

Contribution à l'étude, en lumière ultra-violette, de la chromatographie en couche mince des stérols

Nombre de composés biologiques ne sont détectés que par leur fluorescence en lumière ultra-violette¹⁻⁴. La difficulté consiste à enregistrer les taches observées pour en conserver un document fidèle et pratique à manipuler.

L'étude systématique des stérols sériques par chromatographie sur couche mince⁵, nous a conduit à adopter deux techniques simples, permettant d'objectiver les résultats de nos investigations dans ce domaine par l'utilisation de diagrammes et de la photographie en couleur.

Techniques

I. Diagrammes

La plaque de verre portant le chromatogramme brut ou préalablement révélé par pulvérisation d'un réactif approprié aux stérols (trichlorure d'antimoine; acide phosphomolybdique...) est retournée et posée sur le plan supérieur d'un support. Celui-ci peut être constitué par un panier porte-plaques, dont l'anse est supprimée. On applique alors une feuille de papier transparent sur la surface de la plaque de verre; un contact parfait peut être assuré par des pinces à dessin. Puis, contrairement aux méthodes habituelles on excite le chromatogramme à l'aide d'une source U.V., placée en dessous de la plaque.

On utilise comme sources d'U.V.:

(a) *Pour les courtes longueurs d'ondes.* Une lampe Mineralight modèle UVS-11 constituée d'un seul tube de 4 W à ondes courtes, haute transmission et d'un filtre à ondes courtes cobalt alimenté en 115 V, 50 cycles alternatifs. Intensité de $80 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 45 cm et à une longueur d'onde de 2537 Å.

(b) *Pour les grandes longueurs d'ondes.* Une lampe Mineralight modèle UVL-21 constituée d'un seul tube de 4 W produisant une intensité de $87 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 45 cm et

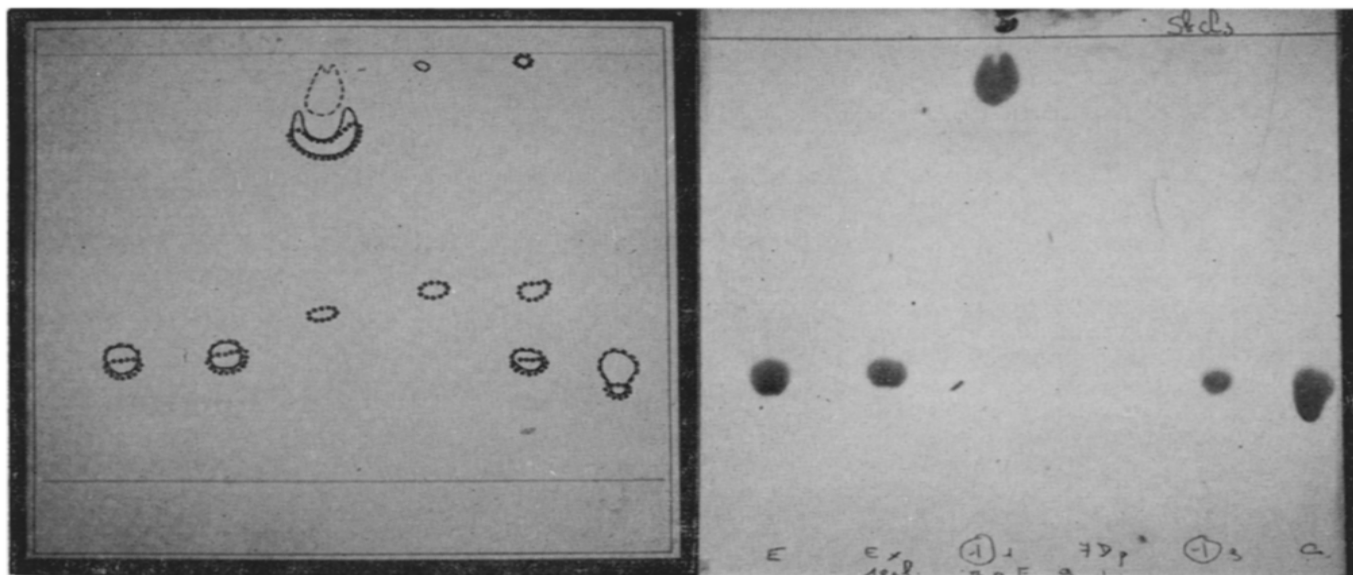
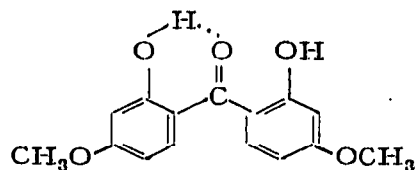


Fig. 1. Révélation de stérols par SbCl_3 (en lumière visible), à droite et diagramme obtenue à partir de ce même chromatogramme, à gauche: (- - -) en lumière visible; (. . .) à 2537 Å; (—) à 3660 Å.

à une longueur d'onde de 3360 Å. (Mineralight Ultra-Violet Products, Inc., San Gabriel, Californie).

L'ensemble ainsi réalisé comporte dans l'ordre et de bas en haut: la source, la surface de l'adsorbant avec l'échantillon à analyser et la plaque de verre. L'observateur examine le chromatogramme et déplace la lampe le plus près possible du chromatogramme, en prenant soin de ne pas détériorer la surface par un contact accidentel. Dans ces conditions on peut calquer le chromatogramme (Fig. 1) et au besoin y inscrire des renseignements complétant l'observation.

Il est évident qu'un tel procédé qui expose de façon prolongée l'observateur aux émissions ultra-violettes rend indispensable une protection oculaire efficace. Ceci nous a conduit à mettre au point des verres de composition bien définie. La matière première de ces verres est de l'Orma 1000, polyester organique de synthèse constituant un réseau tridimensionnel qui lui confère des propriétés remarquables quant à la rigidité et la dureté. L'absorption dans l'ultra-violet est réalisée par incorporation (Fig. 2) de 0.1 % d'Uvinul 490 qui est un mélange de benzophénones tétra-substituées et de 2,2'-dihydroxy-4,4'-diméthoxybenzophénone.



2,2'-Dihydroxy-4,4'-diméthoxybenzophénone.

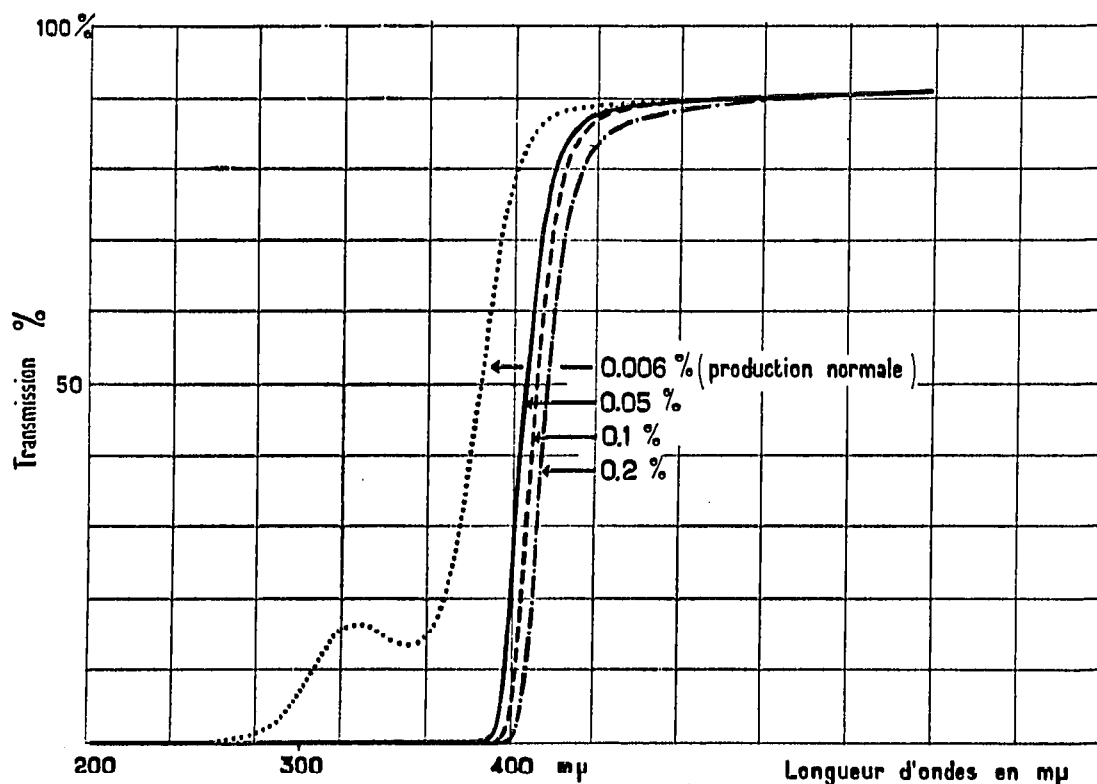


Fig. 2. Courbe de transmission de l'Orma 1000 en fonction de son pourcentage en Uvinul 490.

Cette adjonction nous a paru après essais donner une protection totale au dessous de 3850 Å, sans pour autant modifier la transparence des verres (Fig. 2).

II. La photographie

(a) *En lumière visible.* Réalisée en couleur elle ne pose pas de problème particulier. Elle demande un matériel de prise de vue très simple, composé essentiellement : d'un appareil photographique réflexe mono-objectif de format 24 × 36 mm, d'un statif à colonne sur lequel l'appareil coulisse par l'intermédiaire d'un support en équerre.

d'un dispositif d'éclairage à 2 réflecteurs (de 250W chacun) se fixant également sur la colonne du statif et réglable en hauteur comme en éloignement latéral.

L'appareil photographique est muni d'une bonnette additionnelle de + 1 dioptrie permettant de faire une mise au point à une distance de 45 cm, le sujet occupant alors tout le format de la surface sensible. Celle-ci est constituée par un film Kodachrome II type lumière artificielle, de sensibilité voisine de 40 A.S.A.

Le plan horizontal du support des lampes flood est fixé à 35 cm au-dessus du plan du sujet. Latéralement chacune des lampes est éloignée de 20 cm de l'axe optique et inclinée vers le bas de telle manière qu'aucun rayon lumineux ne vienne frapper le rebord de l'objectif.

La plaque de Silicagel qui mesure 20 cm × 20 cm est placée sur la table, entre les pieds du statif.

Ces conditions étant réunies, on procède à la prise de vue de chacune des plaques révélées, en utilisant le diaphragme 8 pour une vitesse de 1/60° de seconde.

(b) *En lumière ultra-violette.* Le même matériel est utilisé pour la photographie de ces plaques à la lumière ultra-violette, avant leur révélation. On se contente de remplacer les lampes flood par des tubes à lumière U.V. (Fig. 3) fixés sur les supports

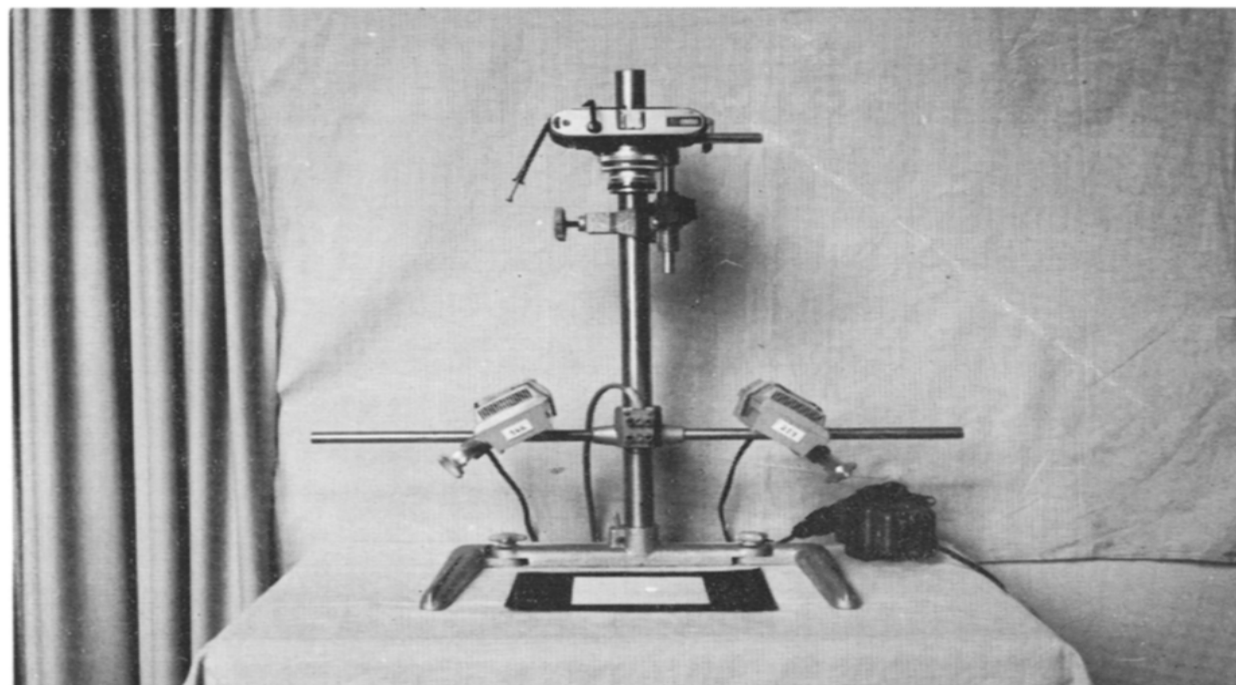


Fig. 3. Dispositif pour la photographie en lumière ultra-violette.

horizontaux par des attaches spécialement adaptées à la forme des tubes. On rapproche ceux-ci à une quinzaine de centimètres du centre de la plaque de Silicagel, en les orientant de telle manière que le faisceau couvre uniformément toute la surface. On utilise les lampes précédemment décrites pour les diagrammes: l'une émettant à 3660 Å, l'autre à 2537 Å.

Notre but consistant à photographier les produits de dégradation des stérols (Fig. 4), dont les composants, migrant sur le silicagel, forment des taches qui sont rendues fluorescentes par la lumière U.V. La localisation, la forme, la couleur, les dimensions de ces taches, enregistrées sur des films en couleur permettent d'effectuer d'intéressantes comparaisons. D'une part, on peut aboutir à l'identification de certains produits de dégradation, d'autre part ces taches peuvent différencier certains groupes d'individus sur le plan clinique ou biologique.

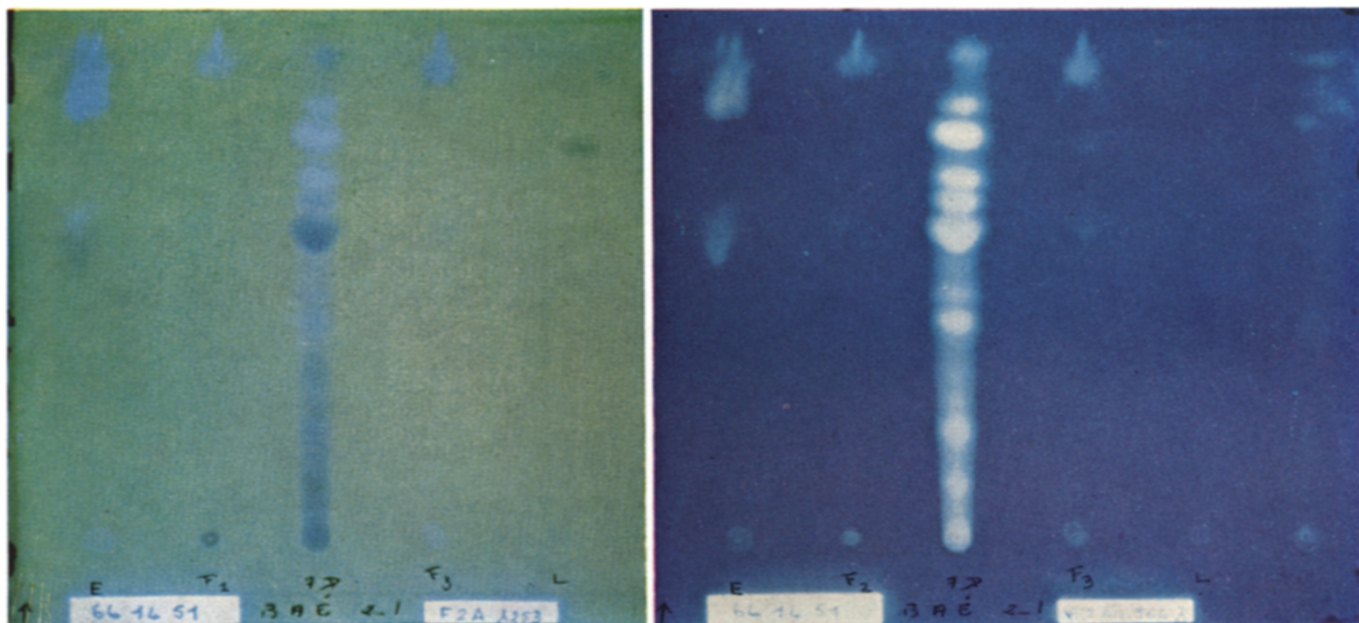


Fig. 4. Dégradation du 7-déshydrocholestérol (7 D) à 2537 Å (a) et à 3660 Å (b).

Le problème consiste à enregistrer sur la pellicule photographique les taches fluorescentes à l'exclusion de toute radiation parasite.

Dans un premier temps, nous avons remarqué que le filtre Wratten 85 du commerce améliorerait la qualité de la prise de vue sans pourtant donner des résultats satisfaisants. C'est à partir de cette constatation que nous avons eu l'idée d'utiliser la gamme des filtres Kodak. Notre choix s'est fixé sur le filtre jaune 2 A qui absorbe l'énergie radiante au-dessous de 4050 Å. Ce filtre, placé en avant de la bonnette additionnelle permet d'éliminer les radiations ultra-violettes en ne laissant passer vers la surface sensible que les longueurs d'ondes du spectre visible. Après avoir essayé différentes surfaces sensibles, notamment le Kodachrome II, nous avons décidé d'utiliser le film *Ektachrome* de haute rapidité, type lumière du jour. Le temps de pose optimum nous a paru être de l'ordre de 30 à 45 secondes pour une ouverture de diaphragme de 4.

Lorsque l'on veut s'attacher à respecter plus particulièrement les nuances de couleurs, car le plus souvent la dimension et la localisation de la tache importent avant tout, on a intérêt à adjoindre au filtre 2 A, un filtre compensateur de couleur de densité 0.05 Magenta ou Vert adapté aux corrections que l'on cherche à obtenir. Dans ce cas il est nécessaire d'ouvrir le diaphragme d'environ $1/2$ à 1 division.

Il est bien évident que la prise de vue doit toujours se faire en chambre noire, à la seule lueur de la source de lumière ultra-violette; toute lumière parasite, même faible, affecterait en effet gravement la qualité de la photographie.

Conclusion

Les conclusions que nous pouvons tirer de l'utilisation de ces deux procédés sont essentiellement d'ordre pratique:

1. La superposition des diagrammes donne la possibilité de faire des comparaisons systématiques dans les domaines clinique et biologique. L'intensité fluorescente des taches, augmentée notablement par la position inhabituelle de la source, donne une résolution accrue des stérols présents à l'état de traces (lanostérol, 7-déshydro-cholestérol, desmostérol...).

2. La photographie en couleur permet d'enregistrer définitivement les documents les plus caractéristiques. On élimine ainsi les risques d'altération ou même de disparition des taches, accident qui se produit fréquemment avec les chromatogrammes plastifiés.

3. Nous proposons enfin un moyen efficace de protection oculaire, au dessous de 3850 Å.

Remerciements

Nous remercions vivement pour leur collaboration technique Madame S. GUFFROY et le laboratoire L.O.R. Telegic.

Laboratoire de Biologie et Endocrinologie*,
Institut Gustave-Roussy,
94-Villejuif (France)

C. LE BORGNE DE KAOUËL
J. DURON
C. AUBERT
P. JURET

1 R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 45 (1949) 294.

2 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer, Berlin, 1962, p. 43-47.

3 K. RANDERATH, *Chromatographie sur couches minces*, Gauthier Villars, Paris, 1964.

4 R. JACKSON, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 410.

5 J. R. CLAUDE ET J. L. BEAUMONT, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 22 (1964) 815.

Reçu le 11 juillet 1966

* Chef de service: Docteur P. JURET.