

UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE FABRICATION DE COLONNES CAPILLAIRES DE VERRE,
UTILISANT DES CHLOROSILANES POLYMERISES. APPLICATION A L'ANALYSE DES
STEROIDES ET DES PROSTAGLANDINES.

M. RIGAUD^o, P. CHEBROUX, J. DURAND, J. MACLOUF

Laboratoire de Biochimie, CHU Dupuytren - 87031 LIMOGES CEDEX - FRANCE

C. MADANT^o

Laboratoire d'Hormonologie, CHU de Grenoble - 38700 LA TRONCHE - FRANCE

(Received in France 8 June 1976; received in UK for publication 14 September 1976)

De nombreuses méthodes ont été publiées dans le domaine de la fabrication de colonnes capillaires de verre, utilisant comme phases stationnaires des polymères de silicone stables à haute température. (1), (2), (3). Cependant, leur réalisation est délicate. Nous présentons une méthode simple, rapide et reproductible pour les réaliser, utilisant un polymère de polysiloxane obtenu par hydrolyse préalable du diméthylchlorosilane, comme phase stationnaire.

CONDITIONS EXPERIMENTALES

L'étirage du verre est réalisé à partir de cannes de verre borosilicate Pyrex (6 × 2 mm), selon le principe donné par DESTY (4). Les colonnes ainsi obtenues ont un diamètre intérieur de 0,20 - 0,25 mm.

Après lavage au méthanol, à l'acétone, et séchage, elles sont remplies d'HCl gazeux selon la méthode d'ALEXANDER (5) ; puis scellées aux extrémités, elles sont portées à 350°C pendant 24 heures. Ce traitement a pour objet de dégager le maximum de groupes hydroxyles libres à la surface du verre. Par ailleurs, la faible teneur en Na du verre utilisé ne conduit pas à la formation de NaCl, comme dans le cas du verre sodocalcique.

Le polymère de polysiloxane est obtenu par la méthode décrite par PATNODE (6). A 40 ml de DMCS sont ajoutés, goutte à goutte, 60 ml d'une solution de NH₄OH à 12,5 %. Cette opération est réalisée dans un bain de glace, sous agitation magnétique. Les conditions utilisées ici permettent d'obtenir le mélange de polymères contenant le moins possible de composés distillables.

Le produit huileux obtenu est décanté, puis lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Il est dilué au 1/5 dans du CH₂Cl₂ pour utilisation.

Environ 1/4 de la colonne est rempli avec la solution de polymère. Cette solution parcourt la totalité de la colonne, sous une pression d'azote, à une vitesse d'environ 10 cm/sec. Le courant d'azote est maintenu jusqu'à séchage complet, environ 2 heures. La colonne est ensuite remplie d'ammoniac, obtenu en faisant réagir une solution de NH₄OH à 25 % sur des pastilles de NaOH. Scellée aux deux extrémités, elle est ensuite portée à 350°C pendant 24 heures.

Des études sont actuellement en cours pour déterminer la nature de l'action de l'ammoniac sur l'ensemble polymère-verre. Cependant, on peut penser que cette action se situe au niveau de la décyclisation (7) des polysiloxanes, suivie de polymérisation permettant d'obtenir des

chaînes linéaires.

Le gaz est ensuite évacué, sous courant d'azote, et la colonne montée sur le chromatographe. Après conditionnement de 100 à 300°C à raison de 2°C/min, elle est prête à l'emploi. Cette méthode permet d'obtenir des colonnes possédant au moins 2 000 plateaux théoriques au mètre, calculés sur le tétracosane à 220°C avec de l'hydrogène comme gaz vecteur.

Le tableau I donne les caractéristiques de quelques colonnes obtenues (8).

TABLEAU I

Caractéristiques	Colonne n°	
	1	2
Longueur (mètre)	26	29
Diamètre intérieur	0,20	0,20
Température	220	220
Facteur de capacité : k	4,5	6,9
Vitesse linéaire (cm/sec)	23,5	24
Nombre de séparations TZ n _{C₂₄₋₂₆}	33,3	34,4
Nombre de plateaux théoriques/mètre	3524	3230
HEPT (mm)	0,28	0,31
Nombre de plateaux efficaces	2359	2481

La polarité de ce type de colonne est similaire à celle obtenue avec des colonnes préparées avec des méthylsilicones de commerce, type OV-101 ou SE-30. Le tableau II estime cette polarité par comparaison des indices de rétention de divers stéroïdes sous forme de dérivés méthylloximes-éthers de triméthylsilyle et de prostaglandines, sous forme d'esters méthyliques-éthers de triméthylsilyle.

TABLEAU II

Comparaison des indices de rétention de divers stéroïdes et prostaglandines, sur colonne d'OV-101 et une colonne de méthylpolysiloxane.

	Colonne			Colonne	
	Méthyl- polysi- loxane	OV-101		Méthyl- polysi- loxane	OV-101
PG F _{2β}	2655	2660	Déhydroépiandrostérone	2561	2563
PG F _{1β}	2678	2683	11-céto androstérone	2600	2600
13-14-dihydro-PG F _{2α}	2713	2716	11-céto étiocholanolone	2613	2610
15-épi-PG F _{1α}	2734	2735	11-OH androstérone	2698	2693
15-céto-PG F _{2α}	2754	2750	11-OH étiocholanolone	2715	2712
15-épi-PG F _{2α}	2697	2701	Prégnanediol	2758	2758
11-épi-PG F _{2α}	2693	2699	Prégnanetriol	2789	2880
PG F _{3α}	2718	2710	Tétrahydrocortisone (THE)	2969	2960
PG F _{1α}	2803	2808	Tétrahydrocortisol (THF)	3029	3023
PG F _{2α}	2745	2742	Allo-tétrahydrocortisol (α-THF)	3034	3036
Androstérone	2500	2501			
Étiocholanolone	2520	2522			

PG. F
Me.E-TMS

250°C

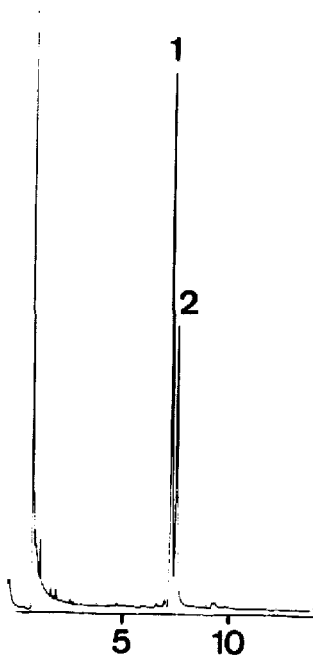


Figure 1 ↑

Les caractéristiques chromatographiques de ce type de colonnes sont excellentes. Elles permettent de réaliser la séparation de certaines prostaglandines, distinctes entre-elles d'un très faible indice de rétention. C'est le cas de la figure 1, montrant la séparation de 13-14-dihydro-PG F_{1β} (I_{250°} = 2692) et 15-épi-PG F_{2α} (I_{250°} = 2701), pics 1 et 2.

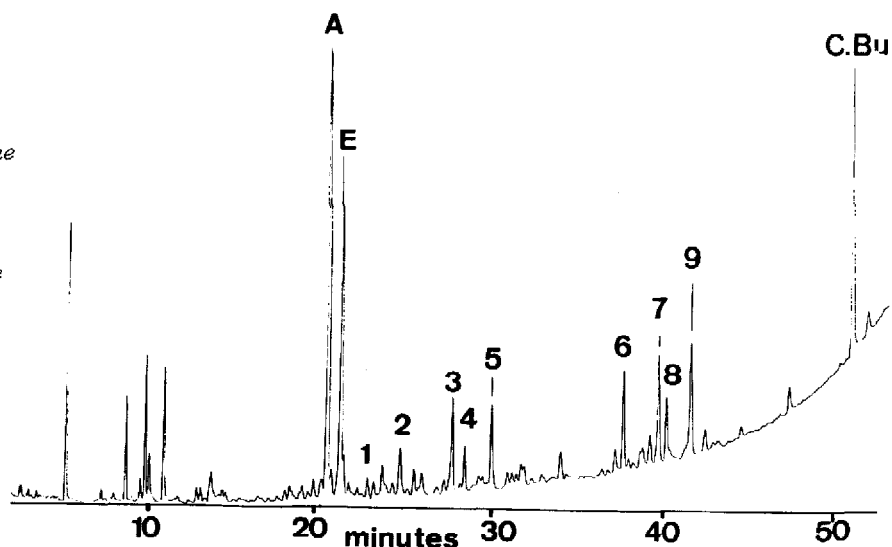
La figure 2 montre le profil d'excrétion urinaire des métabolites des stéroïdes hormonaux sous forme de dérivés méthoxyloximes-éthers de triméthylsilyle (MO-TMS), obtenu en programmation de température de 170 à 260°C à 2°C/min.

La nature exacte de la phase stationnaire obtenue par action de catalyse basique sur l'ensemble polymère, groupements OH libres du verre, n'est pas encore entièrement élucidée. Une étude similaire a été réalisée dans le domaine des supports poreux applicables à la chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide (9). Un grand nombre d'éléments permet de penser que la phase est chimiquement greffée à la surface interne de la colonne de verre. En particulier, l'extraction par des solvants de haute affinité pour le polymère libre, ne change pas les caractéristiques chromatographiques ; de plus, la possibilité d'obtenir des colonnes avec des polymères du type méthyl-phényl-siloxanes semble indiquer que le caractère commun à ces deux types de colonnes, est une liaison chimique entre le verre et le polymère permettant d'obtenir un film stable. Des études sont en cours pour préciser la nature de cette liaison.

♂ NORMAL
MO-TMS

Légende Figure 2 →

- A = Androstérone
- E = Etiocholanolone
- 1 = Déhydroépiandrostérone
- 2 = 11-céto androstérone
- 3 = 11-OH androstérone
- 4 = 11-OH étiocholanolone
- 5 = Prégnanediol
- 6 = Tétrahydrocortisone
- 7 = Tétrahydrocortisol
- 8 = Allo-tétrahydrocortisol
- 9 = β cortolone
- CBu = Butyrate de cholestéryle (standard interne).



REMERCIEMENTS

Nous remercions le Docteur UDO AXEN (Upjohn) pour la fourniture des standards de prostaglandines utilisés dans ce travail.

REFERENCES

1. RUTTEN G.A.F.M., LUYTEN J.A.
J. Chromatog. 74, 177 (1972).
2. GERMAN A.L., PFAFFENBERGER C.D., THENOT J.P., HORNING M.G., HORNING E.C.
Anal. Chem., 45, 930 (1973).
3. LIN S.N., SZAFRANEK J., PFAFFENBERGER C.D., HORNING E.C.
J. Chromatog., 104, 319 (1975).
4. DESTY D.H., HARESNAPE J.N., WHYMAN B.H.F.
Anal. Chem., 32, 302 (1960).
5. ALEXANDER G., RUTTEN G.A.F.M.
Chromatographia, 6, 231 (1973).
6. PATNODE C.W., WILLOCK D.F.
J. Amer. Chem. Soc., 68, 358 (1946).
7. ODIAN G.
Principles of Polymerisation, p. 495
Mc Graw Hill Book Inc. (1970).
8. ETRE L.S., MARCH E.W.
J. Chromatog., 91, 5 (1974).
9. KIRKLAND J.J., DESTEFANO J.J.
J. Chromatog. Sci., 8, 309 (1970).