

GRADIENT DE POLARITÉ EN
CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE EN PHASE INVERSÉE
APPLICATION À LA SÉPARATION
DES ACIDES MONO-, DI- ET TRI-HYDROXYCHOLANIQUES

J. C. HAUTON

Hôpital de la Timone, Marseille (France)

(Reçu le 2 avril 1962)

Ce travail préliminaire a été fait en nous inspirant des techniques de séparation des acides biliaires par chromatographie de partage de BERGSTRÖM ET SJÖVALL^{1,2} et NORMAN³. La séparation des acides biliaires se fait sur colonne de kieselguhr siliconé en phase inversée, selon la méthode décrite par HOWARD ET MARTIN en 1950⁴. La phase mobile consiste en de l'alcool méthylique aqueux saturé de la phase fixe. Plus la phase mobile est riche en alcool méthylique, plus vite apparaissent les acides biliaires dans le liquide d'élution.

L'ordre de sortie des acides cholaniques avec des substituants oxygénés en position 3, 7 et 12 est le suivant:

- Acide 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxycholannique = acide cholique,
- Acide 3 α ,7 α -dihydroxy-12-cétocholannique,
- Acide 3 α -hydroxy-7,12-dicétocholannique,
- Acide 3 α ,12 α -dihydroxy = 3 α ,7 α -dihydroxycholannique = acides désoxycholique et chéno-désoxycholique,
- Acide 3,7,12-tricéto = 3 α -hydroxy-12-céto = 3 α -hydroxy-7-cétocholannique,
- Acide 3 α -hydroxycholannique = acide lithocholique,
- Acide 3,12-dicéto = 3,7-dicétocholannique,
- Acide 3-cétocholannique.

En physiologie humaine, les acides biliaires les plus intéressants sont les acides cholique (Tri-OH), désoxycholique et chéno-désoxycholique (Di-OH) et accessoirement l'acide lithocholique (Mono-OH).

Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'obtenir en une seule opération chromatographique les acides mono-, di- et tri-hydroxycholaniques:

(1) sous forme de trois pics suffisamment étroits pour permettre un dosage titrimétrique valable;

(2) en évitant que l'acide cholique ne soit trop rapidement élué.

Cela est possible à condition d'établir un gradient de polarité de la phase mobile. En diminuant progressivement la polarité de la phase mobile par enrichissement en alcool méthylique, on accélère progressivement l'élution des acides hydroxycholaniques.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Solvants

On a utilisé les trois systèmes de solvants suivant:

	<i>Phase mobile (ml)</i>	<i>Phase fixe (ml)</i>
Système 50 %	méthanol-eau (150:150)	Chloroforme-octanol <i>sec.</i> (15:15)
Système 55 %	méthanol-eau (165:135)	Chloroforme-octanol <i>sec.</i> (30:30)
Système 60 %	méthanol-eau (180:120)	Chloroforme-octanol <i>sec.</i> (40:40)

L'alcool octylique secondaire peut être remplacé par de l'alcool isoctylique secondaire, les éluions étant alors retardées.

Support

Le kieselguhr a été préparé de la façon suivante.

Le kieselguhr commercial (Touzart et Matignon, France) est mis en suspension dans un large excès d'acide chlorhydrique 2 *N* durant 24 h. Ensuite il est abondamment lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité, puis séché 24 h à l'étuve à 120°. Ensuite il est mis en suspension 24 h dans de l'heptane dans lequel on ajoute approximativement 5 à 10 % de diméthyl-dichlorosilane. Après le kieselguhr est lavé abondamment à l'alcool éthylique à 98° jusqu'à ce que l'alcool coule absolument limpide. Puis après 24 h à l'étuve à 120° le kieselguhr est prêt à l'usage. Chaque lot de kieselguhr ainsi préparé a été contrôlé par chromatographie de produits purs afin de vérifier l'absence de rétention, rétention qui en cas de préparation defectueuse se manifeste surtout pour le premier produit élué.

Produits utilisés

Acide cholique et acide désoxycholique, Hoffmann-La Roche (France). Acide lithocholique, BLB (France).

Appareillage

Le gradient de polarité de la phase mobile s'obtient par le système de deux réservoirs explicité par la Fig. 1 (voir aussi réf.⁵). Dans le réservoir inférieur se place un volume déterminé V de la phase mobile de plus forte polarité (concentration C_1 en méthanol) et dans le réservoir supérieur un volume variable de la phase mobile de polarité plus faible (concentration C_2 en méthanol) qui induit le gradient de polarité. Ce système placé sur la colonne fonctionne à double niveau constant, un dans la colonne, l'autre dans le réservoir inférieur. Une baisse de niveau dans la colonne détermine l'écoulement d'un certain volume de liquide du réservoir inférieur à la colonne, ceci provoquant l'écoulement d'un même volume de liquide du réservoir supérieur au réservoir inférieur. La concentration en méthanol de l'écoulement du réservoir inférieur est donné en fonction du volume v écoulé par la formule:

$$c = C_2 - (C_2 - C_1)e^{-\frac{v}{V}}$$

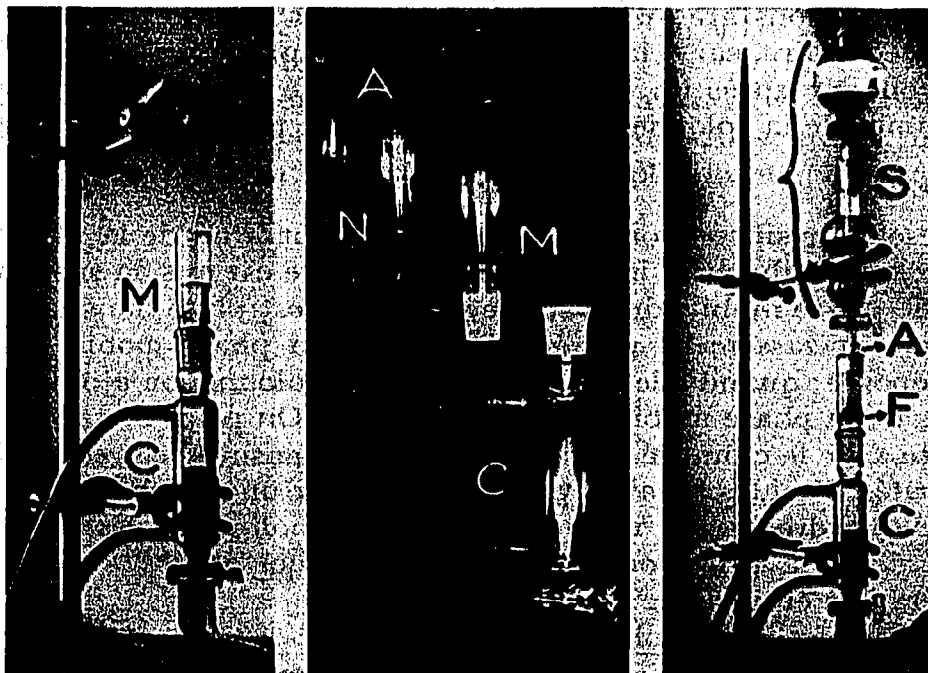


Fig. 1. Au milieu, les divers éléments de la colonne à chromatographie. A = Cylindre creux échancré à une base, se plaçant dans la nacelle perforée N. Cette nacelle contenant la couche filtrante est placée dans le manchon M qui s'adapte à la colonne à jaquette C destinée à recevoir le support imprégné de phase fixe. A gauche, aspect présenté avant la mise en place de la nacelle N contenant la couche filtrante et le cylindre A. A droite ensemble en cours de marche. Le bec du réservoir inférieur du système à gradient S plonge dans le cylindre A. Le liquide qui s'écoule du réservoir inférieur traverse obligatoirement la couche filtrante F avant de parvenir dans le manchon M par les orifices situés à mi-hauteur de la nacelle N.

Le passage de l'air de la colonne au réservoir supérieur crée un régime turbulent suffisant pour assurer un brassage efficace dans le réservoir inférieur qui joue le rôle de chambre de mélange. Quand le volume écoulé du système est égal au volume de phase placé dans le réservoir supérieur, on obtient un palier de concentration. L'allure du gradient est déterminé par V , C_2 , C_1 et par le volume placé dans le réservoir supérieur.

Dans les résultats présentés,

C_1 = phase mobile du système 50 %,

C_2 = phase mobile du système 55 % ou 60 %,

V = 75 ml,

et volume de phase dans le réservoir supérieur = 210 ml.

On a utilisé le type spécial de colonne explicité par la Fig. 1. En effet, il se produit lors du contact des phases mobiles de polarité différente dans le réservoir inférieur une sursaturation en phase fixe et une émulsion plus lourde que la phase mobile apparaît. On se débarrasse de cette émulsion en faisant passer la phase mobile au travers d'une couche filtrante. Dans le fond de la nacelle N (Fig. 1) on place 0.250 g de kieselguhr siliconé non imprégné de phase fixe. Ce kieselguhr est mis en suspension dans de la phase mobile du système 50 %. (Pour d'autres systèmes de solvants, il est parfois nécessaire d'imprégner partiellement la couche filtrante de phase fixe afin qu'elle se mélange correctement à la phase mobile.) En cours de chromatographie, la phase trouble qui s'écoule du réservoir inférieur traverse obligatoirement la couche fil-

trante et ensuite on constate qu'elle est limpide à la sortie de la nacelle. Ce montage particulier est nécessaire, car si la couche filtrante est placée au sommet de la colonne, il se produit souvent après un certain volume écoulé une couche de phase fixe qui coiffant le sommet de la colonne gêne le déroulement normal de la chromatographie.

Technique opératoire

A 4.5 g de kieselguhr siliconé on mélange intimement 4 ml de la phase fixe du système 50 %. Le kieselguhr ainsi imprégné de phase fixe est mis en suspension dans un petit volume de phase mobile du système 50 % puis est placé dans la colonne. Après homogénéisation et tassement par écoulement de la phase mobile, la substance à analyser est déposée; quand elle a pénétrée dans la colonne, on ajoute une couche de sable lavé puis de la phase mobile du système 50 %. On place la nacelle contenant la couche filtrante avec le cylindre de verre intérieur et ensuite le système à gradient.

Les quantités d'acides biliaires purs utilisés pour une colonne de 4.5 g de kieselguhr ont été de l'ordre de 5 à 10 mg pour l'acide cholique et les acides dihydroxycholiques et de 1.5 à 4 mg pour l'acide lithocholique.

La température était de 22.5°.

Le volume des fractions collectées était de 4 ml.

L'écoulement était réglé à raison d'une goutte toute les 4 sec.

Dosage des fractions

Il a été fait par titrimétrie avec une solution méthylique de NaOH *N*/100 avec comme indicateur une solution à 0.05 % de bleu de bromothymol dans de l'alcool méthylique.

La récupération des produits purs se situe invariablement au alentour de 97 % (97 % \pm 2).

La caractérisation des pics élués a été faite par chromatographie sur papier entre plaques⁶, avec les systèmes de solvants décrit par SJÖVALL⁷.

DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS

La Fig. 2 schématise les résultats de chromatographie d'un mélange d'acides cholique (Tri-OH), désoxycholique (Di-OH) et lithocholique (Mono-OH) avec et sans gradient de polarité.

Sans gradient de polarité, avec la phase mobile du système 50 %, l'acide cholique s'élué sous forme d'un pic étroit avec un maximum vers 70 ml d'éluat. L'établissement d'un gradient de polarité entre la phase mobile du système 50 % et la phase mobile du système 55 % ou 60 % (gradient 50-55 % ou gradient 50-60 %) ne modifie pas de façon appréciable l'élué de l'acide cholique. Il existe un temps de latence avant que ne se manifeste l'effet accélérateur du gradient, dû en particulier au volume mort de la colonne du point de vue effet du gradient (volume de phase mobile du système 50 % compris entre la nacelle et le sommet de la colonne de support).

L'acide désoxycholique avec la phase mobile du système 50 % sort en traînant de 180 à 300 ml d'éluat et ne peut être dosé valablement. Par contre sous l'effet d'un gradient de polarité, son élué accélérée se fait sous forme d'un pic correct, dosable. Le maximum du pic se trouve à 190 ml pour un gradient 50-55 % et à 160 ml pour un gradient 50-60 %.

L'acide lithocholique sans gradient et avec un gradient 50-55 % reste dans la

phase fixe. Par contre avec un gradient 50-60 %, il s'élué entre 240 et 280 ml et peut être l'objet d'un dosage titrimétrique.

Cette méthode avec un gradient de polarité dit "saturé" (les deux phases mobiles utilisées étant saturées en phase fixe) est plus satisfaisante que la méthode avec gradient de polarité dit "non saturé" où la phase de plus faible polarité qui induit le

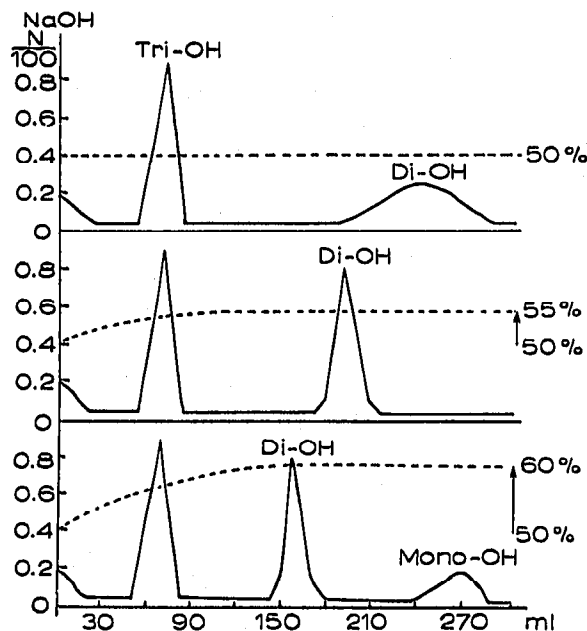


Fig. 2. En pointillé les courbes théoriques donnant la concentration en méthanol de l'écoulement du système à gradient en fonction du volume d'éluion. Tri-OH = acide cholique; Di-OH = acide désoxycholique; Mono-OH = acide lithocholique. En haut, phase mobile du système 50%. Au milieu, gradient 50-55 %. En bas, gradient 50-60 %. (Pour explication, voir texte).

gradient n'est pas saturée en phase fixe. (Dans ce cas une couche filtrante est inutile.) Nous avons essayé des gradients 50-60 %, 50-55 % et 50-52.5 % en plaçant dans le réservoir supérieur de la phase mobile du système 50 % auquel on ajoutait une quantité déterminée d'alcool méthylique de façon à obtenir une concentration de 60 %, 55 % ou 52.5 % en méthanol. Avec un gradient non saturé 50-60 %, l'acide lithocholique s'élué en même temps que l'acide désoxycholique sous forme d'un pic aigu presque symétrique. Avec un gradient non saturé 50-55 %, ces deux acides sortent ensemble mais sous forme d'un pic asymétrique. Par contre avec un gradient non saturé 50-52.5 % ces deux acides sortent séparés, mais il y a élargissement des pics d'éluion avec interpénétration de la base des pics. Avec un gradient non saturé, la colonne de phase fixe se déplace par rapport au support par désaturation progressive de la colonne de haut en bas au profit de la phase mobile. L'emploi de la méthode de gradient "saturé" est préférable parce que à priori le support ne se désature pas en phase fixe, la phase mobile restant saturée quoique sa polarité varie.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mesdemoiselles C. GREUSARD et M. J. PERROT pour leur aide appréciable.

Ce travail a été exécuté dans le cadre de la Fondation de Diététique expérimentale et appliquée dirigée par le Pr.Ag. H. SARLES et subventionné par l'Institut National d'Hygiène et le Centre National de la Recherche Scientifique, Hôpital de la Timone, Marseille.

RÉSUMÉ

Description d'une méthode de chromatographie de partage en phase inversée avec utilisation d'un gradient de polarité de la phase mobile.

Exemple de séparation des acides mono-, di- et tri-hydroxycholiques en une seule chromatographie dans des conditions permettant un dosage titrimétrique valable.

SUMMARY

A method of reversed phase partition chromatography is described, in which a gradient in the polarity of the mobile phase is utilized.

An example is given of the separation of mono-, di- and trihydroxycholic acids in a single chromatographic operation under such conditions that a satisfactory titrimetric estimation is possible.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ S. BERGSTRÖM ET J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 5 (1951) 1267.
- ² J. SJÖVALL, *Acta Physiol. Scand.*, 29 (1953) 232.
- ³ A. NORMAN, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 1413.
- ⁴ G. A. HOWARD ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 46 (1950) 532.
- ⁵ J. C. HAUTON, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 257.
- ⁶ J. C. HAUTON, *J. Chromatog.*, 7 (1962) 341.
- ⁷ J. SJÖVALL, *Clin. Chim. Acta*, 4 (1959) 652.

J. Chromatog., 9 (1962) 439-444