

PROGRÈS RÉCENTS DE LA MICROCHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES

E. DEMOLE

*Laboratoires de Recherches, Firmenich & Cie,
Genève (Suisse)*

(Reçu le 1 mars 1961)

La présente revue d'ensemble complète et met à jour un premier article consacré au même sujet en 1958¹. Depuis lors, la microchromatographie sur couches minces a connu un important développement. Rendue plus accessible sur le plan pratique, elle a été adaptée, avec un succès remarquable, à l'analyse des substances hydrosolubles. Son usage se généralise de plus en plus.

I. APPAREILLAGE, TECHNIQUE

(a) *Préparation des couches adsorbantes*

Seules les chromatoplaques préparées à l'aide d'égaliseurs produisant des couches actives rigoureusement régulières et d'épaisseur constante assurent une reproductibilité satisfaisante des résultats. L'un de ces appareils, construit par STAHL², donne des couches adsorbantes de 0.01 à 0.5 mm d'épaisseur. Il en existe un modèle commercial* produisant des couches de 0.25 mm à partir de mélanges fluides d'adsorbant, de plâtre de Paris et d'eau. Un mode d'emploi détaillé libère l'utilisateur de cet appareil de toute difficulté pratique concernant la préparation proprement dite des chromatoplaques; ce facteur de commodité a largement contribué à la diffusion de la méthode ces deux dernières années.

STAHL² a mis au point un autre appareil (non commercialisé), électrique, permettant la préparation automatique de 800 à 1500 "chromatostrips" (2.5 × 20 cm) par heure avec réglage variable de l'épaisseur des couches adsorbantes (de 0 à 1 mm).

Un égaliseur plus simple, construit en plexiglas, a été décrit par BARBIER *et al.*³ pour la production de couches adsorbantes régulières de 0.3 mm d'épaisseur environ.

MACHATA⁴ a construit un instrument tout aussi simple, en acier inoxydable, donnant un film adsorbant de 0.25 mm environ.

MOTTIER⁵ a utilisé de son côté un dispositif encore plus simple pour répartir régulièrement de l'alumine pulvérulente sur des plaques de verre. Il s'agit là toutefois d'une technique spéciale conduisant à des couches adsorbantes non adhérentes et non à des chromatoplaques au sens habituel du terme.

* Fabriqué par C. Desaga GmbH, Hauptstrasse 60, Heidelberg (Allemagne). Un autre égaliseur est construit par Camag S.A., Muttenz (BL/Suisse).

A l'exception de l'appareil réglable de STAHL², tous ces égaliseurs donnent des couches d'une épaisseur unique comprise entre 0.2 et 0.3 mm, limites adoptées par la quasi-totalité des utilisateurs de chromatoplaques. On ne doit cependant pas perdre de vue l'intérêt que présente l'emploi des couches spécialement épaisses (1 mm) qui autorisent les séparations semi-préparatives et méritent particulièrement bien le nom de "colonnes ouvertes" conféré aux chromatoplaques en général. Il ne semble par contre guère y avoir d'avantage à utiliser des couches adsorbantes extrêmement minces (< 0.2 mm) sur lesquelles la reproductibilité des valeurs de R_F est influencée par les plus petites irrégularités de l'adsorbant².

Les chromatoplaques préparées sans l'aide d'égaliseur conduisent à des résultats utilisables si l'on caractérise les substances chromatographiées par leurs valeurs de R_F relatives. Celles-ci restent en effet, dans certaines limites, indépendantes des variations d'épaisseur des couches. Citons à ce propos TSCHESCHE *et al.*⁶ qui ont utilisé des chromatoplaques préparées simplement à l'aide d'une spatule.

(b) *Composition des couches adsorbantes*

L'adsorbant le plus généralement utilisé sur chromatoplaques est l'acide silicique (silicagel). Ses propriétés chromatographiques à la fois souples et sélectives et le fait qu'il peut être adapté aussi bien à la séparation de corps liposolubles (par adsorption) qu'à celle de corps hydrosolubles (par partage) justifient cette préférence. L'oxyde d'aluminium, d'un emploi beaucoup plus restreint, paraît surtout recommandé pour les séparations des substances basiques. MOTTIER⁵ a cependant obtenu d'intéressants résultats avec cet adsorbant dans le cas d'acides aminés et de colorants.

Il existe, dans le commerce, des adsorbants préparés tout spécialement pour l'emploi sur chromatoplaques*. Ces produits contiennent une certaine quantité (par exemple 5%) de plâtre comme agent liant.

PRYOR ET BRYANT⁷ ont préféré le magnésol (silicate hydraté de magnésium) à l'acide silicique dans le cas de la microchromatographie de certaines huiles essentielles.

Dans le domaine particulier de la chromatographie de partage, TEICHER *et al.*⁸ ont mentionné l'usage d'une poudre de cellulose commerciale** sur chromatoplaques. Rappelons que la série "G" des adsorbants de Merck comprend le kieselguhr.

L'emploi d'autres adsorbants s'imposera certainement à l'avenir, particulièrement dans le but de permettre des séparations spéciales (couches minces à base de polyamides, de résines échangeuses d'ions, etc.).

L'agent liant incorporé à l'adsorbant est presque toujours le plâtre, ce qui donne des couches actives exclusivement minérales supportant l'action des réactifs de révélation les plus corrosifs. L'amidon constitue un autre excellent liant, de moins en moins utilisé cependant à cause de sa nature organique. Il conduit pourtant à des couches adsorbantes réellement dures, permettant des inscriptions au crayon, ce qui n'est pas le cas, par exemple, de celles préparées à partir du silicagel "G" (Merck).

* Silicagel "G", oxyde d'aluminium "G" et kieselguhr "G" fabriqués par E. Merck, Darmstadt (Allemagne); "G" = Gips = plâtre. Un oxyde d'aluminium pour chromatographie sur couches minces est également fabriqué par Fluka S.A., Buchs, St.-Gall. (Suisse).

** Fabriquée par Excorna, Pharm. Präparate o.H.G., Mainz (Allemagne).

(c) *Normalisation des couches adsorbantes*

Les films actifs utilisés pour la microchromatographie doivent respecter certains critères que STAHL² s'est attaché à bien définir. Cet auteur tient compte de trois propriétés fondamentales des chromatoplaques pour fixer les normes suivantes, auxquelles doivent répondre les couches siliciques de 0.25 mm d'épaisseur activées à 105° durant 30 minutes.

1. *Pouvoir séparateur, degré d'activité.* En développant avec de l'hexane le microchromatogramme d'un mélange de trois colorants (bleu d'indophénol, rouge Soudan G, *p*-diméthylaminoazobenzène; 2 µg de chaque), on doit constater que ceux-ci restent à leur point de départ (situé à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque, celle-ci trempant de 0.5 cm dans le solvant). L'essai est terminé lorsque le front du solvant a atteint un niveau situé à 10 cm au-dessus de la ligne de départ.

En répétant le même essai en présence de benzène, on doit observer une migration et une séparation parfaites des trois colorants. Le degré d'activité exact de la plaque peut être chiffré par les valeurs de R_F obtenues.

2. *Propriétés capillaires.* Le temps mis par le benzène pour couvrir un trajet ascendant de 10 cm sur la couche adsorbante, dans les conditions normales de la chromatographie, ne doit pas excéder 45 minutes (30 minutes habituellement).

3. *Structure physique, résistance mécanique.* L'adsorbant doit posséder un degré granulométrique permettant l'obtention de couches régulières, d'apparence lisse, de 0.25 mm d'épaisseur. Ces couches doivent pouvoir supporter une forte pulvérisation d'acides concentrés suivie d'un chauffage.

Le silicagel "G" (Merck) satisfait à ces exigences. Il est toutefois recommandé de placer un témoin (par exemple le mélange des trois colorants cités plus haut) sur chaque chromatoplaque utilisée. On obtient alors un maximum de précision, les plaques d'activité anormale pouvant être décelées et leurs résultats corrigés. Cette pratique est d'autant plus justifiée que l'obtention d'une reproductibilité parfaite des valeurs de R_F absolues nécessite de grandes précautions expérimentales difficiles à observer pleinement (manipulation des plaques à l'abri total de l'humidité atmosphérique, utilisation de cuves idéalement conditionnées pour le développement, etc.). Dans les conditions les meilleures, les valeurs de R_F sont constantes à ± 0.05 près.

L'un des principaux avantages de la microchromatographie sur couches minces est de permettre, à partir de très peu de produits, l'étude des conditions les meilleures à adopter (choix du solvant, etc.) pour effectuer des séparations préparatives sur colonnes. Ce passage de l'échelle micro- à l'échelle macrochromatographique ne soulève pas de problème particulier pour un même adsorbant, bien que le pouvoir de définition des colonnes s'avère souvent relativement amoindri par des effets de diffusion.

STAHL² a constaté que les couches adsorbantes préparées à partir du silicagel "G" (Merck) possèdent un pouvoir adsorbant "correspondant" à celui de l'oxyde d'aluminium neutre d'activité II/III (Merck) (détermination d'après BROCKMANN ET SCHODDER⁹). Une telle correspondance des deux adsorbants ne peut être valable que dans un nombre limité de cas. STAHL¹⁰ a d'ailleurs constaté que les valeurs de R_F

obtenues sur l'un et l'autre pouvaient différer, particulièrement en présence de mélanges de solvants. Rappelons que l'adsorption sur acide silicique s'effectue principalement par liaisons hydrogène entre les groupes silanols et les groupements polaires des molécules du soluté¹¹, alors que l'oxyde d'aluminium paraît agir, dans une plus large mesure, par d'autres facteurs¹² (forces de Van der Waals, pouvoir échangeur d'ions, etc.). De cette diversité dans les modes d'adsorption, il ressort que la reproduction à l'échelle préparative des séparations obtenues sur chromatoplaques ne peut parfaitement s'effectuer que sur des colonnes de même adsorbant.

La forme des "chromatostrips" exerce une certaine influence sur les valeurs de R_F , ainsi qu'il résulte d'une étude de FURUKAWA¹³. L'intérêt de ce phénomène, qui ne semble pas avoir d'incidence pratique, paraît toutefois assez secondaire.

(d) Choix du solvant de développement

La règle, en microchromatographie d'adsorption, est d'accorder la polarité du solvant à celle du mélange à séparer. On s'adressera donc à la série dite "éluotrope" pour effectuer un premier choix. Une détermination plus précise du meilleur solvant peut ensuite être faite par la microtechnique circulaire de STAHL²: on dépose, à quelques centimètres d'intervalle sur une couche adsorbante, plusieurs gouttes d'une solution du mélange à chromatographier. Après évaporation du solvant, on dépose au centre de chacune des taches un fin capillaire rempli d'un des solvants à examiner. Chaque tache subit un développement radial très rapide et l'examen de la plus ou moins grande netteté de séparation des composants du mélange, distribués sous forme de cercles concentriques, permet d'effectuer un choix. On utilise autant de capillaires qu'il y a de solvants à tester.

Cette microtechnique peut également servir à choisir le système de solvants convenant aux microchromatographies de partage. On utilise souvent, dans ce dernier cas, les solvants mis au point pour des séparations analogues en chromatographie sur papier.

(e) Développement et révélation des microchromatogrammes

On utilise la technique ascendante. La tendance des taches à la diffusion est inversement proportionnelle à la vitesse du développement et celle-ci, très rapide initialement, diminue fortement après un parcours d'environ 10 cm. Aussi la plupart des auteurs utilisent-ils des distances de développement comprises entre 10 et 20 cm, parcourues en 20 à 120 minutes suivant la viscosité du solvant.

L'emploi de la technique descendante, envisagé par NIEDERWIESER ET PATAKI¹⁴, peut éventuellement contribuer à augmenter les distances de développement utilisables. Un effet plus prononcé dans ce sens pourrait être réalisé par la mise au point d'une méthode centrifuge analogue à celle utilisée en chromatographie sur papier¹⁵.

Il est recommandé de faciliter la saturation de l'atmosphère des cuves de développement, par exemple en recouvrant partiellement leurs parois intérieures de papier-filtre trempant dans le solvant. On améliore ainsi la reproductibilité des valeurs de R_F , supprime l'"effet de bord"^{10,25} (augmentation anormale des valeurs de R_F dans les zones marginales des plaques), et augmente la rapidité du développement.

Nous mentionnerons dans les chapitres 2 et 3, sous chaque rubrique spécialisée, les différentes techniques permettant la révélation des microchromatogrammes des substances incolores.

(f) *Conservation, mise en archives des microchromatogrammes*

La méthode la plus précise et la plus pratique consiste à photographier les microchromatogrammes en lumière transmise puis à les classer sous forme de diapositives couleur 24 × 36.

La photographie en noir et blanc convient aussi, spécialement en lumières transmises et réfléchiées combinées², de même que les autres procédés d'usage courant en chromatographie sur papier (photocopie, dessin, etc.).

On peut enfin "fixer" les plaques dans la paraffine⁵ et les conserver ainsi.

2. SÉPARATIONS PAR ADSORPTION

(Substances liposolubles)

Il est de règle d'utiliser, pour la séparation des corps liposolubles, des chromatoplaques fortement activées par un chauffage à 100–140° durant 30 à 120 minutes. Les manipulations s'effectuent autant que possible à l'abri de l'humidité atmosphérique.

(a) *Mono-, di-, tri- et tétraterpénoïdes*

Dans la classe des terpènes monocycliques, une intéressante étude a été faite par PETROWITZ¹⁶ sur la séparation des menthols. Les épimères dont l'hydroxyle est équatorial (menthol, isomenthol) sont les plus fortement retenus par l'acide silicique. La configuration du groupe méthyle n'exerce de son côté que peu d'effet, d'où l'impossibilité de séparer le menthol de l'isomenthol ou le néomenthol du néoisomenthol. Ces résultats montrent que l'adsorption sur l'acide silicique s'effectue par la fonction hydroxyle, les valeurs de R_F reflétant le degré d'empêchement stérique de celle-ci. On peut rappeler ici que les épimères axiaux des stéroïdes hydroxylés sont généralement aussi les moins adsorbés¹⁷ lorsque le processus chromatographique implique la participation de liaisons hydrogène (chromatographie sur papier).

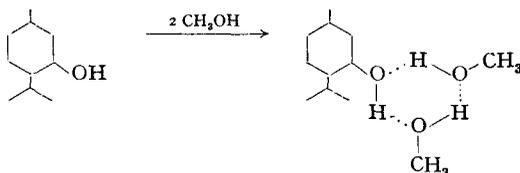
Le Tableau I résume le comportement des menthols sur chromatoplaque.

TABLEAU I
CHROMATOGRAPHIE DES MENTHOLS SUR COUCHE SILICIQUE
D'APRÈS PETROWITZ¹⁶

	Valeurs de R_F (× 100)			
	A	B	C	D
Menthol	16	36	67	90
Isomenthol	17	37	62	91
Néomenthol	28	51	73	85
Néoisomenthol	29	55	76	80

Solvants: A = benzène; B = benzène-méthanol (95:5); C = benzène-méthanol (75:25); D = méthanol; trajet de développement: 10–12 cm (50 min); révélation: par l'action de $SbCl_5$ à 20% dans CCl_4 .

L'inversion remarquable des valeurs de R_F en présence du méthanol suggère que celui-ci s'associe avec les menthols, particulièrement avec les épimères équatoriaux, les "complexes" ainsi formés devant avoir une adsorbabilité relativement diminuée. On peut par exemple écrire :



Une application de la microchromatographie sur couches minces dans le domaine synthétique a été mentionnée par MARBET ET SAUCY¹⁸. Ces auteurs parviennent, grâce à cette méthode, à mettre en évidence l'existence d'un cétal acétylénique particulièrement instable, intermédiaire dans une synthèse de la pseudo-ionone.

Dans le domaine des diterpénoïdes, DEMOLE ET LEDERER^{19,1} ont décrit la séparation du phytol, de l'isophytol, du géranyl-linalol et de l'acétate de phytyle naturels sur acide silicique. Le développement s'effectue avec le mélange hexane-acétate d'éthyle (85:15, v/v) et la révélation par l'action d'une solution aqueuse de permanganate de potassium à 0.25% (taches brunes sur fond blanc). On constate l'ordre suivant des valeurs de R_F :

acétate de phytyle > isophytol > géranyl-linalol > phytol

Cette séquence suggère que l'adsorption s'effectue principalement par les groupes hydroxyles et secondairement par les doubles liaisons.

Dans la classe des triterpénoïdes, THOMAS ET MÜLLER²⁰ ont contrôlé sur chromatoplaques siliciques le degré de pureté des esters méthyliques des acides triterpéniques de *Commiphora glandulosa* Schinz. L'éluant est un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle (4:1) et le révélateur l'acide sulfurique concentré.

TSCHESCHE ET SEN GUPTA²¹ ont également utilisé les chromatoplaques pour examiner la pureté des esters de deux nouveaux acides triterpéniques de la série de la β -amyrine présents dans *Bredemeyera floribunda* Willd. Les résultats obtenus, favorables, ont incité TSCHESCHE *et al.*²² à étudier de plus près les possibilités d'emploi des chromatoplaques siliciques pour l'analyse rapide des triterpénoïdes. Le comportement de 23 acides triterpéniques et de 16 triterpénoïdes neutres (esters, alcools, hydrocarbures) dans 9 systèmes de solvants démontre clairement que la méthode permet d'intéressantes séparations dans ces séries. TSCHESCHE *et al.*²² soulignent particulièrement les avantages suivants des chromatoplaques :

(1) Le temps nécessaire pour effectuer une séparation est de 20 à 30 minutes.

(2) La méthode convient à la séparation des triterpénoïdes neutres et acides, alors que la chromatographie sur papier n'est habituellement satisfaisante que pour les seconds.

(3) La révélation des triterpénoïdes s'effectue avec une extrême sensibilité (0.02 μg pour l'acide oléanolique) par l'acide chlorosulfonique⁶.

(4) Les chromatoplaques peuvent être utilisées pour l'analyse des mélanges très complexes aussi bien que pour des tests de pureté ou l'examen rapide du résultat de réactions chimiques.

Les séparations décrites par TSCHESCHE *et al.*²² ont été obtenues sur couches de silicagel "G" (Merck) en présence, notamment, de benzène, cyclohexane, chlorure de méthylène (pour les triterpénoïdes neutres) et des mélanges éther di-isopropylique-acétone (5:2), acétate d'éthyle-méthanol-diéthylamine (14:4:3), etc. (pour les triterpénoïdes acides). Parmi les substances chromatographiées nous trouvons les acides oléanolique, ursolique, bétulique, leurs esters, le lanostérol, la β -amyrine, etc. La reproductibilité des valeurs de R_F est satisfaisante si l'on effectue chaque microchromatogramme en présence d'une substance standard (par exemple l'acide oléanolique) permettant la correction des chiffres obtenus.

Le seul insuccès rencontré par TSCHESCHE *et al.*²² concerne les acides oléanolique, ursolique et bétulique qui possèdent les mêmes valeurs de R_F et doivent être séparés au moyen d'une technique complémentaire spéciale utilisant un papier échangeur d'anions (Schleicher & Schüll).

La séparation de quelques caroténoïdes sur chromatoplaques siliciques en présence du mélange hexane-éther diéthylique (3:7, v/v) a été décrite par DEMOLE¹. Valeurs de R_F : β -carotène 0.96; canthaxanthine 0.38; zéaxanthine 0.17; isozéaxanthine 0.63; bixine 0.51.

ISLER *et al.*²³ ont d'autre part décrit le comportement de β -apocaroténals (C_{25} - C_{40}) et β -apocaroténoates de méthyle (C_{27} - C_{40}) sur un adsorbant spécial (mélange $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -silicagel "G" (Merck), 6:1).

STAHL^{10,24} a également mentionné l'usage de chromatoplaques pour la séparation de caroténoïdes.

(b) Stéroïdes

La microchromatographie d'acides biliaires et d'autres stéroïdes a été mentionnée par STAHL^{24,25} avec peu de détails expérimentaux.

BARBIER *et al.*³ ont utilisé les chromatoplaques siliciques pour l'analyse de stéroïdes peu polaires et obtenu des séparations qui n'avaient pu être réussies sur papier. Leur technique, classique, utilise le silicagel "G" (Merck) et des mélanges d'acétate d'éthyle et de cyclohexane en proportions variables comme solvants. Après deux heures de développement (parcours du front du solvant de 175 mm environ), les chromatogrammes sont révélés par SbCl_3 en solution chloroformique, par l'acide phosphomolybdique ou, dans le cas des cétones stéroïdes, par une solution acide de 2,4-dinitrophénylhydrazine. BARBIER *et al.*³ donnent les valeurs de R_F de 22 stéroïdes peu polaires (il s'agit principalement de cétones, esters, alcools et époxydes 3β - et 3α -acétoxylés). Comme pour les triterpénoïdes vus précédemment, les séparations doivent être effectuées en présence d'un témoin permettant la correction des valeurs de R_F . Les chiffres obtenus sont constants de ± 0.05 à ± 0.1 près suivant les cas.

Dans le cas des stéroïdes polaires (comme pour les substances polaires en général) on obtient de meilleurs résultats en utilisant des chromatoplaques partiellement désactivées par un séjour à l'air libre. On se rapproche ainsi des conditions d'une chromatographie de partage, l'eau adsorbée fonctionnant comme phase stationnaire. BARBIER *et al.*³ ont appliqué ce principe à la séparation des acides cholique ($R_F = 0.32$) et désoxycholique ($R_F = 0.62$) en présence d'acétate d'éthyle.

On peut identifier certains stéroïdes en observant, sous lumière ordinaire ou ultra-violette, le nuancement plus ou moins spécifique de la réaction colorée produite par le $SbCl_3$. Ceci permet aussi la différenciation de stéroïdes qui possèdent des valeurs de R_F presque identiques.

VAN DAM *et al.*²⁶ ont mis au point la séparation du cholestérol, d'esters de cholestérol, de cholestérols et de quelques 3β -acétoxy-cétones stéroïdes. Leur technique permet d'examiner rapidement et commodément les produits complexes résultant de la dégradation oxydative de la chaîne latérale du cholestérol. En 90 minutes, certains mélanges ont été fractionnés en plus de 20 composants, dont plusieurs identifiés avec certitude. Les chromatoplaques sont à base de silicagel, le développement étant assuré par des mélanges de benzène, toluène, cyclohexane et acétate d'éthyle. Après un parcours du front du solvant d'environ 18 cm (40 à 100 minutes), les stéroïdes sont révélés par $SbCl_3$ (taches de couleurs variées). Les valeurs de R_F de 17 d'entre eux ont été déterminées dans 13 solvants.

Le comportement de 13 cardénolides et dérivés sur chromatoplaques siliciques a été décrit par TSCHESCHE *et al.*⁶. Après 10 à 30 minutes de développement (dans l'acétate d'éthyle ou l'acétate de butyle), les plaques subissent une révélation au moyen du mélange acide acétique-acide chlorosulfonique (2:1). Cette réaction, particulièrement sensible, donne des taches vertes à fluorescence brun-violet dans l'ultra-violet.

TSCHESCHE ET SNATZKE²⁷ ont encore utilisé les chromatoplaques pour séparer 13 autres stéroïdes (cholestérol, β -sitostérol, 5α -prégnanedione-3,20, 14^4 -prégnènetrione-3,6,20, etc.). Le développement s'effectue avec des solvants moins polaires que dans le cas des cardénolides (éther di-isopropylique, mélange éther di-isopropylique-acétate d'éthyle (5:2), benzène). Les auteurs soulignent une nouvelle fois la remarquable sensibilité de la révélation par l'acide chlorosulfonique⁶ qui leur permet de déceler jusqu'à 0.025 μ g de cholestérol sur un microchromatogramme développé (en série triterpénique, le seuil de sensibilité est de 0.02 μ g pour l'acide oléanolique).

Pour terminer, mentionnons encore un travail de BARBIER ET ZAV'YALOV²⁸ concernant la séparation des stéroïdes oestrogènes sur chromatoplaques.

(c) Huiles essentielles, peroxydes

STAHL^{2,29} a examiné certaines huiles essentielles sur chromatoplaques siliciques avec, généralement, le benzène comme solvant. Pour révéler les microchromatogrammes, il recourt à l'action de $SbCl_3$ ou mieux de $SbCl_5$ (réactif universel pour les terpènes), au test brome-fluorescéine³⁰ (pour les substances insaturées) et à l'effet de masquage de fluorescence³⁰ (pour les substances absorbant suffisamment dans l'ultra-violet).

Dans le cas des huiles essentielles contenant des peroxydes, ceux-ci peuvent être détectés au moyen de tests au sulfocyanure ferrique ou à l'iodure de potassium^{31,32}.

WINKLER ET LUNAU³³ ont différencié sur chromatoplaque les huiles essentielles de *Curcuma xanthorrhiza* et *Curcuma longa*.

PRYOR ET BRYANT⁷ ont étudié la composition d'huiles essentielles d'espèces hybrides d'*Eucalyptus* au moyen de la chromatographie radiale sur magnésol (silicate hydraté de magnésium; l'acide silicique donnerait de moins bons résultats dans ce cas particulier). Après développement (30 minutes) avec le système hexane-acétate d'éthyle (85:15, v/v), les chromatogrammes circulaires sont révélés par l'acide sulfurique concentré ou examinés en lumière ultra-violette. A l'exception du *p*-cymène et des pinènes, la plupart des composants des essences d'*Eucalyptus* donnent des réactions caractéristiques avec l'acide sulfurique.

On doit à STAHL ET TRENNHEUSER³⁴ une démonstration de l'intérêt que peut présenter, notamment pour l'étude d'huiles essentielles, l'utilisation combinée de la chromatographie gaz-liquide et de la microchromatographie sur couches minces.

FRYDMAN *et al.*³⁵ ont également utilisé les chromatoplaques pour l'examen direct et systématique d'huiles essentielles.

(d) *Pyréthrines, coumarines, mono- et polyphénols, quinones*

STAHL³⁶ a mis à contribution les avantages de la microchromatographie sur couches minces pour étudier le réarrangement des pyréthrinés en lumi-pyréthrinés inactives sous l'effet de la lumière. Sa technique, dite "séparation-réaction-séparation", est inspirée des tests microchimiques sur "chromatostrips" décrits par MILLER ET KIRCHNER³⁷. Elle consiste à soumettre un microchromatogramme unidimensionnel à l'action de certains réactifs (gaz, rayonnements), puis à le développer dans la seconde dimension afin de mettre en évidence les nouveaux produits éventuellement formés.

BERNHARD³⁸ a détecté au moyen de "chromatostrips" la présence, dans le jus de citron, de huit analogues fluorescents de la coumarine et proposé une identité (basée sur les valeurs de R_F et les spectres d'absorption ultra-violette) pour cinq d'entre eux.

La même technique a permis à LYMAN *et al.*³⁹ d'étudier la méthylation séquentielle de l'acide β -résorcylique. L'examen du produit en cours de méthylation, sur "chromatostrips" fluorescents, permet de suivre et d'interrompre judicieusement la réaction afin d'obtenir le dérivé désiré. La méthylation de l'acide β -résorcylique en milieu alcalin livre d'abord l'ester correspondant, ensuite le dérivé méthylé en 4 puis diméthylé en 2,4. Dans cette série, le solvant utilisé est un mélange éther diéthylique-skellysolve B* (7:3). LYMAN *et al.*³⁹ ont donné les valeurs de R_F de 26 mono- et polyphénols déterminées dans trois systèmes de solvants et indiqué les couleurs de fluorescence de ces substances à 254 m μ .

STAHL¹⁰ a également mentionné la microchromatographie de quelques phénols et dérivés (eugénol, pyrocatechine et éthers correspondants, safrol).

* Éther de pétrole bouillant à 66-67°.

BARBIER⁴⁰ a obtenu une excellente séparation des *p*-benzoquinones substituées, sur couches siliciques désactivées, en présence de mélanges de benzène ou d'hexane avec l'acétate d'éthyle. Cet auteur recommande l'usage des chromatoplaques pour la recherche préliminaire des *p*-benzoquinones naturelles et indique les valeurs de R_F suivantes (*n*-hexane-acétate d'éthyle, 85:15): *p*-benzoquinone 0.21; méthyl-*p*-benzoquinone 0.43; éthyl-*p*-benzoquinone 0.58; méthyl-2 diméthoxy-5,6 *p*-benzoquinone 0.47; dihydroxy-2,5 *n*-undécyl-3 *p*-benzoquinone 0.62.

(e) *Dérivés d'acides aminés, alcaloïdes et autres substances azotées*

Les phénylthiohydantoïnes des acides aminés N-terminaux, résultant de la dégradation des peptides d'après EDMAN, peuvent être identifiées sur chromatoplaques siliciques. CHERBULIEZ *et al.*⁴¹ ont donné des exemples de séparations en soulignant la sensibilité remarquable de la méthode. On peut en effet obtenir de bons résultats à partir de 0.01 μ mole de di- ou tripeptides, ce seuil étant 10 à 20 fois plus élevé en chromatographie sur papier. Le solvant utilisé pour séparer les phénylthiohydantoïnes de la glycine, de la proline et de la leucine, est un mélange heptane-pyridine-acétate d'éthyle (5:3:2, v/v). La révélation des chromatogrammes (développés en 30 minutes environ) s'effectue par pulvérisation d'une solution aqueuse d'amidon suivie d'un réactif à l'iode et azoture de sodium. Les phénylthiohydantoïnes apparaissent en blanc sur fond brun.

SCHLEMMER ET LINK⁴² ont caractérisé la réserpine, la rescinnamine et la serpentine par microchromatographie sur silicagel de divers extraits de *Rauwolfia*. Ces alcaloïdes sont détectés en lumière ultra-violette et dosés spectrophotométriquement après micro-élution des taches (découpées au rasoir).

FIORI ET MARIGO⁴³ ont identifié le méprobamate (drogue tranquillisante) dans les urines par microchromatographie silicique en présence du mélange cyclohexane-éthanol absolu (85:15). Après un développement de deux heures (parcours du front du solvant: 10 à 11 cm), les chromatoplaques subissent une légère pulvérisation d'acide sulfurique concentré, un chauffage de 2 à 3 minutes à 110-115°, une nouvelle légère pulvérisation d'eau et un nouveau chauffage de plusieurs minutes, jusqu'à l'apparition des taches jaunes du méprobamate ($R_F = 0.30$). Des déterminations colorimétriques peuvent être effectuées après découpage et élution des taches.

MACHATA⁴ a introduit les chromatoplaques dans le domaine de l'analyse toxicologique où leur emploi semble prometteur par rapport à la chromatographie classique sur papier (économie de temps, simplicité de la méthode et faculté d'effectuer aisément des séparations à l'échelle de quelques milligrammes). Cet auteur décrit le comportement chromatographique d'un certain nombre d'alcaloïdes (pavérine, narcotine, codéine, morphine, etc.) et d'autres substances intéressant le domaine toxicologique. Il développe les chromatogrammes des substances basiques avec le méthanol et acides avec le mélange chloroforme-éther diéthylique (85:15). La révélation peut s'effectuer avec le réactif de Dragendorff ou le mélange acide acétique-iode-iodure de potassium pour les alcaloïdes, par le réactif de Zwikkers pour les barbiturates, le chlorure ferrique en solution acétique pour les pyrazolones

etc. Les alcaloïdes de l'opium peuvent de plus être différenciés par l'action du réactif de Marquis, trop corrosif pour l'usage en chromatographie sur papier. Dans les cas où il n'existe aucune méthode particulière de révélation, on chauffe rapidement les chromatoplaques à 500° et observe les taches de carbonisation.

DEMOLE¹ a chromatographié certains pigments tétrapyrroliques sur acide silicique en présence du mélange benzène-acétate d'éthyle-éthanol (90:20:7.5, v/v) et observé les valeurs de R_F suivantes: coproporphyrine I (ester méthylique) 0.68; coproporphyrine III (e.m.) 0.63; uroporphyrine I (e.m.) 0.33; deutéroporphyrine (e.m.) 0.80; protoporphyrine (e.m.) 0.85; bilirubine 0.92; biliverdine 0.06.

La séparation d'autres substances azotées a été mentionnée par STAHL¹⁰ (alcaloïdes de l'ergot de seigle, diphénylamine, carbazol, indol).

Pour l'analyse de vitamines du groupe B, voir le paragraphe suivant.

(f) Vitamines

L'adaptation des chromatoplaques à la séparation de vitamines du groupe B (B_1 , B_2 , B_6 , nicotinamide, biotine, pantothénate de calcium) et de la vitamine C a été réalisée par GÄNSHIRT ET MALZACHER⁴⁴. La microchromatographie s'effectue sur une couche de silicagel "G" (Merck) contenant 2% d'un indicateur fluorescent* en présence du mélange acide acétique-acétone-méthanol-benzène (5:5:20:70). Le développement, unidimensionnel (distance de migration: 19 cm), est réalisé à l'abri de la lumière. Chaque mélange examiné doit être chromatographié à double (deux taches de départ) afin de permettre l'exécution des trois réactions de révélation décrites ci-dessous.

On examine tout d'abord les microchromatogrammes sous éclairage ultra-violet de grande longueur d'onde (366 m μ), qui ne provoque pas la fluorescence de l'indicateur incorporé. La vitamine B_2 ($R_F = 0.35$) apparaît sous forme d'une tache fluorescente jaune sur un fond sombre. Passant à l'éclairage ultra-violet de courte longueur d'onde (254 m μ) on détecte, sur les plaques devenues fluorescentes, les taches sombres correspondant aux vitamines B_1 ($R_F = 0$), C ($R_F = 0.30$) et à la nicotinamide ($R_F = 0.65$). Pour identifier la biotine, on pulvérise une solution d'iodo-platinate de potassium sur l'un des microchromatogrammes (l'autre étant protégé par un cache). La biotine ($R_F = 0.86$) forme alors une tache blanche sur fond rose (simultanément, la vitamine B_1 apparaît en gris, la nicotinamide en jaune pâle et la vitamine C en jaune). Pour rechercher la vitamine B_6 et le pantothénate de calcium, on pulvérise sur la partie inférieure du second microchromatogramme (jusqu'alors protégé par le cache) une solution à 0.1% de dichloroquinone-chloroimide dans l'éthanol puis expose aux vapeurs ammoniacales. La vitamine B_6 ($R_F = 0.15$) apparaît en bleu. On chauffe ensuite la plaque 1/2 heure à 160° puis pulvérise une solution de ninhydrine à 0.5% dans l'éthanol sur la partie supérieure du même chromatogramme. Après un bref chauffage à 160°, le pantothénate de calcium ($R_F = 0.57$) apparaît sous forme de tache violette.

* "ZS-Super" de Riedel de Haen.

Sensibilité de la méthode: 1 à 10 μg pour les vitamines du groupe B et 5 à 30 μg pour la vitamine C.

(g) *Antioxydants, plastifiants*

SEHER⁴⁵ a trouvé que l'usage des chromatoplaques simplifie la recherche et l'identification des antioxydants. Il pulvérise uniformément, sur les microchromatogrammes développés, une solution méthanolique à 20% d'acide phosphomolybdique puis, après une ou deux minutes, expose les plaques au contact de vapeurs ammoniacales. Les antioxydants apparaissent sous forme de taches bleues, violettes ou vertes sur fond blanc. Pour révéler les antioxydants peu réactifs, il peut être nécessaire de chauffer les plaques à 120° durant 10 minutes. Une autre méthode de révélation consiste en une aspersion de 2,6-dichloroquinone-chloroimide (en solution alcoolique) suivie de borax (dans le même solvant). Les colorations produites sont caractéristiques et l'auteur les décrit pour 24 antioxydants.

COPIUS PEEREBOOM⁴⁶ a utilisé les chromatoplaques pour le contrôle des plastifiants présents dans certains emballages pour denrées alimentaires. Les séparations se font sur silicagel en présence de 0.005% d'un indicateur fluorescent*. Les microchromatogrammes, développés avec l'un des mélanges isooctane-acétate d'éthyle (9:1), benzène-acétate d'éthyle (95:5) ou éther dibutylique-hexane (80:20), sont examinés en lumière ultra-violet (365 m μ). Les plastifiants apparaissent sous forme de taches fluorescentes ou, dans le cas des phtalates, de taches sombres. La reproductibilité des valeurs de R_A ($R_A = R_F$ par rapport au sébaçate de dibutyle) paraît satisfaisante pour les 16 produits étudiés (limites de fluctuation ± 0.06). Certains réactifs donnant des réactions colorées plus ou moins spécifiques peuvent faciliter l'identification des plastifiants, surtout dans le cas de trois "paires critiques" de valeurs de R_F très voisines (phosphate de tricrésyle + butyl-phtalyl-butyl glycolate, phosphate de tricrésyle + phosphate de 2-éthylhexyle diphényle; ce dernier + acétylcitrate de tributyle). Parmi ces réactifs, on peut mentionner l'acide phosphomolybdique, la 2,6-dichloroquinone-chloroimide, le permanganate de potassium, la *p*-nitroaniline diazotée, etc. Les valeurs de R_A et les réactions colorées permettent d'identifier, dans la plupart des cas, les plastifiants d'un mélange inconnu. Toutefois, certains de ceux-ci, par exemple le Paraflex G62, de composition complexe, donnent une série de taches pouvant entraver sérieusement l'identification des autres substances éventuellement présentes.

(h) *Divers*

STAHL^{24,25} a parfaitement bien démontré l'intérêt que présente la microchromatographie sur couches minces dans les domaines pharmaceutique (contrôles de résines, baumes et goudrons médicinaux) et cosmétologique (contrôles de matières premières: huiles essentielles, parfums, baumes, résinoïdes, graisse de laine et dérivés, colorants liposolubles, etc.).

* Par exemple "Ultraphor", Badische Anilin & Soda Fabrik.

Les chromatoplaques peuvent également permettre le contrôle d'excipients pour médicaments⁴⁷ et l'étude de lipides⁴⁸.

3. SÉPARATIONS PAR PARTAGE

(Substances hydrosolubles)

(a) Généralités

La microchromatographie de partage sur couches minces s'effectue le plus souvent sur silicagel désactivé et en présence de solvants aqueux.

NIEDERWIESER ET PATAKI¹⁴ ont fort bien défini les avantages présentés par cette technique pour la séparation des acides aminés, peptides et dérivés. Comparant un chromatogramme bi-dimensionnel d'acides aminés sur papier avec le même (solvants et dimensions identiques) effectué sur silicagel, ces auteurs soulignent :

1. La diffusibilité relativement réduite des substances dans la couche silicique. Les taches obtenues étant très petites, les séparations sont meilleures et la méthode devient dix fois plus sensible que la chromatographie sur papier.

2. L'obtention d'une séparation incomplète de dix acides aminés sur papier (après un développement de dix centimètres dans chacune des dimensions), alors que quatorze de ceux-ci se séparent complètement sur acide silicique.

Solvants : (a) *n*-butanol-acide acétique-eau (60:20:20) ; (b) phénol-eau (75:25, poids).

3. La durée du développement pour une dimension, réduite à 1 1/2-2 h sur chromatoplaque.

Les chromatoplaques siliciques possèdent de plus une excellente sélectivité. La séparation de peptides isomères, par exemple glycyl-leucine et leucyl-glycine, s'effectue facilement.

De bons résultats peuvent aussi être obtenus là où la chromatographie sur papier réussit difficilement, notamment dans le cas des substances à groupe-SH libre (dérivés de la cystine). Les chromatoplaques permettent en outre la séparation des dérivés dinitrophénylés d'acides aminés et par conséquent l'analyse séquentielle des peptides. La micro-élution des taches s'effectue en découpant l'adsorbant à l'endroit voulu, épuisant avec un solvant convenable, puis filtrant. On ne peut utiliser l'eau pour cette opération lorsque les couches siliciques sont "liées" avec du plâtre (légèrement soluble). On doit alors utiliser, par exemple, le *n*-butanol ou l'acide acétique.

La révélation s'effectue à l'aide de réactifs corrosifs (acide sulfurique concentré, etc.) aussi bien qu'avec ceux habituellement utilisés en chromatographie sur papier (ninhydrine, etc.). Les taches colorées pâlisent souvent assez rapidement et ceci oblige à prendre immédiatement une copie des microchromatogrammes.

En lumière ultra-violette, les couches siliciques (silicagel "G", Merck) présentent un "fond" d'absorption qui gêne la détection des petites quantités d'acide aminés aromatiques. On peut partiellement remédier à cet inconvénient en pulvérisant une solution de fluorescéine à 10⁻⁴% sur les microchromatogrammes. L'usage d'adsorbants autres que le silicagel "G" (Merck) permettrait éventuellement de supprimer les désavantages inhérents à ce "fond" d'absorption et à la présence de plâtre.

La reproductibilité des valeurs de R_F (technique ascendante) dépend beaucoup du degré de saturation de l'atmosphère de la cuve de développement; aussi recommande-t-on de disposer contre les parois de celle-ci des feuilles de papier-filtre trempant dans la phase mobile. L'emploi d'une technique de développement descendante, proposé par NIEDERWIESER ET PATAKI¹⁴, pourrait éliminer ce genre de difficulté.

(b) *Acides aminés*

MUTSCHLER ET ROCHELMMEYER⁴⁹ ont effectué la chromatographie bi-dimensionnelle de 14 acides aminés sur silicagel en présence d'un tampon phosphate, avec de l'éthanol à 70% et le mélange éthanol-ammoniacal à 25% (4:1, v/v) comme solvants. La très belle séparation obtenue a été confirmée par BRENNER ET NIEDERWIESER⁵⁰ qui ont étudié avec un soin particulier l'applicabilité des chromatoplaques à l'analyse des acides aminés.

Ces derniers auteurs constatent que, parmi les solvants habituellement utilisés en chromatographie sur papier, ceux riches en méthanol, éthanol ou acétone permettent souvent de bonnes séparations sur chromatoplaques mais donnent des taches relativement diffuses. On obtient, de loin, les meilleurs résultats par chromatographie bi-dimensionnelle avec les systèmes *n*-butanol-acide acétique-eau (60:20:20) et phénol-eau (75:25, poids).

Les couches siliciques utilisées pour la séparation des acides aminés ne doivent pas être activées à chaud, mais simplement séchées à la température ambiante et à l'air libre. On dépose les acides aminés (1 à 5 μg) à 0.8 cm les uns des autres sur une ligne située à 1.5 cm de la base des chromatoplaques (soit 20 substances par plaque de 20 \times 20 cm). Cette opération peut être effectuée à l'aide d'une micro-pipette ou de capillaires étirés par soi-même, la règle essentielle étant de ne pas déposer plus de 1 mm³ de solution à la fois afin que les taches initiales restent suffisamment petites. On stoppe habituellement le développement du microchromatogramme après un parcours du front du solvant d'environ 10 cm. Il n'y a guère d'avantage à utiliser de plus grands trajets, ceux-ci favorisant la diffusion des taches. Il est recommandé de couper l'adsorbant d'un trait de crayon, à 10 cm au-dessus de la ligne de départ, et d'interrompre le chromatogramme au moment exact où le solvant atteint ce repère. Les valeurs de R_F obtenues de la sorte sont reproductibles à ± 0.05 près (Tableau II). Si la cuve contient plusieurs plaques, on ne trace de trait que sur la première, puis, son développement étant terminé, on note le niveau atteint par le solvant sur chacune des autres. Ce mode opératoire s'impose car le niveau atteint par le solvant à la fin du développement peut différer légèrement d'une plaque à l'autre.

Les valeurs de R_F fluctuent, dans des limites ordinairement négligeables, suivant la quantité de substance chromatographiée. La grosseur des taches dépend bien entendu de ce même facteur et leur surface, dans une zone de concentrations moyennes (1 à 20 μg environ), est proportionnelle au log de la quantité de substance, comme en chromatographie sur papier.

Pour révéler les microchromatogrammes, on les sèche à 110° durant 10 minutes

TABLEAU II
 CHROMATOGRAPHIE DES ACIDES AMINÉS SUR COUCHE SILICIQUE
 D'APRÈS BRENNER ET NIEDERWIESER⁵⁰

	$R_F (\times 100)$			$R_F (\times 100)$	
	A	B		A	B
Tryptophane	56	63	Thréonine	25	26
Phénylalanine	49	55	Sérine	22	20
Norleucine	49	52	Glycine	22	24
Leucine	47	48	Hydroxy-proline	20	38
Isoleucine	46	49	Proline	19	50
Tyrosine	47	47	Sarcosine	17	37
Dioxyphénylalanine	45	34	Ac. glutamique	27	10
Méthionine	40	49	Ac. aspartique	21	06
Norvaline	38	42	Histidine-HCl	06	32
Valine	35	40	Lysine-HCl	05	09
Alanine	27	29	Arginine-HCl	08	19
β -Alanine	27	30	Cystine-HCl	16	12

Solvants: A = *n*-butanol-acide acétique-eau (60:20:20); B = phénol-eau (75:25, poids).

puis les soumet à une pulvérisation soignée du réactif à la ninhydrine modifié par MOFFAT ET LYTLE⁵¹. On chauffe à nouveau en suivant, par transparence, l'apparition graduelle des taches colorées. Il est souvent possible de différencier des acides aminés migrant presque ensemble, s'ils se révèlent initialement sous forme de taches extrêmement petites ne s'élargissant que progressivement. Les acides aminés se distinguent en outre par la plus ou moins grande rapidité de leur réaction avec la ninhydrine. Malgré ce comportement spécifique, les composants de certains mélanges ne peuvent être tous différenciés à coup sûr (par exemple: Phe + Leu + Ileu et Ser + Hypo + Gly).

L'avantage primordial de la chromatographie de partage des acides aminés sur couches minces réside dans l'économie de temps réalisée (4 à 5 heures pour un chromatogramme bi-dimensionnel contre 2 à 3 jours en chromatographie sur papier).

MOTTIER⁵ a étudié le comportement chromatographique d'acides aminés et d'hydrolysats protéiques sur plaque d'alumine. Sa technique, appliquée précédemment à l'analyse de colorants alimentaires, est caractérisée par le fait que les couches adsorbantes ne contiennent pas d'agent liant. L'alumine utilisée doit répondre à des critères de qualité et d'activation bien définis. Les acides aminés sont chromatographiés à l'état de sels de sodium (alcalinisation des taches de départ) en présence de 4 systèmes de solvants. Le meilleur de ceux-ci, le mélange *n*-butanol-éthanol-eau (60:40:40, v/v), conduit aux résultats résumés dans le Tableau III, la durée du développement étant de 8 heures.

Du fait de l'absence d'agent liant, les couches adsorbantes préparées d'après MOTTIER⁵ sont fragiles. On peut se demander si des chromatoplaques conventionnelles, évidemment moins délicates, ne pourraient les remplacer avec profit.

TABLEAU III
CHROMATOGRAPHIE DES ACIDES AMINÉS SUR COUCHE ALUMINIQUE,
D'APRÈS MOTTIER⁵

	$R_F (\times 100)^*$		$R_F (\times 100)^*$
Tryptophane	100	Hydroxy-proline	43.5
Proline	87	Histidine	39
Phénylalanine	87	Glycine	35
Norleucine	79	Thréonine	34
Isoleucine	75	Sérine	32.5
Leucine	71	Arginine	29
Norvaline	62	Ac. glutamique	29
Tyrosine	56.5	Cystine	29
Valine	55.5	Lysine	28
Méthionine	51	Cystéine	20.5
Alanine	47	Ac. aspartique	19.5
Carnosine	44.5		

* Valeurs de R_F relatives au tryptophane.

Solvant: *n*-butanol-éthanol-eau (60:40:40, v/v).

Note: il est intéressant de comparer ces chiffres à ceux du Tableau II.

(c) Ptéridines

NICOLAUS⁵² a utilisé les chromatoplaques siliciques pour l'examen de la pureté et la séparation micro-analytique de ptéridines. Sa méthode supporte avantageusement la comparaison avec la chromatographie classique sur papier. Certaines ptéridines, difficilement séparables au moyen de cette dernière, se laissent parfaitement chromatographier sur chromatoplaques.

Vingt-quatre systèmes de solvants (neutres, acides et basiques) ont été étudiés pour la séparation de 12 ptéridines. La chromatographie des amino-2 hydroxy-4 ptéridines à caractère neutre peut s'effectuer avec l'un quelconque de ces types de solvants, les meilleurs résultats étant cependant obtenus en milieu acide. Le mélange *n*-butanol-acide acétique-eau donne de bons résultats avec les ptéridines méthylées en position 6 ou 7. Dans le cas des amino-2 hydroxy-4 ptéridines portant des substituants acides, on utilise de préférence un milieu basique. La dihydroxy-2,4 ptéridine migre tout aussi bien en milieu neutre, acide ou basique.

Le développement des microchromatogrammes nécessite en moyenne 20 minutes (parcours du front du solvant: environ 10 cm) et la quantité nécessaire de ptéridines varie de 1 à 10 μg . L'identification est assurée par les valeurs relatives de R_F et par l'observation des couleurs de fluorescence dans l'ultra-violet, partiellement caractéristiques. Ce même nuancement dans la fluorescence permet la différenciation de ptéridines migrant presque ensemble.

L'oxyde d'aluminium ne semble guère convenir pour la séparation de ce genre de substances (adsorption trop forte).

(d) Ions minéraux

SEILER ET SEILER⁵³ ont pu adapter la chromatographie sur couches minces à la séparation de cations, non sans s'être heurtés à certaines difficultés préalables. Par exemple,

le silicagel "G" (Merck) contient du fer, fort gênant, et doit être soumis à une purification spéciale (lavages acides). D'autre part, les couches adsorbantes se dissocient au contact des solvants contenant trop d'eau, ceci oblige à effectuer les développements en milieu relativement peu polaire.

SEILER ET SEILER⁵³ préparent leurs chromatoplaques d'une manière conventionnelle, sans les activer à chaud. La séparation des cations du groupe H_2S (résultant du fractionnement analytique classique) s'effectue en présence du mélange *n*-butanol-HCl 1.5 *N*-acétyl-acétone (100:20:0.5, v/v), moyennant un développement de deux heures (12 à 14 heures en chromatographie sur papier). Celle du groupe $(NH_4)_2S$ s'effectue avec le mélange acétone-HCl concentré-acétyl-acétone (100:1:0.5, v/v), en 15 à 20 minutes (10 à 12 heures sur papier). Le rôle de l'acétyl-acétone (agent complexant) est de diminuer la "traînée" des taches.

Les valeurs de R_F absolues étant moins constantes qu'en chromatographie sur papier, on identifie les différents cations d'après leur ordre de distribution sur les chromatogrammes et leurs réactions colorées spécifiques.

La révélation des cations du groupe H_2S s'effectue en pulvérisant une solution de KI à 2% sur le chromatogramme. Après séchage, on porte la plaque au contact de vapeurs ammoniacales puis de H_2S . On observe les colorations indiquées dans le Tableau IV.

TABLEAU IV

Cations	Réactions caractéristiques	
	KI	H_2S
Hg ²⁺	rouge	brun-noir
Bi ³⁺	brun-jaune	brun-noir
Cd ²⁺		jaune
Pb ²⁺	jaune-brun	brun
Cu ²⁺	brun	brun foncé

Les valeurs de R_F décroissent de Hg²⁺ à Cu²⁺.

Pour révéler le groupe $(NH_4)_2S$, on plonge tout d'abord les chromatogrammes dans une atmosphère d'ammoniac puis les soumet à une pulvérisation d'une solution de 0.5 g d'hydroxy-8 quinoléine dans 100 cm³ d'éthanol à 60%. On termine par l'observation des taches en lumière ultra-violet (Tableau V).

TABLEAU V

Cations	Réactions caractéristiques		
	NH_3	Oxine	U.V.
Fe ³⁺		brun	foncé
Zn ²⁺		rose	jaune
Co ²⁺	bleu	jaune	foncé
Mn ²⁺		orangé	foncé
Cr ³⁺	vert		foncé
Ni ²⁺			foncé
Al ³⁺			jaune clair

Les valeurs de R_F décroissent de Fe³⁺ à Al³⁺.

4. CONCLUSIONS

Dans cette seconde revue, nous avons relaté les progrès essentiels réalisés par la microchromatographie sur couches minces entre 1958 et 1960. Cette méthode, introduite en 1951 par KIRCHNER *et al.*³⁰, perfectionnée par REITSEMA⁵⁴, normalisée par STAHL², se révèle aujourd'hui comme exceptionnellement universelle dans ses applications. Elle permet de séparer des substances indifféremment lipo- ou hydrosolubles, présente l'avantage d'une grande rapidité alliée à une excellente sélectivité et à une sensibilité souvent supérieure à celle de la chromatographie sur papier. Le matériel nécessaire en pratique, simple et peu coûteux, est actuellement commercialisé. On ne saurait trouver un indice plus sûr de l'intérêt général soulevé par cette méthode.

Le domaine d'application de la microchromatographie sur couches minces va probablement s'agrandir encore ces prochaines années, notamment en ce qui concerne la séparation des substances hydrosolubles (acides aminés, sucres et dérivés, etc.). On peut souhaiter que l'usage intensif de cette méthode stimulera l'étude théorique des relations existant entre le comportement chromatographique et la structure moléculaire des substances.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime sa vive reconnaissance au Dr. M. STOLL, Directeur scientifique, et à la Maison Firmenich & Cie, Genève, pour leur appui et approbation.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. DEMOLE, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 24; *Chromatographic Reviews*, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 1959, p. 1.
- ² E. STAHL, *Chem. Ztg.*, 82 (1958) 323.
- ³ M. BARBIER, H. JÄGER, H. TOBIAS ET E. WYSS, *Helv. Chim. Acta*, 42 (1959) 2440.
- ⁴ G. MACHATA, *Mikrochim. Acta*, (1960) 79.
- ⁵ M. MOTTIER, *Mitt. Gebiete Lebensm. u. Hyg.*, 49 (1958) 454; 47 (1956) 372.
- ⁶ R. TSCHESCHE, W. FREYTAG ET G. SNATZKE, *Ber.*, 92 (1959) 3053.
- ⁷ L. D. PRYOR ET L. H. BRYANT, *Proc. Linnean Soc. N.S. Wales*, 83 (1958) 55; *cf. Chem. Abstr.*, 53 (1959) 3397 f; L. H. BRYANT, *Nature*, 175 (1955) 556.
- ⁸ K. TEICHER, E. MUTSCHLER ET H. ROCHELMMEYER, Mitteilung: Die Plattenchromatographische Untersuchung von Naturstoffgemischen; Symposium: *Moderne Methoden der Analyse organischer Verbindungen*, München, 1960.
- ⁹ H. BROCKMANN ET H. SCHODDER, *Ber.*, 74 (1941) 73. Modifié par Merck, *Chromatographie S 12*, Darmstadt, 1956.
- ¹⁰ E. STAHL, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 411.
- ¹¹ A. H. SPORER ET K. N. TRUEBLOOD, *J. Chromatog.*, 2 (1959) 499; J. J. WREN, *J. Chromatog.*, 4 (1960) 173.
- ¹² H. GRASSHOF, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 285.
- ¹³ T. FURUKAWA, *Nippon Kagaku Zasshi*, 80 (1959) 45; *cf. Chem. Abstr.*, 54 (1960) 4107f.
- ¹⁴ A. NIEDERWIESER ET G. PATAKI, *Chimia (Switz.)*, 14 (1960) 378.
- ¹⁵ H. J. McDONALD, L. P. RIBEIRO ET L. J. BANASZAK, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 825.
- ¹⁶ H. J. PETROWITZ, *Angew. Chem.*, 72 (1960) 921.
- ¹⁷ R. NEHER, *Chromatographic Reviews*, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, p. 184; *J. Chromatog.*, 1 (1958) 249.
- ¹⁸ R. MARBET ET G. SAUCY, *Chimia (Switz.)*, 14 (1960) 362.
- ¹⁹ E. DEMOLE ET E. LEDERER, *Bull. soc. chim. France*, (1958) 1128; E. DEMOLE, *Thèse de Doctorat*, Paris, 1958.
- ²⁰ A. F. THOMAS ET J. M. MÜLLER, *Experientia*, 16 (1960) 62.

- ²¹ R. TSCHESCHE ET A. K. SEN GUPTA, *Ber.*, 93 (1960) 1903.
²² R. TSCHESCHE, F. LAMPERT ET G. SNATZKE, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 217.
²³ O. ISLER, R. RÜEGG ET P. SCHUDEL, *Chimia (Switz.)*, 15 (1961) 208.
²⁴ E. STAHL, *Parfümerie u. Kosmetik*, 39 (1958) 564.
²⁵ E. STAHL, *Pharm. Rundschau*, 1, Heft 2 (1959)
²⁶ M. J. D. VAN DAM, G. J. DE KLEUVER ET J. C. DE HEUS, *J. Chromatog.*, 4 (1960) 26.
²⁷ R. TSCHESCHE ET G. SNATZKE, *Ann.*, 636 (1960) 105.
²⁸ M. BARBIER ET S. I. ZAV'YALOV, *Izvest. Akad. Nauk S.S.S.R., Otdel. Khim. Nauk*, (1960) 1309;
cf. Current Chem. Papers, No. 11 (1960) 834.
²⁹ H. D. WULFF ET E. STAHL, *Naturwiss.*, 47 (1960) 114; voir aussi CH. BRIESKORN ET E. WENGER,
Arch. Pharm., 293 (1960) 21.
³⁰ J. G. KIRCHNER, J. M. MILLER ET G. J. KELLER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 420.
³¹ C. D. WAGNER, R. M. SMITH ET E. D. PETERS, *Anal. Chem.*, 19 (1947) 979.
³² K. TÄUFEL ET B. VOGEL, *Ref. Pharm. Zentralhalle*, 94 (1955) 285.
³³ W. WINKLER ET E. LUNAU, *Pharm. Ztg.*, 104 (1959) 1407.
³⁴ E. STAHL ET L. TRENNHEUSER, *Arch. Pharm.*, 293 (1960) 826.
³⁵ B. J. FRYDMAN, A. L. MONTES ET A. TROPAREVSKY, *Anales asoc. quim. arg.*, 45 (1957) 248;
cf. Chem. Abstr., 52 (1958) 17622c.
³⁶ E. STAHL, *Arch. Pharm.*, 293 (1960) 531.
³⁷ J. M. MILLER ET J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1107.
³⁸ R. A. BERNHARD, *Nature*, 182 (1958) 1171.
³⁹ R. L. LYMAN, A. L. LIVINGSTON, E. M. BICKOFF ET A. N. BOOTH, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 756.
⁴⁰ M. BARBIER, *J. Chromatog.*, 2 (1959) 649.
⁴¹ E. CHERBULIEZ, B. BAEHLER ET J. RABINOWITZ, *Helv. Chim. Acta*, 43 (1960) 1871.
⁴² F. SCHLEMMER ET E. LINK, *Pharm. Ztg.*, 104 (1959) 1349.
⁴³ A. FIORI ET M. MARIGO, *Nature*, 182 (1958) 943.
⁴⁴ H. GÄNSHIRT ET A. MALZACHER, *Naturwiss.*, 47 (1960) 279.
⁴⁵ A. SEHER, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 61 (1959) 345.
⁴⁶ J. W. COPIUS PEEREBOOM, *J. Chromatog.*, 4 (1960) 323.
⁴⁷ H. LIEBICH, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 99 (1959) 1246; 100 (1960) 393.
⁴⁸ H. K. MANGOLD, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 61 (1959) 879.
⁴⁹ E. MUTSCHLER ET H. ROCHELMAYER, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 449; voir aussi E. NÜRNBERG,
Arch. Pharm., 292 (1959) 617.
⁵⁰ M. BRENNER ET A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 16 (1960) 378.
⁵¹ E. D. MOFFAT ET R. I. LYTLE, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 926.
⁵² B. J. R. NICOLAUS, *J. Chromatog.*, 4 (1960) 384.
⁵³ H. SEILER ET M. SEILER, *Helv. Chim. Acta*, 43 (1960) 1939.
⁵⁴ R. H. REITSEMA, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 960; *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 43 (1954) 414.

NOTE AJOUTÉE DURANT LA CORRECTION DES ÉPREUVES

Les références supplémentaires suivantes, venant de parvenir à notre connaissance, doivent encore être mentionnées:

(a) *Analyse de mélanges complexes de lipides par chromatographie sur couches minces et méthodes complémentaires*

D. C. MALINS ET H. K. MANGOLD, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 37 (1960) 576; *cf. Current Chem. Papers*, No. 1 (1961) 60.

(b) *Séparation de lipides*

H. P. KAUFMANN ET Z. MAKUS, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 62 (1960) 1014.

(c) *Analyse de mélanges de tocophérols à l'aide de la chromatographie sur couches minces*

A. SEHER, *Mikrochim. Acta*, (1961) 308.

(d) *Analyse d'esters p-hydroxy-benzoïques*

H. GÄNSHIRT ET K. MORIANZ, *Arch. Pharm.*, 293 (1960) 1065.

(e) *Séparation d'amines*

K. TEICHER, E. MUTSCHLER ET H. ROCHELMMEYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 100 (1960) 283.

(f) *Ionophorèse et chromatographie-ionophorèse sur couches minces (acides aminés et amines)*

C. G. HONEGGER, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 173.

(g) *Séparation de peptides et dérivés sur couches minces*

R. L. HUGUENIN ET R. A. BOISSONNAS, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 219.

J. Chromatog., 6 (1961) 2-21