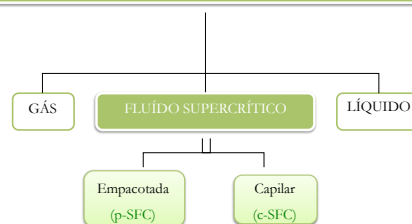


Introdução às Técnicas Cromatográficas

Cromatografia com Fluido Supercrítico

Prof. Dr. Fernando M. Lanças
Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

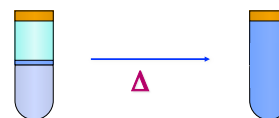
CROMATOGRAFIA



Flúidos Supercríticos Fundamentos

Descoberta

1822 **Baron Cagniard de la Tour**

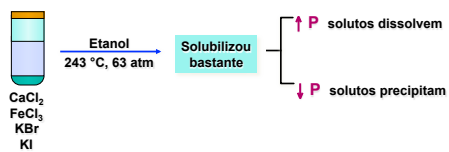


Descobriu o ponto crítico de várias substâncias.

Cagniard de la Tour, C., *Ann. Chim. Phys.*, **21**, 127 (1822)

Evolução da Técnica

1879 Hannay e Hogart



Hannay, J.B. and Hogart, J., *Proc. Roy. Soc.*, **29**, 324 (1879)
30, 178 (1880)

1906 Buchner

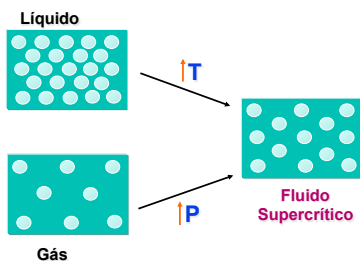
Solubilidade de compostos orgânicos em CO₂-SC era muito maior que o esperado.

Buchner, E.H., Z. Phys. Chem., **54**, 665 (1906)

≈ até 1980

Basicamente apenas processos industriais.

O Fluido Supercrítico



Fluido Supercrítico

Qualquer material acima de sua pressão crítica e temperatura crítica.

T_c - Temperatura máxima na qual um gás pode ser convertido à um líquido por um aumento de pressão.

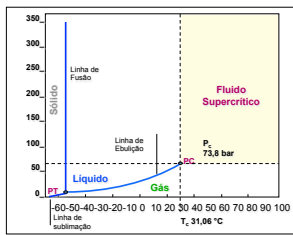
P_c - Pressão máxima na qual um líquido pode ser convertido à um gás por um aumento na temperatura.

Parâmetros Físicos

Fluido	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (atm)	Momento dipolar (D)
Dióxido de carbono	31,3	72,9	0
Óxido nitroso	36,5	72,5	0,5
Amônia	132,5	112,5	1,6
Pentano	196,6	33,3	0

Propriedades dos Fluidos Supercríticos

Diagrama de Fases
(pressão-temperatura) para o CO₂



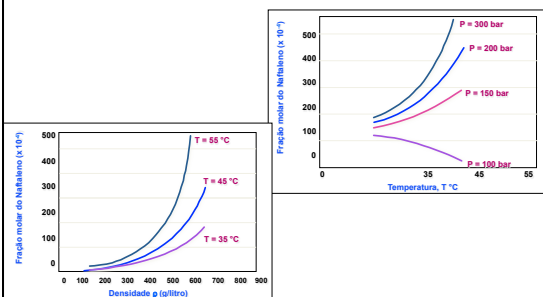
Ordem de magnitude de dados físicos: gases, líquidos e fluidos supercríticos

	Densidade (g/mL)	Viscosidade (g/cm-seg)	Coefficiente de difusão (cm ² /seg)
Gas (ambiente)	0,0006-0,002	0,0001-0,003	0,1-0,4
Fluido supercrítico	0,2-0,5	0,0001-0,0003	0,0007
Líquido (ambiente)	0,6-1,6	0,002-0,03	0,000002-0,00002

Controle dos Parametros Experimentais

- Temperatura
- Pressão/densidade
- Viscosidade
- Modificadores

Solubilidade (fração molar) do Naftaleno em CO₂ em função da temperatura e da densidade à várias pressões



Modificadores

Modificador	T_c (°C)	P_c (atm)	MW
Metanol	239,4	79,9	32,04
Etanol	243,0	63,0	46,07
1-Propanol	263,5	51,0	60,10
2-Propanol	235,1	47,0	60,10
1-Hexanol	336,8	40,0	102,18
2-Metoxi-etanol	302,0	52,2	76,10
Tetrahidrofurano	267,0	51,2	72,11
1,4-Dioxano	314,0	51,4	88,11
Acetonitrila	275,0	47,7	41,05
Diclorometano	237,0	60,0	84,93
Cloroformo	263,2	54,2	119,38
Propileno carbonato	352,0	54,2	102,09
N,N-dimetilacetamida	384,0		87,12
Dimetil sulfóxido	465,0		78,13
Ácido fórmico	307,0		46,02
Água	374,1	217,6	18,01
Dissulfeto de carbono	279,0	78,0	76,13

Química

Enfoque principal é no CO₂

- CO₂ frequentemente pode substituir solventes orgânicos e clorados
- É verde (comparado aos solventes orgânicos)
- É recuperado de outros processos
- Pode ser facilmente reciclado

Custo

- CO₂ é barato
 - \$6/pound (cerca \$12/L) para grau SFC e \$ 0.15/pound para grau industrial
 - Solventes orgânicos grau HPLC: cerca de \$ 15/L para aquisição e \$35/L para descarte
- Processos baseados em CO₂ frequentemente requerem menos energia que destilação

Velocidade

A difusão é mais rápida em CO₂ e em fluidos supercríticos do que em líquidos; processos controlados por difusão são mais rápidos do que em líquidos.

Flexibilidade

- Líquidos são muito pouco compressíveis: as distâncias soluto-solvente são fixas e as interações intermoleculares são fixas.
- Fluidos supercríticos são compressíveis: as distâncias solvente-soluto são facilmente ajustáveis, e as interações intermoleculares são ajustáveis.
- A força e a solubilidade de um fluido podem ser ajustados através da temperatura e pressão.
- As propriedades de solvente podem ser modificadas pela adição de co-solventes.

Vantagens do CO₂ em SFC

- temperatura crítica baixa
- inerte à maioria dos materiais e compostos
- seguro (asfixiante simples, não tóxico, não inflamável, não explosivo)
- Barato
- Pode ser purificado com facilidade
- Não apresenta resposta no detector de ionização de chama (FID)

Desvantagens do CO₂ em SFC

- baixa polaridade (momento dipolar zero)

Como dissolver solutos polares

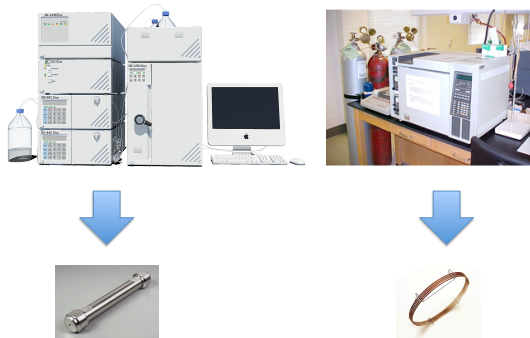
- adicionar um modificador ao CO₂
- derivatizar o soluto para melhorar a solubilidade em CO₂

Modificador: análogo a um solvente forte em RP-HPLC

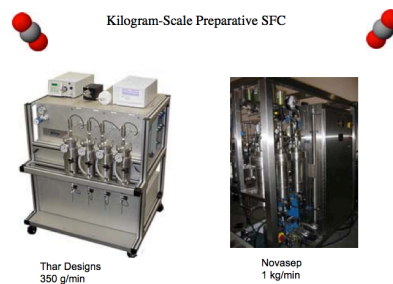
- Modificadores são solventes orgânicos polares (geralmente metanol) adicionados até cerca de 60%.
- Modificadores reduzem o tempo de retenção e alteram a seletividade.
- A pressão e a temperatura devem ser selecionada com respeito à composição da fase móvel para evitar separação líquido-vapor na coluna.
- Esteja seguro que os componentes do sistema são compatíveis com o modificador (ex. não usar THF com PEEK).

Instrumentação para SFC

Colunas Empacotadas (HPLC) x Capilares (GC)

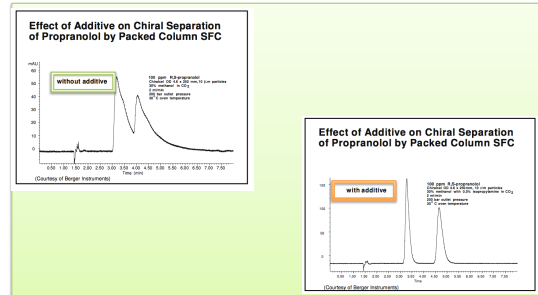


SFC Preparativo

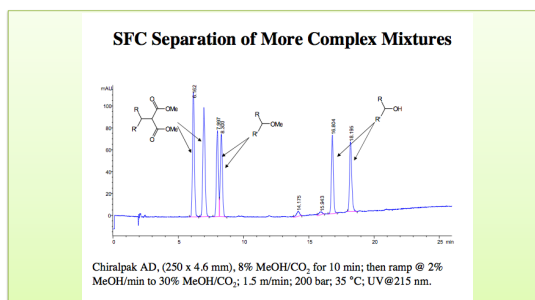


SFC Aplicações

Efeito do aditivo em separações quirais via p-SFC

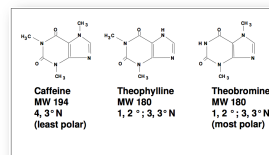


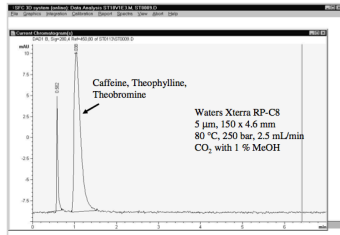
SFC de misturas complexas



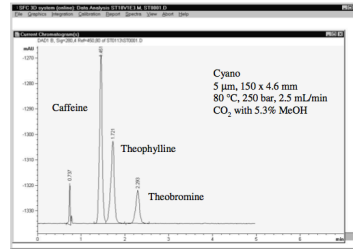
Efeito da coluna em SFC

Solutos: cafeína, teofilina, teobromina
 Temperatura = 80° C
 Pressão = 250 bar
 Modificador = metanol,
 Aditivo: sem aditivo
 % modificador = ajustado para $k \sim 1$ para o 1o. pico

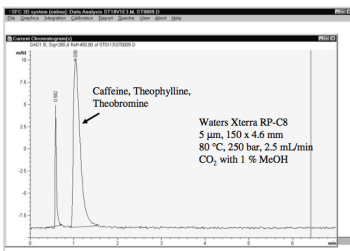




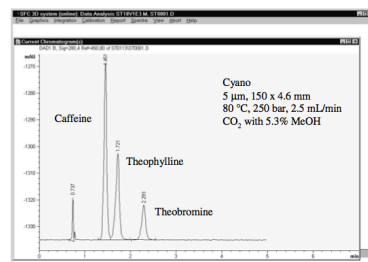
Weak retention, co-elution



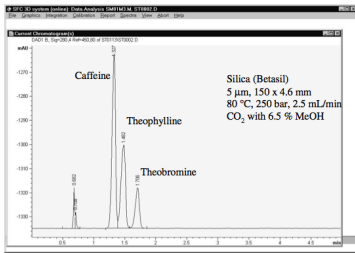
Stronger retention, separation by polarity



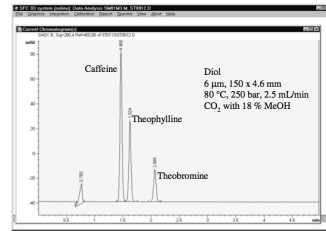
Weak retention, co-elution



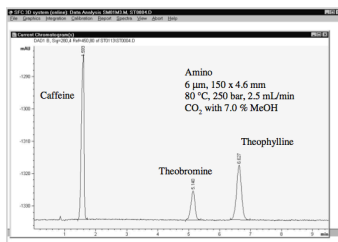
Stronger retention, separation by polarity



Similar retention to cyano, separation by polarity



Very strong retention, separation by polarity

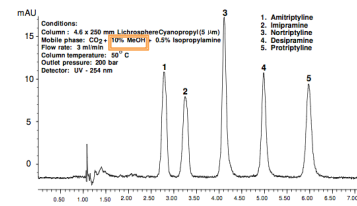


Completely different! Strong retention of theophylline relative to the other two.

Análise de Antidepressivos Tricíclicos em μ -SFC

Packed Column Analysis of Tricyclic Antidepressants

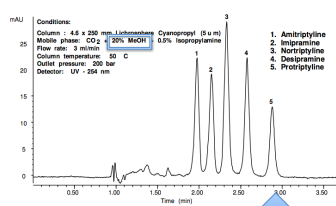
(9.5 ppm each; 5 µl injected)



Análise de Antidepressivos Tricíclicos em p-SFC

Packed Column Analysis of Tricyclic Antidepressants

(9.5 ppm each; 5 ul injected)

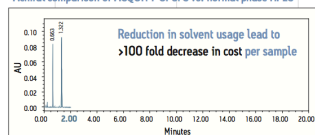


UP-SFC

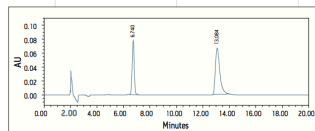


UP-SFC x NP-HPLC

Achiral comparison of ACQUITY UP-SFC vs. normal phase HPLC



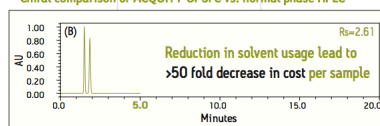
ACQUITY UP-SFC achiral analysis of tolbutamide and tolazamide.



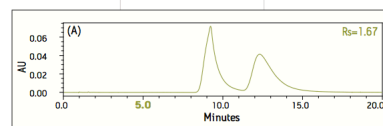
Normal phase HPLC achiral analysis of tolbutamide and tolazamide.

UP-SFC x NP-HPLC

Chiral comparison of ACQUITY UP-SFC vs. normal phase HPLC



ACQUITY UP-SFC chiral analysis of BINOL.

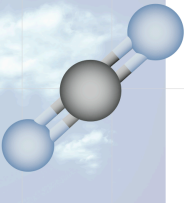
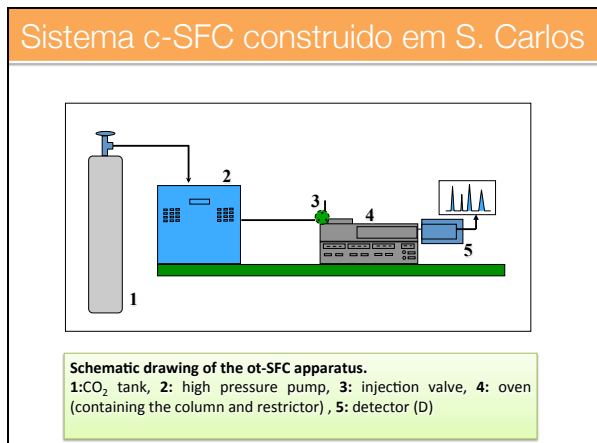
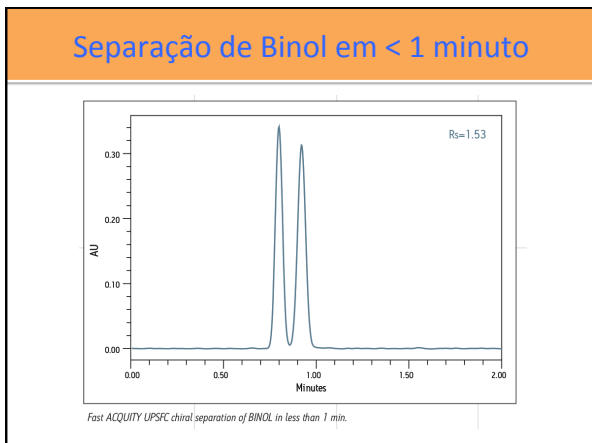
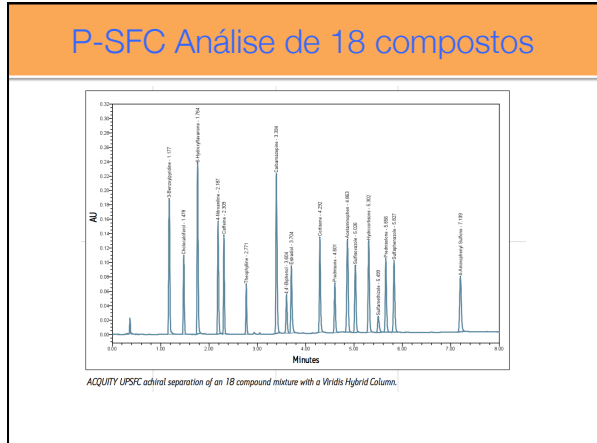


Normal phase HPLC chiral analysis of BINOL.

CO₂ — A NATURAL NEXT STEP.

Waters UPLC technology has dramatically reduced solvent usage in chromatographic analysis. UPSFC technology continues our commitment to the environment, and since it uses CO₂ as the primary component of the mobile phase, your laboratory will have far less solvent to purchase and dispose of, less negative impact on the environment, and reduced health risks. Here are some additional benefits of CO₂ as part of UPSFC:

- CO₂ is a commercially available recycled by-product of other industrial processes.
- CO₂ is an inexpensive and environmentally beneficial alternative to traditional normal phase solvents.
- CO₂ is a stable, non-toxic, and non-flammable green solvent.

Separation of Underivatized Triterpene Acids by Capillary Supercritical Fluid Chromatography

Marta Cecilia H. Tavares, Janete H. Yariwaki Vilgas and Fernando M. Langa*

*Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, Caixa Postal 13508-910, São Carlos, SP, Brasil

Capillary supercritical fluid chromatography with flame ionization detection was used for the separation of underivatized triterpene acids such as oleanolic, ursolic, polytrienic and ursolic acids. Supercritical chromatography showed advantages over capillary gas chromatography: derivatization was not required and separation was obtained in less than 15 min with high efficiency and good resolving power.

Copyright © 2001 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: capillary supercritical fluid chromatography; flame ionization detector; triterpene carboxylic acid; oleanolic acid; polytrienic acid; ursolic acid

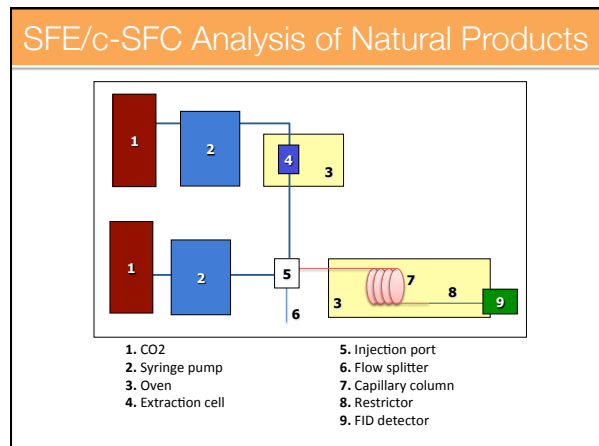
INTRODUCTION

Supercritical fluid chromatography (SFC) was developed as an analytical technique in 1958 by Lovelock and co-workers. The same group introduced the separation of triterpene acids chromatographically (SFC) and gas chromatography (GC). Since 1980, SFC has been used as a complementary technique to LC and GC (Pittman & Barile, 1995). Recently, it is increasingly used from the beginning of the century. SFC was replaced with packed columns in the so-called "LC-SFC" (Liu et al., 1980), but only in that decade (the 1980s) open capillary columns with trimethylsilane (TMS) endcapped silica particles (Pittman & Barile, 1995) were used in SFC. The combination of these high-resolution capillary columns with traditional GC detectors (the analysis of compounds with low volatility) higher molecular weight substances that may be by GC (Barile, 1998).

Figure 2. c-SFC chromatogram of a mixture of triterpene acids. Key to peak identities: 1, oleoic acid; 2, ursolic acid; 3, polytrienic acid. Chromatographic conditions: column, LM6, 20 m × 0.10 mm i.d.; 0.20 μm d.f.; 5% phenyl, 95% methyl polysiloxane cross-linked; temperature, 80°C; pressure, 120 atm; sample size, 60 nL. (For other protocols see Experimental section.)

Figure 4. c-SFC chromatogram of ursolic acid: the chromatographic conditions were as in Fig. 2 except for the column, which was LM6, 5 m × 0.05 mm i.d.; 0.10 μm d.f.; 5% phenyl, 95% methyl polysiloxane. (For other chromatographic conditions see legend to Fig. 2.)

Phytochemical Analysis - 2001



Conclusões

- SFC pode ser uma boa alternativa para GC e HPLC
- SFC é ambientalmente correta quando se utiliza CO2 como fase móvel
- Existe uma grande diversidade de colunas (empacotadas e capilares) que permitem uma melhor otimização da separação do que GC ou HPLC