



HAL
open science

Détermination des volumes morts et des eff ets extra-colonne en chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée

Corinne Delaurent, Guilhem Pages, Stéphane Alphéran

► **To cite this version:**

Corinne Delaurent, Guilhem Pages, Stéphane Alphéran. Détermination des volumes morts et des eff ets extra-colonne en chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée. *Spectra Analyse*, 2005, 245, pp.36-46. hal-02683632

HAL Id: hal-02683632

<https://hal.inrae.fr/hal-02683632v1>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



C. Delaurent*, G. Pagès*

S. Alphéran**

Détermination des volumes morts et des effets extra-colonne en chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée

RÉSUMÉ

Les notions de volume mort et de temps de rétention nulle sont primordiales en chromatographie. Elles interviennent dans la détermination des principales grandeurs chromatographiques, indispensables pour s'assurer de la validité d'un système chromatographique, décrire des modèles de rétention théoriques, prédire la rétention des analytes etc. En chromatographie liquide haute performance de partage à polarité de phase inversée, le concept de volume mort est l'objet de polémiques à cause de l'ambiguïté de sa définition et des différentes méthodes expérimentales mises en œuvre pour le déterminer. Nous avons comparé différentes méthodes de mesure des volumes morts totaux et extra-colonne. La pertinence de chaque méthode étudiée est discutée en fonction des objectifs de l'analyste.

MOTS CLÉS

Chromatographie liquide haute performance, polarité de phase inversée, volume mort, effet extra-colonne.

Void volume and band broadening determination in reversed phase liquid chromatography

SUMMARY

Void volume and void time are of the utmost importance in chromatography. They are essential for an accurate determination of fundamental chromatographic values. These fundamental values are used for system suitability issues, for theoretical retention descriptions, for prediction of retention of both small and large molecules and for many other issues. In reversed phase liquid chromatography, void volume concept has proven to be controversial because of its definition ambiguity and the many different methods proposed. The present work deals with the comparison of the principal methods carried out to determine void volume but also band broadening effect. We discuss also about the care to take in method selection depending on the objectives of the chromatographers.

KEYWORDS

High performance liquid chromatography, reversed phase, void volume, band broadening.

I - Introduction

Dans son sens le plus large, le volume mort V_m peut être défini comme le volume de phase mobile contenu dans le système chromatographique entre la

vanne d'injection et le détecteur. La démarche classique consiste à déterminer V_m à partir du volume d'élution d'un composé non retenu et non exclu, communément appelé inerte. Ainsi, les espèces non retenues par la phase stationnaire apparaissent

* JE TRACES - Faculté des Sciences et Techniques - Université Paul Cézanne Aix-Marseille III et Université de Provence Aix-Marseille I - Avenue Escadrille Normandie-Niemen - 13397 Marseille cedex 20 - France - Tél. : 04 91 28 85 49 - Fax : 04 91 28 28 97 - E-Mail : corinne.delaurent@univ.u-3mrs.fr

** Laboratoire Pharmaceutique DISTRI B3 - Technopôle de Château-Gombert - Rue Max-Planck - 13013 Marseille.

Détermination des volumes morts et des effets extra-colonne en chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée

dans l'effluent au bout d'un temps t_0 correspondant à l'écoulement du volume de phase mobile V_m contenu dans le système chromatographique. Cette définition peut se réduire au volume mort de la colonne, sous réserve que les volumes extérieurs à la colonne, dits extra-colonne, soient négligeables. En Chromatographie Liquide (CL) de partage à polarité de phase inversée, la détermination de V_m et de t_0 est délicate, essentiellement à cause de la solvata-tion des greffons de la phase stationnaire par une partie de la phase mobile, mais aussi à cause de la nature poreuse des supports stationnaires utilisés classiquement. La littérature scientifique est proluxe en méthodes de détermination de V_m et de t_0 et les différents auteurs qui ont traité ce sujet, s'accordent sur le fait qu'elles peuvent conduire à des valeurs très différentes. Dans ce contexte, nous avons comparé les résultats obtenus avec différentes procédures et appréhendé l'influence de paramètres comme la nature de la phase stationnaire, la taille des pores, le débit de la phase mobile, ainsi que les effets extra-colonne.

II – La nécessité d'une mesure fiable du volume mort

Les notions de V_m et de t_0 sont indispensables en chromatographie pour la détermination du facteur de rétention k (voir *équation 1*). Cette grandeur est caractéristique de la rétention d'un composé pour une phase stationnaire et une phase mobile données; son utilisation est quasi-systématique, et ce aussi bien dans le cadre d'une approche fondamentale des processus chromatographiques, que dans le cadre du développement d'applications.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Equation 1

Détermination du facteur de rétention k . t_R temps de rétention du composé, t_0 temps d'élution de l'inerte ou temps de rétention nulle.

Il intervient dans les tests de performances, ou tests de validité de système, il est mentionné, à titre indicatif, pour chaque soluté d'un mélange de référence sur les chromatogrammes fournis par les constructeurs et une valeur minimum de 2,0 est recommandée dans les guides de l'International Conference on Harmonization (ICH) dans le cadre des analyses en routine. La description des modèles théoriques de rétention et de ce fait, la prédiction de la rétention des analytes, reposent sur l'expression du logarithme de k en fonction de différents paramètres. Ainsi, en chromatographie d'adsorption, le modèle de Snyder-Soczewinski (voir *équation 2*) permet de distinguer l'influence des différents facteurs à l'origine de la rétention.

$$\log k = \log V_a + \beta [E_0 - A_s \epsilon_0] + \log \frac{W_A}{V_M}$$

Equation 2

Théorie de Snyder-Soczewinski en chromatographie d'adsorption. V_a volume de phase mobile adsorbée par unité de masse de silice, β mesure de l'activité de l'adsorbant (SiOH libres non recouverts d'eau), E_0 énergie libre d'adsorption des molécules d'analyte dans les conditions d'activité standard ($\beta=1$), A_s surface occupée par une mole d'analyte sur l'adsorbant, ϵ_0 énergie libre d'adsorption des molécules de phase mobile par unité de surface de solvant adsorbé dans les conditions d'activité standard ($\beta=1$), W_A masse d'adsorbant contenue dans la colonne, V_m volume total de phase mobile dans la colonne.

En CL de partage à polarité de phase inversée, de nombreuses études menées avec des mélanges binaires hydro-organiques ont montré que les équations 3 et 4 décrivaient la variation de la rétention en fonction de la fraction volumique en solvant organique (1); ces modèles permettent également d'estimer les phénomènes de partage et de déterminer des coefficients de partage octanol-eau des solutés chromatographiés.

$$\log k = \log k_w + a\phi + b\phi^2$$

Equation 3

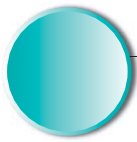
En chromatographie de partage avec des mélanges binaires, cas général. k_w ordonnées à l'origine (accessible par extrapolation), ϕ fraction volumique en solvant organique, a et b constantes propres à un soluté et une combinaison de solvants.

$$\log k = \log k_w - S\phi$$

Equation 4

En chromatographie de partage avec des mélanges binaires, cas particuliers. k_w ordonnées à l'origine (accessible par extrapolation), ϕ fraction volumique en solvant organique, S paramètre dépendant du soluté et de la force du solvant organique.

Comparée à une approche exclusivement empirique, l'utilisation de ces modèles théoriques et des principales grandeurs chromatographiques facilite l'optimisation de méthode. En effet, la méthode d'analyse idéale doit conduire à une résolution optimale entre les analytes d'intérêt, et ce dans des conditions expérimentales réalistes tant en terme de durée d'analyse qu'en terme de perte de charge. La résolution R_s (voir *équation 5*, page suivante) de deux composés dépend de l'efficacité (N), de la différence de rétention, soit la sélectivité (α), ainsi que de la rétention exprimée par k , l'augmentation de l'un de ces facteurs induisant l'augmentation de R_s (2).



$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right) \sqrt{N_2}$$

Equation 5

Expression de la résolution d'après l'équation de Purnell en supposant les largeurs des pics à la base égales, soit des pics très voisins.
N efficacité, α sélectivité, k_2 facteur de rétention du composé le plus retenu.

Si l'on considère l'influence de la sélectivité, α peut être modifiée en jouant sur la nature de la phase stationnaire, la nature de la phase mobile et sur la température. La démarche la plus courante consiste à faire varier la nature et la composition de la phase mobile. Trois méthodes peuvent être envisagées pour obtenir une sélectivité optimale avec un minimum d'expériences à réaliser : les diagrammes en fenêtres, les diagrammes des valeurs critiques des facteurs de rétention et le triangle de sélectivité de Snyder (2, 3), les deux premières méthodes reposant directement sur les modèles de rétention élaborés en CL de partage à polarité de phase inversée (voir équations 3 et 4). L'optimisation de R_s à partir seulement d'une augmentation de la rétention offre peu d'intérêt dans la mesure où le rapport $(k / k + 1)$ tend rapidement vers 1 et que le temps d'analyse augmente beaucoup plus rapidement que R_s . Enfin, les conditions expérimentales idéales conduisant à une efficacité maximale peuvent être déterminées à partir d'une généralisation sous forme d'abaques reliant entre elles différentes grandeurs chromatographiques : le temps d'analyse exprimé par t_o , la longueur de la colonne L , le diamètre des particules d_p , le nombre de plateaux de la colonne N , la perte de charge ΔP , exprimées en fonction de la vitesse réduite v (2). En CL de partage à polarité de phase inversée, des variations de l'ordre de 50 % ont été constatées lors de la mesure de V_m et de t_o , ce qui, par conséquent, peut induire des erreurs considérables sur l'estimation de k et sur les applications qui en découlent. Il s'avère donc indispensable de s'assurer de la pertinence de la méthode choisie pour déterminer V_m et t_o .

III – Les méthodes de mesure

En Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG), dans le cadre d'une estimation rigoureuse, V_m et t_o doivent être déterminés à partir de l'injection d'un gaz dont la nature dépendra du détecteur : du méthane, du propane ou du butane avec un détecteur à ionisation de flamme, de l'air avec un catharomètre, un détecteur à capture d'électrons ou un spectromètre de masse etc. Il est également possible d'extrapoler t_o à partir de la régression linéaire de la variation du logarithme des temps de rétention de solutés appartenant à une série homologue, en fonction du nombre d'atomes de carbones de chaque composé (4), le temps de rétention nulle correspondant au terme constant de la régression. Enfin, il est d'usage courant d'assimiler t_o au temps d'élution du solvant, cette dernière façon de procéder est contestable, dans la mesure où la plupart du temps le solvant est retenu par la colonne. En CL d'adsorption, le tritertiobutylbenzène est un inerte de choix : ce composé très lipophile présente l'avantage de pouvoir être utilisé avec la plupart des détecteurs. En revanche, en CL de partage à polarité de phase inversée, la détermination de V_m et de t_o est l'objet de polémiques, dans la mesure où il n'y a pas de distinction franche entre les phases mobile et stationnaire et que la présence des pores contribue à l'incertitude des mesures. Un modèle simplifié de la colonne chromatographique est représenté en figure 1. En CL d'adsorption, le volume de phase mobile contenu dans la colonne, V_m , correspond à la somme des volumes interstitiel (V_i), soit le volume de liquide en mouvement à l'extérieur des particules, et poreux (V_p), soit le volume de liquide stagnant à l'intérieur des particules. En partage exclusivement, V_p inclue un volume de liquide vecteur dit « stationnaire » (V_{liq}), car immobilisé du fait de sa participation à la solvation des greffons et des groupements silanols de la phase stationnaire. V_{liq} doit donc être dissocié de V_m . Les constructeurs s'accordent sur le fait qu'en CL de partage, V_m représente approximativement 60 % du volume total

Figure 1

Modèle simplifié de la colonne chromatographique. d diamètre interne de la colonne, L longueur de la colonne, V_c volume total de la colonne.

Volume interstitiel (V_i) :

liquide vecteur en mouvement

$$V_i = \frac{\pi}{4} d_c^2 L - (V_s + V_{liq} + V_p)$$

Volume poreux (V_p) :

liquide vecteur stagnant

$$V_p = V_c - (V_s + V_i + V_{liq})$$

dont Volume liquide stationnaire (V_{liq}) uniquement en chromatographie liquide-liquide

liquide stationnaire

Volume du « squelette » de la phase stationnaire (V_s)

Détermination des volumes morts et des effets extra-colonne en chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée

d'une colonne de 25 cm avec un diamètre interne de 4 mm et que V_i et V_p sont équivalents ; en revanche, la contribution de V_{liq} à V_p est extrêmement difficile à déterminer. En plus de la solvata-tion de la phase stationnaire par la phase mobile, la présence des pores va nuire à la précision des mesures de V_m et de t_o . En effet, la taille des pores conditionne l'accessibilité des solutés à l'ensemble de la surface spécifique de la phase stationnaire. Ce phénomène est lié à la taille des composés, mais aussi aux conditions expérimentales, ainsi qu'à l'usure de la colonne. Quand les greffons sont bien déployés, l'encombrement qu'ils provoquent limite l'accès à l'intérieur du pore qui est plus accessible aux solutés, dès lors que les greffons sont effondrés. Ces considérations ont conduit Knox et Kaliszan (5) à distinguer un volume mort cinétique, correspondant à V_p , et un volume mort thermodynamique, correspondant à la somme de V_i et du volume de phase éluante à l'intérieur des pores. Alhedai et al (6) ont alors suggéré que le volume mort cinétique était commun à tous les solutés, alors que le volume mort thermodynamique était propre à chaque composé. Enfin, il convient de noter qu'en CL de partage à polarité de phase inversée, le mécanisme de rétention est complexe. En effet, bien qu'il repose essentiellement sur du partage, soit une différence de solubilité entre les deux phases stationnaire et mobile, il peut exister des interactions secondaires comme des liaisons hydrogène avec les silanols, de l'adsorption ou encore des phénomènes d'exclusion, ce qui contribue à la complexité des mesures de V_m et de t_o . Il existe deux types de méthodes de mesure de V_m : statique et dynamique. La méthode statique la plus couramment mise en œuvre est la pycnométrie. Elle consiste à déterminer V_m à partir de la différence de masses de la colonne remplie successivement par deux solvants de densité très différente (voir équation 6) (7-9). Une procédure simplifiée a été proposée : elle consiste à n'utiliser qu'un seul solvant et à soustraire la masse de la colonne séchée par un courant de gaz inerte à la masse de la colonne remplie avec soit de l'eau, soit du pentane, soit du tétrachlorure de carbone (10-14). Le volume ainsi calculé représente le volume total de la colonne accessible à des solutés dont la taille est similaire à celle des molécules de solvant (7). Engelhardt et al (15) ont principalement reproché à la pycnométrie son manque de précision et ont montré qu'une fois la colonne séchée, elle était inutilisable. Berendsen et al (16) ont confirmé que cette méthode conduisait à une surestimation de V_m , puisqu'il est impossible de prendre en compte le volume de phase mobile solvantant la phase stationnaire et ainsi de distinguer V_{liq} de V_m . Ces auteurs s'accordent sur le fait que seules les méthodes dynamiques sont suffisamment précises pour conduire à des valeurs fiables de V_m .

$$V_m = \frac{m_x - m_y}{\rho_x - \rho_y}$$

Equation 6

Détermination du volume mort par pycnométrie (7). V_m volume mort de la colonne, m masse de la colonne « remplie » de solvant organique x ou y , ρ densité du solvant x ou y , x et y acétonitrile ($\rho = 0,7138$), ou méthanol ($\rho = 0,7866$), et chloroforme ($\rho = 1,484$) ou tétrachlorure de carbone ($\rho = 1,589$).

Le principe des méthodes dynamique repose sur une détermination de V_m à partir du produit du temps d'élu-tion d'un inerte par le débit de la phase mobile. Le principal problème réside dans le choix d'un composé non retenu et non exclu (16-18). Différents composés organiques "neutres", comme l'acétone (19, 20), la formamide (20), la diméthylformamide (15), le phloroglucinol (15, 19, 21), l'uracile (20, 22, 23), l'urée (15, 20) et la thio-urée (15, 24, 25) ont été proposés. Il est indispensable d'utiliser des composés de petite taille et hydrophiles (15). En pratique, l'utilisation d'une molécule organique neutre conduit à des résultats très différents suivant la nature de la phase mobile ; de plus, son temps d'élu-tion augmente avec une diminution de la force éluante (26, 27) et V_m augmente quand la température diminue (14, 15). Du fait de la polarité de la phase mobile, il suffit d'une faible diminution de sa force éluante pour que ce type de composés soit retenu. Dans ce contexte, l'utilisation des solutés organiques neutres ne peut être raisonnablement envisagée, ni dans le cadre d'une optimisation de méthode à l'aide de diagrammes en fenêtre ou à l'aide de diagrammes des valeurs critiques des facteurs de rétention, ni dans le cadre de la détermination de V_m , qui est alors majoré du fait de la rétention partielle de ces composés. Un autre type de composé a fait l'objet de nombreux travaux de recherche, mais aussi de nombreuses polémiques. Il s'agit des sels organiques et inorganiques recommandés pour leur praticité d'utilisation, qui présentent néanmoins l'inconvénient de pouvoir être exclu des pores. En effet, à cause de la présence de silanols résiduels, les composés chargés négativement subissent, à de faibles concentrations, en l'absence de tampon ou sans ajustement de la force ionique de la phase mobile, le phénomène d'exclusion de Donnan (8, 12, 15). Les travaux d'Engelhardt et al (15, 28-30) ont montré que l'augmentation du temps d'élu-tion de l'ion était liée à l'augmentation de sa concentration et de nombreux auteurs (6, 30-32) ont exploité le phénomène d'exclusion de Donnan pour déterminer V_i avec des concentrations en ions très faibles ($<10^{-3}$ M). Alhedai et al. (6) ont également comparé les résultats obtenus avec différents sels (du nitrate de sodium, du sulfite de sodium, du thiosulfate de sodium, du dichromate de potassium et du nitroprussiate de sodium), ils ont ainsi pu établir qu'il n'y avait pas d'effet de la charge et que t_o augmente alors que la taille de l'ion diminue. Berendsen et al (16) ont confirmé les résultats d'Alhedai et al (6), ces auteurs ont également préconisé l'utilisation d'ions monovalents à de fortes concentrations ($>10^{-1}$ M), avec des phases mobiles composés de mélanges à base de méthano-



nol et d'eau. L'utilisation de sels inorganiques ou organiques est largement documentée ; de très nombreux auteurs préconisent ce type de composés et estiment que c'est la méthode de choix pour déterminer V_m (33-40). Il est également possible de détecter un pic de rétention nulle en créant une perturbation mineure à l'intérieur des systèmes chromatographiques. Les méthodes les plus simples consistent à utiliser un système pic (41), injecter un des composants de la phase mobile (42), ou un composant deutéré (43). Bien que très populaires, ces méthodes ne sont pas de mise en œuvre facile, car elles nécessitent souvent l'utilisation d'un détecteur particulier. De plus, l'injection d'un solvant organique est contestable, puisqu'il peut participer à la solvataion du greffon. Pour pallier ce problème, Kazakevich et Mc Nair (24, 25, 44), ainsi que Rustamov et al. (13) ont proposé de déterminer t_0 à partir d'une valeur moyenne obtenue en étudiant la variation du temps d'éluion de la phase mobile d'utilisation injectée sur une large gamme de composition du mélange hydro-organique d'intérêt, ce qui complique encore plus la méthode. Enfin, la méthode de détermination de V_m et de t_0 à partir d'une série homologue, décrite à l'origine en CPG gaz-liquide, a été employée avec succès en CL ; mais elle présente l'inconvénient d'être beaucoup plus laborieuse à mettre en œuvre en CL qu'en CPG. En effet, c'est une méthode efficace et précise, dans la mesure où l'influence de la série utilisée, du nombre d'homologues, de la taille des solutés et du type de régression utilisée est maîtrisée. Différents travaux menés à partir des séries homologues suivantes : les n-alcools - exceptés le méthanol et l'éthanol, les alkyl-benzènes, les n-alcanes et les alkyl-cétones, ont montré que trois homologues au minimum étaient nécessaires, quatre sont recommandés, pour obtenir une régression significative (14, 32, 45-49). Berendsen et al (16) ont montré l'importance de choisir des homologues comportant un nombre d'atomes de carbone conséquent, supérieur ou égal à 4, et inférieur au nombre d'atomes de carbone du greffon de la phase stationnaire, cette dernière condition permettant d'éviter une rupture de pente dans la variation des temps de rétention des solutés en fonction de leur nombre d'atomes de carbones. Ces considérations ont été confirmées par d'autres équipes (15, 22, 50).

De très nombreux travaux portant sur la détermination de V_m et de t_0 ont été produits depuis une trentaine d'années, pour de plus amples et plus complètes informations sur ce sujet, il convient de consulter la revue de Dorsey et al (51) ainsi que les travaux de Anon (52), Escuder-Gilabert et al. (53), Sajonz (54), Gritti et Guiochon (55).

IV – Matériel et méthodes

Toutes les mesures de V_m et de t_0 ont été effectuées sur une chaîne de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) composée d'une

pompe à débit contrôlée (modèle L-600, Merck), d'une vanne d'injection manuelle avec une boucle de 10 μ L (Rhéodyne), d'un détecteur (modèle L-4200, Merck) dont la longueur d'onde a été fixée à 254 nm et la sensibilité à 0,01. L'étude finale portant sur la comparaison des effets extra-colonne a été réalisée sur deux chaînes de CLHP Lachrom, différant entre elles par la longueur et le diamètre des tubes de connections, composée chacune d'une pompe (modèle L-7100, Merck), d'un injecteur automatique (modèle L-7200, Merck), d'une interface (D-7000 Merck) et d'un détecteur (modèle L-7400, Merck) dont la longueur d'onde a été fixée à 254 nm et la sensibilité à 0,01. L'acquisition et le traitement des données chromatographiques ont été gérés par le logiciel HSM (Merck). Deux colonnes de mêmes dimensions (250*4 mm) et de même granulométrie (5 μ m), différant uniquement par le diamètre moyen des pores (100 et 300 Å) ont été utilisées : LiChrospher® RP-18 non postgreffée (Merck). Tous les solvants et les réactifs ont été fournis par VWR International ; l'acétonitrile, l'eau et le méthanol sont de qualité pour la CLHP et le tétrachlorure de carbone est de qualité pour la spectroscopie. Les différentes phases mobiles ont été préparées manuellement à l'aide de fioles jaugées, la répétabilité de chaque mélange a été systématiquement vérifiée par la mesure de son indice de réfraction. La série homologue des hydrocarbures aromatiques a été préparée dans un mélange composé d'acétonitrile et d'eau 75/25 vol/vol, à raison des teneurs suivantes : 77 mg de benzène, 9,1 mg de naphthalène et 0,49 mg d'anthracène pour un volume final de 100 mL. La série homologue des cétones a été préparée dans l'acétonitrile, à raison des teneurs suivantes : 0,8 mg d'acétone, 1,2 mg de butanone, 1,3 mg de pentanone et 1,6 mg d'hexanone pour un volume final de 50 mL. Ces valeurs ont été déterminées de façon à obtenir un nombre de plateaux théoriques similaire pour chaque composé. La composition de la phase mobile pour la séparation des cétones a été déterminée d'après des diagrammes à fenêtre, de façon à obtenir une résolution supérieure à 1,5 entre chaque couple de composés consécutifs. Un mélange d'acétonitrile et d'eau à 60/40 vol/vol a ainsi été choisi.

V – Résultats et discussion

Il se dégage de la littérature scientifique que les méthodes de détermination de V_m et de t_0 sont nombreuses, variées et fortement dépendantes des conditions expérimentales, comme la température, la composition et la force éluante de la phase mobile etc. Dans un premier temps, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'influence de paramètres physiques comme la taille des pores et le débit de la phase mobile sur la répétabilité de la mesure de ces deux grandeurs. Nous avons tout d'abord déterminé V_m par pycnométrie, pour deux colonnes remplies d'un gel

Détermination des volumes morts et des effets extra-colonne en chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée

Colonnes LiChrospher® RP-18 Non postgreffées, 250*4,6 mm, 5 µm	V _m Valeur moyenne (en mL)	Écart-type (σ en mL)	Coefficient de variation (en %)
Diamètre de pores : 100 Å	2,06	7.10 ⁻³	0,34
Diamètre de pores : 300 Å	2,27	7,1.10 ⁻³	0,31

de silice greffée octadécylsilane, différant entre elles uniquement par le diamètre moyen des pores (100 et 300 Å). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I ; les données statistiques ont été établies à partir de six séries de six pesées de chaque colonne, remplie alternativement de méthanol et de tétrachlorure de carbone. Le diamètre de pores le plus important induit la plus forte valeur de V_m .

Nous avons poursuivi cette étude par la comparaison des V_m déterminés à partir de l'injection de trois inerts différents et de deux séries homologues. Pour chaque type de solutés non retenus, nous avons choisi le composé le plus couramment utilisé d'après les données de la littérature. La composition de la phase mobile, ainsi que la série homologue ont été choisies en se référant aux chromatogrammes tests fournis par les constructeurs, réalisés à partir d'un mélange constitué de toluène ou de benzène, de naphthalène et d'anthracène. Les concentrations de ces solutés ont été déterminées de façon à obtenir un nombre de plateaux constants pour chacun de ces trois pics, condition sine qua non de mise en oeuvre de la méthode décrite ci-après, permettant d'estimer V_m extra-colonne. L'utilisation systématique du benzène est nécessaire à l'obtention d'une série homologue. En effet, comme le motif de cette série est un cycle aromatique, la rétention des homologues augmente très rapidement avec le nombre de cycles. Par conséquent, le temps d'analyse augmente très rapidement, et ce d'autant plus aux faibles débits. Comme il apparaît dans la littérature que l'utilisation de quatre homologues est seulement recommandée et que trois sont suffisants, nous avons finalement retenu cette dernière solution. Les figures 2 et 3 représentent la variation de V_m en fonction du débit de la phase mobile, composée d'un mélange composé d'acétonitrile et d'eau 75/25 vol/vol. Pour chaque colonne et indépendamment de l'inerte utilisé, deux tendances sont à considérer : pour des débits supérieurs ou égaux à 0,5 mL.min⁻¹, la valeur moyenne de V_m est constante, alors qu'elle augmente significativement pour des débits inférieurs à 0,5 mL.min⁻¹. D'une façon générale, les résultats obtenus correspondent aux données de la littérature. Les valeurs les plus importantes de V_m sont obtenues avec l'uracile qui est retenue pour cette composition de la phase mobile. Nous avons vérifié qu'en augmentant la force éluante, le temps d'élution de l'uracile diminuait. En effet, pour des teneurs en acétonitrile inférieures à 25 %, ce composé est élué avant le nitrate de potassium 1 M et après le nitrate de potassium 10⁻¹ M. De plus, ce composé

est partiellement exclu du fait de sa taille, puisque quand il n'est pas retenu, son temps d'élution reste inférieur à celui du nitrate de potassium 1 M. Si l'on considère le graphe illustrant la variation de V_m en fonction du débit pour des différentes concentrations en nitrate de potassium (voir figure 4), l'effet du phénomène d'exclusion de Donnan est clairement marqué : V_m augmente avec la concentration en sel. De plus, on remarque, comme pour les figures 2 et 3, une variation dans la dispersion des résultats suivant la colonne utilisée. En effet, avec du 300 Å, le phénomène d'exclusion est plus

Tableau I

Détermination du volume mort V_m par pycnométrie.

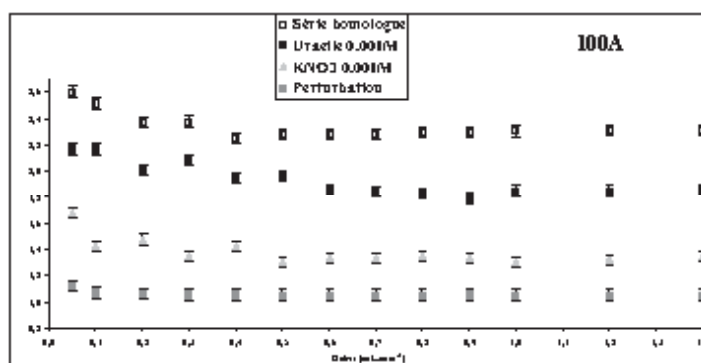


Figure 2

Les différentes valeurs de V_m pour une même colonne : LiChrospher® RP-18 non postgreffée 250*4 mm, 5 µm, diamètre moyen des pores 100 Å, avec une phase mobile composée d'un mélange acétonitrile/eau 75/25 vol/vol. Inertes utilisés : uracile 10⁻³ M, nitrate de potassium 10⁻³ M, eau deutériée et série homologue des hydrocarbures aromatiques (benzène, naphthalène et anthracène).

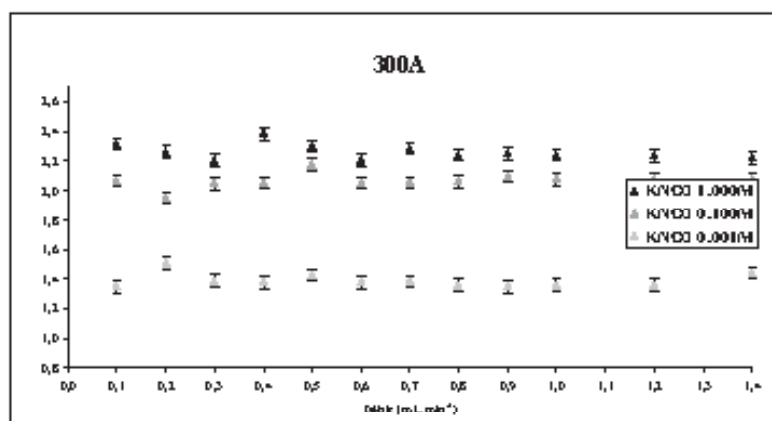


Figure 3

Les différentes valeurs de V_m pour une même colonne : LiChrospher® RP-18 non postgreffée 250*4 mm, 5 µm, diamètre moyen des pores 300 Å, avec une phase mobile composée d'un mélange acétonitrile/eau 75/25 vol/vol. Inertes utilisés : uracile 10⁻³ M, nitrate de potassium 10⁻³ M, eau deutériée et série homologue des hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzène, naphthalène et anthracène).

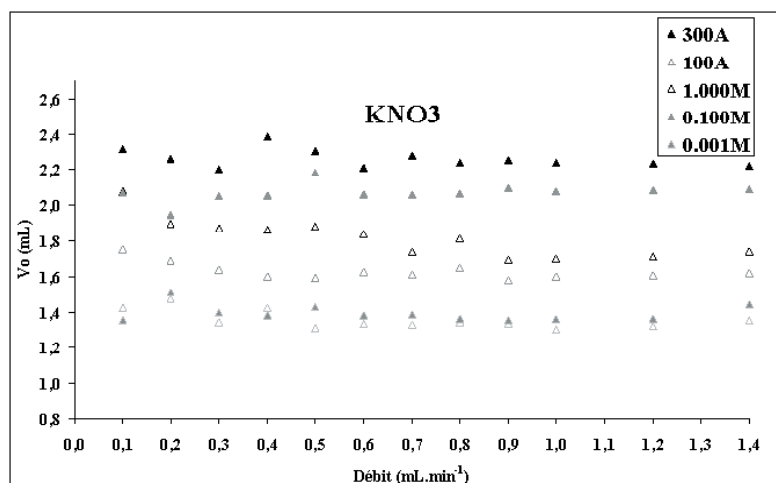


Figure 4

Les différentes valeurs de V_m pour les deux colonnes : LiChrospher® RP-18 non postgreffées 250*4 mm, 5 μ m, diamètre moyen des pores 100 et 300 Å, avec une phase mobile composée d'un mélange acétonitrile/eau 75/25 vol/vol. Inertes utilisés : nitrate de potassium à différentes concentrations 1 M, 10^{-1} M et 10^{-3} M.

Diamètre des pores	100 Å	100 Å	Diamètre des pores	300 Å	300 Å
Débit	1,0 mL.min ⁻¹	0,1 mL.min ⁻¹	Débit	1,0 mL.min ⁻¹	0,1 mL.min ⁻¹
V_m série homologue	2,30 mL	2,51 mL	V_m pycnométrie	2,27 mL	2,27 mL
V_m pycnométrie	2,06 mL	2,06 mL	V_m uracile	2,28 mL	2,33 mL
V_m uracile	1,85 mL	2,17 mL	V_m KNO ₃ 1 M	2,24 mL	2,31 mL
V_m KNO ₃ 1 M	1,70 mL	2,08 mL	V_m série homologue	2,23 mL	2,24 mL
V_m KNO ₃ 10 ⁻¹ M	1,60 mL	1,75 mL	V_m KNO ₃ 10 ⁻¹ M	2,08 mL	2,07 mL
V_m KNO ₃ 10 ⁻³ M	1,30 mL	1,42 mL	V_m KNO ₃ 10 ⁻³ M	1,36 mL	1,35 mL
V_m perturbation (D20)	1,05 mL	1,07 mL	V_m perturbation (D20)	1,31 mL	1,34 mL

Tableau II

Résultats les plus représentatifs de l'influence du diamètre des pores et du débit sur la détermination de V_m et de t_o .

fortement marqué. Si l'on compare les valeurs de V_m obtenues avec les différents inertes utilisés, il n'existe pas de différence significative entre les deux colonnes dans le cas du nitrate 10^{-3} M. On peut donc supposer qu'avec cette concentration en sel, il est effectivement possible d'accéder à V_i . Nous avons regroupés dans le tableau II, les résultats les plus caractéristiques de l'influence du diamètre des pores et du débit sur les mesures de V_m et de t_o . Quel que soit l'inerte utilisé, les valeurs de V_m sont plus importantes pour un débit de 0,1 mL.min⁻¹ que pour un débit de 1 mL.min⁻¹ et cette différence est d'autant plus marquée avec la colonne de 100 Å. De plus, la variation de V_m en fonction de la méthode utilisée diffère suivant la colonne. En effet, avec un diamètre de pore de 300 Å, la plus grande valeur de V_m est obtenue par pycnométrie, alors qu'avec du 100 Å, c'est la série homologue qui conduit à la valeur la plus importante. Dans ce contexte, nous avons vérifié la répétabilité de ces résultats avec une série homologue d'alkyl-cétones comportant de l'acétone, de la butanone, de la pentanone et de l'hexanone. Comme

pour la série homologue des hydrocarbures aromatiques, nous avons limité au strict minimum le nombre de solutés à séparer, de façon à réduire le temps d'analyse. Bien que le premier homologue, l'acétone en l'occurrence, ne comporte pas trois atomes de carbone, nous avons volontairement introduit ce soluté dans la série étudiée. La littérature fait état d'un usage courant de l'acétone en tant qu'inerte ; nous avons vérifié la validité de cette pratique. Ce composé s'est avéré particulièrement inadapté à la détermination de V_m ; en effet, quelle que soit la composition en eau de la phase mobile, il est élué après l'uracile et son temps d'éluion augmente linéairement lorsque la force éluante diminue, ce dernier point montrant clairement que l'acétone est retenue. De plus, le coefficient de régression linéaire caractéristique de la variation du logarithme du temps de rétention des cétones en fonction de leur nombre d'atomes de carbone n'est pas affecté par l'introduction de la valeur obtenue avec l'acétone. Nous n'avons pu conserver la phase mobile utilisée pour la sé-

paration des hydrocarbures aromatiques ; une diminution de la force éluante s'est avérée nécessaire pour obtenir la séparation des quatre cétones. Des résultats identiques ont été obtenus : la série homologue des cétones donne une valeur de V_m supérieure à celle obtenue par pycnométrie, alors que c'est l'inverse qui se produit avec du 300 Å. D'un point de vue pratique, les valeurs de V_m et de t_o obtenus avec ces différentes méthodes ont été employées dans le cadre de l'optimisation de la séparation de plusieurs types de solutés. Il est difficile de dégager une méthode de choix. D'une façon générale, les applications développées à partir des résultats obtenus avec la série homologue se caractérisent par leurs grandes fiabilité et robustesse. La rétention des solutés organiques neutres avec la diminution de la force éluante de la phase mobile et la sensibilité de cette méthode aux variations de températures limitent grandement leur domaine d'applications. Avec des sels organiques ou inorganiques, il est nécessaire de s'affranchir du phénomène d'exclusion de Donnan, en jouant sur le pH, ou la force ionique de la phase mobile, ou

Détermination des volumes morts et des effets extra-colonne en chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée

bien encore sur la concentration en sel. Enfin, le pic de l'eau deutériée présente l'inconvénient d'apparaître sous forme d'un système pic d'assez faible intensité, qui n'est pas toujours pris en compte par le système d'intégration et qui peut être confondu avec un système pic provenant d'une autre perturbation, comme le simple fait de basculer la vanne d'injection de la position de remplissage à la position d'injection.

En complément de cette étude, nous sommes intéressés à la détermination du V_m extra-colonne. Dans un système chromatographique bien conçu, V_m peut se réduire au volume mort de la colonne, sous réserve que les volumes extérieurs à la colonne, dits extra-colonne, soient négligeables. Dans ce contexte, nous avons utilisé les séparations obtenues avec les séries homologues pour déterminer V_m extra-colonne et estimer sa contribution dans le processus chromatographique. En effet, en chromatographie, le volume d'injection ne peut être considéré comme ponctuel : la dispersion du composé dans la phase mobile est assimilée à une bande de largeur variable. La diffusion moléculaire du composé dans l'éluant, la diffusion due au manque d'homogénéité du support stationnaire, ainsi que la résistance aux transferts de masse dans les phases mobile et stationnaire sont à l'origine de l'élargissement de cette bande. Tous les volumes morts contribuent également à ce phénomène et suivant leur ordre de grandeur, ils nuisent à l'efficacité du système chromatographique en augmentant la dispersion du soluté. Le

concept d'élargissement de bande en chromatographie repose sur la distribution statistique du soluté qui est assimilée à une courbe de Gauss, dont la dispersion est estimée à partir du nombre de plateaux théoriques calculées sur le chromatogramme (voir équations 7 et 8).

La dispersion totale d'un pic d'éluion s'exprime donc par la somme des dispersions se produisant à l'intérieur et à l'extérieur de la colonne (voir équation 9). En combinant les équations 1, 8 et 9, il est possible d'exprimer la variation de la variance totale caractérisant la dispersion d'un soluté en fonction de son facteur de rétention. A partir de la séparation d'un mélange de solutés, la variance extra-colonne ($\sigma^2_{\text{extracolonne}}$) peut être extrapolée à partir de la régression linéaire de la variation de la variance totale déterminée pour chaque soluté du mélange en fonction de son facteur de rétention (voir équation 10), $\sigma^2_{\text{extracolonne}}$ correspondant au terme constant de la régression.

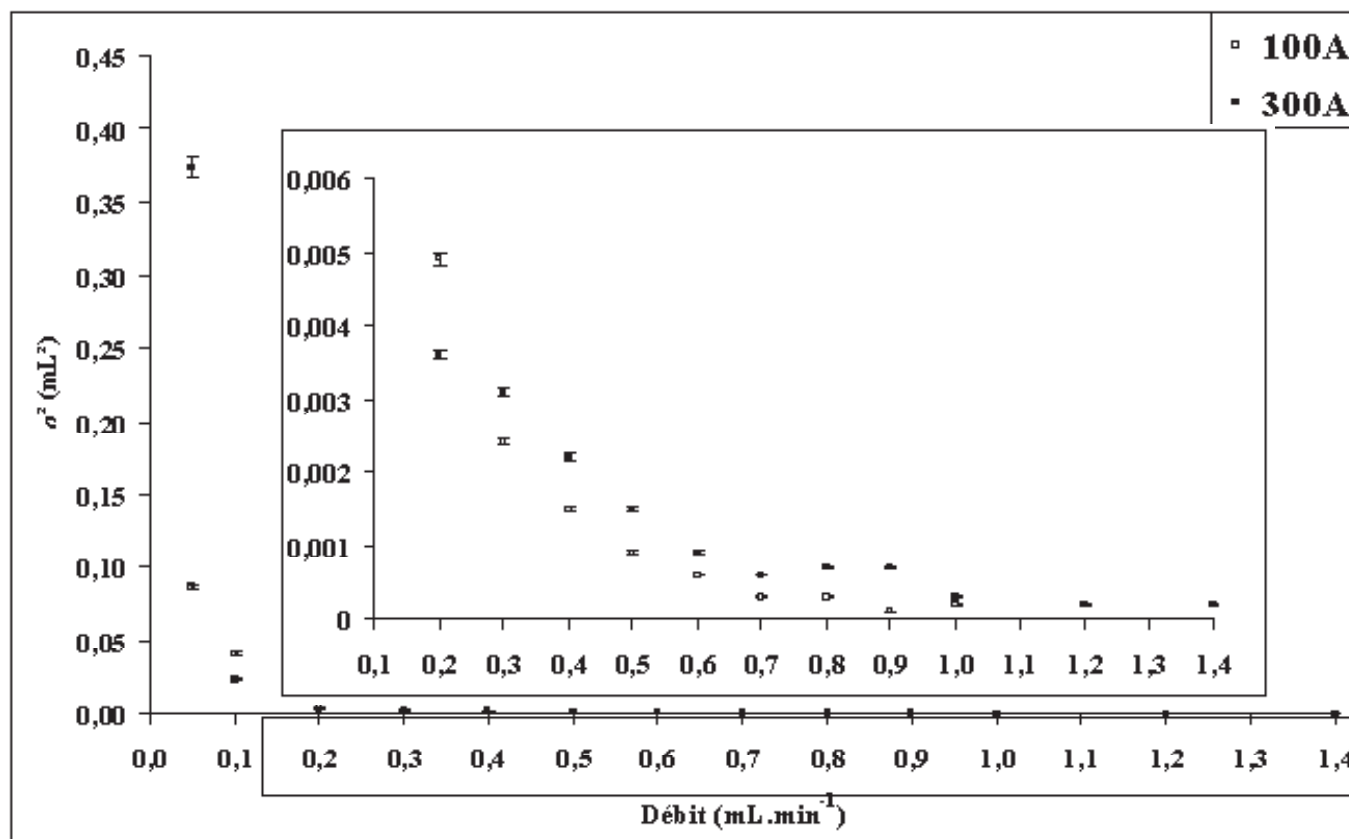
$$\sigma^2 = \frac{t_R^2}{N} = \frac{d_R^2}{N} = \frac{V_R^2}{N}$$

Equation 7

Expression de la dispersion d'un soluté en chromatographie. σ écart-type, t_R temps de rétention, d_R distance de rétention, V_R volume de rétention, N efficacité.

Figure 5

Les différentes valeurs de V_m extra-colonne pour les deux colonnes : LiChrospher® RP-18 non postgreffées 250*4 mm, 5 μ m, diamètre moyen des pores 100 et 300 Å, avec une phase mobile composée d'un mélange acétonitrile/eau 75/25 vol/vol. Série homologue utilisée : hydrocarbures aromatiques.





$$N = a \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 = a \left(\frac{d_R}{\omega} \right)^2 = a \left(\frac{V_R}{\omega} \right)^2$$

Tableau III

Comparaison des performances de deux systèmes chromatographiques en fonction des effets extra-colonne.

LACHROM 2		LACHROM 1	
Effets extra-colonne (avec une série de composés aromatiques) $\sigma^2_{\text{extra-colonne}} = 0,0033$		Effets extra-colonne (avec une série de composés aromatiques) $\sigma^2_{\text{extra-colonne}} = 0,0062$	
σ^2_{obs} (toluène) = 0,0052 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0019$		σ^2_{obs} (toluène) = 0,0077 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0015$	
σ^2_{obs} (naphtalène) = 0,0059 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0026$		σ^2_{obs} (naphtalène) = 0,0083 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0021$	
σ^2_{obs} (anthracène) = 0,0100 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0067$		σ^2_{obs} (anthracène) = 0,0114 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0062$	
Effets extra-colonne (avec une série de cétones) $\sigma^2_{\text{extra-colonne}} = 0,0038$		Les effets extra-colonne (avec une série de cétones) $\sigma^2_{\text{extra-colonne}} = 0,0065$	
σ^2_{obs} (acétone) = 0,0052 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0014$		σ^2_{obs} (acétone) = 0,0079 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0015$	
σ^2_{obs} (butanone) = 0,0059 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0021$		σ^2_{obs} (butanone) = 0,0085 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0020$	
σ^2_{obs} (pentanone) = 0,0067 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0029$		σ^2_{obs} (pentanone) = 0,0094 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0029$	
σ^2_{obs} (hexanone) = 0,0080 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0042$		σ^2_{obs} (hexanone) = 0,0108 $\sigma^2_{\text{col}} = 0,0040$	
Détermination du nombre de plateaux théoriques		Détermination du nombre de plateaux théoriques	
$N_{\text{toluène}} : 15589$ $N_{\text{naphtalène}} : 15776$ $N_{\text{anthracène}} : 14611$	$N_{\text{acétone}} : 10541$ $N_{\text{butanone}} : 11256$ $N_{\text{pentanone}} : 12049$ $N_{\text{hexanone}} : 12785$	$N_{\text{toluène}} : 6837$ $N_{\text{naphtalène}} : 7756$ $N_{\text{anthracène}} : 10412$	$N_{\text{acétone}} : 4456$ $N_{\text{butanone}} : 5097$ $N_{\text{pentanone}} : 5889$ $N_{\text{hexanone}} : 6915$

Equation 8

Expression de l'efficacité d'une colonne chromatographique. t_R temps de rétention, d_R distance de rétention, V_R volume de rétention, N efficacité, ω largeur du pic, a facteur dépendant de la hauteur à laquelle ω est mesurée.

$$\sigma^2_{\text{observée}} = \sigma^2_{\text{colonne}} + \sigma^2_{\text{connexion}} + \sigma^2_{\text{injecteur}} + \sigma^2_{\text{détecteur}}$$

soit

$$\sigma^2_{\text{observée}} = \sigma^2_{\text{colonne}} + \sigma^2_{\text{extracolonne}}$$

Equation 9

Expression de la dispersion totale caractéristique du pic d'éluion d'un composé retenu. σ^2_{obs} variance observée mesurée sur le chromatogramme d'après l'équation 7, $\sigma^2_{\text{colonne}}$ variance due à la colonne, $\sigma^2_{\text{connexion}}$ variance due au volume mort dans les tubes de connexion, $\sigma^2_{\text{injecteur}}$ variance due au volume mort dans l'injecteur, $\sigma^2_{\text{détecteur}}$ variance due au volume mort dans le détecteur.

$$\sigma^2_{\text{observée}} = \frac{V_m^2}{N} (1+k)^2 + \sigma^2_{\text{extracolonne}}$$

Equation 10

Expression de la variation de la variance totale caractérisant la dispersion d'un soluté en fonction de son facteur de rétention. V_m volume de phase mobile dans la colonne, N nombre de plateaux théoriques, k facteur de rétention.

Cette méthode a été appliquée pour déterminer V_m extra-colonne avec deux séries homologues. L'étude de V_m extra-colonne, déterminé à partir de la série homologue des hydrocarbures aromatiques, a montré que quelle que soit la colonne utilisée, cette valeur est sensible au débit utilisé (voir figure 5). Nous avons alors soustrait V_m extra-colonne à V_m colonne, pour chaque débit ; aucune différence notable n'a pu être observée, dans la mesure où V_m reste constant pour des débits supérieurs ou égaux à 0,5 mL.min⁻¹ et augmente avec la diminution du débit. Bien que ces derniers travaux n'ont pu montrer une influence particulière des effets extra-colonne sur la mesure de V_m , les résultats obtenus nous ont permis de comparer pour une même colonne les performances de deux systèmes chromatographiques différant par la longueur des tubes des connexions et ainsi de qualifier l'appareillage le plus performant. Les résultats obtenus avec les séries homologues des hydrocarbures aromatiques et des alkyl-cétones sont regroupés dans le tableau III.

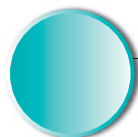
VI - Conclusion

En CL de partage à polarité de phase inversée, il est impossible de distinguer une méthode universelle pour déterminer V_m et t_R . Les résultats obtenus au cours de cette étude ont confirmé les données de la littérature, notamment en ce qui concerne la disparité des résultats obtenus suivant la méthode choisie. En pratique, en termes de robustesse et de fiabilité des applications développées à la suite, les meilleurs résultats ont été obtenus avec des séries homologues. Selon la littérature, cette méthode présente l'inconvénient d'être la plus laborieuse de mise œuvre. En revanche, dans la mesure où les concentrations en solutés ont été optimisées, elle présente l'avantage de vérifier les performances du système chromatographique utilisé et de s'assurer ainsi de la répétabilité des mesures effectuées.

Détermination des volumes morts et des effets extra-colonne en chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée

BIBLIOGRAPHIE

- (1) POOLE C. F., POOLE S. K., «Chromatography today», Amsterdam Elsevier, 1991, 375-402
- (2) ROSSET R., CAUDE M., JARDY A., «Chromatographies en phase liquide et supercritique», Paris Mas 10-3 Masson, 1991, 84-116
- (3) SNYDER L. R., «Classification of the solvent properties of common liquids», *J. Chromatogr. Sci.*, 1978, **16**, 223-234
- (4) POOLE C. F., POOLE S. K., «Chromatography today», Amsterdam Elsevier, 1991, 180-181
- (5) KNOX J. H., KALISZAN R., «Theory of solvent disturbance peaks and experimental determination of thermodynamic dead-volume in column liquid chromatography», *J. Chromatogr.*, 1985, **349**, 211-34
- (6) ALHEDAI A., MARTIRE D. E., SCOTT R. P. W., «Column "dead volume" in liquid chromatography», *Analyst*, 1989, **114**, 869-75
- (7) MC CORMICK R. M., KARGER B. L., «Distribution phenomena of mobile-phase components and determination of dead volume in reversed-phase liquid chromatography», *Anal. Chem.*, 1980, **52**, 2249-57
- (8) MELANDER W. R., ERARD J. F., HORVATH C., «Movement of components in reversed-phase chromatography. I. Mobile phase space with multi-component eluents», *J. Chromatogr.*, 1983, **282**, 211-28
- (9) DJERKI R. A., LAUB R. J., «Solute retention in column liquid chromatography. IX. Comparison of methods of determination of the void volume in liquid-liquid chromatography», *J. Liq. Chromatogr.*, 1987, **10**, 1749-67
- (10) SLAATS E. H., KRAAK J. C., BRUGMAN W. J. T., POPPE H., «Study of the influence of competition and solvent interaction on retention in liquid-solid chromatography by measurement of activity coefficients in the mobile phase», *J. Chromatogr.*, 1978, **149**, 255-70
- (11) VESPALEC R., SIMEK Z., «Dependence of the retention volumes of additional streaming current responses and of the column void volume on mobile phase composition», *Chromatographia*, 1991, **32**, 130-6
- (12) KRSTULOVIC A. M., COLIN H., GUIOCHON G., «Comparison of methods used for the determination of void volume in reversed-phase liquid chromatography», *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 2438-43
- (13) RUSTAMOV I., FARCAS T., AHMED F., CHAN F., LOBRUTTO R., MCNAIR H. M., KAZAKEVICH Y. V., «Geometry of chemically modified silica», *J. Chromatogr. A*, 2001, **913**, 49-63
- (14) MOCKEL H. J., «Influence of temperature on dead volume of ODS columns and on n-alkane retention in high-performance liquid chromatography», *J. Chromatogr. A*, 1994, **675**, 13-28
- (15) ENGELHARDT H., MUELLER H., DREYER B., «Is there a "true" dead volume for HPLC columns?» *Chromatographia*, 1984, **19**, 240-5
- (16) BERENDSEN G. E., SCHOENMAKERS P. J., DE GALAN L., VIGH G., VARGA-PUCHONY Z., INCZEDY J., «On the determination of the hold-up time in reversed phase liquid chromatography», *J. Liq. Chromatogr.*, 1980, **3**, 1669-86
- (17) SHIBUKAWA M., OHTA N., «A new method for the determination of mobile phase volume in normal and reversed-phase liquid chromatography», *Chromatographia*, 1988, **25**, 288-94
- (18) POPPE H., «Distribution isotherms in reversed-phase systems», *J. Chromatogr.*, 1993, **656**, 19-36
- (19) SMITH R. J., NIEASS C. S., WAINWRIGHT M. S., «A review of methods for the determination of hold-up volume in modern liquid chromatography», *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9**, 1387-430
- (20) NOWOTNIK D. P., NARRA R. K., «A comparison of methods for the determination of dead time in a reversed-phase high-performance liquid chromatography system used for the measurement of lipophilicity», *J. Liq. Chromatogr.*, 1993, **16**, 3919-32
- (21) VIT I., FAHNRICH J., POPL M., «Determination of the dead volume of columns in reversed phase liquid chromatography», *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 1989, **54**, 953-66
- (22) BIDLINGMEYER B. A., WARREN F. V., JR., WESTON A., NUGENT C., FROEHLICH P. M., «Some practical considerations when determining the void volume in high-performance liquid chromatography», *J. Chromatogr. Sci.*, 1991, **29**, 275-9
- (23) STANLEY B. J., FOSTER C. R., GUIOCHON G., «On the reproducibility of column performance in liquid chromatography and the role of the packing density», *J. Chromatogr. A*, 1997, **761**, 41-51
- (24) KAZAKEVICH Y. V., MCNAIR H. M., «Thermodynamic definition of HPLC dead volume», *J. Chromatogr. Sci.*, 1993, **31**, 317-22
- (25) KAZAKEVICH Y. V., MCNAIR H. M., «Study of the excess adsorption of the eluent components on different reversed-phase adsorbents», *J. Chromatogr. Sci.*, 1995, **33**, 321-7
- (26) VAN DER HOUWEN O. A. G. J., VAN DER LINDEN J. A. A., INDEMANS A. W. M., «Evaluation of the use of lithium nitrate as a test substance for the determination of the hold-up time on a reversed-phase packing», *J. Liq. Chromatogr.*, 1982, **5**, 2321-41
- (27) JINNO K., «Elution characteristic of sodium nitrite in reversed-phase HPLC with aqueous methanol as the mobile phase», *Chromatographia*, 1983, **17**, 367-9
- (28) VIT I., POPL M., FAHNRICH J., «Dead volume determination in reversed-phase liquid chromatography», *J. Chromatogr.*, 1983, **281**, 293-8
- (29) SMITH R. M., BURR C. M., «Retention prediction of analytes in reversed-phase high-performance liquid chromatography based on molecular structure. II. Long term reproducibility of capacity factors and retention indexes», *J. Chromatogr.*, 1989, **475**, 75-83
- (30) DAIGNAULT L. G., JACKMAN D. C., RILLEMA D. P., «The case of the elusive tm values in HPLC», *Chromatographia*, 1989, **27**, 156-8
- (31) OUMADA F. Z., ROSES M., BOSCH E., «Inorganic salts as hold-up time markers in C18 columns», *Talanta*, 2000, **53**, 667-677
- (32) WELLS M. J. M., CLARK C. R., «Liquid chromatographic elution characteristics of some solutes used to measure



column void volume on C18 bonded phases", *Anal. Chem.*, 1981, **53**, 1341-5

(33) HORVATH C., MELANDER W., MOLNAR I., "Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases", *J. Chromatogr.*, 1976, **125**, 129-56

(34) SCHOENMAKERS P. J., BILLIET H. A. H., TIJSSEN R., DE GALAN L., "Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, 1978, **149**, 519-37

(35) HERMANSSON J., "Reversed-phase liquid chromatography of steroid glucuronides", *J. Chromatogr.*, 1978, **152**, 437-45

(36) SCOTT R. P. W., SIMPSON C. F., "Solute-solvent interactions on the surface of reversed phases. I. Stationary phase interactions and their dependence on bonding characteristics", *J. Chromatogr.*, 1980, **197**, 11-20

(37) HEARN M. T. W., GREGO B., "High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. XXXVI. Organic solvent modifier effects in the separation of unprotected peptides by reversed-phase liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, 1981, **218**, 497-507

(38) JINNO K., "Chromatographic performance of deuterated solvents in reversed phase micro high-performance liquid chromatography", *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications*, 1982, **5**, 364-7

(39) DE JONG J., VAN VALKENBURG C. F. M., TJADEN U. R., "Selective retention of catecholamines and their derivatives in reversed-phase ion-pair partition chromatography", *J. Chromatogr.*, 1985, **322**, 43-53

(40) SMITH R. M., "The use of retention indexes to measure the solvent selectivity of ternary eluents in reversed-phase liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, 1985, **324**, 243-50

(41) LEVIN S., GRUSHKA E., "System peaks in liquid chromatography: their origin, formation, and importance", *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 1602-7

(42) DJERKI R. A., LAUB R. J., "Solute retention in column liquid chromatography. XI. Exposition of the minor-disturbance method of measurement of the void volume", *J. Liq. Chromatogr.*, 1988, **11**, 327-32

(43) BILLIET H. A. H., VAN DALEN J. P. J., SCHOENMAKER P. J., DE GALAN L., "Measurement of deuterium oxide elution data in reversed-phase liquid chromatography with a microwave induced plasma detection", *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 847-51

(44) KAZAKEVICH Y. V., MCNAIR H. M., "Low-energy interactions in high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 2000, **872**, 49-59

(45) DIDAOU L., TOUABET A., MEKLATI B. Y., LEWIN-KRETZSCHMAR U., ENGEWALD W., "Comparison of retention indices of some explosives and related compounds calculated by different mathematical methods in reversed-phase liquid chromatography", *J. High Res. Chromatogr.*, 1999, **22**, 613-618

(46) GROBLER A., BALIZS G., "Computer program for a statistical calculation of retention indexes", *J. Chromatogr. Sci.*, 1974, **12**, 57-8

(47) GUARDINO X., ALBAIGES J., FIRPO G., RODRIGUEZ-VINALS R., GASSIOT M., "Accuracy in the determination of the Kovats retention index. Mathematical dead time", *J. Chromatogr.*, 1976, **118**, 13-22

(48) AL-THAMIR W. K., PURNELL J. H., WELLINGTON C. A., LAUB R. J., "Evaluation of dead space in chromatographic systems", *J. Chromatogr.*, 1979, **173**, 388-91

(49) LAUB R. J., MADDEN S. J., "Solute retention in column liquid chromatography. V. The column dead volume", *J. Liq. Chromatogr.*, 1985, **8**, 173-86

(50) TCHAPLA A., COLIN H., GUIOCHON G., "Linearity of homologous series retention plots in reversed-phase liquid chromatography", *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 621-5

(51) RIMMER C. A., SIMMONS C. R., DORSEY J. G., "The measurement and meaning of void volumes in reversed-phase liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 2002, **965**, 219-232

(52) ANON, "Liquid Chromatography Problem Solving and Troubleshooting", *J. Chromatogr. Sci.*, 2003, **41**, 570-571

(53) ESCUDER-GILABERT L., BERMUDEZ-SALDANA J. M., VILLANUEVA-CAMANAS R. M., MEDINA-HERNANDEZ M. J., SAGRADO S., "Reliability of the retention factor estimations in liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1033**, 247-255

(54) SAJONZ P., "Influence of the column hold-up time measurement accuracy on the prediction of chromatographic band profiles", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1050**, 129-135

(55) GRITTI F., GUIOCHON G., "Influence of the pressure on the properties of chromatographic columns. I. Measurement of the compressibility of methanol-water mixtures on a mesoporous silica adsorbent", *J. Chromatogr. A*, 2005, **1070**, 1-12