

## APPLICATIONS DE LA MICROCHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COUCHES MINCES

E. DEMOLE

*Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (France)*

### CHROMATOSTRIPS

En 1951, KIRCHNER, MILLER ET KELLER<sup>1</sup> ont décrit une technique microchromatographique d'adsorption basée sur l'emploi de lames de verre supportant une mince couche adsorbante minérale ("chromatostrips").

Il s'agissait d'une adaptation de la chromatographie radiale d'ions inorganiques selon MEINHARD ET HALL<sup>2</sup>.

Un chromatostrip se prépare généralement à partir d'une bande de verre de 12 × 1.2 cm, sur une face de laquelle on étend une pâte composée d'un adsorbant, d'eau et d'un agent liant tel que l'amidon. Après dessiccation, la couche adsorbante devient dure et est épaisse de 0.5 mm environ.

Chaque chromatostrip permet l'exécution d'un microchromatogramme ascendant; on dépose quelques  $\mu\text{g}$  de la substance à examiner sur l'adsorbant, à peu de distance d'une extrémité de la lame; on plonge cette extrémité dans le solvant choisi pour le développement, la lame étant disposée verticalement, par exemple dans un tube à essais de dimensions convenables. L'ascension capillaire du solvant, très rapide, porte à environ 30 minutes la durée nécessaire au développement du microchromatogramme.

Il ne reste plus ensuite qu'à noter l'emplacement des constituants du mélange chromatographié, distribués sous forme de spots entre le point de départ du microchromatogramme et le niveau atteint par le front du solvant. Dans le cas—fréquent—où l'on chromatographie des substances incolores, on localise ces spots à l'aide de réactions chimiques colorées (révélation).

Il convient de souligner ici que les séparations obtenues sur chromatostrips résultent d'un processus d'adsorption "vraie". De ce fait, cette méthode diffère sensiblement de la technique de la chromatographie sur papier, basée sur un mécanisme de partage.

### CHROMATOPLAQUES (CHROMATOPLATES)

Toute méthode chromatographique valable doit conduire à des résultats précis et

reproductibles. Or, les séparations sur chromatostrips sont influencées par le degré d'activation de l'adsorbant, ainsi que par son épaisseur. La constance de ces deux facteurs doit donc être assurée, d'une part par l'emploi d'un appareil spécial produisant des couches adsorbantes d'épaisseur connue<sup>3,4</sup>, d'autre part en déshydratant celles-ci dans des conditions standard.

On obtient alors des séparations reproductibles à  $\pm 0.05 R_F$  près<sup>5</sup>, à condition de protéger encore les chromatostrips de l'humidité atmosphérique au cours des manipulations. Celles-ci s'avèrent dans l'ensemble assez délicates.

REITSEMA, en 1954<sup>6</sup>, a remarquablement simplifié la méthode en utilisant des *chromatoplaques* ou larges chromatostrips, sur lesquels on exécute simultanément plusieurs microchromatogrammes. Les différentes séparations obtenues sur une même plaque sont rigoureusement comparables, sous l'unique condition d'une grande régularité dans la répartition de l'adsorbant.

#### *Comparaison des chromatographies sur papier et sur chromatoplaques*

Ces deux procédés, à côté de qualités communes, présentent chacun des possibilités en rapport avec le mécanisme physico-chimique qui les caractérise (partage ou adsorption "vraie").

Par exemple, les chromatographies des substances hydrosolubles, devenues classiques sur le papier (acides aminés, sucres), ne semblent pas praticables sur chromatoplaques. Il en va de même pour le fractionnement de séries homologues, relativement aisé sur le papier, les coefficients de partage variant régulièrement avec l'allongement des chaînes carbonées.

Les substances liposolubles, de polarité généralement modérée, constituent le meilleur champ d'application des chromatoplaques. Parmi les avantages présentés par ces dernières, nous devons signaler en premier lieu leur rapide et facile mise au point; le solvant, choisi selon son pouvoir éluant comme dans le cas des chromatographies sur colonnes, est homogène et certains facteurs tels que la température ambiante et la quantité de substance chromatographiée s'avèrent sans influence, dans des limites raisonnables. Enfin, la durée du développement des chromatoplaques est remarquablement courte (entre 15 et 30 minutes usuellement) et l'adsorbant (que l'on peut varier selon les cas) supporte l'action de réactifs de révélation énergiques.

Il n'est pas exclu que, dans l'avenir, on puisse adapter les chromatoplaques au principe de la chromatographie de partage. Pour l'instant, cette méthode constitue un excellent procédé de contrôle ou d'investigation préliminaire, rapide et souple. La chromatographie sur papier, quelquefois moins maniable mais plus précise du fait du grand trajet couvert par la phase mobile, assure mieux l'identification rigoureuse des substances par leur  $R_F$ .

#### DOMAINES D'APPLICATION DES CHROMATOPLAQUES

Les publications originales de KIRCHNER *et al.*<sup>1,5,7-10</sup> donnent une bonne idée de l'envergure de la méthode, utilisée pour la recherche et l'identification des diverses substances, de nature souvent terpénique, composant les huiles essentielles.

Plus récemment, d'autres auteurs l'ont encore utilisée dans le même but<sup>3,11-15</sup> et ONOE<sup>16</sup> l'a employée pour la séparation de dinitrophénylhydrazones d'aldéhydes aliphatiques.

REITSEMA<sup>6</sup> a en outre effectué l'étude comparative d'une série d'huiles essentielles sur les chromatoplaques qu'il a mis au point, et WAGNER<sup>17</sup> a examiné quelques phénols par le même procédé. D'autres publications mentionnent l'usage des chromatostrips pour la séparation d'azulènes<sup>3,27</sup> et, tout récemment, pour l'étude de peroxydes organiques<sup>28</sup> et de coumarines<sup>29</sup>. Ceci, joint aux exemples inédits de séparations de caroténoïdes, pigments tétrapyrroliques et diterpènes que nous donnons plus loin (Figs. 1-4), prouve que la méthode possède un intérêt très général.

#### *Adsorbants et solvants généralement utilisés*

Dans le domaine des huiles essentielles, l'adsorbant le plus généralement utilisé sur chromatoplaques est l'*acide silicique*. Les couches siliciques possèdent non seulement d'excellentes propriétés mécaniques (dureté, etc...), mais aussi une sélectivité remarquable vis-à-vis des composants oxygénés de ces essences. A notre avis, cette sélectivité peut s'expliquer par un processus d'adsorption comportant l'établissement de liaisons hydrogène entre l'acide silicique et les corps adsorbés<sup>18,19</sup>; les molécules contenant des atomes à doublets électroniques libres (O, N) sont particulièrement touchées par ce mécanisme et plus ou moins retenues selon la polarité et l'empêchement stérique de ces centres actifs.

En général, l'acide silicique ménage très bien les substances délicates. Nous avons chromatographié, sur cet adsorbant employé aussi bien en colonnes que sur chromatoplaques, des alcools allyliques diterpéniques acycliques<sup>20</sup>; les séparations étaient bonnes et aucun signe de déshydratation ou d'isomérisation n'a été relevé.

Dans des cas spéciaux, on peut cependant avoir intérêt à n'utiliser l'acide silicique qu'après désactivation partielle<sup>21</sup>.

KIRCHNER *et al.*<sup>1</sup> ont décrit plusieurs mélanges de solvants de développement. Comme en toute chromatographie d'adsorption, on doit accorder le pouvoir éluant du solvant à l'affinité de la substance pour l'adsorbant, déterminée par essais préliminaires.

Dans le domaine des huiles essentielles, les mélanges d'acétate d'éthyle avec l'hexane ou le benzène sont souvent utilisés avec de bons résultats (proportion comprise généralement entre 10 et 20% d'acétate d'éthyle).

#### *Méthodes de révélation*

KIRCHNER *et al.* (*loc. cit.*) ont imaginé différentes méthodes de révélation qualitatives en rapport avec la nature des corps adsorbés. Ainsi, ils détectent les substances insaturées par "effet de masque" sur un adsorbant fluorescent, selon le principe de la technique de SEASE<sup>22</sup>: les spots apparaissent en sombre sur fond brillant par éclairage ultra-violet de courte longueur d'onde.

REITSEMA<sup>6</sup> a également utilisé les possibilités de l'éclairage ultra-violet.

Les substances colorées ou fluorescentes ne posent évidemment aucun problème quant à leur détection.

Une méthode de révélation chimique des substances insaturées, par l'action combinée de la fluorescéine et des vapeurs de brome, a aussi été décrite par KIRCHNER *et al.*<sup>1</sup>. Ces mêmes auteurs utilisent en outre l'*o*-dianisidine en solution acétique pour localiser les aldéhydes, et le vert de bromocrésol, préconisé par RAMSEY ET PATTERSON<sup>23</sup>, pour les acides. Ils révèlent encore les substances organiques particulièrement inertes par l'acide sulfurique concentré à froid, ou même par l'action d'un mélange sulfo-nitrique à chaud; les couches adsorbantes contiennent, dans ces derniers cas, du plâtre comme agent liant, au lieu de l'amidon ordinairement utilisé<sup>1</sup>.

D'autres réactions chimiques de révélation peuvent être imaginées, selon la nature fonctionnelle des substances chromatographiées. Citons la détection des cétones et aldéhydes par l'action de 2,4-dinitrophénylhydrazine en solution chlorhydrique selon REITSEMA<sup>6</sup>, et celle des phénols par couplage avec l'acide sulfanilique diazoté, selon WAGNER<sup>17</sup>.

Nous décrivons nous-même quelques réactions inédites. Ainsi, le permanganate de potassium très dilué, ou les vapeurs d'iode à chaud, révèlent bien les *substances insaturées* ou facilement déshydratables. Les *phénols* peuvent être détectés par la *p*-nitroaniline diazotée préparée selon RAYBURN *et al.*<sup>24</sup>, ou par le chlorure ferrique en solution hydro-alcoolique. La *p*-nitroaniline diazotée révèle d'ailleurs toute substance copulable comme, par exemple, *l'indole* (réaction rouge). La ninhydrine peut être utilisée, comme en chromatographie sur papier, pour localiser les *amines primaires*<sup>25</sup>.

Nous décrivons plus loin (partie expérimentale) une technique de détection des *esters volatils* par une adaptation de la réaction hydroxamique décrite par FEIGL<sup>26</sup>.

Toutes ces réactions permettent l'utilisation des chromatoplaques comme méthode d'analyse qualitative ou semiquantitative. KIRCHNER *et al.*<sup>9</sup> ont aussi montré une possibilité d'adapter leur technique au stade quantitatif.

#### *Réactions microchimiques sur chromatostrips ou chromatoplaques*

La reproductibilité des  $R_F$  sur chromatostrips est de l'ordre de  $\pm 0.05^5$ . Cette excellente précision ne permet pourtant pas l'identification formelle des composants des huiles essentielles, d'après leurs seuls  $R_F$ , même déterminés dans plusieurs solvants. C'est pourquoi MILLER ET KIRCHNER<sup>5</sup> dégradent ou dérivent certaines substances avant microchromatographie et obtiennent de nouveaux produits permettant une caractérisation plus sûre du corps initial. Certaines de ces réactions sont effectuées directement sur l'adsorbant, en recouvrant la substance d'une goutte de réactif avant le développement. Des oxydations ( $\text{CrO}_3$ ), déshydratations ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), réductions ( $\text{LiAlH}_4$ ), dérivations en semicarbazones et phénylhydrazones ont été effectuées ainsi localement sur chromatostrips.

D'autres transformations ont été de préférence exécutées en micro-tubes (hydrolyse alcaline à chaud, formation d'uréthanes); en ce cas, une goutte du produit réactionnel brut est chromatographiée.

Ces réactions microchimiques permettent la caractérisation d'une série de substances naturelles par les chromatoplaques. Le citral, par exemple, peut être

oxydé en acide géranique (par  $H_2O_2$ ) et celui-ci réduit en géraniol, séquence assurant l'identification certaine.

*Utilisation des chromatoplaques pour la mise au point de chromatographies à l'échelle préparative*

Des substances appartenant à tous les groupements fonctionnels principaux ont été chromatographiées sur chromatoplaques; tout produit de polarité modérée et de solubilité convenable peut en principe être examiné par cette méthode, même s'il est relativement volatil, comme l'aldéhyde butyrique par exemple<sup>6</sup>.

En outre, les microchromatogrammes réussis sur chromatoplaques peuvent être reproduits sur une colonne de même adsorbant, à l'échelle préparative. On possède ainsi un moyen de mettre rapidement au point les grands chromatogrammes liquides, tout en dépensant peu de substance<sup>1,7</sup>. Toutefois, sous toutes conditions égales, les colonnes sont un peu moins sélectives que les chromatoplaques; ceci s'explique par la diffusion des bandes sur les colonnes. De plus, certains mélanges de solvants subissent une chromatographie frontale sur chromatoplaques. Ce phénomène, qui peut influencer favorablement certaines séparations délicates, n'est pas reproduit sur les colonnes préparées par sédimentation de l'adsorbant dans un excès de solvant.

La marche d'un chromatogramme liquide peut être suivie avec précision par

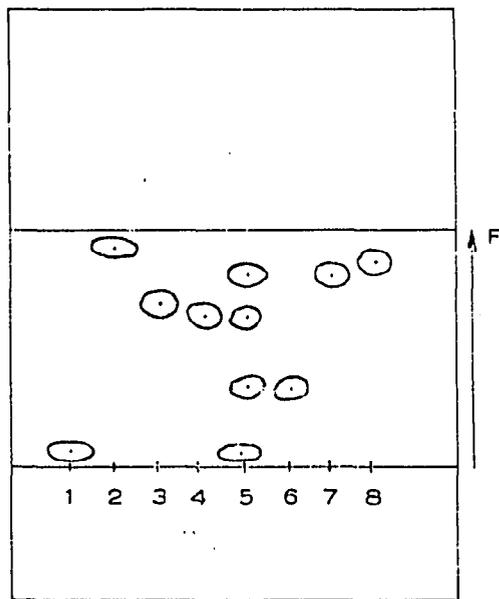
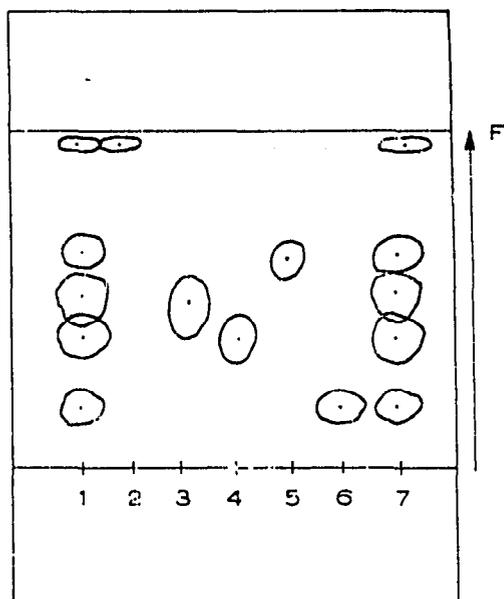


Fig. 1. Séparation de caroténoïdes sur chromatoplaques. 5 à 10  $\gamma$  déposés en solution acétonique. 2 =  $\beta$ -Carotène  $R_F$  0.96, 3 = Bixine  $R_F$  0.51; 4 = Canthaxanthine  $R_F$  0.38; 5 = Isozéaxanthine  $R_F$  0.63; 6 = Zéaxanthine  $R_F$  0.17; 1, 7 = Mélange. Adsorbant: acide silicique, couche de 0.3 mm. Solvant: *n*-hexane-éther 3:7 (v/v). Trajet du front du solvant: 76 mm. Durée du développement: 15 minutes.

Fig. 2. Séparation de pigments tétrapyrroliques sur chromatoplaques. Porphytines (esters méthyliques) et bilirubine déposés en solution benzénique; biliverdine en solution alcoolique. 1 = Biliverdine, 3  $\gamma$   $R_F$  0.06; 2 = Bilirubine, 7  $\gamma$   $R_F$  0.92; 3 = Coproporphyrine I ester, 7  $\gamma$   $R_F$  0.68; 4 = Coproporphyrine III ester, 15  $\gamma$   $R_F$  0.63; 6 = Uroporphyrine I ester, 9  $\gamma$   $R_F$  0.33; 7 = Deutéroporphyrine ester, 3  $\gamma$   $R_F$  0.80; 8 = Protoporphyrine ester, 5  $\gamma$

0.85  $R_F$ ; 5 = Mélange de 1, 4, 6, 7. Adsorbant: acide silicique, couche de 0.3 mm. Solvant: benzène 90, acétate d'éthyle 20, alcool éthylique 7.5 (v/v). Trajet du front du solvant: 54 mm. Durée du développement: 15 minutes.

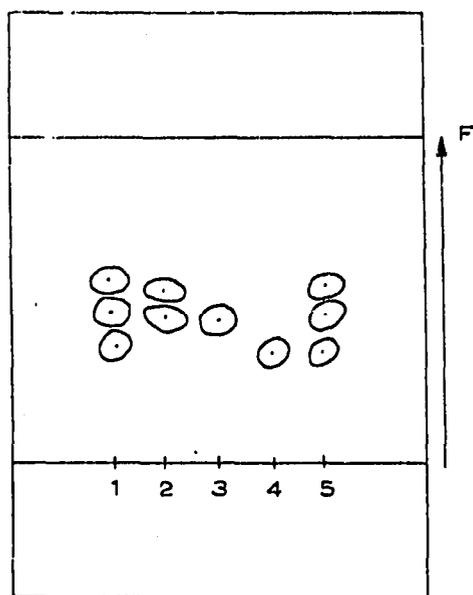


Fig. 3. Séparation de diterpénoïdes de la classe du phytol sur chromatoplaques. 10  $\gamma$ , déposés en solution dans le *n*-hexane. 1 et 5 = Mélange isophytol + diterpène inconnu + phytol. 2 = Mélange isophytol + diterpène inconnu. 3 = Diterpène inconnu. 4 = Phytol. Phytol,  $R_F$  0.34-0.35. Diterpène inconnu  $R_F$  0.44-0.46. Isophytol  $R_F$  0.53-0.55. Adsorbant: acide silicique, couche de 0.3 mm. Solvant: acétate d'éthyle-*n*-hexane 1:4 (v/v). Trajet du front du solvant: 74 mm. Durée du développement: 15 minutes. Révélation: par l'action de  $KMnO_4$  à 0.25 % dans  $H_2O$ .

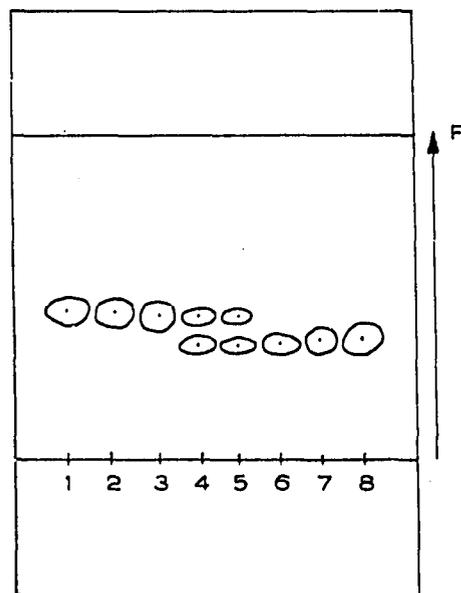


Fig. 4. Contrôle d'un chromatogramme liquide sur chromatoplaque. Quelques  $\gamma$  de chacune des 8 fractions résultant d'une chromatographie préparative sur colonne ont été chromatographiés sur cette plaque. Le processus du fractionnement apparaît ainsi clairement; les fractions 4 et 5 sont encore des mélanges. Mélange étudié: phytol + diterpène inconnu. Cette chromatoplaque a été effectuée à peu près aux mêmes conditions que la précédente.

le contrôle de chaque éluat sur chromatoplaque. On distingue ainsi rapidement les fractions homogènes des mélanges intermédiaires<sup>7</sup>. Nous donnons plus loin un exemple d'un tel contrôle.

#### *Utilisation des chromatoplaques à l'échelle micropréparative*

Nous avons pu chromatographier jusqu'à 1 mg de substance sur des chromatostrips spécialement épais (1 mm d'adsorbant). Après le développement, nous avons découpé l'adsorbant à l'emplacement des divers spots (localisés par comparaison avec un chromatostrip témoin révélé chimiquement) et l'avons extrait avec un solvant approprié. Les micro-éluates obtenus contenaient suffisamment de matière pour étude spectrographique ou microchimique ultérieure.

Il va sans dire que des chromatoplaques épaisses permettraient de réaliser tout aussi bien la même opération.

#### *Conclusions*

Dans les Figs. 1-4, nous illustrons les possibilités d'emploi des chromatoplaques par plusieurs séparations inédites obtenues dans les domaines des caroténoïdes, pigments tétrapyrroliques et diterpènes.

La partie expérimentale contient ensuite la description détaillée de la préparation des chromatoplaques, de leur usage, ainsi que de certains procédés de révélation inédits intéressant les substances insaturées, les phénols et les esters.

Nous croyons que l'usage des chromatoplaques est appelé à se répandre encore, car il est rare de rencontrer une méthode analytique donnant autant de résultats pour si peu de moyens mis en œuvre.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### *Préparation des chromatoplaques*

Nous utilisons des plaques de verre de  $17 \times 11 \times 0.2$  cm et un acide silicique 100 mesh (analytical reagent, Mallinckrodt Co.). Les plaques sont recouvertes selon le procédé de REITSEMA<sup>6</sup>, légèrement modifié en ce qui concerne le chauffage du mélange silicique :

On ajoute 54 ml d'eau à un mélange de 28.5 g d'acide silicique avec 1.5 g d'amidon de riz\*. Bien malaxer le tout, chauffer au voisinage de l'ébullition (sur un bec de gaz et non au bain-marie) jusqu'à obtenir l'épaississement maximum de la masse (2-3 minutes) ; ce détail est important car son observation permet d'éviter le craquellement des couches à la dessiccation. Ensuite on dilue avec 20-30 ml d'eau, chauffe à nouveau rapidement au voisinage de l'ébullition et laisse refroidir. Le mélange est prêt pour le recouvrement des plaques.

On verse 10 ml de suspension silicique amidonnée au centre de chaque plaque ; le liquide est immédiatement réparti sur toute la surface du verre au moyen d'une spatule. Quelques rapides secousses transversales achèveront la répartition régulière du film liquide. Après séchage partiel sur un plan bien horizontal, à température ambiante, les plaques peuvent être introduites dans une étuve réglée à 100-105° C. Dans ces conditions, on obtient des surfaces actives de 0.5 mm d'épaisseur environ, sans craquelures et suffisamment dures pour supporter des inscriptions au crayon.

Seule la zone centrale de ces chromatoplaques donne des microchromatogrammes rigoureusement comparatifs, car la couche silicique s'amincit progressivement vers les bords. Ce défaut, dû à l'étalement "en ménisque" du liquide amidonné, n'entrave pas l'exécution des travaux les plus courants sur chromatoplaques. On constate seulement une légère augmentation des  $R_F$  sur les zones marginales des plaques (effet de bord).

Cependant, une répartition plus uniforme de la couche adsorbante peut être obtenue par l'emploi d'un appareil spécial. Nous utilisons dans ce but un instrument commercial destiné normalement à la production de minces couches de peintures. Cet instrument se compose d'un couteau métallique glissant à distance réglable au-dessus d'une surface plane ; l'ensemble est disposé horizontalement. On verse un excès de mélange amidonné sur une plaque placée sur cet appareil dont on a, au préalable, réglé convenablement l'écart du couteau. En faisant glisser celui-ci par

\* La nature de l'amidon est importante.

dessus la plaque, on chasse l'excès de liquide et ne laisse qu'un film de l'épaisseur désirée.

Nous obtenons par cette méthode des chromatoplaques de 0.3 mm d'épaisseur où l'effet de bord est absent, sauf dans les parties marginales extrêmes (que nous éliminons d'ailleurs par grattage de 10 à 15 mm d'adsorbant de chaque côté des plaques).

#### *Marquage des chromatoplaques*

Le marquage s'effectue au crayon mou sur l'adsorbant bien sec. On trace les points de départ des microchromatogrammes, espacés de 8 à 10 mm, sur une droite située à 30 mm de la base des plaques.

On peut effectuer jusqu'à 10 microchromatogrammes par chromatoplaque possédant les dimensions indiquées plus haut.

Après marquage, on remet les chromatoplaques à l'étuve pour leur activation définitive, durant 30 minutes à 100–105° C. On les introduit encore chaudes dans un dessiccateur à potasse ou chlorure de calcium et les utilise dès refroidissement; on peut aussi les conserver indéfiniment à l'abri de l'humidité.

#### *Dépôt des substances à chromatographier*

Le dessiccateur contenant les chromatoplaques doit posséder une petite ouverture supérieure permettant le passage des micropipettes portant les solutions des substances à étudier. On opère ainsi pratiquement à l'abri de l'humidité atmosphérique.

On dépose, sur chaque repère des chromatoplaques, 5 à 10 mm<sup>3</sup> de solution représentant une quantité appropriée de substance (en général 5 à 10  $\gamma$ ); celle-ci doit être dissoute dans un solvant volatil peu polaire (pentane, éther, etc...).

#### *Développement des chromatoplaques*

On dispose les chromatoplaques dans un petit bac (21 × 12 × 4 cm) fermé par une plaque de verre rodée et contenant 100 ml de solvant. Les plaques, maintenues à peu près verticalement, plongent de 2 cm dans le liquide.

En 15 à 30 minutes le développement est terminé, le front du solvant s'étant élevé de 8 à 10 cm. On n'a généralement pas intérêt à prolonger l'opération car les spots commenceraient à diffuser. D'ailleurs, la vitesse de migration du solvant, très rapide au début, n'est plus que faible après un déplacement de 8 cm environ.

On retire les plaques, note l'emplacement du front du solvant, et laisse sécher à température douce (50° C).

#### *Solvants de développement*

Les mélanges d'acétate d'éthyle et d'hexane, fréquemment utilisés par les auteurs originaux, constituent de bons solvants de développement à usage général. Une proportion de 15 à 20% d'acétate d'éthyle convient à la séparation des substances oxygénées peu polaires, jusqu'aux monophénols.

D'autres mélanges de solvants peuvent être établis. Ceux dont les constituants

ont des polarités différentes donnent souvent les meilleurs résultats: ce type de solvant subit vraisemblablement une chromatographie frontale retardant la progression du constituant le plus polaire; deux fronts d'élution naissent ainsi, séparés par un gradient de concentration pouvant améliorer certaines séparations.

#### *Techniques de révélation particulières*

(a) *Révélation avec  $KMnO_4$* : On verse, à température ambiante, un excès d'une solution de permanganate de potasse à 0.25–0.50% dans l'eau, sur l'ensemble de la surface des chromatoplaques. Celles-ci doivent être, au préalable, bien débarrassées de leur solvant de développement.

Les spots foncés correspondant aux substances oxydables apparaissent presque immédiatement. Après environ 10 secondes, on immerge les plaques dans l'eau courante pour chasser l'excès de permanganate (les couches siliciques, convenablement préparées, supportent sans se dissocier un contact prolongé avec l'eau). Après lavage, on retire les chromatoplaques et les laisse sécher.

On obtient des spots brunâtres bien nets sur fond blanc.

(b) *Révélation avec les vapeurs d'iode*: Cette méthode, moins commode que la précédente, peut être utile pour la recherche des substances susceptibles de se déshydrater à chaud.

Les chromatoplaques sont préchauffées à 100–150° C, puis plongées brusquement dans une atmosphère de vapeurs d'iode. Après quelques secondes, on les retire et les chauffe à nouveau pour chasser l'iode en excès.

On obtient des spots bruns sur fond presque blanc. L'amidon contenu dans l'adsorbant n'interfère pas.

(c) *Usage de  $p$ -nitroaniline diazotée pour l'étude et la détection des phénols*: On pulvérise, sur les chromatoplaques bien sèches, le mélange suivant que l'on prépare au moment de l'emploi:

1 volume de solution aqueuse à 0.7 g de  $p$ -nitroaniline et 9 ml de HCl concentré pour 100 ml.

1 volume de  $NaNO_2$  à 1%.

2 volumes de  $NaHCO_3$  à 5%.

On laisse ensuite sécher les plaques à 40–50° C. Les phénols apparaissent à l'état de taches brunâtres.

RAYBURN *et al.*<sup>24</sup> ont effectué l'analyse de mélanges de phénols par chromatographie sur papier des colorants résultant de leur couplage avec la  $p$ -nitroaniline diazotée. Nous avons transposé cette méthode sur chromatoplaque ainsi:

On dépose 10  $\gamma$  de chaque phénol ou mélange à examiner (solutions méthanoliques) sur les points de départ d'une chromatoplaque. On pulvérise, sur les mêmes emplacements, le réactif mentionné plus haut, le reste de la surface adsorbante étant protégé par un cache. Après 10 à 15 minutes de séchage à 40–50° C, on laisse la plaque refroidir dans un dessiccateur, puis développe avec le mélange  $n$ -hexane/éther 2:1. On pulvérise enfin, sur la plaque développée sèche, une solution de  $Na_2CO_3$  à 10%, ce qui provoque l'apparition de teintes caractéristiques permettant, conjoint-

tement avec les  $R_F$ , l'identification des phénols ou types de phénols mis en jeu.

(d) *Révélation avec le chlorure ferrique*: L'action d'une solution à 5% de  $FeCl_3$  dissous dans méthanol-eau 1:1 permet aussi la détection de certains phénols ou énols. On opère éventuellement à 30-40° C.

(e) *Révélation des esters*: La recherche directe d'esters volatils sur chromatoplaques peut se faire par une adaptation de la réaction hydroxamique décrite par FEIGL<sup>20</sup>. Cette réaction, trop peu sensible lorsqu'on l'effectue sur l'acide silicique, doit être reportée sur papier de la façon suivante:

La couche active de la chromatoplaque à révéler, sèche de tout solvant organique, est humidifiée par une légère pulvérisation d'eau puis recouverte d'une feuille de papier Whatman No. 1 de mêmes dimensions, préalablement imprégnée d'hydroxylamine (voir ci-dessous). On dépose sur le tout une plaque de verre maintenant le papier bien appliqué sur l'acide silicique et place cet assemblage sur une surface légèrement chaude (30-45° C). Les esters s'évaporent avec l'humidité de l'acide silicique et viennent se fixer dans le papier imprégné d'hydroxylamine, où ils passent à l'état d'acides hydroxamiques.

Après un délai variable (10-15 minutes à 30° C pour les esters benzyliques simples) on retire la feuille sur laquelle on pulvérise une solution de 5% de  $FeCl_3$  dans  $HCl$  0.5 *N*. On observe l'apparition de spots violacés caractéristiques correspondant à l'emplacement d'esters sur la chromatoplaque originale.

Cette méthode permet de détecter facilement 6  $\gamma$  d'acétate de benzyle par exemple. Les esters trop peu volatils ne sont par contre pas décelés. Le solvant utilisé pour le développement des chromatoplaques examinées par ce procédé doit naturellement être exempt d'esters.

Préparation du papier imprégné d'hydroxylamine: On mélange, au moment de l'emploi, volumes égaux d'une solution à 7 g de  $NH_2OH \cdot HCl$  dans 100 ml d'eau et d'une solution à 12 g de  $KOH$  pour 100 ml de  $CH_3OH$ . On pulvérise ce mélange sur le papier à imprégner, que l'on utilise immédiatement, encore humide.

#### REMERCIEMENTS

Nous sommes vivement reconnaissant à Monsieur E. LEDERER de l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Nous remercions également les Etablissements Firmenich, Genève, pour leur aide financière et la fourniture de certaines des substances que nous avons étudiées sur chromatoplaques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. G. KIRCHNER, J. M. MILLER ET G. J. KELLER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 420.
- <sup>2</sup> J. E. MEINHARD ET N. F. HALL, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 185.
- <sup>3</sup> E. STAHL, G. SCHRÖTER, G. KRAFT ET R. RENZ, *Die Pharmazie*, 11 (1956) 633.
- <sup>4</sup> J. M. MILLER ET J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 2002.
- <sup>5</sup> J. M. MILLER ET J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1107.
- <sup>6</sup> R. H. REITSEMA, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 960; *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Edil.*, 43 (1954) 414.
- <sup>7</sup> J. M. MILLER ET J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1480.

- <sup>8</sup> J. G. KIRCHNER ET J. M. MILLER, *Ind. Eng. Chem.*, 44 (1952) 318.  
<sup>9</sup> J. G. KIRCHNER, J. M. MILLER ET R. G. RICE, *Agric. and Food Chem.*, 2 (1954) 1031.  
<sup>10</sup> J. M. MILLER ET J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 428.  
<sup>11</sup> J. LABAT ET A. L. MONTES, *Anales asoc. quim. argentina*, 41 (1953) 166; *C. A.*, 48 (1954) 3637f.  
<sup>12</sup> M. ITO, S. WAKAMATSU ET H. KAWAHARA, *J. Chem. Soc. Japan*, 75 (1954) 413; *C. A.*, 48 (1954) 13172d.  
<sup>13</sup> S. GRÜNER ET W. SPAICH, *Arch. Pharm. Ber. deut. pharm. Ges.*, 287 (1954) 243.  
<sup>14</sup> I. ONISHI, H. TOMITA ET T. FUKUZUMI, *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 20 (1956) 61.  
<sup>15</sup> R. G. W. SPICKETT, *Chem. and Ind.*, (1957) 561.  
<sup>16</sup> K. ONOE, *Chem. Zentralbl.*, 127 (1956) 3958.  
<sup>17</sup> G. WAGNER, *Die Pharmazie*, 10 (1955) 302.  
<sup>18</sup> R. S. MC. DONALD, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 850.  
<sup>19</sup> V. N. FILIMONOV, *Optika i Spektroskopiya*, 1 (1956) 490; *C. A.*, 51 (1957) 6271c.  
<sup>20</sup> E. DEMOLE, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1883.  
<sup>21</sup> J. H. LINFORD, *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, 34 (1956) 1153.  
<sup>22</sup> J. W. SEASE, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 3630.  
<sup>23</sup> L. L. RAMSEY ET W. L. PATTERSON, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 31 (1948) 139.  
<sup>24</sup> C. H. RAYBURN, W. R. HARLAN ET H. R. HANMER, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1419.  
<sup>25</sup> J. M. BREMNER ET R. H. KENTEN, *Biochem. J.*, 49 (1951) 651.  
<sup>26</sup> F. FEIGL, *Spot Tests in Organic Analysis*, 5th Ed., Elsevier, Amsterdam, 1956, p. 237.  
<sup>27</sup> S. FUKUSHI ET Y. OBATA, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 27 (1953) 353; *C. A.*, 50 (1956) 15027-f.  
<sup>28</sup> K. MARUYAMA, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.*, 77 (1956) 1496; *Analyt. Abstr.*, 4 (1957) 3002.  
<sup>29</sup> W. L. STANLEY ET S. H. VANNIER, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 3488.

Reçu le 11 septembre 1957