

CHROM. 3795

## POSSIBILITÉS ANALYTIQUES NOUVELLES DES COUCHES MINCES CHROMATOGRAPHIQUES SUR SUPPORT PLASTIQUE SOUPLE

J. PETIT, J. A. BERGER, G. GAILLARD ET G. MEYNIEL

*Laboratoires de Chimie Analytique et de Biophysique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie et Unité No. 71 de l'INSERM, B.P. 38, 63, Clermont-Ferrand (France)*

(Reçu le 24 septembre 1968)

## SUMMARY

*New analytical possibilities of chromatographic thin layers on flexible plastic support*

The use of chromatographic thin layers on flexible supports allows one to combine the advantages of both thin-layer chromatography and paper chromatography.

In the laboratory, the practical realisation of thin layers on a film of ethylene polyterephthalat allows the use of many different substrates and chromatographic techniques.

Two original analytical processes are proposed: two-dimensional fractional chromatography on large homogeneous thin layers, and one- or two-dimensional fractional chromatography on plates with three layers of different kinds placed side by side.

## INTRODUCTION

Un certain nombre de travaux récents<sup>1-5</sup> ont souligné l'intérêt des couches minces sur support plastique souple, qui possèdent à la fois les avantages des papiers chromatographiques (souplesse, découpage possible, formats les plus variés), tout en conservant la polyvalence des couches minces classiques (utilisation des substrats organiques ou minéraux les plus divers).

L'intérêt commercial des couches minces sur support plastique souple n'a pas échappé d'ailleurs à certaines firmes\*, mais les couches proposées dans le commerce présentent encore un certain nombre d'inconvénients: prix de revient relativement élevé, variété de substrats limitée et présence, dans les couches minérales, de divers liants organiques, qui s'opposent à la révélation par certains réactifs ( $H_2SO_4$  concentré, dérivés iodés, etc...).

C'est pourquoi, nous avons été amenés à étudier les possibilités de réalisation pratique, au laboratoire, sur un support plastique souple convenable, de couches minces de dimensions et de nature extrêmement variées et en particulier des couches

\* Kodak-Pathé France, 37-39, Avenue Montaigne, Paris (8<sup>e</sup>) et Macherey Nagel, 516 Düren (Allemagne).

multiples juxtaposées, dont le principe et les premières applications ont déjà été publiés<sup>5-9</sup>.

#### RÉALISATION DES COUCHES MINCES SUR SUPPORT PLASTIQUE SOUPLE

Une étude préliminaire des propriétés physiques et chimiques de plusieurs sortes de matière plastique nous a conduits à fixer notre choix sur le film de polytéréphtalate d'éthylène de 0.2 mm environ d'épaisseur\*. Il fait preuve, en effet, d'un comportement excellent aux principaux agents physiques, ainsi qu'aux solvants usuels et permet de réaliser des couches minces, dont l'adhérence reste correcte au cours des diverses opérations, mises en jeu en chromatographie sur couches minces. Il est évident cependant que, sans addition de liant organique, les couches minérales perdent à la longue cette adhérence et ne peuvent être stockées très longtemps avant leur emploi.

Les caractéristiques de l'appareillage pour couches minces employé conditionnent les dimensions des feuilles de plastique utilisées, qui sont lavées au préalable avec une solution aqueuse de détergent et rincées successivement à l'eau distillée, à l'éthanol et à l'éther. Pour les couches minces homogènes, l'étalement de la suspension des divers substrats utilisés est réalisé selon le procédé habituel, le film de plastique étant maintenu parfaitement horizontal sur une plaque de verre, de dimensions appropriées. Pour les couches multiples juxtaposées, le mode opératoire est identique à celui décrit par ailleurs<sup>5-9</sup>.

Nous avons tenu à contrôler, l'efficacité des couches minces réalisées au laboratoire, à base des substrats les plus courants, tels que cellulose, silice, alumine, résines ou cristaux échangeurs d'ions et à comparer, le cas échéant, les résultats obtenus à ceux enregistrés avec les couches commerciales. Toute une série d'expériences, qu'il est inutile de détailler ici, permettent d'affirmer que le film de polytéréphtalate d'éthylène peut être valablement utilisé, pour la confection de couches minces de performances comparables à celles réalisées sur plaques de verre.

#### CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE FRACTIONNÉE SUR COUCHE MINCE HOMOGÈNE DE GRAND FORMAT

Comme les papiers chromatographiques, mais contrairement aux plaques de verre, les couches minces sur support plastique souple se prêtent aisément, en cours de chromatographie par exemple, à tout découpage éventuel, que des impératifs techniques sont susceptibles d'imposer. Nous schématiserons tout d'abord le procédé original, que nous avons été amenés à concevoir et qui a permis de résoudre certains problèmes analytiques, posés par des mélanges complexes. Nous donnerons ensuite un exemple d'application, choisi parmi les divers essais, qui ont été réalisés.

##### *Mode opératoire général*

Sur une couche mince de Gel de Silice, par exemple, de 20 cm sur 30 cm, on dépose à 8 cm environ du bord inférieur et à 1.5 cm d'un bord latéral (point D, sur la Fig. 1), la prise d'essai de quelques microlitres du mélange à analyser. On soumet ce

\* Société "La Cellophane", 110, Bd. Haussmann, Paris (8°).

mélange à une première chromatographie ascendante avec le solvant 1, jusqu'à ce que le front du solvant soit parvenu à 7 cm environ du bord supérieur de la couche mince.

Des essais préliminaires ayant montré, que cette première opération n'engendrait qu'une amorce de séparation des divers constituants, dont certains restent encore groupés, on découpe alors la couche mince perpendiculairement au sens de la première migration, de manière à obtenir deux segments, correspondant chacun à des groupes de substances chimiquement voisines.

Sur chaque demi-chromatogramme obtenu, les espaces de 7 à 8 cm réservés au cours de la première chromatographie, à chaque extrémité de la couche mince initiale, permettent d'effectuer les témoins externes, correspondant aux divers constituants de chaque groupe.

Perpendiculairement au sens de la première migration, on soumet alors séparément chaque demi-chromatogramme à une nouvelle chromatographie, respectivement avec les solvants 2 et 2', susceptibles d'engendrer la meilleure séparation des substances non différenciées par le premier solvant.

On obtient finalement deux chromatogrammes avec témoins externes, où tous les constituants du mélange initial sont parfaitement séparés et identifiés.

#### *Application à un mélange de vitamines et de stéroïdes (Fig. 1)*

Composition du mélange: acide ascorbique, pantothénate de calcium, cholestérol, cortisone, hydrocortisone. Couche mince: Gel de Silice. Solvant 1: eau distillée.

*Chromatographie 1.* La première chromatographie sépare, selon un  $R_F$  croissant, le cholestérol du groupe I (cortisone + hydrocortisone) et du groupe II (acide ascorbique et acide pantothénique). On découpe ce premier chromatogramme entre les groupes I et II, repérés aux U.V. et l'on soumet chaque demi-chromatogramme à une seconde chromatographie.

*Chromatographie 2:* Le groupe des stéroïdes est fractionné avec le solvant 2 (chloroforme-acétone, 70:30) et les témoins externes permettent d'identifier cholestérol, cortisone et hydrocortisone, après révélation par  $H_2SO_4$  concentré et à chaud.

*Chromatographie 2'.* Les deux vitamines sont séparées avec le solvant 2' (benzène-méthanol-acétone-acide acétique, 70:20:5:5). L'acide ascorbique est révélé par l'iodoplatinate et l'acide pantothénique par la ninhydrine.

Ce nouveau procédé, qui fait bénéficier la chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de l'avantage incontestable des témoins externes, souligne l'un des intérêts majeurs du support plastique souple.

#### CHROMATOGRAPHIE SUR TRIPLES COUCHES JUXTAPOSÉES

Le procédé est fondé sur l'utilisation simultanée de trois substrats différents, dont les propriétés spécifiques respectives permettent de séparer successivement les constituants d'un mélange, appartenant à trois groupes chimiques homogènes. Dans l'exemple choisi, il s'agit de colorants, de stéroïdes et de cations minéraux.

#### *Confection des triples couches (Fig. 2)*

Les modifications de l'étaleur classique (Desaga), décrites pour la réalisation des doubles couches juxtaposées<sup>5-9</sup>, sont toujours valables et l'introduction, dans le

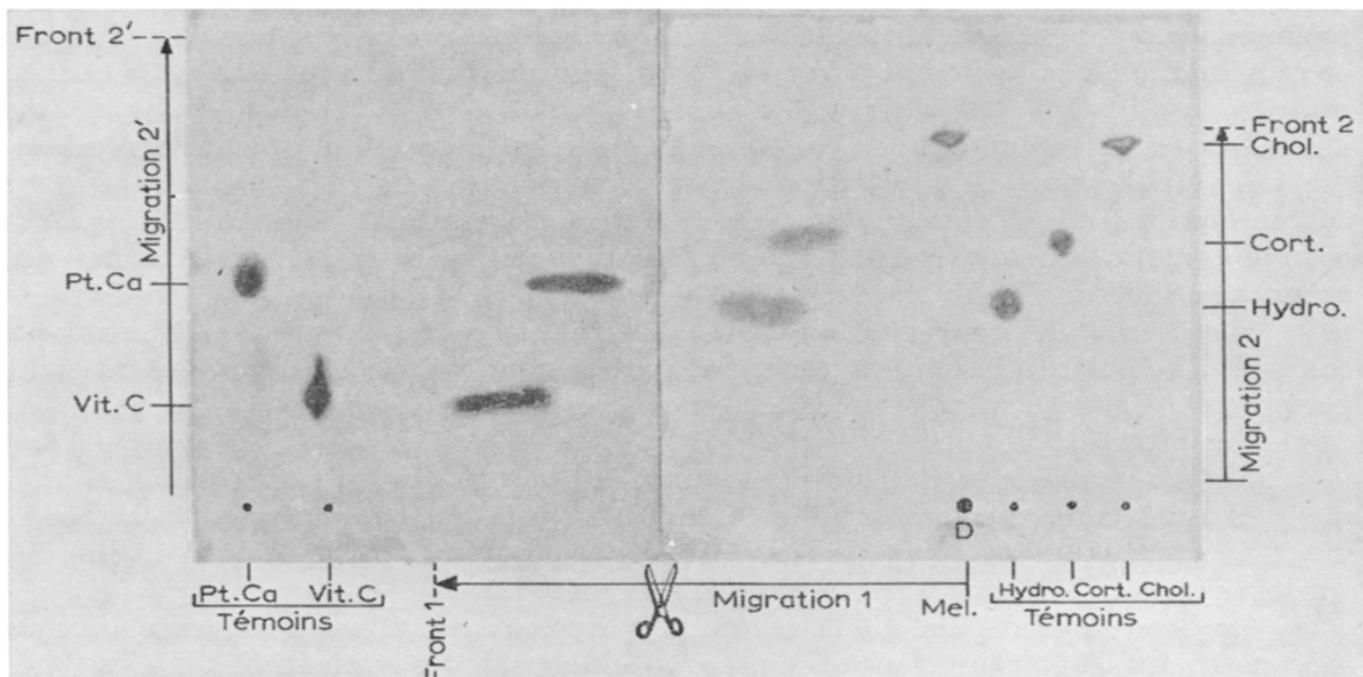


Fig. 1. Exemple de chromatographie bidimensionnelle fractionnée, sur couche mince de Gel de Silice, d'un mélange de vitamines (acide ascorbique, pantothénate de calcium) et de stéroïdes (cortisone, hydrocortisone, cholestérol). Après la première migration, la feuille est découpée entre les deux groupes de constituants, incomplètement séparés. Les stéroïdes et les vitamines sont différenciés ensuite respectivement avec les solvants 2 et 2' et identifiés par comparaison avec les témoins externes correspondants.

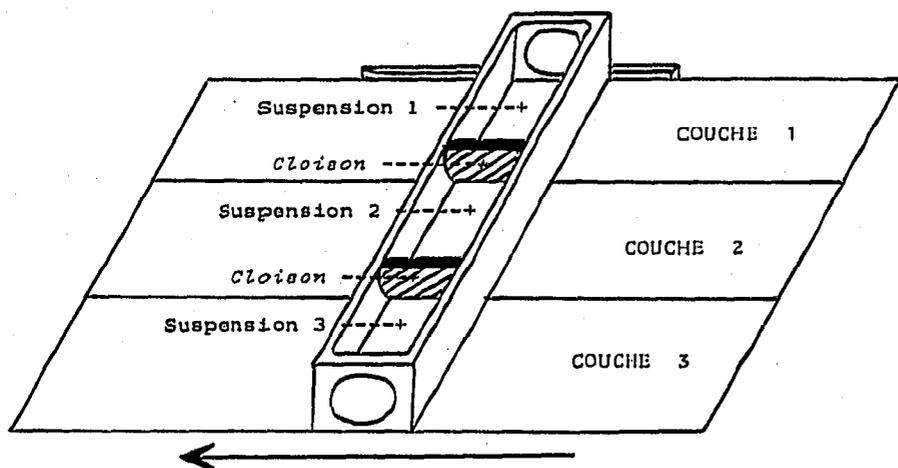


Fig. 2. Schéma de l'étalement des triples couches juxtaposées sur support plastique souple, à l'aide de l'appareillage classique modifié, dont le réservoir comporte deux cloisons en plexiglass.

réserveur, d'une seconde cloison en plexiglass permet d'aménager trois compartiments, destinés à recevoir les suspensions aqueuses des trois substrats, choisis en fonction du mélange à analyser. L'étalement de ces trois suspensions, schématisé sur la Fig. 2, conduit à une juxtaposition parfaite des trois couches, de largeur respective variable,

sur le même support plastique souple. Dans l'exemple choisi, les trois couches juxtaposées ont la composition suivante:

Couche 1: résine complexante Chelex 100 (Biorad), additionnée de 15 % environ de cellulose.

Couche 2: Gel de Silice G.

Couche 3: Cellulose MN 300.

### Opérations chromatographiques (Fig. 3)

Le mélange synthétique analysé a la composition suivante: Colorants: Jaune Naphtol S, Ponceau cristallisé, Noir acide brillant; Stéroïdes: oestrone, cholestérol, prégnénolone; Cations minéraux:  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ .

Une première chromatographie, réalisée avec de l'eau distillée (solvant 1) à partir de la première couche de résine, entraîne les colorants hydrosolubles jusqu'à la troisième couche de cellulose, où leur séparation est amorcée.

Perpendiculairement au sens de cette première migration, on découpe la feuille de plastique au niveau de la seconde couche de silice et à 1 cm environ de la couche

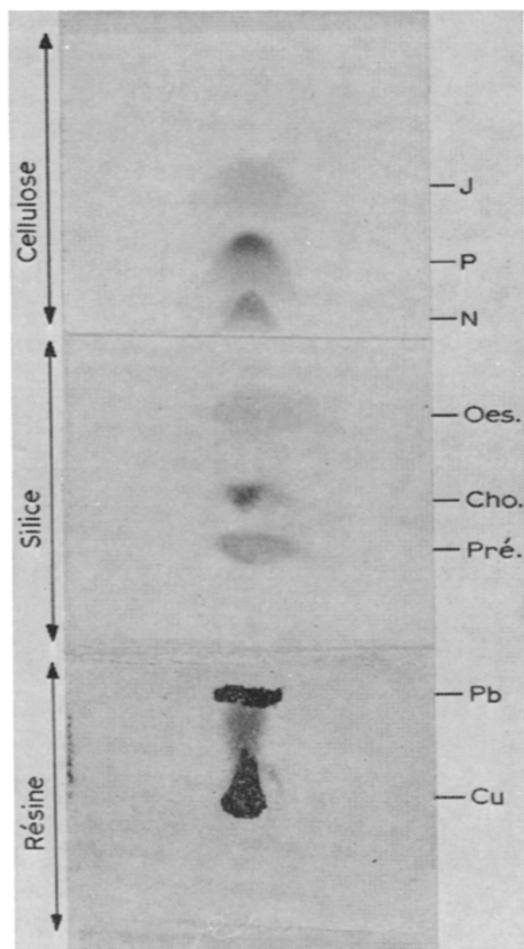


Fig. 3. Exemple de chromatographie fractionnée sur triple couche, constituée par la juxtaposition de résine complexante (couche 1), de Gel de Silice G (couche 2) et de cellulose (couche 3), qui permettent une séparation respective excellente des cations ( $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ), des stéroïdes (oestrone, cholestérol, prégnénolone) et des colorants (Jaune Naphtol S, Ponceau cristallisé, Noir acide brillant).

de cellulose. La couche de cellulose, ainsi isolée, est alors soumise séparément à une seconde migration avec le même solvant et les trois colorants sont ainsi complètement séparés.

Sur les deux couches juxtaposées restantes et en partant toujours de la première couche de résine, on réalise une nouvelle chromatographie ascendante avec le solvant 2 (benzène-éthanol, 95:5). Les stéroïdes sont entraînés, à leur tour, sur la seconde couche de silice. On découpe, comme précédemment, la feuille de plastique entre les couches 1 et 2 et l'on soumet la couche de silice, ainsi isolée, à une nouvelle migration avec le même solvant. La révélation par  $H_2SO_4$  et à chaud montre que les trois stéroïdes sont parfaitement différenciés.

Enfin, la couche de résine restante est soumise à une dernière chromatographie avec le solvant 3 (solution aqueuse 0.05 M d'EDTA disodique), qui sépare  $Pb^{2+}$  de  $Cu^{2+}$ , révélés par le sulfure d'ammonium.

Dans l'exemple choisi, des chromatographies successives et fractionnées unidimensionnelles sont suffisantes, pour obtenir une bonne séparation des divers constituants du mélange, mais il est évident qu'il s'agit là d'un cas particulier. Dans d'autres cas, en effet, des chromatographies bidimensionnelles fractionnées, avec d'autres solvants, peuvent être systématiquement nécessaires.

Cette méthode nécessite toujours, pour chaque mélange à analyser, une mise au point préalable, permettant de choisir la nature des diverses couches, leurs dimensions respectives, ainsi que les solvants les mieux appropriés. Elle devrait pouvoir s'appliquer avec profit à des analyses de contrôle systématiques de mélanges très divers, tels que les produits pharmaceutiques ou certaines denrées alimentaires.

## RÉSUMÉ

L'emploi de couches minces chromatographiques sur support souple permet de concilier à la fois les avantages de la chromatographie sur couches minces et de la chromatographie sur papier.

La réalisation pratique, au laboratoire, de couches minces, sur film de polytéréphtalate d'éthylène, rend possible l'utilisation des substrats et des techniques chromatographiques les plus variés.

Deux procédés analytiques originaux sont proposés: la chromatographie bidimensionnelle fractionnée sur couches minces homogènes de grand format et la chromatographie uni ou bidimensionnelle fractionnée sur triples couches juxtaposées de nature différente.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. LESTIENNE, E. P. PRZYBYLOWICZ, W. J. STAUDENMEYER, E. S. PERRY, A. D. BAITSHOLTS ET T. N. TISCHER, *III<sup>e</sup> Symposium de Chromatographie, Bruxelles, 1964*, *J. Pharm. Belg.*, 20 (1965) 213.
- 2 J. A. BERGER, G. MEYNIEL ET J. PETIT, *Compt. Rend.*, 259 (1964) 2231.
- 3 G. MEYNIEL, J. A. BERGER, R. N. ARNAUD ET P. BLANQUET, *Compt. Rend.*, 260 (1965) 3065.
- 4 R. SEVE, J. THORIN ET C. IMBERT, *Journées hellènes d'Étude des Méthodes de Séparation immédiate et de Chromatographie, Athènes, Vol. 2, 1965*, p. 115.
- 5 J. PETIT, *Thèse Doctorat Pharmacie (État)*, Clermont-Ferrand, 1965.
- 6 J. A. BERGER, G. MEYNIEL, P. BLANQUET ET J. PETIT, *Compt. Rend.*, 257 (1963) 1534.
- 7 J. A. BERGER, G. MEYNIEL, J. PETIT ET P. BLANQUET, *Bull. Soc. Chim. France*, (1963) 2662.
- 8 J. A. BERGER, G. MEYNIEL ET J. PETIT, *Bull. Soc. Chim. France*, (1964) 3179.
- 9 J. A. BERGER, G. MEYNIEL ET J. PETIT, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 190.