

# Chromatographie en phase supercritique

par **Marcel CAUDE**

*Ingénieur du Conservatoire national des arts et métiers (CNAM)*

*Docteur ès sciences*

*Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS)*

et **Didier THIÉBAUT**

*Docteur en pharmacie*

*Docteur de l'université Pierre et Marie Curie (Paris VI)*

*Chargé de recherche au CNRS*

<b>1. Fluides supercritiques en chromatographie</b> .....	P 1 460 – 2
1.1 Propriétés thermodynamiques.....	— 2
1.1.1 Fluide pur .....	— 2
1.1.2 Mélanges binaires .....	— 3
1.2 Propriétés physico-chimiques .....	— 3
1.2.1 Masse volumique et compressibilité .....	— 3
1.2.2 Viscosité .....	— 4
1.2.3 Coefficient d'autodiffusion.....	— 4
1.2.4 Coefficient de diffusion des solutés .....	— 4
1.2.5 Polarité d'un fluide supercritique .....	— 4
1.2.6 Solubilité dans un fluide supercritique .....	— 4
1.3 Principaux fluides utilisables en CPS.....	— 5
<b>2. Propriétés chromatographiques du dioxyde de carbone</b> .....	— 6
2.1 Aspect thermodynamique .....	— 6
2.1.1 Influence de la masse volumique.....	— 6
2.1.2 Influence de la température.....	— 6
2.1.3 Addition de modificateurs polaires.....	— 6
2.1.4 Gradients d'élution .....	— 7
2.2 Aspect cinétique .....	— 8
<b>3. Colonnes et phases stationnaires</b> .....	— 8
3.1 Colonnes remplies.....	— 8
3.2 Colonnes capillaires .....	— 9
3.3 Avantages et inconvénients des colonnes remplies et capillaires .....	— 9
<b>4. Appareillage</b> .....	— 9
4.1 Colonnes capillaires .....	— 9
4.2 Colonnes remplies.....	— 10
<b>5. Applications</b> .....	— 11
<b>Bibliographie</b> .....	— 16

**L**a chromatographie en phase supercritique, CPS (en anglais SFC : Supercritical Fluid Chromatography) met en œuvre, comme phase mobile, un fluide ou un mélange de fluides porté au-delà du point critique par un contrôle adéquat de la température et de la pression.

Cette technique est complémentaire des chromatographies en phases liquide et gazeuse (CPG). En effet, la CPG exige simultanément la volatilité et la stabilité thermique des solutés ; quant à la CPL, elle présente deux limitations :

- l'obtention difficile de grandes efficacités ;
- l'absence de détecteur aussi universel et sensible que le détecteur à ionisation de flamme (DIF) de la CPG.

Par suite, lorsqu'on est confronté à la séparation d'un mélange complexe de solutés non volatils, thermosensibles et non aisément détectables, ce qui représente environ 25 % des exemples rencontrés, on peut envisager de mettre en œuvre la CPS associée aux détecteurs de la CPG.

Enfin, la CPS possède des caractéristiques propres qui en font une technique chromatographique performante aussi bien avec des colonnes capillaires qu'avec des colonnes remplies :

- de grandes efficacités par unité de temps peuvent être atteintes en raison de la diffusion rapide des solutés dans les fluides supercritiques du fait de leur faible viscosité ; aussi des séparations peuvent-elles être obtenues en des temps d'analyse 10 à 20 fois plus courts qu'en CPL ;

- on peut aussi, pour la même raison, augmenter la longueur de la colonne, ce qui permet alors de disposer d'une très grande efficacité, même avec les colonnes remplies ;

- des sélectivités importantes sont observées en raison des interactions entre les solutés, la phase stationnaire et la phase mobile que l'on peut faire varier par l'ajout de faibles quantités de modificateurs polaires à la phase supercritique ;

- la CPS préparative présente l'avantage, par rapport à la CPL, d'une récupération rapide des solutés par détente de la phase mobile, en dépit des difficultés technologiques pour lesquelles diverses solutions ont été proposées.

## 1. Fluides supercritiques en chromatographie

### 1.1 Propriétés thermodynamiques

#### 1.1.1 Fluide pur

L'état thermodynamique d'un composé pur est déterminé par les trois variables pression  $P$ , volume  $V$  et température  $T$ . Il existe une relation entre ces trois variables, connue sous le nom d'équation d'état et représentée par une surface dans le référentiel à trois dimensions  $P, V, T$ . Tout corps pur, suivant la valeur des trois variables  $P, V, T$  sera sous la forme solide  $s$ , liquide  $\ell$ , ou vapeur  $v$ . Les domaines d'existence de chacune de ces trois phases sont déterminés par l'équation d'état et peuvent être représentés sur plusieurs types de diagrammes : au diagramme tridimensionnel ( $P, V, T$ ), on préfère généralement les projections sur les plans ( $P, T$ ) (isochores) et ( $P, V$ ) (isothermes) d'une mise en œuvre plus aisée. Dans la majorité des cas, le volume  $V$  est remplacé par la masse volumique  $\rho$ , inversement proportionnelle à  $V$ . On utilise donc des diagrammes ( $P, \rho$ ) et ( $P, T$ ).

Le diagramme ( $P, T$ ) (figure 1) précise les domaines des trois états de la matière,  $s, \ell, v$ . Les raccordements de ces différents domaines correspondent aux transitions de phase, s'accompagnent de discontinuité de certaines propriétés physiques,  $\rho$  en particulier, et correspondent aux équilibres liquide-vapeur ( $\ell-v$ ), solide-liquide ( $s-\ell$ ) et solide-vapeur ( $s-v$ ). Au point triple  $T$  coexistent les trois phases solide-liquide-vapeur.

On remarque que l'on ne peut passer de l'état solide à l'état liquide sans traverser un segment, donc sans qu'il y ait discontinuité de la masse volumique des phases. Par contre, il est possible de passer de l'état liquide à l'état gazeux continûment, sans traverser le segment ( $\ell-v$ ), à la condition de contourner le point C. Ce point où se termine la courbe d'équilibre liquide-vapeur est appelé **point critique**, et il lui correspond une température critique  $T_C$ , une pression critique  $P_C$  et une masse volumique  $\rho_C$ .

Au point C, on a un état intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux que l'on appelle **état critique** ou, si l'on s'éloigne notablement de C, **état supercritique**. Cet état correspond donc à des températures et des pressions supérieures à celles de C.

La figure 2 représente le diagramme de phase ( $P, \rho$ ) du dioxyde de carbone. Plusieurs isothermes ont été tracées et la zone d'utilisation habituelle de la CPS a été grisée.

Pour toute température supérieure à  $T_C$ , on constate qu'à une augmentation continue de la pression correspond une augmentation continue de la masse volumique.

#### Historique

Dès 1962, Klesper, Corwin et Turner [1] utilisent la CPS pour la séparation de porphyrines non volatiles. Toutefois, le développement de cette méthode a d'abord été éclipsé par celui, très rapide, de la chromatographie en phase liquide (CPL) bien que, périodiquement, des exemples d'utilisation et des mises au point aient été publiés. Il faut attendre 1982 pour assister à un regain d'intérêt pour la CPS, et 1988 pour la parution du premier ouvrage [2].

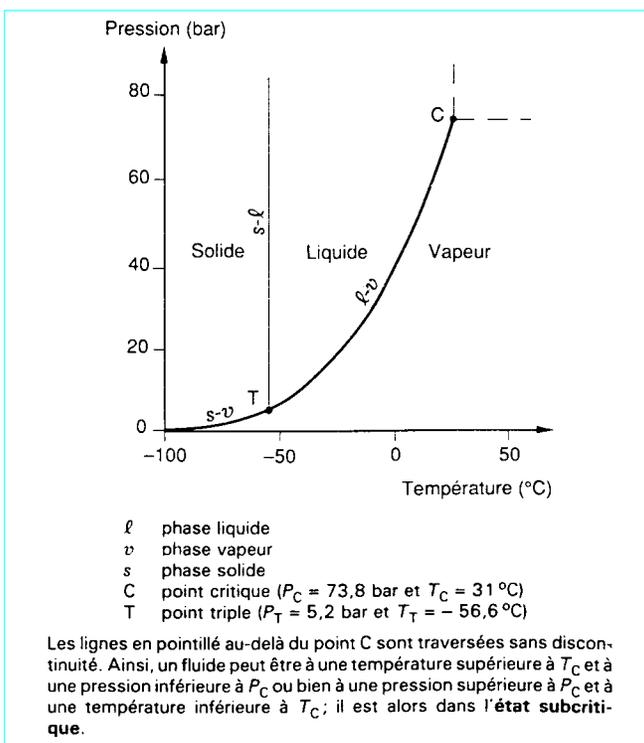


Figure 1 – Diagramme (P, T) du dioxyde de carbone (d'après [3])

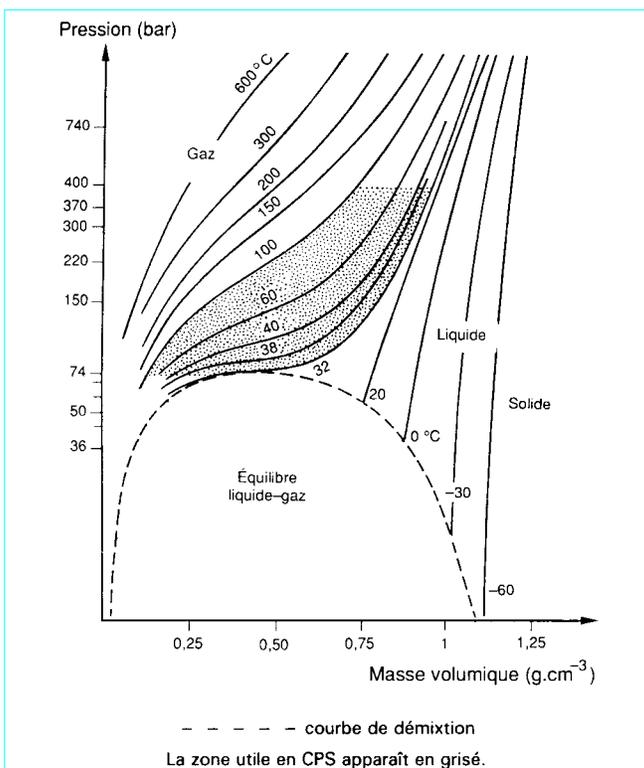


Figure 2 – Diagramme de phase (P,  $\rho$ ) du dioxyde de carbone

La compressibilité  $K_T$ :

$$K_T = -\frac{1}{V} \left( \frac{dV}{dP} \right)_T = \frac{1}{\rho} \left( \frac{d\rho}{dP} \right)_T$$

augmente lorsque la température se rapproche de  $T_C$ ; au point critique,  $K_T$  tend vers l'infini : une faible augmentation de la pression provoque un accroissement important de la masse volumique ; ce phénomène est, comme nous le verrons, largement exploité en CPS, aussi bien avec les colonnes capillaires que les colonnes remplies.

### 1.1.2 Mélanges binaires

L'ajout au fluide supercritique d'un solvant polaire entraîne des déplacements importants du point critique [4]. Si on se limite à une fraction molaire en solvant inférieure à 0,1, ce qui est le plus souvent le cas en CPS, il est aisé de maintenir le mélange à l'état supercritique. En revanche, pour des teneurs supérieures, les températures critiques atteignent très vite des valeurs incompatibles tant avec la stabilité thermique des phases stationnaires greffées qu'avec celle des solutés. C'est la raison pour laquelle l'emploi de phases mobiles subcritiques (du point de vue de la température) est couramment réalisé.

## 1.2 Propriétés physico-chimiques

Le tableau 1 rassemble les ordres de grandeur des trois paramètres masse volumique, viscosité et coefficient de diffusion, pour les trois états d'un même fluide. On remarque que, malgré des masses volumiques élevées (du même ordre que celles des liquides), les fluides supercritiques sont peu visqueux et, de ce point de vue, se rapprochent des gaz.

Tableau 1 – Ordre de grandeur de la masse volumique  $\rho$ , de la viscosité  $\eta$  et du coefficient d'autodiffusion  $D$  pour les gaz, liquides et fluides supercritiques (d'après [5])

État du fluide	$\rho$ (g.cm <sup>-3</sup> )	$\eta$ (Pa.s)	$D$ (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
gazeux 1 bar, 15-30 °C	0,6 x 10 <sup>-3</sup> à 2 x 10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-5</sup> à 3 x 10 <sup>-5</sup>	1 x 10 <sup>-5</sup> à 4 x 10 <sup>-5</sup>
supercritique - à $T_C, P_C$	0,2 à 0,5	1 x 10 <sup>-5</sup> à 3 x 10 <sup>-5</sup>	5 x 10 <sup>-8</sup>
- à $T_C, 4 P_C$	0,4 à 0,9	3 x 10 <sup>-5</sup> à 9 x 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-8</sup>
liquide (solvants organiques-eau) 1 bar, 15-30 °C	0,6 à 1,6	0,2 x 10 <sup>-3</sup> à 3 x 10 <sup>-3</sup>	0,2 x 10 <sup>-9</sup> à 3 x 10 <sup>-9</sup>

### 1.2.1 Masse volumique et compressibilité

Un grand nombre des propriétés remarquables des fluides au voisinage du point critique sont une conséquence de la très forte compressibilité  $K_T$  ( $K_T$  infinie au point critique) :

$$K_T = \frac{1}{\rho} \left( \frac{d\rho}{dP} \right)_T$$

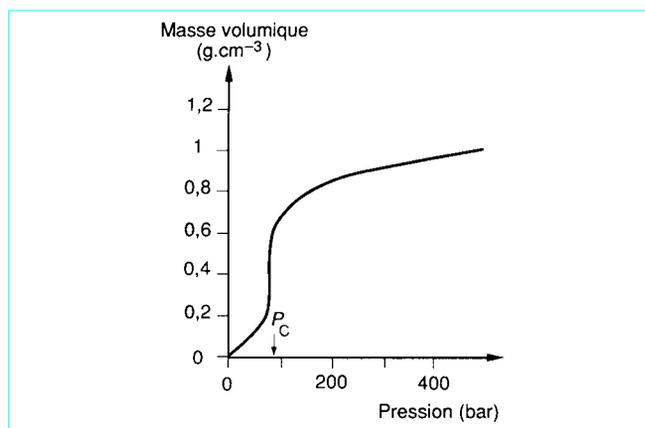


Figure 3 – Variation de la masse volumique du CO<sub>2</sub> en fonction de la pression à 40 °C

Une légère augmentation de la pression provoque alors un accroissement de la masse volumique (figure 3). Dans la zone du point critique, la compressibilité est environ 500 fois plus forte que celle des liquides. Par conséquent, contrairement à la CPL, il est possible de faire varier la masse volumique de la phase mobile en agissant sur la pression et (ou) la température.

À température constante, la masse volumique augmente avec la pression (figure 3), tandis qu'à pression constante la masse volumique diminue lorsque la température augmente. Comme la masse volumique influe à la fois sur le pouvoir solvant et sur la polarité du fluide (§ 1.2.5), on comprend que la rétention des solutés pourra être modifiée par des changements de la pression (et de la température). C'est là un point où la CPS diffère de la CPL : en phase liquide, la compressibilité n'a que des effets négligeables pour des pressions inférieures à 300 bar et la masse volumique est constante.

### 1.2.2 Viscosité

La viscosité des fluides supercritiques est 5 à 20 fois inférieure à celle des liquides (tableau 1). Cela est important, car la viscosité est en partie responsable de la faible vitesse de diffusion des solutés et du fort gradient de pression dans une colonne chromatographique. La viscosité augmente avec la pression (figure 4), mais elle approche celle du liquide plus lentement que ne le fait sa masse volumique. La viscosité ne diminue que légèrement avec une augmentation de la température.

### 1.2.3 Coefficient d'autodiffusion

Il caractérise la diffusion des molécules de fluide dans le fluide lui-même et le tableau 1 montre qu'il est intermédiaire entre celui d'un liquide et celui d'un gaz. Il diminue avec la pression et augmente avec la température.

### 1.2.4 Coefficient de diffusion des solutés

Le coefficient de diffusion  $D_m$  est un paramètre important en chromatographie puisqu'il régit les processus de transfert de masse entre les phases solide et mobile.

#### ■ Fluide supercritique pur

Pour un fluide comme le CO<sub>2</sub>, les valeurs de  $D_m$  sont comprises entre  $10^{-8}$  et  $5 \times 10^{-8}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> et sont d'autant plus faibles que la

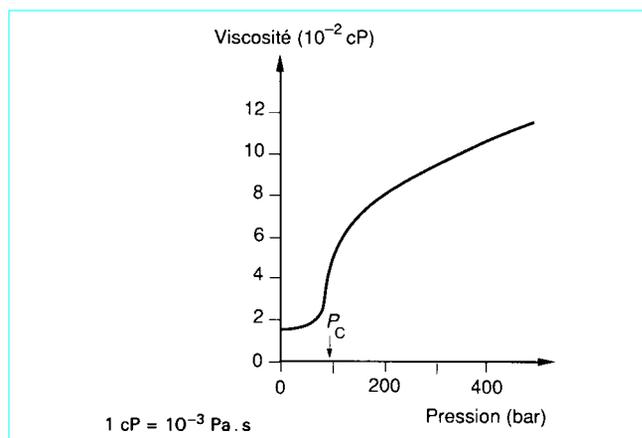


Figure 4 – Variation de la viscosité  $\eta$  du CO<sub>2</sub> en fonction de la pression à 40 °C

masse molaire du soluté et la masse volumique du fluide sont grandes à température constante [5, 6]. Elles diminuent lorsque la viscosité augmente et augmentent avec la température à masse volumique constante. Elles peuvent être calculées [6], comme en CPL, par la relation de Wilke et Chang.

#### ■ Mélange fluide supercritique – modificateur polaire

Les coefficients de diffusion diminuent lorsque la teneur en modificateur polaire dans la phase mobile augmente, mais ils demeurent néanmoins très supérieurs à ceux mesurés en phase liquide pour des teneurs inférieures à 10 % [6].

### 1.2.5 Polarité d'un fluide supercritique

La polarité d'un solvant peut être mesurée par son paramètre de solubilité de Hildebrand  $\delta$  [7] :

$$\delta = \sqrt{\frac{E^V}{V_m}}$$

$E^V$  est l'énergie de cohésion du solvant ;  $V_m$  le volume molaire.

Pour un fluide supercritique,  $\delta$  augmente avec la masse volumique [8], ce qui permet de disposer d'un paramètre supplémentaire pour la mise au point des séparations par simple variation de la pression et/ou de la température. Par ailleurs, un gradient de pression permettra aussi d'augmenter la masse volumique du fluide lors de la séparation et, partant, d'éluer des solutés de plus en plus polaires.

### 1.2.6 Solubilité dans un fluide supercritique

La solubilité d'un soluté dépend, en première approximation, de deux facteurs [9, 10] :

- le pouvoir solubilisant du fluide lié à sa nature et à sa masse volumique ;
- la volatilité éventuelle du soluté qui varie en fonction de la température.

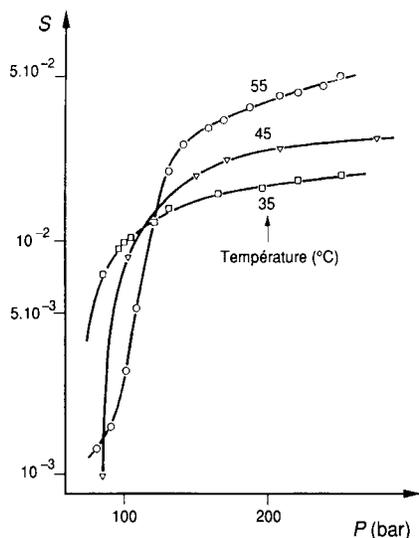
La figure 5 montre la variation de la solubilité du naphtalène (exprimée en fraction molaire) dans le dioxyde de carbone en fonction de la pression et de la température à masse volumique constante. Dans la gamme de pression considérée, la solubilité du naphtalène, comme celle de la plupart des solutés, est une fonction croissante de la pression (figure 5 a) et de la masse volumique

### 1.3 Principaux fluides utilisables en CPS

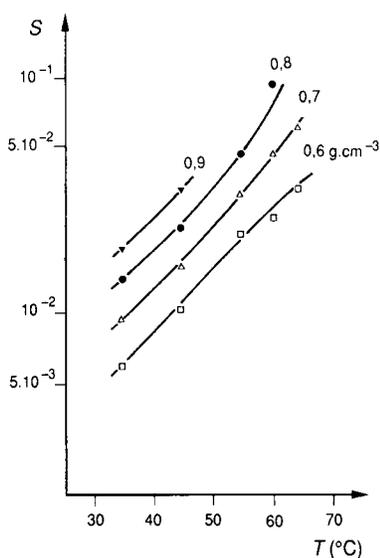
Le tableau 2 rassemble les fluides sélectionnés pour une éventuelle utilisation en chromatographie.

Parmi ceux-ci, le dioxyde de carbone est, de loin, le plus utilisé pour les raisons suivantes :

- facilité de manipulation compte tenu de sa température et de sa pression critiques (31 °C et 73,8 bar) ;
- bon pouvoir solvant et miscibilité avec la plupart des solvants ;
- compatibilité de sa température critique avec la stabilité thermique des solutés et des silices greffées ;
- absence de toxicité ;
- ininflammabilité ;
- absence de corrosion ;
- sans odeur ;
- coût peu élevé (environ 15 F le litre dans sa qualité technique ; 100 F le litre dans sa qualité N 45-99,995 % de pureté) ;
- disponibilité, si cela s'avère nécessaire, dans une très grande pureté ;
- transparence dans l'UV jusqu'à 200 nm et dans l'infrarouge, en particulier dans le domaine de nombre d'onde compris entre 800 et 1 600  $\text{cm}^{-1}$  ;
- couplage avec les détecteurs de la CPG.



(a)



(b)

**Figure 5 - Variation de la solubilité S du naphthalène (exprimée en fraction molaire) dans le CO<sub>2</sub> supercritique en fonction de la pression pour différentes températures (a), et en fonction de la température pour différentes masses volumiques (b) (d'après [11])**

(figure 5 b). L'augmentation de la solubilité avec la pression est d'autant plus forte que l'on est plus proche du point critique, c'est-à-dire que la compressibilité du fluide est grande.

La figure 5 b montre également que la solubilité est une fonction croissante de la température à masse volumique constante, cela en raison de l'augmentation de la volatilité du soluté (la pression de vapeur saturante du naphthalène augmente d'un facteur 7 lorsque la température passe de 35 à 55 °C).

Composé	Pression critique (bar)	Température critique (°C)	Masse volumique critique ( $\text{g.cm}^{-3}$ )
Dioxyde de carbone .....	73,8	31,0	0,448
Oxyde de diazote .....	71,4	36,5	0,457
Hexafluorure de soufre.....	37,1	45,6	0,752
Dichlorotétrafluoroéthane.	35,5	146,7	0,582
Isopropanol .....	47,0	253,3	0,273
Dioxyde de soufre .....	77,6	157,5	0,524
Méthyléthyléther .....	43,4	164,7	0,272
Xénon.....	58,0	16,6	1,105
Ammoniac .....	111,3	132,3	0,240
Éthane .....	48,3	32,4	0,203
n-Propane .....	41,9	96,7	0,217
Butane.....	37,5	152,0	0,228
n-Pentane.....	33,3	196,6	0,232
Dichlorodifluorométhane..	39,4	111,7	0,558
Dichlorofluorométhane .....	51,0	178,5	0,522
Trichlorofluorométhane ....	41,7	196,6	0,554
Eau .....	221	374,4	0,322

Les autres fluides sont beaucoup moins employés pour des raisons variées (polarité insuffisante, incompatibilité avec les phases stationnaires,...).

## 2. Propriétés chromatographiques du dioxyde de carbone

### 2.1 Aspect thermodynamique

#### 2.1.1 Influence de la masse volumique

Comme en CPL, la rétention dépend des interactions soluté-phase stationnaire, soluté-fluide supercritique et fluide supercritique-phase stationnaire. On peut gouverner les interactions soluté-CO<sub>2</sub> supercritique en faisant varier sa pression et, partant, sa masse volumique (figure 6). Toute diminution de la masse volumique entraîne une diminution de la polarité du CO<sub>2</sub> et, par suite, une augmentation des facteurs de capacité (on admet en première approximation que les interactions soluté-phase stationnaire sont indépendantes de la masse volumique du fluide).

#### 2.1.2 Influence de la température

À masse volumique constante, une augmentation de la température entraîne une diminution de la rétention dont l'ordre de grandeur dépend de la volatilité du soluté.

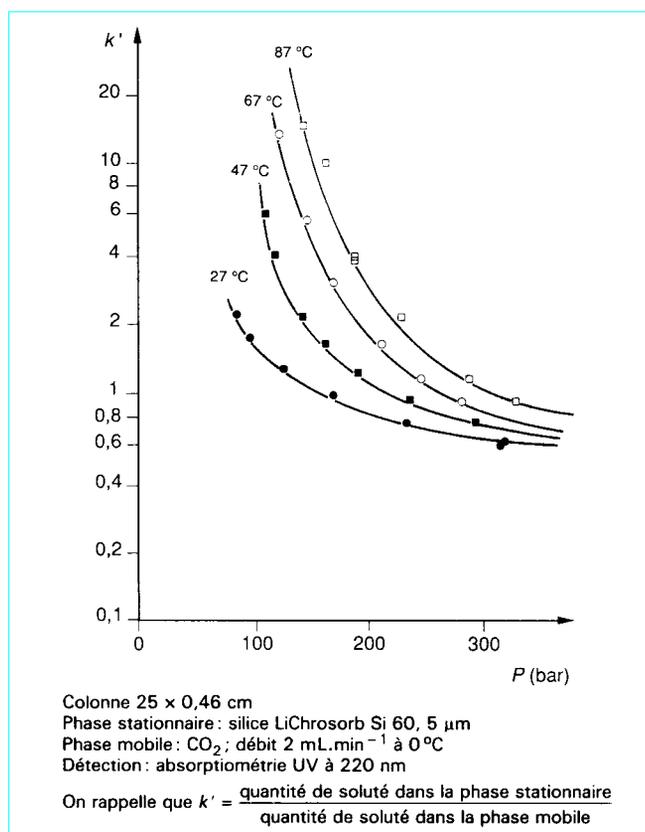


Figure 6 – Variation du facteur de capacité  $k'$  du phénanthrène en fonction de la pression à diverses températures (d'après [13])

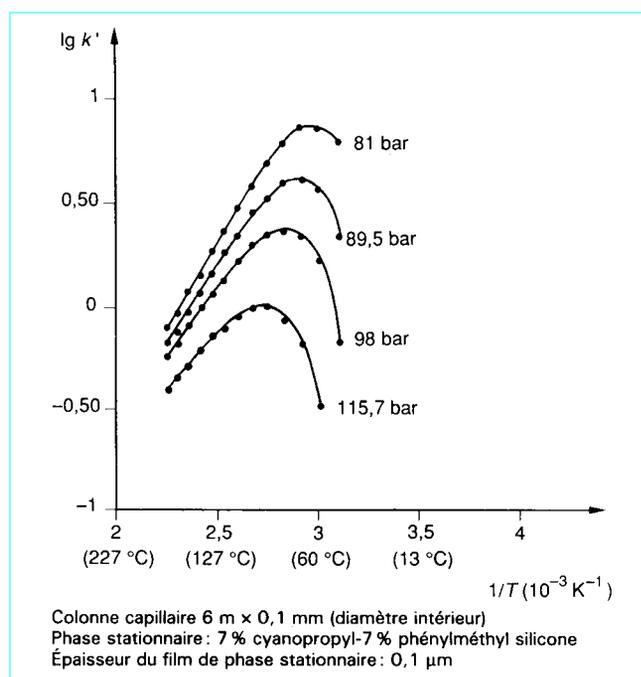


Figure 7 – Variation du logarithme du facteur de capacité de l'hexadécane à pression constante, en fonction de l'inverse de la température absolue (d'après [14])

À pression constante, une augmentation de la température peut entraîner soit une augmentation de la rétention du fait de la diminution de la masse volumique du CO<sub>2</sub>, soit, inversement, une diminution de la rétention liée majoritairement à la volatilité du soluté. À titre d'exemple, la figure 7 montre l'évolution du logarithme du facteur de capacité de l'hexadécane en fonction de la température pour différentes valeurs de la pression du CO<sub>2</sub>. Par exemple, pour une pression de 115,7 bar, l'inversion du comportement a lieu pour une température voisine de 100 °C.

#### 2.1.3 Addition de modificateurs polaires

L'addition d'un solvant polaire, en faible teneur, au CO<sub>2</sub> en phase supercritique permet de gouverner la rétention et la sélectivité des solutés spécialement avec les colonnes remplies. En ce qui concerne les chromatographies d'adsorption et de partage normal, le choix du solvant est effectué selon la même démarche qu'en CPL [15]. Avec les phases stationnaires apolaires, les mécanismes de rétention avec le CO<sub>2</sub> sont très différents de ceux de la CPL (on ne peut évoquer ici l'effet hydrophobe). Il y a partage entre une phase stationnaire apolaire et une phase éluante apolaire ou peu polaire. On observe une diminution de la rétention avec la teneur en modificateur polaire comparable à celle observée en chromatographie d'adsorption ou de partage normal (par exemple la rétention des phénols décroît fortement avec la teneur en méthanol de la phase éluante par recouvrement des silanols résiduels de la phase stationnaire ou (et) association soluté-alcool dans la phase éluante par formation de liaisons hydrogène).

Pour les séparations chirales, la mise en œuvre de mélanges CO<sub>2</sub> – modificateurs polaires permet soit de conserver la même sélectivité qu'en CPL (phases stationnaires de type Pirkle), soit d'obtenir des sélectivités particulières (phases stationnaires greffées cyclodextrine ou cellulose modifiée), tout en diminuant la durée des séparations [16, 17].

Avec les colonnes capillaires, l'influence de l'ajout de modificateurs polaires dans le CO<sub>2</sub> est beaucoup plus faible, vraisemblablement à cause de la désactivation (absence de groupements silanol résiduels) de ce type de phase stationnaire. Par ailleurs, ces colonnes sont très souvent couplées à une détection à ionisation de flamme, ce qui exclut l'ajout de tout modificateur polaire à l'exception de l'eau et de l'acide formique dans la phase éluante.

### 2.1.4 Gradients d'éluion

La rétention peut être gouvernée par la masse volumique (pression et température) du CO<sub>2</sub> et sa teneur en modificateur polaire. Ces différents paramètres peuvent être modifiés par programmation au cours de la séparation.

#### ■ Masse volumique

L'augmentation de la solubilité des solutés avec la masse volumique a permis de développer une technique similaire à la programmation de température en CPG ou de polarité de l'éluant en CPL. En général, les gradients de masse volumique sont obtenus par l'intermédiaire d'une programmation de la pression du fluide plutôt que par la diminution de sa température à pression constante [18]. Le profil du gradient de masse volumique dépend du type de colonne utilisé (capillaire ou remplie) et de sa longueur. Avec les colonnes capillaires longues (supérieures à 10 m), la programmation de la pression est de quelques bars par minute, tandis qu'avec les colonnes courtes elle peut atteindre 100 bar par minute. On choisit, le plus souvent, une programmation linéaire de la masse volu-

mique, ce qui exige une variation non linéaire de la pression afin de compenser à la fois le profil non strictement linéaire des isothermes pression-masse volumique et la compressibilité du fluide contenu dans le volume mort du système chromatographique.

La programmation de la masse volumique qui permet d'accélérer l'éluion des solutés les plus polaires est majoritairement utilisée avec les **colonnes capillaires couplées à une détection par ionisation de flamme**. Toutefois, elle est également mise en œuvre avec des mélanges CO<sub>2</sub> – modificateurs polaires ; à titre d'exemple, la figure 8 compare la séparation des isomères du Triton X114 (tensioactif moléculaire) par éluion graduée à l'aide de méthanol ou de la masse volumique du CO<sub>2</sub>. On observe des rétentions du même ordre de grandeur dans les deux cas, mais une « efficacité » très supérieure dans le cas du gradient de masse volumique du CO<sub>2</sub> [19].

#### ■ Teneur en modificateur polaire

Les gradients de modificateur polaire sont essentiellement mis en œuvre avec des colonnes remplies [20] et la détermination de leurs profils est effectuée selon la même démarche qu'en CPL.

#### ■ Masse volumique et modificateur polaire

On peut, dans le cas de la séparation de mélanges complexes, associer des gradients de masse volumique et de modificateur polaire, ce qui offre un degré de liberté supplémentaire à la CPS par rapport à la CPL [21].

Le tableau 3 montre l'influence des différents paramètres (phase stationnaire, nature de la phase mobile, pression et température), pour les trois techniques chromatographiques.

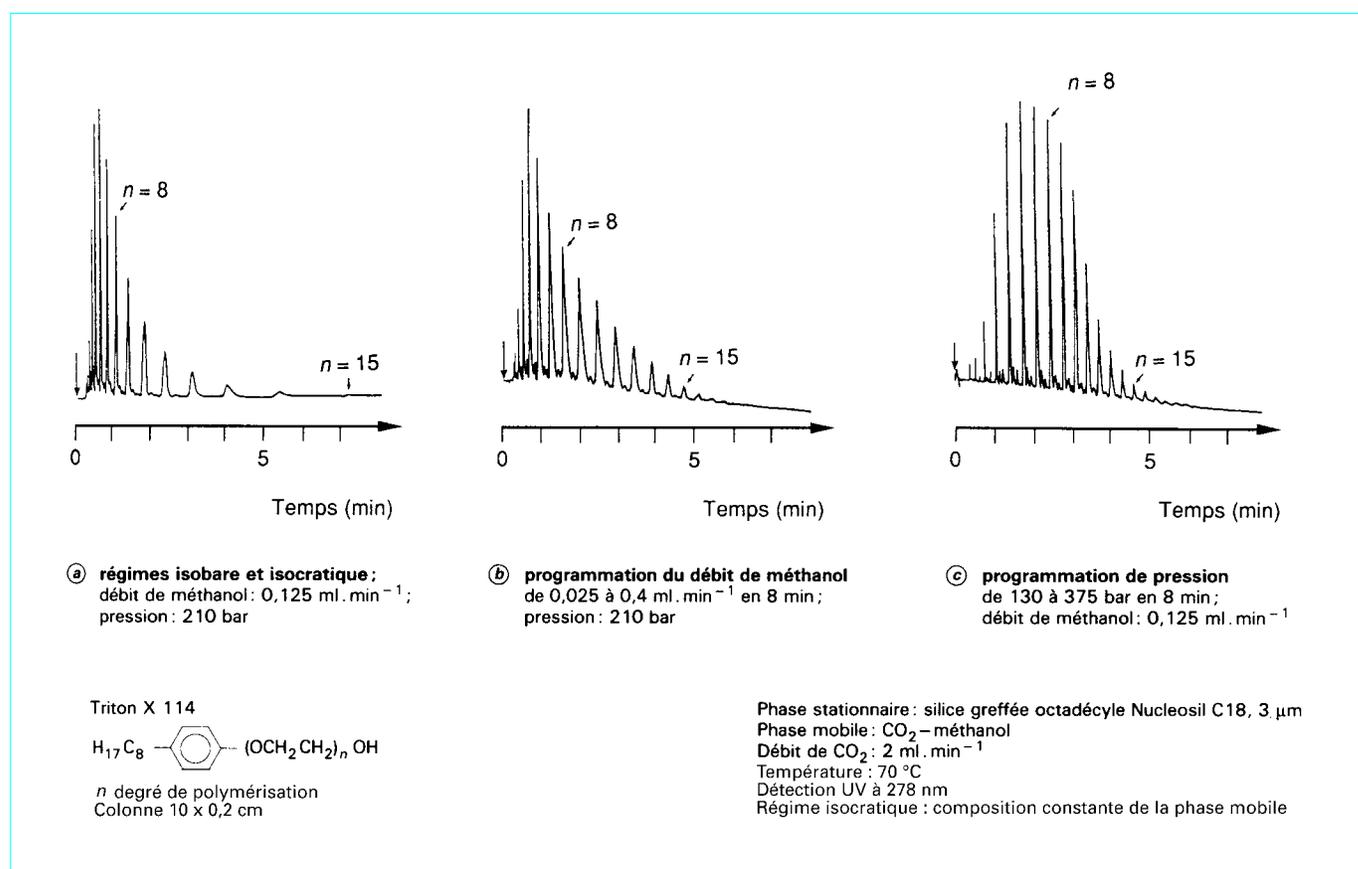


Figure 8 – Séparation par chromatographie en phase supercritique du Triton X114 (d'après [19])

**Tableau 3 – Influence de différents paramètres sur la séparation (1)**

Paramètre	CPG	CPL	CPS
Phase stationnaire	+	+	+
Composition de la phase mobile	-	+	+
Pression	-	-	+
Température	+	±	+

(1) + forte influence  
- faible influence

## 2.2 Aspect cinétique

L'efficacité d'une colonne est mesurée par le nombre de plateaux théoriques  $N$  de la colonne.

Le nombre de plateaux par unité de temps ( $N/t_0$ ) généré par une colonne chromatographique est donné par la relation :

$$\frac{N}{t_0} = \frac{v}{h} \frac{D_m}{d^2}$$

- avec  $v = ud / D_m$  vitesse réduite de la phase mobile,
- $h = H / d$  hauteur de plateau réduite,
- $d$  diamètre des particules de la phase stationnaire (colonne remplie) ou diamètre intérieur de la colonne capillaire,
- $H$  hauteur équivalente à un plateau théorique,
- $D_m$  coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile,
- $u$  vitesse linéaire de la phase mobile,
- $t_0$  temps de rétention d'un composé non retenu.

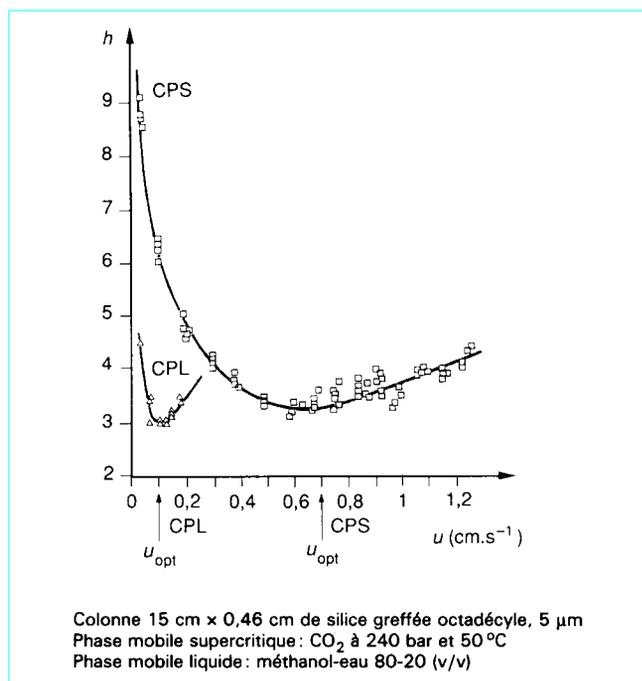
Le rapport  $v/h$  est le même en CPS et en CPL ; par suite, toutes choses égales par ailleurs, le nombre de plateaux par unité de temps est proportionnel à  $D_m$ . Or on montre que les valeurs de  $D_m$  dans un fluide supercritique sont supérieures à celles dans les liquides (§ 1.2.4) ; on obtiendra donc toujours en CPS un nombre de plateaux par unité de temps plus grand qu'en CPL. La figure 9 compare la variation de la hauteur de plateau réduite du phénanthrène en fonction de la vitesse linéaire de la phase mobile en CPL (mélange méthanol-eau 80-20 v/v) et en CPS (dioxyde de carbone supercritique). On constate que les vitesses optimales sont dans un rapport 7 sensiblement égal au rapport des coefficients de diffusion du phénanthrène dans les deux phases mobiles [22]. De plus, les valeurs élevées des coefficients de diffusion dans le dioxyde de carbone supercritique abaissent la résistance au transfert de masse du soluté, ce qui se traduit, pour les vitesses supérieures à  $u_{opt}$ , par une diminution de l'efficacité beaucoup plus faible qu'en CPL.

### ■ Influence de la masse volumique et de l'ajout de modificateur polaire

Quand la masse volumique du  $CO_2$  augmente [23, 24] ou lorsqu'on ajoute un modificateur polaire [6],  $D_m$  diminue et l'efficacité par unité de temps aussi. Du point de vue cinétique, on a donc intérêt à limiter la masse volumique du  $CO_2$  ainsi que sa teneur en modificateur polaire.

### ■ Influence de la température

À masse volumique constante, une augmentation de la température a deux avantages ; elle accroît la valeur des coefficients de diffusion des solutés dans le fluide et la volatilité des solutés, ce qui



**Figure 9 – Variation de la hauteur de plateau réduite, mesurée sur le pic d'éluion du phénanthrène, en fonction de la vitesse linéaire de l'éluant en CPL et CPS (d'après [22])**

a pour effet de diminuer leur rétention et d'augmenter l'efficacité [24].

Du point de vue cinétique, les conditions optimales nécessitent le choix d'une faible masse volumique du  $CO_2$ , et d'une température assez élevée (> 100 °C), ce qui est souvent le cas avec les colonnes capillaires.

## 3. Colonnes et phases stationnaires

La CPS met en œuvre aussi bien la grande majorité des colonnes remplies de la CPL que des colonnes capillaires dont la phase stationnaire est greffée.

### 3.1 Colonnes remplies

On utilise en CPS les mêmes géométries et la même variété de phases stationnaires qu'en CPL, y compris la grande majorité des phases stationnaires chirales (à l'exclusion des phases stationnaires incompatibles avec la CPS comme les échangeurs d'ions par exemple). Toutefois, on choisira de préférence un **phase stationnaire de forme sphérique** et des conditions de travail ( $P$ ,  $T$  et débit de phase mobile) permettant de minimiser la perte de charge qui peut occasionner un gradient de masse volumique dans la colonne et, partant, un étalement thermodynamique de la bande de soluté [22, 25], surtout lorsque des colonnes de grande longueur sont mises en œuvre.

Du fait de la présence de groupements silanol résiduels, les silices greffées exigent, très souvent, l'addition d'un modificateur polaire dans le CO<sub>2</sub>, ce qui réduit les possibilités de détection. Aussi, récemment, des phases polymériques [26] ainsi que des silices greffées spécialement traitées [27] ont été proposées pour la séparation de solutés de polarité variée avec du CO<sub>2</sub> pur.

### 3.2 Colonnes capillaires

Le diamètre des colonnes capillaires commercialisées pour la CPS est de 50 µm pour une longueur comprise entre 5 et 20 m. Les phases stationnaires sont greffées à la surface des parois afin d'éviter leur dissolution et leur entraînement mécanique par le fluide. L'épaisseur du film de phase stationnaire varie entre 0,25 et 0,5 µm. Toutes les phases greffées de la CPG peuvent être mises en œuvre à condition que le diamètre interne de la colonne soit inférieur ou égal à 100 µm. Des phases stationnaires originales (octyle [28], biphényle, liquide dans un état smectique [29]) sont également commercialisées.

### 3.3 Avantages et inconvénients des colonnes remplies et capillaires

Ces deux types de colonnes ne sont pas concurrents mais complémentaires et leur choix dépend exclusivement de la nature de l'échantillon et des objectifs poursuivis [31, 32]. Le tableau 4 rassemble leurs avantages et inconvénients. Les principaux avantages des colonnes remplies sont la grande variété des phases stationnaires, les possibilités de transposition à l'échelle préparative et une technologie simplifiée, en particulier dans le contrôle et la régulation de pression. Les colonnes capillaires présentent l'avantage d'une plus grande efficacité et d'un couplage plus aisé avec les détecteurs de la CPG et la spectrométrie de masse.

## 4. Appareillage

Il diffère sensiblement selon le type de colonne, capillaire ou remplie. Dans le premier cas, il se rapproche de celui de la CPG et, dans le second cas, de celui de la CPL.

### 4.1 Colonnes capillaires

La figure 10 représente un schéma type d'appareillage utilisé en CPS avec des colonnes capillaires.

#### ■ Système de pompage

Le fluide est toujours pompé à l'état liquide de façon à maintenir l'efficacité de la pompe. Dans le cas du CO<sub>2</sub>, on utilise des bouteilles munies d'un tube plongeur et l'on refroidit (0 °C) la ligne de transfert vers la pompe et le corps de pompe, qui est généralement de type seringue [33]. Grâce à un asservissement de la pression, on peut effectuer des gradients de masse volumique par augmentation du débit de la pompe seringue.

#### ■ Injection

Les dispositifs d'injection à boucle interne (Valco CI4W ou Rheodyne 7520) de la microchromatographie en phase liquide sont utilisés généralement avec une division de débit (*split*). Les appareils commerciaux offrent aussi la possibilité d'effectuer l'injection des solutés durant une période de temps très brève (quelques dixièmes de seconde) et contrôlée grâce à la motorisation de la vanne (*moving injection* ou injection aller-retour).

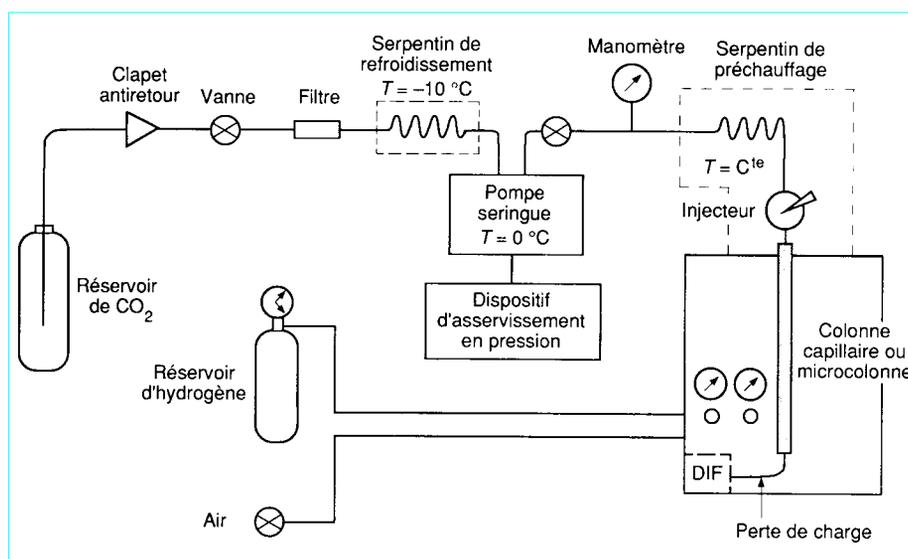
Avec une détection par ionisation de flamme, on peut s'affranchir du pic solvant en effectuant, immédiatement après l'injection, une élimination du solvant de l'échantillon par une « ventilation » de la colonne à l'aide d'un gaz inerte par exemple [34, 35].

#### ■ Régulation de la température

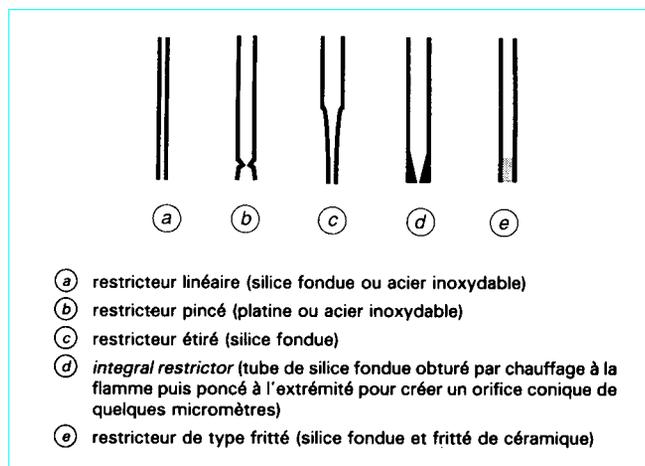
Le contrôle de la température de l'injecteur, de la colonne capillaire et de la phase mobile est assuré par un four thermorégulé.

**Tableau 4 – Avantages et inconvénients des colonnes capillaires et remplies (d'après [30])**

Avantages	Inconvénients
<b>COLONNES REMPLIES</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contrôle aisé de la pression</li> <li>• Grande variété de phases stationnaires</li> <li>• Efficacité par unité de temps généralement supérieure à celle des colonnes capillaires</li> <li>• Grande efficacité avec les colonnes longues</li> <li>• Faible durée d'analyse (sauf avec les colonnes longues)</li> <li>• Capacité très supérieure à celle des colonnes capillaires</li> <li>• Transposition possible à l'échelle préparative</li> <li>• Gradients multiples (masse volumique + modificateurs polaires)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Débits importants, les fluides onéreux (xénon) ou dangereux (alcane) ne peuvent être utilisés</li> <li>• Couplage avec le détecteur à ionisation de flamme exigeant une division de débit de l'effluent</li> <li>• Gradient de pression dans la colonne pouvant entraîner un gradient de masse volumique et, partant, un étalement thermodynamique des pics d'éluion</li> </ul>
<b>COLONNES CAPILLAIRES</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grande efficacité possible (&gt; 100 000 plateaux) dans un temps raisonnable</li> <li>• Phases stationnaires désactivées</li> <li>• Faible perte de charge</li> <li>• Possibilité d'utiliser des solvants coûteux (xénon) ou dangereux (alcane)</li> <li>• Facilité de programmation de la masse volumique</li> <li>• Couplage aisé avec les détecteurs de la CPG et la spectrométrie de masse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contrôle de la pression assez délicat</li> <li>• Faible capacité</li> <li>• Volume d'injection très faible</li> <li>• Efficacité par unité de temps plus faible qu'avec les colonnes remplies</li> <li>• Faible possibilité de modifier la rétention par l'ajout de modificateurs polaires</li> </ul>



**Figure 10 – Principe d'un chromatographe en phase supercritique opérant avec des colonnes capillaires ou des microcolonnes remplies, et détection à ionisation de flamme (DIF)**



**Figure 11 – Différents types de restricteurs utilisés en chromatographie en phase supercritique**

■ **Régulation de la pression**

Comme la régulation de la température, celle de la pression est essentielle car ces deux paramètres fixent la masse volumique du fluide et, par conséquent, sa force éluante. Dans tous les cas, elle est réalisée à l'aide de restricteurs (figure 11) placés en amont du détecteur (DIF, spectromètre de masse,...) ou, beaucoup plus rarement, en aval (détecteurs spectrophotométrique et spectrofluorimétrique).

En accord avec Smith et al. [36], on peut dire que c'est encore le point délicat de l'appareillage, en raison du fonctionnement du restricteur qui peut devenir aléatoire, essentiellement lors de la séparation de composés lourds, par risque de précipitation des solutés dans ce dernier lors de la détente du fluide supercritique, ce qui modifie sa perméabilité. Mentionnons que les restricteurs doivent être chauffés à des températures de l'ordre de 350-400 °C afin d'éviter leur obturation par formation de carboglace lors de la détente du CO<sub>2</sub> et de minimiser les risques de précipitation des solutés.

■ **Détection**

En CPS, la détection peut être effectuée de deux manières différentes : soit directement dans le fluide à l'état supercritique ou subcritique, soit, après décompression du fluide, à l'état gazeux. La CPS utilise donc à la fois les détecteurs de la CPL et ceux de la CPG, mettant ainsi à son profit les progrès technologiques effectués dans ces deux techniques.

Avec les colonnes capillaires, on utilise majoritairement la détection en milieu gazeux (DIF et spectrométrie de masse [37, 38]). Les autres types de détecteurs de la CPG sont moins employés (détecteur thermoionique [39], photométrie de flamme [40], capture d'électrons [41]). Quelques exemples font aussi appel à une détection en milieu supercritique, spectrophotométrie UV [42] ou infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF) [43]. Le couplage en différé CPS-IRTF (par élimination du fluide par détente et dépôt des solutés sur une micropastille de KBr ou de ZnSe déplacée en continu ou de façon séquentielle après chaque pic) est également mis en œuvre. Il nécessite, dans le cas des colonnes capillaires, l'adjonction d'un module microscopique au spectrophotomètre infra-rouge [44].

**4.2 Colonnes remplies**

La figure 12 représente un schéma type d'un chromatographe en phase supercritique avec des colonnes remplies. Il est à noter que, pour les colonnes remplies de diamètre inférieur ou égal à 1 mm, on peut utiliser le même appareillage qu'en CPS capillaire.

■ **Système de pompage**

Le fluide est pompé à l'état liquide au moyen des pompes à piston de la CPL en prenant soin de refroidir le corps de pompe pour éviter les phénomènes de cavitation. L'ajout de modificateur polaire est réalisé à l'aide d'une seconde pompe.

■ **Injection**

Les injecteurs à boucle externe de la CPL sont classiquement utilisés. Le volume de la boucle dépend du diamètre des colonnes.

■ **Régulation de la température**

Le montage est très similaire à celui de la CPL, la régulation de la température du fluide et de la colonne chromatographique est assurée soit par un bain thermostaté, soit par un four.

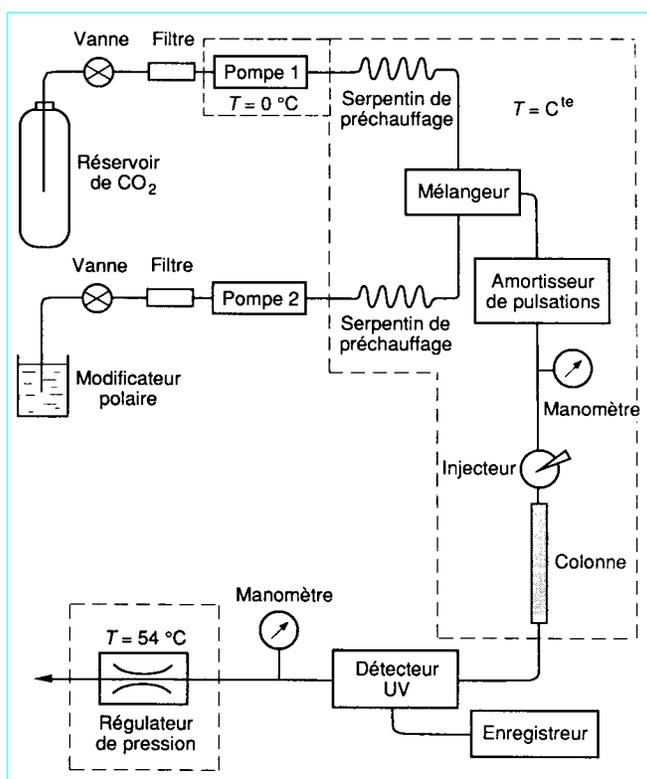


Figure 12 - Principe d'un chromatographe en phase supercritique opérant avec des colonnes remplies et détection par spectrophotométrie dans l'ultraviolet

#### ■ Régulation de la pression

Du fait que la détection est le plus souvent réalisée en milieu supercritique ou subcritique, la régulation de la pression dans le système chromatographique est effectuée en aval du détecteur au moyen d'une soupape Tescom [45] ou, sur certains appareils commerciaux, d'une vanne gérée par microprocesseur. C'est, sans aucun doute, le moyen le plus simple et le plus reproductible de réguler la pression en CPS, puisque le contrôle de la pression est indépendant du débit du fluide supercritique pourvu que celui-ci soit supérieur à  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  (à  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Ce type de dispositif peut être asservi de façon à pouvoir effectuer des gradients de pression, donc de masse volumique du fluide [19]. Dans le cas d'une détection à l'état gazeux, on assure le transfert des solutés dans le détecteur à l'aide de restricteurs comme pour les colonnes capillaires. Cependant, lorsqu'une division de débit est nécessaire (colonnes de diamètre intérieur  $> 1 \text{ mm}$ ), on peut conserver le bénéfice de l'emploi de la vanne de régulation qui est alors placée en dérivation ; ainsi, débit et pression demeurent indépendants ; le débit dans le restricteur dépend seulement de la géométrie de ce dernier (diamètre de l'orifice généralement) et de la pression imposée par la vanne.

#### ■ Détection

La plupart des détecteurs de la CPL (spectrophotomètres UV et spectrofluorimètres) ont été mis en œuvre après adaptation de la cellule aux hautes pressions (350 bar). De plus, le couplage avec l'IRTF est utilisé grâce à la mise au point de cellules haute pression en séléniure de zinc et à la transparence du  $\text{CO}_2$  dans un grand domaine de longueur d'onde [46]. On peut également mettre en œuvre les détecteurs de la CPG à condition de respecter les débits admissibles et la compatibilité de l'effluent de la colonne avec le

détecteur choisi (par exemple, pas de modificateur polaire autre que l'eau ou l'acide formique avec le DIF) [47].

Enfin, le détecteur à diffusion de la lumière est bien adapté aux mélanges fluide supercritique-modificateurs polaires volatils, ce qui le rend complémentaire du DIF [48, 49].

## 5. Applications

Les propriétés des fluides supercritiques procurent à la CPS une partie des avantages de la CPL (pouvoir solvant et sélectivité de la phase mobile, grande variété de phases stationnaires) et de la CPG (détection universelle et sensible, grande efficacité). Aussi, n'est-il pas surprenant que la CPS permette de résoudre, souvent de façon plus performante, des séparations effectuées avec les deux autres méthodes.

Il y a donc un recouvrement des domaines d'applications des trois méthodes ; le domaine propre de la CPS concerne essentiellement les solutés de hautes masses moléculaires ( $MM > 1000$ ) ou thermolabiles dépourvus de groupements chromophores et, de façon plus générale, de groupements réactifs. De plus, la sélectivité particulière des fluides supercritiques permet d'effectuer des séparations originales (isomères optiques, sucres,...).

Le tableau 5 qui ne saurait être exhaustif, résume les principaux domaines d'applications de la CPS.

À titre d'exemples, nous donnons ci-après quelques applications typiques de la CPS.

La majeure partie des phases chirales de la CPL peut être mise en œuvre en CPS avec des mélanges  $\text{CO}_2$  - modificateurs polaires. Pour certaines d'entre elles (phases de type Pirkle), la sélectivité est souvent comparable à celle de la CPL (bien que des sélectivités tout à fait particulières aient été récemment observées) ; en revanche, d'un point de vue cinétique, le gain est important comme le démontre la figure 13 qui compare la variation de la résolution en fonction de la durée de la séparation d'un amide chiral. Pour une durée d'analyse constante, la résolution est toujours plus grande en CPS dans le domaine de temps considéré. Pour d'autres phases, le gain en stéréosélectivité peut être appréciable comme le montrent les figures 14 et 15 où l'on observe simultanément un accroissement de la sélectivité (dû probablement à la modification de la structure des cavités chirales de la cellulose sous l'influence de la pression) et un gain de temps important.

La figure 16 montre la séparation, après silanisation, des polyglucoses contenus dans des sirops de maïs, où l'on met en évidence la présence d'oligomères ayant un degré de polymérisation égal à 18, ce qui correspond à une masse moléculaire de 2 934 (6 966 après silanisation) et dépasse largement les possibilités actuelles de la CPG (la CPL, quant à elle, souffre de l'absence de détecteur suffisamment sensible). Pour chaque masse molaire, deux formes anomères coexistent, ce qui explique la présence de doubles pics.

La figure 17 illustre la séparation de composés thermosensibles tels que les composés azoïques. Pour la majorité d'entre eux, l'absence de groupement chromophore rend inopérante la mise en œuvre de la CPL.

La figure 18 montre la séparation d'un mélange d'additifs de polymères sur colonne capillaire associée à une détection par ionisation de flamme. On remarquera la qualité de la séparation obtenue grâce à la grande efficacité de la colonne capillaire. Ce mode opératoire est utilisé pour identifier ces additifs par spectrométrie IRTF après détente de l'effluent et dépôt des solutés sur des micro-pastilles de KBr. Le couplage d'un microscope au spectrophotomètre infrarouge permet d'obtenir des spectres pour des échantillons de l'ordre de 100 ng.

On remarquera que ces trois séparations de mélanges complexes sont effectuées à l'aide d'un gradient de masse volumique du  $\text{CO}_2$ .

Tableau 5 – Principales applications de la CPS

Famille	Type de solutés	Colonne (1)	Détecteur (2)	Références
Médicaments	Antibiotiques	C	DIF	[50]
	Alcaloïdes	R	UV	[51]
	Stéroïdes	C, R	DIF, UV	[29, 52]
	Vitamines	C	DIF	[53]
	Benzodiazépines	R	UV	[54]
	Lipides	C	DIF	[55]
	Antidépresseurs	C (NH <sub>3</sub> )	UV	[56]
Produits naturels	Nucléotides	C	DIF	[57]
	Coumarines	R	UV	[58]
	Terpènes	R	IRTF	[59]
	Extraits (café, vanille, poivre,...)	R	UV, IRTF	[60, 61, 62]
	Sucres	R	DDL	49
Acides gras et dérivés	Acides et alcools gras	C, R	DIF, UV	[63, 64, 65] [26]
	Esters, triglycérides			
Isomères optiques	Oxydes de phosphine	R	UV	[16, 17]
	Lactones, lactames			
	β Bloquants			
	Sulfoxydes			
Pesticides	Carbamates	C, R	DIF, UV, SM	[66, 67, 68, 69]
	Pyréthrine			
	Organophosphorés			
	Sulfonylurées			
Polymères et additifs	Polyéthylène glycols	C, R	DIF, UV, IRTF	[70] à [75]
	Polystyrènes			
	Polysiloxanes			
	Isocyanates			
	Dérivés phénolés			
Produits pétroliers	Cires	C, R	DIF, UV, SM	[47, 76, 77, 78]
	Hydrocarbures aromatiques polynucléaires			
	Hydrocarbures saturés oléfiniques, aromatiques			
	Composés polaires			
Divers	Amines	C, R	DTI, DIF, UV	[15], [79] à [84]
	Organométalliques			
	Phtalates, explosifs			
	Antraquinones			

(1) C : colonne capillaire

R : colonne remplie

(2) DIF : détecteur à ionisation de flamme

DDL : détecteur à diffusion de la lumière

DTI : détecteur thermo-ionique

IRTF : spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier

SM : spectrométrie de masse

UV : absorptiométrie dans l'ultraviolet

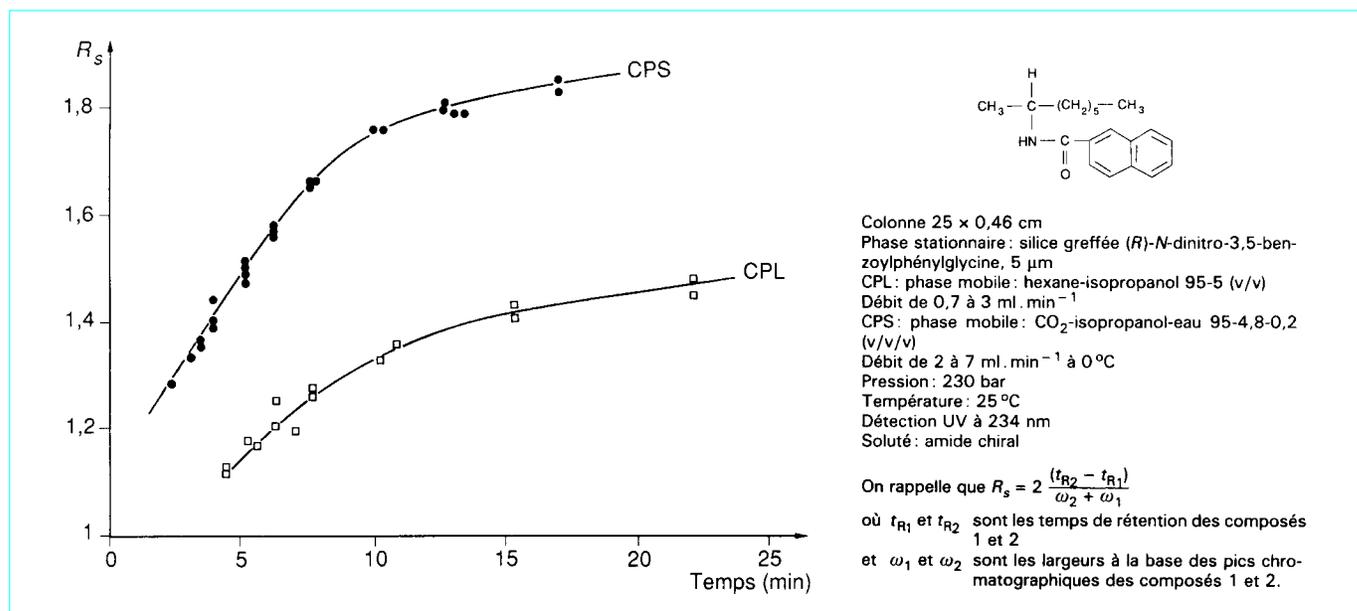
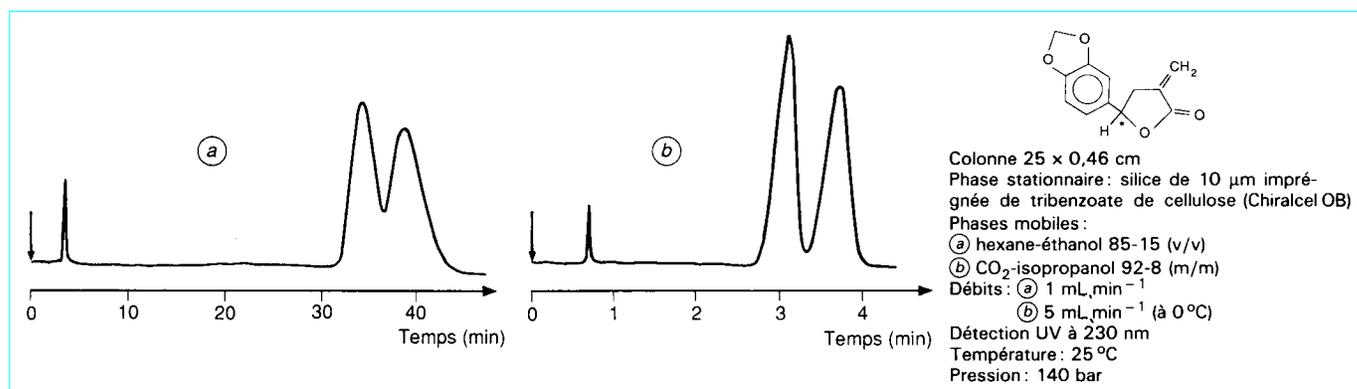

 Figure 13 - Variation de la résolution  $R_s$  en fonction de la durée de la séparation en chromatographie en phases liquide et subcritique (d'après [87])


Figure 14 - Séparation d'une α-méthylène γ-lactone par chromatographie en phase liquide (a) et en phase supercritique (b) (d'après [17])

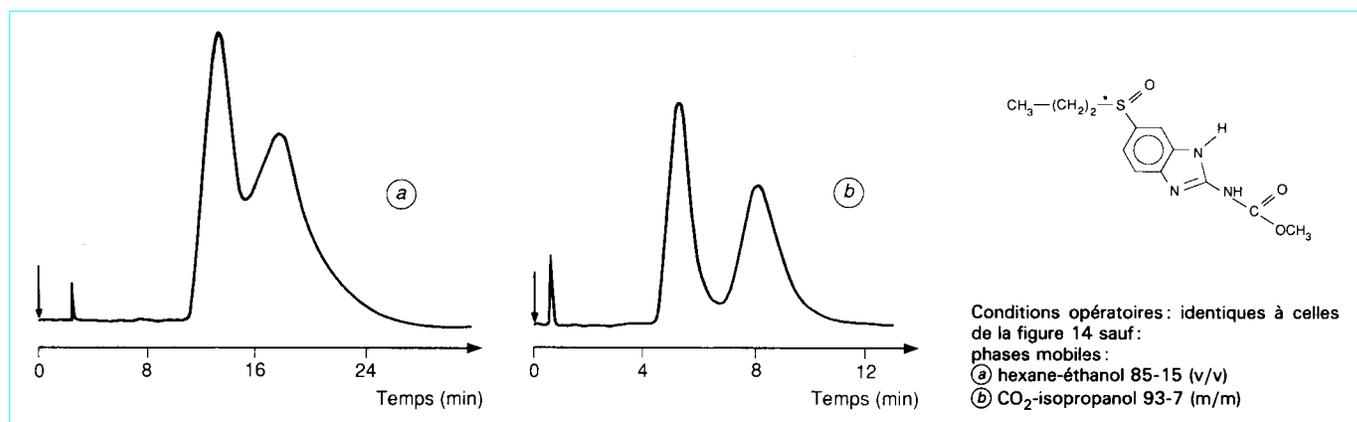


Figure 15 - Séparation du sulfoxyde d'albendazole par chromatographie en phase liquide (a) et en phase supercritique (b) (d'après [17])

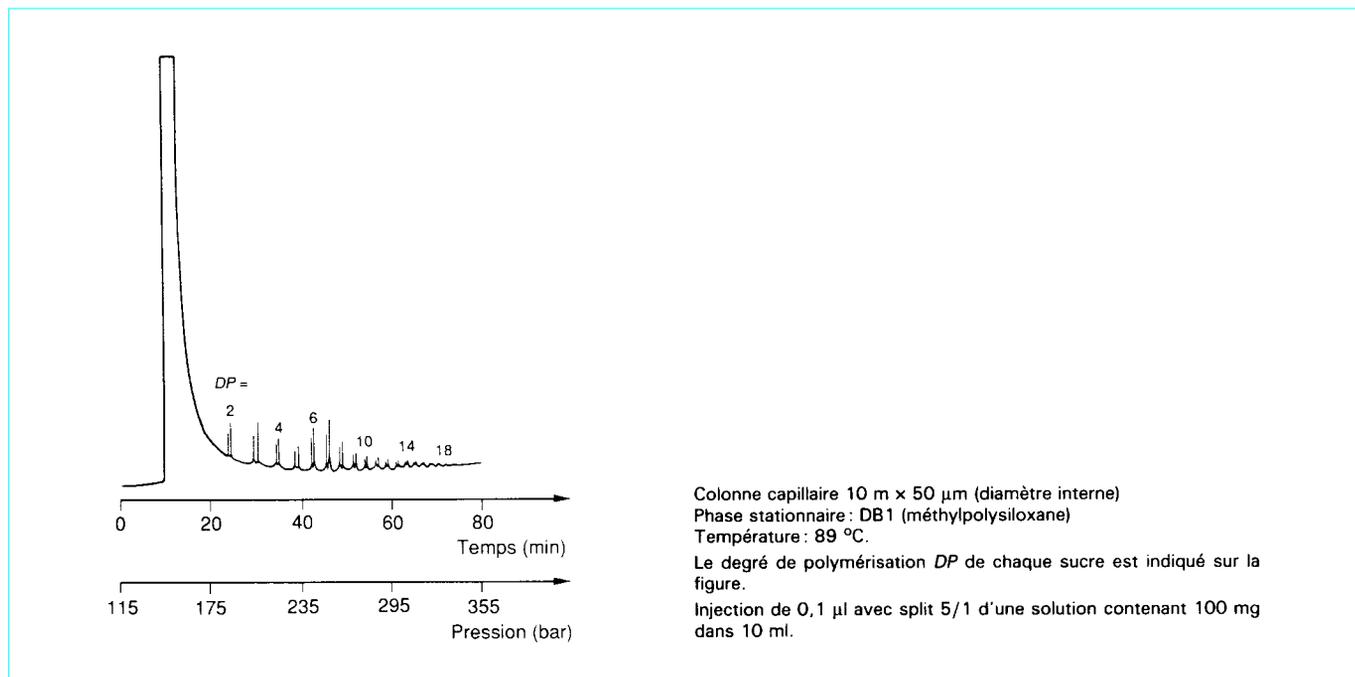


Figure 16 - Chromatogramme obtenu par couplage CPS-DIF sur un échantillon de sirop de maïs (d'après [85])

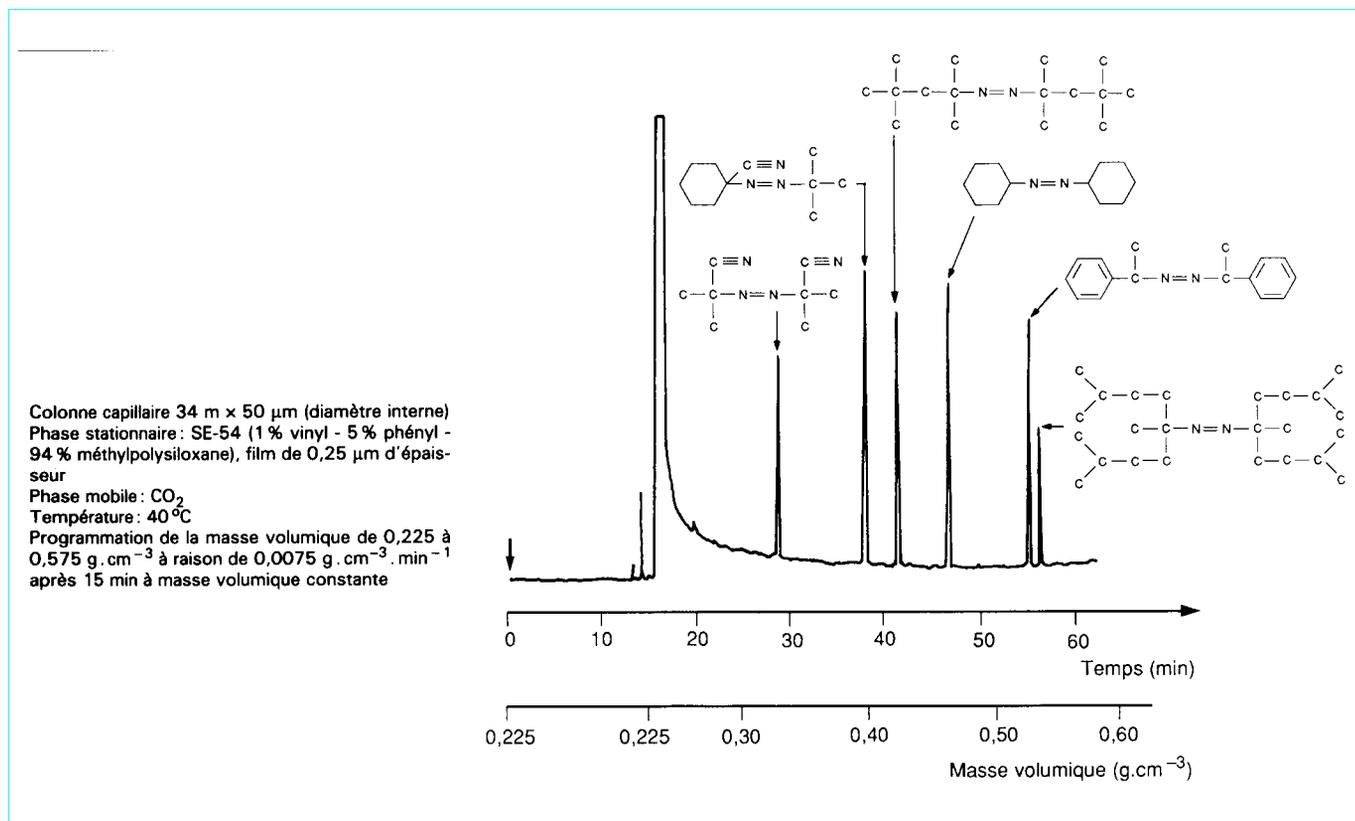
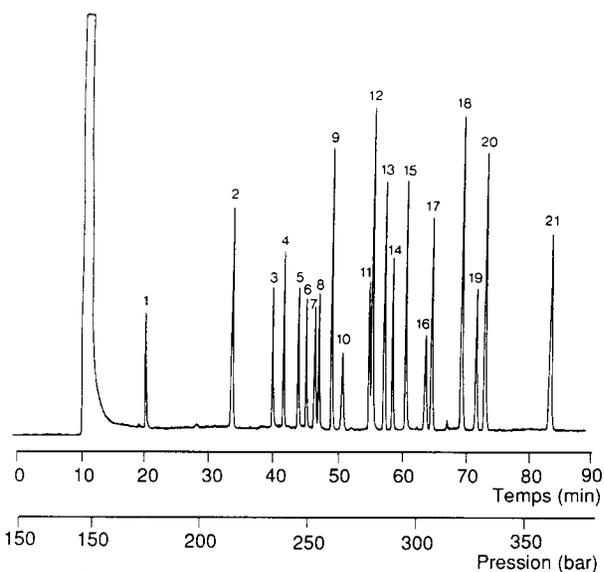


Figure 17 - Séparation de composés azoïques par chromatographie en phase supercritique (d'après [86])



Colonne capillaire 10 m x 50  $\mu$ m (diamètre interne)  
 Phase stationnaire : SB méthyle (méthylpolysiloxane), film de  
 0,25  $\mu$ m d'épaisseur  
 Phase mobile : CO<sub>2</sub>  
 Température : 140°C  
 Programmation de la pression de 150 à 350 bar à raison de  
 3 bar par minute après 12 min à pression constante  
 Quantité injectée : 20 ng de chaque soluté  
 Détection : DIF

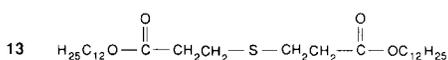
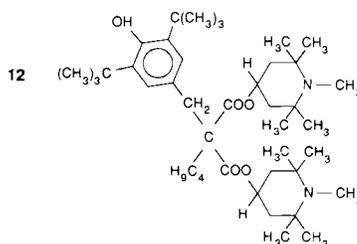
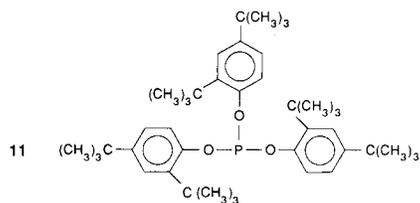
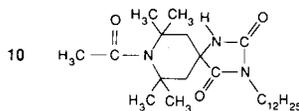
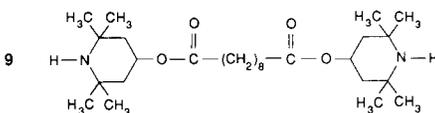
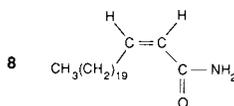
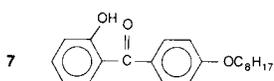
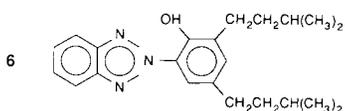
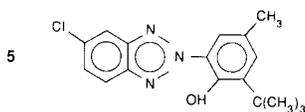
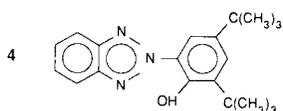
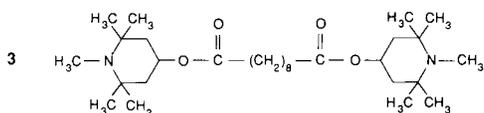
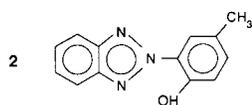
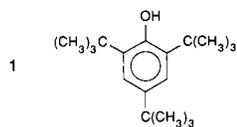


Figure 18 - Séparation d'additifs de polymères par chromatographie en phase supercritique (d'après [44])

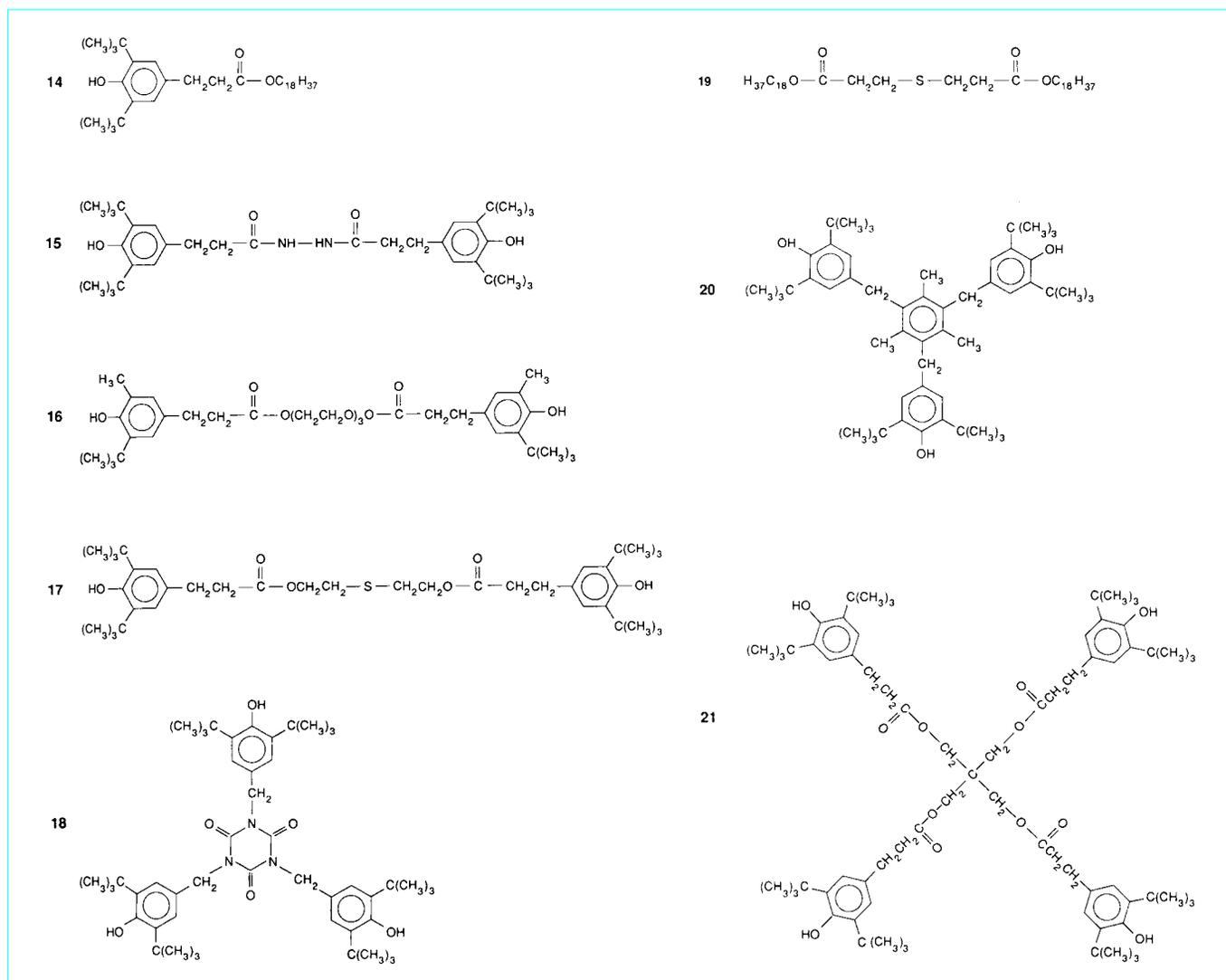


Figure 18 – Séparation d'additifs de polymères par chromatographie en phase supercritique (d'après [44]) (suite et fin)

## Références bibliographiques

- [1] KLESPIER (E.), CORWIN, (A.H.) et TURNER (D.A.). – *High pressure gas chromatography above critical temperatures*. J. Org. Chem. 27 1962 p. 700.
- [2] SMITH (R.M.). – *Supercritical chromatography*, series RSC Chromatography Monographs, The Royal Society of Chemistry, London 1988.
- [3] CROWTHER (J.B.) et HENION (J.D.). – *Supercritical fluid chromatography of polar drugs using small particle packed columns with mass spectrometry*. Anal. Chem., 57 1985 p. 2711.
- [4] YONKER (C.R.) et SMITH (R.D.). – *Study of retention processes in capillary supercritical fluid chromatography with binary fluid mobile phases*. J. Chromatogr., n° 361 1986 p. 25.
- [5] SPRINGSTON (S.R.) et NOVOTNY (M.). – *Mobile phase solute mass transfer in supercritical fluid chromatography*. Anal. Chem., 56 1984 p. 1762.
- [6] SASSIAT (P.), MOURIER (P.), CAUDE (M.) et ROSSET (R.). – *Measurement of diffusion coefficients in supercritical carbon dioxide and correlation with the equation of Wilke and Chang*. Anal. Chem. 59 1987 p. 1164.
- [7] HILDEBRAND (J.H.) et SCOTT (R.L.). – *Regular solutions*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York 1962.
- [8] GIDDINGS (J.C.), MYERS (M.N.), Mc LAREN (L.) et KELLER (R.). – *High pressure gas chromatography of nonvolatile species*. Science, n° 162 1968 p. 67.
- [9] PAULAITIS (M.E.) et Mc HUGH (M.A.) et CHAI (C.P.). – Dans « *Chemical Engineering at Supercritical Fluid Conditions* », coordonnateurs PAULAITIS (M E.), PENNINGER (J.M.L.), GRAY Jr (R.D.), DAVIDSON (P.), Ann Arbor Science, Michigan, 1983 p. 139.
- [10] PETER (S.) et BRUNNER (G.). – *The separation of nonvolatile substances by means of compressed gases in countercurrent processes*. Angew. Chem. 17 1978 p. 746.
- [11] Mc HUGH (M.A.) et PAULAITIS (M.E.). – *Solid solubilities of naphthalene and biphenyl in*

- supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data*, 25 1980 p. 326.
- [12] NOVOTNY (M.). – Dans « Microcolumn Separation », *Journal of Chromatography Library*, vol. 30, coordonateurs NOVOTNY (M.) et ISHII (D.), Elsevier, New York 1985 p. 105.
- [13] MOURIER (P.). – *La chromatographie en phase dioxyde de carbone supercritique*. Thèse de Doctorat d'État, Université Pierre et Marie Curie, Paris 1986.
- [14] CHESTER (T.L.) et INNIS (D.P.). – *Retention in capillary supercritical fluid chromatography*. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 8 1985 p. 561.
- [15] MOURIER (P.), CAUDE (M.) et ROSSET (R.). – *Retention and selectivity in carbon dioxide supercritical fluid chromatography with various stationary phases*. *J. Chromatogr.* n° 363 1986 p. 61.
- [16] MACAUDIERE (P.), CAUDE (M.), ROSSET (R.) et TAMBUTE (A.). – *CO<sub>2</sub> supercritical fluid chromatography with chiral stationary phases : a promising coupling for the resolution of various racemates*. *J. Chromatogr. Sci.*, 27 1989 p. 383.
- [17] MACAUDIERE (P.), CAUDE (M.), ROSSET (R.) et TAMBUTE (A.). – *Chiral resolution in SFC : mechanisms and applications with various stationary phases*. *J. Chromatogr. Sci.*, 27 1989 p. 583.
- [18] KLESPIER (E.) et SCHMITZ (F.P.). – *Gradients methods in supercritical fluid chromatography*. *J. Supercritical Fluids*, 1 1988 p. 45.
- [19] GIORGETTI (A.), PERICLES (N.), WIDMER (H.L.), ANTON (K.) et DATWYLER (P.). – *Mixed mobile phases and pressure programming in packed and capillary columns supercritical fluid chromatography : a unified approach*. *J. Chromatogr. Sci.*, 27 1989 p. 318.
- [20] SCHMITZ (F.P.) et KLESPIER (E.). – *Gradient elution in supercritical fluid chromatography*. *J. Chromatogr.* n° 388 1987 p. 3.
- [21] VILLERMET (A.), THIEBAUT (D.), CAUDE (M.) et ROSSET (R.). – *Packed column superficial fluid chromatography with carbon dioxide-polar modifiers : influence of carbon dioxide density on the retention*. *J. Chromatogr.* n° 557 1991 p. 85.
- [22] MOURIER (P.), CAUDE (M.) et ROSSET (R.). – *The dependence of reduced plate height on reduced velocity in carbon dioxide supercritical fluid chromatography with packed columns*. *Chromatographia*, 23 1987 p. 21.
- [23] FIELDS (S.M.), KONG (R.C.), FJELDSTED (J.C.) et LEE (M.L.). – *Effect of column diameter on efficiency in capillary supercritical fluid chromatography*. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 7 1984 p. 312.
- [24] FIELDS (S.M.) et LEE (M.L.). – *Effect of density and temperature on efficiency in capillary supercritical fluid chromatography*. *J. Chromatogr.*, n° 349 1985 p. 305.
- [25] BOUIGEON (C.), THIEBAUT (D.) et CAUDE (M.). – *Long packed column supercritical fluid chromatography : influence of pressure drop on efficiency*. *Anal. Chem.* 68 1997 p. 3622.
- [26] LIU (Y.), YANG (F.) et POHL (C.). – *Microbore packed column supercritical fluid chromatography using a new polymer stationary phase*. *J. Microcol. Sep.*, 2 1990 p. 245.
- [27] TAYLOR (L.T.) et KAREN CHANG (H.C.). – *Packed column development in supercritical fluid chromatography*. *J. Chromatogr. Sci.*, 28 1990 p. 357.
- [28] KUEI (J.C.), TARBET (B.J.), JACKSON (W.P.), BRADSHAW (J.S.), MARKIDES (K.E.) et LEE (M.L.). – *n-Octylmethylpolysiloxane stationary phase for capillary column gas chromatography and superficial fluid chromatography*. *Chromatographia*, 20 1985 p. 25.
- [29] CHANG (H.C.), MARKIDES (K.E.), BRADSHAW (J.S.) et LEE (M.L.). – *Separation of steroid isomers using liquid crystalline polysiloxane stationary phase in capillary supercritical fluid chromatography*. *J. Microcol. Sep.*, 1 1989 p. 131.
- [30] CAUDE (M.) et ROSSET (R.). – *Chromatographie en phase supercritique : colonnes capillaires ou colonnes remplies ?* *Analisis*, 14 1986 p. 310.
- [31] WHEELER (J.R.) et McNALLY (M.E.). – *Comparison of packed column and capillary column supercritical fluid chromatography and high-performance liquid chromatography using representative herbicides and pesticides as typical moderate polarity and molecular weight range molecules*. *J. Chromatogr.*, n° 410 1987 p. 343.
- [32] SHAH (S.) et TAYLOR (L.T.). – *Comparison of the efficiency of packed and capillary columns to be used in supercritical fluid chromatography for the analysis of nonvolatile compounds*. *Chromatographia*, 29 1990 p. 453.
- [33] VAN LENTEN (F.J.) et ROTHMAN (L.D.). – *Pressure control of a liquid chromatograph pump*. *Anal. Chem.*, 48 1976 p. 1430.
- [34] LEE (M.L.), XU (B.), HUANGH (E.C.), DJORDJEVIC (N.M.), CHANG (H.C.) et MARKIDES (K.E.). – *Liquid sample introduction methods in capillary supercritical fluid chromatography*. *J. Microcol. Sep.*, 1 1989 p. 7.
- [35] HAWTHORNE (S.B.) et MILLER (D.J.). – *An almost on-column injector for capillary supercritical fluid chromatography*. *J. Chromatogr. Sci.*, 27 1989 p. 197.
- [36] SMITH (R.D.), WRIGHT (B.W.) et YONKER (C.R.). – *Supercritical fluid chromatography : current status and prognosis*. *Anal. Chem.*, 60 1988 p. 1 323 A.
- [37] COUSIN (J.) et ARPINO (P.J.). – *Couplage de la chromatographie en phase supercritique (CPS) avec la spectrométrie de masse (SM)*. *Analisis*, 14 1986 p. 215.
- [38] SHEELEY (D.M.) et REINHOLD (V.N.). – *Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry of high molecular weight biopolymers. Industrial considerations and recent progress*. *J. Chromatogr.*, n° 474 1989 p. 83.
- [39] MATHIASSEN (L.), JONSSON (J.A.) et KARLSSON (L.). – *Determination of nitrogen compounds by supercritical fluid chromatography using nitrous oxide as the mobile phase and nitrogen sensitive detection*. *J. Chromatogr.*, n° 467 1989 p. 61.
- [40] MARKIDES (K.E.), LEE (E.D.), BOLICK (R.) et LEE (M.L.). – *Capillary supercritical fluid chromatography with dual flame photometric detection*. *Anal. Chem.*, 58 1986 p. 740.
- [41] KAREN CHANG (H.C.) et TAYLOR (L.T.). – *The performance of electron capture detection after capillary supercritical fluid chromatography*. *J. Chromatogr. Sci.*, 28 1990 p. 29.
- [42] FIELDS (S.M.), MARKIDES (K.E.) et LEE (M.L.). – *Ultraviolet-absorption detection for capillary supercritical fluid chromatography with compressible mobile phases*. *Anal. Chem.*, 60 1988 p. 802.
- [43] ASHRAF-KHORASSANI (M.) et TAYLOR (L.T.). – *Analysis of propellant stabilizer components via packed and capillary supercritical fluid chromatography / Fourier transform infrared spectrometry*. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 12 1989 p. 40.
- [44] RAYNOR (M.W.), BARTLE (K.D.), DAVIES (I.L.), WILLIAMS (A.), CLIFFORD (A.A.), CHALMERS (J.M.) et COOK (B.W.). – *Polymer additive characterization by capillary supercritical fluid chromatography / Fourier transform infrared microspectrometry*. *Anal. Chem.*, 60 1988 p. 427.
- [45] MOURIER (P.), CAUDE (M.) et ROSSET (R.). – *Rétention, sélectivité et efficacité en chromatographie en phase supercritique*. *Analisis*, 13 1985 p. 299.
- [46] MORIN (P.), CAUDE (M.), RICHARD (H.) et ROSSET (R.). – *Couplage de la chromatographie en phase dioxyde de carbone supercritique avec la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier : analyse d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et sesquiterpéniques*. *Analisis*, 15 1987 p. 117.
- [47] THIEBAUT (D.), CAUDE (M.) et ROSSET (R.). – *Couplage de la chromatographie en phase dioxyde de carbone supercritique sur colonnes remplies avec la détection à ionisation de flamme*. Application à l'analyse de produits pétroliers. *Analisis*, 15 1987 p. 522.
- [48] CARRAUD (P.), THIEBAUT (D.), CAUDE (M.), ROSSET (R.), LAFOSSE (M.) et DREUX (M.). – *Supercritical fluid chromatography / light scattering detection : a promising coupling for the analysis of polar compounds with packed columns*. *J. Chromatogr. Sci.*, 25 1987 p. 395.
- [49] HERBRETEAU (B.), LAFOSSE (M.), MORIN-LORY (L.) et DREUX (M.). – *Analysis of sugars by supercritical fluid chromatography using polar packed columns and light-scattering detection*. *J. Chromatogr.*, n° 505 1990 p. 299.
- [50] RICHTER (B.E.). – *Modified flame ionization detector for the analysis of large molecular weight polar compounds by capillary supercritical fluid chromatography*. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 8 1985 p. 297.
- [51] JANICOT (J.L.), CAUDE (M.) et ROSSET (R.). – *Separation of opium alkaloids by carbon dioxide sub-and supercritical fluid chromatography with packed columns. Application to the quantitative analysis of poppy straw extracts*. *J. Chromatogr.*, n° 437 1988 p. 351.
- [52] MORGAN (E.D.), MURPHY (S.J.), GAMES (D.E.) et MYLCHREEST (I.C.). – *Analysis of ecdysteroids by supercritical fluid chromatography*. *J. Chromatogr.*, n° 441 1988 p. 165.
- [53] WHITE (C.M.), GERE (D.R.), BOYER (D.), PACHOLEC (F.) et WONG (L.K.). – *Analysis of pharmaceuticals and other solutes of biochemical importance by supercritical fluid chromatography*. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 11 1988 p. 94.
- [54] SMITH (R.M.) et SANAGI (M.M.). – *Packed column supercritical fluid chromatography of benzodiazepines*. *J. Chromatogr.*, n° 483 1989 p. 51.
- [55] DELUCA (S.J.), VOORHEES (K.J.), LANGWORTHY (T.A.) et HOLZER (G.). – *Capillary supercritical fluid chromatography of archaeobacterial glycerol tetraether lipids*. *J.*

- High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 9 1986 p. 182.
- [56] KUEI (J.C.), MARKIDES (K.E.) et LEE (M.L.). – *Supercritical ammonia as mobile phase in capillary chromatography*. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 10 1987 p. 257.
- [57] Erbadays in SFC, Madonna di Campiglio, Italie, 13-15 décembre 1988.
- [58] HASNI-PICHARD (H.). – *Contribution au couplage de la chromatographie en phase supercritique avec l'infrarouge à transformée de Fourier*. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, Paris, mars 1990.
- [59] MORIN (P.), PICHARD (H.), CAUDE (M.), RICHARD (H.) et ROSSET (R.). – *Supercritical fluid chromatography of sesquiterpene hydrocarbons on silica packed columns with on-line Fourier transform infrared detection*. J. Chromatogr., n° 464 1989 p. 125.
- [60] PICHARD (H.), CAUDE (M.), MORIN (P.), RICHARD (H.) et ROSSET (R.). – *Application de divers couplages chromatographies-spectroscopies à l'identification des constituants d'une huile essentielle de poivre*. Analisis, 18 1990 p. 178.
- [61] SUGIYAMA (K.), SAITO (M.), HONDO (T.) et SENDA (M.). – *New double stage separation analysis method. Directly coupled laboratory-scale supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography monitored with a multi-wavelength ultraviolet detector*. J. Chromatogr., n° 332 1985 p. 107.
- [62] ENGELHARDT (H.) et GROSS (A.). – *On-line extraction and separation by supercritical fluid chromatography with packed columns*. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 11 1988 p. 38.
- [63] WHITE (C.M.) et HOUCK (R.K.). – *Analysis of mono-, di- and triglycerides by capillary supercritical fluid chromatography*. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 8 1985 p. 293.
- [64] NOMURA (A.), YAMADA (J.), TSUNODA (K.I.), SAKAKI (K.) et YOKOCHI (T.). – *Supercritical fluid chromatography determination of fatty acids and their methyl esters on an ODS-silica gel column*. Anal. Chem., 61 1989 p. 2076.
- [65] PROOT (M.), SANDRA (P.) et GEERAERT (E.). – *Resolution of triglycerides in capillary SFC as a function of column temperature*. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 9 1986 p. 189.
- [66] McNALLY (M.E.P.) et WHEELER (J.R.). – *Supercritical fluid extraction coupled with supercritical fluid chromatography for the separation of sulfonylurea herbicides and their metabolites from complex matrices*. J. Chromatogr., n° 435 1988 p. 63.
- [67] WRIGHT (B.W.) et SMITH (R.D.). – *Rapid capillary supercritical fluid chromatographic analysis of carbamate pesticides*. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 8 1985 p. 8.
- [68] WRIGHT (B.W.) et SMITH (R.D.). – *Rapid analysis using capillary supercritical fluid chromatography*. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 9 1986 p. 73.
- [69] WIEBOLDT (R.C.), KEMPFFERT (K.D.), LATER (D.W.) et CAMPBELL (E.R.). – *Analysis of pyrethrins using capillary supercritical fluid chromatography and capillary gas chromatography with Fourier transform infrared detection*. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 12 1989 p. 106.
- [70] SCHMITZ (F.P.) et KLESPER (E.). – *Separation of oligomers and polymers by supercritical fluid chromatography*. J. Supercritical Fluids, 3 1990 p. 29.
- [71] GEMMEL (B.), LORENSCHAT (B.) et SCHMITZ (F.P.). – *Separation of oligomers of medium polarity by packed column supercritical fluid chromatography*. Chromatographia, 27 1989 p. 605.
- [72] MORI (S.), SAITO (T.) et TAKEUCHI (M.). – *Separation of prepolymers of phenol-formaldehyde resins by supercritical fluid chromatography*. J. Chromatogr., n° 478 1989 p. 181.
- [73] MOULDER (R.), KITHINJI (J.P.), RAYNOR (M.W.) et CLIFFORD (A.A.). – *Analysis of chemical additives in polypropylene films using capillary supercritical fluid chromatography*. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 12 1989 p. 688.
- [74] CHESTER (T.L.), BOWLING (D.J.), INNIS (D.P.) et PINKSTON (J.P.). – *Capillary supercritical fluid chromatography at pressures above 400 atm*. Anal. Chem., 62 1990 p. 1 299.
- [75] FIELDS (S.M.), GREYER (H.J.) et GROLIMUND (K.). – *Analysis of organic isocyanates using capillary supercritical fluid chromatography*. J. Chromatogr., n° 472 1989 p. 175.
- [76] HAWTHORNE (S.B.) et MILLER (D.J.). – *Analysis of commercial waxes using capillary supercritical fluid chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr., n° 388 1987 p. 397.
- [77] KITHINJI (J.P.), RAYNOR (M.W.), EGIA (B.), DAVIES (I.L.), BARTLE (K.D.) et CLIFFORD (A.A.). – *Analysis of coal tar polycyclic aromatic hydrocarbon LC-fractions by capillary SFC on a crystalline stationary phase*. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 13 1990 p. 27.
- [78] CAMPBELL (R.M.), DJORDJEVIC (N.M.), MARKIDES (K.E.) et LEE (M.L.). – *Supercritical fluid chromatography determination of hydrocarbon groups in gasoline and middle distillate fuels*. Anal. Chem., 60 1988 p. 356.
- [79] MATHIASSEN (L.), JONSSON (J.A.) et KARLSSON (L.). – *Determination of nitrogen compounds by supercritical fluid chromatography using nitrous oxide as the mobile phase and nitrogen sensitive detection*. J. Chromatogr., n° 467 1989 p. 61.
- [80] KHORASSANI (M.A.), HELLGETH (J.W.) et TAYLOR (L.T.). – *Separation of metal containing compounds by supercritical fluid chromatography*. Anal. Chem., 59 1987 p. 2077.
- [81] DOUSE (J.M.F.). – *Trace analysis of explosives by capillary supercritical fluid chromatography with thermal energy analysis detection*. J. Chromatogr., n° 445 1988 p. 244.
- [82] GRIEST (W.H.), GUZMAN (C.) et DEKKER (M.). – *Packed column supercritical fluid chromatographic separation of highly explosive compounds*. J. Chromatogr., n° 467 1989 p. 423.
- [83] MUNDER (A.), CHESLER (S.N.) et WISE (S.A.). – *Capillary supercritical fluid chromatography of explosives. Investigations of the interactions between the analytes, the mobile phase and the stationary phase*. J. Chromatogr., n° 521 1990 p. 63.
- [84] HIRATA (Y.). – *Supercritical fluid chromatography of various samples with different polarities*. J. Chromatogr., n° 315 1984 p. 39.
- [85] CHESTER (T.L.) et INNIS (D.P.). – *Separation of oligo- and polysaccharides by capillary supercritical fluid chromatography*. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 9 1986 p. 209.
- [86] FJELDSTED (J.C.), KONG (R.C.) et LEE (M.L.). – *Capillary supercritical fluid chromatography with conventional flame detectors*. J. Chromatogr., n° 279 1983 p. 449.
- [87] MACAUDIERE (P.), TAMBUTE (A.), CAUDE (M.), ROSSET (R.), TAMBUTE (A.), ALEMBIK (M.A.) et WAINER (I.W.). – *Resolution of enantiometric amides on a Pirkle-type chiral stationary phase: a comparison of subcritical fluid and liquid chromatographic approaches*. J. Chromatogr., n° 371 1986 p. 177.