

# Méthodes de séparation analytiques

Chromatographie SFC

## Introduction

⇒ La chromatographie en phase supercritique (SFC) vient en complément des chromatographies en phase liquide CPL et en phase gazeuse GC.

⇒ Il s'agit d'une chromatographie hybride de ces deux dernières qui permet de tirer bénéfice des avantages de chacune de ces techniques en exploitant un éluant sous la forme d'un fluide supercritique.

⇒ La GC et la CPL possèdent des avantages et des limitations:

	GC	CPL
Avantages	<ul style="list-style-type: none"><li>• Grande efficacité (colonnes capillaires longues)</li><li>• Détection universelle et sensible</li><li>• Faible viscosité du gaz vecteur</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Les propriétés physiques et chimiques des solutés ne sont pas un problème</li></ul>
Limitations	<ul style="list-style-type: none"><li>• Volatilité et stabilité thermique des solutés</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Faible efficacité (colonnes courtes)</li><li>• Pas de détecteur universel</li><li>• Viscosité importante de l'éluant</li></ul>

⇒ La SFC présente certains avantages:

⇒ La SFC est une méthode chromatographique rapide car on observe une diffusion rapide des solutés dans les fluides supercritiques du fait de la faible viscosité de ces derniers.

⇒ Les temps de chromatographie sont de 10 à 20 fois plus courts qu'en CPL.

⇒ La SFC présente une grande sélectivité en raison des interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire que l'on peut moduler par ajout d'une faible quantité de modificateurs polaires à la phase mobile.

⇒ La SFC est compatible avec la plupart des détecteurs utilisés en CPL et GC.

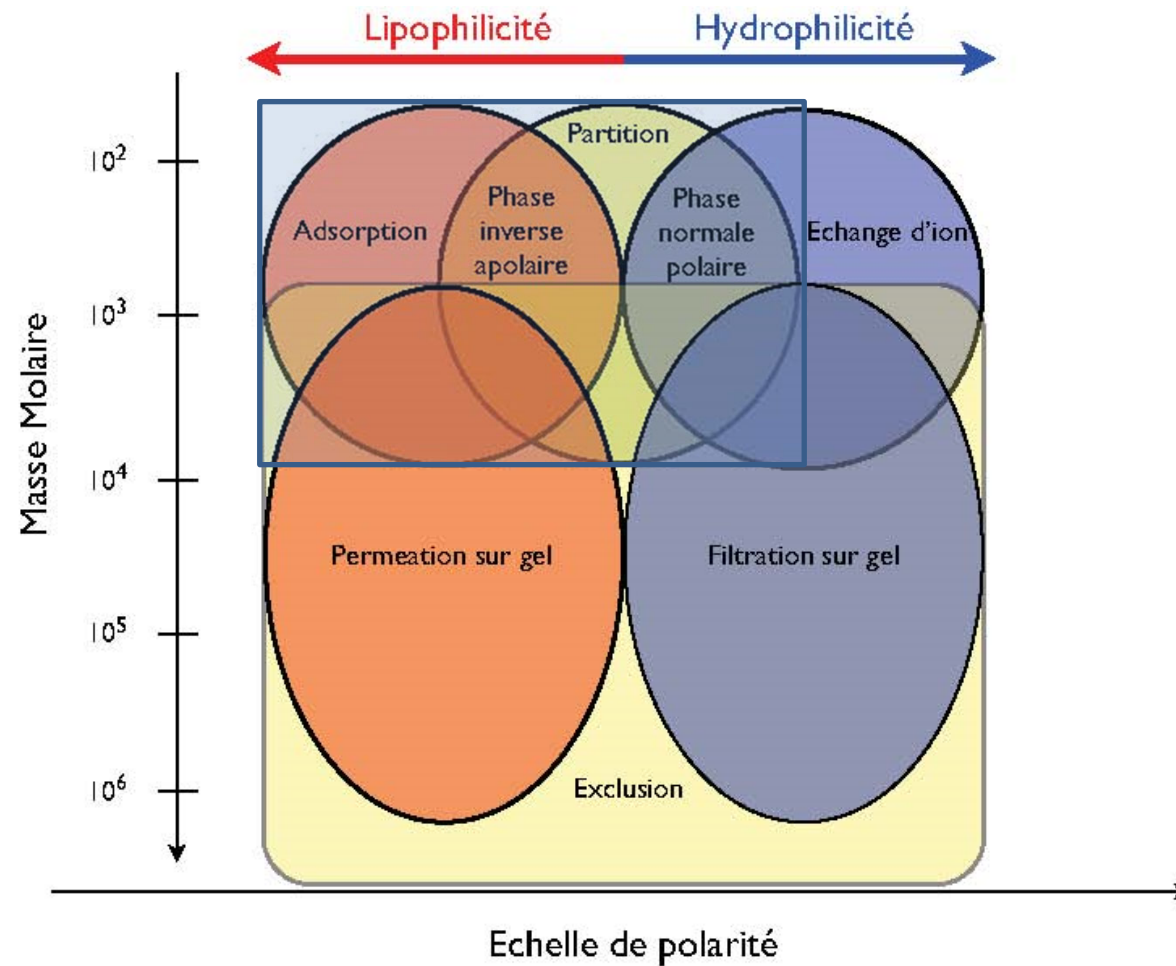
⇒ La SFC préparative présente l'avantage d'un éluant qui s'élimine facilement par simple détente sans avoir recours à une évaporation sous vide.

## **Chromatographie SFC**

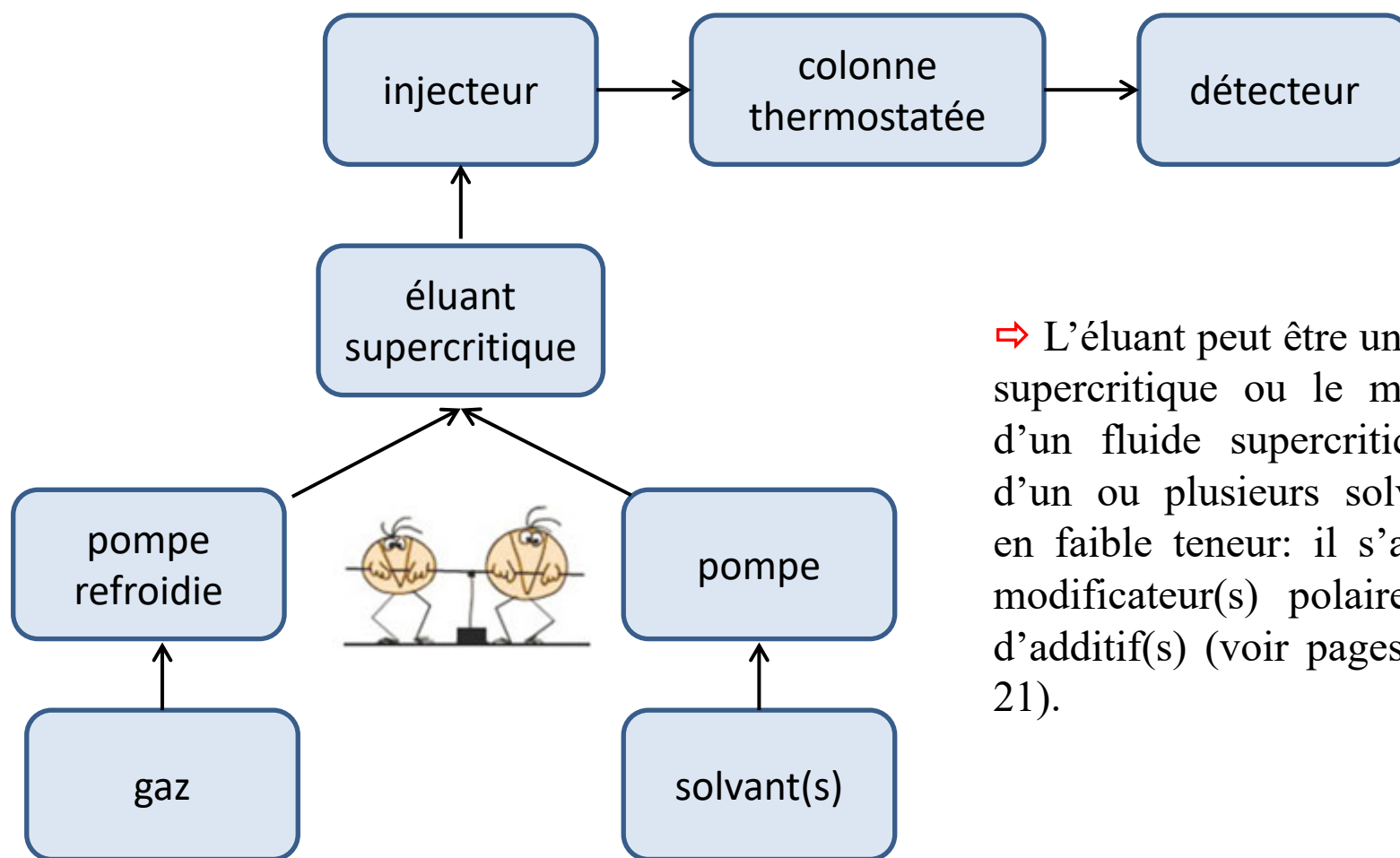


Chromatographie SFC Waters

## Domaine de la chromatographie SFC



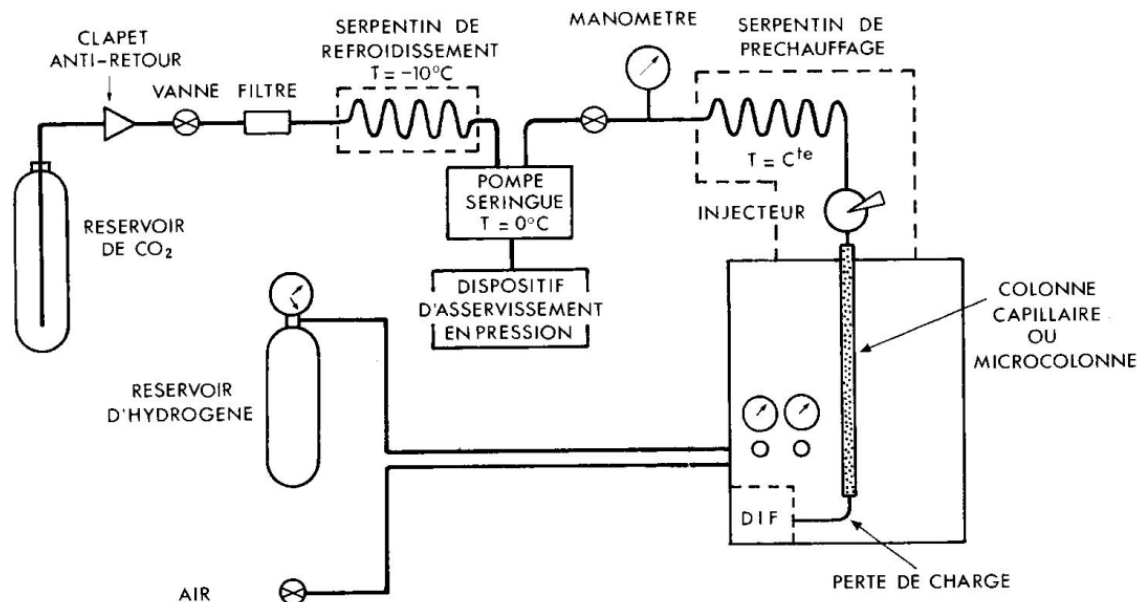
## Principe de la chromatographie SFC



⇒ L'éluant peut être un fluide supercritique ou le mélange d'un fluide supercritique et d'un ou plusieurs solvant(s) en faible teneur: il s'agit de modificateur(s) polaire(s) et d'additif(s) (voir pages 20 et 21).

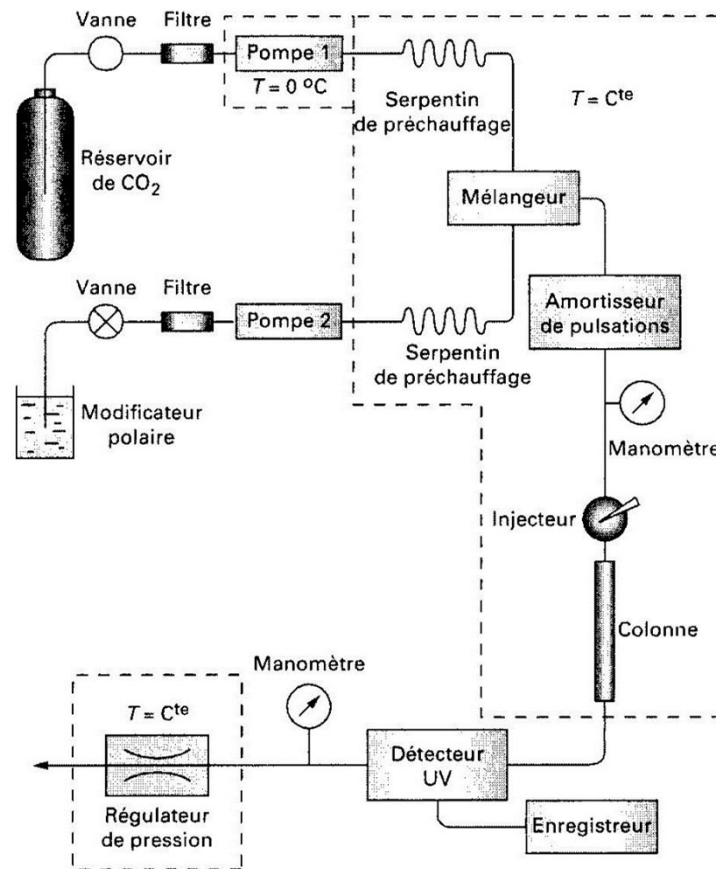
## Principe de la chromatographie SFC

⇒ Si on désire utiliser une colonne capillaire, l'appareil SFC s'apparente à un chromatographe GC. Le mode de détection sera principalement basé sur un détecteur FID.

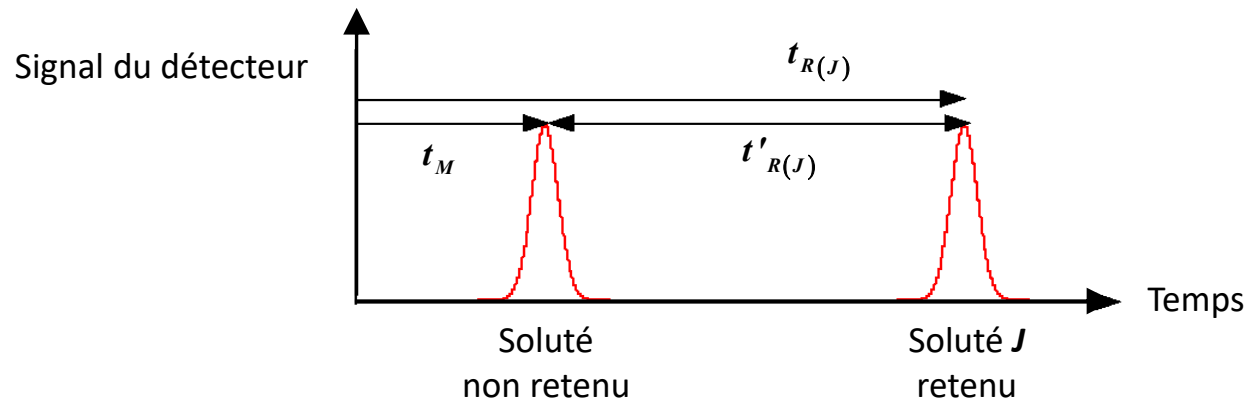


⇒ Ce type d'appareil n'autorise pratiquement que l'utilisation d'un fluide supercritique pur, principalement le CO<sub>2</sub>.

⇒ Si on désire utiliser une colonne remplie, l'appareil SFC s'apparente à un chromatographe en phase liquide. Le mode de détection sera alors basé principalement sur les détecteurs pour HPLC. Dans ce cas, on pourra utiliser un modificateur polaire.



⇒ Une chromatographe SFC génère un chromatogramme en temps:



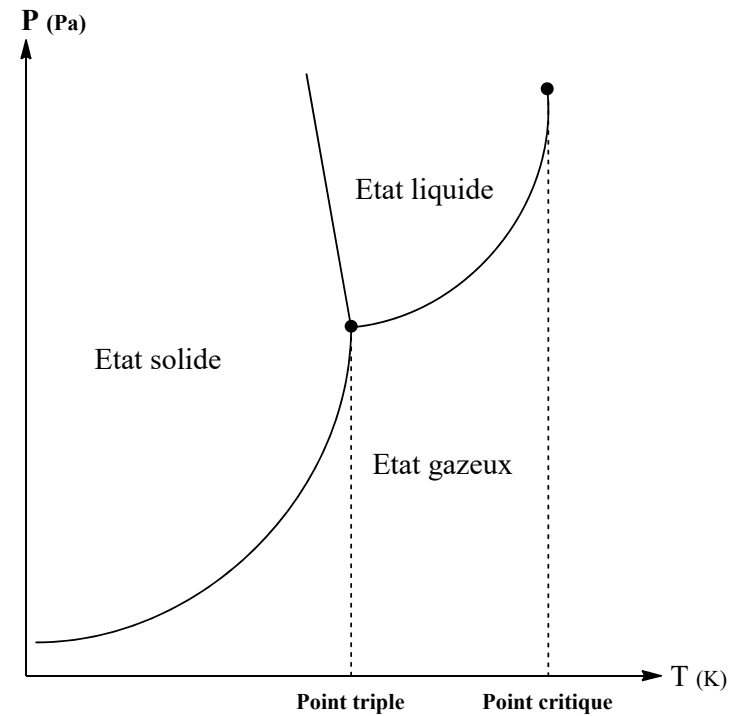
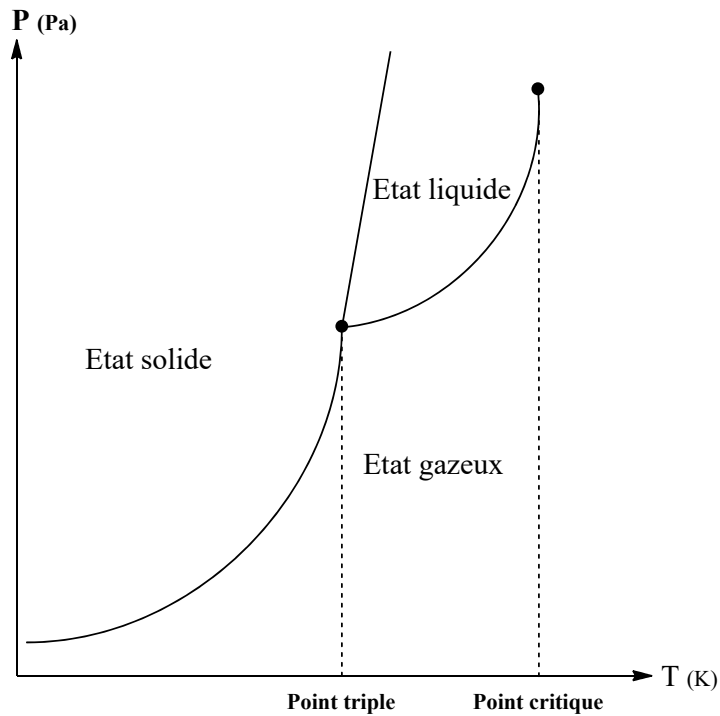
## Eluants

⇒ L'éluant peut être un fluide supercritique pur.

⇒ L'éluant peut être un fluide supercritique comportant un modificateur polaire comme le méthanol par exemple.

⇒ L'état supercritique est observé pour un couple pression-température au dessus du point critique.

⇒ Les diagrammes de phases d'un corps pur sont les suivants:



Diagrammes de phases normal (gauche) et anormal (droite) d'un corps pur

- ⇒ Dans le cas où l'on utilise un modificateur polaire, ce dernier ne doit pas dépasser une fraction molaire de 0,1 pour faciliter le maintien de la phase à l'état supercritique.
- ⇒ Dans le cas où la fraction molaire du modificateur polaire dépasse ce seuil, le déplacement du point critique est tel qu'il faut augmenter considérablement la température pour rester à l'état supercritique. Les températures à maintenir sont en général incompatibles avec la stabilité des phases stationnaires usuelles.
- ⇒ Les fluides supercritiques ont une viscosité 5 à 20 fois inférieure à celle des liquides. La viscosité augmente avec la pression et diminue légèrement avec une augmentation de la température. En SFC, le couple pression-température se situe dans les domaines de 100 à 400 bars et de 0 à 60°C.
- ⇒ Les fluides critiques utilisables en SFC sont les suivants: CO<sub>2</sub>, isopropanol, SF<sub>6</sub>, SO<sub>2</sub>, méthyléthyléther, Xe, NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O, éthane, propane, butane, pentane, dichlorofluorométhane, trichlorofluorométhane, dichlorotétrafluoroéthane.
- ⇒ Parmi tous ces fluides, le CO<sub>2</sub> est celui qui est le plus utilisé:
- ⇒ Point critique: 31°C; 73,8 bars. Température d'utilisation compatible avec la stabilité thermique des phases stationnaires usuelles, bon pouvoir solvant.

- ⇒ Non toxique, ininflammable, non corrosif, inodore, peu onéreux, inerte.
- ⇒ En chromatographie préparative, les solutés sont isolés par simple détente du fluide (pas d'évaporation à l'évaporateur rotatif).
- ⇒ Transparence dans l'UV et dans de nombreuses régions de l'infrarouge, très faible signal FID.

### **Pompes**

- ⇒ Le fluide est pompé à l'état liquide de façon à ce que l'efficacité de la pompe soit conservée. Le débit délivré dans la colonne doit être précis et constant.
- ⇒ Les pompes sont du même type que celle utilisées en chromatographie CPL lorsque l'on utilise des colonnes remplies.
- ⇒ Lorsque l'on utilise des colonnes capillaires, on fait appel à des pompes de type pousse-seringue. Les seringues utilisées ont une capacité de 250 mL.
- ⇒ Lorsque le fluide supercritique est du CO<sub>2</sub>, on refroidit le gaz à 0°C pour qu'il devienne liquide. Le corps de pompe est aussi maintenu à 0°C pour maintenir le CO<sub>2</sub> à l'état liquide.

## Injecteurs

- ⇒ Les injecteurs sont des vannes haute pression munies d'une boucle d'injection comme pour les appareils de chromatographie CPL.
- ⇒ En présence de colonnes remplies, les vannes d'injection utilisées sont les vannes classiques de chromatographie CPL.
- ⇒ Avec des colonnes capillaire, on doit utiliser des micro-vannes d'injection avec division de débit (mode split).
- ⇒ Les mélanges à séparer sont dilués un solvant liquide à température ambiante comme l'hexane, le dichlorométhane ou le méthanol.
- ⇒ Lorsque l'on travail avec un détecteur FID, le solvant de choix est le  $\text{CS}_2$  car il ne génère qu'un très faible signal FID.
- ⇒ On peut dans certains cas, dissoudre le mélange dans la phase mobile supercritique.
- ⇒ Cette technique demande une modification des vannes d'injection classiques.

## La colonne chromatographique: caractéristiques physiques

⇒ Les colonnes chromatographiques peuvent être des colonnes remplies ou capillaires.

↪ Les colonnes remplies sont les mêmes que celles utilisées en HPLC. On choisira les conditions de pression et de température limitant la perte de charge qui pourrait occasionner un gradient de masse volumique non contrôlé au sein de la colonne.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"><li>• Contrôle aisé de la pression</li><li>• Grande variété de phases stationnaires</li><li>• Efficacité</li><li>• Faible durée d'analyse</li><li>• Capacité disponible</li><li>• Transposition à l'échelle préparative</li><li>• Rétention et sélectivité modulables par ajout de solvants polaires variés</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nombre de plateaux limités</li><li>• Gradient de pression dans la colonne qui peut entraîner un gradient de masse volumique non contrôlé</li><li>• Débits importants</li><li>• Fluides onéreux (Xe) ou dangereux (alcane) ne peuvent être utilisés</li><li>• Connexion avec un FID délicate</li></ul>

➡ Les colonnes capillaires ont un diamètre interne de 50  $\mu\text{m}$ . Leur longueur est comprise entre 2 et 20 m. L'épaisseur du film de phase stationnaire varie entre 0,05 et 0,25  $\mu\text{m}$ .

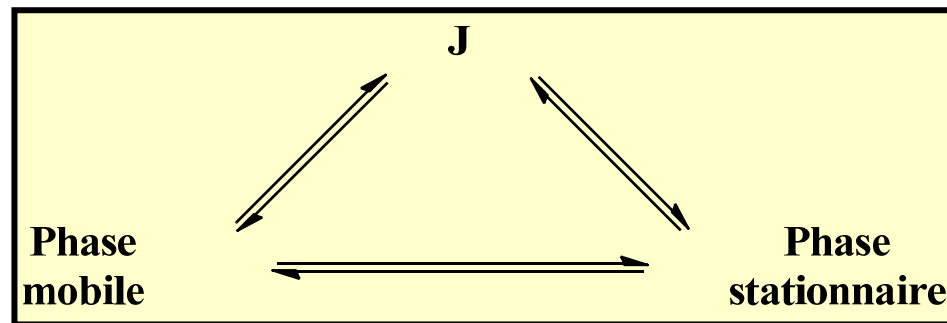
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"><li>• Grande efficacité (<math>N &gt; 500000</math>)</li><li>• Temps d'analyse raisonnable</li><li>• Faible perte de charge</li><li>• Possibilité d'utiliser des solvants coûteux (Xe) ou dangereux (alcane)</li><li>• Possibilité de programmation de masse volumique</li><li>• Couplage aisé avec les détecteurs FID et MS</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Contrôle de la pression délicat</li><li>• Choix limité de phase stationnaires</li><li>• Peu de possibilités pour modifier le temps de rétention, pas d'adjonction de solvant polaire possible</li><li>• Faible capacité disponible</li><li>• Limite de détection spectrophotométrique plus faible qu'avec une colonne remplie (petit chemin optique)</li></ul>

➡ La SFC basée sur l'utilisation de colonnes capillaires est de moins en moins utilisée au profit de la SFC basée sur l'utilisation de colonnes remplies.

➡ Dans le cas des fluides supercritiques, la perte de charge de la colonne est estimée par la loi de Darcy.

## La colonne chromatographique: principes de rétention

⇒ Les principes de rétention thermodynamiques sont décrits ci-après:



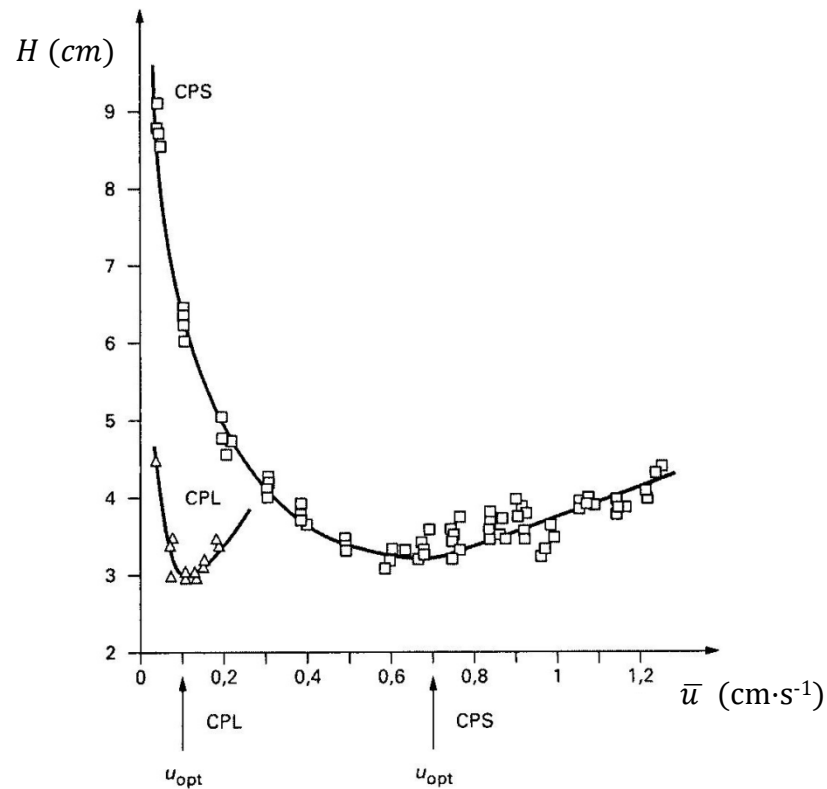
⇒ Alors que seule la nature chimique de la phase mobile était à considérer pour la chromatographie CPL, en SFC, la masse volumique ainsi que le couple pression-température de la phase mobile va aussi jouer un rôle non négligeable.

⇒ D'un point de vue thermodynamique, on se trouve dans les mêmes conditions qu'en HPLC ou en GC, dépendant de la nature de la colonne chromatographique utilisée. On aura donc:  $K_{D(J)} > 1$ .

⇒ D'un point de vue cinétique, il faut considérer le cas des colonnes remplies et celui des colonnes capillaires.

⇒ En présence d'une colonne remplie, les équations de Van Deemter et de Knox ressemblent fortement à celles décrites pour la chromatographie HPLC si la compressibilité du fluide peut être négligée.

⇒ En revanche, dans le cas d'une colonne capillaire, on aura affaire à l'équation de Golay.



Colonne 15 cm  $\times$  0,46 cm de silice greffée octadécyle, 5  $\mu\text{m}$   
Phase mobile supercritique :  $\text{CO}_2$  à 240 bar et 50  $^\circ\text{C}$   
Phase mobile liquide : méthanol-eau 80-20 (v/v)

⇒ Dans tous les cas de figures, les valeurs des coefficients de diffusion des solutés dans les fluides supercritiques étant supérieures à ceux en phase liquide, on obtiendra toujours un nombre de plateaux plus important en SFC qu'en CPL.

## La colonne chromatographique: l'éluant

### *Généralités*

⇒ Les propriétés chromatographiques des fluides supercritiques dépendent de la masse volumique, de la température, de la présence d'un modificateur polaire.

### *Masse volumique*

⇒ On peut faire varier la masse volumique d'un fluide supercritique en modifiant la pression et la température.

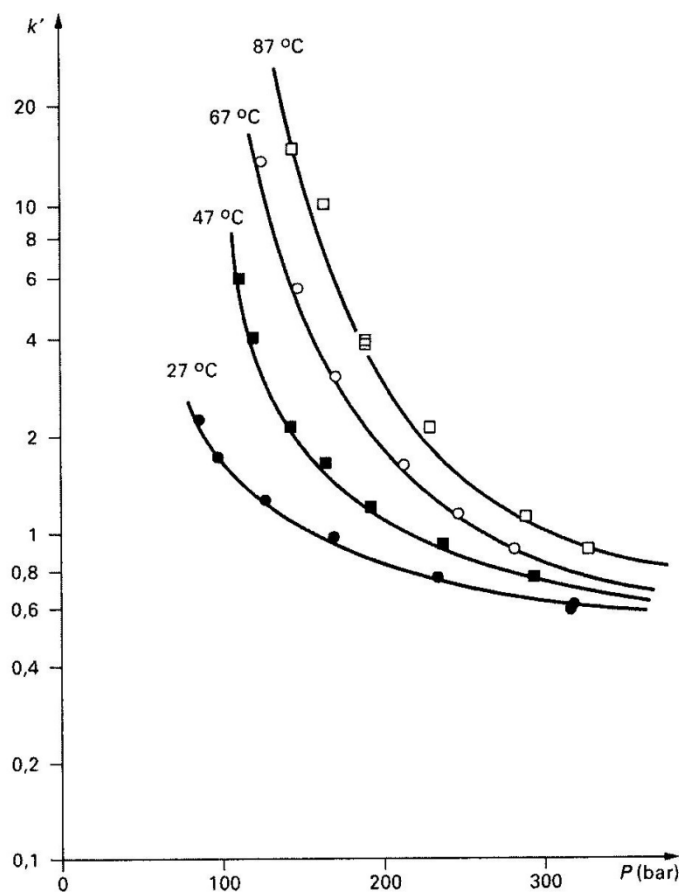
⇒ A température constante, une légère augmentation de la pression engendre un accroissement de la masse volumique.

⇒ A pression constante, la masse volumique diminue lorsque la température augmente.

⇒ Par exemple, toute diminution de la masse volumique du CO<sub>2</sub> supercritique pur entraîne une diminution de sa polarité, impliquant une augmentation des facteurs de rétention.

⇒ La solubilité des solutés dans un fluide supercritique augmente avec sa masse volumique.

⇒ Le CO<sub>2</sub> supercritique reste néanmoins un solvant peu polaire, dont la polarité peut être estimée comme variant entre celle des alcanes et du dichlorométhane.



Colonne 25 × 0,46 cm  
Phase stationnaire : silice LiChrosorb Si 60 ; 5 µm  
Phase mobile : CO<sub>2</sub> ; débit 2 mL · min<sup>-1</sup> à 0 °C  
Détection : absorptiométrie UV à 220 nm

### ***Température***

⇒ A pression constante, une augmentation de la température du CO<sub>2</sub> peut entraîner un accroissement (diminution de la masse volumique) ou une diminution de la rétention (lié à la volatilité du soluté chromatographié).

### ***Addition de modificateur polaire***

⇒ Le CO<sub>2</sub> supercritique est un fluide très peu polaire.

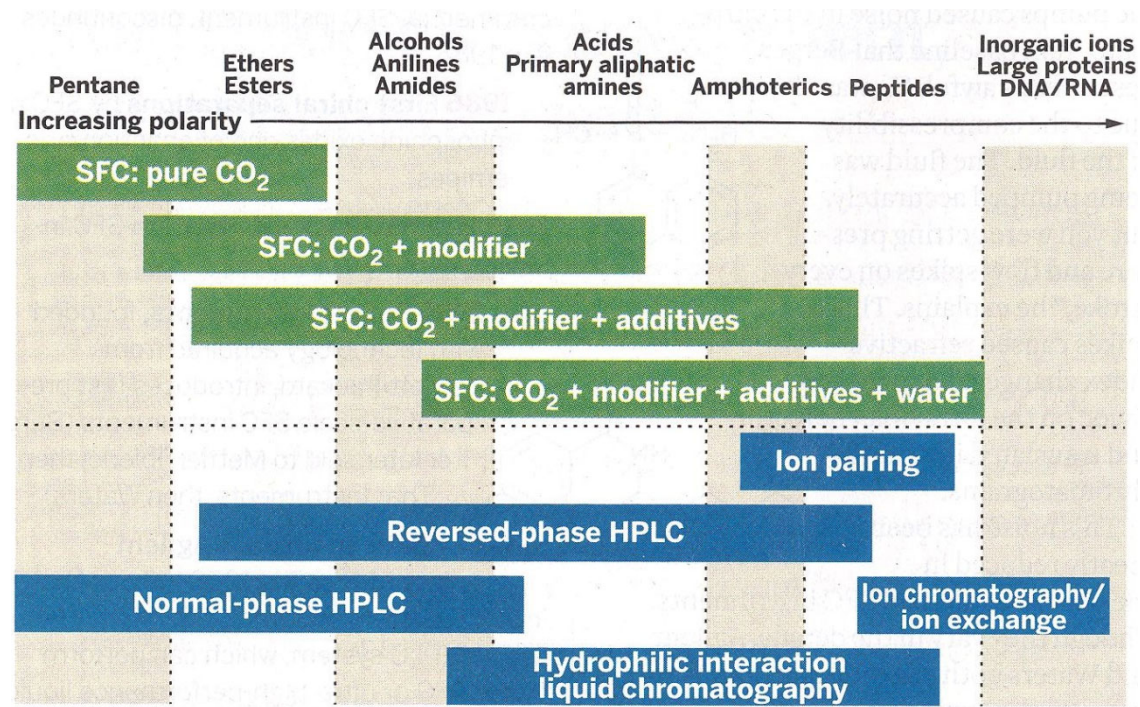
⇒ L'addition d'un solvant polaire au CO<sub>2</sub> supercritique permet de gouverner la rétention et la sélectivité des solutés polaires ( $x_{\text{solvant polaire}} \leq 0,1$ ).

⇒ Les modificateurs polaires les plus utilisés sont les alcools à courte chaîne (méthanol, éthanol, propanol, isopropanol, butanol), l'acétonitrile, et les solvants classiques de la CPL (THF, dichlorométhane...).

⇒ L'eau est peu miscible au CO<sub>2</sub> supercritique et ne peut être ajoutée qu'en présence d'un autre solvant comme le méthanol par exemple.

⇒ On peut ajouter aussi des additifs avec un caractère acide ou basique pour améliorer la séparation de solutés ionisables.

⇒ Ci-dessous un comparatif entre la SFC et l'HPLC:



### *Elution en mode isocratique*

⇒ Tout comme en CPL, la séparation peut s'effectuer en mode isocratique, c'est à dire avec une composition d'éluant constante au cours du temps.

### *Elution en mode gradient*

⇒ La rétention des solutés peut être gouvernée par la masse volumique (polarité en fonction de P et T) du CO<sub>2</sub> et de la teneur en modificateur polaire. Ces différents paramètres peuvent être modifiés au cours de la séparation.

⇒ Gradient de masse volumique:

⇒ Les gradients de masse volumique sont générés à l'aide d'une programmation de la pression du fluide plutôt que par programmation de température.

⇒ Programmation de 1 à 100 bar·min<sup>-1</sup> (colonne longue et courte respectivement).

⇒ Une augmentation linéaire de la masse volumique nécessite une programmation non linéaire de la pression.

⇒ Cette méthode peut être utilisée avec des colonnes capillaires ou remplies et autoriser une détection FID si la présence d'un modificateur polaire n'est pas nécessaire. Dans le cas où ce dernier est requis, sa fraction molaire doit être très inférieure à 0,1 et la détection FID est par conséquent proscrite.

⇒ Une augmentation de la masse volumique augmente la polarité du fluide supercritique ainsi que la solubilité des solutés dans ce dernier.

⇒ Gradient de température:

↪ Il est très peu utilisé en SFC car à pression constante, un gradient de température implique une diminution de la masse volumique. On devrait appliquer un gradient de température décroissant.

⇒ Gradient de modificateur polaire:

↪ Tout comme en CPL, on peut utiliser un gradient de modificateur polaire (FID proscrit).

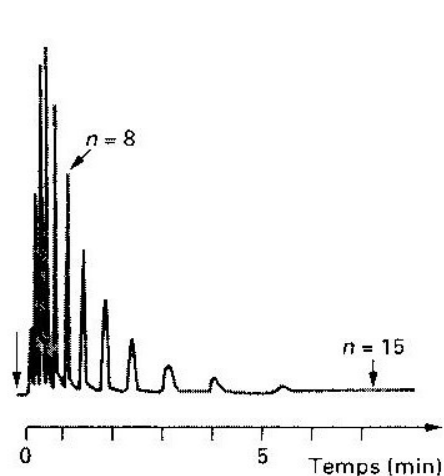
⇒ Gradient de masse volumique et modificateur polaire:

↪ On peut, dans le cas de séparations complexes jouer sur une combinaison de gradients de masse volumique et de modificateur polaire (FID proscrit).

⇒ Gradient simultané pression, température, modificateur polaire:

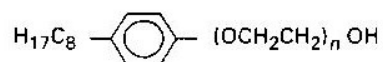
↪ Un gradient simultané de pression, température et modificateur polaire (dioxanne) a permis d'augmenter la résolution d'une séparation d'oligomères du styrène. Ceci reste néanmoins un cas exotique qui ne constitue pas la majorité des séparations réalisées en SFC (FID proscrit).

⇒ Les chromatogrammes et tableau ci-après retracent les principaux facteurs qui influencent la séparation:

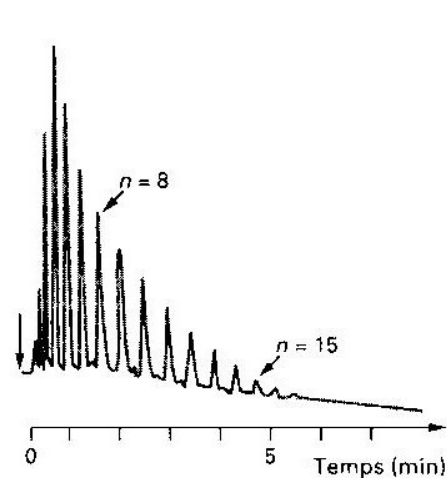


(a) régimes isobare et isocratique ; débit de méthanol :  $0,125 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  ; pression : 210 bar

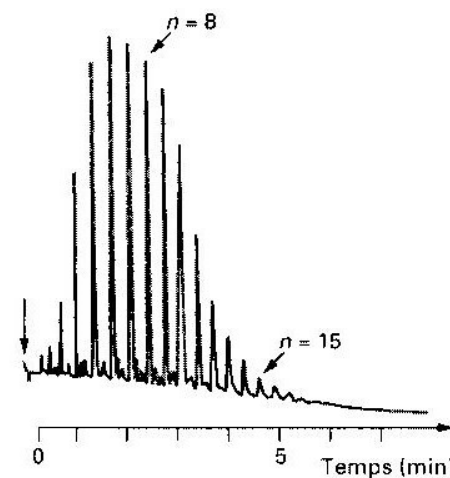
Triton X 114



$n$  degré de polymérisation  
colonne  $10 \times 0,2 \text{ cm}$



(b) programmation du débit de méthanol de  $0,025$  à  $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  en 8 min ; pression : 210 bar



(c) programmation de pression de 130 à 375 bar en 8 min ; débit de méthanol :  $0,125 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Phase stationnaire : silice greffée octadécyle Nucleosil C18 ;  $3 \mu\text{m}$   
Phase mobile :  $\text{CO}_2$ -méthanol  
Débit de  $\text{CO}_2$  :  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$   
Température :  $70^\circ\text{C}$   
Détection UV à  $278 \text{ nm}$   
Régime isocratique : composition constante de la phase mobile

	GC	CPL	SFC
Phase stationnaire	+	+	+
Phase mobile	-	+	+
Pression	-	-	+
Température	+	+	+

## **La colonne chromatographique: phases stationnaires**

- ⇒ Les phases stationnaires utilisées sont les mêmes que celles utilisées en CPL et GC.
- ⇒ Pour les colonnes CPL, les phases stationnaires ne fonctionnant qu'avec un éluant aqueux sont incompatibles.
- ⇒ Pour les colonnes GC, les phases stationnaires doivent être pontées pour éviter leur dissolution et greffées à la surface de la colonne pour prévenir de l'entraînement de cette dernière par le fluide supercritique (haute pression).
- ⇒ Pour les séparations impliquant une phase normale d'adsorption ou de partage, le choix du modificateur polaire s'effectue comme en CPL.
- ⇒ Pour les séparations impliquant une phase inverse de partage, les mécanismes de rétention avec le CO<sub>2</sub> sont très différents de ceux observés en CPL.
- ⇒ On observe un partage entre une phase stationnaire apolaire et une phase mobile apolaire ou peu polaire.
- ⇒ Le temps de rétention diminue avec la teneur en modificateur polaire.

⇒ Quelques exemples de séparations chirales en SFC et leurs comparaisons avec une séparation HPLC:

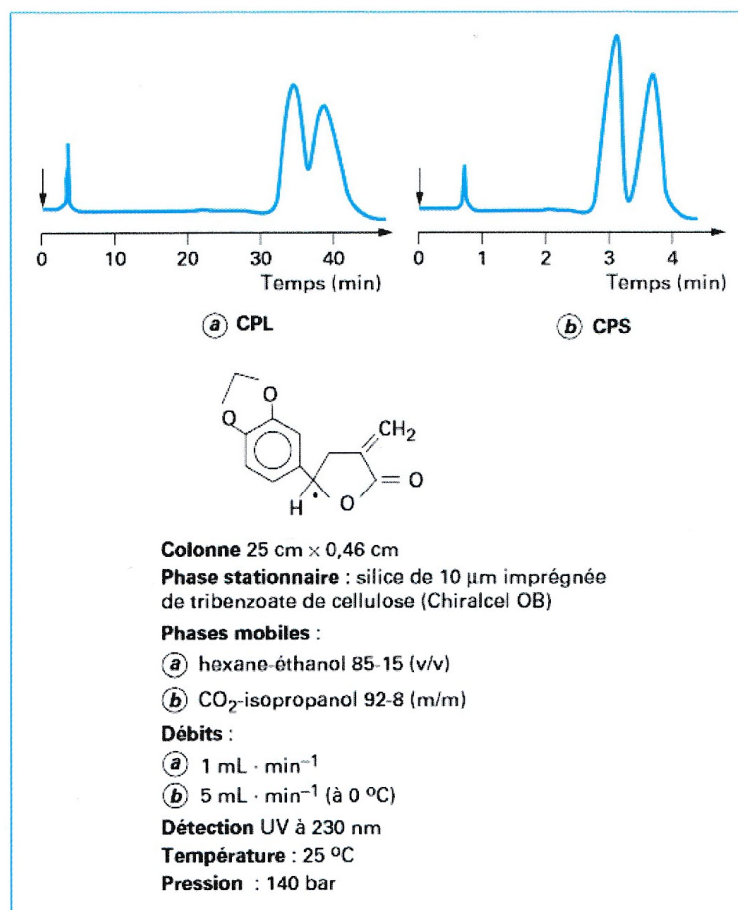


Figure 13 – Séparation d'une α-méthylène γ-lactone par chromatographie en phase liquide et en phase supercritique [17]

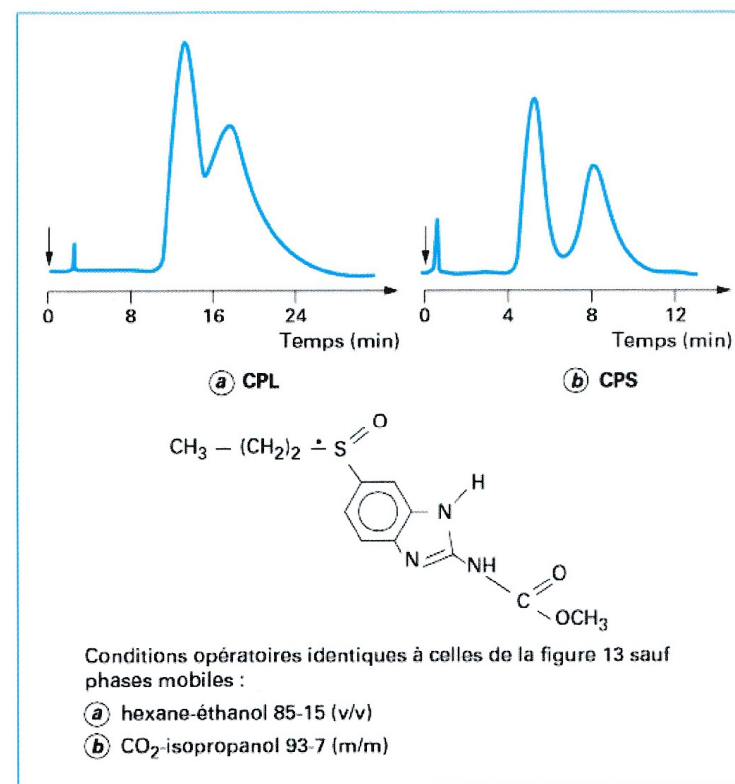


Figure 14 – Séparation du sulfoxyde d'albendazole par chromatographie en phase liquide et en phase supercritique [17]

## **Détecteurs**

⇒ La SFC utilise des détecteurs dédiés à la CPL et ceux réservés à la GC.

### ***Détection à l'état supercritique***

⇒ Détecteurs utilisés en CPL avec une cellule de détection admettant de hautes pressions.

⇒ UV-Visible, Fluorescence, FTIR, MS...

### ***Détection à l'état gazeux***

⇒ Détecteurs utilisés en GC après détente du fluide supercritique.

⇒ FID, NPD, FPD, MS...