

# CONTRIBUTION A L'ANALYSE DES POLYÉTHYLÈNEGLYCOLS ET DE LEURS MONOÉTHERS PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE DE LEURS ESTERS 3,5-DINITROBENZOÏQUES

## I. POLYÉTHYLÈNEGLYCOLS

H. GAUTHIER

*Laboratoire Analytique, Laboratoire Central, FMC-SA. \*,  
Saint-Denis, Seine (France)*

ET

G. MANGENEY

*Chef Service PAT \*\*, Laboratoire Central, FMC-SA. \*,  
Saint-Denis, Seine (France)*

(Reçu le 3 juillet 1963)

La méthode de chromatographie sur papier des 3,5-dinitrobenzoates (DNB) des polyéthylène-glycols (PEG) et de leurs éthers avec les alcools aliphatiques, publiée par BORECKÝ ET GASPARIČ<sup>1,2</sup>, a été appliquée dans notre laboratoire à l'étude des produits techniques obtenus par polyoxyéthylénation du glycol ("polyéthylène-glycols"). Nous rappelons que, selon les auteurs cités, les substances (PEG, respectivement leurs dérivés) sont transformées préalablement en 3,5-dinitrobenzoates, lesquels sont chromatographiés sur papier imprégné, selon les cas, de formamide, diméthylformamide, huile de paraffine. La révélation est obtenue par transformation, sur le papier, en bases de Schiff correspondantes (de couleur jaune), grâce à une réduction au moyen de chlorure stanneux suivie de condensation avec le *p*-diméthylamino-benzaldéhyde.

La méthode nous a effectivement fourni de bons résultats. Cependant, dans le cas des diesters 3,5-dinitrobenzoïques des polyéthylène-glycols, et avec le formamide comme phase stationnaire, nous avons rencontré des difficultés de séparation (forme allongée des taches, défaut de reproductibilité, etc.). Il est apparu, de plus, au cours du travail, que la phase stationnaire (formamide) gênait la révélation.

Nous avons également étudié l'application du principe de la méthode de BORECKÝ ET GASPARIČ, à savoir la chromatographie sur papier à l'état d'esters 3,5-dinitrobenzoïques, à la classe fort importante mais, à notre connaissance, non traitée par les auteurs tchèques, des alkylphénols polyoxyéthylénés. Mentionnons seulement pour l'instant que l'emploi des systèmes de phases préconisés par BORECKÝ ET GASPARIČ, tant pour le cas des DNB des polyéthylène-glycols que pour celui des DNB des alcools aliphatiques polyoxyéthylénés (notamment l'utilisation d'huile de paraffine comme phase stationnaire), n'a pas donné de résultat positif. Par contre, la résolution des DNB des alkylphénols polyoxyéthylénés (du moins de leurs douze à quinze premiers

\* Française des Matières Colorantes, Société Anonyme.

\*\* Produits Auxiliaires de Teinture.

termes) a pu être réalisée grâce à l'emploi d'une phase stationnaire telle que l'huile de soja, ayant un caractère polaire dont l'huile de paraffine est dépourvue. La netteté et la reproductibilité des séparations observées avec ce type de phase stationnaire nous a incités, par la suite, à étendre leur emploi à la chromatographie sur papier des esters 3,5-dinitrobenzoïques des alcools gras, et des diesters 3,5-dinitrobenzoïques des polyéthylèneglycols. Nous réservons à une date ultérieure la publication de nos travaux à ce sujet.

Pour ce qui concerne la chromatographie selon BORECKÝ ET GASPARIČ, sur papier imprégné de formamide, des diesters 3,5-dinitrobenzoïques des polyéthylèneglycols, nous rapportons ici, d'une part, l'étude des facteurs susceptibles d'être responsables des irrégularités signalées plus haut, et d'autre part, la recherche de phases mobiles permettant de réaliser des séparations plus nettes et plus régulières.

Enfin, nous écartant de la méthode de BORECKÝ ET GASPARIČ, nous examinons la possibilité d'employer des supports de la phase stationnaire (formamide) autres que le papier (Kieselguhr en couche mince, colonne d'alumine).

Auparavant, nous tenons toutefois à préciser ici le mode opératoire utilisé par nous pour la préparation des esters 3,5-dinitrobenzoïques.

#### PRÉPARATION DES DIESTERS DES PEG

La préparation en série des esters dinitrobenzoïques peut être effectuée selon la méthode simple indiquée par BORECKÝ ET GASPARIČ<sup>1</sup>. Cependant, pour l'élimination de l'excès de chlorure de 3,5-dinitrobenzoyle, nous avons été conduits, d'une part, à substituer la soude 5 % au carbonate de sodium trop peu actif (préconisé par BORECKÝ ET GASPARIČ<sup>1</sup>), et d'autre part, à effectuer un lavage systématique des solutions benzéniques.

Nous opérons actuellement de la manière suivante:

Dans un tube à essais de 160 mm de longueur et 16 mm de diamètre, on pèse exactement 0.1 g de produit à étudier, et approximativement une quantité de Cl-DNB correspondant à un excès de 50 % par rapport à la quantité théorique nécessaire pour obtenir les diesters dans le cas des PEG. On mélange le tout avec une baguette de verre, et porte 20 min à 110°.

Après refroidissement, on ajoute d'abord 2 ml de benzène, puis 3-4 ml de soude à 5 %; on agite avec la baguette de verre pour dissoudre le produit de réaction, et l'on ajoute encore 8 ml de benzène de manière à obtenir une solution à 1 % en produit mis en oeuvre.

Le tube est bouché au moyen d'un bouchon de liège protégé par une feuille souple de polyéthylène, et agité mécaniquement pendant 5 min. On laisse décanter; la solution alcaline sous-jacente est pipetée, remplacée par 5 ml de soude à 5 % et le tube est soumis pendant 15 min à l'agitation mécanique. L'opération est répétée trois fois. On lave, de la même manière, à l'eau distillée jusqu'à neutralité (3-4 fois).

La phase benzénique restante est additionnée de sulfate de sodium anhydre et agitée afin de la sécher. On laisse reposer. La solution benzénique surnageante des dinitrobenzoates est alors prête à être déposée sur le papier pour la chromatographie.

Nous avons opéré en chromatographie descendante; les indications et les observations du texte qui suit sont relatives à ce mode opératoire. Le papier utilisé était le papier Arches 302. Ajoutons que la position verticale adoptée lors du développe-

ment correspondait au "sens machine" du papier; le déplacement de la phase mobile s'effectuait donc suivant le sens d'orientation des fibres.

Il convient peut-être de souligner que la présente étude de séparation chromatographique ne concerne que *les esters 3,5-dinitrobenzoïques* des classes de corps citées (polyéthylène glycols). Si donc, dans le texte qui suit, il nous arrive d'utiliser des expressions telles que par exemple premiers termes, termes légers, termes lourds, etc., ce n'est que dans le dessein d'alléger le texte, et il faut toujours entendre par là les esters 3,5-dinitrobenzoïques de ces termes.

#### RÉVÉLATION DES TACHES

Nous avons mentionné que l'excès de la phase stationnaire (formamide) gênait la révélation des DNB sur le papier. Nous avons donc recherché tout d'abord un moyen d'y remédier.

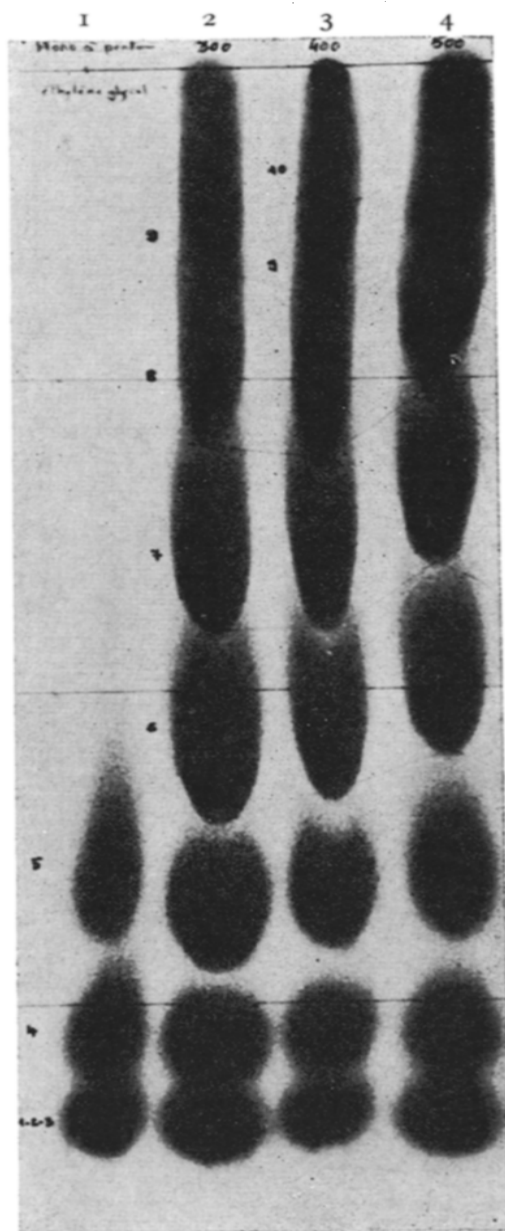


Fig. 1. Bis-3,5-DNB de polyéthylène glycols techniques. 1 = mélange synthétique des mono-, di-, tri-, tétra- et pentaéthylène glycols; 2, 3, 4 = polyéthylène glycols techniques 300, 400, 500. Phase stationnaire: formamide (20% dans acétone). Phase mobile: hexane-benzène (1:1) (en vol.). Atmosphère de l'enceinte saturée avec hexane-benzène (1:1). Durée de développement: 6 h. Température: 17-19°.

Nous n'avons pas trouvé de solvant permettant, par lavage des chromatogrammes, d'éliminer le formamide sans dissoudre les DNB. Mais il est facile de s'en débarrasser en le volatilisant par chauffage des chromatogrammes à 75–80° pendant 1,5–2 h. Nous avons vérifié que, pendant ce traitement, les DNB ne se décomposent pas et ne diffusent pas dans le papier. Par suite du départ du formamide, la révélation ultérieure des taches se trouve grandement améliorée (intensité, sensibilité, stabilité accrues, Fig. 1).

Après révélation des DNB, les bases de Schiff formées (jaunes) ne sont plus solubles dans l'éther éthylique, ni même dans des mélanges éther-méthanol suffisamment riches en éther, ce qui permet, à ce stade, de laver les chromatogrammes et d'éliminer ainsi la majeure partie de l'excès des réactifs ayant servi à la révélation ( $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{SnCl}_4$ ,  $\text{HCl}$ , *p*-diméthylaminobenzaldéhyde), et même le formamide ayant éventuellement échappé au chauffage. Ce traitement assure une meilleure conservation des chromatogrammes.

#### SYSTÈME FORMAMIDE/HEXANE-BENZÈNE

De même que BORECKÝ ET GASPARIČ<sup>1</sup>, nous avons observé un accroissement notable des  $R_F$ , en fonction de la concentration, dans les dépôts, des termes correspondants, accroissement sensible surtout à partir du bis-3,5-DNB du pentaéthylène-glycol.

D'autre part, et également à partir du bis-3,5-DNB du pentaéthylène-glycol, les taches prennent une forme allongée particulière: tête de forme plus ou moins aiguë (en V, en W, parfois plus arrondie) où la concentration est maximale, suivie d'une queue élargie et diffuse, de concentration décroissante; cette queue bifurque même souvent en deux branches. Le phénomène, parfois très prononcé, gêne la séparation des DNB: les taches se recouvrent, souvent sur une partie importante de leur surface, et cela surtout pour les termes supérieurs (par exemple, Figs. 1 et 2)\*.

A cet allongement des taches s'ajoute un élargissement par diffusion dans le papier au cours du développement, lequel diminue encore la netteté des séparations, et semble en même temps accentuer l'allongement des taches.

Enfin, malgré tous les soins apportés, une reproductibilité suffisante de la qualité des séparations reste difficile à atteindre.

Nous avons considéré un certain nombre de facteurs qui nous paraissaient susceptibles d'être responsables des phénomènes d'irrégularité observés.

Sauf indication contraire, les systèmes de phases utilisés dans l'étude de ces facteurs sont les suivants:

<i>Phase stationnaire</i>	<i>Phase mobile</i>
Papier imprégné avec une solution de formamide à 20 %	Hexane-benzène (1:1)
Papier imprégné avec une solution de formamide à 25 %	Hexane-benzène (3:4)

\* Il est d'ailleurs probable que l'accroissement des  $R_F$  en fonction de la concentration des termes correspondants et l'allongement des taches sont imputables à une même cause: nous verrons en effet que l'importance des deux phénomènes augmente ou diminue simultanément.

### *Influence de la qualité du formamide*

Des essais comparatifs de formamides d'origines et de puretés différentes (produit Prolabo tel quel, ou purifié par nos soins, produit Merck pur pour chromatographie) n'ont pas fait ressortir une influence significative du facteur pureté du formamide sur la qualité des chromatogrammes.

L'addition de petites quantités de produits de décomposition que l'on peut trouver dans le formamide (ammoniac, formiate d'ammonium, acide formique) n'a pas non plus paru exercer une influence notable.

### *Influence du solvant du formamide*

Nous utilisons primitivement le méthanol comme solvant du formamide, pour l'imprégnation du papier. Mais nous avons constaté que les solutions méthanoliques de formamide se décomposaient rapidement, avec dégagement d'ammoniac ( $\sim 24$  h). Nous avons alors remplacé avantageusement le méthanol par l'acétone qui permet de réaliser des solutions beaucoup plus stables, pouvant être conservées plusieurs jours sans décomposition apparente. Les auteurs tchèques utilisent l'éthanol<sup>1</sup>.

### *Influence de l'humidité*

On effectue l'imprégnation du papier en formamide par immersion dans une solution de ce dernier dans un solvant volatil. Lors de l'évaporation du solvant suivant les indications de BORECKÝ ET GASPARIČ<sup>1,2</sup>, c'est-à-dire dans l'atmosphère et à la température ambiante, il se produit inévitablement une absorption d'humidité par le papier imprégné, due à l'action conjuguée des propriétés hygroscopiques du formamide et du refroidissement provoqué par l'évaporation du solvant.

Nous avons cherché à éliminer l'influence de cette humidification en séchant, après départ du solvant, le papier imprégné de formamide dans une enceinte légèrement chauffée: par exemple, un séjour de 15 min dans une étuve, réglée à 45° et en présence de CaCl<sub>2</sub> anhydre, s'est avéré suffisant, sans provoquer de départ sensible de formamide. (Notons que ce traitement permet en même temps d'éliminer des traces de solvant, capables, le cas échéant, d'exercer une action perturbatrice (Réf. 2, p. 483).)

Après le dépôt des substances à chromatographier, on sèche à nouveau pendant 10 min dans les mêmes conditions.

Nous prenons également soin de dessécher l'atmosphère de la cuve de développement au moyen de CaCl<sub>2</sub> anhydre.

Dans ces conditions, nous avons constaté que l'effet d'élargissement diffus des taches se trouvait réduit notablement (Fig. 2a et 2b).

### *Influence du mode de dépôt des substances à chromatographier*

Nous avons déjà dit plus haut (p. 212) que, dans le système considéré ici (formamide 20 ou 25 %/hexane-benzène (1:1) ou (3:4)), les  $R_F$  variaient en fonction directe de la quantité de substance déposée par unité de surface (concentration de substance sur le papier). Cette variation est accompagnée du phénomène d'allongement des taches. Nous nous sommes alors demandé si la forme elle-même des taches (forme en V ou W), de son côté, n'était pas à mettre en relation avec des variations de concentration en substance à l'intérieur de la surface de dépôt.

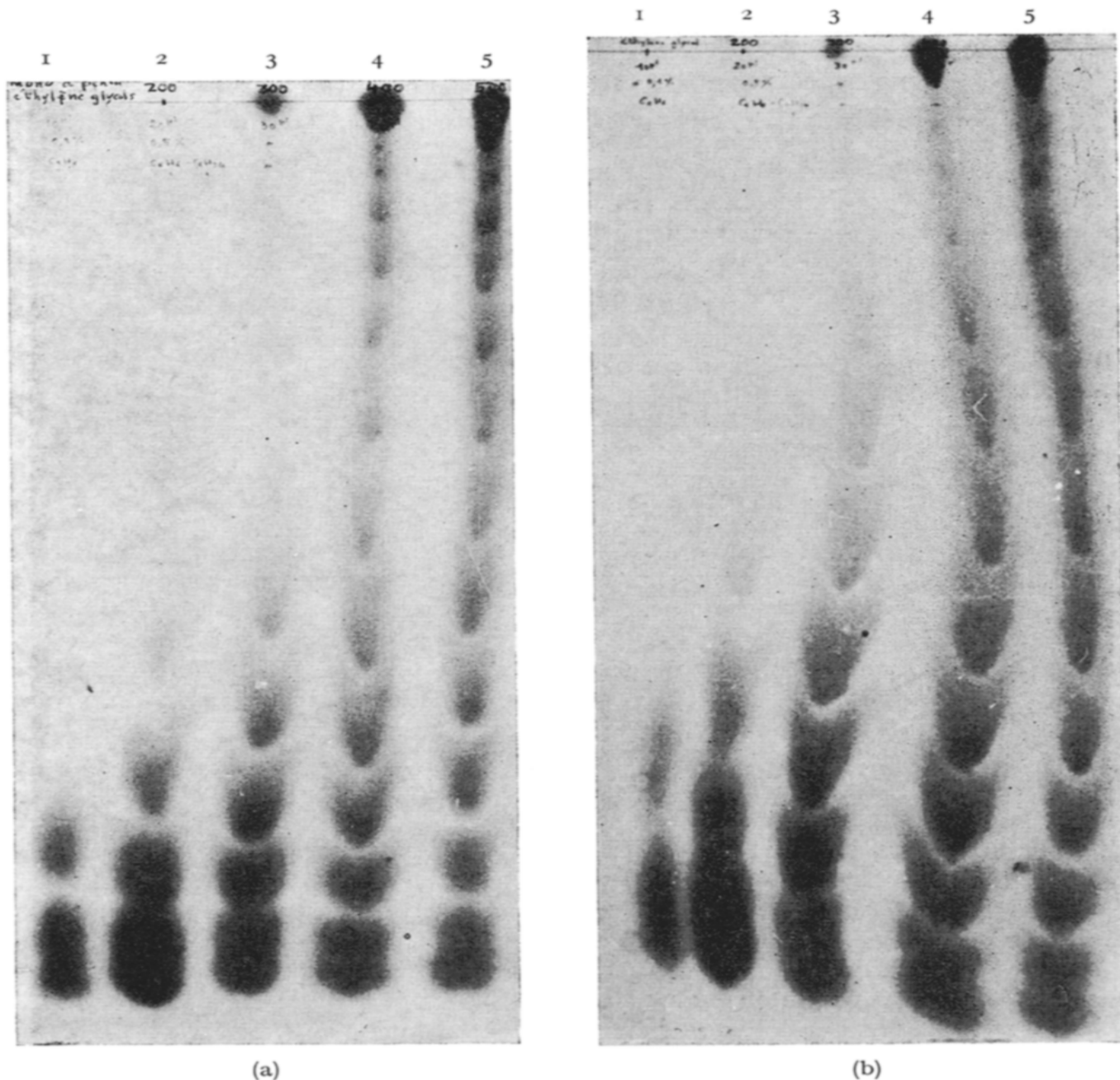


Fig. 2. Bis-3,5-DNB de polyéthylèneglycols techniques. (a) Papier séché 15 min à 45° après imprégnation. (b) Papier non séché après imprégnation. 1 = mélange synthétique des mono-, di-, tri-, tétra- et pentaéthylèneglycols; 2,3,4,5 = polyéthylèneglycols techniques 200, 300, 400, 500. Phase stationnaire: formamide (20% dans acétone). Phase mobile: hexane-benzène (1:1). Durée de développement: 3 h 30 min. Température:  $\sim 18^\circ$ .

Nous déposons les DNB des polyéthylèneglycols sous forme de leurs solutions dans le benzène. Si l'on effectue le dépôt en appliquant la pointe de la micropipette au point choisi sur le papier, il se produit autour de ce point une tache circulaire, constituant la surface de dépôt. Le diamètre de cette tache dépend du volume de solution déposée et de la rapidité d'évaporation du solvant (température, courants

d'air, etc.). Or, le benzène est, vis-à-vis des DNB, un éluant fort; il aura tendance à les entraîner vers la périphérie de la surface de dépôt.

On conçoit que le mouvement de la phase mobile à travers une surface de dépôt ainsi constituée (surface circulaire à concentration périphérique plus grande) ait tendance, étant donné l'influence sur les  $R_F$  de la concentration en substances, à donner des taches à double maximum (forme en W plus ou moins prononcé).

La réalisation d'une surface de dépôt plus homogène, obtenue par exemple en multipliant les touches à la micropipette et en les répartissant sur une surface rectangulaire, a permis d'obtenir des taches en forme de trapèzes plus ramassés.

Mais aucun artifice ne nous a permis, dans le système considéré ici, de supprimer ou de réduire l'allongement des taches proprement dit.

#### *Influence de la saturation de l'atmosphère de la chambre de développement*

Dans nos essais, l'atmosphère de la chambre de développement est saturée en phase mobile d'une part grâce à un bac, contenant celle-ci, placé au fond de la chambre, d'autre part grâce à une feuille de papier supplémentaire imbibée de phase mobile, dispensée par une augette spéciale située à la partie supérieure de l'enceinte.

La saturation exacte de l'atmosphère de la chambre en phase mobile (hexane-benzène) est très importante, car elle influe directement sur la composition de la phase mobile parcourant la feuille de papier. Cette variation de composition, à coup sûr, perturbe le développement; elle pourrait très bien être responsable de l'allongement des taches: en effet, une saturation imparfaite semble devoir a priori entraîner un enrichissement, sur le papier, de la phase mobile en benzène, par suite d'une évaporation plus rapide de l'hexane. Et le benzène, éluant fort vis-à-vis des DNB, a tendance à les entraîner vers le front du liquide.

Effectivement, des essais en atmosphère saturée par un mélange hexane-benzène plus riche en benzène que la phase mobile, ont conduit à des chromatogrammes dont les taches sont très allongées; en même temps, l'on constate une augmentation générale des  $R_F$  (Fig. 3b). Inversement, les chromatogrammes obtenus en opérant en atmosphère saturée par un mélange plus riche en hexane que la phase mobile ont montré une atténuation sensible de l'allongement des taches, en même temps qu'une diminution des  $R_F$  (Fig. 3a).

Nous avons, également, réalisé volontairement une saturation imparfaite de l'enceinte, de manière à en vérifier directement l'influence, envisagée ci-dessus, sur la forme des taches. On constate là aussi une forte accentuation de l'allongement des taches, accompagnée d'une forte augmentation des  $R_F$  (mesurés au front des taches).

Ces essais vérifient donc bien que l'influence perturbatrice d'une saturation imparfaite de l'atmosphère de l'enceinte consiste en une accentuation de l'allongement, un étirement des taches.

Cependant, ce facteur ne peut pas être considéré comme une cause essentielle du phénomène pour la raison suivante: nous avons effectué des essais dans une atmosphère à la saturation et à l'homogénéité de laquelle avaient été apportés des soins tout particuliers (notamment grâce à un brassage de l'atmosphère de l'enceinte par ventilateur<sup>3</sup>: la saturation est vérifiée par le fait que la feuille de papier destinée à saturer l'atmosphère ne sèche plus, même à proximité du courant de vapeurs produit par le ventilateur). Et pourtant, le phénomène d'allongement des taches est demeuré toujours aussi prononcé.

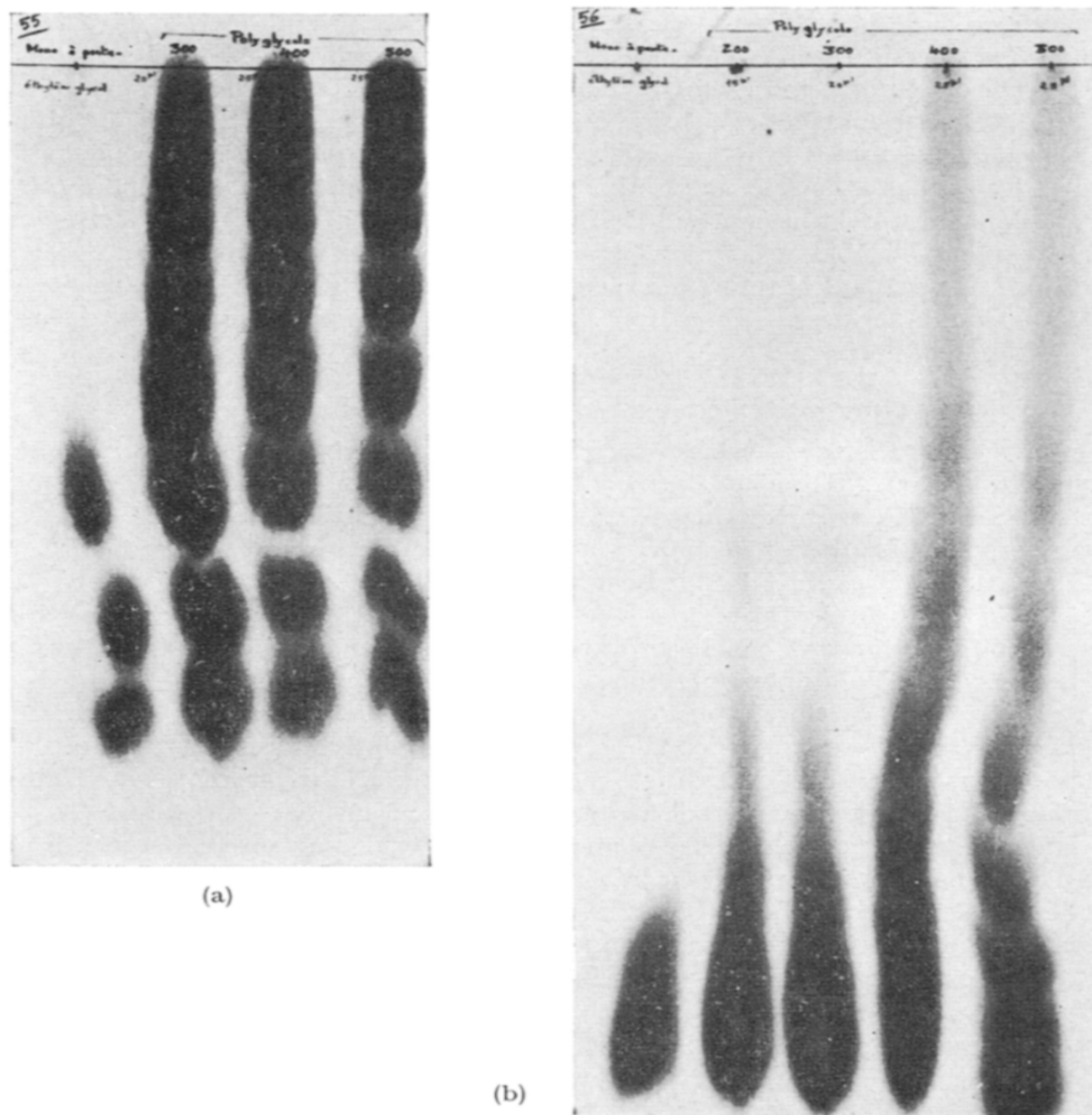


Fig. 3. Bis-3,5-DNB de polyéthyléneglycols techniques. (a) Atmosphère de l'enceinte saturée avec c hexane-benzène (2:1). (b) Atmosphère de l'enceinte saturée avec hexane-benzène (1:2). Phase stationnaire: formamide (20% dans acétone); papier séché à 45° après imprégnation. Phase mobile: hexane-benzène (1:1).

Il reste que, lorsqu'il intervient, le facteur saturation imparfaite de l'atmosphère, joint d'autre part aux fluctuations de la concentration du papier en formamide<sup>1,2</sup> peut du moins rendre compte du défaut de reproductibilité observé dans les séparations.

#### *Influence de la concentration du papier en phase mobile*

Nous avons pensé aux perturbations que peut apporter à un développement régulier le fait que, au cours de la migration de la phase mobile, il existe sur le papier une diminution continue de la concentration en phase mobile depuis la ligne d'immersion jusqu'au front de progression.



Ce phénomène, qui est connu (*cf.*, entre autres, Réfs. 4, 5), est facilement observable dans le cas présent: la partie de la feuille de papier voisine de la ligne d'immersion prend un aspect mouillé alors que les régions proches du front apparaissent presque sèches, à tel point que le front de déplacement de la phase mobile devient de moins en moins discernable avec l'augmentation de la distance parcourue (ceci étant vrai même en atmosphère bien saturée).

Plus particulièrement, nous nous sommes demandé comment évoluerait le développement si l'on évitait, ou si l'on supprimait la zone très mouillée. Une première manière était d'éloigner de la ligne d'immersion les points de dépôt des produits à chromatographier (c'est d'ailleurs cette raison qui sans doute justifie la recommandation faite par certains auteurs de déposer les substances à une distance d'au moins 5 cm de la ligne d'immersion).

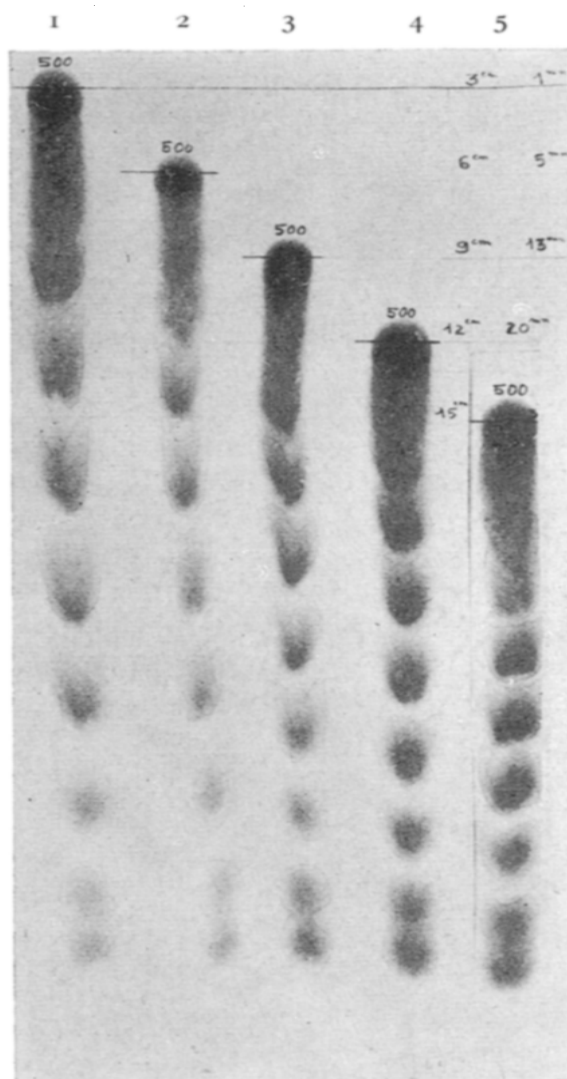


Fig. 4. Bis-3,5-DNB d'un polyéthylène glycol 500 technique. Dépôt de la substance à des distances croissantes de la ligne d'immersion. Col. 1 = 3 cm; col. 2 = 6 cm; col. 3 = 9 cm; col. 4 = 12 cm; col. 5 = 15 cm. Phase stationnaire: formamide (20 % dans acétone); papier séché à 45° après imprégnation. Phase mobile: hexane-benzène (3:4). Atmosphère saturée avec hexane-benzène (3:4).  
Température: 21-22°.

Une seconde manière consistait à abaisser le régime des tensions de vapeur dans l'atmosphère de l'enceinte par création dans celle-ci d'un gradient de température, de manière à diminuer, par évaporation, la concentration en phase mobile sur le papier: ce que nous avons tenté de réaliser par introduction de glace carbonique dans l'enceinte. C'est, en quelque sorte, prendre le contrepied de ce que nous avons recherché p. 215, mais d'une manière tout à fait particulière\*.

(a) *Eloignement des points de dépôt des produits à chromatographier.* La Fig. 4 montre très nettement une diminution progressive de l'allongement des taches au fur et à mesure que l'on augmente la distance des dépôts à la ligne d'immersion. Pour une distance de 12-15 cm, les taches ne sont pratiquement plus allongées; la résolution est sensiblement améliorée.

(b) *Introduction de glace carbonique dans l'enceinte en début de développement.* Voici comment nous avons procédé: la saturation de l'atmosphère en phase mobile étant assurée selon les modalités indiquées plus haut, et le papier, portant les substances à chromatographier, étant en place dans son augette vide, on introduit rapidement dans l'enceinte 500-800 g de glace carbonique pilée; on ferme l'enceinte, puis on verse rapidement, par un orifice prévu à cet effet, la phase mobile dans son augette.

On observe alors, autour de la glace carbonique, l'apparition d'aiguilles de benzène et une condensation d'hexane (moins apparente). Entre temps, la progression de la phase mobile a commencé; mais, après une certaine avance (qui dépend des conditions opératoires; Fig. 5), le développement est pratiquement stoppé du fait de l'appauvrissement du papier en phase mobile. Puis, au fur et à mesure que disparaît la glace carbonique les conditions initiales se rétablissent, et le développement reprend progressivement.

Le résultat obtenu est intéressant: après révélation, on voit apparaître des taches presque rondes pour les termes inférieurs, beaucoup moins allongées pour les termes plus élevés, et la séparation est améliorée (Fig. 5, col. 1).

(c) *Combinaison des modifications (a) et (b).* Le chromatogramme de la Fig. 5 (col. 2-8) permet de voir que la combinaison des deux modifications (a) et (b) est encore plus efficace que chacune d'elles prise isolément: là encore les taches sont d'autant plus rondes et régulières que le point de dépôt a été éloigné davantage de la ligne d'immersion, et leur séparation devient cette fois pratiquement complète (alors que, notons-le en passant, les quantités de substances présentes dans les taches sont relativement très importantes).

#### *Influence de la concentration du papier en phase stationnaire*

Nous venons d'exposer que la diminution de la concentration en phase mobile sur le papier (diminution obtenue soit par introduction de glace carbonique dans l'enceinte, soit par l'artifice de l'éloignement des points de dépôt, soit encore par la combinaison des deux procédés) avait pour conséquence l'obtention de taches arrondies bien ramassées.

On peut se demander si le même effet ne pourrait pas être atteint par une voie inverse, c'est-à-dire par augmentation de la concentration du papier en phase stationnaire (formamide).

BORECKÝ ET GASPARIČ<sup>1</sup> imprègnent le papier au moyen d'une solution de for-

\* Une technique analogue de création d'un gradient de température a déjà été décrite (DRAFRON<sup>2</sup>).

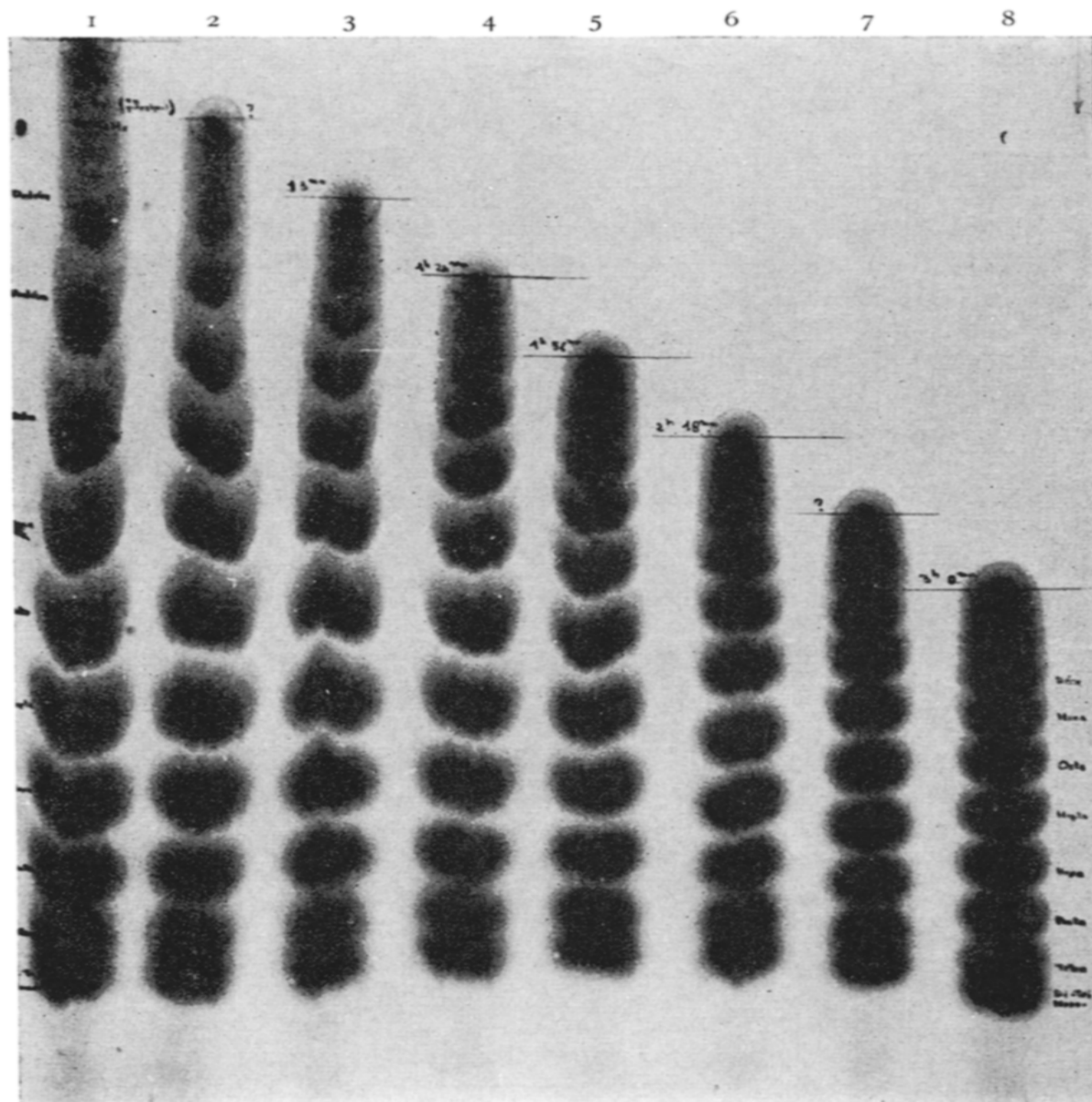


Fig. 5. Bis-3,5-DNB d'un polyéthylène glycol 400 technique. Introduction de glace carbonique dans l'enceinte au début du développement. Dépôt de la substance à des distances croissantes de la ligne d'immersion. Col. 1 = 3 cm; col. 2 = 6 cm; col. 3 = 9 cm; col. 4 = 12 cm; col. 5 = 15 cm; col. 6 = 18 cm; col. 7 = 21 cm; col. 8 = 24 cm. Phase stationnaire: formamide (20 % dans acétone) papier séché à 45° après imprégnation. Phase mobile: hexane-benzène (1:1)

formamide à 20 % (dans l'éthanol). Nous avons alors imprégné le papier avec des solutions de formamide à 40 % et davantage (dans l'acétone).

Cependant, conformément à la formule:

$$R_F = \frac{1}{1 + \frac{C_s A_s}{C_m A_m}}$$

où  $C_s/C_m$  = coefficient de partage entre phase stationnaire et phase mobile,  $A_s$  = aire de la section transversale de la phase stationnaire,  $A_m$  = aire de la section transversale de la phase mobile, conformément, aussi, aux observations faites par GASPARIČ ET

BORECKÝ<sup>2</sup> et par nous-mêmes à ce sujet, l'augmentation de la concentration du papier en phase stationnaire a pour effet de diminuer les valeurs des  $R_F$ . Afin de compenser cette influence défavorable, nous avons été amenés à augmenter la proportion d'éluant fort (benzène) dans la phase mobile et à utiliser ainsi des mélanges hexane-benzène dont les proportions respectives étaient, par exemple, de 1:2.

Il convient de souligner que, pour obtenir des résultats satisfaisants, tant du point de vue de la qualité des séparations que de celui de la qualité de la révélation des chromatogrammes, avec des concentrations aussi élevées en formamide sur le papier, il est nécessaire de prendre les précautions indiquées plus haut: (a) séchage, avant développement, du papier imprégné en formamide (p. 213), (b) élimination totale de la phase stationnaire (formamide) avant révélation (p. 212).

Il est possible que les effets défavorables du formamide, constatés en l'absence de ces précautions, aient amené BORECKÝ ET GASPARIČ à ne pas dépasser la concentration de 20 % en formamide, pour la solution d'imprégnation.

Afin d'observer l'action d'une concentration plus grande du papier en formamide, nous avons donc développé deux chromatogrammes simultanément, dans la même enceinte, l'un ayant été imprégné avec une solution de formamide à 20 % (dans l'acétone), l'autre avec une solution à 40 % (dans le même solvant). Les autres conditions opératoires étaient maintenues aussi identiques que possible: procédure d'imprégnation, séchage à 45° (selon mode opératoire p. 213), dépôts à la même distance de la ligne d'immersion (~ 3 cm), composition de la phase mobile hexane-benzène (1:2), saturation de l'atmosphère de l'enceinte, dispositif d'alimentation en phase mobile, température, etc.

Les résultats sont démonstratifs: sur le papier traité avec la solution de formamide à 40 % (et malgré la faible distance, 3 cm, des dépôts à la ligne d'immersion), on constate l'absence de tout allongement des taches (Fig. 6b). Au contraire, le chromatogramme réalisé sur papier traité au formamide à 20 % a conservé l'aspect habituel: taches allongées, qui se recouvrent partiellement (Fig. 6a).

Ces résultats (disparition de l'allongement des taches par augmentation de la concentration du papier en phase stationnaire), joints à ceux du paragraphe précédent (disparition de l'allongement des taches par diminution de la concentration du papier en phase mobile), font donc apparaître un lien, nécessaire à l'obtention de taches régulières, entre quantités de phase stationnaire et de phase mobile en présence sur le papier.

Ceci nous amène à reconsidérer la manière de préparer le papier imprégné en phase stationnaire. En effet, jusqu'ici, dans un souci de régularité d'imprégnation, nous avons, à l'encontre de BORECKÝ ET GASPARIČ, suspendu le papier imprégné, aux fins d'égouttage et d'évaporation, de telle manière que la future ligne de départ fût placée en haut. BORECKÝ ET GASPARIČ placent, dans cette opération, la ligne de départ en bas (Réf. 2, p. 482). La concentration du papier en phase stationnaire est alors plus élevée à la ligne de départ, et décroît lorsque l'on s'en éloigne (Réf. 2, p. 481)\*. De cette manière, le gradient de concentration du papier en phase station-

\* On pourrait même, à ce propos, objecter au raisonnement de la p. 218 (influence de l'éloignement des points de dépôt) que l'effet observé est dû à ce gradient (de sens croissant) de concentration du papier en phase stationnaire, et non pas au gradient (de sens décroissant) de concentration du papier en phase mobile. Mais, nous l'avons vérifié, la variation de la concentration de la phase stationnaire le long du papier, sur une longueur de 10-15 cm, n'est pas assez importante pour produire un effet aussi notable.

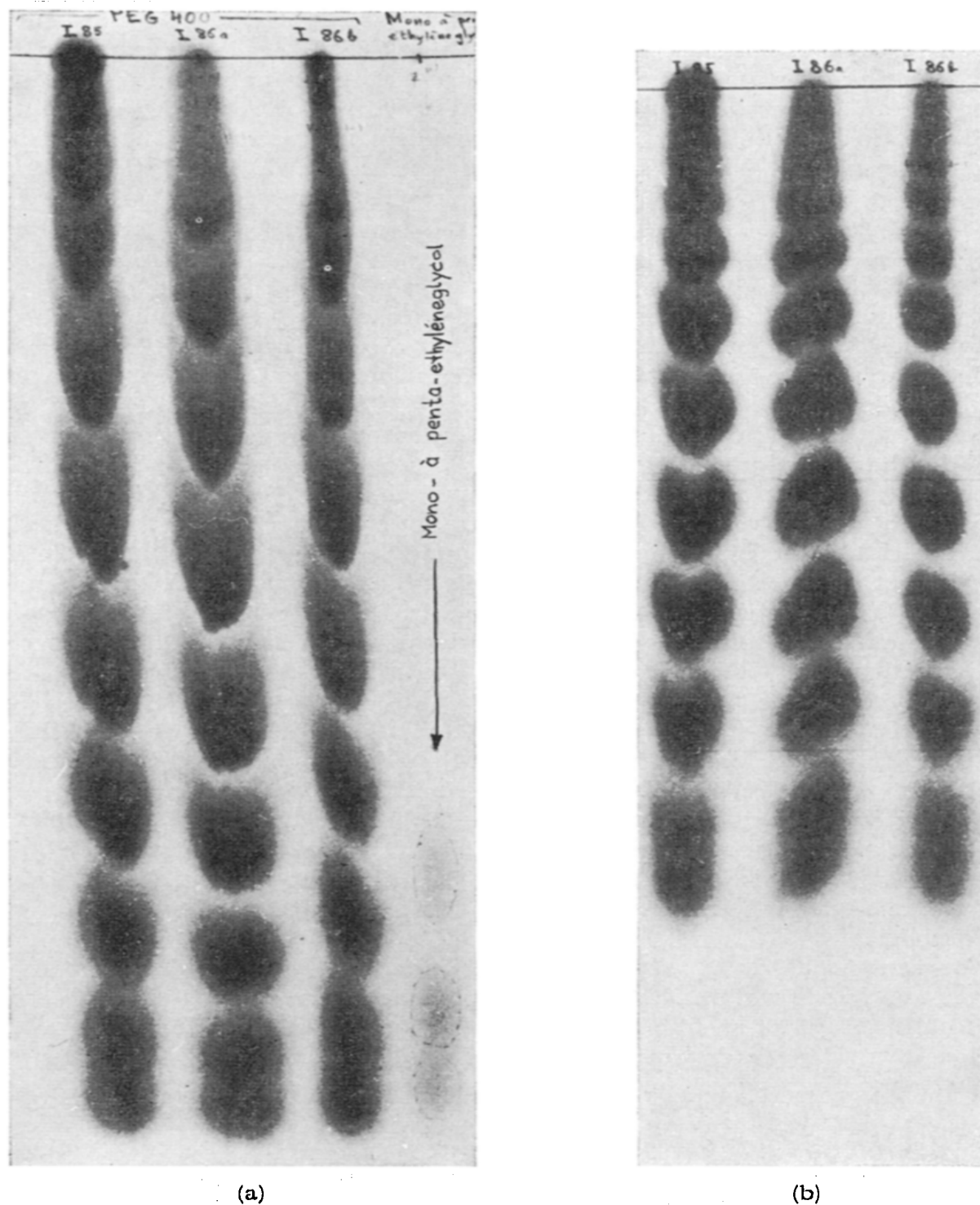


Fig. 6. Bis-3,5-DNB d'un polyéthylène-glycol 400 technique. (a) Papier imprégné avec solution de formamide à 20%. (b) Papier imprégné avec solution de formamide à 40%. Papier séché à 45° après imprégnation. Phase mobile: hexane-benzène (1:2). Atmosphère de l'enceinte saturée avec hexane-benzène (1:2), et brassée par un ventilateur. Durée d'élu-tion: 5 h 15 min. Température: 19°.

naire est de même sens que le gradient de concentration du papier en phase mobile qui s'établit lors du développement. Ce mode opératoire est donc plus indiqué dans le cas étudié ici, puisqu'il tend à corriger partiellement le déséquilibre, sur le papier, entre quantités de phase stationnaire et de phase mobile en présence. Nous l'avons utilisé pour effectuer le chromatogramme de la Fig. 7, où l'on peut voir en effet une certaine diminution de l'allongement, bien que la résolution soit ici incomplète. Avec ce mode opératoire, il suffit de porter la concentration de la solution d'imprégnation à 30 ou 35 % (au lieu des 40 % indiqués plus haut) pour obtenir de bons résultats.

#### *Influence de la concentration du papier imprégné en substance déposée*

Le fait que l'augmentation de la concentration du papier en phase stationnaire a pour effet de supprimer l'allongement des taches conduit à se demander s'il n'intervenait pas, lors de l'emploi de papier traité avec des solutions à 20 % seulement en phase stationnaire (mode opératoire de BORECKÝ ET GASPARIČ<sup>1, 2</sup>), un phénomène de saturation de celle-ci en substance à chromatographier, saturation que l'augmentation de la quantité de phase stationnaire ferait cesser.

S'il y a saturation, on peut aussi bien la faire cesser en diminuant la concentration en substance dans les taches déposées. Nous avons par conséquent étudié l'influence de la variation de cette concentration sur la forme des taches et sur la résolution. A cet effet, nous avons effectué, dans le système formamide à 20 %/hexane-benzène (4.5:5.5), la chromatographie d'une série de dépôts de même volume (50  $\mu$ l), donc de même surface, de solutions benzéniques du même produit de dinitrobenzoylation d'un polyéthylèneglycol 400 technique, à des concentrations variables: 0.1 %, 0.2 %, 0.5 %, 1 % et 2 %.

On peut alors constater (Fig. 7) que, en effet, l'allongement des taches diminue et que la résolution s'améliore avec la diminution de concentration des solutions déposées. L'effet est cependant beaucoup moins important que l'on pourrait s'y attendre: pour voir disparaître l'allongement des taches, il faut descendre jusqu'à une concentration de 0.1 %, concentration dix fois plus faible que celles que nous avons utilisées en général, et avec lesquelles nous avons cependant obtenu des taches non allongées et bien séparées, simplement en doublant la concentration du papier en phase stationnaire.

Le phénomène paraît donc plus complexe qu'une simple question de saturation de la phase stationnaire en produit à chromatographier. Cependant, la saturation, comme toujours en chromatographie, fixe une limite supérieure, à ne pas dépasser, pour la concentration en substance déposée du papier imprégné, limite qui, naturellement, varie avec le degré d'imprégnation.

#### *Conclusion*

Il semble donc bien, d'après les essais décrits ci-dessus, que l'allongement des taches soit dû essentiellement à un déséquilibre entre quantité de phase stationnaire et quantité de phase mobile en présence sur le papier. L'équilibre, par contre, paraît rétabli aussi bien lorsque (toutes autres modifications mises à part) l'on diminue, par un moyen approprié, la concentration du papier en phase mobile, que lorsque l'on augmente la concentration du papier en phase stationnaire.

Nos essais semblent, en outre, mettre en évidence une influence, sur l'allonge-

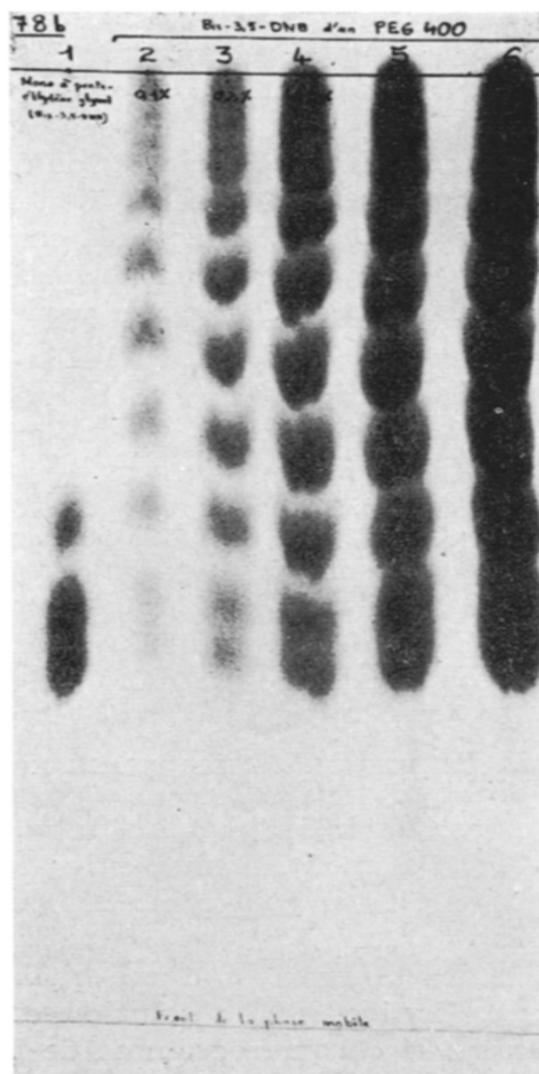


Fig. 7. Col. 1 = bis-3,5-DNB des mono-, di-, tri-, tétra- et pentaéthylèneglycols; col. 2,3,4,5,6 = bis-3,5-DNB d'un polyéthylèneglycol 400 technique à 0.1, 0.2, 0.5, 1 et 2 % (pourcentages exprimés en PEG mis en oeuvre). Phase stationnaire: formamide à 20 % (dans acétone); égouttage ligne de départ en bas; papier séché à 45° après imprégnation. Phase mobile: hexane-benzène (4.5:5.5). Durée d'éluion: 2 h 55 min. Température: 19°.

ment des taches, de la concentration en substance à chromatographier dans la surface de dépôt; en tout état de cause, et pour un système donné il faut éviter des concentrations trop élevées; la limite à ne pas dépasser, pour les concentrations des solutions à déposer, dans le système formamide 20 % se situe à 0.1 ou 0.2 % et dans le système formamide 40 % à 1 ou 2 % (avec le papier Arches 302).

Nous avons pu dégager également l'influence d'autres facteurs sur la qualité des chromatogrammes, ce sont :

- (i) L'humidité (élargissement diffus des taches).
- (ii) Le défaut de saturation de l'atmosphère de l'enceinte (enrichissement, sur le papier, de la phase mobile en benzène, d'où augmentation des  $R_F$  et étirement généralisé des taches).
- (iii) Le mode de dépôt de la substance à chromatographier (hétérogénéité de la surface de dépôt).

En résumé, les améliorations introduites dans la procédure de BORECKÝ ET GASPARIČ sont de deux sortes: celles qui concernent le développement des chromatogrammes, celles qui concernent leur révélation.

Les premières comprennent:

(a) L'alternative: augmentation de la concentration du papier en phase stationnaire, "diminution" (voir p. 216-218) de la concentration du papier en phase mobile.

(b) La détermination des limites supérieures de la concentration des surfaces de dépôt en produit à chromatographier, en fonction du système de phases utilisé.

(c) L'élimination de l'humidité par séchage du papier imprégné en phase stationnaire, à 45° en présence de CaCl<sub>2</sub> anhydre.

(d) La saturation et l'homogénéisation de l'atmosphère de l'enceinte par brassage.

(e) La réalisation de surfaces de dépôt (des substances à chromatographier) plus homogènes en concentration.

Les secondes (voir p. 212) sont les suivantes:

(a) Élimination de la phase stationnaire (formamide) *avant révélation* (traitement thermique à 75-80°).

(b) Élimination des réactifs excédentaires après révélation, par lavage des chromatogrammes (par mélange éther éthylique-méthanol).

#### L'ÉTHER ÉTHYLIQUE COMME PHASE MOBILE

Nous avons essayé d'autres phases mobiles (heptane-benzène, heptane-toluène, etc.). Si la séparation des termes légers se montrait meilleure (différences de  $R_F$  plus marquées), celle des termes lourds était par contre moins bonne. Par conséquent, nous n'avons pas retenu ces phases mobiles.

Mais nous avons obtenu des séparations d'une qualité excellente en utilisant comme phase mobile l'éther éthylique. La résolution est particulièrement nette, comme le montre, par exemple, le chromatogramme de la Fig. 8, obtenu avec les dérivés bis-3,5-dinitrobenzoylés des premiers représentants de la série, purs (mono-, di-, tri-, tétra- et pentaéthylèneglycols), et avec les dérivés bis-3,5-dinitrobenzoylés de polyéthylèneglycols techniques de P.M. moyens compris entre 200 et 600:

(i) Les taches sont rondes, séparées complètement les unes des autres, jusqu'au dixième terme.

(ii) Les  $R_F$  des constituants se montrent relativement indépendants de leur concentration dans les dépôts; par conséquent, les identifications sont plus aisées et plus sûres.

(iii) Alors qu'avec le mélange hexane-benzène comme phase mobile, les trois premiers termes ne sont pas séparés, seuls les deux premiers ne sont pas résolus en utilisant l'éther éthylique comme phase mobile.

Il est nécessaire de saturer l'éther en formamide, celui-ci étant légèrement soluble dans l'éther. La volatilité de l'éther éthylique oblige à assurer une étanchéité suffisante de l'enceinte, d'abord pour des raisons de régularité de développement, ensuite, pour des raisons de sécurité. De même, la manipulation, après développement, des papiers imbibés d'éther éthylique exige l'observation de certaines précautions, ce qui est aisément concevable. D'ailleurs, les mêmes servitudes valent, encore davantage peut-être, pour l'emploi de solvants tels que benzène, hexane, etc. Toutefois, le fait



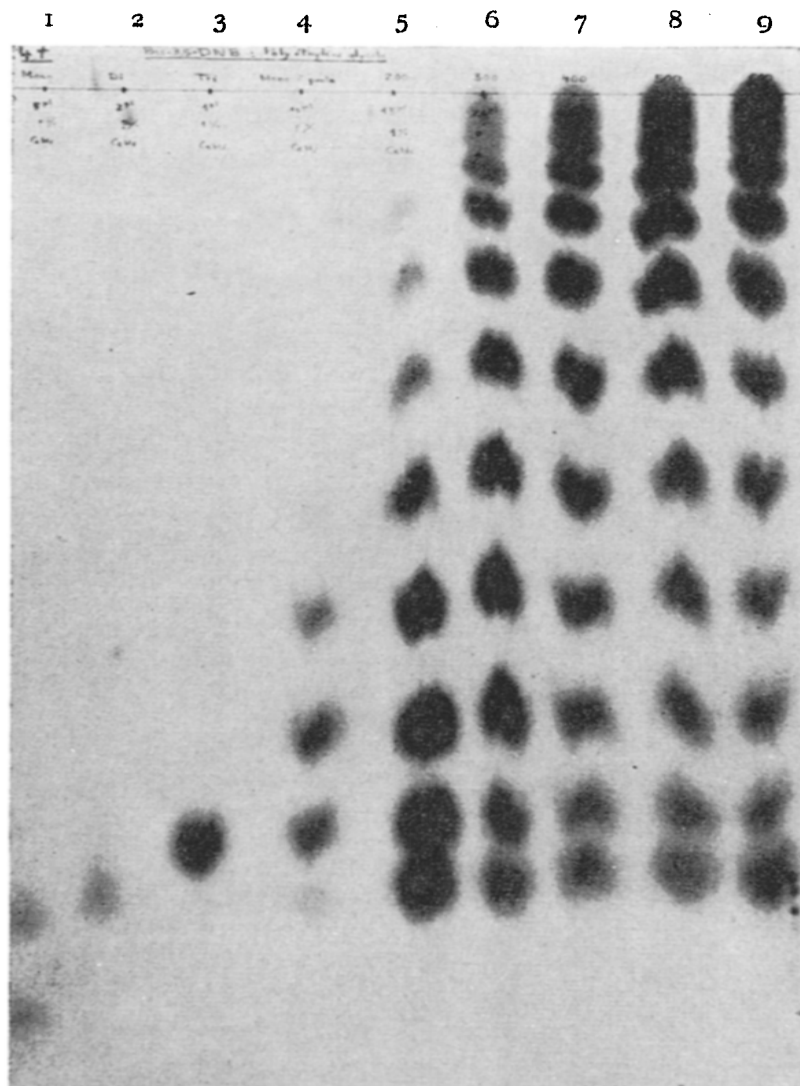


Fig. 8. Bis-3,5-DNB de polyéthylène glycols techniques. 1 = glycol tache supérieure (tache inférieure non identifiée); 2 = diéthylène glycol; 3 = triéthylène glycol; 4 = mélange synthétique des mono-, di-, tri-, tétra- et pentaéthylène glycols (mono et di en faible proportion); 5 = PEG 200; 6 = PEG 300; 7 = PEG 400; 8 = PEG 500; 9 = PEG 600. Phase stationnaire: formamide (20 % dans acétone); papier séché à 45° après imprégnation. Phase mobile: éther éthylique saturé de formamide. Durée de développement: 3 h. Température: 17-18°.

que la phase mobile soit constituée par un solvant unique constitue, en soi, une notable simplification, puisque tout risque de variation dans la composition de la phase mobile, pendant la durée du développement, se trouve écarté; l'obtention aisée de meilleurs résultats doit sans aucun doute être attribuée pour une part à cet avantage.

La manifestation simultanée de la disparition complète de l'allongement des taches et de l'insensibilité relative des  $R_f$  des constituants vis-à-vis de leur concentration dans les dépôts, confirme à nos yeux l'existence d'un lien entre ces deux phénomènes.

La netteté particulière des séparations obtenues avec ce système est très favorable à une étude quantitative de la composition des polyéthylène glycols techniques, étude qu'il est dans notre intention d'entreprendre.

## UTILISATION DE SUPPORTS DE LA PHASE STATIONNAIRE AUTRES QUE LE PAPIER

Dans la chromatographie sur papier imprégné, le rôle du papier paraît être simplement celui de support de la phase stationnaire. Il est, d'ailleurs, sans doute souhaitable, en chromatographie de partage, que le rôle du support soit aussi minime que possible.

Nous avons donc pensé qu'il était possible d'obtenir, par exemple sur couche mince ou sur colonne, imprégnées de formamide, les mêmes résultats que sur papier imprégné.

En effet, nous avons obtenu les mêmes séparations (des neuf à dix premiers termes des bis-3,5-DNB des PEG) et d'une qualité égale, sur couche mince de Kieselguhr imprégnée de formamide (au moyen d'une solution à 20 % dans l'acétone). Comme liant de la couche mince, plutôt que le plâtre très fragile, nous avons utilisé la gomme du Sénégal, laquelle donne un revêtement très adhérent et très résistant. Là aussi, la phase mobile éther éthylique saturé de formamide donne de bonnes séparations (taches rondes complètement séparées), tandis que les mélanges hexane-benzène donnent des taches allongées en V se recouvrant partiellement. On observe seulement une rétention un peu plus grande des DNB ( $R_F$  plus faibles). La révélation est effectuée de la même manière que sur papier (pulvérisation de chlorure stanneux, puis de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde) et les précautions prises (séchage à 45° après imprégnation en particulier) sont les mêmes.

Des essais sur colonne (par exemple alumine imprégnée de formamide) ont également permis d'obtenir la séparation des premiers termes des diesters 3,5-dinitrobenzoïques des polyéthylèneglycols (depuis le quatrième jusqu'au neuvième) en quantités pondérales (20-30 mg de chacun des constituants ont été ainsi obtenus). L'éluant utilisé était le mélange hexane-benzène, la quantité de benzène étant progressivement accrue au fur et à mesure de l'élution.

La progression des zones dans la colonne était suivie d'une part par leur pouvoir absorbant en lumière U.V. réfléchi, et d'autre part par pesée des fractions éluées (le formamide est insoluble dans les mélanges hexane-benzène). Cette méthode a toutefois comme inconvénient la lenteur d'élution des taches.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer ici nos remerciements à la Direction Technique de la Société Française des Matières Colorantes, dans les services de laquelle nos travaux ont été effectués et qui a bien voulu nous autoriser à publier cette étude, à Monsieur R. GOUPIL, pour les conseils dont nous avons bénéficié, et à Monsieur N. DEVILLE dont nous avons pu apprécier l'aide technique.

## RÉSUMÉ

L'étude analytique des polyéthylèneglycols par chromatographie sur papier de leurs diesters 3,5-dinitrobenzoïques, telle qu'elle a été proposée par BORECKÝ ET GASPARIČ<sup>1</sup>, conduit à des résultats très intéressants. Cependant, certaines irrégularités (allongement des taches, diffusion) réduisent la netteté des séparations. Il a donc été procédé à une étude des causes de ces perturbations, ainsi qu'à la recherche d'autres phases mobiles, permettant d'obtenir une netteté et une reproductibilité plus grandes dans les séparations.

Cette étude a montré que la cause essentielle de perturbation (formation de taches allongées se recouvrant partiellement) pouvait être attribuée à un déséquilibre entre quantité de phase stationnaire (formamide) et quantité de phase mobile (mélange hexane-benzène), en présence sur le papier. Un autre facteur, l'humidité présente dans le papier imprégné, ajoute ses effets au premier (taches diffuses).

Une phase mobile, l'éther éthylique, en association avec le formamide comme phase stationnaire, s'est montrée particulièrement intéressante: les taches obtenues sont presque rondes et leur séparation est complète.

Des supports autres que le papier pour la phase stationnaire (formamide) ont également été examinés. L'utilisation de Kieselguhr en couche mince, lié à la gomme du Sénégal, et imprégné de formamide, a donné des séparations de qualité équivalente à celles obtenues sur papier imprégné. De même, la chromatographie sur colonne d'alumine imprégnée de formamide a permis la séparation de quantités pondérales des neuf premiers termes.

#### SUMMARY

Analysis of polyethylene glycols by paper chromatography of their bis-3,5-dinitrobenzoates according to the method of BORECKÝ AND GASPARIČ, gives useful results. However, some irregularities (elongation of the spots, diffusion) make the separations less distinct. Therefore the causes of these disturbances were studied and a search was made for other mobile phases with which better separations and greater reproducibility might be obtained.

This investigation showed that the main cause of the disturbances (formation of elongated spots, partially overlapping) was a lack of equilibrium between the amount of stationary phase (formamide) and the amount of mobile phase (hexane-benzene mixture) present on the paper. Another factor, the moisture of the impregnated paper, has an additional effect (diffuse spots).

One mobile phase, ethyl ether used in conjunction with formamide as stationary phase, is particularly interesting, since the spots obtained are practically round and completely separated from each other.

Other supports for the stationary phase (formamide) besides paper were also examined. Thin layers of kieselguhr with Senegal gum as binding agent and impregnated with formamide, gave separations of the same quality as those obtained with impregnated paper. Chromatography on columns of alumina likewise made it possible to separate weighable amounts of the first nine members of the series.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. BORECKÝ ET J. GASPARIČ, *Mikrochim. Acta*, (1961) 96.
- <sup>2</sup> J. GASPARIČ ET J. BORECKÝ, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 466.
- <sup>3</sup> R. DRAPRON, Séance du 20.1.1961 de la Section de Chimie analytique de la Soc. Chim. de France. Résumé: *Bull. Soc. Chim. France*, (1961) 447.
- <sup>4</sup> J. C. GIDDINGS, G. H. STEWART ET A. L. RUOFF, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 239.
- <sup>5</sup> S. E. WOOD ET H. H. STRAIN, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 260.