

SÉPARATION DES ACIDES ALIPHATIQUES VOLATILS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

ROGER OSTEUX, JEAN GUILLAUME* ET JEAN LATURAZE

*Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie (Prof. P. Boulanger)
et Institut Pasteur (Prof. Ch. Gernez-Rieux), Lille (France)*

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

Les acides aliphatiques volatils de C_1 à C_6 , exception faite de l'acide formique, ont des propriétés chimiques très voisines et l'on conçoit que leur séparation, leur identification, et leur dosage soient difficilement réalisables d'une façon parfaite. Aussi, de nombreuses méthodes ont-elles été proposées, que l'on peut classer et résumer de la façon suivante.

(a) Méthodes par extraction ou distillation

Les constantes physiques des acides aliphatiques volatils varient légèrement lorsque l'on passe d'un terme à l'autre de la série: de C_1 à C_6 , la température d'ébullition augmente, la vitesse d'entraînement par la vapeur d'eau croît, le coefficient de répartition entre l'eau et les solvants organiques décroît; il est donc normal que les méthodes de séparation soient des méthodes physiques. La technique de DUCLAUX¹ et ses nombreuses modifications sont fondées sur ces deux principes: tout d'abord les acides volatils distillent à une vitesse variable selon leur nombre d'atomes de carbone; ensuite, dans un mélange de deux acides, chacun est entraîné par la vapeur d'eau selon ses caractéristiques propres, sans que l'autre intervienne. La détermination se ramène donc à l'établissement de la courbe de l'acidité titrable du distillat en fonction de son volume, et à sa comparaison aux courbes témoins.

Dans la méthode de séparation des acides volatils introduite par BEHRENS², puis complétée par WERKMAN³, on fait appel au coefficient de répartition entre un solvant organique et l'eau, ce coefficient ne dépendant pas de la présence d'un autre acide.

Ces méthodes présentent deux inconvénients majeurs:

1. elles permettent de déterminer les composants d'un mélange binaire, mais ne donnent pas le moyen de savoir si l'on se trouve uniquement en présence d'un mélange de deux acides;
2. elles ne réalisent pas la séparation effective des acides et la composition du mélange est obtenue par calcul et non par dosage direct.

SCHICKTANZ *et al.*⁴ ont introduit en 1940 un procédé fondé sur la distillation des azéotropes formés par les acides et les hydrocarbures acycliques; ils ont obtenu de bonnes séparations, non quantitatives cependant. La complexité du procédé le rend inutilisable pour des analyses en série.

(a) Chromatographie de partage sur colonne

En 1942, LESTER SMITH⁵ a montré que, par chromatographie sur colonne de gel de silice, on pouvait séparer les composants d'un mélange d'acides formique, acétique, propionique, butyrique, valériannique. ELSDEN⁶ a repris ce travail et précisé les conditions expérimentales: la colonne de gel de silice est imbibée d'une solution de vert de bromocrésol; la phase mobile est composée de chloroforme et de butanol et la migration des acides est suivie grâce à la coloration jaune du vert de bromocrésol. L'acide formique, fortement retenu, ne peut être élué. Les autres acides passent dans l'ordre inverse de leur poids moléculaire et sont titrés dans le liquide d'éluion. L'acide acétique, élué le dernier, passe en même temps que l'indicateur; il ne peut donc être dosé que par différence, l'acide formique ayant été éliminé par la méthode de FRIEDEMANN⁷ (distillation en présence d'oxyde mercurique). Cette méthode a été mise en œuvre dans des conditions expérimentales très voisines par RAMSEY ET PATTERSON⁸, NIJKAMP⁹, KRETOVITCH *et al.*¹⁰, NEISH¹¹ a

* Chargé de Recherches du Centre National de la Recherche Scientifique.

préconisé comme phase mobile le mélange benzène et butanol, NIJKAMP¹² le mélange tétrachlorure de carbone et butanol, qui permet de doser l'acide acétique.

SYNGE¹³ a étudié le manque de régularité du front et les variations de la vitesse de migration, qu'il attribue à l'ionisation en phase aqueuse, tandis qu'en phase organique mobile, il n'existe que des molécules non dissociées. MOYLE, BALDWIN ET SCARISBRICK¹⁴ ont mis en pratique cette théorie et ont utilisé un gel de silice tamponné, sans indicateur interne; ils ont obtenu ainsi une bonne séparation des acides de la série normale. PETERSON ET JOHNSON¹⁵ sont parvenus à des résultats analogues avec une colonne de Celite saturée d'acide sulfurique, la phase mobile étant le benzène.

Parallèlement, différents auteurs se sont attachés à la détermination des acides de la série ramifiée, dite "iso". RAMSEY¹⁶ a séparé partiellement l'acide butyrique de l'acide isobutyrique par double chromatographie sur colonnes de gel de silice. BUEDING ET YALE¹⁷ ont séparé les isomères de l'acide valérianique sur colonne de Celite tamponnée par du phosphate à pH 6.5. Les acides du rumen ont de même été déterminés par GRAY *et al.*¹⁸ grâce à des chromatographies successives.

Enfin, JAMES ET MARTIN¹⁹ ont décrit leur méthode de séparation chromatographique gaz-liquide et l'ont appliquée au fractionnement des acides volatils. D'après les courbes présentées par ces auteurs, cette technique semble excellente; ANNISON²⁰ l'a mise en œuvre pour l'étude de certains liquides biologiques: sang, salive, suc gastrique et liquide céphalo-rachidien. (Voir aussi les modifications techniques proposées par VAN DE KAMER, GERRITSMA ET WANSINK²¹).

Les méthodes de séparation sur colonne donnent dans l'ensemble des résultats satisfaisants, notamment du point de vue quantitatif. Cependant, en dehors des difficultés générales de séparation de l'acide formique, il faut remarquer que les opérations sont longues et délicates et par suite se prêtent mal à des déterminations en série.

(c) *Chromatographie sur papier*

Plusieurs auteurs ont déjà tenté, avec plus ou moins de succès, de vaincre les difficultés inhérentes à la chromatographie sur papier des termes inférieurs de la série des acides aliphatiques.

En 1949, FINK ET FINK²² ont proposé de transformer au préalable les acides volatils en *hydroxamates*, en faisant réagir les esters avec l'hydroxylamine. La chromatographie des hydroxamates est réalisée en utilisant comme phase mobile de l'acide isobutyrique ou du phénol saturés d'eau. Les auteurs obtiennent une bonne séparation des acides de C₁ à C₆, mais la grande mobilité des hydroxamates dans ces solvants fait qu'ils se tassent dans la partie inférieure de la feuille. La révélation est effectuée par pulvérisation d'une solution de chlorure ferrique: il se forme un complexe rouge pourpre avec les hydroxamates.

INOUE ET NODA²³ ont décrit une technique analogue. THOMPSON²⁴ a essayé de nombreux solvants, parmi lesquels les mélanges alcool amylique/acide acétique/eau (4:1:5) et alcool octylique/acide formique/eau (75:25:25) donnent un échelonnement correct des taches. Signalons que STADTMAN ET BARKER²⁵ ont utilisé la même transformation préalable en hydroxamates pour la séparation des acyl-phosphates; la chromatographie est faite avec le solvant butanol saturé d'eau.

SATAKE ET SEKI²⁶ ont séparé les acides volatils sous forme de leurs *hydrazides*, obtenus par chauffage des acides en présence d'hydrate d'hydrazine à 110⁰-130⁰ C. Le solvant utilisé se compose d'alcool isoamylique, de collidine et d'eau (10:2:1). La révélation est réalisée par le nitrate d'argent ammoniacal.

Constatant les inconvénients de la préparation des hydroxamates ou des hydrazides, la plupart des auteurs ont essayé de séparer les acides sous forme de sels, la chromatographie des acides libres étant gênée par leur grande volatilité.

BROWN ET HALL²⁷ ont décrit une technique de chromatographie des sels de sodium des acides volatils. Les solvants sont le butanol saturé d'ammoniaque 1.5 *N*, ou le mélange butanol/éthanol/ammoniaque 3 *N* (4:1:5). Les R_F sont donnés dans le Tableau I. Après séchage, on pulvérise une solution de bleu de bromothymol ajustée à pH 7.5 par de la soude. Les taches jaunes sur fond bleu sont très fugaces. HISCOX ET BERRIDGE²⁸ ont abandonné les sels de sodium pour les sels d'ammonium ou d'éthanolamine. Le solvant se compose de butanol saturé de la base utilisée. Les acides de C₂ à C₆ sont bien séparés (Tableau I). La révélation est faite à l'aide d'une solution de vert de bromocrésol amenée à pH 5.5 par de l'acide citrique. La base est retenue au niveau des acides et ceux-ci apparaissent en bleu sur un fond acide jaune. VIRTANEN ET MIETTINEN²⁹ ont de même chromatographié les sels de diéthyl-

TABLEAU I

	BROWN ET HALL ²⁷ 1950	HISCOX ET BERRIDGE ²⁸ 1950	KENNEDY ET BARKER ³⁴ 1951	REID ET LEDERER ³⁵ 1951	ISHERWOOD ET HANES ³⁹ 1953			
Sels des acides	Sodium	Ammonium Ethanolamine	Ammonium	Ammonium	Ammonium			
Solvants	Butanol saturé d'am- moniaque 1.5 <i>N</i>	Butanol saturé d'une solution d'é- thanolamine	a. Ethanol/ NH ₃ conc./ eau (95:1:5) b. Butanol/ eau/diéthyl- amine (100:15:1)	Butanol saturé d'am- moniaque 1.5 <i>N</i>	a. Propanol/ NH ₃ conc. (7:3) b. Propanol/ NH ₃ conc. (9:1) c. Propanol/ NH ₃ conc. (6:4)			
R_F			a	b	a	b	c	
Ac. formique	0.09		0.31		0.10			
Ac. acétique	0.10	0.20	0.33	0.28	0.11	0.37	0.13	0.52
Ac. propionique	0.19	0.31	0.44	0.41	0.19	0.48	0.25	0.61
Ac. butyrique	0.33	0.44	0.54	0.51	0.29	0.57	0.33	0.69
Ac. valérianique	0.45	0.55	0.60	0.56	0.41	0.69	0.44	0.80
Ac. caproïque	0.61	0.77	0.68		0.53	0.73	0.52	0.84
Indicateur pour révélation...	Bleu de Bromothymol à 0.04 p. 100 d'eau ajusté à pH 7.5 par NaOH	Vert de Bromocrésol à 0.04 p. 100 d'éthanol ajusté à pH 5.5 par ac. citrique	Bleu de Bromophénol à 0.05 p. 100 d'eau + 0.20 g acide citrique	Pourpre de Bromocrésol à 0.04 p. 80 d'éthanol + 20 de formalin	Bleu de thymol à 0.10 p. 100 d'eau ajusté à pH 10 par NaOH <i>N</i> /10			
Coloration: taches acides fond	jaune bleu	bleu jaune	bleu jaune	jaune pourpre	jaune bleu			
Estimation quantitative				Mesure de la surface des spots	Elution et titration colori- métrique			

amine et ont utilisé cette technique pour les dosages en série de l'acide butyrique dans les "silages" (végétaux en silo). Les sels de diéthylamine ont été encore employés par LONG *et al.*³⁰, puis par JONES *et al.*³¹. BÖRJE ET TORSTEN³² ont tenté de rendre la méthode plus précise en déterminant sur le chromatogramme les acides formique, acétique et lactique par des révélations spécifiques. BURTON³³ a modifié la technique de révélation: la solution alcoolique de vert de bromocrésol est pulvérisée avant le séchage complet de la feuille; les anions donnent une coloration bleue stable.

En 1951, KENNEDY ET BARKER³⁴ ont proposé une méthode de séparation des sels d'ammonium par le solvant éthanol/ammoniaque concentrée/eau (95:1:5). Les R_F obtenus sont reproduits dans le Tableau I: on remarque le léger décalage entre l'acide formique et l'acide acétique. Mais la difficulté d'effectuer des chromatographies convenables avec un solvant à base d'éthanol oblige les auteurs à préparer auparavant le papier filtre pour éliminer les taches "fantômes"; ils lavent le papier avec une solution d'acide oxalique à 1 p. 100, puis le rincent plusieurs fois à l'eau distillée.

La même année, REID ET LEDERER³⁵ ont publié une méthode très intéressante: la chromatographie des sels d'ammonium est réalisée à l'aide du solvant classique-butanol saturé d'ammoniaque 1.5 *N* (Tableau I). La révélation est faite par pulvérisation d'une solution de pourpre de bromocrésol contenant 20 p. 100 de formaldéhyde; celui-ci se combine à l'ammoniaque et libère les acides; si l'on fait subir ensuite au papier l'action ménagée de vapeurs ammoniacales, le fond se colore en rouge, alors que les acides se détachent en jaune. Les auteurs envisagent aussi une possibilité de dosage par la mesure des aires des taches acides. Ce procédé permet une estimation quantitative, dont l'erreur, selon ces auteurs, est inférieure à 5 p. 100; JACQUET ET VILLETTE³⁶ l'ont utilisé avec succès en microbiologie. MUNIER³⁷ a amélioré la méthode de REID ET LEDERER en ajoutant de l'acétone à la phase organique et en remplaçant le formaldéhyde par l'acétaldéhyde dans l'indicateur. DUNCAN ET PORTEOUS³⁸ ont proposé de laver le papier-filtre avec la phase alcoolique d'une solution de butanol saturée d'ammoniaque. La révélation est réalisée par pulvérisation d'une solution de rouge de méthyle et de bleu de bromothymol ajustée à pH 5.2 et additionnée de formaldéhyde. Les taches des acides apparaissent en rouge sur fond vert.

En 1953, ISHERWOOD ET HANES³⁹ ont décrit leur technique originale, dans laquelle les sels d'ammonium sont séparés par des solvants à base de propanol (Tableau I). Le papier est préalablement lavé successivement à l'acide acétique, à l'eau distillée et à l'ammoniaque 10 *N*. La solution révélatrice est une solution de bleu de bromothymol amenée à pH 10 par de la soude; la révélation ne peut se faire que dans une atmosphère privée de gaz carbonique. Les auteurs dosent les acides par colorimétrie après repérage des bandes à l'aide d'un chromatogramme-témoin; découpage et élution.

Le nombre des techniques successives et des améliorations proposées fait présager qu'elles ne sont pas sans défauts. Ceux-ci sont avant tout:

1. la difficulté de révélation, qui nécessite soit la pulvérisation d'un indicateur coloré dans une atmosphère privée de CO₂ (ISHERWOOD ET HANES³⁹), soit le lavage fastidieux des feuilles de papier-filtre (KENNEDY ET BARKER³⁴, ISHERWOOD ET HANES³⁹, DUNCAN ET PORTEOUS³⁸): en général, ce sont les techniques de HISCOX ET

BERRIDGE²⁸ et de REID ET LEDERER³⁵ qui ont séduit les utilisateurs par leur simplicité;

2. les conditions même de la chromatographie: dans le cas des sels de sodium (BROWN ET HALL²⁷), on est gêné par *la tache alcaline de l'ion sodium, qui masque la tache de l'acide acétique*; quand on sèche les chromatogrammes, il y a une perte certaine en acides, variable selon les conditions de séchage et les solvants utilisés: l'acétate et le propionate d'ammonium disparaissent les premiers; d'autre part, l'utilisation d'un indicateur acide, qui permet de déceler les ions ammonium retenus au niveau des acides, alors que le fond du papier reste lui-même acide, n'est pas satisfaisante;

3. l'impossibilité de *séparer les acides formique et acétique, les acides de la série normale et ceux de la série "iso"*.

TECHNIQUE PERSONNELLE

Les problèmes que nous avons à résoudre pour la chromatographie sur papier des acides aliphatiques volatils des milieux biologiques étaient donc les suivants:

1. obtention des acides sous forme d'acides libres en solution suffisamment concentrée pour être chromatographiée;

2. recherche de phases mobiles permettant la séparation de tous les acides volatils de C₁ à C₆, y compris celle du formique et de l'acétique, et d'autre part la séparation des acides de la série "iso" de ceux de la série normale;

3. mise au point d'une technique de révélation permettant d'obtenir des taches colorées relativement stables par simple pulvérisation;

4. simplification des opérations, aux dépens même de la sensibilité, l'estimation semi-quantitative restant néanmoins possible.

Nous avons mis au point une technique qui nous paraît répondre à ces exigences: elle a fait l'objet d'une note préliminaire en 1955⁴⁰ et nous nous proposons de la décrire maintenant d'une façon plus détaillée.

(a) Préparation des solutions d'acides

La concentration optima pour la chromatographie est de 0.5 à 5 millimolécules pour 10 ml, le volume de solution mis en jeu étant de 5 à 20 μ l.

(1) Entraînement à la vapeur

L'extraction est faite selon la technique décrite par DYER⁴¹, par entraînement à la vapeur d'eau. Ce procédé obligeant à recueillir un volume très grand de distillat pour être quantitatif a été modifié par OLMSTED *et al.*⁴². Ces auteurs distillent en présence de sulfate de magnésium à saturation: la proportion des acides passant dans les premières fractions est très augmentée. FRIEDEMANN⁷ traite préalablement le liquide par le tungstate de sodium avant entraînement à la vapeur, ce qui empêche la mousse et permet de mener l'opération plus rapidement. L'entraînement à la vapeur est effectué en présence d'acide sulfurique et de sulfate de magnésium.

Nous avons étudié l'influence du sulfate de magnésium à saturation sur la distilla-

TABLEAU II

ENTRAÎNEMENT À LA VAPEUR D'EAU DE 1000 μM D'ACIDES DANS 100 ml D'EAU, EN PRÉSENCE OU ABSENCE DE SULFATE DE MAGNÉSIUM + 1 ml H₂SO₄ CONCENTRÉ

Distillat recueilli	100 ml		200 ml	
	SO ₄ Mg		SO ₄ Mg	
	sans	avec	sans	avec
Ac. formique distillé	210 μM	350 μM	410 μM	600 μM
Ac. acétique distillé	355 μM	730 μM	590 μM	940 μM
Ac. propionique distillé	610 μM	950 μM	880 μM	1000 μM
Ac. butyrique distillé	805 μM	970 μM	1000 μM	1000 μM

tion des acides. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau II. Nous voyons qu'en recueillant 200 ml de distillat, on obtient quantitativement les acides à partir de C₂; mais 60 p. 100 seulement de l'acide formique passent dans le distillat (WITZEMANN)⁴³. Il est à remarquer que les conditions opératoires jouent un rôle certain dans la quantité d'acide recueillie, en particulier la vitesse de passage du courant de vapeur d'eau et surtout la concentration initiale de la liqueur à distiller (dans toutes nos expériences, le volume du ballon contenant la solution acide a été maintenu constant par réglage du chauffage).

Nous avons essayé de définir les meilleures conditions d'entraînement à la vapeur, applicables aux liquides biologiques et aux milieux de culture bactériens en particulier. 10 à 50 ml du liquide sont additionnés de 1 ml d'acide sulfurique concentré, puis de 15 ml de solution aqueuse de tungstate de sodium à 10 p. 100. On ajoute enfin 15 ml d'une solution de sulfate de magnésium à 50 p. 100 (poids/volume). On agite après chaque addition. Le ballon est monté sur le générateur de vapeur d'eau; on chauffe jusqu'à ébullition, puis on distille à feu doux, jusqu'à un volume de 25 ml; pendant ce temps la vapeur est réglée pour passer bulle par bulle. Lorsque le volume de 25 ml est atteint, on met en veilleuse sous le ballon et l'on fait passer rapidement la vapeur d'eau. On arrête l'entraînement lorsque l'on a distillé 250 ml de liquide. L'opération dure environ 20 minutes. Dans ces conditions, nous recueillons 97 p. 100 de l'acide formique et la totalité des autres acides volatils; 4 à 6 p. 100 de l'acide lactique sont également entraînés. Nous avons pu observer que, lorsque la quantité d'acide lactique contenue dans la prise d'essai était inférieure à 140 mg, cet acide n'était pas décelé par notre technique chromatographique et n'était pas gênant. Dans le cas où cette dose est dépassée, on effectue un deuxième entraînement à la vapeur, après avoir concentré le premier distillat en présence d'un excès de soude. Cette précaution est d'ailleurs rarement nécessaire, car la présence de 140 mg dans la prise d'essai correspond à une quantité initiale d'acide lactique allant de 3 g à 12 g par/litre selon le volume traité. Quant à l'acide pyruvique, qui troublerait la chromatographie et dont 10 à 40 p. 100 sont entraînés par la vapeur, il est totalement détruit lors des opérations ultérieures; sa présence n'est gênante que pour le dosage de l'acidité totale. FRIEDEMANN⁷ a proposé de s'en débarrasser par distillation sur oxyde jaune de mercure, mais cette opération élimine l'acide formique. Aussi préférons-nous précipiter les acides cétoniques par addition ménagée de 2,4-dinitrophénylhydrazine

en solution sulfurique, après défécation tungstique; la liqueur filtrée est directement soumise à l'entraînement par la vapeur.

(2) *Dosage de l'acidité volatile totale*

Le distillat contient toujours une proportion variable d'anhydride carbonique, en particulier lors de la distillation de cultures bactériennes gazogènes. Il doit être éliminé, car il donne une acidité titrable non négligeable et empêche le virage net de l'indicateur coloré. Par barbotage d'air privé de CO_2 durant quelques minutes (FRIEDEMANN⁷), on peut éliminer l'erreur due à l'acidité titrable; mais nous avons préféré la technique de ELSDEN⁸ qui consiste à faire barboter de l'azote pendant toute la titration; dans nos conditions expérimentales, le gaz employé étant de l'azote pur, il faut 1,5 minute pour éliminer le CO_2 de 100 ml de solution, 3 minutes pour 250 ml de solution. Les acides volatils ne commencent à être entraînés qu'après plus de 10 minutes de barbotage, temps largement suffisant pour effectuer la titration. Celle-ci est faite avec de la soude $N/10$ en présence d'orthocrésol-sulfone-phthaléine (en solution aqueuse à 1 p. 100).

(3) *Concentration de la solution d'acides*

Après addition d'un léger excès de soude, on concentre par ébullition jusqu'à 1 ml environ. Pour éliminer l'ion sodium, nous avons employé des résines échangeuses d'ions. Les résines anioniques faibles (type *Amberlite IR4B*) retiennent très mal les acides faibles; les résines anioniques fortes retiennent bien les acides, mais leur élution par les bases faibles est difficile. Nous avons donc utilisé des résines cationiques sulfonées (*Permutite 50*, *Amberlite IR 120*). Elles retiennent l'ion sodium, les acides se retrouvant à l'état libre dans les eaux de lavage. Chaque échantillon de résine est dosé avant usage; nos prises d'essais fixent toujours environ 30 ml de soude $N/1$ par gramme. On met en présence du résidu d'évaporation des sels de sodium la quantité de résine calculée selon les résultats du dosage précédent; on ajoute un peu d'eau distillée si c'est nécessaire. Après agitation, on laisse 5 minutes en contact, puis on filtre sur coton hydrophile dans un petit entonnoir. Le filtrat est recueilli dans un tube contenant une quantité de solution de morpholine $N/1$ correspondant aux acides volatils titrés. La résine est lavée à l'eau distillée par fractions de 1 ml. La liqueur acide filtrante est jaune; elle vire au rouge au contact de la morpholine. On arrête le lavage lorsque l'indicateur devient orangé. On a ainsi recueilli tous les acides initialement titrés. On ajoute alors une goutte de morpholine pure, pour assurer la fixation des acides. Cette solution se conserve indéfiniment en chambre froide, en flacon bouché au caoutchouc.

(4) *Limites de la technique de concentration*

Une opération menée correctement permet de recueillir tous les acides dans un volume de liquide égal à 20 fois le poids de résine utilisée (pour 0.50 g de résine, correspondant à 1500 μM d'acides, on obtient 10 ml de solution). La concentration est alors correcte.

(b) *Chromatographie sur papier*(I) *Choix des solvants mobiles organiques*

a. Parmi les hydrocarbures liquides, le benzène et le cyclohexane donnent une bonne résolution des taches; aucun ne sépare l'acide formique de l'acide acétique.

b. Les alcools aliphatiques saturés de la série normale de C_1 à C_8 , et les alcools à chaînes latérales, secondaires ou tertiaires, de C_3 à C_8 , ne nous ont pas permis la séparation de ces acides, ni des acides "iso" et normaux. Les alcools éthylique et méthylique tendent à étirer la tache acétique-formique (voir les R_F du Tableau I); mais la résolution est d'une façon générale mauvaise, le solvant formant des taches

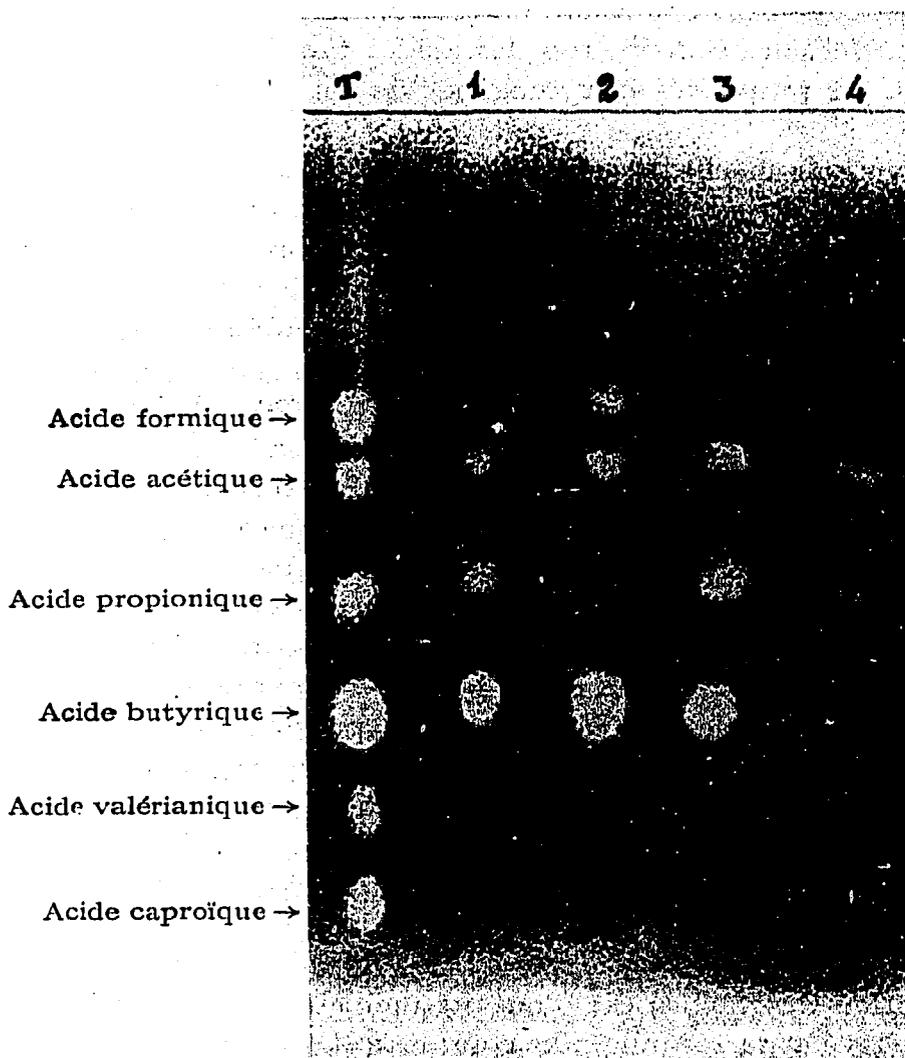


Fig. 1. Chromatographie des acides volatils des milieux de culture de bactéries anaérobies (Milieu V.F. glucosé à 1 p. 100; essai sur 30 ml). T: mélange témoin; — 1: *Fusiformis hemolyticus*; 2. *Fusiformis fusiformis*; 3. *Spherophorus funduliformis*; 4. *Ristella convexa*.

parasites. KENNEDY ET BARKER³⁴ avaient observé cette anomalie et recommandaient de laver le papier-filtre avec une solution d'oxalate de potassium, avant la chromatographie avec le solvant alcool-ammoniacque.

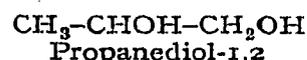
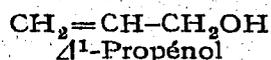
Bibliographie p. 84/85.

Les alcools supérieurs donnent des taches bien nettes. Les R_F des acides décroissent quand le poids moléculaire des alcools augmente. Les R_F sont plus grands pour les alcools de la série normale que pour leurs isomères ramifiés.

c. L'essai des solvants organiques classiques: cétones; dérivés chlorés, bromés, soufrés des hydrocarbures; esters; ne nous a permis aucune séparation intéressante.

d. L'alcool allylique (Δ^1 -propénol) sépare convenablement les acides formique et acétique. Le solvant est composé d'alcool allylique, d'eau et d'ammoniaque concentrée (100:5:1). Les R_F obtenus pour les acides formique et acétique sont respectivement 0.45 et 0.52. Les acides valérienique et caproïque migrent avec le front et sont difficilement repérables. Les divers mélanges d'alcool allylique avec des solvants diminuant les R_F des acides ne nous ont donné aucun résultat; dès que la concentration en propénol est inférieure à 80 p. 100, les acides formique et acétique ne sont plus séparés. De plus, les propriétés lacrymogènes de cet alcool rendent son emploi très pénible.

e. Nous avons cherché si, parmi les corps de formule voisine de l'alcool allylique, certains ne présentaient pas la propriété de séparer les acides formique et acétique. Nous avons obtenu un résultat favorable avec le propanediol-1,2 (ou propylène-glycol), dont la formule peut être considérée comme dérivant de celle de l'alcool allylique par fixation des éléments de l'eau sur la double liaison. Ce solvant sépare



très correctement les deux premiers acides volatils, même lorsqu'il se trouve à la concentration de 10 p. 100 dans la phase mobile. Mais il possède un point d'ébullition élevé (188° C), d'où l'impossibilité de sécher le chromatogramme sans éliminer les acides; d'autre part, la migration des acides est très rapide. Nous avons donc cherché à diluer convenablement le propanediol avec d'autres solvants qui lui conserveraient ses avantages, en diminuant ou supprimant ses inconvénients; pour choisir ces solvants, nous avons dégagé de nos essais les règles suivantes:

1. Les solvants miscibles à l'eau en toutes proportions (éthanol, propanediol) font migrer très rapidement les acides; les taches sont régulièrement espacées mais tassées vers le bas du chromatogramme; l'eau ajoutée au solvant a la même propriété et les R_F sont fonction de la quantité d'eau ajoutée.

2. Les solvants hydrophobes ou peu hydrophiles (hydrocarbures, alcools supérieurs) ralentissent la vitesse de migration; les premiers acides sont largement espacés, mais, à partir de l'acide butyrique, les taches sont à peine séparées.

3. La résolution des taches est d'autant meilleure que le poids moléculaire du solvant est plus élevé et sa formule plus complexe (les taches deviennent plus ramassées et plus nettes quand on passe du méthanol au butanol, l'alcool butylique tertiaire donnant la meilleure résolution).

4. L'addition d'un liquide volatil au propanediol était indispensable afin de permettre un séchage partiel du chromatogramme. Nous avons essayé le benzène et le cyclohexane: ceux-ci influencent assez peu la vitesse de migration des acides et ont l'inconvénient de mal séparer les acides butyrique, valérienique et caproïque

TABLEAU III
(Les proportions sont indiquées en volume)

Solvant I		Solvant II		Solvant III	
Benzène	30	Alcool benzylique	30	Butanol	30
Propylèneglycol	10	Cyclohexane	10	Cyclohexane	30
Isopropanol	20	Propylèneglycol	10	Propylèneglycol	10
Ammoniaque 22° Bé.	0.6	Isopropanol	20	Ammoniaque 22° Bé	0.07
Eau	3	Ammoniaque 22° Bé	0.7	Morpholine	0.5
...		Morpholine	0.07	Eau	3.7
		Eau	3.5		

Valeurs des R_F

	Solvant I	Solvant II	Solvant III
Ac. formique	0.41	0.23	0.29
Ac. acétique	0.50	0.29	0.36
Ac. propionique	0.59	0.40	0.49
Ac. butyrique	0.68	0.52	0.62
Ac. valérianique	0.74	0.58	0.70
Ac. caproïque	0.79	0.66	0.80

(Solvant I du Tableau III). Par adjonction d'un solvant ralentissant fortement la vitesse de migration (alcool benzylique), nous avons obtenu des R_F plus faibles, mais une mauvaise séparation des acides supérieurs (Solvant II). Enfin l'addition de butanol nous a permis d'obtenir un espacement homogène entre les taches acides (Solvant III) (voir Fig. 1). Aussi est-ce à ce dernier solvant que nous avons donné la préférence.

f. Dans la série aromatique, l'alcool benzylique nous a permis de séparer les acides de la série "iso" de ceux de la série normale. Nous nous sommes inspirés de la technique décrite par CONSDEN, GORDON ET MARTIN⁴⁴ pour la séparation de la leucine et de l'isoleucine. L'alcool benzylique saturé d'ammoniaque 1,5 N fait migrer très lentement les acides (après 24 heures de chromatographie descendante, tous les acides sont encore confondus en une tache étirée, dont la base a pour R_F 0.2 environ). Mais lorsqu'on laisse couler le solvant durant trois ou quatre jours, le front dépassant largement le bord inférieur du papier, découpé en dents de scie, on observe une séparation très nette des acides, dont les R_F sont les suivants, celui de l'acide valérianique étant pris comme unité: acide formique 0.17; acide acétique 0.20; acide propionique 0.36; acide isobutyrique 0.51; acide butyrique 0.61; acide iso-valérianique 0.82; acide valérianique 1 (voir Fig. 2). Le R_F de l'acide valérianique est arbitrairement fixé à 1, la distance parcourue par le solvant n'étant pas mesurable. Le point d'ébullition élevé de l'alcool benzylique (205° C) empêche le séchage du chromatogramme. A froid, il est impossible d'obtenir la dessiccation; à l'étuve, les acides se volatilisent en même temps que l'alcool benzylique. Le chromatogramme doit donc être révélé alors qu'il est encore imprégné du solvant. Celui-ci donne au papier une apparence huileuse et les taches doivent être examinées par transparence. Il est nécessaire de les entourer d'un trait de crayon immédiatement, car, sous l'influence de l'excès de liquide révélateur pulvérisé, elles tendent à s'élargir rapidement.

Par mélange avec un autre solvant, même en quantité très faible, l'alcool benzylique perd sa propriété de séparer les acides "iso" des acides de la série normale. Aucune autre phase mobile ne nous a donné ces séparations. *Nous avons donc, malgré ses inconvénients, retenu l'alcool benzylique pour la chromatographie sur papier des acides "iso"*. L'utilisation de ce solvant sur colonne permettrait sans doute la séparation et le dosage de tous les acides aliphatiques de C_1 à C_8 et de leurs isomères.

(2) *Choix de la base saturant les acides*

La base utilisée et sa concentration font varier considérablement le R_F : il semble qu'agissent à la fois le coefficient de dissociation et l'hydrophilie de la base. Les bases

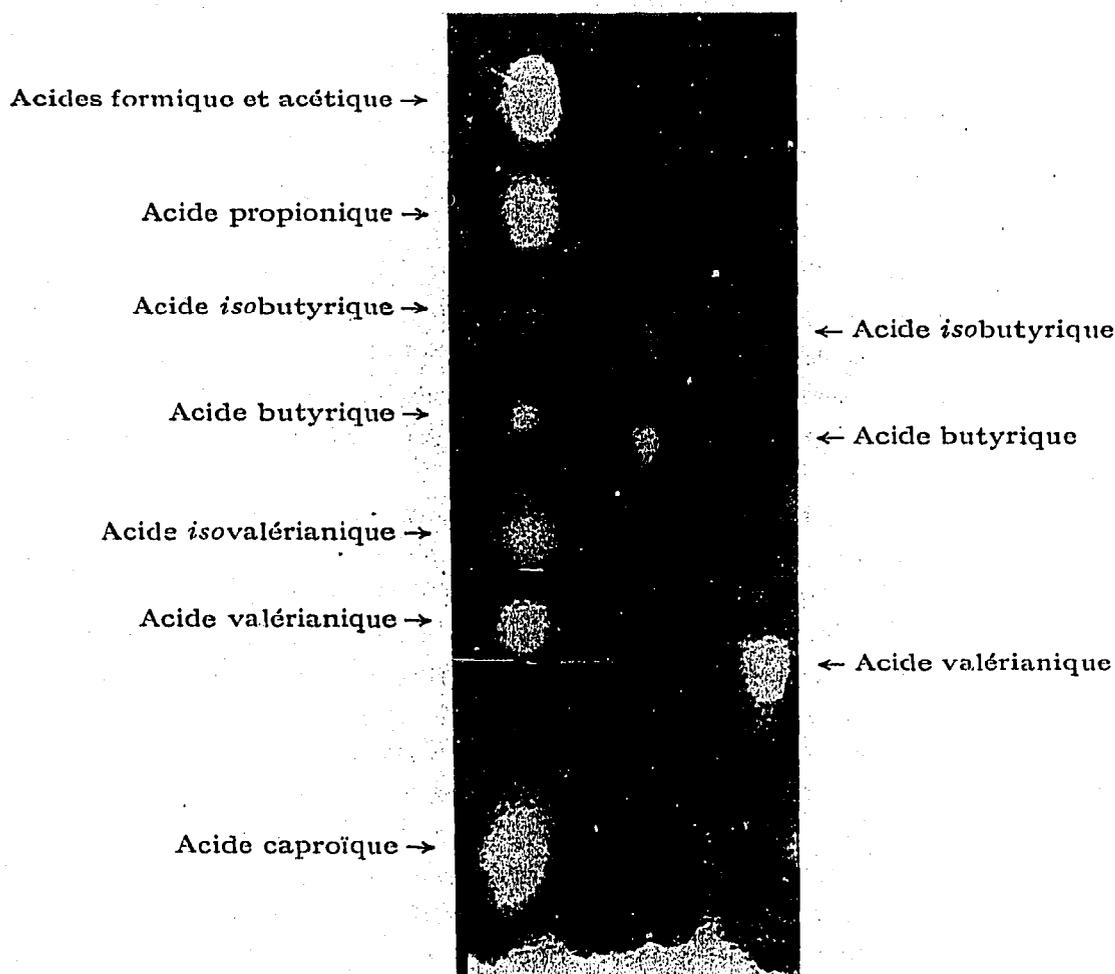


Fig. 2. Chromatographie des acides volatils de la série *iso* dans le solvant alcool benzylique/ammoniaque. On remarquera la diminution des R_F dans le mélange, par rapport aux acides isolés.

organiques faibles et miscibles en toutes proportions à l'eau se comportent comme l'ammoniaque.

Nous avons tenté de remplacer l'ammoniaque par une autre base. En effet, les sels d'ammonium sont instables (sels d'acides faibles et d'une base peu ionisée) et les deux composants dissociés sont très volatils, ce qui entraîne leur disparition

lors du séchage du papier. Cet inconvénient se manifeste à deux moments de la chromatographie: a. lors du dépôt des taches de départ, il est impossible de sécher celles-ci avec de l'air chaud: par séchage à froid d'une durée n'excédant pas une heure, les pertes d'acides sont très faibles; b. lors du séchage du chromatogramme, avant la pulvérisation, les pertes en acide sont très sensibles et dépendent du solvant utilisé; en particulier, les solvants peu volatils entraînent les acides en quantité considérable.

Il fallait donc remplacer l'ammoniaque par une base moins volatile et plus dissociée, mais néanmoins suffisamment faible pour ne pas gêner la révélation.

Parmi les substances essayées, la *morpholine*, $(\text{CH}_2)_2 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_2$ est peu volatile ($E = 126^\circ \text{C}$), elle est plus forte que l'ammoniaque et elle ne gêne pas la révélation. Après 3 heures de séchage à la température du laboratoire, en présence du solvant II, 5 p. 100 seulement des acides acétique et propionique ont disparu et l'on retrouve intégralement les autres acides.

Nous avons donc introduit la morpholine dans les solvants II et III, mais en conservant l'ammoniaque, qui permet une bonne saturation de l'atmosphère de la cuve, ce qui ne peut être obtenu avec la morpholine seule.

(c) Révélation

Les techniques de révélation qui ont été proposées sont de trois types:

(1) *Pulvérisation d'un indicateur virant à pH bas, tamponné par de l'acide citrique (HISCOX ET BERRIDGE²⁸, KENNEDY ET BARKER³⁴).*

Les acides chromatographiés retiennent l'ammoniaque à leur niveau: leurs taches sont donc alcalines sur le fond acide du papier. La coloration disparaît rapidement par départ de l'ammoniaque, et la révélation ne peut être, même grossièrement, quantitative.

(2) *Pulvérisation d'un indicateur virant à pH neutre ou alcalin, préalablement neutralisé exactement par de la soude*

La coloration est très labile, la soude étant rapidement neutralisée par le CO_2 de l'air (BROWN ET HALL²⁷); nous avons vu que ISHERWOOD ET HANES³⁰ évitaient cet inconvénient en effectuant la pulvérisation dans une enceinte privée de gaz carbonique, ce qui complique sensiblement le mode opératoire. REID ET LEDERER³⁵ pulvérisent un indicateur additionné de formol: l'ammoniaque du papier est alors dissimulée et on colore le fond par l'action ménagée de vapeurs ammoniacales.

(3) *Emploi d'une réaction chimique s'effectuant à un pH déterminé*

On a eu recours notamment à la réduction du nitrate d'argent ammoniacal (*cf.* ISHERWOOD ET HANES³⁰): les substances réductrices naturelles du papier colorent le fond en brun foncé, grâce à l'alcalinité du nitrate d'argent ammoniacal; la réduction n'a pas lieu au niveau des taches acides qui apparaissent en blanc sur fond marron;

la teinte du papier s'approfondit si on pulvérise ensuite une solution diluée de glucose et que l'on sèche le chromatogramme. L'acide formique a un comportement particulier : comme il est lui-même réducteur, sa tache vire immédiatement au marron foncé, réaction qui s'avère très utile pour le distinguer de façon spécifique des autres acides volatils, surtout de l'acide acétique. BÖRJE ET TORSTEN³² ont voulu en faire une réaction de différenciation des acides formique, acétique et lactique, mais elle n'est valable que pour l'acide formique, les acides acétique et lactique ne pouvant être séparés.

(4) *Procédé adopté*

Parmi les indicateurs colorés, ceux dont le point de virage se situe entre 7.5 et 9 nous ont donné les meilleurs résultats. Nous avons choisi le rouge de crésol (*o*-crésol-sulfone-phthaléine), dont la couleur est jaune en milieu acide et vire au rouge à pH 8. Cet indicateur, additionné de soude, donne un contraste net entre les taches acides jaunes et le fond du papier rouge. La coloration rouge disparaît en quelques minutes par action du CO₂ de l'air. Nous avons donc ajouté un tampon alcalin, moins sensible au CO₂ : une solution de phosphate ajustée à pH 9.5 permet d'obtenir des taches persistantes ; cependant, l'obligation dans ce cas de pulvériser une solution aqueuse entraîne la diffusion des taches, et le véronal sodique, soluble dans l'alcool, évite cet inconvénient.

La formule de la *solution d'indicateur* est la suivante : *o*-crésol-sulfone-phthaléine : 0.2 g ; soude *N/1* : 0.3 ml ; eau : 15 ml ; après dissolution, ajouter 70 ml d'alcool à 96°. La *solution tampon* est composée d'une solution aqueuse de véronal sodique à 10 g pour 100 ml d'eau, à laquelle on ajoute 150 ml d'alcool à 96°. Les deux solutions sont mélangées avant l'emploi en proportions variables selon la base utilisée pour la chromatographie. Avec une phase mobile ammoniacale, on pulvérise un mélange à parties égales des deux solutions. Si la phase mobile contient de la morpholine, on fait un mélange contenant $\frac{1}{4}$ de la solution tampon pour $\frac{3}{4}$ de la solution indicatrice.

Cette technique de révélation nous a donné des résultats constants : elle met en évidence toutes les substances qui communiquent au papier un pH inférieur à la neutralité ; la coloration ne disparaît qu'après 48 heures environ.

(d) *Nature du papier*

Lors de nos essais préliminaires nous avons employé le papier Whatman no. 1, qui est relativement lent et qui permet de déceler de petites quantités d'acides, de l'ordre de 0.025 micromolécules. Pour les applications pratiques de la technique, nous avons préféré le papier Whatman no. 3, dont l'épaisseur permet de déposer des quantités de liquide plus importantes à la tache de départ. Après révélation, les taches sont plus nettes et la coloration disparaît plus lentement.

(e) *Mode opératoire*

Les considérations précédentes nous conduisent à résumer la technique de chromatographie des acides volatils de la façon suivante :

Bibliographie p. 84/85.

1. Le papier utilisé est le Whatman no. 3; la chromatographie est effectuée en phase descendante.

2. Les acides sont déposés sur le papier sous forme de leurs sels de morpholine, par fractions de $5 \mu\text{l}$, à l'aide d'une micropipette; entre chaque addition, on laisse sécher la tache à la température du laboratoire. La quantité d'acide déposée doit être comprise entre 0.5 et $3 \mu\text{M}$, et le volume de solution utilisé compris entre 5 et $20 \mu\text{l}$.

3. Dès que les taches de départ sont sèches, on effectue la chromatographie à l'aide du solvant III durant 24 heures pour les acides de la série normale; pour la séparation des acides de la série normale et de la série "iso", on emploie l'alcool benzylique saturé d'ammoniaque $1.5 N$; on laisse couler ce solvant durant quatre jours, le bord inférieur du papier étant découpé en dents de scie pour permettre un écoulement homogène.

4. Les feuilles sont retirées de la cuve à chromatographie et laissées 20 minutes à la température du laboratoire ou 10 minutes à 50°C . L'indicateur tamponné est ensuite pulvérisé; la technique suivante nous a donné les meilleurs résultats; d'abord, pulvérisation homogène mais légère sur une face, jusqu'à l'apparition des taches jaunes sur un fond jaune orangé; ensuite, sur l'autre face, pulvérisation jusqu'à obtention d'un fond rouge violacé. Après 5 minutes, on examine les taches par transparence et on les entoure d'un trait de crayon. Lors de l'emploi du solvant alcool benzylique/ammoniaque, le chromatogramme peut être séché à la température du laboratoire durant 45 minutes. Après pulvérisation, il faut attendre 10 minutes environ avant que les taches deviennent bien visibles; elles sont alors marquées immédiatement; elles persistent 48 heures environ, mais en s'agrandissant considérablement par diffusion dans le papier humide, le fond du papier se décolorant peu à peu.

Il est possible de déceler par cette technique $0.05 \mu\text{M}$ d'acide formique; $0.1 \mu\text{M}$ des acides acétique, propionique, butyrique, et $0.15 \mu\text{M}$ des acides valérianique et caproïque. Les acides minéraux (en particulier l'acide sulfurique), qui peuvent avoir été entraînés lors de la distillation des acides volatils, restent à la tache de départ. L'acide lactique se place entre les acides formique et acétique: son R_f est variable et dépend de la présence de ces acides; s'il gêne la lecture du chromatogramme, il est facile de procéder à un nouvel entraînement à la vapeur à partir de la solution des acides volatils obtenue précédemment.

CONCLUSION

Nous avons effectué au moyen de la technique précédente plus de 1000 séparations d'acides volatils et nous avons obtenu des résultats constants et aisément reproductibles. Le procédé est bien adapté à des déterminations en série, particulièrement dans certaines études métaboliques, comme par exemple l'exploration systématique du type fermentaire des bactéries anaérobies (GUILLAUME, BEERENS ET OSTEUX⁴⁵) (voir Fig. 1). La rapidité d'exécution et la simplicité des moyens mis en œuvre sont

les principaux avantages de la méthode, dont la fidélité nous a donné d'autre part entière satisfaction.

RÉSUMÉ

La chromatographie sur papier des acides aliphatiques volatils de C_1 à C_6 est réalisée après entraînement à la vapeur dans des conditions bien déterminées, élimination des cations et concentration par des résines sulfonées. Les acides sont transformés en sels de morpholine et chromatographiés sur papier Whatman No. 3 dans le solvant butanol/cyclohexane/propylène-glycol/ammoniaque à 22° Bé/morpholine/eau (30:30:10:0.7:0.07:3.5) pour la séparation des acides de la série normale, et dans le solvant alcool benzylique saturé d'ammoniaque 1.5 N pour ceux de la série "iso"; révélation par une solution alcoolique d'*o*-crésol-sulfone-phthaléine, tamponnée par le véronal sodique. Le procédé a donné d'excellents résultats, notamment dans la détermination des types fermentaires des bactéries anaérobies.

SUMMARY

The volatile aliphatic acids from C_1 to C_6 are chromatographed on paper after recovery by steam distillation under controlled conditions, elimination of cations and concentration by passage over a sulfonated resin. The acids are transformed into their morpholine salts and chromatographed on Whatman No. 3 paper in the solvent-system butanol/cyclohexane/propylene glycol/ammonia 22° Bé/morpholine/water (30:30:10:0.7:0.07:3.5) for the separation of the straight chain acids, and in the system benzyl alcohol saturated with 1.5 N ammonia for the "iso" series. Revelation is carried out by spraying with an alcoholic solution of *o*-cresolsulfonphthalein in sodium veronal buffer. The method has given excellent results, notably in the determination of the fermentation type or pattern of anaerobic bacteria.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. DUCLAUX, *Ann. Inst. Pasteur*, 9 (1895) 265.
- ² W. U. BEHRENS, *Z. anal. Chem.*, 69 (1926) 97.
- ³ C. H. WERKMAN, *Ind. Eng. Chem.*, 2 (1930) 302.
- ⁴ S. T. SCHICKTANZ, W. I. STEELE ET A. C. BLAISDELL, *Ind. Eng. Chem.*, 12 (1940) 320.
- ⁵ E. LESTER-SMITH, *Biochem. J.*, 36 (1942) xxii.
- ⁶ S. R. ELSDEN, *Biochem. J.*, 40 (1946) 258.
- ⁷ T. E. FRIEDEMANN, *J. Biol. Chem.*, 123 (1938) 161.
- ⁸ L. L. RAMSEY ET W. I. PATTERSON, *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, 28 (1945) 644 (voir aussi: *id.*, 29 (1946) 337 et 31 (1948) 441).
- ⁹ H. J. NIJKAMP, *Anal. Chim. Acta*, 5 (1951) 325.
- ¹⁰ V. L. KRETOVITCH, T. V. DROZDOVA ET I. S. PETROVA, *Doklady Akad. Nauk. SSSR*, 80 (1951) 409.
- ¹¹ A. C. NEISH, *Canad. J. Research*, 27B (1949) 6.
- ¹² H. J. NIJKAMP, *Chem. Weekblad*, 45 (1949) 480.
- ¹³ R. L. M. SYNGE, *Analyst*, 71 (1946) 256.
- ¹⁴ V. MOYLE, E. BALDWIN ET R. SCARISBRICK, *Biochem. J.*, 42 (1948) xiv; 43 (1948) 308.
- ¹⁵ M. H. PETERSON ET M. J. JOHNSON, *J. Biol. Chem.*, 147 (1948) 775.
- ¹⁶ L. L. RAMSEY, *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, 31 (1948) 164.
- ¹⁷ E. BUEDING ET H. W. YALE, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 411.
- ¹⁸ F. V. GRAY, A. F. PILGRIM, H. J. RODDA ET R. A. WELLER, *Nature*, 167 (1951) 954.
- ¹⁹ A. T. JAMES ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 679.
- ²⁰ E. F. ANNISON, *Biochem. J.*, 58 (1954) 671.
- ²¹ J. H. VAN DE KAMER, K. W. GERRITSMAN ET E. J. WANSINK, *Biochem. J.*, 61 (1955) 174.
- ²² K. FINK ET R. M. FINK, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 70 (1949) 654.
- ²³ Y. INOUE ET M. J. NODA, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 18 (1950) 294.
- ²⁴ A. R. THOMPSON, *Australian J. Sci. Research*, B4 (1951) 180.
- ²⁵ E. R. STADTMAN ET H. A. BARKER, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 769.
- ²⁶ K. SATAKE ET T. SEKI, *J. Japan. Chem.*, 4 (1950) 557.
- ²⁷ F. BROWN ET L. P. HALL, *Nature*, 166 (1950) 66.
- ²⁸ E. R. HISCOX ET N. J. BERRIDGE, *Nature*, 166 (1950) 522.
- ²⁹ A. I. VIRTANEN ET J. K. MIETTINEN, *Nature*, 168 (1951) 294.
- ³⁰ A. G. LONG, J. R. QUAYLE ET R. J. STEDMAN, *J. Chem. Soc.*, (1951) 2197.
- ³¹ A. R. JONES, E. J. DOWLING ET W. J. SKRABA, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 394.
- ³² L. BÖRJE ET S. TORSTEN, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 87.
- ³³ H. S. BURTON, *Nature*, 173 (1954) 127.

- ³⁴ E. P. KENNEDY ET H. A. BARKER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1033.
³⁵ R. L. REID ET M. LEDERER, *Biochem. J.*, 50 (1951) 60.
³⁶ J. JACQUET ET O. VILLETTE, *74ème Congrès de l'Ass. Franc. pour l'Avancement des Sciences, Caen, 1955*.
³⁷ R. MUNIER, *Bull. Soc. Chim.*, (1952) 869.
³⁸ R. E. B. DUNCAN ET J. W. PORTEOUS, *Analyst*, 78 (1953) 641.
³⁹ F. A. ISHERWOOD ET C. S. HANES, *Biochem. J.*, 55 (1953) 824.
⁴⁰ J. GUILLAUME ET R. OSTEUX, *Compt. rend.*, 241 (1955) 501.
⁴¹ D. C. DYER, *J. Biol. Chem.*, 28 (1916-1917), 445.
⁴² W. H. OLMSTED, C. W. DUDEN, W. N. WHITAKER ET R. F. PARKER, *J. Biol. Chem.*, 85 (1929-1930), 114.
⁴³ E. J. WITZEMANN, *J. Am. Chem. Soc.*, 41 (1919) 1946.
⁴⁴ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
⁴⁵ J. GUILLAUME, H. BEERENS ET R. OSTEUX, *Ann. Inst. Pasteur*, 90 (1956) 229.

Reçu le 3 juillet 1957