

CHROM. 9614

DÉTECTION PAR SPECTROMÉTRIE INFRAROUGE EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

M. LEMAR, P. VERSAUD et M. PORTHAULT

Équipe de Recherche associée au C.N.R.S. (E.R.A. 474), Laboratoire de Chimie Analytique III, Université de Lyon I, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69621 Villeurbanne (France)

(Reçu le 7 juillet 1976)

SUMMARY

Detection by infrared spectrometry in high-performance liquid chromatography

The cell of a Perkin-Elmer 521 spectrophotometer is adapted to the requirements of infrared detection. It is possible to choose a mobile phase which is suitable at the wavelength used. Two types of separations are realised with this detection system.

The first example is realised with isooctane as a mobile phase. The transparency of this classical solvent in infrared permits to work with 1748 cm^{-1} radiation

corresponding to the absorption of the function $\text{C}=\text{O}$ of esters.

The second example is made with a mixture of tetrachlorodifluoroethane-trichlorotrifluoroethane (20:80). This eluent can be used for many separations, its absorption in infrared is almost the same as that of carbon tetrachloride.

The experimental conditions for utilisation of the infrared detector are discussed.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, d'énormes progrès ont été réalisés en chromatographie liquide. En effet, les supports de fine granulométrie (5 et $10\ \mu\text{m}$) ont permis d'atteindre des efficacités tout à fait remarquables et simultanément l'appareillage a suivi cette évolution.

Cependant, la détection reste un point en retrait par rapport aux efficacités de séparation maintenant réalisables. Les deux modes classiques sont insuffisants: la spectrophotométrie dans l'ultraviolet est limitée dans son application et la réfractométrie différentielle par sa sensibilité trop faible. Il faut donc s'intéresser à d'autres modes de détection.

Récemment, certains auteurs, dont les travaux ont entre autre été rappelés au XI Symposium de Chromatographie à Barcelone¹, ont essayé d'utiliser la détection électrochimique. Celle-ci peut permettre de résoudre un certain nombre de problèmes, qu'il s'agisse des méthodes coulométriques ou ampérométriques. Dans le cas de cette

dernière nous avons pu montrer que, par l'apport d'un électrolyte support, on peut adapter cette détection à tous les types de chromatographie². Malheureusement, la pollution qui apparaît aux électrodes restreint un peu cette méthode de détection et ce problème ne peut être considéré comme réellement résolu.

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à un autre mode de détection faisant appel à la spectrométrie infrarouge. Ce mode de détection ne paraît pas avoir encore donné lieu à publication. Toutefois, la spectrométrie infrarouge a déjà été utilisée en aval du détecteur pour réaliser le spectre des solutés après séparation afin de permettre leur identification^{3,4}. Comme tous les composés organiques présentent au moins une bande de vibration infrarouge active, le champ d'application de cette technique paraît assez étendu. Plusieurs problèmes sont à résoudre: (i) choix de l'appareillage et construction d'une cellule à circulation de liquide de faible volume, (ii) choix du solvant et (iii) choix des conditions opératoires et notamment de la fréquence de travail. Notre travail a abordé ces différents points.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Le montage chromatographique comporte une pompe (Minipump Dosapro) avec un système d'amortissement constitué de deux tubes Bourdon reliés par un capillaire. La détection est assurée à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau et monochromateur à réseau (Perkin-Elmer Type 521) muni de cellules à circulation de liquide. L'injection est faite par seringue (0.5–5 μ l) à travers une tête d'injection (Reeve-Angel).

Les colonnes utilisées ont été conçues pour des séparations en chromatographie de partage à l'aide de phases imprégnées. Les colonnes ont été remplies au laboratoire par voie humide⁵ et imprégnées soit de β, β' -oxydipropionitrile (ODPN), soit de Carbowax 400⁶.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Détection du signal

On cherchera à obtenir un signal proportionnel à la concentration du soluté traversant la cellule du détecteur. Dans le cas présent, ceci sera réalisé si, selon la loi de Lambert-Beer on détecte la variation d'absorbance de l'éluat en fonction de la concentration du soluté. Or l'appareil utilisé fournit un enregistrement linéaire en pourcentage de transmission. De plus les variations de transmittance produites par le soluté n'excèdent pas en général 10%. Aussi il est nécessaire d'utiliser un montage annexe à la fois pour amplifier le signal et pour le rendre linéaire en unités de densité optique et donc en concentration. Ce résultat est obtenu en utilisant l'amplificateur logarithmique d'un lecteur de concentration (Quanta de Type S 32). L'ensemble est schématisé (Fig. 1). L'enregistrement se fait alors sur un enregistreur extérieur à plusieurs sensibilités (Solea-Tacussel Type EPL 1).

Cellule

Deux types de cellules de détection ont été utilisés. (1) La Fig. 2 présente le montage le plus simple: une cellule à liquide scellée classique, de chemin optique 1 mm, à eu son volume interne réduit à 100 μ l par l'utilisation d'un spacer en plomb

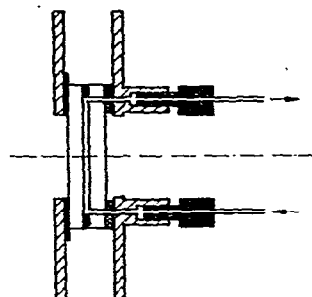
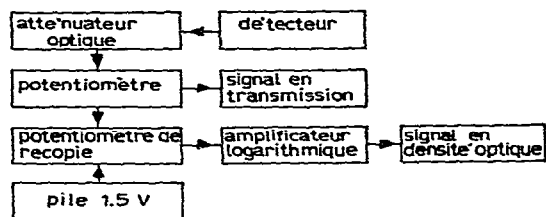


Fig. 1. Montage annexe pour la mesure des densités optiques.

Fig. 2. Cellule à liquide classique.

muni d'une ouverture plus étroite. Les bouchons en PTFE de la cellule sont percés, suivant leurs axes, aux diamètres extérieurs des canalisations de jonctions, elles-mêmes en PTFE. Introduites dans les bouchons, les extrémités de ces canalisations sont munies d'un méplat. L'étanchéité est assurée d'une manière convenable par compression de ces méplats contre le fond des ouvertures du porte-cellule. (2) La Fig. 3 présente un ensemble constitué d'une microcellule scellée à fenêtres KBr, de chemin optique 0.2 mm, de volume 5 μ l (Perkin-Elmer) et d'un porte-cellule en acier inoxydable. Ce dernier est muni de deux capillaires de 0.5 mm de diamètre interne et diamétralement opposés qui permettent la circulation de l'effluent chromatographique à l'intérieur de la cellule. L'étanchéité est assurée par compression de joints en PTFE entre les faces externes des fenêtres de la cellule et les faces internes du porte cellule. Dans ces deux montages, la circulation du liquide est réalisée du bas de la cellule vers le haut afin de permettre un meilleur remplissage et d'éviter la formation de bulles.

Choix du solvant

On a déjà signalé que tous les produits organiques possèdent des vibrations actives dans l'infrarouge. Il est donc indispensable de choisir un solvant qui présente

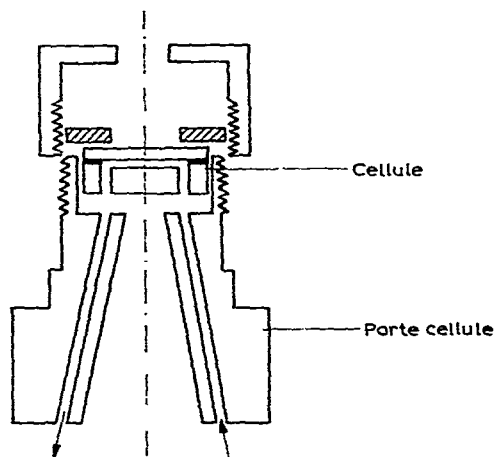


Fig. 3. Microcellule.

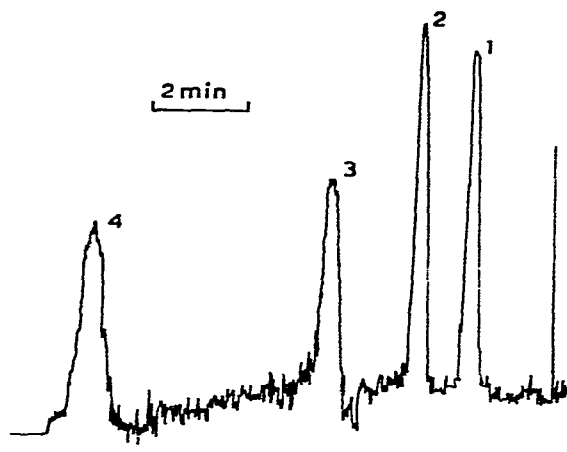


Fig. 4. Séparation d'esters en chromatographie de partage. Colonne, LiChrosorb SI-60 ($5\ \mu\text{m}$) + ODPN; éluant, isooctane, $2\ \text{ml/min}$; $s = 250\ \text{mV}$; $\bar{\nu} = 1748\ \text{cm}^{-1}$; fentes, $150\ \mu\text{m}$; cellule, $100\ \mu\text{l}$ ($l = 1\ \text{mm}$); injection, $1\ \mu\text{l}$. 1 = Dioctylphtalate; 2 = diéthyladipate; 3 = diéthylphtalate; 4 = diméthylphtalate.

une fenêtre de transmission au voisinage de la fréquence de détection des solutés. Le chromatogramme (Fig. 4) montre une séparation d'esters réalisée en utilisant l'isooctane comme solvant, la détection se faisant à $1748\ \text{cm}^{-1}$ sur la vibration de valence

C=O de la bande fonctionnelle.

En fait, pour rendre ce mode de détection universel, il semble nécessaire de travailler entre 3100 et $2800\ \text{cm}^{-1}$ dans la région des vibrations de valence des groupements alkyls. Or la plupart des solvants utilisés en chromatographie liquide présentent de tels groupements et absorbent donc dans ce domaine. Les solvants classiques utilisés en spectroscopie infrarouge, comme CS_2 et CCl_4 , peuvent être de bons éluants pour la chromatographie liquide. Toutefois, leur force éluante, respectivement 0.15 et 0.18 dans l'échelle de Snyder⁷, est trop importante pour remplacer les hydrocarbures pratiquement apolaires. De plus, ils possèdent des points d'ébullition assez bas et une toxicité élevée.

Un essai réalisé avec un mélange 20:80 de tétrachlorodifluoroéthane ($\text{CCl}_2\text{F}-\text{CCl}_2\text{F}$) et de trichlorotrifluoroéthane ($\text{CCl}_2\text{F}-\text{CClF}_2$), Foranes 112 et 113, (Ugine Kuhlmann), montre que la polarité de cette phase mobile est encore trop importante, donc cette phase ne peut remplacer systématiquement les hydrocarbures (Fig. 5). L'utilisation de solvants plus proches des fluoroalcane devrait permettre de résoudre ce problème.

Fréquence de détection

La fréquence de détection du soluté détermine le choix du solvant mais l'ouverture des fentes du monochromateur est également un paramètre fondamental. D'une part, l'énergie reçue par le détecteur est proportionnelle à la surface de la fente d'entrée du monochromateur donc à la largeur géométrique de cette fente. D'autre part,

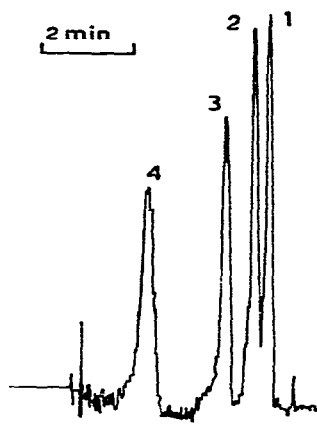


Fig. 5. Exemple d'utilisation d'un mélange de foranes. Mêmes conditions que Fig. 4, sauf: éluant, Forane 112-Forane 113 (20:80), 1,5 ml/min.

le pouvoir de résolution du spectrophotomètre dépend de la largeur de fente spectrale, qui est une fonction linéaire de la largeur de fente géométrique. Enfin, si on ouvre plus largement les fentes, on peut obtenir un signal donné, avec un gain d'amplification du détecteur plus faible. En réduisant ainsi le bruit de fond électronique, il est possible d'abaisser le seuil de détection.

Comme nous opérons à fréquence fixe, un pouvoir de résolution élevé présente peu d'intérêt et même pas du tout dans le cas d'un mélange de solutés absorbant à des fréquences différentes. Comme il est nécessaire d'avoir au niveau du détecteur infrarouge un maximum d'énergie disponible pour abaisser le seuil de détection et le temps de réponse de la chaîne de mesure, il semble primordial d'opérer avec une ouverture de fente importante. Malheureusement une telle ouverture a une grande influence sur les coefficients d'extinction moléculaire apparents. Robinson⁸ a montré qu'une largeur de fente supérieure à 40% à la largeur de demi-bande infrarouge diminue le coefficient d'extinction moléculaire apparent de la bande et la loi de Lambert-Beer n'est plus vérifiée.

Les chromatogrammes (Figs. 6 et 7) ont été réalisés avec une ouverture de fente importante; ils présentent des pics chromatographiques élargis dont le sommet est écrêté. Lorsqu'il s'agit de détecter, un mélange de solutés dont les maxima d'absorption sont situés à des fréquences assez voisines, il convient de trouver une fréquence de travail moyenne qui permette un compromis: en ouvrant les fentes, on diminue la résolution, on obtient donc un signal pour des produits auparavant non détectés, mais on abaisse les coefficients d'extinction moléculaires respectifs de ces solutés donc la sensibilité de leur réponse.

En général, les seuils de détection obtenus pour différents composants d'un mélange seront plus élevés que ceux trouvés en analysant séparément, aux fréquences optimales, chaque constituant.

Nous avons vu précédemment qu'il est important que la réponse du détecteur (en unités de densité optique) varie linéairement en fonction de la concentration du soluté, c'est à dire que la loi de Lambert-Beer soit vérifiée. La Fig. 8 montre que cette

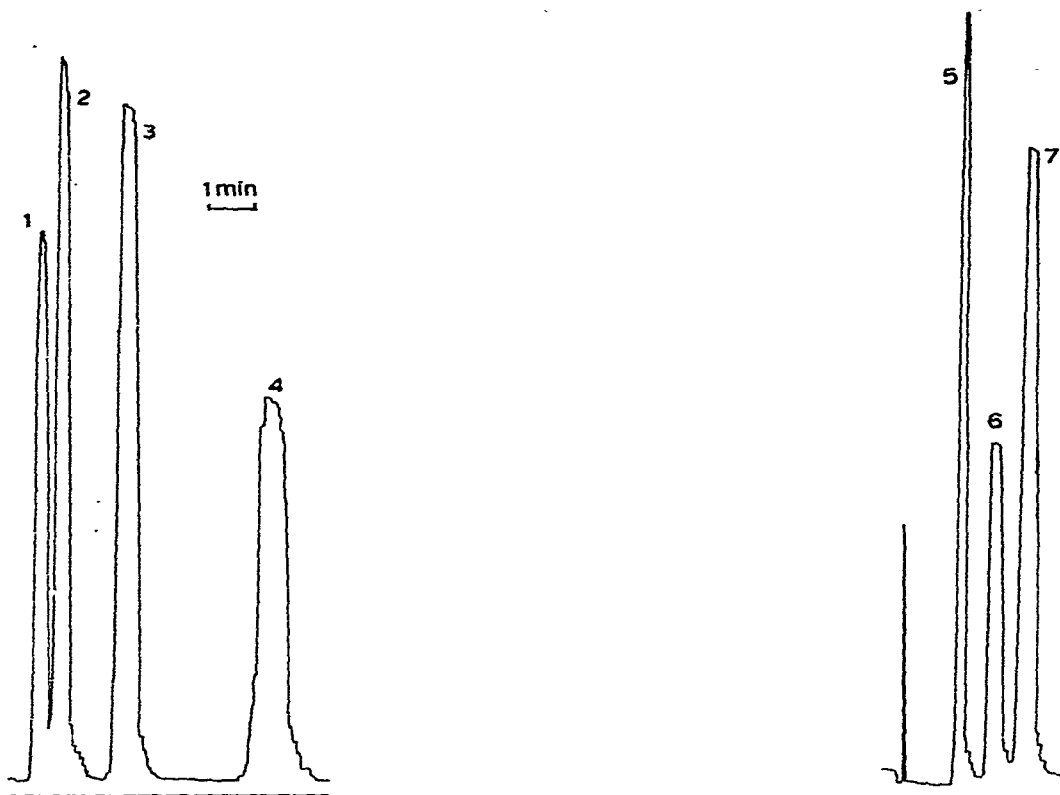


Fig. 6. Séparation de phtalates. Colonne, LiChrosorb ($10\ \mu\text{m}$) + Carbowax 400; éluant, isoocane; $s = 50\ \text{Mv}$; $\bar{\nu} = 1741\ \text{cm}^{-1}$; fentes, $973\ \mu\text{m}$; cellule, $0.2\ \text{mm}$; injection, $5\ \mu\text{l}$. 1 = Dioctylphtalate; 2 = dibutylphtalate; 3 = diéthylphtalate; 4 = diméthylphtalate.

Fig. 7. Séparation d'esters aliphatiques. Même conditions que Fig. 6. 5 = Butyrate d'éthyle; 6 = adipate d'éthyle; 7 = malonate d'éthyle.

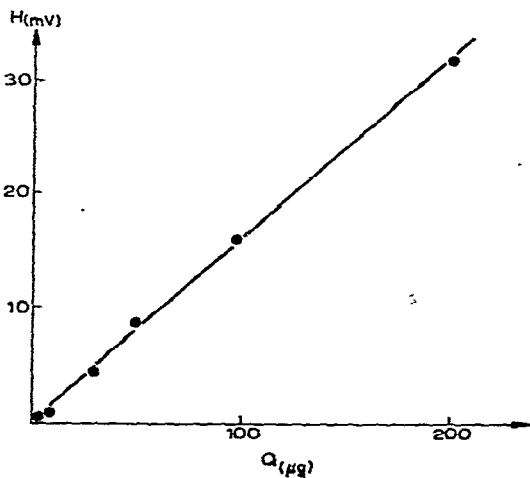


Fig. 8. Linéarité de réponse sur l'adipate d'éthyle. $\bar{\nu} = 1748\ \text{cm}^{-1}$; fente, $400\ \mu\text{m}$.

condition est vérifiée, dans le cas de l'adipate d'éthyle, pour des quantités injectées variant entre 5 et 200 μg . Il est certainement possible en réduisant le bruit de fond électronique, d'abaisser le seuil de détection ci-dessus. Cette réduction peut être obtenue par l'amélioration du montage électrique annexe, représenté sur la Fig. 1.

Signalons enfin le grand intérêt présenté par la détection infrarouge pour l'étude d'un mélange de composés aromatiques et aliphatiques qui ne peut être analysé complètement en ultraviolet.

CONCLUSION

Un spectrophotomètre infrarouge classique, muni de cellules à circulation de liquide, peut être avantageusement utilisé comme détecteur de chromatographie liquide. En réduisant la longueur de la canalisation colonne-cellule et le volume interne de la cellule, on peut encore espérer abaisser le seuil de détection de tous les solutés analysables.

RÉSUMÉ

Les auteurs proposent une cellule adaptée à une telle détection. Il est possible de choisir un éluant chromatographique compatible avec la longueur d'onde de travail. Deux séparations ont été réalisées avec une telle détection.

La première montre que l'utilisation d'un éluant tel que l'isooctane est envisageable par exemple pour l'étude de fonctions $\text{C}=\text{O}$ à 1748 cm^{-1} .

La deuxième est un essai avec un solvant plus transparent dans le domaine infrarouge: tétrachlorodifluoréthane-trichlorofluoréthane (20:80).

De tels solvants peuvent permettre l'étude des groupes alkyls et couvrent donc un très large domaine.

Les conditions expérimentales dans un tel cas sont discutées.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 B. Fleet et C. J. Little, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 747.
- 2 M. Lemar et M. Porthault, *J. Chromatogr.*, 130 (1977) 372.
- 3 F. Mirabella, J. Johnson et E. M. Barral, *Int. Lab.*, (1975) 37.
- 4 J. H. Ross et M. E. Carto, *J. Polym. Sci.*, 21 (1968) 443.
- 5 B. Coq, C. Gonnet et J.-L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.
- 6 M. Viricel et M. Lemar, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 343.
- 7 L. R. Snyder, *Principles of Adsorption Chromatography*, M. Dekker, New York, 1968.
- 8 D. Z. Robinson, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 273.