

CHROM. 16,731

Note

Purification de colorants xanthéniques bromés par chromatographie sur échangeur d'ions (DEAE) Trisacryl M

D. FOMPEYDIE* et P. LEVILLAIN

Laboratoire de Chimie Analytique, UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 6 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris (France)

(Reçu le 22 Février, 1984; manuscrit modifié reçu le 10 Mars, 1984)

De nombreux dérivés halogénés de la fluorescéine notamment l'éosine: tetra-bromo-2,4,5,7 fluorescéine, sont utilisés dans l'industrie des colorants mais aussi pour des applications analytiques¹⁻⁴.

A l'encontre de la fluorescéine qui est accessible avec un degré de pureté suffisant⁵, les échantillons commerciaux des colorants halogénés sont, pour la plupart, complexes⁵⁻⁹ et leur purification par les méthodes courantes (précipitation en milieu acide, solubilisation fractionnée) est pratiquement impossible.

De même, la chromatographie sur colonne s'est révélée très décevante. Des techniques ont bien été proposées sur cellulose¹⁰ alumine^{7,11,12} ou polyamide¹³ mais sont peu efficaces car perturbées par des phénomènes de diffusion, liés à l'éluant aqueux¹⁴, ou d'adsorption. C'est l'adsorption qui gêne également les séparations sur Séphadex LH-20¹⁵ ou sur résines échangeuses d'ions.

La seule méthode classique donnant des résultats valables opère sur colonne de talc¹⁶ mais est d'un rendement médiocre, étant donné la lenteur de l'éluion et les très faibles quantités séparées.

Une technique récente¹⁷ utilise le Sephadex G-25 de manière satisfaisante mais ne permet de travailler que sur 10 à 30 mg de colorants.

Ayant effectué différentes études sur les colorants xanthéniques bromés¹⁸⁻²² nous avons dû préparer des quantités importantes de produits. Nous avons donc mis au point une méthode de séparation sur échangeur d'ions qui permet de travailler sur des prises d'essai de l'ordre du gramme. Nous présentons ici les résultats obtenus. Nous avons vérifié par ailleurs que cette technique pouvait s'appliquer également à la purification d'autres dérivés halogénés de la fluorescéine —comme le rose bengale— en modifiant légèrement le solvant éluant.

MATÉRIEL ET METHODES

Séparation chromatographique

Elle s'effectue sur colonne d'échangeur d'ions DEAE Trisacryl M*. L'emploi

* Distribué en France par IBF et à l'étranger par LKB.

d'une faible pression facilite les séparations et peut être obtenue à l'aide d'une pompe P_1 et d'une colonne C 16/40 (40 cm \times 16 mm) commercialisés par Pharmacia.

On laisse s'équilibrer pendant 30 min 100 ml de suspension du gel avec 50 ml d'eau distillée et 300 ml de méthanol, puis on transfère le gel sur la colonne et on le rince avec 100 ml d'un mélange méthanol-eau (75:25, v/v).

Un mélange de même composition sert à dissoudre la prise d'essai (1 g dans un volume minimal) pour l'introduire sur la colonne puis à élué la fluorescéine. On fait ensuite migrer la monobromofluorescéine en augmentant progressivement jusqu'à 100% la teneur en méthanol du mélange. On crée enfin un gradient d'acide formique dans le méthanol: à 0.01% il permet d'éliminer les dernières traces de monobromofluorescéine puis d'élué successivement la dibromofluorescéine (0,1% d'acide formique) la tribromofluorescéine (1%) et l'éosine (6%).

La chromatographie doit être effectuée à l'abri de la lumière vive pour éviter l'altération des colorants. Par ailleurs il est préférable de diluer avec de l'eau les échantillons recueillis puis de les concentrer rapidement et à basse température pour éviter les réactions d'estérification pouvant se produire en milieu méthanolique acide.

Préparation des échantillons à chromatographier

Outre les composés bromés sur le cycle xanthénique, les échantillons commerciaux renferment souvent des dérivés estérifiés sur le groupement carboxylique, qui se séparent mal des colorants xanthéniques par la méthode que nous proposons: l'éthyltribromofluorescéine, par exemple, est éluee en même temps que l'éosine.

En partant d'échantillons commerciaux, on doit donc contrôler l'absence d'esters par chromatographie sur couche mince de gel de silice [solvant éluant: toluène-acide acétique (65:35, v/v)]. Si le résultat est favorable on procède directement à la chromatographie sur colonne.

Dans le cas contraire, on doit opérer une saponification préalable: dissoudre 1 g d'échantillon dans 10 ml de méthanol et 3 ml de potasse caustique concentrée²³. Porter à l'ébullition à reflux 5 à 10 min. Précipiter les colorants en milieu acide, vérifier par chromatographie sur couche mince la disparition des esters. Redissoudre par action de soude selon la technique préconisée par Vogel pour l'éosine²⁴ puis recueillir les sels à l'état cristallisé.

On peut également bromer la fluorescéine en milieu mixte eau-acétone²² ce qui évite l'estérification du groupement carboxylique.

Contrôle des composés séparés

La nature et la pureté des produits séparés sur colonne ont été contrôlées:

par chromatographie sur couche mince de gel de silice (mélange éluant: toluène-acide acétique, 65:35, v/v). Les R_F obtenus sont les suivants: fluorescéine: 0,34, bromo-4 fluorescéine: 0,52, dibromo-4,5 fluorescéine: 0,63, tribromo-2,4,5 fluorescéine: 0,69, éosine: 0,77;

par RMN ^1H à l'aide d'un appareil Brucker WH 270 FT. Les résultats obtenus figurent tableau I;

par spectrophotométrie électronique avec un appareil Beckman Acta III. Les longueurs d'onde des maximums d'absorption figurent Tableau I.

TABLEAU I

DÉPLACEMENTS CHIMIQUES δ PPM OBTENUS EN RMN ^1H DANS LE DIMÉTHYLSULFOXYDE d_6 ET LONGUEUR D'ONDE DES MAXIMUMS D'ABSORPTION DANS LE VISIBLE DES COLORANTS XANTHÉNIQUES BROMÉS ISOLÉS SUR DEAE TRISACRYL

	RMN						λ_{max} (nm)
	H_1	H_2	H_4	H_5	H_7	H_8	
Fluorescéine (F1)	6.60	6.47	6.47	6.47	6.47	6.60	490
Bromo-4 F1	6.67	6.50	—	6.52	6.50	6.67	496
Bromo-4,5 F1	6.72	6.54	—	—	6.54	6.72	504
Bromo-2,4,5 F1	6.73	6.53	—	—	—	6.82	510
Eosine	6.85	—	—	—	—	6.85	516

RESULTATS ET DISCUSSION

La pureté des différentes fractions isolées s'est révélée excellente. La séparation résulte de la différence entre les pK_a des colorants, différence qui se trouve renforcée en milieu méthanolique¹⁸. Cette technique présente par ailleurs un avantage important au point de vue préparatif puisque les différentes fractions ne migrent pas simultanément mais sont éluées successivement à l'aide du gradient de solvants proposé.

Toutefois la vitesse de migration peut se trouver accélérée par la présence d'autres sels dans l'échantillon (ce qu'on observe fréquemment pour les produits commerciaux). Ce phénomène est particulièrement sensible au niveau de la mono et de la dibromofluorescéine. Cet inconvénient peut être éventuellement évité en désalant la prise d'essai au préalable sur une petite colonne de Sephadex G-25 en éluant avec de l'eau. Mais il est beaucoup plus simple d'effectuer directement la chromatographie sur DEAE Trisacryl en observant la migration des colorants et, si celle-ci semble trop rapide, en modifiant légèrement le pouvoir éluant du solvant pour faciliter la séparation: la présence d'eau facilite la rétention et il suffit généralement d'augmenter lentement le pourcentage de méthanol pour obtenir une excellente séparation de la fluorescéine, de la mono et de la dibromofluorescéine.

Pour les échantillons d'éosine, on travaille très facilement avec une prise d'essai de 1 g et il est sans doute possible de dépasser cette quantité. Pour la dibromofluorescéine commerciale, qui renferme un pourcentage élevé de mono et de dibromofluorescéine, nous préférons limiter la prise d'essai à 500 mg pour être sûrs d'obtenir des fractions pures.

La comparaison de la composition des échantillons avant purification —obtenue par densitométrie de couches minces ou par chromatographie liquide haute performance— et après purification —calculée par pesée des fractions recueillies— montre que la récupération des produits est proche de 95%. En outre, pour l'éosine, une petite fraction supplémentaire peut se trouver dénaturée lors de l'hydrolyse des esters, donnant un produit violet qui reste adsorbé sur le haut de la colonne. Compte tenu du fort pouvoir adsorbant des colorants xanthéniques, ce résultat est excellent et confirme que le DEAE Trisacryl M crée très peu d'interactions non spécifiques.

L'identification est effectuée sans ambiguïté par RMN ^1H , qui montre la dis-

partition progressive des protons du cycle xanthénique. En chromatographie sur couche mince, l'augmentation de la teneur en brome accélère la migration, comme prévu d'après la valeur de l'énergie d'adsorption de cet élément sur silice ($Q = -0.17$)²⁵. Les spectres électroniques des différents composés sont d'aspect semblable, mais le maximum d'absorption subit une évolution progressive liée à l'effet bathochrome résultant de la présence du brome sur le cycle xanthénique. Les longueurs d'onde des maximums sont conformes à ceux publiés par ailleurs¹⁷.

Nous avons effectué d'autre part quelques essais sur d'autres colorants halogénés dérivés de la fluorescéine. Un protocole similaire à celui décrit par l'éosine a été appliqué à l'érythrosine (tétraiodo-2-4-5-7 fluorescéine) et, en augmentant l'acidité finale, au rose bengale (tétraiodo-3',4',5',6'-tétrabromo-2,4,5,7 fluorescéine) et à un échantillon de tétrabromo-3',4',5',6' éosine synthétisé au laboratoire. A chaque fois nous avons obtenu des fractions bien séparées, en nombre égal à celles obtenues par chromatographie sur couche mince. La méthode mise au point pour les dérivés de la fluorescéine bromés sur le cycle xanthénique semble donc s'appliquer valablement aux autres dérivés halogénés de ce colorant.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de proposer une méthode chromatographique sur échangeur d'ions permettant de préparer simplement des colorants xanthéniques bromés à partir d'échantillons commerciaux ou synthétisés au laboratoire. L'avantage de cette méthode réside dans la quantité importante de produit pouvant être chromatographiée en une seule fois.

L'emploi de méthodes classiques (RMN ¹H, spectrophotométrie dans le visible, chromatographie sur couche mince) nous a permis de vérifier la nature et la pureté des composés isolés.

Enfin cette technique chromatographique doit pouvoir s'appliquer à la séparation des différents dérivés halogénés de la fluorescéine.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. Laugel et D. Hasselmann, *Ann. Pharm. Franc.*, 26 (1968) 631.
- 2 M. El Gamry et R. Frei, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 1986.
- 3 D. N. Listsyna et D. P. Scherbov, *Zh. Analit. Khim.*, 25 (1970) 2310.
- 4 M. Birkedal-Hansen, *Histochemie*, 36 (1973) 73.
- 5 P. N. Marshall, *Histochem. J.*, 8 (1976) 487.
- 6 M. Dolinski et J. H. Jones, *J. Ass. Offic. Agric. Chem.*, 34 (1951) 114.
- 7 C. Graichen et J. C. Molitor, *J. Ass. Offic. Agric. Chem.*, 42 (1959) 149.
- 8 W. R. Ondorff et A. J. Hemmer, *J. Am. Chem. Soc.*, 49 (1929) 1272.
- 9 M. A. Phillips, *J. Chem. Soc.*, 1 (1932) 724.
- 10 T. Ono et I. Mori, *J. Pharm. Soc. Japan*, 84 (1964) 1134.
- 11 M. Kamikura et Shok, *Eis. Zasshi*, 7 (1966) 338.
- 12 B. Unterhalt, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 144 (1970) 109.
- 13 S. Tsukui et K. Mochida, *Eisi Kagaku*, 18 (1972) 103.
- 14 D. Fompeydie, *Thèse d'Etat en Pharmacie*, Paris, 1978.
- 15 R. W. Horobin et J. Gardiner, *J. Chromatogr.*, 43 (1959) 547.
- 16 Koch, *J. Ass. Offic. Agric. Chem.*, 39 (1956) 397.
- 17 E. Gandin, J. Piette et Y. Lion, *J. Chromatogr.*, 249 (1982) 393.
- 18 D. Fompeydie, F. Onur et P. Levillain, *Bull. Soc. Chim. France*, 1 (1979) 375.

- 19 D. Fompeydie et P. Levillain, *Bull. Soc. Chim. France*, 1 (1980) 459.
- 20 J. P. Dubost, J. M. Leger, J. C. Colleter, P. Levillain et D. Fompeydie, *C.R. Acad. Sci., Paris*, 292. série II (1981) 965.
- 21 D. Fompeydie, A. Rabaron, P. Levillain et R. Bourdon, *J. Chem. Res. (M)*, (1981) 4052.
- 22 D. Fompeydie, F. Onur et P. Levillain, *Bull. Soc. Chim. France*, II (1982) 5.
- 23 M. V. Liebig, *Prakt. J. Chem.*, 88 (1915) 26.
- 24 A. I. Vogel, *A Text Book of Practical Organic Chemistry*, 3e éd., Longmans, (1961) London.
- 25 L. R. Snyder, *Principles of Adsorption Chromatography*, Dekker, New York, 1968.