluid chromatography with superficially porous particles for triglyceride separation, *Journal of Chromatography A*, 1327 (2014) 141-148.

[10] M. Lisa, M. Holčapek, High-throughput and comprehensive lipidomic analysis using ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography–mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 87 (2015) 7187-7195.

[11] C.J. Welch, N. Wu, M. Biba, R. Hartman, T. Brkovic, X. Gong, R. Helmy, W. Schafer, J. Cuff, Z. Pirzada, Greening analytical chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 667-680.

[12] F.M. Kerton, R. Marriott, *Alternative solvents for green chemistry*, Royal Society of chemistry, 2013.

[13] J. Płotka, M. Tobiszewski, A.M. Sulej, M. Kupska, T. Gorecki, J. Namieśnik, *Green chromatography*, *Journal of Chromatography A*, 1307 (2013) 1-20.

[14] W.W. Christie, Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection, *Journal of Lipid Research*, 26 (1985) 507-512.

[15] W.W. Christie, Separation of lipid classes by high-performance liquid chromatography with the "mass detector", *Journal of Chromatography A*, 361 (1986) 396-399.

[16] W.W. Christie, W.R. Morrison, Separation of complex lipids of cereals by high-performance liquid chromatography with mass detection, *Journal of Chromatography A*, 436 (1988) 510-513.

[17] F.D. Conforti, C.H. Harris, J.T. Rinehart, High-performance liquid chromatographic analysis of wheat flour lipids using an evaporative light scattering detector, *Journal of Chromatography A*, 645 (1993) 83-88.

[18] K.C. Arnoldsson, P. Kaufmann, Lipid class analysis by normal phase high performance liquid chromatography, development and optimization using multivariate methods, *Chromatographia*, 38 (1994) 317-324.

[19] W.W. Christie, R. Anne Urwin, Separation of lipid classes from plant tissues by high performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases, *Journal of High Resolution Chromatography*, 18 (1995) 97-100.

[20] C. Silversand, C. Haux, Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 703 (1997) 7-14.

[21] R. Homan, M.K. Anderson, Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 708 (1998) 21-26.

[22] J. Nordbäck, E. Lundberg, W.W. Christie, Separation of lipid classes from marine particulate material by HPLC on a polyvinyl alcohol-bonded stationary phase using dual-channel evaporative light-scattering detection, *Marine Chemistry*, 60 (1998) 165-175.

[23] F.S. Deschamps, P. Chaminade, D. Ferrier, A. Baillet, Assessment of the retention properties of poly(vinyl alcohol) stationary phase for lipid class profiling in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 928 (2001) 127-137.

[24] T. Seppänen-Laakso, I. Laakso, H. Vanhanen, K. Kiviranta, T. Lehtimäki, R. Hiltunen, Major human plasma lipid classes determined by quantitative high-performance liquid chromatography, their variation and associations with phospholipid fatty acids, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 754 (2001) 437-445.

- [25] J.S. Perona, V. Ruiz-Gutierrez, Quantification of major lipid classes in human triacylglycerol-rich lipoproteins by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection, *Journal of Separation Science*, 27 (2004) 653-659.
- [26] M. Graeve, D. Janssen, Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: Application to exceptional marine lipids, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 1815-1819.
- [27] L.M. Rodriguez-Alcala, J. Fontecha, Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3063-3066.
- [28] D.G. McLaren, P.L. Miller, M.E. Lassman, J.M. Castro-Perez, B.K. Hubbard, T.P. Roddy, An ultraperformance liquid chromatography method for the normal-phase separation of lipids, *Analytical Biochemistry*, 414 (2011) 266-272.
- [29] T.H. Mourey, L.E. Oppenheimer, Principles of operation of an evaporative light-scattering detector for liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 56 (1984) 2427-2434.
- [30] P. Van der Meeren, J. Vanderdeelen, L. Baert, Simulation of the mass response of the evaporative light scattering detector, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 1056-1062.
- [31] R.W. Dixon, D.S. Peterson, Development and Testing of a Detection Method for Liquid Chromatography Based on Aerosol Charging, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 2930-2937.
- [32] P.H. Gamache, R.S. McCarthy, S.M. Freeto, D.J. Asa, M.J. Woodcock, K. Laws, R.O. Cole, HPLC analysis of nonvolatile analytes using charged aerosol detection, *Lc Gc Europe*, 18 (2005) 345.
- [33] R.A. Moreau, The analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector, *Lipids*, 41 (2006) 727-734.
- [34] E. Lesellier, Spider diagram: A universal and versatile approach for system comparison and classification: Application to solvent properties, *Journal of Chromatography A*, 1389 (2015) 49-64.
- [35] K. Faure, E. Bouju, P. Suchet, A. Berthod, Use of Limonene in Countercurrent Chromatography: A Green Alkane Substitute, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 4644-4650.
- [36] A. Medvedovici, S. Udrescu, V. David, Use of a green (bio) solvent – limonene – as extractant and immiscible diluent for large volume injection in the RPLC-tandem MS assay of statins and related metabolites in human plasma, *Biomedical Chromatography*, 27 (2013) 48-57.
- [37] A. Mohammad, S. Chemat, V.r. Tomao, F. Chemat, Limonene as Green Solvent for Extraction of Natural Products, in: *Green Solvents I*, Springer Netherlands, 2012, pp. 175-186.
- [38] S. Veillet, V. Tomao, K. Ruiz, F. Chemat, Green procedure using limonene in the Dean Stark apparatus for moisture determination in food products, *Analytica Chimica Acta*, 674 (2010) 49-52.
- [39] M. Viot, V.r. Tomao, C. Ginies, F. Chemat, Total Lipid Extraction of Food Using d-Limonene as an Alternative to n-Hexane, *Chromatographia*, 68 (2008) 311-313.
- [40] M. Viot, V. Tomao, C. Ginies, F. Visinoni, F. Chemat, Green procedure with a green solvent for fats and oils determination: Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation, *Journal of Chromatography A*, 1196-1197 (2008) 147-152.
- [41] D-limonene, MSDS No. 183164, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, Sigma-Aldrich, 2015, pp. 1-8.
- [42] N.D. Danielson, C.L. Goldhammer, J.R. Bowser, P.F. Gavin, Hexamethyldisiloxane as a mobile phase component for normal phase liquid chromatography, *Chromatographia*, 43 (1996) 647-653.

- [43] A. Wolfson, D. Saidkarimov, C. Dlugy, D. Tavor, Green synthesis of isoamyl acetate in glycerol triacetate, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 2 (2009) 107-110.
- [44] S.n. Torres, M.D. Baigorã-, S.L. Swathy, A. Pandey, G.R. Castro, Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase, *Food Research International*, 42 (2009) 454-460.
- [45] S.H. Krishna, S. Divakar, S.G. Prapulla, N.G. Karanth, Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucormiehei*, *Journal of Biotechnology*, 87 (2001) 193-201.
- [46] V. Antonucci, J. Coleman, J.B. Ferry, N. Johnson, M. Mathe, J.P. Scott, J. Xu, Toxicological assessment of 2-methyltetrahydrofuran and cyclopentyl methyl ether in support of their use in pharmaceutical chemical process development, *Organic Process Research & Development*, 15 (2011) 939-941.
- [47] V. Sedivec, J. Flek, *Handbook of analysis of organic solvents*, E. Horwod; Wiley, 1975.
- [48] C.P. Co, MSDS - PSF- 0.65cSt HMDS Silicone Fluid in, 2014, pp. 1-4.
- [49] Sigma-Aldrich, HMDS, MSDS No. 205389, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, Sigma-Aldrich, 2015, pp. 1-8.
- [50] K. Watanabe, N. Yamagiwa, Y. Torisawa, Cyclopentyl methyl ether as a new and alternative process solvent, *Organic Process Research & Development*, 11 (2007) 251-258.
- [51] S. Torres, A. Pandey, G.R. Castro, Banana flavor: insights into isoamyl acetate production, *Cell*, 549 (2010) 776.
- [52] R. Aul, B. Comanita, A green alternative to THF, *Manufacturing chemist*, May, (2007) 33-34.
- [53] D.F. Aycock, Solvent Applications of 2-Methyltetrahydrofuran in Organometallic and Biphasic Reactions, *Organic Process Research & Development*, 11 (2007) 156-159.
- [54] A. Kadam, M. Nguyen, M. Kopach, P. Richardson, F. Gallou, Z.-K. Wan, W. Zhang, Comparative performance evaluation and systematic screening of solvents in a range of Grignard reactions, *Green Chemistry*, 15 (2013) 1880-1888.
- [55] M.J.C. Molina, R. Mariscal, M. Ojeda, M.L. Granados, Cyclopentyl methyl ether: A green co-solvent for the selective dehydration of lignocellulosic pentoses to furfural, *Bioresource technology*, 126 (2012) 321-327.
- [56] S.-J. Tenne, J. Kinzel, M. Arlt, F. Sibilla, M. Bocola, U. Schwaneberg, 2-Methyltetrahydrofuran and cyclopentylmethylether: Two green solvents for efficient purification of membrane proteins like FhuA, *Journal of Chromatography B*, 937 (2013) 13-17.
- [57] L.R. Snyder, *Principles of adsorption chromatography; the separation of nonionic organic compounds*, (1968).
- [58] K.N. Trueblood, E.W. Malmberg, *Chromatographic Properties of Silicic Acid-Celite*, *Analytical Chemistry*, 21 (1949) 1055-1058.
- [59] J.M. Charlesworth, *Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatography*, *Analytical Chemistry*, 50 (1978) 1414-1420.
- [60] P. Chaminade, *The evaporative light scattering and Charged Aerosol Detector*, in: R.A. Shalliker (Ed.) *Hyphenated and alternative methods of detection in chromatography*, CRC Press, 2011, pp. 145-160.
- [61] P.J. Schoenmakers, *Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development*, Elsevier, 1986.
- [62] F.S. Deschamps, A. Baillet, P. Chaminade, Mechanism of response enhancement in evaporative light scattering detection with the addition of triethylamine and formic acid, *Analyst*, 127 (2002) 35-41.
- [63] F.S. Deschamps, K. Gaudin, E. Lesellier, A. Tchaplà, D. Ferrier, A. Baillet, P. Chaminade, Response enhancement for the evaporative light scattering detection for the analysis of lipid classes and molecular species, *Chromatographia*, 54 (2001) 607-611.

CONCLUSION

L'utilisation des solvants issus de la chimie verte, en remplacement du n-heptane et du chloroforme, pour la séparation de classes de lipides par NPLC-ELSD a été évaluée.

L'HMDS, le D-limonène, l'IA, le CPME et le 2-MeTHF étant peu ou pas utilisés en LC, leur compatibilité avec le système chromatographique (viscosité, pureté) a dû être évaluée. Cette étude a permis de montrer, dans un premier temps, qu'ils étaient compatibles avec le système de pompe. L'HMDS présente une perte de charge légèrement plus élevée que le n-heptane, propriété intéressante compte-tenu des difficultés pour les systèmes à pomper des solvants peu visqueux. Quant à la pureté des solvants, les résultats sont différents. La qualité non HPLC d'IA, de CPME et du 2-MeTHF n'a pas été un problème et aucune purification, préalable à leurs utilisations, n'a été nécessaire. Concernant le D-limonène et l'HMDS, la présence de résidus à l'évaporation entraînant une saturation du signal de l'ELSD a nécessité la mise en place d'une double distillation avant utilisation en NPLC-ELSD. Cette étape de purification s'est avérée insuffisante pour le D-limonène, il n'a pas pu être utilisé pour la suite de l'étude.

La comparaison, en gradient ou en condition isocratique, du n-heptane et de l'HMDS a permis de montrer que ce dernier possède une force éluante plus faible que le n-heptane favorisant ainsi la rétention des lipides les plus apolaires. L'IA, le CPME et le 2-MeTHF possèdent quant à eux des forces éluantes similaires et supérieures à celle du chloroforme. La sélectivité développée par ces solvants est différente de celles observées avec les solvants conventionnels comme le n-heptane et le chloroforme.

Appliqués aux séparations de classes lipidiques, l'HMDS, l'IA, le CPME et le 2-MeTHF permettent de réaliser des séparations de classes lipidiques peu polaires (gradient binaire) jusqu'aux phospholipides (gradient ternaire). Ces séparations présentent des similitudes avec celles obtenues avec le n-heptane et/ou le chloroforme et s'avèrent aussi efficace. En effet, dans nos conditions d'analyses aucune coélution n'est observée avec les solvants alternatifs. L'apport de ces solvants pour la séparation associé à leur plus faible impact sur l'homme et l'environnement en font des candidats de choix pour le développement de méthode en NPLC.

**CHAPITRE V : APPORT DES SOLVANTS
ALTERNATIFS POUR LA SEPARATION DE
CLASSES LIPIDIQUES EN NPLC-MS**

INTRODUCTION

Comme décrit dans le chapitre I, les lipides constituent un ensemble hétérogène du point de vue structural permettant ainsi de différencier les familles, les classes et sous-classes ainsi que les espèces moléculaires. Pour atteindre ce degré d'information, l'utilisation de la spectrométrie de masse est essentielle. Dans le domaine de la lipidomique, deux méthodes sont couramment employées : l'introduction directe de l'échantillon en MS (shotgun) ou l'analyse par LC-MS. Concernant la séparation, le mode RPLC est réservé pour la séparation d'espèces moléculaires tandis que le mode NPLC est favorisé pour la séparation de classes lipidiques. L'utilisation de ce dernier montre un couplage quasiment exclusif avec les sources APCI et APPI. En effet, l'utilisation d'un alcane dans la programmation des gradients n'est pas compatible avec la source ESI, les alcanes ne permettant pas la formation d'un nébulisât ou spray stable.

Dans le chapitre IV, nous avons montré que l'HMDS, le CPME, l'IA et le 2-MeTHF pouvaient être utilisés en remplacement du n-heptane et du chloroforme, leur utilisation permettant d'obtenir des séparations de classes lipidiques efficaces et comparables à celles obtenues avec les solvants conventionnels.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des solvants alternatifs en spectrométrie de masse. Ces solvants n'ayant jamais été utilisés en MS, leur compatibilité avec les sources ESI et APCI a dû être évaluée. La limite d'utilisation des solvants alternatifs pouvant être posée par la non disponibilité de qualité HPLC ou LC-MS.

L'HMDS présente des similitudes avec les alcanes, mais contrairement à ces derniers il possède un moment dipolaire non nul qui pourrait permettre la formation d'un spray stable en ESI. De ce point de vue l'HMDS semble être un candidat prometteur. Une investigation de sa compatibilité avec les sources ESI et APCI a été réalisée par introduction directe sur un TQ-MS.

Ces travaux sont synthétisés dans une publication qui regroupe les différents points présentés ci-dessus ainsi que l'intérêt des solvants alternatifs pour la séparation de classes lipidiques par NPLC-MS.

EVALUATION OF ALTERNATIVE SOLVENTS FOR LIPID CLASSES SEPARATION BY NORMAL PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

Nolwenn Prache ^{a,b}, Sonia Abreu ^a, Patrick Sassiati ^b, Didier Thiébaud ^b, Pierre Chaminade ^{a,*}

^a *Lip(Sys)-2, Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92290 Châtenay-Malabry, France.*

^b *UMR 8231 Chimie Biologie Innovation CNRS – ESPCI, LSABM, Université PSL, ESPCI Paris, F-75005 Paris, France*

* *Corresponding author. Tel: +3346835459; Fax: +3346835458*

E-mail address: pierre.chaminade@u-psud.fr

Abstract

An evaluation of alternative solvents to n-heptane (hexamethyldisiloxane) and chloroform (isopentyl acetate, cyclopentyl methyl ether and 2-methyltetrahydrofuran) was developed for lipid classes' separation of non-polar cholesteryl ester to highly polar phospholipids by high-performance liquid chromatography on bare silica stationary phase and mass spectrometry detection. Compatibility of alternative solvents with electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization source was evaluated. This work showed that hexamethyldisiloxane was not compatible with electrospray ionization source and the unavailability of sufficient purity grade was an issue for its use with atmospheric pressure chemical ionization source. Alternative solvents of medium polarity (especially isopentyl acetate, cyclopentyl methyl ether) showed that they were fully compatible with LC-APCI-MS coupling. 2-methyltetrahydrofuran shows MS profiles of lesser intensity compared to the two other solvents. Acetic acid adducts were detected with Isopentyl acetate.

Keywords

Lipids, Alternative solvents, Normal-Phase Liquid Chromatography, Mass spectrometry

1. Introduction

In lipid analysis, structural diversity as well as difference in solubility of these compounds requires to work with a very large polarity solvent range to separate lipids by classes, from hydrophobic compounds elution like cholesteryl esters to phospholipids which are partially water-soluble [1]. The mass spectrometry (MS) is the technique of choice for lipid structural identification [2-5]. Direct infusion, i.e. shotgun [6, 7], or liquid chromatography (LC) coupled to MS are enabled to identify a large number of lipid species from a single biological sample [2, 8]. Numerous applications have already described using either normal-phase (NP) or reversed-phase (RP) liquid chromatography. In RPLC mode, separation of lipids molecular species is based on the carbon-chain length and the number and position of insaturation,

regardless the nature of the polar group. In comparison, in NPLC mode, lipid molecular species of a given class are eluted into the same peak. The retention is based on the polarity of their head group structures. The solubilisation of lipid classes requires the use of a mixture of several solvents, among them chloroform which is mostly designated as solvent of lipids. Moreover, organic solvents traditionally used in adsorption chromatography, i.e. n-heptane, dichloromethane, tetrahydrofuran, etc., although well performing are raising different problems due to their original source, i.e. fossil hydrocarbons, volatility and toxicity for humans and environment.

In a previous work [9], alternative solvents were used to separate lipid classes by NPLC coupled to an evaporative light scattering detection (ELSD). Results showed that hexamethyldisiloxane (HMDS), isoamyl or isopentyl acetate (IA), cyclopentyl methyl ether (CPME) and 2-methyltetrahydrofuran (2-MeTHF) were compatible with this technique. They allowed to achieve efficient separations comparable with those obtained with conventionally used solvents such as n-heptane and chloroform. HMDS offers a lower eluent strength than n-heptane, which is an advantage for the retention of non-polar lipids. Alternative solvents are commercially available but don't exist as HPLC grade. All of them, except HMDS, could be directly used for the chromatographic analysis. HMDS had to be distilled twice prior its use in NPLC-ELSD [9].

Electrospray ionization source (ESI) is the most widely used ionization techniques coupled with LC for the identification of polar lipids, while atmospheric pressure chemical ionization source (APCI) is preferred for non-polar lipids [2, 10, 11]. Both polar and non-polar solvents can be used in APCI, whereas only polar or medium polar solvents can be used in ESI [12]. The alternative solvents investigated in this work have never been used for lipid classes' analysis by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry detection (LC-MS). In order to carry out the lipid classes' analysis by LC-MS using alternative solvents, an evaluation of their compatibility with ESI and APCI is presented. In a second step, their behaviour is compared to conventional solvents used in NPLC-MS of lipids.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

n-heptane (Chromasolv®, $\geq 99\%$) and ethanol (Chromasolv®, absolute, $\geq 99.8\%$) for HPLC were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). HPLC-grade chloroform and water were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Chloroform stabilized with 0.6 % ethanol was preferred to amylene stabilized chloroform.

All alternative solvents were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France): HMDS with a purity $\geq 98\%$; IA was Reagent grade 98% ; CPME was Reagent Plus grade $\geq 99.5\%$ and 2-MeTHF was Reagent Plus grade $\geq 99.9\%$. CPME and 2-MeTHF were stabilized respectively with 50 ppm and 150 - 400 ppm of butylated hydroxytoluene (BHT) to limit formation of peroxides. The solvents were used without a prior distillation step except HMDS for which a double distillation was necessary to reach a suitable purity.

Standards of lipids were purchased from Sigma. The following standards were used during the development method: Cholesteryl palmitate (CE); Glyceryl tripalmitate (TG); methyl stearate (FAME), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG) and 1-stearoyl-rac-glycerol (MG); Stigmasterol (ST), Palmitic acid (FA), galactosyl diglyceride (MGDG), Cholesterol β -D-glucoside (ASG), digalactosyl diglyceride (DGDG), L- α -phosphatidylethanolamine (PE) and L- α -phosphatidylcholine (PC). Glucosylceramides (GluCer) were purchased from Extrasynthese. CE was 98% grade. MGDG, DGDG and ST were approximately 95 % grades. Others standards were 99 % grade.

2.2. Sample preparation for LC-MS coupling

Standards were stored in an n-heptane/chloroform (1:1) mixture, at a concentration of 5 mg/mL. Prior to their use, standards were evaporated to dryness under nitrogen gas at room temperature. Standards designated to direct infusion on APCI were dissolved in a composition of mobile phase corresponding to its composition at their elution time at a concentration of ca. 0.25 mg/mL. Standards designated to LC-MS coupling were dissolved in n-heptane prior to analysis at a concentration of ca. 0.25 mg/mL.

2.3. Apparatus

2.3.1. NPLC conditions

The HPLC instrumentation consisted of a Hewlett-Packard HPLC 1050 system (Agilent, France). The separation of lipids was performed on a 150x2.1 mm column packed with 5 μ m Inertsil SIL-150A (GL Sciences Inc.) supplied by Interchim (Montluçon, France). The column dead volume (V_0) was 0.49 mL. Helium was used as sparging gas during the analysis. The gradient delay volume was measured with an Applied Biosystems 785A Programmable Absorbance Detector (ThermoFisher scientific, France) at 270 nm by observing the rise in the baseline while running a mobile phase from 100% methanol to methanol with 0.5% acetone. The gradient delay was 1.25 mL.

Lipid classes ranging in polarity from cholesteryl ester to phosphatidylcholine were eluted by a ternary gradient. A combination of three solvent mixtures was used. Solvent A was n-heptane or HMDS. Solvent B was IA or 2-MeTHF or CPME or ethyl acetate:chloroform(EA:C) (70:30, v:v) and solvent C was ethanol:water (95:5, v:v). As final step, an eluent composed of A - B mixture (50:50 v/v) was used to flush-out water. The return at 100% solvent A had to be progressive (step from 41 to 51 minutes) to foster the re-equilibration of the column with eluent A (30 min) prior to the next injection. Table V.1 presents the solvent program for total lipid class analysis.

Table V.1: Ternary gradient composition.

time (min)	%A*	%B**	%C
0	100	0	0
12	88	12	0
13	86	12	2
20	81	16	3
25	70	20	10
30	45	20	35
33	35	30	35
41	50	50	0
51	0	0	0

* A: n-heptane or HMDS, ** B: IA or 2-MeTHF or CPME or EA:C (70:30, v:v), *** C: ethanol:water (95:5, v/v).

For all the experiments, the flow rate was set at 0.5 mL/min and a sample volume of 5 μ L was injected. Pure lipid standards were identified individually to confirm retention times by NPLC-ELSD. The column temperature was set at 40°C with a thermostatically controlled oven (Crococil, Cluzeau, Ste. Foy la Grande, France).

Table V.2: Optimization of source, gas and compounds parameters for ESI and APCI in direct infusion and LC-MS coupling

Parameters	Source	ESI	APCI	
		Infusion	Direct Infusion of pure HMDS and lipid standards	LC-MS coupling
Source and gas	Nebulizer gas (NEB)	1-15	1 to 15	8
Source and gas	Curtain gas (CUR)	6 to 15	6 to 15	8
Source and gas	Turbolonspray Voltage (IS)	From 0 To 5500 V	-	-
Source and gas	Nebulizer current (NC)	-	+/- 0 to 5	-
Source and gas	Temperature °C	0 to 500	50 to 500	300
Source and gas	Lateral position	-10 to +10 mm	-6 to +6 mm	-
Source and gas	Horizontal position	5 to 15 mm	-	-
Compound	Flow-rate	10 μ L/min	10 μ L/min	0.5mL /min
Compound	Declustering potential (DP)	+/-0 to 200V	+/-0 to 200V	+/-60V
Compound	Focusing potential (FP)	+/-50 to 400V	+/-50 to 400V	+/-320V
Compound	Entrance potential (EP)	+/-2 to 15V	+/-2 to 15V	+/-9
	Mass range	50 to 1000	50 to 1000	215 to 1500

2.3.2. MS conditions

The MS acquisitions were performed on an API 3000 triple quadrupole controlled by Analyst software (ABI Sciex, USA) and equipped with an electrospray ionization source and an atmospheric pressure chemical ionization source operated in negative and positive ion modes. The parameters values used for direct infusion in ESI or APCI and LC-MS coupling are presented in the table V.2.

3. Results and discussion

The compatibility of alternative solvents with different ionization techniques had to be evaluated in order to perform a lipid classes' separation by NPLC-MS. As described in the literature, NPLC mobile phase possesses a low compatibility with ESI source because it is mainly composed of apolar solvents [12-14]. Indeed, HMDS is a silicon solvent that possesses similar physical and chemical properties compared to alkanes [15-17]. A special attention was paid to this solvent and the first experiments were performed by directly infusing HMDS in the ESI source. We didn't anticipate such difficulties with solvents of medium polarity such as IA, CPME and 2-MeTHF and their use were assessed through LC-MS coupling.

3.1. Compatibility of HMDS with ESI source

The ESI process is complex, several parameters can affect its stability. The applied voltage, the nebulizing gas flow-rate, the distance between the spray capillary and the counter electrode and the solution flow-rate have a direct influence on the ability to achieve a stable and effective spray. Solvent characteristics can also influence ionization process such as conductivity, volatility, surface tension, viscosity or dielectric constant [12, 13]. To evaluate the potential interest of HDMS in ESI ionization, its main physico-chemical properties were compared to these of n-heptane but also water (see Table V.3). Water is known to be useable in ESI ionization [18], although methanol and acetonitrile or hydro-organic mixture provide superior ionization efficiency [12].

Table V.3: Vapor pressure; viscosity; surface tension; dielectric constant; dipole moment of n-heptane; HMDS and water.

	n-heptane [19]	HMDS [15-17]	Water [20]
Vapour pressure hPa (20°C)	47.3	20.0	31.6
Viscosity cP (20°C)	0.41	0.49	0.89
Surface tension dyne/cm	20.35	15.50	72.86
Dielectric constant (20°C)	1.93	2.20	78.5
dipole moment D	0	0.6	1.84

HMDS is a bis(trimethylsilyl)ether. Hence, the notable difference between HMDS and alkanes is the presence of two silicon atoms and an oxygen. Despite to be less polar than n-heptane, HMDS possesses a non-zero/low dipole moment (Table V.3) [16, 21]. The overall dipole moment was estimated of 0.6D [21]. Holland and Smyth showed that the configuration of the HMDS skeleton gives rise to a "negligible polarity in the H-C bonds, considerable polarity in the Si-C bonds, so much ionic character in the Si-O bonds". HMDS could possess a higher conductivity than common alkanes, which could be an advantage for electrospray ionization. HMDS possesses a low surface tension and a low dielectric constant as n-heptane. Those characteristics are not favourable for charged droplet formation. Like water, HMDS is less volatile than alkanes. Evaporation of HMDS from the charged droplets will be lower than the evaporation of other organic solvent and it will restrict the efficient emission of gas-phase ion. HMDS viscosity is lower than water; it could favour the mobility of ions leading to an efficient charge separation, and to obtain a stable spray. Thus, the formation of the spray seems possible with HMDS; the source parameters have to be properly balanced in order to accomplish the formation of a stable ESI spray.

HMDS is not available as LC-MS grade solvent. Previous separations performed on an ELSD have shown that HMDS had to be distilled twice before its used in NPLC-ELSD. Experiments were performed by direct infusion of distilled HMDS in the ESI source (data not shown). The influence of several parameters was investigated: NEB; CUR; IS and the distance between the spray capillary and the counter electrode (lateral and horizontal position). In negative mode, there was no spray formed and no signal was observed. Evaporation of the solvent from the droplets seemed not sufficient to favour the increase of charge density at the surface of the droplet. In positive mode, a signal was observed but the stability of the spray was not sufficient. Modifications of NEB; CUR; IS values gave no amelioration. Variations of distance between the spray capillary and the counter electrode had a positive impact on the stability of the spray. A lateral displacement of 10mm on the right and an increase of 5mm of the horizontal position favoured the stability of the spray. The problem was the use of high fields (>5000V) which are described to be deleterious for the ESI process in terms of stability and sensitivity [12]. According to those results, it was decided that HMDS cannot readily be used with ESI source for this work. As described above, lipid classes' analysis implies the use of a non-polar solvent at the beginning of the ternary gradient. As HMDS wasn't appropriate for ESI ionization, no further experiments were carried out with medium polarity solvents. The possible use of HMDS and medium polarity solvent with APCI was investigated.

3.2. Compatibility of alternative solvent with APCI source

3.2.1. Direct infusion of HMDS

In the literature, lipid classes analyses performed with NPLC were carried out with APCI source because this method was compatible with apolar and polar solvents. The main problem was the purity grade of alternative solvents and their contribution for the ionization in term of intern energy or protonic affinity which could be critical concerning the lipid ionization. The non-availability of sufficient purity grade for HMDS had to be evaluated first. Experiments were performed by direct infusion of commercial HMDS and distilled twice. Mass spectra obtained in positive ion mode are presented in figure V.1.

Mass spectra showed a high proportion of ions covering the m/z values range from 0 to 400. Main ion intensities were the same for commercial HMDS (Figure V.1.A) and distilled twice HMDS (Figure V.1.B). Purification of HMDS permitted to limit the presence of undesired compounds. Intensities of fragments superior to m/z 200 were decreased but they were not totally eliminated. The same observation can be made for spectra obtained in negative ion mode (Figure V.2).

Mass spectra showed a lower proportion of ions in negative than in positive ion mode. The mass range was also lower (m/z from 0 to 300). Main ion intensities were lower for twice distilled HMDS (Figure V.2.A) than commercial HMDS (Figure V.2.B).

Presence of impurities in HMDS represents an issue for lipid classes' identification. Several lipid classes are identified through ion fragment, which possess m/z values lower than 400 such as fatty acids. Therefore, it is impossible to cut off under m/z 400. To evaluate the perturbation of lipid standards identification, they were analysed by direct infusion on APCI source.

3.2.2. Direct infusion of lipid standards

Before using LC-MS coupling, experiments were performed by direct infusion of standard from several lipid classes: CE, TG, FA, ST, DG, MG. These classes were selected because their chromatographic elution imply a high proportion of HMDS and their main fragments have m/z values lower than 500. Lipid standards were analysed separately. For each lipid classes, an exhaustive set of experiments was performed. Standards were dissolved in a mixture corresponding to the proportion of A, B and C solvents at their elution time. The solvent A is HMDS and the solvent C is ethanol:water (95:5, v:v). B solvents are IA, CPME, EA:C (70:30, v:v) or 2-MeTHF. For each lipid classes, spectra showed similar results independently of the nature of B solvents (data not shown). CE was identify by its characteristic fragment of

steryl esters, corresponding to cholestene's cation ($[M+H-FA]^+$, m/z 369) [22]. FA was identified by the $[M-H]^-$ (m/z 255) [23], ST was observed as $[M+H-H_2O]^+$ (m/z 395) [22]. DG and MG were respectively observed as $[M+H-H_2O]^+$ and $[FA-H]^-$ (respectively m/z 551 and 283) [24].

A screening was also performed to evaluate the impact of DP, FP and EP parameters on the chemical noise and lipid fragmentation with HMDS. For each lipid classes, an exhaustive set of experiments was performed. Standards were dissolved in a mixture corresponding to the proportion of A, B and C solvents at their elution time. The solvent A was n-heptane or HMDS and the solvent C was ethanol:water (95:5, v:v). B solvents were IA, CPME, EA:C (70:30, v:v) or 2-MeTHF. To illustrate the results obtained, the mass spectra of TG are presented in the figure V.3.

TG's mass spectra show a characteristic fragment of triglycerides, corresponding to diglyceride-like ($[M+H-FA]^+$, m/z 551) [24]. The comparison of the peak intensity obtained for each lipid class shows no differences except with for TG. Intensity is higher for HMDS/IA mixture than n-heptane/IA. Variations of DP, EP and FP parameters showed that the same values could be used with the two non-polar solvents without any loss of fragmentation information or ion suppression signal (data not shown). According to those results, alternative solvents (HMDS, CPME, 2-MeTHF and IA) have shown their compatibility with the APCI source. Thereafter, an exhaustive set of experiments was performed by combining conventional and alternative solvents to evaluate their impact on the ionization of lipid classes. To appreciate the intrinsic effect of each solvent on lipid classes' ionization it was decided to avoid the use of additive such as formic acid or ammonium formiate.

3.3. LC-APCI-MS coupling

3.3.1. HMDS as weak solvent

Blank tests were performed using a ternary gradient composed by HMDS/IA or CPME or 2-MeTHF/ethanol:water (95:5, v:v). Analyses were performed in positive and negative ion mode. According to results of direct infusion of HMDS, a signal cut off was set at m/z 215. Results showed an abnormal TIC intensity signal of the baseline. In comparison with previous analyses using a conventional ternary gradient (n-heptane/EA:C (70:30, v:v)/ethanol:water (95:5, v:v)), TIC baseline was 50 times higher and is near to the limits of the instrument. Analysis was carried out with HMDS under isocratic conditions. The intensity signal is observed at $8e10$ cps, significantly higher than the intensity measured with ternary gradient

HMDS/IA/ethanol:water (95:5, v:v) (5e9 cps). Corresponding mass spectra of HMDS obtained in positive and negative ion mode are presented in the figure V.4.

Mass spectra showed a high proportion of ions covering the mass range of 215-500 in negative and positive ion modes. Their presence represents an issue for lipid classes' identification because it is impossible to cut off under m/z 500 as explained above. Analysis by direct infusion had shown that HMDS was compatible with this source but the volume of solvent eluted was not the same for infusion and direct coupling operation. In comparison with the infusion mode, the mobile phase flow rate was 50 times higher in coupling mode (10 μ L / min for infusion and 0.5mL/min for LC-MS). Despite a double distillation, purification process did not provide sufficient quality in order to use HMDS in LC-APCI/MS. In order to continue our evaluation of alternative solvents for LC-MS lipid class analysis, ternary gradients were run using n-heptane as weak solvent.

3.3.2. n-heptane as a weak solvent

As far as we know the use of IA, CPME and 2-MeTHF for lipid classes analysis by LC-APCI-MS had never been reported. A screening of B solvent was carried out. Results obtained with these solvents were compared to those obtained with a conventional solvent mixture of intermediate polarity. Chloroform associated with 2-propanol (as 1:4 mixture) was first proposed by Christie [25] for lipid classes analysis using NPLC-ELSD. Dichloromethane was considered as an alternative [26] for toxicity reasons. Ethyl acetate was proposed to improve the overall selectivity of the separation [27]. In the present study, a 70:30 (v/v) mixture of EA:C as solvent of medium polarity was selected. In the ternary gradient conditions as presented in table V.1, the solvent strength of the EA:C solvent B was similar to the one obtained with the alternatives solvents.

The solvent program adapted from our previous article [9] allowed to obtain the chromatographic profiles presented in figure V.5. All the lipid classes under investigation were separated when using B solvents composed of EA:C or 2-MeTHF. In case CPME or IA were used, the only difference was a co-elution between DGDG and PE (Figure V.5. C, D, G, H). The objective of this study is to assess the usability of alternative solvents with MS. It is worthy to note that, regardless of the solvent in use, according to the physico-chemical properties of the lipid class considered, positive or negative ionization can be favoured [10]. Thus, non-polar lipids such as FAMES, TGs, and STs are not or hardly ionisable in negative ion mode but are detected in positive ion mode. At the opposite, FA are only ionized in negative ion mode. Polar and medium polarity lipids ionize in both modes with more or less intensity. These general

observations issued from studies conducted with conventional solvents [10] are also valid with alternative solvents.

The main difficulty encountered with alternative solvents is their non-HPLC grade, which induced a high background noise, and even, ion suppression. This was particularly the case with 2-MeTHF in positive ion mode where only CE are detected with a favourable signal to noise ratio (Figure V.5.C, F). It was deliberately chosen not to add ionization modifiers such as acetic or formic acid that are usually used in mass spectrometry to enhance ionization as to only consider the influence of alternative solvents on ionization. The use of n-heptane as weak solvent influences unfavourably the peak shape of PC. Unlike HDMS, n-heptane induces an important peak broadening in case of PC, why the peak of PC could not be visualized from the TIC.

The main ions of the lipid standards observed in LC-APCI in positive and negative ion mode are presented in table V.4.

In negative mode, the observable ions are listed in table V.4 and correspond to $[M-H]^-$, $[M+35]^-$ or $[M+59]^-$ quasi-molecular ions together with the fragment ion $[FA-H]^-$. Quasi-molecular ions allow to assess the molecular mass of the lipid species while the fragment ion informs about the fatty acid substituent.

From our results and in our conditions, only chloroform and the alternative solvent IA promoted some adducts in negative ion mode. Chloride adduct $[M+Cl]^-$ is frequently encountered with chloroform, this adduct is observed with lipids of intermediate polarity (DG, MG, ASG, MGDG, GluCer and DGDG). Adducts formed with acetic acid $[M-H+CH_3CO_2H]^-$ were found with the alternative solvent IA and concern the same lipid classes of intermediate polarity. The occurrence of acetic acid adducts can be explained by the presence of acetic acid in IA arising from its synthesis process. In presence of chloroform, the only adduct observed was $[M+Cl]^-$. When $[M-H+CH_3COOH]^-$ was observed, the $[M-H]^-$ is also present in some instances (MGDG, GluCer and DGDG). $[M-H]^-$ is observed either for non-polar (SA, FAME, FA and ST) or polar lipids (PE, PC) together with the fragment ion $[FA-H]^-$. FAs cannot ionize in positive mode. The $[M+H]^+$ ion is encountered for all lipid classes except DGDG (with the notable exception of 2-METHF where it appears to be present) and with lipid of the sterol family which undergo in-source fragmentation.

Table V.4: Adducts encountered in positive and negative ion mode for the lipid classes' under consideration. The molecular mass (*M*) of the lipid specie (for monomolecular standards) or the most intense ion (for natural standards) is provided together with the *m/z* of the detected ions and the corresponding adduct.

Compound	M	Positive ion mode					Negative ion mode				
		<i>m/z</i>	IA	CPME	2-METHF	AE/C	<i>m/z</i>	IA	CPME	2-METHF	AE/C
CE	625	[M+H-FA] ⁺	369	369	369	369	[FA-H] ⁻	255	255	255	255
FAME (C23:0)	410	[M+H] ⁺	411	411	411	411	[FA-H] ⁻	-	-	395	395
TG (16:0/16:0/16:0)	806	[M+H] ⁺	807	807	807	807	[M-H] ⁻	805	805	805	-
		[M+H-FA] ⁺	551	551	551	551	[FA-H] ⁻	255	255	255	255
		[RCO+74] ⁺	313	-	-	-	-	-	-	-	-
FA (C16:0)	256	-	-	-	-	-	[M-H] ⁻	255	255	255	255
ST	412	[M+H-H ₂ O] ⁺	395	395	395	395	-	-	-	-	-
		[M+H-4H] ⁺	409	409	409	409	-	-	-	-	-
DG (16:0/16:0)	568	[M+H] ⁺	569	569	569	569	[FA-H] ⁻	255	-	255	255
		[M+H-H ₂ O] ⁺	551	551	551	551	[M+Cl] ⁻	-	-	-	603
		-	-	-	-	-	[M-H+CH ₃ CO ₂ H] ⁻	627	-	-	-
		-	-	-	-	-	Not identified	-	600	-	-
MG (18:0)	358	[M+H] ⁺	359	359	359	359	[FA-H] ⁻	283	-	283	283
		-	-	-	-	-	[M+Cl] ⁻	-	-	-	393
		-	-	-	-	-	[M-H+CH ₃ CO ₂ H] ⁻	418	-	-	-
		-	-	-	-	-	Not identified	-	390	-	-
ASG	838	[M+H-FA-sugar] ⁺	397	397	397	397	[M+Cl] ⁻	-	-	-	873
		-	-	-	-	-	[M-H+CH ₃ CO ₂ H] ⁻	897	-	-	-
MGDG*	746	[M+H] ⁺	747	747	747	747	[M-H] ⁻	745	745	745	-
		[M+H-180] ⁺	567	567	567	567	[FA-H] ⁻	277	277	277	277
		[M+H-162] ⁺	585	585	585	585	[FA-H] ⁻	249	249	249	-
		[RCO +74] ⁺	335	335	335	335	[M+Cl] ⁻	-	-	-	781
		[RCO +74] ⁺	307	307	307	307	[M-H+CH ₃ CO ₂ H] ⁻	805	-	-	-
GluCer*	772	[M+H] ⁺	773	773	773	773	[M-H] ⁻	771	771	771	-
		[M+H-162] ⁺	611	-	-	611	[M+Cl] ⁻	-	-	-	807
		-	-	-	-	-	[M-H+CH ₃ CO ₂ H] ⁻	831	-	-	-
DGDG*	916	[M+H] ⁺	-	-	917	-	[M-H] ⁻	915	915	915	-
		[M+H-341] ⁺	575	575	575	575	[M+Cl] ⁻	-	-	-	951
		[RCO +74] ⁺	313	313	313	313	[M-H+CH ₃ CO ₂ H] ⁻	975	-	-	-
		[RCO +74] ⁺	337	337	337	337	-	-	-	-	-
PE*	743	[M+H] ⁺	744	744	744	-	[M-H] ⁻	742	742	742	742
		[RCO+74] ⁺	336	336	336	-	[FA-H] ⁻	283	283	-	-
PC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

The structure elucidation of sterols and sterol derivatives (ST, SE and ASG) is commonly carried out in positive mode [28]. The observed ions correspond to $[M+H-H_2O]^+$ and ions at m/z 369, 395 and 397 correspond to cholesterol, stigmasterol and sitosterol respectively. Negative mode ionization provides a complementary information by allowing the identification of the fatty acid substituent through the $[FA-H]^-$ ion of SE and ASG.

Glyceroglycolipids (TG, DG, MG, MGDG, DGDG, PE et PC) give an acylium ion $[RCO+74]^+$ in positive mode [24, 29]. This ion corresponds to a rearrangement of the alkyl chain with the glycerol. This ion was found for MGDG and DGDG whatever was the solvent. The low TIC intensity can explain why this ion wasn't observed for DG and MG. With CPME, DG and MG presented a specific fragment (respectively ions at m/z 600 and 390) issued from a gain of m/z 32 ($[M+32]^+$), which was not identified. For TGs, this ion was only encountered with IA and for PE the acylium ion could be seen with all solvents except the EA:C mixture. None of the alternative solvents appeared to present a specific behaviour in this case.

Glycolipids (MGDG, GluCer and DGDG) except ASG present characteristic fragments issued from the loss of the glucose unit $[M+H-180]^-$ $[M+H-162]^-$ et $[M+H-341]^-$ [24]. These glycolipids ions were found with all the solvents considered with the notable exception of GluCer in CPME and 2-METHF.

4. Conclusion

In this study, it was investigated the use of alternative solvents for NP-HPLC-MS analysis of lipid classes. HMDS, the weak solvent alternative to n-heptane appeared promising from its physicochemical characteristics but we couldn't obtain a stable spray in negative in positive mode. This work has to be extended to other ion source geometries to confirm our findings and try to improve. HDMS appeared also to present impurity levels incompatibles with its use in APCI-MS despite of a double distillation performed with our laboratory instruments. Therefore, n-heptane could be used as weak solvent in ternary gradient composition. Thus, medium polar alternative solvents were evaluated in combination with n-heptane. The commercial unavailability of LC-MS purity grade was not an issue for the use of IA, CPME and 2-MeTHF. Comparison of lipid classes identification showed similar results between conventional and alternative solvents. It is important to note that IA permitted the formation of acid acetic adduct.

Acknowledgment

Nolwenn Prache PhD Thesis is funded by a grant of Region Ile de France, DIM Analytics.

References

- [1] W.W. Christie, What is a Lipid?, in: A.L. Library (Ed.), The American Oil Chemists' Society, 2013.
- [2] T. Cajka, O. Fiehn, Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 61 (2014) 192-206.
- [3] M. Li, Z. Zhou, H. Nie, Y. Bai, H. Liu, Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (2011) 243-249.
- [4] U. Loizides-Mangold, On the future of mass-spectrometry-based lipidomics, *Febs Journal*, 280 (2013) 2817-2829.
- [5] M.R. Wenk, The emerging field of lipidomics, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (2005) 594-610.
- [6] X. Han, R.W. Gross, Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples, *Mass spectrometry reviews*, 24 (2005) 367-412.
- [7] N. Navas-Iglesias, A.a. Carrasco-Pancorbo, L. Cuadros-Rodriguez, From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28 (2009) 393-403.
- [8] A. Carrasco-Pancorbo, N. Navas-Iglesias, L. Cuadros-Rodriguez, From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28 (2009) 263-278.
- [9] N. Prache, S. Abreu, P. Sassiati, D. Thiebaut, P. Chaminade, Alternative solvents for improving the greenness of normal phase liquid chromatography of lipid classes, *Journal of Chromatography A*, 1464 (2016) 55-63.
- [10] L. Imbert, M. Gaudin, D. Libong, D. Touboul, S. Abreu, P.M. Loiseau, O. Laprévotte, P. Chaminade, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of *Leishmania donovani*, *Journal of Chromatography A*, 1242 (2012) 75-83.
- [11] W.C. Byrdwell, Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids, *Lipids*, 36 (2001) 327-346.
- [12] R. Kostianen, T.J. Kauppila, Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography - mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 685-699.
- [13] N.B. Cech, C.G. Enke, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass spectrometry reviews*, 20 (2001) 362-387.
- [14] L. Charles, F.d.r. Laure, P. Raharivelomanana, J.P. Bianchini, Sheath liquid interface for the coupling of normal phase liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and its application to the analysis of neoflavonoids, *Journal of mass spectrometry*, 40 (2005) 75-82.
- [15] C.P. Co, MSDS - PSF- 0.65cSt HMDS Silicone Fluid in, 2014, pp. 1-4.
- [16] N.D. Danielson, C.L. Goldhammer, J.R. Bowser, P.F. Gavin, Hexamethyldisiloxane as a mobile phase component for normal phase liquid chromatography, *Chromatographia*, 43 (1996) 647-653.
- [17] Sigma-Aldrich, HMDS, MSDS No. 205389, in: Sigma-Aldrich (Ed.) MSDS, Sigma-Aldrich, 2015, pp. 1-8.
- [18] A. Krueve, Influence of mobile phase, source parameters and source type on electrospray ionization efficiency in negative ion mode, *Journal of mass spectrometry*, 51 (2016) 596-601.
- [19] V. Sedivec, J. Flek, Handbook of analysis of organic solvents, E. Horwod; Wiley, 1975.
- [20] Honeywell, Water, MSDS No. 000000011444, in: Honeywell (Ed.) SDS, Honeywell International Inc., 2014.
- [21] R.S. Holland, C.P. Smyth, The Dielectric Properties and Molecular Structure of Hexamethyldisiloxane 1, 2, *Journal of the American Chemical Society*, 77 (1955) 268-271.
- [22] Chapter 7 Steroids, in: *Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids*, The Royal Society of Chemistry, pp. 233-273.
- [23] Chapter 1 Fatty Acids, in: *Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids*, The Royal Society of Chemistry, pp. 1-39.
- [24] Chapter 4 Glyceryl Esters, in: *Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids*, The Royal Society of Chemistry, pp. 105-129.

- [25] W.W. Christie, Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection, *Journal of Lipid Research*, 26 (1985) 507-512.
- [26] R. Homan, M.K. Anderson, Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 708 (1998) 21-26.
- [27] M. Graeve, D. Janssen, Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: Application to exceptional marine lipids, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 1815-1819.
- [28] R. Rozenberg, N.L. Ruibal-Mendieta, G.r. Petitjean, P. Cani, D.L. Delacroix, N.M. Delzenne, M. Meurens, J.I. Quetin-Leclercq, J.-L. Habib-Jiwan, Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS, *Journal of cereal science*, 38 (2003) 189-197.
- [29] Chapter 5 Glycerophospholipids, in: *Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids*, The Royal Society of Chemistry, pp. 130-193.

Figures

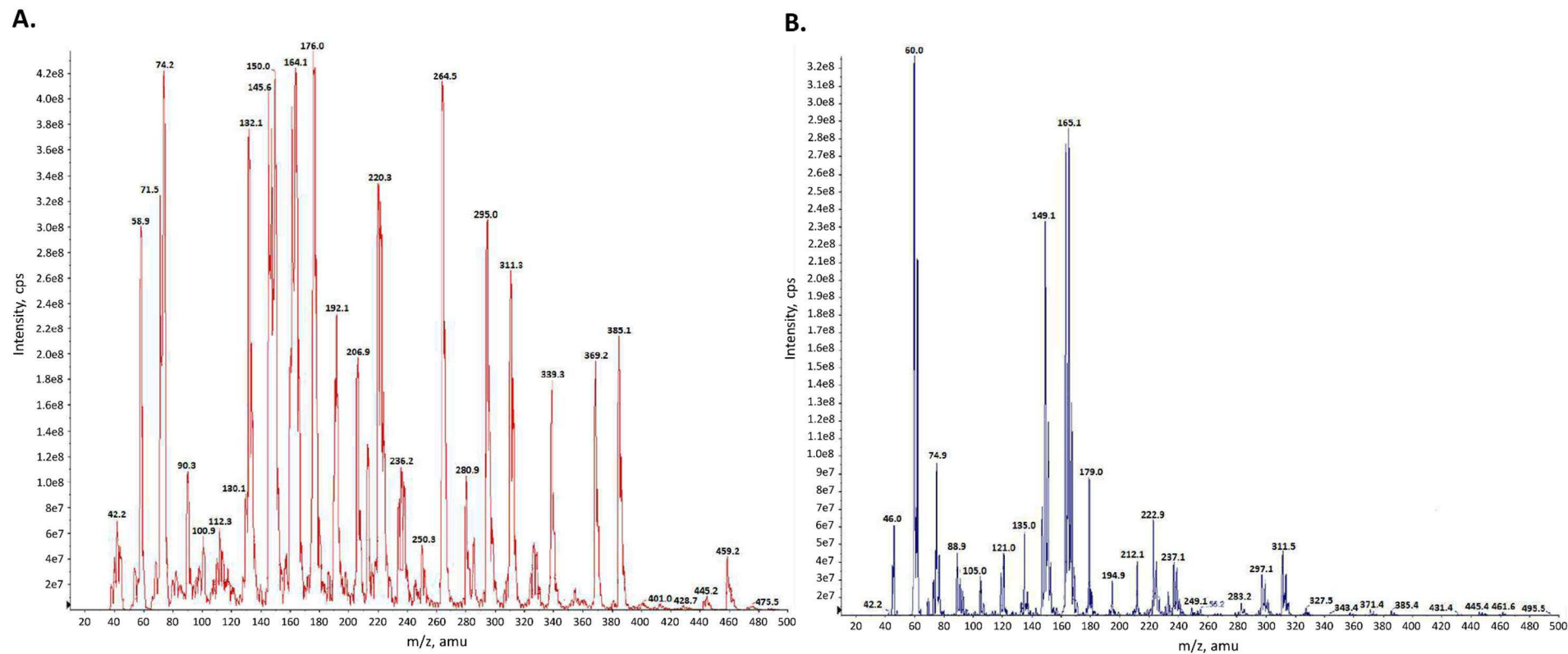


Figure V.1: Mass spectra of pure HMDS (A) and twice distilled HMDS (B) in positive ion mode by direct infusion, APCI source.

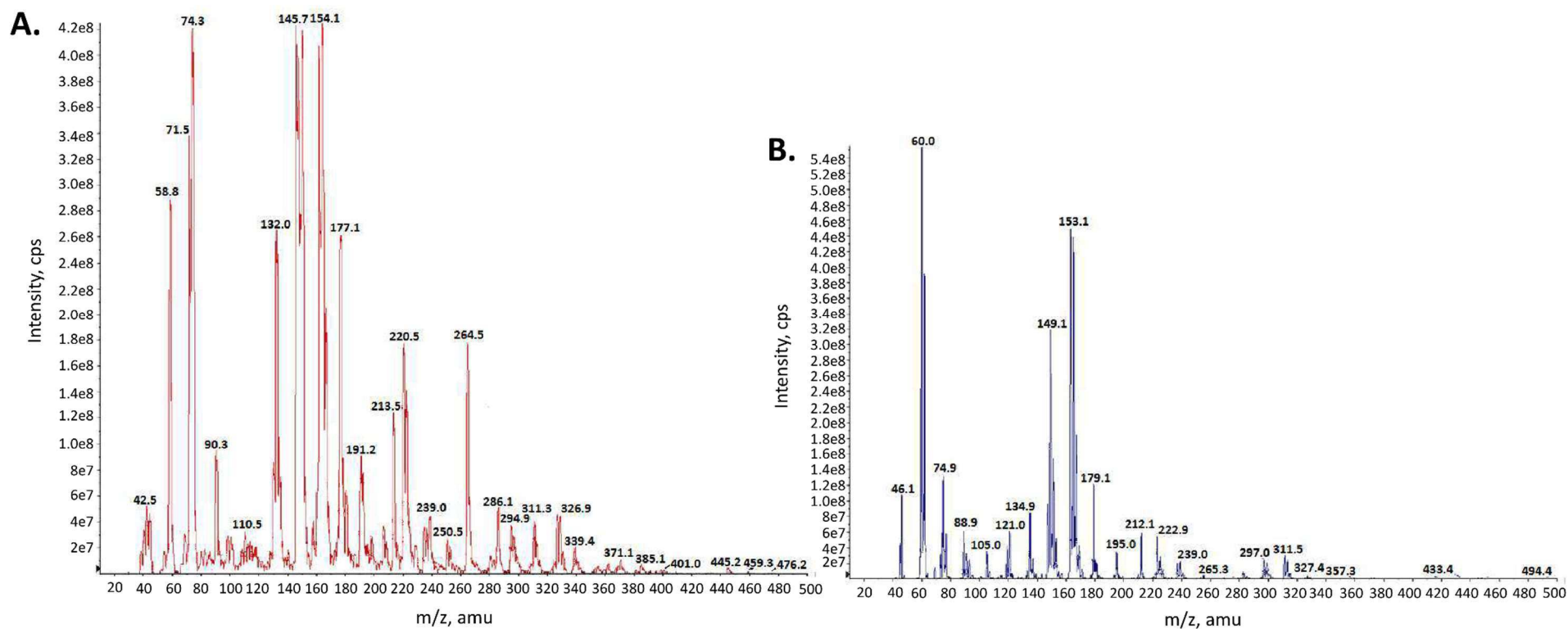


Figure V.2: Mass spectra of pure HMDS (A) and twice distilled HMDS (B) in negative ion mode by direct infusion, APCI source.

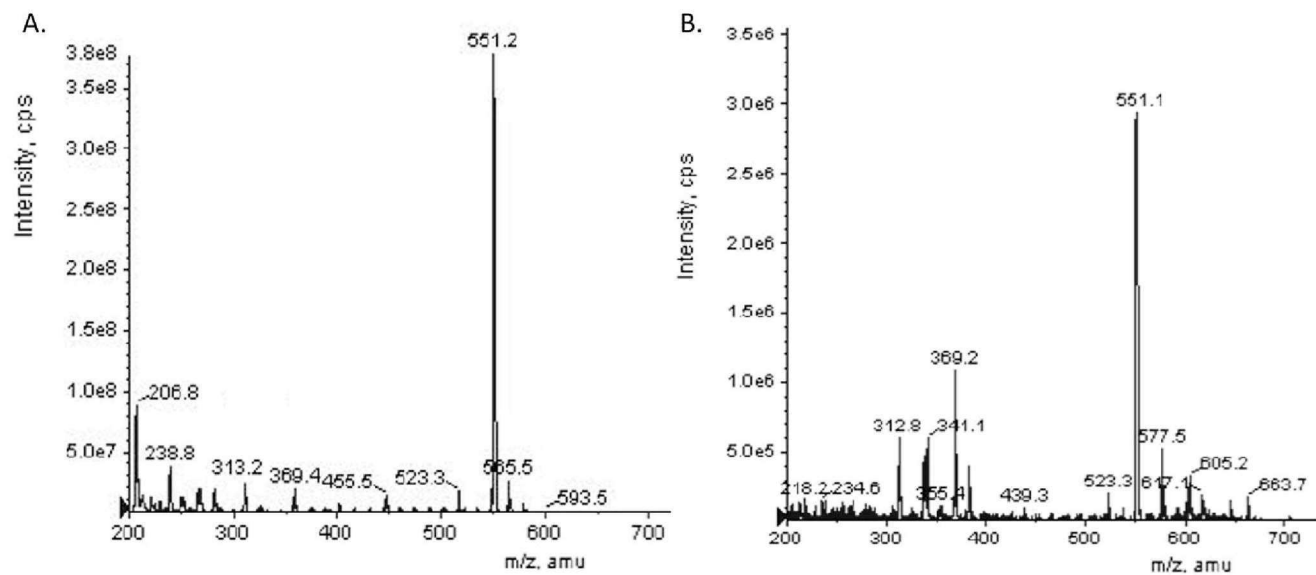


Figure V.3: Mass spectra of TG in positive ion mode. Solvent: H/IA (B) and HMDS/IA (A) by direct infusion, APCI source.

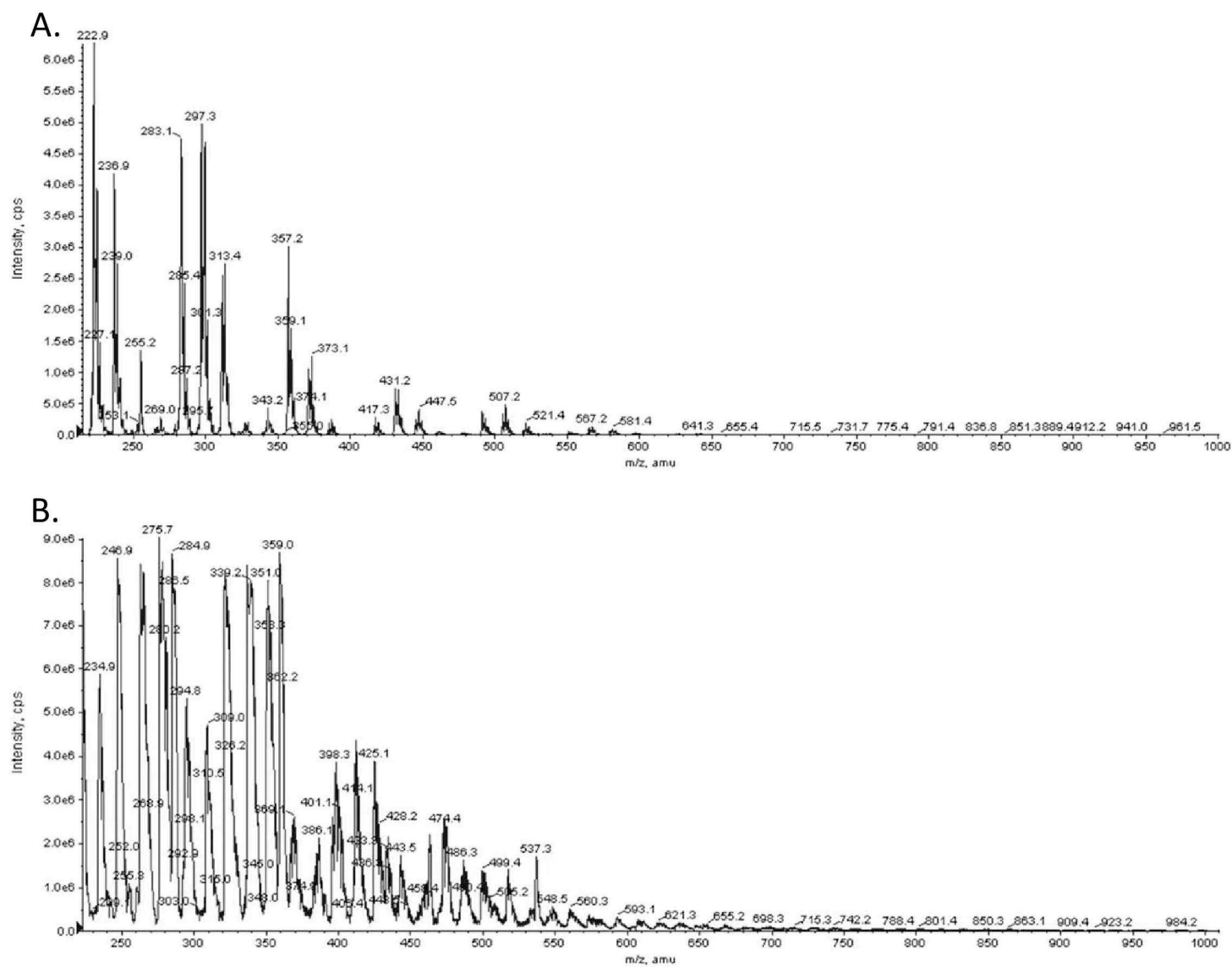


Figure V.4: Mass spectra of pure HMDS in negative (A) and positive (B) ion mode by LC-MS coupling, APCI source.

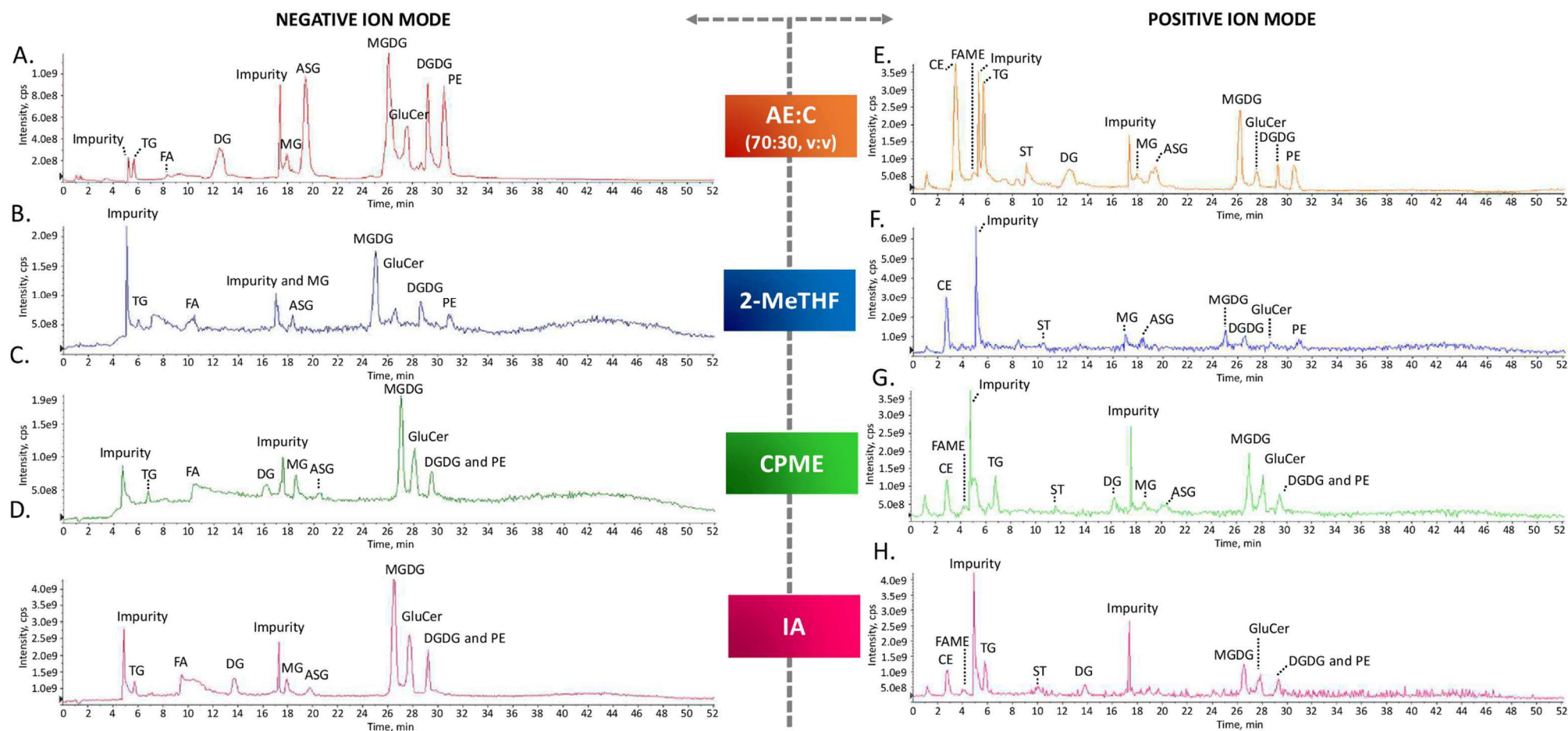


Figure V.5: TICs of the separation of 10 lipid classes (CE, TG, ST, FA, DG, MG, MGDG, DGDG, PE and PC) by NPLC-APCI-MS. HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, ternary gradient composed by (a): n-heptane, (b): (V.5.D,H) IA; (V.5.B, F) 2-MeTHF; or (V.5.C,G) CPME or (V.5.A,E) EA:C (70:30, v:v), (C): ethanol:water (95:5, v:v). The APCI-MS conditions: acquisitions were performed in negative (V.5.A, B, C, D) and positive (V.5.E, F, G, H) ion mode, nebulizer gas: 8; curtain gas: 8; nebulizer current: +/-5; temperature: 300°C; declustering potential: +/-60V; focusing potential: +/-320V; entrance potential: +/-9; mass range: 215-1500. Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG), stigmaterol (ST), palmitic acid (FA), methyl stearate (FAME), Glucosylceramides (GluCer), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG), 1-stearoyl-rac-glycerol (MG), galactosyl diglyceride (MGDG), digalactosyl diglyceride (DGDG), L- α -phosphatidylethanolamine (PE), L- α -phosphatidylcholine (PC).

CONCLUSION

La formation d'un spray stable en ESI dépend en partie de la conductivité, de la volatilité, de la tension de surface, de la viscosité ainsi que de la constante diélectrique du solvant. L'optimisation des paramètres de source peut aussi conduire à une amélioration dans la stabilisation du spray. L'introduction directe de HMDS en ESI-MS montre la formation d'un spray, instable, en mode positif uniquement. Une évaluation de l'impact des paramètres de sources a permis de mettre en évidence l'importance de la géométrie de la source sur la stabilité du spray formé par l'HMDS ainsi que de la puissance de la décharge. La faible stabilité du spray obtenu n'a pas permis l'utilisation, en couplage LC-MS, des solvants alternatifs de milieux de polarité.

L'introduction directe de HMDS en APCI-MS a mis en évidence la présence d'impuretés, se traduisant par un nombre conséquent d'ions compris entre m/z 0 et 400, pouvant perturber la détection des classes lipidiques. L'analyse de standards lipidiques par introduction directe en APCI-MS a permis de valider l'utilisation de HMDS. L'utilisation du gradient ternaire en LC-MS pour la séparation et l'identification de classes lipidiques a été évalué. Le signal obtenu sur le TIC a montré, encore une fois, la présence d'ions de m/z inférieures à 400 limitant l'identification des lipides.

Le couplage LC-MS a alors été évalué pour les solvants alternatifs de milieu de polarité (CPME, IA et 2-MeTHF) utilisés comme solvant B dans un gradient ternaire composé de n-heptane et d'un mélange éthanol:eau (95 :5, v/v). Les résultats obtenus ont été confrontés à un gradient de référence n-heptane/EA:C (70:30, v:v)/éthanol:eau (95:5, v:v). La comparaison des profils de masses obtenus montre que leur utilisation est possible et donne des résultats similaires obtenus avec les solvants conventionnels.

**CHAPITRE VI : APPORT DES SOLVANTS
ALTERNATIFS POUR LA SEPARATION DE
LIPIDES EN SFC-ELSD**

INTRODUCTION

Une autre possibilité de séparation « verte » des lipides est d'exploiter le CO₂ supercritique dont la faible polarité peut être modulée par sa masse volumique, en augmentant la pression ainsi que la température de travail. En SFC, la modulation de la masse volumique du CO₂ permet de travailler sur une gamme d'élution allant du pentane au dichlorométhane environ. Les solubilités mises en jeu sont adaptées à l'analyse des lipides moyennement et peu polaires. L'ajout de solvants polaires (« modificateurs polaires ») en particulier le méthanol permet l'élution des composés les plus polaires comme les phospholipides. L'objectif de cette étude concerne la mise en œuvre des solvants alternatifs utilisés comme modificateurs polaires du CO₂ supercritique.

Dans un premier temps, le comportement des solvants alternatifs, de milieu de polarité, en mélange avec le CO₂ supercritique sera étudié via l'utilisation de composés modèles (ipriflavone et warfarine) sur différentes phases stationnaires classiques (diol et C18) ainsi qu'une phase spécifique à la SFC (EP), de même que leur sélectivité et l'incidence de leur présence dans la phase mobile sur la qualité de la détection que ce soit par absorptiométrie dans l'UV ou par diffusion de la lumière.

L'impact des solvants alternatifs (modificateurs) en mélange avec le CO₂ supercritique sera également évalué pour la séparation de différentes familles de lipides, l'objectif ici étant de déterminer la polarité des familles pouvant être éluées, d'étudier la sélectivité, l'efficacité et la résolution des séparations en comparaison avec un solvant de référence : le méthanol.

Ces travaux sont synthétisés dans une publication qui regroupe les différents points présentés ci-dessus ainsi que l'intérêt des solvants alternatifs pour la séparation de lipides en SFC-ELSD.

EVALUATION OF ALTERNATIVE SOLVENTS FOR NON-POLAR LIPID CLASSES SEPARATION BY SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY AND EVAPORATIVE LIGHT-SCATTERING DETECTION

Authors

Nolwenn Prache ^{a,b}, Yijun Zhou^a, Patrick Sassi^a, Pierre Chaminade^b, Didier Thiébaud ^{a,*}

^a UMR 8231 Chimie Biologie Innovation CNRS – ESPCI, LSABM, ESPCI Paris PSL Research University, F-75005 Paris, France

^b Lip(Sys)-², Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92290 Châtenay-Malabry, France.

* Corresponding author. Tel: +33(0)140794648; Fax: +33(0)140794776

E-mail address: didier.thiebaud@espci.fr

Abstract

An evaluation of alternative solvents to methanol (cyclopentyl methyl ether, 2-methyltetrahydrofuran and isopentyl acetate) was developed for non-polar lipid classes separation by supercritical fluid chromatography and evaporative light-scattering detection. Screening of alternative solvents was used to estimate their compatibility with this technique and to evaluate their chromatographic selectivity. This work shows that methanol can be advantageously replaced by cyclopentyl methyl ether, 2-methyltetrahydrofuran and isopentyl acetate for non-polar lipid classes separation. Aside from offering a different selectivity, the gradients composed by alternative solvents gave efficient and comparable or even better separations than those obtained with methanol.

Keywords

Lipids, Alternative solvents, Supercritical Fluid Chromatography; Evaporative light scattering detection

1. Introduction

Supercritical fluid chromatography (SFC), especially using supercritical carbon dioxide (CO₂) is referred as a green analytical separation method [1-3]. CO₂ is an odourless fluid, non-inflammable, non-corrosive which possesses a low toxicity for human and environment. The CO₂ critical parameters are 31.1°C and 73.8 bars. This low critical temperature and pressure are easily attained by the SFC instrumentation. Moreover, those critical conditions do not cause degradation of sample. Supercritical fluids possess a low viscosity, a similar density and dissolving capacities as liquids [4]. Moreover, they offer higher diffusion properties. When the pressurized CO₂ returns to gas state, it permits to limit the generation of toxic and hazardous wastes and limits the volume of wastes retreatment. The main advantages of SFC compared to

high-pressured liquid chromatography (HPLC) include higher efficiency, faster separation, faster column equilibration, flexibility in solvent selection. The properties of SFC using CO₂ are similar to normal phase liquid chromatography (NPLC) and offer a greener alternative to this method [5]. However, when applied to lipid analysis, NPLC is enabled to resolve a wide range of lipids in a single run. Lipids presenting the same polar group (i.e.; that belong to the same lipid class) are eluting into a single peak. Different polar stationary phases, such as diol [6-8], cyano [9], polymerized polyvinyl alcohol bonded on silica particles (PVA-Sil®) [9-11], or bare silica [12-19] were also reported to perform lipids analysis. Bare silica remains the preferred stationary phase to separate non-polar, neutral and polar lipids from many classes in the same chromatographic analysis. Gradient elution allows handling the huge polarity range of lipids from the non-polar sterol esters to the partially hydro-soluble phospholipids [7, 10, 11, 16, 18-21]. Applications have been also developed with SFC. Several separations of lipid classes were developed using HPLC or more specific SFC columns such as C18 columns [22-27], bare silica [23], diol [28], ethylpyridine [27-29] and silver ion [22, 30]. Applications have been described for the separation of polar lipid classes from glycerolipids to lysophospholipids [28, 29, 31] but also for less polar lipid classes such as triglycerides (TG) [24-26, 30], fatty acid methyl esters (FAMES) [23] and fatty acids (FA) [22, 27]. Concerning the separation of lipid class from steryl esters to lysophosphocholines, Lisa and al. published recently an Ultra High-Pressure SFC coupled to an electrospray ionisation mass spectrometry method for the separation of 24 lipid classes (including the polar and non-polar lipids) in less than 6 minutes [32].

The solubilisation of lipid classes requires the use of a mixture of several solvents, among them chloroform which is mostly designated as solvent of lipids. Moreover, organic solvents traditionally used in NPLC, i.e. n-heptane, dichloromethane, tetrahydrofuran (THF), etc., although well performing are raising different problems due to their original source, i.e. fossil hydrocarbons, volatility and toxicity for humans and environment. One of the ways to avoid such solvents is the substitution with alternative solvents, as proposed by various players in green chemistry. The interest raised by these solvents, is promising in terms of reduction of solvent use with a significant environmental impact. In a previous work, an evaluation of alternative solvents to n-heptane and chloroform was performed for lipid classes separation from non-polar cholesteryl ester to highly polar phospholipids by NPLC coupled to an evaporative light-scattering detection (ELSD) [33]. This work shows that conventional solvents can be advantageously replaced by hexamethyldisiloxane (HMDS), cyclopentyl methyl ether (CPME), isoamyl or isopentyl acetate (IA) and 2-methyltetrahydrofurane (2-MeTHF). Aside

from offering a different selectivity, the gradients composed by one or both alternative solvents gave efficient and comparable or even better separations than those obtained with conventional solvents.

As described above, the use of CO₂ could also be an alternative to NPLC and conventional solvents such as alkanes or chlorinated solvent. CO₂ possesses properties similar to petrochemical hydrocarbons. The modulation of its density allows to vary the eluting strength of the CO₂: from pentane to dichloromethane [4, 34]. It possesses a good miscibility with polar and non-polar solvents such as alcohols and alkanes [35] which makes it an ideal solvent for the separation of lipids. To elute more polar compounds, CO₂ is typically used with a polar solvent modifier. Polar lipid analysis by SFC is performed with CO₂ and a percentage of modifier solvent, typically methanol. This solvent is highly flammable and toxic for human. It could be substituted by ethanol, which represents a greener alternative. However, ethanol was not the best candidate to replace methanol because of its higher viscosity, increasing peak widths and much longer analysis times [36]. According to the results obtained in NPLC, CPME, IA and 2-MeTHF are evaluated as substitute of methanol for lipid analyses by SFC.

Ideally, chemical properties of alternatives solvent should be similar to methanol. It should be noted that they are not available in HPLC grade and they have never been used as modifier solvent in SFC for lipid classes analysis. In a first step, compatibility of alternative solvents with SFC system will be evaluated. The second step will consist of an evaluation of selectivity in terms of separation of lipid between common organic solvents and alternative solvents.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Methanol (HPLC-Plus, $\geq 99,9\%$), ethanol (HPLC-Plus, $\geq 99,9\%$) and 2-propanol (HPLC-Plus, $\geq 99,5\%$) were purchased from Carlo Erba Reagent (Val de Reuil, France). Methanol was stabilized with 200ppm of ethanol. All alternative solvents were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France): IA was Reagent grade 98 %; CPME was Reagent Plus grade $\geq 99.5\%$ and 2-MeTHF was Reagent Plus grade $\geq 99.9\%$. CPME and 2-MeTHF were stabilized respectively with 50 ppm and 150 - 400 ppm of butylated hydroxytoluene (BHT) to limit formation of peroxides. The solvents were used without a prior distillation step.

Standards of lipids were purchased from Sigma. The following standards were used during the development method: Cholesteryl palmitate (CE); Glyceryl tripalmitate (TG₁); Glyceryl tristearate (TG₂); Glyceryl triarachidate (TG₃); 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG) and

1-stearoyl-rac-glycerol (MG); Stigmasterol (ST), Cholesterol (CO) Palmitic acid (FA), methyl stearate (FAME), L- α -phosphatidylethanolamine (PE) and L- α -phosphatidylcholine (PC). CE was 98% grade. ST were approximately 95 % grade. Others standards were 99 % grade. Ipriflavone (98% grade) was purchased from TCI and warfarin (97% grade) was purchased from Sigma-Aldrich.

2.2 Sample preparation

Lipids standards were stored in a n-heptane/chloroform (1:1) mixture, at a concentration of 5 mg/mL. Prior their analyses, standards were evaporated to dryness under nitrogen gas at room temperature. Standards were dissolved in methanol prior to analysis at a concentration of ca. 0.250 μ g/mL during the development method.

2.3 Apparatus

A Berger Instruments supercritical fluid chromatograph SFC FCM-1200 supplied by METTLER TOLEDO AutoChem (Viroflay, France) was used. A dual-pump fluid control module delivered carbon dioxide and modifier. Column outlet pressure was controlled with the backpressure regulator and injections were made using a Rheodyne Model 7413 valve with a 5 μ L internal loop. The injector was air actuated to enable a 4-s injection. The column temperature was controlled with a GC oven Hewlett Packard 5850, series II gas chromatograph (Agilent, France).

It was equipped with two detectors: a DDL 31 ELSD (Eurosep, Cergy, France) and a Hewlett Packard 1050 multi-wavelength photodiode array detector (DAD) (Agilent, France). Prior entering the UV detector, column effluent was split via a T piece placed between the column outlet and the UV detector in order to connect the ELSD. The T piece was connected to the ELSD with a linear restrictor (25 μ m I.D. deactivated fused silica capillary tubing from CIL Cluzeau, Sainte Foy la Grande, France) for transferring ca. 10% of column effluent to the ELSD, and to the diode array UV detector (ca. 90% of column effluent). Berger 3D SFC ChemStation was used for system control and acquisition of detectors signals. The mobile phase was 4.5 grade carbon dioxide from Messer France (Asnieres). The backpressure regulator of the SFC-FCM 1200 was placed downstream the UV detector and controlled the overall pressure in the system. The fixed restrictor controlled the mobile phase flow rates entering in the ELSD; thus, the restrictor controlled the flow rate ratio between the two detectors. To improve the ELSD response, an addition of ethanol in post-column conditions was used. A T piece connected to the linear restrictor and to a HPLC X-LC™ pump (Jasco, France) for

addition of ethanol prior to entering the nebulizer was used. Flow-rate was set to 0.35mL/min. The ELSD drift tube was set at 50°C. The nebulizer was set at 35°C and air pressure at 2.0 bars.

Evaluation of the alternative solvents was performed under constant conditions of outlet pressure and temperature (150 bar and 50°C). The flow-rate was set at 1.0mL/min. The mobile phase was composed of CO₂:modifier (95:5, %/%). Modifiers tested were: methanol, ethanol, 2-propanol, IA, CPME and 2-MeTHF. Three phases were used: a Princeton SFC 2-ethylpyridine (EP) column (4.6 x 100 mm; 5µm), a Princeton SFC Diol column (3.0 x 100 mm; 3µm) (Princeton Chromatography) and a Kinetex Core-shell™ C18 (4.6 x 150 mm; 2.6 µm) (Phenomenex).

Non-polar lipid analyses were performed under constant conditions of outlet pressure and temperature (180 bar and 60°C). The global flow-rate was set at 2.0mL/min. The separation was performed on a Kinetex Core-shell™ C18. Gradient modifier started with 10% modifier (1.5 min) to 20% modifier (8min) with a slope of 20%/min. Modifiers evaluated were methanol, IA, CPME and 2-MeTHF.

3. Results and discussion

The replacement of hazardous solvents by alternative solvents is one of the way used to make analytical method greener [3]. In the literature, CPME and 2-MeTHF are designated as green solvents [37-39]. IA and 2-MeTHF are provided by renewable resources (biofuel, corncobs, bagasse) [40-42] or obtained by green synthesis [43-45]. CPME and 2-MeTHF present a limited toxicity for human and environment [46, 47]. In a previous work, those alternative solvents were used to replace chloroform for the separation of lipid classes by NPLC-ELSD. IA, CPME and 2-MeTHF possess similar properties to chloroform and offered higher eluting strength [33].

IA, CPME and 2-MeTHF have never been used as polar modifier in SFC. To evaluate their compatibility, behaviour of alternatives solvents was compared to short-chain alcohols, which are most commonly used in SFC. Physico-chemical properties of conventional and alternative solvents are presented in the table VI.1.

In SFC, the influence of solute-mobile phase interaction is due either to a change in fluid density or to the particular properties of the modifier (dielectric constant, surface tension or solubility parameter). Alternative solvents possess slightly higher density than short-chain alcohols. This difference could have an impact on the variation of fluid density and had to be considered. Alternative solvents viscosity is displayed in a range from methanol and ethanol. Surface tension is similar for alcohols and alternative solvents. The main difference between

those solvents is the polarity and the interactions developed. Octanol/water partition coefficient ($\text{Log}P_{o/w}$), dielectric constant and solubility parameters values show that IA, CPME and 2-MeTHF possess lower eluting strength than short-chain alcohol.

To evaluate the selectivity of the different solvents, dispersive (δ_d), dipole-dipole (δ_n) and hydrogen bonding (δ_h) interactions were compared. Those values were not available for CPME and 2-MeTHF. As those solvents possess similar properties respectively with diethyl ether and tetrahydrofuran, their behaviours were extrapolated from diethyl ether and THF values. δ_d interactions developed by alcohols and alternative solvents are similar. δ_n values are different for each solvent. No clear pattern emerges. As expected from their chemical formula, δ_h values for alcohols are much higher than those of alternative solvents. Alternative solvents are poorer hydrogen bond donor in comparison with alcohols; this should have consequences on chromatographic retention and selectivity.

In order to evaluate the capacity of alternative solvents as modifier for SFC, the compatibility of alternative solvents and stationary phases or CO_2 had to be assessed. A screening of three analytical stationary phases was performed: diol, EP and C18.

3.1. Compatibility between alternative solvents and stationary phases

The compatibility with alternative solvents was measured by monitoring the variation of retention factor (k) values of target compound (ipriflavone) as a function of percentage modifier. Results were compared with those obtained with conventional solvents (methanol, ethanol and 2-propanol).

3.1.1. Diol column

Chromatograms are presented in the figure VI.1. Profiles obtained were different for conventional and alternative solvents. The use of alcohols as modifier showed a good efficiency excepted for 2-propanol. The peak asymmetry was estimated at 1.01 for methanol (Figure VI.1.A), 0.89 for ethanol (Figure VI.1.B) and 0.53 for 2-propanol (Figure VI.1.C). In comparison, alternative solvents gave abnormal peak shape. Peak height values are considerably lower. According to these results and considering the lower eluting strength of alternative solvents, it could be possible that target compound was not eluted. Thus, analysis time was increased from 5 to 30 minutes. Chromatograms obtained were strictly the same that those obtained in 5 minutes. No other peak was detected. A flush of the column using methanol was also performed and no peak was observed.

Table VI.1: Physical and chemical properties of alternative and conventional solvents.

Parameters	Methanol [48, 49]	Ethanol [48, 49]	2-propanol [48, 49]	IA [48, 49]	CPME[50]	2-MeTHF[50]	Diethyl ether [48, 49]	THF [48, 49]
Molecular weight g/mol	32.04	46.07	60.09	130.20	100.16	86.14	74.12	72.11
Boiling point °C	64.10	78.30	82.10	142.50	106.00	80.00	34.5	66
Density g/ml (20 °C)	0.792	0.789	0.786	0.87	0.86	0.85	0.7135	0.888
Solubility in water %w/w (20 °C)	∞	∞	∞	~0.20	1.10	14.00	6.896	∞
Viscosity cP 20°C	0.54	1.20	2.37	0.87	0.55	0.60 (25°C)	0.242	0.55
Surface tension dyne/cm	22.95	22.31	21.74	24.7	25.17	unknown	17.1	26.4
Vapour pressure hPa (20°C)	123	59	42	6.00	59.90 (25°C)	unknown	563	170
log P _{o/w}	-0.82	-0.32	0.05	2.13	1.41	0.82	1.1	0.46
Dielectric constant (20°C)	32.70 (25 °C)	24.55 (25 °C)	19.92 (25 °C)	4.80	4.76	6.97	4.24	7.35
Solubility parameter cal ^{1/2} .cm ^{-3/2}	14.50	13	11.5	8.4	8.4	9.5	7.4	9.1
δ _d	7.42	7.7	7.7	7.5	unknown	unknown	7.7	9.5
δ _n	6	4.3	3	1.5	unknown	unknown	7.1	8.2
δ _h	10.9	9.5	8	3.4	unknown	unknown	1.4	2.8
Stabilisation	200 ppm of ethanol	-	-	-	50 ppm of BHT	150-400 ppm of BHT	-	-

Another possibility concerned a lack of ELSD detection. Injection of target compound was performed without analytical column. Chromatograms showed the elution of a compound at the delay volume of the system, which presents a peak height near to 600mV. As described above, alternative solvents do not develop hydrogen bond (Table VI.1). The repartition of the solute between the mobile and stationary phase was not homogeneous. Moreover, on the diol column, the retention was based on two different types of sites of interaction: residual silanols and diol. The fact that our solvents are not strong hydro bond donor could probably explain the distortion of the peak on this column. According to these results, alternative solvents didn't provide interesting results with diol column.

3.1.2. EP column

Experiments performed with EP column showed that the column was compatible with alternative solvents in terms of asymmetry and efficiency. An evaluation of the impact of the percentage and nature of the polar modifier on the variation of ipriflavone log k values was performed. Results are presented in the figure VI.2.A.

As also expected from the usual effect of modifiers in SFC, results show that an increase of the modifier percentage lead to a decrease log k values. This behaviour was observed for each solvent tested. The increasing order of eluent strength of CO₂-modifier on EP column was:

IA <CPME <2-MeTHF <2-Propanol <Ethanol <Methanol

This order was only effective for a percentage of modifier higher than 2%. Indeed, CO₂:2-propanol fluid possessed a lower elution strength than CO₂:2-MeTHF and CO₂:CPME for a modifier percentage lower than 2%. For higher percentage of modifier, the eluting strength of alternative solvents was always lower than that of conventional solvents. On this column, elution time of lipid classes could be longer with alternative solvent than alcohols.

3.1.3. C18 column

Experiments performed with C18 column showed that the column was compatible with alternative solvents in terms of asymmetry and efficiency. A similar evaluation to EP column was performed with C18 column. Results are presented in the figure VI.2.B.

On C18 column, log k values are lower than those observed on EP column for each modifier tested. Alkylation leads to a decreased of log k values in comparison with EP, and even more with diol. Below 7% of modifier, the increasing order of eluent strength of CO₂-modifier was exactly the same with EP column and C18 column. On the contrary, an increase of the modifier percentage caused an evolution of the increase order of solvent elution strength with C18 column. CO₂: modifier composed of 10% modifier showed that the eluent strength of

CO₂:2-MeTHF fluid was comparable to that of CO₂:ethanol fluid. The same tendency was observed for CO₂:CPME and CO₂:2-propanol fluids, their elution strengths were close. IA, CPME and 2-MeTHF might lead to short separation time as much as with alcohols.

Compatibility between alternative solvents and C18 column was the most effective among the tested columns. The diol phase was not adapted in terms of interactions. EP phase presented higher log *k* values in comparison with the C18 column. Thus, the latter was used to evaluate the impact of eluent strength and selectivity of alternatives solvents in SFC.

3.2. Impact of alternative solvents on the retention mechanism on C18 phase

As described above, polar modifier influences the solute-mobile phase interaction. Regardless of the type of modifier used, the higher the percentage of modifier the lower the retention is. According to the percentage of modifier used in our application, the difference of density values between short-chain alcohols and alternative solvents was not sufficient to significantly vary the density of CO₂ fluid-modifier. Thus, in the absence of water and with a C18 column the technique can be assimilated to non-aqueous reversed phase (NARP) and the « linear solvent strength (LSS) » model can be used. In our study, the LSS model was carried out to evaluate the eluting strength of alternative solvents in comparison with conventional solvents.

3.2.1. Evaluation of eluting strength

In the LSS model, the *k* value varies as a function of the polar modifier composition in the mobile phase ϕ . This relationship can be used to quantify the retention characteristics by the following equation 1 [51]:

$$\log k = \log k_w - S\phi \quad (1)$$

where ϕ is the volume-fraction of organic modifier in the SFC mobile, *S* is a constant for a given compound and fixed experimental conditions (other than ϕ), and *k_w* is the (extrapolated) value of *k* for $\phi = 0$ (i.e., CO₂ as mobile phase). The term *S* usually reflects the effect of the polar modifier on retention. It depends on the interactions between the polar modifier and solutes but also the type of stationary phase. The linear relationship was used in a raw approach for this work despite a quadratic relationship was described [5]. Experiments were performed from 1 to 30% modifier for ipriflavone and warfarin. Results are presented in the figure VI.3.

Profile obtained for ipriflavone (Figure VI.3.A) showed that *S* values were much closer than those observed for warfarin (Figure VI.3.B). Under 30% modifier, the increasing order of eluent strength of CO₂-modifier for warfarin was: IA < CPME < 2-MeTHF < 2-propanol

<Ethanol <Methanol. At 1% modifier, CO₂ combined with ethanol or methanol gave similar eluting strength (Figure VI.3.B). On the contrary to ipriflavone, no inversion was observed with warfarin in the range from 10 to 30%. For ipriflavone at 30% modifier, the most eluent fluid was CO₂:2MeTHF. At this percentage, CO₂ combined with IA, CPME, 2-propanol, ethanol or methanol gave similar elution strength. For warfarin, CO₂:CPME and CO₂:IA gave similar eluting strength. CO₂:2MeTHF presented a similar eluent strength as CO₂:ethanol, which was higher than CO₂:2-propanol. For warfarin at 30% modifier, the most eluent fluid was CO₂:methanol.

Therefore, results represent a first approach to study the effect of physico-chemical properties of solvents on the eluting strength. Indeed, profiles obtained were not linear in particular for the lower extremity of ϕ tested (from 0 to 30%). SFC mechanisms of retention are not strictly the same as NARP. According to the elution mechanisms, supercritical CO₂, which is considered as a non-polar solvent, would be considered as the strongest solvent in the mobile phase for a apolar column. His eluting strength should decrease when the polar or moderately polar modifiers are added. But experiments showed an opposite tendency (figure VI.3). When the percentage of modifier increased, log k_w was always decreasing. Even-though this model did not seem entirely appropriate, linear trend lines were used to extrapolate S and log k_w values. Results are presented in the table VI.2.

Table VI.2: log k_w , S, ϕ_0 values obtained for ipriflavone and warfarin with each modifier tested.

	ipriflavone			warfarin		
	log k_w	S	ϕ_0	log k_w	S	ϕ_0
IA	0.501	4.252	0.118	1.016	6.088	0.167
CPME	0.375	3.891	0.096	0.855	5.732	0.149
2-MeTHF	0.311	3.986	0.078	0.659	5.668	0.116
2-propanol	0.257	3.281	0.078	0.480	4.670	0.087
Ethanol	0.219	3.331	0.066	0.339	4.559	0.074
Methanol	0.183	3.226	0.057	0.290	4.764	0.061

Normally, the values of log k_w depend on the weaker solvent in the mobile phase, therefore supercritical CO₂, in fixed experimental conditions. It should not depend on the polar modifier added to the mobile phase. For the two compounds, log k_w values were different for alcohols and alternative solvents. The values obtained with alcohols were close for ipriflavone but not for the warfarin (Table VI.2). For ipriflavone, log k_w values obtained with alternative solvents were higher and different for IA. For warfarin, all the values extrapolated were different. No tendency emerged. In NARP mode, the higher the S values, the higher the eluent strength of mobile phase is. It was found that the S values of alternative solvents were higher

than that of alcohols for the two compounds (Table VI.2). However, alternative solvents presented a lower eluting strength than short-chain alcohol. In order to evaluate the retention between the two compounds for each modifier tested, the following relation could be used (equation 2) [51]:

$$\phi_0 = \log k_w/S \quad (2)$$

with ϕ_0 is the volume percentage of organic phase concentration in the mobile phase by which the retention time times is twice the dead time, which means $\log k = 0$. In NARP mode, the higher ϕ_0 , the more lipophilic is the compound. ϕ_0 showed a significant correlation to the $\text{LogP}_{o/w}$ of compound. $\text{LogP}_{o/w}$ values of ipriflavone and warfarin were respectively 4.39 and 2.7. According to the ϕ_0 values obtained, the opposite tendency was observed for the two compounds. ϕ_0 values were always higher for warfarin for each modifier tested. On C18 column, the presence of modifier in the mobile phase could change the stationary phase solvation state. The adsorbed mobile phase could modify the polarity of the stationary phase (modification of the C18 chain extension and rigidity, penetration of compounds in the stationary phase) and affect the solute-stationary phase interaction (retention and selectivity) [5, 52].

As indicated above, alternative solvents and alcohols do not develop the same type of interactions. Difference of $\log k_w$ values can be caused by the solvent effects and confirm this “raw” approach is just supposed to give some trends. Solvents behaviour is the opposite of to the trend base on NARP mode. To conclude results showed our experiments on the C18 column show similarities with the results obtained with stationary phases used in NPLC and adsorption chromatography, probably owing to interactions with the residual silanol groups of the column [5]. The second part of their evaluation was devoted to their selectivity.

3.2.2. Evaluation of the selectivity

In order to evaluate the selectivity developed by the investigated modifier combined to CO_2 , experiments were performed on a mixture containing ipriflavone and warfarin. Results are presented in the figure VI.4.

It was observed that α values decreased according to the increase of polar modifier percentage. This decrease is related to the eluting strength of solvent. The higher decrease of eluting strength was correlated to the largest decrease of selectivity. Per their eluting strength values; IA, CPME and 2-MeTHF gave higher selectivity variations than the conventional solvents investigated. The use of short-chain alcohols showed a reversal of the elution order at a composition of 5% modifier. This was not observed with alternative solvents in our analyses

conditions. According to those results, alternative solvents behaviour (retention, selectivity) can be very interesting to improve lipid separation.

3.3. Alternative solvents and lipid analysis

The last step was to develop separations of lipid classes by SFC-ELSD using the alternative solvents to replace methanol as modifier. As described above, alternative solvents possess lower eluting strength than short-chain alcohols. To evaluate the limits of lipid elution by alternative solvents, several lipids were injected individually: cholesteryl ester, triglyceride, fatty acids and derivatives, sterol, mono and diglyceride and phospholipids like PE and PC. Elution of CE, TG, FA, FAME, ST was obtained using the three alternative solvents. The others lipid classes were never eluted under constant conditions. Per those results, separations were performed for non-polar lipid classes: steryl ester, triglyceride, fatty acids and derivatives and sterols. Chromatograms are presented in figure VI.5.

All target lipid classes investigated were resolved with enough selectivity to avoid lipid class overlap except with 2-MeTHF and methanol. Differences between chromatograms obtained with methanol and those obtained with alternative solvents were noticeable. The elution order of lipid classes was altered as sterols were eluted before TG₁, FA were eluted before FAME with a CO₂:methanol mobile phase while CO appeared after TG₂ and FA appeared after FAME using alternative solvents; solutes-solvent interactions developed by methanol are thought to be different. Interestingly, IA, CPME and 2-MeTHF gave the same order of lipid classes' elution. Thus, CPME and IA appeared as a valuable alternative to methanol as CO₂:methanol fluid did not resolved all lipids investigated. 2-MeTHF, which presents a higher eluting strength than the other alternatives, did not permit to resolve CO and TG₃ but offered a faster separation than methanol, CPME and IA. Resolution (Rs) data are reported in table VI.S1 (see supplementary data). In order to provide a practical assessment of the corresponding chromatograms, the time corrected resolution criterion t_{ne} was calculated for each of them. This criterion allowed to take into account the analysis duration and the Rs values. The values of t_{ne} were obtained from the equation 3 [53]:

$$t_{ne} = t_{max}/R_{Smin}^2 \quad (3)$$

where t_{max} is the retention time of the last eluted solute and R_{Smin} , the minimum peak resolution (or Rs calculated for the most critical pair of peaks). IA and CPME gave comparable separations according to the t_{ne} values (Table VI.S1). Separation obtained with 2-MeTHF and methanol were less effective than the others. IA provided the most favourable t_{ne} result and offered a quasi-ideal selectivities and Rs for the lipid classes investigated. Whatever is the

alternative solvent in use, it can be concluded these conditions appeared satisfactory and offer more flexibility to adapt the chromatographic conditions to non-polar lipid analysis than methanol.

4. Conclusion

CPME, 2-MeTHF and IA were found to be compatible with SFC-ELSD. The commercial unavailability of convenient purity grade solvents has not been a barrier to the development of lipid separation. Preliminary screening (stationary phases) showed that alternative solvents do not enable an efficient separation on diol column. Interactions developed by CPME, IA and 2-MeTHF were not adapted to the retention mechanism of diol column. Results obtained with EP and C18 columns were similar, C18 column was selected for lipid separation because of lower k values than EP column. CPME, IA and 2-MeTHF possess lower eluting strength than methanol. They permitted to separate non-polar lipids such as triglycerides, fatty acid, steryl ester and sterol according to their hydrophobicity. Alternative solvents selectivity also allowed to resolve all the lipids standards investigated with modifier gradient using CPME and IA compared to 2-MeTHF and methanol. Elution of polar lipids, such as phospholipids, was not possible with alternative solvents. The association of alternative solvents and methanol, in a modifier gradient, could be able to separate lipids from steryl ester to phospholipids.

Acknowledgment

Nolwenn Prache PhD Thesis is funded by a grant of Region Ile de France, DIM Analytics.

Supplementary data

Table VI.S1: R_s and t_{ne} values of lipid standards for each composition of mobile phase (CO_2 :modifier).

Modifier	CPME	IA	2-MeTHF	Methanol
FAME	-	-	-	-
FA	1.92	1.92	1.97	1.36
TG ₁	2.94	2.50	1.71	3.62
ECO	2.70	2.02	2.11	2.95
TG ₂	3.41	2.36	2.15	3.20
CO	2.62	2.36	2.17	1.07
TG ₃	1.79	2.56	1.06	3.88
t_{ne} (min)	1.50	1.12	3.34	3.82

References

- [1] F.M. Kerton, R. Marriott, *Alternative solvents for green chemistry*, Royal Society of chemistry, 2013.
- [2] J. Plotka, M. Tobiszewski, A.M. Sulej, M. Kupska, T. Gorecki, J. Namiesnik, *Green chromatography*, *Journal of Chromatography A*, 1307 (2013) 1-20.
- [3] C.J. Welch, N. Wu, M. Biba, R. Hartman, T. Brkovic, X. Gong, R. Helmy, W. Schafer, J. Cuff, Z. Pirzada, *Greening analytical chromatography*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 667-680.
- [4] G. Guiochon, A. Tarafder, *Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography*, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 1037-1114.
- [5] E. Lesellier, C. West, *The many faces of packed column supercritical fluid chromatography - A critical review*, *Journal of Chromatography A*, 1382 (2015) 2-46.
- [6] K.C. Arnoldsson, P. Kaufmann, *Lipid class analysis by normal phase high performance liquid chromatography, development and optimization using multivariate methods*, *Chromatographia*, 38 (1994) 317-324.
- [7] J.S. Perona, V. Ruiz-Gutierrez, *Quantification of major lipid classes in human triacylglycerol-rich lipoproteins by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection*, *Journal of Separation Science*, 27 (2004) 653-659.
- [8] C. Silversand, C. Haux, *Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids*, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 703 (1997) 7-14.
- [9] W.W. Christie, R. Anne Urwin, *Separation of lipid classes from plant tissues by high performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases*, *Journal of High Resolution Chromatography*, 18 (1995) 97-100.
- [10] F.S. Deschamps, P. Chaminade, D. Ferrier, A. Baillet, *Assessment of the retention properties of poly(vinyl alcohol) stationary phase for lipid class profiling in liquid chromatography*, *Journal of Chromatography A*, 928 (2001) 127-137.
- [11] J. Nordbäck, E. Lundberg, W.W. Christie, *Separation of lipid classes from marine particulate material by HPLC on a polyvinyl alcohol-bonded stationary phase using dual-channel evaporative light-scattering detection*, *Marine Chemistry*, 60 (1998) 165-175.
- [12] W.W. Christie, *Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection*, *Journal of Lipid Research*, 26 (1985) 507-512.
- [13] W.W. Christie, *Separation of lipid classes by high-performance liquid chromatography with the "mass detector"*, *Journal of Chromatography A*, 361 (1986) 396-399.
- [14] W.W. Christie, W.R. Morrison, *Separation of complex lipids of cereals by high-performance liquid chromatography with mass detection*, *Journal of Chromatography A*, 436 (1988) 510-513.
- [15] F.D. Conforti, C.H. Harris, J.T. Rinehart, *High-performance liquid chromatographic analysis of wheat flour lipids using an evaporative light scattering detector*, *Journal of Chromatography A*, 645 (1993) 83-88.
- [16] M. Graeve, D. Janssen, *Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: Application to exceptional marine lipids*, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 1815-1819.
- [17] R. Homan, M.K. Anderson, *Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection*, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 708 (1998) 21-26.
- [18] L.M. Rodriguez-Alcala, J. Fontecha, *Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction*, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3063-3066.
- [19] T. Seppänen-Laakso, I. Laakso, H. Vanhanen, K. Kiviranta, T. Lehtimäki, R. Hiltunen, *Major human plasma lipid classes determined by quantitative high-performance liquid chromatography, their variation and associations with phospholipid fatty acids*, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 754 (2001) 437-445.

- [20] L. Chamorro, A. Garcia-Cano, R. Busto, J. Martinez-Gonzalez, A. Albillos, M.A. Lasuncion, O. Pastor, Quantitative profile of lipid classes in blood by normal phase chromatography with evaporative light scattering detector: Application in the detection of lipid class abnormalities in liver cirrhosis, *Clinica Chimica Acta*, 421 (2013) 132-139.
- [21] D.G. McLaren, P.L. Miller, M.E. Lassman, J.M. Castro-Perez, B.K. Hubbard, T.P. Roddy, An ultraperformance liquid chromatography method for the normal-phase separation of lipids, *Analytical Biochemistry*, 414 (2011) 266-272.
- [22] I. Francois, P. Sandra, Comprehensive supercritical fluid chromatography x reversed phase liquid chromatography for the analysis of the fatty acids in fish oil, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4005-4012.
- [23] Y. Hirata, I. Sogabe, Separation of fatty acid methyl esters by comprehensive two-dimensional supercritical fluid chromatography with packed columns and programming of sampling duration, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (2004) 1999-2003.
- [24] 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, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113 (2011) 262-268.
- [25] E. Lesellier, J. Bleton, A. Tchaplá, Use of Relationships between Retention Behaviors and Chemical Structures in Subcritical Fluid Chromatography with CO₂/Modifier Mixtures for the Identification of Triglycerides, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 2573-2580.
- [26] E. Lesellier, A. Tchaplá, Retention Behavior of Triglycerides in Octadecyl Packed Subcritical Fluid Chromatography with CO₂/Modifier Mobile Phases, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 5372-5378.
- [27] S. Qu, Z. Du, Y. Zhang, Direct detection of free fatty acids in edible oils using supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry, *Food Chemistry*, 170 (2015) 463-469.
- [28] H.S.H. Yip, M. Ashraf-Khorassani, L.T. Taylor, Feasibility of Phospholipids Separation by Packed Column SFC with Mass Spectrometric and Light Scattering Detection, *Chromatographia*, 65 (2007) 655-665.
- [29] T. Uchikata, A. Matsubara, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba, Development of oxidized phosphatidylcholine isomer profiling method using supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1250 (2012) 205-211.
- [30] P. Sandra, A. Medvedovici, Y. Zhao, F. David, Characterization of triglycerides in vegetable oils by silver-ion packed-column supercritical fluid chromatography coupled to mass spectroscopy with atmospheric pressure chemical ionization and coordination ion spray, *Journal of Chromatography A*, 974 (2002) 231-241.
- [31] T. Yamada, T. Uchikata, S. Sakamoto, Y. Yokoi, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba, Supercritical fluid chromatography/Orbitrap mass spectrometry based lipidomics platform coupled with automated lipid identification software for accurate lipid profiling, *Journal of Chromatography A*, 1301 (2013) 237-242.
- [32] M. Lisa, M. Holcapek, High-throughput and comprehensive lipidomic analysis using ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 87 (2015) 7187-7195.
- [33] N. Prache, S. Abreu, P. Sassi, D. Thiebaut, P. Chaminade, Alternative solvents for improving the greenness of normal phase liquid chromatography of lipid classes, *Journal of Chromatography A*, 1464 (2016) 55-63.
- [34] T.A. Berger, *Packed column SFC*, Royal society of chemistry, 1995.
- [35] T.A. Berger, Separation of polar solutes by packed column supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 785 (1997) 3-33.
- [36] L. Novakova, A.G.-G. Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guillarme, Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2 μ m particles: a tutorial, *Analytica chimica acta*, 824 (2014) 18-35.
- [37] M.J.C. Molina, R. Mariscal, M. Ojeda, M.L. Granados, Cyclopentyl methyl ether: A green co-solvent for the selective dehydration of lignocellulosic pentoses to furfural, *Bioresource technology*, 126 (2012) 321-327.
- [38] M. Nardi, G. Sindona, P. Costanzo, M. Oliverio, A. Procopio, Eco-friendly stereoselective reduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds by Er (OTf) ₃/NaBH₄ in 2-MeTHF, *Tetrahedron*, 71 (2015) 1132-1135.

- [39] S.-J. Tenne, J. Kinzel, M. Arlt, F. Sibilla, M. Bocola, U. Schwaneberg, 2-Methyltetrahydrofuran and cyclopentylmethylether: Two green solvents for efficient purification of membrane proteins like FhuA, *Journal of Chromatography B*, 937 (2013) 13-17.
- [40] R. Aul, B. Comanita, A green alternative to THF, *Manuf. Chemist*, May, (2007) 33-34.
- [41] Y. Gu, F. Jérôme, Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013) 9550-9570.
- [42] INRS, ED4230 - Les agrosolvants (2015).
- [43] S.H. Krishna, S. Divakar, S.G. Prapulla, N.G. Karanth, Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucormiehei*, *Journal of Biotechnology*, 87 (2001) 193-201.
- [44] S.n. Torres, M.D. BaigorÃ-, S.L. Swathy, A. Pandey, G.R. Castro, Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase, *Food Research International*, 42 (2009) 454-460.
- [45] A. Wolfson, D. Saidkarimov, C. Dlugy, D. Tavor, Green synthesis of isoamyl acetate in glycerol triacetate, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 2 (2009) 107-110.
- [46] V. Antonucci, J. Coleman, J.B. Ferry, N. Johnson, M. Mathe, J.P. Scott, J. Xu, Toxicological assessment of 2-methyltetrahydrofuran and cyclopentyl methyl ether in support of their use in pharmaceutical chemical process development, *Organic Process Research & Development*, 15 (2011) 939-941.
- [47] K. Watanabe, The toxicological assessment of cyclopentyl methyl ether (CPME) as a green solvent, *Molecules*, 18 (2013) 3183-3194.
- [48] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Chromatographie en phases liquide et supercritique*, Masson Paris 1991.
- [49] V. Sedivec, J. Flek, *Handbook of analysis of organic solvents*, E. Horwod; Wiley, 1975.
- [50] K. Watanabe, N. Yamagiwa, Y. Torisawa, Cyclopentyl methyl ether as a new and alternative process solvent, *Organic Process Research & Development*, 11 (2007) 251-258.
- [51] C.M. Du, K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds, M.H. Abraham, Rapid gradient RP-HPLC method for lipophilicity determination: A solvation equation based comparison with isocratic methods, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 4228-4234.
- [52] C. West, E. Lesellier, A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1191 (2008) 21-39.
- [53] P.J. Schoenmakers, *Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development*, Elsevier, 1986.

Figures

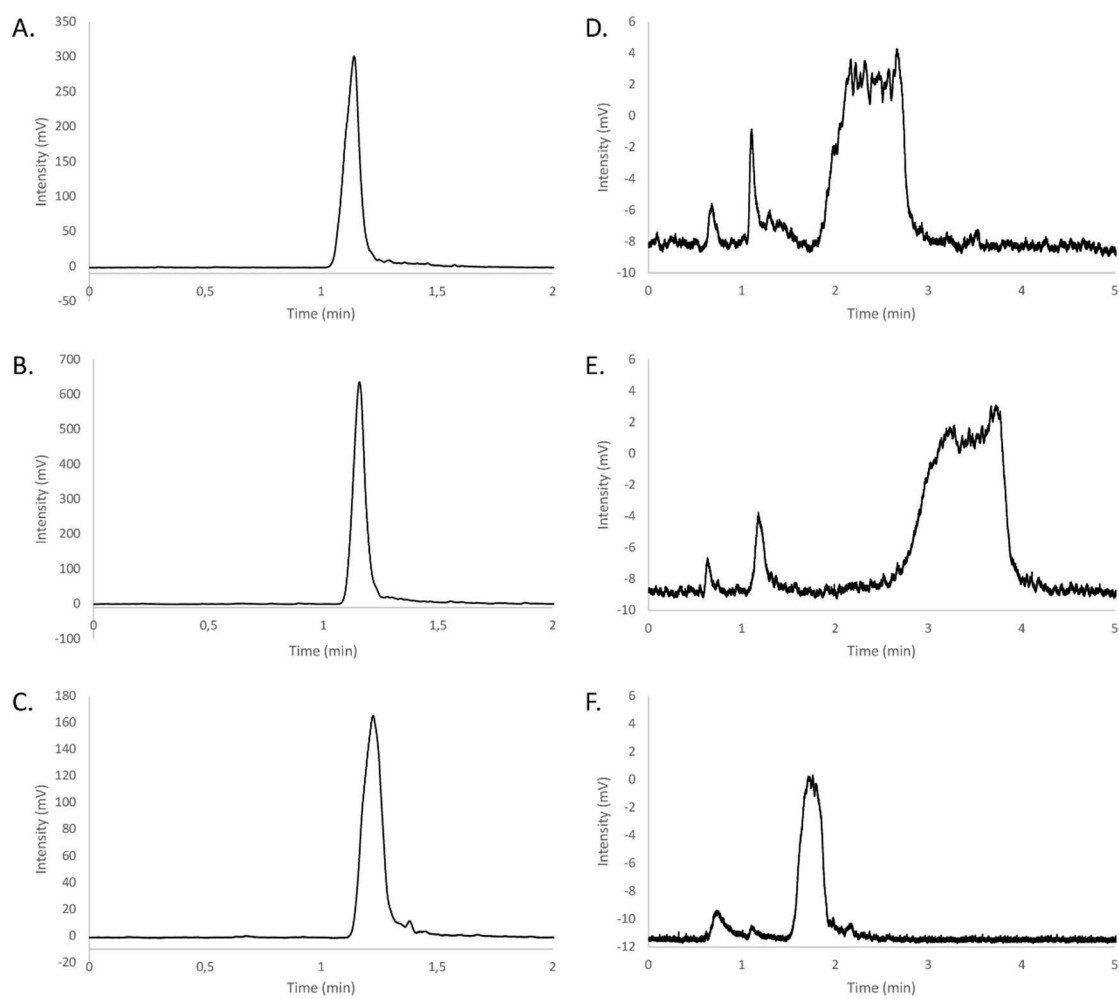


Figure VI.1: Chromatographic profile of ipriflavone elution on a Princeton SFC Diol column (3.0 x 100 mm; 3 μm). SFC conditions: flow-rate 1 mL/min, outlet pressure 150 bar, column temperature 50°C, mobile phase: CO₂:modifier (95:5, %:%). Modifiers were: methanol (A), ethanol (B), 2-propanol (C), 2-MeTHF (D), CPME (E) and IA (F).

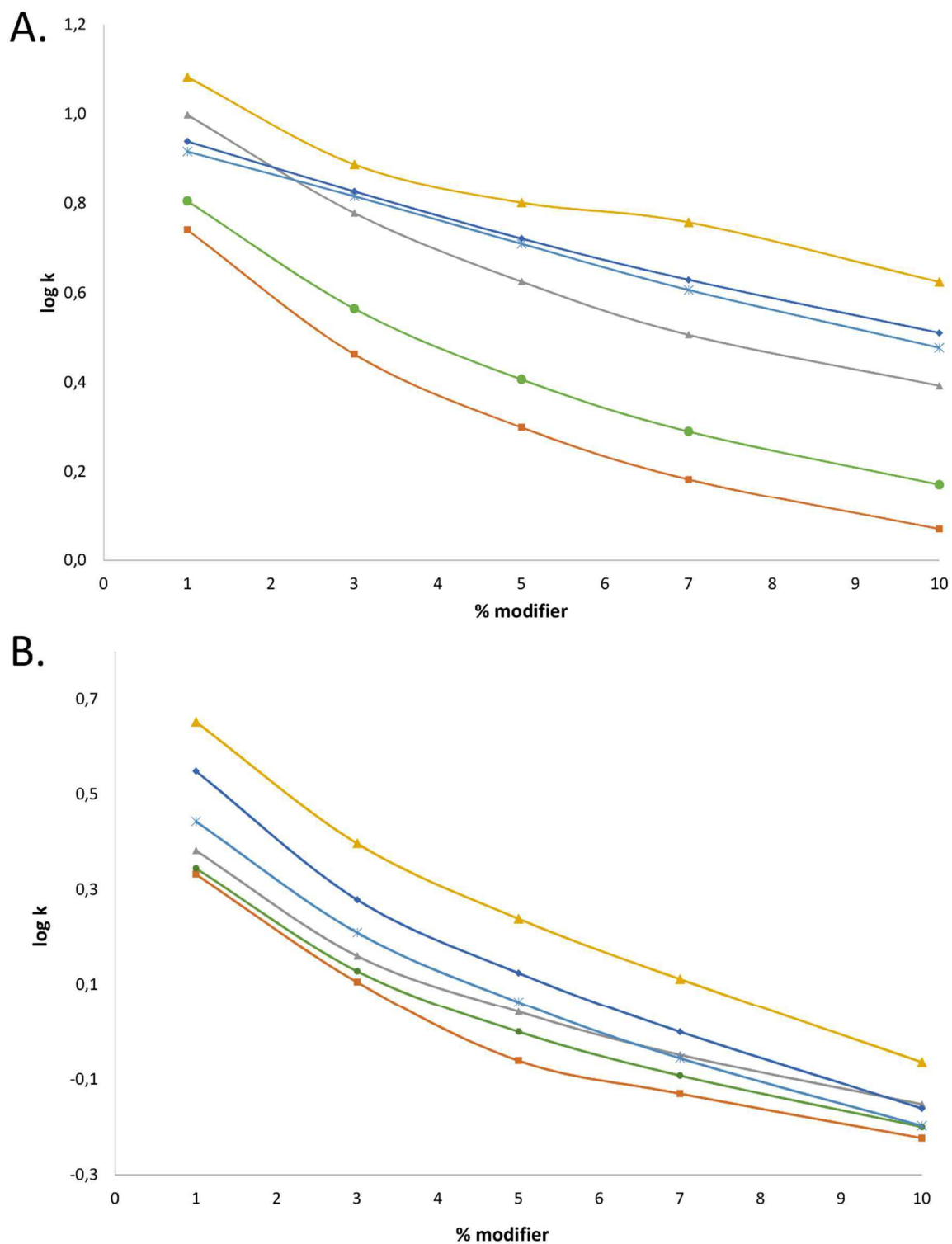


Figure VI.2: Impact of modifier proportion on the variation of $\log k$ values on a 4,6 x 100 mm Princeton SFC 2-ethylpyridine 5µm column (VI.2.A) and a 4,6 x 150 mm Kinetex Core-shell™ C18 2,6 µm column (VI.2.B). SFC conditions: flow-rate 1mL/min, outlet pressure 150 bar, column temperature 50°C, mobile phase: CO₂:modifier (95:5, %:%). Modifiers were: methanol (red), ethanol (green), 2-propanol (grey), 2-MeTHF (light blue), CPME (blue) and IA (yellow).

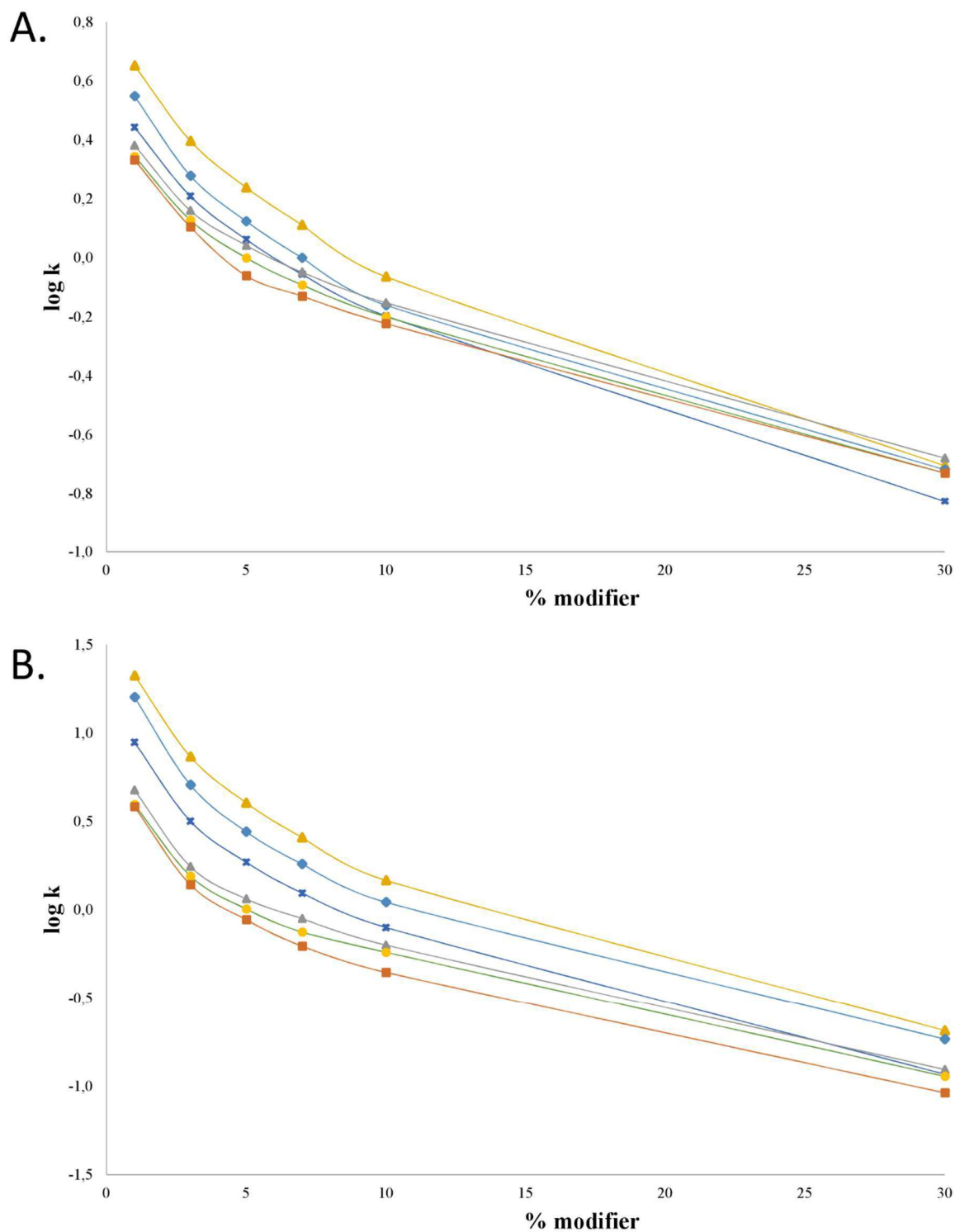


Figure VI.3: Impact of modifier proportion on the variation of log k values of ipriflavone (VI.3.A) and warfarin (VI.3.B) on a 4,6 x 150 mm Kinetex Core-shell™ C18 2,6 μ m column. SFC conditions: flow-rate 1mL/min, outlet pressure 150 bar, column temperature 50°C, mobile phase: CO₂:modifier (95:5, %:%). Modifiers were: methanol (red), ethanol (green), 2-propanol (grey), 2-MeTHF (light blue), CPME (blue) and IA (yellow).

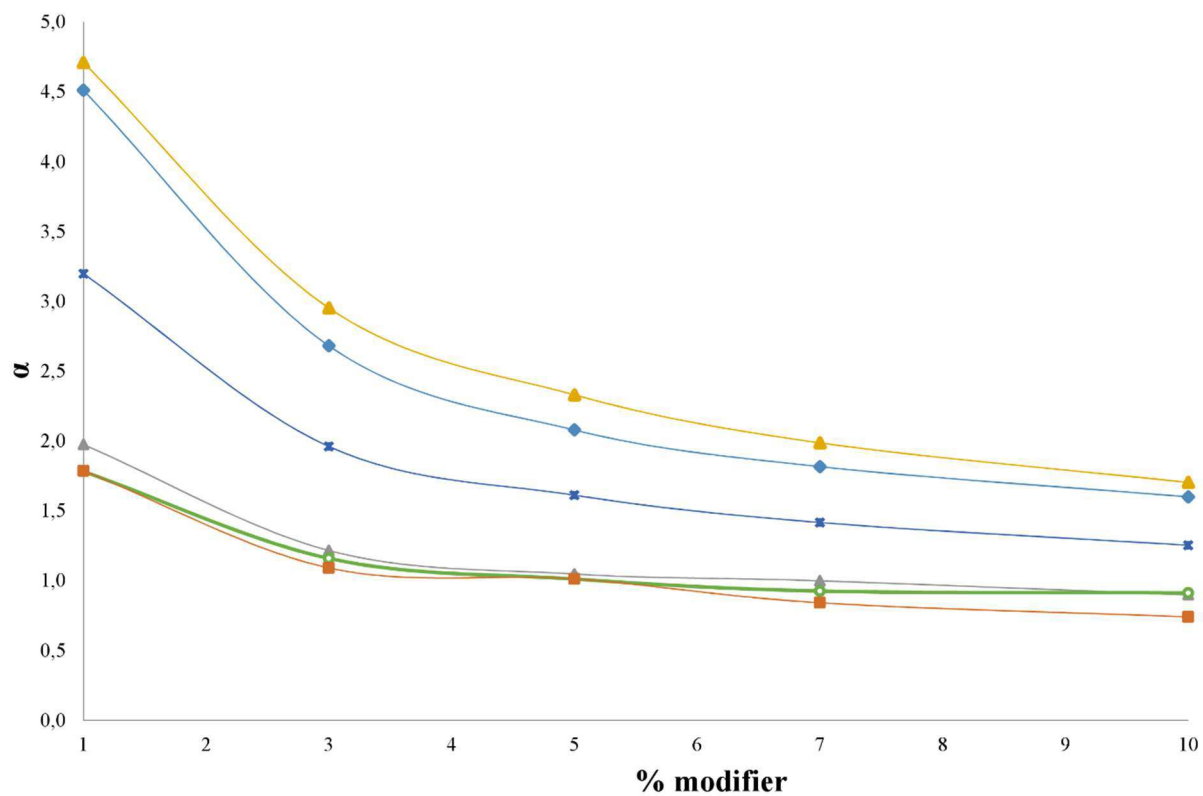


Figure VI.4: Impact of modifier proportion on the variation of α values on a 4,6 x 150 mm Kinetex Core-shell™ C18 2,6 μ m column. SFC conditions: flow-rate 1mL/min, outlet pressure 150 bar, column temperature 50°C, mobile phase: CO₂:modifier (95:5, %:%). Modifiers were: methanol (red), ethanol (green), 2-propanol (grey), 2-MeTHF (light blue), CPME (blue) and IA (yellow).

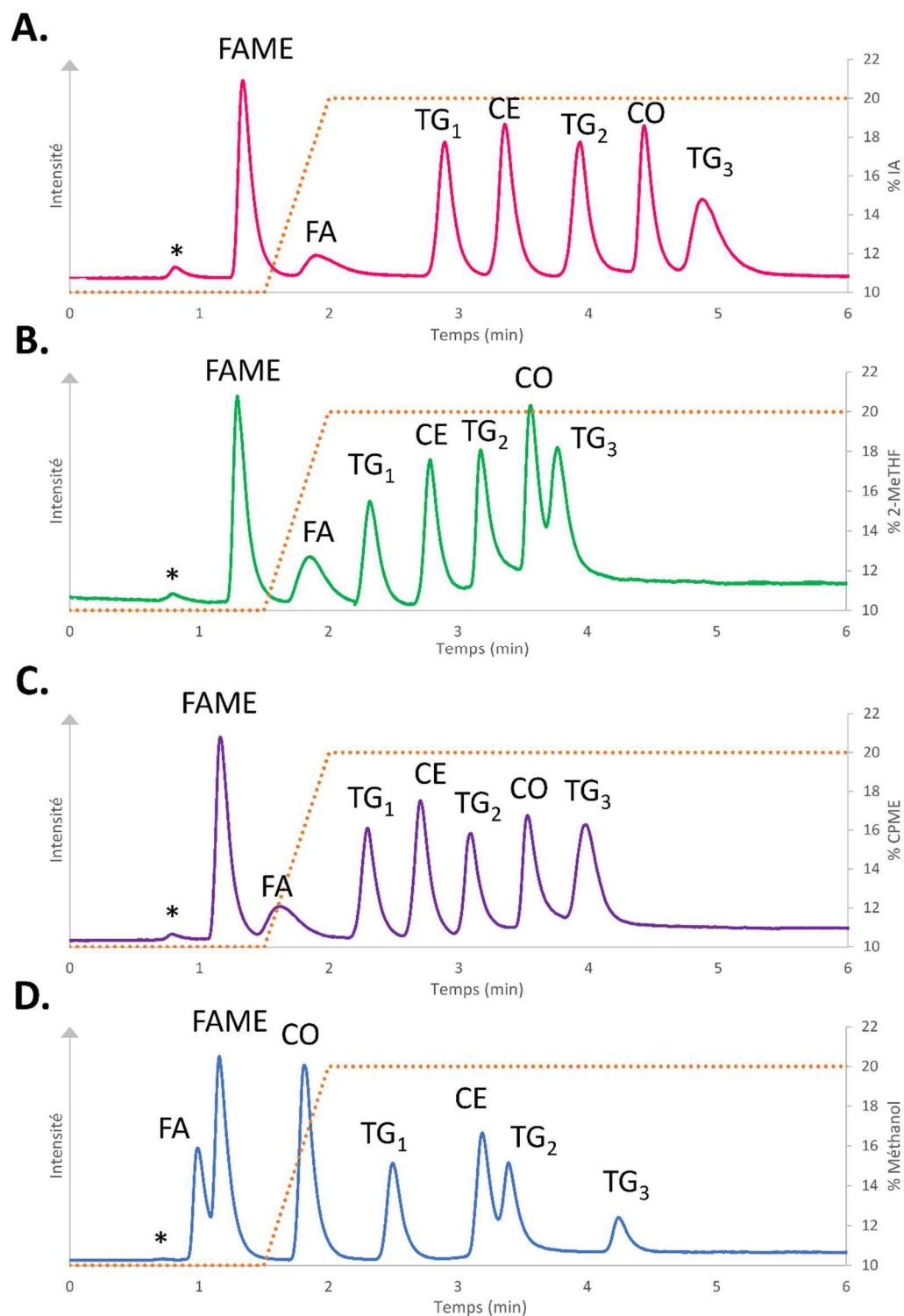


Figure VI.5: SFC chromatograms of the separation of 7 lipids (CE, TG₁, TG₂, TG₃, CO, FA, FAME). SFC conditions: 4.6 x 150 mm Kinetex Core-shell™ C18 2.6 μm, flow-rate 2.0mL/min, outlet pressure 180 bar, column temperature 60°C, gradient modifier started with 10% modifier (1.5 min) to 20% modifier (8min) with a slope of 20%/min. Modifiers evaluated are Methanol (VI.6.D), IA (VI.6.A), CPME (VI.6.C) and 2-MeTHF (VI.6.B). Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG₁), Glyceryl tristearate (TG₂); Glyceryl triarachidate (TG₃); cholesterol (CO), palmitic acid (FA), and methyl stearate (FAME).

CONCLUSION

La SFC est une technique adaptée à l'analyse des lipides. L'utilisation du CO₂ supercritique comme phase mobile permet à cette technique d'être considérée une alternative verte à la NPLC. Afin de permettre l'élution de composés polaire, l'ajout d'un modificateur polaire au CO₂ supercritique est nécessaire. Pour remplacer le méthanol, qui est le modificateur le plus fréquemment utilisé, la compatibilité des solvants alternatifs de milieu de polarité (2-MeTHF, CPME et IA), utilisés en NPLC-ELSD et NPLC-MS, avec la SFC a été évaluée.

Dans un premier temps, différents types de phase stationnaire ont été testés. L'utilisation d'IA, de CPME et du 2-MeTHF avec la colonne diol ne permet pas l'obtention de séparation efficace. La force éluante de ces solvants s'avère insuffisante sur des supports polaires. De toutes les colonnes évaluées, la colonne C18 core-shell s'avère être la plus efficace. Sur la colonne C18, à une composition de plus de 7 %, leur force éluante peut être comparable à celle des solvants conventionnels de SFC. De plus, la sélectivité développée par le CPME, l'IA et le 2-MeTHF semble intéressante pour les classes de lipide les moins polaires.

Appliqués à la séparation de lipides, le CPME, l'IA et le 2-MeTHf permettent l'élution des lipides les moins polaires. Dans nos conditions d'analyses, le CPME et l'IA permettent de séparer l'intégralité des lipides testés contrairement au 2-MeTH et au méthanol. Toutefois, le 2-MeTHF offre une séparation plus efficace que ce dernier. La force éluante des solvants alternatifs ne permet pas l'élution des lipides les plus polaires (phospholipides).

Les perspectives de ce projet concernent l'utilisation des solvants alternatifs associés au méthanol, via un gradient de composition de modificateur, afin de couvrir l'ensemble de la gamme d'élution des lipides (des esters de stérols aux phospholipides). L'éthanol, qui représente une alternative plus verte, pourrait être évalué en tant que substituant du méthanol.

**CHAPITRE VII : MISE EN EVIDENCE ET
CARACTERISATION DES IMPURETES
PRESENTES DANS LES SOLVANTS
UTILISES POUR LA NPLC**

INTRODUCTION

Dans les chapitres IV à VI, nous avons pu mettre en avant les avantages et inconvénients liés à l'utilisation des solvants alternatifs (HMDS, IA, CPME, 2-MeTHF) pour l'analyse de lipides par NPLC-ELSD, NPLC-MS et SFC-ELSD. Ces études ont permis d'évaluer le potentiel de ces solvants en termes de séparation et de sélectivité mais aussi de montrer leurs limites d'utilisation. L'HMDS, l'IA, le CPME et le 2-MeTHF ayant peu ou pas été utilisés en chromatographie, ils ne sont pas disponibles commercialement en qualité HPLC ni en qualité LC-MS. La non disponibilité de qualité suffisante n'est pas un problème majeur pour l'IA, le CPME et le 2-MeTHF, par contre, cela s'avère critique dans le cas de l'HMDS.

Ce solvant présente des impuretés non volatiles perturbant la réponse de l'ELSD (chapitre IV) pouvant être globalement éliminées par une double distillation et d'autres non éliminées par cette étape de purification générant des fragments en NPLC-APCI-MS gênant cette fois-ci l'identification des lipides pour des gammes de m/z allant de 0 à 400. L'HMDS n'est pas disponible en qualité HPLC ou REAGENT grade et est commercialisé avec une pureté de $\geq 98\%$. Compte tenu de ces informations, la présence d'impuretés était prévisible et acceptable.

Ce qui n'est pas le cas des solvants conventionnels (n-heptane, chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol et eau) disponibles en qualité HPLC voir LC-MS utilisés dans les gradients de références utilisés pour évaluer les solvants alternatifs. En effet, la présence régulière de pics systèmes/fantômes lors de la réalisation de gradient ternaire (n-heptane/EA:C (70:30, v:v)/éthanol:eau (95:5, v:v) a été observé. Ces pics sont élués à des temps proches de nos standards lipidiques (TG) voir simplement coélus avec ces derniers (FA, MG, PE, PC) rendant ainsi leur identification et quantification complexe.

Afin de déterminer l'origine de ces composés, le système a été évalué (pompe, injecteur, colonne, verrerie) ainsi que le traitement de l'échantillon. Une évaluation de l'impact des différents solvants a été réalisée afin de déterminer l'origine de la contamination. Une étude large portant sur le n-heptane a été réalisée au travers d'une évaluation de différentes qualités provenant de différents fournisseurs. Enfin une caractérisation des impuretés a été menée par spectroscopie Raman, introduction directe sur un LTQ-Orbitrap et en GC/MS afin de déterminer les caractéristiques de la méthode de purification développée pour éliminer ces impuretés.

Ces travaux sont synthétisés dans une publication qui regroupe les divers aspects présentés ci-dessus, ainsi que l'identification des impuretés présentes dans les solvants commerciaux.

EVIDENCE OF IMPURITIES IN THE SOLVENTS USED FOR NPLC

Authors

Nolwenn Prache ^{a,b}, Sana Tfaili^a, Audrey Solgadi^c, Sonia Abreu ^a, Patrick Sassi^b, Didier Thiébaud^b, Pierre Chaminade ^{a,*}

^a *Lip(Sys)-2, Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92290 Châtenay-Malabry, France.*

^b *UMR 8231 Chimie Biologie Innovation CNRS – ESPCI, LSABM, ESPCI Paris PSL Research University, F-75005 Paris, France*

^c *SAMM, UMS IPSIT, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France*

* *Corresponding author. Tel: +3346835459; Fax: +3346835458*

E-mail address: pierre.chaminade@u-psud.fr

Abstract

In analytical chemistry, the presence of contaminants can be an issue for the analysis and the identification or quantitation of target compounds. The commercial development of solvents qualities adapted to specific techniques (UV, high-pressure liquid chromatography, mass spectrometry) allows to limit the risk of interferences.

In normal phase liquid chromatography, the use of HPLC or LC-MS grade solvents for lipid analysis showed the presence of undesired compounds, coeluting with fatty acids and phospholipids. Experiments permitted to determine the main origin of impurities: n-heptane. Impurities were adsorbed during the equilibration time of the bare silica column and eluted with a ternary gradient. Characterisation of those compounds by gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, Raman spectroscopy and direct infusion on a LTQ-Orbitrap confirmed the presence of fatty acids (palmitic and stearic acids) but also monoglycerides, antioxidative and polymers. Finally, a purification process was evaluated for the elimination of n-heptane' impurities.

Keywords

Normal-Phase Liquid Chromatography; HPLC grade solvents; impurities, lipids

1. Introduction

In analytical chemistry, the purity of solvents has always been a concern, which results in a multiplicity of commercial ranges adapted to different techniques. The modern analytical

chemistry tools lead us to be increasingly demanding, in particular for the LC-MS coupling. However, except for specific contaminants, such as benzene, the quality requirements are limited to non-specific tests (absorbance in the UV, evaporation residue ...) but are, however, more detailed with regard to the presence metals [1, 2]. The inadequacy of these specifications and the need to care about the organic contaminants have been reported in the 1980s [3]. In reversed-phase liquid chromatography, the most frequently implicated source of contaminants is water from purification systems installed in laboratories or contamination during preparation of the mobile phase [4]. However, methanol and acetonitrile are not free from impurities, which are originated from their respective production processes [4, 5].

In a recent study, we focused on alternative solvents to solvents conventionally used in normal phase liquid chromatography (NPLC) [6] for lipid analysis. These solvents, which are not "HPLC-grade", have impurities which may require further purification before use. More surprisingly, the difficulties with these solvents were the same as those encountered with solvents conventionally used in NPLC. The same difficulties were reported by other users: they described the appearance on chromatograms of system peaks or ghost peaks whose intensity in chromatographic profiles [7, 8], obtained with carefully selected solvents from different suppliers and their different qualities, can vary.

n-heptane, a weak solvent used as initial mobile phase gradient in NPLC, was the most critical from this point of view. Therefore, a systematic study of the presence of impurities was initiated for this solvent, regardless of the suppliers or the purity. The characterisation of the main impurities was performed in order to explain the significance of the co-elution between impurities and lipid, for any evaluation of lipid profiles. Moreover, a strategy was also proposed to get rid of the contaminants.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

n-heptane (Chromasolv®, $\geq 99\%$; Chromasolv®, 96%; LC-MS Chromasolv®) was purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). n-heptane (HiperSolv Chromanorm for HPLC) was purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Emsure Reag. Ph EUr, n-heptane for analysis and Uvasol, n-heptane for Spectroscopy were purchased from Merck (France). n-heptane Isocratic HPLC was purchased from Carlo Erba (France). n-heptane 99% HPLC-S was purchased from Biosolve (France). As impurities in n-heptane from different suppliers could be a controversial topic, solvent suppliers and their different qualities are named H_x with x ranging from 1 to 10.

Ethyl acetate (Chromasolv®, LC-MS), ethanol (Chromasolv®, absolute, $\geq 99.8\%$), and dichloromethane were purchased from Sigma Aldrich. HPLC-grade chloroform and water were purchased from VWR International. Chloroform stabilized with 0.6 % ethanol was used instead of amylene stabilized chloroform.

2.2. Sample preparation

Lipid standards were stored in a n-heptane/chloroform (1:1) mixture, at a concentration of 5 mg/mL. Prior to their analyses, standards were evaporated to dryness under nitrogen gas at room temperature. Standards were dissolved in n-heptane prior to analysis at a concentration of ca. 0.25 mg/mL during the development method.

Fractions of impurities were collected manually. Samples were divided in three. First series were analysed by direct infusion on a LTQ-Orbitrap MS. Second series was evaporated by a gentle stream of nitrogen and dissolved in dichloromethane (100 μ l) prior to their analysis by gas chromatography (GC)-MS. For the third series, 5 μ L were deposited on a CaF₂ window for Raman records. Solvents in the deposit were rapidly evaporated, to obtain a dried deposit containing the impurities.

2.3. Apparatus

2.3.1. LC-ELSD applications

2.3.1.1. NPLC-ELSD

The HPLC instrumentation consisted of two Hewlett-Packard HPLC 1050 systems (Agilent, France) and a HPLC X-LC™ system (Jasco, France). One of the two Hewlett-Packard HPLC 1050 pump was connected to a Hewlett-Packard HPLC 1050 or a Rheodyne manual injection valve equipped with a 5 μ L sample loop. Stainless steel was preferred to peek tubing for all the chromatographic instruments connections. Separations were performed on a 150x2.1 mm column packed with 5 μ m Inertsil SIL-150Å (GL Sciences Inc.) supplied by Interchim (Montluçon, France) and a 150x2.0 mm column packed with a 5 μ m Nucleodur-SiOH 100Å (Macherey-Nagel, USA). For all the experiments, the flow rate was set at 0.5 mL/min. The column dead volume (V_0) was 0.49 mL. The columns temperature was set at 40°C with a thermostatically controlled oven (Crococil, Cluzeau, Ste. Foy la Grande, France). Detection was performed with a DDL 31 ELSD (Eurosep, Cergy, France). The drift tube was set at 45°C. The nebulizer was set at 35°C and air pressure at 2.0 bars.

Screening of n-heptane's quality was performed with a binary gradient on the Inertsil SIL-150Å column. Binary gradients started with 100% solvent A to 20% solvent A with a slope of 5%/min. Solvent A was H_x. Solvent B was chloroform.

Ternary gradient was performed using a combination of three solvent mixtures. Solvent A was H_x; solvent B either EA or chloroform or dichloromethane and solvent C was ethanol:water (95:5, v:v). As final step, an eluent composed of A - B mixture (50:50 v/v) was used to flush-out water. The return at 100% solvent A had to be progressive (step from 41 to 51 minutes) to favour the re-equilibration of the column with eluent A prior to the next injection. Equilibration times tested were: 0, 5, 10, 20 and 30 minutes. Table VII.1 presents the solvents program used.

Table VII.1: Ternary gradient composition.

time (min)	%A*	%B**	%C
0	100	0	0
12	88	12	0
13	86	12	2
20	81	16	3
25	70	20	10
30	45	20	35
33	35	30	35
41	50	50	0
51	0	0	0

* A: H_x, ** B: EA or chloroform or dichloromethane, *** C: ethanol:water (95:5, v/v).

2.3.1.2. Pre-concentration and fractionation of impurities

Pre-concentration of n-heptane's impurities was performed on the Nucleodur-SiOH 100Å column under isocratic condition. The HPLC instrumentation consisted of a Hewlett-Packard HPLC 1050 coupled to an ELSD. The flow-rate was set at 0.8mL/min for 1 hour. Ternary gradient elution was used to elute impurities (Table VII.1) trapped on the column. Solvent A was H₁; solvent B was a ethyl acetate:chloroform (EA:C) (70:30, v:v) mixture and solvent C was ethanol:water (95:5, v:v). Prior to their fractionation, retention time (tr) of each impurity was determined by NPLC- ELSD.

2.3.2. LC-APCI-MS

The HPLC instrumentation consisted of a Hewlett-Packard HPLC 1050 pump connected to a X-LC™ 3159AS Intelligent Autosampler (Jasco, France). Separations were performed on the Inertsil SIL-150Å column with a ternary gradient elution (Table VII.1). Solvent A was H_x; solvent B was a EA:C (70:30, v:v) mixture and solvent C was ethanol:water (95:5, v:v). For all the experiments, the flow rate was set at 0.5 mL/min. The column temperature was set at 40°C

with a thermostatically controlled oven. The MS acquisitions were performed on an API 3000 triple quadrupole controlled by Analyst software (ABI Sciex, USA) and equipped with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source operated in negative and positive ion mode. The following parameters were fixed for LC-APCI-MS coupling: nebulizer gas: 8; curtain gas: 8; nebulizer current: +/-5; temperature: 300°C; declustering potential: +/-60V; focusing potential: +/-320V; entrance potential: +/-9; mass range: 215-1500.

2.4. Deactivation/re-activation method

Deactivation step consisted of a washing of the column with absolute ethanol (20V₀). A second washing was performed with 2,2-dimethoxypropane (100V₀). The flow rate was set at 0.5 mL/min. Next, the adsorbent was dried by heating in an oven at 100°C for one hour under nitrogen stream. To finish, reconditioning of the column was performed by a flushing with the weakest solvent used in the mobile phase (100V₀), i.e. H_X. The flow rate was set at 1.0mL/min.

2.5. Fractionated impurities identification

2.5.1. GC-MS

The GC/MS instrumentation consisted of a TRACE GC - IT900 Thermofisher Scientific. Electron ionisation mode was used (temperature of the source: 220°C; solvent delay: 2.5min; full scan 70-900). Separations were performed on a DB5HT column (30 mx0.250 mm, 0.1 µm). Temperature gradient started at 50°C (during 2 min) to 360°C with a slope of 15°C/min. The helium flow rate was set at 1.1 mL/min and a sample volume of 1µL was injected (split 1/10).

2.5.2. Direct infusion on APCI-LTQ-Orbitrap

The MS acquisitions were performed on a LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Scientific, Waltham, USA). An APCI source was used. Data were processed using Xcalibur® software (Thermo Xcalibur 2.2). Source's parameters were: infusion flow-rate: 10µL/min; capillary temp: 300°C; S.lens RF level: 60%; temp: 300°C; sheath Gas flow Rate (arb): 40; aux gas flow rate (arb): 5; sweep gas flow rate (arb): 5; discharge current: 5µA and discharge voltage: 2.84 kV. Scan parameters were: negative and positive ionization modes, analyser: FTMS; mass range: from 50 to 1000 and from 1000 to 2000; resolution: 30000; full scan.

2.5.3. Vibrational spectroscopy: Raman microspectrometry

Raman spectral signature has been recorded for the different fractions of solvent samples containing impurities. Data are registered using a Labram HR microspectrometer (Horiba Scientific®), with an excitation source of 633 nm, a CCD detector (1024x256 pixels), and a

dispersive grating 300 tr/min and a 100X LF objective, with a spectral resolution of 4 cm^{-1} . Spectra were acquired in the interval 400-3800 cm^{-1} and the acquisition time was 10 seconds with 2 accumulations. For each sample, nine spectra were recorded at different points of the deposit, each point spectra was repeated three times. Labspec 6[®] software was used for data processing. After baseline adjustment, assignment of characteristic bands with reference to literature was carried out.

2.6. *n*-heptane purification

The instrumentation consisted of a liquid chromatograph LC-6A pump (Shimadzu, France). H_X was eluted through a 150 x 20.0 mm column packed with 5-20 μm Lichroprep Si 60. The flow-rate was set at 8mL/min. Profile of purified *n*-heptane was controlled by NPLC-ELSD.

3. Results and discussion

Evaluation of solvent alternative to *n*-heptane and chloroform was developed for lipid classes separation by NPLC-ELSD [6]. To estimate their compatibility with this technique and to evaluate their chromatographic selectivity, a screening of alternative solvents was performed. Those experiments were carried out by the comparison of chromatograms obtained with conventional solvents and alternative solvents. Method was primary developed with a conventional ternary gradient: *n*-heptane/EA:C,(70:30, v:v)/ethanol:water,(95:5, v:v).

3.1. Evidence of system peaks occurring during the chromatographic analysis of lipids

Ten classes of lipids including cholesteryl ester, sterols, glyceroglycolipids and phospholipids were analysed. Chromatograms are presented in the figure VII.1.

To highlight the presence of impurities, chromatograms representing the lipid classes' analysis (Figure VII.1.A) and a blank test (Figure VII.1.B) were compared. To exclude the presence of lipid classes' coelution, each lipid class was injected individually to estimate its *t_r* value. The results showed the presence of four main undesired peaks in our separation. The first impurity (X₁) was eluted near TG peak. In those analyses conditions, the X₁ was not coeluted with TG, which can be easily identified. FA and MG were respectively coeluted with X₂ and X₃. Several compositions of gradient elution were tested to improve the separation but the two couple of compounds could not be separated (data not shown). The last interference X₄ appeared as a very broad peak covering an elution area of approximately 6 minutes from 21.5 to 27.5min. Comparison with individual lipid classes highlighted that the identification of PE and PC, which should elute in this region of the chromatogram, is impossible. Chromatograms

appeared to be repeatable as relative standard deviation of t_r values were lower than 3.5%. Presence of proteinaceous and non-proteinaceous impurities has been highlighted in the literature [9]. Plasticizers and anti-oxidative additives were referenced as common contaminants of lipid classes analyses [7, 8]. According to those articles, the presence of impurities could have several origins such as sample preparation, instrumentation, solvents, or intern laboratory contamination. To determine the role of each element of the separation process, their impact on the analyses was evaluated.

3.2. Identification of the cause of the interferences

3.2.1. System

A possible contamination of HPLC instruments was considered. All the system was cleaned (without column) by the successive elution of n-heptane, dichloromethane, isopropanol, dichloromethane and n-heptane. During this step, ELSD signal was stable, no background noise variation was observed. Column was cleaned and its retentive characteristics recovered by the use of a deactivation/activation method. It consisted in deactivation of the adsorbent, elimination of bound water and polar compounds, drying of the adsorbent by heating and reconditioning of the column by a weak solvent. The reconditioning of the silica was performed with n-heptane under isocratic condition (see part 2.4). ELSD signal acquired during this reconditioning step was also stable. After this procedure, blank tests were performed using a ternary gradient. In the first chromatogram, impurities were detected; their peak intensities were higher than those observed in the following injection or lipid classes' separation. The experiments were repeated on another HPLC system (with a different brand and model of HPLC pump and injector) and a second column of similar dimension but with a different silica stationary phase. HPLC-ELSD system and column were cleaned as described above. Observations were the same: impurities were detected with higher intensities observed for the first (blank) chromatogram. From these observations, the impurities observed in blank or lipid sample chromatograms didn't come from a pollution of the HPLC system and/or the chromatography column.

3.2.2. Solvents

Thus, the possibility of n-heptane contamination was considered. This hypothesis was based on the variation of impurities' intensity in blank tests injection sequence. Chromatograms performed after reconditioning or equilibration step showed some differences in terms of the impurities' intensity. Chromatograms are presented in the figure VII.2.

Those steps had in common the use of n-heptane under isocratic condition. During the equilibration step, ELSD signal was stable (Figure VII.2.A). The second chromatogram (Figure VII.2.B) exhibited much higher peak heights for all impurities compared with the others (Figure VII.2.C). Except for this chromatogram, the peak height of impurities appeared to be reproducible from run to run. Results suggested that the impurities could be adsorbed on the stationary phase during the elution of n-heptane under isocratic condition and be eluted by the ternary gradient. n-heptane volume implied in reconditioning step was 4 times higher than this implied in equilibration step (respectively 63 mL and 15 mL of n-heptane). As a result, quantity of impurities adsorbed was higher for the reconditioning step than the equilibration step. To confirm the role of n-heptane, blank tests were performed with several equilibration times. The chromatograms are presented in the figure VII.3.

Chromatographic profiles showed that peak height, area and width (at the base) values of the peak impurities increased with the equilibration time. Data were presented in the table VII.2. For an equilibration time of 0 min (Figure VII.3.A) X_{3'} and X_{4'} were detected. Those impurities were adsorbed during the equilibration of the column and during the beginning of the ternary gradient. The first part of the ternary gradient implies a high percentage of n-heptane. The low eluent strength favoured the adsorption of the most polar impurities such as X_{3'} and X_{4'}. After 5 min of equilibration time; X_{3'} and X_{4'} were also detected and their peak height increased (Figure VII.3.B). On the chromatogram corresponding to an equilibration time of 10 min, X_{1'} was detected (Figure VII.3.C). The increase of peak height was higher for X_{4'} than X_{3'}. After 20 min of equilibrium (Figure VII.3.D) peak height of X_{1'} increased again. X_{4'} peak height was stable but the peak started to widen. X_{3'} peak height was stable. At 30 min of equilibrium, X_{2'} was detected (Figure VII.3.A). There was a significant increase of X_{1'} and X_{3'} peak height. X_{4'} was eluted as a very broad peak. The experiments confirmed our hypothesis: The higher the equilibration time (i.e. the volume of n-heptane percolated through the column, the higher the signal of impurities appeared on the chromatographic profile with peak area growing with increasing equilibration time. The profile of those peaks suggested that several compounds coeluted under the same peak (X_{4'}). Overall chromatograms data suggested that impurities came from n-heptane.

At this step, it was clear that the low eluting strength of n-heptane induced the adsorption of impurities onto the stationary phase and that most of them came from the n-heptane itself. However, the possible contribution of the other solvents of the ternary gradient had to be considered. Impurities from ethanol and water could be *a priori* excluded from this suspicion since those two solvents are the most eluent and appear briefly at the end of the solvent program.

A possible contribution of the solvent B is more difficult to exclude and had to be tested. For this, experiments were performed on blank chromatograms using EA, chloroform, and dichloromethane as solvent B in the ternary gradient. Chromatograms are presented in figure VII.4.

Table VII.2: Time elution, area, peak height and width (at the base) values for each peak impurity according to the equilibration time.

Impurity n°	Equilibration time (min)	tr (min)	Area (mV.min)	Peak height (mV)	Width (min)
X ₁ ,	0	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	10	4.86	6.2	42	0.48
	20	4.73	13.9	117	0.66
	30	4.59	279.0	1386	1.15
X ₂ ,	0	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
	20	-	-	-	-
	30	7.56	43.7	117	0.51
X ₃ ,	0	15.44	3.8	36	0.29
	5	15.45	4.2	39	0.40
	10	15.60	7.9	67	0.54
	20	15.61	10.9	90	0.70
	30	15.61	196.9	948	0.71
X ₄ ,	0	22.50	114.3	281	2.00
	5	21.90	269.5	342	2.87
	10	22.42	553.6	538	3.63
	20	22.05	657.4	546	3.63
	30	22.43	794.1	322	3.86

Tests on solvent B showed similar chromatographic profiles to those obtained with EA:C. Dissimilarities are due to the physico-chemical properties of EA, chloroform and dichloromethane (respectively Figure VII.4.C; 4.B and 4.A). The elution strength (ϵ_0) of those solvent is not the same. EA has a higher ϵ_0 (0.48) than chloroform (0.26) and dichloromethane (0.32) [10]. Non-polar impurities were eluted faster with EA ($t_r = 4.5$ min) than chloroform or dichloromethane ($t_r = 15.8$ min). For each composition gradient, medium polar and polar impurities were respectively detected at 15.8 min and from 21 to 24 min. Solvent C is required to obtain their elution. For impurities at 15.8 min, two peaks were observed for dichloromethane. This duality is certainly due the selectivity difference between EA, chloroform and dichloromethane. Concerning the ELSD response, the intensity of impurities at $t_r = 15.8$ min was lower with EA than with the other solvents. EA is less volatile than

chlorinated solvents (dichloromethane and chloroform). This could influence the nebulization process and the intensity of the response. In fact, the intensity of the signal depends on the nature of the solvent B. According to our results, the presence of impurities coming from n-heptane was confirmed while the other solvents used as B solvent were not responsible of the column pollution.

3.2.3. Screening of n-heptane qualities

3.2.3.1. NPLC-ELSD

A screening of n-heptane was performed with different qualities of n-heptane provided by the same supplier, several HPLC-grade provided by different suppliers, different bottles of the same batch and different batches of the same quality provided by the same supplier. Every n-heptane cited in the part of chemicals was evaluated. Results are presented in the figure VII.5.

For each mobile phase tested, blank tests highlighted the presence of impurities. Deactivation/activation method was used before each series of chromatograms when n-heptane was changed. An equilibration time of 30 minutes was used between two chromatograms. Chromatograms appeared to be repeatable as relative standard deviation of t_r values were lower than 1.1%. The comparison of chromatograms revealed some differences about the t_r values of impurities, their number and their intensities. The chromatogram obtained with H₅ (Figure VII.5.D) showed the higher intensity (near to the limit of the ELSD). Profile of H₆ (Figure VII.5.F) and H₈ (Figure VII.5.H) were similar; purity grade was the same for both but they were purchased from different suppliers. It is important to note that impurities' profile was not the same for different batches of the same quality as it can be deduced from the chromatograms obtained for H₁; H₂ and H₃ (respectively Figure VII.5.A; B and C). Surprisingly, some differences were also observed for two bottles of the same batch of the same quality. In order to identify the impurities observed, direct infusion of three batches of commercial n-heptane (HPLC grade) provided by the same supplier was performed.

3.2.3.2. Direct infusion of commercial n-heptane

H₁, H₂ and H₃, in negative (Figure VII.6.A; B and C) and positive ion modes (Figure VII.6.D; E and F), gave different mass spectra. Several carboxylic acids and fatty acids were detected. Most abundant ions were $[M+H]^+$: acetic acid, butyric acid, heptenoic acid and hydroxy enanthoic acid [ref]. In negative ion mode the same compounds were identified from their $[M-H]^-$ ion: butyric acid, heptenoic acid and hydroxy enanthoic acid [11]. Calculated and found m/z values are presented in the table VII.S1 (see supplementary data). Mass spectra

present some differences in terms of main ion detected. Palmitic, stearic and oleic acid were also detected [11]. Thus, the most abundant ions correspond to carboxylic acids up to C7. Identification of FA permits to explained the presence of a peak, at the elution time of FA standards, in the blank tests. Mass spectra didn't show any ion which can identify other impurity detected by NPLC-ELSD. According to those results, an identification of n-heptane' impurities was performed by directly coupling the separation to the low-resolution mass spectrometer.

3.2.3.3. LC-APCI-MS

NPLC-APCI-MS was used to have information concerning impurities arising along the chromatographic profile. Total ion chromatograms (TIC) are presented in the figure VII.7. in negative (Figure VII.7.A.) and positive (Figure VII.7.B) ion modes.

Under the conditions of NPLC-APCI-MS analysis, the first impurity (X_1'') eluting at 4.03 min was observed in negative and positive ion modes. X_2'' and X_3'' were observed only in negative ion mode at 7.03 and 10.70 min. X_4'' was observed in both ion modes at 17.36 min. Several ions were observed. Main ions, corresponding to X_1'' peak, were at m/z 663 (positive ion mode) and m/z 473 and 529 (negative ion mode). These ions interfered with others compounds signal such as X_2'' , X_3'' and X_4'' . According to the literature, m/z 663 could correspond to an oxidized form of Irgafos 168 [7, 8, 12]; m/z 473 could correspond to Irgafos 168 and m/z 529 could correspond to Irganox 1076 [13]. X_2'' main ions were at m/z 255 and 283. Those two ions could be identified as palmitic and stearic acid. The t_r value corresponded to the elution of FA and their detection only occurred in negative mode [14]. Other m/z values obtained for X_3'' and X_4'' were not specific. To characterize n-heptane' impurities, several analytical techniques were carried out: direct infusion on a high-resolution mass spectrometer, analyses GC-MS and by Raman Spectroscopy. To compare the results for each n-heptane' impurities with the third techniques, each impurity was fractionated and collected by NPLC-ELSD.

3.3. Investigation of impurities' identity

The fraction/collection of impurities was performed with H_1 . It was carried out to concentrate the impurities seen along the chromatogram obtained with the ternary gradient. Impurities t_r values were estimated by NPLC-ELSD. Chromatograms appeared to be repeatable as relative standard deviation of t_r values were lower than 2.1%. Five peaks were observed. The first impurity (X_1''') is eluted just before TG. The second impurity (X_2''') is eluted at the same elution time of FA. The third impurity (X_3''') is eluted between DG and MG. The fourth peak

(X₄^m) corresponded to the time elution of MG. The ending peak (X₅^m) corresponded to the elution time of phospholipids.

Fractions containing the impurities were collected manually. Each fraction was analysed by direct infusion on an APCI-HRMS Orbitrap Velos Pro; GC-MS and Raman Spectroscopy (after solubilisation in dichloromethane and in this later case sample evaporation).

3.3.1. Direct infusion of fractionated samples

Calculated and found *m/z* values of ions detected are presented in the table VII.S1 (see supplementary data). The direct infusion of X₁^m on the LTQ-Orbitrap and its fragmentation at the relative collision energy of 35V produced a series of ions differing by *m/z* 56: 663 (MS1), 607 (MS2), 551 (MS3) in positive ion mode. Another ion is detected at 637 and its fragmentation gave also a series of ions differing by *m/z* 56: 637 (MS1), 581 (MS2), 525 (MS3), 496 (MS4), 413 (MS6). According to the literature, *m/z* 663 and 637 are corresponding to Irgafos 168 respectively to both oxidized form and another derivative [7, 12, 13, 15].

Direct infusion of X₂^m in positive ion mode gave no significant results. However, several ions were identified in negative mode as [M-H]⁻. The main identified compounds were acetic acid; butyric acid, hydroxy enanthoic acid, stearic acid and palmitic acid. Perfluoropropionic acid was also detected as [M-H]⁻[9]. The X₃^m peak is eluted in the region of MG and DG. This contaminant remained unidentified by the different analytical techniques used herein. X₄^m corresponded to the time elution of MG. Direct infusion of X₄^m showed some characteristic fragments of MG (16:0/0:0/0:0) and MG (18:0/0:0/0:0). In negative ion mode, [M+Cl]⁻ were detected for MG (16:0/0:0/0:0) and MG (18:0/0:0/0:0). Ions corresponding to the fatty acid were also detected. In positive ion mode, [M+H]⁺ were also detected for MG (16:0/0:0/0:0) and MG (18:0/0:0/0:0). The last impurity X₅^m appeared as a very broad peak. Direct infusion, in negative ion mode, of this sample showed a mass spectra corresponding to a polymer (Figure VII.8). In positive ion mode, fragment series differing by a loss of 74 was observed at *m/z* 371; 445; 519; 593; 667; 741. It corresponded to [(Si[CH₃]₂O)_n+H]⁺ (n ranging from 5 to 10) [16]. A series of ions corresponding to a loss of methane (-16) were also observed. Overall, the mass spectrometric data suggested that the observed ion series were polydimethylcyclsiloxanes. Their presence was only observed in the X₅^m sample.

3.3.2. Raman spectroscopy

Raman spectroscopy, gives an overview of the global molecular information of a complex mixture. Raman spectroscopy allows to identify characteristic vibrational bands and to point specific functional groups. Raman, as a biophotonic technique, has the advantage to reach

specific molecular information non-destructively and without any particular sample preparation.

In this study, the assignment of the different vibrational bands for the five fractions could be done. For X_1^m , Raman bands at 1047-1072 and 1086-1114 cm^{-1} were assigned to the P-O stretching mode (ν), to ν C-C asym, ν C-O, ν C-O-C asym, and to O-H deformation (δ) [17-21]. The bands at 1428-1479; 1568-1634 and at 1647-1668 cm^{-1} corresponded to the ν (C-C) aromatic ring chain vibrations and to C=O and to COO stretching bands [17, 22-24]. This confirmed the presence of carboxylic acids and fatty acids. Some spectra were very similar to spectra of phospholipid species recorded over the past years in the laboratory, these spectra were observed for all samples. The results of mass spectrometry revealing the presence of Irgafos 168 explained the P-O vibrational bands. For X_2^m , X_3^m and X_4^m , vibrational bands corresponding to carboxylic acids and fatty acids and Irgafos were also observed.

Raman vibrational bands of X_5^m denoted, in addition to Irgafos 168 and to the common revealed groups, the presence of vibrations similar to silicone oils' vibration [25]. Two sharp bands in the range 1000-1200 cm^{-1} characterize the Si-O-C and to the Si-O-Si stretching vibrations. Typical stretching and bending CH_x aliphatic groups vibration bands of silicone oils were observed at 1300-1600 cm^{-1} and 2800-3000 cm^{-1} . A higher peak (compared to the same window for phospholipid vibrations) at about 440 cm^{-1} generated by the oxygen atom bending in the Si-O-Si linkages was detected, as well as bands around 800 cm^{-1} and 980 cm^{-1} corresponding respectively to the SiO_2 network and to the SiOH band [25] (Figure VII.9).

3.3.3. GC-MS

The impurities samples from 1 to 5 were also analysed by GC-MS. No derivation step was performed to avoid a loss of structural information. Thus, fatty acids and derivatives could not be observed with this technique. Presence of phthalate (diisobutyl phthalate) was highlighted in the X_1^m . Moreover, presence of FAMES was observed in the X_1^m : methyl palmitate (FAME (16:0)) and methyl stearate (FAME (18:0)). Presence of a compound containing fluor atoms was detected in the X_2^m . Possible structures are perfluoroalkylether acyl fluoride or pentafluoropropionic acid. This information is coherent with the presence of perfluoropropionic acid observed in the X_2^m by direct infusion of the fractions on the orbitrap. Results confirmed also the presence of MG (16:0/0:0/0:0) and MG (18:0/0:0/0:0) in the X_4^m sample. Presence of cycloheptasiloxane, tetracosamethylcyclododecasiloxane confirmed the presence of the polydimethylcyclsiloxanes in the X_3^m sample.

3.4. Purification of n-heptane

According to these results, a purification process has been developed in order to eliminate the impurities of n-heptane used for lipid classes analysis. Before its use, n-heptane was percolated on a semi-preparative silica column. The packing was flush-out by ethyl acetate and dried in an oven at 60°C during one hour. Chromatograms (blank test) performed with ternary gradient using commercial and purified n-heptane are presented in the figure VII.10.

As expected, chromatograms obtained with commercial n-heptane presented several impurities distributed all along the ternary gradient. The majority of impurities were eluted in less than 10 min (from X₁ to X₄). X₂ and X₃ were partially coeluted. Chromatogram performed with purified n-heptane was not impurities free but only three impurities were observed (X₃, X₅ and X₆). The purification process seems to be efficient for X₁, X₂, X₄ and partially for X₅. Results showed that X₃, X₅ and X₆ do not provided essentially from n-heptane. As indicated above, the contribution of C solvent was difficult to evaluate and, according to different eluting strength which modifying the retention of impurities, the impact of B solvent was also complex to examine. Moreover, similar chromatographic profiles were observed for lipid separation using another weak solvent (hexamethyldisiloxane) than n-heptane (data not shown). Thus, B and C solvents could not be excluded to the origin of contamination.

4. Conclusion

Despite the use of HPLC or higher quality grade solvent, impurities renders the development of NP-LC lipid classes analysis difficult and lengthen the optimization of the solvent program. Common causes of “in lab” mobile phases contamination have been excluded from our operating conditions and n-heptane, the weaker solvent of the gradient program has been identified as the main responsible. Impurities’ peak area or height increase with equilibration time i.e. with increasing n-heptane volume flushed through the column prior analysis. n-heptane impurities are concentrated on the bare silica stationary phase and then elute all along the ternary solvent program. A multi-technique screening of commonly available n-heptane obtained from different suppliers and corresponding to different qualities shows that any of them could be considered as suitable “as is” for analysis. The presence of common organic impurities has been highlighted such as phthalate, anti-oxidative or polymers. More specific to our subject and also embarrassing, it should be pointed out that some lipids classes are part of n-heptane impurities, namely FA, FAME and MG. Their presence is major issue for lipid classes identification or quantitation as these compounds are essentially the same as in

biological samples and even modern hyphenated techniques of analysis such as HRMS can't achieve a reasonable specificity. Moreover, the within batch impurity profile appear to be variable. The blank gradient performed prior any series of analysis appears to be variable depending on the solvent bottle used for initial mobile phase preparation and sometime reveals new or unusually intense interfering peaks. Finally, and despite the growing range of solvent qualities often designated as offering an enhanced purity, flowing the n-heptane through a semi-preparative column packed with the same stationary phase as the one used for analysis remains a practical and inexpensive, way to obtained an appropriate solvent quality for lipid classes analysis.

Acknowledgment

Nolwenn Prache PhD Thesis is funded by a grant of Region Ile de France, DIM Analytics.

Supplementary data

Table VII.S1: Calculated and found m/z values of impurities observed by direct infusion on APCI-LTQ-Orbitrap in negative and positive ion mode.

Ion mode	Sample	compound	ion	Calculated value	Found value	Refs
	pure Hx, X ₁ ^{****} , X ₂ ^{****} , X ₃ ^{****} , X ₄ ^{****} and X ₅ ^{****}	Acetic acid	[M+H] ⁺	61.0284	61.0278	[11]
	pure Hx, X ₁ ^{****} , X ₂ ^{****} , X ₃ ^{****} , X ₄ ^{****} and X ₅ ^{****}	Butyric acid	[M+H] ⁺	89.0597	89.0590	[11]
	pure Hx, X ₁ ^{****} , X ₂ ^{****} , X ₃ ^{****} , X ₄ ^{****} and X ₅ ^{****}	Heptenoic acid	[M+H] ⁺	129.0910	129.0907	[11]
	pure Hx, X ₁ ^{****} , X ₂ ^{****} , X ₃ ^{****} , X ₄ ^{****} and X ₅ ^{****}	hydroxy enanthoic acid	[M+H] ⁺	147.1016	147.1013	[11]
	X ₄ ^{****}	MG (16:0/0:0/0:0)	[M+H] ⁺	331.2843	331.2835	[11]
	X ₄ ^{****}	MG (18:0/0:0/0:0)	[M+H] ⁺	359.3156	359.3147	[11]
+			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₅ + H] ⁺	371.10124	371.101	
			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₆ + H] ⁺	445.12003	445.1187	
			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₇ + H] ⁺	519.13883	519.1381	
			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₈ + H] ⁺	593.15762	593.1565	
			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₉ + H] ⁺	667.17641	667.1754	
	X ₅ ^{****}	Polydimethyl-cyclosiloxanes	[(Si [CH ₃] ₂ O) ₁₀ + H] ⁺	741.19521	741.1943	[9, 16]
			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₅ + H] ⁺	355.06990	355.0698	
			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₆ + H] ⁺	429.08870	429.0882	
			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₇ + H] ⁺	503.10750	503.1068	
			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₈ + H] ⁺	577.12630	577.1254	
			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₉ + H] ⁺	651.14511	651.144	
			[(Si [CH ₃] ₂ O) ₁₀ + H] ⁺	725.16390	725.163	
	pure Hx, X ₁ ^{****} , X ₂ ^{****} , X ₃ ^{****} , X ₄ ^{****} and X ₅ ^{****}	Butyric acid	[M-H] ⁻	87.0452	87.0454	[11]
	pure Hx, X ₁ ^{****} , X ₂ ^{****} , X ₃ ^{****} , X ₄ ^{****} and X ₅ ^{****}	Heptenoic acid	[M-H] ⁻	127.0765	127.0766	[11]
	pure Hx, X ₁ ^{****} , X ₂ ^{****} , X ₃ ^{****} , X ₄ ^{****} and X ₅ ^{****}	hydroxy enanthoic acid	[M-H] ⁻	145.0870	145.0870	[11]
-	pure Hx, X ₁ ^{****} , X ₂ ^{****} , X ₃ ^{****} , X ₄ ^{****} and X ₅ ^{****}	Palmitic acid FA (16:0)	[M-H] ⁻	255.2330	255.2323	[9, 11]
	pure Hx, X ₁ ^{****} , X ₂ ^{****} , X ₃ ^{****} , X ₄ ^{****} and X ₅ ^{****}	Stearic acid FA (18:0)	[M-H] ⁻	283.2643	283.2635	[9, 11]
	X ₂ ^{****}	Perfluoropropionic acid	[M-H] ⁻	162.9824	162.9824	[9]
	X ₄ ^{****}	MG (16:0/0:0/0:0)	[M+Cl] ⁻	365.2464	365.2455	[11]
	X ₄ ^{****}	MG (18:0/0:0/0:0)	[M+Cl] ⁻	393.2777	393.2766	[11]

References

- [1] T. Fisher-Chemical, Purity Grades for Every Application, in, Thermo Fischer Scientific Inc, 2013.
- [2] D. Mak, B. Krastins, E. Genin, V. Jespers, S. Roemer, Optimizing Mobile Phase Solvent Purity for LCMS, in: T.F.S. Inc (Ed.), 2009.
- [3] D.W. Bristol, Detection of trace organic impurities in binary solvent systems: A solvent purity test, *Journal of Chromatography A*, 188 (1980) 193-204.
- [4] S. Williams, Ghost peaks in reversed-phase gradient HPLC: a review and update, *Journal of Chromatography A*, 1052 (2004) 1-11.
- [5] S.-h. Liu, Quality Evaluation of HPLC-Grade Acetonitrile, *American laboratory*, 40 (2008) 22-29.
- [6] N. Prache, S. Abreu, P. Sassiati, D. Thiébaud, P. Chaminade, Alternative solvents for improving the greenness of normal phase liquid chromatography of lipid classes, *Journal of Chromatography A*, 1464 (2016) 55-63.
- [7] I.A. Butovich, On the lipid composition of human meibum and tears: comparative analysis of nonpolar lipids, *Investigative ophthalmology & visual science*, 49 (2008) 3779-3789.
- [8] M. Holcapek, E. Cifkova, B. Cervena, M. Lisa, J. Vostalova, J. Galuszka, Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1377 (2015) 85-91.
- [9] B.O. Keller, J. Sui, A.B. Young, R.M. Whittall, Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry, *Analytica chimica acta*, 627 (2008) 71-81.
- [10] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Chromatographie en phases liquide et supercritique*, Masson Paris 1991.
- [11] The LIPID MAPS Lipidomics Gateway, <http://www.lipidmaps.org/>, in.
- [12] M.A. Yilmaz, H. Temel, Screening of Polymer Additives in Drinking Water Stored in PET Bottles by UHPLC-ESI-IT-TOF MS, (2016).
- [13] M. J. Carrott, G. Davidson, Identification and analysis of polymer additives using packed-column supercritical fluid chromatography with APCI mass spectrometric detection, *Analyst*, 123 (1998) 1827-1833.
- [14] R.C. Murphy, Chapter 1 Fatty Acids, in: *Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids*, The Royal Society of Chemistry, 2015, pp. 1-39.
- [15] M. Woodman, Screening and Qualitative Identification of Antioxidant Polymer Additives by HPLC with UV/VIS and APCI-MS Detection - Application, in: A.C.A.S.-A. Technologies (Ed.), 2003.
- [16] A. Schlosser, R. Volkmer-Engert, Volatile polydimethylcyclsiloxanes in the ambient laboratory air identified as source of extreme background signals in nanoelectrospray mass spectrometry, *Journal of mass spectrometry*, 38 (2003) 523-525.
- [17] S. Tfaili, Caractérisation par microspectroscopie confocale Raman de la diffusion cutanée d'actif : optimisation des paramètres instrumentaux et méthodologiques en vue d'applications in vivo., in: *UFR Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 2012*, pp. 177.
- [18] H. Elmsellem, E. Mohammed, M. Kolli, Synthèse du phosphate tricalcique apatitique et sa céramisation en β -TCP *Nature & Technologie, Sciences fondamentales et Engineering* (2012) 2-6.
- [19] C.B. Fox, R.H. Uibel, J.M. Harris, Detecting phase transitions in phosphatidylcholine vesicles by Raman microscopy and self-modeling curve resolution, *J Phys Chem B*, 111 (2007) 11428-11436.
- [20] G. Niaura, A.K. Gaigalas, V.L. Vilker, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Phosphate Anions: Adsorption on Silver, Gold, and Copper Electrodes, *The Journal of Physical Chemistry B*, 101 (1997) 9250-9262.
- [21] G. Penel, G. Leroy, N. Leroy, P. Behin, J.M. Langlois, J.C. Libersa, P.H. Dupas, [Raman spectrometry applied to calcified tissue and calcium-phosphorus biomaterials], *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*, 42 (2000) 55-63.
- [22] C. Lee, C.D. Bain, Raman spectra of planar supported lipid bilayers, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1711 (2005) 59-71.
- [23] K. Venkateswarlu, C. Balasubramanian, Intensity of Raman lines in carboxylic acids, esters and nitriles, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Section A*, 23 (1960) 146-150.

- [24] A. Tfayli, E. Guillard, M. Manfait, A. Baillet-Guffroy, Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains, *Anal Bioanal Chem*, 397 (2010) 1281-1296.
- [25] W. Österle, A. Giovannozzi, T. Gradt, I. Hausler, A. Rossi, B. Wetzel, G. Zhang, A.I. Dmitriev, Exploring the potential of Raman spectroscopy for the identification of silicone oil residue and wear scar characterization for the assessment of tribofilm functionality, *Tribology International*, 90 (2015) 481-490.

Figures

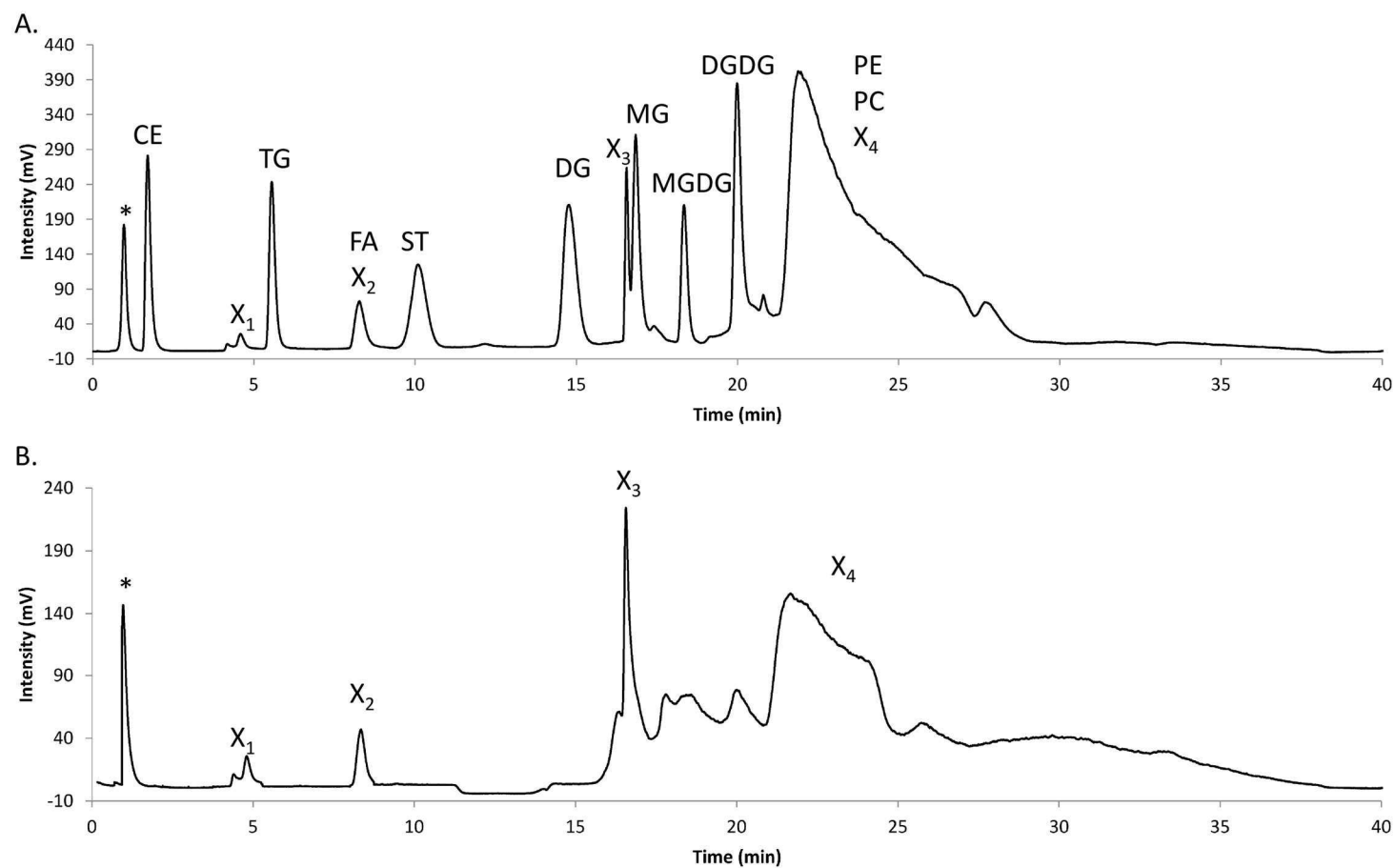


Figure VII.1: Highlight of impurities presence by comparison of chromatograms corresponding to a lipid classes' separation (VII.1.A) and a blank test (VII.1.B). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, ternary gradient composed by (a): H₁, (b): EA:C (70:30, v:v), (c): ethanol:water (95:5, v:v). Peak annotation: cholesteryl palmitate (CE), glyceryl tripalmitate (TG), stigmasterol (ST), palmitic acid (FA), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG), 1-stearoyl-rac-glycerol (MG), galactosyl diglyceride (MGDG), digalactosyl diglyceride (DGDG), L- α -phosphatidylethanolamine (PE), L- α -phosphatidylcholine (PC), impurity 1(X₁), impurity 2(X₂), impurity 3(X₃), impurity 4(X₄) and * dead volume.

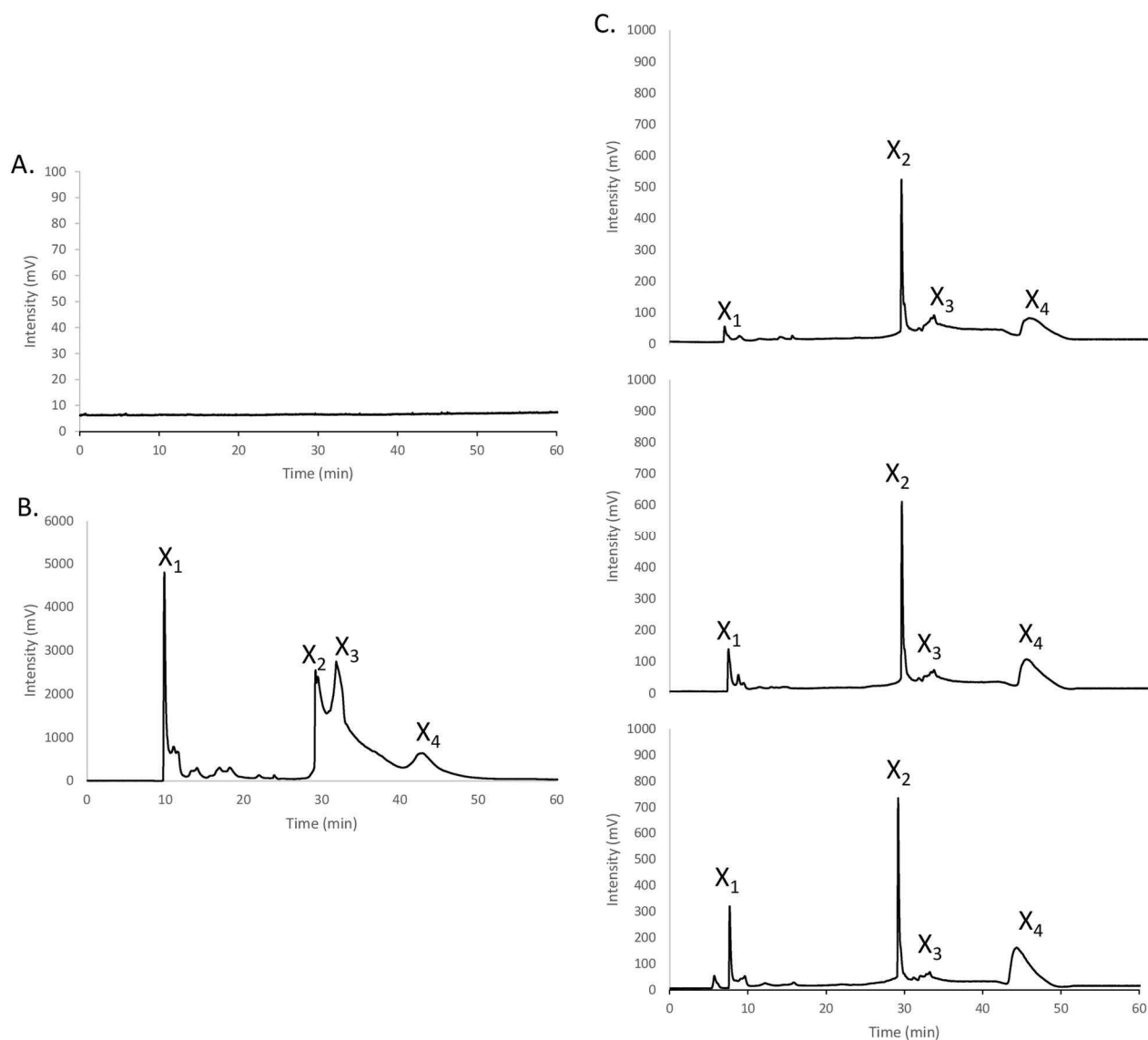


Figure VII.2: Highlight of impurities presence by comparison of chromatograms obtained during the reconditioning of the column (VII.2.A), the first elution after the reconditioning step (VII.2.B), three repetitions of ternary gradient elution performed in the same condition (VII.2.C). Reconditioning step condition: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), column temperature 40°C, flow-rate 1.0mL/min (isocratic mode), volume of H₁: 100V₀. Ternary gradient conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, ternary gradient composed by (a): H₁, (b): EA:C (70:30, v:v), (c): ethanol:water (95:5, v:v). Peak annotation: impurity 1(X₁), impurity 2(X₂), impurity 3(X₃), and impurity 4(X₄).

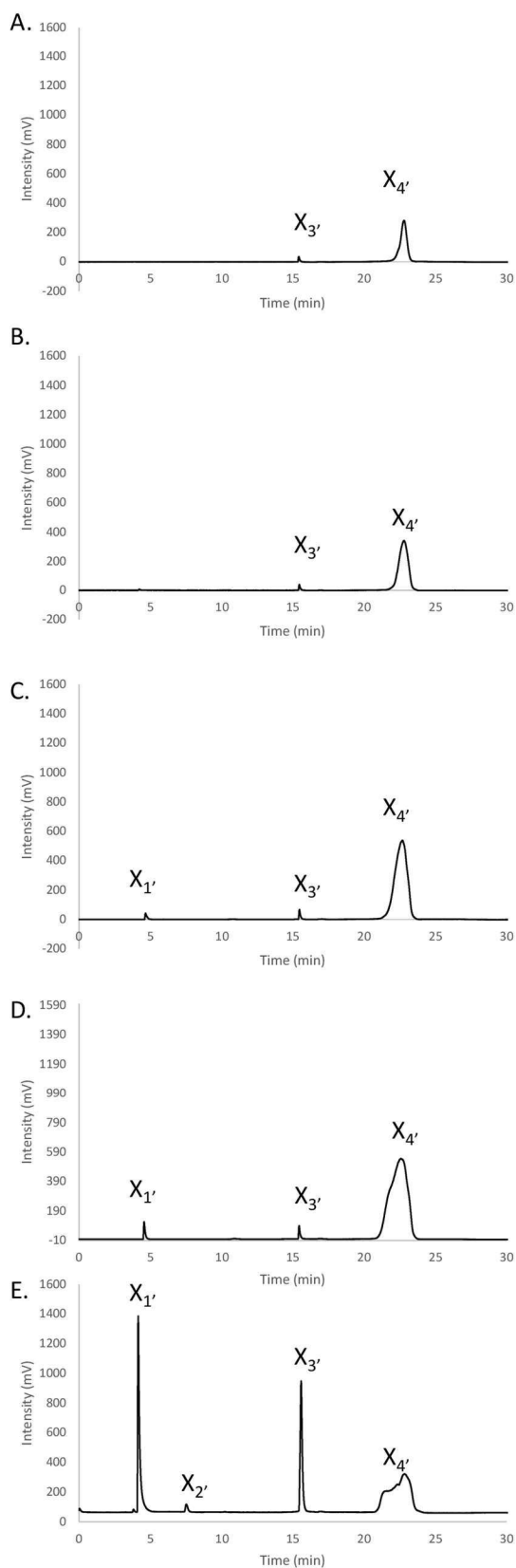


Figure VII.3: Impact of the equilibration time on the presence and area of impurities. Chromatograms were obtained after an equilibration time of: 0 min (VII.3.A); 5 min (VII.3.B); 10 min (VII.3.C); 20 min (VII.3.D) and 30 min (VII.3.E). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, ternary gradient composed by (a): H₁, (b): EA:C (70:30, v:v), (c): ethanol:water (95:5, v:v). Peak annotation: impurity 1(X_{1'}), impurity 2(X_{2'}), impurity 3(X_{3'}), and impurity 4(X_{4'}).

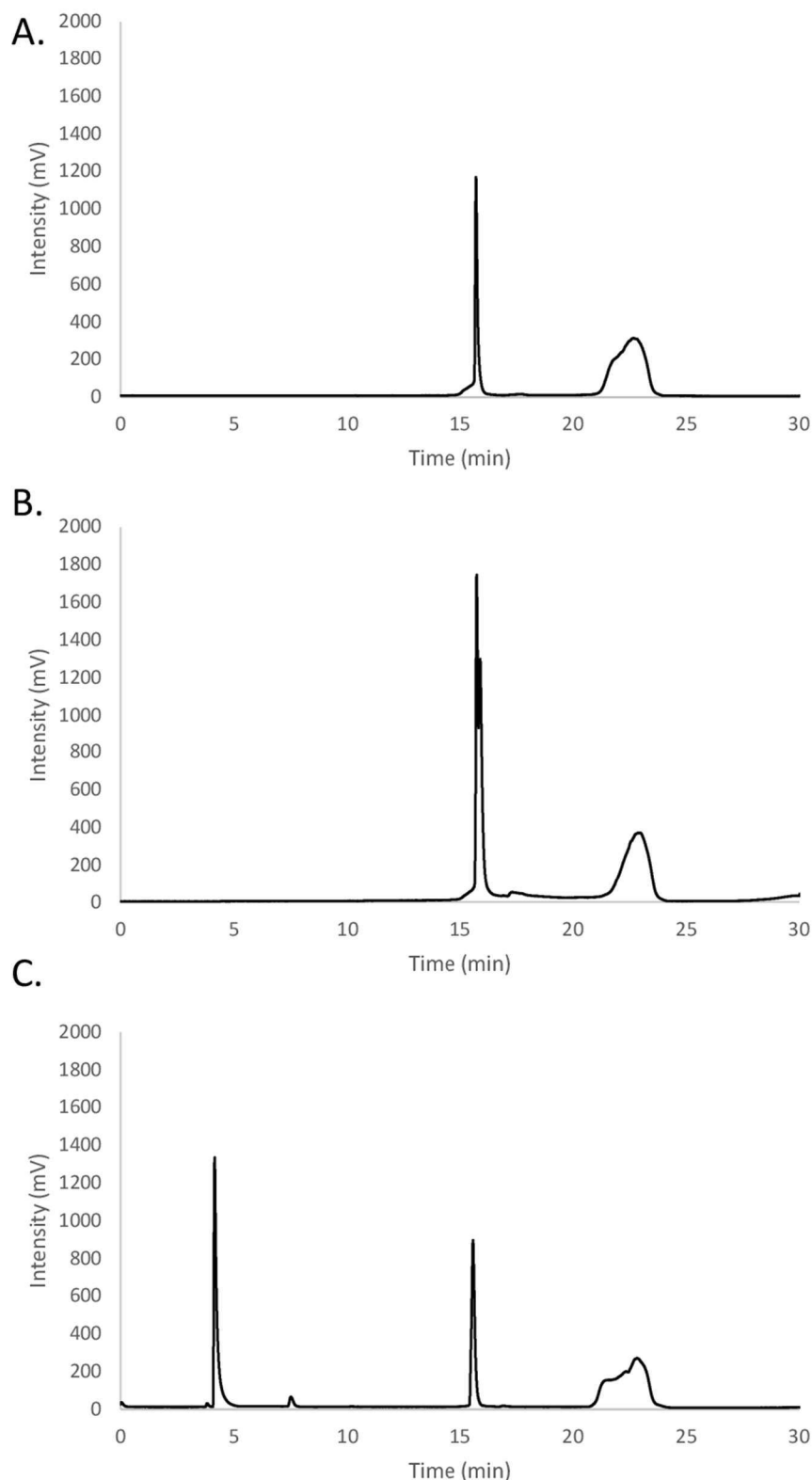


Figure VII.4: Impact of the B solvent on the presence and elution time of impurities. HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, ternary gradient composed by (a): H_1 , (b): Chloroform (VII.4.A) or dichloromethane (VII.4.B) or EA (VII.4.C); (c): ethanol:water (95:5, v:v).

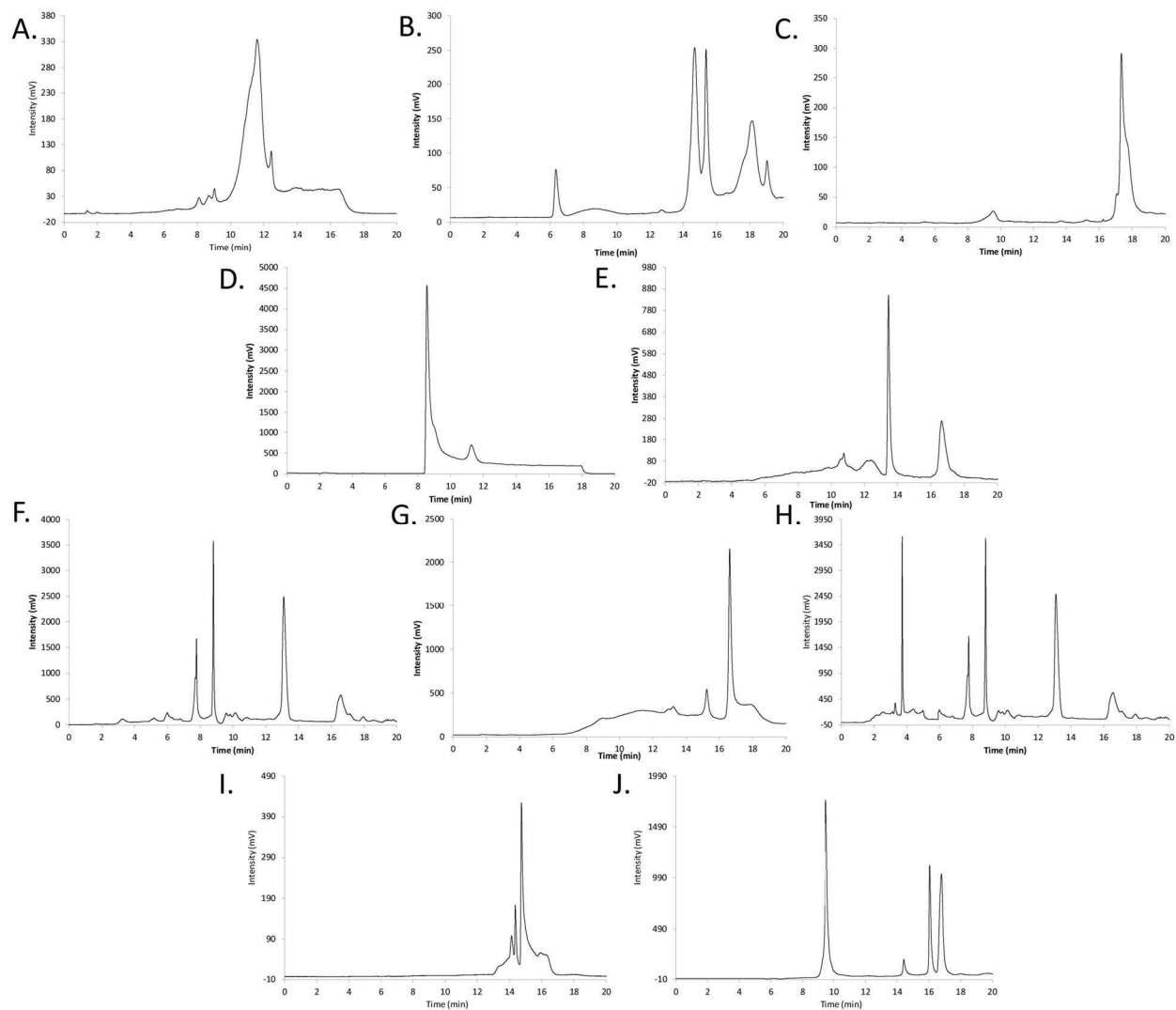


Figure VII.5: Highlight of impurities by a screening of different quality of *n*-heptane. Chromatograms were obtained with H_1 (VII.5.A), H_2 (VII.5.B), H_3 (VII.5.C), H_4 (VII.5.D), H_5 (VII.5.E), H_6 (VII.5.F), H_7 (VII.5.G), H_8 (VII.5.H), H_9 (VII.5.I) and H_{10} (VII.5.J). HPLC conditions : Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, binary linear gradient from 100% solvent a to 20% solvent a with a slope of 5%/min. Solvent a is H_x and solvent B is chloroform.

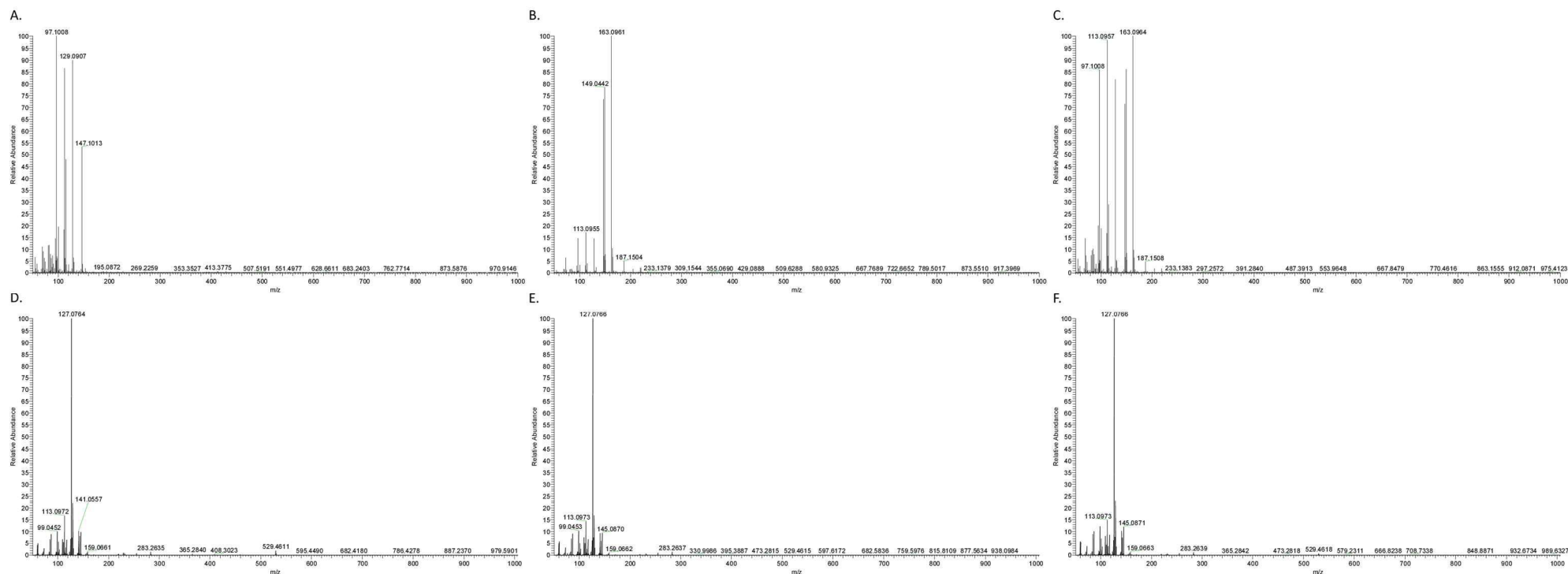


Figure VII.6: Mass spectra of commercial n-heptane performed in positive and negative ion mode. Three batches of the same HPLC grade were evaluated. Mass spectra VII.6.A (positive) and VII.6.D (negative) correspond to direct infusion of H1. Mass spectra VII.6.B (positive) and VII.6.E (negative) correspond to direct infusion of H2. Mass spectra VII.6.C (positive) and VII.6.F (negative) correspond to direct infusion of H2. The APCI-MS conditions are: infusion flow-rate: 10 μ L/min; capillary temp: 300°C; S.lens RF level: 60%; temp: 300°C; sheath Gas Flow Rate (arb): 40; aux gas flow rate (arb): 5; sweep gas flow rate (arb): 5; discharge current: 5 μ A and discharge voltage: 2.84 kV, analyzer: FTMS; mass range: from 50 to 1000; resolution: 30000; full scan.

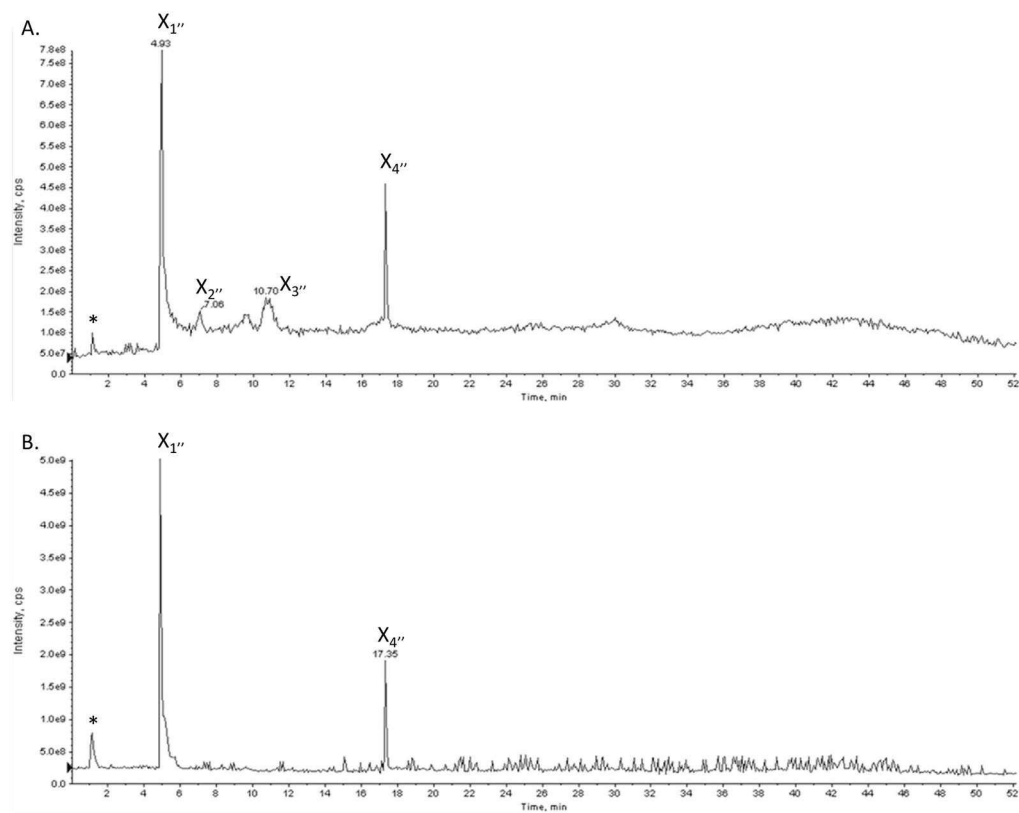


Figure VII.7: TICs of ternary gradient elution performed with NPLC-APCI-MS. HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, ternary gradient composed by (a): H₁, (b): EA:C (70:30, v:v), (c): ethanol:water (95:5, v:v). The APCI-MS conditions: acquisitions were performed in negative (VII.7.A) and positive (VII.7.B) ion mode, nebulizer gas: 8; curtain gas: 8; nebulizer current: +/-5; temperature: 300°C; declustering potential: +/-60V; focusing potential: +/-320V; entrance potential: +/-9; mass range: 215-1500. Peak annotation: impurity 1(X₁''), impurity 2(X₂''), impurity 3(X₃''), and impurity 4(X₄'').

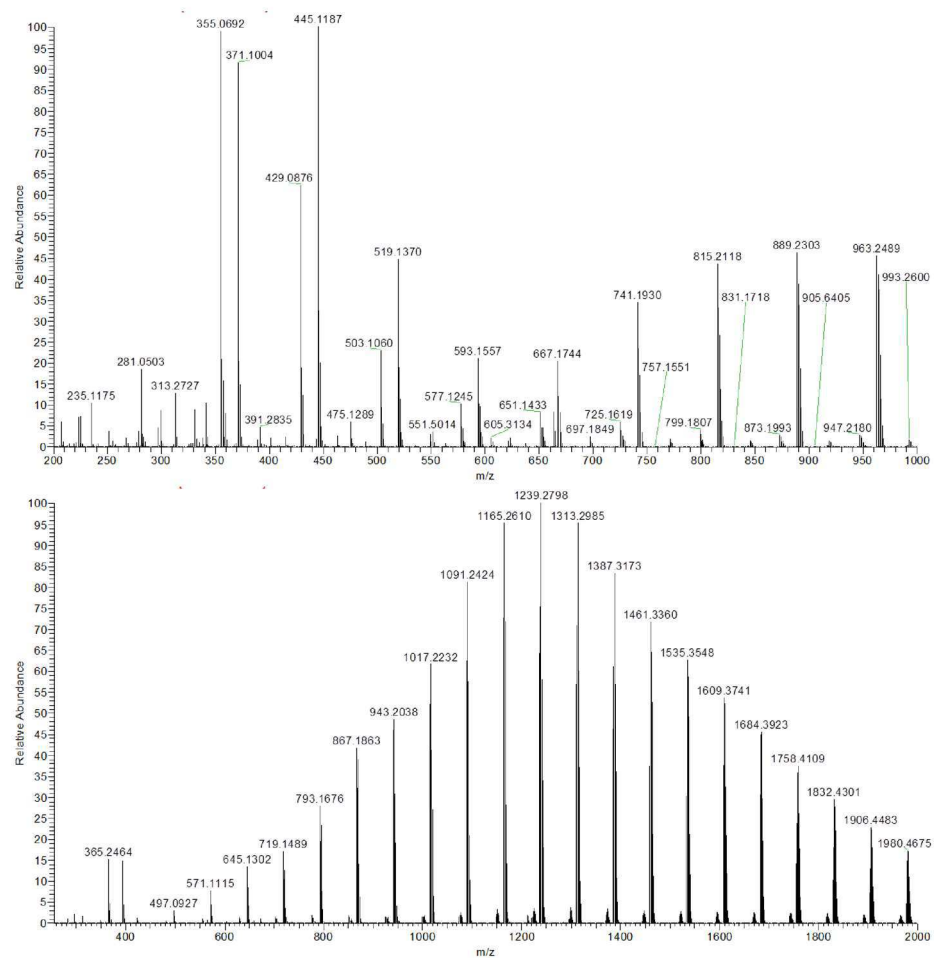


Figure VII.8: Mass spectra of polydimethylcyclosiloxanes present in commercial *n*-heptane performed in positive ion mode. The APCI-MS conditions are: infusion flow-rate: 10 μ L/min; capillary temp: 300°C; S.lens RF level: 60%; temp: 300°C; sheath Gas Flow Rate (arb): 40; aux gas flow rate (arb): 5; sweep gas flow rate (arb): 5; discharge current: 5 μ A and discharge voltage: 2.84 kV, analyzer: FTMS; mass range: from 0 to 2000; resolution: 30000; full scan.

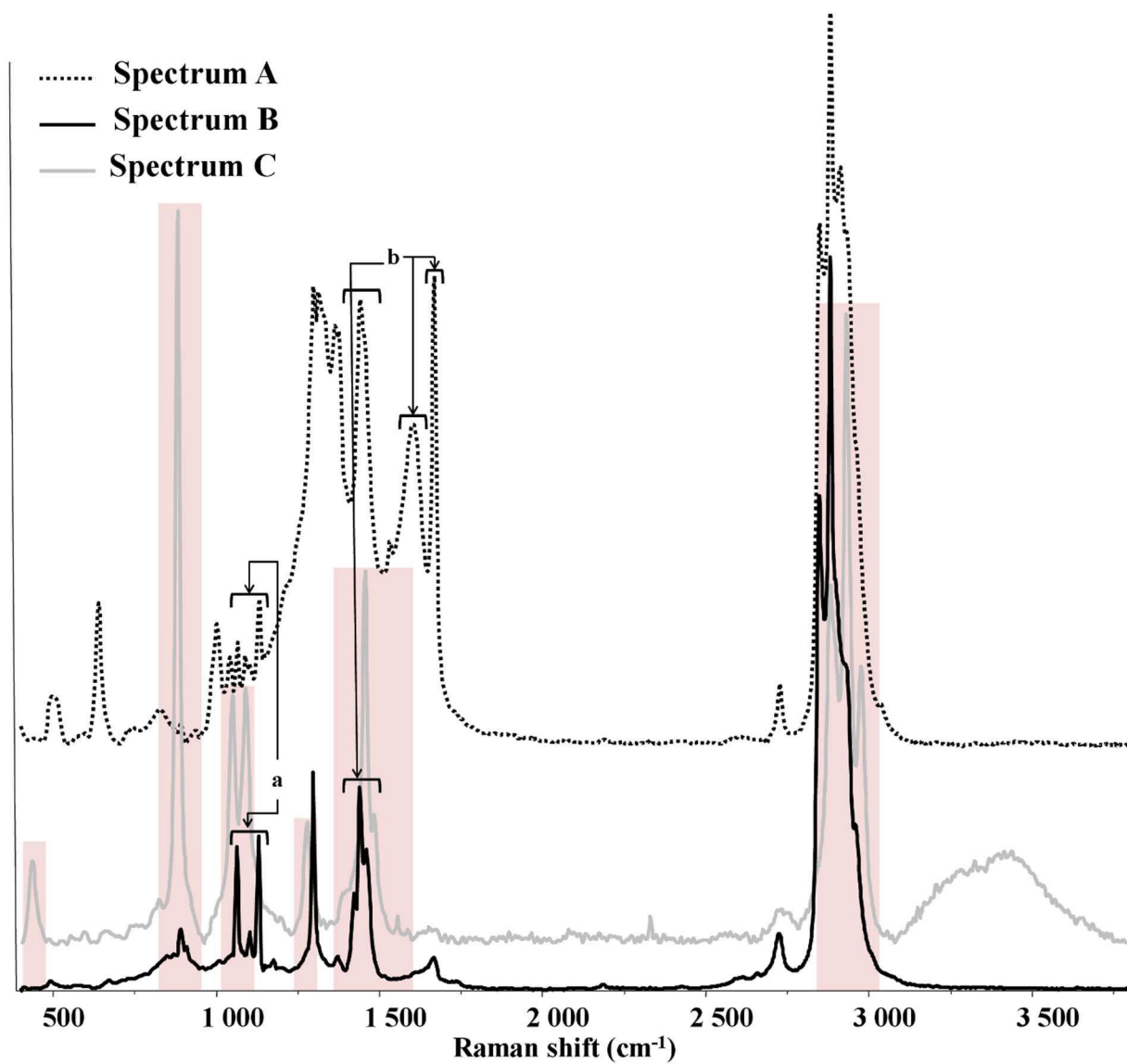


Figure VII.9: Assignment of characteristic vibrational bands for the fractionated impurities. Spectra A and B were observed for all $X^{m,n}$ samples. Spectrum C was only observed for $X_5^{m,n}$.

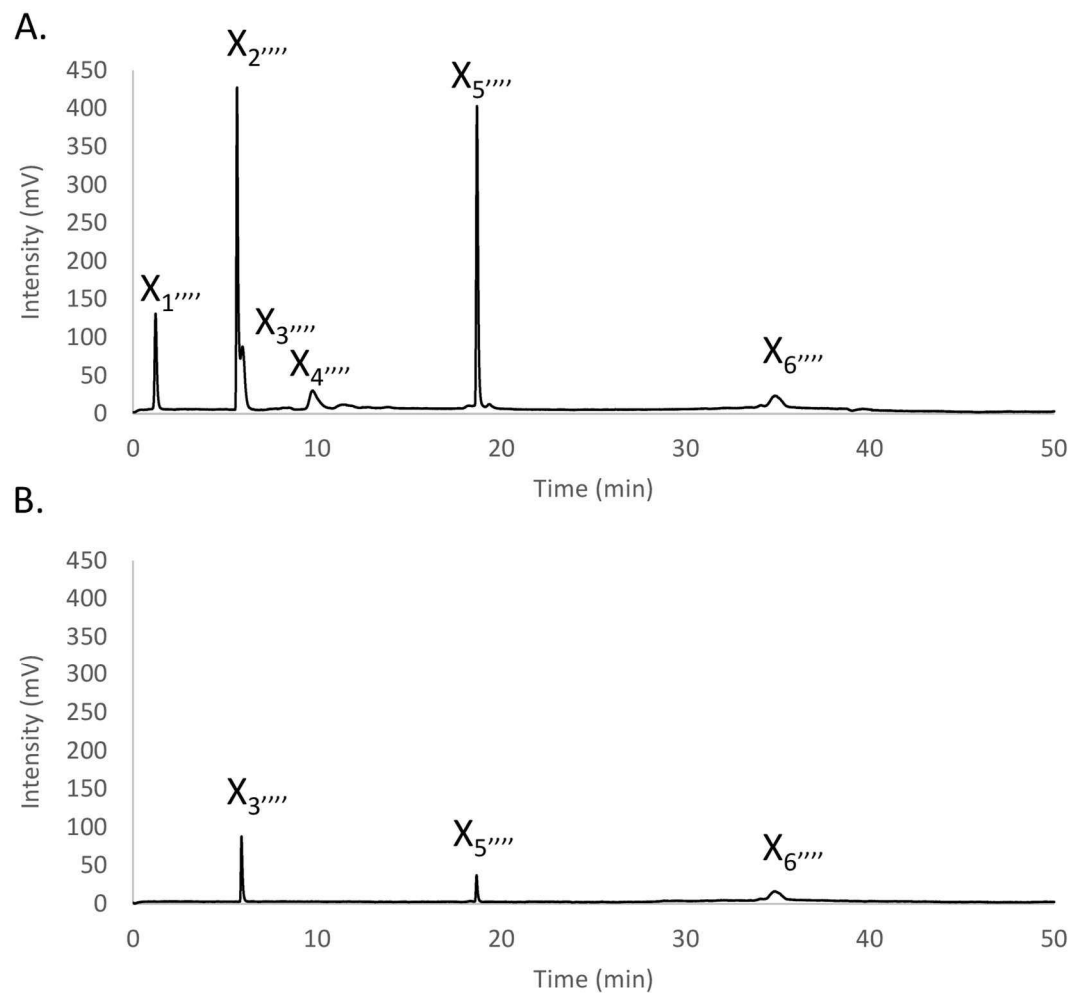


Figure VII.10: Highlight of impurities presence by comparison of chromatograms corresponding to commercial *n*-heptane (VII.10.A.) and a purified *n*-heptane test (VII.10.B). HPLC conditions: Inertsil SIL-150A column (150x2.1 mm, 5 μ m, 150A), flow-rate 0.5mL/min, column temperature 40°C, equilibration time: 30 min, ternary gradient composed by (a): commercial H_1 (VII.10.A) or purified H_1 (VII.10.B.), (b): EA:C (70:30, v:v), (c): ethanol:water (95:5, v:v). Peak annotation: impurity 1 (X_1''''), impurity 2 (X_2''''), impurity 3 (X_3''''), impurity 4 (X_4''''), impurity 5 (X_5'''') and impurity 6 (X_6'''').

CONCLUSION

Le développement de méthodes de références utilisant des solvants conventionnels était nécessaire afin d'évaluer les capacités des solvants alternatifs. Les solvants classiques sont disponibles en qualités variées et adaptées à la NPLC-ELSD ou la NPLC-MS.

Malgré cela, leur utilisation pour la séparation de lipides a permis la mise en évidence d'impuretés pouvant gêner l'identification des lipides. A l'exception des métaux et acides carboxyliques, les spécifications présentées par les fournisseurs ne font pas l'état d'impuretés spécifiques majeurs. Or la littérature montre qu'il est fréquemment trouvé des contaminations par des polymères, antioxydants ou autres phtalates.

Les origines de ces contaminations sont variées. Dans notre cas, l'implication du système HPLC et détecteurs a pu être exclue. En s'intéressant au rôle des solvants impliqués dans le gradient ternaire, l'origine majeure de la contamination, le n-heptane, a pu être déterminée. Lors des étapes de reconditionnement ou bien de la phase d'équilibre de la colonne, entre deux injections, les impuretés contenues dans le n-heptane s'accumulent et se préconcentrent. Elles sont éluées lors de l'utilisation des gradients ternaires. Plus le volume de n-heptane utilisé, lors du reconditionnement ou de la phase d'équilibre, est important, plus on observe d'impuretés en termes de nombre et de quantité.

L'évaluation de différentes qualités de n-heptane a permis de montrer que l'intégralité des n-heptane (soit une dizaine) testés présentaient des impuretés. Les profils obtenus sont différents en termes de nombre et de solubilité mise en jeu, mais tous présentent des composés non désirés risquant de gêner l'identification ou la quantification des standards lipidiques.

La contribution en impuretés des solvants B et C est plus difficile à déterminer mais elle ne peut pas être exclue. Comme le montrent les résultats obtenus avec le n-heptane purifié, une partie des impuretés n'est pas éliminée par la purification. Leur origine est donc fortement liée à la pureté des solvants B et C utilisée. De plus, des profils similaires ont été observés lors de la réalisation de séparation utilisant d'autres solvants faibles que le n-heptane. Les résultats ne permettent pas de les exclure même si leur contribution reste limitée.

Discussion et conclusion générale

Au terme de ce travail doctoral, nous avons pu démontrer que les solvants alternatifs représentent une alternative viable aux solvants conventionnels pour l'analyse des lipides par chromatographie.

La sélection de solvants alternatifs se base sur des solvants présentant une toxicité moindre que le n-heptane et le chloroforme mais possédant surtout des similitudes au niveau de leurs propriétés physico-chimiques. L'HMDS, l'IA, le CPME et le 2-MeTHF ne sont pas issus de sources fossiles, ils ne sont pas suspectés d'être toxique ou même mortel pour l'homme (n-heptane) et encore moins de provoquer le cancer (chloroforme). Leur faible volatilité permet aussi une limitation des émissions de composés organiques volatiles. Ces quatre solvants possèdent des propriétés proches du n-heptane et du chloroforme (viscosité, force éluante, interactions) ce qui rend leur utilisation possible en chromatographie.

Toutefois, ces alternatives ne sont pas idéales. En effet, ces quatre solvants sont inflammables (alors que le chloroforme ne l'est pas). L'IA présente un risque d'irritation (ce qui n'est pas le cas du n-heptane et du chloroforme). Tous comme les solvants non miscibles et moins dense que l'eau, l'HMDS présente un risque de toxicité pour les milieux aquatiques. Les domaines de la chimie exploitant le plus ces nouveaux solvants concernent majoritairement les domaines de la synthèse organique, l'extraction liquide-liquide ainsi que le traitement de surface. Leur utilisation en LC et SFC est une opportunité d'évaluer leur aptitude pour la séparation de lipides mais aussi de proposer de nouveaux solvants pour des techniques exploitant un nombre limité de solvants (LC : alcanes, solvants chlorés ; SFC : méthanol). La non disponibilité de ces solvants en qualité suffisante pouvant représenter un frein à leur essor.

Le développement d'une méthode en NPLC-ELSD a permis de montrer que ces quatre solvants étaient compatibles avec le système. L'HMDS, l'IA, le CPME et le 2-MeTHF permettent l'obtention de séparation efficaces et comparables à celles obtenues avec les solvants conventionnels. La sélectivité développée par ces solvants permet de séparer ($R_s > 1.5$) l'intégralité des classes lipidiques étudiées. De plus l'HMDS permet une augmentation intéressante de la perte de charge, ce qui représente un avantage sachant les difficultés rencontrées par les systèmes HPLC à pomper des solvants peu visqueux.

L'évaluation des solvants alternatifs en couplage LC-MS s'est avéré essentiel étant donné la place importante accordée à la MS pour l'analyse des lipides ainsi qu'en lipidomique. L'atout majeur de HMDS par rapport au n-heptane est qu'il possède un moment dipolaire non nul pouvant laisser espérer la formation d'un spray stable en ESI. Les résultats ont montré que cette formation étant envisageable mais étant dépendante de la géométrie de la source, de nouveaux essais doivent être réalisés et s'ils sont positif passer à l'évaluation d'IA, de CPME et du 2-

MeTHF en ESI-MS. Son utilisation en APCI-MS s'est avérée infructueuse compte tenu de la présence d'impuretés générant un grand nombre d'ions dans la gamme de m/z allant de 0 à 400. L'évaluation en APCI d'IA, de CPME et du 2-METHF n'a pas pu être réalisée avec l'HMDS comme solvant faible mais uniquement avec le n-heptane. Ces trois solvants permettent d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus avec les solvants conventionnels et ce malgré une qualité non HPLC.

Utiliser en SFC en tant que modificateur polaires (en remplacement du méthanol) en mélange avec le CO₂ supercritique, l'IA, le CPME et le 2-MeTHF ont permis de séparer des lipides non polaires. Dans la même condition d'analyse, les solvants alternatifs permettent de séparer les lipides étudiés sans coélution contrairement au méthanol. Toutefois, ils présentent une force éluante plus faible que ce dernier et ne permettent pas l'éluion des lipides les plus polaires comme les phospholipides. L'évaluation de ces solvants a aussi permis d'évaluer leur capacité sur plusieurs phases stationnaires et de montrer une incompatibilité, en termes d'interaction, pour la séparation sur une colonne polaire de type diol.

A la vue de ces résultats, les solvants alternatifs présentent un réel intérêt pour l'analyse de lipides en LC et en SFC ou leur association avec du méthanol ou de l'éthanol permettrait de couvrir l'ensemble de la gamme d'éluion des lipides. L'inconvénient majeur de ces solvants reste la qualité insuffisante. Toutefois ce problème ne leur est pas réservé.

La dernière étude de ce projet doctoral concerne la mise en évidence d'impuretés dans les solvants commerciaux de qualité HPLC. Malgré l'utilisation de qualité suffisante et logiquement adaptée à l'analyse de lipides, des impuretés perturbent l'identification et la quantification des lipides. L'identification de l'origine principale de cette contamination (n-heptane) ainsi que de la nature de ces impuretés (phtalate, polymère, lipides) est un point de plus en défaveur des solvants conventionnels.

Les systèmes séparatifs développés en association avec les solvants alternatifs représentent, pour chacun, des dimensions d'analyses intéressantes en vue d'un couplage chromatographique bidimensionnel pouvant permettre l'établissement de la cartographie du lipidome couplé à de la spectrométrie de masse haute résolution. L'essor des solvants alternatifs repose, quant à lui, sur la mise à disposition de pureté plus élevée et adaptée à l'analyse de lipides.

Annexes

ANNEXE I : ACTIVATION DE LA SILICE VIERGE

En chromatographie d'adsorption, l'obtention de séparations reproductibles passe par un maintien de l'activité constante de la silice vierge tout au long de l'analyse. Pour cela, il est préconisé d'ajuster la teneur en eau des solvants de sorte que la teneur en eau de ces derniers soit en équilibre avec l'adsorbant. Pour réaliser cet équilibre, l'utilisation de solvants isoactifs, c'est à dire de solvants conduisant au même état d'activation, est une solution de choix.

I. Ajustement de la teneur en eau des solvants

Pour réaliser, une séparation de lipides par classe par NPLC-ELSD, l'utilisation d'un gradient ternaire s'impose. Un solvant faible comme le n-heptane permet la rétention des composés les plus apolaires comme les esters de cholestérol et les TGs. Un mélange hydro-organique (éthanol:eau, 95:5, v:v) est, quant à lui, nécessaire pour éluer les composés hydrosolubles que sont les phospholipides. Enfin, la miscibilité entre ces deux phases est assurée par l'utilisation de solvant de milieu de polarité comme le chloroforme. L'utilisation de plusieurs solvants, possédant des forces éluante (ϵ) et des teneurs en eau variées, rend le contrôle de l'activité de la silice et l'ajustement de la teneur en eau isoactifs complexe. La teneur en eau des solvants impliqués au cours de cette étude est donnée dans le tableau AI.1.

Tableau AI.1 : Teneurs en eau dans les solvants commerciaux.

	n-heptane	HMDS	Chloroforme	IA	2-MeTHF	CPME	Ethanol
Teneur en eau	< 0,010%	Inconnu	Inconnu	Inconnu	≤ 1%	Inconnu	≤ 0,2%

Dans ces conditions, la mise en place de séries de solvants isoactifs commune à chaque composition de gradient s'avère délicate. De plus, il a été montré qu'en mélangeant de très faibles quantités (1%) de solvant de polarité moyenne (acétate d'éthyle, acétone) au solvant faible (n-heptane), les solutés analysés (nitrobenzène, cholesteryl palmitate et glycérol tripalmitate) sortaient au volume mort de la colonne. Les teneurs en eau obtenues ($6.10^{-4}\%$ d'eau pour un mélange n-heptane:acétate d'éthyle, 99:1, v/v) étant défavorables à l'analyse, l'utilisation de solvants isoactifs ne semble pas adaptée à l'analyse. Afin d'obtenir des séparations répétables, nous avons choisi de reproduire le plus fidèlement possible (en tenant compte des variations de teneurs en eau des solvants d'une bouteille à une autre) l'évolution de l'activité du support au cours de la séparation.

II. Retour à l'équilibre entre deux injections

L'objectif de ce travail est l'évaluation de la compatibilité des solvants alternatifs au n-heptane et au chloroforme avec la NPLC mais aussi leur apport, en termes de sélectivité et de ϵ , sur la séparation de classes lipidiques. Pour ce faire, différentes compositions de gradient binaire et ternaire vont être testées. Il est essentiel de pouvoir revenir au même état d'activation stable et contrôlé à chaque nouvelle injection. L'état d'activation du support n'est pas le même au début et à la fin d'un gradient, et en fonction du système solvant utilisé l'état d'activation du support en début de gradient n'est pas non plus le même. De plus, la différence de ϵ et de polarité des différents solvants complexifie la démarche (tableau AI.1).

La procédure mise en place tient compte des différences de propriétés physico-chimiques des différents solvants. Dans le cas d'un mélange de solvant, il y a compétition entre les molécules de solvant sur les sites actifs du support. Cette compétition tient compte de l'affinité des molécules de solvants avec les silanols libres mais aussi de la taille de ces molécules. En effet, plus un solvant possède un ϵ élevé plus il est difficile de le désorber par un solvant de ϵ inférieure (l'adsorption d'une molécule de solvant B nécessitant la désorption au préalable d'une molécule de solvant A pour des molécules de taille voisine). Or la compétition entre les solvants utilisé en gradient ternaire est à l'avantage du mélange hydro-organique (éthanol:eau, 95:5, v:v). Le temps nécessaire à la désorption de l'éthanol par le n-heptane est important (plusieurs heures dans nos conditions d'analyses) et nécessite de grands volumes de solvants. La procédure retenue consiste donc en l'élution d'un mélange comportant 50% de solvant A et 50% de solvant B nécessaire pour désorber le solvant le plus polaire. Le retour à 100% de solvant A est réalisé progressivement afin de favoriser la désorption du solvant B (10 minutes avec une pente de 5%/min) suivi d'une élution de 30 minutes de 100% de solvant A. Cette procédure permet ainsi d'obtenir des séparations répétables avec des coefficients de variations de temps de rétention des lipides inférieurs à 4% pour les analyses en gradient binaire et ternaire indépendant des solvants impliqués dans la composition du gradient.

Il est important de noter que l'état d'activation ainsi obtenu est propre au système solvant étudié ainsi qu'à la programmation de gradient utilisé. Pour effectuer des comparaisons en termes d'efficacité de séparations, il est essentiel que chaque série de gradient débute avec strictement le même état d'activation afin de ne pas biaiser les résultats. Une méthode de contrôle de l'activité du support a dû être développée.

III. Activation de la silice

Deux méthodes peuvent être utilisées : activation par les solvants et activation par séchage de l'adsorbant ou plutôt de la colonne chromatographique (dans notre cas). Ces deux méthodes ont été testées et optimisées pour les besoins de l'analyse.

1. Activation par les solvants

Le retour à un état d'équilibre concernant des analyses impliquant le mélange éthanol:eau et le n-heptane a montré la nécessité de faire intervenir un solvant de milieu de polarité afin de diminuer le temps d'équilibre (les volumes de solvants) mais aussi de favoriser la désorption du mélange ainsi que l'adsorption du n-heptane. Les deux solvants et un mélange de solvants ont été testés. Les protocoles utilisés sont détaillés dans le tableau AI.2.

Tableau AI.2 : Protocoles d'activation de la silice réalisés à un débit de 1mL/min.

Protocole	ϵ élevée 50V ₀	ϵ intermédiaire 30V ₀	ϵ faible 260V ₀	Témoin de contrôle
1		Acétone		nitrobenzène à 0,25g/l (n=3)
2	Éthanol:eau	Acétate d'éthyle	n-heptane	
3	95:5, v:v	toluène:acétone (60:40, v:v)		

Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la figure AI.1. Les chromatogrammes obtenus suite au protocole 1 (Figure AI.1.A) présentent un facteur de rétention k moyen (k_{moy}) égal à 8,1 avec un coefficient de variation (CV) supérieur à 12%. Avec le protocole n°2 (Figure AI.1.B), k_{moy} est égal à 3,1 et CV est supérieur à 8%. Le protocole n°3 permet d'obtenir de meilleurs résultats (Fig 1.C.). k_{moy} est égal à 9,48 et CV est inférieur à 1%. En termes d'efficacité, le protocole n°3 permet d'obtenir un nombre de plateaux (N) plus élevé (N= 6999) contrairement aux protocoles n°1 (N = 6700) et n°2 (N=5900). Le protocole permet donc de réactiver de façon contrôlée notre colonne chromatographique. Concernant la reproductibilité de la méthode, elle s'avère insuffisante. La transposition de la méthode sur une seconde chaîne HPLC a montré qu'elle était machine dépendante (volume de délai différent d'une chaîne à une autre). De plus l'utilisation du toluène ne permet pas de rester cohérent avec notre démarche de remplacer les solvants considérés comme toxiques.

2. Activation par séchage thermique

La seconde méthode implique de sécher l'adsorbant. Des recherches bibliographiques montrent que, concernant les silices utilisées en chromatographie, l'eau physisorbée est

entièrement éliminée par un chauffage compris entre 150°C et 200°C avec un début de condensation des groupes hydroxyles autour de 200°C.

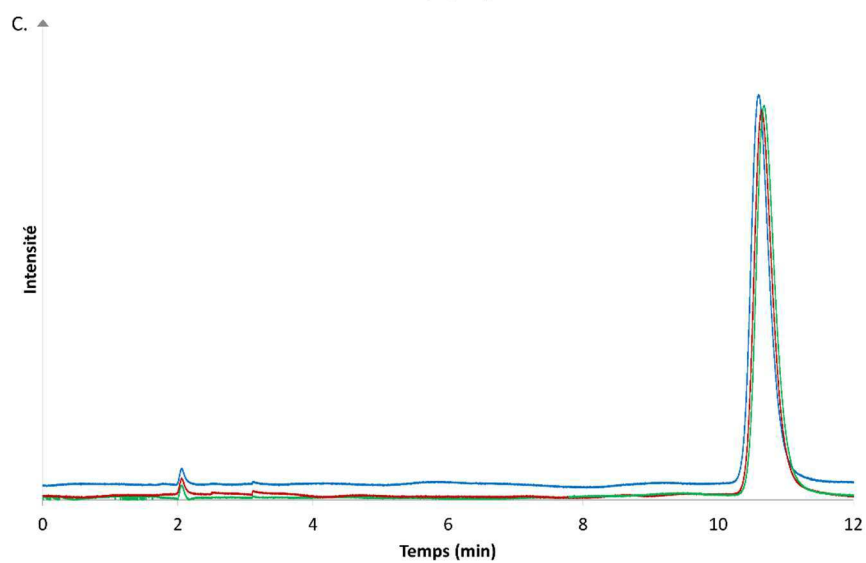
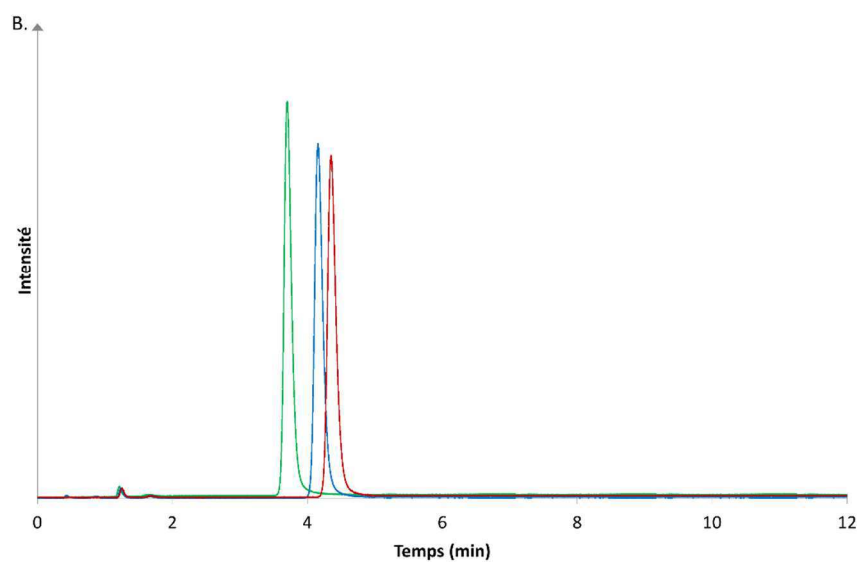
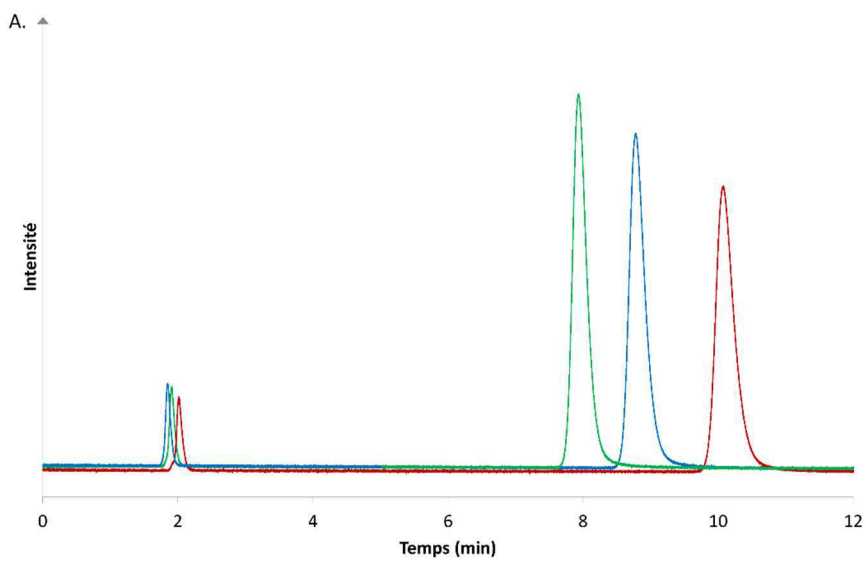


Figure AI.1 : Superposition de trois chromatogrammes correspondant aux injections de nitrobenzène (0,25g/L) par NP-HPLC-UV. Conditions HPLC : colonne Inertsil SIL-150A (150 x 2,1 mm, 5 µm, 150Å), débit 0,5mL/min, température du four 40°C, phase mobile n-heptane sous conditions isocratique. $V_{\text{injection}} = 1 \mu\text{L}$, Détection UV : $\lambda = 254 \text{ nm}$. Les chromatogrammes présentés sur la figure A correspondent au protocole 1 et ceux sur la figure B correspondent au protocole 2.

Compte-tenu de la structure de la colonne, nous avons fixé la température de chauffage à 100°C afin de limiter l'échauffement des joints en PEEK potentiellement contenus dans la colonne. Les données fournisseurs nous indiquent une température d'utilisation maximale de 60°C. Une étude portant sur la résistance à la flexion du PEEK en fonction de la température montre une réponse linéaire pour une plage de température allant de 0 à 125°C au-delà on assiste à une diminution de la résistance à la flexion jusqu'à une annulation.

Afin de pouvoir évaluer l'impact du chauffage sur l'activité du support, un plan d'expériences à 2³ essais a été utilisé. Les paramètres choisis sont la durée du séchage (1h00 ou 16h00), le solvant utilisé pour la désactivation (acétone ou éthanol) et le volume de solvant utilisé (20V₀ ou 100V₀). La réalisation de points centraux étant difficilement réalisable, le plan a été dupliqué. Les réponses choisies pour ce plan sont la rétention (tr), l'efficacité (N), et l'asymétrie (ASY). Elles ont été déterminées pour deux conditionnements : 100V₀ de n-heptane puis 100V₀ d'un mélange n-heptane:isopropanol (98:2, v:v) sera réalisé et son efficacité sera mesuré par injection de nitrobenzène. Le détail de chaque essai et les résultats associés sont présentés dans le tableau AI.3.

Tableau AI.3 : Plan d'expériences et résultats.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Durée	1	16	1	16	1	16	1	16	1	16	1	1
Solvant	E	E	A	A	E	E	A	A	A	A	E	E
V _{solvant}	20	20	20	20	100	100	100	100	20	20	20	100
Tr _{NB,1}	1,437	1,507	1,97	4,617	1,483	2,23	1,677	1,69	4,63	6,7	4,387	2,423
N ₁	2902	3198	4101	5523	3115	3977	3386	3588	4710	3813	4764	4141
ASY ₁	1,559	1,616	1,493	1,878	1,835	1,681	1,595	1,573	2,047	2,835	1,831	1,833
Tr _{NB,2}	1,2	1,197	1,197	1,22	1,207	1,217	1,203	1,197	1,23	1,21	1,21	1,217
N ₂	2570	2595	2713	3084	2920	2382	2627	2552	2592	2674	2658	2633
ASY ₂	1,486	1,525	1,426	1,435	1,404	1,494	1,484	1,491	1,764	1,45	1,442	1,542

Les résultats ne montrent pas d'effets significatifs des trois paramètres sur les réponses choisies. Un autre point important est que l'utilisation du séchage permet d'obtenir des temps de rétention stables (CV<1%) après le conditionnement et cela dans tous les cas étudiés. Cependant de façon générale, les temps de rétention obtenus sont relativement courts à

l'exception des temps observés pour les essais 4, 9, 10 et 11. L'utilisation de l'acétone semble malgré tout favoriser la rétention.

3. Développement d'une méthode de désactivation/activation

3.1. Protocole n°4

Cette méthode se base sur les différents résultats obtenus jusqu'alors. Une première étape de désactivation est nécessaire pour éliminer les impuretés polaires, ou une classe de lipides polaires qui ne seraient pas élués au cours de l'analyse. Un second lavage est envisagé pour éliminer l'éthanol ou l'eau adsorbés sur la silice. Ensuite, l'adsorbant serait séché par chauffage dans un four à 100 °C pendant une heure sous un courant d'azote. Pour finir, le conditionnement de la colonne sera effectué en rinçant la silice avec 100V₀ de n-heptane. Une procédure a été établie en tenant compte de ces différents points. Le protocole n°4 est détaillé ci-dessous:

- 1) Percolation de 20*V₀ d'éthanol absolu : élimination des composés non élués au cours des différentes analyses,
- 2) Percolation de 100*V₀ de 2,2-diméthoxypropane : ce produit, au contact d'eau, réagit et forme de l'acétone et du méthanol – élimination de l'eau résiduelle,
- 3) 1 heure de séchage sous flux d'azote à 100°C : élimination des solvants résiduels et activation de l'adsorbant,
- 4) Conditionnement : 100*V₀ du solvant de début de gradient (ici du n-heptane).

Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la figure AI.2.

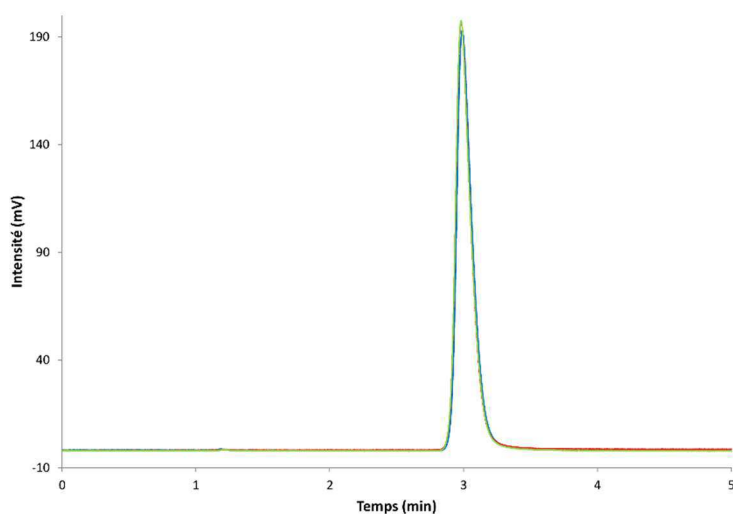


Figure AI.2 : Superposition de trois chromatogrammes correspondant aux injections de nitrobenzène (0,25g/L) par NP-HPLC-UV. Conditions HPLC : colonne Inertsil SIL-150A (150 x 2,1 mm, 5 µm, 150Å), débit 0,5mL/min, température du four 40°C, phase mobile : n-heptane en conditions isocratique, V_{injection} = 1µL, détection UV : λ = 254nm, activation : protocole n°4.

Les résultats obtenus montrent qu'un état d'équilibre est atteint et répétable (CV <1%). Ceci-dit la rétention et l'efficacité obtenues par cette procédure sont plus faibles ($k_{\text{moyen}} = 2,01$ et $N = 5550$), bien que plus stable, que celles obtenues par activation par les solvants. Cette procédure a été reproduite sur un second système HPLC. Un CV <3% a été constaté concernant la répétabilité des k . Afin de déterminer l'efficacité de cette méthode en termes de stabilité des séparations, un test statistique a été appliqué aux valeurs de k nitrobenzène. La valeur moyenne de k était de 1,96. Les variations jour à jour ont été trouvées homogènes avec un risque de 5%. Le coefficient de variation était de 3,95%.

3.2. Adaptabilité de la méthode

Parallèlement deux autres facteurs ont été étudiés. Il est important de savoir comment se comporte cette méthode lorsque l'on est amené à changer de colonne chromatographique ou bien lorsque l'on remplace le n-heptane par l'HMDS. Deux colonnes ont alors été comparées : INERTSIL 150 Å (150x2,1mm ; 5µm) et NUCLEODUR 100Å (150x2,0mm ; 5µm). Le second paramètre concerne l'impact de la nature du solvant de conditionnement. En effet, dans cette étude il est question de remplacer le n-heptane par des solvants alternatifs issus de la chimie verte (HMDS). Il est donc important de savoir si cette méthode conserve son efficacité avec d'autres solvants Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la figure AI.3.

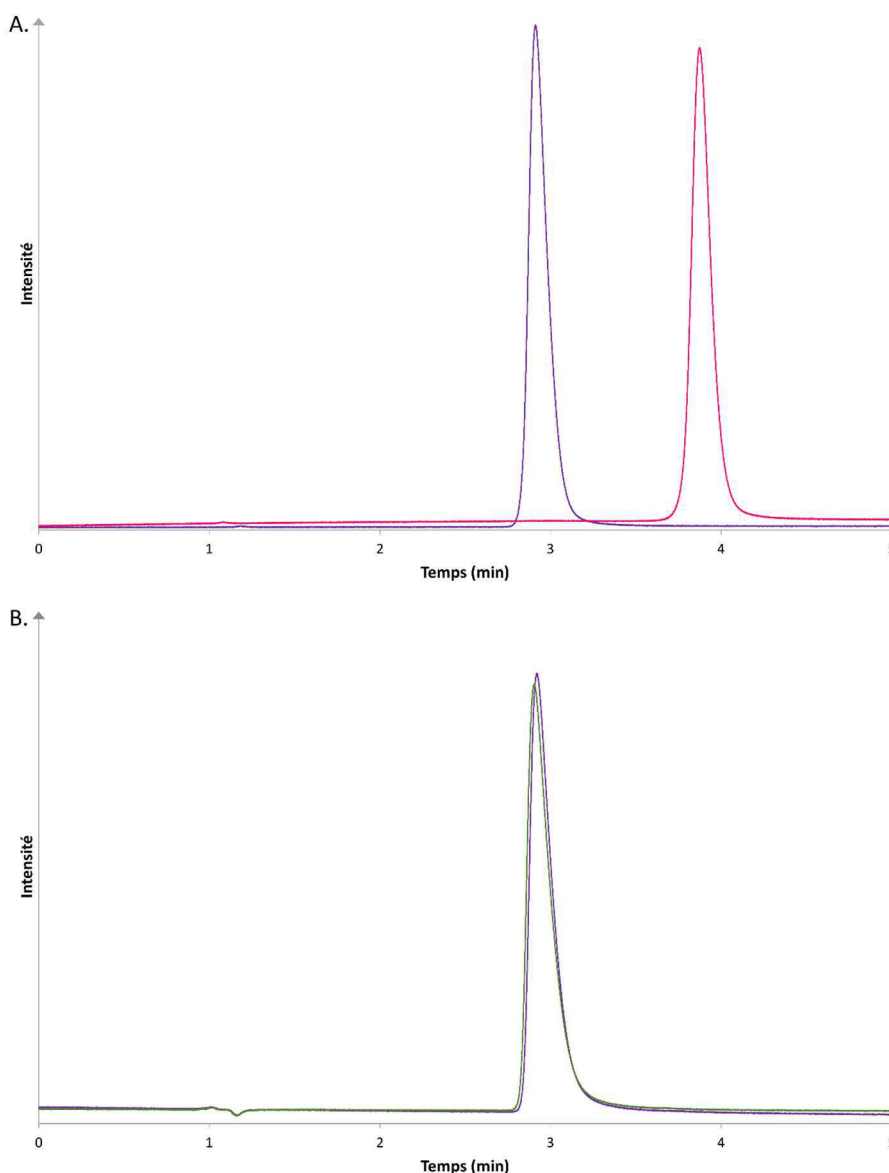


Figure AI.3 : (A) Elution du nitrobenzène avec la colonne Inertsil (violet) et la colonne Nucléodur (rose) par NP-HPLC-UV. (B) Superposition de trois chromatogrammes correspondant aux injections de nitrobenzène (0,25g/L) par NP-HPLC-UV réalisé avec de l'HMDS comme solvant faible. Conditions HPLC : colonne Inertsil SIL-150A (150x2,1 mm, 5 μ m, 150A), colonne Nucléodur 100A (150x2,0 mm, 5 μ m, 100A) débit 0,5mL/min, température du four 40°C, phase mobile n-heptane (A) ou HMDS (B) sous conditions isocratique. $V_{injection} = 1 \mu$ L, détection UV : $\lambda = 254$ nm, activation : protocole n°4.

Les résultats obtenus avec la colonne Nucléodur (Figure AI.3.A) ont été comparé à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec la colonne Inertsil. En termes d'efficacité, la séparation avec la colonne Nucléodur est comparable en termes d'efficacité ($N = 5455$) et on observe un k_{moyen} supérieur (2,81). La répétabilité de la procédure a été évaluée et un $CV < 2\%$ a été observé.

Concernant l'utilisation de l'HMDS comme solvant faible, il s'avère compatible avec la méthode. En effet, les mesures d'efficacité ($N = 5409$) et de rétention ($k_{moyen} = 2,02$) montrent des résultats similaires à ceux obtenus avec le n-heptane. De plus la répétabilité de la méthode avec ce solvant est acceptable ($CV < 2\%$).

ANNEXE II : STRUCTURES DES LIPIDES ET COMPOSES CHIMIQUES ETUDIÉS

Figure AII.1: Acylated steryl glucoside (ASG)

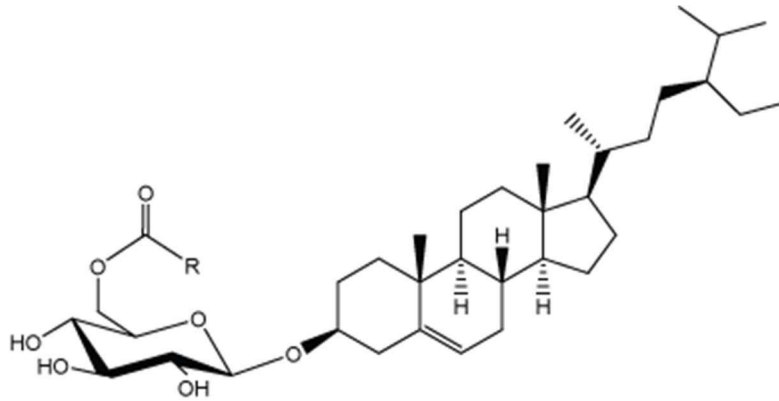


Figure AII.2: Cholesteryl tripalmitate (CE)

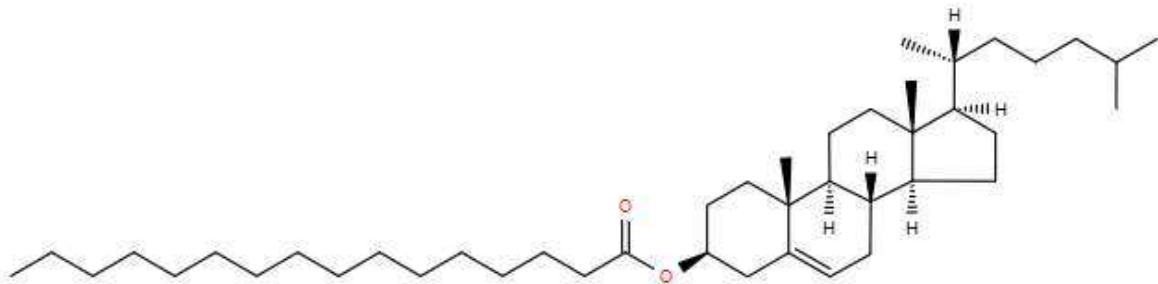


Figure AII.3: Cholesterol (CO)

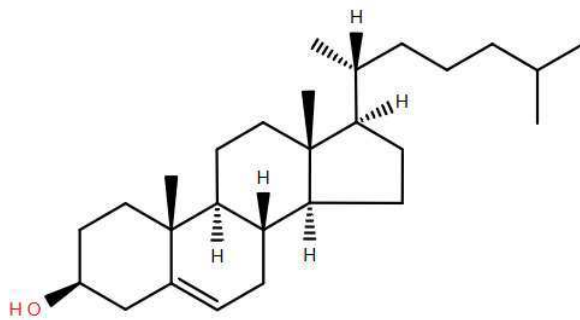


Figure AII.4: 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (DG)

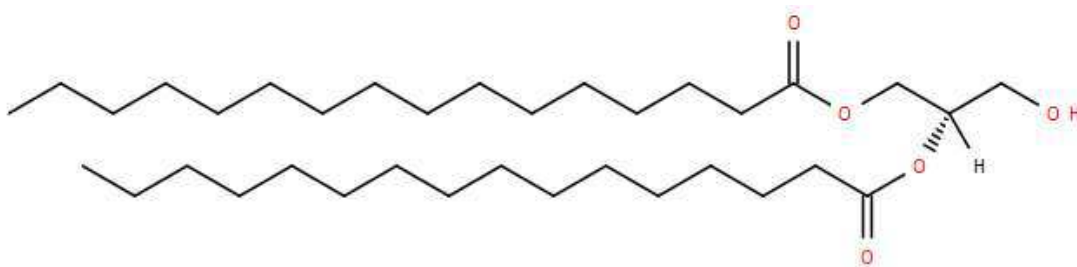


Figure AII.5: Digalactosyldiacylglycerol (DGDG)

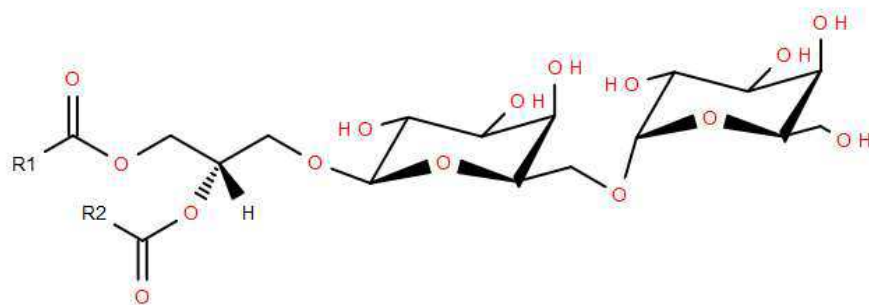


Figure AII.6: Palmitic acid (FA)

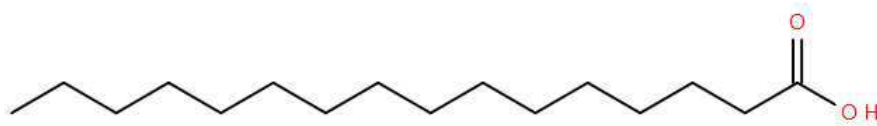


Figure AII.7: Methyl stearate (FAME)

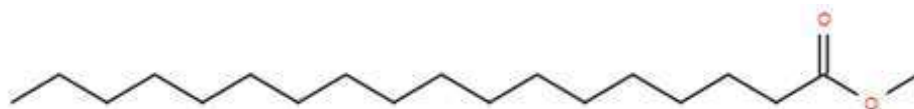


Figure AII.8: Glucosylceramide (GluCer)

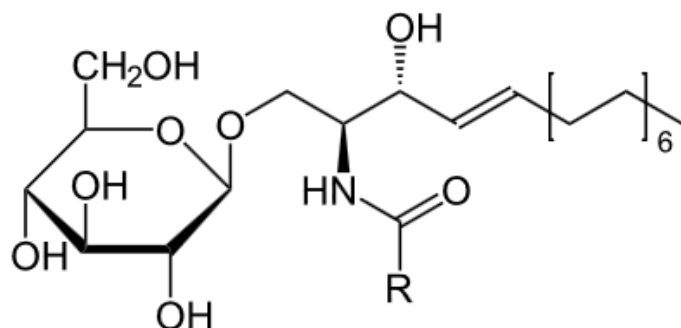


Figure AII.9: 1-stearoyl-rac-glycerol (MG)

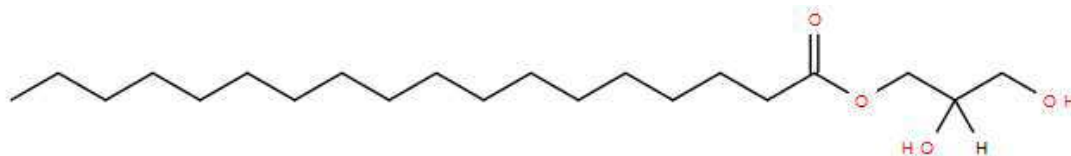


Figure AII.10: Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)

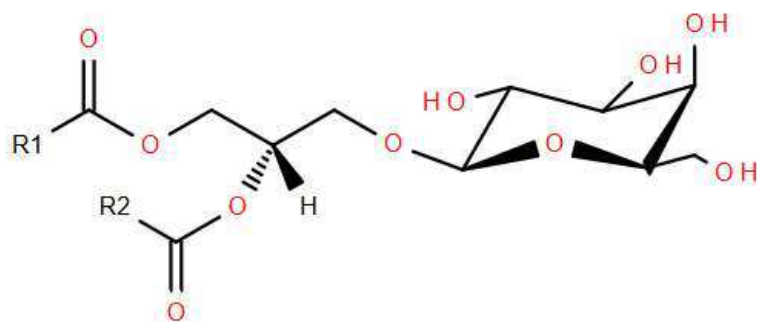
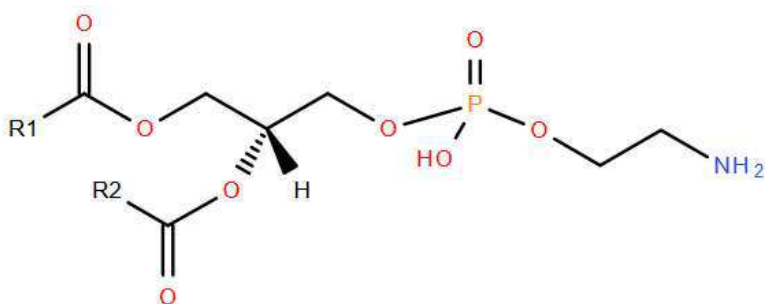
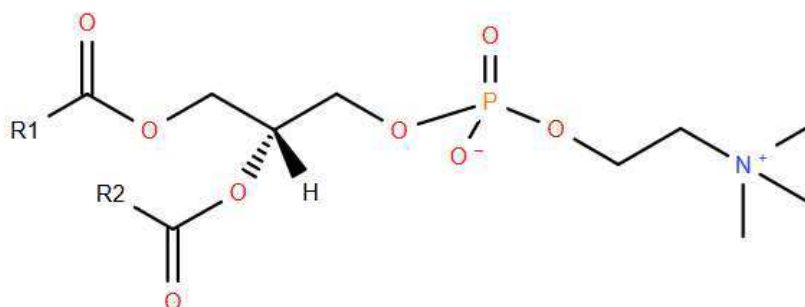
Figure AII.11: L- α -phosphatidylethanolamine (PE)Figure AII.12: L- α -phosphatidylcholine (PC)

Figure AII.13: Stigmasterol (ST)

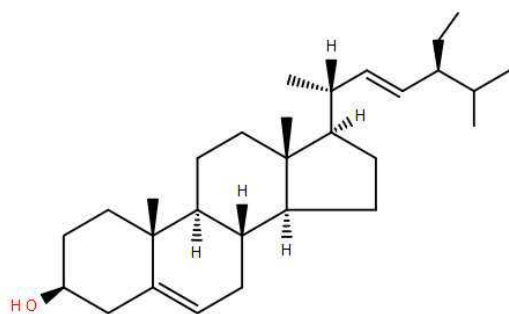


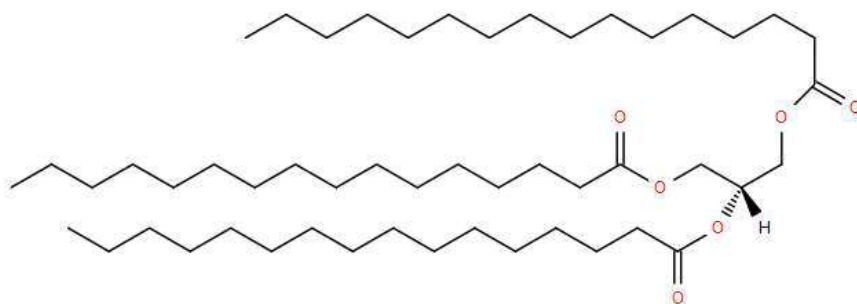
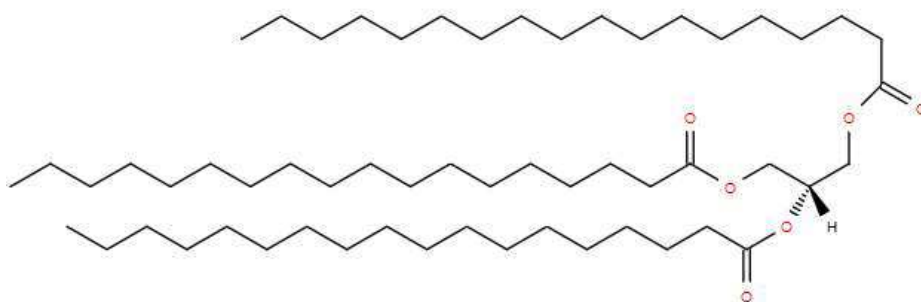
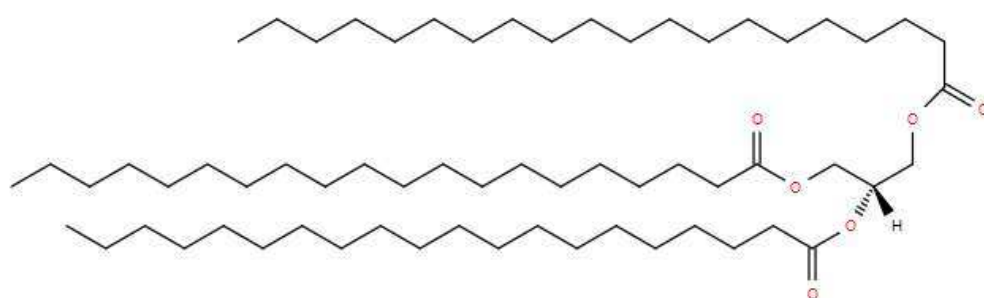
Figure AII.14: Glycerol tripalmitate (TG ou TG₁)Figure AII.15: Glycerol tristearate (TG₂)Figure AII.16 : Glycerol triarachidate (TG₃)

Figure AII.17 : Warfarin

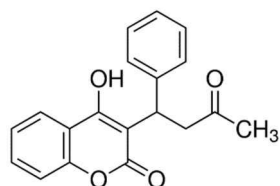
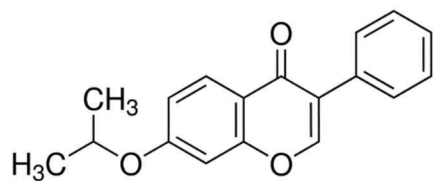


Figure AII.18 : Ipriflavone



ANNEXE III : STRUCTURES DES SOLVANTS ALTERNATIFS

Figure A.III.1: Hexamethyldisiloxane (HMDS)

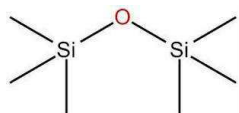


Figure A.III.2: Isopentyl acetate (IA)

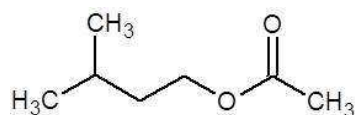


Figure A.III.3: Cyclopentyl methyl ether (CPME)

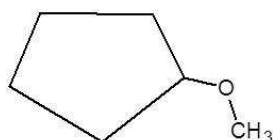
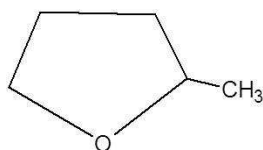


Figure A.III.4: 2-methyltetrahydrofuran (2-MeTHF)



ANNEXE IV : PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

Publication acceptée

- * Alternative solvents for improving the greenness of normal phase liquid chromatography of lipid classes

*Nolwenn Prache, Sonia Abreu, Patrick Sassi, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade
Journal of Chromatography A – 1464 (2016) 55-63*

Publications en préparation

- * Evaluation of alternative solvents for non-polar lipid classes separation by supercritical fluid chromatography and evaporative light-scattering detection

Nolwenn Prache, Yijun Zhou, Patrick Sassi, Pierre Chaminade, Didier Thiébaud

- * Evidence of impurities in the solvents used for normal phase liquid chromatography

Nolwenn Prache, Sana Tfaily, Audrey Solgadi, Sonia Abreu, Patrick Sassi, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

- * Evaluation of alternative solvents for lipid classes separation by normal phase liquid chromatography and mass spectrometry

Nolwenn Prache, Sonia Abreu, Patrick Sassi, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

Communications orales

- * Techniques chromatographiques bidimensionnelles en phases liquide et supercritique pour la cartographie du lipidome - Séminaire du DIM Analytics, Paris, décembre 2014

Nolwenn Prache, Patrick Sassi, Sonia Abreu, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

- * Evaluation des solvants alternatifs pour la chromatographie d'adsorption et l'analyse des lipides par classe de polarité - Congrès SEP15, Paris, avril 2015

Nolwenn Prache, Patrick Sassi, Sonia Abreu, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

- * Solvants alternatifs pour l'analyse des lipides par chromatographie liquide verte en phase normale - Séminaire du DIM Analytics, Paris, Janvier 2016

Nolwenn Prache, Patrick Sassi, Sonia Abreu, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

- * Evaluation des solvants alternatifs pour la chromatographie de phase normale et l'analyse des lipides par classe - Club Jeunes de l'AFSEP, Rouen, 2016

Nolwenn Prache, Patrick Sassi, Sonia Abreu, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

- * Solvants alternatifs pour l'analyse de lipides par chromatographie liquide en phase normale - Journée scientifique de la Fédération de Chimie Physique de Paris-Saclay, Orsay, Juin 2016

Nolwenn Prache, Patrick Sassiati, Sonia Abreu, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

Communications par affiches

- * Mise en évidence des impuretés dans les solvants apolaires [commerciaux] - Congrès SEP15, Paris, Avril 2015

Nolwenn Prache, Patrick Sassiati, Sonia Abreu, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

- * Evaluation of Alternative Solvents in Adsorption Chromatography and Lipid Polarity Classes Analysis - HPLC 2015, Genève, Juin 2015

Nolwenn Prache, Patrick Sassiati, Sonia Abreu, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

- * Evaluation des solvants alternatifs pour la chromatographie d'adsorption et l'analyse des lipides par classe de polarité - Journée de l'école doctorale, Orsay & Journée de la recherche de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Novembre 2015

Nolwenn Prache, Patrick Sassiati, Sonia Abreu, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

- * Alternative solvents in normal phase Chromatography and Lipid Classes Analysis - ISC 2016, Cork, September 2016

Nolwenn Prache, Patrick Sassiati, Sonia Abreu, Didier Thiébaud, Pierre Chaminade

Titre : Apport des solvants alternatifs pour la cartographie du lipidome par chromatographie

Mots clés : Lipides, Solvants alternatifs, Chromatographie

Résumé : Le développement du concept de chimie analytique « verte » représente l'une des préoccupations majeures du tout début du 21^{ème} siècle ; elle a amené les différents acteurs du domaine à s'interroger sur le bien-fondé du développement de méthodes ayant un impact sur l'environnement et sur l'homme.

Dans le domaine de l'analyse des lipides, les séparations par classe nécessitent de travailler sur une très large gamme de polarité, conséquence directe de la diversité des structures et des solubilités mises en jeu. La chromatographie en phase normale (NPLC) permet de réaliser l'élution des composés par ordre de polarité croissante. La mise en solution des classes lipidiques nécessite le recours à des mélanges de solvants incluant le chloroforme, le n-heptane, dichlorométhane. Les solvants organiques classiquement utilisés en NPLC, bien que performants, soulèvent aussi de nombreux problèmes liés à leur toxicité pour l'homme et l'environnement, leur volatilité, ou encore leur origine quand ils sont issus des hydrocarbures fossiles. Une des voies envisagée est la substitution de ces solvants par des solvants alternatifs, tels ceux proposés par les différents acteurs de la chimie verte.

L'intérêt suscité par ces solvants est prometteur en termes de réduction de l'utilisation de solvants avec un impact significatif sur l'environnement. Les propriétés de la chromatographie en phase dioxyde de carbone supercritique sont semblables à la NPLC et offrent également une alternative verte à cette méthode.

Ce travail a mis en évidence que des méthodes de séparation pourraient être développées avec des solvants alternatifs au n-heptane, au méthanol et au chloroforme. Leur utilisation est compatible avec la chromatographie liquide et la chromatographie supercritique et offre une meilleure sélectivité en termes de séparation des classes de lipides. La compatibilité de solvants alternatifs avec ELSD et la spectrométrie de masse a également été évaluée, ce qui a montré que l'absence de pureté suffisante pourrait être un problème. Cependant, ce problème a également été observé avec l'utilisation de solvants commerciaux, qui présentaient des impuretés telles que des acides gras, des polymères et des antioxydants.

Title : Contribution of alternative solvents for mapping lipidome by chromatography

Keywords : Lipids, Alternative Solvents, Chromatography

Abstract: Green analytical chemistry development represents one of the main issues of the 21st century. Many investigators in analytical chemistry are actually involved in the development of well-established analytical methods that prevent irreversible damage to humans and environment. In the domain of lipid analysis, structural diversity as well as difference in solubility of these compounds is leading to work with a very large polarity range to separate lipids by classes. The normal-phase liquid chromatography (NPLC) allows realising elution of compounds in order of increasing polarity.

The solubilisation of lipid classes requires the use of a mixture of several solvents, among them chloroform, n-heptane, dichloromethane.

Moreover, organic solvents traditionally used in NPLC, although well performing are raising different problems due to their original source, i.e. fossil hydrocarbons, volatility and toxicity for humans and environment.

One of the ways to avoid such solvents is the substitution with alternative solvents, as proposed by various players in green chemistry. The interest raised by these solvents, is promising in terms of reduction of solvent use with a significant environmental impact. The properties of supercritical fluid chromatography using CO₂ are similar to NPLC and also offer a greener alternative to this method.

This work has highlighted that separation methods could be developed with alternative solvents to n-heptane, methanol and chloroform. Their use is compatible with liquid and supercritical chromatography and offer better selectivity in terms of separation of lipid classes. The compatibility of alternative solvents with ELSD and mass spectrometry was also evaluated, which showed that the unavailability of sufficient purity could be an issue. However, this problem was also observed with the use of commercial solvents, which presented impurities such as fatty acids, polymers and antioxidants.

