

SÉPARATION DES AMINES PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE EN UTILISANT LE TEFLON COMME SUPPORT

CATHERINE LANDAULT ET GEORGES GUIOCHON

École Polytechnique, Laboratoire du Professeur L. Jacqué, Paris (France)*

(Reçu le 19 juin 1963)

INTRODUCTION

L'analyse des amines par chromatographie gaz-liquide a fait l'objet de nombreuses publications dont les premières remontent aux origines de la méthode, qui fut appliquée à cette séparation par JAMES ET MARTIN^{1,2} dès 1952. Les difficultés rencontrées alors dans la séparation de mélanges d'amines ou d'amino-alcools et de composés analogues ont été difficilement surmontées et les méthodes d'analyses de tels mélanges sont loin d'être aussi bonnes que celles dont on dispose pour quantité d'autres dérivés fonctionnels. Ces difficultés proviennent des traînées importantes causées par l'adsorption sur le support que présentent les pics élués des colonnes faites à partir des supports classiques (célite, chromosorb). La forte adsorption des amines est due à leur grande polarité et au caractère basique de l'azote qui peut conduire à la formation de liaisons hydrogène remarquablement fortes. C'est ainsi qu'on observe dans certains cas la disparition totale du pic lorsque la quantité de produit pur injectée est réduite au-dessous d'une certaine valeur³. Les volumes de rétention observés ne sont plus alors caractéristiques car ils varient beaucoup avec la masse injectée. De nombreux auteurs ont décrit des traitements variés du support utilisé qui, avec des variantes de détail, consistent essentiellement à traiter le chromosorb W par la potasse alcoolique⁴⁻⁶ ou la célite par la soude alcoolique^{1,3,7,8}, comme l'avaient fait JAMES ET MARTIN. La concentration de la solution à utiliser ne semble pas critique, l'essentiel est de ne pas se contenter d'un lavage mais d'introduire dans le support une quantité de base supérieure à celle nécessaire pour assurer la neutralisation complète des sites actifs⁵. On a également préconisé l'emploi comme support du produit obtenu par extraction à l'éther de pétrole de la lessive "Tide" et traitement à la potasse alcoolique⁹. L'emploi de supports ainsi traités permet d'utiliser des phases stationnaires peu polaires telles que l'huile de paraffine et l'huile de silicone² mais, le plus souvent, il est nécessaire, pour obtenir de bons résultats, d'utiliser des mélanges de phase polaire et apolaire^{1,6,10}, tels que l'huile de paraffine et le 5-éthylnonanol-2¹: ceci n'est pas très favorable à l'obtention de résultats bien reproductibles; il semble préférable d'employer des phases polaires sur lesquelles les traînées sont réduites^{6,11}, la triéthanolamine par exemple. Le traitement du support par silanisation semble donner de bons résultats dans certains cas^{10,12}, mais ce traitement est très délicat et il ne semble pas avoir été appliqué au cas des amines aliphatiques. On peut enfin combattre les phénomènes

* 17, rue Descartes, Paris (5e).

d'adsorption en utilisant un gaz vecteur contenant de la vapeur d'eau, de l'ammoniac ou une amine légère¹⁰. Ce procédé est d'une application délicate et ne semble pas pouvoir être généralisé.

La poudre à mouler de téflon n'a été que très peu utilisée jusqu'à présent en raison des grandes difficultés que présente la fabrication de colonnes suffisamment efficaces. Dans une étude antérieure¹³, nous avons décrit le mode de fabrication de colonnes utilisant ce support et donnant des efficacités environ moitié de celles des colonnes classiques pour des composés non polaires, mais bien supérieures dans le cas des amines en particulier. L'avantage du téflon, qui est presque chimiquement inactif et n'adsorbe que très peu, est alors pleinement utilisable.

MÉTHODE D'IDENTIFICATION

Les mélanges d'amines à analyser sont souvent très complexes: on y trouve des amines primaires, secondaires et tertiaires, parfois des diamines ou de l'ammoniac, souvent des composés oxygénés (amino-alcools) et de l'eau.

Il convient donc d'abord de disposer de colonnes assez efficaces pour résoudre de tels mélanges. Il faudra ensuite identifier les composés correspondants et, pour cela, caractériser d'abord leur fonction. Nous avons utilisé dans ce but les indices de rétention de KOVATS^{14,15}: l'incrément d'indice ou différence entre les indices de rétention mesurés sur une phase polaire et sur une phase apolaire est caractéristique, dans certaines limites, d'un type de dérivé fonctionnel. La comparaison entre l'indice mesuré pour un corps inconnu et ceux déterminés pour les dérivés du même type permet alors l'identification.

Nous avons préparé dans ce but deux colonnes de polarités différentes, l'une apolaire avec de l'Apiézon L, l'autre polaire avec un Polyglycol 1500*. La polarité de cette phase est relativement grande: 0.76 dans l'échelle arbitrairement choisie par CHOVIN ET LEBBE¹⁶ où le squalane a une polarité nulle et le β, β' -oxydipropionitrile une polarité égale à 1. Cette polarité est due au grand nombre de groupes hydroxyles libres, susceptibles de former des liaisons hydrogène avec les solutés basiques, en particulier avec les amines.

Interprétation théorique des résultats

L'indice de rétention est donné par la formule de KOVATS³:

$$I = 200 \frac{\log V_N(X) - \log V_N(nP_z)}{\log V_N(nP_{z+2}) - \log V_N(nP_z)} + 100z$$

où $V_N(X)$ désigne le volume de rétention totalement corrigé du composé X, nP_z et nP_{z+2} désignant les paraffines normales paires éluées juste avant et après le composé X.

Les propriétés intéressantes des indices de rétention résultent directement de la formule:

(i) Ils varient peu avec la température. Si cette variation est en toute rigueur représentée par une fonction homographique¹⁷, dans un domaine de température limité cette variation est à peu près linéaire.

* Polyglycol 60-U, K-35, Naphtachimie, 203, Fbg. Saint-Honoré, Paris (8ème).

(ii) L'indice de rétention ne dépend théoriquement pas de la quantité de phase stationnaire contenue dans la colonne, contrairement aux volumes de rétention absolus qui lui sont proportionnels. Cette conclusion doit être nuancée lorsque l'on utilise des solutés polaires et un support classique. L'adsorption sur le support joue parfois un rôle important dans la rétention de tels solutés malgré que l'on obtienne des pics à peu près symétriques. Un support inerte comme le téflon est tout particulièrement intéressant à ce point de vue.

(iii) La comparaison entre les indices de rétention d'un même corps sur deux colonnes de polarité très différente donne des renseignements assez précis sur sa structure, l'incrément d'indice pouvant être utilisé pour la caractérisation des dérivés fonctionnels.

(iv) Le volume de rétention absolu est lié au coefficient de partage K du soluté sur la phase fixe par la relation fondamentale:

$$V_N = K \cdot V_L$$

où V_L est le volume de phase fixe utilisé. Ce coefficient de partage est lui-même donné par :

$$K = e^{-\frac{\Delta\mu^\circ}{RT}}$$

où $\Delta\mu^\circ$ représente la différence de potentiel chimique du soluté entre l'état dissous dans la phase fixe et l'état vaporisé. Or, d'après MARTIN, l'enthalpie libre d'une molécule est la somme d'un certain nombre de contributions additives des différents radicaux qui la composent¹⁸. En particulier, cette enthalpie libre croît linéairement avec le nombre d'atomes de carbone en série homologue, sauf pour les tous premiers termes de certaines séries.

Il est donc normal de voir les indices de rétention de dérivés homologues, qui sont des combinaisons linéaires des logarithmes des volumes de rétention, croître linéairement avec le nombre d'atomes de carbone, l'incrément par atome de carbone (ΔCH_2) étant voisin de 100. Il aurait exactement cette valeur si le principe de l'indépendance des contributions des divers radicaux à l'enthalpie libre était rigoureusement vérifié, mais ce principe n'est qu'approché.

L'utilisation de ces données théoriques facilite considérablement le dépouillement et l'interprétation des résultats et, par conséquent, l'identification des composés contenus dans les mélanges étudiés.

Conditions expérimentales

Les caractéristiques des colonnes utilisées sont résumées Tableau I. Les principales propriétés physiques des solutés intéressantes pour la discussion suivante sont données Tableau II. L'appareil utilisé est un Perkin-Elmer modèle 116 E.

La colonne apolaire est destinée principalement à la détermination de ΔI pour la caractérisation des solutés; la solubilité d'un soluté polaire comme ceux utilisés ici est très faible dans une phase apolaire. En effet, dans ce cas, la séparation se fait essentiellement par différence de tension de vapeur. Par contre, la solubilité dans une phase polaire de ces composés très polaires est élevée. Il en résulte un fort incrément d'indice de rétention et des difficultés pour mesurer avec précision l'indice de rétention sur les

TABLEAU I
CARACTÉRISTIQUES DES COLONNES

	<i>Apolaire</i>	<i>Polaire</i>
Longueur (cm)	226	227
Diamètre intérieur du tube (cm)	0.4	0.4
Granulométrie du support (téflon-Haloport) (μ)	200-500	200-500
Poids de support utilisé (g)	24	13.8
Phase liquide	Apiézon L	Polyglycol 1500
Poids de phase liquide (g)	1	3.44
Teneur en phase (%)	4.4	20
HETP pour le méthanol (cm)	0.75	0.24
Valeur de k correspondante*	1.2	4.9
HETP pour l'éthylamine (cm)	0.69	0.56
Valeur de k correspondante	0.45	8.04

$$*k = K \cdot V_G / V_L$$

deux phases à la même température. Ce phénomène est aggravé par la différence de teneur en phase des colonnes apolaire et polaire qui joue dans un sens défavorable, quoique partiellement compensée par la plus grande densité de remplissage de la colonne apolaire. Malheureusement, il n'a pas été possible de préparer une colonne apolaire qui ait une efficacité satisfaisante avec une phase stationnaire contenant plus de 5 % d'Apiézon L.

Nous avons pu, néanmoins, au prix de quelques difficultés, déterminer l'ensemble des indices de rétention à 130°C sur les deux colonnes; les indices sur la colonne apolaire ont été mesurés entre 70° et 130° et l'on a constaté une très faible variation des indices en fonction de la température dans ce domaine: $10(\delta I_A / \delta T)$ dans le cas le plus défavorable est inférieur à 3, alors que l'erreur de mesure est comprise entre 0.5 et 1%, c'est-à-dire est du même ordre de grandeur.

TABLEAU II
PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DES SOLUTÉS

	Moment dipolaire ¹⁰ (Debye)	T_{eb} (°C) ²⁰
Ammoniac	1.44	-33.3
Monométhylamine	1.24	-6.5
Diméthylamine	1.03	6.9
Triméthylamine	0.67	3.9
Monoéthylamine	1.22	16.6
Diéthylamine	0.92	55.5
Triéthylamine	0.66	89.5
Propylamine	1.17	47.8

Sur la colonne polaire, au contraire, la rétention des amines étant très forte, il serait très difficile de travailler au-dessous de 130°, sauf pour les tout premiers termes des diverses séries. Les mesures ont été faites entre 130° et 150°C.

Résultats expérimentaux

Le Tableau III donne les indices de rétention mesurés à 130° pour les deux colonnes ainsi que l'incrément d'indice résultant. Ces indices ont été mesurés pour les amines primaires dérivés d'hydrocarbures normaux jusqu'à l'octane, les amines secondaires et tertiaires symétriques dérivées d'hydrocarbures normaux jusqu'au butane ainsi que pour les alcools normaux jusqu'au *n*-hexanol et pour l'eau.

TABLEAU III
INDICES DE RÉTENTION MESURÉS À 130°C POUR LES DEUX COLONNES

<i>Soluté</i>	<i>Indice sur phase polaire</i>	<i>Indice sur phase apolaire</i>	ΔI
Eau	1058	317	741
Ammoniac	560	250	310
<i>Alcools</i>			
Méthanol	892	292	600
Ethanol	934	375	559
Propanol-1	1034	497	537
Butanol-1	1140	606	534
Pentanol-1	1245	705	540
Hexanol-1	1342	811	531
<i>Amines primaires</i>			
Méthylamine	709	400	309
Ethylamine	750	441	309
<i>n</i> -Propylamine	826	518	308
<i>n</i> -Butylamine	919	614	305
<i>n</i> -Pentylamine	—	—	—
<i>n</i> -Hexylamine	1145	827	318
<i>n</i> -Heptylamine	1251	912	339
<i>n</i> -Octylamine	1344	1022	322
<i>Amines secondaires</i>			
Diméthylamine	752	458	294
Diéthylamine	763	553	210
Di- <i>n</i> -propylamine	925	746	179
Di- <i>n</i> -butylamine	1098	948	150
<i>Amines tertiaires</i>			
Triméthylamine	589	536	53
Triéthylamine	765	727	38
Tri- <i>n</i> -propylamine	958	917	41
Tri- <i>n</i> -butylamine	1187	1163	24

En examinant le Tableau III, on constate, aussi bien pour les alcools que pour les diverses amines, la régularité de variation des indices de rétention sur colonne polaire ou apolaire, avec le nombre d'atomes de carbone de chaque radical, sauf pour les premiers termes (Fig. 1).

Ceci confirme les hypothèses faites sur l'indépendance des contributions des différents radicaux à l'enthalpie libre de la molécule. Sauf pour les valeurs de *n* inférieures à 3, on peut ainsi mettre l'indice de rétention sous la forme:

$$I = R + n\Delta CH_2$$

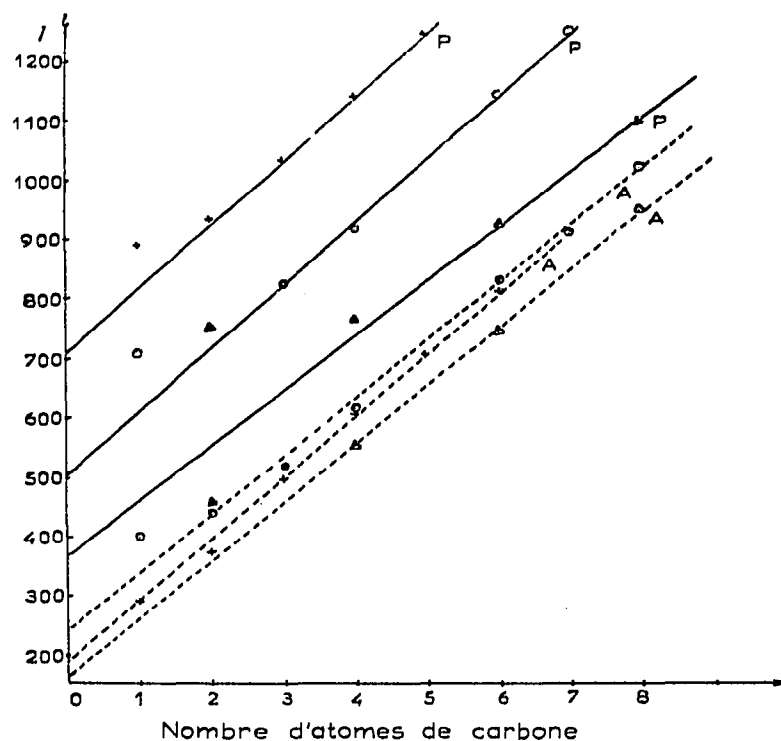


Fig. 1. Variation de l'indice de rétention en fonction du nombre d'atomes de carbone dans la chaîne alkyl. (+) Alcohols primaires; (\odot) amines primaires; (Δ) amines secondaires. P = Colonne polaire (Polyglycol 1500). A = Colonne apolaire (Apiezon L).

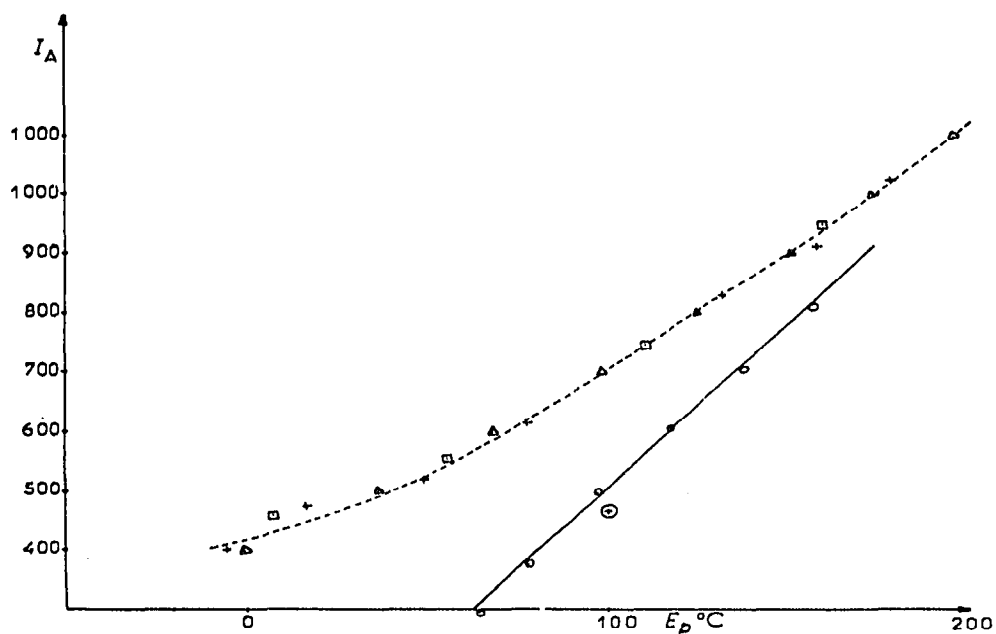


Fig. 2. Variation de l'indice de rétention en fonction de la température d'ébullition. (Δ) Alcanes normaux; (\odot) alcools normaux; (+) amines primaires; (\square) amines secondaires; (\oplus) eau.

n étant le nombre d'atomes de carbone contenus dans l'ensemble des chaînes. Les valeurs de R et ΔCH_2 sont données Tableau IV. L'expérience acquise en ce domaine montre que l'on peut, en cas de besoin, extrapoler ces valeurs dans une mesure raisonnable²¹.

Si l'on trace un graphique en portant l'indice de rétention en fonction de la température d'ébullition, on obtient pour l'indice apolaire une courbe unique pour les hydrocarbures paraffiniques et les diverses amines (Fig. 2). Ce résultat confirme avec des corps très polaires les résultats de KOVATS¹⁵ et HUGUET²²; il n'est toutefois pas possible de donner les valeurs de R et ΔCH_2 pour les amines tertiaires, la variation de I avec le nombre d'atomes de carbone n'étant pas régulière: il faudrait, pour obtenir un résultat, utiliser des produits plus lourds ayant des chaînes de plus de quatre atomes de carbone. On peut en déduire que l'adsorption résiduelle des amines sur le téflon est faible, sinon on mesurerait des indices apolaires trop forts et on observerait une courbe décalée. Les seules exceptions sont la triméthylamine et surtout l'eau et les alcools, pour lesquels on retrouve un phénomène déjà signalé par KOVATS¹⁵: les associations moléculaires qui jouent dans le soluté à l'état pur et provoquent un abaissement important de la pression de vapeur n'interviennent pas dans les interactions soluté-solvant à dilution infinie, lorsque le solvant est apolaire. Il en résulte une solubilité beaucoup plus faible que celle qui serait attendue de la seule considération de la tension de vapeur: même une phase fixe apolaire ne classe pas tous les composés selon les pressions de vapeur croissantes.

TABLEAU IV
CONTRIBUTIONS À L'INDICE DE RÉTENTION

	<i>Amines primaires</i>		<i>Amines secondaires</i>		<i>Alcools primaires</i>	
	ΔCH_2	$R(NH_2)$	ΔCH_2	$R(NH)$	ΔCH_2	$R(OH)$
Colonne polaire	105	505	90	370	104	712
Colonne apolaire	97	245	97	165	103	190
ΔI	8	260	-7	205	1	522

Le Tableau III montre également que les incréments d'indice des corps de chaque famille se groupent autour de valeurs très différentes pour les diverses familles, les différences entre homologues extrêmes d'une famille étant relativement faibles et correspondant à une légère diminution quand le poids moléculaire augmente. Ces valeurs sont réunies Tableau V. On voit que la caractérisation est immédiate à partir

TABLEAU V
INCRÉMENTS D'INDICE CARACTÉRISTIQUES DES DIVERSES FAMILLES ÉTUDIÉES

<i>Famille</i>	$\Delta I_{\Delta P}$
Alcools aliphatiques primaires	530-600
Amines aliphatiques primaires	300-340
Amines aliphatiques secondaires	150-200*
Amines aliphatiques tertiaires	20-50

* Sauf diméthylamine 294.

de la mesure de l'incrément d'indice pour un pic inconnu. Si l'on compare les indices de rétention des alcools mesurés sur Apiézon L par KOVATS, utilisant la célite comme support, à ceux que nous avons mesurés en utilisant la poudre de téflon, on ne constate que des différences minimales, entièrement imputables aux erreurs d'expériences, sauf peut-être pour le méthanol. En comparant les indices mesurés par KOVATS sur Apiézon L et ceux mesurés par nous¹³ sur la même colonne polaire de Carbowax 1500 que celle ayant servi pour la présente étude, on constate que la présence éventuelle d'aldéhydes ou d'esters méthyliques ne pourrait conduire à des interférences qu'avec les amines secondaires.

CONCLUSION

Il ne faut pas s'étonner de trouver une relation linéaire entre indices de rétention et nombre d'atomes de carbone des dérivés homologues. De telles relations avaient déjà été mises en évidence par JAMES ET MARTIN²³ pour les logarithmes de volumes de rétention dont les indices sont des combinaisons linéaires. Il est toutefois remarquable que l'on puisse aboutir à des règles simples de calcul a priori des indices de rétention de dérivés homologues, *ce qui constitue un avantage supplémentaire des indices de rétention*. On dispose ainsi d'une méthode rapide de caractérisation et d'identification des amines.

Grâce à un calcul simple, on peut prévoir la différence minimale nécessaire entre les indices de rétention de deux corps pour qu'ils soient séparés sur une colonne donnée²⁴. La différence d'indice correspondant à une séparation de 2σ est fournie par l'équation :

$$\delta I(2\sigma) = \frac{T_K}{f_K \sqrt{N}} \left(1 + \frac{V_m}{V_N} \right)$$

où T_K = la température de la colonne (°K),

$$f_K = 0.005757 T_K d_z,$$

$$d_z = \log V_{R^\circ} (n\text{P}_{z+2}) - \log V_{R^\circ} (n\text{P}_z),$$

V_m = le volume mort de la colonne,

N = le nombre de plateaux théoriques de la colonne.

On peut chercher par exemple à appliquer cette équation à la séparation des éthylamines. Pour la monoéthylamine on a: $I_{130^\circ}^P = 750$; $\sqrt{N} = 20$; $V_N = 40.2 \text{ cm}^3$.

Par ailleurs, pour la colonne polaire

$$V_m = 23.7 \text{ cm}^3; T_K = 403^\circ\text{K}; d_z = 0.42; \text{ donc:}$$

$$f_K = 0.005757 \times 403 \times 0.42 = 0.9744$$

$$\delta I = \frac{403}{0.9744 \times 20} (1 + 0.59) \sim 33$$

et $\delta I(2\sigma) \sim 33$ unités d'indices.

On ne pourra séparer de la monoéthylamine que des composés ayant un indice différent de 30 points au moins. A 130°C , il est donc impossible de séparer sur la colonne polaire les corps suivants:

$$\text{monoéthylamine } I^P = 750$$

$$\text{diméthylamine } I^P = 752$$

$$\text{diéthylamine } I^P = 763$$

$$\text{triéthylamine } I^P = 765$$

Toutefois, la séparation de ces corps est possible à 70° sur la colonne polaire, les volumes de rétention étant alors beaucoup plus grands devant le volume mort de la colonne. La détermination de l'indice de rétention sur la colonne apolaire permet l'identification de ces composés à l'exception de la monoéthylamine (441) et de la diméthylamine (458) qui ne sont ainsi séparés sur aucune de nos deux colonnes. Il faudrait pour cela des colonnes ayant au moins quatre fois plus de plateaux théoriques.

La Fig. 3 montre un exemple des séparations que l'on peut obtenir avec la colonne polaire.

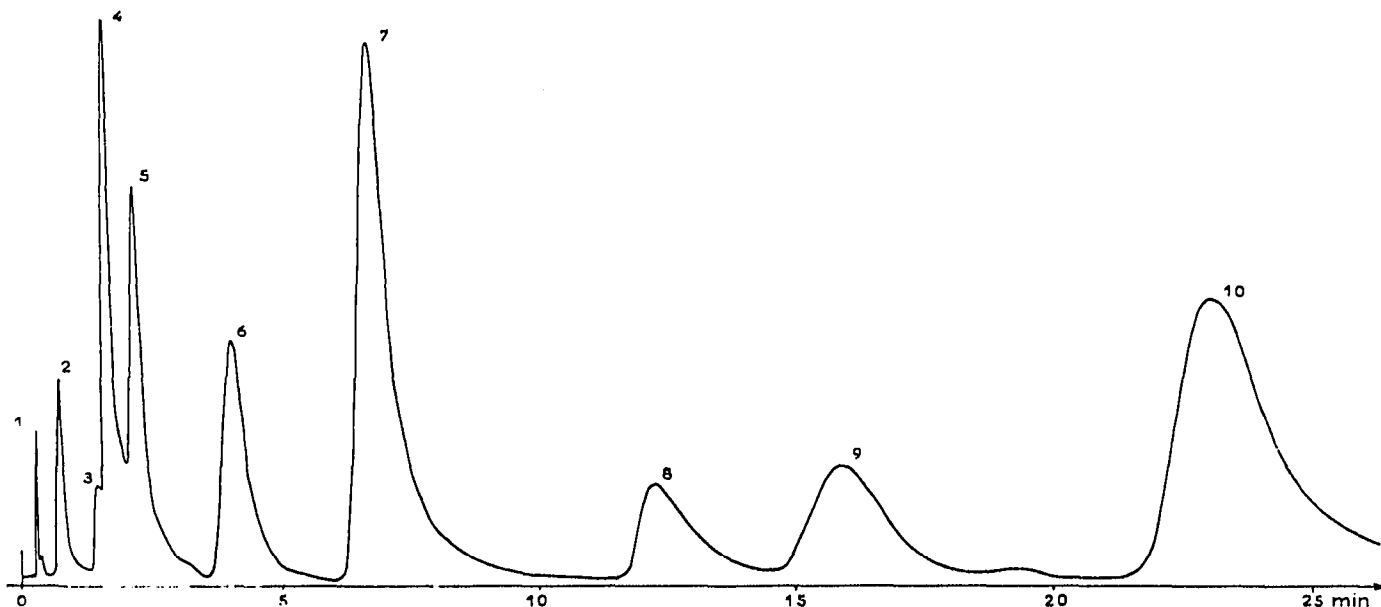


Fig. 3. Séparation d'un mélange d'amines aliphatiques (colonne polaire Tabl. I, 105°C, 70 cm³/min). (1) Air; (2) ammoniac; (3) méthylamine; (4) diéthylamine; (5) propylamine; (6) tripropylamine; (7) eau; (8) hexylamine; (9) tributylamine; (10) morpholine.

RÉSUMÉ

L'application à l'analyse des amines aliphatiques des colonnes utilisant la poudre de téflon comme support permet la séparation et l'identification rapide d'un grand nombre de ces composés. Les indices de rétention des dérivés homologues présentent des régularités que la théorie des solutions explique et qui permettent d'extrapoler dans une certaine mesure les valeurs obtenus et de guider sûrement dans l'interprétation des chromatogrammes.

SUMMARY

In the analysis of aliphatic amines it is possible to separate a great number of these compounds and identify them rapidly by using columns with powdered Teflon as support. The retention indices of homologous derivatives show regularities, which can be explained by the theory of solution, and which make it possible to extrapolate the values obtained, within certain limits. These regularities can also serve as a guide in the interpretation of the chromatograms.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. T. JAMES, A. J. P. MARTIN ET G. H. SMITH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 238.
- ² A. T. JAMES, *Biochem. J.*, 52 (1952) 242.
- ³ J. SERPINET, *Journées Internationales de Séparation Immédiate et de Chromatographie*, Juin 1961, G.A.M.S., Paris, p. 307.
- ⁴ C. G. HONEGGER ET R. HONEGGER, *Nature*, 184 (1959) 551.
- ⁵ E. D. SMITH ET R. D. RADFORD, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 1160.
- ⁶ Y. L. SZE, M. L. BORKE ET D. M. OTTENSTEIN, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 240.
- ⁷ A. R. AMELL, P. S. LAMPREY ET R. C. SCHICK, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 1805.
- ⁸ R. B. HUGHES, *J. Sci. Food. Agr.*, 10 (1959) 431.
- ⁹ A. W. DECORA ET G. V. DINNEEN, dans H. J. NOEBELS, V. J. COATES ET I. S. FAGERSON (Éditeurs), *Gas Chromatography, 1959*, Academic Press, New-York, 1961, p. 33.
- ¹⁰ H. S. KNIGHT, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 2030.
- ¹¹ J. JANAK, J. NOVAK ET G. ZOLLNER, *Collection Chem. Commun.*, 27 (1962) 2628.
- ¹² H. M. FALES ET J. J. PISANO, *Anal. Biochem.*, 3 (1962) 337.
- ¹³ C. LANDAULT ET G. GUIOCHON, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 133.
- ¹⁴ A. WEHRLI ET E. KOVATS, *Helv. Chim. Acta*, 42 (1959) 2709.
- ¹⁵ E. KOVATS, *Helv. Chim. Acta*, 41 (1958) 1915.
- ¹⁶ P. CHOVIN ET J. LEBBE, *Journées Internationales de Séparation Immédiate et de Chromatographie*, Juin 1961, G.A.M.S., Paris, p. 90.
- ¹⁷ M. DUCLOS, *Thèse*, Paris, 1962.
- ¹⁸ A. J. P. MARTIN, *Biochem. Soc. Symp. (Cambridge, Engl.)*, 3 (1949) 4.
- ¹⁹ C. D. HODGMAN, *Handbook of Chemistry and Physics*, Chemical Rubber Publ. Co., Cleveland, Ohio, 1960.
- ²⁰ R. R. DREISBACH, *Physical Properties of Chemical Compounds*, Vol. III, Am. Chem. Soc., Washington, 1961.
- ²¹ J. ZULAICA ET G. GUIOCHON, *Bull. Soc. Chim. France*, (1963) 1241.
- ²² M. HUGUET, *Journées Internationales de Séparation Immédiate et de Chromatographie*, Juin 1961, G.A.M.S., Paris, p. 69.
- ²³ A. T. JAMES ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 679.
- ²⁴ H. STRICKLER ET E. KOVATS, *J. Chromatog.*, 8 (1962) 289.

J. Chromatog., 13 (1964) 327-336