

CHROM. 16,606

## SÉPARATION DE C-GLYCOSYLFLAVONES ISOMÈRES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE EN PHASE INVERSE

CLAUDE LARDY, MARIE-LOUISE BOUILLANT et JEAN CHOPIN\*

*Laboratoire de Chimie biologique, Université Claude Bernard, Lyon I, 69622 Villeurbanne Cedex (France)*

(Reçu le 23 janvier 1984)

---

### SUMMARY

#### *Separation of isomeric C-glycosylflavones by reversed-phase high-performance liquid chromatography*

Isomeric C-glycosylflavones, which differ only from one another by the sugar (or by one of the sugars) by epimerisation (glucose-galactose, xylose-arabinose), by anomerisation, or by pyranose-furanose isomerisation, and some mixtures met in nature are well separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography [LiChrosorb RP-18 and isocratic eluting systems (methanol-water-acetic acid or acetonitrile-water)].

---

### INTRODUCTION

L'étude des C-glycosylflavonoïdes s'est considérablement intensifiée ces dernières années<sup>1</sup>. Les plus répandues dans la nature sont les dihydroxy-5,7 C-glycosylflavones dans lesquelles un sucre se trouve fixé sur le squelette flavonique en position 6 ou (et) 8. L'étude structurale de ces composés est rendue difficile par la résistance à l'hydrolyse acide de la liaison carbone-carbone contractée entre le sucre et la flavone, ne permettant pas l'identification directe du ou des résidus glycosyles. Lorsque la quantité de substance disponible ne permet pas le recours à la RMN <sup>13</sup>C, la comparaison chromatographique avec des substances connues est utilisée. Cependant les techniques chromatographiques usuelles (chromatographie bidimensionnelle sur papier, chromatographie sur couche mince (CCM) ou sur colonne de cellulose) ne permettent pas une bonne différenciation des C-glycosylflavones isomères et surtout épimères: C-glucosyl-C-galactosyl, C-xylosyl-C-arabinosylflavones. Leur séparation par CCM nécessitait le passage par les dérivés perméthylés (PM), alors nettement différenciés<sup>2</sup>. Nous montrons maintenant que cette différenciation est possible sur les produits à l'état libre par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). D'autres auteurs ont appliqué cette technique à l'étude de flavonoïdes pour séparer des mélanges naturels<sup>3-9</sup>, mais aucun ne possédait suffisamment de substances témoins pour généraliser la méthode.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Appareillage*

Sur un ensemble CLHP Touzart et Matignon, est ajoutée une colonne (300 × 3.9 mm) de LiChrosorb RP-18, 10 μm (Merck), remplie par nous-mêmes<sup>10</sup> à l'aide du poste de remplissage Touzart et Matignon. La détection à 270 nm est assurée par un spectrophotomètre UV Gilson, Spectrochrom M, à cellule CLHP de 8 μl.

*Élution*

Deux systèmes de solvants ont été utilisés à température ambiante en régime isocratique: (A) méthanol-eau-acide acétique en proportions variables et (B) acétonitrile-eau (13:87). Les mélanges sont dégazés en permanence par agitation magnétique. La vitesse d'élution (1.4 à 2.0 ml/min) ainsi que la composition du mélange solvant ont été ajustées de manière à obtenir la meilleure résolution.

*Échantillons*

Des solutions méthanoliques de 0.0025-0.025% de chaque C-glycosylflavone sont injectées sur la colonne par l'intermédiaire de la boucle de 20 μl de la vanne d'injection. L'origine des échantillons est donnée dans le Tableau II.

*Expression des résultats*

Les pics sont caractérisés par trois paramètres: le temps de rétention,  $t_r$ , le facteur de capacité<sup>11</sup>,  $k'$ , et la rétention relative<sup>11</sup>,  $\alpha$ , avec  $k' = (t_r - t_0)/t_0$  et  $\alpha = k'_2/k'_1$  ( $t_0$  = temps de rétention d'une substance non retenue, solvant;  $k'_2$  = facteur de capacité du composé 2 et  $k'_1$  = facteur de capacité du composé 1).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans un premier temps, le comportement relatif des composés glycosylés appartenant à la même flavone, synthétique, la O-méthyl-4' tricine, a été observé. Les conditions chromatographiques fixes choisies, méthanol-eau-acide acétique (45:53:2) et un débit de 2 ml/min, ont permis d'obtenir de bonnes différenciations des dérivés de la O-méthyl-4' tricine. Chaque échantillon est injecté avec un témoin, la vitexine (C-glucosyl-8 apigénine).

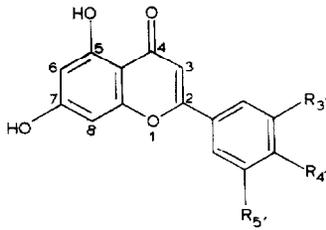
Les composés et leurs temps de rétention sont donnés dans le Tableau I.

Le comportement des glycosyl O-méthyl-4' tricines est identique à celui observé en CCM sur cellulose dans l'eau ou l'acide acétique dilué: les composés di-C-glycosylés possèdent des  $t_r$  plus faibles que leurs homologues C-glycosyl-6, eux-mêmes précédant leurs homologues O-glycosyl-7. Pour les C-glycosyl-6 O-méthyl-4' tricines l'ordre de rétention croissant correspond à l'ordre d'hydrophilie décroissant des restes glycosyles: C-glucosyl-6, C-galactosyl-6, C-xylosyl-6, C-arabinosyl-6 et C-rhamnosyl-6; de même pour les composés O-glycosylés en position 7. Pour les dérivés di-C-glycosylés une inversion de l'ordre d'élution des di-C-pentosyl-6,8 par rapport aux mono-C-pentosyl-6 flavones correspondantes est observée, phénomène déjà vu lors de comparaisons chromatographiques sur papier dans l'acide acétique dilué<sup>21</sup> pour des composés di-C-pentosylés symétriques.

La CLHP sur C<sub>18</sub> possède donc les mêmes propriétés que la chromatographie

TABLEAU I

## TEMPS DE RÉTENTION EN MINUTES DES GLYCOSYL O-MÉTHYL-4' TRICINES



	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>5'</sub>
Apigénine	H	OH	H
Tricine	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
O-benzyl-4' tricine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	OCH <sub>3</sub>
O-méthyl-4' tricine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Glc =  $\beta$ -D-glucopyranosyl; gal =  $\beta$ -D-galactopyranosyl; xyl =  $\beta$ -D-xylopyranosyl; ara =  $\alpha$ -L-arabino-pyranosyl; rham =  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl.

Composés	Temps de rétention (min)				
	Groupements glycosyles				
	Glc	Gal	Xyl	Ara	Rham
<i>Témoin</i>					
C-glucosyl-8 apigénine	2.2				
<i>Glycosyl O-méthyl-4' tricines</i>					
di-C-glycosyl-6,8 O-méthyl-4' tricines	2.7	—	5.1	4.1	9.8
C-glycosyl-6 O-méthyl-4' tricines	5.0	5.8	7.0	10.8	≈ 57.0*
O-glycosyl-7 O-méthyl-4' tricines	7.4	—	9.0	10.8	≈ 31.0*
O-glycosyl-5 O-méthyl-4' tricine	—	—	12.8	—	—
<i>Aglycones</i>					
Tricine	19.4*				
O-benzyl-4' tricine	29.0*				
O-méthyl-4' tricine	≈ 38.0*				

\* Ce solvant n'est pas adéquat pour ce type de molécules, qui n'ont été testées dans ces conditions que pour donner leur position par rapport aux composés C-glycosylés.

sur cellulose ou sur papier, mais le phénomène important nouveau est la différenciation nette observée entre les C-glycosyl O-méthyl-4' tricines épimères, différenciation que l'on n'obtient pas sur cellulose et très difficilement sur gel de silice (silice activée-APEM P20\*). Cette observation est à l'origine de l'étude qui suit.

Le Tableau II donne les conditions chromatographiques, les temps de rétention ( $t_r$ ), les facteurs de capacité ( $k'$ ) et les rétentions relatives ( $\alpha$ ), ainsi que les structures des composés testés pour cette étude.

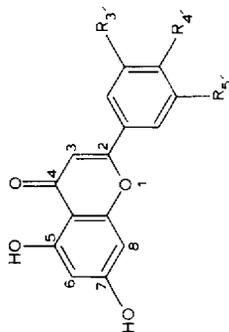
L'utilisation de la silice greffée en C<sub>18</sub> et des systèmes de solvants polaires a permis de distinguer toutes les mono- ou di-C-glycosylflavones, même celles possédant des groupements glycosyles épimères (C-glucosyl et C-galactosyl, C-xylosyl et C-arabinosyl).

*Mono-C-glycosyl dihydroxy-5,7 flavones*

L'isovitexine et la vitexine, très largement répandues dans le monde végétal,

\* APEM P20 = acétate d'éthyle-pyridine eau-méthanol (80:20:10:5).

TABLEAU II  
CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES ET VALEURS CARACTÉRISTIQUES DES PICS,  $t_r$ ,  $k'$  et  $\alpha$



$R_{3'}$	$R_{4'}$	$R_{5'}$
H	OH	H
H	OCH <sub>3</sub>	H
OH	OH	H
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Apigénine  
Acacétine  
Lutéoline  
O-méthyl-4' tricine

Glc =  $\beta$ -D-glucopyranosyl; gal =  $\beta$ -D-galactopyranosyl; xyl =  $\beta$ -D-xylopyranosyl; ara =  $\alpha$ -L-arabinopyranosyl; araf =  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl;  $\beta$ -ara =  $\beta$ -L-arabinopyranosyl; Me = méthyl; N = naturel; S = synthétique; solvant A = méthanol eau acétique; solvant B = acétonitrile eau. Les valeurs entre parenthèses ont été calculées entre le 1er et le 3ème pic.

Origines	Bibliographie	Composés	Noms usuels	Solvant	Débit (ml/min)	$t_r$ (min)	$k'$	$\alpha$
<i>Mono-C-glycosyl-6-dihydroxy-5,7-flavones</i>								
N*		C-glc-6 apigénine	isovitexine	A (40:58:2)	1.4	6.3	2.15	1.21
S	12	C-gal-6 apigénine				7.2	2.6	
N	13 15	C-glc-6 acacétine	isocytisidine	A (45:53:2)	2.0	8.3	4.9	1.34
S	16	C-gal-6 acacétine				10.7	6.6	
S	17	C-glc-6 O-Me-4' tricine		A (40:58:2)	2.0	10.8	7.3	1.16
S	17	C-gal-6 O-Me-4' tricine				12.3	8.5	
N	18, 19	C-xyl-6 apigénine	cerarvensine	A (45:53:2)	2.0	4.3	2.1	1.79
N	12, 20	C-ara-6 apigénine	isomollupentine			6.6	3.7	
S	21	C-araf-6 acacétine				8.5	5.3	
S	16	C-xyl-6 acacétine		A (50:50:0)	2.0	11.0	7.15	(2.23)
S	21	C-ara-6 acacétine				17.3	12.8	
S	17	C-xyl-6 O-Me-4' tricine		A	1.8	3.3	2.3	1.75
S	17	C-ara-6 O-Me-4' tricine		(60:40:0)		5.0	4.0	

<i>Mono-C-glycosyl-8 dihydroxy-5,7 flavones</i>										
N*										
N	22, 23	C-glc-8 apigénine	vitexine	A	(40:58:2)	1.5	4.6	1.5	1.41	
S	21	C-gal-8 apigénine		A	(60:40:0)	2.0	5.7	2.1	2.08	
S	16	C-ara-8 acacétine		A	(60:40:0)	2.0	2.25	1.25	2.08	
S	16	C-xyl-8 acacétine		A	(60:40:0)	2.0	3.6	2.6		
<i>Di-C-glycosyl-6,8 dihydroxy-5,7 flavones</i>										
N	21, 24, 25	di-C-ara-6,8 apigénine		A	(40:58:2)	2.0	4.2	2.0	1.65	
S	16	di-C-xyl-6,8 apigénine		A	(40:58:2)	2.0	6.0	3.3		
S	21	di-C-ara-6,8 acacétine		A	(50:50:0)	1.8	5.6	3.6	1.34	
S	16	di-C-xyl-6,8 acacétine		A	(50:50:0)	1.8	7.0	4.8		
S	17	di-C-ara-6,8 O-Me-4' tricine		A	(50:50:0)	1.8	4.9	3.9	1.41	
S	17	di-C-xyl-6,8 O-Me-4' tricine		A	(50:50:0)	1.8	6.5	5.5		
S	26	C-gal-6 C-glc-8 apigénine		A	(30:70:0)	2.0	4.6	2.3	1.61	
N*		di-C-glc-6,8 apigénine	vicénine-2	A	(30:70:0)	2.0	6.5	3.7		
N	23	C-gal-6 C-ara-8 apigénine	isocorymboside	A	(35:63:2)	2.0	3.6	1.8	1.33	(2.5)
N*		C-glc-6 C-ara-8 apigénine	schaftoside	A	(35:63:2)	2.0	4.4	2.4	1.87	
N*		C-glc-6 C-xyl-8 apigénine	vicénine-3	A	(35:63:2)	2.0	7.1	4.5		
N	23	C-gal-6 C-ara-8 apigénine	isocorymboside	A	(35:63:2)	2.0	3.6	1.8	1.33	(2.3)
N*		C-glc-6 C-ara-8 apigénine	schaftoside	A	(35:63:2)	2.0	4.4	2.4	1.73	
N	25, 27 29	C-glc-6 C-β-ara-8 apigénine	néoschaftoside	A	(35:63:2)	2.0	6.7	4.15		
N	25, 27 29	C-glc-6 C-β-ara-8 apigénine	néoschaftoside	A	(30:68.5:1.5)	2.0	13.1	7.7	1.07	
N*		C-glc-6 C-xyl-8 apigénine	vicénine-3	A	(30:68.5:1.5)	2.0	14.0	8.3		
N*		C-glc-6 C-ara-8 luteoline	carlinoside	B	(13:87)	2.0	7.6	4.1	1.20	(1.56)
N	30, 31	C-glc-6 C-β-ara-8 luteoline	néocarlinoside	B	(13:87)	2.0	8.8	4.9	1.31	
N*		C-glc-6 C-xyl-8 luteoline	lucénine-3	B	(13:87)	2.0	11.1	6.4		

(Continué sur la p. 312)

TABLEAU II (continué)

Origines	Bibliographie	Composés	Noms usuels	Solvant	Débit (ml/min)	$t_r$ (min)	$k'$	$\alpha$
N*		C-xyl-6 C-glc-8 apigénine	vicénine-1			9.4	4.9	1.24
N*		C-ara-6 C-glc-8 apigénine	isoschaftoside	B	2.0	11.3	6.1	1.16
N	23, 32, 33	C-ara-6 C-gal-8 apigénine	corymboside	(13:87)		13.0	7.1	
N*		C-xyl-6 C-glc-8 apigénine	vicénine-1			9.2	4.75	1.21
N	29	C- $\beta$ -ara-6 C-glc-8 apigénine	néoischaftoside	B	2.0	10.8	5.75	1.20
N	23, 32, 33	C-ara-6 C-gal-8 apigénine	corymboside	(13:87)		12.7	6.9	
N	34-36	C-xyl-6 C-glc-8 lutéoline	lucénine-1	B	2.0	7.7	3.8	1.28
N	31	C-ara-6 C-glc-8 lutéoline	isocarlinoside	(13:87)		9.4	4.9	



peuvent être aisément distinguées, respectivement de la C-galactosyl-6 apigénine et de la C-galactosyl-8 apigénine, ceci pouvant être généralisé à d'autres aglycones: acacétine et O-méthyl-4' tricine. Les mono-C-pentosyl-6 apigénines, acacétines, O-méthyl-4' tricines et leurs homologues mono-C-pentosyl-8 acacétines se séparent encore plus facilement ( $\alpha > 1.35$ ). La C- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-6 et la C- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-6 acacétine sont également bien séparées. Ce résultat est très intéressant puisque ces deux composés sont pratiquement inséparables à l'état libre par les techniques habituelles; seule la chromatographie sur couche mince de leurs dérivés perméthylés permettait de les distinguer<sup>21</sup>.

#### *Di-C-glycosyl-6,8 dihydroxy-5,7 flavones*

Les séparations entre di-C-pentosyl-6,8 apigénines, acacétines et O-méthyl-4' tricines, symétriques, se font très bien, souvent même dans des solvants sans acide acétique ( $\alpha > 1.34$ ). La vicénine-2 (di-C-glucosyl-6,8 apigénine), largement répandue et la galactosyl-6 vitexine (C-galactosyl-6 C-glucosyl-8 apigénine) ont des comportements chromatographiques très voisins; la spectrométrie de masse ne les distingue pas, seule l'obtention de plusieurs taches chromatographiques par l'isomérisation acide (isomérisation Wessely Moser<sup>37</sup>) peut établir la nature dissymétrique de la C-galactosyl-6 vitexine. Notre étude montre qu'une bonne différenciation est possible entre ces composés.

Les C-hexosyl-6 C-pentosyl-8 apigénines et lutéolines différant par un sucre épimère se distinguent dans les mélanges méthanol-eau-acide acétique. La différenciation entre les composés possédant un sucre anomère en position 8 (schaftoside-néoschaftoside et carlino-side-néocarlino-side) est réussie. Les C-pentosyl-6 C-hexosyl-8 apigénines et lutéolines se séparent correctement entre elles, mais les composés possédant un sucre anomère (pentose) en position 6 sont, dans les conditions utilisées, inséparables (isoschaftoside-néoisoschaftoside) alors qu'en chromatographie sur papier, le néoisoschaftoside possède un  $R_F$  nettement inférieur dans les acides dilués.

#### *Mélanges de composés naturels*

L'application de cette méthode a donné de bons résultats permettant l'identification et la séparation de mélanges de composés naturels: schaftoside, isoschaftoside-néoisoschaftoside, néoschaftoside d'une part et des vicénines 1, 2 et 3 d'autre part. Pour ces dernières, le résultat est très intéressant puisque par d'autres méthodes, non seulement les composés à l'état libre mais également leurs dérivés perméthylés sont difficilement séparables.

L'emploi de cette technique résolutive, reproductible et rapide, utilisant des produits à l'état libre, doit permettre dorénavant d'aider à distinguer et à identifier ce type de produits naturels.

#### RÉSUMÉ

Des C-glycosylflavones ne différant que par la nature du ou d'un sucre par épimérisation (glucose-galactose, xylose-arabinose), par anomérisation, ou par isomérisation pyranose-furanose sont séparées de manière satisfaisante par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse [LiChrosorb RP-18 et systèmes isocratiques de solvants (méthanol-eau-acide acétique ou acétonitrile-eau)].

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. Chopin, M. L. Bouillant et E. Besson, dans J. B. Harborne et T. J. Mabry (Rédacteurs), *The Flavonoids: Advances in Research 1975 1981*, Chapman and Hall, London, 1982, p. 449.
- 2 J. Chopin et M. L. Bouillant, dans J. B. Harborne, T. J. Mabry et H. Mabry (Rédacteurs), *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, 1975, p. 632.
- 3 H. Becker, G. Wilking et K. Hostettmann, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 174.
- 4 D. Strack et J. Krause, *J. Chromatogr.*, 156 (1978) 359.
- 5 D. Strack, K. Fuisting et G. Popovici, *J. Chromatogr.*, 176 (1979) 270.
- 6 G. J. Niemann et J. van Brederode, *J. Chromatogr.*, 152 (1978) 523.
- 7 V. Quercia, L. Turchetto, N. Pierini, V. Cuozzo et G. Percaccio, *J. Chromatogr.*, 161 (1978) 396.
- 8 D. J. Daigle et E. J. Conkerton, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 202.
- 9 K. Vande Castele, H. Geiger et C. F. Van Sumere, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 81.
- 10 B. Coq, C. Gonnet et J.-L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.
- 11 B. L. Karger, dans J. J. Kirkland (Rédacteur), *Modern Practice of Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1971, p. 10 et 14.
- 12 M. C. Biol, *Thèse de Doctorat de Spécialité*, Lyon, No. 225, 1973.
- 13 R. M. Horowitz, B. Gentili et W. Gaffield, *Communication à la réunion de l'American Chemical Society, Los Angeles, 1974*.
- 14 A. Marston, K. Hostettmann et A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, 59 (1976) 2596.
- 15 M. Jay, B. Voirin, A. Hasan, J. F. Gonnet et M. R. Viricel, *Biochem. Syst. Ecol.*, 8 (1980) 127.
- 16 M. L. Bouillant, *Thèse de Doctorat ès-Sciences*, Lyon, No. 7652, 1976.
- 17 C. Lardy, M. L. Bouillant et J. Chopin, *Phytochemistry*, 22 (1983) 2571.
- 18 J. Chopin et M. L. Bouillant, *C.R. Séances Acad. Sci.*, 270C (1970) 331.
- 19 M. A. Dubois, *Thèse de Doctorat de Pharmacie*, Paris, série No. 12, 1980.
- 20 M. L. Bouillant, F. Ferreres de Arce, J. Favre-Bonvin, J. Chopin, A. Zoll et G. Matthieu, *Phytochemistry*, 18 (1979) 1043.
- 21 E. Besson, *Thèse de Doctorat de Spécialité*, Lyon, No. 655, 1977.
- 22 R. M. Castledine et J. B. Harborne, *Phytochemistry*, 15 (1976) 803.
- 23 J. Chopin, G. Dellamonica, E. Besson, L. Skrzypczakowa, J. Budzianowski et T. J. Mabry, *Phytochemistry*, 16 (1977) 1999.
- 24 J. E. Specht, H. J. Gorz et S. A. Haskins, *Phytochemistry*, 15 (1976) 133.
- 25 K. R. Markham, L. J. Porter, E. O. Campbell, J. Chopin et M. L. Bouillant, *Phytochemistry*, 15 (1976) 1517.
- 26 M. L. Bouillant, (1977), résultats non-publiés.
- 27 A. Proliac, J. Reynaud, H. Combier, M. L. Bouillant et J. Chopin, *C.R. Séances Acad. Sci.*, 277D (1973) 2813.
- 28 E. Besson, J. Chopin, K. R. Markham, R. Mues, H. Wong et M. L. Bouillant, *Phytochemistry*, 23 (1984) 159.
- 29 B. G. Osterdahl, *Acta Chem. Scand.*, B33 (1979) 400.
- 30 H. Fukami et E. Besson, (1981), résultats non publiés.
- 31 A. Linard, P. Delaveau, R. R. Paris, G. Dellamonica et J. Chopin, *Phytochemistry*, 21 (1982) 797.
- 32 A. Dombris et J. Reynaud, *Plant. Med. Phytother.*, 12 (1977) 109.
- 33 E. Besson, A. Dombris, J. Reynaud et J. Chopin, *Phytochemistry*, 18 (1979) 1899.
- 34 M. K. Seikel, J. H. S. Chow et L. Feldman, *Phytochemistry*, 5 (1966) 439.
- 35 M. Levy et K. Fujii, *Biochem. Syst. Ecol.*, 6 (1978) 117.
- 36 K. W. Hilu, J. M. T. De Wet et D. Seigler, *Biochem. Syst. Ecol.*, 6 (1978) 237.
- 37 F. Wessely et G. H. Moser, *Monatsh. Chem.*, 56 (1930) 97.