

CHROM. 9289

Note

Application de la chromatographie liquide sous haute pression et de la spectrographie de masse à l'identification de xanthones

KURT HOSTETTMANN et ANDRÉ JACOT-GUILLARMOD

Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel, CH-2000 Neuchâtel (Suisse)

(Reçu le 16 avril 1976)

Parmi les substances naturelles, les xanthones jouent un rôle de plus en plus important en raison de la découverte de diverses activités pharmacologiques: action antipsychotique, inhibition de la monoamine oxydase, activité antituberculaire¹. De par leur structure, elles se rapprochent des flavones et possèdent un comportement chromatographique similaire. Nous avons séparé avec succès un certain nombre d'aglycones xanthoniques par chromatographie liquide sous haute pression en utilisant des colonnes remplies de phases greffées sur support entièrement poreux². Ces séparations ont été effectuées avec des échantillons purs.

Le présent travail a trait à l'application de cette technique à des extraits végétaux bruts et à l'identification des xanthones séparées à l'échelle du microgramme. Nous décrivons à cet effet une méthode de microtransfert indirect chromatographie liquide sous haute pression-spectrographie de masse. La méthode décrite a aussi été appliquée à la purification de glycosides xanthoniques perméthylés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Préparation des échantillons

500 mg de racines de gentiane séchées sont extraits à chaud avec 50 ml d'éther diéthylique. L'extrait évaporé à sec et repris dans 1 ml de chloroforme est injecté directement dans le chromatographe à raison de 10 μ l. Pour l'analyse des feuilles, il est indispensable de faire une purification préliminaire de l'extrait par filtration sur gel de Sephadex LH-20 (élimination des carotènes, chlorophylles, cires) avant l'injection.

Séparations

Les séparations ont été effectuées sur un instrument Varian 8500 équipé d'un programmateur de flux. La colonne employée (25 cm \times 2.2 mm D.I.) est en acier inoxydable remplie d'une phase greffée sur support entièrement poreux (Micropak CN de Varian = alkyl nitrile sur silicone en couche épaisse) par la méthode du "slurry packing". La détection a été réalisée par absorption UV à 254 nm avec un détecteur Variscan UV-Vis à longueur d'onde variable. Les échantillons (5-10 μ l) ont été injectés à l'aide du système d'interruption de flux de Varian. La phase mobile *n*-hexane-chloroforme (1:1) a été utilisée pour les aglycones, la phase mobile isoocane-

chloroforme (3:7) pour les dérivés méthylés des glycosides; le débit est de 60 ml/h; la pression 70 atm.

Identification

Pour chaque substance, le spectre UV a été enregistré pendant la séparation grâce au système d'interruption de flux (enregistrement entre 400–250 nm). Les substances possédant le spectre caractéristique des xanthones ont été collectées à la sortie du détecteur dans un tube en verre de forme cônica d'un volume de 2 ml. L'éluat est évaporé sous pression réduite. Le produit isolé restant au fond du récipient pointu (1–10 μ g) est additionné d'une goutte de solvant, puis transféré à l'aide d'une seringue sur le tube d'introduction directe du spectrographe de masse. Après évaporation du

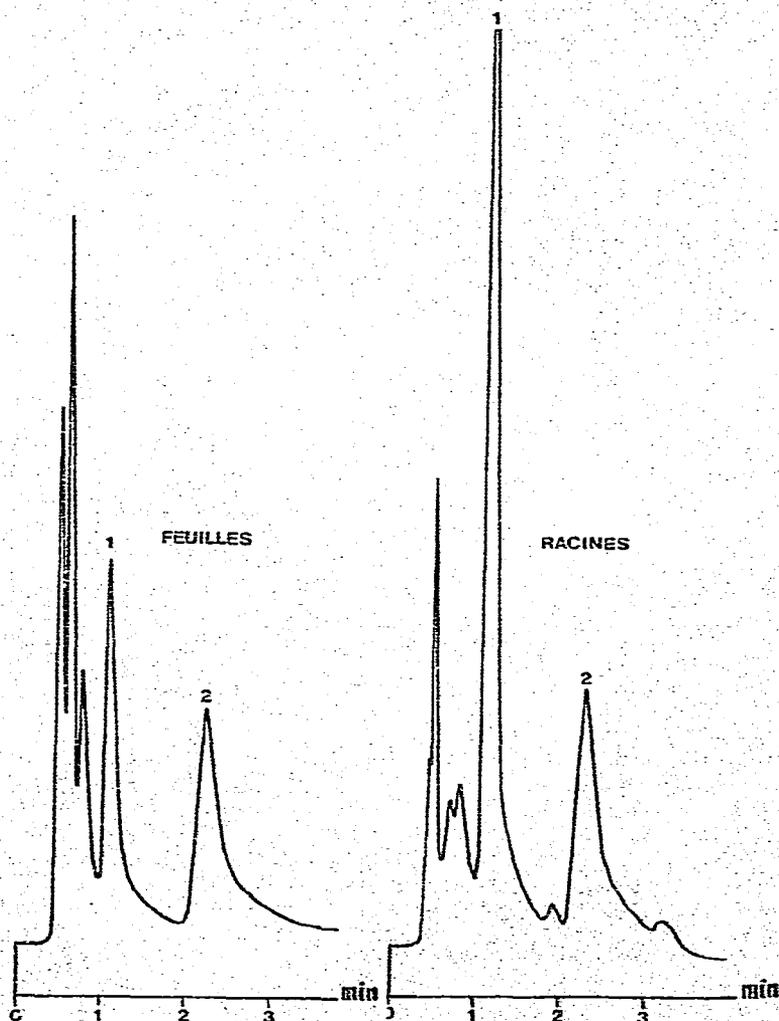
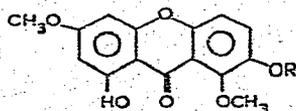


Fig. 1. Extraits éthers de racines et de feuilles de *Gentiana nivalis* L. Colonne, Micropak CN, 25 cm \times 2.2 mm D.I.; solvant, *n*-hexane-chloroforme (1:1); 60 ml/h; pression, 70 atm; échantillon, 5 μ l en solution dans chloroforme; détection, UV 254 nm.

solvant, le spectre de masse est enregistré à 75 eV sur un appareil Hitachi/Perkin-Elmer RMU 6L (température 150–200°).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La méthode décrite ci-dessus a été appliquée à l'identification de xanthones dans les gentianes rares et de petite dimension : les espèces de la section *Cyclostigma*. La Fig. 1 montre le chromatogramme d'extraits étherés de racines et de feuilles de *Gentiana nivalis* L. Les pics 1 et 2 donnent le spectre UV caractéristique des xanthones. Les spectres de masse enregistrés après le microtransfert permettent d'attribuer au pic 1 la structure de la décussatine (I) et au pic 2 celle de la gentiacauléine (II).



I R = CH₃, décussatine II R = H, gentiacauléine

À titre d'exemple, la Fig. 2 montre le spectre de masse de la décussatine isolée à l'échelle du microgramme à partir d'un extrait étheré de *Gentiana nivalis* L. Ce spectre est identique à celui d'un échantillon authentique et cristallin de décussatine et ne présente pratiquement pas de bruits de fond.

La Fig. 3 représente le chromatogramme d'un extrait étheré d'une autre espèce de la section *Cyclostigma*: *Gentiana brachyphylla* Vill. On retrouve à nouveau la

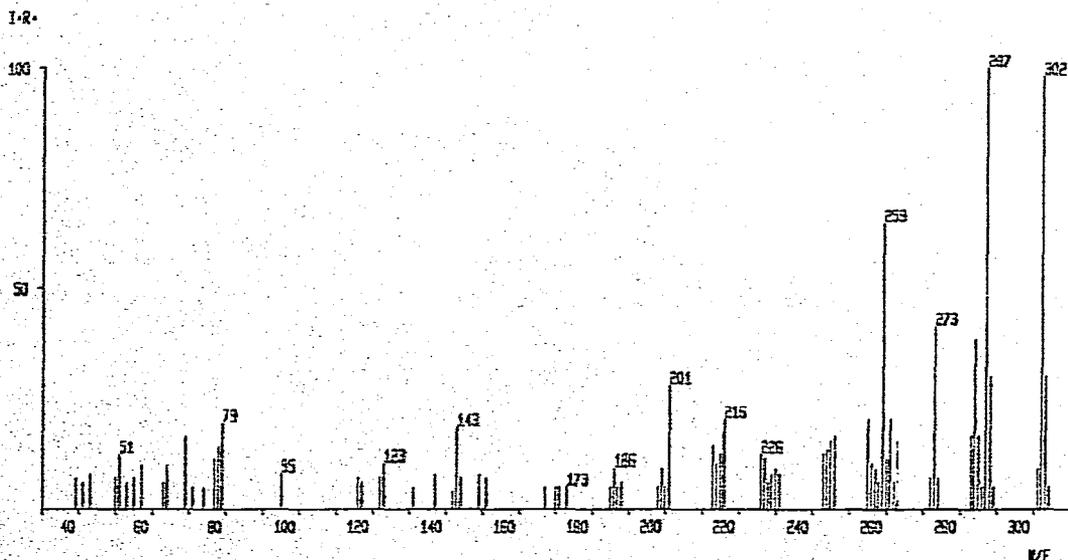


Fig. 2. Spectre de masse de la décussatine (I) isolée à partir d'un extrait étheré de racines de *Gentiana nivalis* L. (voir Fig. 1).

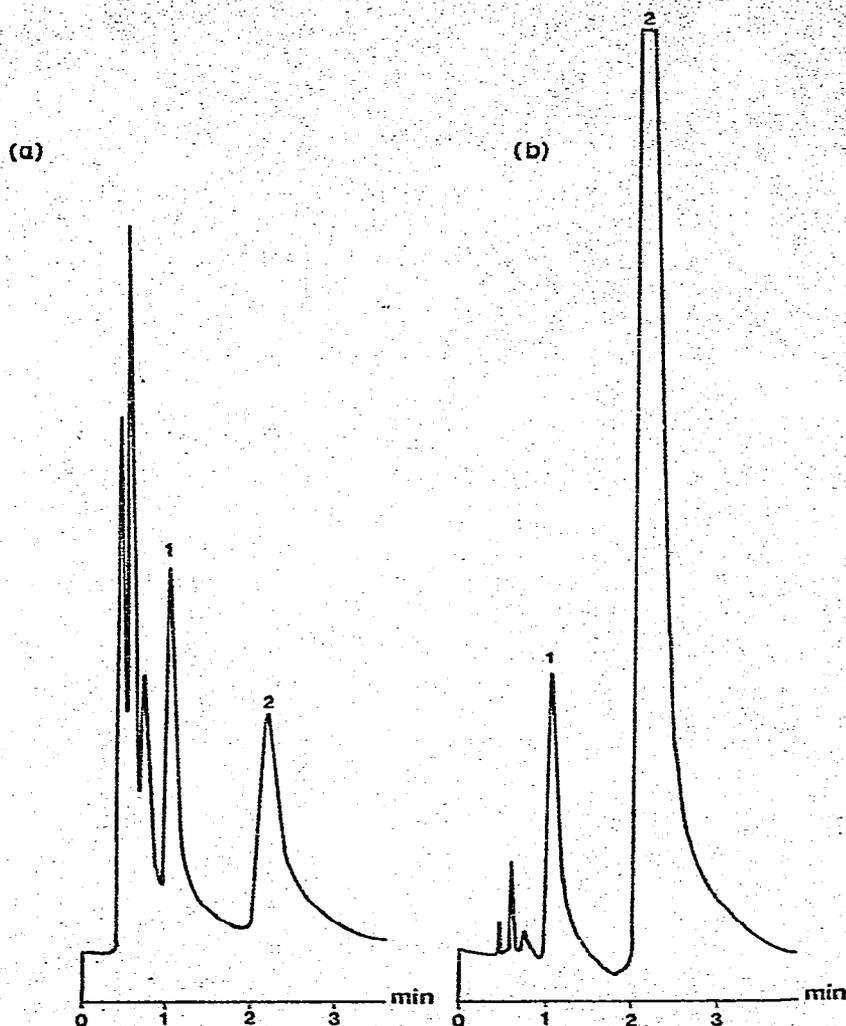
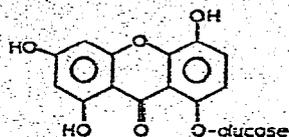


Fig. 3. Extraits éthers de feuilles de (a) *Gentiana nivalis* L. et de (b) *Gentiana brachyphylla* Vill. Conditions, voir Fig. 1.

décussatine et la gentiacauléine. La concentration de cette dernière xanthone est nettement plus élevée ici. L'étude des spectres de masse des glycosides se fait avantageusement sur les dérivés perméthylés. La méthode de Brimacombe *et al.*³ (action de NaH sur CH_3I en milieu DMF sous atmosphère inerte) ne conduit cependant jamais à un dérivé pur. On obtient des produits de condensation divers et souvent des dérivés partiellement perméthylés. Pour la purification, la plupart des auteurs ont employé jusqu'ici la chromatographie sur couche mince en bande. Après élution des différentes zones, les spectres de masse ont pu être enregistrés. Cette méthode est laborieuse, fort longue et demande passablement de substance (au minimum quelques centaines de μg).

La chromatographie liquide sous haute pression se prête fort bien à la purifi-

cation des dérivés perméthylés. À titre d'exemple, nous citerons le cas de la trihydroxy-1,3,5-O-glucosyl-8-xanthone⁴



Le mélange réactionnel additionné d'eau est extrait au chloroforme. L'extrait chloroformé concentré, injecté directement, conduit au chromatogramme représenté à la Fig. 4. Le pic 4 donnant le spectre UV caractéristique des xanthones est collecté et le spectre de masse enregistré (voir Fig. 5). On peut distinguer nettement le pic moléculaire à m/e 520. Le pic de base correspondant à l'aglycone apparaît à m/e 302.

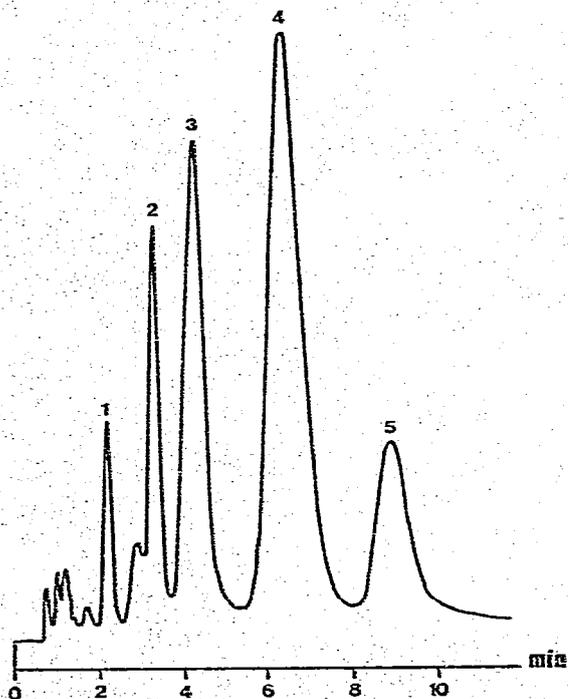


Fig. 4. Trihydroxy-1,3,5-O-glucosyl-8-xanthone perméthylée. Injection directe du mélange réactionnel (10 μ l). Le pic 4 donne le spectre UV caractéristique des xanthones. Conditions comme sous Fig. 1 à l'exception du solvant: iso-octane-chloroforme (3:7).

La chromatographie liquide sous haute pression combinée avec la spectrographie de masse trouve de nombreux champs d'application car elle permet l'identification très rapide de composés à l'échelle du microgramme. Cette technique est indiquée à l'analyse d'extraits végétaux bruts et présente un intérêt particulier pour l'étude phytochimique (voir chimiotaxonomie) d'espèces rares et de petite dimension.

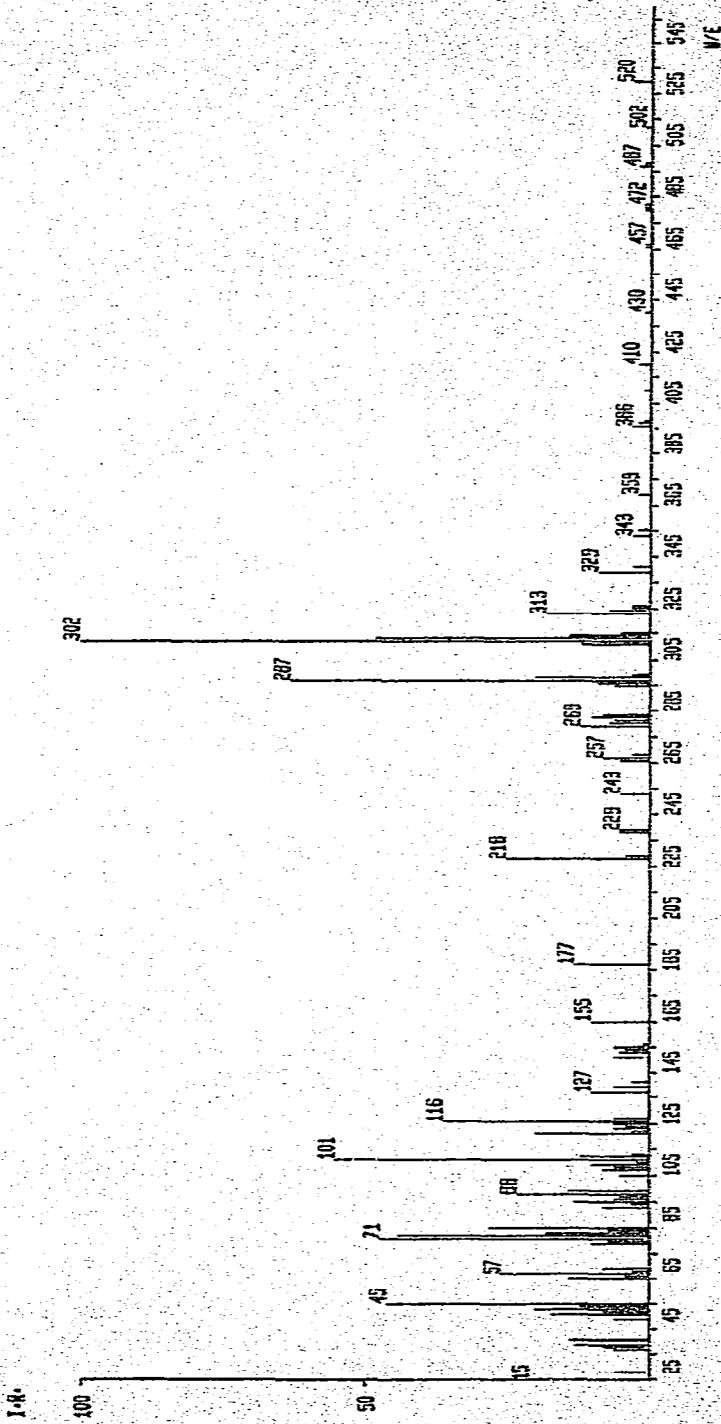


Fig. 5. Spectre de masse de la triméthylsilyl-1,3,5-O-glucosyl-8-xanthone perméthylé correspondant au pic 4 de la Fig. 4.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la maison Varian SA, Zug, de la mise à disposition d'un chromatographe Modèle 8500, ainsi que Monsieur le Prof. H. McNair, Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg (U.S.A.) de ses précieux conseils. Ils expriment leur reconnaissance au Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique pour son support financier (crédit No. 2.1600.74), ainsi qu'au Professeur R. Tabacchi de l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. Ghosal et R. K. Chaudhuri, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 888.
- 2 K. Hostettmann et H. M. McNair, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 201.
- 3 J. S. Brimacombe, B. D. Jons, M. Stacey et J. J. Williams, *Carbohydr. Res.*, 2 (1966) 167.
- 4 M. Kaldas, K. Hostettmann et A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, 57 (1974) 2557.