

## Fractionnement par le dioxyde de carbone supercritique et urée

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 11, Numéro 2, 131-2, MARS/AVRIL 2004, Extraction et fractionnement des AGPI oméga 3 à longues chaînes

**Auteur(s) :** Danielle BARTH

*Laboratoire de Thermodynamique des Milieux Polyphasés, École Nationale Supérieure des Industries Chimiques, 1, rue Grandville, BP 451, 54001 Nancy, France*

*Tél. : (+ 33) 3 83 17 50 27*

*Fax : (+ 33) 3 83 35 08 11*

*<barth@ensic.inpl-nancy.fr>*

**Résumé :** Le dioxyde de carbone supercritique est un solvant de choix dans le cadre de la production ou de la purification des lipides. Il peut être utilisé à des températures voisines de la température ambiante, il protège les molécules sensibles à l'oxydation et, enfin, il évite l'élimination de solvant organique. La connaissance des équilibres de phases devrait permettre une meilleure précision des procédés de séparation potentielle constituée par l'extraction et la chromatographie préparative supercritique.

**Mots-clés :** huile de poisson, esters éthyliques d'acides gras, dioxyde de carbone supercritique, extraction, chromatographie préparative

### ARTICLE

Les fluides supercritiques sont des vecteurs importants du développement de procédés propres et sûrs. En effet les deux composés les plus utilisés, tant au stade de la recherche ou de l'industrie, sont le dioxyde de carbone ( $T_c = 304 \text{ °K}$ ,  $P_c = 74 \text{ bar}$ ) et l'eau ( $T_c = 647 \text{ °K}$ ,  $P_c = 221 \text{ bar}$ ). Les applications des fluides supercritiques concernent de nombreux produits dans des domaines très différents de l'industrie : matériaux, produits de synthèse, produits naturels,... et de nombreux procédés : production de particules, réactions chimiques, procédés de séparation... [1]. Depuis les années 1980, l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique a pu être appliquée à la production d'huile végétale et aux lipides [2]. Nous avons, pour notre part, contribué au développement de deux procédés de séparation utilisant le dioxyde de carbone supercritique : l'extraction liquide et la chromatographie préparative, et les avons utilisés pour la purification des esters éthyliques d'acides gras issus de l'huile de poisson [3]. Le dioxyde de carbone supercritique est un solvant de choix pour ces molécules : il n'est pas toxique, sa température critique est relativement basse, ce qui permet d'éviter la dégradation thermique des molécules, les réactions d'oxydation de ces molécules semblent éviter en présence de dioxyde de carbone supercritique. L'objectif est d'obtenir des fractions riches en composés présentant le plus d'intérêt du point de vue des applications pharmaceutiques : il s'agit des esters des deux acides gras polyinsaturés de la famille n-3 : l'acide cis-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque (EPA) noté 20 :5n-3 et l'acide cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque (DHA) noté 22 :n-3.

L'EPA et le DHA sont présents en quantités particulièrement importantes dans les produits marins, principalement sous forme de triacylglycérols et de phospholipides. Les proportions de chaque acide gras varient selon l'espèce de poisson, le lieu de vie, la saison et l'année. L'huile de poisson peut subir différents traitements, ce qui fait que les fractions riches en EPA et DHA peuvent être issues de sources différentes : glycérides, acides gras libres ou esters. Il semblerait qu'il soit plus facile d'obtenir des extraits concentrés à partir des esters qu'à partir des acides [1], beaucoup moins stables que les esters par ailleurs. Ceci a conduit à ce que ce soit surtout le fractionnement des esters par le dioxyde de carbone supercritique qui ait été étudié.

### **Equilibres de phases**

Le nombre d'acides gras pouvant être très important dans les huiles de poissons (de l'ordre de 60), la charge à traiter est un système multiconstituant qui va être mis en contact avec du dioxyde de carbone supercritique ; ceci conduit au traitement d'un système relativement complexe, d'autant plus que les propriétés du dioxyde de carbone supercritique varient en fonction de la pression et de la température.

Il existe plusieurs méthodes permettant de réaliser des mesures d'équilibre de phases en présence de dioxyde de carbone supercritique. Stout *et al.* [4] ont mesuré les coefficients de partage de sept esters (14 :0, 16 :0, 18 :1 $\omega$ -9, 20 :1 $\omega$ -9, 20 :4 $\omega$ -6, 20 :5 $\omega$ -3, 22 :6 $\omega$ -3) qui leur semblaient les plus importants en utilisant une méthode dynamique, l'extraction. Ces résultats ont été obtenus à partir d'analyses par chromatographie en phase gazeuse des extraits pour des différents couples de température et pression. Ils ont pu mettre en évidence un effet de condensation rétrograde à une pression de 151 bar en comparant des résultats à 70 °C et 90 °C.

Pour mesurer des solubilités de solides ou de liquides dans le dioxyde de carbone supercritique, on peut également utiliser une méthode synthétique. Le principal composant de l'installation est une cellule résistant aux fortes pressions, transparente, de volume variable, thermostatée et munie d'un système d'agitation. Cette cellule est chargée d'un mélange solvant-soluté de composition connue. Une fois la température et la pression réglées afin d'obtenir un mélange homogène, la pression (par variation du volume de la cellule, ou la température sont modifiées afin d'obtenir l'apparition d'une nouvelle phase. Les points de mesure peuvent être obtenus par une méthode visuelle. C'est alors par simple observation de l'intérieur de la cellule, éventuellement grossi, qu'il est possible de déterminer, par variations successives du volume de la cellule, le point de bulle, le point de rosée et le point critique. C'est ainsi que nous avons pu réaliser [5] des mesures de solubilité de produits de grande pureté EPA-EE (96 %) et DHA-EE (93,6 %), produits fournis par la Société Pronova (Porsgrunn-Norvège). Ces résultats ont pu être modélisés par des méthodes utilisant la contribution de groupes ; celles-ci avaient pu être appliquées également à des mélanges [6, 7].

Riha *et al.* [8] ont également utilisé cette méthode, comme ils ont étudié treize mélanges différents d'esters éthyliques, ils ont procédé à des prélèvements de la phase vapeur et de la phase liquide au niveau de la cellule et les ont analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats expérimentaux ont pu être corrélés de manière satisfaisante en utilisant l'équation d'état de Peng-Robinson et la règle de mélange de Melhem. Néanmoins les résultats obtenus pour les systèmes ternaires ne permettent pas de prédire des conditions de séparations d'un mélange complexe.

## Extraction

C'est à partir des résultats obtenus par Eisenbach [9] en extraction batch, utilisant un « doigt chauffant » en tête de colonne et conjointement aux résultats publiés par Nilsson [10], proposant d'utiliser une colonne constituée de quatre tronçons pouvant être thermostatés de manière indépendante, que nous avons pu proposer [3] un procédé d'extraction batch composé de deux colonnes d'extraction de diamètre intérieur 54 mm (colonne 1 : 4 × 1 m., colonne 2 : 1,40 m). Nous avons ainsi pu obtenir à partir d'un mélange d'esters éthyliques préconcentrés (Norsk Hydro Porsgrunn) en EPA-EE (51,2 %) et en DHA-EE (31,3 %) une fraction riche en EPA-EE (95 %) et une fraction riche en DHA-EE (88 %).

Riha *et al.* [11] ont réalisé un fractionnement en continu des esters éthyliques d'acides gras à l'aide d'une colonne d'extraction ( $d_i = 68$  mm,  $h = 12$  m) fonctionnant à contre-courant en mode isotherme et isobare ; les expériences ont été réalisées dans l'intervalle de température 40-80 °C et l'intervalle de pression 6,5-19,5 MPa. L'objectif était d'extraire une phase légère, contenant les produits de C14 à C18 et ainsi d'obtenir un raffinat riche en composés C20 et C22. À partir d'une charge de composition en C20 et C22 respectivement de 24,02 % et 21,71 %, Riha *et al.* ont obtenu un raffinat de composition en C20 et C22 respectivement de 44,12 % et 54,90 %, ceci à une pression de 14,5 MPa et à une température de 60 °C. Les données d'équilibre de phases précédemment acquises [8] et le logiciel Aspen+ leur ont permis de déterminer une hauteur d'étage théorique d'environ 0,3 m.

Le fractionnement à l'urée est couramment utilisé pour concentrer les produits EPA + DHA, on peut ainsi augmenter leur concentration de 50 % à 80 %. Etant donné le coût élevé des produits issus de l'huile de poisson et de leur fractionnement, Kulas *et al.* [12] proposent de traiter les résidus du fractionnement à l'urée par extraction supercritique. Par exemple, 3 kg de résidu du fractionnement à l'urée à une concentration en EPA et DHA de 18 % ont été traités à 300 bar et 50 °C, à un taux de solvant de 8 kg/kg de charge : le rendement d'extraction a été de 13 % et la concentration en EPA + DHA de 67 %.

## Chromatographie préparative

La chromatographie analytique supercritique a rendu bien des services dans le domaine de l'analyse des lipides [2], elle a pu être développée à l'échelle préparative [13], notamment pour la purification des esters éthyliques d'acides gras [3]. La chromatographie préparative supercritique est au moins aussi efficace que la chromatographie liquide haute pression ; de plus, elle permet d'obtenir des produits de pureté élevée avec de bons rendements et exempts de toute trace de solvant organique toxique. L'évolution des procédés de chromatographie batch se situe dans le développement d'un procédé continu, tel que celui du Lit Mobile Simulé [14] avec éluant liquide puis avec éluant supercritique. F. Denet *et al.* [15] ont pu réaliser l'enrichissement en EPA-EE et DHA-EE à partir d'un mélange complexe d'esters éthyliques. Ils ont pu comparer les performances du LMS liquide et du LMS supercritique et montrer la complémentarité des deux méthodes. Alkio. *et al.* [16] ont essayé d'obtenir des concentrés en esters à partir d'huile de thon transestérifiée à l'aide d'une installation de chromatographie préparative de laboratoire. Ils ont réussi à obtenir une fraction très riche en DHA-EE, de 95 % ainsi qu'une fraction enrichie pour les deux composés principaux avec des teneurs respectives de 90 % et 50 % pour le DHA-EE et l'EPA-EE. Ils ont proposé une évaluation économique du procédé (550 \$/kg DHA-EE et EPA-EE) et mentionnent que la Société KD-Pharma GmbH produit les

esters éthyliques n-3 à un degré de pureté supérieur à 95 % à l'aide d'une installation pilote dans son usine de Tarragone en Espagne.

## RÉFÉRENCES

1. Proceedings of 6<sup>th</sup> *International Symposium on Supercritical Fluids, April 28-30, 2003. Versailles, Institut National Polytechnique de Lorraine.*
2. KING JW, LIST GR. *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*, 1996 by AOCS Press.
3. BARTH D. Purification et fractionnement en milieux non conventionnels. Application aux esters éthyliques d'acides gras polyinsaturés. *Journées Chevreul de Nancy « Oléagineux et Corps Gras du Futur »* 16-17 Novembre 1995, Nancy, 154-171.
4. STOUT VF, NILSSON WB, KRZYNOWEK J, SCHLENK H. *Fish oils in nutrition*, Ed. M. E. Stanby, Van Nostrand Reinhold, New-York, 1990, pp. 73-119.
5. JAUBERT JN, BORG P, CONIGLIO L, BARTH D. Phase equilibria measurements and modelling of EPA and DHA ethyl esters in supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids* 2001 ; 20 (2) : 145-55.
6. JAUBERT JN, CONIGLIO L, DENET F. From the correlation of binary systems involving supercritical CO<sub>2</sub> and fatty acid esters to the prediction of (CO<sub>2</sub>-fish oils) Phase behaviour. *Ind Eng Chem Res* 1999 ; 38 (8) : 3162-71.
7. JAUBERT JN, CONIGLIO L. The group contribution concept : a useful tool to correlate binary systems and to predict the phase behaviour of multicomponent systems involving supercritical CO<sub>2</sub> and fatty acids. *Ind Eng Chem Res* 1999 ; 38 (12) : 5011-8.
8. RIHA V, BRUNNER G. Phase equilibrium of fish oil esters with supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids* 1999 ; 15 : 33-50.
9. EISENBACH W. Supercritical fluid extraction : a film demonstration. *Ber Bunsenges Phys Chem* 1984 ; 88 : 882-7.
10. NILSSON WB, GAUGLITZ EJ, HUDSON JK. Supercritical fluid fractionation of fish oil esters using incremental pressure programming and a temperature gradient. *J Am Oil Chem Soc* 1989 ; 66 (11) : 1596-600.
11. RIHA V, BRUNNER G. Separation of fish oil ethyl esters with supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids* 2000 ; 17 : 55-64.
12. KULAS E, BREIVIK H. Recovery of polyunsaturated fatty acids from urea adducts, WOO1/10809, US Patent n°6,528,669 B1 March 4, 2003.
13. JUSFORGUES P, SHAIMI M, BARTH D. Preparative Supercritical Chromatography : Grams, kilograms and tons ! 403-427. *Supercritical Fluid Chromatography and packed columns* Ed. Klaus Anton and Claire Berger 1997.

- 14.** DENET F, HAUCK W, NICOUD RM. Industrial chromatographic separation of fats. *Eur J Lipid Sci Technol* 2000 ; 236-40.
- 15.** DENET F, NICOUD RM. Utilisation de la chromatographie HPLC, du lit mobile simulé, et de la chromatographie avec éluant supercritique pour la purification industrielle des corps gras. *OCL* 1999 ; 6 : 211-7.
- 16.** ALKIO M, GONZALEZ C, JANTTI M, AALTONEN O. Purification of Polyunsaturated fatty acid esters from Tuna Oil with Supercritical Fluid Chromatography. *JAACS* 2000 ; 47 : 315-21.