

CHROM. 6498

## CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES DES NUCLÉOSIDES

JEAN CADET ET ROBERT TÉOULE

Centre d'Études Nucléaires de Grenoble, Département de Recherche Fondamentale, Laboratoire de Radiobiologie, BP 85, Centre de Tri, 38041 Grenoble Cedex (France)

(Reçu le 13 juillet 1972; manuscrit modifié reçu le 22 novembre 1972)

---

### SUMMARY

#### *Thin-layer chromatography of nucleosides*

A new chromatographic bidimensional system which may be used for the separation of nucleosides and derivatives is described. Silica Gel MN-S-HR/UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel & Cy.) or Cellulose F (Merck) were utilized with the following solvents: (1) the lower layer of chloroform-methanol-water (4:2:1) with an additional 5% of methanol and (2) ethyl acetate-isopropanol-water (75:16:9). A good separation of the radioproducts resulting from the action of  $\gamma$ -rays on thymidine was obtained. Correlations between structures and  $R_F$  values have been established.

---

### INTRODUCTION

Le nombre considérable de travaux relatifs à la séparation des constituants fondamentaux des acides nucléiques s'explique par l'importance biologique de ces composés. Les analyses chromatographiques sur papier, malgré la mise au point récente d'éluants à faible durée de développement<sup>1</sup>, ont fait place aux séparations sur couches minces, à la chromatographie en phase vapeur<sup>2-5</sup> et au fractionnement en phase liquide sous haute pression<sup>6,7</sup>.

Parmi les travaux les plus remarquables dans le domaine de la chromatographie sur couche mince, il faut citer les séparations effectuées par RANDEATH *et al.*<sup>8-10</sup>, HOLGUIN-HUESCO ET CARDINAUD<sup>11</sup>, les analyses bidimensionnelles sur cellulose de PATAKI<sup>12</sup> ou sur adsorbants mixtes<sup>13,14</sup>. À notre connaissance, le gel de silice a fait l'objet d'un nombre restreint de publications (PATAKI<sup>15</sup>). L'analyse bidimensionnelle sur Gel de Silice MN-S-HR (Macherey-Nagel & Cie.) que nous présentons dans ce mémoire permet en un temps très court et dans des conditions extrêmement douces de séparer la plupart des bases et nucléosides constitutifs des acides nucléiques. Ce système de solvants qui présente des propriétés similaires sur cellulose Merck assure une bonne séparation des différents diastéréoisomères de la thymidine obtenus après saturation de la double liaison 5,6 sous l'action du rayonnement  $\gamma$  ou d'agents oxy-

dants ( $H_2O_2$ , eau de brome, permanganate de potassium, N-bromosuccinimide). Des corrélations entre la structure et les valeurs de  $R_f$  des différentes substances ont pu être établies.

La caractérisation des produits par microspectrométrie infrarouge est rendue possible par la volatilité des solvants et par l'utilisation d'adsorbants de haute pureté.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### *Adsorbants*

Le Gel de Silice MN-S-HR/UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel & Cie.) (Düren, R.F.A.) est préparé en se conformant aux indications du fabricant. L'empois d'amidon, qui sert de liant et qui assure une bonne tenue mécanique du gel, est obtenu en mélangeant 2.4 g d'amidon à 10 ml d'eau distillée. On complète avec 160 ml d'eau bouillante; puis, à la solution claire résultante, soumise à une vigoureuse agitation, on ajoute 80 g d'adsorbant. L'appareil de revêtement automatique Camag permet d'obtenir à partir de cette suspension, douze plaques de 20 × 20 cm, recouvertes d'une couche de gel d'épaisseur homogène de 0.2 mm. Le séchage de l'adsorbant est effectué à la température ambiante (15 h) et la silice est activée en portant les plaques à 100° pendant 1 h.

Les plaques de cellulose prêtes à l'emploi, de 0.1 mm d'épaisseur et sans indicateur UV, proviennent des Établissements Merck (Darmstadt, R.F.A.).

### *Solvants*

Les séparations chromatographiques, de type ascendant, sont effectuées à la température de 23° dans des cuves Desaga dont l'atmosphère est saturée avec le mélange de solvants servant au développement (120 ml). Du mélange chloroforme-méthanol-eau (4:2:1) on conserve la phase organique à laquelle on ajoute 5% de méthanol. Le développement nécessite 1 h sur gel de silice; il est plus lent sur les plaques de cellulose (1 h 30) pour une même distance de migration (16.5 cm). Avec isopropanol-acétate d'éthyle-eau (16:75:9) (II), la durée de développement est respectivement de 1 h 15 sur silice et de 1 h 40 sur cellulose (16.5 cm).

Il est à noter que deux mélanges binaires acétonitrile-eau (80:20) et butanol-eau (86:14) conduisent au même type de séparation que le système II. Cependant, la faible vitesse de migration du mélange butanol-eau restreint son utilisation.

### *Dépôts chromatographiques*

La substance (0.1 à 25  $\mu$ g) ou le mélange de dérivés (0.1 à 100  $\mu$ g) en solution dans le méthanol (20  $\mu$ l) (exception faite pour la guanine et l'adénine dissoutes dans HCl N/10) sont déposés sur la plaque (distance des bords 1.5 cm; diamètre du dépôt inférieur à 3 mm).

Les séparations chromatographiques peuvent être effectuées, à l'échelle préparative, sur des gels de silice de plus grande épaisseur (0.5 mm). La charge maximum admissible dépend étroitement de la nature et du nombre de substances à isoler: elle est comprise entre 40 et 80 mg sur silice et 10 à 15 mg sur cellulose par dépôt linéaire de 15 cm de longueur.

### *Influence de la température et de l'hygrométrie*

Les meilleures séparations sont obtenues vers 23° et pour un degré hygrométrique de l'atmosphère extérieure de 40%.

### *Détection des substances*

Les révélations radiochimiques sont effectuées à l'aide du papier Kodak Kodirex par autoradiographie. Une radioactivité de 0.01  $\mu\text{Ci}$  en  $^{14}\text{C}$  est mise en évidence après un temps de contact de 15 h.

Les produits présentant la double liaison 5,6 insaturée sont décelés par examen du chromatogramme en lumière UV à 254 nm. La sensibilité de détection est voisine de 0.1  $\mu\text{g}$  sur gel de silice UV; elle est plus faible sur cellulose (15 à 20  $\mu\text{g}$ ).

Les dérivés ribosidiques et les formes pyraniques des désoxyribosides sont révélés par la coloration jaune qu'ils donnent après pulvérisation du gel de silice avec une solution alcoolique de métapériodate<sup>10</sup>.

Les désoxy-2' ribonucléosides saturés ou non en 5,6 donnent lieu à une coloration noire après pulvérisation d'une solution acide perchlorique à 5% et chauffage du chromatogramme pendant 10 min à 80°<sup>17</sup>. La sensibilité de détection est comprise entre 8 et 15  $\mu\text{g}$ .

Le réactif à la cystéine<sup>18</sup> qui est très sensible sur silice est caractéristique des désoxy-2' ribosides. Le seuil de détection est inférieur à 0.1  $\mu\text{g}$ .

La pulvérisation d'une solution alcoolique de dinitro-2,4 phénylhydrazine permet de mettre en évidence les substances présentant une fonction aldéhydrique<sup>19</sup> alors que les peroxydes sont détectés par pulvérisation d'une solution alcoolique d'iodure de potassium<sup>20</sup>. La limite de détection est inférieure à 0.1  $\mu\text{g}$ .

Les uréides sont révélés avec le réactif de FINK *et al.*<sup>21</sup>; les composés pyrimidiques possédant la liaison 5,6 saturée sont transformés en uréidoacides par une pulvérisation au préalable du chromatogramme avec une solution alcoolique de soude. La sensibilité de détection est voisine de 30  $\mu\text{g}$ .

### *Obtention des substances*

La plupart des bases et nucléosides non modifiés, marqués au  $^{14}\text{C}$ , proviennent du Département des Radioéléments de Saclay. La préparation des formes isomères de la thymidine, de la désoxy-2' uridine et de la fluoro-5 désoxy-2' uridine a été effectuée selon une méthode mise au point par les auteurs<sup>22</sup>. Les bromo-5 cyclo-O-5',6 dihydro-5,6 thymidine ont été préparées selon le procédé de LIPKIN ET RABI<sup>23</sup>. Les méthodes de synthèse des dérivés de saturation 5,6 de la thymine et des diastéréoisomères correspondant de la thymidine ont fait l'objet de plusieurs communications<sup>24,25</sup>. L'anhydro-3',5' désoxy-2'  $\beta$  D ribofuranosyl thymine a été préparée selon le procédé de HORWITZ *et al.*<sup>26</sup>.

### *Microspectrométrie infrarouge*

La plupart des nucléosides ou des bases (100 à 200  $\mu\text{g}$ ) sont extraites de l'adsorbant au moyen de 2 ml de méthanol. L'adsorbant en suspension dans le méthanol est centrifugé à 4000 tours/min pendant 6 min et le surnageant est filtré sur membrane Solvinert de porosité 0.45  $\mu$  à l'aide d'une seringue. La solution méthanolique est évaporée à sec et le résidu obtenu est dissous dans 200 à 300  $\mu\text{l}$  d'eau. Par ailleurs, 4 mg de KBr en solution dans 1 ml d'eau sont placés dans un tube à essai de 15 ml;

le conteneur est agité dans un bain réfrigérant et une mince pellicule de glace se forme sur la paroi du tube. Une immersion dans l'azote liquide permet de consolider l'ensemble. La solution aqueuse du produit à analyser est alors ajoutée dans le centre du tube et refroidie dans l'azote liquide. Le produit gelé est alors lyophilisé. Une micropastille de 1,5 mm de diamètre est préparée avec 2 mg du mélange pulvérulent et le spectre est enregistré sur un appareil Perkin Elmer, Modèle 257, muni d'un atténuateur de faisceau.

Quand on dispose d'une quantité plus importante de produit (300  $\mu$ g) il est inutile de former la pellicule de glace protectrice qui sert à minimiser les pertes dues à l'absorption sur les parois. Il est possible d'effectuer directement le mélange du KBr et de la substance à analyser.

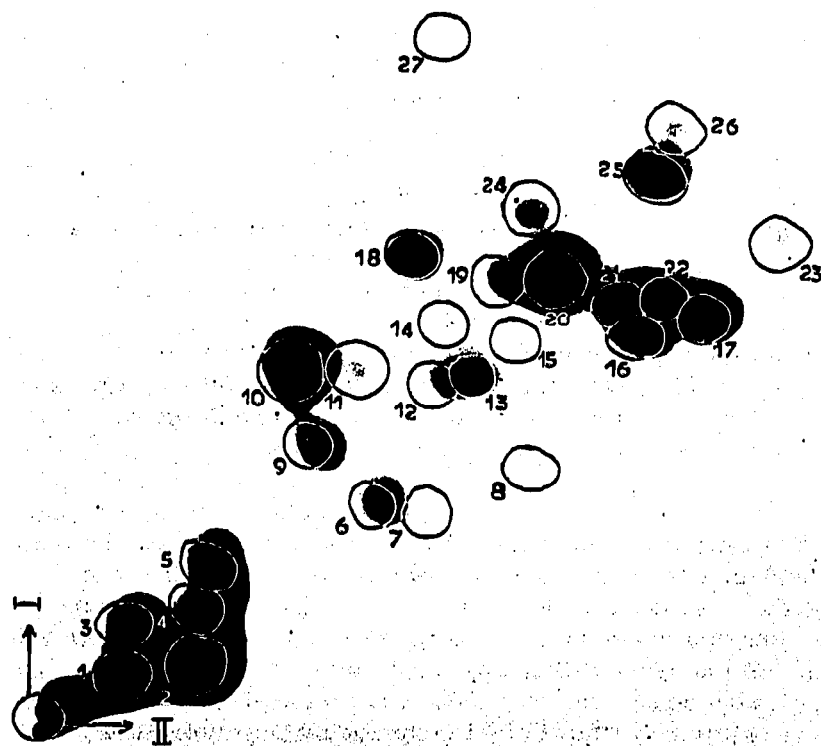


Fig. 1. Séparation bidimensionnelle sur Gel de Silice MN-S-HR/UV<sub>254</sub> des nucléosides purifiés et pyrimidiques et des bases correspondantes. Solvants: (I) chloroforme-méthanol-eau (4:2:1) + 5% méthanol; (II) acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75:16:9). 1 = Cytidine; 2 = guanosine; 3 = cytosine, désoxy-2' cytidine; 4 = guanine; 5 = désoxy-2' guanosine; 6 = hydroxyméthyl-5 désoxy-2' uridine; 7 = uridine; 8 = hydroperoxyméthyl-5 désoxy-2' uridine; 9 = adénosine; 10 = adénine, désoxy-2' adénosine; 11 = désoxy-2'  $\alpha$  D ribopyranosyl uracile; 12 = désoxy-2'  $\alpha$  D ribofuranosyl uracile; 13 = désoxy-2' uridine; 14 = désoxy-2'  $\beta$  D ribopyranosyl uracile; 15 =  $\beta$  D ribofuranosyl thymine; 16 = désoxy-2'  $\alpha$  D ribofuranosyl fluoro-5 uracile; 17 = fluoro-5 désoxy-2' uridine; 18 = désoxy-2'  $\alpha$  D ribopyranosyl thymine; 19 = désoxy-2'  $\alpha$  D ribofuranosyl thymine; 20 = thymidine; 21 = formyl-5 désoxy-2' uridine; 22 = désoxy-2'  $\beta$  D ribopyranosyl fluoro-5 uracile; 23 = fluoro-5 uracile; 24 = désoxy-2'  $\beta$  D ribopyranosyl thymine; 25 = thymine; 26 = cyclo-O-5',6 thymidine; 27 = anhydro-3',5' désoxy-2'  $\beta$  D ribofuranosyl thymine.

TABLEAU I

VALEURS DE  $R_F$  DES PRINCIPAUX NUCLÉOSIDES ET DE LEURS DÉRIVÉS SUR GEL DE SILICE MN-S-HR/UV<sub>254</sub>

Substance	Solvant	
	I	II
Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine <i>cis</i> (+)	0.18	0.31
Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine <i>cis</i> (-)	0.12	0.32
Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine <i>trans</i> (+)	0.15	0.53
Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine <i>trans</i> (-)	0.13	0.43
Hydroxy-5 hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymidine <i>cis</i> (+)	0.17	0.38
Hydroxy-5 hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymidine <i>cis</i> (-)	0.15	0.47
Hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine <i>cis</i> (-)	0.15	0.47
Hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine <i>cis</i> (+)	0.15	0.47
Hydroxy-5 hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymidine <i>trans</i> (+)	0.16	0.60
Hydroxy-5 hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymidine <i>trans</i> (-)	0.16	0.60
Hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine <i>trans</i> (-)	0.16	0.60
Hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine <i>trans</i> (+)	0.18	0.70
Désoxy-2' $\beta$ D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne (+)	0.25	0.57
Désoxy-2' $\beta$ D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne (-)	0.29	0.61
Acide désoxy-2' $\beta$ D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique	0.22	0.52
Hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine <i>cis</i> (+)	0.26	0.49
Hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine <i>cis</i> (-)	0.21	0.43
Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymidine (+) et (-)	0.20	0.37
Dihydro-5,6 thymidine (+) et (-)	0.32	0.42
Bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine (+)	0.42	0.81
Bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine (-)	0.34	0.77
Bromo-5 cyclo-O-5',6 dihydro-5,6 thymidine <i>trans</i>	0.59	0.83
Hydroxy-5 cyclo-O-5',6 dihydro-5,6 thymidine <i>cis</i>	0.31	0.40
Thymidine	0.37	0.52
Désoxy-2' $\alpha$ D ribofuranosyl thymine	0.37	0.46
Désoxy-2' $\beta$ D ribopyranosyl thymine	0.48	0.49
Désoxy-2' $\alpha$ D ribopyranosyl thymine	0.39	0.34
$\beta$ D ribofuranosyl thymine	0.33	0.48
Thymine	0.55	0.66
Désoxy-2' uridine	0.28	0.44
Désoxy-2' $\alpha$ D ribofuranosyl uracile	0.28	0.41
Désoxy-2' $\beta$ D ribopyranosyl uracile	0.33	0.42
Désoxy-2' $\alpha$ D ribopyranosyl uracile	0.29	0.33
Uridine	0.23	0.37
Uracile	0.36	0.46
Fluoro-5 désoxy-2' uridine	0.34	0.66
Désoxy-2' $\alpha$ D ribofuranosyl fluoro-5 uracile	0.32	0.62
Désoxy-2' $\beta$ D ribopyranosyl fluoro-5 uracile	0.37	0.63
Désoxy-2' $\alpha$ D ribopyranosyl fluoro-5 uracile	0.34	0.52
Fluoro-5 uracile	0.40	0.76
Cytosine	0.08	0.13
Cytidine	0.06	0.12
Désoxy-2' cytidine	0.08	0.13
Hydroxy-méthyl-5 désoxy-2' uridine	0.23	0.35
Hydroperoxy- méthyl-5 désoxy-2' uridine	0.24	0.50
Formyl-5 désoxy-2' uridine	0.33	0.62
Cyclo-O-5',6 thymidine	0.49	0.63
Guanine	0.08	0.19
Guanosine	0.06	0.19
Désoxy-2' guanosine	0.13	0.21
Adénine	0.30	0.27
Adenosine	0.23	0.28
Désoxy-2' adénosine	0.30	0.27
Acide orotique	0.01	0.01

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

*Bases et nucléosides non transformés*

Les deux systèmes de solvants associés en analyse bidimensionnelle sur silice sont très complémentaires et permettent de séparer un grand nombre de bases puriques, pyrimidiques et de nucléosides (Fig. 1); en effet, seules l'adénine et la cytosine présentent des valeurs de  $R_F$  voisines de celles de leurs dérivés désoxy-2' ribosidiques (Tableau I). Dans ces mêmes conditions, le mélange des formes anomères furaniques

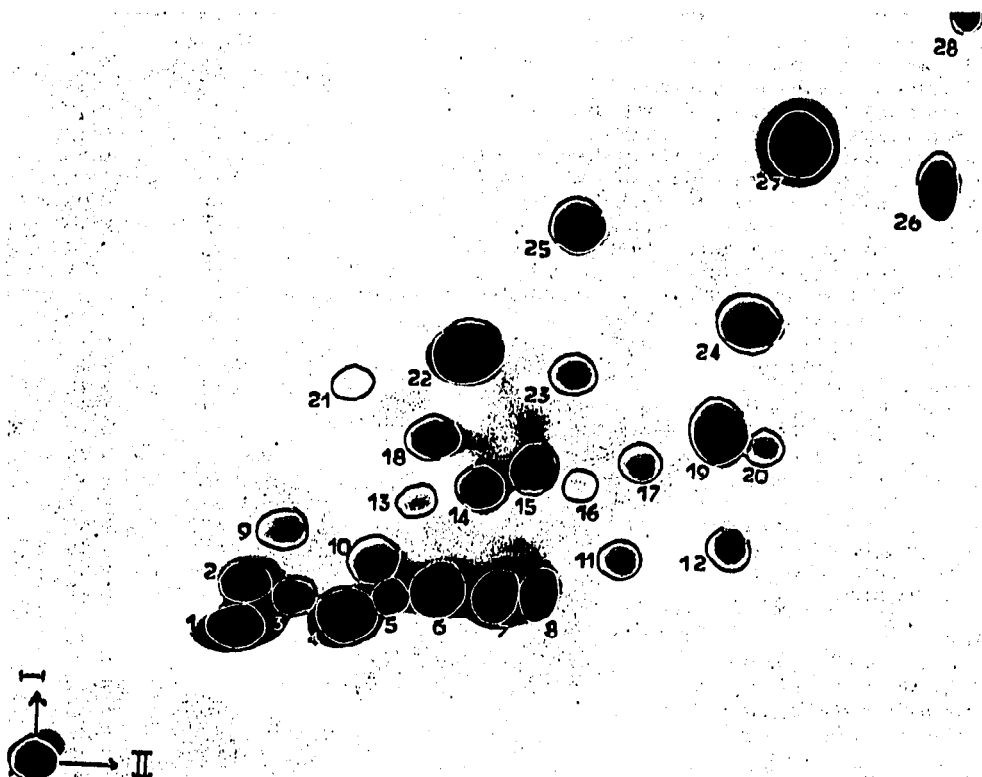
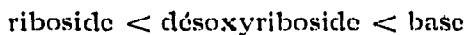


Fig. 2. Séparation bidimensionnelle sur Gel de Silice MN-S-HR/UV<sub>254</sub> des produits de radiolyse  $\gamma$  de la thymidine en milieu aqueux aéré. Solvants: (I) chloroforme-méthanol-eau (4:2:1) + 5% méthanol; (II) acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75:16:9). 1 = Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine *cis* (-); 2 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine *cis* (+); 3 = hydroxy-5 hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymidine *cis* (+); 4 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine *trans* (-); 5 = hydroxy-5 hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymidine *cis* (-), hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine *cis* (+), hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine *trans* (+); 6 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine *trans* (+); 7 = hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine *trans* (-), hydroxy-5 hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymidine *trans* (+), hydroxy-5 hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymidine *trans* (-); 8 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* (+); 9 = hydroxyméthyl-5 désoxy-2' uridine; 10 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* (-); 11 = hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine *trans* (+); 12 = hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymine *trans*, hydroxy-5 hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymine *trans*; 13 = hydroperoxyméthyl-5 désoxy-2' uridine; 14 = désoxy-2'  $\beta$  D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne (+); 15 = désoxy-2'  $\beta$  D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne (-); 19 = acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique; 20 = hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne; 21 = dihydro-5,6 thymidine; 22 = thymidine; 23 = désoxy-2'  $\beta$  D ribofuranosyl-N formyl-N' urée; 25 = thymine; 26 = formyl-N pyruvyl-N' urée; 27 = pyruvamide; 16, 17, 18, 24 et 28 sont des produits de structure inconnue.

et pyraniques de la thymidine et de la désoxy-2' uridine est parfaitement résolu; il est à remarquer que la position relative des différents isomères est conservée dans chaque groupe de ces nucléosides; l'analogie de comportement chromatographique de chaque couple d'isomères implique une identité sur le plan conformationnel qui a pu être vérifiée par analyse de résonance magnétique nucléaire. Le déplacement homothétique des formes anomères furaniques et pyraniques de la thymidine vers les hautes valeurs de  $R_F$  par rapport aux isomères correspondant de la désoxy-2' uridine est à relier à la présence du méthyle. En fonction des valeurs de  $R_F$  croissantes les groupements fonctionnels des dérivés substitués en 5 de l'uridine ou de l'uracile ont pu être rangés dans l'ordre suivant en ce qui concerne le solvant I.



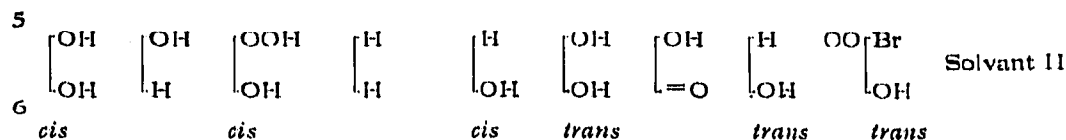
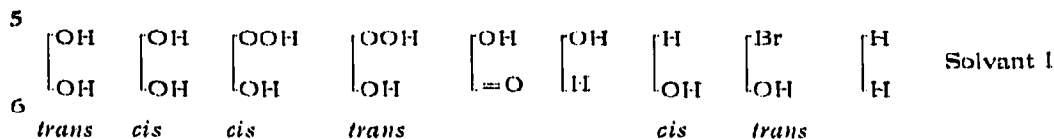
On observe une inversion entre les groupements méthyle et formyle dans le solvant II. Pour des raisons similaires de polarité, l'ordre suivant d'éluion a été observé pour les dérivés présentant la même base pyrimidique.



#### Bases pyrimidiques et nucléosides modifiés

Le système chromatographique sur silice a trouvé un champ d'application particulièrement intéressant dans le domaine de l'analyse de mélanges complexes d'uréides et de diastéréoisomères résultant de l'ouverture ou de la saturation de la double liaison 5,6 de la thymidine. Ainsi la séparation des trente-deux substances de radiolyse  $\gamma$  de ce nucléoside en solution aqueuse et aérée est pratiquement complète à l'exception de quatre hydroxyhydroperoxydes (Fig. 2); en particulier, les formes diastéréoisomères *cis* 5R,6S et 5S,6R de la dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine et leurs homologues *trans* 5R,6R et 5S,6S qui revêtent une importance majeure en radiobiologie présentent des valeurs de  $R_F$  très différentes (Tableau I).

Comme il en a été fait mention précédemment pour les formes insaturées des nucléosides pyrimidiques, des corrélations entre la structure chimique et le comportement chromatographique des différents diastéréoisomères ont pu être mises en évidence. En raison du rôle prépondérant de la polarité des substituants en position 5,6 sur la mobilité chromatographique, un mécanisme d'adsorption mettant en jeu une liaison hydrogène entre le soluté et la silice semble impliqué. L'ordre décroissant d'interaction des groupements fonctionnels en position 5,6 en se basant sur les valeurs moyennes de  $R_F$  de chaque couple de diastéréoisomères s'établit ainsi pour chacun des mélanges de solvants.



Ainsi le déplacement vers les hautes valeurs de  $R_F$  de la bromo-5 cyclo-O-5',6 dihydro-5,6 thymidine et de l'hydroxy-5 cyclo-O-5',6 dihydro-5,6 thymidine par rapport aux dérivés acycliques correspondants s'explique par la disparition des deux fonctions hydroxyles en position 5' et 6.

La plus grande mobilité chromatographique des glycols *trans* de thymidine comparativement aux homologues *cis* est à rapprocher des observations effectuées sur les isomères *thréo* et *érythro* des amino alcools<sup>27</sup> ou sur les dérivés aliphatiques présentant deux fonctions polaires vicinales<sup>28,29</sup>. Les diols *cis*, dont les groupements hydroxyles en position 5,6 adoptent une conformation axiale équatoriale, possèdent une plus forte liaison intramoléculaire que les isomères *trans*; celle-ci est détruite par l'acidité des fonctions silanols et de ce fait, seule, la capacité d'adsorption des groupements fonctionnels avec les sites actifs de la silice, doit régir le comportement chromatographique des diols 5,6.

Il n'en est pas de même pour les hydroxy-6 (ou 5) hydroperoxy-5 (ou 6) dihydro-5,6 thymidine où la très forte liaison hydrogène entre le groupement peroxydique et la fonction carbonyle en position 4 ou avec l'hydroxyle vicinal doit réduire les forces d'interaction de ces dérivés avec l'adsorbant. Un mécanisme identique a été proposé récemment<sup>30</sup> pour expliquer la plus grande vitesse de migration de peroxydes cycliques relativement à celle des alcools correspondants.

Des différentes notables de conformation existent pour chaque couple de diastéréoisomères; elles se reflètent par des valeurs différentes des constantes de couplage des protons osidiques en résonance magnétique nucléaire. Ces modifications conformationnelles jouent un rôle sur la polarité ou sur l'accessibilité des groupements fonctionnels.

### Cellulose

Dans les conditions précitées ses propriétés sont très semblables à celles de la silice; l'utilisation des solvants I et II en analyse bidimensionnelle permet en particulier de séparer les deux diastéréoisomères 5R et 5S de la dihydro-5,6 thymidine et les formes *cis* et *trans* de l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine qui ne sont pas résolus sur silice. Cependant, l'observation d'une dégradation partielle des substances labiles (peroxydes) liée à la faible charge admise et au seuil de détection des produits plus élevés (IK, cystéine) restreint l'emploi de cet adsorbant à des problèmes particuliers de séparation.

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Mmes. VOITURIEZ ET GEORGES et Mlle. POUCHOT pour l'importante contribution qu'elles ont apportée à ce travail.

### RÉSUMÉ

Un nouveau système chromatographique bidimensionnelle destiné à la séparation des nucléosides et de leurs dérivés est décrit. Il comporte l'emploi de Gel de Silice MN-S-HR/UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel & Cie.) ou de Cellulose F (Merck) et des solvants suivants: chloroforme-méthanol-eau (4:2:1) phase inférieure additionnée de 5% de méthanol et acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75:16:9). Une bonne sépara-



tion des produits de radiolyse formés sous rayonnement  $\gamma$  de la thymidine est obtenue. Des corrélations entre la structure et les valeurs de  $R_f$  des substances ont été établies.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 T. F. GABRIEL, *J. Chromatogr.*, 36 (1968) 518.
- 2 C. W. GEHRKE ET C. D. RUYLE, *J. Chromatogr.*, 38 (1968) 473.
- 3 Y. SASAKI ET T. HASHIZUME, *Anal. Biochem.*, 16 (1966) 1.
- 4 R. L. HANCOCK, *J. Gas Chromatogr.*, 6 (1968) 431.
- 5 W. C. BUTTS, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 474.
- 6 H. W. SHMUKLER, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 653.
- 7 J. J. KIRKLAND, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 72.
- 8 K. RANDEPATH ET H. STRUCK, *J. Chromatogr.*, 6 (1961) 365.
- 9 K. RANDEPATH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6 (1961-1962) 452.
- 10 K. RANDEPATH, K. M. FLOOD ET E. RANDEPATH, *FEBS Lett.*, 5 (1969) 31.
- 11 J. HOLGUIN-HUESCO ET R. CARDINAUD, *J. Chromatogr.*, 66 (1972) 388.
- 12 G. PATAKI, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 126.
- 13 G. TORTOLANI, V. MANTOVANI ET P. BIANCHINI, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 47 (1971) 163.
- 14 K. RANDEPATH ET E. RANDEPATH, *Proc. Nucl. Acid Res.*, 2 (1971) 796.
- 15 G. PATAKI, in J. C. GIDDINGS ET R. A. KELLER (Rédacteurs) *Advances in Chromatography*, M. Dekker, New-York, 1968, p. 47.
- 16 J. A. CIFONELLI ET F. SMITH, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1132.
- 17 K. NAGASAWA, A. OGAMO, H. HARADA ET K. KUMAGAI, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 1436.
- 18 J. G. BUCHANAN, *Nature (London)*, 168 (1951) 1091.
- 19 A. MEHLITZ, K. GIERSCHNER ET T. MINAS, *Chem.-Ztg.*, 87 (1963) 573.
- 20 E. STAHL, *Chem.-Ztg.*, 82 (1958) 323.
- 21 R. M. FINK, R. E. CLINE, C. MCGAUGHEY ET K. FINK, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 4.
- 22 J. ULRICH, J. CADET ET R. TROULE, *Org. Mass Spectrom.*, (1973) sous pressc.
- 23 D. LIPKIN ET J. A. RABI, *J. Amer. Chem. Soc.*, 93 (1971) 3309.
- 24 J. CADET ET R. TROULE, *Biochim. Biophys. Acta*, 238 (1971) 8.
- 25 J. CADET ET R. TROULE, *Tetrahedron Lett.*, 31 (1972) 3225.
- 26 J. P. HORWITZ, J. CHUA, J. A. URBANSKI ET M. NOEL, *J. Org. Chem.*, 28 (1963) 942.
- 27 G. DREFAHL, G. HEUBLEIN ET K. SILBERMANN, *J. Chromatogr.*, 22 (1966) 460.
- 28 H. J. PETROWITZ, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 9.
- 29 M. PALAMAREVA, M. HAIMOVA, J. STEFANOVSKI, L. VITEVA ET B. KURTEV, *J. Chromatogr.*, 54 (1971) 383.
- 30 M. M. BUZLANOVA, V. F. STEPANOVSKAYA, A. F. NESTEROV ET L. V. ANTONOVSKI, *Zh. Anal. Khim.*, 21 (1966) 454.