

Microchimie et chromatographie sur papier, application aux cardiotoniques digitaliques

Autor(en): **Fauconnet, Louis / Fazan, René**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **66 (1954-1957)**

Heft 292

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-274728>

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.

Microchimie et chromatographie sur papier, application aux cardiotoniques digitaliques

PAR

Louis FAUCONNET et René FAZAN

(Séance du 11 janvier 1956)

1. *Introduction.*

La chromatographie sur papier (1) permet de séparer, à partir d'un mélange en solution qu'on pose en une « tache initiale » sur le papier chromatographique, des quantités minimes de substances le plus souvent incolores, donc invisibles. Pour pouvoir constater une telle séparation chromatographique, il est nécessaire de révéler le chromatogramme, c'est-à-dire de transformer chimiquement les constituants séparés en des substances colorées ou fluorescentes. Parmi les nombreux révélateurs des hétérosides cardiotoniques proposés par divers auteurs, nous en utilisons surtout deux, dont le constituant principal est de l'acide trichloracétique (AT), utilisé dans ce but pour la première fois par SVENDSEN et JENSEN (2). Nous en avons précisé l'emploi. L'un de nos révélateurs est une solution à 25 % d'AT dans l'éthanol à 95 % ; il est assez stable. L'autre est une solution à 25 % d'AT dans du chloroforme sec et dépourvu d'alcool, à laquelle nous ajoutons au moment de l'emploi quelques gouttes d'une solution aqueuse concentrée d'hypochlorite alcalin (extrait de Javel). Notre premier révélateur (AT) agit exclusivement comme un acide fort et concentré; il ne permet de révéler que les cardiotoniques de la série B des digitales, caractérisés par la présence, en position 16 de leur molécule, d'une fonction alcoolique secondaire libre (B) ou estérifiée (Bc).

Notre deuxième révélateur (ATO) est à la fois acide et oxydant; il peut transformer les cardiotoniques digitaliques en substances dont la fluorescence diffère.

Génines et hétérosides des séries	Fluorescence sous les rayons UV	Limite de sensibilité
A	orange	0,3 μg
B	bleu-blanchâtre	0,1 μg
Bc	bleu-ciel	0,1 μg (?)
C	vert-bleu	0,3 μg

Au cours de recherches destinées à faire connaître avec précision le mécanisme de l'action de nos révélateurs, nous avons inauguré une technique microchimique nouvelle, dont l'emploi peut être généralisé.

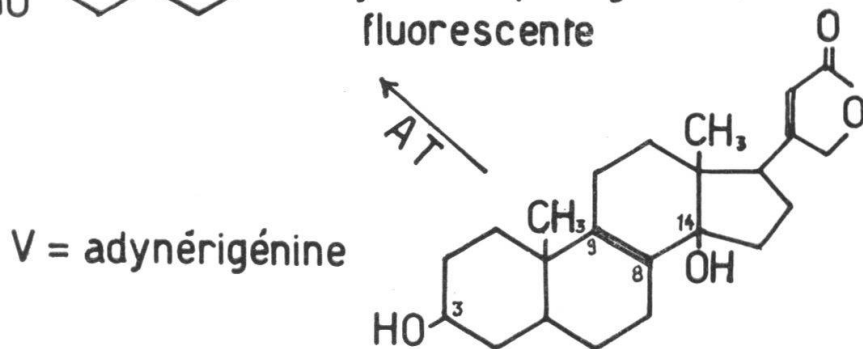
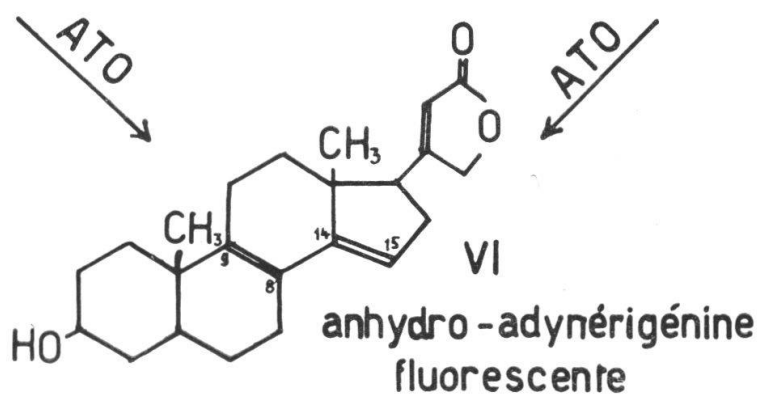
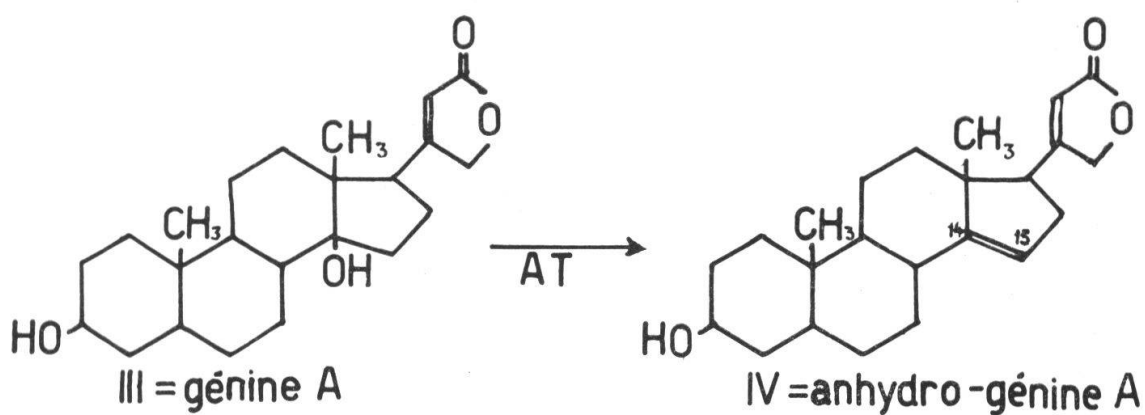
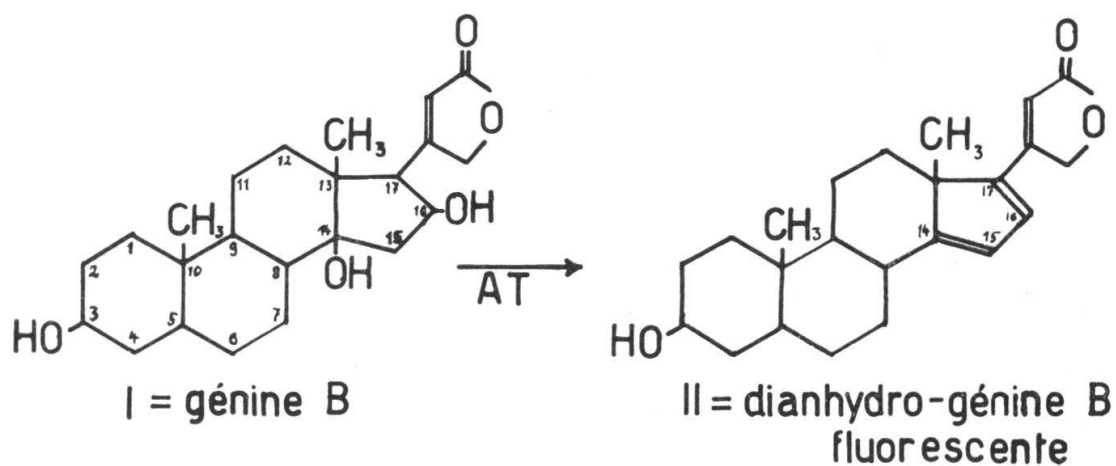
2. Principe de la technique.

Le plus souvent, lorsqu'on veut recourir à la chromatographie sur papier pour étudier une réaction chimique et connaître les produits qui en résultent, on fait réagir la substance à étudier avec un ou plusieurs réactifs dans un récipient de verre (ballon, tube ouvert ou scellé) puis on s'efforce de séparer sur papier par chromatographie et d'identifier par comparaison directe le ou les produits de la réaction. *Nous effectuons la réaction directement sur le papier*, au niveau de la tache initiale, et ce même papier sert ensuite à séparer les substances nées au cours de la réaction.

3. Exemple : révélation de la série B.

C'est ainsi que nous avons vérifié une hypothèse selon laquelle l'AT de notre premier révélateur agit sur une substance de la série B (I) comme le fait un acide fort et concentré quelconque, lui arrache à chaud 2 molécules d'eau et la transforme en 14-15, 16-17-dianhydro-dérivé (II), substance fluorescente bleu-clair sous les rayons UV.

Sur une feuille de papier chromatographique nous posons deux taches de 1 μg de génine B ou gitoxigénine; nous ajoutons à l'une d'elles quelques μl de solution à 25 % d'AT dans l'éthanol; nous mettons la feuille de papier dans une étuve à 95 % pendant 3 minutes, puis nous l'observons sous les rayons UV : la tache qui a reçu de l'AT présente une fluorescence bleu-clair, l'autre qui n'en a pas reçu reste invisible. A côté de ces deux taches nous en posons une troisième de dianhydrogénine préparée *in vitro* selon PESEZ (3) par action d'acide phosphorique concentré sur de la génine B en solu-



tion hydroalcoolique, puis extraite de la solution acide par du chloroforme. Sous les rayons UV, cette troisième tache présente une fluorescence bleu-clair. Après chromatographie par les solvants benzène-méthanol-eau (2 + 2 + 1), nous constatons que les taches fluorescentes bleu-clair se sont déplacées de la tache initiale à une nouvelle position au bas du chromatogramme ($R_f = 0,92$) et se trouvent au même niveau, ce qui est une preuve de leur identité chimique. La génine B non traitée donne une tache invisible que le révélateur permet d'observer beaucoup plus près de la tache initiale ($R_f = 0,13$). Nous avons ainsi vérifié que le révélateur à l'AT rend visibles les taches de la série B (I) des cardiotoniques digitaliques en transformant ces substances en dianhydrodérivés (II) fluorescents.

4. Autre exemple : révélation de la série A.

Au haut d'une feuille de papier à chromatographie, nous posons trois taches de 3 μg de génine A ou digitoxigénine (III). Sur l'une de ces taches, nous ajoutons quelques μl de notre premier révélateur AT (acide sans oxydant). Sur une autre tache, nous ajoutons une quantité égale de notre deuxième révélateur ATO (acide avec oxydant). La troisième tache ne reçoit pas de réactif et sert de témoin. Nous mettons la feuille de papier dans une étuve à 95° pendant 3 minutes, puis nous l'observons sous les rayons UV. Seule la tache traitée par l'ATO présente une belle fluorescence orange. Un oxydant est donc nécessaire pour que la génine A soit transformée en une substance fluorescente. Procédons à la chromatographie de ces trois taches par les solvants benzène + méthanol + eau (2 + 2 + 1). Sous la lampe à rayons UV nous constatons que la tache fluorescente orange s'est déplacée en position $R_f = 0,89$. Traitons la feuille entière par du révélateur ATO à l'aide d'un pulvérisateur, puis chauffons à l'étuve à 95° pendant 3 minutes. De nouvelles taches apparaissent avec une fluorescence orange sous les rayons UV. La génine A témoin s'est arrêtée en position $R_f 0,65$. La génine A traitée par l'AT donne deux taches; l'une, faible, de $R_f 0,65$, montre que la génine n'a été que partiellement transformée; l'autre tache, plus forte, de $R_f 0,93$, correspond au produit de la réaction. La génine A traitée par l'ATO montre la tache de $R_f = 0,89$, déjà mentionnée, et une nouvelle tache plus faible de $R_f = 0,93$, qui représente un produit intermédiaire de la transformation

de la génine A en substance à fluorescence orange; ce produit est le même que celui qui résulte de l'action de l'AT sur la génine A.

Une étude bibliographique nous a fait prévoir que les taches de $R_f = 0,93$ correspondent à la β -anhydrog nine A (IV) préparée et décrite par S. SMITH (4). Pour le vérifier, nous avons préparé cette substance *in vitro* selon S. SMITH et en avons fait la chromatographie sur papier en même temps que celle de la génine A traitée par l'AT. Le parallélisme est complet lorsque les taches initiales ont été posées l'une à côté de l'autre; si elles ont été superposées à des doses inférieures à 1 μ g, nous obtenons une tache unique et bien localisée de $R_f = 0,93$.

Il restait à établir la structure chimique de la substance fluorescente orange sous les rayons UV, produit final de la réaction de l'ATO sur la génine A. Une observation heureuse, faite alors que nous  tudiions un autre sujet, nous a conduits à une hypothèse que nous avons pu vérifier. Dans un chromatogramme d'extrait de feuille de laurier-rose, *Nerium oleander*, de la famille des Apocynacées, nous avons remarqué que le révélateur AT sans oxydant fait apparaître des taches dont la fluorescence orange est semblable à celle des cardiotoniques de la série A des digitales traitées par l'ATO à chaud. Les travaux de TSCHESCHE et NEUMANN (5, 6) ont montré que la feuille de *Nerium oleander* contient de l'adyn roside, dont l'aglucone adynérigénine (V) a une constitution chimique ne différant de celle de la génine A des digitales que par une double liaison en 8-9; l'adynérigénine est donc la 8-9-d hydrog nine A. Or, nous avons pu préparer de l'adynérigénine et constater que traitée par l'AT sur la tache initiale, cette substance devient fluorescente orange sous les rayons UV, et après chromatographie par les mêmes solvants benzène, méthanol, eau (2 + 2 + 1), la substance fluorescente a le même $R_f = 0,89$ que la substance que nous cherchons à identifier. Par analogie avec ce que nous savons de l'action de l'AT sur les g nines A et B des digitales, nous admettons que l'AT enlève à chaud une molécule H_2O à l'adynérigénine et la transforme en 14-15-anhydro-adynérigénine (VI). Ainsi la transformation de la génine A (III) en 14-15-anhydro-adynérigénine par l'ATO à chaud se produit en deux étapes, la première due à l'AT donne l'anhydrog nine A (IV), non fluorescente, de $R_f = 0,93$. Puis l'oxydant ATO donne à chaud le dérivé 8-9-d hydrog n  ou 14-15-anhydro-adynérigénine (VI), à fluorescence orange, de $R_f = 0,89$.

5. Conclusion.

Dans les deux exemples ci-dessus, nous avons réalisé sur papier, au niveau de la tache initiale, des réactions microchimiques dont les produits finals et intermédiaires sont étudiés et identifiés au moyen de la chromatographie sur papier. Un tel procédé peut être utilisé dans de très nombreux domaines. Cette nouvelle technique microchimique présente plusieurs avantages, dont voici quelques-uns.

1. Les substances participant à la réaction peuvent être connues exactement avant la réaction : nous pouvons les poser à l'état pur; s'il s'agit d'un mélange, même complexe, comme un extrait de plante, nous pouvons en séparer les constituants par une première chromatographie, puis sur les taches invisibles du chromatogramme, taches invisibles dont nous repérons la position grâce à un chromatogramme parallèle que nous découpons et révélons, nous faisons agir notre réactif, avec chauffage à volonté; puis, dans la direction perpendiculaire à celle de la première chromatographie, nous réalisons une deuxième chromatographie, avec témoin au besoin, comme dans l'exemple ci-dessus.

2. Plusieurs conditions de la réaction peuvent être précisées et modifiées à notre gré dans une large mesure : concentrations, quantités relatives des corps réagissant les uns avec les autres, température, durée de la réaction à une température déterminée; dans d'autres cas, le pH peut être fixé par un tampon convenable.

3. L'analyse chromatographique peut permettre de connaître et d'identifier d'un seul coup les divers produits de la réaction.

4. Elle permet de savoir dans quelle mesure la réaction a été quantitative : si une des substances à transformer (dans notre exemple, la génine A) n'a réagi que partiellement, nous en retrouvons la tache dans le chromatogramme après la réaction; nous pouvons en outre savoir si la réaction est simple et directe (un produit de départ et un seul produit final, dans le cas de l'adynérigénine) ou si la réaction est complexe, avec des produits intermédiaires (par exemple, transformation de la génine A par l'ATO en anhydro-génine A, puis en anhydro-adynérigénine).

5. Les quantités mises en œuvre peuvent être minimales, le plus souvent d'un ordre de grandeur inférieur au mg, par-

fois de l'ordre du μg , détail important lorsqu'il s'agit d'étudier des substances très coûteuses, rares ou nouvelles.

Il convient de rappeler, pour éviter des désillusions à qui serait tenté de recourir à notre technique, une condition préalable essentielle : il faut disposer d'une technique chromatographique sur papier exactement adaptée au domaine à explorer (solvants appropriés, révélateur assez sensible). Mais le développement de la chromatographie sur papier est tel actuellement que la littérature scientifique s'enrichit chaque semaine de publications susceptibles de faciliter la mise au point de la technique spéciale qui est nécessaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. FAUCONNET L. et KREIS K. — *Bull. Soc. vaud. Sc. nat.* 65, 347-56 (1952).
 2. SVENDSEN A.-B. et JENSEN K.-B. — *Pharm. Acta Helv.* 25, 241-247 (1950).
 3. PESEZ M. — *Bull. Soc. chim.* 17, 288-291 (1950).
 4. SMITH S. — *J. Chem. Soc.* 1935, 1050-1051.
 5. NEUMANN W. — *Ber.* 70, 1547-1554 (1937).
 6. TSCHESCHE R. et BOHLE K. — *Ber.* 71, 654-660 (1938).
-