

2m11. 2772.7

Université de Montréal

Développement d'un système d'extraction par fluide supercritique pour
l'analyse de substances allélopathiques

par

Patrick Bélanger

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M. Sc.)

en chimie

Février 1999

© Patrick Bélanger, 1999



Université de Montréal

QD
3
U54
1999
V.022

Développement d'un système d'irradiation par fluide supercritique

l'analyse de substances aléatoires

par

et

Patrick Bégin

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des arts et des sciences

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en Science (M. Sc.)

en chimie

Présenté par

Patrick Bégin, 1999



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Développement d'un système d'extraction par fluide supercritique pour
l'analyse de substances allélopathiques

Présenté par:

Patrick Bélanger

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Karen Waldron

président-rapporteur

Dr Michel Bertrand

directeur de recherche

Dr Jacques Prudhomme

membre du jury

SOMMAIRE

Les composés allélopathiques sont des composés chimiques synthétisés par les plantes et qui ont pour but d'affecter la croissance d'autres espèces au voisinage de l'espèce concernée. Ces substances peuvent être libérées à partir des feuilles, de la tige et des racines. Par le fait même, une certaine quantité de ces substances se retrouve également sur la terre avoisinant l'espèce.

Les substances allélopathiques constituent un atout supplémentaire propres à certaines plantes qui compétitionnent avec d'autres végétaux pour un milieu donné. Toutefois, l'humain peut tirer profit de ce mécanisme de défense. En effet, il est possible de substituer les herbicides actuels, d'origine synthétique et non biodégradables dans l'environnement, par les substances allélopathiques. Hydro-Québec étudie cette alternative sérieusement puisqu'elle doit, d'ici quelques années, cesser l'utilisation des herbicides sous leurs lignes haute tension.

Déjà, l'analyse des composés allélopathiques provenant des tiges et des feuilles a été effectuée. Toutefois, l'extraction des substances déposées dans la terre pose de nombreux problèmes. En effet, quelques essais préliminaires ont montrés l'inefficacité des techniques traditionnelles d'extractions (Soxhlet et sonification) pour extraire les composés allélopathiques de la terre.

Nous avons donc mis au point un système d'extraction par fluide supercritique (SFE) exploitant le CO₂. Un fluide supercritique (FS) possède un pouvoir solvatant semblable à celui d'un liquide et une diffusion se rapprochant de celle d'un gaz. Ces propriétés sont un atout important dans le cas de matrices poreuses et complexes comme la terre. De plus, l'addition de modifiant (co-

solvant) au FS permet de solvater, aussi bien les composés polaires qu' apolaires et ce, même à de très basses températures. Le temps des extractions est aussi diminué de 20 à 40 fois comparativement aux techniques classiques. Une fois extraites, les substances étaient analysées par HPLC et GC. De très bons rendements ont été obtenus comparativement à des essais effectués par extraction en continu (Soxhlet).

Des essais préliminaires de séparation et d'identification de composés allélopathiques contenus dans des sols ont été effectués par chromatographie en fluide supercritique (SFC) et par spectrométrie de masse (MS). De plus, une étude portant sur le couplage SFC/MS a montré que le FS utilisé (CO_2) était compatible avec cette approche. A la limite, un couplage SFE-SFC/MS permettrait d'améliorer encore davantage la sensibilité et la rapidité de la technique.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xv
DÉDICACE	xvi
REMERCIEMENTS	xvii
Chapitre 1: INTRODUCTION	1
Chapitre 2: ALLÉLOPATHIE	4
2.1 Recherche sur les substances allélopathiques	5
2.2 Structures des substances allélopathiques à l'étude	6
2.3 Interactions des composés à potentiel allélopathique	8
2.4 Effet de matrice	9
2.5 L'analyse des substances allélopathiques	11
2.5.1 Préparation et extraction	11
2.5.2 L'analyse	13
2.6 Conclusion	14
Chapitre 3: EXTRACTION ET CHROMATOGRAPHIE À L'AIDE DE FLUIDE SUPERCRITIQUE (SFE, SFC)	15
3.1 Définition d'un fluide supercritique	16
3.2 Propriétés d'un fluide supercritique	17
3.2.1 Le choix d'un fluide supercritique	19
3.2.2 Le dioxyde de carbone (CO ₂) comme solvant	21
3.2.3 Applications du CO ₂	22
3.3 Extraction par fluide supercritique	23
3.3.1 Comparaison entre la SFE et le Soxhlet	24

3.3.2	Instrumentation et principe de la SFE	24
3.3.3	Modes "off-line" et "on-line" en SFE	28
3.3.4	Solvatation par un fluide supercritique (CO ₂)	30
3.3.4.1	Solubilisation solide-liquide	31
3.3.4.2	Influence de la température sur l'extraction	33
3.5	Chromatographie en fluide supercritique (SFC)	33
3.5.1	Principe	34
3.5.2	La rétention en SFC	38
3.6	SFC versus différentes techniques chromatographiques	38
3.7	Choix d'un fluide supercritique	40
3.8	Le modifiant	40
3.9	L'instrumentation en SFC	42
3.9.1	La pompe	43
3.9.2	L'injecteur	43
3.9.3	La colonne	44
3.9.3.1	Les colonnes remplies	44
3.9.3.2	Les colonnes capillaires	45
3.9.4	L'interface	46
3.9.5	Le restricteur	46
3.9.6	Les détecteurs	47
3.9.6.1	Détection par ionisation à la flamme, FID	47
3.9.6.2	Détection par spectrométrie de masse, MS	48
3.9.6.3	Autres modes de détection	48
3.10	Conclusion	49
Chapitre 4: PARTIE EXPÉRIMENTALE		51
4.1	Substances utilisées	51
4.2	Système de chromatographie liquide à haute performance	51
4.3	Système de chromatographie en phase gazeuse	52
4.4	Détecteurs à spectrométrie de masse	52
4.5	Système SFE	53

4.6	Mode d'opération pour la SFE	54
4.7	Système de chromatographie en fluide supercritique	55
4.8	Mode d'opération pour la SFC couplé à un spectromètre de masse	55
Chapitre 5: OPTIMISATION D'UN SYSTÈME SFE POUR L'ANALYSE		
DES SUBSTANCES ALLÉLOPATHIQUES		56
5.1	Caractérisation du système SFE avec les terpènes	57
5.2	Effet de l'eau et des analytes non-volatils sur l'extraction de terpènes contenus dans la terre	59
5.3	Remplissage de la cartouche d'extraction	60
	5.3.1 Utilisation d'un asséchant chimique	60
5.4	Gradient de pression dans le capillaire de silice	62
5.5	Modifications dans le système de trappage	63
	5.5.1 Analytes non volatils	63
	5.5.2 Restricteur en acier inoxydable	64
	5.5.3 Restricteur fixe	65
	5.5.4 Récupération des analytes sur un adsorbant solide cryogéné	65
	5.5.5 Description de la trappe	67
	5.5.6 Adsorbants solides	69
	5.5.7 Désorption de composés trappés sur la laine de verre	69
5.6	Extraction de composés allélopathiques avec la trappe cryogénique	71
	5.6.1 Décomposition de la phlorhizine	73
	5.6.2 Ajout d'une trappe (barbotat) en série après la trappe cryogénique	75
	5.6.3 Vérification de la décomposition des composés	76
	5.6.4 Modification de la trappe cryogénique	78
	5.6.5 Extraction après modification de la trappe cryogénique	79
	5.6.6 Extraction de composés allélopathiques sur de la terre séchée	81

5.6.7	Effet du volume de modifiant (méthanol) ajouté directement dans la cartouche d'extraction	83
5.6.8	Extraction avec ajout de modifiant (méthanol) dans la pompe à seringue et dans la cartouche d'extraction	85
5.6.9	Évaluation de la teneur en modifiant dans la pompe à seringue	86
5.6.10	Extractions de terpènes avec la trappe cryogénique	87
5.7	Choix des conditions pour la séparation de composés allélopathiques par HPLC	88
5.7.1	Effet de la température de la colonne sur le profil chromatographique	90
5.8	Identification de composés potentiellement allélopathiques	93
5.8.1	Procédure d'extraction par fluide supercritique	93
5.8.2	Analyse d'extrait de terre par HPLC/UV et SFC/MS	93
5.8.3	Composés extraits de la terre et potentiellement allélopathiques	96
5.9	Conclusion	99

Chapitre 6: COUPLAGE DE LA SFC À UN SPECTROMÈTRE DE MASSE

	MASSE	101
6.1	Instrumentation	101
6.1.1	Spectromètres de masse	101
6.1.2	Interface	101
6.1.3	Restricteur et colonne	102
6.1.4	Chauffage du restricteur	103
6.2	Conditions particulières des spectromètres de masse	104
6.3	Ionisation en présence de dioxyde de carbone	105
6.4	SFC/GD/MS (appareil à secteurs)	105
6.5	SFC/MS (appareil quadropolaire)	107
6.5.1	Analyse de la caféine et de la vitamine K par SFC/MS	108
6.6	Conclusion	111

Chapitre 7: CONCLUSION

112

RÉFÉRENCES

115

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Substances allélopathiques utilisées	6
Tableau II :	Paramètres physiques de fluides supercritiques fréquemment employés	20
Tableau III :	Propriétés physiques du dioxyde de carbone	22
Tableau IV :	Comparaison entre la SFE et le Soxhlet	24
Tableau V :	Paramètres en SFE	27
Tableau VI :	Récupération de composés allélopathiques de la trappe avec du méthanol	70
Tableau VII :	Extraction de composés allélopathique sans matrice (sans terre)	72
Tableau VIII :	Recouvrement de composés allélopathiques dans la terre humide	73
Tableau IX :	Effet de l'entraînement des analytes par le modifiant	76
Tableau X :	Recouvrement des HAP extraits par SFE	77
Tableau XI :	Extraction de composés allélopathiques avec la nouvelle configuration de la trappe cryogénique et sans laine de verre	80
Tableau XII :	Extraction de composés allélopathiques avec la nouvelle configuration de la trappe cryogénique et avec la laine de verre	81
Tableau XIII :	Recouvrement des composés allélopathiques versus la quantité de modifiant (méthanol)	82
Tableau XIV :	Extraction de composés allélopathiques dans la terre en utilisant un fluide supercritique modifié au méthanol	86
Tableau XV :	Extraction de terpènes dans la terre avec modification du système de trappage et ajout de 5% de méthanol dans la pompe à seringue	88

Tableau XVI : Efficacité théorique "N" de composés allélopathiques
à différents pH

90

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Extraction par Soxhlet et par fluide supercritique, d'herbicides contenus dans la terre	10
Figure 2:	Diagramme de phase du dioxyde de carbone	17
Figure 3:	Dioxyde de carbone	21
Figure 4:	Schéma d'un système d'extraction par fluide supercritique	25
Figure 5:	Profil d'extraits de produits naturels vs la densité	32
Figure 6:	Le facteur de capacité k' en fonction de la variation de la densité du fluide supercritique (CO_2) à $39,5^\circ\text{C}$ pour une colonne remplie...	35
Figure 7:	La variation du facteur de capacité k' en fonction de la température à pression constante	36
Figure 8:	L'effet de la température sur la séparation de l'antracène et du 1,1-binaphthyl à pression constante	37
Figure 9:	Effet du modifiant sur le temps de rétention et la forme d'un pic chromatographique	41
Figure 10:	Schéma d'un système de chromatographie en fluide supercritique	42
Figure 11:	Graphique montrant l'effet du temps d'extraction de terpènes à 70°C	58
Figure 12:	Trois représentations de la variabilité de la disposition des échantillons dans la cartouche d'extraction	60
Figure 13:	Schéma montrant la décompression du FS à travers un capillaire	62
Figure 14:	Variation du débit gazeux de dioxyde de carbone versus la pression en tête de cartouche d'extraction pour un restricteur fixe	66
Figure 15:	Schéma de la trappe cryogénique avec adsorbant solide	68

Figure 16: Chromatogrammes montrant la décomposition de la phlorhizine avec un restricteur à 90°C	74
Figure 17: Schéma de la trappe cryogénique modifiée	78
Figure 18: Graphique montrant la quantité de méthanol recueillie en fonction du temps	84
Figure 19: Profil chromatographique de composés allélopathiques...	91
Figure 20: Chromatogrammes démontrant l'effet de la température de la colonne sur la séparation de composés allélopathiques...	92
Figure 21: Profil chromatographique généré par un extrait de terre avec HPLC/UV	95
Figure 22: Spectre de masse obtenu pour la fraction correspondant au pic chromatographique au temps de rétention 22.8 minutes à la figure 21	95
Figure 23: Spectre de masse de l'acide cinnamique provenant de l'extrait de terre (voir section 5.8.1) et obtenu par GC/MS	97
Figure 24: Spectre de masse de l'acide vanillique provenant de l'extrait de terre (voir section 5.8.1) et obtenu par GC/MS	97
Figure 25: Spectre de masse du dihydroxy-2,4 méthyl-6 benzoate de méthyle provenant de l'extrait de terre (section 5.8.1) et obtenu par GC/MS	98
Figure 26: Spectre de masse de l'hydroxy-4 méthoxy-3 benzène carboxaldéhyde provenant de l'extrait de terre (section 5.8.1) et obtenu par GC/MS	98
Figure 27: Schéma de l'interface et de la source pour la SFC/GD/MS	102
Figure 28: Spectre de masse démontrant des agglomérats de molécules de dioxyde de carbone	104
Figure 29: Spectres de masse obtenus par SFC/GD/MS; A: Estrone; B: Captafol; C: Vitamine K	106
Figure 30: Spectres de masse du bruit de fond en SFC, A: sans méthanol; B: avec méthanol	108

Figure 31: Profil chromatographique d'une solution de caféine en SFC/MS	109
Figure 32: Spectre de masse de la caféine	110
Figure 33: Spectre de masse de la vitamine K	110

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- A.A.: Absorption atomique
- ASE: *Accelerated solvent extraction*, extraction par solvant à haute pression
- CI: *Chemical ionization*, ionisation chimique
- EI: *Electron ionization*, ionisation par impact électronique
- FID: *Flame ionization detection*, détecteur à ionisation à la flamme
- FS: Fluide supercritique
- GC: *Gas chromatography*, chromatographie en phase gazeuse
- GD: *Glow-discharge*, décharge électroluminescente
- HAP: Hydrocarbure aromatique polycyclique
- HPLC: *High pressure liquid chromatography*, chromatographie liquide à haute pression
- LOD: *Limit of detection*, limite de détection
- MS: *Mass spectrometer*, spectromètre de masse
- PSI: *Pound per square inch*, livre/pouce carré
- SFE: *Supercritical fluid extraction*, extraction par fluide supercritique
- SFC: *Supercritical fluid chromatography*, chromatographie en fluide supercritique
- U.V.: Ultra-violet

Lorsqu'un enfant pose une question, il veut savoir.
Et s'il veut savoir, ne lui poser pas de questions.

À mes parents...

À Isabelle, ma complice...

J'aimerais remercier mes parents pour leurs nombreux sacrifices et leur confiance en moi. La persévérance au travail qu'ils ont me servira de modèle tout au long de ma carrière, de ma vie. **Merci!**

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Michel J. Bertrand pour m'avoir accepté dans son groupe de recherche et pour la confiance qu'il m'a accordée. J'aimerais également le remercier pour l'environnement de recherche qu'il m'a offert et surtout pour le soutien matériel et financier.

J'aimerais remercier Isabelle, premièrement par sa présence, et pour son soutien et sa précieuse aide.

Je ne saurais passer sous silence Alain Carrier et Daniel Carazzato qui ont partagé une partie de leur temps et de leur savoir avec moi, me permettant d'atteindre mes buts.

Enfin, je voudrais remercier les membres du personnel du Centre Régional de Spectrométrie de Masse, le personnel de l'atelier mécanique et d'électronique, et les autres membres du groupe de recherche pour leurs conseils et leur amitié.

Chapitre 1

INTRODUCTION

Ce n'est que depuis les années 70, bien après le début de l'expansion industrielle qui a commencé au début du siècle, que la communauté scientifique se soucie réellement de l'environnement. De nombreux produits toxiques ont été et sont toujours rejetés dans l'environnement sans qu'aucun contrôle ne soit exercé. Certains de ces éléments ou composés se révèlent très néfastes pour les organismes animaux et végétaux. Malgré plusieurs catastrophes écologiques, la révolution industrielle permet difficilement la modification des habitudes humaines et les façons de faire au détriment de l'environnement.

Le gouvernement, suite à la pression exercée de certains groupes et grâce à quelques chercheurs anxieux d'améliorer notre qualité de vie, a légiféré sur l'utilisation des composés chimiques. Par exemple, l'emploi d'herbicides synthétiques contrôlant la végétation, ne sera plus autorisé au Québec d'ici quelques années et ce, dans le but d'éliminer les effets de ces herbicides non biodégradables sur la flore et la faune.

Les grandes compagnies exploitant les herbicides cherchent une alternative permettant de contrôler la végétation tout en respectant les contraintes législatives. Hydro-Québec, par exemple, s'est tournée vers l'utilisation d'herbicides naturels. Certaines plantes rejettent des composés dans la nature dans le but d'éliminer d'autres plantes compétitionnant pour le même milieu. La détermination de ces composés dits "allélopathiques" permettra de répondre aux besoins d'Hydro-Québec et ainsi, éliminer les effets nuisibles des herbicides synthétiques. L'allélopathie est une arme naturelle que la végétation emploie pour compétitionner. Les substances émises par certains végétaux proviennent des feuilles, des racines, du tronc et peuvent même se retrouver dans la terre ou dans les plants environnants.

Les travaux que nous avons effectués portent, plus spécifiquement, sur l'analyse de ces composés allélopathiques qui peuvent se retrouver sur la terre au voisinage des plantes.

Lorsque les analytes sont contenus dans une matrice simple comme l'eau, la préparation de l'échantillon est courte et demande moins de manipulations en général. Dans d'autres cas, comme celui de la terre, la matrice est très complexe et les analytes ne peuvent être analysés directement. Il faut alors chercher à transférer les composés à doser dans une matrice plus simple comme l'eau. Il n'existe pas de technique d'extraction universelle pour tous les éléments ou composés organiques. Les techniques d'extraction couramment employées pour isoler les substances organiques font appel à des équilibres liquide-liquide ou solide-liquide. Par exemple, l'extraction liquide-liquide ABN (acide-base-neutre) est efficace pour séparer quelques produits présents en assez grande quantité. Cette technique devient de moins en moins efficace lorsque le nombre de composés augmente dans l'échantillon (matrice plus complexe). L'extraction solide-liquide peut être effectuée à l'aide de solvants organiques par Soxhlet. Ces solvants organiques sont facilement éliminés par évaporation ou compatibles avec les différentes techniques analytiques.

Il existe plusieurs techniques d'extraction qui varient selon les analytes ou la matrice. L'extraction d'un analyte nécessite souvent de nombreuses manipulations ce qui résulte en une augmentation du temps d'analyse. Le choix de la technique est de première importance car le résultat final apporté par l'instrument de mesure dépend directement de la qualité du traitement de l'échantillon.

La présente recherche se concentre sur certains types de composés allélopathiques émis par une plante, *Kalmia angustifolia*. Cette plante, utilisée dans une étude antérieure¹, constitue un choix judicieux puisqu'elle est déjà active au Québec, donc susceptible de résister au climat. Initialement, nous avons tenté de récupérer les composés de la terre par avoisinant cette plante une extraction

liquide-solide à l'aide d'un Soxhlet. Les résultats obtenus avec cette technique démontraient que la terre avait une forte capacité de rétention pour ces composés. Il a donc fallu considérer l'utilisation d'une autre technique d'extraction. L'extraction par fluide supercritique (SFE) offrant un pouvoir de solvatation très élevé, elle pouvait donc convenir aux types de composés étudiés et surtout, au genre de matrice qu'est la terre².

Dans un premier temps, nous avons mis au point un système d'extraction par fluide supercritique. Par la suite, il a fallu ajuster l'extraction afin de vérifier le bon fonctionnement du système et en régler toutes les composantes. Enfin, nous avons optimisé les paramètres d'extraction, de trappage et, dans certains cas, de récupération. Les standards utilisés pour la mise au point ont été analysés, selon le genre de composés analysés, à l'aide d'un chromatographe liquide à haute pression (HPLC) et d'un chromatographe en phase gazeuse (GC).

Dans un second temps, nous avons effectué quelques essais d'analyse de composés à potentiel allélopathique au moyen d'un système de chromatographie en phase supercritique (SFC) couplé à un spectromètre de masse (MS). Un tel système peut être couplé directement à un extracteur par fluide supercritique³. Un lien direct ("on-line") permet d'éliminer les pertes dues aux nombreuses manipulations des échantillons et de concentrer les composés extraits. Cela est favorable à l'analyse de substances présentes en trace. Le spectromètre de masse permet d'élucider et de caractériser les composés inconnus extraits de la terre.

Finalement, nous avons procédé à l'identification de composés allélopathiques contenus dans la terre avoisinant la *kalmia angustifolia*. Ces composés ont été extraits à l'aide du système d'extraction par fluide supercritique et analysés par SFC/MS et dans certains cas, par GC/MS.

Chapitre 2

ALLÉLOPATHIE

Il y a plusieurs siècles, les cultivateurs alternaient les semences afin d'obtenir de meilleures cultures. Bien que ce phénomène fut mal compris, Theophrastus, un peu avant Jésus-Christ, avait constaté la présence d'interférences entre certaines plantes⁴. Cependant quand Molisch¹ introduit le terme "allélopathie" pour caractériser ces phénomènes d'interférences, il décrit l'allélopathie comme étant la somme des interactions biochimiques entre les plantes, incluant aussi les microorganismes. Cette définition est assez large et peut inclure une multitude de processus possibles. La croissance d'une plante ou d'un arbre s'effectue en de nombreuses étapes, pour arriver enfin à maturité. Ces étapes de croissance peuvent nécessiter de quelques heures à plusieurs semaines. Si une des étapes est ralentie ou arrêtée, la croissance de la plante n'aura pas lieu ou en sera altérée. Par exemple, dans le cycle de l'azote (fixation), la nitrification et la photosynthèse sont parmi les processus responsables de la croissance des plantes. Ces derniers peuvent être altérés, provoquant un ralentissement, voir même un arrêt de la croissance de la plante. Certains composés chimiques ou microorganismes peuvent interagir directement sur un processus de développement de la plante afin de provoquer ces altérations⁴. Les herbicides sont des substances synthétiques utilisées par l'homme qui agissent directement sur les plantes. Ils sont généralement non-biodégradables et très toxiques pour les animaux. Les substances allélopathiques, contrairement aux herbicides, sont biodégradables et sans danger pour les animaux.

Ce chapitre a pour but de décrire sommairement l'allélopathie et son utilité dans la vie courante. Quelques méthodes analytiques de substances allélopathiques actives, incluant les problèmes d'extraction provenant de matrices complexes, sont aussi discutées.

2.1 Recherche sur les substances allélopathiques

Hydro-Québec se voyant imposer l'arrêt d'utilisation d'herbicides synthétiques s'est tourné vers d'autres alternatives afin d'éliminer ou de contrôler la végétation pouvant nuire à ses installations de haute tension. L'allélopathie est une solution envisageable à moyen et long terme en remplacement des herbicides conventionnels. Puisqu'une plante ou les composés émis par cette dernière pourront être utilisés compte tenu du secteur visé par les politiques environnementales, il est important d'avoir recours à une plante pouvant survivre au climat québécois et dont les propriétés allélopathiques ont déjà été démontrées.

Les substances allélopathiques sont des composés qui, agissant seuls ou à l'aide d'autres produits, inhibent la croissance de plantes. Il existe plusieurs plantes et arbustes dotés d'activités allélopathiques. Dans notre stratégie de caractérisation des substances allélopathiques⁵, le travail est principalement centré sur une plante retrouvée au Québec soit la *Kalmia angustifolia*, plus communément nommée le "lambkill" (tueur d'agneau). Les recherches antérieures démontrent qu'il existe une certaine activité allélopathique près de cette plante^{6,7}, due à l'émission de composés ayant un effet inhibiteur sur la croissance de plantes concurrentes avoisinantes.

Plusieurs produits peuvent démontrer un caractère allélopathique. La force allélopathique de certains composés émis par les plantes peut être évaluée d'après plusieurs types d'essais, tels le test de germination et le test de phototoxicité sur plantule⁸. Ces tests sont des bio-essais utilisées afin de vérifier l'effet direct de certaines substances sur la croissance de plantes. On évalue l'atteinte de la plante en mesurant la longueur des racines et du tronc par rapport à des témoins. Des chercheurs ont identifié certains produits chimiques ayant un potentiel allélopathique, et ces derniers, se retrouvent à l'intérieur de quelques grandes familles : acides carboxyliques, alcools, aldéhydes aliphatiques, cétones, lactones insaturées, acides gras, quinones, phénols, flavonoïdes, terpènes,

alcaloïdes, etc⁴.

2.2 Structures des substances allélopathiques à l'étude

De nombreux composés ont été identifiés comme potentiellement allélopathiques dans la littérature. Nous utiliserons certains d'entre eux (Tableau I) afin de déterminer les conditions optimales d'extraction et d'analyse.

Tableau I : Substances allélopathiques utilisées

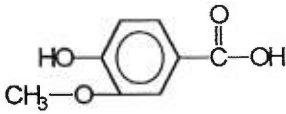
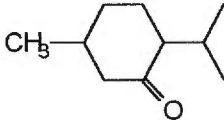
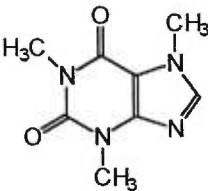
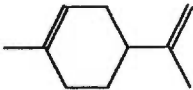
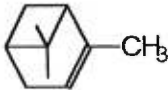
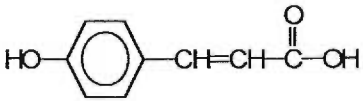
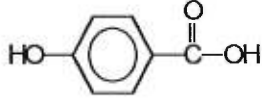
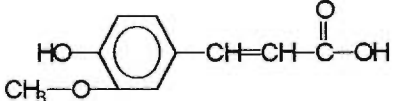
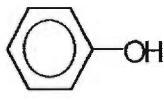
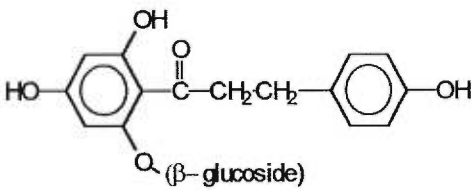
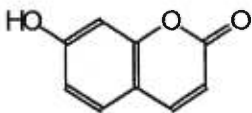
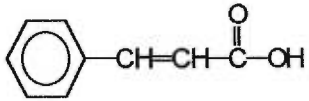
	Acide vanillique
	Menthone
	Caféine
	Limonène
	Pinène

Tableau I : Substances allélopathiques utilisées (suite)

	Acide p-coumarique
	Acide p-hydroxybenzoïque
	Acide férulique
	Phénol
	Phloridzine
	Umbelliférone
	Acide cinnamique

La concentration des composés allélopathiques émis par les plantes varie selon les types de composés. Afin de cibler et d'admettre un composé comme

agent allélopathique, ce dernier doit démontrer une certaine toxicité envers une autre plante et ce à des concentrations plus ou moins grandes. Par exemple, quelques acides carboxyliques retrouvés dans le sol ont été évalués par Whitehead⁹ à une teneur d'environ 10^{-5} M.

La concentration des produits allélopathiques ne peut être évaluée précisément puisqu'il y a plusieurs paramètres affectant sa valeur. Le temps de résidence des composés allélopathiques dans la terre environnant la plante varie. La production de ces composés actifs fluctue selon le temps de l'année mais aussi selon les conditions atmosphériques à l'intérieur d'une même saison. La stabilité de certaines molécules ne dure que quelques jours, voire quelques heures. Tubbs¹⁰ a démontré la décomposition de certains inhibiteurs en l'absence de microorganismes. Aussi, la présence de bactéries dans le sol provoque une dégradation des composés allélopathiques. Bonner¹¹ a démontré la perte de toxicité d'un échantillon de sol dopé à l'acide cinnamique après deux jours.

2.3 Interactions des composés à potentiel allélopathique

Les mécanismes d'interactions des substances allélopathiques sur les plantes ne sont pas très bien caractérisés. Par contre, les voies que peuvent emprunter certains composés émis sont bien identifiées. Les voies principales sont l'exsudation racinaire, le lessivage des plants, l'entraînement des composés volatils par le vent et la putréfaction des plants (feuilles, fleurs)⁴. On a remarqué que les substances émises se retrouvent en grande partie sur ou dans le sol près des plants sources. Une fois au contact du sol, ces composés peuvent migrer vers un plant antagoniste afin d'y être absorbés. Il est également possible que ces composés soient transformés par la présence de microorganismes dans le sol ou stabilisés en se liant à d'autres substances comme les acides humiques¹². Les "substances humiques"¹³ sont formées par des transformations biochimiques des plantes et des tissus animaux dans le sol. De nombreuses réactions dans le sol, donnent lieu à la formation d'hydrates de carbone, d'acides organiques, de gras,

de cires, de résines, etc. Pour décrire ces substances on emploie le terme générique "humique" à cause de leur provenance (végétation, humus). Certains chercheurs ont déterminé plusieurs de ces substances (humine, ulmine et les acides humique, fulvique, lignoïque, crénique, ulmique, etc). Ces dernières sont très actives et peuvent flocculer avec les métaux et former d'autres dérivés avec certains composés déjà intégrés dans le sol.

2.4 Effet de matrice

Il existe différents types de matrices en chimie analytique. En premier lieu, elles sont différenciées d'après leur état physique : solide, liquide, gazeux et un mélange de deux ou trois états. La matrice gazeuse est rare : les composants sont plutôt adsorbés sur une matière solide (adsorption sur du charbon actif)^{14,15,16} et même liquide (barbotage dans l'eau ou un solvant organique).

L'eau est une des matrices liquides les plus courantes en chimie analytique. Elle peut solvater de nombreux éléments ou composés inorganiques de différentes formes physiques de même qu'une multitude de composés organiques. Les propriétés de l'eau sont telles que la plupart des secteurs d'activités l'utilisent. Par exemple dans le milieu minier, que ce soit les eaux de drainage, de lavage, de lessivage ou tout simplement les eaux de rejet, l'eau doit être analysée dans certains cas afin d'y caractériser les analytes.

La matrice solide inclut toute substance composée majoritairement de particules à l'état solide à température ambiante (ex. : charbon). Les analytes d'intérêt se retrouvent à l'état libre (non-liés) parmi ces particules ou bien adsorbés sur une ou plusieurs particules. Dans certains cas, les analytes peuvent former des liens covalents avec des composés chimiques se trouvant dans la matrice elle-même¹². Ce type de lien est très stable et demande une grande énergie pour se briser. Par conséquent, la solvatisation des analytes devient

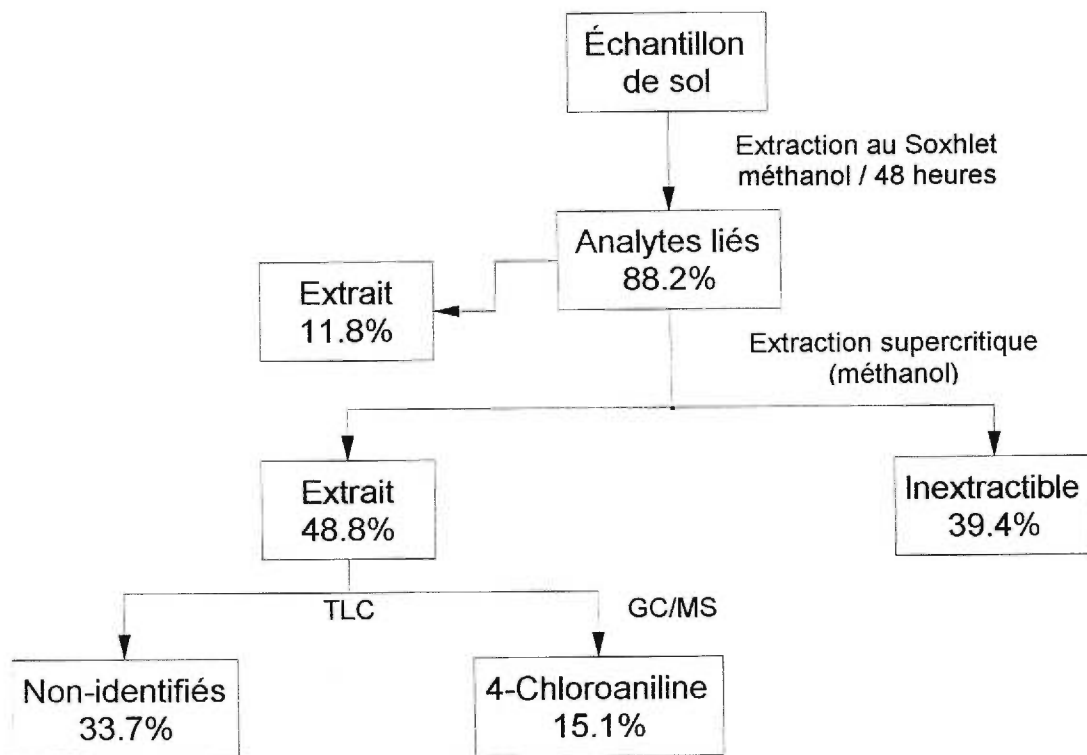


Figure 1 : Extraction par Soxhlet et par fluide supercritique, d'herbicides contenus dans la terre

presque impossible¹², comme dans le cas de la terre et des sédiments marins. Ces derniers étant constitués principalement de matière minérale, végétale et animale.

Nous pouvons retrouver, dans la terre, des composés allélopathiques. Les plantes rejettent, sur cette matrice, la grande majorité des composés actifs. Ces derniers peuvent s'accumuler pendant un certain temps, s'adsorber et même former des liens stables. Il est d'autant plus difficile d'extraire les composés de la terre qu'ils y ont séjourné longtemps. Scheunert¹² a démontré qu'une certaine quantité de produit devient inextractible (Figure 1) après un certain temps dans la terre. En effet, quelques 39% d'une quantité d'herbicide déposée sur la terre n'était pas extraits par deux principales techniques d'extractions. Ce phénomène prend de l'importance lors de l'évaluation écotoxicologique de polluants dans les

sols¹⁷.

Les composés allélopathiques, comme les herbicides ou les insecticides, peuvent se lier à des acides humiques solubles dans l'eau et de masse moléculaire relativement basses. Le lessivage de ces composés est alors accéléré par leur grande mobilité dans la phase aqueuse. Toutefois, la fixation à des acides humiques de très grande masse retient davantage les contaminants et affecte directement l'extraction. Le temps de résidence des contaminants dans le sol contribue également à diminuer les taux de recouvrement¹² de ces derniers. La probabilité de liaison avec d'autres composés présents, d'assimilation par des plantes et de dégradation par des microorganismes augmente avec le temps. Compte tenu de l'ensemble des réactions se manifestant dans le sol, il est évidemment impossible d'attribuer exclusivement la notion de solubilité des analytes dans un solvant aux taux de recouvrement obtenus lors d'extraction. Dans le cas contraire, un changement au niveau du solvant (quantité, polarité, etc.) serait suffisante pour obtenir un recouvrement maximal des analytes d'intérêts.

2.5 L'analyse des substances allélopathiques

2.5.1 Préparation et extraction

Puisque le terme allélopathie regroupe plusieurs familles de nature chimique différente (cétone, acide carboxylique, etc.) dans lesquelles se retrouvent de nombreux composés, il n'existe aucune technique universelle pour l'analyse de ces substances. Les substances allélopathiques sont, pour la plus part, polaires et thermolabiles. Ainsi, le paramètre "température" demande d'être considéré lors de l'analyse et de la préparation de l'échantillon. Puisque ces composés ne possèdent pas tous le même seuil de stabilité, une température minimale doit donc être respectée et ce, lors du prélèvement de l'échantillon, de

sa conservation, de sa préparation et de son analyse. Par exemple, l'extraction par désorption thermique est écartée puisque la dégradation est évidente. Les groupements hydroxyles (OH) sur la majorité des molécules à caractère allélopathique conduisent à une perte d'eau avec l'augmentation de la température. Également, la phlorizidine, dont le caractère allélopathique est reconnu, comporte un radical β d-glucose qui réagit vers 100°C, conduisant à la dégradation de la molécule.

Les composés allélopathiques peuvent se retrouver dans les feuilles et les racines de la *Kalmia angustifolia*, ainsi que dans la terre environnante de cet arbuste. Puisque les feuilles et les racines ont fait l'objet d'études précédentes⁵, nous ciblerons la terre.

La terre est constituée de particules et de pores de différentes dimensions. La technique d'extraction utilisée doit permettre l'extirpation des composés situés jusque dans les moindres pores. Ainsi, la notion de diffusion est très importante. En effet, un solvant offrant une meilleure diffusion aura tendance à couvrir plus de surface, pouvant ainsi augmenter la vitesse de transfert des analytes. Aussi, les solvants ayant un coefficient de diffusion plus élevé sont mieux adaptés à ces matrices poreuses. L'extraction liquide-solide par soxhlet, reverbak ou sonification emploie des solvants dont les coefficients de diffusion sont de l'ordre de 10^{-6} cm²/s, tandis que pour un gaz, les valeurs sont 10^{-1} cm²/s. Selon les conditions de température et de pression, un fluide supercritique offre une très grande diffusion comparativement aux liquides conventionnels utilisés lors d'extraction classique tout en gardant un pouvoir de solvation comparable au liquide. Un fluide supercritique possède un coefficient de diffusion de l'ordre de 10^{-4} cm²/s¹⁸, soit 100 fois plus élevé que les solvants traditionnels. Ainsi, l'emploi de fluide supercritique (FS) peut s'avérer très utile lors de l'extraction d'analytes contenus dans une matrice très poreuse comme la terre et le sédiment marin. Cette propriété permet d'assiéger de petites cavités (pores) plus rapidement que par un solvant liquide. Pour extraire un composé, il faut d'abord le solvater. Un analyte, même très soluble, ne sera extrait convenablement que si le solvant peut

l'atteindre.

2.5.2 L'analyse

Puisque la terre renferme une multitude de substances incluant les produits allélopathiques, il est nécessaire d'effectuer une séparation afin de quantifier ou de déterminer chacun des composés d'intérêt. Les techniques classiques d'extraction (soxhlet, macération) ne sont pas très spécifiques et permettent d'extraire tous les composés. De ce fait, il est possible qu'il y ait trop de composés à séparer par chromatographie. Il est alors nécessaire de procéder à un fractionnement. Le fractionnement consiste généralement à séparer les composés extraits par famille chimique. Cette étape, bien qu'efficace, est souvent longue et fastidieuse. L'extraction par fluide supercritique permet une extraction spécifique. Le changement de densité du fluide supercritique confère à ce dernier une modification des propriétés physiques lui permettant de solvater différents composés. Ainsi, le fractionnement est éliminé, ce qui diminue le temps de traitement de l'échantillon.

Tel que mentionné précédemment, la plupart des composés sont thermolabiles. Par conséquent, la chromatographie en phase gazeuse n'est pas la technique de séparation la plus appropriée bien qu'elle convienne à certaines familles dont les terpènes (limonène, cinéole, etc.). La chromatographie en phase liquide (HPLC) est la plus souvent utilisée dans ce type d'analyse. Par contre, le détecteur ultra-violet/visible (U.V.-visible) n'est pas propice à tous les composés. Certains terpènes absorbent peu en U.V. puisque constitué d'un ou deux liens π . Les coefficients d'extinctions molaires sont très faibles pour ce type de liens ($\pi \rightarrow \pi^*$). Alors pour percevoir ces composés avec un détecteur U.V.-visible, il faut en augmenter la concentration (plusieurs $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), ce qui provoque parfois une saturation de la colonne chromatographique. Ces concentrations élevées ne sont pas représentatives de celles retrouvées dans la terre (quelques ng ou $\text{pg}/\mu\text{L}$).

Les liens σ contenus en grande majorité dans les terpènes absorbent ($\sigma \rightarrow \sigma^*$) à de hautes énergies au même titre que les solvants chromatographiques¹⁹. Alors le choix du type de chromatographie et de détecteur doit tenir compte du plus grand nombre de familles de composés possibles utilisées ou ciblées lors de l'étude.

2.6 Conclusion

Les composés naturels d'origine végétale offrent des propriétés intéressantes pour l'industrie, que ce soit celle de la teinture, des cosmétiques et même le domaine des herbicides. L'allélopathie, phénomène reconnue depuis des siècles, est peut-être la solution à l'utilisation de composés synthétiques difficilement biodégradables trop longtemps utilisés par l'homme dans ses cultures.

L'analyse des substances allélopathiques est limitée par la variété des groupes chimiques et la dégradation thermique possible de certains analytes. C'est pourquoi le développement de techniques analytiques non-spécifiques et à basse température est importante. L'utilisation d'un fluide supercritique pour l'extraction et la séparation des substances allélopathiques mérite donc d'être explorée.

Chapitre 3

EXTRACTION ET CHROMATOGRAPHIE À L'AIDE DE FLUIDE SUPERCRITIQUE (SFE, SFC)

Depuis une vingtaine d'années, l'utilisation de fluides supercritiques dans divers procédés s'est accrue. Déjà en 1879, Hannay et Hogarth observaient une capacité d'un fluide supercritique à transporter certains solides²⁰. Par la suite, l'extraction par fluide supercritique fut employée comme technique préparative. Les fluides supercritiques virent leur utilisation restreintes à certains procédés d'ingénierie, tel l'enlèvement des résidus de pétrole et la décaféination des grains de café dans l'industrie alimentaire. Il faut attendre au début des années 80 pour voir les fluides supercritiques, comme substitue de solvant organique, dans les laboratoires analytiques. L'extraction et la chromatographie à l'aide des fluides supercritiques voient leurs domaines d'applications s'élargir, remplaçant les techniques classiques comme l'extraction en continue à l'aide d'un soxhlet mais aussi la chromatographie (HPLC, GC).

Les échantillons destinés à l'analyse (chromatographie, absorption atomique, etc.) doivent généralement subir un pré-traitement. Puisque les analytes contenus dans une matrice sont rarement compatibles avec la technique utilisée, il faut préalablement effectuer une extraction des analytes afin de les transférer dans une autre matrice moins complexe et assimilable. Les matrices les plus retrouvées en chimie analytique sont l'eau, certains solvants organiques (méthanol, toluène) et, dans certains cas, une phase solide (métal, sel). Le résultat final de l'analyse (concentration, teneur, etc.) dépend en grande partie de la préparation de l'échantillon. Puisqu'il y a de nombreux analytes, il y a plusieurs possibilités pour l'extraction et la préparation des échantillons. L'avènement de la SFE facilite la préparation de l'échantillon en diminuant le temps de travail nécessaire. Par exemple, le temps d'extraction requis avec un soxhlet est de 24 heures, comparativement à la SFE qui prend en moyenne 30 minutes. Aussi, les

fluides utilisés (ex.: dioxyde de carbone, propane) peuvent-être facilement éliminés, ce qui améliore la compatibilité avec les techniques chromatographiques.

L'extraction par fluide supercritique (SFE) est de plus en plus utilisée afin d'améliorer les rendements d'extractions. Certaines matrices plus complexes, comme la terre et le sédiment marin, retiennent fortement les composés. Selon le type de composés à extraire, différentes techniques d'extraction sont utilisées: le soxhlet, le reverbak et la désorption thermique. Puisque le nombre d'échantillons à analyser est de plus en plus élevé et le coût des solvants et de la main-d'oeuvre est davantage dispendieux, la SFE supplante les techniques classiques. Cette technique d'extraction, basée sur les propriétés du fluide supercritique, permet l'automatisation plus facilement, donc plus rentable. Étant donné que la plupart des fluides supercritiques utilisés sont gazeux dans les conditions ambiantes, ils sont facilement éliminés. Par conséquent, le coût relié à la destruction des solvants usés est beaucoup moins élevé. Une technique comme la SFE permet alors de rentabiliser les analyses tout en étant très performante.

Dans ce chapitre, nous expliquerons les principes de la SFE et de la SFC, de même que leurs principales caractéristiques. Il sera aussi question du fonctionnement et des possibilités de cette technique d'extraction (SFE) face aux composés allélopathiques. De plus, la SFC sera décrite comme moyen de séparation des composés allélopathiques. Le couplage de la SFC avec un spectromètre de masse sera également étudié.

3.1 Définition d'un fluide supercritique (FS)

À la température critique (T_c), la densité de la phase vapeur est égale à celle du liquide. La pression correspondant à ce point est appelée pression critique (P_c)(Figure 2). Au dessus du point critique, il n'existe qu'une seule phase:

phase supercritique²¹. Même sous augmentation de la pression, la phase liquide ne peut se reformer de façon distincte. L'obtention du gaz est également impossible par l'élévation de la température. On peut considérer le fluide supercritique comme un état d'équilibre entre le gaz et le liquide ou comme une entité bien distincte. Dans certaines conditions nous pouvons comparer le FS au gaz (basse densité) et dans d'autres cas comme un liquide (haute densité). En changeant les paramètres nous pouvons tirer avantages de ces différentes propriétés.

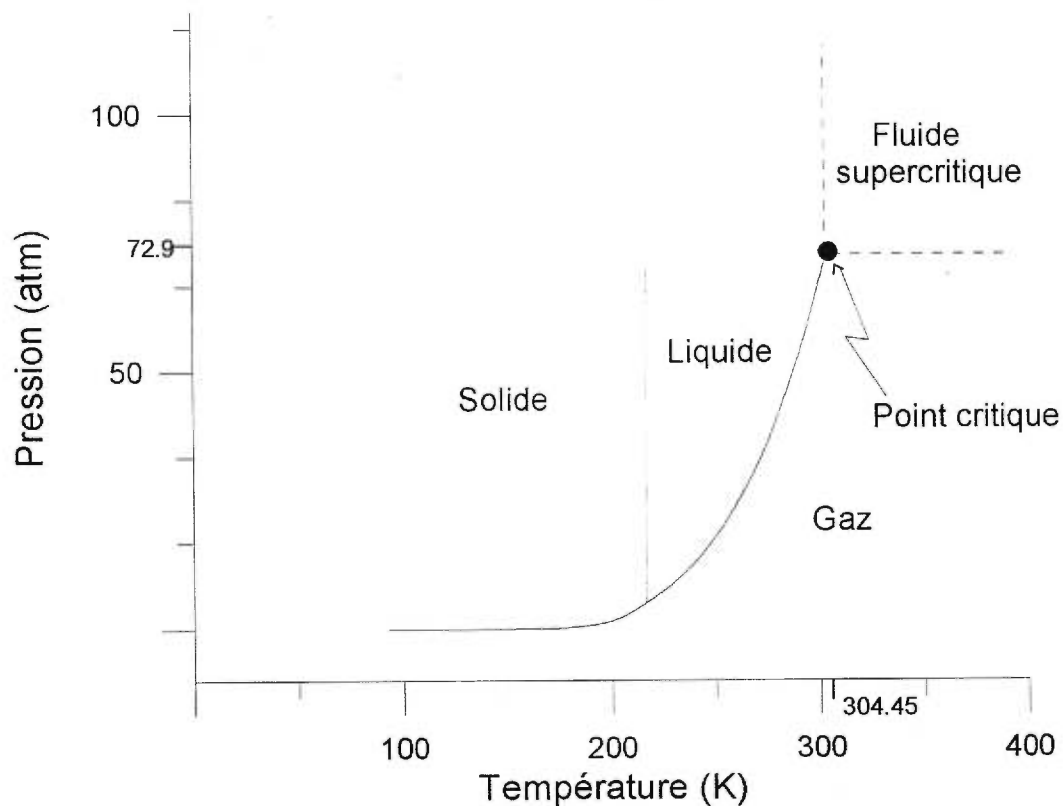


Figure 2 : Diagramme de phase du dioxyde de carbone

3.2 Propriétés d'un fluide supercritique

Au dessus du point critique, une substance possède une densité de 100 à 1000 fois plus élevée que son gaz. Le pouvoir de solvatation d'un FS approche

celui du liquide et la viscosité est intermédiaire entre celles du liquide et du gaz. Une densité se rapprochant de celle du liquide permet d'obtenir des niveaux de solvation plus élevés comparativement au gaz. La plupart des fluides supercritiques couvrent un grand domaine de densité, ce qui permet de solubiliser sélectivement les analytes. Les composés les plus volatils sont solubilisés, même à de très basses densités, tandis que les composés de masses moléculaires plus élevées (et peu volatils) nécessitent des densités s'approchant de celle du liquide.

La viscosité est une propriété reflétant la résistance à l'écoulement. Elle est relié aux forces d'interaction entre les molécules rendant plus ou moins difficile le déplacement des molécules les unes sur les autres. Ces forces dépendent surtout de la grosseur, de la forme et de la polarité des molécules. La température et la pression affectent également la viscosité. Cette dernière diminue avec une augmentation de la température d'un liquide. Par contre, une élévation de température produit l'effet contraire sur les gaz. La viscosité d'un fluide supercritique est intermédiaire entre les états liquide et gazeux.

Généralement, la compressibilité d'un liquide est négligeable comparativement à celle des gaz et des fluides supercritiques. Le facteur de compressibilité Z pour un gaz peut être décrit selon la relation suivante :

$$Z = \frac{P \cdot V_M}{R \cdot T} \quad (1)$$

où P est la pression, V_M le volume molaire, T la température et R la constante des gaz. Pour un gaz parfait $Z = 1$, puisqu'il n'y a aucune force répulsive entre les molécules. Pour un gaz réel, le facteur de compressibilité peut être inférieur ou supérieur à 1, tout dépendant de la pression. Il peut être utilisé comme mesure d'imperfection du gaz. Pour un gaz réel, il existe de nombreux phénomènes d'attraction et de répulsion.

Le coefficient de compressibilité d'un fluide supercritique varie constamment en fonction de la pression et de la température. Ainsi en effectuant

un gradient de pression lors d'une extraction ou d'un essai chromatographique, Z évoluera jusqu'à un quasi-minimum à de très hautes pressions. Cette fluctuation du facteur de compressibilité, surtout près du point critique, procure, au fluide, une très grande variation de ses propriétés (densité, viscosité, diffusion) et ce dans un court intervalle de pression.

Le coefficient de diffusion²¹ d'un fluide supercritique est environ 100 fois plus élevé que celui de son liquide, ce qui permet d'augmenter la vitesse de transfert des analytes dans la phase mobile.

3.2.1 Le choix d'un fluide supercritique

Le choix d'un fluide supercritique utilisé comme phase mobile ou comme solvant se fonde sur quelques critères de base. En SFC, tout comme en SFE, il est important de considérer le type de composés à séparer (polarité, poids moléculaire, solubilité). La phase stationnaire utilisée (polarité et inertie face au fluide) tient compte des composés mais aussi du FS. En SFE, la matrice dicte le choix du fluide après avoir considéré les analytes. Une variation de matrice, par exemple, de l'eau au sol, remet en cause le choix du fluide (voir Tableau II). Mais le dioxyde de carbone est employé la plupart du temps dans les essais préliminaires.

Les contraintes physiques permettant d'obtenir le fluide supercritique constitue un critère très important. Le principe même du FS, consiste en une substance comprimée à une pression P_c et élevée à une température T_c . Ces conditions sont parfois difficilement atteintes par les systèmes. Par exemple, l'eau possède une pression critique de 218,3 atm et une température critique de 647,3 K²¹. Pour utiliser l'eau comme FS, il faudrait donc un four pouvant atteindre de très grande température. De ce fait, les composés organiques devraient être très stables dans ces conditions de hautes températures. L'eau ne constitue donc pas un choix judicieux en tant que FS.

Également, l'inertie du fluide face aux matériaux qui constituent le système ne doit pas être négligée. La plupart des composants des extracteurs par fluide supercritiques sont en acier inoxydable, en verre et en téflon. Or, l'ammoniac attaque le verre et l'acier en un temps très court. De plus, l'utilisation de cette matrice nécessite l'ajout d'un système de récupération de l'ammoniac gazeux. En chromatographie en phase supercritique, il est proscrit d'utiliser ce fluide à cause de la réaction directe sur la phase stationnaire. Le protoxyde d'azote (N_2O) quant à lui, est polaire et démontre un bon potentiel comme fluide supercritique. Par contre, sa réactivité avec certains modifiants peut entraîner des explosions²².

Tout comme en chromatographie en phase liquide, il est impératif que les analytes soient dissous dans la phase mobile. Dans le cas contraire, ils ne seront pas extraits ou précipiteront tout simplement en tête de colonne. Il devient donc nécessaire de bien connaître la grosseur et la polarité des molécules d'intérêts. Cela est essentiel lorsque vient le moment de choisir un fluide supercritique (Tableau II).

Tableau II : Paramètres physiques de fluides supercritiques fréquemment employés^{18,22}

Fluide	Température critique (°C)	Pression critique (atm)
Dioxyde de carbone	31.3	72.9
Protoxyde d'azote	36.5	72.5
Ammoniac	132.5	112.5
Pentane	196.6	33.3
Hexafluorure de soufre	45.5	37.1
Fréon	11.8	40.7
Xénon	16.6	58.4

3.2.2 Le dioxyde de carbone (CO₂) comme solvant

Le dioxyde de carbone est un choix judicieux dans le cadre de notre étude. Ses propriétés physiques lui procurent une grande malléabilité en ce qui concerne sa pression et température critique qui conviennent aux types de composés à extraire.

Le dioxyde de carbone (CO₂), ou anhydride carbonique, est une molécule tri-atomique et linéaire. Cette linéarité lui confère un moment dipolaire nul, ce qui

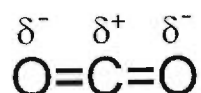


Figure 3 : Dioxyde de carbone

explique, entre autre, pourquoi cette molécule est non-polaire. Par contre, le dioxyde de carbone est polarisable²¹. Une molécule polaire peut induire un moment dipolaire chez une autre molécule non-polaire possédant une certaine polarisabilité. Dans le cas du dioxyde de carbone, des forces attractives sont possibles entre le dipôle induit (CO₂) et un dipôle permanent (molécule polaire). Ces interactions permettent donc la solubilisation des molécules polaires dans le dioxyde carbone.

Le dioxyde de carbone est un gaz ininflammable, incolore, inodore et il est peu actif chimiquement. En général, on retrouve le dioxyde de carbone dans l'air à une concentration de 0.03% (v/v). Bien que considéré comme non-toxique, il peut provoquer l'asphyxie à très grande concentration. Il est donc préférable de travailler dans un endroit bien ventilé.

Comme fluide supercritique, le dioxyde de carbone possède de nombreux avantages :

- conditions critiques facilement atteintes (31,3°C et 72.9 atm)
- compatibilité avec les détecteurs conventionnels, U.V., FID, MS, SFC

- non-corrosif
- non-toxique
- élimination facile
- très grande pureté disponible commercialement
- non-polaire
- polarisable

Dans le cas des produits polaires, la non-polarité du dioxyde de carbone peut représenter un désavantage.

Comme le démontre le Tableau III, le fluide supercritique possède des propriétés intermédiaires entre le gaz et le liquide en ce qui a trait à la densité, la viscosité et la diffusion. Ces propriétés font en sorte que l'on peut comparer le FS tantôt au gaz tantôt au liquide.

Tableau III : Propriétés physiques du dioxyde de carbone¹⁸

Phase mobile	Densité (g/mL)	Viscosité (μpoise)	Diffusion (cm ² /s)×1000
Gaz	0.001	50 - 350	10 - 1000
Fluide supercritique	0.2 - 0.9	200 - 1000	0.33 - 0.01
Liquide	0.8 - 1.0	3000 - 24000	0.005 - 0.02

3.2.3 Applications du CO₂

Le dioxyde de carbone est utilisé dans la grande majorité des cas et ce, en dépit des autres fluides supercritiques disponibles. Certains analystes le préfèrent dû à ses propriétés de solvation, d'autres pour sa non-toxicité, son inertie ou sa facilité d'élimination. Le CO₂ en phase supercritique est utilisé dans différent types de procédés et analyses dans les domaines suivants : pharmaceutique²³,

polymère²⁴, environnement, pesticides,^{25,26} amines,^{27,28} autres polluants environnementaux^{29,30,31,32,33,34} et hydrocarbures^{35,36}.

3.3 Extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique a véritablement été utilisée pour la première fois à grande échelle pour le raffinage du pétrole. Dans les années 50 on a assisté à l'extraction des résidus légers de pétrole dans les huiles lourdes. Cette technique était utilisée dans le but d'économiser de l'énergie en comparaison au système de distillation conventionnel. Par la suite, l'industrie alimentaire a appliqué cette technologie au café, thé, tabac, etc²⁰. Depuis le début des années 80, la chimie analytique s'est tournée vers la SFE pour l'extraction de certains contaminants^{29,35,37} comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les propriétés des fluides supercritiques apportent un certain avancement en ce qui concerne l'étape de l'échantillonnage dans le cheminement de l'analyse de composés organiques.

Que ce soit pour l'activité industrielle ou le souci de l'environnement, de nombreux analytes doivent être évalués. Les méthodes classiques de préparation des dernières décennies ne sont plus toujours adéquates. C'est pourquoi on assiste à l'introduction de nouvelles techniques d'extractions ou à des adaptations visant l'analyse de composés ou matrices plus récents. Le nombre d'échantillon à traiter joue un rôle très important. Dû à une compétition grandissante, la rentabilisation des laboratoires d'analyse demande une automatisation de toutes les étapes analytiques conduisant aux résultats finaux, et ce, avec un maximum de précision et de reproductibilité.

3.3.1 Comparaison entre la SFE et le Soxhlet

De toutes les techniques d'extraction, le soxhlet est sans doute le plus utilisé et normalisé, car il procure généralement de bons résultats, sauf pour les composés volatils. Pour supplanter une technique bien ancrée par une technologie nouvelle, il faut en démontrer, sur plusieurs points, la supériorité ou, tout au moins, l'égalité^{20,18,29,38,39,40,41}. De nos jours, la SFE démontre un grand potentiel par sa puissance de solvation et sa rapidité. Aussi, l'automatisation possible fait en sorte, que de nombreux laboratoires décident de changer leur technique de préparation au profit de la SFE. D'après le Tableau IV, certains points sont pris en considération lors du choix de la méthode de préparation à utiliser.

Tableau IV : Comparaison entre la SFE et le Soxhlet

Soxhlet	SFE
Volume important de solvant	Volume minimum de solvant
Quantité importante d'échantillon	Variable
Extraction très longue	Extraction rapide
Non-sélective	Sélective
Difficilement-automatisable	Automatisable
Aucun couplage possible	Couplage possible
Verrerie fragile	Appareillage robuste

3.3.2 Instrumentation et principe de la SFE

Un système d'extraction par fluide supercritique est composé de parties distinctes (Figure 4). Pour obtenir le fluide supercritique il est nécessaire d'obtenir une pression minimale, soit celle de sa pression critique P_c ²¹. Une variation de

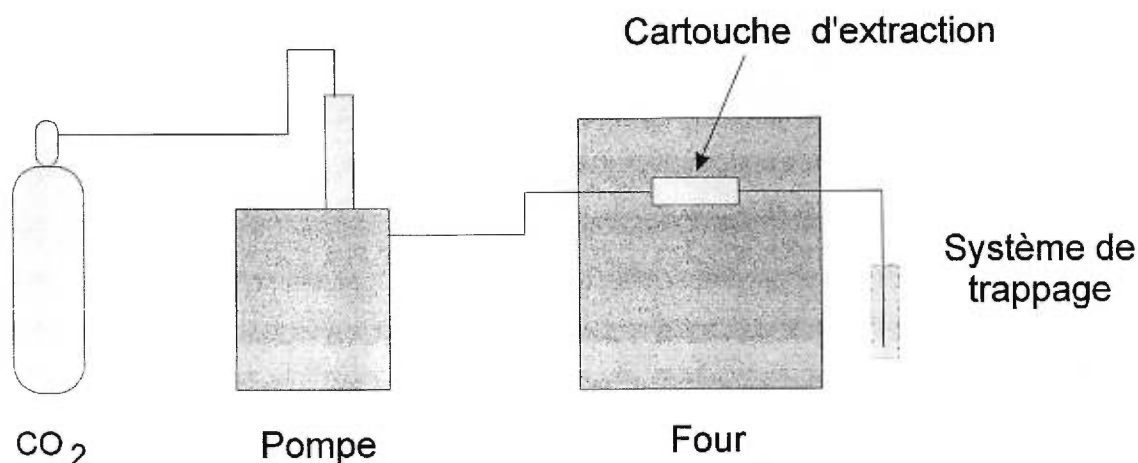


Figure 4 : Schéma d'un système d'extraction par fluide supercritique

pression est essentielle selon les composés à extraire. Pour ce faire, on utilise une pompe à seringue pouvant atteindre un minimum 5000 psi. Puisque le principe de cette pompe consiste en un cylindre et un piston, le volume est limité. Il est nécessaire d'avoir un volume minimal d'environ 100 mL afin d'exécuter une extraction sans avoir à remplir constamment le cylindre de la pompe. Ce volume peut varier selon la pression du CO_2 dans la bombonne, du temps d'extraction nécessaire, du débit du fluide et du volume de la cartouche. La rapidité de la pompe est également importante. En effet, une pompe requérant beaucoup de temps afin d'arriver à la pression voulue augmentera la durée des analyses.

Le gaz carbonique doit être très pur sinon des impuretés peuvent se concentrer dans la trappe. Des impuretés comme les hydrocarbures ou l'eau peuvent affecter l'extraction en agissant comme modifiant^{42,43} comme nous verrons plus loin. Généralement, le dioxyde de carbone employé est de grade SFC pour la chromatographie en phase supercritique. Pour faciliter le remplissage de la pompe, une surpression d'hélium à environ 1500 psi peut être ajoutée. Cette approche est nécessaire lorsque le volume de la pompe est inférieur à 100 mL.

Afin d'obtenir la température minimale critique (T_c) et celle qui convient aux

composés à extraire, un four est indispensable afin de thermostatier la cartouche d'extraction. Cette dernière doit supporter de hautes pressions, habituellement de 8000 à 10 000 psi. Elle est généralement fabriquée en acier inoxydable assurant ainsi une bonne solidité et l'inertie chimique. La géométrie et le volume (100 μ l à 50 mL) de la cartouche varient selon le constructeur et les besoins. Ces deux derniers paramètres ne sont pas à négliger. Un volume trop grand par rapport à l'échantillon augmente le temps nécessaire pour l'extraction suite à la dilution possible dans la cartouche. La géométrie de la cartouche, quant à elle, varie par sa longueur et son diamètre. Une cartouche trop longue par rapport à son diamètre augmente la probabilité d'adsorption de l'analyte après la première solvataion.

Le restricteur est l'une des parties les plus importantes et aussi la plus difficile à contrôler. Le restricteur peut être soit un tube en acier inoxydable soit un capillaire de silice^{18,25,27,44,45}. Même si son rôle principal est de garder la pression voulue dans le système, il agit aussi comme contrôleur de débit par son ouverture. Après le restricteur, les analytes peuvent être isolés dans une trappe cryogénique, sur un adsorbant solide ou bien dans un solvant par barbotage.

L'extraction par fluide supercritique comporte plusieurs paramètres à ajuster. De plus, l'établissement d'un paramètre peut en faire varier un autre qui devra être ajusté ultérieurement. Ainsi, la mise au point d'une méthode d'extraction peut être assez longue si on a aucune idée du comportement des analytes et de l'effet de matrice impliqués lors de l'extraction. Les principaux paramètres affectant l'extraction sont démontrés dans le Tableau V.

Le facteur le plus important est sans contredit la pression. Son impact sur la densité influence beaucoup plus que la température. Généralement, les composés que l'on retrouve dans les matrices naturelles sont thermolabiles. La variation de pression permet alors une bonne extraction tout en évitant la décomposition de certaines molécules.

Tableau V : Paramètres en SFE

Paramètres	Variables
Le fluide supercritique	polarité
	pression
	température
	débit
Le modifiant	présence ou non
	polarité
	concentration
La matrice	type (organique, minérale)
	taux d'humidité
	taux de matière organique
L'analyte	polarité
	stabilité
	pression de vapeur
L'instrument	volume et géométrie de la cartouche
	restricteur
	système de trappage (cryo., barbotage)

Dans un système d'extraction par fluide supercritique (Figure 4), le gaz ou le liquide conduisant au fluide supercritique est d'abord introduit dans une pompe afin d'y être comprimé jusqu'à la pression désirée. Ensuite, le fluide entre dans le four contenant la cartouche d'extraction et est chauffé à une température minimale, soit la température critique. Dans le cas du dioxyde de carbone, une étape de préchauffage du fluide n'est pas nécessaire puisque la température critique est facilement atteinte (32°C). Par contre, il est préférable d'ajuster la température du four quelques minutes avant le début de l'extraction afin de thermostat convenablement l'enceinte chauffante.

L'échantillon est préalablement placé dans la cartouche d'extraction. Le FS entre dans la cartouche et solvate les analytes présents. Ces derniers sont chassés de la cartouche par le biais d'une fuite : le restricteur. La solvataion des composés dépend surtout de la densité du fluide supercritique qui est donnée par la température et la pression. Un FS moins dense, et par le fait même, de pouvoir solvantant inférieur, lessivera les composés de petites tailles, de polarité semblables à celles du solvant et généralement très volatils. La densité est augmentée selon la difficulté à extraire les analytes. Les composés de masses élevées et de polarités très différentes du FS sont difficilement solvatés.

L'ajout d'un modifiant ou cosolvant modifie les propriétés du FS^{20,25,27,46,47,48}. La densité se voit généralement haussée et la polarité varie, selon la quantité et le type de modifiant. En changeant ces conditions on peut étendre le champ des composés à extraire et améliorer l'extraction de ceux qui existent.

Le restricteur est placé à la suite de la cartouche d'extraction et sert à conduire les analytes, dissous dans le fluide supercritique, vers une trappe où ils seront recueillis. Le fluide étant généralement un gaz comprimé, il se volatilise aussitôt qu'il n'y a plus de parois de confinement. Le restricteur joue un rôle extrêmement important puisqu'il garde la pression désirée dans le système. Pour garder les analytes dissous dans le FS jusque dans la trappe, il est nécessaire que la pression demeure constante. Lorsqu'il y a vaporisation, la plupart des analytes ne sont plus solvatés et peuvent précipiter ou s'adsorber. La vaporisation doit avoir lieu directement sur la trappe ou dans le solvant de barbotage.

3.3.3 Modes "off-line" et "on-line" en SFE

L'extraction par fluide supercritique peut fonctionner directement (mode "off-line") ou être couplé à un système d'analyse (mode "on-ligne")^{36,37,49,50}. Dans les

deux cas un restricteur est requis. Lorsque la SFE est couplée à un système chromatographique, une trappe est nécessaire afin de concentrer les analytes et de limiter la largeur de la bande d'injection. Pour obtenir une bonne sensibilité et une résolution adéquate, il est impératif que le cheminement complet soit effectué en deux étapes : l'extraction et le trappage dans un premier temps, puis l'analyse chromatographique.

Les deux modes comportent certains avantages et inconvénients⁵¹. Le mode "off-line", est plus simple à utiliser puisqu'il n'est constitué que du système d'extraction^{35,45,51,52,53}. Une fois extraits, les composés sont analysés par une technique bien distincte : GC/MS, HPLC, SFC, etc.. Par contre, ce mode demande un plus grand nombre de manipulations des échantillons de même qu'une dilution, ce qui entraîne une perte de sensibilité. Lors de l'analyse de composés présents en trace, le mode "off-line" peut tout simplement diminuer les concentrations des analytes en dessous de la limite de détection. De plus, il n'est pas automatisable car il nécessite la présence d'un analyste.

Le mode "on-line", pour sa part, permet d'analyser les composés directement à partir de l'échantillon^{37,50,54,55}. Pour passer de l'extraction en fluide supercritique à une autre technique, il faut en premier lieu que les analytes soient compatibles avec la technique chromatographique. Par exemple, les composés extraits doivent rencontrer les conditions pour l'analyse de la chromatographie en phase gazeuse si un couplage SFE/GC est utilisé. Aussi, l'emploi d'un modifiant lors de l'extraction peut compliquer l'analyse chromatographique, car il est élué au même titre que les produits extraits et peut interférer avec les analytes.

Bien que ce mode demande moins de manipulations, il est beaucoup plus complexe du point de vue de l'instrumentation. L'interface consiste généralement en une trappe cryogénique. Le volume, la forme et la température de la trappe influencent beaucoup les résultats chromatographiques. Le volume mort occasionné par la trappe peut diminuer la sensibilité. Aussi, il y a la perte de résolution lorsque le volume d'injection est très grand.

Toutefois ces systèmes "on-line" sont automatisables. De plus, les pertes dues aux nombreuses manipulations sont éliminées. La concentration plus grande des analytes, assurée par la diminution de la dilution, augmente la sensibilité. L'automatisation du système devient très intéressante dans l'industrie analytique. Un plus grand nombre d'échantillons peuvent être analysés comparativement au mode "off-line" et aux systèmes classiques d'extraction tels le soxhlet et le réverbak.

3.3.4 Solvatation par un fluide supercritique (CO₂)

Lors de la solubilisation de composés dans la phase mobile (solvant), plusieurs phénomènes sont en compétition tout dépendant des conditions expérimentales. Si le CO₂ seul se retrouve comme solvant, il y aura principalement des interactions CO₂-analytes. Par contre, l'ajout de méthanol comme modifiant au dioxyde de carbone augmente le nombre d'interactions, par exemple : CO₂-analyte, CO₂-MeOH, MeOH-analyte. Le modifiant permet d'augmenter la densité du solvant. Par exemple, en employant le méthanol qui est très polaire, la polarité du fluide est augmentée selon la quantité de modifiant ajoutée. En ajoutant un modifiant, les conditions critiques minimum changent et peuvent être évaluées par l'équation utilisée par Reed et Sherwood²⁰ :

$$T_C = X_A T_A + X_B T_B \quad (2)$$

$$P_C = X_A P_A + X_B P_B \quad (3)$$

où T_C et P_C sont les conditions critiques atteintes, $T_{(A,B)}$ la température critique et $P_{(A,B)}$ la pression critique de chaque constituant.

Le méthanol peut solvater certains analytes et peut, par la suite, être resolubiliser par le CO₂. Toutefois un analyte peut être solvaté à la fois par le méthanol et le CO₂. Des ponts hydrogène peuvent se former également avec le

CO₂ et le méthanol. Le modifiant augmente la sélectivité lors de l'extraction. Un modifiant polaire favorisera davantage la solvataion des composés plus polaires²⁵.

Plusieurs chercheurs ont tenté de formuler des équations décrivant l'extraction en tenant compte des différents paramètres^{25,29,56}. Étant donné qu'il y a plusieurs paramètres à ajuster, les résultats obtenus ne reflètent pas la réalité.

L'extraction comporte d'abord la solubilisation du composé dans un solvant (CO₂, modifiant). Par la suite, l'analyte est écarté de la matrice de façon à éliminer la possibilité de nouvelles interactions matrice-analyte. Le fluide contenant le composé est acheminé dans un contenant. Ce dernier peut contenir un solvant de récupération ou un adsorbant solide. Après cette étape, l'analyte peut être dirigé vers une technique analytique comme la chromatographie.

3.3.4.1 Solubilisation solide-liquide

L'extraction par fluide supercritique est limitée à certains types de composés. En effet, la solubilité des solides ioniques⁵⁷, métalliques⁵⁸ et covalents dans le CO₂ est très faible, étant donné le caractère apolaire de ce dernier. Toutefois, il est donc possible d'utiliser un fluide non-polaire et non-corrosif et d'y ajouter un modifiant polaire.

Il est démontré que les composés moins polaires tels les hydrocarbures, les esters et les lactones, sont plus facilement extraits (Figure 5); une faible densité étant suffisante (P = 1000-1500 psi). Ces composés sont plus solubles, en général, dans les solvants apolaires tel le CO₂. Les composés beaucoup plus polaires comme les acides carboxyliques et les amines, sont moins solubles dans les solvants apolaires tel le CO₂. L'augmentation de la densité et de la polarité haussera la solubilité de ces composés. Ainsi, en sélectionnant la densité appropriée, nous pouvons éliminer une certaine quantité de composés

normalement extraits par soxhlet. Cette sélection de densité permet, entre autres, d'éviter une pré-séparation (fractionnement) qui augmente la durée de l'analyse.

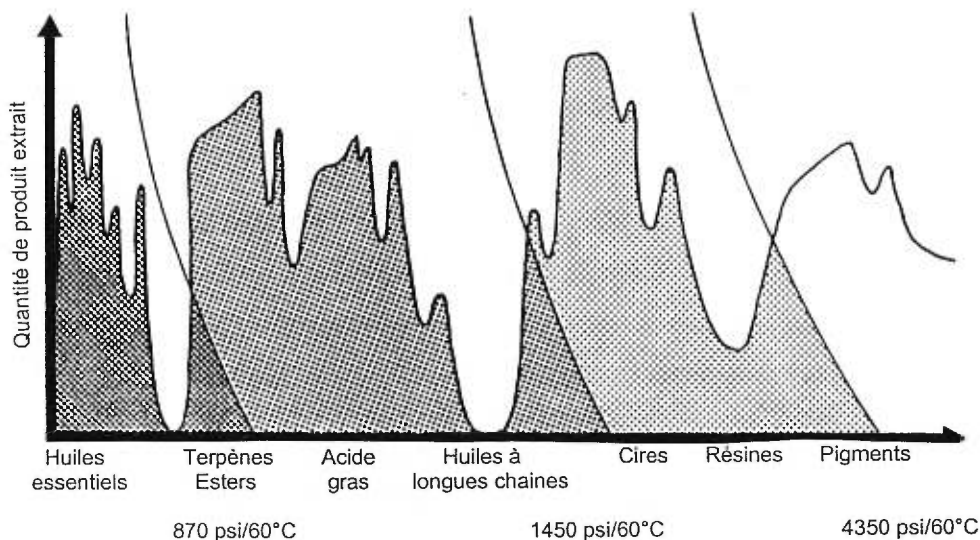


Figure 5 : Profil d'extraits de produits naturels vs la densité⁵⁹

Les solides moléculaires organiques qui, sont surtout constitués de liaisons de Van der Waals et de ponts hydrogène⁶⁰, se prêtent mieux à la solubilisation. Pour solubiliser un tel composé, le solvant doit s'approcher de l'analyte, à une distance où les interactions deviennent importantes. Plus les interactions augmentent et plus les chances de vaincre les forces analyte-matrice sont élevées.

Ce qui peut diminuer l'extraction, mis à part le principe de la technique, ce sont les surfaces de contact. Plus les molécules de solvant cernent l'analyte, plus les chances de solvater un analyte sont élevées. Ce phénomène peut être comparé à certains supports adsorbants utilisés pour le trappage de contaminants atmosphériques ou tout simplement à la phase stationnaire en chromatographie. Dans les deux cas, plus le diamètre des particules de la phase stationnaire est petit et plus la surface de contact est élevée, ce qui provoque une plus grande adsorption des composés favorisant l'équilibre entre le solvant et la phase stationnaire¹⁵.

3.3.4.2 Influence de la température sur l'extraction

Il a été démontré précédemment que la densité d'un fluide supercritique (CO_2) diminue avec l'augmentation de la température. Par le fait même, la quantité de molécules de solvant disponibles en un point pour solvater un analyte sera restreinte. Par contre, la température possède un effet inverse sur la diffusion du solvant. Une grande diffusion est favorable dans le cas où la surface de contact est faible et les pores de la matrice sont minimes. L'augmentation de température augmente la diffusion, et par conséquent, peut améliorer le transfert des analytes dans la phase mobile. Toutefois, une élévation de température conduit dans certains cas, à l'augmentation de la tension de vapeur des analytes. La température peut également provoquer la décomposition de certains composés thermolabiles.

Dans le cas d'un fluide supercritique, l'augmentation de la température provoque une variation de la densité beaucoup plus importante que celle d'un solvant liquide conventionnel. La densité diminue avec une augmentation de la température pour un fluide supercritique, entraînant ainsi une perte du pouvoir de solvatation de ce dernier.

3.5 Chromatographie en fluide supercritique (SFC)

L'émergence de la SFC depuis les dernières années est, en grande partie, attribuable à la recherche sur les techniques de chromatographie et les autres techniques de séparation dont le but est d'améliorer la résolution des mélanges comportant plusieurs composés tout en diminuant le temps d'analyse. Bien que, la chromatographie en phase gazeuse offre une très grande efficacité, elle est, généralement, réservée aux composés thermiquement stables. La dérivation des composés est possible, mais complique la procédure analytique. Pour sa part, la chromatographie en phase liquide est utilisée lorsque la GC n'est pas appropriée.

En effet, la plupart des molécules peuvent être analysées par HPLC. La température de travail, généralement ambiante, permet l'analyse des composés thermolabiles, mais la longueur des analyses, le temps de stabilisation et le coût des solvants font en sorte que l'on préfère la GC. La SFC, quant à elle, permet l'analyse de composés thermolabiles puisque la séparation s'effectue à basse température et ce, avec une rapidité comparable à celle de la GC. L'instrument est de conception hybride entre la GC et la HPLC.

Le premier système de chromatographie en fluide supercritique a été mis au point par Jentoft et Gouw⁶¹ en 1972. Par la suite, de nombreuses applications^{62,63,64,65} ont fait l'objet de publications. Par exemple, Saito et Yamauchi⁶⁶ ont isolé le tocophérol à partir de l'huile de germe de blé par SFC semi-préparative.

3.5.1 Principe

La séparation d'analytes par la SFC, comme pour les autres techniques chromatographiques, repose sur la compétition entre les interactions se produisant sur la phase stationnaire et la phase mobile avec les analytes. Dans le cas présent, la phase mobile est un fluide à l'état supercritique. Les propriétés d'un fluide supercritique, énoncées dans le chapitre précédent, offrent plusieurs avantages à son utilisation comme phase mobile en chromatographie.

La plupart des composés peuvent être analysés par SFC. Par exemple, les terpènes, les acides carboxyliques, les phénols peuvent être séparés par cette technique chromatographique. La phase stationnaire et le fluide servant d'éluant sont choisis selon la polarité, la grosseur et la volatilité des molécules à séparer. La programmation de pression en SFC produit les mêmes effets que le gradient d'éluant en HPLC. L'augmentation de la pression provoque l'augmentation de la densité, conduisant à une plus grande rapidité d'analyse, une plus grande sensibilité et une meilleure résolution⁶⁷. L'augmentation de la densité (à

température constante) a pour effet de diminuer le coefficient de diffusion des solutés dans la phase mobile. Le transfert de masse est plus lent, augmentant ainsi la hauteur d'un plateau théorique. Cet effet est observable (Figure 6) par une perte d'efficacité surtout dans des conditions de haute densité avec les colonnes capillaires⁶⁸. Puisque les composés à haute masse moléculaire ont aussi un coefficient de diffusion plus petit, leur rétention est très grande. Ainsi, lorsqu'il y a présence de composés de hautes masses, l'utilisation d'un modifiant est essentielle. La teneur en modifiant dépend des analytes à séparer, mais aussi du type de colonne (remplie ou capillaire).

Le facteur le plus important en SFC est, sans contredit, la pression. Son impact sur la densité a une influence plus importante que la température. Toutefois, cette dernière n'est pas à négliger surtout près du point critique. En effet, l'élévation de la température, à pression constante, a pour effet d'augmenter

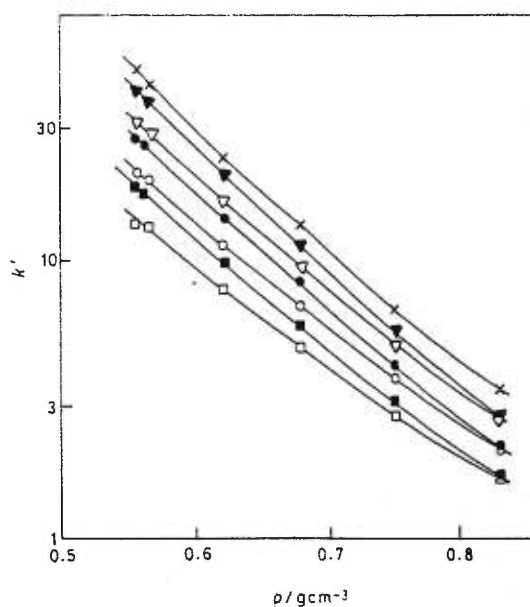


Figure 6: Le facteur de capacité k' en fonction de la variation de la densité du fluide supercritique (CO_2) à $39,5^\circ\text{C}$ pour une colonne remplie¹²,

X : $n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}\text{OC}_6\text{H}_5$; ▼ : $n\text{-C}_{17}\text{H}_{35}\text{OOC}_6\text{H}_5$; ∇ : $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}\text{OC}_6\text{H}_5$;
 ● : $n\text{-C}_{15}\text{H}_{31}\text{OOC}_6\text{H}_5$; ○ : $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}\text{OC}_6\text{H}_5$; ■ : $n\text{-C}_{13}\text{H}_{27}\text{OOC}_6\text{H}_5$;
 □ : $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}\text{OC}_6\text{H}_5$,

la pression de vapeur. Par conséquent, les analytes peuvent être déplacés dans la phase mobile. Le facteur de capacité k' est petit pour les composés davantage entraînés par la phase mobile.

Un compromis doit être obtenu entre la pression et la température. Bien que la densité du fluide explique en grande partie la solubilité des analytes, la température et la pression, à densité constante, ont un effet direct sur la chromatographie en fluide supercritique. Comme le montrent les figures 7 et 8, l'augmentation de température peut intervertir le temps de rétention de deux composés. La volatilité des composés augmente avec la température, ce qui mène à un meilleur transfert dans la phase mobile. À l'opposé, l'augmentation de température, à pression constante, diminue la densité, ce qui diminue le pouvoir de solvation du fluide supercritique. La plupart des composés n'ont pas la même pression de vapeur et la même solubilité dans un fluide supercritique donné. Ces distinctions permettent de prédire une séparation des composés en variant la pression et la température.

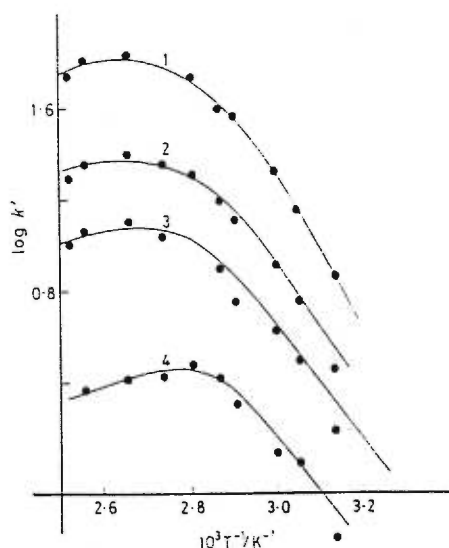


Figure 7: La variation du facteur de capacité k' en fonction de la température à pression constante⁶⁸

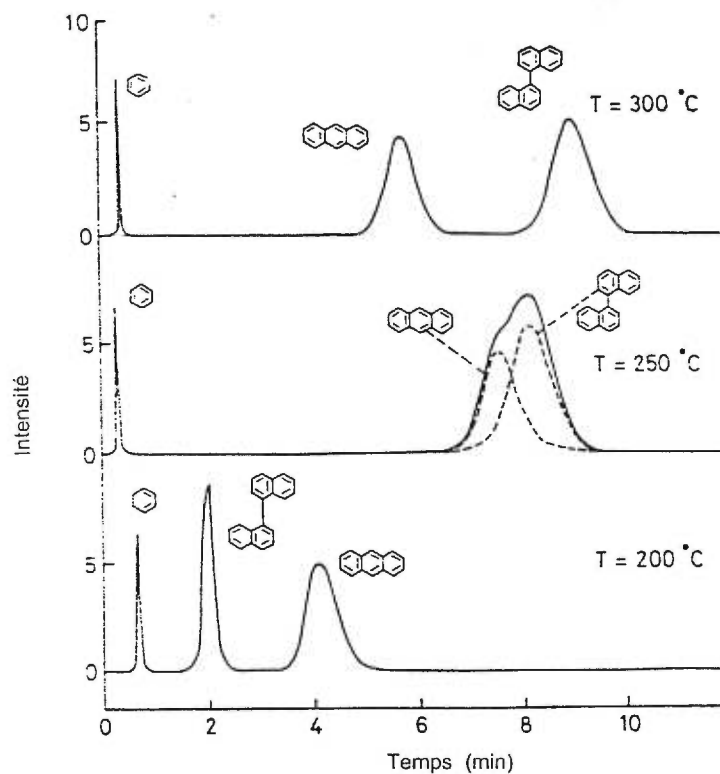


Figure 8: L'effet de la température sur la séparation de l'anthracène et du 1,1-binaphthyl à pression constante⁶⁹

Les principaux paramètres affectant la chromatographie sont :

- Le fluide supercritique
 - ⇒ polarité
 - ⇒ pression
 - ⇒ température
 - ⇒ débit

- Le modifiant
 - ⇒ présence ou non
 - ⇒ polarité
 - ⇒ concentration

- L'analyte
 - ⇒ polarité
 - ⇒ stabilité
 - ⇒ pression de vapeur

- La colonne
 - ⇒ capillaire (longueur, polarité)
 - ⇒ remplie (particule, polarité)

3.5.2 La rétention en SFC

Shang⁷⁰ et ses collaborateurs ont étudié la rétention des analytes en SFC. Pour ce faire, ils ont utilisé une colonne remplie avec du gel de silice. La rétention des analytes se base sur des mécanismes d'adsorption et de désorption entre la phase stationnaire et la phase mobile, associé à l'entropie et l'enthalpie. L'énergie libre de Gibbs du transfert des solutés en chromatographie peut expliquer la rétention. Afin d'évaluer la pertinence de l'utilisation de la SFC, on peut comparer certaines de ses caractéristiques avec d'autres techniques chromatographiques. J.L. Bernal et ses collaborateurs⁷¹ ont démontré la supériorité de la SFC par rapport à la HPLC du point de vue de la résolution et du temps d'analyse pour certains composés pharmaceutiques.

3.6 SFC versus différentes techniques chromatographiques

Les différentes techniques chromatographiques possèdent leurs propres modes de fonctionnement et interactions vis-à-vis des analytes et les différentes phases stationnaires.

G.C.

Tension de vapeur des analytes
Variation de la température

H.P.L.C.

Solubilité et polarité des analytes
Force éluotropique du solvant (phase organique)

S.F.C.

Solubilité et polarité des analytes
Variation de la densité (pression et température)

La rétention d'un composé dans une colonne chromatographique reflète sa distribution entre la phase mobile et la phase stationnaire. Pour séparer deux produits, il faut que cette distribution soit quelque peu différente. Afin de caractériser les composés entre eux, la chromatographie s'est munie de termes bien distincts. Ces derniers permettent de comparer les diverses techniques chromatographiques et, à l'occasion, de choisir celle qui sera appropriée à l'analyse de composés cibles.

La résolution, R , quantifie la distance entre deux pics chromatographiques (correspondant à deux produits) afin de qualifier la séparation. Elle est définie selon la relation suivante :

$$R = 2 \cdot (Tr_2 - Tr_1) / (\omega_1 + \omega_2) \quad (4)$$

où Tr_2 et Tr_1 sont les temps de rétention des composés et ω est la largeur des pics à 13,5 % de leurs hauteurs totales⁷².

Aussi, l'efficacité réelle d'une colonne peut être évaluée en déterminant le nombre de plateaux théoriques effectifs, N_e . Ce dernier se calcule selon la relation suivante :

$$N_e = 16 \cdot (Tr - T_0)^2 / \omega^2 \quad (5)$$

où Tr est le temps de rétention d'un composé, ω est la largeur du pic et T_0 est le temps mort du système. Pour une même colonne et dans les mêmes conditions (débit, température, etc), le nombre de plateaux théoriques effectifs varie selon le produit. Afin d'évaluer une colonne chromatographique dans le temps, on peut déterminer N_e avec le même composé et dans les mêmes conditions⁶⁸.

En SFC, l'utilisation d'une colonne remplie ou d'une colonne capillaire est possible. Lors de comparaison entre techniques chromatographiques, il est plus justifié de comparer deux types semblables de colonnes, puisque le transfert de

masse, le débit, la diffusion des analytes, etc, sont différents pour chacun d'eux. Ces paramètres affectent directement la résolution et le temps de rétention. Par exemple, une colonne capillaire en SFC sera comparée à une colonne capillaire en GC.

3.7 Choix d'un fluide supercritique

Que se soit un solvant ou un mélange de plusieurs solvants, le choix d'un éluant, en HPLC, s'effectue en tenant compte des composés et de la colonne. En chromatographie en fluide supercritique, le choix du fluide supercritique dépend surtout des composés analysés. Il est important de considérer la polarité, la grosseur de la molécule et sa solubilité dans le fluide.

Les fluides les plus populaires en SFC sont le dioxyde de carbone, le pentane, l'hexane, le propane⁷³ et le protoxyde d'azote. D'autres hydrocarbures aliphatiques sont également utilisés. La majorité des analyses en SFC utilise le dioxyde de carbone, compte tenu de ses nombreux avantages décrit au chapitre précédent. L'ajout de modifiant polaire peut combler le fait que le CO₂ est non-polaire. Comme on l'a vu, cette propriété fait en sorte que la solubilité des composés polaires est plus faible.

3.8 Le modifiant

Les modifiants les plus utilisés sont le méthanol, l'iso-propanol et l'acétonitrile⁷⁴. Ces solvants sont préférés pour leur pouvoir solvatant dû, en outre, à leur polarité. L'ajout de modifiant peut s'effectuer à partir d'une deuxième pompe contenant seulement le modifiant. Une union en "T" permet le mélange modifiant-fluide à la sortie des deux pompes. Ce système permet de contrôler la teneur en modifiant en assurant un débit constant. Pour de courtes analyses ou

de simples essais, le modifiant peut être ajouté directement dans la pompe avec le fluide. Aussi, il est possible de se procurer commercialement du dioxyde de carbone contenant une certaine quantité de modifiant.

La quantité de modifiant influence le temps de rétention et la forme des pics chromatographiques comme le démontre la figure 9. L'élargissement des pics peut être dû à des interactions sur les sites actifs de la phase stationnaire. Dans une colonne remplie, le ratio de phase ($P_{stationnaire}/P_{mobile}$) est plus grand que dans une colonne capillaire. Par conséquent, les colonnes remplies requièrent moins de modifiant ($\approx 1\%$). Cet ajout de modifiant fait considérablement varier la rétention des analytes, d'une part dû à une meilleure solubilisation mais aussi par la compétition des sites actifs modifiant-analyte⁷⁵.

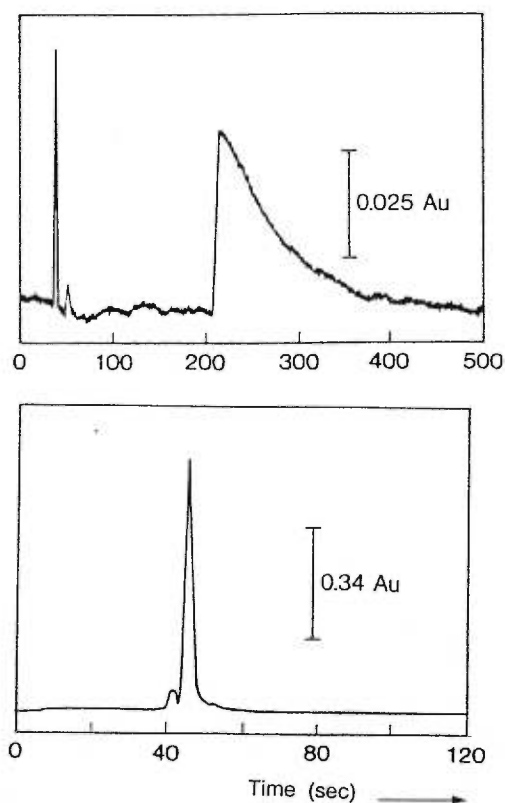


Figure 9 : Effet du modifiant sur le temps de rétention et la forme d'un pic chromatographique sur une colonne remplie. Concentration en éthanol, A: 0.013%; B: 1.1%⁷⁶

Pour leur part, les colonnes capillaires (non-remplies), requièrent une plus grande quantité de modifiant ($\approx 5-20\%$). La probabilité, qu'une molécule de modifiant interagisse sur la phase stationnaire ou sur un site actif, est plus faible dû au faible ratio de phase ($P_{\text{stationnaire}}/P_{\text{mobile}}$).

3.9 L'instrumentation en SFC

Le principe même du fluide supercritique a été décrit dans le chapitre précédent. En chromatographie en fluide supercritique, comme pour l'extraction par fluide supercritique, le fluide est d'abord comprimé dans une pompe haute pression afin d'obtenir le liquide à la pression voulue, supérieure à sa pression critique. Le fluide passe à l'état supercritique lorsqu'il atteint le four contenant la colonne (Figure 10). Le four est chauffé à une température supérieure à la température critique du fluide. Un restricteur, placé en fin de colonne, est nécessaire afin de garder le fluide à l'état supercritique. Les échantillons sont introduits dans la colonne par un injecteur similaire à celui retrouvé dans les systèmes de chromatographie liquide à haute performance. Ces injecteurs sont essentiels puisqu'ils résistent à des pressions élevées (environ 5000 psi). Après

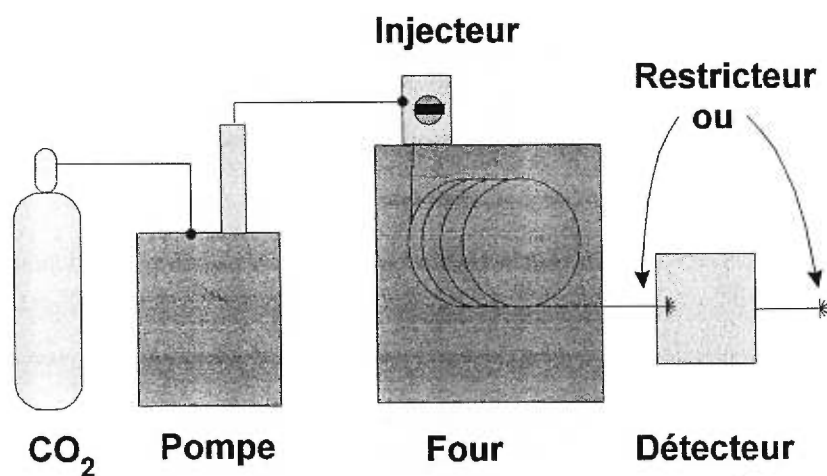


Figure 10 : Schéma d'un système de chromatographie en fluide supercritique

la séparation, qui s'effectue sur la colonne, les composés sont détectés. Les détecteurs employés en HPLC et GC peuvent être utilisés en SFC, en y apportant certaines modifications. Par exemple, les cellules de détection pour des détecteurs UV-visible, RMN et IR ne supportent pas les hautes pressions retrouvées en SFC. Il faut donc utiliser des cellules compatibles avec les haute pression.

3.9.1 La pompe

La pompe à piston à double action (remplissage-expulsion) a pour avantage de ne pas être limitée par la quantité de fluide demandée pour une séparation. Lors de l'utilisation d'une colonne remplie (par exemple, 4,6 mm × 150 mm), le débit se situe à environ 1 mL. Pour des séparations nécessitant de grands volumes, cette pompe est donc plus appropriée. Son principal désavantage vient des pulsations provoquées par le piston. Malgré les vannes (check-valve) et l'amortisseur de pulsations (damper), de légères chutes de pression sont perceptibles, provoquant une ligne de base plus instable et parfois un élargissement des pics chromatographiques. Pour cette raison, la pompe à piston à simple action (seringue) est favorisée. Son principe de fonctionnement élimine complètement les pulsations. Par contre, elle possède un volume maximal fixe, ce qui limite la durée des analyses lorsqu'il y a utilisation de colonnes remplies. Les colonnes capillaires (débit $\approx 2 \mu\text{L}$) s'adaptent parfaitement aux pompes à seringue.

3.9.2 L'injecteur

Puisqu'il s'agit d'un fluide comprimé, il est nécessaire que l'injecteur évite de provoquer une décompression en tête de colonne lors de l'injection. Une décompression lors de cette étape, élargit la bande d'injection, ce qui provoque

une perte de résolution et de sensibilité. Les injecteurs utilisés en HPLC conviennent aux conditions du SFC (haute pression).

Selon la capacité de la colonne (capillaire ou remplie), le volume de la boucle d'injection est plus ou moins important. Par exemple, avec une colonne remplie de 4,6 mm de diamètre interne et 10 cm de long, le volume d'injection est de l'ordre de quelques μL . Par contre, pour des colonnes capillaires dont le diamètre varie de 50 à 200 μm , le volume est de 50 nL à 1500 nL respectivement⁶⁸.

3.9.3 La colonne

En chromatographie en fluide supercritique, on utilise la plupart des phases stationnaires retrouvées en GC ou en HPLC; la silice et les phases greffées comme cyanopropyle et octadécylsilane en sont des exemples⁷⁷.

3.9.3.1 Les colonnes remplies

Les colonnes remplies⁷⁸ ont généralement un diamètre interne entre 1 et 5 mm, ce qui conduit à un débit plus élevé que celui des colonnes capillaires. Le volume d'échantillon injecté est plus grand, ce qui améliore la limite de détection. Par contre, un tel débit complique le couplage avec un spectromètre de masse, car leur capacité de pompage n'est généralement pas suffisante pour évacuer de grandes quantités de produits. L'utilisation de "split" en chromatographie liquide est difficilement adaptable pour la chromatographie en fluide supercritique. Aussi, il a été démontré qu'il se produit une chute de pression dans la colonne due à la viscosité et à la compressibilité du fluide supercritique⁶⁷. Cette chute de pression est plus élevée dans les colonnes remplies⁷⁷ et provoque une diminution de densité, causant la précipitation partielle ou totale des analytes sur la phase

stationnaire qui conduit à une diminution de résolution et de sensibilité. Pendant ce gradient de pression, les propriétés du fluide supercritique changent, amenant une variation dans la rétention et la diffusion des analytes⁶⁵. Afin de diminuer les effets de cette chute de pression, on augmente la pression initiale sur la colonne. Par conséquent, le domaine de pression pour effectuer un gradient de pression lors de l'analyse se voit diminuer, causant une limitation dans le pouvoir de séparation.

3.9.3.2 Les colonnes capillaires

Puisque les intérêts pour la SFC visent les produits plus polaires et de plus haute masse qui nécessite généralement une très grande densité de fluide, les colonnes capillaires sont d'usage plus courant. De plus, la phase stationnaire, dans les colonnes remplies, contient plus de sites actifs (silanols), comparativement aux colonnes capillaires, ce qui provoque une plus grande rétention. Une plus grande densité ou l'ajout de modifiant sera nécessaire.

Les colonnes capillaires utilisées en SFC possèdent un diamètre interne entre 25 et 200 μm . Les colonnes capillaires avec une phase stationnaire greffée sur un support apportent une meilleure reproductibilité en diminuant les variations de pressions (<3%)⁶⁸, comparativement aux colonnes remplies. Le volume d'échantillon injecté est d'environ 60 nL dû à la faible capacité de ces colonnes. Par contre, un bon transfert de masse s'effectue dans un petit domaine de débit linéaire⁷⁹.

Payne et ses collaborateurs⁸⁰ ont utilisé une colonne capillaire remplie avec un diamètre interne de 250 μm . L'efficacité de cette colonne est supérieure à celle d'une colonne capillaire non-remplie de même diamètre. Avec une plus grande efficacité, le volume d'injection peut être augmenté.

Selon l'analyse à effectuer, un choix doit être fait entre une colonne remplie ou une colonne capillaire. Le type de détecteur utilisé, le genre et la quantité de composés dictent, généralement, la colonne à utiliser.

3.9.4 L'interface

L'interface peut être définie comme étant la composante unissant le chromatographe et le détecteur. Elle a comme rôle de préparer l'analyte afin de le rendre compatible avec les conditions de détection. Par exemple, le spectromètre de masse, en mode d'ionisation EI ou CI, nécessite la volatilisation complète de l'analyte. Heureusement, en chromatographie en phase supercritique, le fluide se vaporise aussitôt passer le restricteur, entraînant les analytes. Mais cette vaporisation (expansion adiabatique) provoque une perte d'énergie du fluide se manifestant par une diminution importante de température causant la cristallisation des analytes les moins volatils à l'intérieur du restricteur. Par conséquent, le chauffage du restricteur est nécessaire afin d'assurer un bon transfert des analytes dans le détecteur en évitant le blocage.

3.9.5 Le restricteur

Le restricteur est l'une des parties les plus importantes, mais aussi la plus difficile à contrôler. Le restricteur peut être un tube en acier inoxydable ou un capillaire de silice⁷⁶. Le restricteur a deux rôles principaux: maintenir la pression à l'intérieur de la colonne et contrôler le débit. Selon les conditions optimales d'une colonne, l'orifice du restricteur sera plus ou moins grand ($\approx 1 \mu\text{m}$). Le débit d'une colonne remplie est généralement supérieur à celui d'une colonne capillaire. La majorité des restricteurs sont fixes et, selon le gradient de pression, le débit variera. Certains détecteurs, comme le spectromètre de masse, sont sensibles à de grande variation d'apport massique. Dans le cas de l'ionisation chimique (CI),

un changement de pression dans la source conduit à une variation dans les conditions d'ionisation, ce qui entraîne des fluctuations dans le signal (spectre de masse).

Le restricteur est placé au bout de la colonne et avant ou après le détecteur, selon ce dernier. Mais la majorité du temps, il nécessite un chauffage pour éviter la précipitation ou le blocage.

3.9.6 Les détecteurs

Un des avantages que comporte la SFC est qu'elle permet l'utilisation de la plupart des détecteurs reliés à la GC et à la HPLC. La plupart des détecteurs utilisés en HPLC et en GC ont été adaptés pour la chromatographie en fluide supercritique. Le spectrophotomètre ultra-violet et le FID ont été largement utilisés. Depuis la dernière décennie, le spectromètre de masse (MS) et l'infrarouge à transformées de Fourier (FTIR) sont de plus en plus employés pour la détection en SFC.

3.9.6.1 Détection par ionisation à la flamme, FID

Le FID est largement utilisé et surtout lorsque le fluide se compose essentiellement de dioxyde de carbone ou de protoxyde d'azote. Par contre, la présence de modifiant à plus de 5% de la phase mobile rend impossible l'utilisation du FID comme détecteur⁸¹, le bruit de fond étant trop élevé. Ainsi, l'ajout d'un modifiant limite le choix du détecteur. Ce dernier est placé à l'extrémité du restricteur.

3.9.6.2 Détection par spectrométrie de masse, MS

Le spectromètre de masse se prête bien à la chromatographie en fluide supercritique. Puisqu'il y a vaporisation des analytes et de la phase mobile après le restricteur, les analytes gazeux sont ionisables dans la plupart des sources d'un spectromètre de masse. Par exemple, l'ionisation chimique et par impact électronique^{72,82} nécessitent des analytes à l'état gazeux. L'introduction des analytes peut avoir lieu en plaçant le restricteur directement dans la source (direct fluid introduction, DFI)⁸³. Puisque l'expansion du fluide après le restricteur provoque un refroidissement qui cause la formation d'agglomérats et même un blocage, la DFI exige le chauffage du restricteur pour éviter ces inconvénients.

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et l'ionisation par nébulisation électrostatique (electrospray) sont aussi utilisés pour la SFC⁷⁷.

3.9.6.3 Autres modes de détection

Les détecteurs spectrophotométriques tel UV-visible^{62,79,85} ou IR⁸⁶, sont placés entre la colonne et le restricteur puisqu'ils ne nécessitent pas un apport de matière. Les cellules sont adaptées à de grandes pressions rencontrées en SFC.

Dans les détecteurs utilisés en GC, il a aussi le détecteur à capture d'électron (ECD), à photométrie de flamme (FPD) et thermoionique (NPD)^{72,87}. Ces détecteurs sont positionnés à la sortie du restricteur.

Il est possible d'utiliser plus d'un détecteur à la fois. Certaines combinaisons en série sont possibles telles : UV-FID, UV-MS, FID-MS, etc.^{74,79}

3.10 Conclusion

La chromatographie en fluide supercritique a couvert de nombreux domaines et plusieurs types de composés : les oligomères du polystyrène, les hydrocarbures (HAP), les acides carboxyliques⁶³, les alcools, les acides gras, les pesticides, les herbicides⁶², les drogues, les cires, les acides aminés, etc.⁷⁴. Certains sels peuvent être analysés par SFC. En effet, David et Sandra⁸⁸ ont séparé quelques sels d'ammonium quaternaire.

Markides et ses collaborateurs⁶³ ont analysé quelques acides carboxyliques thermolabiles par SFC. Puisque la séparation s'effectuait à basse température, aucune décomposition n'a été observée.

Généralement, les molécules de hautes masses nécessitent l'ajout de modifiant pour se solubiliser dans le fluide supercritique. Le modifiant permet d'étendre le domaine de masse, mais cette solution connaît aussi des limites quant à la masse. Smith et ses collaborateurs⁶⁴ ont démontré qu'il est possible, en chromatographie en fluide supercritique (éthane et propane), d'analyser des molécules tel le cytochrome C à 12842 daltons avec l'emploi de micelles. L'ajout de surfactants, sous certaines conditions, provoque la formation de micelles⁸⁹ qui sont plus facilement solubilisables.

Les propriétés physiques d'un fluide supercritique ont permis d'ajouter deux techniques analytiques très intéressantes. L'extraction par fluide supercritique se voit une technique plus rapide et performante pour l'analyse de composés traces comme les substances allélopathiques. La possibilité de couplage avec une technique chromatographique (SFC) procure un avantage de plus, contrairement aux techniques classiques d'extraction (soxhlet, sonification). De son côté, la SFC permet le couplage au spectromètre de masse, un outil majeur dans l'élucidation de composés inconnus.

En pratique, le couplage de la SFE avec la SFC est plus complexe, il

nécessite l'ajout d'une trappe cryogénique. Cette trappe doit avoir un très petit volume afin d'éviter un volume d'injection trop grand provoquant une perte d'efficacité chromatographique. Mais une trappe cryogénique trop petite possède une capacité limitée à retenir les composés, surtout si l'on utilise un modifiant lors de l'étape d'extraction.

Chapitre 4

PARTIE EXPÉRIMENTALE

4.1 Substances utilisées

Les composés employés lors des différentes expériences proviennent de la compagnie Aldrich (Milwaukee, USA) et étaient utilisés sans purification préalable. Ces composés sont l'acide férulique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique, l'acide t-cinnamique, la caféine, l'umbelliférone, le pinène, le menthol, la limonène, l'antracène et la vitamine K. Les HAP utilisés proviennent de chez Ultra Scientific (North Kingstown, USA).

Les solvants nécessaires à la HPLC, à la GC, à la SFC, à la SFE et aux mises en solution étaient tous de grade HPLC ou spectrograde. L'acétone et le méthanol proviennent de la compagnie BDH (Toronto, Canada). L'acétonitrile et l'acide acétique glacial ont été achetés chez Sigma, tandis que le toluène et le dichlorométhane proviennent de J&W. L'eau pour sa part provenait d'un système de purification d'eau milli-Q vendu par la compagnie Millipore (Bedford, U.S.A.)

Le gaz utilisé pour l'extraction et la chromatographie par fluide supercritique est le dioxyde de carbone (CO₂) de grade SFC acheté chez Liquid Carbonic (Montréal, Canada); Il est fourni avec une surpression d'hélium à 1500 psi. L'hélium, l'hydrogène et l'air de grade zéro proviennent de la compagnie Liquid Carbonic inc. Ces derniers traversent des trappes de purification additionnelles provenant de chez CSC.

4.2 Système de chromatographie liquide à haute performance

Une pompe à piston modèle LC-410 a été employée avec un détecteur UV

à longueur d'onde variable modèle LC-85 muni d'une cellule de 2,4 μL (≈ 254 nm), tous deux de marque Perkin-Elmer. L'injecteur modèle 7125 de la compagnie Rheodyne a été monté avec une boucle d'injection de 5 μL . Une colonne de 15 cm de longueur par 4,6 cm de diamètre interne contenant une phase stationnaire ODS-2 de 5 μm de diamètre a été employée. Les solvants d'élution étaient dégazés à l'aide d'un courant d'hélium gazeux en continu pour éviter la formation de bulles dans le système. Le système d'intégration modèle PE Nelson 1020 de la compagnie Perkin-Elmer a été utilisé pour l'analyse qualitative et quantitative.

4.3 Système de chromatographie en phase gazeuse

Un chromatographe en phase gazeuse modèle Autosystem de Perkin-Elmer muni d'un détecteur à ionisation à la flamme (FID) a été utilisé. Le système d'intégration modèle PE Nelson 1020 de la compagnie Perkin-Elmer a été utilisé pour l'analyse qualitative et quantitative. Une colonne capillaire de 320 μm de diamètre interne et de 30 mètres de longueur contenant une phase stationnaire SPB-5 de 0.25 μm d'épaisseur de la compagnie Supelco était employée.

4.4 Détecteurs à spectrométrie de masse

Deux spectromètres de masse ont été employés comme détecteurs chromatographiques. Tout d'abord, un spectromètre de masse quadrupolaire TRIO-1 de la compagnie VG interfacé à un système d'acquisition LAB-BASE a été utilisé. Le vide était obtenu à l'aide de deux pompes turbo-moléculaires: 240 L/s pour la source et 50 L/s pour l'analyseur. Le pompage primaire était assuré par une pompe rotative Edwards modèle 2. La source utilisée était de type CI.

Le second instrument employé est un spectromètre de masse à secteur MS-9 de la compagnie Kratos muni d'une source modifiée¹⁰⁶ à décharge

électroluminescente (Glow-discharge). Le vide était obtenu avec trois pompes à diffusion.

4.5 Système SFE

Le système SFE a été mis au point dans nos laboratoires (Figure 4). Il est constitué d'une pompe à seringue HPLC Varian 8500. Entre la pompe et la cartouche d'extraction, une valve permet d'augmenter la pression dans la pompe sans amorcer l'extraction. Par la suite, la cartouche d'extraction est insérée dans un four GC, de Varian. La tubulure en acier inoxydable de 1/8" de même que la plupart des unions et valves proviennent de la compagnie Vannes et Raccords Laurentien (Montréal, Canada). Une cartouche d'extraction en acier inoxydable de 5 mL résistant à 10000 psi, et les connecteurs "Slip-free" ont été achetés chez Keystone Scientific de même que la tubulure en acier inoxydable de 1/16". Le restricteur est constitué d'un capillaire de silice de 35 μm de diamètre interne. Le diamètre interne du restricteur doit obligatoirement être plus petit que la tubulure avant la cartouche d'extraction, ce qui permet de créer une restriction située seulement après la cartouche. La longueur de capillaire nécessaire entre la cartouche d'extraction et le vial de trappage est d'environ 40 cm. Le contrôleur de température nécessaire au restricteur a été fabriqué à l'atelier d'électronique et mécanique du département de chimie.

Après la solubilisation par le FS, les analytes doivent être recueillis dans un espace hors de portée de la matrice initiale. Le FS à température et pression normale, se volatilise à la sortie du restricteur. À ce moment, les analytes peuvent être rejetés dans un solvant. Cette procédure se nomme *barbotage*. Cette solubilisation constitue en fait le trappage des analytes.

Le contenant servant au trappage des analytes doit contenir un volume minimum de solvant afin d'être efficace. La forme du contenant de trappage est également importante. Un contenant court et large diminue le temps de résidence

du dioxyde de carbone contenant les analytes. Un contenant long et étroit apporte un long temps de résidence et procure un bon transfert des analytes vers le solvant. Étant donné un débit gazeux élevé (150-300 mL), un contenant trop étroit expulserait le solvant à l'extérieur. Un vial de 10 cm de longueur par 1 cm de diamètre interne, que nous avons utilisé, convient parfaitement au débit employé en SFE.

4.6 Mode d'opération pour la SFE

Dans un premier temps, le dioxyde de carbone est acheminé vers la pompe. Cette dernière permet de compresser le dioxyde de carbone à des pressions supérieures à la pression critique du gaz. En parallèle, la cartouche d'extraction est remplie avec la matrice contenant les composés cibles (composés allélopathiques) et déposée dans l'enceinte chauffante. La température de l'enceinte doit être supérieure à la température critique du gaz. Pour débiter l'extraction, une valve située entre la pompe et la cartouche d'extraction, est ouverte. Les analytes extraits par le SF sont acheminés vers une trappe où ils sont accumulés pendant toute la durée de l'extraction.

Le développement de l'instrument avait comme objectif d'obtenir le plus haut taux de recouvrement des substances allélopathiques contenu dans la terre avoisinant la *Kalmia angustifolia*. La principale partie de l'instrument qui dut subir plusieurs ajustements est la trappe. Cette partie a pour fonction de retenir tous les composés allélopathiques extraits de la terre, donc un rôle majeur dans la qualité du recouvrement.

L'ajustement de chaque paramètre de l'appareil (pression, température, débit, etc) avait également comme objectif d'obtenir le plus haut taux de recouvrement des substances allélopathiques contenu dans la terre.

4.7 Système de chromatographie en fluide supercritique

Le système de chromatographie en fluide supercritique comporte une pompe à seringue HPLC Varian 8500. Un GC 1590 de Hewlett-Packard servait d'enceinte chauffante. Une colonne capillaire de 50 μm de diamètre interne et de 10 mètres de longueur contenant une phase stationnaire DB-1, achetée chez CSC, (Montréal) a été utilisée. Un injecteur comportant une boucle d'injection interne Valco de 60 nL a été employé avec des connexions à volume mort réduit de la compagnie Valco.

4.8 Mode d'opération pour la SFC couplé à un spectromètre de masse

Le principe du pompage du dioxyde de carbone est le même qu'en SFE (section 4.6). La température de l'enceinte contenant la colonne doit être supérieure à la température critique du gaz. Le fluide supercritique traverse l'injecteur (de type HPLC) et est pompé à travers la colonne jusqu'au restricteur. Après ce dernier les analytes et le FS sont vaporisés dans la source chauffée du spectromètre de masse. Puisque le système est artisanal, il faut débiter l'acquisition du spectromètre manuellement au moment de l'injection.

Les paramètres instrumentaux (pression, température du fluide supercritique, température du restricteur, etc.) sont établis en fonction des différents composés alléopathiques. Les paramètres expérimentaux sont décrits au chapitre 5 avec l'évolution du système SFE.

Chapitre 5

OPTIMISATION D'UN SYSTÈME SFE POUR L'ANALYSE DES SUBSTANCES ALLÉLOPATHIQUES

Parallèlement au développement des techniques de séparation et d'identification des composés contenus dans un mélange, telle la chromatographie, il est également indispensable de développer une technique d'extraction de manière à isoler les composés de leur matrice initiale. C'est la première étape avant l'utilisation des techniques chromatographiques. Des essais antérieurs ont démontré que la plupart des composés organiques polaires contenus dans la terre sont difficilement extraits par les techniques classiques d'extractions, tel le soxhlet et la sonification⁴¹.

La mise au point de méthodes analytiques nécessite de connaître la nature des composés visés ainsi que les caractéristiques de la technique utilisée. Il est toujours nécessaire de faire quelques essais puisqu'il est difficile de prévoir les résultats. En chromatographie, par exemple, une bonne résolution entre deux ou plusieurs analytes ou l'élimination d'interférences ne peuvent être obtenues qu'à la suite de quelques essais. De plus la mise au point de la technique elle-même requiert de nombreuses expériences.

Ainsi le processus de modification du système d'extraction par FS a dû être appliqué à l'étude des substances allélopathiques. Le présent chapitre s'intéresse donc au développement du système d'extraction effectué dans nos laboratoires, de même qu'aux causes et conséquences des différentes modifications. Nous constaterons l'évolution de l'instrument et ce, dans le but de rendre cette technique à un niveau supérieur aux autres techniques d'extractions utilisées en chimie analytique.

5.1 Caractérisation du système SFE avec les terpènes

Afin de caractériser le système SFE et de mieux visualiser son fonctionnement en général, nous avons utilisé des composés volatils, stables et peu réactifs face à la température et aux divers solvants, et facilement analysables par une technique chromatographique. Certains composés de la famille des terpènes sont reconnus comme potentiellement allélopathiques. Les terpènes choisis sont volatils et sont peu polaires. La limonène, la cinéole et la menthone peuvent être analysés par GC/FID.

Dans un premier temps, aucune matrice n'était insérée dans la cartouche d'extraction. Les terpènes étaient ajoutés directement à cette cartouche. Cette procédure permet de vérifier le fonctionnement du système d'extraction directement en éliminant les effets de matrice avec la terre telle l'adsorption de composés.

La terre renferme plusieurs composés, mais à de très faibles concentrations. Pour reproduire une extraction de terre, nous avons inséré, dans la cartouche, 100 µg des trois terpènes sélectionnés. Une fois extraits, les terpènes étaient recueillis dans 10 mL de dichlorométhane (trappe par barbotage) et analysée par GC. La concentration des terpènes est évalué par rapport à des standards de concentrations connues. Le recouvrement des terpènes en fonction de la pression du CO₂ est montré à la figure 11.

Les terpènes à l'intérieur de la cartouche d'extraction doivent être solubilisés par le FS pour être extraits et amenés dans la trappe. Selon la figure 11, nous pouvons constater, par les taux de recouvrement élevés, que les terpènes sont solubilisés dans le FS et ce, quelque soit la pression de ce dernier. Lors de ces extractions, le restricteur employé était fixe. En conséquence, une augmentation de la pression du FS provoquait nécessairement une élévation du débit du CO₂ gazeux. L'augmentation du barbotage peut entraîner les analytes volatils, tels les terpènes, hors de la trappe, ce qui explique, en partie, les taux de

recouvrement en deçà de 100%.

Aussi, nous pouvons constater que 45 minutes d'extraction est suffisant. Une prolongation de la durée d'extraction pourrait provoquer l'entraînement des analytes hors du solvant de trappage. Lors d'analyse de composés volatils par SFE, il est préférable de faire quelques essais afin de cibler la durée d'extraction optimale.

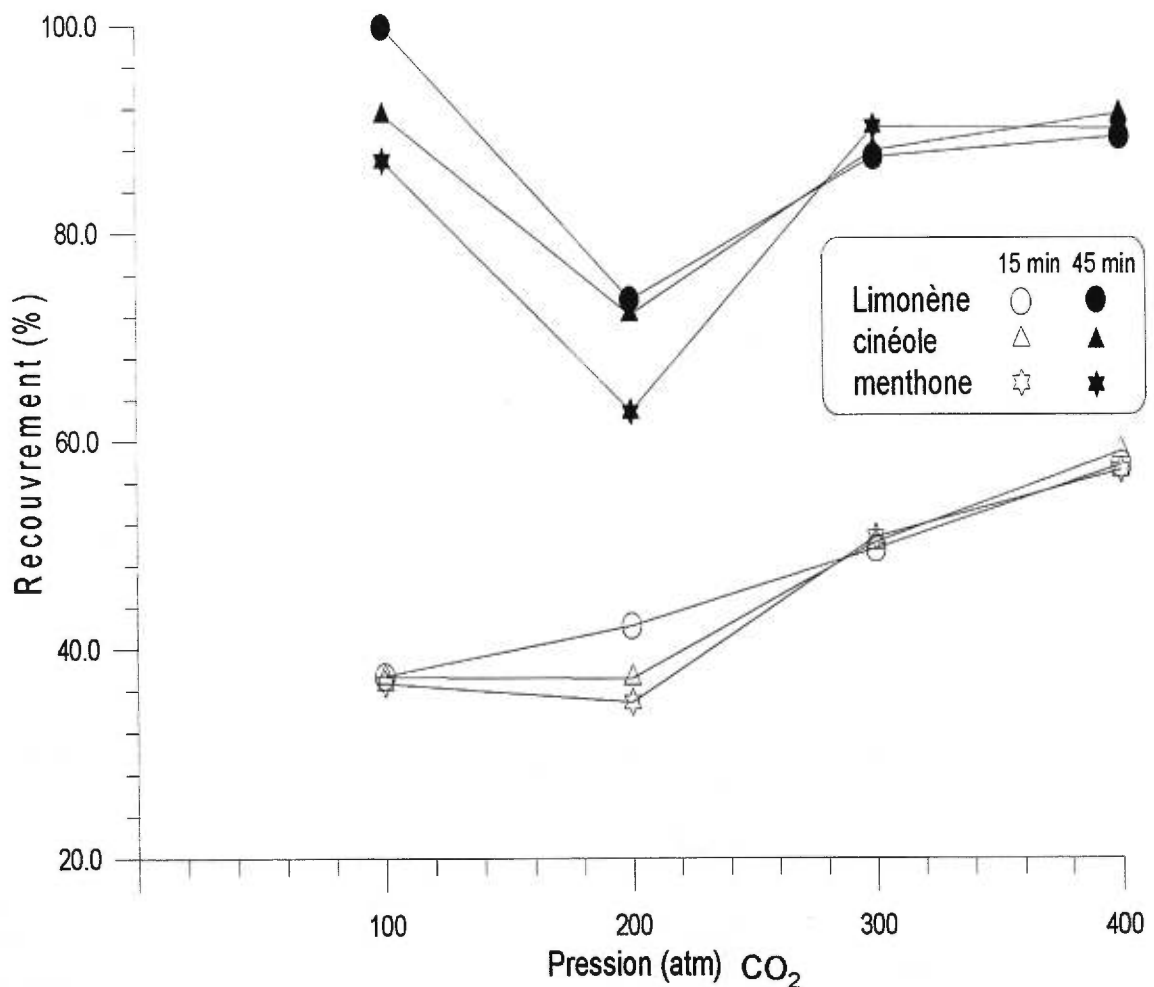


Figure 11: Graphique montrant l'effet du temps d'extraction de terpènes à 70°C

Ainsi, l'extraction de terpènes par fluide supercritique est possible avec un système de trappage par barbotage. La basse pression utilisée démontre la grande solubilité de ces composés dans le CO₂ sous sa phase supercritique. Lors de l'extraction, la température n'est pas élevée afin d'éviter toute décomposition.

La pression est le facteur principal qui augmentera la solubilité des analytes lors des extractions.

5.2 Effet de l'eau et des analytes non-volatils sur l'extraction de terpènes contenus dans la terre

Lors de l'extraction des terpènes contenus dans la terre, nous avons constaté une différence comparativement à l'extraction de terpènes sans matrice. Un blocage se produit au niveau du restricteur, ce qui était probablement causé par la présence d'eau ou d'analytes non-volatils. Plusieurs essais ont été effectués, mais puisque le blocage se produisait au début de l'extraction, presque aucun composé n'a été extrait. Il a donc fallu trouver un moyen d'empêcher le blocage du restricteur.

Lors de l'analyse de composés provenant de matrices naturelles comme la terre, il est courant d'observer des taux d'humidité de l'ordre de 50-70 %. L'eau est également extraite par le dioxyde de carbone malgré sa faible solubilité³⁷. L'eau se condense puis gèle dans le restricteur lorsqu'il y a décompression du CO₂, ce qui a pour effet de bloquer partiellement ou totalement le restricteur et de causer l'arrêt de l'extraction. Plusieurs solutions^{2,49}, ont été proposées, dont le chauffage du restricteur. Avec un système de récupération par barbotage, il est impossible de chauffer la partie du restricteur qui baigne dans le solvant de trappage. Si le restricteur est chauffé, il en sera de même pour le solvant, et l'évaporation du solvant diminue la capacité de trappage. D'ailleurs, certains chercheurs ont démontré qu'il est préférable de réfrigérer le solvant.

Un second effet de l'eau lors de l'extraction par FS est qu'elle contribue à former des agglomérats de terre. Cette hétérogénéité de l'échantillon procure des chemins préférentiels au CO₂ tout en diminuant la surface de contact, ce qui cause un mauvais transfert des analytes dans le CO₂.

5.3 Remplissage de la cartouche d'extraction

L'échantillon contenant les analytes est placé dans la cartouche d'extraction. La disposition de l'échantillon dans la cartouche d'extraction a une influence sur le recouvrement et la reproductibilité. La disposition et l'homogénéité sont très importantes. Puisque la surface de contact des composés avec le FS est importantes, il faut éviter les agglomérats de terre causés, entre autres, par l'humidité. Un échantillon non homogène peut créer des voies préférentielles pour le FS comme démontré à la figure 12.

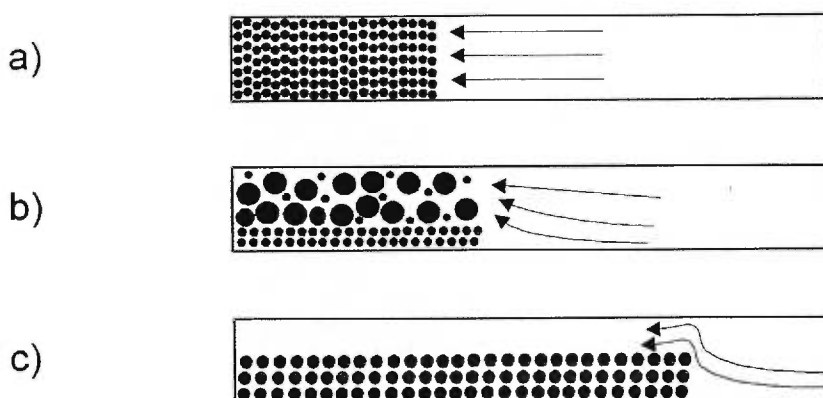


Figure 12 : Trois représentations de la variabilité de la disposition des échantillons dans la cartouche d'extraction; a) bonne disposition, b) échantillon non homogène, c) échantillon mal disposé

5.3.1 Utilisation d'un asséchant chimique

Puisque l'eau peut provoquer des agglomérats de terre et diminuer les surfaces de contact (Figure 12-b), on peut assécher cette matrice de différentes façons. Un composé chimique hydrophile ou un chauffage permettent une bonne homogénéité de l'échantillon, améliorant les taux de recouvrements et la reproductibilité des extractions.

L'utilisation d'asséchants chimiques complique le protocole d'extraction. Elle est également nécessaire pour prévenir le blocage du restricteur. Burford et ses collaborateurs⁵² ont démontré que le sulfate de magnésium est un asséchant très efficace. En effet, ce composé possède une bonne capacité à adsorber l'eau. C'est pourquoi, le sulfate de magnésium a été utilisé dans nos essais.

Il existe deux façons de trapper l'eau à l'aide d'un asséchant chimique. Tout d'abord, on peut déposer successivement, dans la cartouche d'extraction, un lit d'asséchant puis l'échantillon. L'eau extraite est trappée sur le lit d'asséchant avant de parvenir au restricteur. Étant donné la haute teneur en eau dans les échantillons de sol, nous avons observé que le lit se transforme en un bloc très solide et obstrue complètement le passage du FS, provoquant l'arrêt de l'extraction en moins de dix minutes, indépendamment de la pression et de la température dans la cartouche d'extraction.

L'autre façon d'éliminer l'eau est d'effectuer un mélange homogène avec le sol et le sulfate de magnésium. L'eau est adsorbée par l'asséchant avant l'extraction. Comme tous les échantillons de sol ne contiennent pas le même taux d'humidité, il n'existe donc pas de quantité fixe d'asséchant à ajouter. Toutefois, nous avons observé qu'en utilisant un sol avec un taux d'humidité d'environ 50 %, un mélange terre-MgSO₄ (1:2) constitue un mélange homogène sans agglomérat de sol.

Nous avons observé qu'après 15-20 minutes d'extraction, le débit du dioxyde de carbone diminuait jusqu'à une obstruction complète du restricteur. Malgré ce blocage, environ 50 % des terpènes étaient extraits. Par contre, le blocage du restricteur n'était pas dû simplement à l'eau gelée. En effet, après un léger chauffage (environ 50°C), le débit à travers le restricteur ne se rétablissait pas. Un chauffage du restricteur à plus de 200 °C était nécessaire pour obtenir un faible débit. Puisque l'obstruction s'effectuait lentement, il est probable que l'adsorption de composés non volatils sur les parois du restricteur était responsable de cette colmatation. Une décompression précoce du FS provoquait

une diminution du pouvoir solvatant de ce dernier dans le restricteur causant l'adsorption des composés sur la première surface rencontrée.

5.4 Gradient de pression dans le capillaire de silice

La tubulure et la cartouche utilisées avaient un diamètre interne supérieur à 250 μm . Le restricteur constitué d'un capillaire de silice d'environ 30 cm de longueur et dont le diamètre interne était de 30 μm . Par conséquent, une limitation de pression se fait avec le restricteur. Le diamètre interne du capillaire est constant, donc l'expansion du fluide se fait tout au long du capillaire. La pression initiale, celle de la cartouche d'extraction, est supérieure à la pression finale du système (Figure 13). Lorsque la restriction du fluide supercritique n'est pas localisée dans une infime partie d'un tube (ou capillaire), il y a gradient de pression. Durant l'expansion, le fluide supercritique voit sa densité diminuer et, par conséquent, son pouvoir de solvatation. Il est probable que certains analytes non volatils se condensent sur les parois.

Dans la terre, on retrouve plusieurs composés chimiques et la plupart ne sont pas volatils, ainsi l'utilisation d'un restricteur à capillaire de silice de diamètre interne constant n'était pas très appropriée puisqu'il y avait risque de formation de dépôt.

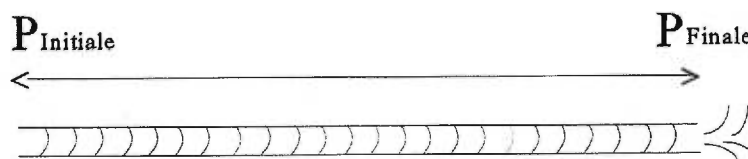


Figure 13: Schéma montrant la décompression du FS à travers un capillaire,

$$P_{\text{initiale}} > P_{\text{finale}}$$

Pour empêcher le dépôt des analytes non volatils sur les parois du

capillaire de silice, il était nécessaire, dans un premier temps, de chauffer le capillaire sur toute sa longueur et de localiser la restriction en diminuant le diamètre interne seulement à son extrémité. Mais le chauffage complet du capillaire était exclu dû au principe de trappage par barbotage dans un solvant organique, qui risquait de provoquer l'ébullition de ce dernier. Par contre, il était possible de fermer le bout du capillaire de silice par simple chauffage à la température de fusion de la silice. Mais cette étape avait pour effet de dénuder le capillaire de sa couche de polyimide protectrice rendant le restricteur très friable. Une autre solution devait donc être envisagée. Alors en changeant le type de restricteur, nous avons modifié également le principe de trappage des analytes suite à l'extraction.

5.5 Modifications dans le système de trappage

Il n'existe pas de problème majeur lors de l'extraction des composés volatils comme les terpènes avec un système d'extraction par fluide supercritique, puisque ces composés sont bien solubilisés et entraînés par le FS. Nous avons constaté que les différents problèmes survenus étaient dus aux analytes non volatils. En effet, ces derniers avaient tendance à s'adsorber sur les parois du restricteur de silice. Pour cette raison, il a fallu adapter le système d'extraction en fonction de tous les analytes, c'est-à-dire, un système qui pourrait, à la fois, extraire les composés volatils et non volatils. Le restricteur en silice a été remplacé par un restricteur en acier inoxydable, et la trappe par barbotage, par une trappe cryogénique.

5.5.1 Analytes non volatils

Les composés non volatils semblent constituer le problème majeur qui limite l'extraction par FS. En effet, les analytes non volatils tels certains acides

carboxyliques, sont entraînés de façon moins importante par le dioxyde de carbone gazeux comparativement aux terpènes. Un FS beaucoup plus dense est donc nécessaire afin d'obtenir une bonne solubilisation. Lors de la décompression du dioxyde de carbone, une baisse de densité provoque les dépôts d'analytes sur la première surface rencontrée. Si cette surface est la paroi intérieure du restricteur, il y aura perte, puisque les analytes doivent être acheminés jusque dans la trappe. Un mélange témoin de composés, autres que les terpènes, a alors été utilisé dans les essais ultérieurs (Tableau I, chapitre 2).

5.5.2 Restricteur en acier inoxydable

Un nouveau restricteur a été installé sur le système d'extraction par fluide supercritique. L'adsorption des composés sur les parois du capillaire de silice n'était pas attribuable à la silice mais à un manque de solubilité des analytes provoqué par un changement physique du fluide supercritique.

Un tube en acier inoxydable de 250 μm interne et 1,6 mm externe a été utilisé comme restricteur. Toutefois, un diamètre interne aussi grand par rapport à la cartouche d'extraction ne crée pas une bonne restriction, et le débit à la sortie du restricteur était presque égale au débit retrouvé avant la cartouche d'extraction. Ainsi, la pompe ne pouvait pas atteindre la pression critique désirée. Alors nous avons pincé le bout du tube afin de diminuer le diamètre interne à la sortie et créer une restriction très localisée. Ce restricteur était beaucoup plus robuste que celui constitué par un capillaire de silice, et la restriction s'effectuait sur une distance inférieure à un millimètre à la sortie du tube. Ceci permettait d'éviter l'expansion précoce du FS et ainsi d'éliminer le dépôt des analytes sur les parois du tube avant le transfert dans le système de récupération.

Nous avons constaté une baisse importante de température à l'extrémité du tube, où la vaporisation du FS a lieu, causant un blocage. L'expansion adiabatique provoquait une chute de température et refroidissait considérablement

le restricteur, en plus d'ajoutés un changement de phase du dioxyde de carbone (devient liquide puis gazeux). Les analytes dissous dans le FS étant soumis à cette température très basse, étaient moins solubilisés et précipitaient au niveau du restricteur. Un chauffage de ce dernier pouvait permettre de garder le dioxyde de carbone dans des conditions supercritiques avant la vaporisation et empêcher la précipitation précoce des analytes avant le système de récupération. Puisque le chauffage du restricteur est impossible avec un système de trappe par barbotage dans un solvant, un autre système a été employé: la trappe cryogénique (sur adsorbant solide).

5.5.3 Restricteur fixe

Le restricteur consistant en un tuyau pincé sur l'extrémité, tel que décrit dans la section précédente, a la caractéristique d'être fixe. Un restricteur fixe signifie que le diamètre de son embouchure est constant pendant l'extraction, comparativement au restricteur variable dont le diamètre est ajustable. Il est important d'en tenir compte, surtout lorsque l'on effectue des gradients de pression pendant une extraction. Une augmentation de la pression, en tête de la cartouche d'extraction, agit directement sur le débit du dioxyde de carbone à la sortie de la trappe (Figure 14). Si la quantité de dioxyde de carbone à la sortie de la trappe augmente, le volume de FS passant à travers l'échantillon sera obligatoirement accru. Par conséquent, une plus grande quantité d'analytes devrait être extraite. Il est important de connaître le type de restricteur, puisqu'il explique, en partie, les taux de recouvrement. Tel que décrit dans la section théorique (Chapitre 3), une augmentation de la pression conduit à un accroissement de la densité. La solubilité des analytes est directement proportionnelle à la densité du FS. Mais un débit plus grand peut être comparable à une durée d'extraction plus longue.

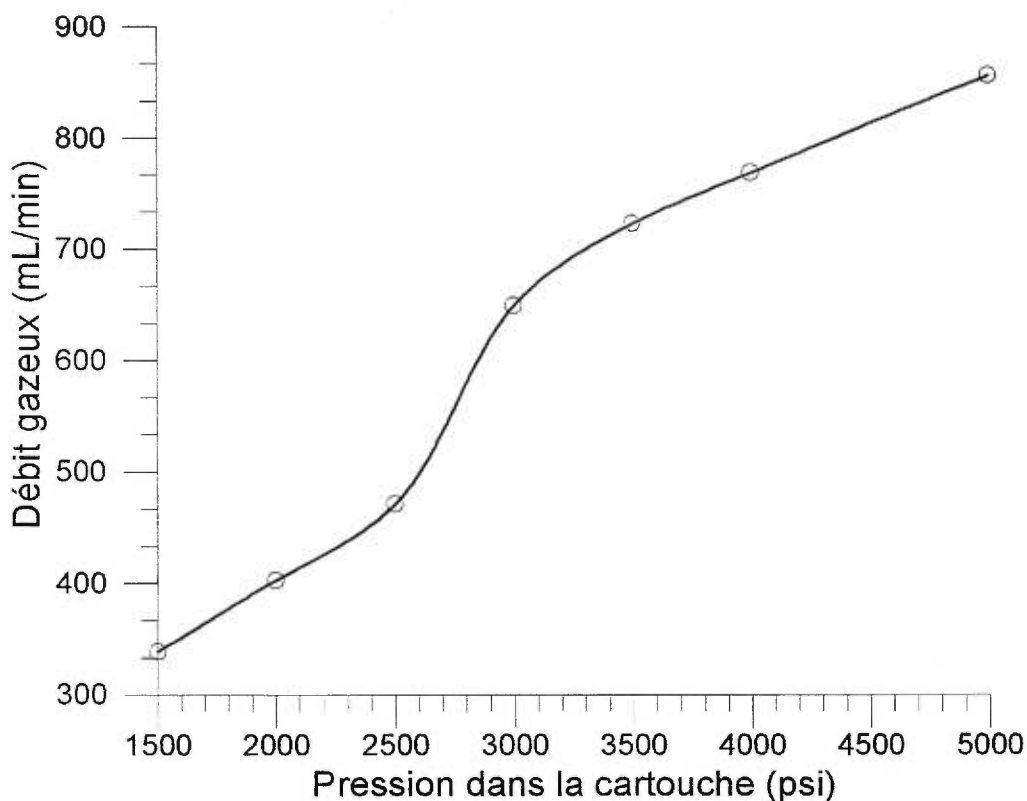


Figure 14 : Variation du débit gazeux de dioxyde de carbone versus la pression en tête de cartouche d'extraction pour un restricteur fixe

5.5.4 Récupération des analytes sur un adsorbant solide cryogéné

Au cours des dernières années, le développement des systèmes d'extraction par fluide supercritique a conduit à la disparition graduelle des trappes par barbotage au profit des trappes sur adsorbant solide^{45,50}. Ces dernières permettent, dans certains cas, d'éliminer le solvant de trappage. Puisque le restricteur n'est pas en contact direct avec les analytes, le chauffage du restricteur est donc possible.

Lors de la décompression du CO₂ supercritique, les analytes sont pulvérisés. Le dioxyde carbone capte l'énergie du milieu environnant, y compris celle des analytes dissous. Les analytes solides n'ayant presque plus d'interactions avec le dioxyde de carbone, ils auront tendance à cristalliser et à se

déposer sur les surfaces rencontrées. Dans le cas où les analytes sont recueillis dans un solvant, ils seront solvatés au contact de ce dernier. Sur un adsorbant solide, les composés sont déposés sur la surface solide. Il n'existe pas nécessairement de force de cohésion entre la phase solide et les analytes.

5.5.5 Description de la trappe

La trappe était composée d'une colonne HPLC conventionnelle en acier inoxydable de 4,6 mm de diamètre interne par 7-8 cm de longueur, vidée de son contenu (Figure 15). Le boulon d'entrée de la cartouche était machiné de manière à obtenir un cylindre. Sur ce dernier reposait une rondelle d'aluminium de 8-9 mm d'épaisseur par 7 cm de diamètre. Le centre de la rondelle était percé afin d'y insérer la cartouche de trappage. La rondelle était chauffée par un élément de 150 watts contrôlé par un système électronique maison. Ce dernier était de type "marche/arrêt", c'est-à-dire qu'il ordonne à l'élément de chauffer si la température devient inférieure à celle indiquée par un thermocouple de type K qui était introduit dans la rondelle. Le boulon dans lequel le restricteur était inséré était également chauffé. La précision du système de chauffage était d'environ de 10°C.

Le filtre poreux en acier inoxydable et le boulon à l'entrée de la colonne étaient troués afin de faciliter la détente du dioxyde de carbone. Il est nécessaire d'obtenir la vaporisation après le restricteur sur l'adsorbant et non sur le filtre poreux, car dans le cas contraire la vaporisation des analytes aurait lieu, en partie, à l'entrée de la colonne où il y a le chauffage. Le deuxième boulon situé à la fin de la cartouche était percé afin d'obtenir une meilleure évacuation du gaz. Le diamètre du trou était inférieur à celui du filtre poreux afin de bien retenir ce filtre et l'adsorbant solide.

La trappe était insérée dans un cylindre de téflon. La réfrigération de la colonne était assurée par du dioxyde de carbone comprimé avec une surpression

d'azote à 1500 psi. Le débit, donc la capacité de cryogénéation, était ajusté par un restricteur consistant en un tube d'acier inoxydable de 1/16 pouce de diamètre externe pincé sur l'extrémité. Ce restricteur pénétrait par le haut du cylindre de téflon et atteignait la zone de refroidissement. Cette dernière était délimitée par la trappe et le cylindre de téflon. Le dioxyde de carbone était ensuite rejeté par une ouverture à la fin de la trappe.

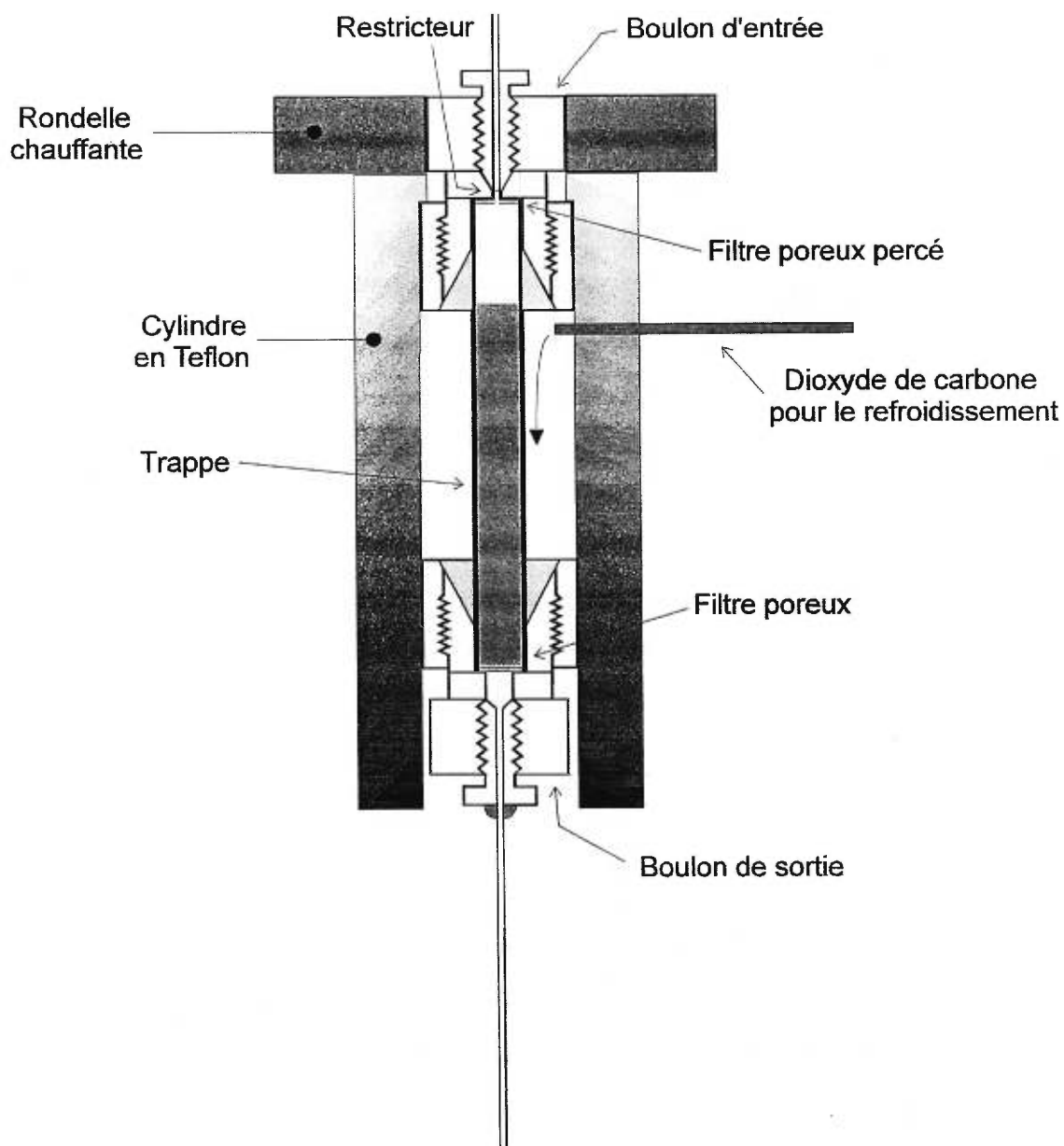


Figure 15: Schéma de la trappe cryogénique avec adsorbant solide

5.5.6 Adsorbants solides

Les adsorbants solides utilisés varient selon la matrice et surtout, le type de composé. Dans la littérature, on utilise des particules de C₁₈ (octa decylsilane) servant surtout à la HPLC, de la laine de verre, des billes de verre, des billes d'acier, etc.

Nous avons testé des particules de C₁₈ (octa decylsilane) provenant de cartouche d'extraction solide-liquide de type "Sep-Pak" de la compagnie Waters. Le diamètre des particules est d'environ 45 µm. Nous avons observé que cet adsorbant donne de bons taux de recouvrement lors de l'extraction, mais étant donné la finesse des particules, il se produisait une certaine restriction. Lors des extractions, le débit variait de 150 à 300 mL/min de dioxyde de carbone gazeux. Puisque le gaz ne pouvait s'échapper convenablement, une augmentation de pression apparaissait en amont de l'adsorbant. Dans certains cas, les pressions d'extractions atteignait 4500 psi et les particules de C₁₈ semblait se compacter. En effet, au bout de quelques extractions, la cartouche s'obstruait et ne laissait passer le gaz que partiellement. Une augmentation de la pression dans la trappe entraînait les analytes hors de celle-ci. Pour ces raisons, nous avons testé, par la suite, de la laine de verre silanisée de la compagnie Supelco. Les taux de recouvrement et la facilité à désorber les composés semblaient identiques et il n'y avait aucun blocage à court et long terme. Ainsi, nous avons utilisé de la laine de verre dans nos essais puisqu'elle convenait aux attentes d'un adsorbant solide.

5.5.7 Désorption de composés trappés sur la laine de verre

Une fois les composés extraits de la terre, ils se retrouvent sur l'adsorbant solide. Puisque nous avons démontré que la laine de verre convient parfaitement, nous l'avons utilisée afin de retenir les composés. Dans un deuxième temps, la trappe était retirée du système d'extraction et installée sur une pompe HPLC

conventionnelle où un solvant acheminait les analytes, préalablement extraits, de la laine de verre vers un vial. Afin de vérifier l'adsorption des analytes sur des sites actifs possiblement contenus dans la trappe et la procédure de récupération, une quantité connue de sept composés était déposée en tête de trappe. La laine de verre était séchée au dioxyde de carbone de façon à simuler une extraction. Successivement, 7 mL et 5 mL de méthanol passaient à travers la trappe à un débit de 1 mL/min. Les deux fractions étaient recueillies séparément afin de déterminer une quantité minimale de solvant nécessaire à la désorption des analytes. Les deux fractions étaient analysées par HPLC et comparées à un mélange de standards de concentration connue.

Tableau VI: Récupération de composés alléopathiques de la trappe avec du méthanol (A: avec 7.0 mL; B: 5.0 mL supplémentaire)

Composés	A (%)	B (%)
Ac. vanillique	92.0	<LOD
Caféine	83.5	<LOD
Ac. p-coumarique	109.5	<LOD
Ac. férulique	87.5	<LOD
Umbelliférone	85.5	<LOD
Ac. cinnamique	118	<LOD
Phlorhizine	91.5	<LOD

Nous avons constaté, d'après le Tableau VI, qu'il était possible de récupérer les produits trappés. De plus, 7 mL de méthanol semblaient suffisants pour déloger les analytes, puisque dans la deuxième fraction aucun composé n'était perceptible sur le chromatogramme.

5.6 Extraction de composés allélopathiques avec la trappe cryogénique

Cette section présente l'évolution de la méthode afin d'analyser les composés allélopathiques. Certaines modifications ont été apportées au système d'extraction par fluide supercritique afin d'éliminer quelques problèmes instrumentaux dans le but d'obtenir des taux de recouvrements les plus élevés possibles.

Il existe plusieurs causes à de faibles taux de recouvrements. La rétention de composés sur la matrice peut être une explication à une faible quantité de composés recueillis. Afin d'écartier cette possibilité, quelques extractions ont été effectuées en disposant aucune matrice à l'intérieur de la cartouche d'extraction. Un volume connu (250 μL), d'une solution mère comprenant les composés allélopathiques sélectionnés dissous dans l'acétonitrile, a été ajouté à la cartouche d'extraction. L'acétonitrile servait aussi de modifiant. Les conditions d'extractions étaient les suivantes:

Pression en tête de la cartouche d'extraction: 3000 psi

Température de la cartouche d'extraction: 50°C

Température du restricteur: 130°C

Durée de l'extraction: 30 minutes

Les données du Tableau VII montrent que le recouvrement moyen n'est pas de 100%. Ainsi, en écartant les conditions d'extraction (pression température, etc), nous pouvions observer qu'il y avait un problème au niveau du système d'extraction. Le recouvrement des analytes déposés dans la cartouche d'extraction devrait être de 100%. Nous pouvons prétendre que les analytes n'étaient pas extraits ou qu'il y avait perte à un ou plusieurs endroits.

Afin de vérifier si l'ajout de matrice dans la cartouche affecte le recouvrement moyen, nous y avons ajouté une quantité de terre humide, sans séchage thermique ou chimique (voir Tableau VIII). Un volume connu (250 μL)

Tableau VII: Extraction de composés allélopathique sans matrice (sans terre)

Composé	Recouvrement (%)
Ac. p-hydroxy-benzoïque	36-52
Ac. férulique	18-54
Ac. vanillique	34-56
Ac. p-coumarique	33-48
Phlorhizine	0-7
Umbelliférone	32-49
Caféine	37-58
Ac. cinnamique	37-59

d'une solution mère comprenant les composés allélopathiques sélectionnés dissous dans l'acétonitrile, a été ajouté à la cartouche d'extraction. L'acétonitrile servait aussi de modifiant. Les conditions d'extractions étaient les suivantes:

Pression en tête de la cartouche d'extraction: 4000 psi

Température de la cartouche d'extraction: 50°C

Température du restricteur: 140°C

Durée de l'extraction: 30 minutes

Matrice: 1,1 gramme de terre humide

Nous pouvons observer que l'extraction est très faible avec un sol humide. Il est normal que le recouvrement moyen obtenu soit inférieur comparativement à l'extraction sans matrice. En effet, la terre retient, en partie, les composés et l'eau contenue dans cette matrice contribue à rendre l'échantillon plus ou moins homogène. Par contre, l'acide cinnamique montre de bons résultats. Ceci peut être dû à la faible solubilité de l'acide cinnamique dans l'eau, puisque l'eau contenue dans la terre retient fortement les autres composés ou la présence de ce composé dans la terre.

Tableau VIII: Recouvrement de composés allélopathiques dans la terre humide

Composé	Recouvrement (%)
Ac. p-hydroxy-benzoïque	2
Ac. férulique	11
Ac. vanillique	6
Ac. p-coumarique	2
Phlorhizine	0
Umbelliférone	4
Caféine	13
Ac. cinnamique	75

5.6.1 Décomposition de la phlorhizine

La phlorhizine montre des taux de recouvrement beaucoup plus faibles que ceux des autres composés (Tableaux VII et VIII et Figure 16). Cette molécule contient un radical glucosique qui la rend thermolabile. En effet, nous avons constaté la présence de matière brune et collante autour du restricteur et à l'entrée de la trappe. Il est possible que d'autres composés aient été adsorbés aux endroits où la phlorhizine se décomposait. En regardant les chromatogrammes de la figure 16, nous pouvons constater la diminution évidente de la hauteur du pic de la phlorhizine ($T_r = 21$ min) et l'apparition d'un pic étranger (α , $T_r = 22$ min) à droite de celui de la phlorhizine, après l'extraction du mélange standard avec le restricteur à 90°C. Ce nouveau pic chromatographique peut correspondre à un produit de décomposition de la phlorhizine.

Quelques extractions ont été effectuées en réglant la température du restricteur à un niveau plus bas (50-80°C). Mais il y a eu blocage, au niveau du restricteur, dû à l'adsorption de l'eau et des analytes non volatils. Puisque la phlorhizine se décompose à très basse température, il était difficile de l'extraire

en obtenant de bons recouvrements. De plus, ce composé rendait les extractions moins représentatives compte tenu de l'adsorption des autres composés.

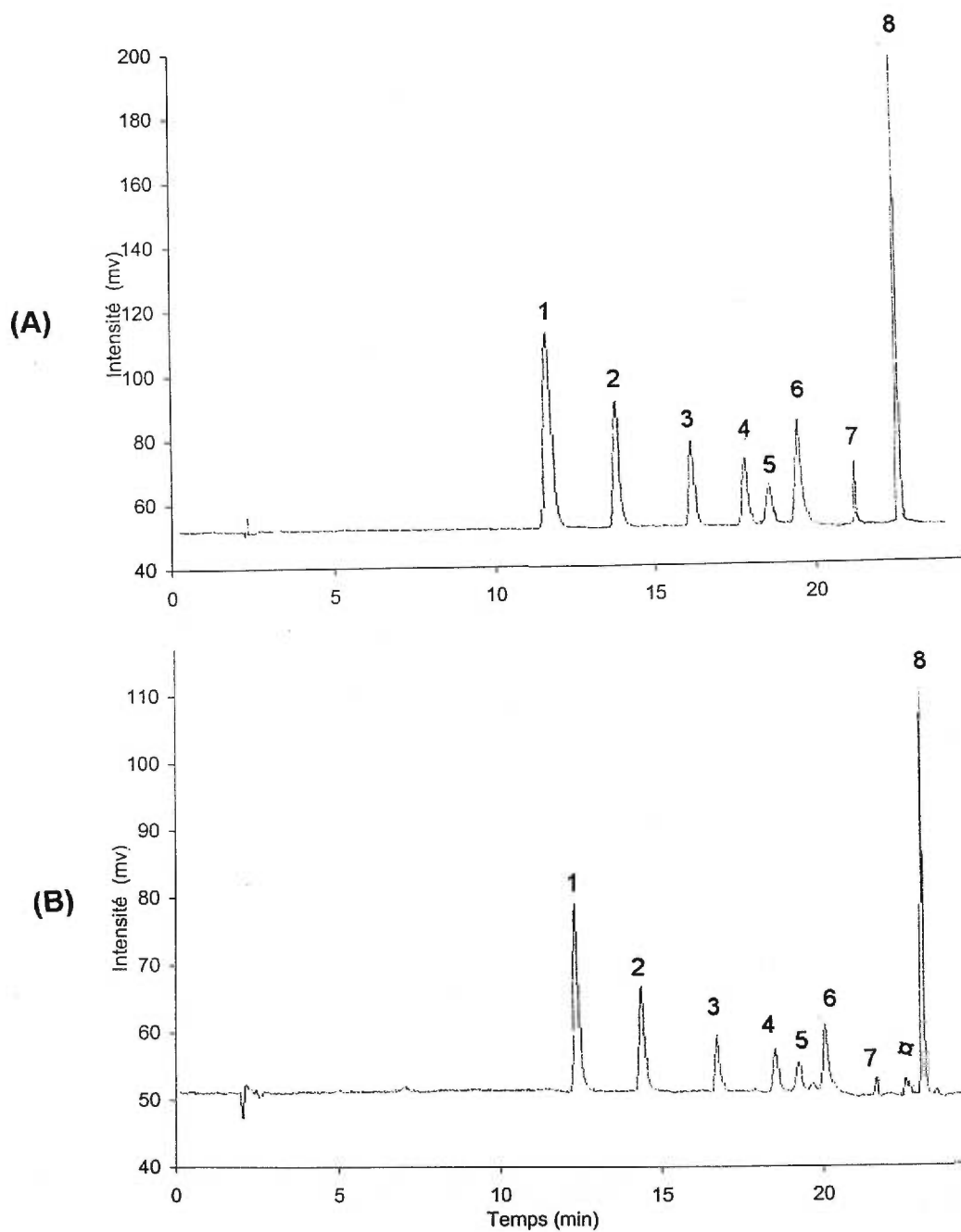


Figure 16: Chromatogrammes montrant la décomposition de la phlorhizine avec un restricteur à 90°C, (A): mélange standard avant extraction (B): mélange standard après extraction; 1. ac.p-hydroxybenz., 2. ac. vanil., 3. caféine, 4. ac. coum., 5. ac. férul., 6. umbelli., 7. phlorhizine, 8. ac. cinnam., α. pic de décomposition

5.6.2 Ajout d'une trappe (barbotat) en série après la trappe cryogénique

La trappe cryogénique est efficace dans la mesure où l'analyte touche une partie solide (paroi de la trappe ou laine de verre). Si la température de la trappe descendait beaucoup plus bas que la température de fusion du modifiant, ce dernier se solidifierait et bloquerait le passage du dioxyde de carbone, provoquant ainsi l'arrêt de l'extraction. Mais nous n'avons pas observé ce phénomène avec le refroidissement offert par un courant de dioxyde de carbone autour de la trappe.

Le modifiant liquide présent dans la trappe peut être entraîné par le courant de dioxyde de carbone et lessiver une certaine quantité d'analyte. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons déposé 250 µL d'une solution mère contenant les analytes (l'acétonitrile qui sert de solvant agit comme modifiant) directement dans la trappe cryogénique. Une deuxième trappe, (par barbotat) était ajoutée en série après la trappe cryogénique. Le contenant servant pour la deuxième trappe (barbotat) était le même que celui utilisé lors des extractions avec barbotat seulement (voir section 5.1.1). Ensuite, un courant de dioxyde de carbone a traversé la trappe cryogénique telle une extraction. Toutefois, aucun chauffage n'a été effectué pour éliminer le blocage du restricteur, puisqu'il n'y avait rien dans la cartouche d'extraction. Les analytes contenus dans les deux trappes ont été recueillis puis analysés afin de déterminer le recouvrement. Les résultats de recouvrement sont montrés dans le tableau IX pour les conditions suivantes:

Pression en tête de la cartouche d'extraction: 4000 psi

Température de la cartouche d'extraction: 50°C

Durée de l'extraction: 50 minutes

Nous pouvons observer (Tableau IX) que le dioxyde de carbone entraînait le modifiant avec une certaine quantité d'analyte dans le barbotat. Puisque les composés allélopathiques sont polaires et nécessitent l'ajout d'un modifiant pour améliorer la solubilisation, l'utilisation d'un barbotat en plus de la trappe s'avérait essentiel. Par contre, sans chauffage du restricteur, le rendement total tendait

vers 100%. Il est possible que le système comporte une anomalie. La rétention ou la décomposition d'analytes, entre la cartouche d'extraction et le restricteur, sont des hypothèse qui peuvent justifier un rendement non maximal.

Tableau IX: Effet de l'entraînement des analytes par le modifiant

Composé	Recouvrement moyen (%) (n=2)	
	Trappe cryogénique	Trappe (barbotat)
Ac. p-hydroxy-benzoïque	52	42
Ac Féruilique	53	42
Ac. Vanillique	55	37
Ac. p-coumarique	53	40
Umbelliférone	54	42
Caféine	49	27
Ac. Cinnamique	51	40

5.6.3 Vérification de la décomposition des composés

En utilisant des composés thermiquement stables ayant des structures différentes de celles des produits allélopathiques (et moins polaires), tels certains hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), il est possible de déterminer s'il y a décomposition ou problème d'adsorption des composés allélopathiques. Une extraction par fluide supercritique (sans terre) a été effectuée en utilisant du toluène comme modifiant (250 µL d'une solution mère de HAP) puisque les HAP sont bien solubilisés dans ce solvant. La pression d'extraction était de 4000 psi, la cartouche d'extraction à 100°C et le restricteur à 95°C. Généralement une extraction durait environ 30-45 minutes, mais afin de s'assurer d'obtenir la quantité totale des composés, 60 minutes d'extraction sont nécessaires pour les HAP. Les

résultats de cette extraction sont présentés dans le Tableau X.

Tableau X: Recouvrement des HAP extraits par SFE

Composés	Point d'éb. (°C)	Recouvrement moyen (%) (n=2)	
		Trappe cryogénique	Trappe (Barbotat)
Acénaphthylène	270	62	17
Acénaphène	279	64	15
Fluorène	295	63	10
Anthracène	340	50	2
Phénanthrène	340	58	4
Fluoranthène	375	49	1
Pyrène	399	51	1
Benzo(a)Anthracène	400	46	2
Chrysène	448	45	2
Benzo(k)fluoranthène	480	45	3
Benzo(ghi)Pérylène	542	40	3

En examinant le Tableau X, nous constatons toujours des taux de recouvrement de l'ordre de 50%. Nous pouvons donc écarter la décomposition due à la température dans l'expérience précédente. De plus, nous constatons une baisse dans le taux de recouvrement avec la diminution de la volatilité des composés. Ce phénomène peut être expliqué par un entraînement des composés plus volatils par le dioxyde de carbone ou directement par le processus d'extraction. Le dioxyde de carbone peut avoir une plus grande difficulté à solvater les composés de masses plus élevées. La décomposition des composés fut écartée. Ainsi, il est probable que le système présente une anomalie au niveau de la trappe.

5.6.4 Modification de la trappe cryogénique

Après plusieurs essais d'extraction sur la terre, et malgré le changement de la plupart des paramètres reliés à la SFE, des recouvrements moyens de 50 à 60% étaient obtenus. Le problème semblait donc provenir de la trappe au niveau du restricteur, puisqu'on retrouvait un dépôt situé près du restricteur après quelques extractions. Le jet de dioxyde de carbone n'était pas droit. Compte tenu du mode de fabrication du restricteur, il était très difficile d'orienter le jet de gaz du restricteur. Ainsi, le jet de dioxyde de carbone frappait la paroi chauffée située juste avant le filtre poreux percé avant de se retrouver dans la zone cryogénée contenant l'adsorbant solide.

Nous avons décidé de modifier la trappe cryogénique afin d'obtenir la configuration présentée à la figure 17. La rondelle de chauffage (section 5.5.5) n'était pas séparée physiquement de la zone cryogénée. Ainsi, il existe une zone de compétition intermédiaire. Afin de chauffer le restricteur convenablement, il est nécessaire de chauffer la rondelle de quelques dizaines de degrés supplémentaires. Puisque la zone autour du restricteur est chauffée davantage, il est important de vaporiser les analytes directement sur l'adsorbant cryogéné.

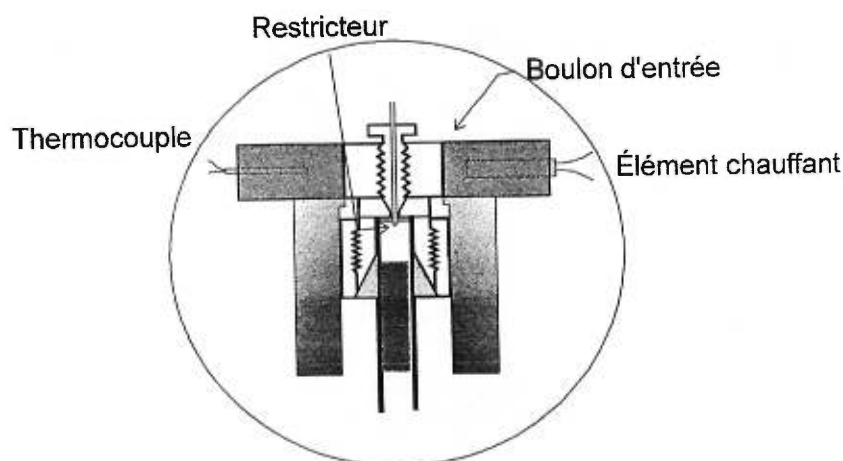


Figure 17: Schéma de la trappe cryogénique modifiée

La modification de la trappe consistait à percer davantage le filtre poreux afin d'y prolonger le restricteur. Ce changement permettait de vaporiser les analytes dissous dans le FS directement dans la zone cryogénée. Par contre, une trop grande prolongation du restricteur éloignait ce dernier de la zone chauffante. Puisque le chauffage de l'extrémité du restricteur est assuré par la conductivité thermique du tube en acier servant de restricteur, il fallait augmenter davantage la température de la rondelle, ce qui pouvait conduire à une décomposition des composés.

5.6.5 Extraction après modification de la trappe cryogénique

La dernière modification de la trappe (Figure 17) avait pour but d'améliorer la vaporisation des analytes dans la trappe, donc sur l'adsorbant (laine de verre). Ainsi, un volume connu (250 μ L) d'une solution mère comprenant les composés allélopathiques sélectionnés dissous dans l'acétonitrile, a été ajouté à la cartouche d'extraction. L'acétonitrile servait aussi de modifiant. Nous avons effectué une extraction sans laine de verre dans la trappe cryogénique selon les conditions suivantes:

Pression en tête de la cartouche d'extraction: 4000 psi

Température de la cartouche d'extraction: 50°C

Température du restricteur: 120°C

Durée de l'extraction: 60 minutes

Les résultats sont montrés dans le Tableau XI.

Nous avons des recouvrements moyens de 50%. Le Tableau XI, montrent des recouvrement totals d'environ 86%. Nous pouvons prétendre une augmentation des taux de recouvrements de 70% environ, depuis la modification de la trappe cryogénique. Il y avait des pertes à l'entrée de cette dernière dues à un mauvais transfert des analytes extraits dans la trappe cryogénée.

Tableau XI: Extraction de composés allélopathiques avec la nouvelle configuration de la trappe cryogénée et sans laine de verre

Composé	Recouvrement moyen (%) (n=2)	
	Trappe cryogénique	Trappe (barbotat)
Ac. p-hydroxy-benzoïque	47	39
Ac Férulique	53	40
Ac. Vanillique	50	43
Ac. p-coumarique	48	38
Umbelliférone	50	39
Caféine	47	23
Ac. Cinnamique	64	20

Afin de vérifier l'efficacité de la laine de verre avec la nouvelle configuration de la trappe, nous avons effectué une extraction dans les mêmes conditions hormis l'ajout de la laine de verre dans la trappe cryogénique. Les résultats de l'extraction sont présentés dans le Tableau XII. Nous pouvons constater que la laine de verre trappe bien les composés et le volume de modifiant utilisé (250 μ L) ne semble pas trop entraîner les composés.

Puisque l'eau contenue dans la terre semblait retenir davantage les composés (section 5.5.1), les prochains essais ont été effectués sur de la terre séchée (100°C pendant 12 heures). Ce traitement permet aussi de rendre la terre plus homogène.

Tableau XII: Extraction de composés allélopathiques avec la nouvelle configuration de la trappe cryogénée et avec la laine de verre

Composé	Recouvrement moyen (%) (n=2)	
	Trappe cryogénique	Trappe (barbotat)
Ac. p-hydroxy-benzoïque	76	1
Ac Férulique	81	0
Ac. Vanillique	81	1
Ac. p-coumarique	74	0
Umbelliférone	101	0
Caféine	80	0
Ac. Cinnamique	86	2

5.6.6 Extraction de composés allélopathiques sur de la terre séchée

La terre séchée ne contient pas d'agglomérats provoqués par une grande quantité d'eau. L'échantillon est donc plus homogène et permet une meilleure reproductibilité. Quelques extractions ont été effectuées sur un gramme de terre séchée et dans les mêmes conditions d'extraction, soient:

Pression en tête de la cartouche d'extraction: 4000 psi

Température de la cartouche d'extraction: 90°C

Température du restricteur: 140°C

Durée de l'extraction: 60 minutes

Nous avons choisi le méthanol comme modifiant, puisque c'est un solvant organique très polaire. Le volume de modifiant (méthanol) ajouté s'additionne au 250 µL d'une solution mère de composés allélopathiques (dissous dans

l'acétonitrile). Ainsi, le modifiant était déposé dans la cartouche d'extraction avec la terre. Les résultats sont présentés au Tableau XIII.

Tableau XIII: Recouvrement des composés allélopathiques versus la quantité de modifiant (méthanol)

Composé	Recouvrement (%) (n=2)					
	200 μ L		400 μ L		600 μ L	
	trappe cryo.	trappe (barb.)	trappe cryo.	trappe (barb.)	trappe cryo.	trappe (barb.)
Ac. p-hydroxy-benzoïque	4	10	4	15	5	32
Ac Férulique	5	10	6	14	5	25
Ac. Vanillique	5	12	6	20	7	36
Ac. p-coumarique	4	7	3	13	5	22
Umbelliférone	4	7	5	12	5	23
Caféine	5	8	5	14	6	21
Ac. Cinnamique	9	21	15	30	12	45

Nous pouvons observer dans le Tableau XIII que les taux de recouvrement sont bas et varient en fonction de la quantité de modifiant ajoutée. La quantité d'analytes retenus sur la trappe est sensiblement identique pour les trois essais. Par contre, la quantité totale d'analytes extraits s'accroît en augmentant le volume de modifiant. Parallèlement, plus d'analytes sont entraînés vers le barbotat.

L'ajout du modifiant directement dans la cartouche d'extraction permet de vérifier l'efficacité d'un modifiant et la quantité nécessaire à ajouter pour une quantité de matrice donnée. Par contre, lorsqu'une quantité fixe de modifiant est ajoutée à la cartouche au début de l'extraction, la concentration de l'analyte, extrait de la cartouche n'est pas constante durant l'extraction. Il est probable qu'avec le temps d'extraction la quantité de modifiant dans la cartouche d'extraction devient nulle, diminuant ainsi le pouvoir de solvatisation du FS.

5.6.7 Effet du volume de modifiant (méthanol) ajouté directement dans la cartouche d'extraction

Il existe plusieurs façons de rendre le fluide supercritique plus polaire. Entre autre, l'ajout de solvant organique polaire comme l'acétone, l'acétonitrile et le méthanol dans la phase mobile (FS), permet de mieux solubiliser les composés organiques polaires.

Il est possible d'utiliser une deuxième pompe afin d'ajouter le modifiant, en plus de la pompe servant à acheminer le FS. Bien que ce soit la façon la plus précise pour contrôler la teneur en modifiant, elle est plus dispendieuse. On peut aussi ajouter le modifiant directement dans la pompe avec le fluide supercritique. Toutefois, ce procédé ne permet pas un mélange homogène du modifiant et du fluide supercritique. Ainsi, la quantité de modifiant est élevée au début de l'extraction et diminue avec le temps d'extraction. Pour de courtes extractions, la variation est faible mais il est nécessaire d'ajouter du modifiant dans la pompe avant chaque extraction.

Certains chercheurs ajoutent directement du modifiant dans la cartouche d'extraction avec l'échantillon. Encore là, comme le montre la figure 18, le modifiant a tendance à être évacué rapidement de la cartouche d'extraction. L'extraction du modifiant s'effectue rapidement dans les quelques minutes après le début de l'extraction. Dans un premier temps, une quantité de méthanol était placée dans la cartouche d'extraction vide, donc aucune rétention due à la matrice (échantillon). Par la suite, la cartouche d'extraction était remplie avec du sable. Nous constatons le même phénomène, c'est-à-dire que le modifiant est extrait rapidement. Par contre, la majeure partie du modifiant est extraite plus rapidement lorsque la cartouche contient du sable. Ceci est dû à une plus grande surface de contact entre le méthanol et le dioxyde de carbone lorsqu'il y a présence de sable car le méthanol se disperse sur le sable.

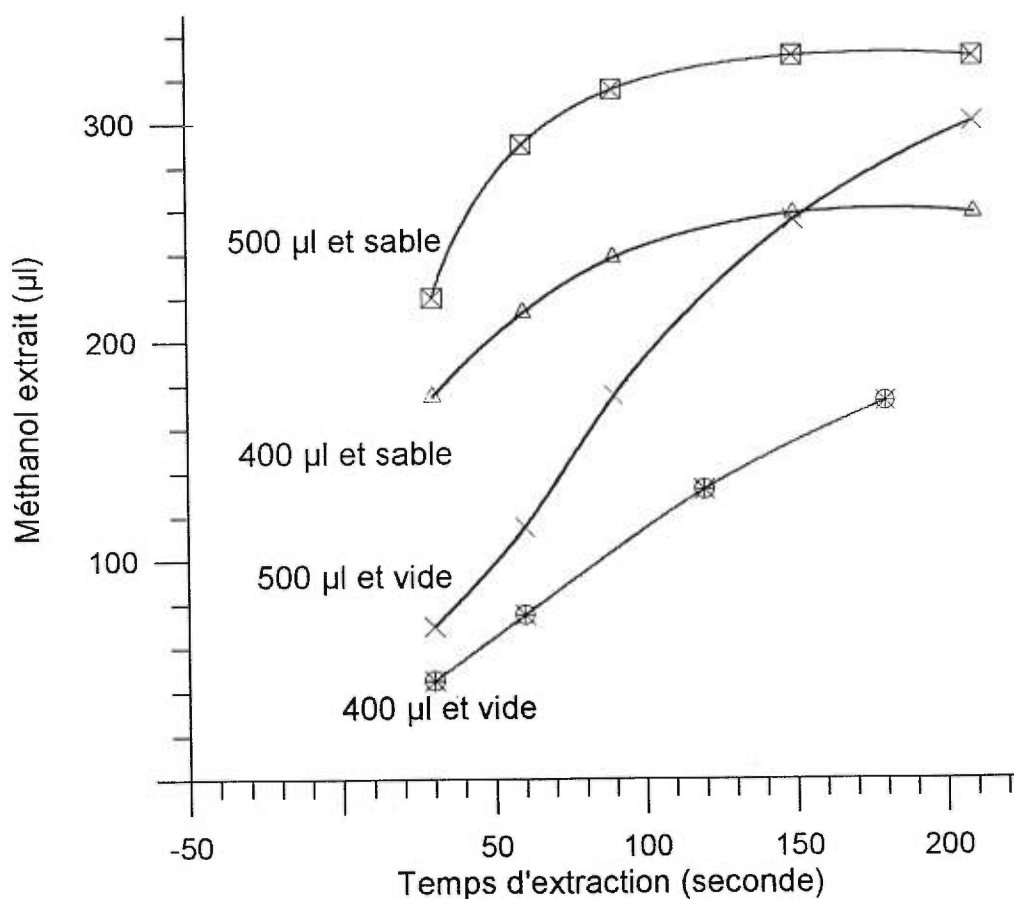


Figure 18: Graphique montrant la quantité de méthanol recueillie en fonction du temps

Si l'on veut employer l'ajout direct de modifiant dans la cartouche, il est nécessaire de faire l'essai de plusieurs volumes de modifiant pour chaque quantité et type de matrice. L'ajout de modifiant directement dans la pompe peut assurer la présence d'une certaine quantité de modifiant dans la cartouche d'extraction à condition de faire une nouvelle préparation (dioxyde de carbone -modifiant) avant chaque extraction. Dans le cas contraire on ne peut déterminer précisément la teneur en modifiant pour une extraction. Il a été démontré que le modifiant affecte de façon importante la quantité d'analytes extraits. Ainsi, des résultats non-reproductibles sont obtenus avec la variation de la teneur en modifiant.

5.6.8 Extraction avec ajout de modifiant (méthanol) dans la pompe à seringue et dans la cartouche d'extraction

L'ajout de modifiant dans la pompe à seringue permet d'assurer une certaine teneur en modifiant dans le fluide supercritique. Par contre, des essais, avec un chromatographe en fluide supercritique couplé à un spectromètre de masse, ont démontré une tendance à la diminution du méthanol (modifiant) dans le temps (1 à 3 heures). Ainsi, la teneur en méthanol par rapport au dioxyde de carbone diminue. Ce phénomène peut être expliqué par un mélange non homogène de modifiant et de dioxyde de carbone. La pompe à seringue ne permet pas d'agiter le volume interne du cylindre contenant la phase mobile.

Par contre, ce phénomène de chute de la teneur en modifiant est assez reproductible si le remplissage de la pompe s'effectue à chaque extraction. L'utilisation de ce mode de fonctionnement (ajout de modifiant dans la pompe) combiné à un ajout de modifiant directement dans la cartouche d'extraction peut apporter de bons résultats.

Nous avons effectué quelques extractions en insérant directement dans la pompe 10 mL de méthanol, ce dernier servant de modifiant. Le méthanol était mélangé dans la pompe à du dioxyde de carbone à 1500 psi pour un volume total de 150 mL. Puisque les extractions s'effectuaient à une pression de 4000 psi, la teneur en modifiant se situait vers 8.0%. En plus des 250 µL de solution mère contenant les composés allélopathiques, 200 µL de méthanol étaient déposés sur un gramme de terre séchée. Les résultats montrés au Tableau XIV ont été obtenus avec les conditions d'extractions suivantes:

Pression en tête de la cartouche d'extraction: 4000 psi

Température de la cartouche d'extraction: 90°C

Température du restricteur: 170°C

Durée de l'extraction: 90 minutes

Tableau XIV: Extraction de composés allélopathiques dans la terre en utilisant un fluide supercritique modifié au méthanol

Composé	Recouvrement moyen (%) (n=2)	
	Trappe cryogénique	Trappe (barbotat)
Ac. p-hydroxy-benzoïque	5	40
Ac Féruilique	6	46
Ac. Vanillique	8	63
Ac. p-coumarique	4	30
Umbelliférone	6	37
Caféine	10	71
Ac. Cinnamique	8	90

Nous avons observé (Tableau XIV) une amélioration remarquable des taux de recouvrements comparativement aux extractions contenant de plus petites quantités de modifiant (sans modifiant dans la pompe). L'effet du modifiant peut être visualisé par le taux de recouvrement total, mais aussi par la grande quantité d'analytes se retrouvant dans le barbotat comparativement à la trappe.

5.6.9 Évaluation de la teneur en modifiant dans la pompe à seringue

En assumant que le ratio modifiant/dioxyde de carbone ne varie pas trop du début à la fin de l'extraction (pour 90 minutes d'extraction), la teneur en modifiant devrait être assez constante. Le dioxyde de carbone et le méthanol sont en phase liquide aux pressions de travail (d'extraction). Le méthanol est considéré comme incompressible contrairement au dioxyde de carbone qui peut être comprimé davantage. Lors du calcul de la teneur en modifiant, il faut

considérer cette propriété du dioxyde de carbone. Par exemple, en déposant 10 mL de méthanol dans la pompe et en complétant à 120 mL avec le dioxyde de carbone à 1500 psi, nous obtenons,

$$\frac{10 \text{ mL de méthanol}}{110 \text{ mL de CO}_2 \text{ à 1500 psi} + 10 \text{ mL de méthanol}} \times 100 = 8.3\% \text{ v/v en méthanol}$$

Par contre, si la pression d'extraction est de 4000 psi, il y a compression du dioxyde de carbone à environ 22.8% v. Alors la teneur effective en méthanol devient,

$$\frac{10 \text{ mL de méthanol}}{84.9 \text{ mL de CO}_2 \text{ à 4000 psi} + 10 \text{ mL de méthanol}} \times 100 = 10.5\% \text{ v/v en méthanol}$$

La teneur en méthanol effective correspond à la quantité réelle de modifiant lors de l'extraction. Ces valeurs sont précises à quelques dixièmes près, puisque nous évaluons le volume de dioxyde de carbone et que la compressibilité du méthanol est négligée.

5.6.10 Extractions de terpènes avec la trappe cryogénique

La dernière version du système d'extraction, c'est-à-dire, la trappe cryogénique suivie du barbotage permet le chauffage du restricteur. Les composés volatils comme les terpènes peuvent être extraits. En effet, nous avons effectué quelques extractions en déposant 100 µL d'une solution mère de trois terpènes et 100 µL de méthanol sur 0.9 gramme de terre séchée. Le fluide supercritique contenait environ 5% en modifiant (méthanol). Les conditions d'extractions étaient les suivantes:

Pression en tête de la cartouche d'extraction: 4000 psi

Température de la cartouche d'extraction: 90°C

Température du restricteur: 170°C

Durée de l'extraction: 60 minutes

Le recouvrement des terpènes est montré au Tableau XV.

Tableau XV: Extraction de terpènes dans la terre avec modification du système de trappage et ajout de 5% de méthanol dans la pompe à seringue

Composé	Recouvrement moyen (%)
Limonène	71
Cinéole	86
Menthone	92

Les taux de recouvrements (Tableau XV) montrent clairement qu'il est possible d'extraire les composés volatils par fluide supercritique et d'obtenir de très bons résultats. Il est possible qu'il y ait des pertes parmi les composés les plus volatils. Premièrement, aucun composé n'était demeuré dans la trappe cryogénique, démontrant leur facilité à être entraîné. Aussi, nous remarquons avec les trois terpènes recueillis que le taux de recouvrement augmente avec le point d'ébullition. Par exemple, le limonène ayant un recouvrement plus faible possède une plus grande volatilité.

Le barbotat situé après la trappe cryogénique trappe la grande majorité des composés extraits. Le CO₂ gazeux passant à travers les trappes (cryogénique et barbotat) possède un débit de 150 mL à 300 mL. Il existe un phénomène d'entraînement à la vapeur qui expulse les analytes volatils en dehors des trappes, provoquant un recouvrement inférieur à 100%.

Une teneur en modifiant un peu plus basse aurait été suffisante pour obtenir de bons taux de recouvrement car les composés volatils semblaient être

très bien extraits. Puisque le modifiant augmente la rapidité d'extraction et lessive les composés de la trappe vers le barbotat, le modifiant contribuait aux pertes dues à l'entraînement par le dioxyde de carbone gazeux.

5.7 Choix des conditions pour la séparation de composés allélopathiques par HPLC

La mise au point du système d'extraction se fait en évaluant les taux de recouvrement de composés connus ajoutés à la cartouche d'extraction contenant ou ne contenant pas de substrat. Le mélange témoin de composés allélopathiques est constitué en majorité d'acides carboxyliques, donc une phase mobile acidifiée s'avère nécessaire comme il s'agit d'une chromatographie liquide en phase inversée. Un gradient d'acétonitrile permet une bonne séparation sur une phase non polaire C18. Le pH influence la forme chimique de certains composés.

Quelques essais démontrent qu'un pH d'environ 3 permet d'obtenir une bonne résolution, une bonne forme de pic et une bonne sensibilité. Des exemples de chromatogrammes sont présentés sur la figure 19. Les interactions des composés sur la phase stationnaire en fonction du pH sont observés à l'aide de leur efficacité donc relatif à la résolution (Tableau XVI).

On peut observer la largeur beaucoup plus grande de certains pics chromatographiques (Figure 21) à pH 6. La phase mobile à ce pH permet aux acides carboxyliques de demeurer dans un état d'équilibre entre leurs formes moléculaire et ionique. Cet équilibre varie selon le pKa de chaque acide et provoque une dispersion des composés dans la colonne chromatographique. Un pH plus acide (≈ 3) de la phase mobile permet de garder les composés à caractère acide sous leur forme moléculaire et, ainsi, de diminuer la dispersion sur la phase stationnaire, ce qui améliore la résolution et la sensibilité.

Tableau XVI: Efficacité théorique, N, de composés allélopathiques à différents pH

	Efficacité, N (plateaux théoriques)			
	pH : 6.00	pH :3.4	pH : 3.2	pH : 2.8
Ac. p-hydroxy-benzoïque	79	1 180	2 230	2 170
Ac. Vannillique	192	1 970	4 030	7 710
Caféine	1 020	10 400	10 400	10 300
Ac. Coumarique	1 630	13 900	13 900	21 000
Ac. Férulique	3 850	22 600	22 500	40 100
Umbelliférone	9 750	23 700	23 700	42 500
Phlorhizine	44 000	107 000	290 000	107 000
Ac. Cinnamique	1 120	30 500	54 900	127 000

5.7.1 Effet de la température de la colonne sur le profil chromatographique

La température de la colonne constitue un facteur souvent négligé en HPLC. Pourtant, les propriétés de la phase mobile peuvent varier considérablement sur un petit intervalle de température. Aussi, les différents équilibres pouvant se produire dans la colonne chromatographique sont affectés par la température. Par exemple, la vitesse de l'équilibre du transfert de masse d'un analyte entre la phase stationnaire et la phase mobile est plus rapide à haute température. Ainsi, il est possible de changer le profil chromatographique à l'aide de la température.

Lorsque des analyses chromatographiques sont effectuées à l'échelle de plusieurs heures ou jours, des changements de température ambiante peuvent provoquer la co-élution de composés initialement bien résolus (Figure 20).

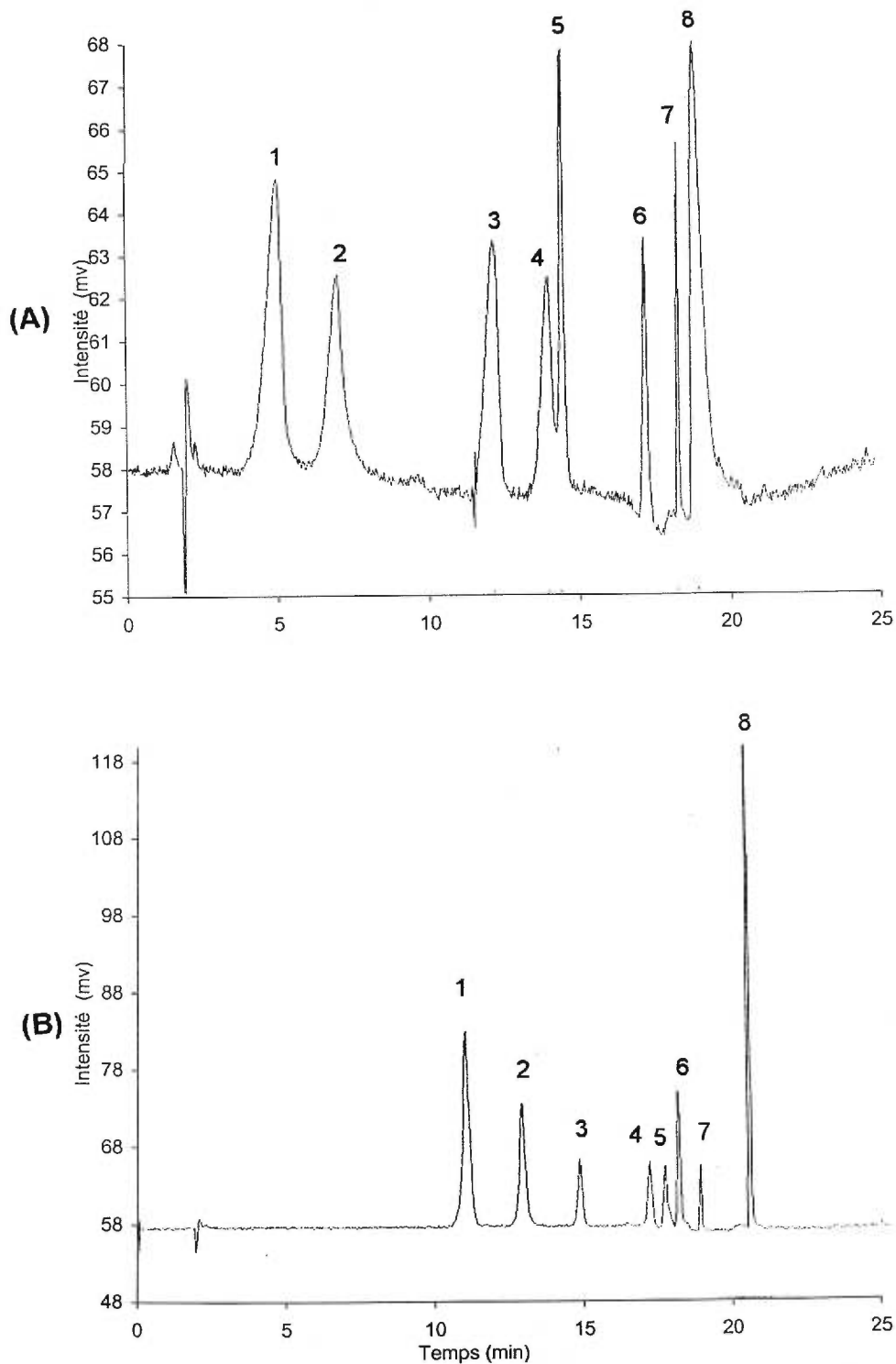


Figure 19: Profil chromatographique de composés allélopathiques à 254nm, (A): pH 6 ;(B): pH 3.2. Conditions: Acétonitrile/Eau Tampon, 5% ACN → 1min, à 20%ACN en 15 min, à 100%ACN en 8 min. Boucle d'injection 5 μ L, Colonne : C18 ODS-2 4,6 mm \times 12,5 cm, (\approx 30 $^{\circ}$ C) 1. ac.p-hydroxybenz., 2. ac. vanill., 3. caféine, 4. ac. coum., 5. ac. férul., 6. umbelli., 7. phlorhizine, 8. ac. cinnam.

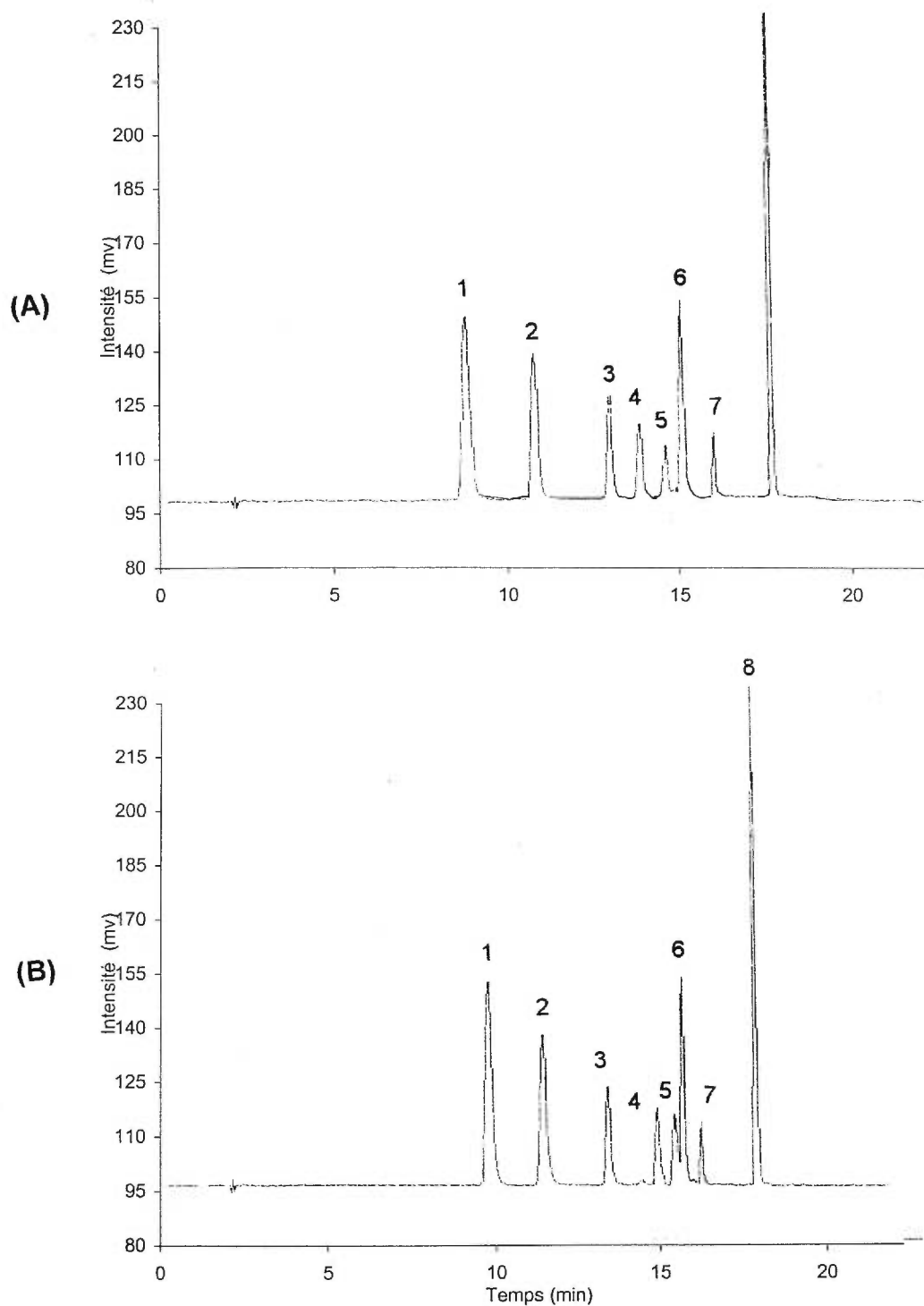


Figure 20: Chromatogrammes démontrant l'effet de la température de la colonne sur la séparation de composés allélopatiques (254nm), (A): 34°C ; (B): 26°C. Conditions: Acétonitrile/Eau Tampon, 5% ACN → 1min, à 20%ACN en 15 min, à 100%ACN en 8 min. Boucle d'injection 5 µL, Colonne : C18 ODS-2 4,6 mm×12,5 cm, (pH 3) 1. ac.p-hydroxybenz., 2. ac. vanil., 3. caféine, 4. ac. coum., 5. ac. férul., 6. umbelli., 7. phlorhizine, 8. ac. cinnam.

5.8 Identification de composés potentiellement allélopathiques

L'étape d'identification de composés à caractère allélopathique consistait à extraire ces composés^(4,90) de quelques échantillons de terre provenant d'un site où il se trouvait une densité importante de l'arbuste étudié *Kalmia angustifolia*. Par la suite, ces extraits étaient analysés par HPLC/UV, SFC/MS et GC/MS.

5.8.1 Procédure d'extraction par fluide supercritique

Les extraits de terre étaient décongelés et séchés à l'étuve pendant 12 heures à 100°C, puis broyés de façon à obtenir une bonne homogénéisation. Environ 1 g de terre était déposé dans la cartouche d'extraction, et 250 µL de méthanol étaient ajoutés directement à la terre. Par la suite, les composés étaient extraits avec le dioxyde de carbone contenant 10% de méthanol (ajout de méthanol dans la pompe), pendant 60 minutes. Les conditions d'extraction étaient les suivantes: pression de 4000 psi, cartouche d'extraction à 80°C et restricteur à 130°C. Les composés extraits de la terre étaient trappés en partie sur la laine de verre et dans le barbotat. Puis les deux fractions étaient rassemblées, et une partie du solvant était évaporée de manière à concentrer les composés pour donner l'extrait de terre.

5.8.2 Analyse d'extrait de terre par HPLC/UV et SFC/MS

Dans un premier temps, les échantillons étaient analysés par HPLC/UV. Le profil chromatographique d'un extrait de terre démontre plusieurs pics mais de faible d'intensité (Figure 21). Par contre, on y retrouve deux pics dont les temps de rétention correspondent à ceux de standards. En effet, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide cinnamique possèdent des temps de rétention respectifs de 12.2 min et 22.8 min. Cette concordance des temps de rétention

permet d'affirmer la présence possible de ces composés. Afin de confirmer la présence de l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide cinnamique, plusieurs analyses chromatographiques du même extrait ont été effectuées dans les mêmes conditions, et deux fractions d'éluant correspondant à ces temps de rétention ont été récupérées.

Ces deux fractions d'éluant contenant possiblement les composés ont été soumises à une évaporation afin d'éliminer le solvant chromatographique. Ensuite, elles ont été solubilisées dans une faible quantité de méthanol et analysées par chromatographie en phase supercritique, SFC. Une seule fraction avait une concentration suffisante pour permettre, à l'aide d'un spectre de masse, l'identification d'un composé; soit la fraction dont le temps de rétention correspondait au pic à 22.8 minutes (Figure 22).

Le spectre de masse présenté sur la Figure 22 a été obtenu à l'aide de l'appareil Trio-1 munit d'une source de type CI. Les conditions d'ionisation correspondent à un mélange de CI, d'échange de charges et de EI. Nous pouvons observer la présence du pic de l'ion moléculaire à m/z 148. Les pics du solvant (méthanol), sont visibles à 64 et 65 m/z . Le pic à m/z 71 correspond au fragment $[\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}]^+$. Nous pouvons prétendre qu'il un composé avec le même temps de rétention et la même masse moléculaire que l'acide cinnamique dans l'extrait de terre. Puisque la présence de l'acide cinnamique dans la terre est connu, nous pouvons prétendre que ce pic est probablement l'acide cinnamique. La présence de l'acide p-hydroxybenzoïque ne peut être présumée que par la correspondance des temps de rétention de l'extrait et du standard. Comme mentionné plus haut, nous n'avons pu obtenir le spectre de masse du pic à 12.2 minutes puisque la concentration de la fraction était inférieure à la limite de détection.

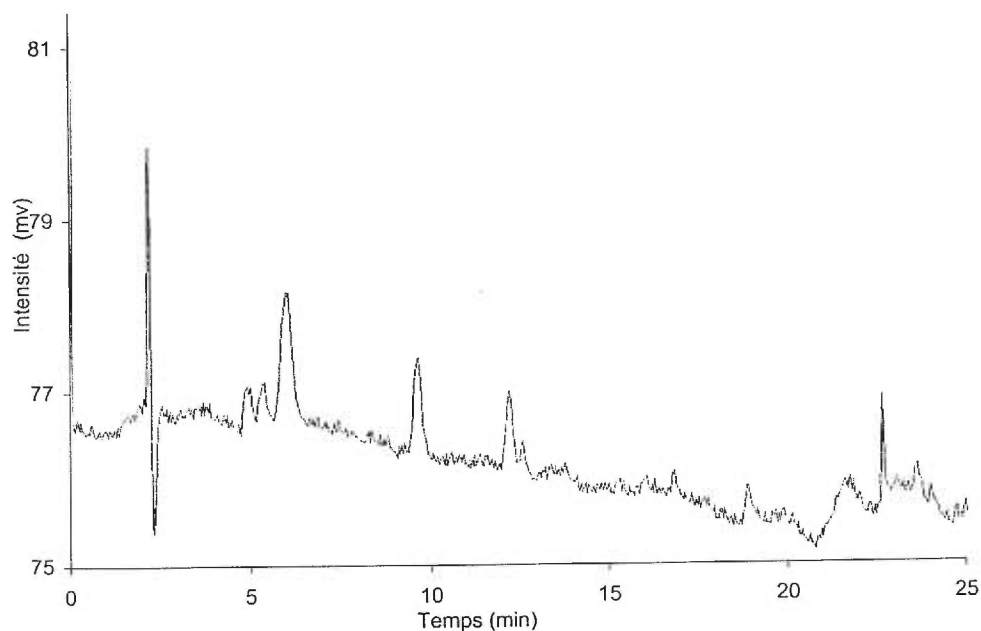


Figure 21: Profil chromatographique, généré par un extrait de terre, avec HPLC UV (254 nm), Conditions: Acétonitrile / Eau Tampon pH 3.0, 5% ACN pendant 1 min, à 20%ACN en 15 min, à 100%ACN en 8 min. Boucle d'injection 5 μ L, Colonne : C18 ODS-2 4,6 mm \times 12,5 cm

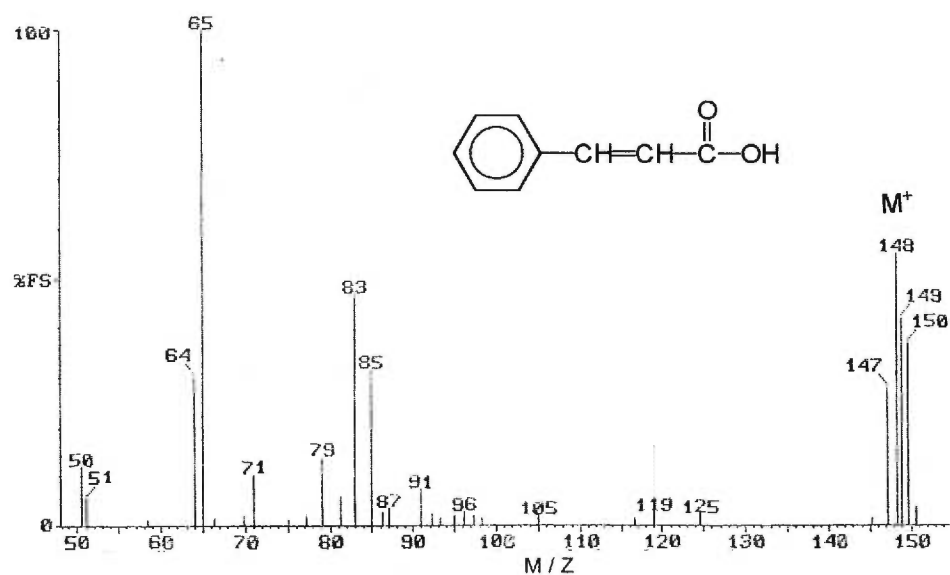


Figure 22: Spectre de masse obtenu pour la fraction correspondant au pic chromatographique au temps de rétention 22.8 minutes à la figure 21

5.8.3 Composés extraits de la terre et potentiellement allélopathiques

Les composés organiques, incluant les composés allélopathiques, contenus dans la terre s'y retrouvent en très faible concentration. Or, le système de chromatographie en phase supercritique couplé au spectromètre de masse, ne permet pas, pour l'instant, d'abaisser la limite de détection davantage afin d'obtenir des spectres de masses des composés étudiés. L'obtention du spectre de masses de l'acide cinnamique (Figure 22), constitue toutefois un résultat préliminaire encourageant pour le développement et le perfectionnement des couplages SFC/MS.

Le même extrait de terre obtenu à la section 5.8.1 a été ensuite analysé par GC/MS en mode EI. Certains pics chromatographiques ont révélé la présence de composés ou de dérivés de composés reconnus comme allélopathiques. Sur la base de ces résultats encourageants, nous avons poursuivi la caractérisation des composés potentiellement allélopathiques à l'aide de la GC/MS. Même avec cette technique, l'intensité des pics chromatographiques obtenus avec l'extrait de terre était très faible. Par contre, il a été possible de déceler deux composés correspondant aux standards utilisés pour l'optimisation du SFE. D'après, les spectres de masse démontrés aux figures 23 et 24, l'acide cinnamique déjà identifié par SFC/MS dans la section précédente et l'acide vanillique sont présents dans l'extrait de terre.

Ce même extrait de terre contenait deux autres composés. Ces derniers n'ont pas été homologués dans la liste des composés allélopathiques. Toutefois, leurs structures moléculaires s'apparentent beaucoup aux composés allélopathiques. En effet, le dihydroxy-2,4 méthyl-6 benzoate de méthyle, dont le spectre de masse est présenté à la figure 25, est un dérivé de l'acide benzoïque. D'après Macias⁹¹, les dérivés de l'acide benzoïque seraient potentiellement allélopathiques. Le second composé fait partie de la famille chimique des aldéhydes. Le spectre de masse de ce composé (Figure 26) correspond à l'hydroxy-4 méthoxy-3 benzèncarboxaldéhyde. Mandava⁹² a présenté un

composé allélopathique analogue, soit l'acétyl-3 méthoxy-6 benzèncarboxaldéhyde.

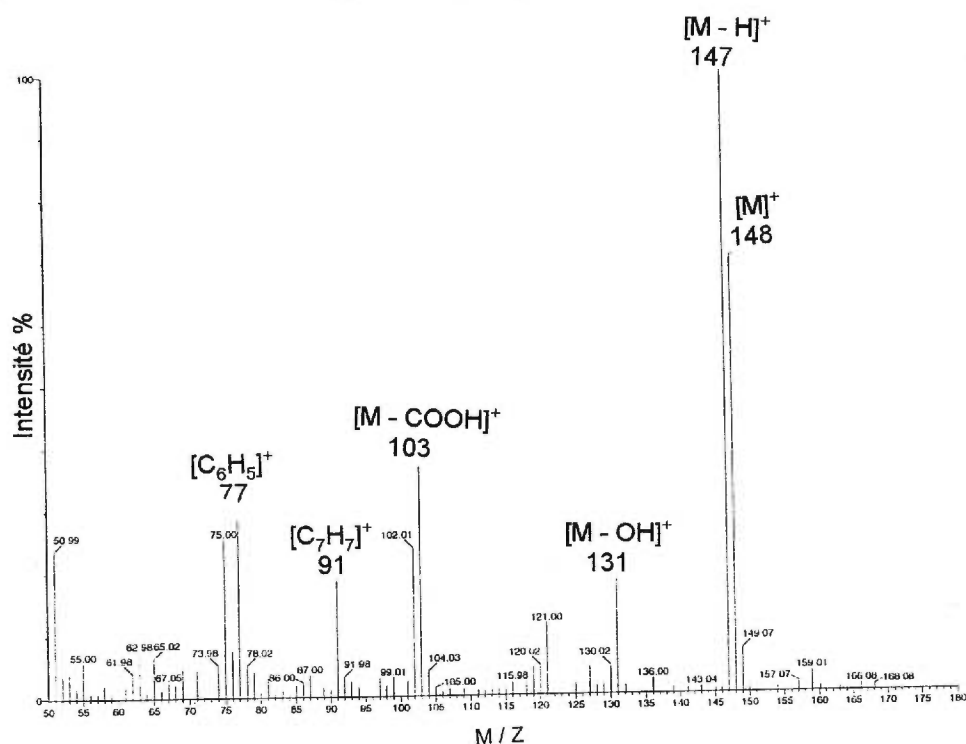


Figure 25: Spectre de masse de l'acide cinnamique provenant de l'extrait de terre (section 5.8.1) et obtenu par GC/MS

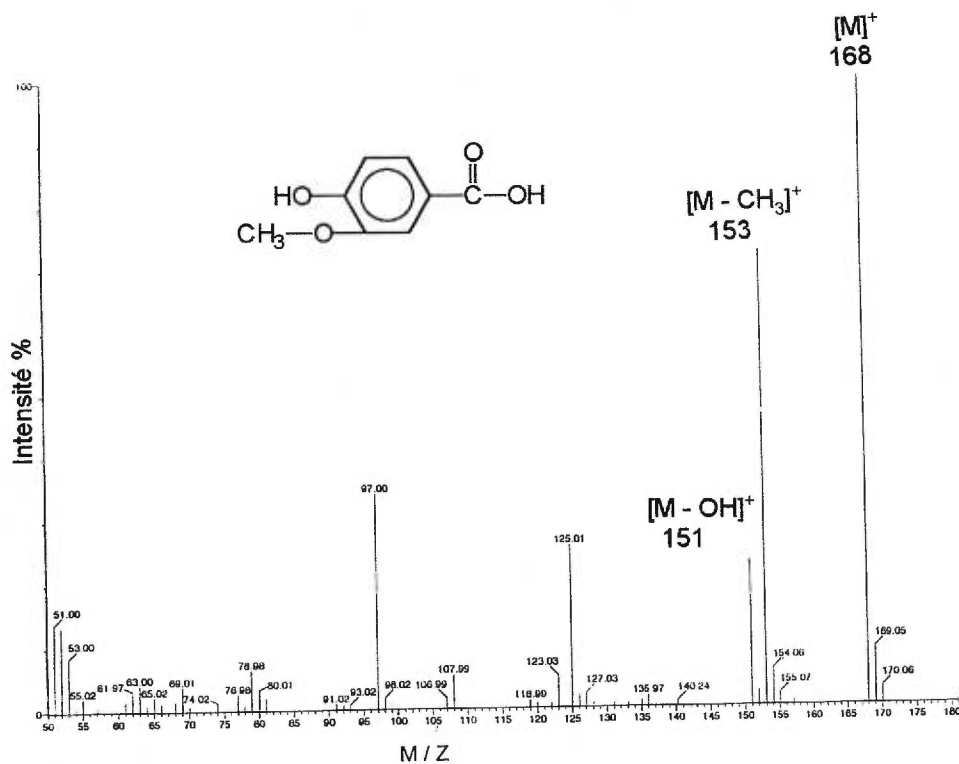


Figure 24: Spectre de masse de l'acide vanillique provenant de l'extrait de terre (section 5.8.1) et obtenu par GC/MS

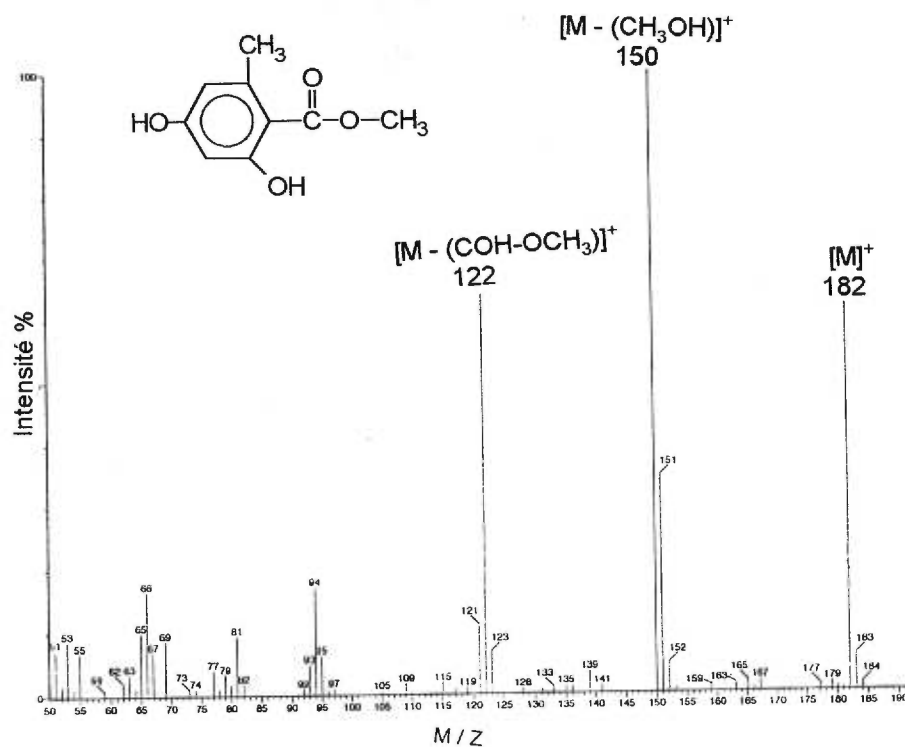


Figure 25: Spectre de masse du dihydroxy-2,4 méthyl-6 benzoate de méthyle provenant de l'extrait de terre (section 5.8.1) et obtenu par GC/MS

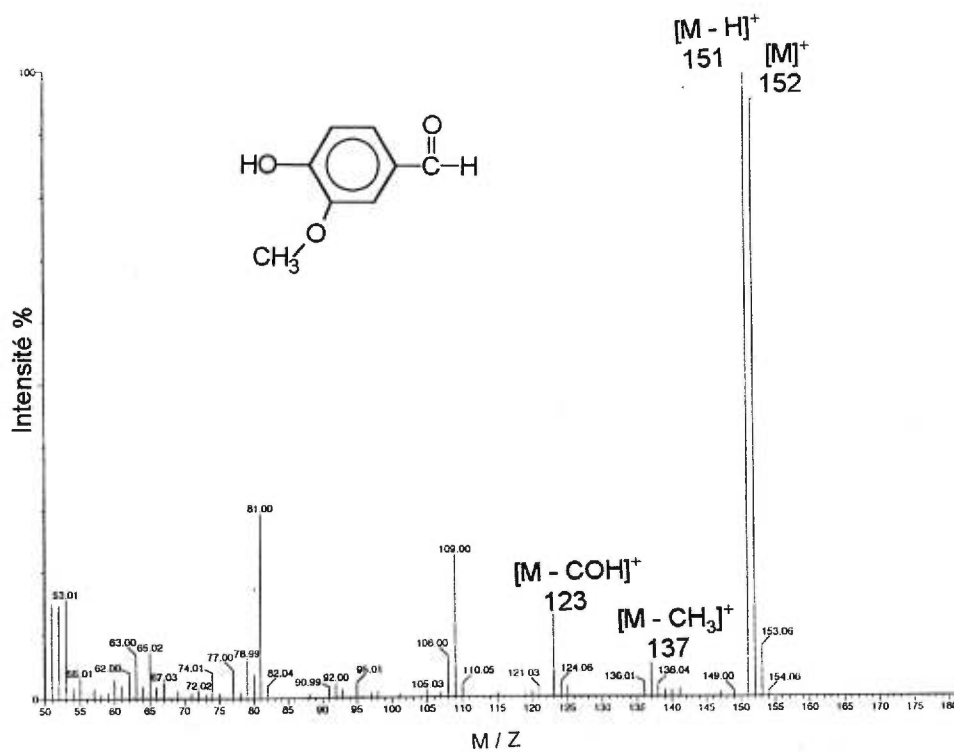


Figure 26: Spectre de masse de l'hydroxy-4, méthoxy-3, benzène-carboxaldéhyde provenant de l'extrait de terre (section 5.8.1) et obtenu par GC/MS

5.9 Conclusion

L'extraction par fluide supercritique ne dépend pas spécifiquement de quelques paramètres comme le choix du solvant et la durée d'extraction. En plus de l'élaboration d'une méthode, il a fallu mettre au point un système d'extraction. La SFE est une technique récente qui demande quelques ajustements, surtout lorsque l'appareil est fabriqué au laboratoire. Ce chapitre a démontré qu'il est possible d'extraire, avec de bons rendements, certaines substances organiques incluant des composés allélopathiques.

Dans la littérature, les premiers systèmes d'extraction par fluide supercritique employaient le principe du barbotage dans un solvant organique comme procédure de recueillement des composés extraits. Par la suite, l'apparition des systèmes de trappage cryogénique, avec ou sans adsorbant solide, a démontré une supériorité en ce qui concerne les possibilités et la qualité des résultats. Mais il a été clairement démontré dans ce chapitre que nous ne pouvions utiliser qu'un seul de ces systèmes de trappage, et ce, dû à la présence de composés non volatils. La combinaison de deux systèmes de trappages (trappe cryogénique et barbotat) a permis d'obtenir de bons taux de recouvrements et une meilleure reproductibilité. Bien que l'ajout du barbotat complique légèrement le système d'extraction, rien n'indique que l'extraction par fluide supercritique se doive être simple pour être plus performante que les autres techniques d'extraction conventionnelles.

En utilisant un modifiant, la presque totalité des analytes extraits se retrouve dans le barbotat dû à l'entraînement par le modifiant. La trappe sert presque uniquement de zone intermédiaire entre la zone chauffée et le barbotat. En utilisant une trappe ayant un volume plus grand, il est probable que la quantité d'analytes recueillie sur l'adsorbant solide serait supérieure. Toutefois, le volume de solvant nécessaire pour désorber les analytes devrait être augmenté.

Nous constatons qu'il y a moins de blocage en chauffant le restricteur, bien

que ce dernier ait toujours une tendance à bloquer à long terme lorsque la terre est la matrice analysée. En lavant le système après chaque extraction, nous n'avons pas observé de quantité importante d'analytes dans les solvants de lavage. Les solvants de lavage étaient analysés de la même façon que les composés allélopathiques ciblés, c'est-à-dire par HPLC/UV. Il est possible que des sels et de nombreux autres composés organiques présents en trace, donc non perceptibles par la technique analytique utilisée, s'accumulaient sur les parois internes du restricteur et provoquaient un blocage partiel ou total.

Nous ne pouvons affirmer que les composés allélopathiques trouvés dans la présente recherche proviennent du *Kalmia angustifolia*, puisque nous avons étudié la terre autour de l'arbuste en question. Il faudrait donc appliquer la SFE et les autres techniques analytiques utilisées dans cette recherche à l'analyse de la plante afin de confirmer la provenance de ces composés.

Chapitre 6

COUPLAGE DE LA SFC À UN SPECTROMÈTRE DE MASSE

La spectrométrie de masse est une technique analytique permettant l'identification de composés inconnus et la quantification de composés ciblés. Elle constitue donc une technique intéressante dans la recherche de composés allélopathiques.

Ce chapitre a pour but de démontrer qu'il est possible de coupler divers types de spectromètres de masse à un système de chromatographie en phase supercritique. En effet, des expériences préliminaires de couplage ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre à secteurs et d'un spectromètre quadropolaire. Leurs potentiels de détection chromatographique ont été comparés.

6.1 Instrumentation

6.1.1 Spectromètres de masse

Un appareil à secteur, MS-9 de Kratos, muni d'une source à décharge électroluminescente (GD) modifiée⁹³ a été utilisé. Par la suite, des essais ont été effectués à l'aide d'un spectromètre quadropolaire, soit un Trio-1 de VG, muni d'une source à ionisation chimique.

6.1.2 Interface

Peu importe le spectromètre utilisé, il fallait avoir recours à une interface permettant d'unir le spectromètre de masse au système de chromatographie en phase supercritique. Nous avons mis au point une interface de type DFI (direct

fluid introduction) (Figure 27), compatible avec le Trio-1 et le MS-9. Le principe de la source d'ionisation du MS-9⁹³ étant une décharge entre deux électrodes, l'extrémité de l'interface servait de cathode. Pour assurer la tension, une union en acier inoxydable servait de cathode et, par le fait même, de connexion entre la colonne capillaire et le restricteur. Le tout était disposé dans un tube de céramique jouant le rôle d'isolant, placé lui-même dans un tube d'acier inoxydable poli pour faciliter le glissement lors de l'insertion dans la source, et permettant une bonne étanchéité. Pour le Trio-1, la même interface était employée sans toutefois utiliser la haute tension nécessaire à la décharge.

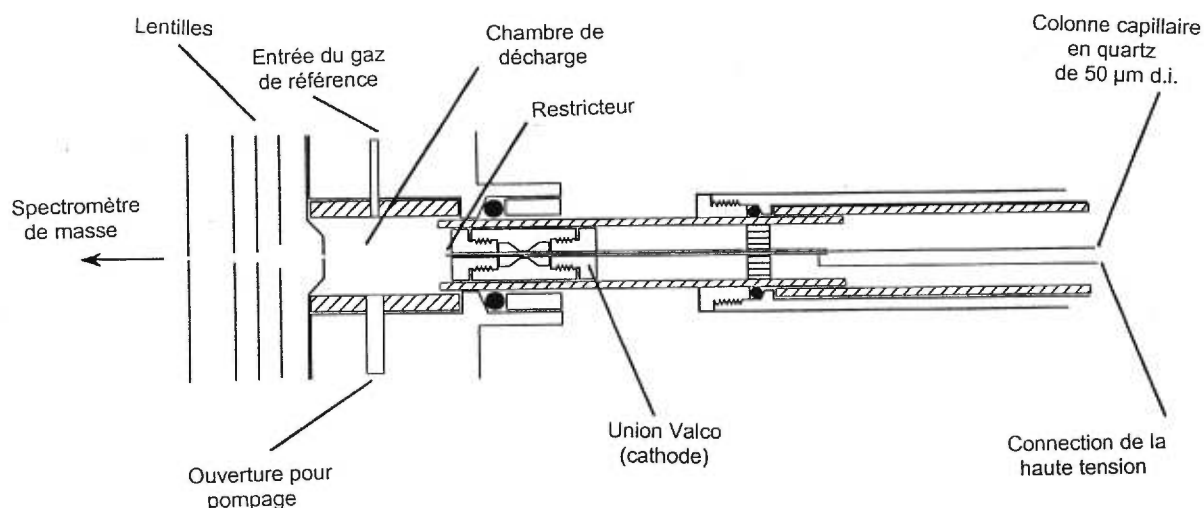


Figure 27: Schéma de l'interface et de la source pour la SFC/GD/MS

6.1.3 Restricteur et colonne

Avec les deux spectromètres de masses, le chauffage du restricteur était assuré par le chauffage de la source. Le restricteur consistait en un bout d'aiguille de seringue, utilisé en chromatographie en phase gazeuse. Il était d'une longueur de un cm et l'extrémité, servant de restriction, a été écrasé afin d'obtenir un débit

gazeux d'environ 1 mL/min aux pressions d'analyse. Le restricteur était joint à la colonne chromatographique par une union en acier inoxydable (Figure 27) ne comportant pas de volume mort.

La colonne capillaire (10 m × 50 µm dia. interne) utilisée possédait un volume d'environ 20 µL. Ainsi, le moindre volume mort affectait la résolution et la sensibilité. Le faible diamètre interne de la colonne permettait d'atteindre les conditions optimales de la colonne et ce, pour un débit compatible avec les spectromètres de masse (environ 1-2 mL/min de CO₂ gazeux). En effet, les spectromètres de masse n'étaient pas dotés de système de pompage pour de grandes quantités de matière. L'ajout de "split" après la colonne chromatographique aurait compliqué l'interface pour quelques essais.

6.1.4 Chauffage du restricteur

L'expansion adiabatique du fluide supercritique à l'extrémité du restricteur provoque une baisse importante de température. Ce phénomène causait la solidification du dioxyde de carbone, donc le blocage du restricteur même s'il n'y avait aucun analyte dans le restricteur. Nous avons obtenu un spectre de masse du dioxyde de carbone (Figure 28) dans une source à environ 50°C. Nous avons observé des agglomérats de CO₂ d'un m/z de 132, 176, 220, 264, 308, 352, 396, 440 et 484, ce qui correspond à [(CO₂)_n]⁺ où n = 3,4,5,6,7,8,9,10 et 11. Les conditions d'obtention d'un tel spectre sont difficilement reproductibles puisqu'elles précèdent le blocage total du restricteur. Afin d'éviter l'arrêt du débit, le restricteur était chauffé indirectement par le biais de la source à environ 200°C. Lors de cet essai, les masses de 90 à 600 Da étaient observées. En deçà de 90 Da, on retrouve les masses 44 et 88 qui correspondent respectivement à [CO₂]⁺ et [(CO₂)₂]⁺ (Figure 30-A).

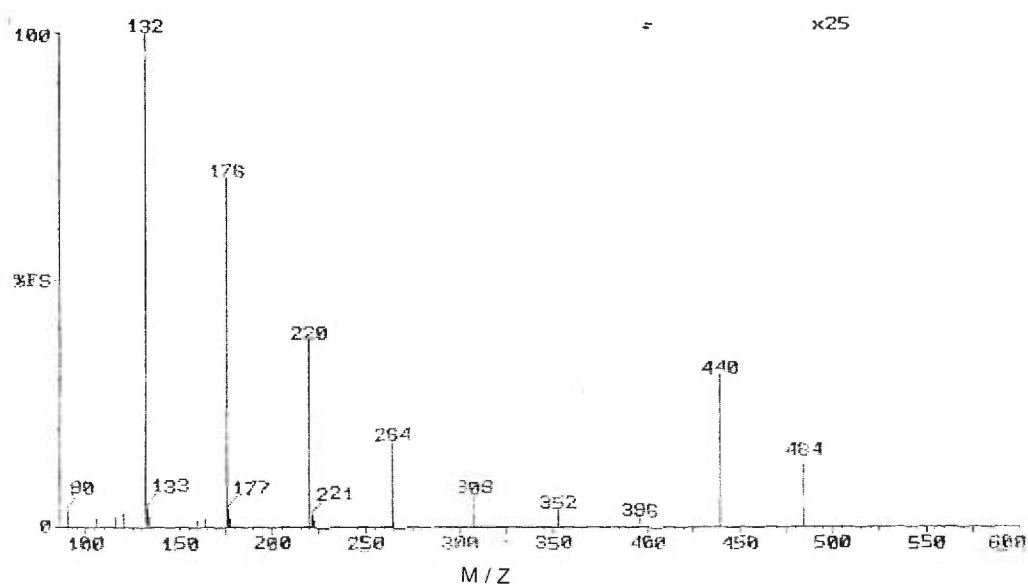


Figure 28: Spectre de masse démontrant des agglomérats de molécules de dioxyde de carbone

6.2 Conditions particulières des spectromètres de masse

La source à décharge électroluminescente du MS-9 opère généralement dans des conditions de pressions modérées, soit environ 1×10^{-4} mbar. Une pression trop élevée dans la source empêche cette dernière de fonctionner convenablement dû à un courant excessif. Pour sa part, une pression trop basse entraîne une trop grande résistance pour amorcer et soutenir une décharge électrique. Ainsi, les conditions chromatographiques étaient limitées par la capacité de pompage de la source. Aussi, le MS-9 étant un appareil à secteurs, la vitesse de balayage de l'analyseur était trop lente pour répondre convenablement à une analyse chromatographique.

La source CI du Trio-1 offrait moins de limitation de pression, puisqu'un abaissement de pression ne nuit pas au fonctionnement de la source, malgré une perte de sensibilité. En effet, une pression trop basse réduit la quantité de collisions responsable de l'ionisation. Le Trio-1 est également limité par sa capacité de pompage. Ainsi, une pression trop élevée empêche le fonctionnement de l'appareil.

En SFC, il est nécessaire d'effectuer un gradient de pression (densité) lorsque plusieurs composés doivent être séparés. Par contre, un tel gradient de pression provoquait une plus grande pression dans la source et changeait les conditions d'ionisation.

6.3 Ionisation en présence de dioxyde de carbone

Avec l'ionisation par décharge électroluminescente (GD), de nombreuses réactions sont en compétition (EI, CE, Penning)⁹⁴. Ainsi, les spectres de masse obtenus sont caractéristiques de plusieurs types d'ionisation. Par contre, le dioxyde de carbone donne principalement lieu à des échanges de charge^{95,96}.

Avec une source CI (Trio-1), les mécanismes d'ionisation ne sont pas très bien précisés, mais il semble qu'un mélange de EI et de transfert de charge⁸³ en soient responsables. Par contre, l'ajout de modifiant (méthanol) dans la phase mobile initie le transfert de proton, donnant ainsi un spectre de type CI.

6.4 SFC/GD/MS (appareil à secteurs)

Nous avons effectué quelques tests dans le but d'étudier le comportement du SFC couplé à un spectromètre de masse à secteur muni d'une source GD. Ces essais ont démontré qu'il est possible d'analyser différents composés par SFC/MS. Les composés choisis peuvent être difficilement analysés en GC/MS et HPLC/UV. Quelques nanogrammes de captafol, d'estrone et de vitamine K ont démontré une bonne sensibilité et n'ont révélé aucun signe de décomposition sur la colonne. Pour ces analyses, la température de la colonne et du restricteur étaient respectivement de 50°C et 200°C. La pression se situait à environ 2000 psi. L'utilisation de modifiant pour les molécules de hautes masses moléculaires est souvent nécessaire, mais la vitamine K, qui possède une masse moléculaire

de 450, a été très bien éluée dans les conditions énoncées. Les spectres de masse de ces composés sont présentés sur la figure 31.

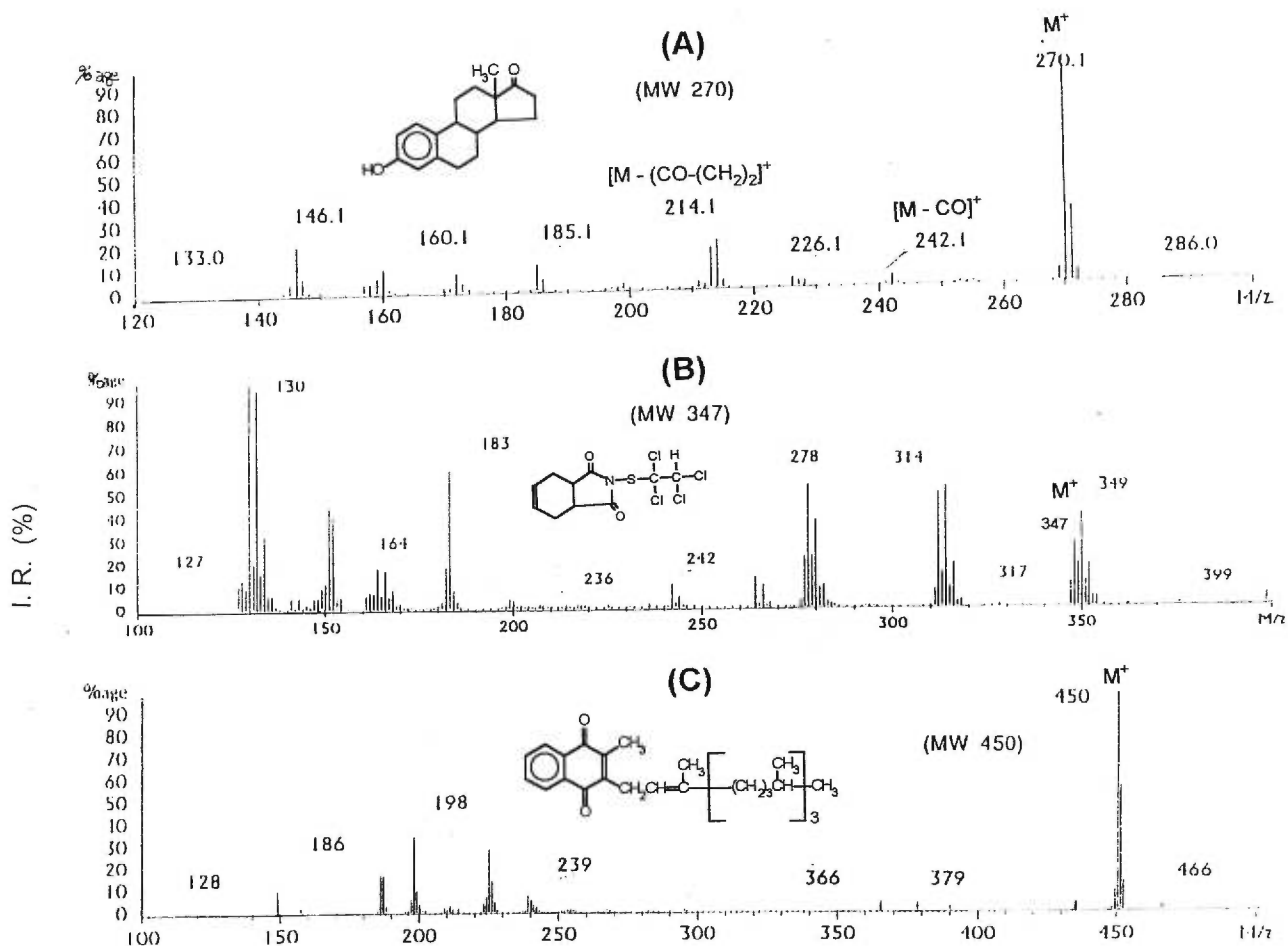


Figure 30: Spectres de masse obtenus par SFC/GD/MS; A: Estrone; B: Captafol; C: Vitamine K

Dans le spectre de masse de l'estrone (Figure 29 A), le pic à m/z = 270 est celui de l'ion moléculaire. Dans ce spectre, nous pouvons observer un pic à m/z = 242 qui correspond à l'ion moléculaire résultant de la perte du groupement C=O après l'ouverture du cycle entre les carbones 13 et 17. Nous pouvons aussi observer un pic à m/z 214 qui correspond à la perte de CO-CH₂-CH₂, également après l'ouverture de ce cycle.

Le spectre de masse du captafol (Figure 29 B) contient également l'ion moléculaire à $m/z = 347$. Le pic à $m/z = 349$ est attribuable à la distribution isotopique ($M + 2$) d'une molécule contenant quatre atomes de chlore⁹⁷. Nous pouvons également observer les pertes d'atomes de chlore dans quelques fragments.

Le spectre de masse de la vitamine K (Figure 29 C) possède également le pic de l'ion moléculaire $m/z = 450$, et l'un des principaux fragments ($m/z = 225$) est attribuable à la perte du groupement $[(CH_2)_3-CHCH_3]_3-CH_3$.

6.5 SFC/MS (appareil quadrupolaire)

Le spectromètre de masse à analyseur quadrupolaire (Trio-1) a démontré une plus grande souplesse d'analyse lorsque utilisé comme détecteur chromatographique. En effet, sa plus grande vitesse de balayage permettait d'obtenir plusieurs points (lecture) par pic chromatographique. Un plus grand nombre de points par pic est important afin d'acquérir une meilleure sensibilité et un profil chromatographique plus reproductible. Ce spectromètre de masse se comporte mieux que le GD/MS lors de l'ajout de modifiant dans le fluide supercritique en ce qui concerne la pression dans la source.

La Figure 30 A présente le spectre de masse du bruit de fond du fluide supercritique (CO_2). Nous pouvons observer les principaux ions ($m/z = 44, 72$ et 88) représentant respectivement $[CO_2]^+$, $[(CO_2)_2-O]^+$ et $[CO_2]_2^+$. La Figure 30 B montre les spectres de masse du bruit de fond du fluide supercritique (CO_2) en présence de 3% de méthanol. Nous pouvons observer les principaux ions ($m/z = 33, 47, 65, 96$ et 97) qui traduisent respectivement la présence de $[CH_3OH+H]^+$, $[(CH_3OH)_2-H_2O]^+$, $[(CH_3OH)_2+H]^+$, $[CH_3OH]^+$ et $[(CH_3OH)_3+H]^+$. Par ailleurs, l'ajout de méthanol provoque la disparition des espèces ioniques dérivant du CO_2 . Toutefois, selon la disposition de la sonde dans la source et le débit du fluide supercritique, l'intensité relative des espèces ioniques variait. Ce

phénomène est attribuable principalement à un changement de pression dans la source.

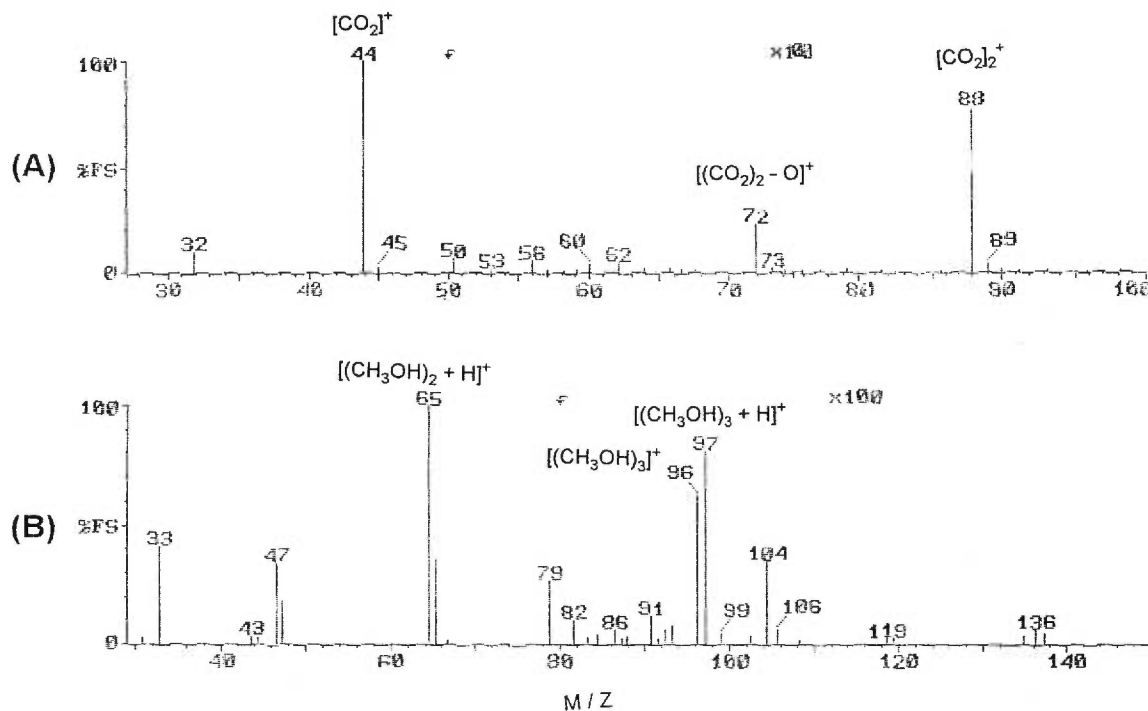


Figure 30: Spectres de masse du bruit de fond en SFC, (A): sans méthanol; (B): avec méthanol

6.5.1 Analyse de la caféine et de la vitamine K par SFC/MS

La caféine est un composé dont le potentiel allélopathique est reconnu⁹¹. Une solution standard de 100 µg/mL a été analysée par SFC/MS. La figure 31 présente un chromatogramme comportant deux pics, soit dans l'ordre, celui du solvant et celui de la caféine. La pression du fluide supercritique en tête de colonne se situait à 2200 psi et la température de la colonne à 50°C. Le spectre de masse de la caféine est présenté sur la figure 34. Nous pouvons observer les

pics de l'ion moléculaire et de l'ion moléculaire protoné à $m/z = 194$ et 195 respectivement, ainsi qu'un pic à $m/z = 165$ qui correspond à une perte de $N-CH_3$ suite à l'ouverture du cycle à 5. Le pic de base ($m/z = 109$) correspond à un réarrangement suite à la perte du cycle à 5 ($N=CH-N-CH_3$) et des 2 groupements méthyle sur le cycle à 6.

La figure 33 montre le spectre de masse de la vitamine K. Ce spectre est similaire à celui obtenu par SFC/GD/MS (Figure 29 C).

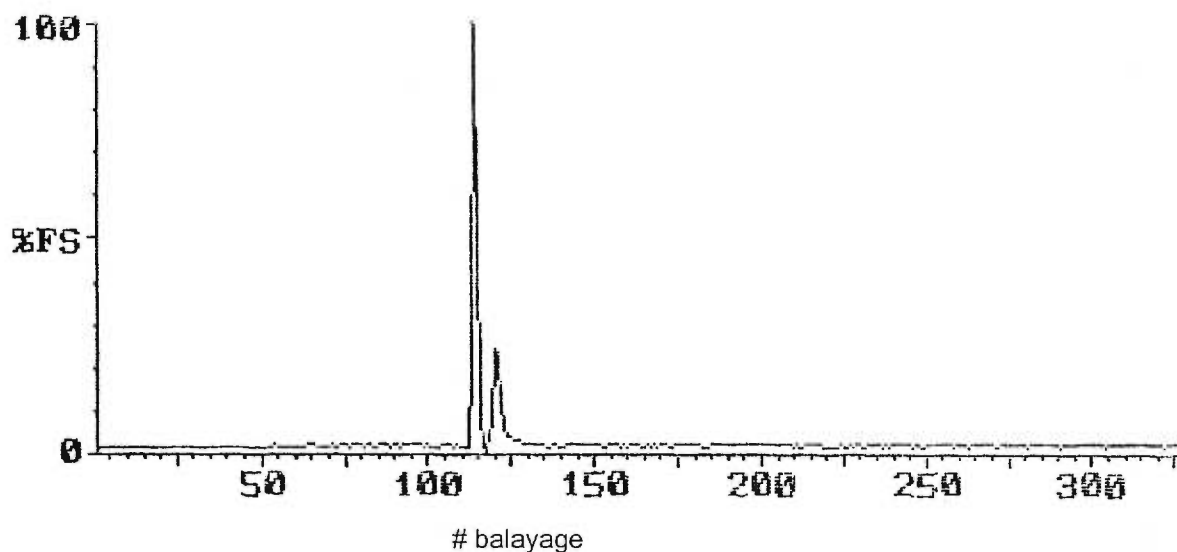


Figure 31: Profil chromatographique d'une solution de caféine en SFC/MS

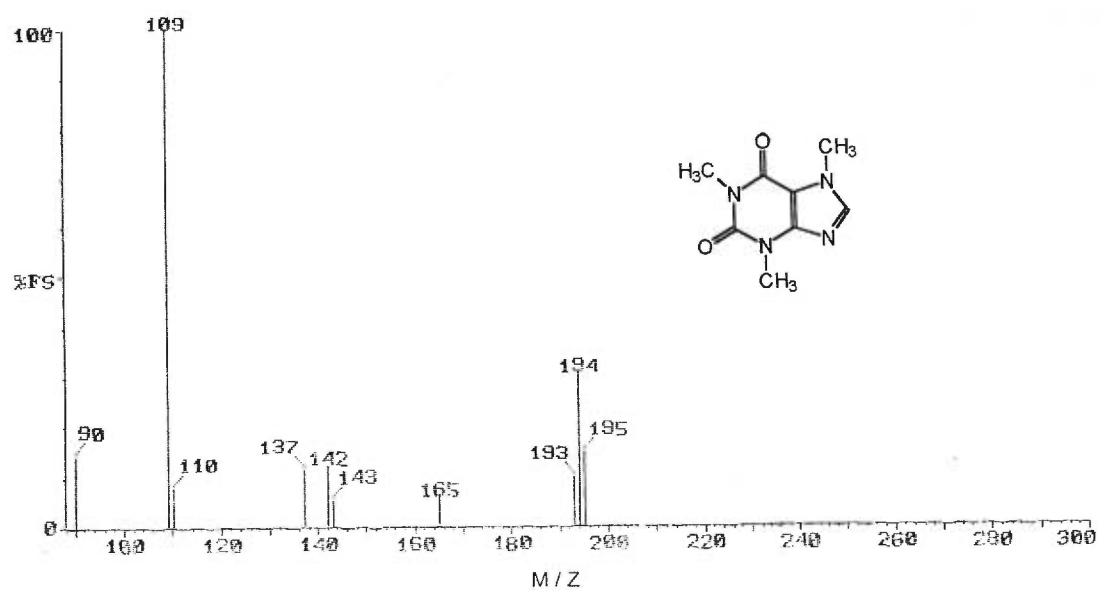


Figure 32: Spectre de masse de la caféine

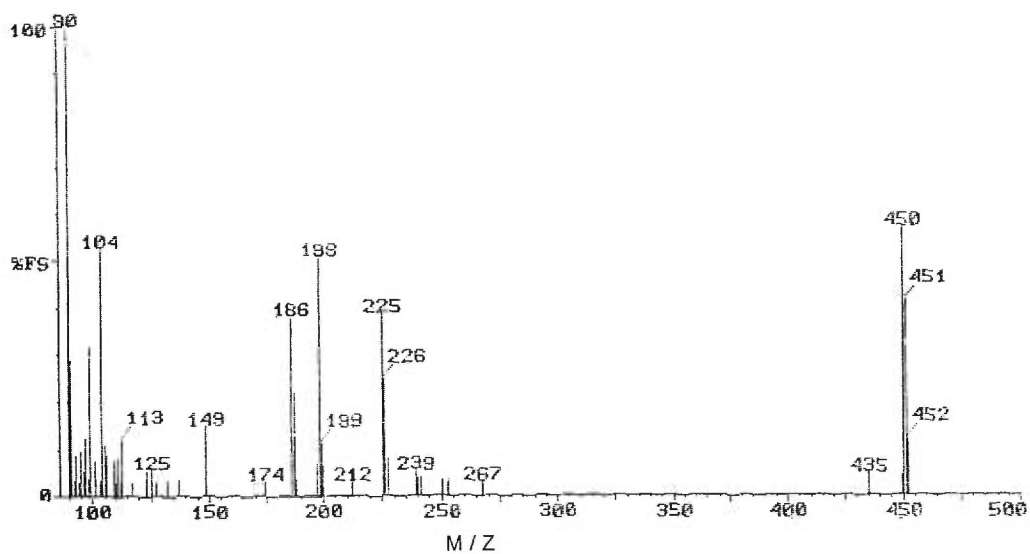


Figure 33: Spectre de masse de la vitamine K

6.6 Conclusion

Par des essais préliminaires, nous avons démontré que la SFC/MS peut être très utile à l'identification de composés organiques incluant les composés allélopathiques. La pression dans la source limite cependant la séparation des analytes en raison de la faible capacité de pompage des spectromètres de masse utilisés.

Le spectromètre Trio-1, qui est muni d'un analyseur quadrupolaire, est plus approprié comme détecteur chromatographique grâce à sa grande vitesse de balayage. En effet, le temps nécessaire pour un balayage était d'environ une seconde. Pour sa part, le spectromètre MS-9 nécessitait 4 à 5 fois plus de temps pour balayer le même domaine de masse. Par conséquent, nous obtenions un plafond de quatre balayages par pic chromatographique, tandis que l'analyseur quadrupolaire nous permettait d'obtenir environ huit balayages par pic chromatographique selon la largeur du pic chromatographique.

L'amélioration du système de pompage des spectromètres de masse, ou bien l'adaptation d'un système de "split" non discriminatoire dont la fabrication serait reproductible (même ratio), permettrait d'effectuer des chromatographies avec gradient de pression. Par conséquent, la séparation de plusieurs composés serait favorisée. Par ailleurs, une meilleure optimisation du système SFC/MS permettrait le couplage de ce système avec la SFE. Le système analytique global, SFE/SFC/MS, bien que complexe, offrirait la possibilité de diminuer la limite de détection et la sensibilité. Comparativement à un système "off-line", qui implique plus de manipulations, un tel système constituerait un atout dans la recherche de composés allélopathiques contenu en trace dans la terre.

Chapitre 7

CONCLUSION

Le but de notre travail était d'extraire et d'identifier des composés allélopathiques contenus dans la terre avoisinant les plantes responsables (*kalmia angustifolia*) de leur synthèse, et ce, à l'aide d'un système d'extraction par fluide supercritique (CO₂) et d'un chromatographe en fluide supercritique. Les propriétés du fluide supercritique (diffusion, densité, viscosité, etc.) lui confèrent un très bon pouvoir solvatant, ce qui s'est traduit par des hauts-taux de recouvrement obtenus lors de l'extraction des composés allélopathiques.

Nous avons observé, initialement, que l'extraction des terpènes sans matrice apportait de très bons résultats. Par contre, l'extraction des terpènes seuls représente nullement l'extraction de composés allélopathiques dans une matrice aussi complexe que la terre, et ce fait fut observé lors de l'ajout de la terre comme matrice. En effet, le système d'extraction par fluide supercritique, conçu d'après la plupart des systèmes SFE décrits dans la littérature, ne convenait pas à nos objectifs. En fait, la procédure de trappage (barbotage) limitait l'extraction. Afin d'améliorer le fonctionnement du système SFE, nous avons changé le barbotage par une trappe cryogénique. Ceci nous permettait, par le fait même, de chauffer le restricteur, de façon à éliminer le blocage dû à la cristallisation des composés. Désormais, le système SFE pouvait extraire les composés organiques quelles que soient leurs volatilités et ce, même dans la terre.

L'ajout de modifiant polaire était nécessaire pour palier à la propriété non polaire du dioxyde de carbone, puisque la plupart des composés allélopathiques étaient polaires. Mais la quantité de modifiant nécessaire provoquait l'entraînement des composés déjà trappés sur l'adsorbant solide à l'intérieur de

la trappe cryogénique. La diminution de la température de la trappe cryogénique était possible, mais elle occasionnait la solidification du modifiant dans la trappe, ce qui obstruait le débit de CO₂ et mettait fin à l'extraction. Afin de contrer les pertes dues au lessivage par le modifiant, une deuxième trappe a été ajoutée à la suite de la trappe cryogénique. En effet, un barbotat permettait de recueillir le modifiant et les analytes provenant de la trappe cryogénique. Suite à cette dernière modification du système SFE, nous avons obtenu de très bons taux de recouvrement lors de l'extraction des composés allélopathiques sélectionnés.

La désorption des analytes de la trappe cryogénique, par passage d'un solvant à travers cette trappe, s'est avéré très efficace. Ainsi, plus aucun analyte ne demeurait dans la trappe cryogénique. Une désorption complète améliore les taux de rendement.

Ce système d'extraction par fluide supercritique développé pour l'analyse de composés allélopathiques nécessiterait une dernière modification. En effet, la décomposition des composés très thermolabiles est présente et il serait essentiel d'éliminer cette lacune. Le restricteur doit être chauffé pour éviter un blocage. Ce chauffage, qui est plus élevé que celui dans la cartouche d'extraction, a un impact néfaste sur la phlorizine. Il y aurait donc une amélioration à apporter en ce qui concerne le chauffage du restricteur.

Selon les spectres de masses, la chromatographie en phase supercritique peut séparer différents composés organiques, incluant les composés allélopathiques. L'interface entre le système SFC et le spectromètre de masse est plus simple que celle impliquant un système HPLC/MS, puisqu'il y a vaporisation instantanée à la sortie du restricteur. Par ailleurs, nous avons constaté que le spectromètre quadropolaire était plus approprié comme détecteur chromatographique grâce à une vitesse de balayage plus rapide. Aussi, la capacité de pompage des spectromètres limitait le pouvoir de résolution en

empêchant l'exploitation de gradients de pression en SFC.

Les composés organiques identifiés dans les sols examinés, que se soit l'acide vanillique, l'acide cinnamique ou l'acide p-hydroxybenzoïque, ne peuvent être attribués de manière certaine à la *kalmia angustifolia*. Nous savions cependant que leur prélèvement avait été effectué au voisinage de cette plante. Tout au plus, nous pouvons conclure à la présence d'activité allélopathique dans les sols près de la *kalmia angustifolia*, car il s'agit de composés à caractère allélopathique bien connu. Afin de clarifier ce point, il faudrait exploiter la SFE et les autres techniques analytiques employées dans la présente étude, en vue de vérifier si ces composés sont présents dans les feuilles, les tiges ou les racines de la *kalmia angustifolia*, ou cultiver cette plante en serre et procéder à des analyses de la terre avoisinante.

Voyant que la SFE et la SFC présentent un excellent potentiel analytique face aux composés allélopathiques, il serait maintenant très intéressant de travailler sur les méthodes analytiques et non sur l'appareillage. Par exemple, il faudrait vérifier l'utilité de la lyophilisation de la terre au lieu du chauffage dans l'élimination de l'eau. L'optimisation de ces méthodes permettrait d'améliorer les rendements d'extractions en SFE et le pouvoir de séparation en SFC. La performance de ces techniques permet d'envisager l'application de ces systèmes à d'autres matrices et composés.

RÉFÉRENCES

- (1) E.L. Rice dans, " Allelochemicals: role in agriculture and forestry", Éd. G.R. Waller, American Chemical Society, Symposium series, Washington, (1987)
- (2) F.V. Bright et M. E. P. McNally, ACS Symposium Series, Washington, 266, (1992)
- (3) H. Daimon et Y. Hirata, J. High Resolut. Chromatogr., **17**, 809, (1994)
- (4) E.L. Rice, Allelopathy, Second edition, Academic Press inc., London, (1984)
- (5) A.Carrier et M.J. Bertrand, "Développement d'une méthodologie analytique pour l'étude des substances allélopathiques: Phase III", juin, (1993)
- (6) A.U. Mallik, "Possible role of allelopathy in growth inhibition of softwood seedling in Newfoundland", dans Allelopathy: Basic and applied aspects, Ed. S.J.H. Rizvi et V. Rizvi, Chapman and Hall, London, (1992)
- (7) E.B. Peterson, For. Sci., **11**, 473-479, (1965)
- (8) U. Blum, J. Chem. Ecol.,**18**, 2191-2221, (1992)
- (9) J.P. Guenier et J. Muller, Échantillonnage des polluants gazeux: Étude de l'adsorption sur charbon actif, Centre de recherche de l'INRS, (1981)
- (10) A.E. Smith, Intern. J. Anal. Chem., **46**, 111, (1991)
- (11) J.L. Guinamant, Préparation des échantillons: L'extraction en phase supercritique (SFE), Hewlett Packard
- (12) D.C. Whitehead, Nature, **202**, 417-418, (1964)
- (13) M. Hammon, F. Pellerin, M. Guernet et G. Mahuzier, 2^{ième} édition, Masson, Paris, (1990)
- (14) C.H. Tubbs, For. Sci., **19**, 139-145, (1973)
- (15) J. Bonner, Bot. Gaz., **107**, 343-351, (1946)
- (16) I. Scheunert, M. Mansour et F. Andreux, Intern. J. Anal. Chem., **46**, 189-199, (1991)
- (17) P.C. Head dans "Estuarine Chemistry" : Organic Processes in Estuaries, Ed. J.D. Burton and P.S. Liss, Academic Press, London, 53-91, (1976)
- (18) R. Lemlich, Ind. Eng. Chem., **60**, 16-29, (1968)

- (19) J.P. Guenier et P. Ferrari, Échantillonnage des polluants gazeux: Les badges, utilisation et comparaison avec les tubes à charbon actifs, Centre de recherche de l'INRS, (1981)
- (20) R.W. Vannoort, J.P. Chervet, H. Lingeman, G.J. De Jong et U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatog.*, **505**, 45-77, (1990)
- (21) P.W. Atkins, *Physical Chemistry*, 5^{ième} édition, W.H. Freeman and Company, New-York, (1994)
- (22) C.D. Bevan et P.S. Marshall, *Naturel Product Reports*, **11**, 451, (1994)
- (23) K.A. Larson et M.L. King, *Biotech. Prog.*, **2**, 73, (1986)
- (24) V.J. Krukonis, *Polymer News*, **11**, 7, (1985)
- (25) V. Lopez-Avila, N.S. Dodhiwala et W.F. Beckert, *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 468, (1990)
- (26) B. Murugaverl, A. Gharaibeh et K.J. Voorhees, *J. Chromatogr. A*, **657**, 223-226, (1993)
- (27) M.K.L. Bicking, *J. Chromatogr. Sci.*, **30**, 358, (1992)
- (28) T.S. Oostdyk, R.L. Grob, J.L. Snyder et M.E. McNally, *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 177, (1993)
- (29) J.S. HO, P.H. Tang, *J. Chromatogr. Sci.*, **30**, 344, (1992)
- (30) Uma T. Kumar, N.P. Vela, J.G. Dorsey et J.A. Caruso, *J. Chromatogr. A*, **665**, 340-345, (1993)
- (31) A. Meyer et W. Kleibohmer, *J. Chromatogr. A*, **657**, 327-335, (1993)
- (32) Hing-Biu Lee, T.E. Peart, R.L. Hong-You et D.R. Gere, *J. Chromatogr. A*, **653**, 83-91, (1993)
- (33) R. Alzaga et J.M. Bayona, *J. Chromatogr. A*, **655**, 51-56, (1993)
- (34) S.B. Hawthorne, J.J. Langenfeld, D.J. Miller et M.D. Burford, *Anal. Chem.*, **64**, 1614-1622, (1992)
- (35) V. Lopez-Avila, J. Benedicto, N.S. Dodhiwala, R. Young et W.F. Beckert, *J. Chromatogr. Sci.*, **30**, 335, (1992)
- (36) J.M. Levy, L.A. Dolata et R.M. Ravey, *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 349, (1993)
- (37) D. Thiebaut, J.-P. Chervet, R.W. Vannoort, G.J. Dejong, U.A.Th. Brinkman et R.W.Frei, *J. Chromatogr.*, **477**, 151, (1989)

- (38) K. G. Furton, C.W. Huang, R. Jaffé et M.A. Sicre, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **17**, 679, (1994)
- (39) A.E. Smith, *Intern. J. Anal. Chem.*, **46**, 111, (1991)
- (40) J.P. Alcantara-Licudine, Q.X. Li et M.K. Kawate, *J. Chromatogr. Sci.*, **34**, 238, (1996)
- (41) M. Richards et R.M. Campbell, *LC-GC*, **9**, 358, (1987)
- (42) Y.Koga, Y. Iwai, Y. Hata, M. Yamamoto, Y. Arai, *Fluid Phase Equilibria*, **15**, (1996)
- (43) Douglas E. Raynie et al., *J. Chromatogr. Sci.*, **32**, 298-300, (1994)
- (44) B.W. Wright, J.L. Fulton, A.J. Kopriva et R.D. Smith, *ACS*, (1988)
- (45) M. Ashraf-Khorassani, R.K. Houck et J. M. Levy, *J. Chromatogr. Sci.*, **30**, 361, (1992)
- (46) T.S. Oostdyk, R.L. Grob, J.L. Snyder et M.E. McNally, *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 177, (1993)
- (47) H. Engelhardt, A. Gross, R. Mertens et M. Petersen, *J. Chromatogr.*, **477**, 169, (1989)
- (48) F.V. Bright et M. E. P. McNally, *ACS Symposium Series*, Washington, 266, (1992)
- (49) N.L. Porter, A.F. Rynaski, E.R. Campbell, M. Saunders, B.E. Richter, J.T. Swanson, R.B. Nielsen et B.J. Murphy, *J. Chromatogr. Sci.*, **30**, 367, (1992)
- (50) R.M. Smith et M.D. Burford, *J. Chromatogr.*, **600**, 175, (1992)
- (51) J.M. Levy, L. Dolata, R.M. Ravey, E. Storzynsky et K.A. Holowczak, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **16**, 368, (1993)
- (52) Mark D. Burford, S.B. Hawthorne et D.J. Miller, *J. Chromatogr. A*, **657**, 413-427, (1993)
- (53) J. Vejrosta, A. Ansorgová, J. Planeta, D.G. Breen, K.D. Bartle et A. Clifford, *J. Chromatogr. A*, **683**, 407, (1994)
- (54) R. Hillmann et K. Bachmann, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **17**, 350-352, (1994)

- (55) K. Anton, N. Pericles et H.M Wildmer, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **12**, 394, (1989)
- (56) J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 31, (1993)
- (57) F. David et P. Sandra, *J. High Resolut. Chromatogr. & Chromatogr. Comm.*, **11**, 897, (1988)
- (58) N. Smart, Y. Lin et C.M. Wai, *LC-GC*, (1996)
- (59) R.T. Marentis dans "Supercritical Fluid Extraction and Chromatography", ACS Symposium Series 366, Éd. B.A. Charpentier et M.R. Sevenants, (1988)
- (60) M. Tournier et M. Servant, *Chimie 2, les équilibres de phases*, Centre Éducatif et Culturel inc., (1983)
- (61) R.E. Jentoft et T.H. Gouw, *Anal. Chem.*, **44**, 681,(1972)
- (62) S. Shah, M.Ashraf-Khorassani et L.T. Taylor, *J. Chromatogr*, **505**, 293, (1990)
- (63) K.E. Markides, S.M. Fields et M.L. Lee, *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 254, (1986)
- (64) R.D. Smith, J.L. Fulton, H.K. Jones, R.W. Gale et B.W. Wright, *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, pp.309-317, (1989)
- (65) T.L. Chester, J.D. Pinkston et D.E. Raynie, *Anal. Chem.*, **68**, 487R-514R, (1996)
- (66) M. Saito et Y. Yamauchi, *J. Chromatogr.*, **505**, 257, (1990)
- (67) R.D. Smith, B.W. Wright et H.T. Kalinoski, *Progress in HPLC*, **4**, 111, (1989)
- (68) K.D. Bartle dans *Supercritical Fluid Chromatography*, édité par R.M. Smith, The Royal Society of Chemistry, London, (1988)
- (69) D. Leyendecker dans *Supercritical Fluid Chromatography*, édité par R.M. Smith, The Royal Society of Chemistry, London, (1988)
- (70) D.Y. Shang, J.L. Grandmaison et S. Kaliaguine, *J. Chromatogr. A*, **672**, 185-201, (1994)
- (71) J.L. Bernal, M.J. del Nozal, H. Velasco et L. Toribio, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19**, 1579-1589, (1996)

- (72) A. Rouessac, *Analyse chimiques, Méthodes et techniques instrumentales modernes*, Masson, Paris, (1992)
- (73) C.H. Lochmüller et L.P. Mink, *J. Chromatogr.*, **505**, 119, (1990)
- (74) M.M. Sanagi et R.M. Smith dans *Supercritical Fluid Chromatography*, édité par R.M. Smith, The Royal Society of Chemistry, London, (1988)
- (75) D. Gere, *Science*, **222**, 258, (1985)
- (76) E.J. Guthrie et H.E. Schwartz, *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, (1986)
- (77) M. Petersen, *J. Chromatogr.*, **505**, 3, (1990)
- (78) Terry A. Berger, *Anal. Chem.*, **62**, (1990)
- (79) D. Tong, K.D. Bartle et A.A. Clifford, *J. Chromatogr. A*, **703**, 17-35, (1995)
- (80) K.M. Payne, I.L. Davies, K.D. Bartle, K.E. Markides et M.L. Lee, *J. Chromatogr.*, **477**, 161, (1989)
- (81) A.J. Berry, E.D. Ramsey, M. Newby et D.E. Games, *J. Chromatogr. Sci.*, **34**, 245, (1996)
- (82) H.H. Willard, L.L. Merritt Jr, J.A. Dean et F.A. Settle jr, *Instrumental methods of analysis*, 7^{ième} édition, Wadsworth publishing company, Belmont, (1988)
- (83) M.A.A. Mertens, H.G.M. Janssen, C.A. Cramers, W.J.L. Guenit, G.J. van Velzen, H. Dirkwager et H. Van Binsbergen, *J. High Resol. Chromatogr.*, **19**, 17, (1996)
- (84) K. Matsumoto, S. Nagata, H. Hattori et S. Tsuge, *J. Chromatogr.*, **605**, 87, (1992)
- (85) A. Munder et S.N. Chesler, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **12**, 669, (1989)
- (86) H.-G. Janssen et C.A. Cramers, *J. Chromatogr.*, **505**, 19, (1990)
- (87) B.E. Richter, *Gas Chromatographic Detector in SFC*, *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, (1989)
- (88) F. David et P. Sandra, *J. High Resolut. Chromatogr. & Chromatogr. Comm.*, **11**, 897, (1988)
- (89) R.D. Smith, J.L. Fulton et H.K. Jones, *Sep. Sci. Technol.*, **23**, 2015-2030, (1988)
- (90) H. Zhu et A.U. Mallik, *J. Chem. Ecol.*, **20**, 407, (1994)

- (91) F.A. Macias dans: Allelopathy, Organisms, Processes and Applications, ACS Symposium, séries 582, Éd. Par Inderjit, K.M.M. Dakshini et F.A. Einhelling, (1995)
- (92) N.B. Mandava dans "The Chemistry of Allelopathy", Biochemical Interactions Among Plants, ACS Symposium, séries 268, Éd. A.C. Thompson, (1985)
- (93) D. Carazzato, Thèse Ph.D., Caractérisation d'une source à décharge lumineuse pour l'analyse de composés organiques par spectrométrie de masse, Université de Montréal, (1994)
- (94) D. Carazzato et M.J. Bertrand, J. Am. Soc. Mass Spectrom., **5**, 4, (1994)
- (95) P.J. Arpino et P. Haas, J. Chromatogr. A, **703**, 479 (1995)
- (96) E. Hoffmann, J. Charette et V. Stroobant, Spectrométrie de masse, Éd. E. Hoffmann, Belgique, (1993)
- (97) F.W. McLafferty et F. Turecek dans, "Interpretation of Mass Spectra", 4^{ième} édition, Éd. University Science Books, Sausalito, Californie, (1993)