

Note

Chromatographie en couche mince sur gel de silice avec double imprégnation ascendante à sens inversés à l'huile de silicone

N. HOUNGBEDJI et K. WAISSER*

Faculté de Pharmacie, Université Charles, Heyrovského 1203, 501 65 Hradec Králové (Tchécoslovaquie)

(Reçu le 12 décembre 1989; manuscrit modifié reçu le 27 février 1990)

La chromatographie en couche mince de gel de silice est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'étude de la lipophilie des substances biologiquement actives¹. On améliore dans certains cas les séparations chromatographiques en modifiant la nature de l'adsorbant utilisé, par exemple par une imprégnation des chromatoplaques à l'huile de silicone. Il existe en pratique deux méthodes d'imprégnation utilisées pendant plus de vingt ans dans notre département. (a) Par la première méthode, la plus ancienne, la plaque garnie de gel de silice est immergée dans la solution d'huile de silicone (solution de méthylsilicone, le plus souvent à 5% dans de l'éther). Une fois retirée, on laisse sécher à température ordinaire pour faire évaporer l'éther. (b) La deuxième méthode consiste à imprégner les chromatoplaques par une ascension de la solution de silicone dans une cuve fermée. Chaque de ces deux méthodes présente certaines insuffisances: la première méthode conduit à une répartition non-homogène de la couche imprégnante (couche d'huile de silicone) sur la chromatoplaque. La deuxième méthode permet une répartition plus homogène de la couche imprégnante. Cependant la section de cette couche diminue progressivement de la base plongée dans la solution d'imprégnation vers le sommet. Nous avons très tôt abandonné la première méthode pour son insuffisance qui ne permet pas d'avoir des résultats reproductibles. Plusieurs résultats ont été publiés avec la deuxième méthode. Il s'agit là des résultats reproductibles avec l'utilisation d'un étalon. Des substances étudiées par cette méthode, nous pouvons citer les phénols^{2,3}, les dérivés de colchicine⁴, les dérivés des acides iodobenzoïque, iodophénylacétique, iodophénylpropionique, iodophenoxy-acétique et iodhippurique^{5,6}, les dithiooxalamides⁷ et les thiobenzamides⁸.

L'insuffisance de la deuxième méthode, qui consiste en la diminution progressive de la section de la couche imprégnante, peut être éliminée selon nos expériences actuelles par une double imprégnation ascendante à sens inversés. Nous avons utilisé cette nouvelle méthode pendant l'étude de la lipophilie des thiohydrazides^{9,10} et thiobenzanilides¹¹. Le but de ce travail est de prouver l'efficacité et les avantages que nous apporte cette troisième méthode en comparaison avec les deux premières. Une autre possibilité est la chromatographie sur couche mince de gel de silice silanisé, fourni par certaines firmes telles que Whatman et Merck.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Réactifs

Les substances étudiées, thiobenzanilide (I), 4-méthylthiobenzanilide (II), 4-méthoxythiobenzanilide (III), 4,4'-diméthylthiobenzanilide (IV), 4'-chloro-4 méthylthiobenzanilide (V), 4'-chloro-4-méthylthiobenzanilide (VI) et 4-chloro-4'-méthoxythiobenzanilide (VII) ont été décrites et caractérisées dans l'une de nos précédentes publications¹¹. Les solvants, méthanol et éther, sont de pureté p.A. (Lachema, Brno, Tchécoslovaquie). La solution d'imprégnation utilisée est une solution à 5% dans de l'éther de méthylsilicone (Lucoil M 100, Lutchebnik, Kolin, Tchécoslovaquie). La phase mobile chromatographique est composée d'une solution tampon phosphate (5,447 g de KH_2PO_4 et 9,541 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml de l'eau, pH 6.900, ajoutée à du méthanol en proportions variables).

Matériels

Les chromatoplaques, 20 × 20 cm, munies d'une couche de gel de silice (Silufol UV 254, Kavalier, Votice, Tchécoslovaquie) ont été imprégnées dans une cuve en verre avec couvercle rodé. Pour une comparaison appropriée nous avons aussi utilisé les chromatoplaques silanisées KC 18F reversed-phase (Whatman, Clifton, U.S.A.). Celles-ci n'ont pas été imprégnées.

Chromatographie

Les plaques Silufol ont été imprégnées de trois manières différentes A, B et C.

(A) La plaque garnie de gel de silice est immergée dans la solution de méthylsilicone; une fois retirée, on laisse sécher 24 h durant à la température du laboratoire, 23°C.

(B) La deuxième méthode consiste en la migration ascendante de la solution d'imprégnation pendant une durée de 15 h dans la cuve en verre soigneusement fermée. La plaque retirée est séchée à la température du milieu pendant 24 h.

(C) Double imprégnation à sens inversés: Après une migration ascendante de la solution d'imprégnation pendant une durée de 15 h et après avoir séché la plaque pendant 7 h, nous avons répété l'imprégnation suivant le principe B, mais avec une migration opposée à la première. La plaque a été ensuite séchée pendant 24 h à la température du laboratoire. Nous avons imprégné 60 chromatoplaques, 20 pour chaque type d'imprégnation.

Le développement et la détection chromatographique ont été plus simples. Nous avons chromatographié par la technique ascendante sur une distance de 15 cm à partir de la ligne de départ. Celle-ci est située à 20 cm du bord inférieur de la plaque. Toutes les substances étudiées (solution à 5% dans du chloroforme) ont été déposées sur la ligne de départ à environ 2 cm d'intervalle les unes des autres. Sur chaque chromatoplaque nous avons toutefois déposé toutes les sept substances. Les plaques ont été déposées simultanément dans la phase mobile (solution tampon phosphate plus méthanol en proportions variables selon la méthode de Biagi *et al.*¹²). Les concentrations de méthanol dans la phase mobile ont été respectivement de 30, 40, 50, 60 et 70%. Les chromatoplaques Whatman ont été utilisables pour les concentrations de 50, 60, 70 et 80% de méthanol dans la phase mobile. L'opération a été répétée quatre fois pour chaque concentration avec variation de la place des substances sur les plaques.

Des valeurs de R_F obtenues après détection sous lampe UV nous avons calculé les valeurs de R_M correspondants par l'équation 1 à l'aide de la calculatrice programmable Texas Instruments TI-59. Pour les équations de regression permettant l'extrapolation à la concentration zéro du méthanol, ainsi que pour toute autre équation pour la comparaison des trois types d'imprégnation nous avons utilisé le mini-ordinateur Sharp PC 1211. L'extrapolation a été faite selon l'équation 2.

$$R_M = \log(1/R_F - 1) \quad (1)$$

$$R_M = a(\% \text{ méthanol}) + b \quad (2)$$

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'expérience a montré certains avantages de la double imprégnation à sens inversés, c'est-à-dire la méthode C, par rapport aux méthodes A et B. Le front de la phase mobile a migré sur toutes les plaques imprégnées par la méthode C parallèlement à la ligne horizontale de départ. Pour une comparaison objective nous nous sommes servis des variations aléatoires (S)¹³ des valeurs de R_M (Tableaux II, III et IV). Pour la plupart les valeurs de S des valeurs de R_M par la méthode C sont inférieures à celles des valeurs de R_M obtenues par les méthodes A et B. L'imprégnation C permet aussi une grande reproductibilité des valeurs de R_M . Il existe cependant une corrélation notable entre les valeurs de R_M des trois types d'imprégnation:

$$R_M^B = 0,582 \quad R_M^A + 0,895 \quad (3)$$

$$r = 0,916 \quad s = 0,126 \quad F = 26,125 \quad n = 7$$

$$R_M^C = 1,044 \quad R_M^A + 0,212 \quad (4)$$

$$r = 0,917 \quad s = 0,225 \quad F = 26,427 \quad n = 7$$

TABLEAU I

ÉTUDE DE LA LIPOPHILIE AVEC LES CHROMATOPLAQUES WHATMAN KC 18F

Valeurs de R_M selon les différentes proportions de méthanol dans la phase mobile.

Substances	R_M				
	Proportions de méthanol dans la phase mobile (%)				
	50	60	70	80	0 ^a
I	0,180	-0,180	-0,504	-0,890	1,949
II	1,090	0,542	0,301	-0,034	2,825
III	0,265	-0,211	-0,530	-0,794	1,955
IV	1,123	0,689	0,358	0,000	2,948
V	0,962	0,065	-0,311	-0,678	3,452
VI	1,038	0,578	0,204	-0,158	2,992
VII	1,123	0,720	0,347	-0,017	3,009

^a Valeurs extrapolées selon l'équation 2.

TABLEAU II

ÉTUDE DE LA LIPOPHILIE AVEC LES CHROMATOPLAQUES IMPRÉGNÉES PAR LA MÉTHODE A

Valeurs de R_M extrapolées à la concentration zéro du méthanol dans la phase mobile; $n = 4$.

Substances	$R_M \pm S$					
	Proportions de méthanol dans la phase mobile (%)					
	30	40	50	60	70	θ^a
I	0,892 \pm 0,053	0,538 \pm 0,011	0,215 \pm 0,048	0,065 \pm 0,195	-0,408 \pm 0,058	1,797
II	1,106 \pm 0,008	0,712 \pm 0,042	0,383 \pm 0,014	0,119 \pm 0,149	-0,275 \pm 0,288	2,087
III	0,926 \pm 0,008	0,544 \pm 0,029	0,300 \pm 0,175	0,138 \pm 0,269	-0,274 \pm 0,178	1,730
IV	1,263 \pm 0,019	0,959 \pm 0,045	0,506 \pm 0,019	0,365 \pm 0,296	-0,163 \pm 0,022	2,309
V	1,372 \pm 0,102	1,140 \pm 0,565	0,378 \pm 0,146	0,378 \pm 0,146	-0,173 \pm 0,054	2,582
VI	1,700 \pm 0,055	0,683 \pm 0,252	0,547 \pm 0,085	0,351 \pm 0,195	-0,190 \pm 0,144	2,674
VII	1,534 \pm 0,125	1,120 \pm 0,048	0,710 \pm 0,027	0,457 \pm 0,450	-0,112 \pm 0,053	2,719

^a Valeurs extrapolées selon l'équation 2.

$$R_M^C = 1,704 \quad R_M^B = 1,193 \quad (5)$$

$$r = 0,951 \quad s = 0,174 \quad F = 47,376 \quad n = 7$$

Les coefficients de corrélation r et les coefficients s (variances des résidus) sont obtenus par un test de Fisher¹³.

Les indices A, B, C utilisés dans ces équations désignent les différentes sortes d'imprégnation. Les R_M^A sont les valeurs de R_M obtenues des chromatoplaques Whatman KC 18F.

En comparaison avec les valeurs de R_M obtenues avec les chromatoplaques Whatman KC 18F, la méthode A présente une corrélation $r = 0.885$, la méthode B $r = 0.947$ et la méthode C $r = 0.990$:

TABLEAU III

ÉTUDE DE LA LIPOPHILIE AVEC LES CHROMATOPLAQUES IMPRÉGNÉES PAR LA MÉTHODE B

Valeurs de R_M extrapolées à la concentration zéro du méthanol dans la phase mobile; $n = 4$.

Substances	$R_M \pm S$					
	Proportions de méthanol dans la phase mobile					
	30	40	50	60	70	θ^a
I	0,945 \pm 0,018	0,682 \pm 0,108	0,231 \pm 0,023	0,077 \pm 0,027	-0,309 \pm 0,068	1,882
II	1,107 \pm 0,125	0,793 \pm 0,128	0,396 \pm 0,143	0,111 \pm 0,014	-0,279 \pm 0,077	2,152
III	0,940 \pm 0,065	0,634 \pm 0,110	0,253 \pm 0,043	0,078 \pm 0,040	-0,293 \pm 0,078	1,833
IV	1,144 \pm 0,137	0,859 \pm 0,063	0,498 \pm 0,028	0,239 \pm 0,010	-0,226 \pm 0,017	2,183
V	1,463 \pm 0,062	1,074 \pm 0,360	0,779 \pm 0,045	0,449 \pm 0,045	-0,161 \pm 0,094	2,657
VI	1,314 \pm 0,333	0,990 \pm 0,075	0,734 \pm 0,012	0,455 \pm 0,047	-0,280 \pm 0,094	2,507
VII	1,315 \pm 0,190	0,999 \pm 0,021	0,717 \pm 0,017	0,402 \pm 0,044	-0,323 \pm 0,017	2,559

^a Valeurs extrapolées selon l'équation 2.

TABLEAU IV

ÉTUDE DE LA LIPOPHILIE AVEC LES CHROMATOPLAQUES IMPRÉGNÉES PAR LA MÉTHODE C

Valeurs de R_M extrapolées à la concentration zéro du méthanol dans la phase mobile; $n = 4$.

Substances	$R_M \pm S$					
	Proportions de méthanol dans la phase mobile (%)					
	30	40	50	60	70	0 ^a
I	0,945 \pm 0,012	0,732 \pm 0,047	0,253 \pm 0,022	0,087 \pm 0,055	-0,286 \pm 0,060	1,900
II	1,619 \pm 0,020	1,298 \pm 0,071	1,022 \pm 0,057	0,597 \pm 0,014	0,285 \pm 0,054	2,649
III	0,985 \pm 0,014	0,740 \pm 0,053	0,348 \pm 0,038	0,122 \pm 0,015	-0,218 \pm 0,050	1,904
IV	1,809 \pm 0,029	1,464 \pm 0,038	1,165 \pm 0,023	0,784 \pm 0,007	0,394 \pm 0,064	2,878
V	1,728 \pm 0,034	1,483 \pm 0,094	0,968 \pm 0,034	0,631 \pm 0,034	-0,057 \pm 0,019	3,162
VI	1,550 \pm 0,025	1,304 \pm 0,071	0,789 \pm 0,002	0,378 \pm 0,027	-0,082 \pm 0,053	2,883
VII	1,640 \pm 0,022	1,393 \pm 0,089	0,868 \pm 0,007	0,593 \pm 0,007	-0,064 \pm 0,025	2,990

^a Valeurs extrapolées selon l'équation 2.

$$R_M^A = 0,700 \quad R_M^W + 0,397 \quad (6)$$

$$r = 0,885 \quad s = 0,235 \quad F = 17,254 \quad n = 7$$

$$R_M^B = 0,479 \quad R_M^W + 0,931 \quad (7)$$

$$r = 0,947 \quad s = 0,101 \quad F = 43,885 \quad n = 7$$

$$R_M^C = 0,896 \quad R_M^W + 0,176 \quad (8)$$

$$r = 0,990 \quad s = 0,081 \quad F = 235,566 \quad n = 7$$

Somme toute, les avantages de la double imprégnation ascendante à sens inversés (méthode C) nous ont conduit à préférer cette méthode malgré la proportionnalité des équations 4, 5 et 6. Dans notre département de chimie minérale et organique nous avons adopté cette méthode d'imprégnation applicable pendant l'étude chromatographique de la lipophilie des substances. L'étude réalisée sur les plaques Whatman a prouvé une excellente corrélation avec l'étude des mêmes substances sur les plaques de la méthode C. Nous pouvons alors conclure que le gel de silice silanisé peut être valablement utilisé pour l'étude de la lipophile des substances. Une explication profonde des effets physico-chimiques de la double imprégnation C, permettant une répartition homogène de la couche imprégnante, est l'objet de notre prochaine publication.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. Tomlinson, *J. Chromatogr.*, 113 (1975) 1.
- 2 K. Waisser, E. Spálenská, V. Šimánek et F. Šantavý, *Cesk. Farm.*, 28 (1979) 321.
- 3 K. Waisser et E. Spálenská, dans J. Knoll et F. Darvas (Rédacteurs), *Chemical Structure — Biological Activity Relationships*, Akademiai Kiado, Budapest, 1980, p. 241.
- 4 S. Dvořáková, D. Guénard, F. Picot, V. Šimánek et K. Waisser, *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Med.*, 111 (1985) 13.

- 5 M. Lazníček, K. Waisser, J. Květina et P. Beňo, dans M. Tichý (Rédacteur), *QSAR in Toxicology and Xenobiochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1985, p. 249.
- 6 M. Lazníček, P. Beňo, K. Waisser et J. Květina, *Cesk. Farm.*, 34 (1985) 353.
- 7 K. Waisser, Ž. Odlerová, W. Thiel et R. Mayer, *Pharmazie*, 43 (1988) 794.
- 8 J. Lebvoua, *Thèse*, Farmaceutická Fakulta, Universita Karlova Hradec Králové, 1986.
- 9 K. Waisser, Ž. Odlerová, N. Houngbédji, W. Thiel et R. Mayer, *Zentralbl. Mikrobiol.*, 144 (1989) 355.
- 10 K. Waisser, N. Houngbédji, Ž. Odlerová, W. Thiel, R. Mayer, *Pharmazie*, 45 (1990) 141.
- 11 K. Waisser, N. Houngbédji, M. Macháček, M. Sekera, J. Urban et Ž. Odlerová, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 55 (1990) 307.
- 12 G. L. Biagi, A. M. Barbaro, M. F. Gamba et M. C. Guerra, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 371.
- 13 L. K. Kleinbaumdaud, *Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods*, Duxbury Press, North Scituate, MA, 1978, p. 227.