

149. Etude de structures peptidiques à l'aide du phénylthiocyanate VI[1]¹⁾. Chromatographie sur couche mince de phénylthiohydantoïnes dérivées d'acides aminés

par **Emile Cherbuliez, Br. Baehler** et **J. Rabinowitz**

(2 V 64)

Pour la séparation et l'identification des phénylthiohydantoïnes dérivées d'acides aminés, la chromatographie sur couches minces de silice²⁾ préparées selon STAHL [2] a rendu de très bons services [1] [2]. Dans ce mémoire, nous rendrons compte d'essais tendant à améliorer encore le procédé, et ceci sous les aspects suivants:

1. — *Mode de préparation des plaques.* Dans la préparation des couches, nous avons remplacé le procédé proposé par STAHL [3] (étalement, à l'aide d'un appareil, d'une suspension épaisse de l'adsorbant mélangé à un liant), par celui de HÖRHAMMER *et al.* [4] qui consiste à verser une suspension de l'adsorbant dans un solvant volatil sur une plaque et à laisser le solvant s'évaporer.

Les plaques de verre servant de support en chromatographie sur couche mince sont rarement rigoureusement planes, si bien que l'étalement mécanique conduit souvent à la confection de couches dont l'épaisseur varie notablement d'un bord à l'autre de la chromatoplaque. Comme la vitesse de migration de l'éluant dépend dans une certaine mesure de l'épaisseur de la couche d'adsorbant, il s'ensuit une distorsion du front, avec tous les inconvénients que cela comporte. La technique de HÖRHAMMER permet d'éliminer, ou tout au moins d'atténuer, ce phénomène gênant.

D'après HÖRHAMMER [4], on disperse l'adsorbant³⁾ dans de l'acétate d'éthyle, on coule la suspension ainsi obtenue sur des plaques de verre que l'on incline légèrement en tous sens pour favoriser l'étalement de la couche, et on laisse finalement sécher les plaques à l'air. On active éventuellement l'adsorbant à l'étuve.

Pour le développement des chromatoplaques à gel de silice WOELM, les solvants que nous avons utilisés pour les plaques à gel de silice MERCK se sont révélés inappropriés, aussi avons-nous mis au point de nouveaux solvants.

Les meilleures séparations de phénylthiohydantoïnes ont été obtenues sur adsorbant désactivé par 15% d'eau, préparé soit par incorporation directe d'eau à l'adsorbant (A), soit par une méthode plus rapide (B) consistant à ajouter de l'eau au liquide qui servira à la dispersion. Dans ce deuxième cas, l'eau étant très peu soluble dans l'acétate d'éthyle et le liquide de dispersion devant être homogène, il faut ajouter à l'acétate d'éthyle une certaine quantité d'acétone (v. Méthode B).

Ce procédé, basé sur l'emploi d'un liquide organique de dispersion, contenant la quantité voulue d'eau, permet d'obtenir très rapidement des chromatoplaques à gel de silice de n'importe quelle activité.

¹⁾ Les chiffres entre crochets renvoient à la bibliographie, p. 1353.

²⁾ Gel de silice G d'après STAHL, pour chromatographie sur couche mince, E. MERCK, Darmstadt, Allemagne.

³⁾ Gel de silice pour chromatographie en couche mince, M. WOELM, Eschwege, Allemagne.

Mode opératoire. – Méthode A. Dans un mortier contenant 15 ml d'eau, on ajoute peu à peu en triturant 85 g d'adsorbant (à conserver en flacon bien bouché). On procède ensuite selon la technique décrite par HÖRHAMMER [4], c'est-à-dire qu'à 10 g d'adsorbant désactivé, pesés dans un erlenmeyer rodé de 50 ml, on ajoute 30 ml d'acétate d'éthyle, agite vigoureusement et coule 5 ml de cette suspension sur une plaque de verre de 5 × 20 cm. On étale la suspension en inclinant la plaque et laisse sécher à l'air pendant 20–30 min; la plaque doit être utilisée immédiatement.

Méthode B. A 8,5 g d'adsorbant d'activité maximum (éventuellement activé pendant 24 h à 180°), on ajoute le mélange de 1,5 ml d'eau, 10 ml d'acétone et 20 ml d'acétate d'éthyle. On agite et procède comme ci-dessus. Les résultats obtenus selon les méthodes A et B sont identiques.

2. – *Préparation des chromatoplaques à alumine.* BHANDARI *et al.* [5] ont utilisé un mélange éthanol-eau comme liquide de dispersion de l'alumine WOELM⁴⁾ et ont obtenu des couches régulières de cet adsorbant. Avec l'alumine FLUKA⁵⁾ ce solvant donne de mauvais résultats. Nous nous sommes servis avec succès de l'isopropanol. On obtient des chromatoplaques régulières, pour autant que les ingrédients utilisés soient bien secs, sinon la couche se fendille et se détache du verre.

Mode opératoire. Dans un flacon rodé à large col, de 100 ml, on pèse 10 g d'alumine FLUKA⁵⁾, séchée 2 h à 150°, ajoute 80 ml d'isopropanol séché sur sulfate de sodium et agite vigoureusement pendant 30 s. On coule la suspension sur des plaques de verre (5,5 ml pour une plaque de 5 × 20 cm) disposées sur une surface bien horizontale. La suspension s'étale uniformément si l'on prend soin de la répartir sommairement sur toute la plaque en la coulant. On laisse sécher à l'air à température ordinaire pendant 1 à 2 h. On peut activer l'adsorbant à l'étuve. On égalise ensuite le bord des plaques en grattant l'adsorbant sur une largeur de 0,5–1 mm.

Cette méthode fournit des chromatoplaques dont la couche d'adsorbant, d'une épaisseur de 0,15–0,17 mm, adhère bien au verre, et qui peuvent être conservées de la manière habituelle dans un dessiccateur à silicagel.

3. – *Révélation des PTH chromatographiés sur couche mince de silice ou d'alumine.* Nous avons modifié la méthode à l'«iode-azide» en augmentant la teneur relative du réactif en iode et en empois d'amidon, de manière à prévenir la diffusion des taches après révélation, et à obtenir une coloration du fond plus stable. La coloration due à l'iodure d'amidon disparaît en effet à la longue, l'iode étant transformé peu à peu en NaI sous l'influence de NaN₃.

Révélation à l'iode-azide. On pulvérise directement sur les chromatoplaques le mélange des solutions 1, 2 et 3 (1:1:6 vol.). – Solution 1: I₂ 1,27 g; KI 8,3 g; eau pour 100 ml. Solution 2: NaN₃ 3,2 g; eau pour 100 ml. Solution 3: empois d'amidon à 1%.

Ce mélange se conserve quelques jours au frais.

4. – *Résultats de la chromatographie des PTH sur couche mince resp. de silice* (v. tableau 1) *et d'alumine* (v. tableau 2 et fig. 1 et 2).

Tableau 1. *R_f (± 5%) de PTH sur couche mince de silice*

PTH dérivé de	Ser	Thr	Tyr	Lys	Gly	Ala	Met	Phe	Val	Ile	Leu	Pro
R _f	0,05	0,09	0,16	0,23	0,34	0,46	0,57	0,60	0,61	0,71	0,72	0,81

Chromatoplaques à silice hydratée (15% H₂O) préparées comme indiqué plus haut.

Solvant de développement: chloroforme Ph. H. V., acétate d'éthyle (95:5 vol./vol.).

Le mélange chloroforme Ph. H. V., acide formique (9:1 vol/vol) permet de séparer le PTH d'Asp (NH₂) (R_f 0,34) et de Glu (R_f 0,50). Le mélange chloroforme Ph. H. V.,

⁴⁾ Alumine pour chromatographie sur couche mince, M. WOELM, Eschwege, Allemagne.

⁵⁾ Alumine pour chromatographie sur couche mince, type DO (sans gypse), FLUKA S.A., Buchs, Suisse.

Tableau 2. *Rf* ($\pm 5\%$) de PTH sur couche mince d'alumine

Dérivé PTH de	Solvants			Dérivé PTH de	Solvants		
	I	II	III		I	II	III
Ala	0,51	0,66		Leu	0,78	0,80	
Arg	0	0	0	Lys	0,28	0,62	
Asp	0	0	0,20	Met	0,58	0,76	
Asp (NH ₂)	0	0	0,32	Phe	0,60	0,74	
Cys-Cys			0,69	Pro	0,91	0,91	
Glu	0	0	0,32	Ser	0	0	0,48
Glu (NH ₂)	0	0	0,36	Thr	0	0	0,51
Gly	0,28	0,45	0,78	Try	0,28	0,52	
His	0	0	0,04	Tyr	0	0,08	0,64
Ileu	0,78	0,80		Val	0,72	0,76	

Chromatoplaques à alumine préparées comme indiqué plus haut, activées 12 h à 80°.

Solvant I: chloroforme Ph. H. V.

Solvant II: chloroforme Ph. H. V, éthanol abs. (98:2 vol./vol.).

Solvant III: chloroforme Ph. H. V, isopropanol, acide formique (35:4:1 vol./vol.).

isopropanol, acide formique (15:3:2 vol./vol.) sépare PTH d'Arg (*Rf* 0,80) et PTH de His (*Rf* 0,75).

La reproductibilité des *Rf* est de $\pm 5\%$; cette variation se fait toujours dans le même sens pour tous les PTH lorsqu'on les chromatographie simultanément sur une même

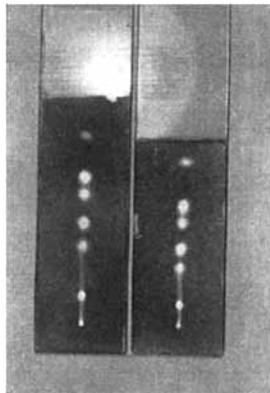


Fig. 1 Chromatographie sur couche mince d'alumine

Séparation (de haut en bas) des dérivés PTH de Pro, Leu, Val, Phe, Ala, Gly (PTH-Tyr restant sur le point de départ). Chaque tache contient 0,005 μ mole de PTH. Solvant I. Distance et temps de migration: à gauche 12,5 cm, env. 1 h 20, à droite 10 cm, env. 50 min. Révélation par le mélange I₂, NaN₃, amidon.

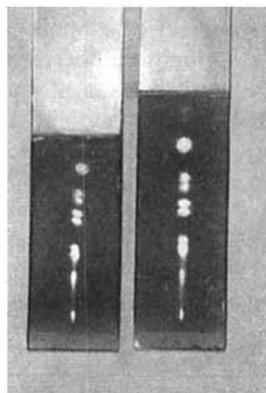


Fig. 2 Chromatographie sur couche mince d'alumine

Séparation (de haut en bas) des dérivés PTH de Gly, Tyr, parasite, Thr, Ser, Glu (NH₂). Glu (+ Asp (NH₂), Asp, His. Chaque tache contient 0,005 μ mole de PTH. Solvant III. Distance et temps de migration, à gauche 10 cm, env. 1 h, à droite 12,5 cm, env. 1 h 40. Révélation par le mélange I₂, NaN₃, amidon.

plaque. Dans le cas de la détermination d'un mélange de PTH inconnus, il est nécessaire de chromatographier simultanément (sur la même plaque) les PTH de référence.

Conclusion. Pour la séparation chromatographique des dérivés PTH d'acides aminés, l'alumine nous a donné en général de meilleurs résultats que la silice. Comme le montrent les figures 1 et 2, sur alumine, les taches formées sont rondes, petites, bien nettes et exemptes de traînées (sauf PTH-Asp dont la tache est allongée).

Cependant, dans certains cas, la chromatographie sur gel de silice micronisé comme celui de WOELM peut présenter des avantages.

Les auteurs remercient sincèrement la COMMISSION POUR LA SCIENCE ATOMIQUE DU FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, de l'aide financière accordée pour ce travail.

SUMMARY

Two substrates, hydrated silica gel and alumina, have been used to separate phenylthiohydantoines derived from amino acids, using thin layer chromatography.

The simplified method of HÖRHAMMER *et al.*, which requires no coating apparatus, has been used to prepare the chromatoplates. A method allowing to obtain rapidly with this procedure the silica gel at the desired hydration degree, is described.

The revelation by the iodine-azide reaction has been improved by direct spraying of a convenient mixture of its three components (solutions of (1) I₂-KI; (2) NaN₃; (3) starch).

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

BIBLIOGRAPHIE

- [1] V. E. CHERBULIEZ, BR. BAEHLER, J. MARSZALEK, A. R. SUSSMANN & J. RABINOWITZ, *Helv.* **46**, 2446 (1963).
 - [2] E. CHERBULIEZ, BR. BAEHLER & J. RABINOWITZ, *Helv.* **43**, 1871 (1960).
 - [3] E. STAHL, *Chemiker Ztg.* **82**, 323 (1958).
 - [4] L. HÖRHAMMER, H. WAGNER & G. BITTNER, *Der Deutsche Apotheker* **14**, 148 (1962).
 - [5] P. R. BHANDARI, B. LERCH & G. WOHLLEBEN, *Pharmaz. Ztg.* **107**, 1618 (1962).
-