

## CHROMATOGRAPHIE DES ACIDES PHÉNOLIQUES URINAIRES SUR PAPIER IMPRÉGNÉ D'ACÉTATE DE SODIUM\*

P. MATHIEU ET L. REVOL

*Laboratoire de l'Hôpital Départemental Psychiatrique du Vinatier, 95 Boulevard Pinel, Lyon-Bron, Rhône (France)*

(Reçu le 31 octobre 1966)

A la suite des travaux de ARMSTRONG et coll.<sup>1</sup>, SMITH<sup>2</sup>, DALGLIESH<sup>3</sup> et d'autres auteurs, la chromatographie sur papier est largement utilisée pour préciser l'identité et étudier les modalités d'excrétion des acides phénoliques urinaires, et même pour l'évaluation quantitative de certains d'entre eux par comparaison visuelle<sup>4</sup> ou mesure photométrique après élution<sup>5,6</sup>.

En raison du nombre élevé des composés présents sur les chromatogrammes, les techniques proposées font habituellement appel à une séparation bi-dimensionnelle. Cependant, quels que soient les solvants choisis, les similitudes de  $R_F$  rendent certaines identifications difficiles ou impossibles. C'est, en particulier, le cas lorsque le prélèvement biologique dont on est parti provient d'un malade (phénylcétonurie, phéochromocytome) ou d'un individu qui n'a pas été soumis au préalable à une restriction médicamenteuse ou alimentaire appropriée.

On sait que certains auteurs ont eu recours avec succès—pour la séparation chromatographique de composés phénoliques<sup>7-9</sup> ou de substances de faible polarité comme les alcaloïdes<sup>10</sup>—à l'emploi de papiers imprégnés de sels ou de systèmes tampons particuliers.

En nous référant aux travaux de ces auteurs nous nous sommes proposés de rechercher si, dans le cas des acides phénoliques urinaires, une telle imprégnation saline du papier jointe à l'emploi de solvants appropriés, ne serait pas susceptible de conduire à une meilleure distinction des taches, en modifiant les solubilités et les équilibres ioniques des substances présentes.

De nombreux essais ont été effectués sur des papiers imprégnés de sels ou de systèmes tampons divers. Ce sont les résultats obtenus sur papier Whatman No. 20 imprégné d'acétate de sodium 0.1 M que nous nous proposons de rapporter ici.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tous les produits de référence cités sont d'origine commerciale\*\*.

L'extraction des acides phénoliques de l'urine est effectuée selon ARMSTRONG, SHAW ET WALL<sup>1</sup>, par l'acétate d'éthyle. Le volume final de l'extrait est amené à une valeur telle que 1 ml corresponde au volume d'urine qui renferme 1 mg de créatinine. On dépose habituellement sur un chromatogramme 0.5 ou 1 ml d'extrait.

\* Travail effectué avec l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Convention 61-Fr-202, avec la collaboration scientifique de Mlle R. BELLIMAZ et la collaboration technique de Mlle G. GIRARD.

\*\* Produits Fluka, Buchs, Suisse.

*Préparation du papier*

Après en avoir découpé le bord inférieur en dents de scie, les feuilles de papier Whatman No. 20 (44 × 56 cm) sont suspendues à des baguettes de verre (fibre du papier dans le sens vertical) puis arrosées régulièrement\*, en allant du haut vers le bas et sur les deux faces, avec une solution d'acétate de sodium 0.1 *M*. On laisse ensuite sécher spontanément à l'air.

Les caractères du papier ainsi traité se révèlent, après plus d'une centaine d'essais, parfaitement constants. La vitesse de migration du solvant devient plus grande sur le papier traité que sur le papier normal, ce qui est sans doute lié à une modification de la texture des fibres résultant du gonflement: le papier imprégné d'acétate de sodium prend un aspect plus irrégulier et plus rugueux que le papier normal. Dans le solvant *n*-butanol-acide acétique-eau (4:1:5) on obtient un déplacement du front de 35 cm environ en 14-16 heures, contre 36 heures (HAIS ET MACEK<sup>11</sup>) sur le papier Whatman No. 20 normal.

Le papier Whatman No. 1 peut être utilisé, mais il semble plus fragile pendant le traitement et donne des spots moins beaux que le papier Whatman No. 20.

*Solvants*

Voir Tableau II. L'emploi du solvant isopropanol-ammoniaque-eau (8:1:1), déjà préconisé par ARMSTRONG<sup>1</sup>, demande certaines précautions: cuves à chromatographie placées dans un local thermostaté et sans courants d'air, nécessité d'en charger le couvercle pour assurer son étanchéité.

Nous avons toujours utilisé la technique descendante, à une température du Laboratoire comprise entre 20° et 25°, et en équilibrant les chromatogrammes dans l'atmosphère de la cuve pendant 1 heure avant le début de la migration. Le solvant est renouvelé à chaque essai.

*Révélation des taches d'acides phénoliques*

Les chromatogrammes sont d'abord examinés sous lumière U.V. à 360 m $\mu$  et 254 m $\mu$  puis, après avoir été privés de toute trace de solvant acide soit par un séchage sous courant d'air de 1 heure au moins, soit par un séjour prolongé à l'air (24 heures), ils sont révélés par l'acide sulfanilique ou la *p*-nitraniline diazotés. Ces réactifs sont particulièrement sensibles et ils donnent des colorations spécifiques avec de nombreux composés phénoliques. En vue de l'utilisation sur papier imprégné d'acétate de sodium, nous avons adopté les formules suivantes:

*Réactif à la diazo-*p*-nitraniline*

- (a) *p*-Nitraniline pure en solution à 0.1 % dans HCl 0.1 *M*;
- (b) Nitrite de sodium en solution à 1 % dans l'eau distillée, cette solution est diluée au 1/10 e au moment de l'emploi;
- (c) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.6 *M*: ce titre doit être contrôlé.

Au moment de l'emploi, à 10 ml de (a) on ajoute, dans l'ordre, 10 ml de (b) dilué au 1/10 e, puis 10 ml de (c). Réactif à pulvériser aussitôt après sa préparation.

*Réactif à l'acide sulfanilique diazoté*

Même formule, mais en substituant à (a):

- (a') Acide sulfanilique pur en solution à 1.25 % dans HCl 0.1 *M*.

\* À l'aide d'une "pissette" de laboratoire.

Ces formules donnent également de bonnes colorations sur le papier chromatographique normal. Dans tous les cas, l'apparition des taches colorées n'est pas instantanée, elle demande quelques heures. Le fond du chromatogramme reste incolore.

## RÉSULTATS

Le Tableau I donne les caractères d'identification des acides phénoliques de référence, sur papier imprégné d'acétate de sodium, en lumière U.V. (254 m $\mu$ ) et après révélation par les deux réactifs décrits.

Le Tableau II indique les  $R_F$  de ces mêmes acides phénoliques sur papier Whatman No. 20 normal et imprégné d'acétate de sodium 0.1  $M$ , dans quatre solvants différents.

La Fig. 1 illustre l'intérêt de l'emploi du papier imprégné d'acétate de sodium. On remarque, en particulier, la position privilégiée qu'occupe, sur le chromatogramme de droite, l'acide 4-hydroxy-3-méthoxymandélique (AVM), nettement séparé des autres acides phénoliques. Cette distinction de l'acide vanillomandélique en chromatographie mono-dimensionnelle est encore plus nette avec le solvant isopropanol-acide acétique-eau (8:1:1) (voir Tableau II) dans lequel on peut l'isoler totalement, à  $R_F$  0.25, des autres composés phénoliques normaux de l'urine qui réagissent avec les diazo-réactifs. Cette propriété peut être mise à profit pour une évaluation quantitative de l'AVM (visuelle ou photométrique) par comparaison avec des quantités connues de substance pure chromatographiées parallèlement.

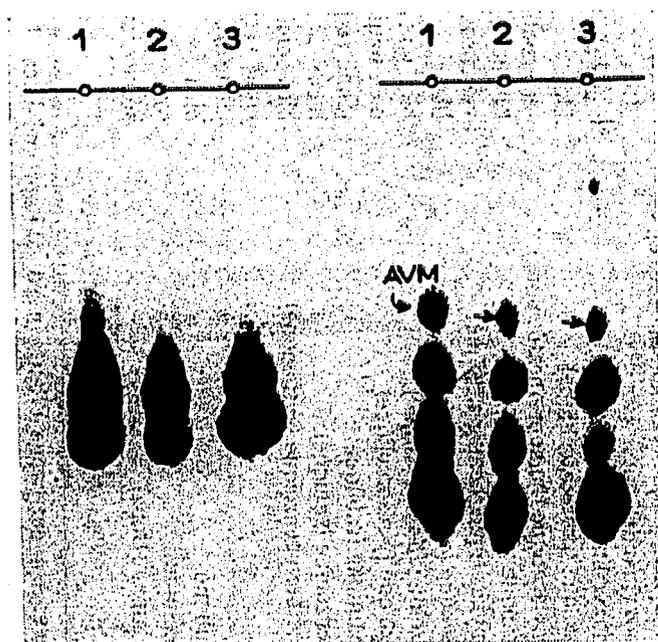


Fig. 1. Chromatogrammes de trois extraits urinaires (*n*-butanol-acide acétique-eau (4:1:5) sur papier Whatman No. 20 normal (à gauche) et imprégné d'acétate de sodium (à droite). Les quantités d'extrait déposées à gauche et à droite sont identiques. On voit que les taches d'acides phénoliques sont beaucoup mieux séparées les unes des autres, et plus nettes, sur le papier imprégné d'acétate de sodium. Il faut noter, en particulier, la position privilégiée de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxymandélique (AVM), nettement distinct, après une migration monodimensionnelle, des autres composés présents.

TABLEAU I

## IDENTIFICATION DES TACHES D'ACIDES PHÉNOLIQUES

Acides	U.V. 254 m $\mu$		Dz PN	Sulfa Dz
	A	B		
<i>o</i> -Hydroxybenzoïque (salicylique)	bleu clair	—	rose pâle	jaune pâle
<i>m</i> -Hydroxybenzoïque	bleu	—	rose	jaune vif
<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	bleu sombre	bleu sombre	rose	jaune vif
<i>o</i> -Hydroxyphénylacétique	bleu sombre	bleu sombre	rouge violet	jaune orangé
<i>m</i> -Hydroxyphénylacétique	—	—	rose foncé	jaune
<i>p</i> -Hydroxyphénylacétique	—	—	violet clair	rose saumon
<i>m</i> -Hydroxymandélique	—	—	rose vif	jaune
<i>p</i> -Hydroxymandélique	—	—	rose	jaune
<i>p</i> -Hydroxyphénylpropionique	—	—	violet clair	rose saumon
<i>p</i> -Hydroxyphénylpyruvique	—	—	violet pâle	orangé pâle
<i>p</i> -Hydroxyphényllactique	bleu pale	—	violet	rose saumon
3-4-Diméthoxybenzoïque (vétratrique)	—	—	violet t. pâle	—
3-4-Diméthoxyphényllactique (homovétratrique)	bleu sombre	bleu sombre	—	—
4-Hydroxy-3-méthoxybenzoïque (vanillique)	bleu sombre	bleu sombre	violet	orange
4-Hydroxy-3-méthoxyphényllactique (homovanillique)	bleu sombre	—	bleu gris	rose
4-Hydroxy-3-méthoxymandélique (vanillomandélique)	bleu	—	violet	orange
3-Hydroxy-4-méthoxymandélique	—	—	violet	orange
4-Hydroxy-3-méthoxycinnamique (féruilique)	—	—	gris bleu	rose violacé
3-4-Dihydroxybenzoïque (protocatéchtique)	turquoise vif	turquoise vif	violet pâle	jaune pâle
3-4-Dihydroxyphényllactique (homoprotocatéchtique)	bleu	bleu	violet pâle	gris
2,5-Dihydroxybenzoïque (gentisique)	bleu sombre	bleu sombre	jaune pâle	jaune pâle
2,5-Dihydroxyphényllactique (homogentisique)	turquoise vif	turquoise vif	brun pâle	gris brun
3,5-Dihydroxybenzoïque ( $\alpha$ -résorcylrique)	violet sombre	violet sombre	jaune d'or	jaune citron
2,4-Dihydroxybenzoïque ( $\beta$ -résorcylrique)	bleu	bleu	jaune orangé	jaune citron
2,6-Dihydroxybenzoïque ( $\gamma$ -résorcylrique)	bleu vif	bleu sombre	jaune	jaune citron
3,4-Dihydroxycinnamique (caféttique)	bleu sombre	jaune vert	gris pâle	gris vert
3,4,5-Trihydroxybenzoïque (gallique)	jaune vert	bleu	gris pâle	gris
4-Hydroxy-3,5-diméthoxybenzoïque (syringique)	bleu	bleu sombre	bleu vif	rose vif
Cynurénique	jaune vert	jaune vert	—	—
Xanthurénique	jaune orangé	jaune clair	violet	rose vif
3-Hydroxyanthranilique	bleu	bleu	violet pâle	rose pâle
5-Hydroxyindoleacétique	rose	rose	rose violet	rouge saumon
Dihydroxyphénylalanine (Dopa)	jaune orangé	rose orangé	rose pâle	orangé pâle
Tyrosine	—	—	violet clair	rose saumon

Abbréviations: A = sur papier Whatman No. 20 imprégné d'acétate de sodium; B = sur papier Whatman No. 20 normal; Dz PN = *p*-nitro-niline diazotée, sur papier Whatman No. 20 imprégné d'acétate de sodium; Sulfa Dz = acide sulfanilique diazoté sur papier Whatman No. 20 imprégné d'acétate de sodium.

TABLEAU II

R<sub>F</sub> DES ACIDES PHÉNOLIQUES DANS DIFFÉRENTS SOLVANTS

(1) Trainée; (2) décomposition; (3) une tache secondaire jaune (Dz PN et Sulfa Dz) de R<sub>F</sub> 0.07; (4) une tache secondaire jaune (Dz PN et Sulfa Dz) de R<sub>F</sub> 0.11; (5) deux taches secondaires visibles sous lumière U.V. de R<sub>F</sub> 0.22 (jaune clair) et 0.46 (bleu clair); (6) une tache secondaire visible sous lumière U.V. de R<sub>F</sub> 0.57 (bleu clair); (7) deux taches secondaires visibles sous lumière U.V. de R<sub>F</sub> 0.09 (jaune clair) et 0.26 (bleu clair); (8) une tache secondaire visible sous lumière U.V. de R<sub>F</sub> 0.35 (bleu clair).

Acides	Bu-Ac (4:1:5)		Bu-Ac (12:3:5)		Isoprop-Ac		Isoprop-NH <sub>3</sub>	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>o</i> -Hydroxybenzoïque (salicylique)	0.68	0.85	0.75	0.85	0.56	0.81	0.55	0.56
<i>m</i> -Hydroxybenzoïque	0.74	0.82	0.83	0.84	0.67	0.81	0.25	0.24
<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	0.78	0.83	0.88	0.85	0.78	0.82	0.14	0.13
<i>o</i> -Hydroxyphénylacétique	0.72	0.82	0.81	0.84	0.69	0.80	0.57	0.55
<i>m</i> -Hydroxyphénylacétique	0.72	0.82	0.80	0.84	0.71	0.81	0.34	0.28
<i>p</i> -Hydroxyphénylacétique	0.73	0.80	0.81	0.84	0.72	0.79	0.27	0.25
<i>m</i> -Hydroxymandélique	0.34	0.67	0.41	0.69	0.31	0.63	0.22	0.23
<i>p</i> -Hydroxymandélique	0.33	0.66	0.40	0.66	0.32	0.63	0.17	0.18
<i>p</i> -Hydroxyphénylpropionique	0.81	0.84	0.88	0.85	0.75	0.81	0.29	0.32
<i>p</i> -Hydroxyphénylpyruvique	0.36	0.72	0.48	0.69	0.38	0.69	(1)	0.21
<i>p</i> -Hydroxyphényllactique	0.53	0.71	0.54	0.69	0.35	0.67	0.25	0.22
3,4-Diméthoxybenzoïque (vétratrique)	0.80	0.80	0.85	0.84	0.75	0.78	0.29	0.29
3,4-Diméthoxyphénylacétique (homovétratrique)	0.80	0.80	0.85	0.85	0.73	0.78	0.33	0.32
4-Hydroxy-3-méthoxybenzoïque (homovanillique)	0.76	0.81	0.86	0.82	0.65	0.77	0.07	0.09
4-Hydroxy-3-méthoxyphénylacétique (homovanillique)	0.74	0.79	0.80	0.80	0.70	0.74	0.22	0.21
4-Hydroxy-3-méthoxymandélique (vanillomandélique)	0.31	0.62	0.36	0.64	0.25	0.57	0.13	0.16
3-Hydroxy-4-méthoxymandélique	0.31	0.60	0.36	0.62	0.23	0.55	0.14	0.17
4-Hydroxy-3-méthoxycinnamique (féruilique)	0.79	0.80	0.88	0.82	0.70	0.75	0.08	0.15
3,4-Dihydroxybenzoïque (protocatéchique)	0.69	0.73	0.77	0.75	0.64	0.69	0.02	0.05
3,4-Dihydroxyphénylacétique (homoprotocatéchique)	0.62	0.71	0.62	0.72	0.57	0.65	(2)	0.08 (1)
2,5-Dihydroxybenzoïque (gentisique)	0.43	0.80	0.53	0.81	0.37	0.73	0.37	0.39
2,5-Dihydroxyphénylacétique (homogentisique)	0.57	0.69	0.59	0.70	0.52	0.72	(2)	(1)
3,5-Dihydroxybenzoïque (α-résorcylrique)	0.62 (3)	0.75	0.72 (4)	0.78	0.64	0.73	0.06	0.11 (1)
2,4-Dihydroxybenzoïque (β-résorcylrique)	0.60	0.82	0.70	0.85	0.52	0.78	0.13	0.19
2,6-Dihydroxybenzoïque (γ-résorcylrique)	0.49	0.45	0.75	0.53	0.46	0.40	0.64	0.68
3,4-Dihydroxycinnamique (caféique)	0.69	0.71	0.78	0.76	0.60	0.66	(1)	0.05
3,4,5-Trihydroxybenzoïque (gallique)	0.45	0.50	0.52	0.55	0.54	0.52	(1)	(1)
4-Hydroxy-3,5-diméthoxybenzoïque (syringique)	0.73	0.78	0.82	0.79	0.67	0.71	0.05	0.08
Cynaurénique	0.35	0.46	0.50	0.51	0.24	0.29	0.29	0.32
Xanthurénique	0.33 (5)	0.42	0.46 (6)	0.49	0.19 (7)	0.30	0.02 (8)	0.05
3-Hydroxyanthranilique	0.75	0.78	0.85	0.77	0.67	0.40	(1)	0.05
5-Hydroxyindoleacétique	0.62	0.68	0.70	0.69	0.59	0.63	0.14	0.12
Dihydroxyphénylalanine	0.13	0.08	0.20 (1)	0.14	0.07	0.07	(2)	0.05
Tyrosine	0.28	0.22	0.35	0.28	(1)	0.16	0.15	0.16

Abbréviations: Bu-Ac (4:1:5) = *n*-butanol-acide acétique-eau (4:1:5), phase organique; Bu-Ac (12:3:5) = *n*-butanol-acide acétique-eau (12:3:5); Isoprop-Ac = Isopropanol-acide acétique-eau (8:1:1); Isoprop-NH<sub>3</sub> = Isopropanol-ammoniac-eau (8:1:1); A = sur papier Whatman No. 20 imprégné d'acétate de sodium 0.1 M; B = sur papier Whatman No. 20 normal.

Cependant le recours à une séparation bi-dimensionnelle reste indispensable pour l'identification de l'ensemble des composés présents dans les extraits d'urine. Les deux solvants qui nous ont donné les meilleurs résultats sont les suivants:

1. (Première dimension): isopropanol-ammoniaque-eau (8:1:1),
2. (Deuxième dimension): isopropanol-acide acétique-eau (8:1:1).

La Fig. 2 montre la localisation des taches d'acides phénoliques urinaires sur un chromatogramme bi-dimensionnel. On peut observer, pour certains composés,

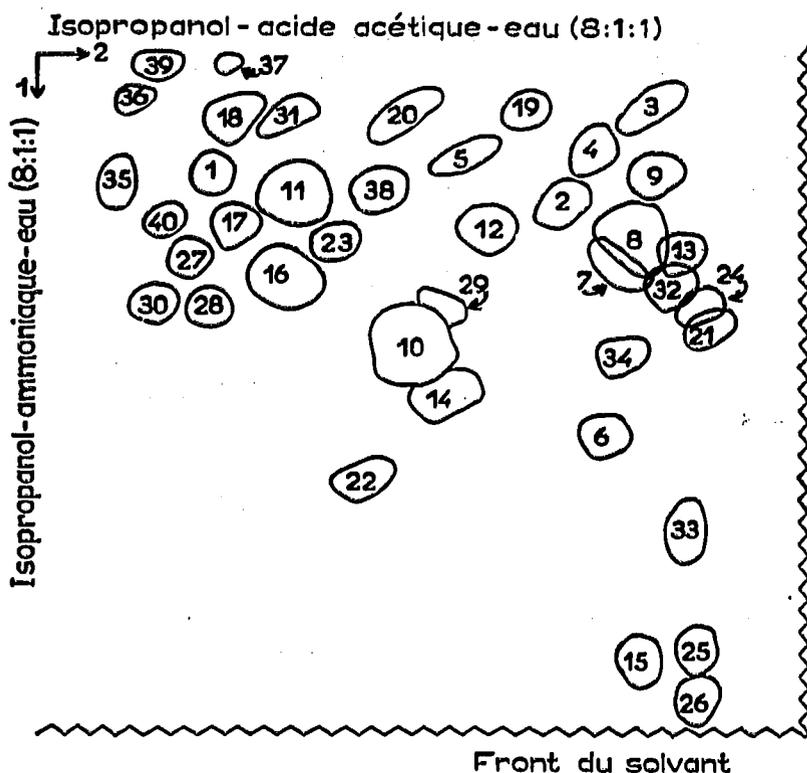


Fig. 2. Les acides phénoliques de l'urine humaine. Chromatographie bi-dimensionnelle descendante sur papier Whatman No. 20 imprégné d'acétate de sodium 0.1 M. DzPN = *p*-Nitraniline diazotée; Sulfa Dz = acide sulfanilique diazoté; U.V. = examen sous lumière ultra-violette à 254 m $\mu$ .

(1) Ac. 4-hydroxy-3-méthoxymandélique (vanillomandélique); (2) ac. 4-hydroxy-3-méthoxyphénylacétique (homovanillique); (3) ac. vanillique; (4) ac. 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique (féruilique); (5) ac. 5-hydroxyindoleacétique; (6) ac. *o*-hydroxyphénylacétique; (7) ac. *m*-hydroxyphénylacétique; (8) ac. *p*-hydroxyphénylacétique; (9) ac. *p*-hydroxybenzoïque; (10) ac. hippurique (Dz PN + O, Sulfa Dz = O, U.V. = bleu sombre); (11) ac. *p*-hydroxyhippurique (Dz PN = rouge clair, Sulfa Dz = jaune orangé, U.V. = bleu); (12) Dz PN = rose, Sulfa Dz = jaune; (13) U.V. = bleu clair; (14) U.V. = bleu clair; (15) U.V. = bleu; (16) U.V. = bleu sombre; (17) U.V. = bleu sombre; (18) U.V. = bleu turquoise vif; (19) ac. 3,5-dihydroxybenzoïque ( $\alpha$ -résorcylique); (20) ac. *o*-hydroxyhippurique (salicylurique) (Dz PN = rose, Sulfa Dz = jaune, U.V. = bleu vif); (21) ac. *p*-hydroxyphénylpropionique; (22) ac. *o*-hydroxybenzoïque (salicylique); (23) ac. *p*-hydroxyphényllactique; (24) Dz PN = rose, Sulfa Dz = jaune; (25) Dz PN = rose, Sulfa Dz = jaune; (26) Dz PN = rose violacé, Sulfa Dz = rose saumon; (27) U.V. = bleu clair; (28) U.V. = bleu; (29) U.V. = bleu clair; (30) U.V. = bleu clair; (31) ac. *m*-hydroxyhippurique (Dz PN = rose clair, Sulfa Dz = jaune clair, U.V. = bleu sombre); (32) Dz PN = bleu foncé, Sulfa Dz = rose; (33) U.V. = bleu clair; (34) U.V. = bleu; (35) U.V. = jaune; (36) et (37) U.V. = bleu sombre; (39) ac. xanthurénique (?); (40) tyrosine (?). Les taches 1 à 18 ont été observées sur presque tous les chromatogrammes; en revanche la présence des taches 19 et suivantes est inconstante. Les noms de plusieurs acides phénoliques, reconnus comme constituants normaux de l'urine humaine, ne figurent pas sur cette liste qui comporte seulement les noms des substances que nous avons identifiées en nous référant aux seuls produits purs en notre possession.

des différences sensibles de  $R_F$  selon qu'il s'agit du produit pur ou de la même substance présente dans l'extrait urinaire.

Le solvant 1 présente l'inconvénient de décomposer ou d'altérer certains acides phénoliques fragiles. Il serait bon de pouvoir lui substituer un autre solvant qui, tout en permettant une résolution comparable des taches, n'aurait pas cet inconvénient. Nos recherches dans ce sens, à l'aide de solvants contenant plusieurs types de bases: propylamine, isopropylamine, *n*-butylamine, isobutylamine,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ont été jusqu'à ce jour infructueuses.

La comparaison entre les chromatogrammes obtenus avec ces solvants, sur papier Whatman No. 20 imprégné d'acétate de sodium 0.1 *M*, et ceux réalisés sur papier normal à l'aide de solvants préconisés par d'autres auteurs (isopropanol-ammoniaque-eau, 8:1:1, suivi de benzène-acide propionique-eau, 2:2:1 phase organique (1) ou anisol-acide acétique-eau, 70:29:1 (2)) montre que l'on obtient, sur le papier traité par imprégnation saline, une meilleure répartition des spots sur l'ensemble du chromatogramme. Ils se distinguent donc mieux les uns des autres.

Ces constatations corroborent celles de MUNIER ET MACHEBOEUF<sup>10,12</sup>. On sait que ces auteurs ont préconisé pour la chromatographie des alcaloïdes et des bases organiques—substances dont les constantes de dissociation varient dans de larges limites, comme c'est le cas pour les acides phénoliques—l'emploi de papier imprégné d'un sel dont l'anion forme un système tampon avec l'acide présent dans la phase solvante. Les résultats que nous avons obtenus montrent que ce principe peut être appliqué avec succès à la séparation des acides phénoliques: en phase solvante acide et sur papier normal, un grand nombre de ces composés ont des  $R_F$  voisins, ce qui n'est plus le cas sur le papier imprégné d'acétate de sodium.

On peut observer (Tableau II) que les modifications de  $R_F$  des acides phénoliques, sous l'effet de l'imprégnation saline du papier, varient de l'un à l'autre dans de grandes proportions. La comparaison, pour un certain nombre d'entre eux, entre la constante de dissociation  $K$ <sup>13,14</sup> et la différence entre le  $R_F$  sur papier normal et le  $R_F$  sur papier imprégné d'acétate de sodium ( $R_{F(B)} - R_{F(A)}$ ) montre que ce sont ceux qui ont une constante de dissociation élevée ( $K > 10^{-3}$ ) pour lesquels la valeur de  $R_{F(B)} - R_{F(A)}$  est la plus élevée. Les acides phénoliques dont la constante de dissociation est moyenne ou faible ( $K < 10^{-4}$ ) ne voient leur comportement chromatographique que peu ou pas modifié.

Quelques exemples (Tableau III) illustrent ces faits.

En phase solvante alcaline, comme il était prévisible, les  $R_F$  et l'aspect des chromatogrammes sont sensiblement identiques pour le papier normal et le papier imprégné d'acétate de sodium.

## RÉSUMÉ

La séparation chromatographique des acides phénoliques extraits de l'urine humaine peut être effectuée dans de bonnes conditions sur papier Whatman No. 20 imprégné d'acétate de sodium 0.1 *M*, et à l'aide des solvants suivants:

Première dimension: isopropanol-ammoniaque-eau (8:1:1),

Deuxième dimension: isopropanol-acide acétique-eau (8:1:1).

Par rapport aux techniques antérieurement décrites, la chromatographie sur papier imprégné d'acétate de sodium conduit à une meilleure répartition des taches

TABLEAU III

RELATION, POUR QUELQUES ACIDES PHÉNOLIQUES, ENTRE LA CONSTANTE DE DISSOCIATION  $K$  ET LA MODIFICATION DE LEUR  $R_F$  SOUS L'EFFET DE L'IMPRÉGNATION SALINE DU PAPIER  
Se reporter au texte.

Acides	$K^*$	$R_{F(B)} - R_{F(A)}^{**}$
2,5-Dihydroxybenzoïque	$1.08 \cdot 10^{-3}$	0.36
2,4-Dihydroxybenzoïque	$1.14 \cdot 10^{-3}$	0.26
<i>o</i> -Hydroxybenzoïque	$1.25 \cdot 10^{-3}$	0.25
<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	$3.3 \cdot 10^{-5}$	0.04
3,4-Dihydroxybenzoïque	$3.3 \cdot 10^{-5}$	0.05
3,4,5-Trihydroxybenzoïque	$3.9 \cdot 10^{-5}$	0.02

\* Première dissociation.

\*\* Dans le solvant: isopropanol-acide acétique-eau (8:1:1).

d'acides phénoliques sur l'ensemble du chromatogramme. Elle améliore les possibilités d'identification et, dans certains cas, d'évaluation quantitative de ces composés.

## SUMMARY

The chromatographic separation of phenolic acids extracted from human urine can be carried out under good conditions on Whatman No. 20 paper, impregnated with 0.1 *M* sodium acetate, using the following solvents:

1st dimension: isopropanol-ammonia-water (8:1:1),

2nd dimension: isopropanol-acetic acid-water (8:1:1).

In comparison with techniques previously described, chromatography on paper impregnated with sodium acetate leads to a better distribution of the spots of the phenolic acids over the whole chromatogram. It improves the possibility of identification and, in certain cases, the quantitative determination of these compounds.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. D. ARMSTRONG, K. N. F. SHAW ET P. E. WALL, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 293.
- 2 P. SMITH, dans H. VARLEY ET A. H. GOWENLOCK (Rédacteurs), *The Clinical Chemistry of Monoamines*, Elsevier, Amsterdam, 1963, pp. 31-38.
- 3 C. E. DALGLIESH, *J. Clin. Pathol.*, 8 (1955) 73.
- 4 R. ROBINSON, J. RATCLIFFE ET P. SMITH, *J. Clin. Pathol.*, 12 (1959) 541.
- 5 L. BERMAN ET J. A. PETTITT, *J. Lab. Clin. Med.*, 57 (1961) 126.
- 6 H. FLOCH, *Biol. Med. (Paris)*, 53 (1964) 381.
- 7 S. G. E. GUERRA, *Anales Asoc. Quim. Arg.*, 50 (1962) 79.
- 8 L. JURD, *J. Chromatog.*, 4 (1960) 369.
- 9 P. COLOMBO, D. CORBETTA, A. PIROTTA ET G. RUFFINI, *J. Chromatog.*, 6 (1961) 467.
- 10 R. MUNIER, M. MACHEBOEUF ET N. CHERRIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34 (1952) 204.
- 11 I. M. HAIS ET K. MACEK, *Paper Chromatography*, Academic Press, New York, 1963, pp. 100-101.
- 12 R. MUNIER ET M. MACHEBOEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33 (1951) 846.
- 13 R. C. WEAST, S. M. SELBY ET C. D. HODGMAN, *Handbook of Chemistry and Physics*, Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio, 1965, p. D78.
- 14 G. KORTUM, W. VOGEL ET K. ANDRUSSOW, *Dissociation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, Butterworths, London, 1961.