

La chromatographie sur papier et son application à l'analyse des hétérosides digitaliques

Autor(en): **Fauconnet, Louis / Kreis, Kurt**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **65 (1951-1953)**

Heft 282

PDF erstellt am: **25.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-274375>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

La chromatographie sur papier et son application à l'analyse des hétérosides digitaliques

PAR

Louis FAUCONNET et Kurt KREIS

(Séance du 12 novembre 1952)

I. LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

1. *Introduction.*

TSWETT, un botaniste russe, est l'inventeur de la méthode chromatographique. En 1906¹, il publia des travaux sur la séparation des colorants naturels des feuilles (chlorophylles et caroténoïdes) au moyen de colonnes de carbonate de calcium. Les chimistes et les physiologistes ignorèrent les publications de TSWETT, ou refusèrent d'en tenir compte jusque vers 1930. Dès cette date la méthode chromatographique a été reprise, étudiée et perfectionnée par plusieurs grands chimistes, et elle est utilisée pour analyser et purifier les produits des domaines les plus divers.

TSWETT a réalisé une chromatographie par adsorption, mais l'adsorption n'est pas le seul phénomène qui permette de séparer dans une colonne des substances chimiques pures à partir d'un mélange plus ou moins purifié. Comme STRAIN (2) le fait remarquer, on obtient des différences de vitesse de migration, qui provoquent la séparation des constituants du mélange, en mettant en œuvre divers phénomènes : ceux de l'électrophorèse, des échangeurs d'ions, de la chromatographie par adsorption (TSWETT) et de la chromatographie de partage.

La chromatographie de partage, imaginée vers 1940 par MARTIN et SYNGE (3), a été réalisée sous une forme nouvelle par CONSDEN, GORDON et MARTIN (4) qui, en 1944, remplacèrent la colonne par une feuille de papier et inventèrent la chromatographie sur papier.

¹ Voir ZECHMEISTER et CHOLNOKY (1).

2. *Théorie de la chromatographie de partage.*

Son principe repose sur la répartition d'une substance soluble dans deux phases en contact l'une avec l'autre. Cette répartition s'exprime par le coefficient de partage α .

Soit, par exemple, une substance S répartie en solution dans un système solvant à deux phases comprenant du benzène et de l'eau

$$\alpha_s = \frac{\text{concentration de S dans l'eau}}{\text{concentration de S dans le benzène}}$$

Un système solvant à deux phases permet de réaliser une chromatographie de partage si l'un des solvants (phase mobile) peut passer par dessus et à travers l'autre phase constituée par un support à particules microscopiques imprégnées de l'autre solvant (phase immobile). Le plus souvent l'eau est le constituant liquide principal de la phase immobile. Toutes les matières inertes qui gonflent au contact de l'eau peuvent servir de support.

3. *Chromatographie sur papier.*

La fibre cellulosique d'un papier filtre pur et homogène a toutes les qualités requises d'un support pour la phase aqueuse. Pour préparer la phase immobile, on laisse, en vase clos, une bande de ce papier s'imprégner des vapeurs de l'eau et de la phase mobile, à température constante et jusqu'à ce que soit établi l'équilibre des tensions de vapeurs. La phase mobile peut avancer dans la bande de papier soit par capillarité : on trempe dans la phase mobile le bord inférieur de la feuille imprégnée (technique ascendante), soit par gravité : on fixe le bord supérieur de la feuille dans une auge qui recevra la phase mobile (technique descendante).

Le mélange des substances à analyser est déposé en solution sur la bande de papier avant l'imprégnation, et constitue la tache initiale. Les constituants du mélange sont entraînés par la phase mobile à différentes distances. Le chromatogramme terminé comprend autant de taches que de constituants séparés. Les différences de migration des diverses substances pures au cours de la chromatographie sur papier s'expliquent à l'aide des coefficients de partage. Voyons un exemple schématique, et considérons le cas théorique d'un mélange de 100 γ d'une substance A et de 100 γ d'une substance B qu'on analyse par chromatographie sur papier (les quantités sont en pratique environ 20 fois plus faibles dans le cas des hétérosi-

des digitaliques). Les coefficients de partage dans les deux phases du système solvant utilisé sont $\alpha A = 1$ et $\alpha B = 4$.

Suivons le développement du chromatogramme sur une coupe longitudinale de la bande de papier (fig. 1), et faisons avancer la phase mobile de manière discontinue par segments égaux. Dans chaque intervalle nous imaginons les deux phases superposées en quantités égales et comme dans une ampoule à décanter ; les quantités des substances A et B, calculées dans chaque intervalle d'après les coefficients de partage, indiquent directement les concentrations. Nous admettons que A et B sont visibles sur le papier à partir d'une concentration de 20γ par intervalle (sur le schéma de la fig. 1, A = pointillé, B = quadrillé).

Les intervalles du schéma sont en réalité infiniment petits. Les chiffres indiquant les quantités des substances A ou B représentent sur chaque coupe des distributions du type de celle de Gauss-Laplace, qu'on peut figurer par des courbes en cloche. En diminuant les intervalles, c'est-à-dire en se rapprochant de la réalité, on obtient des courbes plus raides, qui expliquent l'apparition de taches à bords nets.

La plupart des publications qui parlent de chromatographie sur papier contiennent des valeurs R_f , réputées caractéristiques de chaque substance pure dans un système solvant déterminé.

$$R_f = \frac{\text{parcours du centre de la tache}}{\text{parcours du front de la phase mobile}}$$

La relation entre la valeur R_f et le coefficient de partage α est la suivante :

$$R_f = \frac{A_L}{A_L + \alpha A_S}$$

où A_L = aire de la coupe transversale de la phase mobile,

A_S = aire de la coupe transversale de la phase immobile

La pratique de la chromatographie sur papier nous a conduits à renoncer à l'emploi des valeurs R_f dans nos recherches, pour les raisons suivantes. Pour que les valeurs R_f soient exactement reproductibles d'une expérience à l'autre, il faudrait que les conditions expérimentales soient idéales :

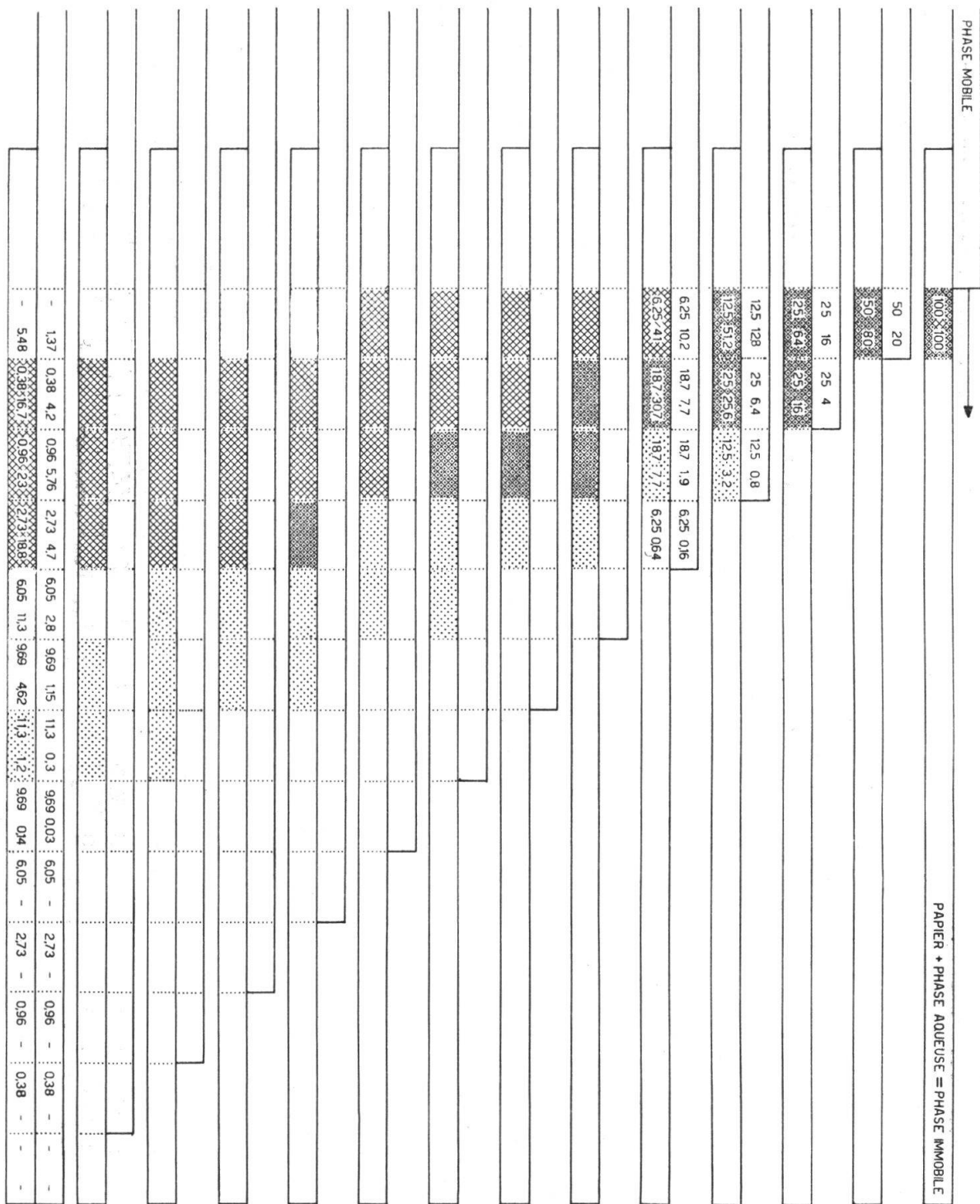
température constante,

solvants de même composition et de même pureté,

papiers de texture, de pureté et d'imprégnation égales,

équilibre complet des tensions de vapeurs dans un récipient strictement étanche,

composition constante de la phase mobile au cours du développement.



Développement schématique d'une tache contenant un mélange A+B

FIG. 1.

Cette dernière condition n'est pas réalisable en pratique : le solvant de la phase mobile subit lui aussi, au cours de chaque développement, une analyse chromatographique. En outre chaque constituant d'un mélange à analyser modifie, quand il est dissous dans le système à deux phases, les coefficients de partage des autres constituants. Pour que les valeurs R_f soient reproductibles d'un laboratoire à l'autre, il faut que les techniques et les appareillages soient exactement les mêmes.

Malgré ces désavantages, la chromatographie sur papier peut rendre de grands services. Au lieu d'employer les valeurs R_f , il y a souvent avantage à comparer le chromatogramme du mélange inconnu au chromatogramme que donnent des substances connues et pures sur la même bande de papier. La chromatographie sur papier sans valeur R_f offre encore un autre avantage : il n'est pas nécessaire d'observer le front de la phase mobile, on peut le laisser atteindre le bord inférieur de la bande de papier et prolonger le développement aussi longtemps qu'on veut.

La technique bidimensionnelle de la chromatographie sur papier, inaugurée par CONSDEN, GORDON et MARTIN (4) et reprise par DENT (5) en 1948, donne de très bons résultats dans l'analyse des mélanges d'acides aminés. Mais elle est d'un emploi limité, car elle donne des résultats meilleurs que ceux de la technique unidimensionnelle, seulement si :

a) les coefficients de partage des constituants à isoler sont relativement peu différents dans chaque système solvant ;

b) les rapports entre les coefficients de partage des constituants à analyser sont sensiblement différents dans le premier et dans le second système solvant.

II. APPLICATION AUX HÉTÉROSIDES DIGITALIQUES.

1. Introduction.

A la suite des travaux de STOLL et collab. (6, 7), on connaît 18 substances cardiotoniques provenant des feuilles de digitales (*Digitalis purpurea* L. et *Digitalis lanata* EHRH.). Leur constitution et leurs relations chimiques sont rassemblées dans la fig. 2.

Plusieurs auteurs ont déjà utilisé la chromatographie sur papier dans le domaine des hétérosides et des génines cardiotoniques. SVENDSEN et JENSEN (8) furent les premiers, en 1950, à publier des valeurs R_f d'hétérosides digitaliques ; ils emploient des systèmes solvants à base de chloroforme et d'eau ; ils augmentent la solubilité des hétérosides dans l'une et l'autre

phases du système en y ajoutant du méthanol ; les taches des chromatogrammes sont alors moins étalées et leurs distances relatives sont modifiées. Quelques auteurs ont repris et poursuivi les travaux de SVENDSEN avec des techniques semblables : JAMINET (9), MESNARD et DEVEZE (10) ; DEVEZE (11)

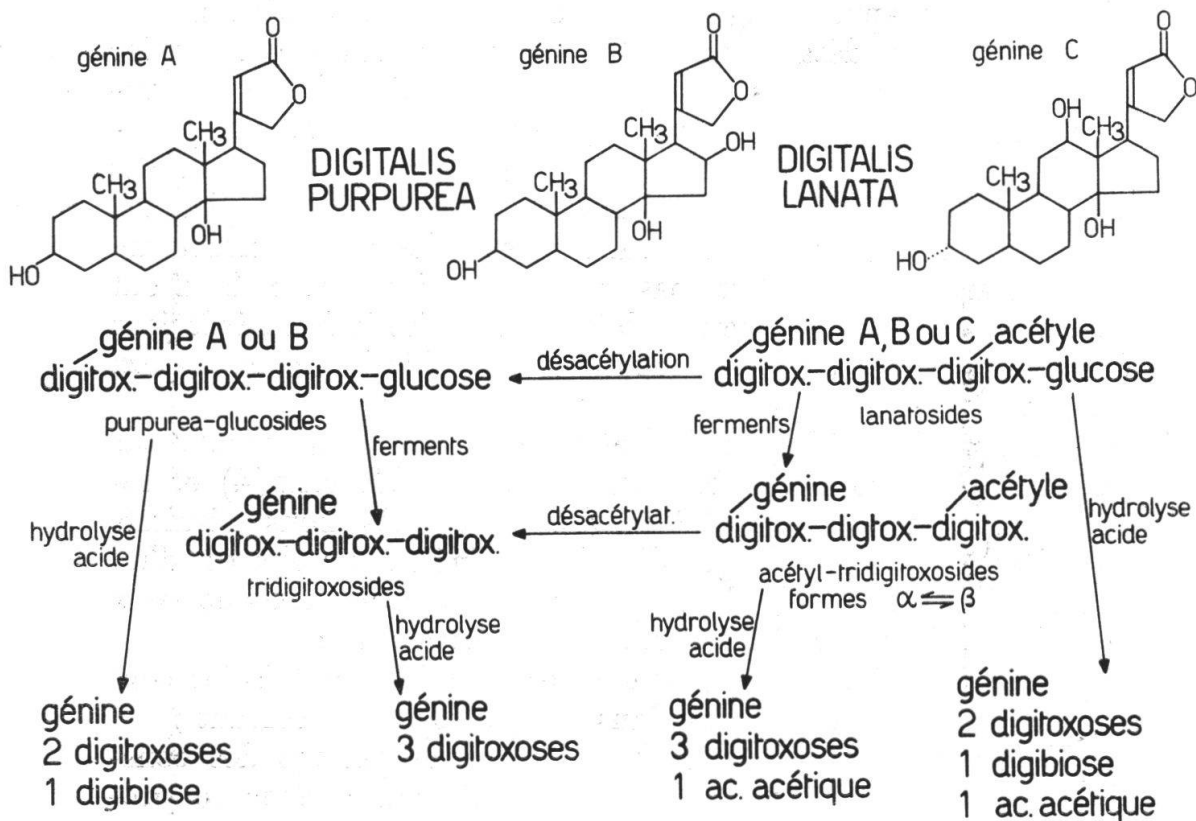


FIG. 2.

a aussi utilisé la technique bidimensionnelle. D'autres emploient des techniques différentes : SCHINDLER et REICHSTEIN (12), HEFTMANN et LEVANT (13) ont remplacé l'eau par de meilleurs solvants, tels que la formamide, le propylène-glycol ; ils ont aussi renoncé à utiliser les valeurs R_f , et préfèrent caractériser les diverses taches des chromatogrammes au moyen des rapports des distances qu'elles parcourent suivant la durée du développement. HASSALL et MARTIN (14) travaillent avec d'autres systèmes solvants : esters éthyliques et cétones/eau ou solutions aqueuses de divers sels.

2. Technique et appareillage.

A la suite d'essais préliminaires, nous avons choisi la technique descendante unidimensionnelle. Aux systèmes solvants de base : benzène/eau, benzène+dichlorméthane/eau, dichlorméthane/eau, nous ajoutons en diverses proportions du méthanol ou de l'acétone ; l'acétone est surtout efficace dans le système benzène/eau.

Nos *chambres à chromatographie* sont des cuves de verre de $15 \times 17 \times 36$ cm munies d'une fermeture étanche (voir

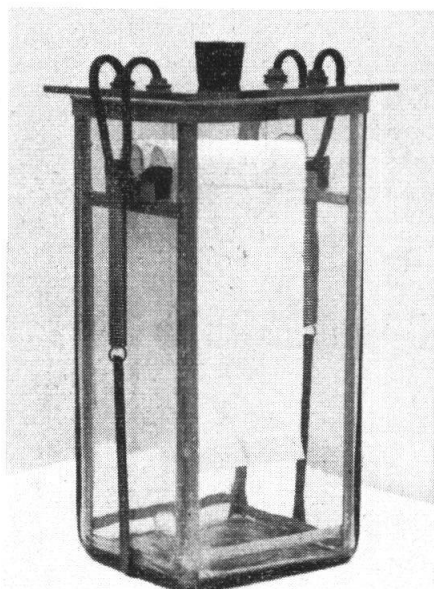


FIG. 3.

la fig. 3) ; un trou dans le couvercle permet d'introduire après l'imprégnation la phase mobile dans l'auge en verre placée sur un support métallique.

Dans cette auge on fixe, au moyen d'une baguette de verre, deux bandes de papier (Schleicher et Schüll n° 2045/A), de 13×29 cm, sur lesquelles on a déposé les taches initiales de solutions à analyser.

Pour réaliser une série de chromatogrammes, nous posons 4 ou 5 *taches initiales* à 7 cm du bord supérieur de chaque bande de papier, à $2\frac{1}{2}$ ou 3 cm de chaque bord latéral et à 2 cm de distance entr'elles ; chaque tache contient 5 à 20 γ de résidu sec et ne doit pas avoir plus de 6 mm de diamètre ; le solvant de la solution à analyser doit être évaporé.

Chacune de nos feuilles porte au moins un *chromatogramme témoin*, à partir d'une tache initiale contenant un mélange d'hétérosides purifiés².

L'imprégnation est très importante : au fond de la chambre à chromatographie, on verse un peu d'eau ou du constituant liquide de la phase immobile et on place une plaque de Petri sans couvercle contenant la phase mobile. On ferme hermétiquement la cuve et on la place dans une armoire à thermostat (23-24°), à l'abri de la lumière ; il faut 15 à 20 heures, parfois plus encore, pour que le papier soit imprégné des vapeurs d'eau et de la phase mobile.

Pour *développer* le chromatogramme, on introduit la phase mobile par le trou du couvercle dans l'auge, d'où elle avance lentement le long de chaque bande de papier. Les divers constituants des taches initiales se déplacent plus ou moins suivant leur coefficient de partage. On prolonge le développement jusqu'à ce que les taches soient suffisamment séparées les unes des autres. La différence entre les coefficients de partage du désacétyllanatoside C et des génines est si grande, qu'il est impossible d'obtenir sur la même bande de papier la séparation de toute la série des cardiotoniques digitaliques ; cette différence exclut aussi la technique bidimensionnelle. Pour obtenir la séparation complète de toutes les substances de la série qui nous intéresse, nous réalisons quatre chromatogrammes, sur quatre bandes de papier dans quatre cuves contenant chacune un système solvant choisi de telle sorte qu'il développe une partie déterminée de la série :

syst. solv. IV a ou b	}	désacétyl-lanatoside C... coefficient de	partage élevé (hydrophile)
		purpurea-glucoside B	
		lanatoside C	
		purpurea-glucoside A	
	}	lanatoside B	
		lanatoside A	
syst. solv. III.....		tridigitoxoside B (gitoxine)	
	}	tridigitoxoside C (digoxine)	
		tridigitoxoside A (digitoxine)	
syst. solv. II.....	}	génine C	coefficient de partage bas
		génine B	
syst. solv. I.....		génine A.....	

² Nous remercions M. le prof. A. Stoll et ses collaborateurs de la Maison Sandoz S. A., à Bâle, qui ont bien voulu mettre à notre disposition ces substances de référence.

Systèmes solvants

Constituants	I	II	III	IV a	IV b
benzène	100 cm ³	20	—	10	70
dichlorméthane	—	80	100	100	—
méthanol	—	—	—	60	—
acétone	—	—	—	—	130
eau	50	50	50	50	50

Pour *révéler* les cardiotoniques digitaliques, qui sont incolores, nous employons l'acide trichloracétique en solution chloroformique à 25 %, que nous projetons au vaporisateur sur le chromatogramme développé et dont les solvants ont été partiellement évaporés à l'air pendant quelques minutes ; un chauffage plus ou moins prolongé dans une étuve à 105° transforme alors les cardiotoniques digitaliques en substances fluorescentes sous les rayons ultra-violet, qui permettent de repérer la position et la nature des taches.

Génines et hétérosides des groupes	Fluorescence après	
	2 à 3 min. à 105°	20 min. à 105°
A	orange	jaune-orange
B	blanc-bleuâtre	blanc
C	vert	bleu

Les réactions colorées classiques, qui reposent sur la réactivité de l'anneau lactonique caractéristique des cardiotoniques digitaliques, sont aussi réalisables par vaporisation des réactifs sur le papier, mais leur sensibilité est au moins dix fois plus faible que celle de la réaction à l'acide trichloracétique ; elles ne permettent pas de différencier les trois groupes A, B et C.

3. Résultats.

La technique de la chromatographie sur papier que nous avons mise au point permet de séparer tous les hétérosides et les génines digitaliques actuellement connus ; elle permet de les déceler même dans les extraits bruts des feuilles de digitales laineuse et pourprée. C'est, à notre connaissance, la seule méthode qui donne des renseignements qualitatifs précis et même semi-quantitatifs par analyse directe d'un extrait brut de feuille de digitale. Les applications possibles et directes en sont nombreuses dans l'étude et l'appréciation des

drogues et des préparations pharmaceutiques à base de digitales.

Les recherches que nous poursuivons et dont les résultats seront publiés ultérieurement (15) montrent qu'à côté des 18 cardiotoniques digitaliques actuellement connus et identifiés, il en existe encore d'autres, plus hydrophiles, donc plus riches en groupes —OH. Ces groupes —OH peuvent se trouver soit sur des sucres allongeant la chaîne osique des hétérosides à génines connues, soit sur le noyau stérolique, correspondant alors à une ou à des génines à 4 —OH, génines qui n'ont été encore ni décrites, ni identifiées.

BIBLIOGRAPHIE

1. ZECHMEISTER L. et CHOLNOKY L. — Die chromatographische Adsorptionsanalyse, Springer, Wien, 1937.
— Principles and Practice of Chromatography, Wiley, New-York, 1943.
2. STRAIN H.-H. — *Anal. Chem.* 24, 50 (1952).
3. MARTIN A.-J.-P. et SYNGE R. — *Bioch. J.* 35, 1358 (1941).
4. CONSDEN R., GORDON A.-H., MARTIN A.-J.-P. — *Bioch. J.* 38, 224 (1944).
5. DENT C.-E. — *Bioch. J.* 43, 169 (1948).
6. STOLL A. et KREIS W. — *Helv. Chim. Act.* 16, 1049 et 1390 (1933); 17, 592 (1934); 18, 120 (1935); 35, 1318 (1952).
7. STOLL A., VON WARTBURG A., KREIS W. — *Helv. Chim. Act.* 35, 1324 (1952).
8. SVENDSEN A.-B. et JENSEN K.-B. — *Pharm. Act. Helv.* 25, 241 (1950).
9. JAMINET F. — *J. Pharm. Belg.* 6, 92 (1951); 7, 169 (1952).
10. MESNARD P. et DEVEZE J. — *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux* 88, 109, 114 (1950); 89, 85 (1951).
11. DEVEZE J. — Thèse doctorat, Université de Bordeaux, 1951.
12. SCHINDLER O. et REICHSTEIN T. — *Helv. Chim. Act.* 34, 108 (1951).
13. HEFTMANN E. et LEVANT A.-J. — *J. Biol. Chem.* 194, 703 (1952).
14. HASSALL C.-H. et MARTIN S.-L. — *J. Chem. Soc.* 1951, 2766.
15. KREIS K. — Thèse de doct. en pharmacie, Université de Lausanne, à paraître.