

CHROM. 8628

## CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE AVEC PHASES IMPRÉGNÉES SUR MICROPARTICULES DE SILICE

M. VIRICEL et M. LEMAR

*Equipe de Recherche Associée au C.N.R.S. No. 474 (A. Lamotte et M. Porthault), Laboratoire de Chimie Analytique, Université Claude Bernard, Lyon I, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69621 Villeurbanne (France)*

(Reçu le 29 mai 1975; manuscrit modifié reçu le 4 août 1975)

---

### SUMMARY

#### *Liquid chromatography on impregnated silica micro particles*

The use of impregnated supports permits the resolution of many analytical problems. To obtain reproducible capacity factors impregnations of 20-40% by weight of stationary phase are used. In this region the transpositions thin-layer chromatography-column chromatography are valid and columns have better efficiencies.

---

### INTRODUCTION

La chromatographie liquide-liquide est une technique d'analyse qui connaît actuellement un grand essor, dû en particulier à l'apparition de nouvelles phases stationnaires greffées<sup>1</sup>. Cependant, l'emploi de supports imprégnés de composés possédant les mêmes groupements fonctionnels que les greffes garde tout son intérêt, du fait de sa souplesse. De plus, l'emploi des microparticules poreuses, que l'on trouve maintenant dans le commerce, permet d'atteindre un très haut niveau d'efficacité.

La présente étude porte sur l'évolution des facteurs de capacité avec le pourcentage de phase stationnaire, en l'occurrence le  $\beta, \beta'$ -oxydipropionitrile et le Carbowax 400, déposée sur des microparticules de silice. L'intérêt que présente une analyse préalable sur couches minces sera également étudié. Enfin, quelques exemples de séparations montreront les possibilités offertes par la chromatographie liquide-liquide en phase imprégnée sur support à fine granulométrie.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### *Produits utilisés*

Les phases stationnaires utilisées sont le  $\beta, \beta'$ -oxydipropionitrile (ODPN) et le Carbowax 400 (Merck, Darmstadt, Allemagne Fédérale), déposés sur des particules de Lichrosorb SI 60 de 5 et 10  $\mu\text{m}$  (surface spécifique 500  $\text{m}^2/\text{g}$ ). Les solvants employés comme phase mobile —isooctane et dichlorométhane— sont des produits

Merck pour analyse, saturés d'agent d'imprégnation. Les solutés étudiés pour tester le comportement chromatographique des colonnes sont des amines aromatiques, des pesticides chlorés et l'acétophénone.

#### *Technique chromatographique en colonne*

L'appareillage comprend une pompe Dosapro Milton Roy, un système d'amortissement et un détecteur photométrique UV LDC 1205 à 254 nm. L'injection est réalisée à travers un septum à l'aide d'une seringue.

Les colonnes, qui ont une longueur de 15 cm et un diamètre interne de 4.6 mm, sont tout d'abord remplies de microparticules de Lichrosorb selon la méthode par voie humide mise au point au laboratoire et déjà décrite dans ce journal<sup>2</sup>.

Plusieurs méthodes d'imprégnation sont proposées dans la littérature<sup>3-5</sup>. Pour notre part, nous avons utilisé une variante de la technique d'imprégnation *in situ* de Majors<sup>6</sup>: 100 ml d'une solution de phase stationnaire en concentration connue dans le dichlorométhane sont percolés à travers la colonne avec un débit de 1 ml/min. Le solvant est ensuite évaporé par passage d'un courant d'azote dont on augmente progressivement la pression jusqu'à deux bars. Enfin, sous cette même pression, l'imprégnation est homogénéisée par chauffage à 80° pendant 1 h. La phase stationnaire est récupérée par élution avec du dichlorométhane et pesée après évaporation de ce dernier; on détermine ainsi le taux d'imprégnation. En procédant de cette façon la même colonne peut être réutilisée pour plusieurs imprégnations.

L'utilisation d'une précolonne permet d'éviter tout entraînement de la phase stationnaire fixée sur le support. Cette précolonne, de longueur 30 cm et de diamètre interne 8 mm, est remplie, selon la méthode par voie sèche<sup>7</sup>, de support préalablement imprégné à 35% en poids de phase stationnaire. Pour éviter toute perte de charge supplémentaire, on utilise de la silice SI 60, 100-200  $\mu\text{m}$ .

#### *Technique chromatographique sur couches minces*

Les plaques utilisées ont été préparées au laboratoire avec de la silice Merck HF<sub>254</sub> type 60 (surface spécifique mesurée par la méthode B.E.T.: 510 m<sup>2</sup>/g). Un mélange silice-phase stationnaire, dans un rapport donné, est réalisé dans du méthanol puis étalé sur ces plaques avec un étaleur Desaga; les couches ainsi obtenues sont chauffées à 80° pendant 1 h puis reconditionnées à atmosphère ambiante pendant 4 h. Le développement est effectué dans une cuve rectangulaire (20 × 20 × 10 cm) et la détection faite dans l'ultraviolet à 254 nm.

## RÉSULTATS

### *Chromatographie en colonne*

Le Tableau I montre les différents taux d'imprégnation obtenus en fonction de la concentration en phase stationnaire dans la solution initiale. Dans nos conditions opératoires, les valeurs données sont obtenues à 5% près.

Cette méthode permet d'étudier l'évolution des facteurs de capacité  $k'$ , pour des taux d'imprégnation allant de 0-55% en poids par rapport à l'adsorbant sec. Au-delà de 60% l'imprégnation devient difficile et peu reproductible, une partie de la phase stationnaire n'étant plus fixée assez solidement.

Les Figs. 1a et b relatives à l'ODPN et les Figs. 2a et b relatives au Carbowax

TABLEAU I

QUANTITÉ DE PHASE STATIONNAIRE FIXÉE SUR LE SUPPORT EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PHASE STATIONNAIRE DANS LA SOLUTION D'IMPRÉGNATION

% initial en volume de phase stationnaire	% de phase stationnaire par g d'adsorbant sec, $W_p/W_s$	
	ODPN	Carbowax 400
2	12	—
5	16	13
10	20	21
15	23	—
20	30	25
25	—	35
30	57	45

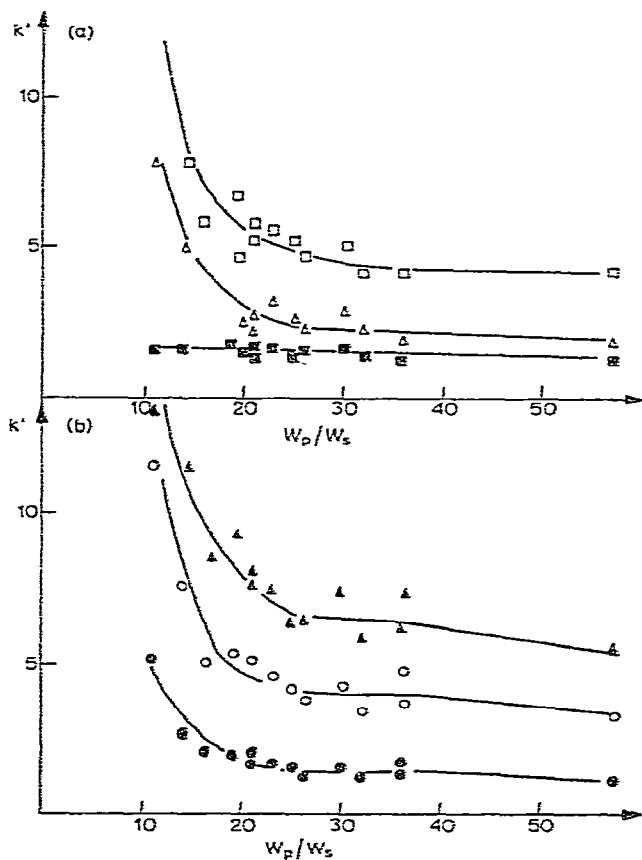


Fig. 1. Évolution des  $k'$  en fonction du taux d'imprégnation en ODPN. Support: Lichrosorb SI 60 ( $5\mu$ ).  $\square$ , Acétophénone;  $\triangle$ , dieldrin;  $\blacksquare$ , DDT;  $\blacktriangle$ , méthylaniline;  $\circ$ , éthylaniline;  $\odot$ , diméthylaniline.

400 montrent l'évolution des  $k'$  des solutés "tests" en fonction du taux d'imprégnation. On peut distinguer deux domaines:

(i) De 0-20% les  $k'$  diminuent de façon nette. Dans cet intervalle, le recouvrement de la silice n'étant à priori que partiel, la compétition entre les phénomènes d'adsorption et de partage est importante. Étant donnée la nature des solutés utilisés, la rétention y demeure relativement forte du fait de l'adsorption tant que la silice demeure accessible. Cette compétition peut d'ailleurs se traduire par l'asymétrie des pics obtenus.

(ii) À partir de 20% on pourrait penser que le phénomène de rétention relève seulement d'un processus de partage. En fait, en considérant le facteur de capacité  $k' = k \cdot V_s / V_M$ , où  $V_s$  représente le volume de phase stationnaire et  $V_M$  le volume de phase mobile, il peut paraître surprenant que l'augmentation du taux d'imprégnation, donc de  $V_s$ , qui entraîne une diminution de  $V_M$ , ne se traduise pas par un accroissement de la rétention; en effet l'évolution des  $k'$  est assez faible. Actuellement nous ne sommes pas en mesure de donner une explication définitive de cette observation mais on peut proposer diverses hypothèses: d'une part un phénomène d'adsorption sur la surface du liquide stationnaire peut venir se superposer au partage proprement dit entre la phase mobile et la phase stationnaire. D'autre part le volume de phase sta-

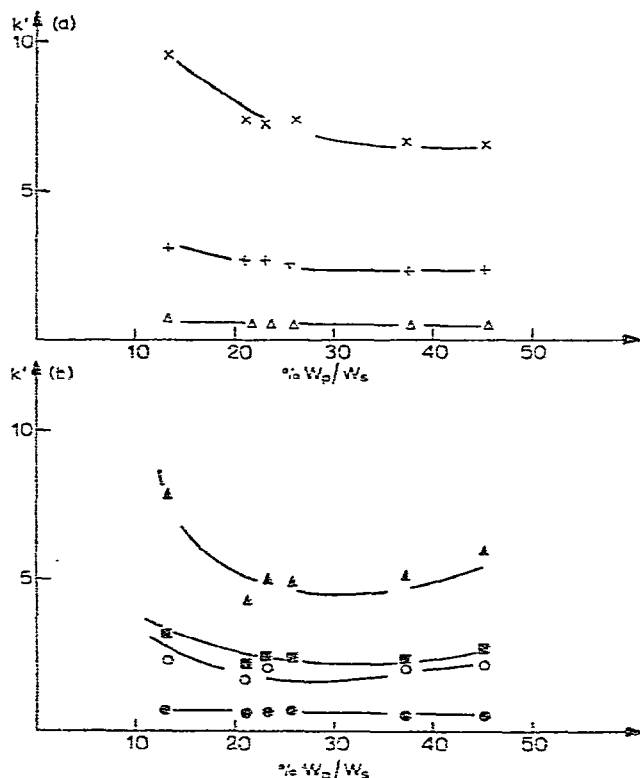


Fig. 2. Évolution des  $k'$  en fonction du taux d'imprégnation en Carbowax 400. Support: Lichrosorb SI 60 ( $S\mu$ ).  $\times$ , Méthoxychlore;  $+$ , DDT;  $\Delta$ , aldrin;  $\blacktriangle$ , méthylaniline;  $\blacksquare$ , éthylaniline;  $\circ$ , acétophénone;  $\bullet$ , diméthylaniline.

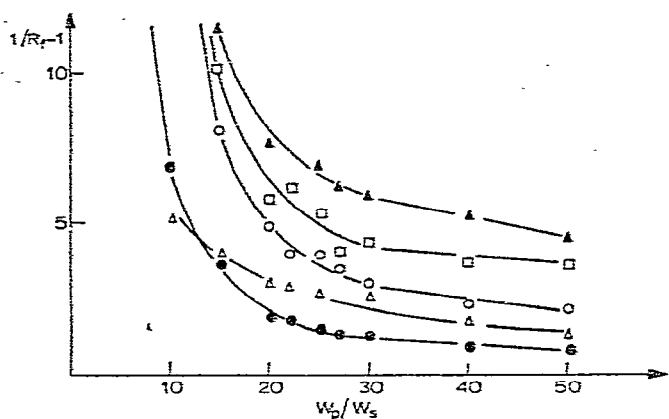


Fig. 3. Variation du facteur  $(1/R_F - 1)$  avec le taux d'imprégnation des couches minces en ODPN. Support: silice HF<sub>254</sub>.  $\Delta$ , Méthylaniline;  $\square$ , acétophénone;  $\circ$ , éthylaniline;  $\triangle$ , diédrin;  $\odot$ , diméthylaniline.

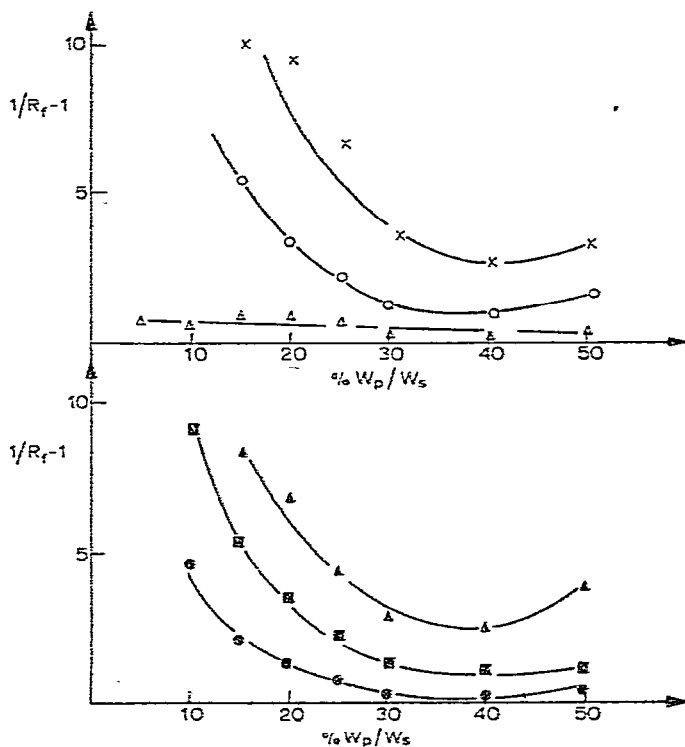


Fig. 4. Variation du facteur  $(1/R_F - 1)$  avec le taux d'imprégnation des couches minces en Carbowax 400. Support: silice HF<sub>254</sub>.  $\times$ , Méthoxychlor;  $\circ$ , acétophénone;  $\triangle$ , aldrin.

Fig. 5. Variation du facteur  $(1/R_F - 1)$  avec le taux d'imprégnation des couches minces en Carbowax 400. Support: silice HF<sub>254</sub>.  $\Delta$ , Méthylaniline;  $\square$ , éthylaniline;  $\odot$ , diméthylaniline.

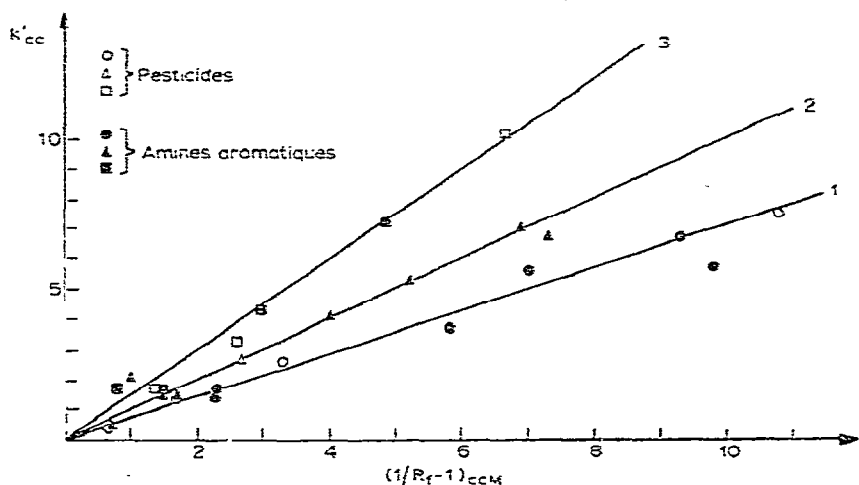


Fig. 6. Relations entre  $k'_{cc}$  et  $(1/R_F - 1)_{CCM}$  obtenues lors de chromatographies de pesticides chlorés et d'amines aromatiques sur de la silice imprégnée à différents taux d'ODPN: (1) 18%; (2) 25%; (3) 30%.

tionnaire intervenant dans le processus chromatographique peut, à partir d'un certain taux d'imprégnation, rester inférieur au volume global de phase stationnaire déposée. En effet, au fur et à mesure que le taux d'imprégnation augmente, le traitement thermique subi par la phase stationnaire lors de l'imprégnation et qui a pour but de lui permettre une bonne pénétration dans le support peut conduire à l'occupation de certaines zones "mortes" non accessibles aux solutés lors de la chromatographie. Les différences de variation de  $k'$  observées lors de l'utilisation de l'ODPN et du

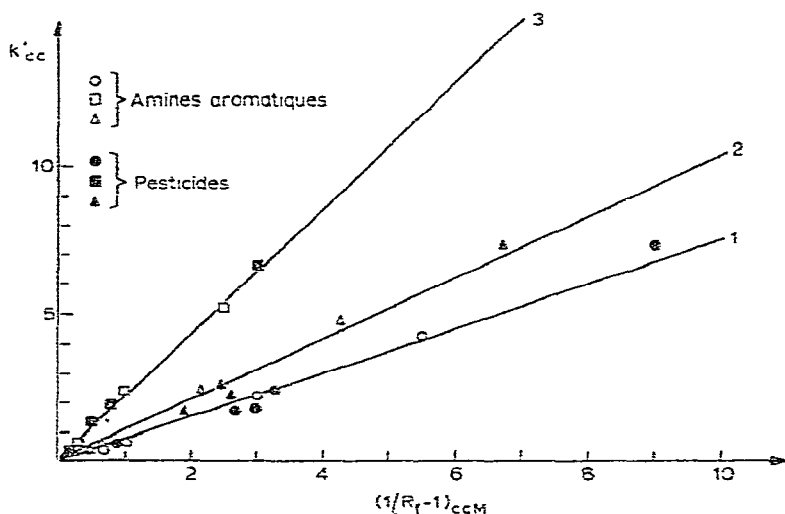


Fig. 7. Relations entre  $k'_{cc}$  et  $(1/R_F - 1)_{CCM}$  obtenues lors de chromatographies de pesticides chlorés et d'amines aromatiques sur de la silice imprégnée à différents taux de Carbowax 400: (1) 21%; (2) 25.5%; (3) 37%.

Carbowax 400 proviennent certainement d'un aspect différent de la phase stationnaire lié aux différences de leurs caractéristiques physiques (masse moléculaire, viscosité, tension superficielle, etc.). Ce domaine est intéressant car il permet d'avoir des résultats reproductibles même si le taux d'imprégnation varie légèrement et, de plus, les efficacités des colonnes y sont importantes. En effet, pour des solutés dont le  $k'$  est de l'ordre de 7, nous arrivons à obtenir une HEPT de  $20 \mu\text{m}$  avec l'ODPN et de  $50 \mu\text{m}$  avec le Carbowax 400. Ainsi, le fait de déposer une couche de phase stationnaire régulière permet d'avoir des résistances au transfert de masse assez faibles et par suite de conserver les qualités intrinsèques des fines granulométries utilisées comme support.

#### Chromatographie sur couches minces

Sur la Fig. 3 pour l'ODPN et les Figs. 4 et 5 pour le Carbowax 400 sont représentées les variations du facteur  $(1/R_F - 1)$  en fonction du pourcentage de phase stationnaire. L'expression  $(1/R_F - 1)$  équivaut, en couches minces, au facteur de capacité  $k'$  en colonne. Ces courbes sont analogues à celles obtenues avec les facteurs de capacité. Ainsi, le système phase stationnaire-phase mobile le mieux approprié à un

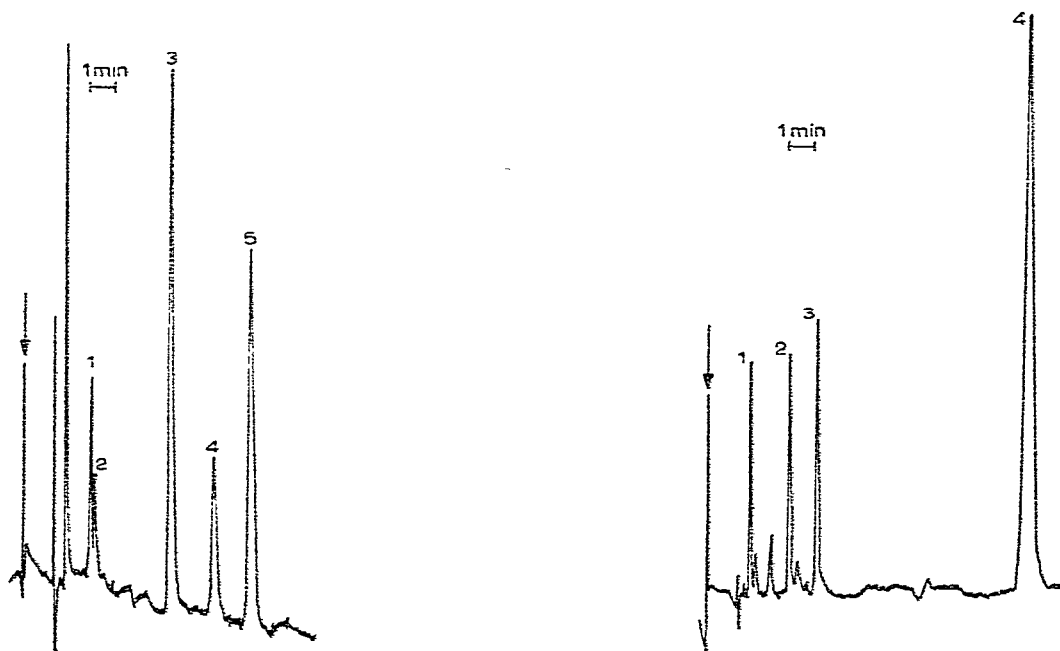


Fig. 8. Séparation d'amines aromatiques sur de la silice imprégnée à 25% avec de l'ODPN. Appareil, montage laboratoire; éluant, isooctane saturé ODPN; débit éluant, 1.2 ml/min; colonne, 15 cm  $\times$  4.6 mm I.D., SI 60 ( $5 \mu$ ); sensibilité, 0.04; volume injection, 3  $\mu$ l. 1 = Diéthylaniline; 2 = diméthylaniline; 3 = éthylaniline; 4 = acétophénone; 5 = méthylaniline.

Fig. 9. Séparation de pesticides chlorés sur de la silice imprégnée à 25% avec de l'ODPN. Appareil, montage laboratoire; éluant, isooctane saturé ODPN; débit éluant, 1.2 ml/min; colonne, 15 cm  $\times$  4.6 mm I.D., SI 60 ( $5 \mu$ ); sensibilité, 0.08; volume injection, 3  $\mu$ l. 1 = Aldrin; 2 = DDT; 3 = dieldrin; 4 = méthoxychlore.

problème donné en chromatographie liquide-liquide peut être préalablement mis au point sur couches minces.

La relation entre la rétention des solutés en colonne et leurs  $R_F$  sur couches minces, déjà vérifiée en chromatographie liquide-solide<sup>8</sup>, se révèle aussi valable en chromatographie liquide-liquide.

Si on appelle  $K_{tr}$  le coefficient de transposition tel que

$$K_{tr} = \frac{(V_s/V_M)_{CC}}{(V_s/V_M)_{CCM}}$$

$V_s$  étant le volume de phase stationnaire et  $V_M$  le volume de phase mobile, on a

$$k'_{CC} = K_{tr} \cdot (1/R_F - 1)_{CCM}$$

La linéarité de cette expression est bien vérifiée sur les Figs. 6 et 7. Nous observons une augmentation de la pente  $K_{tr}$  des droites de transposition au fur et à mesure que croît le taux d'imprégnation. Nous attribuons cette augmentation à une diminution plus rapide du volume de phase mobile  $V_M$  dans la colonne à paroi rigide que dans la couche mince où il n'y a pas de contrainte paroi.

#### APPLICATIONS

Les chromatogrammes dans les Figs. 8 et 9 illustrent les résultats obtenus avec des colonnes préparées selon la méthode décrite précédemment. Ils correspondent à la séparation d'amines aromatiques et de pesticides chlorés.

Les Figs. 10-12 montrent les possibilités analytiques des supports à fine granulométrie en chromatographie liquide-liquide avec divers solutés tels que alcools

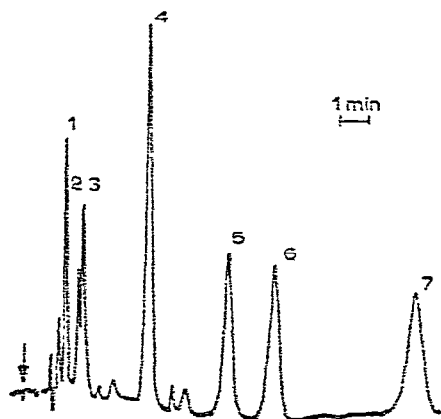


Fig. 10. Séparation d'alcools aromatiques sur de la silice imprégnée à 30% avec du Carbowax 400. Appareil, montage laboratoire; éluant, dichlorométhane-isooctane (15:85); débit éluant, 1,2 ml/min; colonne, 15 cm  $\times$  4,6 mm I.D., SI 60 (10  $\mu$ ); sensibilité, 0,16 u.d.o.; volume injection, 3  $\mu$ l. 1 = Alcool anisique; 2, 3 = impuretés; 4 = 2-phényl 2-propanol; 5 = 1-phényl éthanol; 6 = 2-phényl éthanol; 7 = alcool benzylique.



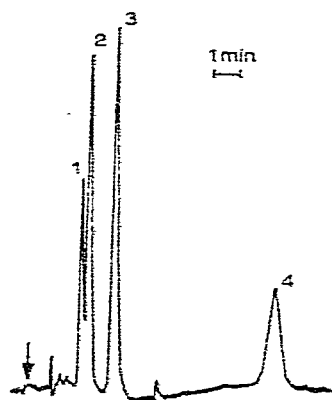


Fig. 11. Séparation de stéroïdes sur de la silice imprégnée à 30% avec du Carbowax 400. Conditions opératoires, voir la Fig. 10. 1 = Acétestosterone; 2 = inconnu; 3 = progestérone; 4 = *cis*-testostérone.

aromatiques (Fig. 10), stéroïdes (Fig. 11) et benzodiazepines (Fig. 12). Ces séparations réalisées avec un mélange isooctane-dichlorométhane, saturé en agent d'imprégnation, montrent que l'utilisation d'un éluant relativement polaire n'altère pas la phase stationnaire.

## CONCLUSION

L'utilisation de supports à fine granulométrie (5–10  $\mu\text{m}$ ), imprégnés de  $\beta,\beta'$ -oxydipropionitrile ou de Carbowax 400, permet de résoudre de façon simple divers

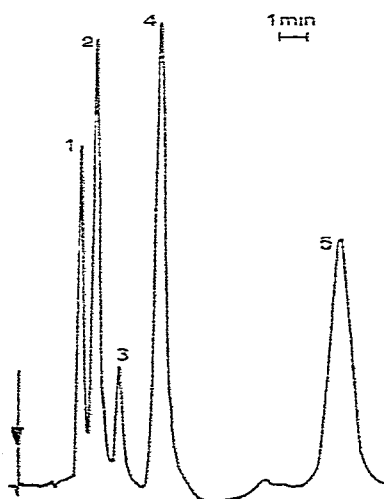


Fig. 12. Séparation de benzodiazépines sur de la silice imprégnée à 30% avec du Carbowax 400. Appareil, montage laboratoire; éluant, isooctane-dichlorométhane (85:15); débit éluant, 1,2 ml/min; colonne, 15 cm  $\times$  4,6 mm I.D., SI 60 (10  $\mu$ ); sensibilité, 0,16 u.d.o.; volume injection, 2  $\mu\text{l}$ . 1 = Médazépam; 2 = tétrazépam; 3 = impureté 1; 4 = diazépam; 5 = clobazam.

problèmes d'analyse. Les facteurs de capacité  $k'$  montrent que la reproductibilité est bonne lorsque les taux d'imprégnation sont compris entre 20 et 40%, ces limites restant les mêmes pour les deux phases stationnaires étudiées. Il est intéressant de noter que, dans ce domaine, les transpositions couches minces-colonne sont valables, ce qui permet un gain de temps dans la recherche du couple phase stationnaire-phase mobile le mieux adapté à un problème donné. D'autre part, avec l'utilisation de supports à très fine granulométrie, les efficacités obtenues sont importantes.

#### RÉSUMÉ

L'utilisation de supports imprégnés permet de résoudre divers problèmes d'analyse. Pour avoir des facteurs de capacité reproductibles il suffit de réaliser des imprégnations à des taux compris entre 20 et 40%. Dans ce domaine, les transpositions couches minces-colonne sont valables et les colonnes ont les meilleures efficacités.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. Grushka, *Bonded Stationary Phases in Chromatography*, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Mich., 1974.
- 2 B. Coq, C. Gonnet et J. L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.
- 3 J. J. Kirkland et C. H. Dilks, Jr., *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1778.
- 4 B. L. Karger, H. Engelhardt, K. Conroe et I. Halász, dans R. Stock et S. G. Perry (Rédacteurs), *Gas Chromatography 1970*, Institute of Petroleum, London, 1971, p. 112.
- 5 H. Engelhardt et N. Weigand, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1149.
- 6 R. E. Majors, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 755.
- 7 J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 7.
- 8 E. Coq, J. P. Nicolas, A. Lamotte et M. Portihault, *J. Chromatogr.*, 97 (1974) 137.