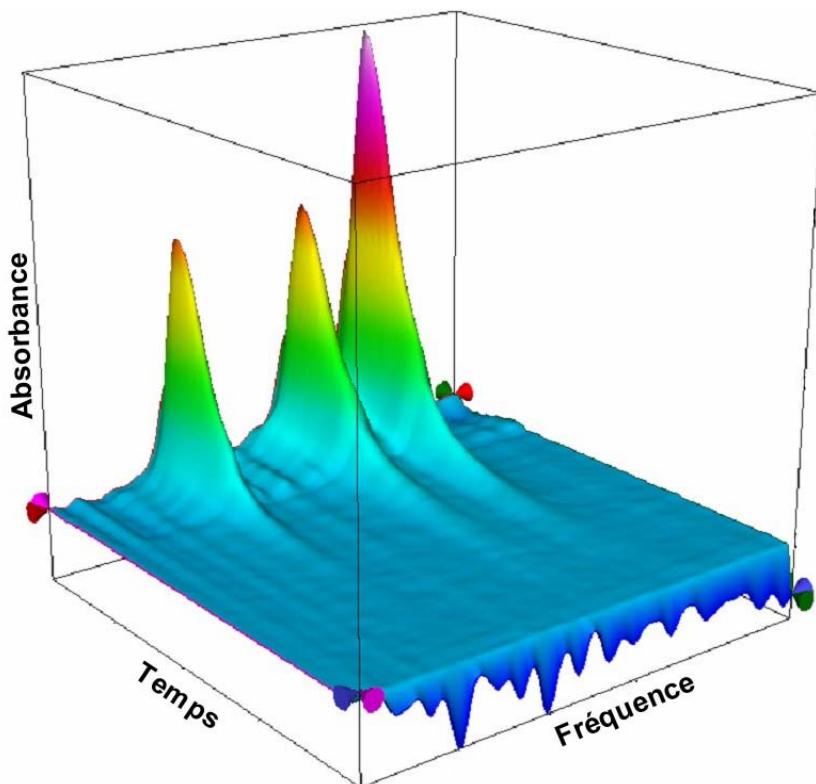




UNIVERSITE DE LIEGE

Faculté de Médecine
Laboratoire de Chimie Analytique
Professeur Ph. Hubert

**ETUDE EN TEMPS REEL DU PROCESSUS D'EXTRACTION DE
LA TAGITININE C EN FONCTION DES CARACTERISTIQUES
PHYSICO-CHIMIQUES DU CO₂ SUPERCRITIQUE A L'AIDE DE
FIBRES OPTIQUES COUPLANT UN SPECTROPHOTOMETRE IRTF
A UN EXTRACTEUR A FLUIDE SUPERCRITIQUE**



Eric ZIEMONS
Pharmacien
Assistant à l'Université de Liège

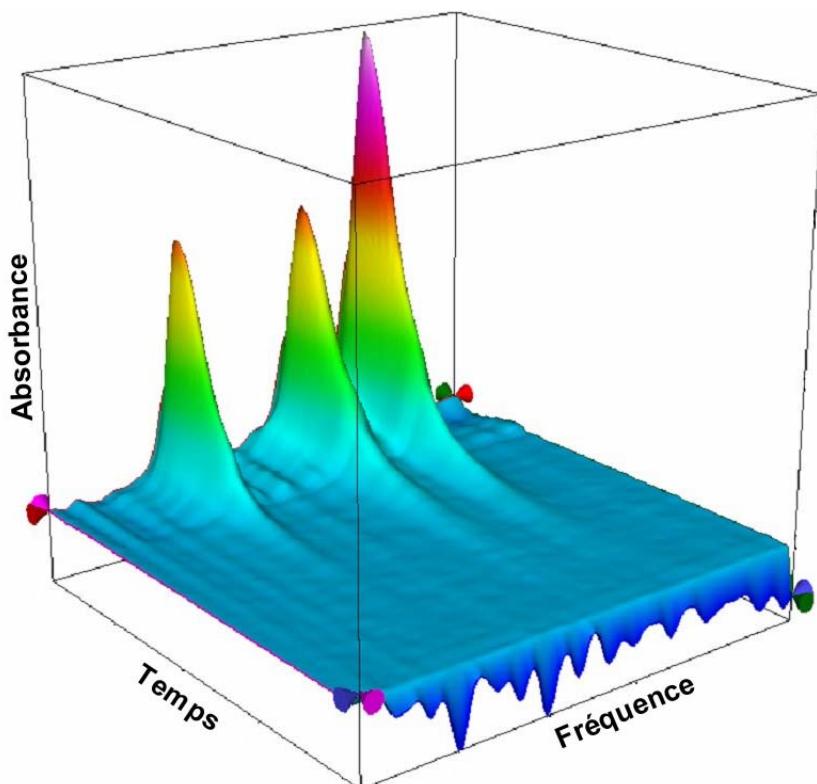
**Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Pharmaceutiques**

Année académique 2006-2007

UNIVERSITE DE LIEGE

*Faculté de Médecine
Laboratoire de Chimie Analytique
Professeur Ph. Hubert*

**ETUDE EN TEMPS REEL DU PROCESSUS D'EXTRACTION DE
LA TAGITININE C EN FONCTION DES CARACTERISTIQUES
PHYSICO-CHIMIQUES DU CO₂ SUPERCRITIQUE A L'AIDE DE
FIBRES OPTIQUES COUPLANT UN SPECTROPHOTOMETRE IRTF
A UN EXTRACTEUR A FLUIDE SUPERCRITIQUE**



Eric ZIEMONS
*Pharmacien
Assistant à l'Université de Liège*

**Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Pharmaceutiques**

Année académique 2006-2007

Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de celui-ci.

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur le Professeur L. Thunus pour son accueil au sein du service de Chimie Analytique. Je le remercie également pour le suivi, les idées et les conseils apportés tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer mes sentiments de sincère gratitude à Monsieur le Professeur L. Angenot pour son aide précieuse et ses conseils éclairés dans le domaine de la Pharmacognosie.

Je remercie Monsieur le Professeur Ph. Hubert de m'avoir permis de poursuivre mes recherches. Ses qualités humaines et sa vision pragmatique des défis auxquels la Chimie Analytique est confrontée, ont grandement facilité la finalisation de ce travail.

Je remercie également Monsieur R. Lejeune, Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Chef de travaux, pour sa disponibilité, son expérience et ses conseils judicieux.

Mes sincères remerciements s'adressent à Messieurs les Membres du Comité de Thèse qui m'ont prodigué de précieux conseils lors de la réalisation de ces recherches, ainsi qu'à Messieurs les Membres du Jury qui me font l'honneur de juger cette thèse.

Il me tient à cœur de remercier les personnes qui, de près ou de loin, ont collaboré à ce travail et en particulier :

- *Monsieur G. Dive, Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Chercheur Qualifié du FNRS, qui m'a fait partager ses connaissances dans le domaine de la modélisation moléculaire ;*
- *Monsieur le Professeur Y. Lion pour ses conseils dans le domaine de la physique des matériaux ;*

- Monsieur V. Barillaro, Docteur en Sciences Pharmaceutiques, pour son aide lors de la réalisation de l'interfaçage entre le CO₂ supercritique et l'infrarouge moyen et lors de l'étude des complexes formés avec les cyclodextrines ;
- Monsieur M. Frederich, Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Chercheur Qualifié au FNRS, pour l'acquisition et l'interprétation des spectres RMN en phase liquide ;
- Monsieur E. Rozet, Ingénieur Agronome, qui m'a fait partager ses connaissances dans le domaine de la validation et de la planification expérimentale ;
- Tous les membres du service de Chimie Analytique pour leur amabilité et leur soutien et plus particulièrement les nouvelles recrues pour leur dynamisme, leur jovialité et leur amitié.

Enfin je voudrais dédier ce travail à tous les membres de ma famille et en particulier à ma femme et ma fille. La gentillesse, la patience et le soutien de tous les instants dont ils ont fait preuve à mon égard durant la réalisation et la rédaction de cette thèse ont été pour moi un encouragement constant.

Table des matières

Chapitre I : Objectifs du travail.....	1
Chapitre II : Les fluides supercritiques	4
II.1 Introduction	4
II.2 Principe.....	4
II.3 Propriétés des fluides supercritiques.....	5
II.4 Le CO ₂ supercritique	6
II.4.1 Le pouvoir solvant à géométrie variable.....	6
II.5 Les applications des technologies supercritiques.....	10
II.5.1 L'extraction par fluide supercritique.....	10
II.5.1.1 L'influence de la matrice	11
II.5.1.2 La collection	13
II.5.1.2.1 Condensation	13
II.5.1.2.2 Barbotage dans un solvant	13
II.5.1.2.3 Fixation sur une phase stationnaire	14
II.5.1.3 Le couplage.....	16
II.5.2 La chromatographie en phase supercritique	18
II.5.3 Réactions chimiques en phase supercritique	18
II.5.4 Le traitement de solides	19
II.5.4.4 L'imprégnation.....	19
II.5.4.5 La micronisation et l'encapsulation	20
II.6 Conclusion.....	21
II.7 Bibliographie	22
Chapitre III : La spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier.....	31
III.1 Introduction	31
III.2 Principe.....	31
III.2.1 Vibrations d'élongation	31
III.2.2 Vibrations de déformation	33
III.3 Appareillages	34
III.4 Avantages.....	36
III.5 Limitations.....	37
III.6 Mesure en infrarouge.....	38
III.6.1 Echantillons gazeux	38
III.6.2 Echantillons solides et liquides.....	39
III.6.2.1 Pastille de KBr.....	39
III.6.2.2 Travail en solution	39
III.7 Applications qualitatives	42
III.7.1 La spectroscopie infrarouge	42
III.7.2 La spectroscopie infrarouge de corrélation (2D IR).....	42
III.8 Applications quantitatives	43
III.8.1 Dosage en solution.....	43
III.8.2 Les couplages	44
III.8.2.1 Le couplage entre l'IRTF et la chromatographie en phase gazeuse.....	44
III.8.2.2 Le couplage entre l'IRTF et l'analyse thermique	45
III.9 Conclusion	45
III.10 Bibliographie	46

Table des matières

Chapitre IV : FTIR measurement of tagitinin C after solvent extraction from <i>Tithonia diversifolia</i>	51
IV.1 Introduction.....	52
IV.2 Experimental	53
IV.2.1 Apparatus and reagents.....	53
IV.2.2 Plant material	54
IV.2.3 Procedure	54
IV.3 Results and discussion.....	55
IV.3.4 Validation of the FTIR spectroscopy method	57
IV.4 References	61
Chapitre V : Supercritical carbon dioxide extraction of tagitinin C from <i>Tithonia diversifolia</i>.....	63
V.1 Introduction.....	64
V.2 Experimental	64
V.2.1 Reagents.....	64
V.2.2 Plant material	65
V.2.3 Apparatus.....	65
V.2.4 Experimental procedure.....	66
V.2.4.1 Particle size analysis	66
V.2.4.2 Supercritical fluid extraction.....	66
V.2.4.3 Soxhlet extraction with dichloromethane	67
V.2.4.4 Maceration and lixiviation with ether.....	67
V.2.4.5 Quantification of tagitinin C by FTIR	67
V.3 Results and discussion.....	67
V.3.1 Validation of the FTIR spectroscopy method	67
V.3.2 Tithonia diversifolia extracts by SFE	69
V.3.3 Distribution of tagitinin C in the plant	72
V.3.4 Effect of particle size on the extract obtained by SFE.....	73
V.3.5 Comparison of the different extraction methods	76
V.4 Conclusion.....	77
V.5 References	78
Chapitre VI : Study of the physicochemical properties in aqueous medium and molecular modeling of tagitinin C/cyclodextrin complexes	80
VI.1 Introduction.....	81
VI.2 Experimental	82
VI.2.1 Chemical and reagents	82
VI.2.2 Characterisation of complexes.....	82
VI.2.2.1 Job plots	82
VI.2.2.2 Electrochemical determination.....	83
VI.2.2.2.1 Differential pulse polarography	83
VI.2.2.2.2 Direct current tast polarography (DC _{tast.})	84
VI.2.2.3 Photochemical conversion study	84
VI.2.2.4 NMR study	85
VI.2.2.4.1 ¹ H-NMR study	85
VI.2.2.4.2 ROESY experiment	85
VI.2.2.5 NMR study	86
VI.3 Results and discussion.....	86
VI.3.1 Stoichiometry of inclusion complexes	86
VI.3.2 Measurement of association constants of inclusion complexes.....	87
VI.3.3 Photochemical conversion of tagitinin C in aqueous medium.....	93
VI.3.4 NMR study	96
VI.3.5 Comparison of the different extraction methods	100

Table des matières

VI.4 Conclusion.....	106
VI.5 References.....	107
Chapitre VII : Optimisation of SFE method on-line coupled to FT-IR spectroscopy for the real-time monitoring of the extraction of tagitinin C in <i>T. diversifolia</i> 110	
VII.1 Introduction.....	111
VII.2 Experimental	112
VII.2.1 Chemicals and reagents	112
VII.2.2 Plant material	112
VII.2.3 High pressure fiber optic flow cell	113
VII.2.4 Apparatus.....	114
VII.2.5 Experimental procedures	114
VII.2.5.1 Determination of tagitinin C by FT-IR	114
VII.2.5.2 Supercritical fluid extraction.....	115
VII.3 Results and discussion.....	115
VII.3.1 Spectral Characteristics on SFE conditions	116
VII.3.2 Extraction curves on SFE conditions	118
VII.3.3 SFE optimization through experimental design approach.....	120
VII.3.4 Qualitative approach of the composition profile of the <i>T. diversifolia</i> extract.	122
VII.4 Conclusion.....	125
VII.5 References	126
Chapitre VIII : Direct determination of tagitinin C in <i>Tithonia diversifolia</i> leaves by on-line coupling of supercritical CO₂ extraction to FT-IR spectroscopy by means of optical fibres 129	
VIII.1 Introduction.....	130
VIII.2 Experimental	131
VIII.2.1 Chemical and reagents	131
VIII.2.2 Plant material	131
VIII.2.3 High pressure fibre optic flow cell	132
VIII.2.4 Apparatus.....	132
VIII.2.5 Experimental procedures	133
VIII.2.5.1 Quantification of tagitinin C by FT-IR.....	133
VIII.2.5.2 Supercritical fluid extraction.....	133
VIII.2.5.3 Preparation of the validation standards	134
VIII.3 Results and discussion.....	134
VIII.3.1 Design of high pressure fibre optic flow cell.....	134
VIII.3.2 Selection of the FT-IR conditions	135
VIII.3.3 Qualitative and quantitative analysis.....	138
VIII.3.4 Validation of the SFE/FT-IR method	140
VIII.4 Conclusion.....	145
VIII.5 References	146
Chapitre IX : Conclusions générales 149	
Résumé.....	154
Summary	156
Annexes.....	158

OBJECTIFS

Chapitre I : Objectifs du travail

Au cours de ces dernières années, l'extraction par les fluides supercritiques (EFSC) se présente de plus en plus comme une alternative aux techniques classiques d'extraction liquide-solide (macération, percolation, lixiviation, extraction assistée par micro-ondes, extraction accélérée par solvant, ...) pour la préparation d'échantillons d'origines diverses. En effet, ces dernières possèdent un certain nombre d'inconvénients tant au niveau de la toxicité des solvants, de la durée, du coût que de la pollution de l'environnement. De plus, l'EFSC peut apporter une amélioration nette du rendement d'extraction et, compte tenu de la sélectivité du fluide supercritique, une amélioration tout aussi significative de la pureté de l'extrait.

Par ailleurs, le potentiel de couplage de l'extraction par les fluides supercritiques à différents systèmes de détection semble très prometteur pour l'analyse en ligne d'une ou de plusieurs molécule(s) cible(s) présente(s) dans le fluide supercritique pendant le processus d'extraction.

L'objectif principal de ce travail sera le couplage de la spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier à l'extraction par les fluides supercritiques et ensuite le développement et la validation d'une méthode originale de dosage en ligne d'une molécule cible dans le CO₂ supercritique (CO₂ SC) après passage de celui-ci au travers d'une cartouche d'extraction contenant une matrice végétale.

A cette fin, nous avons choisi un composé d'intérêt thérapeutique d'origine naturelle, la tagitinine C présente dans les parties aériennes de *Tithonia diversifolia*, comme molécule cible et la spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) comme système de détection compte tenu de sa spécificité, de son universalité et de son caractère non destructeur.

Nos travaux débuteront par la mise au point d'une méthode de dosage en différé de la molécule cible dans des extraits bruts de *Tithonia diversifolia*. Pour ce faire, nous comptons utiliser la vibration d'elongation de la fonction diénone comme marqueur. Ensuite, nous étendrons son champ d'application aux extraits obtenus par l'extraction en phase supercritique et au Soxhlet.

Objectifs

Compte tenu du pouvoir solvant à géométrie variable du fluide supercritique en fonction de sa température et de sa pression, le procédé d'extraction de la molécule cible sera optimisé en prenant comme critère son rendement d'extraction. Afin d'améliorer la perception du processus d'extraction et de diminuer le nombre d'expériences et par conséquent la quantité de matière première végétale qui sera consommée, nous appliquerons la méthodologie des plans d'expériences. Sur la base des conditions optimales, une étape de comparaison de l'extraction au CO₂ supercritique aux méthodes classiques d'extraction sera ensuite menée afin d'évaluer ses performances.

Parallèlement à ces travaux, la formation de complexes d'inclusion entre la tagitinine C et les cyclodextrines en milieu aqueux sera investiguée et ce, dans le but de ralentir ou d'empêcher la photo-dégradation de la tagitinine C. Plusieurs méthodes analytiques seront envisagées pour caractériser les complexes formés au niveau de la stoechiométrie et de la constante de formation. Cependant, nous serons extrêmement attentifs à la sensibilité des méthodes choisies compte tenu du fait que la quantité de matière première végétale disponible est limitée. Quant à leur structure, elle sera déterminée par deux approches complémentaires pour permettre l'interprétation des résultats obtenus lors de l'étude de la photo-dégradation. La première sera expérimentale et réalisée à l'aide de la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire. La seconde sera théorique et fera appel à la modélisation moléculaire.

La conception de l'interfaçage entre l'IRTF et l'EFSC constituera très logiquement la deuxième partie de ce travail. Pour ce faire, nous utiliserons des fibres optiques en chalcogène d'arsenic, matériau amorphe et chimiquement inerte offrant une large plage de travail (10000 et 900 cm⁻¹) et possédant une température de transition vitreuse nettement supérieure à la température critique du CO₂. Cette étape critique de notre travail menée à bien, nous nous attacherons à étudier l'influence de la température et de la pression sur le profil d'extraction de l'analyte et nous tenterons d'optimiser ces conditions en ayant recours de nouveau à la méthodologie des plans d'expériences. Une approche qualitative de la composition des extraits en fonction des caractéristiques physico-chimiques du fluide supercritique sera également réalisée en se basant sur les vibrations d'elongation de type C-H.

Objectifs

Finalement, notre dernière préoccupation sera d'évaluer les performances du couplage EFSC/IRTF pour le dosage en ligne de la tagitinine C à partir de sa matrice végétale en appliquant la nouvelle stratégie de validation basée sur le profil d'exactitude.

INTRODUCTION

Chapitre II : Les fluides supercritiques

II.1 Introduction

L'existence d'un état supercritique fut découverte par le Baron Cagniard de la Tour en 1822. Il constata la disparition de la frontière gaz-liquide de certaines substances chauffées en milieu fermé.

En 1879, le pouvoir solvant des fluides supercritiques fut décrit par Hannay et Hogarth. Ils observèrent la solubilité élevée de l'iodure de potassium dans l'éthanol supercritique ($T_c=243^\circ\text{C}$ et $P_c=63$ atm) et montrèrent que la réduction de la pression provoquait la précipitation du sel à partir du fluide homogène [1]. Ils étudièrent ensuite le pouvoir solvant des fluides supercritiques avec d'autres sels (chlorure de cobalt (II), chlorure ferrique et le bromure de potassium).

Une des applications les plus connues au niveau industriel de l'extraction par fluide supercritique (EFSC) fut la décaféinisation de grains de café en 1971.

En 1989, l'agence américaine de protection de l'environnement lança un programme de développement des méthodes EFSC en vue de diminuer de 95% la consommation de solvants organiques chlorés.

La technologie utilisant les fluides supercritiques suscite actuellement beaucoup d'intérêt dans différents domaines : industriel, pharmaceutique et agroalimentaire.

II.2 Principe

Le diagramme d'un corps pur présente les différents états de la matière (solide, liquide et gazeux) en fonction de la pression et de la température (Figure II-1). Les domaines d'existence de ces trois états sont délimités par les courbes d'équilibre (solide-gazeux, solide-liquide et liquide-gazeux).

Par définition, l'état supercritique est caractérisé par la disparition de l'interface séparant l'état liquide et l'état gazeux au-dessus d'une certaine température et d'une certaine pression. Si seulement l'un de ces deux paramètres satisfait à cette définition, on parle de l'état subcritique.

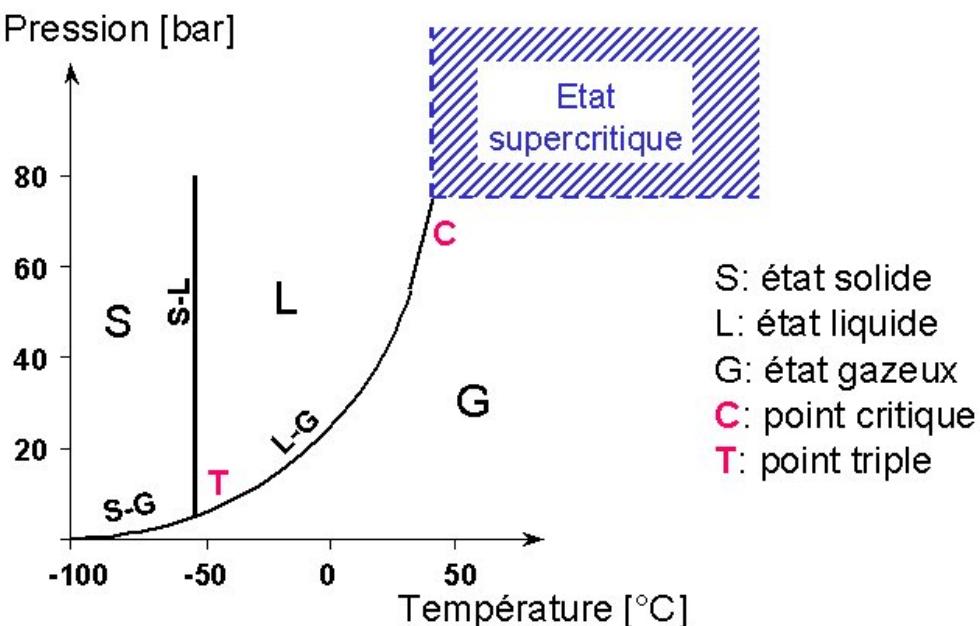


Figure II-1 : Représentation bidimensionnelle (Pression, Température) du diagramme de phases d'un corps pur.

II.3 Propriétés des fluides supercritiques

Les propriétés des fluides supercritiques sont intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz. Le fluide supercritique présente une viscosité faible et une diffusivité élevée comme les gaz et une masse volumique se rapprochant de celle d'un liquide. Un ordre de grandeur de la masse volumique, de la viscosité et de la diffusivité pour les gaz, les fluides supercritiques et les liquides est repris dans le tableau II-1.

Tableau II-1 : Propriétés physiques pour les gaz, le CO₂ supercritique et les liquides [2].

Propriétés	Gaz (30°C et 1 atm)	CO ₂ supercritique (T _c et P _c)	Liquide (30°C et 1 atm)
Masse volumique, ρ (g/cm ³)	10 ⁻³	0,47	0,6 – 1,6
Diffusivité, D (cm ² /s)	10 ⁻¹	10 ⁻³	5 10 ⁻⁶
Viscosité, η (g/cm s)	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²

Chapitre II : Les fluides supercritiques

Comme le montre le tableau II-2, les paramètres critiques (pression et température) varient fortement suivant le choix du fluide supercritique.

Tableau II-2 : Paramètres critiques des fluides à l'état supercritique [2].

Fluide	Constantes critiques		
	Pression (atm)	Température (°C)	Masse volumique (g/cm ³)
Dioxyde de carbone	73,8	31,1	0,468
Ethane	48,8	32,2	0,203
Ethylène	50,4	9,3	0,200
Propane	42,5	96,7	0,220
Propylène	46,2	91,9	0,230
Benzène	48,9	289	0,302
Toluène	41,1	318,6	0,290
Chlorotrifluorométhane	39,2	28,9	0,580
Trichlorofluorométhane	44,1	196,6	0,554
Protoxyde d'azote	71,0	36,5	0,457
Ammoniac	112,8	132,5	0,240
Eau	220,5	374,2	0,272

II.4 Le CO₂ supercritique

Le dioxyde de carbone présente de multiples avantages qui en font de loin le fluide le plus utilisé. Il est peu coûteux, peu toxique, ininflammable et chimiquement inerte. Sa température critique et pression critique facilement accessibles sont compatibles avec les composés thermiquement instables. En outre, son état gazeux à pression atmosphérique permet de le séparer spontanément du produit final et d'éviter ainsi la présence de solvants résiduels.

II.4.1 Le pouvoir solvant à géométrie variable

La solubilité d'une substance dans le CO₂ supercritique dépend de la masse volumique du fluide. Compte tenu de la compressibilité du CO₂ SC, la température et la pression de travail influencent la masse volumique et par conséquent la solubilité des composés. Ce changement de masse volumique du fluide supercritique est à l'origine du pouvoir solvant "à géométrie variable" [3].

L'influence de la température et de la pression sur la masse volumique du CO₂ supercritique est illustrée à la figure II-2.

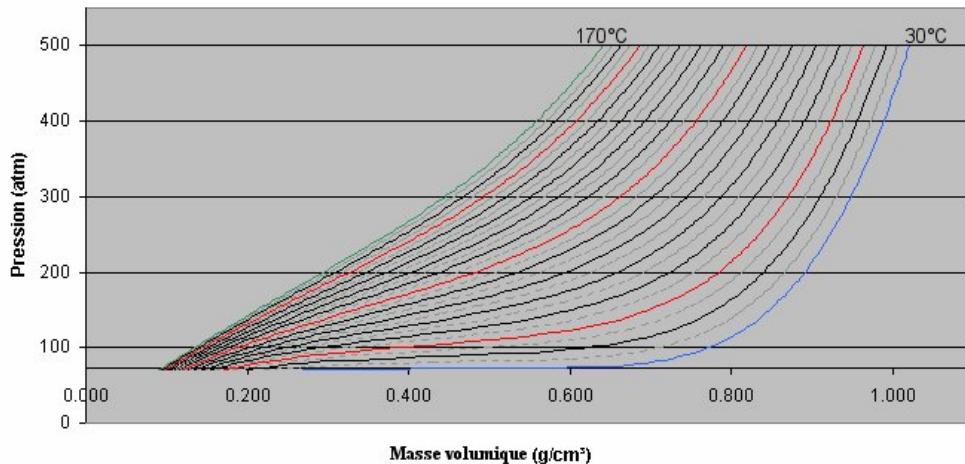


Figure II-2 : Influence de la pression et de la température sur la masse volumique du CO₂ supercritique.

Dans des conditions isothermes, une augmentation de la pression provoque une augmentation de la masse volumique (Figure II-2), et donc une augmentation du pouvoir solvant. L'augmentation de la solubilité d'un soluté ne sera effective qu'au-dessus de la « pression seuil ». Celle-ci est définie comme la pression à partir de laquelle le soluté commence à se solubiliser dans le fluide supercritique. Stahl et al. déterminèrent la pression seuil de stéroïdes diversement substitués [4] (Tableau II-3).

Tableau II-3 : Pression seuil de stéroïdes diversement substitués.

Substitution des stéroïdes	Pression seuil (bar)
1 groupement OH	80
2 groupements OH	120
3 groupements OH	150
4 groupements OH	Pas soluble
1 groupement carbonyle	80
1 groupement OH + 1 carbonyle	90
1 groupement OH + 1 phénol	100
2 groupements OH + 1 acide carboxylique	200
3 groupements OH + 1 acide carboxylique	Pas soluble

L'influence de la température sur la solubilité d'une substance dans un solvant supercritique est plus difficilement prédictible que celle de la pression. A pression élevée, le fluide est difficilement compressible et donc la solubilité augmente avec la température suivant ainsi l'augmentation de pression de vapeur du soluté. Par contre, à des pressions intermédiaires proches de la pression critique, le fluide est hautement compressible et une faible augmentation de la température entraîne une forte diminution de la masse volumique et parallèlement la solubilité du composé diminue dans le fluide supercritique. La pression à laquelle s'effectue le changement de l'influence de la température sur la solubilité du composé a été définie comme la pression de croisement ou de « crossover » : au-dessus de celle-ci, la solubilité du composé est favorisée par une augmentation de la température, en dessous de celle-ci, l'effet inverse se produit. La figure II-3 représente l'évolution de la solubilité du naphtalène dans l'éthylène supercritique à 12°C et 35°C.

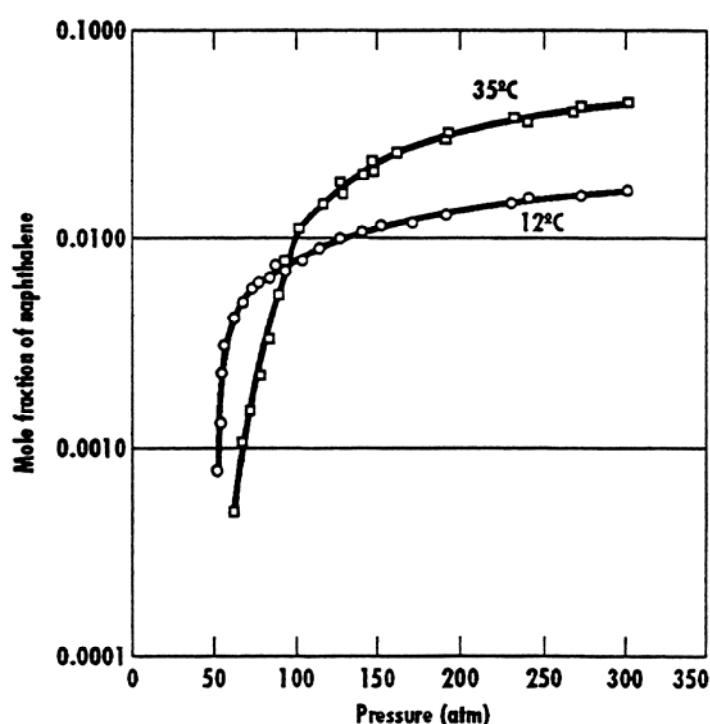


Figure II-3 : Solubilité (en fraction molaire) du naphtalène dans l'éthylène supercritique en fonction de la pression à 12°C et 35°C. (T_c éthylène = 9,3°C) [5].

La polarité du CO₂ supercritique est estimée par le paramètre de solubilité d'Hildebrand. Ce paramètre, calculé à partir de l'équation de Giddings, est fonction de la pression critique du fluide et du rapport des masses volumiques du fluide à l'état supercritique et à l'état liquide [6].

$$\delta_H = \frac{1,25 \cdot \sqrt{P_c \cdot \rho_{fs}}}{\rho_{liq}}$$

où P_c est la pression critique du fluide, ρ_{fs} la masse volumique du fluide à l'état supercritique et ρ_{liq} la masse volumique à l'état liquide.

La polarité du CO₂ supercritique varie entre celle d'un alcane et celle de la pyridine (Figure II-4). Par conséquent, le pouvoir solvant est limité aux composés apolaires ou peu polaires. Il est toutefois possible de remédier à cet inconvénient en ajoutant un co-solvant (modificateur ou entraîneur) en faibles quantités (5 à 15%) qui va conférer au mélange les propriétés idoines pour la molécule visée.

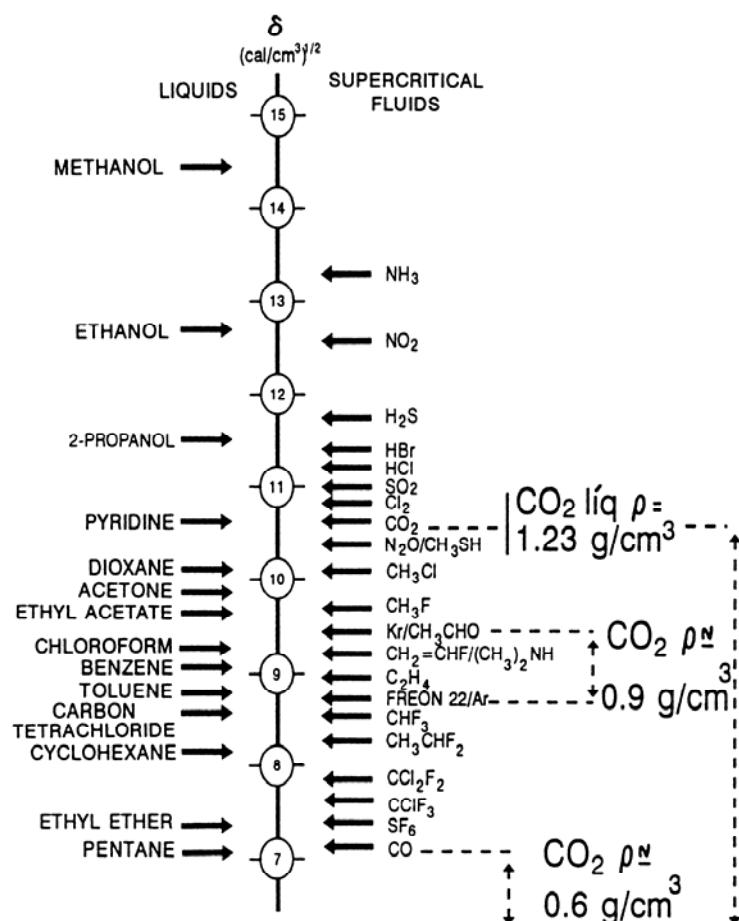


Figure II-4 : Paramètres de solubilité de différents liquides et fluides supercritiques [2].

II.5 Les applications des technologies supercritiques

Les fluides supercritiques proposent désormais au monde industriel et pharmaceutique une vaste gamme de technologies innovantes dans des secteurs d'application très diversifiés. Un de leurs atouts majeurs est d'être une alternative à l'usage de solvants organiques et donc, de rencontrer des normes de plus en plus strictes en matière d'environnement. Dans certains cas, ils offrent des solutions que ne peuvent apporter les techniques traditionnelles.

II.5.1 L'extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique constitue le secteur d'application le plus ancien. L'EFSC prend de plus en plus d'importance par rapports aux techniques conventionnelles pour l'extraction de matrices solides. Parmi les applications industrielles, l'extraction de la caféine des grains de café [7-9] est la plus célèbre. Elle permet de réduire le pourcentage de caféine d'une valeur comprise entre 0,7 et 3% à un taux final de 0,02% et ce, sans extraire les composés conférant l'arôme. A côté de cette application, on trouve de nombreux exemples de l'extraction de substances naturelles d'intérêt biologique: l'extraction de la nicotine [10-11], de la digoxine [12], du paclitaxel [13-14], de la coronaridine et de la voacangine [15], de l'artémisinine [16], de l'acétate d'aurentiamide [17], de la vinblastine [18], du parthénolide [19], de la cocaïne [20], de la tagitinine C [21], des pyréthrines [22],

...

L'EFSC est utilisée également dans le domaine agroalimentaire pour l'extraction de colorants naturels [23-24], d'antioxydants [25-26], d'acides gras polyinsaturés [27-28], pour la production de boissons sans alcool [29-31], de denrées alimentaires délipidées [32-33], de bouchons en liège traités [34], ...

Le domaine des arômes et parfums est un secteur offrant également un large éventail d'applications. On trouve désormais des installations de capacité moyenne permettant de produire des extraits (jasmin, rose, vanille, citron, eucalyptus, bergamote, romarin, thym, paprika, poivre, ...) de qualité supérieure et exempts de toutes traces de solvant [35-38].

II.5.1.1 L'influence de la matrice

Les caractéristiques physico-chimiques de la matrice jouent un rôle important dans le processus d'extraction en influençant la durée et le rendement d'extraction du ou des composé(s). Le processus d'extraction d'un composé comporte plusieurs étapes (Figure II-5) :

- désorption ($A \rightarrow B$) ;
- diffusion hors des pores ($B \rightarrow C$) ;
- solubilisation dans le fluide supercritique ($C \rightarrow D$)
- transport du composé ($D \rightarrow E$).

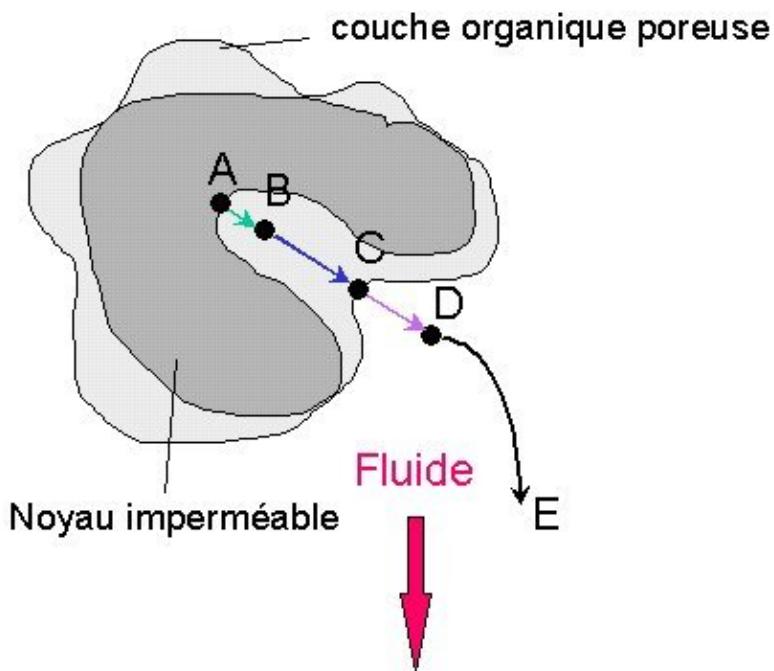


Figure II-5 : Représentation schématique du processus d'extraction de matrices solides par fluide supercritique ($A \rightarrow B$: désorption du composé ; $B \rightarrow C$: diffusion, $C \rightarrow D$: solubilisation dans le fluide supercritique et $D \rightarrow E$: transport).

La solubilité du composé dans le fluide supercritique ($C \rightarrow D$) n'est donc pas une condition suffisante pour garantir l'efficacité de l'extraction à partir de matrices solides réelles. Dans la mesure du possible, l'EFSC doit être réalisée sur des échantillons réels afin de prendre en compte les interactions composé-matrice et la répartition du composé dans la matrice [39].

En général, le profil d'une extraction par fluide supercritique est un processus dynamique qui se divise en trois phases. La phase initiale est limitée par la solubilité du composé dans le fluide supercritique, la phase intermédiaire est contrôlée par la diffusion du composé au sein de la matrice et la phase finale est liée à la désorption du composé [40-41]. Un exemple de l'évolution du rendement d'extraction en fonction du temps est illustré dans la figure II-6.

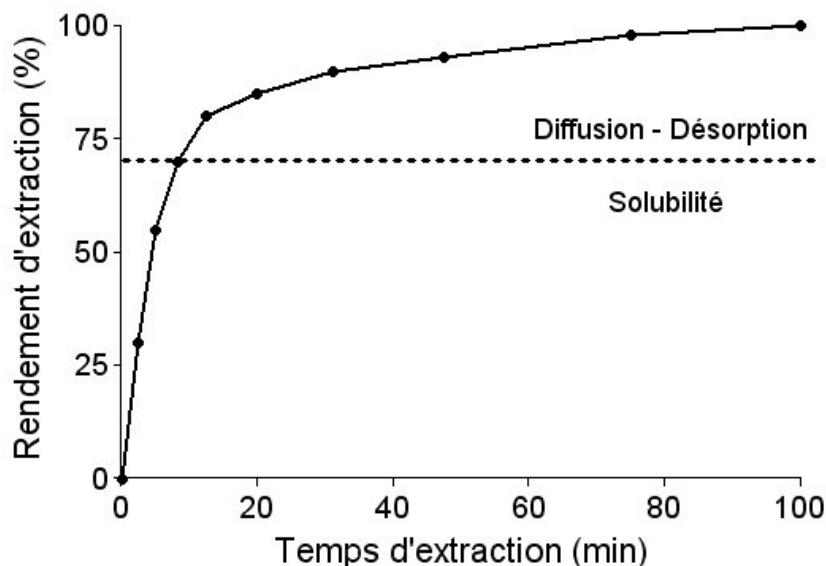


Figure II-6 : Profil théorique de l'extraction par fluide supercritique d'un composé à partir d'une matrice solide.

Lorsque le rendement n'est pas satisfaisant ou lorsque la durée de l'extraction est trop longue, il est possible d'améliorer les résultats en jouant sur différents paramètres. Comme abordé précédemment dans le chapitre II.4.1, le pouvoir solvant à « géométrie variable » du fluide supercritique peut être mis à profit en faisant varier la pression et la température de travail. Une augmentation de la pression influence positivement le pouvoir solvant du fluide par accroissement de sa densité. Une augmentation de la température à pression élevée permet à la fois d'augmenter la tension de vapeur de la substance et de diminuer les interactions soluté-soluté. À côté du pouvoir solvant à « géométrie variable », une réduction de la taille des particules de la matrice permet d'augmenter la surface de contact avec le fluide supercritique réduisant ainsi la phase de diffusion ou rendant le composé accessible au fluide. Parfois, de faibles quantités de solvant sont ajoutées direc-

tement à la matrice avant l'extraction afin de favoriser des modifications physico-chimiques comme la dilatation des pores et la réduction des interactions composé-matrice.

II.5.1.2 La collection

L'extraction quantitative d'un composé à partir d'une matrice peut être considérée comme un processus à diviser en deux étapes. La première consiste à définir les conditions optimales qui permettront l'extraction du composé par le fluide supercritique. La deuxième, quant à elle, doit assurer une récupération efficace du soluté lors de la dépressurisation du fluide supercritique.

Il existe différents procédés de récupération : la condensation, le barbotage dans un solvant et la fixation sur une phase stationnaire.

II.5.1.2.1 Condensation

La détente du fluide supercritique provoque la précipitation de l'extrait dans le gaz résultant contenu dans un tube en verre ou dans une cellule en acier inoxydable refroidie. En effet, le passage du fluide supercritique au gaz est responsable de la diminution de la densité et donc du pouvoir solvant.

Cette méthode a été utilisée avec succès pour des échantillons de taille relativement importante de l'ordre de 10 à 20 g. Mais, elle reste inadaptée pour l'analyse de traces en raison des pertes dues à la formation d'aérosol.

II.5.1.2.2 Barbotage dans un solvant

La méthode de collection la plus simple et la plus largement utilisée dans l'EFSC est la décompression du fluide supercritique directement dans un solvant (Figure II-7).

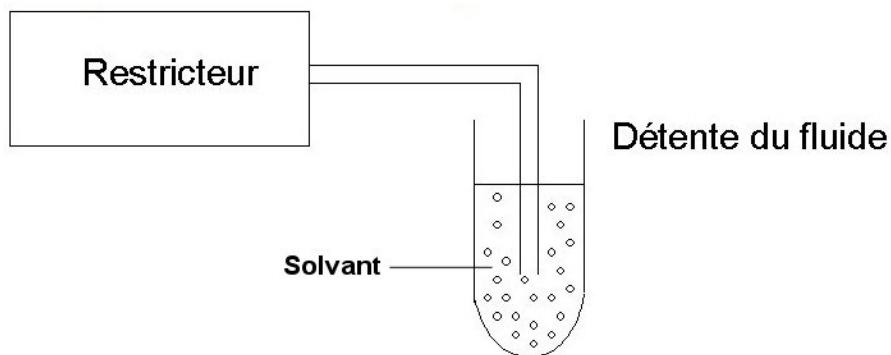


Figure II-7 : Schéma de la collection par barbotage dans un solvant.

Dans les situations les plus favorables, l'extrait se dissout dans le solvant tandis que le fluide supercritique décompressé se dilue dans l'atmosphère. Le volume du solvant devra également être pris en compte lors de l'optimisation de la collection. Le volume et le choix du solvant seront dictés par l'extrait et la méthode d'analyse [42-43]. En effet, le solvant devra permettre la solubilisation de l'extrait et être compatible avec la méthode d'analyse.

L'utilisation de ce type de collection ne permet pas l'utilisation d'un débit de fluide supercritique supérieur à $1\text{mL}.\text{min}^{-1}$ afin d'éviter la perte de l'extrait sous forme d'un aérosol.

II.5.1.2.3 Fixation sur une phase stationnaire

Dans ce mode de piégeage, les substances extraites précipitent sur une phase stationnaire située après le restricteur. La nature de la phase stationnaire est très variable (billes de verre, phase normale, inverse, ...) et dépendra des caractéristiques physico-chimiques des composés à piéger. Les substances extraites seront récupérées par élution à l'aide d'un solvant organique (Figure II-8).

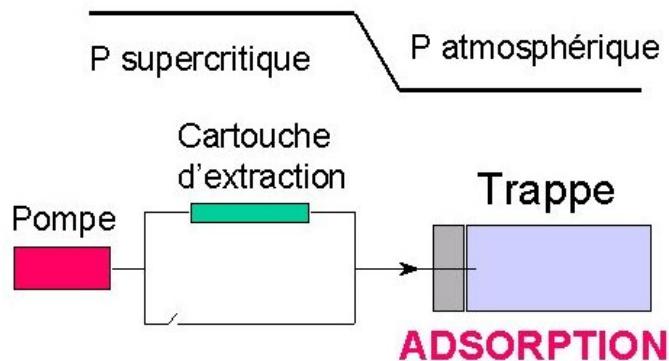


Figure II-8 : Schéma de la fixation sur une phase stationnaire.

Le choix et le volume de l'éluant peut entraîner une désorption incomplète de l'extrait (Tableau II-4). Ashraf-Khorassani et al. étudièrent le taux de récupération des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) piégés sur des billes de verre en fonction de deux solvants d'élution : le dichlorométhane et le méthanol. Ils démontrèrent que le dichlorométhane était le solvant de choix pour la désorption complète de la majorité des HAP testés [44]. Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous.

Tableau II-4 : Taux de récupération des hydrocarbures aromatiques polycycliques suivant le solvant de rinçage avec comme piège des billes de verre (80-100 mesh).

	Dichlorométhane	Méthanol
1-Méthyl naphthalene	94	84
2-Méthyl naphtalène	93	87
1-Méthyl fluorine	100	104
Phénanthrène	100	78
Anthracène	102	67
Fluoranthrène	101	67
Pyrène	100	71
Chrysène	107	51

Contrairement au barbotage dans un solvant, le piégeage sur phase stationnaire autorise l'utilisation de débits supérieurs à $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ et offre également la possibilité d'introduire une sélectivité supplémentaire.

Néanmoins, lors du piégeage sur phase stationnaire, les pertes peuvent être d'origines très variées. En effet, les composés peuvent être chassés par le CO₂ gazeux. Dans ce cas, il convient de limiter le débit du fluide supercritique ou de réduire la durée de l'extraction. Les composés sont parfois entraînés par l'aérosol formé lors de l'ajout d'un modificateur au fluide supercritique. L'utilisation d'un support plus absorbant améliorera l'efficacité de la collection. Enfin, les composés sont directement élués par le modificateur condensé. Par conséquent, il faudra éviter le dopage dans la cartouche d'extraction ou diminuer le pourcentage du modificateur [45-47].

II.5.1.3 Le couplage

Le couplage de l'extraction par fluide supercritique avec un système de détection présente l'avantage de ne pas manipuler l'échantillon entre l'extraction et l'analyse. De cet avantage, il résulte que les risques de dégradation, de perte ou de contamination lors du transfert sont minimisés et que la durée d'analyse est réduite. Au niveau des inconvénients, il est important de souligner que le développement de ce type d'appareillage doit tenir compte des conditions de pression et de température imposées par l'état supercritique, que la réponse du détecteur peut être affectée par la variation de la densité du fluide et que la taille de l'échantillon doit être adaptée à la technique d'analyse.

L'extraction par fluide supercritique a été couplée avec un grand nombre de systèmes de détection. Une liste non exhaustive des couplages est reprise dans le tableau II-5.

Chapitre II : Les fluides supercritiques

Tableau II-5 : Exemples de couplage de l'extraction par fluide supercritique.

Système de détection	Analyse	Référence
Chromatographie gazeuse	Détermination des hydrocarbures aromatiques dans des sédiments marins.	[48]
	Détermination de substances organiques présentes sur des cheveux humains.	[49]
	Détermination de la sulfoquinoxaline dans des denrées alimentaires.	[50]
Chromatographie liquide haute performance	Détermination du lorazepam, temazepam, flurazepam et medazepam en mélange.	[51]
	Détermination des caroténoïdes dans des denrées alimentaires.	[52]
Spectrophotométrie UV	Déterminations des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans des huiles végétales.	[53]
	Détermination de la caféine dans des grains de café torréfiés.	[54]
	Détermination du fluorène.	[55]
Fluorimétrie	Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans de la terre.	[56]
Absorption atomique	Détermination de l'As, Cd, Cu, Mn, Pb, Se ou Zn à l'aide du tétrabutylammonium dibutyldithiocarbamate en milieu aqueux.	[57]
Spectrométrie de masse	Détermination de mycotoxines dans des échantillons de froment.	[58]
Résonance magnétique nucléaire	Suivi du processus d'extraction de la carvone à partir de la menthe.	[59]
Spectroscopie proche IR	Suivi du processus d'extraction de la caféine du café torréfié et de la pipérine du poivre noir.	[60]
Spectroscopie moyen IR	Suivi du processus de dégraissage de la limaille et de pièces métalliques	[61]
	Détermination du polyuréthane, du polyamide et de l'aramide dans des fibres textiles	[62]
Spectroscopie moyen IR	Détermination quantitative des hydrocarbures dans de la terre et qualitative de la caféine à partir du café	[63]
	Détermination des hydrocarbures dans de la terre	[64]

II.5.2 La chromatographie en phase supercritique

La chromatographie en phase supercritique (CPS) est un hybride entre la chromatographie gazeuse et la chromatographie liquide. Elle a été appliquée avec succès à une large variété de composés, comprenant les produits naturels, les médicaments, les aliments, les pesticides et herbicides, les combustibles fossiles, les explosifs et les gaz propulseurs [65].

La phase mobile la plus répandue pour la CPS est le dioxyde de carbone. D'autres fluides ont été utilisés comme phase mobile, à savoir l'éthane, le pentane, le monoxyde d'azote, le dichlorofluorométhane, l'ammoniac, l'hexafluorure de soufre et le xénon.

Les colonnes capillaires de la chromatographie gazeuse aussi bien que les colonnes remplies de la chromatographie liquide à haute performance ont été utilisées pour la chromatographie en phase supercritique. Toutefois le choix du type de colonne sera dicté par la nature des composés à séparer.

Un grand nombre de détecteurs utilisés en chromatographie gazeuse et en chromatographie liquide à haute performance peut être couplé à la CPS : spectrophotométrie UV-visible [66], spectrophotométrie IR-TF [67], spectrométrie de masse [68], détection par ionisation de flamme [69], émission atomique [70], la résonance magnétique nucléaire [71], ... Cependant, lorsque la phase mobile contient un modificateur, le couplage avec les détecteurs employés en chromatographie gazeuse est proscrit et on optera pour l'utilisation d'un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière [72-73].

Depuis plusieurs années, la chromatographie en phase supercritique est aussi employée pour la séparation des substances chirales [72-75].

II.5.3 Réactions chimiques en phase supercritique

Le remplacement des solvants organiques par un fluide supercritique comme milieu réactionnel est en parfait accord avec le concept de la chimie verte ou « green chemistry » soucieuse de l'environnement [76].

La haute diffusivité des milieux supercritiques comparée à celle des milieux liquides conduit à une accélération notable de la vitesse de réaction.

Les milieux supercritiques ont été utilisés dans différents types de réaction : enzymatique (décarboxylation, estérification énantiomériste, ...) [77-79] et non-enzymatique (hydrogénéation, oxydation, polymérisation, ...) [80].

Un autre axe de recherches en plein essor est l'utilisation de l'eau à l'état supercritique en mélange avec de l'oxygène ou du peroxyde d'hydrogène où son pouvoir oxydant est mis à profit pour le traitement des déchets organiques (hydrocarbures polycycliques aromatiques, dérivés phénoliques, ...) dans diverses matrices (eau usée, sédiments, ...) [81-82]. Selon les conditions opératoires, l'élimination des polluants peut être réalisée dans un intervalle de temps très court. Cependant, la forte agressivité de ce milieu réactionnel nécessite l'utilisation d'alliages pouvant résister à la corrosion [83].

II.5.4 Le traitement de solides

Au cours de ces dernières années, le traitement de solides a connu un important développement dans le secteur de l'industrie pharmaceutique. Ce domaine d'application offre beaucoup de perspectives et une valeur ajoutée indéniable aux molécules mises en œuvre. Les applications peuvent être réparties en trois grandes catégories : l'imprégnation, la micronisation et l'encapsulation [84].

II.5.4.4 L'imprégnation

La propriété mise à profit est la diffusivité de l'état supercritique qui va permettre à un soluté comme l'acide salicylique de pénétrer profondément le réseau poreux de matrices solides inertes telles que la silice colloïdale, le silicate de magnésium ou de phosphate d'aluminium [85].

Dans le cas des polymères, la capacité des fluides supercritiques à provoquer le gonflement de la matrice sera également exploitée afin de faciliter la diffusion du soluté au sein du réseau. Elvira et al. étudièrent le profil de libération du cholestérol à partir de particules formées d'un copolymère de polyméthylméthacrylate et de poly- ϵ -caprolactone [86]. Guney et al. et Gong et al. réalisèrent respectivement l'imprégnation de β -estradiol et de 5-fluoro-uracile dans un copolymère biodégradable d'acide D,L-lactique et d'acide glycolique [87] et de l'indométacine dans du chitosane [88].

II.5.4.5 La micronisation et l'encapsulation

Les fluides supercritiques offrent une palette très diversifiée de procédés pour réaliser l'encapsulation et la micronisation. Le fluide supercritique peut jouer le rôle de solvant, d'anti-solvant ou d'agent d'expansion [89].

Le procédé RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solution) est dédié aux composés solubles dans le fluide supercritique. Le solide est solubilisé par le fluide supercritique et la solution est ensuite détendue au travers d'une buse d'atomisation dans une enceinte maintenue à basse pression. La forte chute de pression réduit considérablement le pouvoir solvant du fluide supercritique et dès lors provoque la précipitation du solide sous forme de fines particules. De nombreuses applications ont été décrites dans la littérature scientifique : micronisation de l'acide acétylsalicylique [90], de l'ibuprofène [91-92], de la carbamazépine, ... Une autre variante du procédé RESS appelé RESS-SC (Rapid Expansion of Supercritical Solution-Solid Cosolvent) permet de contourner la faible solubilité des principes actifs dans le CO₂ supercritique par l'ajout d'un cosolvant solide comme le menthol. Thakur et al. utilisèrent avec succès ce procédé afin d'obtenir de la phénytoïne micronisée [94].

Les méthodes anti-solvant sont quant à elles dédiées aux molécules non solubles dans le fluide supercritique. Le solide est initialement dissous dans un solvant organique et la solution liquide est ensuite mise en contact avec le fluide supercritique. Deux phénomènes participent à la cristallisation du soluté : la perte du pouvoir solvant de la solution et le transfert du solvant dans la phase supercritique. Après expansion de la solution, une étape de lavage au CO₂ permet d'éliminer les traces de solvants organiques du produit fini. Selon la nature du dispositif de dispersion de la phase liquide, on distingue plusieurs variantes : SAS (Supercritical Anti-Solvent), ASES (Aerosol Solvent Extraction) ou SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluid). Reverchon et al. investigueront l'influence de plusieurs paramètres (pression, température, concentration, ...) sur la taille des particules de céphalosporines (0,2 à 50 µm) obtenues par SAS [95-96]. Lorsque l'on dissout un agent de revêtement ou d'encapsulation dans le solvant organique, on peut, en jouant sur les conditions opératoires, gérer l'ordre chronologique des précipitations et ainsi réaliser des enrobages successifs de principes actifs comme l'hydrocortisone [97], la félodipine [98] et même un herbicide [99].

Le procédé appelé PGSS (Particles from Gas-Saturated Solutions) est particulièrement intéressant pour microniser des composés à bas point de fusion comme les polymères. Le fluide supercritique est solubilisé dans la substance. Ensuite, le mélange obtenu est détendu au travers d'une buse pour produire des particules de la taille du micron. Cette technique est également efficace lorsqu'un composé est en suspension dans un polymère liquide, permettant la réalisation aisée d'encapsulations [100-101].

II.6 Conclusion

Comme nous avons pu le constater tout au long de ce chapitre, les propriétés des fluides supercritiques ont été mises à profit dans des secteurs d'applications très diversifiés et ce, plus particulièrement, dans le secteur de l'extraction de matrices solides où le pouvoir solvant à géométrie variable offre des possibilités en terme de rendement et de sélectivité de l'extraction que ne peuvent apporter les techniques traditionnelles d'extraction à l'aide de solvants organiques. De plus, l'utilisation du dioxyde de carbone supercritique qui ne laisse aucune trace de solvant résiduel dans les extraits est également un atout important lors de la réalisation d'études d'efficacité thérapeutique.

Au niveau de l'étape de piégeage de l'extrait, le procédé consistant à faire barboter le fluide supercritique directement dans un solvant a retenu toute notre attention car celui-ci est assez simple à mettre en œuvre et offre la possibilité de collecter directement l'analyte dans un solvant compatible avec la méthode d'analyse.

D'autre part, le développement de couplages de l'extraction par fluide supercritique avec différents systèmes de détection semble être très prometteur car il permettrait d'atteindre les objectifs fixés par le nouveau concept intitulé « Process and Analytical Technology » qui prévoit de comprendre, d'analyser et de contrôler un procédé de fabrication par l'analyse non destructive et en temps réel de ses différents paramètres. Le chapitre suivant traitera du choix du système de détection.

II.7 Bibliographie

- [1] Hannay J.B., Hogarth J., On the solubility of solids in gases. *Proceedings of the Royal Society of London* 29, 324 (1879).
- [2] Luque de Castro M.D., Valcarcel M., Tena M.T., in *Analytical supercritical fluid extraction*. Springer laboratory, Berlin, p 321 (1994).
- [3] Knutson B., Debenedetti P., Tom J., in *Drugs and pharmaceuticals sciences series: Preparation of microparticules using supercritical fluids*, Marcel Dekker, New-York, pp 89-125 (1996).
- [4] Stahl E., Quirin K.W., Dense gas extraction on a laboratory scale: A survey of some recent results. *Fluid Phase Equilibria* 10, 269-278 (1983).
- [5] McHugh M.A., Krukonis V.J., in *Supercritical fluid extraction-Principles and practices*. Butterworths, Boston, p 10 (1986).
- [6] Giddings J.C., Myers M.N., McLaren L., Keller R.A., High-pressure gas chromatography of nonvolatile species. Compressed gas is used to cause migration of intractable solutes. *Science* 162 (3849), 67-73 (1968).
- [7] Zosel K., Process for recovering caffeine. *US Patent* 3.806.619 (1972).
- [8] Katz S., Spence J., O'Brien M., Skiff R., Vogel G., Prasad R., Method for decaffeinating coffee with a supercritical fluid. *US patent* 4.911.941 (1988).
- [9] Moorman C., Sabadics J., Royal T., Apparatus for fluid-solid bed processing. *US Patent* 4.951.561 (1989).
- [10] Fischer M., Jefferies T.M., Optimization of nicotine extraction from tobacco using supercritical fluid technology with dynamic extraction modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (5), 1258-1264 (1996).
- [11] Fantozzi P., Rossi M., Schiraldi A., Montanari L., Removal of nicotine from tobacco leaf protein by supercritical CO₂. *Italian Journal of Food Science* 5 (4), 333-339 (1993).
- [12] Moore W.N., Taylor L.T., Gaining greater selectivity in the supercritical fluid extraction of digoxin from Digitalis lanata leaves. *Phytochemical Analysis* 8 (5), 238-243 (1997).
- [13] Moon-Kyoong C., Hye-Won S., Huen L., Supercritical fluid extraction of paclitaxel and baccatin II from needles of *Taxus cuspidate*. *Journal of Supercritical Fluids* 9, 192-198 (1996).

Chapitre II : Les fluides supercritiques

- [14] Vandana V., Teja A.S., Zalkow L.H., Supercritical extraction and HPLC analysis of taxol from *Taxus brevifolia* using nitrous oxide and nitrous oxide + ethanol mixtures. *Fluid Phase Equilibria* 116, 162-169 (1996).
- [15] Pereira C.G., Marques M.O., Barreto A.S., Siani A.C., Fernandes E.C., Meireles M.A., Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. *Journal of Supercritical Fluids* 30, 51-61(2004).
- [16] Kohler M., Haerdi W., Christen Ph., Veuthey J-L., Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A* 785, 353-360 (1997).
- [17] Peng J., Fan G., Wu Y., Supercritical fluid extraction of aurentiamide acetate from *Patrinia villosa* Juss and subsequent isolation by silica gel and high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1083, 52-57 (2005).
- [18] Choi Y.H., Yoo K.P., Kim J., Supercritical extraction and liquid chromatography-electrospray mass analysis of vinblastine from *Catharanthus roseus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50 (9), 1294-1296 (2002).
- [19] Smith R.M., Burford M.D., Supercritical fluid extraction and gas chromatographic determination of the sesquiterpene lactone parthenolide in the medicinal herb feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Journal of Chromatography A* 627, 255-261 (1992).
- [20] Brachet A., Christen Ph., Gauvrit J-Y., Longeray R., Lantéri P., Veuthey J-L., Experimental design in supercritical fluid extraction of cocaine from coca leaves. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 43, 353-366 (2000).
- [21] Ziemons E., Goffin E., Lejeune R., Proença dan Cunha A., Angenot L., Thunus L., Supercritical carbon dioxide extraction of tagitinin C from *Tithonia diversifolia*. *Journal of Supercritical Fluids* 33, 53-59 (2005).
- [22] Pan W.H.T., Chang C.C., Su T.T., Lee F., Fuh M.R.S., Preparative supercritical fluid extraction of pyrethrin I and II from pyrethrum flower. *Talanta* 42 (11), 1745-1749 (1995).
- [23] Mira B., Blasco M., Subirats S., Supercritical CO₂ extraction of essential oils from orange peel. *Journal of Supercritical Fluids* 9, 238-243 (1996).
- [24] de Fran  a L.F., Reber G., Meireles M.A., Machado N.T., Brunner G., Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. *Journal of Supercritical Fluids* 14, 247-256 (1999).
- [25] Turner C., King J.W., Mathiasson L., Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *Journal of Chromatography A* 936, 215-237 (2001).

Chapitre II : Les fluides supercritiques

- [26] de Lucas A., de la Ossa E.M., Rincon J., Blanco M.A., Gracia I., Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *Journal of Supercritical Fluids* 22, 221-228 (2002).
- [27] Fleck U., Tiegs C., Brunner G., Fractionation of fatty acid ethyl esters by supercritical CO₂: high separation efficiency using an automated contercurrent column. *Journal of Supercritical Fluids* 14, 67-74 (1998).
- [28] Létisse M., Rozières M., Hiol A., Sergent M., Comeau L., Enrichment of EPA and DHA from sardine by supercritical fluid extraction without modifier : I. Optimization of extractions conditions. *Journal of Supercritical Fluids*, In press.
- [29] Vollbrecht H.R., Schuetz R., Faust, R., Zobel R., Process for removal of ethanol from drinks produced by fermentation utilizing extraction with compressed carbon dioxide and carbon dioxide regeneration. *German Patent* 3843908 (1992).
- [30] Gamse T., Rogler I., Marr R., Supercritical CO₂ extraction for utilisation of excess wine of poor quality. *Journal of Supercritical Fluids* 14, 123-128 (1999).
- [31] Senorans F.J., Ruiz-Rodriguez A., Ibanez E., Tabera J., Guillermo R., Optimization of contercurrent supercritical fluid extraction conditions for spirits fractionation. *Journal of Supercritical Fluids* 21, 41-49 (2001).
- [32] Mohamed R.S., Saldana M.D.A., Socantaype F.H., Kieckbusch T.G., Reduction in the cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina. *Journal of Supercritical Fluids* 16 (3), 225-233 (2000).
- [33] Devineni N., Mallikarjunan P., Chinnan M.S., Phillips R.D., Supercritical fluid extraction of lipids from deep-fried food products. *Journal of the American Oil Chemists Society* 74 (12), 1517-1523 (1997).
- [34] Taylor M. K., Young T. M., Christian E. Butzke C.E., Ebeler S.E. Supercritical fluid extraction of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6), 2208-2211 (2000).
- [35] Mukhopadhyay M., Sastry S.V.G.K., Process for Cyclic supercritical fluid CO₂ extraction of fragrances (absolute or essential oils) from jasmine flowers. *Indian Patent* 183454 (72/BOM/96) (1995).
- [36] Moldao-Martins M., Palavra A., Beiro da Costa M.L., Bernardo-Gil M.G., Supercritical CO₂ extraction of *Thymus zygis* L.. subsp. *sylvestris* aroma. *Journal of Supercritical Fluids* 18, 25-34 (2000).
- [37] Perakis C., Louli V., Magoulas K., Supercritical fluid extraction of black pepper oil. *Journal of Food Engineering* 71, 386-393 (2005).

- [38] Senorans F.J., Ibanez E., Cavero S., Tabera J., Reglero G., Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *Journal of Chromatography A* 870, 491-499 (2000).
- [39] Clifford A.A., in *Supercritical fluid extraction and its use in chromatographic sample preparation*. Blackie Academic and Professional, London, pp 1-38 (1993).
- [40] Mukhopadhyay M., in *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. CRC press, London, p 1-329 (2000).
- [41] Sovova H., Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *Journal of Supercritical Fluids* 33 (1), 35-52 (2005).
- [42] Langenfeld J.J., Burford M.D., Hawthorne S.B., Miller D.J., Effects of collection solvent parameters and extraction cell geometry on supercritical fluid extraction efficiencies. *Journal of Chromatography* 594, 297-3007 (1992).
- [43] Thompson P.G., Taylor L.T., Richter B.E., Porter N.L., Ezzell J.L., Trapping efficiencies of various collection solvents after supercritical fluid extraction. *Journal of High Resolution Chromatography* 16, 713-716 (1993).
- [44] Ashraf-Khorassani M., Houck R.K., Levy J.M., Cryogenically cooled adsorbent trap for off-line supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatographic science* 30, 361-366 (1992).
- [45] Mulcahey L.J., Taylor L.T., Collection efficiency of solid surface and sorbent traps in supercritical fluid extraction with modified carbon dioxide. *Analytical Chemistry* 64, 2352-2358 (1991).
- [46] Howard A.L., Taylor L.T., Considerations for analytical supercritical fluid extraction of sulfonyl ureas employing a modified fluid. *Journal of High Resolution Chromatography* 16, 39-45 (1993).
- [47] Bowadt S.; Johansson B.; Fruekilde P., Hansen M., Zilli D., Larsen B., de Boer J., Supercritical fluid extraction of polychlorinated biphenyls from lyophilized fish tissue. *Journal of Chromatography A* 675, 189-204 (1994).
- [48] Fuoco R., Ceccarini A., Onor M., Lottici S., Supercritical fluid extraction combined on-line with cold-trap gas chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 346, 81-86 (1997).
- [49] Benner B.A., Goodpaster J.V., DeGrasse J.A., Tully L.A., Levin B.C., Characterization of surface organic components of human hair by on-line supercritical fluid extraction-gas chromatography/mass spectrometry: a feasibility study and comparison with human identification using mitochondrial DNA sequences. *Journal of Forensic Sciences* 48 (3), 554-562 (2003).

- [50] Tena M., Luque de Castro M., Valcarcel M., On-line of a flow-through sensor to a supercritical fluid extractor. *Analytical Chemistry* 67, 1054-1059 (1995).
- [51] Stone M.A., Taylor L.T., Quantitative coupling of supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography by means of a coated open-tubular interface. *Journal of Chromatography A* 931, 53-65 (2001).
- [52] Pol J., Hyötuläinen T., Tanta-Aho O., Riekkola M-L., Determination of lycopene in food by on-line SFE coupled to HPLC using a single monolithic column for trapping and separation. *Journal of Chromatography A* 1052, 25-31 (2004).
- [53] Zougagh M., Redigolo H., Rios A., Valcarcel M., Screening and confirmation of PAHs in vegetable oil samples by use of supercritical fluid extraction in conjunction with liquid chromatography and fluorimetric detection. *Analytica Chimica Acta* 525, 265-271 (2004).
- [54] Tena M., Valcarcel M., Fiber optic-based interface for on-line selective photometric determinations in solid samples by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A* 753, 299-305 (1996).
- [55] Dunham D.C., Desmarais M.S., Breid T., Hills J.W., Carbon dioxide supercritical fluid extraction with on-line fluorescence detection. *Analytical Letters* 28 (14), 2561-2574 (1995).
- [56] Tena M.T., Luque de Castro M.D., Valcarcel M., Screening of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by on-line fiber-optic-interface supercritical fluid extraction spectrofluorometry. *Analytical Chemistry* 68, 2386-2391 (1996).
- [57] Wang J., Marshall W.D., Metal speciation by supercritical fluid extraction with on-line detection by atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* 66, 3900-3907 (1994).
- [58] Kalinoski H.T., Udseth H.R., Wright B.W., Smith R.D., Supercritical fluid extraction and direct fluid injection mass spectrometry for the determination of trichothecene mycotoxins in wheat samples. *Analytical Chemistry* 58, 2421-2425 (1986).
- [59] Jublot L., Linforth R.S.T., Taylor A.J., Direct coupling of supercritical fluid extraction to a gas phase atmospheric pressure chemical ionisation source ion trap mass spectrometer for fast extraction and analysis of food components. *Journal of Chromatography A* 1056, 27-33 (2004).
- [60] Braumann U., Hänel H., Albert K., On-line monitoring of supercritical fluid extraction process with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Chemistry* 67, 930-935 (1995).
- [61] Bürck J., Wiegand G., Roth S., Mathieu H., Krämer K., Monitoring of technical oils in supercritical CO₂ under continuous flow conditions by NIR spectroscopy and multivariate calibration. *Talanta, In Press*.

Chapitre II : Les fluides supercritiques

- [62] Kirschner C.H., Jordan S.L., Seemuth P.D., Taylor L.T., Feasibility of extraction and quantification of fiber finishes via on-line SFE/FT-IR. *Analytical Chemistry* 66, 882-887 (1994).
- [63] Heglung D.L., Tilotta D.C., Hawthorne S.B., Miller D.J., Simple fiber-optic interface for on-line supercritical fluid extraction Fourier transform infrared spectrometry. *Analytical Chemistry* 66, 3543-3351 (1994).
- [64] Liang S., Tilotta D.C., Determination of total petroleum hydrocarbons in soil by dynamic on-line supercritical fluid extraction with infrared photometric detection. *Journal of Chromatography A* 986, 319-325 (2003).
- [65] Smith R.M., Supercritical fluids in separation science-the dreams, the reality and the future. *Journal of Chromatography A* 856, 83-115 (1999).
- [66] Jagota N.K., Nair J.B., Frazer R., Klee M., Wang M.Z., Supercritical fluid chromatography of paclitaxel. *Journal of Chromatography A* 721, 315-322 (1996).
- [67] Bartle K.D., Raynor M.W., Clifford A.A., Davies I.L., Kithinji J.P., Chalmers J.M., Cook B.W., Shilstone G.F., Capillary supercritical fluid chromatography with Fourier transform infrared detection. *Journal of Chromatographic Science* 27, 283-292 (1989).
- [68] Hsieh Y., Favreau L., Schwerdt J., Cheng K.C., Supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometric method for analysis of pharmaceutical compounds in metabolic stability samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40, 799-804 (2006).
- [69] Thiébaut D., Caude M.; Rosset R., Coupling of supercritical fluid chromatography with carbon dioxide mobile phase on packed columns with flame ionization detection. Application to petroleum products group analysis. *Analisis* 15 (10), 528-539 (1987).
- [70] Bertoncini F., Thiébaut D., Caude M., Gagean M., Carrazé B., Beurdouche P., Duteurtre X., On-line packed column supercritical fluid chromatography-microwave-induced plasma atomic emission. *Journal of Chromatography A* 910, 127-135 (2001).
- [71] Albert K., Supercritical fluid chromatography-proton nuclear magnetic resonance spectroscopy coupling. *Journal of Chromatography A* 785, 65-83 (1997).
- [72] Bargmann-Leyder N., Thiébaut D., Caude M., La chromatographie en phase supercritique: mythe ou réalité. *Analisis Magazine* 21 (10), 39-43 (1993).
- [73] Terfloth G., Enantioseparations in super and subcritical fluid chromatography. *Journal of chromatography A* 906, 301-307 (2001).

Chapitre II : Les fluides supercritiques

- [74] Bargmann-Leyder N., Thiébaut D., Vergne F., Begos A., Tambute A., Caude M., High-speed chiral separation of β -blockers by supercritical fluid chromatography on ChyRoSine-A. *Chromatographia* 39, 673-681 (1994).
- [75] Yang Y., Su B., Yan Q., Ren Q., Separation of naproxen enantiomers by supercritical/subcritical fluid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39, 815-818 (2005).
- [76] Warner J.C., Cannon A.S., Dye K.M., Green chemistry. *Environmental Impact Assessment Review* 24, 775-799 (2004)
- [77] Randolph T.W., Blanch H.W., Prausnitz J.M., Wilke C.R., Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnology Letters* 7, 325-328 (1985).
- [78] Jaberski A.J., Malinowski J.J., Potentials and prospects for application of supercritical fluid technology in bioprocessing. *Process Biochemistry* 30, 343-352 (1994).
- [79] Matsuda T., Watanabe K., Harada T., Nakamura K., Enzymatic reactions in supercritical CO₂: carboxylation, asymmetric reduction and esterification. *Catalysis Today* 96, 103-111 (2004).
- [80] Beckman E.J., Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. *Journal of Supercritical Fluids* 28, 121-191 (2004).
- [81] Kronholm J., Kuosmanen T., Hartonen K., Riekkola M-L., Destruction of PAHs from soil by using pressurized hot water extraction coupled with supercritical water oxidation. *Waste Management* 23, 253-260 (2003).
- [82] Vera Pérez I., Rogak S., Branon R., Supercritical water oxidation of phenol and 2,4-dinitrophenol. *Journal of Supercritical Fluids* 30, 71-87 (2004).
- [83] Kritzer P., Dinjus E., Assessment of supercritical water oxidation (SCWO): existing problems, possible solution and new reactor concepts. *Chemical Engineering Journal* 83, 207-214 (2001).
- [84] Charbit G., Badens E., Boutin O., Applications des technologies supercritiques. *16^{ème} Congrès Français de Mécanique*, Nice (France), Septembre (2003).
- [85] Domingo C., Garci-Carmona J., Fanovich M.A., Saurina J., Application of chemometric techniques to the characterisation of impregnated materials obtained following supercritical fluid technology. *The Analyst* 126, 1792-1796 (2001).
- [86] Elvira C., Fanovich A., Fernandez M., Fraile J., San Roman J., Domingo C., Evaluation of drug delivery characteristics of micropsheres of PMMA-PCL-Cholesterol obtained by supercritical-CO₂ impregnation by dissolution-evaporation techniques. *Journal of Controlled Release* 99, 231-240 (2004).

Chapitre II : Les fluides supercritiques

- [87] Guney O., Akgerman A., Synthesis of controlled-released products in supercritical medium. *American Institute of Chemical Engineers* 48, 856-866 (2002).
- [88] Gong K., Darr J.A., Rehman I.U., Supercritical fluid assisted impregnation of indomethacin into chitosan thermosets for controlled release applications. *International Journal of Pharmaceutics* 315, 93-98 (2006).
- [89] Fages J., Lochard H., Letourneau J-J., Sauceau M., Rodier E., Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. *Powder Technology* 141, 219-226 (2004).
- [90] Huang Z., Sun G-B., Chiew Y.C., Kawi S., Formation of ultrafine aspirin particles through rapid expansion of supercritical solutions (RESS). *Powder Technology* 160, 127-134 (2005).
- [91] Hirunsit P., Huang Z., Srinophakun T., Charoenchaitralkool M., Kawi S., Particle formation of ibuprofen-supercritical CO₂ system from rapid expansion of supercritical solutions (RESS): A mathematical model. *Powder Technology* 154, 83-94 (2005).
- [92] Kayrak D., Akman U., Hortaçsu O., Micronisation of ibuprofen by RESS. *Journal of Supercritical Fluids* 26, 17-31 (2003).
- [93] Gosselin P.M., Thibert R., Preda M., McMullen J.N., Polymorphic properties of micronised carbamazepine produced by RESS. *International Journal of Pharmaceutics* 252, 225-233 (2003).
- [94] Thakur R., Gupta R.B., Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process. *International Journal of Pharmaceutics* 308, 190-199 (2006).
- [95] Reverchon E., De Marco I., Supercritical antisolvent micronization of Cefonid : thermodynamic interpretation of results. *Journal of Supercritical Fluids* 31, 207-215 (2004).
- [96] Reverchon E., De Marco I., Supercritical antisolvant precipitation of Cephalosporins. *Powder Technology* 164, 139-146 (2006).
- [97] Wang Y., Yang J., Pfeffer R., Dave R., Michniak B., The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery. *Powder Technology* 164, 94-102 (2006).
- [98] Won D-H., Kim M-S., Lee S., Park J-S., Hwang S-J., Improved physicochemical characteristics of felodipine solid dispersion particles by supercritical anti-solvent precipitation process. *International Journal of Pharmaceutics* 301, 199-208 (2005).

Chapitre II : Les fluides supercritiques

- [99] Boutin O., Badens E., Carretier E., Charbit G., Co-precipitation of a herbicide and biodegradable materials by the supercritical anti-solvent technique. *Journal of Supercritical Fluids* 31, 89-99 (2004).
- [100] Rodrigues M., Peirço N., Matos H., Gomes de Azevedo E., Lobato M.R., Almeida A.J., Microcomposite theophyllinne/hydrogenated palm oil from a PGSS process for controlled drug delivery systems. *Journal of Supercritical Fluids* 29, 175-184 (2004).
- [101] Sencar-Bozic P., Srcic S., Knez Z., Kerc J., Improvement of nifedipine dissolution using supercritical CO₂. *International Journal of Pharmaceutics* 148, 123-130 (1997).

Chapitre III : La spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier

III.1 Introduction

La spectrophotométrie dans l'infrarouge moyen à transformée de Fourier (IRTF) est utilisée depuis de nombreuses années dans l'industrie pharmaceutique pour identifier directement les composés organiques et inorganiques purs.

Les avantages majeurs de l'IRTF sont sa spécificité et son universalité. La spécificité réside dans le concept de « fréquences caractéristiques ». Les groupes fonctionnels absorbent à des fréquences relativement constantes, donnant ainsi la possibilité d'obtenir des informations structurelles détaillées sur les molécules étudiées à partir de ces spectres. On peut donc considérer un spectre infrarouge comme l'empreinte unique d'un composé chimique. Dès lors, la concordance exacte entre le spectre d'un composé de structure connue et celui d'un analyte permet d'identifier ce dernier sans aucun doute possible. A l'exception de quelques molécules homonucléaires telles que O₂, N₂ et Cl₂, toutes les espèces moléculaires absorbent dans l'infrarouge.

III.2 Principe

Les radiations infrarouges de fréquences comprises entre 4000 et 400 cm⁻¹ sont absorbées par une molécule en tant qu'énergie de vibration moléculaire. Il existe deux grands types de vibrations moléculaires : les élongations et les déformations [1-3].

III.2.1 Vibrations d'élongation

Quand deux atomes s'associent pour former une liaison covalente, il s'établit un équilibre entre les forces d'attraction et de répulsion. La distance qui sépare les deux atomes est telle que l'énergie est minimale. La liaison va se comporter comme un oscillateur non-harmonique. En d'autres termes, les atomes vont se rapprocher et s'éloigner en fonction de la variation de la distance inter-atomique (Figure III-1).

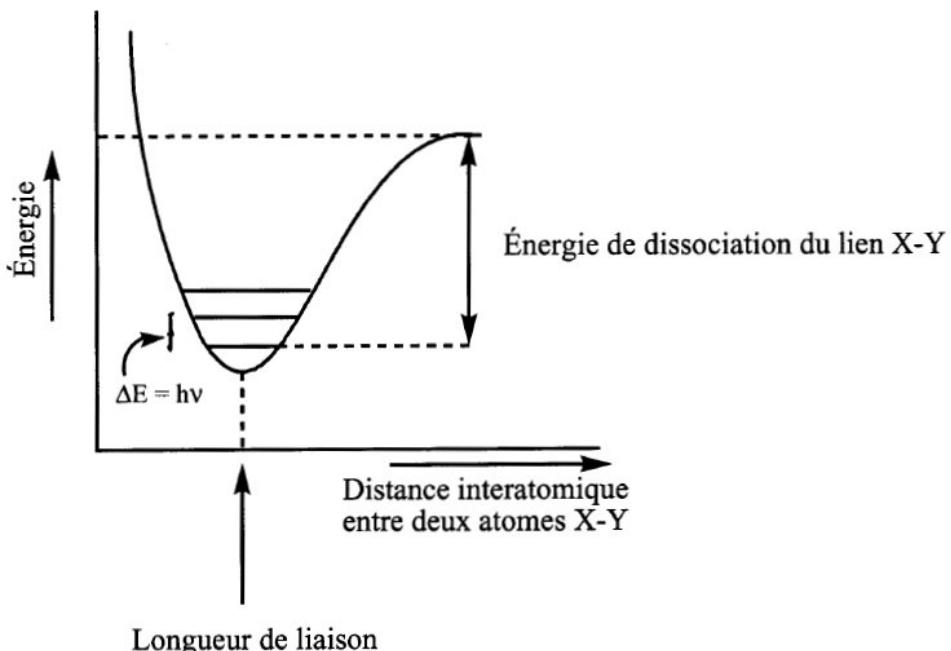


Figure III-1 : Puits de potentiel d'un oscillateur non-harmonique.

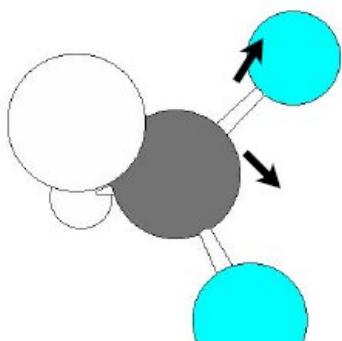
Les attributions des fréquences d'elongation peuvent être estimées par l'application de la loi de Hooke. C'est ainsi que deux atomes et leur liaison se traitent comme un simple oscillateur harmonique composé de deux masses reliées par un ressort. L'équation suivante, dérivée de la loi de Hooke, établit la relation entre la fréquence d'oscillation, les masses atomiques et la constante de force de la liaison.

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi C} \sqrt{\frac{f(M_x + M_y)}{M_x M_y}}$$

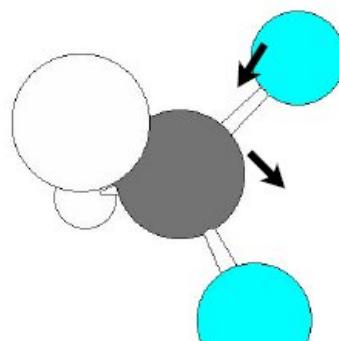
où $\bar{\nu}$ = fréquence de vibration (cm^{-1}) ;
 C = vitesse de la lumière (cm sec^{-1}) ;
 f = constante de force de la liaison (dyne cm^{-1}) ;
 M_x et M_y = masse (g) des atomes X et Y.

Ainsi, les liaisons simples, moins énergétiques que les doubles liaisons, auront une constante de force moins élevée, donc une fréquence de vibration inférieure à celles des liaisons doubles entre atomes identiques. Par contre, les liaisons X–H, où X est un atome quelconque (C, N, O, ...), auront une fréquence d'elongation plus élevée que celle des liaisons C–X.

Dans le cas d'un groupement triatomique, la vibration d'elongation peut ou non conserver son élément de symétrie. La vibration sera alors symétrique (en phase) ou asymétrique (déphasage) (Figure III-2).



Elongation symétrique



Elongation asymétrique

Figure III-2 : Vibrations d'elongation du groupement méthylène (CH_2)
(Richard Giasson, Spectroscopie infrarouge).

Les élongations requièrent généralement de plus hautes énergies que les déformations angulaires.

III.2.2 Vibrations de déformation

Les vibrations de déformation angulaire consistent en une variation de l'angle formé entre deux liaisons successives ou en un mouvement d'un groupe d'atomes par rapport au reste de la molécule.

Les vibrations de déformation peuvent s'effectuer dans le plan ou hors du plan et également de manière symétrique ou asymétrique (Figure III-3).

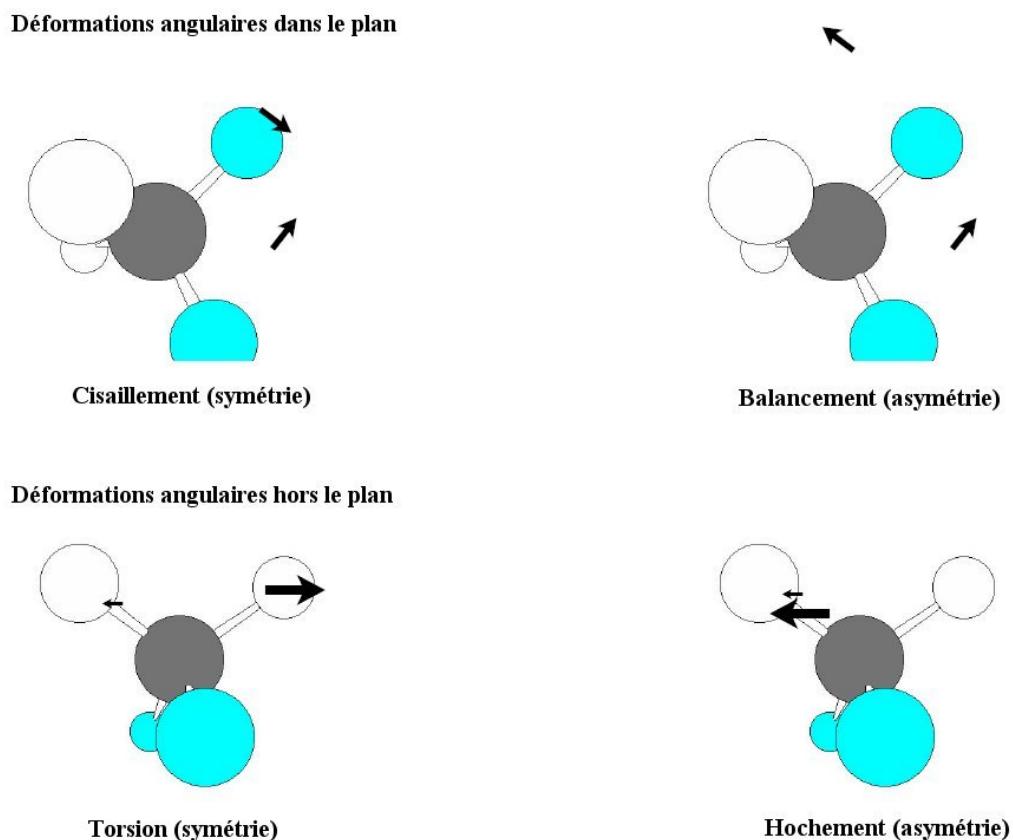


Figure III-3 : Vibrations de déformation du groupement méthylène (CH_2)
(Richard Giasson, Spectroscopie infrarouge).

III.3 Appareillages

La radiation contenant toutes les longueurs d'ondes IR comprises entre 4000 et 400 cm^{-1} est divisée en deux faisceaux grâce à un miroir semi-transparent. Un des faisceaux parcourt un chemin optique fixe, l'autre un chemin optique de longueur variable suivant la position du miroir mobile, avant d'être recombinés, de traverser l'échantillon et d'atteindre le détecteur.

Quand la différence de chemin optique entre les faisceaux correspond à un multiple entier de la longueur d'onde, on parle d'interférence constructive. Une interférence destructive apparaît quant cette différence est un multiple entier impair d'une demi de la longueur d'onde. L'ensemble des interférences produit un interférogramme. La transformée de Fourier convertit cet interférogramme en un spectre IR.

La figure III-4 présente le schéma d'un spectrophotomètre IRTF.

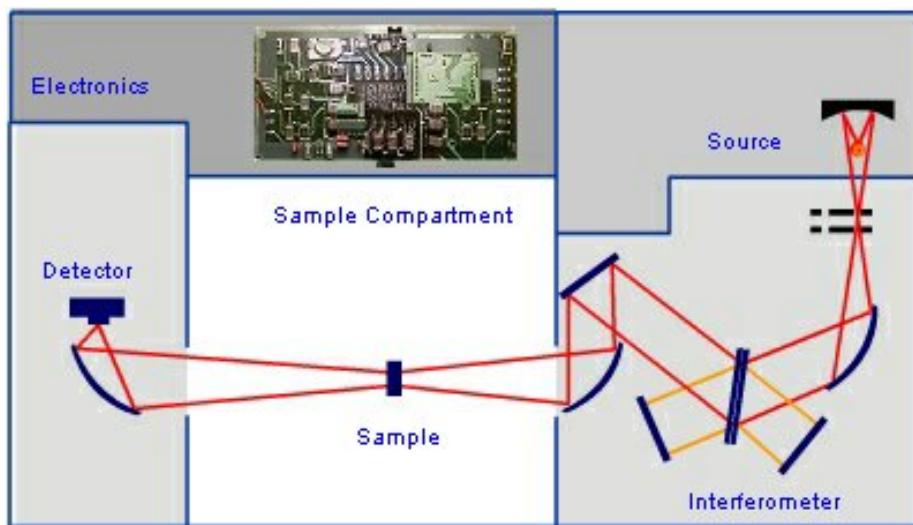


Figure III.3-4 : Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier
(Bruker, IR introduction).

Les systèmes utilisés comportent les parties suivantes :

- Interféromètre de Michelson qui divise la radiation IR en deux faisceaux (séparateur de faisceau) et différencie leurs trajets optiques suivant la position du miroir mobile ;
- Laser (He-Ne) qui permet de suivre la position du miroir mobile et sert de standard interne de nombre d'onde ($\nu=15798,637 \text{ cm}^{-1}$) assurant ainsi une répétabilité de la mesure inférieure à $0,01 \text{ cm}^{-1}$;

- DéTECTEURS. Il en existe deux grands types :
 - MCT (Mercure Cadmium Tellurure) : il s'agit d'un semi-conducteur. Ce type de détecteur est nettement plus sensible et plus rapide que le détecteur DTGS et ce jusqu'à dix fois. Son utilisation est obligatoire pour des analyses rapides (couplage ou détermination de la cinétique) et conseillée avec des accessoires optiques diminuant l'intensité du faisceau. Cependant, il doit être refroidi à l'azote liquide et est nettement plus cher.
 - DTGS (Deuterated TriGlycine Sulfate) : il s'agit d'un bolomètre pyroélectrique. Ce détecteur présente comme avantages d'être simple, peu coûteux, robuste et de travailler à température ordinaire. Mais, il est moins sensible et plus lent que le détecteur MCT.

III.4 Avantages

La spectrophotométrie à transformée de Fourier présente deux avantages par rapport aux techniques dispersives :

- L'avantage de Fellgett : le passage simultané de la gamme complète des radiations à travers l'échantillon est à l'origine du premier avantage [1-2]. A facteurs égaux, cet avantage permet de prendre un spectre plus rapidement, de l'ordre d'une seconde au lieu d'une quinzaine de minutes. La prise d'un spectre résulte souvent de la moyenne de plusieurs balayages successifs. Dans ces conditions, le rapport signal sur bruit (S/B) augmente car le bruit à une longueur d'onde est inversement proportionnel à la racine carrée du temps passé à l'observer. De plus, les absorptions aspécifiques sont réduites jusqu'à une limite qui dépend de l'instrument utilisé et des paramètres choisis.
- L'avantage de Jacquinot : pour des spectres mesurés à la même résolution, l'intensité du faisceau émergeant est plus élevée après le passage dans un interféromètre que dans un monochromateur [4-5]. En effet, l'ouverture d'entrée d'un spectromètre dispersif est assurée par une fente verticale qui possède un angle solide beaucoup plus petit que l'ouverture circulaire dans le cas du spectromètre à transformée de Fourier.

III.5 Limitations

Les principales limitations sont :

- Seules les vibrations provoquant une variation du moment dipolaire de la molécule absorbent en IR.
- Dans le cas de mélanges complexes, il faut généralement réaliser la séparation des composés avant la prise du spectre ou opérer par soustractions successives en se basant sur une, voire plusieurs vibrations spécifiques. Toutefois, l'analyse d'un mélange par soustractions successives reste délicate car elle peut provoquer deux grands types d'artefacts: des pics en forme de dérivée causés par un léger déplacement (chimique ou spectral) de nombre d'onde entre le spectre du mélange et celui de référence ou des pics produits par une soustraction incorrecte car ils ne suivent pas la loi de Beer.
- Compte tenu de leur forte absorption, les solutions aqueuses et alcooliques sont analysées au moyen d'une cellule à réflexion totale atténueée (Figure III-5).

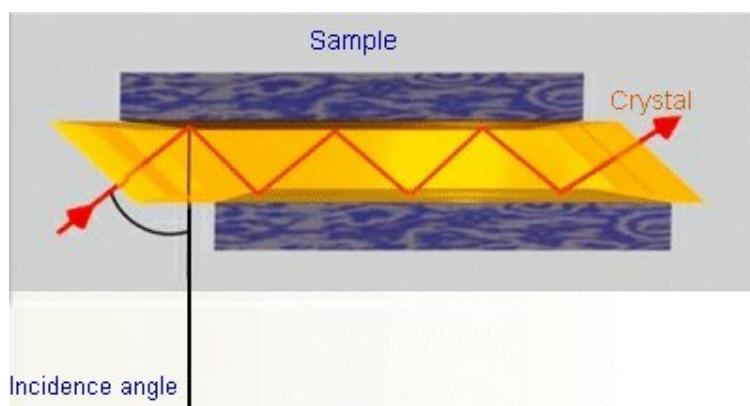


Figure III-5 : Réflexion totale atténueée (RTA ou « ATR »)
(Bruker, IR introduction).

La spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier est une technique à simple faisceau. Donc, le milieu ambiant et les balayages sont enregistrés à des temps différents. Si les concentrations en dioxyde de carbone et/ou en vapeur d'eau ou de solvants varient dans l'atmosphère, elles seront détectées sur le spectre et entraîneront des modifications de celui-ci. Pour remédier à ce problème, le compartiment dans lequel se trouve l'échantillon est purgé à l'azote ou équipé d'un système de navette qui place tour à tour l'échantillon et le blanc dans le faisceau lumineux. Dans ce dernier cas, on se retrouve dans un système à double faisceau.

III.6 Mesure en infrarouge

III.6.1 Echantillons gazeux

Le spectre de gaz ou de liquide à bas point d'ébullition est obtenu par l'expansion de l'échantillon dans une cellule qui, si nécessaire, peut être placée sous pression réduite. Le trajet optique d'une cellule à gaz est généralement de 10 cm (Figure III-6).



Figure III-6 : Cellule à gaz.
(Bruker, IR introduction).

Les spectres sont caractérisés par des pics fins car les interactions intermoléculaires sont faibles dans les gaz.

De plus, pour des analyses quantitatives [6-7], il est nécessaire d'ajouter un gaz inerte afin de toujours obtenir la même pression totale au sein de la cellule. En effet, les coefficients d'extinction d'un signal sont fonctions non seulement de la pression partielle du gaz mais également de la pression totale au sein de la cellule.

III.6.2 Echantillons solides et liquides

III.6.2.1 Pastille de KBr

La réalisation d'une pastille de KBr est l'une des techniques les plus utilisées pour les échantillons solides. Une quantité de solide comprise entre 0.5 et 1mg est mélangée intimement avec environ 250 mg de KBr. Le mélange est ensuite soumis à une pression allant de 5 à 15 tonnes/cm² pour former la pastille.

Compte tenu des propriétés hydrophiles du KBr, on observe souvent les bandes de l'eau atmosphérique absorbée sur celui-ci vers 3500 (ν_{OH}) et 1650 cm⁻¹ (δ_{OH}). Il faut être toutefois conscient que l'eau absorbée dans le KBr peut catalyser certaines réactions chimiques (racémisation, hydrolyse, ...) conduisant à la formation d'un nouveau produit. L'apparition de ce produit, qui n'existe pas dans l'échantillon initial, perturbe les renseignements obtenus lors de la prise du spectre IR.

D'autres problèmes physico-chimiques peuvent intervenir lors de la réalisation de la pastille dûs aux effets conjugués de la pression et de l'échauffement (dégradation de certains sucres fragiles, formation d'entités métastables, modifications polymorphiques de certains réseaux cristallins). La taille des particules joue également un rôle important. Elle doit être dix fois plus petite que la longueur d'onde incidente pour éviter des phénomènes de réflexion ou de lumière diffuse.

III.6.2.2 Travail en solution

Le travail en solution présente quant à lui un certain nombre d'avantages. Premièrement, la diminution des interactions moléculaires provoque un affinement des pics et une augmentation de la résolution spectrale dans le cas de solvants peu polaires. Deuxièmement, l'influence due à l'état cristallin ou amorphe du composé est absente. Finalement, les spectres en solution présentent une ligne de base remarquable. Cependant, le travail en solution est limité par le fait que le solvant doit solubiliser le produit et que ce solvant doit absorber le moins possible dans les zones de fréquences intéressantes.

Il existe plusieurs types de cellule pour travailler en transmission/absorbance (cellules scellées, démontables, micro-cellules,...). Un exemple de cellule à transmission démontable et à épaisseur variable est repris dans la figure ci-dessous (figure III-7).

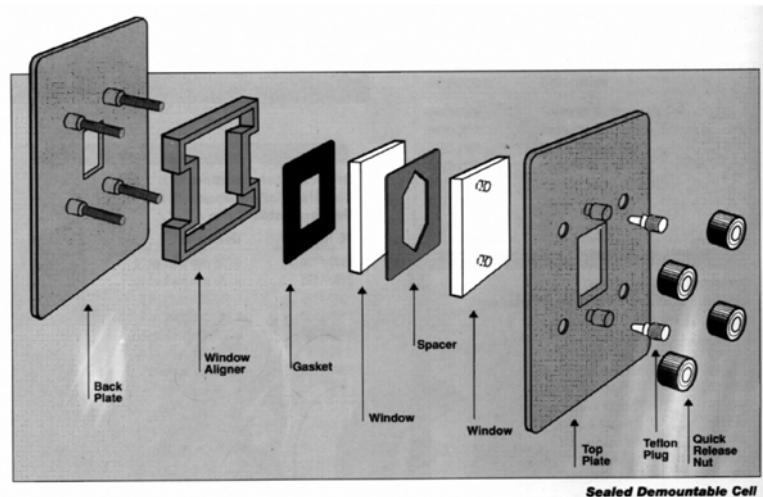


Figure III-7 : Cellule à transmission démontable et à épaisseur variable.

Une liste des différents matériaux pouvant être utilisés comme fenêtre est présentée dans le tableau III-1.

Tableau III-1 : Liste des matériaux couramment utilisés en IR pour la fabrication des fenêtres.

Matériaux	Plage d'utilisation en cm^{-1}	Indice de réfraction à 1000 cm^{-1}	Propriétés générales
NaCl	40000-625	1,49	Soluble dans l'eau et la glycérine, légèrement soluble dans l'alcool. Matériau couramment employé en IR.
KBr	40000-385	1,52	Soluble dans l'eau, l'alcool et la glycérine, légèrement soluble dans l'éther. Hygroscopique.
CsI	33000-200	1,74	Soluble dans l'eau et l'alcool. Malléable et très hygroscopique.
CaF ₂	50000-1100	1,39 (2000 cm^{-1})	Insoluble dans l'eau, résiste à la plupart des acides et des alcalins. Grande résistance mécanique utile pour les opérations nécessitant de fortes pressions.
BaF ₂	50000-770	1,42	Insoluble dans l'eau, soluble dans les acides et NH ₄ Cl. Très sensible aux chocs mécaniques et thermiques.
ZnSe (Irtran-4)	10000-515	2,41	Insoluble dans l'eau. Les solvants organiques, les acides et bases diluées n'ont aucun effet. Du fait de sa faible absorption en IR, il convient parfaitement pour les travaux d'RTA.
ZnS (Cleartran)	10000-715	2,2	Insoluble dans l'eau, les bases et acides et virtuellement dans tous les solvants organiques. Bonne résistance aux chocs mécaniques et thermiques. Convient pour les travaux dans la gamme de température de 200 à 800°C.
AgBr	20000-285	2,2	Insoluble dans l'eau, soluble dans NH ₄ Cl. Malléable, très sensible aux chocs mécaniques et aux rayonnements UV Bonne résistance aux chocs thermiques.
Poly-éthylène	625-30	1,54 (à 5000 cm^{-1})	Matériau économique pour IR lointain. Insoluble dans l'eau, tend à gonfler et à se contaminer avec certains solvants organiques. Ne peut être utilisé pour des travaux nécessitant de fortes températures.

III.7 Applications qualitatives

III.7.1 La spectroscopie infrarouge

Depuis des années, la spectroscopie infrarouge est une méthode très répandue servant à identifier une grande variété de matières organiques et inorganiques. Cette méthode donne rapidement un aperçu des composantes d'un échantillon tout en garantissant l'intégrité de celui-ci [8-13].

III.7.2 La spectroscopie infrarouge de corrélation (2D IR)

Parmi les approches qui contribuent à faciliter l'interprétation des spectres IR des biomolécules, la spectroscopie infrarouge de corrélation peut être utilisée. Elle permet de construire un spectre infrarouge en deux dimensions (2D IR) et améliore la résolution spectrale des pics en les dispersant dans les deux dimensions, facilitant l'analyse des informations sur la structure, sur la nature des interactions intra et intermoléculaires et également sur l'identification des groupements protonés comme l'aspartate et le glutamate des molécules.

La spectroscopie infrarouge de corrélation a été développée pour la première fois en 1990 par Noda [14], puis elle s'est généralisée à partir de 1993 [15].

De nombreux exemples d'applications de la spectroscopie de corrélation pour l'analyse des spectres complexes de macromolécules ont été publiés [16-21]. Cette approche peut être non seulement utilisée pour caractériser les changements de structures produits au cours d'une perturbation physique ou chimique périodique mais également au cours de processus irréversibles ou cinétiques [22-26].

Récemment, les équipes de Chan et de Noda ont utilisé la spectroscopie de corrélation dans l'identification de matrices végétales et ce, plus particulièrement pour l'analyse de la composition de ces matrices et de leurs extraits [27-29].

III.8 Applications quantitatives

L'analyse quantitative par IRTF s'est fort développée depuis ces 20 dernières années. Les premières approches quantitatives commencèrent par le dosage de substances dans des pastilles de KBr [9,30-32]. Cependant, les problèmes rencontrés lors de la réalisation de pastilles, tant au niveau de l'homogénéité et de l'épaisseur de celles-ci qu'au niveau de la nature de l'échantillon, en ont limité la portée et orienté vers l'analyse en solution ou vers les couplages.

III.8.1 Dosage en solution

Comme nous l'avons déjà signalé, le travail en solution présente un certain nombre d'avantages par rapport à celui en pastille. Parmi ces avantages, il convient de rappeler la diminution des interactions moléculaires pour les solvants peu polaires provoquant un affinement des pics et la disparition de l'influence due à l'état cristallin ou amorphe du composé.

Comme le montrent les tableaux III-2 & III-3, nombreuses sont les applications quantitatives qui ont été développées et ce, dans des domaines très variés.

Tableau III-2 : Exemples de dosage en solution par IRTF.

Application quantitative	Référence
Dosage du polydiméthylsiloxane	[33]
Dosage du 17 β -œstradiol et du phénobarbital marqués à l'aide de ligands organométalliques de type Cr(CO) ₃ et Co ₂ (CO) ₆ à l'état de trace	[34]
Détermination de la caféine dans des grains de café	[35]
Analyse quantitative d'huiles essentielles de thym, d'origan et de camomille par réflexion totale atténuée	[36]
Détermination de la buprofénine et du malathion dans des pesticides	[37-38]
Dosage de l'eau lourde dans un réacteur nucléaire	[39]

Tableau III-3 : Exemples de dosage en solution par IRTF.

Application quantitative	Référence
Détermination du succinate de doxylamine dans des préparations pharmaceutiques	[40]
Détermination de l'urée dans des crèmes et des pomades	[41]
Détermination des intermédiaires de synthèse de l'azodicarboxamide	[42]
Détermination de la teneur en éthanol dans de la bière	[43]

III.8.2 Les couplages

A côté des couplages EFSC/IRTF ou CPS/IRTF abordés dans le chapitre précédent, les avantages de l'IRTF ont également été également mis à profit avec la chromatographie en phase gazeuse et l'analyse thermique.

III.8.2.1 Le couplage entre l'IRTF et la chromatographie en phase gazeuse

Le couplage entre l'IRTF et la chromatographie en phase gazeuse a été utilisé pour analyser directement des mélanges complexes. En effet l'IRTF, permet d'obtenir des informations tant qualitatives au travers des fonctions chimiques des molécules que quantitatives en fonction de l'absorbance d'une fréquence spécifique [44-48].

On peut distinguer trois types d'interfaçages qui rendent possible le couplage d'un chromatographe en phase gazeuse avec un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier :

- La cellule appelée « light-pipe » qui autorise l'enregistrement des spectres en phase vapeur directement dans l'effluent chromatographique ;
- Le disque rotatif, maintenu à la température de l'hélium liquide, qui permet de piéger les solutés ;
- La fenêtre en sélénium de zinc qui est refroidie par de l'azote liquide et sur laquelle l'effluent chromatographique est directement déposé.

III.8.2.2 Le couplage entre l'IRTF et l'analyse thermique

L'analyse thermique, dont la thermogravimétrie et l'analyse calorimétrique font partie, est une technique qui a pour objet l'étude de l'évolution d'un paramètre physique ou d'une propriété d'un matériau en fonction de l'élévation de température au cours du temps. Couplée à l'IRTF, l'analyse des gaz émis lors de la transformation ou de la décomposition pourra être réalisée. Par conséquent, ce type de couplage peut apporter une meilleure compréhension des réactions chimiques en fonction du temps. De nombreuses applications ont été décrites dans la littérature comme l'étude des mécanismes de dégradation de chélates formés entre le cuivre ou le nickel et l'aminoimidazole-5(4)-carboxamide [49], des produits de dégradation de dérivés chlorés du latex [50] et de la décomposition de l'hexafluorophosphaste de lithium [51].

III.9 Conclusion

La spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier permet d'obtenir des informations tant sur la structure d'un composé au travers du concept de fréquences caractéristiques des fonctions chimiques que sur la teneur de celui-ci en fonction de l'absorbance d'une vibration spécifique tout en garantissant l'intégrité de l'échantillon analysé. Par conséquent, l'IRTF est un candidat intéressant pour la réalisation de couplages selon le concept PAT. Il convient également de signaler que l'IRTF est une technique de choix pour l'étude de molécules cibles possédant une fonction carbonyle mais également pour celles qui ne possèdent pas de chromophores.

Comme nous avons pu le constater dans le chapitre précédent, peu de publications relatives à l'extraction par fluide supercritique de matrices solides font mention du couplage à l'IRTF afin d'assurer le suivi en temps réel du processus d'extraction. Cependant, le développement de ce type d'interfaçage utilisant des fibres optiques en chalcogène d'arsenic, matériau amorphe et chimiquement inerte offrant une large plage de travail comprise entre 10000 et 900 cm^{-1} et ayant une température de transition vitreuse nette supérieure à la température critique du CO_2 , semble prometteur et a guidé notre choix dans le cadre de ce travail.

III.10 Bibliographie

- [1] Sevhlá G., in *Comprehensive Analytical Chemistry: Analytical Infrared Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, p 555 (1976).
- [2] Silverstein R.M., Balser G.C., Morill T.C., in *Identification spectrométrique de composés organiques*, traduction de la 5^{ème} édition américaine, De Boeck Université, Paris, p 420 (1998).
- [3] Mohan J., in *Organic spectroscopy Principles and Applications*, Narosa, New Delhi, p 505 (2000).
- [4] Koenig J.L., Application of Fourier transform infrared spectroscopy to chemical systems. *Applied Spectroscopy* 29 (4), 293-308 (1975).
- [5] Griffiths P.R., Fourier transform infrared spectrometry. *Science* 222, 297-302 (1983).
- [6] Hakuli A., Kytokivi A., Lakomaa E.L., Krause O., FT-IR in the quantitative analysis of gaseous hydrocarbon mixtures. *Analytical Chemistry* 67 (11), 1881-1886 (1995).
- [7] Garrigues J.M., Pérez-Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Direct determination of ethanol and methanol in liquid samples by means of vapor phase-Fourier transform infrared spectrometry. *Vibrational Spectroscopy* 15, 219-228 (1997).
- [8] Bacci M., Fabbri M., Picollo M., Porcinai S., Non invasive fibre optic Fourier transform-infrared reflectance spectroscopy on painted layers identification of materials by means of principal component analysis and Mahalanobis distance. *Analytica Chimica Acta* 446, 15-21 (2001).
- [9] Al-Zoubi N., Koundourellis J.E., Malamataris S., FT-IR and Raman spectroscopic methods for identification and quantification of orthorhombic and monoclinic paracetamol in powder mixes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29, 459-467 (2002).
- [10] Na N., Ouyang Q-M., Ouyang J., LiY., Non-destructive and in situ identification of rice paper, seals and pigments by FT-IR and XRD spectroscopy. *Talanta* 64, 1000-1008 (2004).
- [11] Cerna M., Barros A.S., Nunes A., Rocha S.M., Delgadillo I., Copikova J., Coimbra M.A., Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. *Carbohydrate Polymers* 51, 383-389 (2003)
- [12] Marengo E., Liparota M.C., Robotti E., Bobba M., Gennaro M.C., Monitoring of pigmented surfaces in accelerated ageing process by ATR-FT-IR spectroscopy and multivariate control charts. *Talanta* 66, 1158-1167 (2005).

- [13] Fischer G., Braun S., Thissen R., Dott W., FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* 65, 63-77 (2006).
- [14] Noda I., Two-dimensional infrared (2D IR) spectroscopy: theory and applications. *Applied Spectroscopy* 44 (4), 550-561 (1990).
- [15] Marcott C., Dowrey A.E., Noda I., Instrumental aspects of dynamic two-dimensional infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 47 (9), 1324-1328 (1993).
- [16] Zanni M.T., Hochstrasser R.M., Two-dimensional infrared spectroscopy: a promising new method for the time resolution of structures. *Current Opinion in Structural Biology* 11 (5), 516-522 (2001).
- [17] Noda I., Story G.M., Marcott C., Pressure-induced transitions of polyethylene studied by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 19 (2), 461-465 (1999).
- [18] Osawa M., Yoshii K., Hibino Y.I., Nakano T., Noda I., Two-dimensional infrared correlation analysis of electrochemical reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 426 (1-2), 11-16 (1997).
- [19] Singhal A., Fina L.J., Dynamic two-dimensional infrared spectroscopy. Part II: Morphological assignments in melt-crystallized nylon 11 spectra. *Vibrational Spectroscopy* 13 (1), 75-82 (1996).
- [20] Wang J., Hochstrasser R.M., Characteristics of the two-dimensional infrared spectroscopy of helices from approximate simulations and analytic models. *Chemical Physics* 297, 195-219 (2004).
- [21] Chen Y., Zhang H., Huang C., Cao Y., Sun R., Guo W., Synthesis and two dimensional correlation infrared spectroscopy study of an organic-inorganic hybrid compound constructed by $[\text{Mo}_5\text{P}_2\text{O}_{23}]$ and Cu-imidazole components. *Spectrochimica Acta Part A* 63, 536-540 (2006).
- [22] Peng Y., Wu P., A two dimensional infrared correlation spectroscopic study on the structure changes of PVDF during the melting process. *Polymer* 45, 5295-5299 (2004).
- [23] Melin A-M., Perromat A., Lorin C., Déléris G., Sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to chemical aggression : investigation by one- and two dimensional infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 36, 15-22 (2004).
- [24] Zhou Q., Sun S-Q., Yu L., Xu C-H., Noda I., Zhang X-R., Sequential changes of main components in different kinds of milk powders using two-dimensional infrared correlation analysis. *Journal of Molecular Structure*, In press.

- [25] Xu P., Wang H., Tong R., Lv R., Shen Y., Du Q., Zhong W., A two dimensional infrared correlation spectroscopic study on the thermal degradation of poly (2-hydroxyethyl acrylate)-co-methyl methacrylate/SiO₂ nanohybrids. *Polymer Degradation and Stability* 91, 1522-1529 (2006).
- [26] Zimmermann B., Baranović G., Two-dimensional infrared correlation spectroscopic study on thermal polymerization of diphenylbutadiyne. *Vibrational Spectroscopy* 41, 126-135 (2006).
- [27] Yu L., Sun S-Q., Fan K-F., Zhou Q., Noda I., Research on processing in medicinal herbs with multi-steps infrared macro-fingerprint method. *Spectrochimica Acta Part A* 62, 22-29 (2005).
- [28] Liu H-X., Sun S-Q., Lv G-H, Chan K.K.C., Study on Angelica and its different extracts by Fourier transform infrared spectroscopy and two-dimensional correlation IR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A* 64, 321-326 (2006).
- [29] Xu C-H., Sun S-Q., Guo C-Q., Zhou Q., Tao J-X., Noda I. Multi-steps infrared macro-fingerprint analysis for thermal processing of *Fructus viticis*. *Vibrational Spectroscopy* 41, 118-125 (2006).
- [30] Ivanova B.B., Monoclinic and orthorhombic polymorphs of paracetamol-solid state linear dichroic infrared spectral analysis. *Journal of Molecular Structure* 738, 233-238 (2005).
- [31] Koleva B.B., Polymorphs of aspirin-solid-state IR-LD spectroscopic and quantitative determination in solid mixtures. *Journal of Molecular Structure*, In press.
- [32] Vagenas N.V., Gatsouli A., Kontoyannis C.G., Quantitative analysis of synthetic calcium carbonate polymorphs using FT-IR spectroscopy. *Talanta* 59, 831-836 (2003).
- [33] Falk M., Seto P.F., Determination of traces of silicones by FT-IR spectroscopy. *Canadian Journal of Spectroscopy* 1, 153-155 (1988).
- [34] Salmain M., Vessières A., Jaouen G., Butler I.S., Fourier transform infrared spectroscopy method for the quantitative trace analysis of transition-metal carbonyl-labeled bioligands. *Analytical Chemistry* 63, 2323-2329 (1991).
- [35] Bouhsain Z., Garrigues J.M., Garrigues S., de la Guardia M., Flow injection Fourier infrared determination of caffeine in coffee. *Vibrational Spectroscopy* 21, 143-150 (1999).
- [36] Schulz H., Quilitzsch R., Krüger H., Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 661-662, 299-306 (2003).

- [37] Armenta S., Quintas G., Moros J., Garrigues S., de la Guardia M., Fourier transform infrared spectrometric strategies for the determination of Buprofezin in pesticide formulations. *Analytica Chimica Acta* 468, 81-90 (2002).
- [38] Quintas G., Morales-Noé A., Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M., Fourier transform infrared spectrometric determination of malathion in pesticides formulations. *Analytica Chimica Acta* 502, 213-220 (2004).
- [39] Choi S.Y., Choo J., Chung H., Sohn W., Kim K., Feasibility of Fourier transform (FT) infrared spectroscopy for monitoring heavy water concentration in pressurized heavy water reactor. *Vibrational Spectroscopy* 31, 251-256 (2003).
- [40] Ventura-Gayete J.F., de la Guardia M., Garrigues S., On-line sample treatment and FT-IR determination of doxylamine succinate in pharmaceuticals. *Talanta*, In press.
- [41] Otte X., Evrard B., Delattre L., Thunus L., Development and validation of a new Fourier transform infrared spectrometric method for the quantification of urea in creams and ointments. *Analytica Chimica Acta* 451, 323-328 (2002).
- [42] Otte X., Lejeune R., Thunus L., Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) for qualitative and quantitative analysis of azodicarboxamide and its potential impurities. *Analytica Chimica Acta* 355, 7-13 (1997).
- [43] Gallignani M., Garrigues S., de la Guardia M., Derivative Fourier transform infrared spectrometric determination of ethanol in Beers. *Analyst* 119, 1773-1778 (1994).
- [44] Ragunathan N., Krock K.A., Klawun C., Sasaki T.A., Wilkins C.L., Gas chromatography with spectroscopic detectors. *Journal of Chromatography A* 856, 349-397 (1999).
- [45] Praisler M., Dirinck I., Van Bocxlear J., De Leenheer A., Massart D.L., Pattern recognition techniques screening for drugs of abuse with gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy. *Talanta* 53, 177-193 (2000).
- [46] Visser Tom, FT-IR detection in gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 21, 627-636 (2002).
- [47] Praisler M., Van Bocxlear J., De Leenheer A., Massart D.L., Chemometric detection of thermally degraded samples in the analysis of drugs of abuse with gas chromatography-Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Chromatography A* 962, 161-173 (2002).
- [48] Cooper D.B., Read R.W., Timperley C.M., Williams N.H., Black R.M., Identification of iso- and n-propylphosphonates using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Chromatography A* 1040, 83-95 (2004).

Chapitre III : La spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier

- [49] Materazzi S., D'Ascenzo G., Aquili S., Kadish K.M., Bear J.L., Thermoanalytical characterization of solid-state Co(II)-, Ni (II)- and Cu(II)-4(5)-aminoimidazole-5(4)-carboxamide complexes. *Thermochimica Acta* 397, 129-134 (2003).
- [50] Yu H-P., Li S-D., Zhong J-P., Xu K., Studies of thermooxidative degradation process of chlorinated natural rubber from latex. *Thermochimica Acta* 410, 119-124 (2004).
- [51] Teng X-G., Li F-Q., Ma P-H., Ren Q-D., Li S-Y., Study on thermal decomposition of lithium hexafluorophosphate by TG-FT-IR coupling method. *Thermochimica Acta* 436, 30-34 (2005).

CONCLUSIONES GENERALES

Chapitre IX : Conclusions générales

Les techniques de préparation d'échantillons demeurent assez rudimentaires et ceci plus particulièrement dans le cas des matrices solides. Parmi les différentes techniques, l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique se présente de plus en plus comme une alternative aux procédés classiques d'extraction liquide-solide qui possèdent, ainsi que nous l'avons déjà souligné, un certain nombre d'inconvénients tant au niveau de la toxicité des solvants que de la pollution de l'environnement et de la durée. De plus, l'EFSC offre la possibilité de couplage à de nombreux systèmes de détection permettant ainsi l'analyse en ligne du processus d'extraction de molécules cibles présentes dans le fluide supercritique.

Récemment, le concept « Process and Analytical Technology », défini comme un système permettant de comprendre, d'analyser et de contrôler le procédé par l'analyse non destructive et en temps réel de ses différents paramètres, tend à s'imposer dans le domaine pharmaceutique et est tout au moins promu par l'administration américaine de contrôle des aliments et des médicaments (FDA). C'est notamment dans ce contexte que nous avons travaillé sur le développement et la validation d'une méthode de dosage en ligne d'une molécule cible par la spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier dans le CO₂ supercritique après passage de celui-ci au travers d'une cartouche d'extraction contenant la matrice végétale.

La première partie de ce travail a été consacrée au développement et à la validation d'une méthode de dosage en différé par IRTF de la tagitinine C contenue dans les parties aériennes de *Tithonia diversifolia*. A cette fin, nous avons exploité le signal très spécifique de la vibration d'elongation de la fonction diénone (1664.8 cm⁻¹) pour effectuer nos expériences. L'absence d'interférences à cette fréquence a été vérifiée sur différents extraits bruts éthérés et aqueux de la plante et ce, en comparant les résultats à ceux obtenus avec une méthode chromatographique haute performance. Au terme de ce travail, il ressort que nous avons été les premiers à proposer une méthode IRTF quantitative pour le dosage de la tagitinine C qui présente en plus l'avantage d'être non destructive, spécifique, sensible et rapide.

Conclusions générales

Par la suite, la méthode de dosage par IRTF nous a permis d'étudier le processus d'extraction de l'analyte par le CO₂ supercritique. A cette occasion, la méthodologie des plans d'expériences a été utilisée pour optimiser le rendement d'extraction de l'analyte en fonction de la pression et de la température du fluide supercritique. L'analyse des résultats a mis en évidence que l'extraction du composé s'opère sur l'entièreté du domaine expérimental et que la zone optimale se situe à des valeurs élevées de pression (30,4-40,5 MPa) et de température (60-80 °C).

Dans les conditions optimales de température et de pression du fluide supercritique, nous avons pu démontrer que l'ajout de méthanol au CO₂ supercritique ne permettait pas d'améliorer le rendement d'extraction de la tagitinine C.

A l'aide d'une étude comparative avec les procédés conventionnels d'extraction, nous avons montré que l'extraction par fluide supercritique dans les conditions optimales extrayait plus rapidement la tagitinine C tout en conservant un rendement égal à celui de l'extraction à l'éther et au dichlorométhane. Enfin, nous avons surtout démontré que l'extraction par fluide supercritique présentait une sélectivité nettement supérieure aux procédés conventionnels testés.

Grâce à l'association de ces deux techniques originales, nous avons ensuite contribué à la détermination de la distribution de la tagitinine C dans les parties aériennes de *T. diversifolia* à savoir les feuilles, les inflorescences et la tige. Au terme de cette étude accessoire dans le cadre de notre travail, nous avons clairement mis en évidence que la partie la plus riche en tagitinine C est la feuille et que la tige en est exempte.

Par ailleurs, l'importance de la granulométrie de la poudre sur le rendement d'extraction a pu être clairement objectivé et ce, plus particulièrement dans des conditions de faible température et de faible pression. En effet, nous avons observé, lorsque la taille des particules diminuait, des résultats comparables à ceux obtenus dans les conditions optimales d'extraction. Par conséquent, la prise en compte de ce paramètre nous a permis de réduire la pression et la température du fluide supercritique et donc de travailler dans des conditions plus « douces » qui pourraient s'avérer indispensables dans le cas de composés thermolabiles.

Conclusions générales

Parallèlement, nous avons étudié la formation de complexes entre la tagitinine C et trois cyclodextrines différentes (β -, 2,6 diméthyl- β - et la γ -cyclodextrine) en milieu aqueux. Par la méthode dite de « Job-plot » utilisant la spectrophotométrie UV-visible et par la polarographie classique, nous avons pu déterminer respectivement que la tagitinine C forme un complexe de stœchiométrie 1:1 avec les trois cyclodextrines et que la constante d'association la plus élevée était obtenue avec le dérivé méthylé de la β -cyclodextrine (165 M⁻¹). La résonance magnétique nucléaire et la modélisation moléculaire nous ont permis de déterminer les différentes parties de la tagitinine C incluses dans la cavité des cyclodextrines testées.

Par la suite, nous avons comparé l'influence des complexes sur la transformation photochimique de la tagitinine C en tagitinine F et ce, à deux niveaux de concentration en cyclodextrine. Seul le complexe tagitinine C/2,6 diméthyl- β -cyclodextrine a montré un ralentissement de la cinétique de la réaction photochimique. Cette diminution était d'autant plus marquée que la concentration en cyclodextrine augmentait dans le milieu traduisant un déplacement de l'équilibre entre la molécule hôte et la cyclodextrine vers la formation du complexe. L'influence sur la cinétique a pu être expliquée par l'encombrement stérique des groupements 2-O-méthyles de la cyclodextrine au niveau de la fonction diénone de la tagitinine C. Cette hypothèse a été corroborée par les résultats obtenus avec de la RMN 2D montrant la présence d'interactions entre les groupements 2-O-méthyles de la cyclodextrine et ceux proches de la diénone et par les résultats de la modélisation moléculaire.

Cependant, compte tenu de l'orientation au sein de la cavité des cyclodextrines et des faibles constantes d'association, la tagitinine C ne semble pas être une molécule idéale pour l'utilisation des cyclodextrines comme agent photo-protecteur.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons construit un interfaçage tout à fait original et à notre connaissance unique entre un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier et un extracteur à CO₂ supercritique. Celui-ci est composé d'une cellule à haute pression équipée de fibres optiques en séléniure et tellure d'arsenic (AsSeTe). La focalisation du rayonnement infrarouge entrant et sortant des fibres optiques est assurée par deux lentilles plan-convexes (GeAsSe) montées sur un rail optique. Ce dispositif présente une excellente résistance mécanique à la pression et à la température et a l'avantage d'être peu coûteux.

Conclusions générales

Ce couplage nous a permis d'étudier de manière approfondie et en temps réel le processus d'extraction de la tagitinine C ainsi que les variations de la composition de l'extrait en fonction des caractéristiques physico-chimiques du fluide supercritique. A l'aide du profil d'extraction, nous avons observé qu'un plateau pouvait être atteint pour des pressions égales à 14.0 et 20.0 MPa endéans les 25 minutes et que les profils différaient en fonction des conditions de travail. En effet, lorsque la pression était égale à 8.0 MPa, aucun profil n'a pu être constaté. L'absence de résultats s'explique par le fait que le pouvoir solvant du fluide supercritique est insuffisant pour extraire l'analyte de la matrice végétale.

En vue d'augmenter encore la sélectivité de l'extraction par fluide supercritique, nous avons testé des conditions de température et de faible pression qui sont communément admises comme plus sélectives. A nouveau, nous avons utilisé la méthodologie des plans d'expériences qui nous a permis de mettre en évidence l'influence positive et prépondérante de la pression par rapport à l'influence négative de la température sur le rendement d'extraction de l'analyte. Par ailleurs, nous avons également pu mettre en évidence l'influence de ces deux paramètres sur la composition de l'extrait par une approche qualitative basée sur les vibrations d'élongation C-H.

Finalement, la méthode de dosage EFSC/IRTF développée a été validée selon l'approche novatrice faisant appel aux profils d'exactitude. Les résultats de la validation indiquent clairement non seulement que cette technique répond aux exigences fixées pour le dosage de composés dans des matrices complexes mais, et surtout, permet de quantifier les extraits produits de la sorte avec une exactitude (justesse+précision) en accord avec celle requise dans le cadre des études ultérieures.

En effet, cette parfaite maîtrise en ligne du processus d'extraction en fonction du pouvoir solvant du CO₂ supercritique nous permet de caractériser relativement rapidement de nouveaux extraits qui pourront être utilisés directement dans des études ultérieures d'efficacité thérapeutique.

Conclusions générales

Au cours de ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'extraction et le dosage en ligne de la tagitinine C dans les parties aériennes de *Tithonia diversifolia*. Toutefois, il serait intéressant de tester de nouvelles molécules cibles d'origine naturelle afin d'évaluer l'applicabilité du couplage EFSC/IRTF à d'autres matrices végétales. Cependant, des investigations complémentaires concernant l'influence de la densité du CO₂ supercritique sur les caractéristiques spectrales des différentes fonctions nous semblent encore nécessaires pour mener à bien ce projet.

Cet outil original et rapide pourrait également être très utile lors de l'étude en temps réel de l'évolution d'une réaction chimique en milieu supercritique. En effet, la mesure *in situ* permettrait d'obtenir rapidement des informations sur le terme de la réaction mais aussi sur la formation d'intermédiaires dont la stabilité ne permet pas leur caractérisation par des techniques en différée. Une application particulièrement intéressante de cet outil serait l'investigation en ligne de la formation de complexes d'inclusion avec des cyclodextrines en milieu supercritique.

RESUME-SUMMARY

Résumé

L'extraction par fluide supercritique fait partie des nouvelles techniques de préparation d'échantillons solides qui ont émergé au cours de ces dernières années. Elle constitue une alternative intéressante aux techniques classiques d'extraction liquide-solide car le pouvoir solvant du fluide supercritique est ajustable, non seulement par la température, mais aussi par la pression.

L'extraction par le CO₂ supercritique de la tagitinine C, lactone sesquiterpénique photo sensible à l'activité anti-inflammatoire, anti-malarique et anticancéreuse à partir des parties aériennes de *Tithonia diversifolia* constituait une application intéressante de ce procédé et a été sélectionnée comme molécule cible dans le cadre de ce travail. Son optimisation a impliqué des dosages répétés de l'analyte dont la vibration d'elongation de la fonction diénone absorbe intensément à des fréquences particulières dans le domaine de l'infrarouge. Aussi, avons-nous tout d'abord développé et validé, dans la première partie de ce travail, une technique IRTF d'analyse en différé sélective, rapide, non destructrice et sensible fondée sur ses propriétés. Les différents paramètres (température, pression, quantité de CO₂, granulométrie de l'échantillon) influençant le rendement d'extraction de l'analyte ont pu être étudiés à cette occasion. Dans les conditions optimales, nous avons montré que l'extraction par le CO₂ supercritique extrayait rapidement et avec une meilleure sélectivité la tagitinine C tout en conservant un taux de récupération comparable aux techniques classiques d'extraction.

Parallèlement à ces travaux et compte tenu de la photo-dégradation de la tagitinine C en tagitinine F, la formation de complexes d'inclusion avec la β, 2,6-di-O-méthyle-β et la γ-cyclodextrine a été investiguée. Différentes techniques ont été employées pour caractériser les complexes formés au niveau de la stœchiométrie, de la constante de formation et de la structure. Aucun effet photo-protecteur significatif n'a été démontré avec la β et la γ-cyclodextrine. En revanche, nous avons mis en évidence une diminution de la vitesse de la photo-dégradation en présence de la 2,6-di-O-méthyle-β-cyclodextrine. Malheureusement, celle-ci reste trop limitée pour envisager l'utilisation de cette cyclodextrine pour éviter la dégradation de la tagitinine C lors de son exposition à la lumière directe.

Résumé

Dans la dernière partie de notre travail, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur l'interfaçage EFSC/IRTF qui constituait un indéniable défi. Le développement de l'interfaçage a été réalisé à l'aide de fibres optiques en chalcogène d'arsenic entre un extracteur à fluide supercritique et un spectrophotomètre IR et a ainsi permis d'effectuer le dosage en ligne de la tagitinine C dans le CO₂ supercritique après passage de celui-ci au travers d'une cartouche d'extraction contenant la matrice végétale. Par ailleurs, le développement de cet outil répond parfaitement aux nouvelles approches (Process and Analytical Technology) préconisées par la FDA.

Le processus d'extraction de l'analyte a pu dès lors être étudié de manière approfondie et en temps réel en fonction des caractéristiques physico-chimiques du fluide supercritique et de la durée de l'extraction. L'utilisation de la vibration d'elongation CH comme marqueur a permis de mettre en évidence l'obtention d'extraits de composition variable qui pourront être utilisés directement dans des études d'efficacité thérapeutique.

Enfin, la méthode d'extraction et de dosage en ligne de la tagitinine C a fait l'objet d'une validation poussée selon la nouvelle approche faisant appel aux profils d'exactitude dans un intervalle de dosage allant 500 à 2500 µg. Sur la base des différents profils d'exactitude obtenus, le modèle de régression linéaire a été choisi pour décrire la relation concentration-réponse. En effet, ce modèle présentait des valeurs de biais relatif inférieures à 2%, des valeurs de coefficient de variation ne dépassant pas 4% et des limites de tolérance comprises dans les limites d'acceptation de ±15% sur toute la gamme de concentration. De plus, le modèle de régression linéaire était en parfaite adéquation avec la méthode des ajouts dosés.

Summary

In the last two decades, supercritical fluid extraction processing with carbon dioxide has emerged as an alternative to the conventional solvent extractions of solid matrices and especially for the extraction of natural products for foods and medicines. Indeed, carbon dioxide is an inert, inexpensive, widely available, odourless, environment-friendly solvent and its solvent strength can be tuned by changing the pressure and temperature conditions.

In the first part of our work, supercritical fluid extraction of tagitinin C, a known sesquiterpene lactone which shows significant antiplasmodial and antiproliferative activity, was investigated using an off-line FTIR method for the determination of this compound in the aerial parts of *Tithonia diversifolia*. Different parameters as temperature, pressure, solvent mass and sample granulometry governing the supercritical fluid extraction process were optimised. Finally, we demonstrated that the optimised supercritical fluid extraction gave extraction yields comparable to those of the classical methods of extraction but with an improvement of the selectivity and a reduction of the extraction time.

At the same time, the formation of inclusion complexes of tagitinin C with β -, 2,6-di-O-methyl- β and γ -cyclodextrin was investigated according to its photochemical conversion into tagitinin F. Several techniques were used to characterize the tagitininC/CyD complexes in order to understand and to interpret the data obtained from the photochemical study. This letter mainly showed that the photodegradation rate of tagitinin C was slowed in presence of 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin while no significant effect was observed in presence of β - and γ -cyclodextrin.

The second part of our work was devoted to the SFE/FTIR interfacing which was a great challenge. This interface was constructed from a stainless steel cross cell equipped with chalcogenide-glass infrared fibers. This hyphenated system allowed to determine online tagitinin C in supercritical CO₂ after this one flowed through the extraction vessel containing the plant material. Consequently, the extraction process of the analyte was studied thoroughly and in real time according to the physicochemical characteristics of the supercritical fluid and to the extraction time. The use of the CH stretching vibration as tracer allowed to highlight the composition change of extracts which could be used directly

Summary

in studies of therapeutic efficiency. In addition, the development of this tool answers perfectly the new approaches (Process and Analytical Technology) recommended by the FDA.

Finally, the extraction and on-line determination method of tagitinin C was successfully validated using a new approach based on accuracy profiles as decision tool. On this basis, a linear regression model was chosen for the calibration curve. Regarding trueness, precision and accuracy, mean measured values were close to the theoretical concentrations (lower than 1.6%) and the RSD values were relatively low (less than 4% for the middle of the range). Moreover, the method was found to be accurate as the two-sided 95 % beta-expectation tolerance interval did not exceed the acceptance limits of 85 and 115 % on the concentration range from 500 to 2500 µg

ANNEXES

Liste des publications internationales

1^{er} auteur

- 1) Ziemons E., Goffin E., Lejeune R., Angenot L., Thunus L., FT-IR measurement of tagitinin C after solvent extraction from *Tithonia diversifolia*. *Talanta* 62, 383-387 (2004).
- 2) Ziemons E., Goffin E., Lejeune R., Proença da Cunha A., Angenot L., Thunus L., Supercritical carbon dioxide extraction of tagitinin C from *Tithonia diversifolia*. *Journal of Supercritical fluids* 33, 53-59 (2005).
- 3) Ziemons E., Dive G., Debrus B., Barillaro V., Frederich M., Lejeune R., Angenot L., Delattre L., Thunus L., Hubert Ph., Study of physicochemical properties in aqueous medium and molecular modelling of tagitinin C/cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, sous presse (2006).
- 4) Ziemons E., Wandji Mbakop N., Rozet E., Lejeune R., Angenot L., Thunus L., Hubert Ph., Optimisation of SFE method on-line coupled to FT-IR spectroscopy for the real-time monitoring of the extraction of tagitinin C in *T. diversifolia*. *Journal of Supercritical Fluids*, sous presse (2006).
- 5) Ziemons E., Barillaro V., Rozet E., Wandji Mbakop N., Lejeune R., Angenot L., Thunus L., Hubert Ph., Direct determination of tagitinin C in *Tithonia diversifolia* leaves by on-line coupling of supercritical carbon dioxide extraction to FT-IR spectroscopy by means of optical fibres. *Talanta*, sous presse (2006).

Coauteur

- 1) Goffin E., Ziemons E., de Ceu de Madureira M., Martins A.P., Proença da Cunha A., Philippe G., Tits M., Angenot L., Frederich M., In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: tagitinin C. *Planta Medica* 68 (1-2), 541-543 (2002).
- 2) Goffin E., Proença da Cunha A., Ziemons E., Tits M., Angenot L., Frederich M., Quantification of tagitinin C in *Tithonia diversifolia* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 14(6), 378-380 (2003).
- 3) Barillaro V., Bertholet P., Henry de Hassonville S., Ziemons E., Evrard B., Delattre L., Piel G., Effect of acidic ternary compounds on the formation of miconazole/cyclodextrin inclusion complexes by means of supercritical carbon dioxide. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7(3), 378-388 (2004).
- 4) Marini R.D., Rozet E., Vander Heyden Y., Ziemons E., Boulanger B., Bouklouze A., Servais A-C., Fillet M., Crommen J., Hubert Ph., Robustness testing of chiral NACE method for R-timolol determination in S-timolol maleate and uncertainty assessment for quantitative data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, sous presse (2006).

