

CHROM. 17 920

Note

Séparation par chromatographie liquide haute performance sur silice greffée octadecyle d'alcaloïdes furo- et dihydrofuroquinoléiques

Dosage dans des cultures *in vitro* de Rutacées

MONIQUE MONTAGU* et P. LEVILLAIN

Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, 2 bis Boulevard Tonnellé, B.P. 3213, 37032 Tours Cedex (France)

et

J. C. CHENIEUX et M. RIDEAU

Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté de Pharmacie, 2 bis Boulevard Tonnellé, B.P. 3213, 37032 Tours Cedex (France)

(Reçu le 17 avril 1985; manuscrit modifié reçu le 21 mai 1985)

L'étude de la production des métabolites secondaires par des cellules végétales *in vitro*¹ nécessite l'examen d'un grand nombre de petits échantillons dont la masse est souvent inférieure à 100 mg. En effet, il est nécessaire, à la fois de sélectionner des souches à haute production (par exemple par clonages) et d'optimiser les conditions de culture. Les dosages doivent donc être aussi simples et rapides que possible²⁻⁵.

Certains alcaloïdes furo- et dihydrofuroquinoléiques peuvent présenter des propriétés intéressantes⁶. Nous en étudions la production *in vitro* par diverses Rutacées⁷. Or, il n'existe pratiquement pas de méthodes analytiques les concernant: les alcaloïdes furoquinoléiques peuvent être dosés par chromatographie en phase gazeuse⁸ et nous avons mis au point un dosage par spectrofluorimétrie⁹ et par spectrofluodensitométrie¹⁰ des alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques après séparation par chromatographie sur couche mince. Nous rapportons dans cette note une nouvelle méthode permettant de séparer les deux types d'alcaloïdes par chromatographie liquide haute performance (CLHP) et de doser les alcaloïdes quaternaires dihydrofuroquinoléiques.

MATERIEL ET METHODES

Alcaloïdes étalons

Quatre alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques sous forme de perchlorates de platydesminium, d'isoptelefolonium, de ribalinium et de chlorure de balfourodinium ainsi que trois alcaloïdes furoquinoléiques sous forme de bases: evoxine, skimmianine, kokusaginine, ont été isolés à partir de diverses Rutacées. Leur structure a été analysée par résonance magnétique nucléaire et spectrographie de masse⁶.

TABLEAU I

R_f DE TROIS ALCALOÏDES DIHYDROFUROQUINOLÉIQUES (BALFOURODINIUM, ISOPTÉLEFOLONIUM, RIBALINIUM) ET DE DEUX AL-CALOÏDES FUROQUINOLÉIQUES (KOKUSAGININE, SKIMMIANINE) DANS DIVERS SYSTÈMES DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les alcaloïdes sont repérés grâce à leur fluorescence.

Support chromatographique	Solvant	R_f des alcaloïdes				
		Balfourodinium	Isoptelefolonium	Ribalinium	Kokusaginine	Skimmianine
Silice	Pyridine	0,10	0,05	0,05	0,86	0,93
	Méthanol	0,07	0,07	0,07	0,95	0,95
	$\text{NaClO}_4 \cdot 10^{-2} M$ - méthanol	0,20	0,22	0,20	0,77	0,93
	$\text{HClO}_4 \cdot 10^{-1} M$ - méthanol	0,76	0,76	0,75	0,63	0,91
	CH_3COOH	0,52*	0,50*	0,20*	0,95	0,95
	HCOOH	0,82	0,82	0,70	0,87	0,78
Alumine	Pyridine	0-0,10	0,93	0	0,90	0,94
	Méthanol	0,90	0,78	0,79	0,85	0,92
	Eau	0,80	0,15	0,70	0,10	0,13
Silice greffée Octadecyle	Acétonitrile	0,06	0,06	0,06	0,72	0,69
	Acétonitrile-eau (9:1)	0,18	0,40	0,12	0,75	0,70
	Méthanol	0,13	0,25	0,11	0,76	0,63
	Méthanol-eau (9:1)	0,27	0,41	0,21	0,59	0,63
	$\text{HClO}_4 \cdot 10^{-1} M$ -méthanol	0,78	0,81	0,68	0,50	0,46
	**PIC B7 5 · 10 ⁻³ M-méthanol	0,77	0,79	0,72	0,64	0,60

* Taches étalées.

** Réactif Waters PIC B7 5 · 10⁻³ M = heptane sulfonate 5 · 10⁻³ M + CH_3COOH 3,3 · 10⁻³ M.

Matériel végétal

Quatre souches de *Choisya ternata* H.B.K. (Rutacées), accumulant seulement des alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques ont été utilisées¹¹: 1, très chlorophyllienne, alcaloïdes à l'état de traces; 2, achlorophyllienne, teneur moyenne en alcaloïdes; 3, chlorophyllienne, riche en platydesminium, pauvre en balfourodinium; 4, chlorophyllienne, riche en alcaloïdes. Des extraits méthanoliques de tissus lyophilisés (10 mg/ml; macération sous agitation, 2 h) sont chromatographiés tels quels ou après purification par agitation (2 h) en présence de 50 mg/ml d'alumine (Prolabo 21013).

Chromatographie liquide haute performance

Nous avons utilisé un appareil Waters comportant une pompe 6000A, un injecteur à boucle U6K, une colonne μ Bondapak C₁₈ (30 cm \times 4 mm) associée à une précolonne μ Bondapak C₁₈/Corasil et un détecteur ultraviolet (raies du mercure utilisées: 254 ou 313 nm). Les extraits méthanoliques sont injectés sous un volume variant de 5 à 25 μ l.

Chromatographie sur couche mince

Trois supports ont été étudiés: gel de silice 60 (Merck 5553), oxyde d'aluminium (IB-F Becker Flex) et silice greffée octadecyle (Whatman KC₁₈F).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Comportement chromatographique des alcaloïdes furoquinoléiques et dihydrofuroquinoléiques

Les extraits d'organes des Rutacées que nous étudions (*Ruta graveolens* L., *Ptelea trifoliata* L., *Choisya ternata* H.B.K.) contiennent à la fois des alcaloïdes furoquinoléiques tertiaires et des alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques quaternaires. Afin d'appréhender les propriétés physicochimiques permettant de différencier ces deux types de structures, trois alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques (balfourodinium, rutilinium, isoptelefolonium) et deux alcaloïdes furoquinoléiques (skimmianine et kuskuginine) ont été chromatographiés sur couche mince de différents supports. Les résultats rapportés dans le Tableau I ont permis d'établir que les alcaloïdes quaternaires:

(1) sont faiblement adsorbés sur alumine. En présence de méthanol, dans lequel ils sont très solubles, ils se comportent comme les alcaloïdes tertiaires. Les propriétés d'adsorption de l'alumine vis à vis d'autres composés pourront donc être utilisées pour purifier des extraits méthanoliques de Rutacées, les alcaloïdes restant en solution.

(2) sont très fortement adsorbés sur la silice, contrairement aux alcaloïdes tertiaires. Seuls les acides acétique et formique, de force éluante élevée, permettent leur desorption, ce qui exclut la possibilité de les séparer sur silice, par chromatographie liquide haute performance.

(3) présentent une affinité modulable sur la silice greffée octadecyle (C₁₈). Très forte en présence de solvants purs, cette affinité diminue quand la proportion d'eau augmente. Elle est inhibée par l'addition d'électrolytes forts dans les solvants. Ils ont sur ce support un comportement différent de celui des alcaloïdes tertiaires (peu sensibles à la présence d'électrolytes).

Ces résultats nous ont conduits à mettre au point une séparation simultanée des deux types d'alcaloïdes par chromatographie liquide haute performance sur silice greffée octadecyle C_{18} .

Optimisation de la séparation d'alcaloïdes purs par chromatographie liquide haute performance sur silice greffée octadecyle (C_{18})

Quatre alcaloïdes (platydesminium, balfourodinium, evoxine, skimmianine) présents chez *Choisya ternata* (espèce que nous étudions plus particulièrement) ont été retenus pour cette étude.

Nous avons recherché (Tableau II).

TABLEAU II

INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MÉLANGE ÉLUANT SUR LE FACTEUR DE CAPACITÉ k' DE DEUX ALCALOÏDES DIHYDROFUROQUINOLÉIQUES (PLATYDESMINIUM, BALFOURODINIUM) ET DE DEUX ALCALOÏDES FUROQUINOLÉIQUES (EVOXINE, SKIMMIANINE) SUR COLONNE DE SILICE GREFFÉE OCTADECYLE

Solvant modificateur (%)	Electrolyte	Facteur de capacité k' pour les alcaloïdes			
		Platydesminium	Balfourodinium	Evoxine	Skimmianine
<i>Méthanol</i>	<i>NaClO₄</i>				
100	$5 \cdot 10^{-3} M$	0,16	0,21		
50	$5 \cdot 10^{-3} M$	1	2	4,2	5,5
	<i>*PIC B5</i>				
50	$5 \cdot 10^{-3} M$	0,80	1,60	4	5,4
25	$5 \cdot 10^{-3} M$	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 20
<i>Ethanol</i>	<i>HCOOH</i>				
30	$2 \cdot 10^{-3} M$	1,8	2,8	3,7	6
	<i>CH₃COOH</i>				
30	$8,3 \cdot 10^{-3} M$	1	2	4,3	6,7
30	$3,3 \cdot 10^{-3} M$	2,2	2,4	4,2	6,5
	<i>*PIC B5</i>				
70	$5 \cdot 10^{-3} M$	0	0	0	0
35	$5 \cdot 10^{-3} M$	0,4	0,7	1,7	2,7
30	$5 \cdot 10^{-3} M$	0,8	1,8	4,7	7,3
30	$2,5 \cdot 10^{-3} M$	1	2	4,7	7,3
25	$5 \cdot 10^{-3} M$	1,7	3,4	11	17
	<i>*PIC B7</i>				
30	$5 \cdot 10^{-3} M$	2,3	3,8	4,7	7,3
30	$2,5 \cdot 10^{-3} M$	3,3	7		
<i>Propanol-1</i>	<i>CH₃COOH</i>				
20	$3,3 \cdot 10^{-3} M$	1,7	2,3	1,7	3,3

* Réactifs Waters PIC B5 ou PIC B7 $5 \cdot 10^{-3} M$ = pentane ou heptane sulfonate $5 \cdot 10^{-3} M$ + CH_3COOH $3,3 \cdot 10^{-3} M$.

L'influence de la nature et de la concentration en électrolytes. En absence d'électrolytes, la rétention des alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques étant très forte (facteur de capacité $k' \geq 20$), nous avons étudié l'effet d'addition d'électrolytes de différentes polarités: $NaClO_4$, $HCOOH$, CH_3COOH , réactifs PIC B5 et PIC B7 Waters

(pentane et heptane sulfonate en présence de CH_3COOH). Le Tableau II indique les valeurs du facteur de capacité k' pour ces divers électrolytes et divers mélanges de solvants. Pour un même mélange éluant (ethanol-eau (30:70) par exemple), la rétention des alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques augmente de façon très marquée lorsque le réactif PIC B7 est utilisé par rapport à l'ensemble des autres électrolytes. Pour un même électrolyte, la rétention augmente lorsque la concentration de l'électrolyte diminue. En revanche, la rétention des alcaloïdes furoquinoléiques est très peu affectée par la présence d'un électrolyte. Seul l'acide formique abaisse légèrement leur rétention certainement par suite de la diminution du pH.

L'influence de la nature et de la concentration en solvant modificateur. Trois solvants modificateurs ont été utilisés: méthanol, éthanol et propanol-1 en mélange avec l'eau. L'étude du Tableau II montre que, pour une concentration donnée en électrolytes, la rétention augmente avec la polarité du milieu: par exemple, elle est plus élevée avec le méthanol qu'avec l'éthanol (réactif PIC B5-25% de solvant modificateur). De même, elle augmente lorsque le pourcentage de solvant modificateur diminue (réactif PIC B5-éthanol).

En fonction de ces données, nous avons choisi le mélange éluant: ethanol-eau-PIC B5 (30:70:5 $\cdot 10^{-3} M$) avec lequel la séparation des quatre alcaloïdes est très bien résolue comme le montre la Fig. 1.

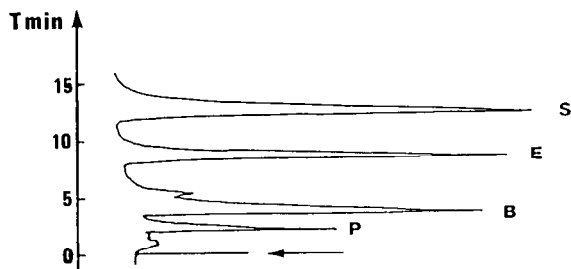


Fig. 1. Séparation du mélange de quatre alcaloïdes sur colonne $\mu\text{Bondapak C}_{18}$. Détection: 254 nm; absorbance: 0,01 pleine échelle; solvant: ethanol-eau-PIC B5 (30:70:5 $\cdot 10^{-3} M$); débit 2 ml/min. S = Skimmianine, E = evoxine, B = balfourodinium, P = platydesminium.

On sait que les mécanismes proposés pour expliquer la rétention des molécules organiques sur des phases greffées apolaires sont variés¹². Les résultats précédents, qui sont conformes et complètent ceux obtenus sur couches minces, permettent une interprétation de la rétention des alcaloïdes étudiés: La rétention des furoquinoléines tertiaires peut s'expliquer par un simple partage entre la phase greffée apolaire et l'éluant polaire puisque l'électrolyte n'intervient pas et qu'une plus grande polarité du solvant modificateur ou un plus fort pourcentage d'eau augmentent la rétention.

La rétention des alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques est certainement due, en absence d'électrolytes, à leur adsorption sur les résidus silanols du support bien que ce risque, qui diminue avec la longueur de la chaîne carbonée greffée, devrait être faible dans le cas de l'octadécyle¹³. Ceci expliquerait l'analogie de comportement observée avec les divers électrolytes dont le premier rôle est de saturer les résidus silanols. En présence d'électrolytes, une rétention par interaction ionique est probable¹⁴ mais n'exclut pas l'appariement d'ions qui semble intervenir avec l'heptane

sulfonate. Le temps de rétention augmente alors avec la longueur de la chaîne apolaire de l'électrolyte.

Séparation et dosage des alcaloïdes dihydrofuroquinoléïques d'extraits de cultures in vitro

Des extraits méthanoliques de quatre souches de *Choisya ternata* cultivées *in vitro*, choisies pour leurs teneurs différentes en alcaloïdes, ont été utilisés. L'objectif était le dosage du platydesminium et du balfourodinium synthétisés par les cultures (les alcaloïdes furoquinoléïques tertiaires sont inexistantes ou ne sont produits qu'à l'état de traces dans ces souches¹⁵). Les extraits sont chromatographiés dans les conditions précédemment définies en utilisant le mélange éluant ethanol-eau (30:70) avec les réactifs PIC B5 ou PIC B7. Les alcaloïdes sont repérés grâce à leur temps de rétention et identifiés par le spectre de fluorescence¹⁶ de la fraction d'éluat concernée. Les teneurs en alcaloïdes sont estimées par la mesure des absorbances à 254 nm pour le balfourodinium et à 313 nm pour le platydesminium.

Nous avons établi que:

(1) L'utilisation du réactif PIC B7 à la place du réactif PIC B5, en augmentant la rétention des alcaloïdes, permet une meilleure résolution du chromatogramme (Fig. 2a et b).

(2) Une purification préalable des extraits par l'alumine simplifie le tracé chromatographique et donc améliore également la résolution (Fig. 2b et c).

(3) La limite de détection est, dans les conditions adoptées, de 10 pmoles d'alcaloïdes, ce qui correspond à environ 0,2 mg de matériel végétal lyophilisé pour les souches à faibles teneurs en alcaloïdes.

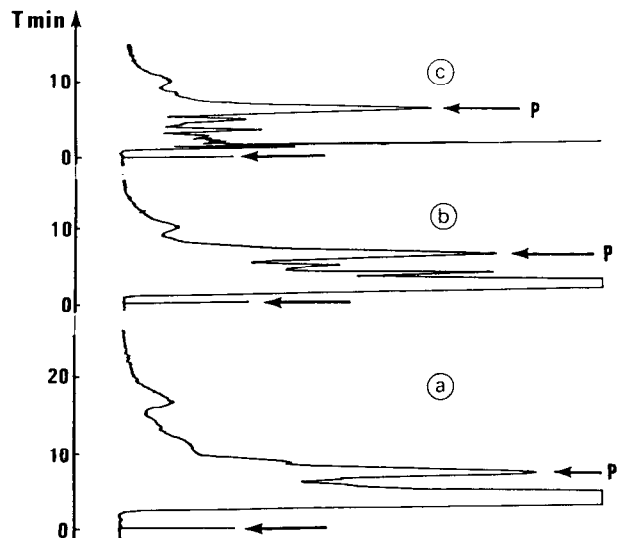


Fig. 2. Chromatogrammes obtenus pour la souche 4. Détection du platydesminium (P) à 313 nm. Absorbance: 0,01 pleine échelle. (a) Extrait méthanolique; mélange éluant: ethanol-eau-PIC B5 (30:70:5 · 10⁻³ M); débit 1 ml/min. (b) Extrait méthanolique; mélange éluant: ethanol-eau-PIC B7 (30:70:5 · 10⁻³ M); débit 2 ml/min. (c) Extrait méthanolique purifié par l'alumine. Mêmes conditions que (b).

(4) Les courbes d'étalonnage pour les 2 alcaloïdes sont linéaires (coefficient de corrélation de 0,997 établi sur 10 mesures).

(5) Les résultats sont en bon accord avec ceux obtenus en utilisant une méthode fluorimétrique précédemment publiée¹⁶ et mettant en oeuvre un plus haut degré de purification. Le coefficient de corrélation entre les deux méthodes, de 0,9935 pour le dosage du platydesminium, montre l'exactitude de la méthode proposée qui présente en outre une meilleure fiabilité. (Tableau III).

TABLEAU III

COMPARAISON DES RÉSULTATS DE DOSAGE DES ALCALOÏDES DIHYDROFUROQUINOLÉIQUES DANS QUATRE SOUCHES DE *CHOISYA TERNATA* OBTENUS PAR FLUORIMÉTRIE¹⁶ ET PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

Les teneurs en alcaloïdes (moyenne de quatre échantillons) sont exprimées en $\mu\text{moles/g}$ de matériel végétal lyophilisé.

Souches	Teneurs en alcaloïdes [moyenne \pm écart-type (coefficient de variation %)]			
	Platydesminium		Balfourodinium	
	Fluorimétrie	CLHP	Fluorimétrie	CLHP
1	0,123 \pm 0,006 (5)	0,080 \pm 0,001 (3)	0,029 \pm 0,009 (30)	0,044 \pm 0,001 (3)
2	0,656 \pm 0,010 (4)	0,465 \pm 0,005 (1)	0,183 \pm 0,009 (5)	0,135 \pm 0,003 (2)
3	1,371 \pm 0,069 (5)	1,290 \pm 0,032 (2,5)	0,180 \pm 0,009 (5)	0,147 \pm 0,003 (2)
4	2,605 \pm 0,156 (6)	3,033 \pm 0,046 (1,5)	0,471 \pm 0,028 (6)	0,613 \pm 0,012 (2)

CONCLUSION

L'utilisation de la chromatographie liquide haute performance pour le dosage des alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques synthétisés par des cultures de tissus de certaines espèces de Rutacées, paraît présenter les qualités requises pour l'analyse de grandes séries d'échantillons: linéarité du dosage, purification rapide, fiabilité et bonne sensibilité. Cette technique a été mise au point avec des extraits de souches de *Choisya ternata*, mais des travaux préliminaires nous ont montré qu'elle était également adaptable à des extraits de souches de *Ruta graveolens* et *Ptelea trifoliata*.

La séparation par chromatographie liquide haute performance permet aussi de séparer, dans les organes *in vivo*, les deux types d'alcaloïdes présents: furo et dihydrofuroquinoléiques et de doser ces derniers, ce qui permet de comparer l'évolution des teneurs en alcaloïdes dans les plantes et les cultures *in vitro*.

Les performances de la méthode, déjà très satisfaisante puisqu'on peut détecter 10 pmoles d'alcaloïdes, pourraient être facilement améliorées en utilisant un détecteur fluorimétrique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Fujiwara, *Plant Tissue Culture*, JAPTC, Tokyo, 1982, 839 pp.
- 2 R. Verpoorte, T. Mulder-Krieger, R. Wijnsha, J. M. Verzijl et A. Baerheim Svendsen, *Z. Naturforsch. C*, 39 (1984) 680.

- 3 F. Sasse, J. Hammer et J. Berlin, *J. Chromatogr.*, 194 (1980) 234.
- 4 F. Sasse, U. Heckenberg et J. Berlin, *Plant Physiol.*, 69 (1982) 400.
- 5 E. W. Weiler, dans W. Barz, E. Reinhard et M. H. Zenk (Editors), *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*, Springer, New York, 1977, p. 266.
- 6 M. Rideau, C. Verchere, P. Hibon, J. C. Chenieux, P. Maupas et C. Viel, *Phytochemistry*, 18 (1979) 155.
- 7 P. G. Waterman, *Biochem. Systematics Ecol.*, 3 (1975) 149.
- 8 M. F. Grundon, D. M. Harrison et C. G. Syropoulos, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 19 (1974) 2722.
- 9 M. Montagu-Bourin, M. Rideau, P. Levillain et J. C. Chenieux, *Planta Med.*, 38 (1980) 50.
- 10 M. Montagu, *Thèse de Doctorat de 3^e Cycle, No. 4*, Tours, 1983.
- 11 M. Gras, J. Creche, J. C. Chenieux et M. Rideau, *Planta Med.*, 46 (1982) 231.
- 12 Cs. Horváth, W. Melander, I. Molnár et P. Molnár, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 2295.
- 13 R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Liquide*, Masson, Paris, 2nd éd., 1982, ch. 7, p. 149.
- 14 B. A. Bidlingmeyer, *J. Chromatogr. Sci.*, 18 (1980) 525.
- 15 M. Sejourne, C. Viel, J. Bruneton, M. Rideau et J. C. Chenieux, *Phytochemistry*, 20 (1981) 353.
- 16 M. Montagu, P. Levillain, M. Rideau et J. C. Chenieux, *Talanta*, 28 (1981) 709.