

QUELQUES MODALITÉS EXPÉRIMENTALES NOUVELLES DANS LE DOMAINE DE LA CHROMATOGRAPHIE ET DE LA CHROMATO-ÉLECTROPHORÈSE EN COUCHE MINCE DE POUDRE DE CELLULOSE DES SUBSTANCES HYDROSOLUBLES

ROGER L. MUNIER ET GISÈLE SARRAZIN

Institut Pasteur, Service de Biochimie Cellulaire, Paris (France)

(Reçu le 14 juillet 1965)

Lorsqu'on désire procéder à des analyses chromatographiques de routine dans le domaine de la détermination de la structure primaire des protéines (enchaînement des aminoacides), il faut être en mesure de répéter un grand nombre d'essais d'identification d'acides aminés ou de certains de leurs dérivés. Il est donc extrêmement intéressant de pouvoir réaliser ces essais à l'aide d'un matériel très simple, peu coûteux et peu encombrant. Connaissant l'intérêt que présentent dans ce domaine les techniques de la chromatographie en couche mince, nous nous sommes attachés à la mise au point de conditions opératoires et d'un matériel permettant de réaliser simultanément un grand nombre de chromatogrammes sur de très faibles quantités de substance et dans des conditions expérimentales très variées. Pour réaliser ce programme, nous avons mis au point une modification de la cuve de BRENNER ET NIEDERWIESER¹. Le modèle de cuve que nous proposons est d'un emploi très général; en particulier, il permet de réaliser les différents types possibles d'opérations chromatographiques: développement de chromatogrammes en atmosphère conditionnée ou non, développement avec ou sans écoulement continu du solvant, écoulement continu des solvants hors des limites de la couche mince avec ou sans évaporation du solvant mobile en extrémité de couche, développement en seconde dimension d'une portion choisie du chromatogramme déjà développé en totalité en 1-ère dimension etc. . . . Grâce aux procédés que nous allons décrire, on peut réaliser des chromatogrammes à deux dimensions ou des chromato-électrogrammes avec ou sans écoulement continu des solvants et ainsi répartir les taches de substances sur la surface totale d'une couche mince (200 × 200 mm). Des méthodes très simples et efficaces de couplage électrophorèse-chromatographie seront également décrites.

Ce matériel et les modalités de son emploi ont donné d'excellents résultats dans le domaine de la chromatographie en couche mince de poudre de cellulose des aminoacides libres^{2,3} et des dinitrophényl-aminoacides^{4,5}. Le faible encombrement que représente chaque dispositif de chromatographie et la possibilité de faire des empilements font qu'il est possible de réaliser simultanément jusqu'à 80 chromatogrammes sur un plan de travail d'un mètre carré et en une journée de laboratoire.

Quoique les méthodes décrites aient été mises au point pour la chromatographie des substances hydrosolubles sur couche mince de poudre de cellulose sans liant, elles peuvent aussi être employées, sous certaines conditions, pour la chromato-

graphie dans des couches minces formées d'autres matières et donc dans des couches mécaniquement moins résistantes. Ainsi les méthodes décrites peuvent, avec quelques modifications, s'appliquer à la chromatographie des substances liposolubles.

I. TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Couches minces

Les couches minces (250μ) utilisées sont formées, sur plaque de verre $200 \times 200 \times 4$ mm, à partir de poudre de cellulose sans liant (Macherey et Nagel No. MN300; taille moyenne des particules: 10μ) de la manière décrite dans les références^{2,5}. Ces couches sont mécaniquement très résistantes; avec des solvants mobiles aqueux ou organiques on peut réaliser sur ces plaques des chromatographies en "couche mince plafond" ou en "couche mince plancher", c'est à dire dans des conditions telles que, dans la cuve à chromatographie, la couche mince soit portée par la plaque de verre supérieure ou par la plaque de verre inférieure.

Cuve à chromatographie

Dans sa réalisation et sa mise en oeuvre la plus simple, la cuve à chromatographie utilisée est celle qui est représentée par le schéma de la Fig. 1. Les deux grands côtés de la cuve sont formés par deux plaques de verre ($200 \times 200 \times 4$ mm) espacées par un étrier (u) en forme de u plus long que les plaques. Cet étrier est formé à partir d'une baguette de verre pyrex de 6 mm de diamètre. La plaque de verre supérieure

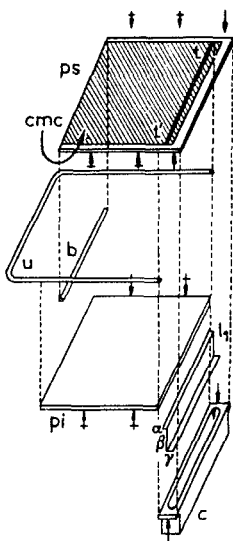


Fig. 1. Principe de montage d'une "auto-cuve", pour développement d'un chromatogramme en "couche mince plafond", mettant en oeuvre une cuvette à solvant modifiée. cmc = couche mince de poudre de cellulose sur la face inférieure de la plaque ($200 \times 200 \times 4$ mm) de verre supérieure (ps); b = baguette (diamètre: 6 mm) de fermeture de l'autocuve; c = cuvette à solvant comportant, aux deux extrémités, un rebord permettant sa fixation facile à la plaque de verre supérieure (ps) à l'aide de pinces à dessin; l_1 — languette ($17 \times 4,2$ cm), de papier Whatman No. 2, amenant le solvant de la cuvette (c) à la couche mince; pi = plaque inférieure ($200 \times 200 \times 4$ mm) de verre; u = étrier de verre (diamètre: 6 mm) séparant les deux plaques de verre (ps, pi); l'ensemble est maintenu en place grâce à des pinces à dessin de petite (\downarrow , largeur \times ouverture: $20-40 \times 6$ mm) ou de grande (\downarrow , largeur \times ouverture: $80 \times 10-15$ mm) taille.

(ps), ici, porte la couche mince sur sa face inférieure. L'ensemble, constituant quatre des côtés de la cuve, est maintenu en place à l'aide de pinces à dessin. Le solvant contenu dans la cuvette (c) est amené à la couche mince par une languette de papier (l_1) pliée en trois segments (α, β, γ). Une extrémité (β, γ) de cette languette (l_1) baigne dans le solvant tandis que celle (α) qui repose sur le bord de la cuvette à solvant se trouve mise au contact de la couche mince (trace tt' de la partie α de la languette l_1 sur la couche mince). A l'aide de deux petites pinces à dessin et grâce aux rebords ($5 \times 5 \times 25$ mm) ménagés dans ses deux petits côtés, la cuvette à solvant est fixée à la plaque de verre supérieure; ainsi cette cuvette assure également la fermeture du 5-ème côté de la cuve à chromatographie. Dans le cas de la Fig. 1, le 6-ème côté de la cuve est fermé par une baguette de verre (diamètre 6 mm). Nous verrons que cette fermeture du 6-ème côté de la cuve à chromatographie peut être assurée par d'autres dispositifs (voir Fig. 4) que la baguette de verre (b). Dans certains montages, l'étrier de verre (u), la baguette de verre (b) peuvent être remplacés par des pièces de polyéthylène haute pression ou de polytetrafluoroéthylène. Une cuve à chromatographie similaire peut être construite pour des plaques de verre $400 \times 200 \times 4$ mm.

Pour la plupart des solvants employés en chromatographie de partage direct et en chromatographie de relargage une cuvette à solvant usinée dans un bloc ($2.5 \times 2.5 \times 20$ cm) de chlorure de polyvinyle (Afcodur, Leucoflex) suffit; lorsque la chromatographie est réalisée dans des solvants attaquant le chlorure de polyvinyle (exemple, mélange méthyl-éthylcétone-acétone-eau), on emploie des cuvettes en polyéthylène basse pression.

La cuve à chromatographie ainsi décrite sera désignée sous le nom d'"auto-cuve"; lorsque ses composants sont assemblés avec des pinces suffisamment puissantes, la cuve obtenue est d'une étanchéité satisfaisante qui permet son emploi dans tous les domaines de la chromatographie en couche mince.

On peut remarquer que le modèle d'"auto-cuve" décrit diffère en trois points de celui de BRENNER ET NIEDERWIESER¹: plus grand espace ménagé entre les deux plaques de verre, plus grande accessibilité de l'ouverture de la cuve se trouvant à l'opposé de la cuvette à solvant, plus grande facilité de fixation de la cuvette à solvant sur la plaque de verre supérieure. Ces modifications rendent cette auto-cuve plus maniable et permettent de l'employer dans un plus grand nombre de cas.

Cellules d'électrophorèse

Pour obtenir des séparations électrophorétiques sur couches minces (250μ), portées sur plaques 200×200 (ou 400) $\times 4$ mm, en 1-ère ou 2-ème dimension, nous avons mis au point des dispositifs simples (voir Fig. 2) utilisant, en général, des récipients en matières plastiques d'origine commerciale. Dans la plupart des cas, avec des gradients de potentiels compris entre 15 et 20 V par cm, il est possible d'obtenir par électrorhéophorèse^{6,7} en couche mince, la séparation des substances, sous forme de petites taches très nettes, en 30 à 240 min. La cellule d'électrophorèse A de la Fig. 2 permet d'utiliser des plaques 200×200 mm, les cellules B et C des plaques 200×400 mm; le champ est appliqué respectivement sur 200 mm dans le montage B et sur 400 mm dans le montage C.

Dans tous les cas, nous utilisons un même générateur de tension continue constitué par un transformateur dont le circuit secondaire est à point moyen ($350 - 0 - 350$ V_{eff.}), une valve biplaque 5Z3 (chauffage: 5 V_{eff.}, $3A$ eff.), une cellule de filtrage

en π ($16 \mu\text{F}$, t.s. 1000 V; 10 H, 300 Ω , c.s. 120 mA; $8 \mu\text{F}$, t.s. 1000 V); la cellule d'électrophorèse est montée en parallèle avec une résistance de l'ordre de 100,000 Ω (10 watts) montée en potentiomètre aux bornes de sortie du générateur de tension continue.

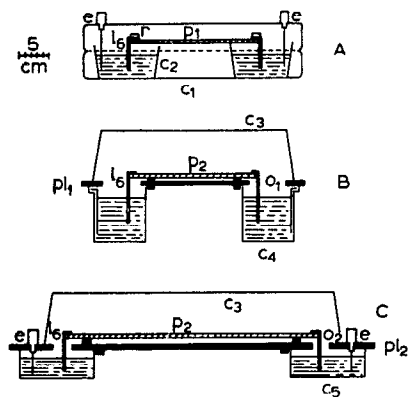


Fig. 2. Dispositifs simples pour l'électrophorèse "basse tension" en couche mince de poudre de cellulose. (A) pour plaque $200 \times 200 \times 4$ mm. (B) pour plaque $200 \times 400 \times 4$ mm, sens d'électrophorèse 200 mm. (C) pour plaque $200 \times 400 \times 4$ mm, sens d'électrophorèse 400 mm. c_1 = 2 cuves en plexiglass $34 \times 23 \times 4.2$ cm; c_2 = cuve en polypropylène $21 \times 10 \times 6$ cm pour 800 ml de liquide, ou $21 \times 14 \times 6$ cm pour 1 l de liquide; c_3 = cuve en polypropylène $48 \times 32 \times 7.5$ cm; c_4 = cuve en chlorure de polyvinyle $44 \times 9 \times 8$ cm, à électrode incorporée, pour 2 l de liquide; c_5 = cuve en plexiglass $24 \times 12 \times 5$ cm pour 900 ml de liquide; e = électrode amovible; l_6 = languette (19×6 cm) de papier Whatman No. 2; o_1 = orifice (41×6 cm) percé dans le plateau (pl_1) à 3 cm du bord; o_2 = orifice (21×3 cm) percé dans le plateau (pl_2) à 7 cm du bord; p_1 = plaque de verre $200 \times 200 \times 4$ mm; p_2 = plaque de verre $200 \times 400 \times 4$ mm; p_1, p_2 portent la couche mince (250μ) de poudre de cellulose; pl_1 = plateau en chlorure de polyvinyle (35×50 cm); pl_2 = plateau (35×58 cm); r = réglette de plexiglass.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

BRENNER ET NIEDERWIESER¹ ont proposé un dispositif ingénieux pour réaliser le développement continu des chromatogrammes sur couche mince par évaporation du solvant mobile en extrémité de plaque. Du point de vue réalisation, on peut cependant reprocher au dispositif tel qu'il est décrit par ses auteurs¹ d'exiger l'emploi d'un dispositif de serrage encombrant pour la fixation de la cuvette à solvant et de ne laisser qu'un écartement trop faible entre les plaques de verre. Ainsi les gouttelettes de solvant, qui se condensent sur la plaque de verre supérieure ne portant pas de couche mince ont tendance à mouiller la couche mince portée par la plaque de verre inférieure. Enfin, et surtout, le modèle de cuve à chromatographie en couche mince proposé par BRENNER ET NIEDERWIESER¹ n'a été conçu qu'en vue de son emploi en chromatographie avec écoulement continu du solvant par évaporation de ce dernier lors de son arrivée en extrémité de couche mince.

Reprenant le principe proposé par ces auteurs¹, à savoir la possibilité de former une cuve à chromatographie en couche mince avec deux plaques de verre dont l'une porte la couche mince, nous avons mis au point un modèle de cuve, dont le montage n'exige qu'un matériel simple et courant, et qui peut être utilisé dans tous les cas possibles de chromatographie: développement avec ou sans écoulement continu du solvant, développement d'une couche mince fixée sur la plaque de verre inférieure

ou supérieure, développement simultané de deux chromatogrammes sur deux couches minces se faisant face, développement en atmosphère conditionnée, etc.

Dans sa mise en oeuvre la plus simple, ce dispositif est décrit p. 337 et dans la Fig. 1; dans cette figure, on a représenté le développement (sans écoulement continu) d'un chromatogramme en "couche mince plafond" (voir p. 337).

Chromatographie sans écoulement continu du solvant

Sur la Fig. 3, sont donnés des schémas qui montrent différents cas de mise en oeuvre de la chromatographie en couche mince de poudre de cellulose à l'aide d'"auto-cuve" sans écoulement continu du solvant. Dans tous les cas, le côté de la cuve, qui est à l'opposé de la cuvette à solvant, est fermé par une baguette de verre (b). Le schéma A montre le montage qui permet de développer un chromatogramme sur "couche mince plafond"; dans ce cas, l'alimentation en solvant est faite à travers la languette (l_1) de papier dont l'extrémité mise au contact de la couche mince, est serrée entre la plaque de verre supérieure (ps) et le bord de la cuvette à solvant (c).

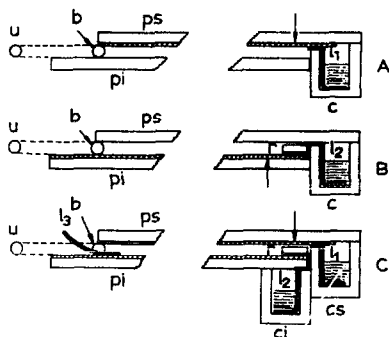


Fig. 3. Schémas montrant différents cas de mise en oeuvre de la chromatographie en couche mince de poudre de cellulose à l'aide d'"auto-cuves"; développement: (A) d'une "couche mince plafond"; (B) d'une "couche mince plancher"; (C) d'une "couche mince plafond" (ps) avec écoulement préalable ou (et) simultané, dans la couche mince inférieure (pi) d'un solvant créant l'atmosphère de la cuve. b = baguettes de verre (diamètre 6 mm) formant les "auto-cuves"; c = cuvette à solvant; ci = cuvette inférieure à solvant; cs = cuvette supérieure à solvant; l_1, l_2 = languettes (respectivement: 17×4.2 et 17×5.5 cm) de papier Whatman No. 2, amenant les solvants des cuvettes (c, ci, cs) aux bords des couches minces de poudre de cellulose (surfaces hachurées); l_3 = languette (17×9 cm) de papier permettant éventuellement l'écoulement continu du solvant incréant l'atmosphère de la cuve; pi, ps = respectivement, plaques de verre ($200 \times 200 \times 4$ mm) inférieure et supérieure; r = réglette ($180 \times 20 \times 4$ mm) de verre; u = trace de l'étrier de verre (u, de la Fig. 1); \downarrow = positions de dépôt des substances à soumettre à la chromatographie.

Dans le schéma B, on a représenté le montage utilisé pour développer un chromatogramme en "couche mince plancher"; l'alimentation en solvant de la couche mince est obtenue par l'intermédiaire de la languette de papier (l_2) qui est appliquée sur le bord de la couche mince grâce à la réglette de verre (r) d'épaisseur plus faible que l'espace existant entre les deux plaques de verre (ps, pi). Lorsqu'on utilise des couches minces de poudre de cellulose, l'une ou l'autre des méthodes précédentes de développement (A ou B, Fig. 3) peuvent être utilisées; en général, on préfère cependant employer le montage le plus simple, c'est à dire celui représenté dans le schéma A. Lorsqu'il s'agit de couches minces fragiles (SiO_2 , Al_2O_3) pour lesquelles le développement du chromatogramme ne peut donc avoir lieu qu'en "couche mince plancher"

on utilise le montage B (Fig. 3)*. Pour les couches minces de support activé (chromatographie d'adsorption) on remplace l'étrier de verre (u), la baguette de verre (b) et la réglette de verre (r) par un cadre (épaisseur 6 mm) taillé dans une plaque de polyéthylène haute pression. Dans ce cas, le cadre maintient en place la languette l_2 (comme dans le schéma B de la Fig. 3), ferme la cuve, permet de maintenir la séparation entre les deux plaques de verre (ps et pi) et, enfin, protège la couche mince de la désactivation par l'humidité atmosphérique.

Le schéma C de la Fig. 3 montre le montage utilisé pour développer un chromatogramme en couche mince, dans une atmosphère conditionnée. Ici, l'auto-cuve contient deux couches minces se faisant face. Dans un premier temps, l'atmosphère de la cuve à chromatographie est créée par l'irrigation de la couche mince inférieure par un solvant volatil approprié; pour obtenir ce résultat, le solvant introduit dans la cuvette inférieure (ci) est amené à la couche mince à l'aide de la languette de papier (l_2). Après un temps convenable, le solvant devant permettre le développement du chromatogramme dans la couche mince supérieure (ps) est introduit dans la cuvette supérieure (cs). Ainsi le développement du chromatogramme (alimentation en solvant à travers la languette de papier l_1) peut avoir lieu en atmosphère conditionnée (vapeurs de solvants organiques, ammoniac, amines aliphatiques volatiles, pyridine, acides volatils etc...). Remarquons qu'il peut être intéressant de mettre, au contact de l'extrémité de la couche mince inférieure, une languette de papier (l_3) afin de permettre l'écoulement continu éventuel du solvant devant créer l'atmosphère de la cuve.

Dans l'exemple que nous venons de décrire, les deux couches minces représentées dans le schéma C (Fig. 3) sont à base de poudre de cellulose et sont, donc, mécaniquement très résistantes. Lorsqu'il s'agit de faire une chromatographie dans une couche mince fragile, le développement du chromatogramme doit être réalisé dans la couche mince inférieure et le solvant qui va créer l'atmosphère de la cuve devra donc se déplacer dans la couche mince supérieure à base de poudre de cellulose; dans ce cas, la languette de papier (l_3) est, évidemment, mise au contact de la couche mince supérieure et son extrémité est repliée sur la face supérieure de la plaque de verre supérieure.

Le dispositif représenté dans le schéma C (Fig. 3) est extrêmement intéressant puisqu'il permet de faire des chromatographies dans une atmosphère rigoureusement contrôlée, opération qui ne pouvait être réalisée, jusqu'ici, qu'en chromatographie sur papier. Signalons que ce dispositif a donné d'excellents résultats^{4,5} pour la chromatographie, en atmosphère fortement ammoniacale, des dinitro-phényl-aminoacides sur couche mince de poudre de cellulose.

Remarquons, enfin, que dans le cas du montage représenté dans le schéma C (Fig. 3) le modèle adopté pour la cuvette à solvant (c) de l'auto-cuve (voir Fig. 1) rend très aisée la fixation (à l'aide de petites pinces à dessin) des cuvettes inférieure et supérieure aux plaques de verre.

Chromatographie avec écoulement continu du solvant

Si dans les dispositifs A et B de la Fig. 3, on tire légèrement vers l'extérieur la baguette de verre (b), lorsque le front du solvant a atteint l'ouverture de la cuve à

* Dans ce cas, on peut remplacer la réglette de verre r par une réglette (verre ou polyéthylène haute pression) de même épaisseur que l'espace existant entre les deux plaques de verre (pi et ps).

chromatographie, on peut réaliser à l'instar de BRENNER ET NIEDERWIESER un développement continu du chromatogramme par évaporation du solvant en extrémité de plaque. En fait ceci ne peut être pratiqué que pour des temps courts de développement continu et avec des solvants dont tous les constituants sont également (et suffisamment) volatils. Pratiquement, dans beaucoup de cas, ce procédé donne des résultats très peu reproductibles; ceci est dû au fait que, d'une part, le dispositif est extrêmement sensible à l'action néfaste des courants d'air et que d'autre part, les impuretés contenues dans la poudre de cellulose de la couche mince et dans les constituants du solvant mobile s'accumulent en extrémité de plaque et bloquent plus ou moins rapidement la progression du solvant.

Pour pallier tous ces inconvénients, nous avons mis au point un procédé nouveau de développement continu des chromatogrammes en couche mince. A la place de la baguette (b) de verre (voir schéma A de la Fig. 3) qui forme le 6-ème côté de l'auto-cuve, nous avons mis un accordéon (l_4) de papier (voir schéma A de la Fig. 4) dont une des faces du premier pli est au contact de l'extrémité de la couche

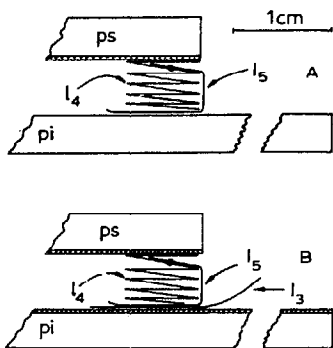


Fig. 4. Dispositif simple et maniable permettant l'écoulement continu du solvant hors des limites de la couche mince; seule la partie terminale de la couche mince, mise en oeuvre dans une "auto-cuve", est représentée dans le schéma ci-dessus. En A: développement d'une "couche mince plafond" de poudre de cellulose; en B: développement d'une "couche mince plafond" (ps), avec écoulement simultané dans la "couche mince plancher" (pi) d'un solvant volatil maintenant une atmosphère conditionnée dans la cuve de développement; l_5 = languette de papier Whatman No. 2 permettant l'écoulement continu du solvant créant l'atmosphère de la cuve; l_4 = languette (185 × 220 cm) de papier Whatman No. 2 pliée (12-14 plis) en accordéon et emballée, dès la 2-ème face du 1-er pli, dans une languette (180 × 35 × 0.2 mm) de polyéthylène; pi, ps = respectivement, les plaques de verre inférieure et supérieure de l'auto-cuve.

mince. Dès que le 1-er du solvant arrive en fin de couche mince, il continue à progresser dans le papier et ainsi on réalise un développement continu du chromatogramme. Afin de rendre le dispositif insensible à l'action des courants d'air, une languette (l_5) de polyéthylène haute pression (agrafée sur le second côté du premier pli) recouvre la partie externe de l'accordéon de papier. Ce dispositif a permis d'obtenir des séparations intéressantes dans le domaine de la chromatographie des aminoacides^{2,3} et de certains dinitro-phényl-aminoacides^{4,5}. En combinant les dispositifs A de la Fig. 4 et C de la Fig. 3, on obtient un montage qui permet de réaliser, en atmosphère conditionnée, le développement continu d'un chromatogramme "en couche mince plafond". On trouvera, dans le schéma B de la Fig. 4, une représentation de l'extrémité de ce montage.

Pour le développement continu de chromatogrammes en "couche mince plancher", des dispositifs similaires aux précédents peuvent être montés; dans ce cas, la languette de papier (l_3), l'accordéon de papier (l_4) partiellement entouré par la languette de polyéthylène (l_5) sont mis dans une position inverse de celle qui est indiquée dans les schémas A et B de la Fig. 4; la partie de couche mince se trouvant hors de l'auto-cuve est éliminée si l'on n'utilise pas une plaque de verre supérieure de 200×225 mm.

Remarquons que le procédé de développement continu des chromatogrammes que nous proposons peut aussi être appliqué lorsqu'il s'agit de chromatographies réalisées dans des bacs de verre (voir Fig. 5). Suivant les cas, l'accordéon de papier (l_4) et la réglette de verre (r) peuvent être maintenus en place à l'aide de bracelets de caoutchouc ou de petites pièces en acier inoxydable.

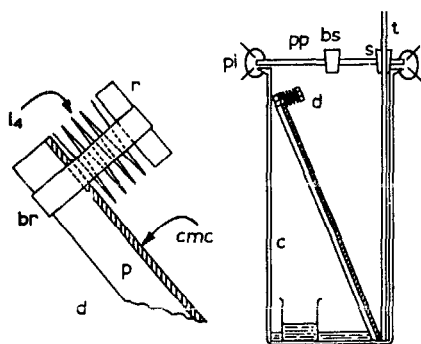


Fig. 5. Schéma d'un dispositif permettant l'écoulement continu du solvant hors des limites de la couche mince (250μ); développement sur plaques (p) $200 \times 200 \times 4$ mm dans les cuves $21 \times 21 \times 9$ cm (dimensions internes); couvercle en polyéthylène (pp) de la cuve (c) percé de deux trous pour recevoir un bouchon de caoutchouc de silicone (bs) et un bouchon percé (s) muni d'un tube de verre (t); pi = pince à dessin maintenant le couvercle (pp) en place; d = dispositif d'absorption du solvant; r = réglette ($200 \times 200 \times 4$ mm) de verre, l_4 = accordéon (12-14 plis) de papier (19×22 cm) Whatman No. 2; br = bracelet de caoutchouc; cmc = couche mince de poudre de cellulose.

Développement en seconde dimension d'une portion de chromatogramme

Lorsque dans un procédé chromatographique, le mélange des substances soumis à l'analyse se trouve séparé (en première dimension) en divers groupes, il est quelquefois intéressant de pouvoir développer (en 2-ème direction) avec des solvants différents les portions de couche mince portant ces divers groupes de substances ou même de pouvoir soumettre certaines d'entre elles à une électrophorèse de zone.

En chromatographie sur couches minces portées par des plaques de verre, ce procédé est utilisé avec sûreté lorsque la séparation des substances peut être obtenue, en première dimension, par une électrophorèse de zone; en effet, dans ce cas, les positions atteintes par les taches de substances sont identiques d'un essai à l'autre si les conditions d'électrophorèse sont les mêmes; il est ainsi possible de déterminer en toute rigueur les positions que doivent avoir les bandes étroites (vv' , Fig. 6) où la couche mince sera éliminée pour être divisée en portions avant les développements en 2-ème dimension.

Il était donc intéressant de mettre au point un dispositif mettant en oeuvre une "auto-cuve" et permettant de ne développer, en seconde dimension, qu'une portion

d'un chromatogramme déjà développé, dans sa totalité, en 1-ère dimension. Un tel dispositif est représenté à la Fig. 6. Dans ce schéma, on voit qu'après développement, en 1-ère dimension, le chromatogramme a été divisé en deux portions (cmc_1 , cmc_2) par élimination de la couche mince (à l'aide d'un scalpel et d'un pinceau) sur une bande étroite (vv'). L'alimentation en solvant de la partie (cmc_1) de la couche mince est assurée à travers la languette de papier (l_1) dont la largeur est égale à celle de la

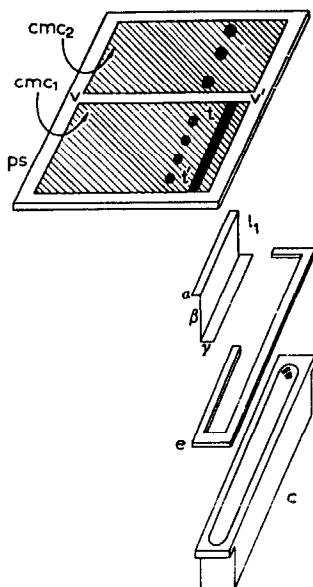


Fig. 6. Schéma de montage d'une "auto-cuve" en vue du développement en 2-ème dimension d'une portion (cmc_1) de couche mince déjà développée en 1-ère dimension sur toute sa surface. Couche mince de poudre de cellulose (surfaces hachurées) divisée en deux portions (cmc_1 , cmc_2) par élimination d'une bande étroite (vv') de la couche mince; c = cuvette à solvant; l_1 = languette de papier Whatman No. 2 amenant le solvant de la cuvette (c) à la portion (cmc_1) de couche mince; e = cale taillée dans une languette de polyéthylène ($200 \times 25 \times 1$ mm); seule la plaque supérieure (ps) porteuse de la couche mince a été représentée dans ce schéma, mais l'étrier de verre (u), la baguette de fermeture (b) et la plaque de verre inférieure (pi), représentés dans la Fig. 1, sont également utilisés.

zone que l'on souhaite irriguer par le solvant. Pour isoler la portion (cmc_2) de couche mince ne devant pas être irriguée par le solvant, une cale (e)* est placée entre la languette de papier (l_1) et la face supérieure de la cuvette à solvant (c); l'ensemble — cuvette à solvant (c), cale (e), languette (l_1) de papier — est attaché à la plaque de verre supérieure à l'aide d'une pince à dessin. Le montage de l'auto-cuve est, pour le reste, identique à celui qui est représenté à la Fig. 1.

Dans l'étape chromatographique suivante la seconde portion (cmc_2) de couche mince est, par exemple, développée par un autre solvant; une autre cale de taille et de forme appropriées isole la portion (cmc_1) de couche mince déjà développée.

Sous certaines conditions, ce procédé a l'avantage de pouvoir permettre la séparation d'un plus grand nombre de substances que dans le cas où le chromatogramme est développé en totalité dans les deux dimensions.

* Découpée à la taille convenable par l'expérimentateur dans une mince (1 mm) plaque de polyéthylène haute pression ou de polytétrafluoroéthylène.

Association chromatographie-électrophorèse, électrophorèse de zone à deux dimensions

Les dispositifs décrits dans le schéma de la Fig. 2 sont ceux que nous avons utilisés pour l'électrophorèse en couche mince de poudre de cellulose (250μ) soit pour des plaques de verre $200 \times 200 \times 4$ mm, soit pour des plaques $200 \times 400 \times 4$ mm; suivant les cas, le champ est appliqué sur 200 ou 400 mm. Dans des couplages chromatographie-électrophorèse ces montages extrêmement simples* nous ont permis d'obtenir d'excellentes séparations dans le domaine de la chromatographie des aminoacides^{2,3} et des dinitro-phényl-aminoacides hydrosolubles^{4,5}. La présence d'une plaque épaisse de verre (4 mm) comme support de la couche mince permet de travailler avec un gradient de potentiel relativement élevé: une partie de l'énergie dégagée par effet Joule se trouve utilisée pour porter la plaque de la température ambiante à une valeur de régime plus élevée. L'épaisseur de la plaque de verre joue un rôle non négligeable dans les essais n'exigeant l'application du champ électrique que pour un temps relativement court. Dans tous les cas, pour rendre petites les taches de substances et pour les maintenir plus longtemps sur la couche mince** malgré l'action d'un gradient de potentiel relativement élevé***, nous réglons l'évaporation uniforme de la solution d'électrolyte par unité de surface de couche mince à une valeur convenable (pour un exemple, voir la séparation des dinitro-phényl-aminoacides hydroacidosolubles par chromato-électrophorèse^{4,5}). Ce résultat est obtenu en amenant à une valeur satisfaisante la conductivité de la solution d'électrolyte imprégnant la couche mince. Dans certains cas on peut faire varier la concentration de la solution saline à pouvoir tampon utilisée; dans d'autres et lorsque cette dernière est constituée par des électrolytes faibles, il est intéressant de régler la conductivité de la solution par addition d'un sel neutre (exemple: NaCl, Na₂SO₄) jusqu'à obtention d'une concentration convenable.

RÉSUMÉ

Des méthodes et des dispositifs expérimentaux simples, peu coûteux et efficaces permettant de réaliser la chromatographie à deux dimensions et la chromato-électrophorèse sur couche mince, sont présentés. En particulier, il est possible, avec ce matériel, de faire des chromatogrammes avec écoulement continu des solvants sans évaporation de ces derniers en extrémité de plaque et (ou) de les développer dans une atmosphère conditionnée. Ces procédés permettent de réaliser simultanément, dans des conditions rigoureusement reproductibles, un grand nombre de chromatogrammes sur une faible surface de travail. Ces méthodes ont donné, en particulier, d'excellents résultats dans le domaine de la chromatographie sur couche mince de poudre de cellulose des aminoacides et de leurs 2,4-dinitro-phényl dérivés.

SUMMARY

Cheap and efficacious methods and simple apparatus are described for two-dimensional chromatography and chromato-electrophoresis on thin layers. With this material, it is in particular possible to run chromatograms with continuous solvent

* Sans les dispositifs compliqués de refroidissement qui rendent les appareils onéreux.

** Et donc sous l'action séparatrice du champ électrique appliqué.

*** C'est à dire pour bénéficier des avantages fondamentaux de l'électrophorèse^{6,7}.

flow without evaporation of the solvent at the end of the plate and/or to develop them in a conditioned atmosphere. These procedures permit, under closely controlled conditions, the simultaneous running of a large number of chromatograms on a fragile working surface. The methods have given excellent results, particularly in the field of chromatography of amino acids and their 2,4-dinitrophenyl derivatives on thin layers of powdered cellulose.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. BRENNER ET A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 17 (1961) 237.
- 2 R. L. MUNIER ET G. SARRAZIN, *Bull. Soc. Chim. France*, (1965) 1490.
- 3 R. L. MUNIER ET G. SARRAZIN, *Bull. Soc. Chim. France*, (1966) sous presse.
- 4 R. L. MUNIER ET G. SARRAZIN, *Bull. Soc. Chim. France*, (1965) 2959.
- 5 R. L. MUNIER ET G. SARRAZIN, *J. Chromatog.*, 22 (1966) 347.
- 6 M. MACHEBOEUF, P. REBEYROTTE ET J. M. DUBERT, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35 (1953) 334 et 346; *Chem. Weekblad*, 49 (1953) 237.
- 7 R. L. MUNIER, *Chim. Anal. (Paris)*, 36 (1954) 253, 283 et 340.

J. Chromatog., 22 (1966) 336-346