

PROCÉDÉ DE CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ENTRE PLAQUES DE VERRE

APPLICATION À LA SÉPARATION DE LA 3,5-DI-IODO-THYRONINE ET DE LA 3,5,3'-TRI-IODO-THYRONINE*

J. C. HAUTON**

Hôpital de la Timone, Marseille (France)

(Reçu le 24 juin 1961)

La chromatographie sur papier, en cuve, présente certains inconvénients en particulier lors de l'usage de solvants très volatils. Dans ce cas, il est nécessaire de travailler en petites cuves avec des temps d'équilibration souvent très longs. Le procédé que nous proposons repose sur la réduction au minimum de l'atmosphère qui entoure le papier à chromatographie afin d'obtenir un espace d'évaporation aussi réduit que possible. On obtient alors des conditions de saturation particulièrement favorables pour l'emploi de solvants très volatils, que ce soit en phases normales ou inversées.

PRINCIPE

Le papier à chromatographie est découpé en bandes étroites qui sont placées en atmosphère close entre deux plaques de verre. Chacune d'elles se sature en phase fixe grâce à un encadrement constitué par deux bandes de papier imprégnées de cette phase. Une extrémité des bandes de chromatographie déborde du système de plaques de façon à pouvoir plonger dans un récipient contenant la phase mobile. La jonction entre ce récipient et les plaques est hermétique.

DESCRIPTION D'UN APPAREIL ET MISE EN OEUVRE DE LA CHROMATOGRAPHIE

De nombreux dispositifs peuvent être réalisés suivant par exemple l'inclinaison des plaques et le nombre de bandes chromatographiques. Nous avons utilisé un dispositif horizontal représenté par la Fig. 1, permettant l'emploi commode de deux pistes chromatographiques. Les plaques de verre, de 5 mm d'épaisseur, ont été siliconées avec du diméthyl-dichlorosilane (SERLABO, France).

La mise en oeuvre d'une chromatographie à deux pistes se déroule ainsi. Le papier à chromatographie est découpé en bandes de 1 à 1.5 cm de large. Sur chaque bande

* Travail de la fondation de Diététique expérimentale et appliquée (Pr. Agrégé H. SARLES), Hôpital de La Timone, Marseille, subventionnée par l'INH et le C.N.R.S.

** Stagiaire de recherche à l'I.N.H.

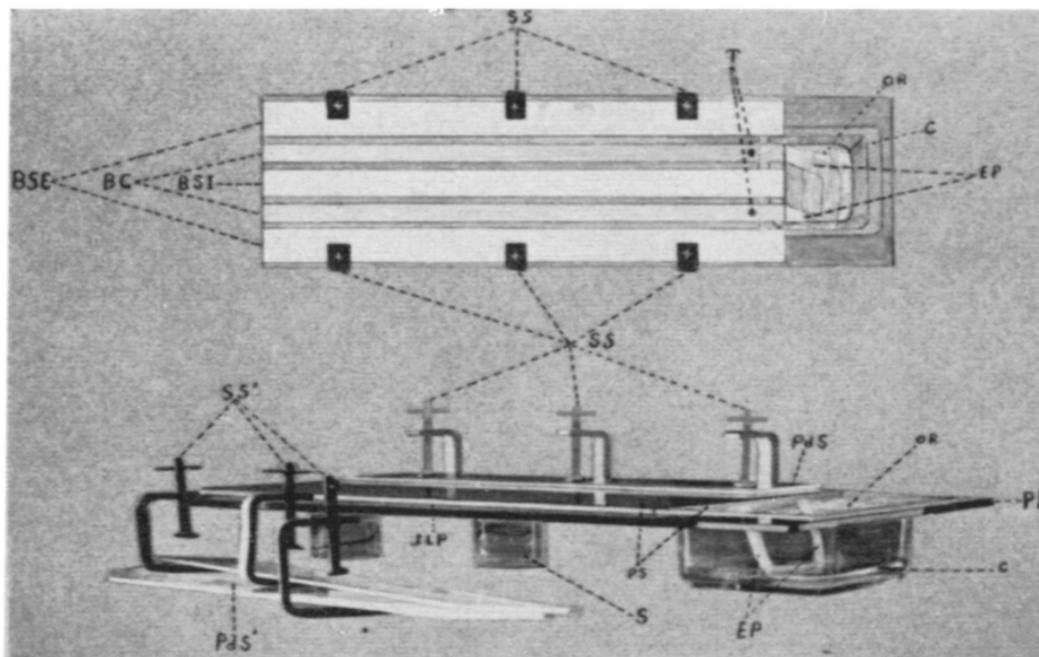


Fig. 1. PI = plaque inférieure. OR = orifice rectangulaire de la plaque inférieure par lequel débordent les bandes de chromatographie. PS = Plaque supérieure, une grande recouvrant les bandes de saturation et chromatographie, une petite recouvrant l'orifice rectangulaire de la plaque inférieure. BC = Bandes de chromatographie. EP = Extrémité proximale des bandes de chromatographie. T = Tache du mélange à analyser. BSI = Bande de saturation interne. BSE = Bandes de saturation externes. JLP = Jonction latérale des plaques. C = Cuve contenant la phase mobile. SS, SS' = Système de serrage des plaques (SS = système monté et SS' système non monté). PdS, PdS' = Plaquettes de serrage en matière plastique (PdS, plaquettes installées, et PdS' non installées). S = Support.

(BC) le mélange à analyser est déposé à 10 cm d'une extrémité dite extrémité proximale (EP). Chaque bande est alors placée sur la plaque inférieure (PI) de sorte que l'extrémité proximale déborde celle-ci de 7 cm à partir de l'orifice rectangulaire (OR); la tache du mélange à analyser (T) se trouve ainsi à 3 cm de cet orifice. Chaque bande de chromatographie est alors bordée de chaque côté, à une distance de 0.5 à 1 cm d'une bande de papier filtre ordinaire, dite bande de saturation.

L'imprégnation en phase fixe de la bande de saturation interne (BSI) se fait rapidement avant la pose des plaques supérieures (PS). L'imprégnation des deux bandes de saturation externes (BSE) se fait ensuite en déposant la phase fixe avec une pipette à la jonction latérale des plaques (JLP). Il suffit d'imprégner une partie de la surface des bandes de saturation, l'imbibition homogène se poursuivant par capillarité.

Un excès risque de provoquer une fuite de la phase fixe vers les bandes de chromatographie lorsque l'on serre les plaques. Après un temps d'équilibration convenablement choisi (de l'ordre d'une heure) les plaques de verre, protégées par des plaquettes en matière plastique, sont serrées uniformément l'une contre l'autre à l'aide d'un système de serrage (SS), tel des serre-joints par exemple. Les extrémités proximales des bandes de chromatographie sont alors plongées dans la phase mobile que contient une petite cuve (C) que l'on amène sous l'orifice rectangulaire de la plaque inférieure.

La jonction entre cette cuve à bord rodé et la plaque inférieure est hermétique. Le développement demande un temps variable suivant la nature des phases et celle du papier à chromatographie.

Toutes les expériences ont été réalisées à 19°.

PRODUITS UTILISÉS

La 3,5-di-iodo-DL-thyronine (T_2) et la DL-thyroxine (T_4) provenaient de Hoffman-La Roche (Bâle), la 3,5,3'-tri-iodo-thyronine (T_3) de Sigma (St Louis, Miss., U.S.A.), l'amylool tertiaire et l'ammoniaque de Prolabo (France).

Le papier à chromatographie utilisé est du Whatman 3 MM.

La révélation est faite à l'aide du réactif sulfate cérrique-arsenite de sodium selon BOWDEN *et al.*¹.

RÉSULTATS

Nous avons appliqué ce procédé à la séparation de T_2 , T_3 et T_4 suivant deux modalités différentes.

(1) Phases saturées entre elles

Le solvant chromatographique utilisé a été l'amylool tertiaire saturé de NH_4OH 2 N, obtenu en mélangeant dans une ampoule à décantation 1 volume d'amylool tertiaire et 1 volume de NH_4OH 2 N. Après agitation et repos, le mélange se sépare en deux phases dont la supérieure consiste en l'amylool tertiaire saturé d'ammoniaque et l'inférieure en l'ammoniaque saturé d'amylool.

On a utilisé comme phase mobile la phase supérieure du mélange précédemment décrit (amylool tertiaire saturé de NH_4OH 2 N) et comme phase fixe imprégnant les bandes de saturation la phase inférieure (NH_4OH 2 N saturé d'amylool tertiaire).

La Fig. 2A montre une séparation de T_2 et T_3 . La durée de migration a été de 48 heures (front à 48 cm).

$$R_F: T_4 = 0.21; T_3 = 0.30; T_2 = 0.37.$$

(2) Phases non saturées entre elles

Les phases sont préparées séparément et non saturées entre elles. La phase mobile consiste en de l'amylool tertiaire saturé d'eau. La phase fixe consiste en de l'ammoniaque 4 N, qui imprègne les bandes de saturation.

La Fig. 2B montre une séparation rapide de T_2 et T_3 . La durée de migration a été de 20 heures (front à 25.5 cm).

La Fig. 2C montre une bonne séparation de T_2 et T_3 . La durée de migration a été de 40 heures (front à 35 cm).

Chromatogramme 2B

$$R_F: T_4 = 0.14; T_3 = 0.26; T_2 = 0.33.$$

Chromatogramme 2C

$$R_F: T_4 = 0.17; T_3 = 0.30; T_2 = 0.38.$$

Nous avons appliqué ce procédé à une expérience de découpage d'une fraction de

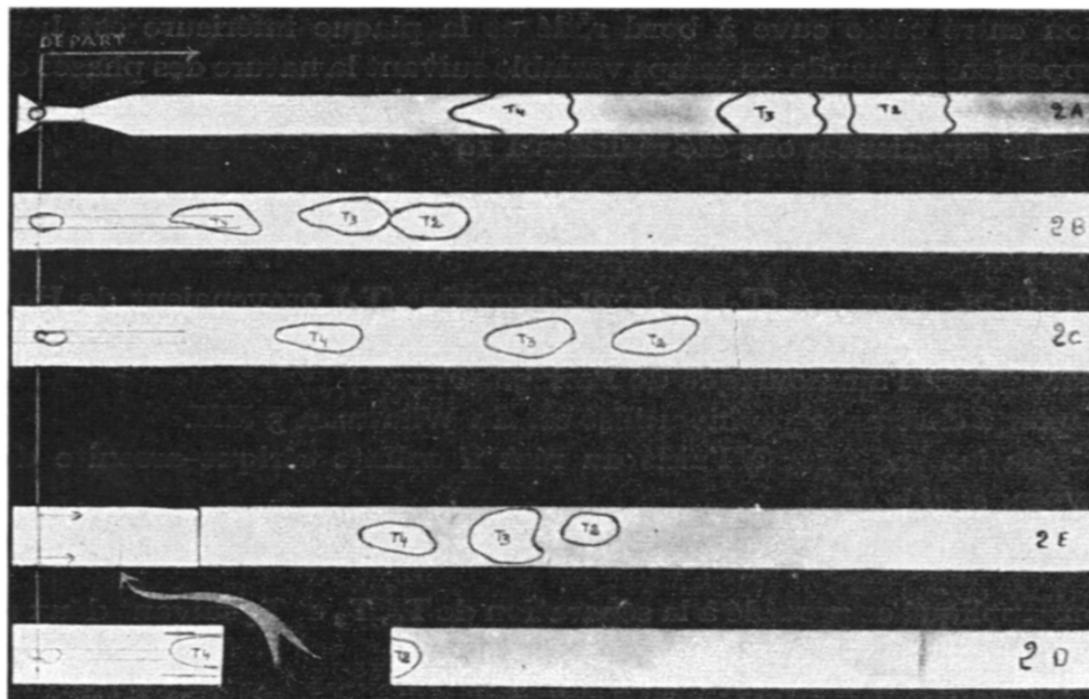


Fig. 2. Photographie de chromatogrammes sur papier réalisés avec le dispositif décrit, montrant la séparation de T_2 , T_3 et T_4 . Conditions expérimentales voir texte.

chromatogramme suivie d'une nouvelle séparation sans élution préalable. Nous avons utilisé la méthode des phases non saturées entre elles décrite au paragraphe précédent.

La Fig. 2D montre un chromatogramme (front à 24.5 cm) où l'on a découpé après le développement une petite portion contenant la totalité de T_3 et une partie de T_4 et T_2 . Cette portion est par la suite intercalée par jointage bout à bout avec deux bandes vierges formant ainsi une bande de chromatographie continue constituée de trois éléments distincts (Fig. 2E). Le contact entre ces trois éléments successifs est maintenu par la pression des plaques. Puis il a été procédé à une seconde chromatographie avec les mêmes phases. Le chromatogramme 2E montre que T_2 , T_3 et T_4 ont été entraînées et correctement séparées.

DISCUSSION

Nous avons appliqué avec succès ce procédé à la séparation des acides biliaires. Les résultats obtenus feront l'objet d'une publication ultérieure.

L'application à la séparation de T_2 et T_3 a été choisie pour les raisons suivantes:

(1) T_2 et T_3 ne peuvent être séparées qu'en utilisant des solvants organiques tels que les alcools isoamylique et amylique tertiaire saturés de NH_4OH 6 N². Les migrations sont très longues et les manipulations rendues très difficiles par la forte concentration en ammoniacque.

(2) La présence d'ammoniacque, très volatil, nécessite des cuves de faible capacité, une parfaite saturation préalable du papier avec la phase fixe et des températures assez basses (10 à 15°).

Le procédé proposé permet d'obtenir une bonne séparation de T_2 et T_3 avec de

faibles concentrations en ammoniacque (2 *N*) dans des conditions techniques simples. Les taches obtenues sont bien délimitées.

Ce procédé permet également d'utiliser des phases préparées séparément et non saturées entre elles. Les conditions particulièrement satisfaisantes de saturation semblent permettre durant le développement l'établissement d'un gradient de saturation des phases, la phase mobile se saturant en ammoniacque et la phase fixe en amyloï. La polarité relative de la phase fixe par rapport à la phase mobile doit diminuer très régulièrement, n'empêchant pas une séparation correcte de T_2 , T_3 et T_4 sous forme de taches arrondies sans effet de traînée. Les R_F doivent varier en début de développement suivant une relation unissant les coefficients de partage des substances, la nature des phases, la vitesse et la durée de migration.

L'exemple de découpage suivi de séparation consécutive montre que ce procédé permet d'isoler dans un chromatogramme plusieurs fractions correspondant à des taches non séparées, et de soumettre directement et séparément chacune de ces fractions à une nouvelle chromatographie dans le même ou dans un autre solvant.

REMERCIEMENT

Nous remercions le Prof. S. LISSITZKY, qui nous a prodigué d'excellents conseils et nous a fourni les produits utilisés.

RÉSUMÉ

1. Description d'un procédé de chromatographie sur bandes de papier entre plaques de verre. Ce procédé, facile à réaliser, permet d'obtenir de très bonnes conditions de saturation après un bref temps d'équilibration. Il semble particulièrement adapté pour l'emploi de solvants très volatils.

2. Exemples de séparation de 3,5-di-iodo-DL-thyronine et 3,5,3'-tri-iodothyronine avec des phases saturées et non saturées entre elles.

3. Exemple de rechromatographie directe d'une petite fraction découpée dans un chromatogramme.

SUMMARY

1. A chromatographic method is described, using paper bands between glass plates. The technique is convenient and gives very good conditions of saturation after a brief period of equilibration. It is particularly suitable for use with highly volatile solvents.

2. Examples are given of the separation of 3,5-di-iodo-DL-thyronine and 3,5,3'-tri-iodothyronine by means of phases saturated and not saturated with each other respectively.

3. By rechromatography of a small piece cut out of a chromatogram, further separation can be obtained.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. H. BOWDEN, N. F. MACLAGAN ET J. H. WILKINSON, *Biochem. J.*, 59 (1955) 93.
- ² S. LISSITZKY, *Biochimie des acides aminés iodés marqués par l'iode-131 dans le corps thyroïde*, Thèse Doct.-ès-Sciences, Paris, 1952.