

36. Révélation par microsublimation de chromatogrammes sur couche mince

par Br. Baehler

(16 X 61)

Un avantage de la microchromatographie sur couche mince¹⁾ réside dans le fait que bon nombre de dérivés organiques sont susceptibles d'être révélés très simplement par aspersion par l'acide sulfurique et chauffage de la «chromatoplaque» à 150–250°. Une tache noire due à la carbonisation du dérivé organique chromatographié apparaît. On évite ainsi souvent la recherche longue et fastidieuse d'un réactif de révélation.

Il existe cependant des cas où cette méthode de révélation est inefficace. Nous avons pu constater que les dérivés puriques comme la caféine, la théobromine et la théophylline ne sont pas révélables par l'acide sulfurique. Lorsqu'on chauffe la chromatoplaque aspergée d'acide sulfurique, ces corps subliment sans charbonner. Or, à notre connaissance, il n'existe pas de réactif très sensible pour la révélation de ces dérivés puriques. Le réactif de DRAGENDORFF ou l'acide phosphomolybdique ne produisent une coloration nette que lorsque les taches contiennent au moins 20 µg d'alcaloïde²⁾.

Nous avons tenté d'utiliser pour la révélation cette propriété qu'ont les dérivés puriques de sublimer, et nous avons pu constater qu'il était alors possible de révéler des quantités de l'ordre du µg.

Nous procédons comme suit: la chromatoplaque développée est déposée horizontalement sur un réchaud, couche de silice en haut; une plaque de verre de même dimension est posée sur la chromatoplaque, dont elle sera séparée par deux cales de carton d'amiante de 1 mm d'épaisseur et de la largeur des plaques, placées aux extrémités de la plaque. La plaque réceptrice est refroidie par un réfrigérant à eau plat, que nous décrirons plus loin.

Lorsqu'on chauffe la chromatoplaque développée, les substances sublimables se condensent sur la plaque réceptrice froide, et l'on obtient ainsi un contretype du chromatogramme. Pour obtenir de bons résultats, il est nécessaire de contrôler la température de la surface supérieure de la chromatoplaque, au moyen de témoins constitués par des substances de F. connu. Si la température est trop basse, la sublimation est insuffisante (perte de sensibilité). Si l'on chauffe trop, les taches deviennent peu nettes, car il y a diffusion du produit sublimable. Les taches peuvent même disparaître sous l'influence de la chaleur radiée et des courants de convection, malgré un refroidissement énergique de la plaque réceptrice. Le choix de la température la plus favorable résulte donc d'un compromis, et c'est d'ailleurs là, la raison pour laquelle ce procédé ne saurait être quantitatif.

¹⁾ E. STAHL, *Pharmazie* 11, 633 (1956); *Pharmac. Weekbl.* 92, 829 (1957); *Chemiker-Ztg.* 82, 323 (1959).

²⁾ R. MUNIER & M. MECHEBOEUF, *Bull. Soc. Chim. biol.* 31, 1144 (1949); 32, 192 (1950).

Une superposition exacte entre chromatoplaque et plaque réceptrice facilite évidemment le repérage précis des taches et la détermination des Rf.

Cette méthode, qui a donné d'intéressants résultats dans le domaine des dérivés puriques, est applicable à tous les corps sublimables. Des essais préliminaires nous ont montré que l'on obtenait également de bons résultats avec les barbituriques. Par contre les alcaloïdes (sous forme de base libre) comme la morphine, l'atropine et la papavérine, qui sont aussi révélables par cette méthode, nécessitent des quantités de 20–50 μg pour être nettement mis en évidence.

Les avantages du procédé sont évidents: non seulement les Rf peuvent être déterminés sans révélation, mais encore le sublimat reçu sur la plaque réceptrice est déjà séparé du substratum chromatographique; le problème de l'éluion n'existe donc pas. Pour l'identification ultérieure des substances, l'examen microscopique du sublimat donne une première indication. Si le dépôt est amorphe ou trop finement granuleux pour qu'on puisse en apprécier la structure, on peut souvent effectuer sur la plaque même une microcristallisation en déposant une microgoutte de solvant adéquat au centre de la tache. Si le dépôt est suffisamment abondant, on peut le détacher et en déterminer le F. au moyen d'un microscope à platine chauffante. Si le dépôt est peu abondant, on peut tenter d'en évaluer le F. en chauffant graduellement la plaque réceptrice sur laquelle on dépose des témoins de F. connu. Il faut alors recouvrir le sublimat d'un couvre-objet microscopique et observer la fusion avec une forte loupe. Ces tests physiques qui n'altèrent pas la substance peuvent être suivis de n'importe quelle microréaction habituelle.

Pour les dérivés puriques, la sensibilité de la méthode est bonne; puisque 5 μg donnent encore une tache bien visible sans aucun artifice auxiliaire. Avec 1 μg les taches ne sont visibles que dans des conditions spéciales: examen sur fond noir avec un bon éclairage latéral (fig. 1).

Fig. 1. Photographie non retouchée, en lumière rasante, d'une plaque réceptrice montrant, après chromatographie (solvant A, v. partie expérimentale) et microsublimation, la séparation (de haut en bas) de la théophylline, de la caféine et de la théobromine.

Les taches déposées contiennent (de gauche à droite) 10, 5, 2 et 1 μg de chacun des trois alcaloïdes ci-dessus.



Partie expérimentale. — *Appareillage* (fig. 2). Le réchaud est constitué par un bloc d'aluminium (A) de $3 \times 8 \times 25$ cm, chauffé par une petite rampe à gaz (B). Un trou permet l'introduction d'un thermomètre et le contrôle de la température du bloc. Il faut noter qu'entre la température du bloc et celle de la face supérieure de la chromatoplaque (C), peuvent exister des écarts

de température de 30–70°. – La chromatoplaque est recouverte de la plaque réceptrice (D) reposant sur des cales (E) en amiante. – Le réfrigérant (F) placé sur la plaque réceptrice se compose d'un bloc d'aluminium de 1,5 × 5 × 15 cm avec circulation intérieure d'eau en M (v. fig. 2, plan; le plan fait aussi ressortir la manière de laquelle le circuit de l'eau peut être creusé).

Nous avons utilisé des plaques de verre de format standard 5 × 20 cm. La chromatoplaque était recouverte de silicagel G MERCK.

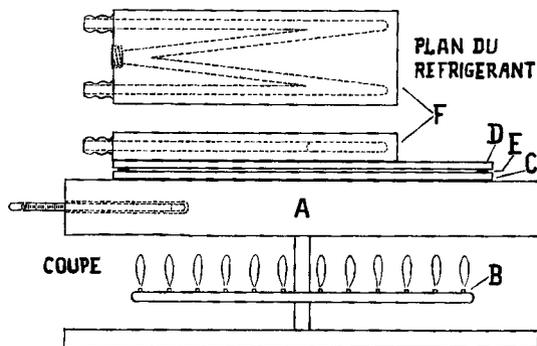


Fig. 2

Mode opératoire. Les taches déposées peuvent contenir de 1 à 300 μg de chacune des trois bases pures consignées dans le tableau ci-dessous. La surface du chromatogramme a été portée graduellement à une température de 250–260° (température du bloc de chauffage: 300–320°).

Rf de bases pures avec divers solvants

solvant:	A	B	C
caféine:	0,36 (\pm 0,01)	0,41 (\pm 0,02)	0,51 (\pm 0,02)
théobromine:	0,25 (\pm 0,01)	0,36 (\pm 0,01)	0,26 (\pm 0,02)
théophylline:	0,41 (\pm 0,02)	0,50 (\pm 0,02)	0,23 (\pm 0,01)

Solvants:

A: acétate d'éthyle, méthanol, HCl 12N, 18:2:0,05 vol.

B: acétate d'éthyle, méthanol, acide acétique 8:1:1 vol.

C: chloroforme, méthanol 19:1 vol.

Les solvants A et B donnent une bonne résolution du mélange des trois bases pures citées, bien que les Rf soient relativement proches. En effet les taches sont très petites et bien nettes dans les conditions opératoires définies plus haut. Le solvant C sépare bien la caféine de la théobromine ou de la théophylline, mais il ne sépare pas bien la théobromine de la théophylline.

L'appareillage utilisé dans ce travail a été construit par Monsieur C. BULLINGER, mécanicien, Ecole de Chimie de Genève.

L'auteur remercie le Professeur E. CHERBULIEZ de l'intérêt qu'il a porté à ce livre.

RÉSUMÉ

Dans le cas de substances sublimables, la microchromatographie d'adsorption sur couche mince de silice associée à la sublimation permet d'obtenir une réplique sur plaque de verre des diverses substances réparties sur le chromatogramme. On peut ainsi déterminer les Rf sans révélation particulière; en outre les substances sublimées se trouvent déposées sur la plaque de verre sous une forme qui se prête à toute opération microchimique ultérieure. – La caféine, la théobromine et la théophylline peuvent être séparées et identifiées en des quantités de 1 à 5 μg .

Laboratoires de chimie organique et
pharmaceutique de l'Université de Genève