

**Contribution à l'étude de la composition  
chimique de lichens:  
Application de la spectrométrie de masse  
en tandem (MS-MS) à l'identification de  
triterpènes et stéroïdes**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

*Pierre Allemand*

Ingénieur chimiste diplômé  
de l'Université de Neuchâtel  
pour l'obtention du grade  
de Docteur ès Sciences

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Contribution à l'étude de la composition  
chimique de lichens: application de la  
spectrométrie de masse en tandem (MS-MS)  
à l'identification de triterpènes et stéroïdes  
de Monsieur Pierre Allemand

## UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,  
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs R. Tabacchi, A. Jacot-Guillarmod,  
P. Clerc (Berne) et A. Buchs (Genève)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 3 octobre 1988

Le doyen:

F. Persoz



---

A Claudine  
A mes parents

---

Le présent travail a été effectué d'octobre 1983 à juin 1988 dans les laboratoires de chimie organique analytique de l'institut de chimie de l'université de Neuchâtel, sous la direction de Monsieur le Professeur Raffaele Tabacchi.

Que soient remerciés ici tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'achèvement de ce travail.

J'aimerais plus particulièrement souligner combien j'ai apprécié Monsieur le Professeur Tabacchi pour la confiance qu'il m'a accordée et pour la liberté qu'il m'a laissée tout au long de ce travail.

Que Georges trouve ici l'expression de ma gratitude pour l'aide qu'il m'a apportée et pour son amitié.

Je remercie Monsieur le Professeur A. Buchs, Monsieur le Dr. Ph. Clerc et Monsieur le Professeur A. Jacot-Guillarmod d'avoir accepté d'être membres du jury auprès de Monsieur le Professeur R. Tabacchi, et pour avoir consacré une partie de leur temps au jugement de ce travail.

Marin, juin 1988

---

## TABLE DES MATIERES

<b>I</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1	AVANT-PROPOS	3
2	QUELQUES REMARQUES A PROPOS DES LICHENS	4
3	LES PRINCIPAUX COMPOSES LICHENIQUES	6
4	BIOSYNTHESE DES COMPOSES DEPSIDIQUES	7
5	BIOSYNTHESE DES COMPOSES STEROIDIQUES ET TRITERPENIQUES	9
5.1	Schéma général	9
5.2	Les triterpènes tetra et pentacycliques	12
6	METHODE CLASSIQUE D'IDENTIFICATION DES SUBSTANCES NATURELLES	14
7	PRESENTATION DE LA MS-MS ET DE SES TECHNIQUES	19
7.1	Intérêt de la méthode	19
7.2	Quelques remarques sur les quadripôles	20
7.3	Principe du quadripôle	21
7.4	Présentation de l'appareil NERMAG R30-10	23
<b>II</b>	<b>ETAT DES RECHERCHES</b>	<b>25</b>

---

<b>III</b>	<b>RECHERCHES ENTREPRISES ET BUT DE NOTRE TRAVAIL</b>	<b>29</b>
8	RECHERCHES ENTREPRISES	29
9	BUT DU TRAVAIL	30
<b>IV</b>	<b>EVERNIA PRUNASTRI (L.) Ach.</b>	<b>31</b>
10	PROCEDURE D'ANALYSE	33
11	ANALYSE DE LA FRACTION AC3.3	39
12	ANALYSE DE LA FRACTION AC3.4	51
13	DIFFERENCIATION DE L' $\alpha$ -AMYRINE DE LA $\beta$ -AMYRINE	57
14	ETUDE PAR GC-MS DE LA FRACTION NT2.2	67
15	FRACTION NF1.9	73
15.1	Etude par GC-MS	73
15.2	Identification du lanostérol	74
15.3	Identification de la lupène-3-one	76
15.4	Identification de la $\beta$ -amyronone	78
15.5	Identification de l'isomultiflorénone	80
15.6	Identification de l'hopan-22-en-3-one	82
15.7	Identification de la $\beta$ -amyrine et de l' $\alpha$ -amyrine	84
15.8	Identification de la 24-méthylène-cycloartanone	84
15.9	Identification de l'acétyl-isonmultiflorérol	86
16	FRACTION NF2	89
16.1	Fraction NF2.1	89
16.2	Fraction NF2.2	91

---

17	FRACTION CL2.4	93
17.1	Etude par résonance magnétique nucléaire	93
17.2	Etude par spectrométrie de masse	97
18	PRODUIT MINEUR DE LA FRACTION CL2.4	103
18.1	Etude par spectrométrie de masse (EI)	103
18.2	Etude par MS-MS	106
18.3	Etude de la structure de l'ion m/z 135	110
19	FRACTION CL2.6	115
19.1	Etude par résonance magnétique nucléaire	115
19.2	Etude par spectrométrie de masse	118
19.3	Etude par MS-MS	119
19.4	Détermination de la position de l'acétate	124
19.5	Conclusions	125
V	CLADONIA FURCATA (Huds.) Schrad.	127
20	PROCEDURE D'ANALYSE	129
20.1	Partie insoluble dans l'éther	129
20.2	Partie soluble dans l'éther	129
21	IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX DEPSIDES	133
22	FRACTION FU3	137
22.1	Etude GC-MS	137
22.2	Etude MS-MS	140
22.3	Etude des amyrynes par GC-MS-MS	143
22.4	Conclusions	144
23	FRACTION FU2	145

---

VI	CLADONIA STEREOCLADA des Abb.	155
24	PROCEDURE D'ANALYSE	157
25	ETUDE SPECTRALE DE L'ACIDE BOURGEANIQUE	161
25.1	Etude <sup>1</sup> H-NMR	162
25.2	Etude <sup>13</sup> C-NMR	167
25.3	Etude par spectrométrie de masse	169
26	ETUDE DES FRACTIONS ST3.1 ET ST3.2	171
26.1	Fraction ST3.1 par GC-MS	171
26.2	24ξ-méthyl-22-en-cholestérol	172
26.3	Ergost-3,5,22-trien-7-one	172
26.4	24-éthyl-22-en-cholestérol	174
26.5	Ergost-3,5-dien-7-one	174
26.6	Stigmast-3,5,22-trien-7-one	175
26.7	Fraction ST3.2 (stigmast-3,5-dien-7-one)	176
VII	ETUDE DIRECTE DES LICHENS PAR MS-MS	177
27	INTRODUCTION	179
27.1	Quelques remarques sur la NCI	180
27.2	Etude NCI de l'atranorine et de quelques autres depsides	184
28	ETUDE DE QUELQUES LICHENS PAR NCI/MS-MS	197
28.1	Introduction	197
28.2	Etude par NCI/MS-MS directe de <i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Ach.	201

---

29	COMPARAISON DES METHODES D'ANALYSE	211
29.1	Introduction	211
29.2	Acide 8'-O-méthyl-stictique	212
29.3	Acide stictique	214
29.4	Acide 2'-O-méthyl-connorstictique	217
29.5	Etude du lichen par NCI/MS-MS	219
<b>VIII</b>	<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>225</b>
30	GENERALITES	227
31	EVERNIA PRUNASTRI	231
32	SYNTHESE DU 4-BENZYL-3,5-DIMETHYL-PHENOL	232
33	CLADONIA FURCATA ET STEROIDES	236
<b>IX</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>237</b>
34	RESUME DES RESULTATS	239
35	CONCLUSIONS	243
<b>X</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>249</b>

**INTRODUCTION**

## I INTRODUCTION

### 1 AVANT-PROPOS

Depuis plusieurs années déjà, notre laboratoire s'intéresse à l'étude de la composition chimique des lichens. Deux buts sont poursuivis : d'une part, découvrir des structures nouvelles, et, d'autre part, contribuer à la classification des différentes espèces par une étude chimiotaxonomique, ceci en collaboration avec des botanistes. [1]

La découverte de substances inconnues est particulièrement intéressante dans le cadre d'une collaboration avec les industries pharmaceutiques et de la parfumerie. Le screening des produits isolés (étude sur un large spectre des propriétés d'une substance donnée) est souvent délicat étant donné les faibles quantités isolées. Les recherches entreprises ont donc surtout porté sur la caractérisation de nouvelles substances et sur l'ouverture de nouvelles voies synthétiques.

Deux études importantes entreprises dans nos laboratoires, dans le cadre de travaux de doctorat, nous ont aidé dans nos recherches. La première, réalisée par Nicollier, porte sur l'*isolement, l'identification et quelques synthèses de composés de la mousse de chêne (Evernia Prunastri (L.) Ach.)* [2]. La seconde est due à Gunzinger et s'intitule *Etude de la composition chimique de Pseudevernia Furfuracea (L.) Ach. Synthèse d'un depside et d'une depsidone* [3].

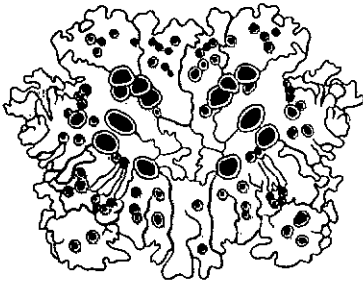
Elles ont plus particulièrement porté sur les composés appartenant aux classes des depsides et des depsidones. Il s'agit des composés les plus caractéristiques des lichens.

## 2 QUELQUES REMARQUES A PROPOS DES LICHENS [4]

Ce n'est qu'à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle que les lichens, jusque-là considérés comme des êtres simples à mi-chemin entre l'algue et le champignon, ont été reconnus comme résultant de l'union symbiotique d'une algue autotrophe (capable de photosynthèse) et d'un champignon hétérotrophe (tributaire d'un autre être vivant pour son alimentation carbonée).

Les thalles peuvent avoir des structures très différentes allant d'une croûte adhérent au rocher, jusqu'à la forme d'un petit arbuste. La taille varie de quelques centimètres à près d'un mètre; les couleurs sont généralement ternes. La classe des *Cladonia*, dont nous avons étudié certaines espèces, est caractérisée par une base foliacée ou crustacée évanescence donnant naissance à des branches dressées plus ou moins ramifiées.

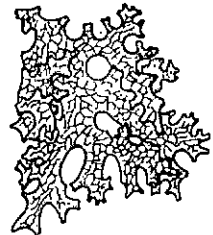
Quelques exemples types de thalles son présentés ci-après



*Xanthoria parietina*



*Peligera horizontalis*



*Lobaria pulmonaria*

thalles foliacés

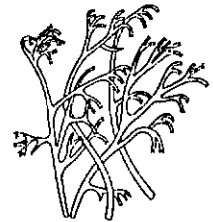


*Ramalina calicaris*

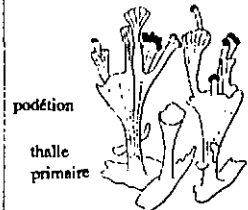


*Usnea ceratina*

thalles fruticuleux



*Cl. rangiferina* (podétions)



*Cl. chlorophaea*

thalles de *Cladonia*

La nutrition carbonée est assurée par la photosynthèse de l'algue. Il n'est pas exclu que le mycosymbiote puisse tirer certaines substances du substrat organique sur lequel le lichen se développe. L'absorption de l'eau s'effectue sur toute la surface du thalle. La capacité à conserver celle-ci est faible et, par temps sec, le lichen se dessèche et passe alors à un état de vie ralentie.

Les substances azotées ainsi que les sels minéraux sont apportés par les poussières qui se déposent sur le thalle ou par les produits dissous dans l'eau.

Les lichens se développent dans la plupart des milieux existant sur la terre. Ils représentent la dernière végétation que l'on rencontre aux pôles et sur les montagnes. Chacun d'eux nécessite toutefois des conditions ambiantes bien précises.

Les lichens, outre le fait qu'ils constituent la nourriture de certains animaux, ont été utilisés en teinturerie. Leur emploi est cependant en régression par suite de la concurrence des produits synthétiques. Ils continuent par contre à être utilisés en parfumerie et nombre de leurs composants figurent dans les pharmacopées du monde entier.

On connaît près de 20000 lichens différents et régulièrement de nouvelles espèces sont identifiées. La classification est très difficile car les distinctions morphologiques sont souvent ténues. L'étude chimiotaxonomique revêt donc une importance primordiale.

### 3 LES PRINCIPAUX COMPOSES LICHENIQUES

Les composés mis en évidence jusqu'à présent appartiennent aux classes suivantes [3]:

- Sucres
- Dérivés monoarylés de l'orcinol et du  $\beta$ -orcinol
- Depsides
- Depsidones
- Depsones
- Dérivés de xanthones
- Quinones
- Dérivés du dibenzofurane
- Dérivés de l'acide pulvinique
- Acides  $\gamma$ -lactoniques
- Acides gras
- Diterpènes
- Triterpènes
- Stéroïdes
- Caroténoïdes
- Composés azotés
- Composés soufrés
- Acides aminés, vitamines et enzymes

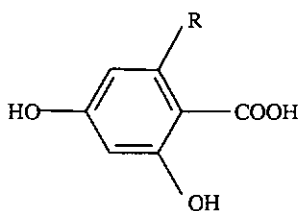
Les études réalisées sur la biosynthèse des métabolites secondaires montrent que ceux-ci doivent être synthétisés par le champignon à partir des hydrates de carbones fournis par l'algue. Il est important de souligner que l'étude des composés biosynthétisés spécifiquement par l'algue est très difficile, vu la faible proportion que représente cette dernière dans le thalle par rapport au champignon.

Les lichens sont caractérisés par la présence de produits aromatiques résultant de la condensation de deux ou trois unités phénoliques par estérification ou par couplage oxydatif. Ces réactions conduisent aux depsides, depsidones, depsones. Les autres composés rencontrés dans les lichens sont également connus chez les champignons et dans les plantes d'ordres supérieurs.

Dans ce travail seront essentiellement étudiés les triterpènes et les stéroïdes ainsi que, dans une moindre mesure, les depsides.

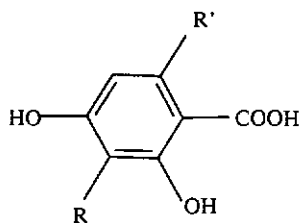
#### 4 BIOSYNTHESE DES COMPOSES DEPSIDIQUES

Deux voies biosynthétiques distinctes sont reconnues pour expliquer la formation des depsides et des depsidones [5]. Toutes partent d'une structure de base qui est soit de type orcinol, soit de type  $\beta$ -orcinol.



Unité du type orcinol

$R = \text{CH}_3, \text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_5\text{H}_{11}, \text{C}_7\text{H}_{15}$

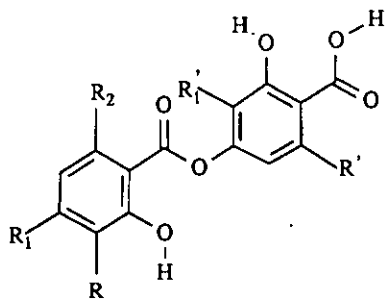


Unité du type  $\beta$ -orcinol

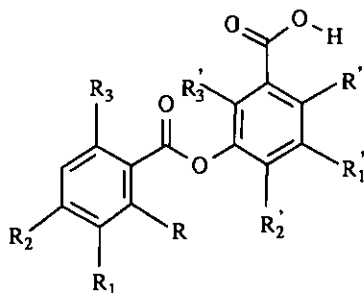
$R = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{OH}, \text{CHO}, \text{COOH}$

$R' = \text{CH}_3$

Leur formation est expliquée par la condensation d'acétyl-S-CoA ( $\text{CH}_3\text{COSCoA}$ ) avec du malonyl-S-CoA ( $\text{COO-CH}_2\text{COSCoA}$ ). Les unités obtenues peuvent ensuite être combinées pour former des para-depsides ou des méta-depsides.



para-depside



méta-depside

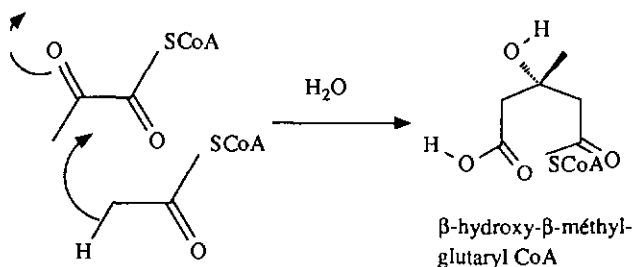
Parmi les para-depsides descendants de l'orcinoïde, celui que nous avons le plus souvent rencontré est l'acide évernique. L'atranorine, un autre para-depside, appartient à la série du  $\beta$ -orcinoïde.

Les méta-depsides sont également formés à partir des deux séries, ainsi l'orcinoïde conduit à des composés tels que l'acide sekikaïque alors que la série du  $\beta$ -orcinoïde conduit à des composés comme l'acide thamnolique [5].

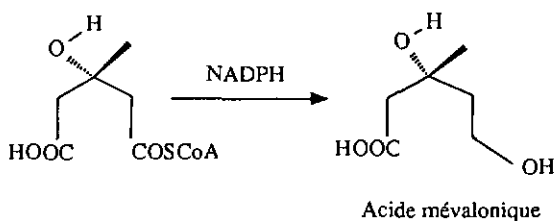
5 BIOSYNTHESE DES COMPOSES STEROIDIQUES ET TRITERPENIQUES

## 5.1 SCHEMA GENERAL

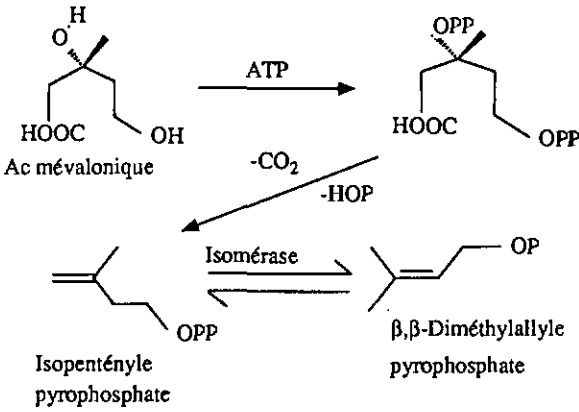
La base de la biosynthèse des triterpènes est la combinaison de 3 unités d'acétyl-CoA pour donner le  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -méthyl-glutaryl-CoA [6,7].



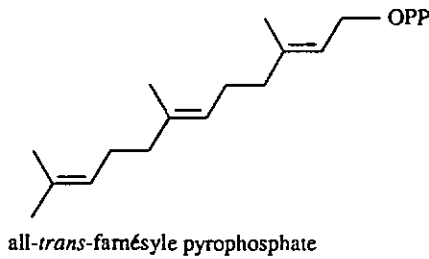
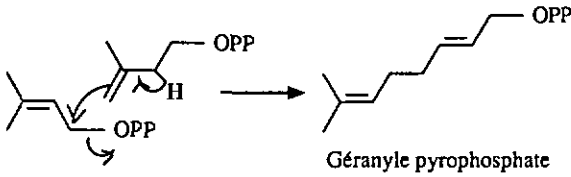
La réduction de la fonction CoA en alcool conduit à l'acide mévalonique.



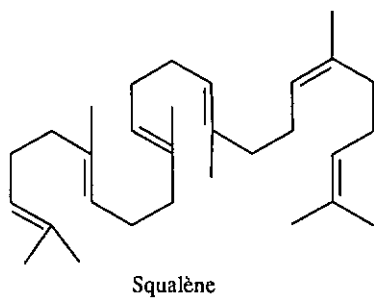
Celui-ci, réagissant avec une molécule d'ATP, se transforme en un intermédiaire instable qui se décompose pour donner, après élimination de l'alcool tertiaire et du carbonyle libre, un dérivé isoprénique, l'isopentényle pyrophosphate. Ce dernier peut être transformé en diméthylallyle pyrophosphate par l'enzyme appelée isomérase.



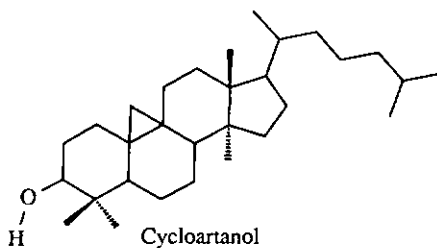
La condensation de deux de ces unités conduit au géranyl pyrophosphate, puis, après condensation avec une autre unité C<sub>5</sub>, au farnésyl pyrophosphate.



La dimérisation de ce dernier conduit au squalène qui est l'unité de base pour la formation des triterpènes.



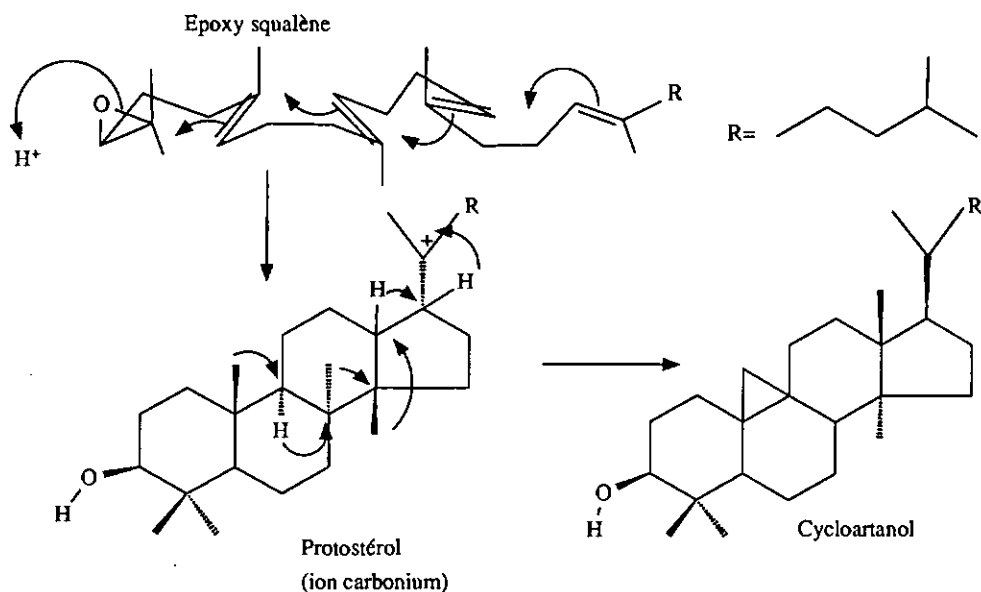
La cyclisation du squalène conduit, chez les animaux, à la formation de lanostérol qui peut être transformé en cholestérol par plusieurs voies parallèles. Chez les plantes, elle conduit notamment au cycloartanol.



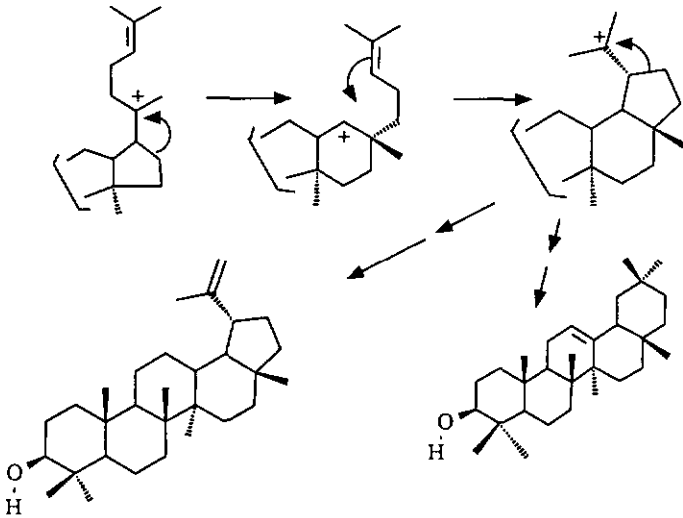
## 5.2 LES TRITERPENES TETRA ET PENTACYCLIQUES

On reconnaît deux groupes importants de triterpènes: les tétracycliques qui incluent les stérols, et les pentacycliques [8].

La conformation dictée au squalène par l'enzyme lors de sa cyclisation conduit à divers sous-groupes. Nous ne développerons pas ici les multiples possibilités, mais nous donnons l'exemple de la formation du cycloartanol depuis l'époxy-2,3-squalène pour illustrer comment la position des méthyles est dictée par la conformation du squalène au moment de sa cyclisation.



Les composés pentacycliques sont obtenus par un réarrangement du cycle à cinq membres et formation du cinquième cycle à partir de la chaîne latérale. Nous proposons ici la formation du lupéol et de la  $\beta$ -amyrine à partir d'un ion carbonium obtenu selon le même schéma, mais à partir de squalène ayant une conformation quelque peu différente (chaise-chaise-chaise-bateau).

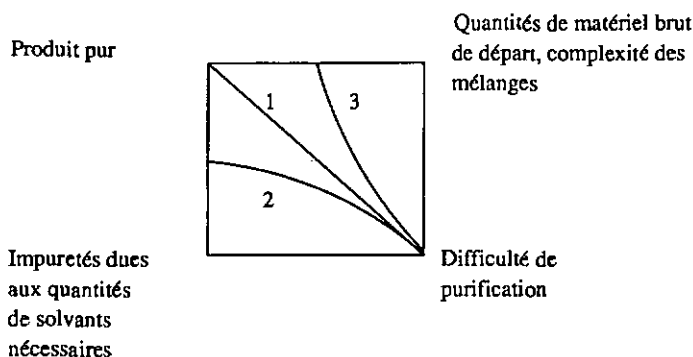


Dans le cas de la  $\beta$ -amyryne, le cycle E à six membres se forme de la même manière que D, par réarrangement du cycle à cinq membres et de la chaîne latérale. L' $\alpha$ -amyryne est obtenue par réarrangement des méthyles sur le cycle E lors de la formation de la double liaison par perte d'un proton (transformation du carbonium en une molécule neutre).

Cette rapide étude de la voie biosynthétique des triterpènes montre que ceux-ci ne se différencient qu'au moment de la cyclisation du squalène et par quelques réarrangements ultérieures.

## 6 METHODE CLASSIQUE D'IDENTIFICATION DES SUBSTANCES NATURELLES

L'isolement de substances naturelles ainsi que leur identification deviennent difficiles lorsque ne sont disponibles que de faibles quantités de matériel de départ. L'étude de produits en traces notamment est souvent rendue impossible par la présence massive de certains composés qui les masquent. Les impuretés des solvants utilisés peuvent également être la cause de difficultés car il est souvent nécessaire de travailler avec des quantités très importantes de matériel brut de départ pour obtenir une quantité du produit recherché suffisante pour son analyse. On peut représenter les contraintes qui régissent l'analyse des produits naturels par le schéma suivant:



La courbe 1 correspond au cas idéal: des quantités de produits suffisantes, un solvant pur et une bonne séparation. Dans ce cas le produit pourra être isolé.

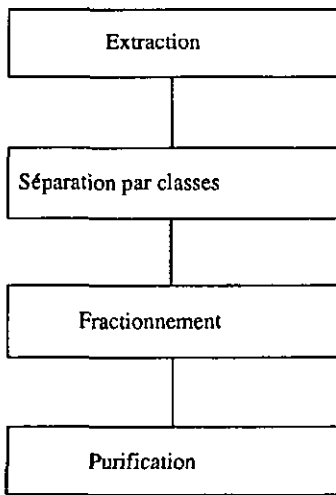
La courbe 2 correspond à la situation que l'on rencontre lorsque le solvant utilisé a été mal choisi. Les problèmes de la solubilité des échantillons (par exemple) vont souvent pouvoir se résoudre par une augmentation de la quantité de solvant, mais cela provoquera également une accumulation des impuretés de celui-ci qui nuiront à la purification du produit. A partir d'un certain stade, l'accumulation est suffisante pour annihiler les efforts de purification.

L'augmentation de la quantité de matériel de départ semble être la solution, mais elle entraîne souvent une augmentation de la difficulté de séparation. C'est le cas de la courbe 3. Lorsqu'on travaille avec un matériel de départ plus conséquent, les techniques de séparation deviennent plus grossières (colonnes remplies de matériel d'un grain moins fin, coût du support limitant certaines utilisations à de faibles quantités, etc). Il en résulte une accumulation de substances parasites provenant du mélange brut. L'augmentation des quantités de départ n'est donc souhaitable que si les méthodes de séparation qui seront utilisées restent d'une efficacité suffisante.

La figure ci-dessus devrait en fait être réalisée en trois dimensions, sous la forme d'un polygone dont chaque sommet correspondrait à une difficulté. Il y a en effet de nombreux facteurs qui tendent à nous éloigner de la ligne médiane. Ils peuvent être aussi divers que la toxicité des produits, leur disponibilité ainsi que celle des appareils, leur manipulation, etc.

Les chimistes ont cherché à contourner le problème posé par la purification des produits en la subdivisant en plusieurs étapes. Il devenait ainsi possible de mieux adapter les conditions et les méthodes aux quantités de produits à purifier.

Le résultat a été l'établissement d'une voie classique de purification de composés qui suit le schéma suivant:



L'étape de l'extraction peut déjà être utilisée pour procéder à un premier tri des substances en jouant sur la polarité du solvant employé.

La séparation par classes peut être basée sur une partition acides, bases, neutres ou sur une précipitation des composés par abaissement de la polarité du solvant dans lequel l'échantillon est dissout. Cette première séparation est grossière et souvent peu sélective (sauf pour l'extraction acides-bases-neutres).

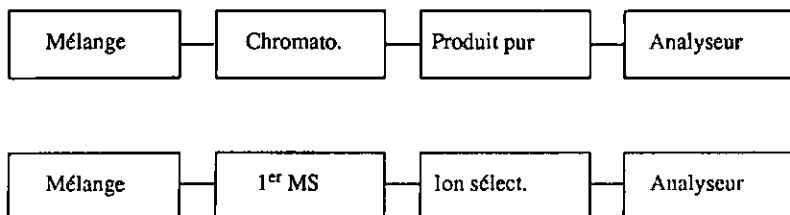
Le fractionnement correspond à la séparation des composants des divers groupes de produits sur la base de critères chimiques ou physiques. Les méthodes les plus courantes sont les diverses techniques chromatographiques et la distillation.

La purification, dans le cas des substances naturelles tout au moins, est généralement réalisée par des moyens chromatographiques. Certaines méthodes comme la chromatographie liquide préparative (MP et HPLC), ou la chromatographie en phase gazeuse, sont très bien adaptées à la purification et à l'analyse de petites quantités.

Lorsqu'on a affaire à un mélange complexe, il est évidemment difficile d'isoler et de purifier chaque composé en quantités suffisantes pour permettre une étude par voie spectroscopique.

C'est ici qu'il est nécessaire de coupler directement à la méthode de séparation une technique spectroscopique (UV, IR, MS). Le développement des systèmes GC-MS et LC-MS a nettement amélioré le seuil de détection et d'identification des produits [23]. Il n'est également plus nécessaire d'isoler les substances pour pouvoir les analyser, il suffit de les séparer chromatographiquement. Ces méthodes peuvent toutefois s'avérer inadaptées dans certains cas. Il est en effet des composés qui par exemple ne peuvent pas être séparés par chromatographie en phase gazeuse parce que leurs points d'ébullition sont trop élevés. L'entraînement de la phase stationnaire par la phase mobile est également un problème non négligeable en GC-MS puisqu'il provoque une augmentation du bruit de fond.

Une alternative intéressante est apparue ces dernières années. Elle consiste à remplacer l'appareil de chromatographie par un spectromètre de masse. Le système ainsi formé utilise le premier MS pour sélectionner un ion et le second pour l'analyser. La comparaison des différentes étapes nécessaires à l'analyse d'une substance en GC-MS et en MS-MS est schématisée ici.



Dans le premier cas l'analyseur est un MS formé d'une chambre d'ionisation, d'un système permettant de séparer les ions sur la base de leur rapport masse sur charge et d'un détecteur. Dans le second cas la chambre d'ionisation est remplacée par une chambre de collision dans laquelle l'ion entre en collision avec un gaz (inerte ou réactant) sous certaines conditions énergétiques. Les fragments résultants sont analysés par le deuxième MS de manière classique.

## 7 PRESENTATION DE LA MS-MS ET DE SES TECHNIQUES

### 7.1 INTERET DE LA METHODE

Comme nous l'avons constaté précédemment, la méthode classique d'analyse des substances naturelles nécessite de nombreuses manipulations de celles-ci. Les risques de dégradation de l'échantillon, ainsi que la perte d'une partie de celui-ci sont directement dépendants de la durée de sa préparation ainsi que du nombre de manipulations nécessaires. L'introduction de la GC-MS et de la LC-MS avait déjà bien simplifié le travail en évitant de devoir isoler complètement les produits à étudier. Mais ces deux méthodes restent souvent lentes (dans le cas des séparations difficiles notamment) et ne peuvent pas toujours être appliquées.

L'étude d'un extrait brut en MS simple montre souvent un foisonnement d'ions divers, parfois dominés par quelques  $m/z$  plus importants dus à 1 ou 2 produits présents en grandes quantités. L'interprétation de tels spectres n'est que très rarement réalisable, et ne concerne généralement que l'identification du produit majeur.

L'idée de la MS-MS est de mettre entre la chambre d'ionisation et l'analyseur un appareil qui soit suffisamment sélectif pour ne laisser passer qu'un produit. L'appareil le plus à même de séparer des ions de masses différentes étant le spectromètre de masse, le couplage de deux appareils est tout de suite apparu comme une solution intéressante [9].

La MS-MS peut être employée de plusieurs manières différentes que nous avons résumées dans le tableau ci-dessous [10]:

Analyse	Premier MS	Collision	Deuxième MS	Information
Ions descendants	Transmission spécifique	Collision ou réaction	Balaye	Identification
Ions ascendants	Balaye		Transmission spécifique	Information structurale
Pertes de neutres	Balaye		Balaye décalé d'une constante	recherche de familles

## 7.2 QUELQUES REMARQUES SUR LES QUADRIPOLES

Comme le spectromètre de masse que nous avons utilisé était équipé de trois quadripôles, nous avons jugé intéressant de commenter quelque peu leur fonctionnement [9,11].

Sur la base des techniques utilisées pour la séparation des ions, les appareils de spectrométrie de masse peuvent être subdivisés en quatre types d'appareils:

- A secteur (magnétique et/ou électrique)
- A temps de vol
- Ion-cyclotron
- A quadripôle

Le premier fonctionne sur le principe qui veut que des ions ayant un rapport masse sur charge différent soient déviés différemment lorsqu'ils subissent un champ magnétique ou électrique pendant leur déplacement.

La détection par temps de vol se base sur le fait que des ions de  $m/z$  différents recevant tous la même impulsion au même instant n'acquiescent pas la même vitesse et auront donc des temps de vol

différents pour parcourir une certaine distance.

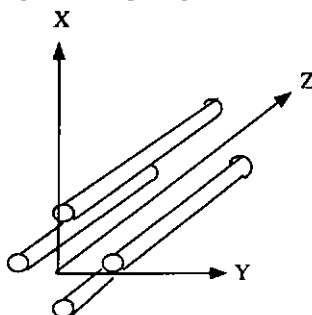
L'appareil à ion-cyclotron fonctionne sur le principe du cyclotron utilisé pour accélérer les électrons, mais appliqué et adapté aux ions rencontrés dans un spectromètre de masse.

Le quadripôle est d'un fonctionnement quelque peu plus compliqué. Nous allons le développer ci-dessous [11].

### 7.3 PRINCIPE DU QUADRIPOLE

L'effet de filtre d'ions obtenu avec un quadripôle est dû à l'utilisation simultanée d'une tension continue et d'une tension modulée. La décomposition du système selon deux axes perpendiculaires rend les phénomènes intervenants plus simple à comprendre.

La figure ci-dessous représente schématiquement le quadripôle.



Considérons l'effet d'une tension modulée appliquée aux deux barres se trouvant dans le plan X-Z sur des ions positifs se déplaçant dans ce même plan. Lorsque la tension appliquée sera positive, les ions seront focalisés sur l'axe Z. Si au contraire la tension est négative, les ions subiront une accélération qui les défocalisera et ils s'éloigneront de l'axe Z.

Si nous ajoutons une tension continue positive sur ces mêmes barres, nous obtiendrons aussi une focalisation des ions sur l'axe Z par cette nouvelle tension.

Si les ions sont de masse élevée, ils auront une inertie telle qu'ils seront peu influencés par la tension modulée. Ils seront donc focalisés sur l'axe Z. Par contre les ions de faible masse, eux, seront influencés de façon importante par la tension modulée et, si celle-ci est suffisante, ils iront se décharger au contact de l'une des électrodes.

Nous constatons donc que la situation présentée selon le plan X-Z agit comme un filtre ne laissant

passer que les masses supérieures à une certaine valeur .

Voyons à présent ce qui se passe dans le plan Y-Z. A chaque instant, la tension appliquée sur les barres dans ce plan est égale en intensité, mais de signe opposé à celle appliquée sur les barres dans le plan X-Z. En appliquant le raisonnement développé précédemment, nous constatons que cette fois les ions lourds sont défocalisés de l'axe Z par la tension continue, et que seuls les ions suffisamment légers pour être refocalisés par la tension modulée parviendront à l'autre bout du quadripôle.

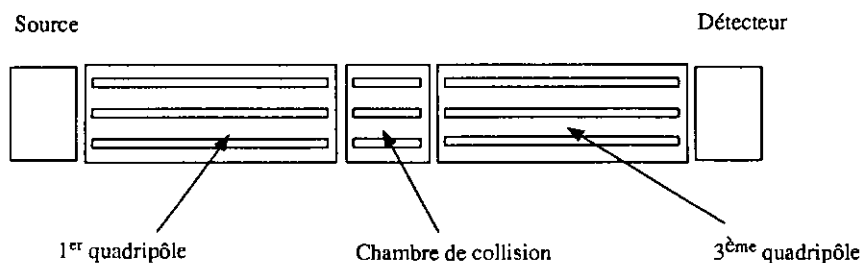
Si nous considérons maintenant le quadripôle globalement, nous constatons que pour une fréquence et une tension donnée, seul un petit nombre d'ions parviendront à franchir le filtre.

En modifiant simultanément la tension continue et la fréquence de la tension modulée, il devient possible de "balayer" un domaine de masses, et ainsi d'enregistrer un spectre.

Le principal avantage du quadripôle sur les autres systèmes vient de la rapidité avec laquelle le balayage des masses peut être effectué. Cette extrême souplesse permet de réaliser plusieurs expériences successives à partir d'un seul échantillon. Ceci autorise ainsi l'étude de plusieurs ions différents en une seule expérience de MS-MS.

#### 7.4 PRESENTATION DE L'APPAREIL NERMAG R 30-10

L'appareil avec lequel nous avons travaillé est un NERMAG R 30-10 [9,10]. C'est un double spectromètre de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse, et permettant une introduction directe des produits dans la source. Il est possible d'étudier ceux-ci par ionisation chimique ou par impact électronique, tant sur les ions positifs que sur les ions négatifs. Le système d'analyse est constitué de trois quadripôles, d'une chambre d'ionisation, d'une chambre de collision (contenant le deuxième quadripôle utilisé exclusivement pour refocaliser les ions) et d'une cellule de détection.



En mode MS simple, les deux premiers quadripôles sont utilisés pour focaliser les ions vers l'entrée du troisième. Seul ce dernier est utilisé pour balayer les masses.

En mode MS-MS, on crée une deuxième fragmentation en introduisant un gaz au niveau du deuxième quadripôle. Les ions qui ont traversé le premier quadripôle entrent en collision avec ce gaz, et subissent une nouvelle fragmentation. Ils peuvent être ensuite analysés à l'aide du quadripôle 3.

Trois types d'analyses peuvent être entreprises: premièrement l'étude des ions descendants formés dans la chambre de collisions à partir d'un ion sélectionné à l'aide du quadripôle 1. Dans ce cas le premier MS sert à sélectionner l'ion et le second sert à balayer les masses des descendants éventuels. Deuxièmement, l'étude des parents d'un ion. Il s'agit de déterminer quels sont les ions qui, lorsqu'ils sont fragmentés produisent un ion donné. Cette fois c'est le premier MS qui balaye et c'est le deuxième qui est fixé sur un  $m/z$  choisi. Troisièmement, la recherche de l'élimination de fragments neutres. Si les deux quadripôles balayent simultanément avec un écart fixe dans les masses balayées (par exemple 18,  $H_2O$  ou 28,  $CO$ ), tout signal indiquera l'élimination d'un fragment neutre d'une masse correspondant à la différence entre les deux quadripôles.

## II ETAT DES RECHERCHES

Dans leur travail de doctorat, Nicollier et Gunzinger ont principalement étudié la fraction contenant les composés depsidiques. Leur méthode de travail a consisté en l'extraction des lichens, puis en la séparation et la purification des produits. Une fois les substances pures isolées, ils ont procédé à l'analyse de celles-ci par résonance magnétique nucléaire, spectrométrie infrarouge ou encore spectrométrie de masse. Certaines structures ont été confirmées par synthèse.

Les travaux de Nicollier et Gavin [2,12] portaient sur *Evernia prunastri* (L.) ACH. Ils ont permis l'identification de nombreux depsides et de quelques triterpènes. Une analyse chromatographique des fractions légères leur a permis d'identifier de nombreux dérivés d'alcanes. La liste des principales substances isolées est présentée ci-dessous.

Orsellinate de méthyle  
Sparassol  
Everninate d'éthyle

Acide orsellinique  
Acide éverninique

$\beta$ -orcinoicarboxylate de méthyle

Rhizoninate de méthyle

Divaricate de méthyle  
Acide divaricaique

Divaricate d'éthyle

Atranol  
Acide haematomique  
Haematomate d'éthyle

Cl-atranol  
Haematomate de méthyle

Orcinol  
Ether monométhyle de l'orcinol  
Ether monométhyle du chlororcinol  
Ether monométhyle du dichlororcinol

$\beta$ -orcinol

Acide évernique  
 Chloratranorine  
 Acide divarique

Atranorine  
 Acide barbatique  
 Acide thamnolique

Evermine  
 Acide lécanorique  
 Méthyle-3'-lécanorate de méthyle

Acide O-méthyl-2'-évernique  
 Acide méthyl-3'-évernique

Acide O-di-Me-4,2''gyrophorique

Acide usnique

Fridéline  
 Nor-29-21 $\alpha$ -hopan-3,22-dione  
 Acide ursolique  
 Lanostérol

Taraxérol  
 Moréténone  
 Lupéol

Le travail de Gunzinger a porté sur *Pseudevernia furfuracea* (L.) ACH [3,13]. Il a permis l'identification des composés suivants:

Haematomate d'éthyle  
 Ac.  $\beta$ -orcinolcarboxylique

$\beta$ -orcinolcarboxylate de Me  
 Acide haematomique

Atranorine  
 Acide olivétorique  
 Acide imbricarique  
 Erythrine

Cl-atranorine  
 Acide lécanorique  
 Acide mycophyllinique

Acide physodique  
 Acide isophysodique

Acide fumarprotocétrarique  
 Acide olivétorique

Acide physodalique  
 Acide Me-2'-O-physodique  
 Me-2-O-physodone

Acide hydroxyphysodique  
 Acide aléctoronique

Acide furfurique

Olivétonide

Le travail de Gunzinger a été complété par Tsoupras dans nos laboratoires. Ce dernier a identifié les composés suivants:

Cholestan-3 $\beta$ -ol  
 Cholest-4-en-3-one

Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol  
 Cholest-8-en-3 $\beta$ -ol

Péroxyde de 9(11)-déhydroergostérol  
 Ergostan-3 $\beta$ -ol  
 Ergost-4-en-3-one  
 Ergost-5,8,22-trien-3 $\beta$ -ol  
 Ergost-5,7,9,22-tetraen-3 $\beta$ -ol  
 4 $\alpha$ -Me-ergost-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol  
 Ergost-5,22-dien-3 $\beta$ -ol  
 Ergost-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol

Péroxyde d'ergostérol  
 Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol  
 Ergost-7-en-3 $\beta$ -ol  
 Ergost-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol  
 Ergost-8,22-dien-3 $\beta$ -ol  
 4 $\alpha$ -Me-ergost-7-en-3 $\beta$ -ol  
 Ergost-7,22-dien-3 $\beta$ -ol

Stigmastan-3 $\beta$ -ol  
 Stigmast-4-en-3-one  
 Stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -ol

Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol  
 Stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol  
 Stigmast-7,22-dien-3 $\beta$ -ol

Notre propos n'est pas de dresser ici la liste de tous les composés isolés dans ces lichens, mais nous présenterons encore quelques substances déjà isolées dans le genre *Cladonia* puisque nous nous sommes penchés sur quelques espèces de celui-ci, ainsi que celles connues dans *Lobaria Pulmonaria* que nous avons étudié par MS-MS.

**Cladonia [13,14,15]**

Acide usnique

Acide protocétrarique

Acide 4-O-déméthylbarbatique

Acide hypoprotocétrarique

Acide rangiformique

Acide fumarprotocétrarique

Acide squamatique

Acide barbatique

Atranorine

Acide Norrangiformique

**Lobaria pulmonaria [13,14,15,51]**

Acide stictique

Acide connorstictique

Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol (ergostérol)Ergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (épiatérol)Ergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (fécostérol)Ergosta-5,8,22-trien-3 $\beta$ -ol (lichestérol)24-méthyl-cholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol24-éthyl-cholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol

Acide constictique

Acide cryptostictique

### III RECHERCHES ENTREPRISES ET BUT DE NOTRE TRAVAIL

#### 8 RECHERCHES ENTREPRISES

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 7, l'introduction, il y a quelques années, de la spectrométrie de masse en tandem ("tandem mass spectrometry") a permis d'envisager une simplification importante de l'analyse de mélanges complexes.

Au cours de notre travail, nous avons essayé d'étudier quelques possibilités d'application de la MS-MS à l'étude des substances naturelles et en particulier à des composés mineurs dans les extraits de lichens.

Nous nous sommes essentiellement intéressés aux problèmes suivants:

##### - Différenciation d'isomères

Lorsque deux composés possèdent la même masse moléculaire et des structures très voisines, leurs spectres de masse sont souvent difficilement différenciables. Il est toutefois des fragments qui, après collision, donnent des spectres différents. Nous avons recherché ces différences pour divers composés de la famille des oléanes et des ursanes.

##### - Etude comparative de fragments

L'identification de composés par comparaison de leurs spectres de collision avec ceux de témoins est une technique qui se voit nettement valorisée par la MS-MS. L'étude des spectres des principaux fragments de la molécule à identifier permet de travailler avec des références provenant de diverses sources. Il n'est plus nécessaire de disposer d'un échantillon témoin, il suffit de posséder les spectres de ses principaux fragments.

#### - Etude mécanistique de la formation d'un ion

Puisqu'il est possible de comparer par MS-MS la structure d'un fragment avec celle d'un témoin, nous nous sommes attachés à prouver la structure de certains ions formés par fragmentation ou réarrangements. A cet effet, nous avons synthétisé un composé qui, après collision, produisait un fragment identique à celui proposé dans le mécanisme. L'étude MS-MS des deux fragments nous a permis de démontrer l'exactitude du chemin de fragmentation proposé.

#### - Identification des principaux composés d'un lichen

Forts du fait que la MS-MS permet d'isoler un ion moléculaire dans un mélange et d'obtenir son spectre, nous avons tenté d'introduire quelques lichens directement dans la source de l'appareil MS-MS sans procéder à une extraction préalable. Cette technique d'analyse a toutefois nécessité de travailler dans des conditions particulières (ionisation chimique, MS-MS des ions négatifs). Nous reviendrons sur celles-ci dans le chapitre qui leur est consacré.

### 9 BUT DU TRAVAIL

- Compléter les travaux de Gunzinger, Nicollier et Gavin en identifiant les composés mineurs de *Evernia prunastri* et *Pseudevernia furfuracea*. On aura ainsi une vue détaillée de la composition chimique de ces lichens très largement répandus.
- Etudier les composés mineurs d'espèces moins répandues (*Cladonia*) pour lesquelles on ne dispose que de petites quantités, en mettant en oeuvre des techniques comme la GC-MS, la HPLC etc.
- Etudier la possibilité d'utiliser la MS-MS pour l'analyse directe des lichens

**EVERNIA PRUNASTRI (L.) Ach.**

#### IV EVERNIA PRUNASTRI (L.) Ach.

##### 10 PROCEDURE D'ANALYSE

Les schémas des pages suivantes donnent un aperçu des manipulations réalisées pour isoler les composés d'*Evernia Prunastri* que nous avons étudiés. L'analyse détaillée de ces divers produits est présentée aux chapitres 12 à 19. La partie expérimentale est présentée en détail au chapitre 31.

##### 10.1 FRACTION INSOLUBLE DANS L'ETHER

C'est la fraction quantitativement la plus importante. Elle avait déjà été étudiée précédemment [2]. Nous avons rapidement analysé ses composants en  $^1\text{H-NMR}$ .

##### 10.2 FRACTION ACIDE

La fraction acide de la partie soluble dans l'éther de la concrète a permis l'identification de plusieurs depsides déjà étudiés par Nicollier [2] et de deux acides de la famille des hopanes.

##### 10.3 FRACTION NEUTRE

La fraction neutre est de loin celle qui a le plus retenu notre attention. Nous l'avons étudiée à partir de différents extraits car il nous est apparu que le type de solvant utilisé pour l'extraction avait une influence directe sur les types de produits isolés.

La fraction neutre de la concrète benzénique nous a permis d'identifier plusieurs triterpènes, notamment par GC-MS.

##### 10.4 NOUVEL EXTRAIT DE LICHEN FRAIS

Les depsides étant les composés les plus abondants dans les lichens, nous avons choisi de travailler sur un nouvel extrait réalisé à l'éther. Nous avons ainsi évité d'extraire les depsides et avons obtenu une fraction plus riche en terpènes que la fraction tirée de la concrète benzénique. Une dizaine de produits ont ainsi pu être identifiés.

##### 10.5 EXTRAIT AU CHLOROFORME

Ayant constaté la très grande solubilité de la plupart de nos composés dans le chloroforme, nous avons choisi de traiter notre lichen avec ce solvant. Nous avons ainsi pu identifier 4 autres terpènes.

## Schéma d'extraction I

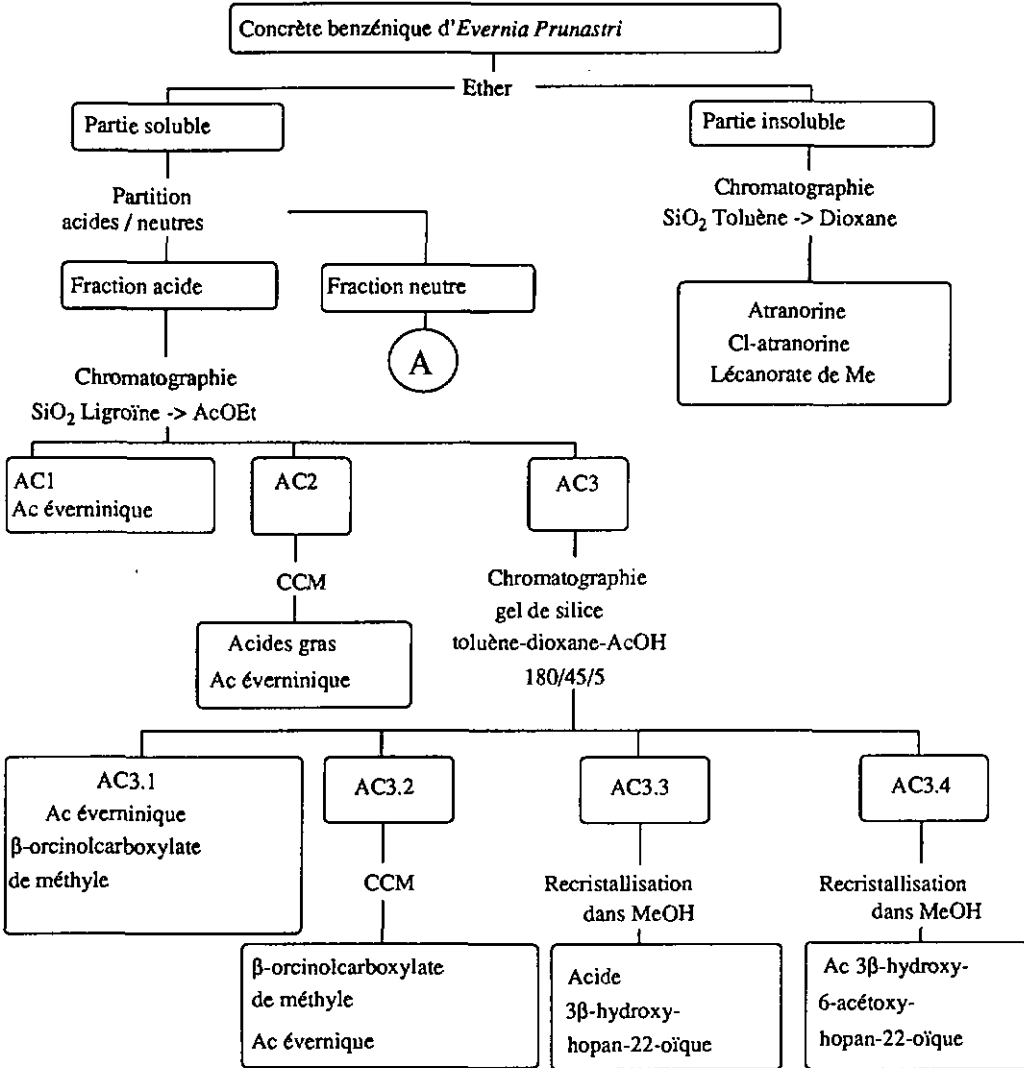


Schéma d'extraction 2

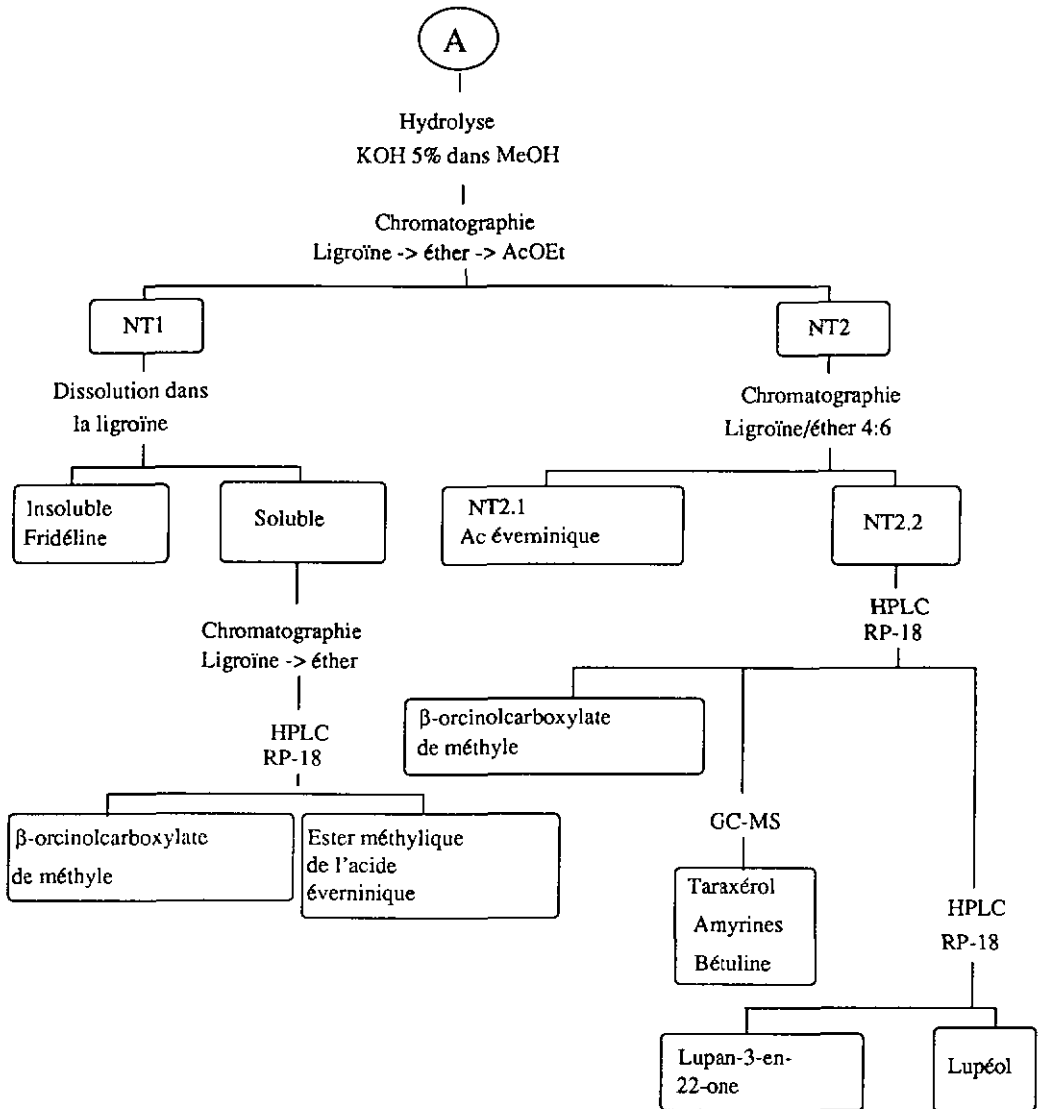


Schéma d'extraction 3

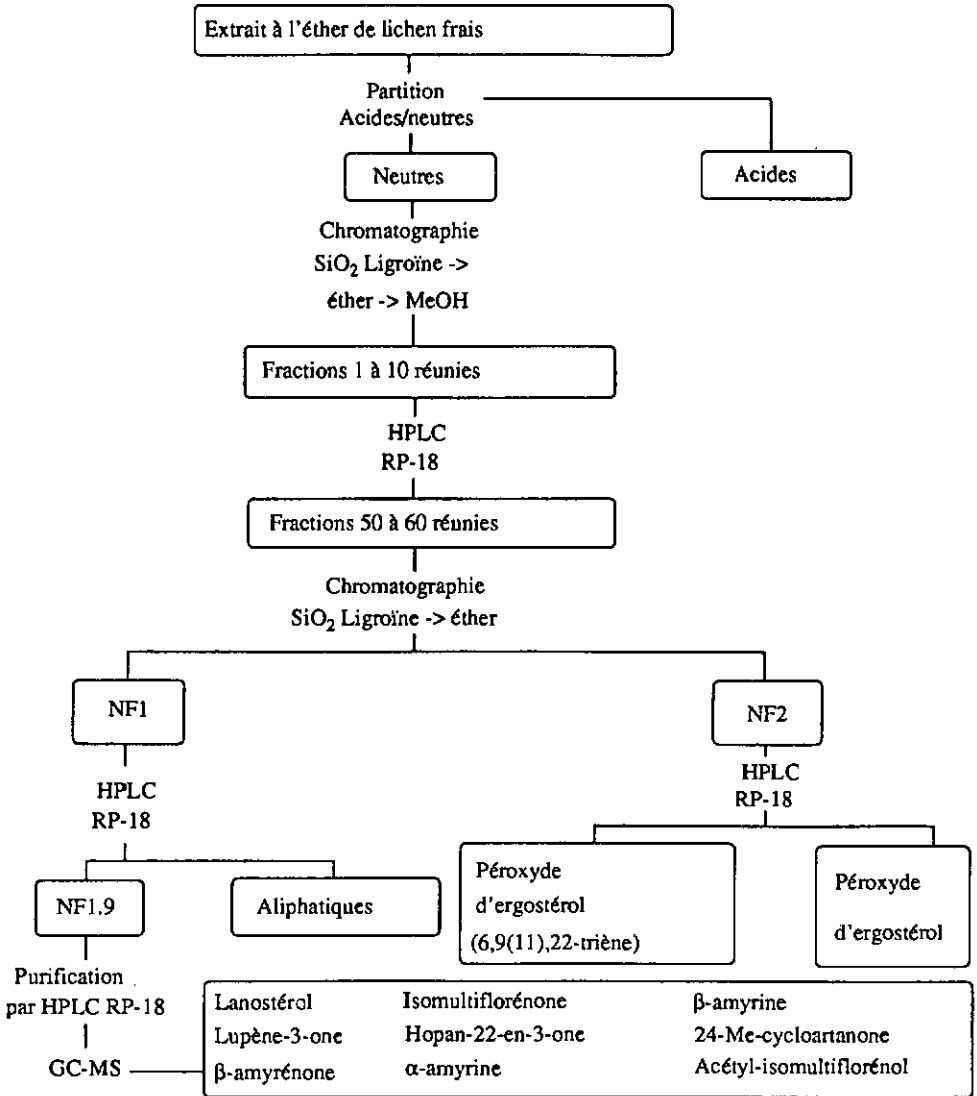
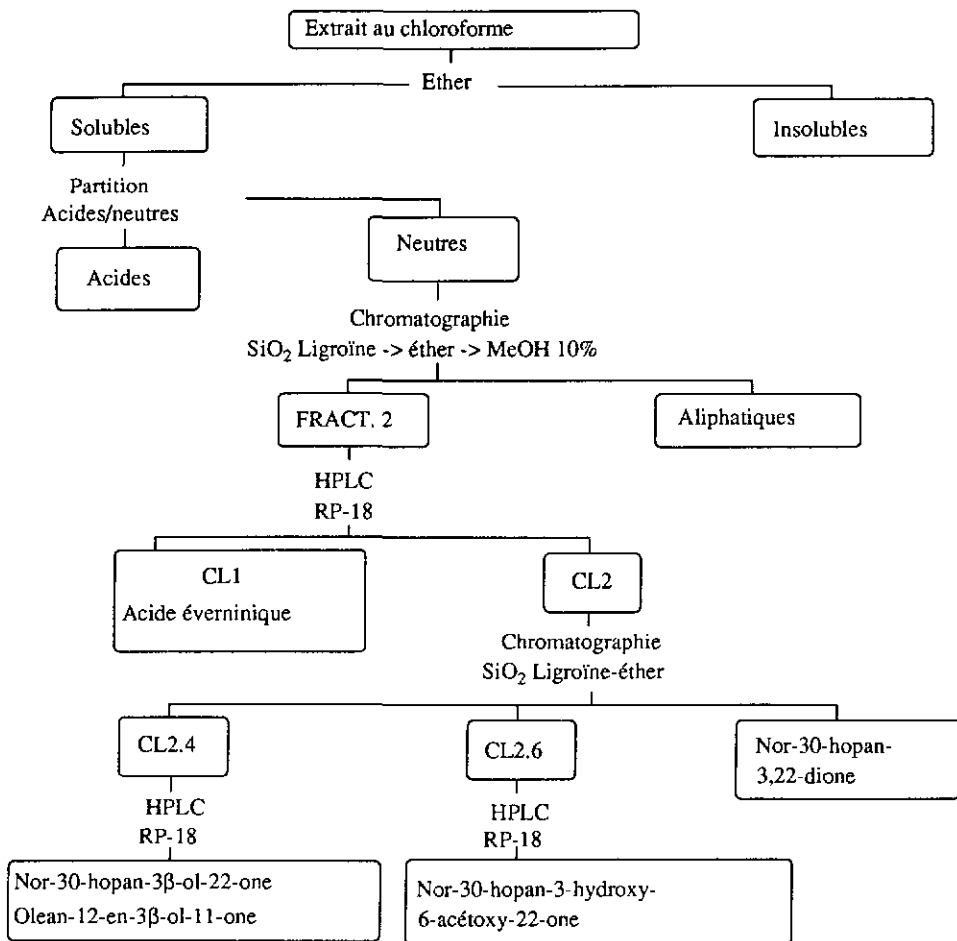


Schéma d'extraction 4



11 ANALYSE DE LA FRACTION AC3.3

Lors de la solubilisation de celle-ci dans du MeOH, un produit blanc a précipité. Nous l'avons recueilli et nous avons enregistré son spectre  $^1\text{H-NMR}$ . Comme nous pouvons le voir à la figure 11.1, celui-ci indique la présence de nombreux méthylènes et de plusieurs méthyles.

Spectre  $^1\text{H-NMR}$  du produit

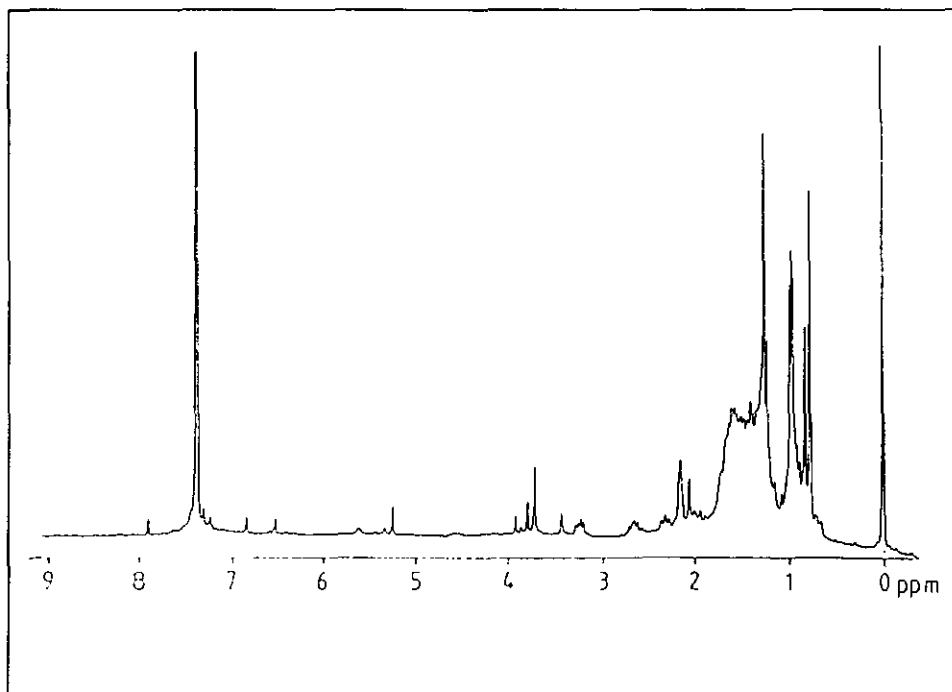


Figure 11.1

La présence d'un multiplet à 3.22 ppm ainsi que les déplacements chimiques des méthyles nous ont fait penser à rapprocher notre spectre de celui du dihydroxy-3 $\beta$ ,22 hopane. Le tableau ci-dessous donne une comparaison des déplacements chimiques des méthyles de notre produit avec ceux du produit précité [16].

Tableau comparatif des déplacements chimiques des méthyles

	4 $\alpha$	4 $\beta$	8 $\beta$	10 $\beta$	14 $\alpha$	18 $\alpha$
Référence	0.766	0.816	0.966	0.966	0.966	0.766
Produit	0.762	0.800	0.950*	0.955*	0.975	0.762

\*Peuvent être intervertis.

De manière à mieux cerner la structure de notre substance, nous avons étudié celle-ci par spectrométrie de masse. Dans un premier temps, les spectres d'ionisation par impact électronique (figure 11.2) et par ionisation chimique (NH<sub>3</sub>), ont été enregistrés.

## Spectre MS EI du produit

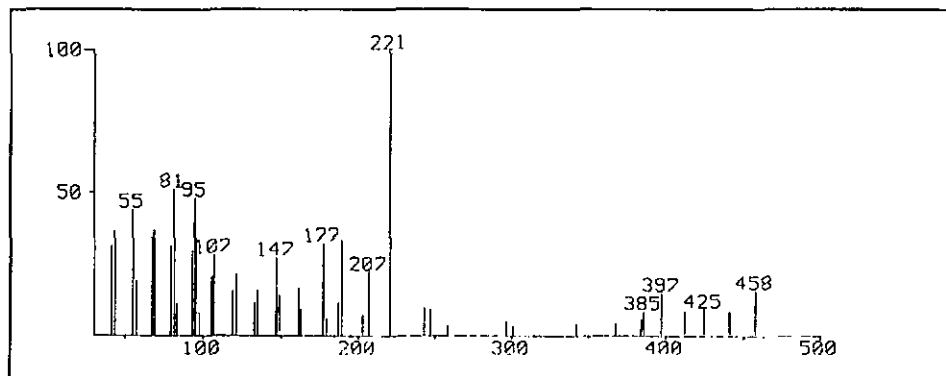


Figure 11.2

Les deux spectres mettent en évidence le fait que le produit à un PM de 458 et qu'il se fragmente pour donner principalement m/z 221.

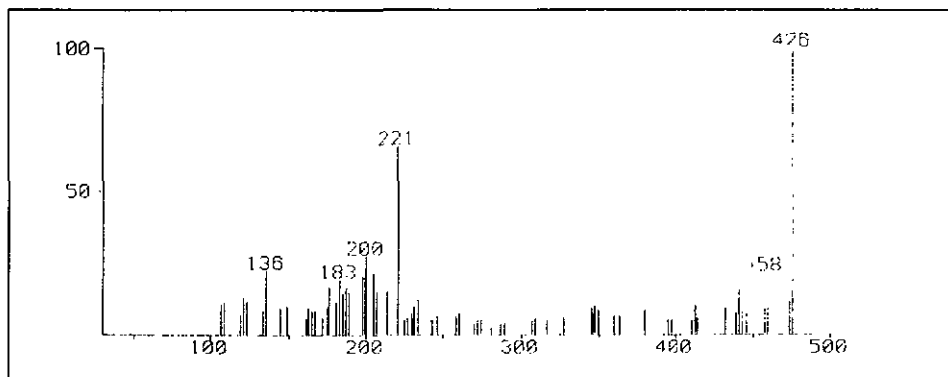
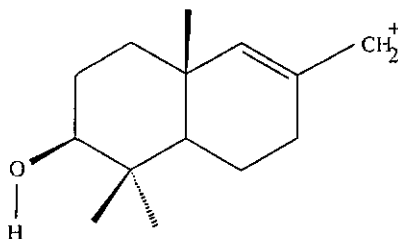
Spectre MS CI ( $\text{NH}_4^+$ ) du produit

Figure 11.3

Les signaux à  $m/z$  207 et  $m/z$  189 ont également retenu notre attention puisqu'ils sont caractéristiques d'un fragment ayant pour structure :



La présence de ces deux ions confirme la fonction hydroxyle sur le carbone C(3), qui nous avait déjà été suggérée par le multiplet à 3,22 ppm sur le spectre  $^1\text{H-NMR}$ .

Malgré ces quelques indications, il est très difficile de postuler une structure. Nous avons aussi procédé à une étude du composé par MS-MS.

Nous avons premièrement enregistré le spectre des descendants de  $m/z$  221. Ce dernier est représenté à la figure 11.4.

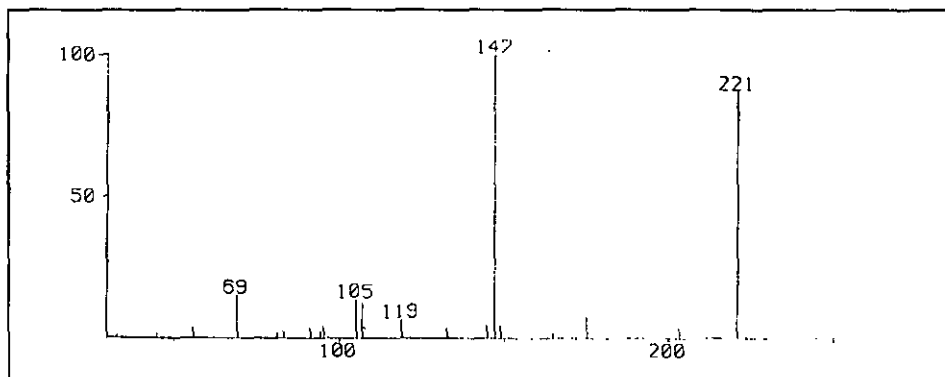
Descendants de  $m/z$  221 du produit

Figure 11.4

Deux éléments sont à retenir:

- Les fragments  $m/z$  207 et 189 ne descendent pas de  $m/z$  221.
- $m/z$  221 perd 74 unités de masse lorsqu'il se fragmente.

La première remarque implique que le fragment correspondant à  $m/z$  221 ne provient pas de la même partie de la molécule que celle qui est à l'origine des  $m/z$  207 et 189.

La perte de 74 unités de masse, elle, est caractéristique d'une fonction acide en position alpha par rapport à un méthyle.

Nous avons enregistré le spectre des parents de  $m/z$  221 pour établir la paternité de celui-ci.

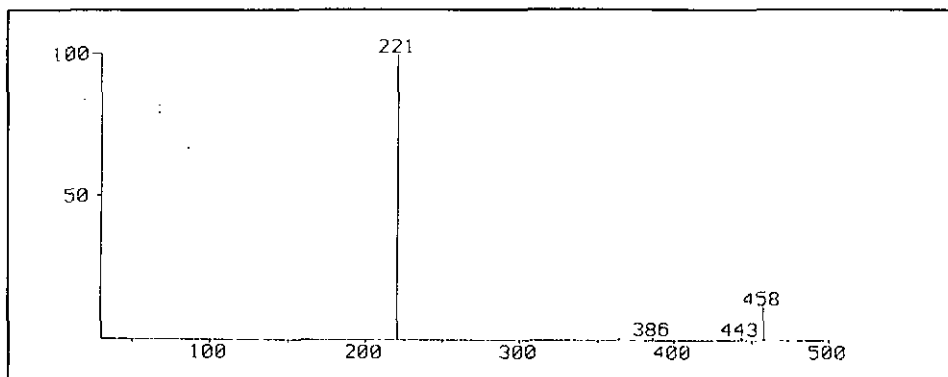
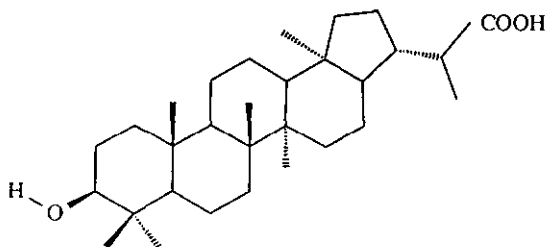
Parents de  $m/z$  221 du produit

Figure 11.5

Il montre sans équivoque que  $m/z$  221 est formé directement à partir du pic moléculaire.

L'étude des données réunies au travers des expériences réalisées jusqu'ici suggère que notre produit doit avoir la structure de base de l'hopane avec des cycles A et B identiques et une fonction acide sur un des cycles D ou E.

La perte de 74 unités de masse depuis  $m/z$  221 ainsi que l'importance de cette perte par rapport aux fragmentations concurrentes nous induit à postuler que la fonction acide doit être fixée sur la chaîne latérale du squelette, sur le carbone 22. Nous proposons donc la structure suivante.



Nous avons encore démontré la parenté des ions  $m/z$  207 et  $m/z$  189 en enregistrant les spectres des descendants du  $m/z$  458. (figure 11.6).

#### Descendants de $m/z$ 458 du produit

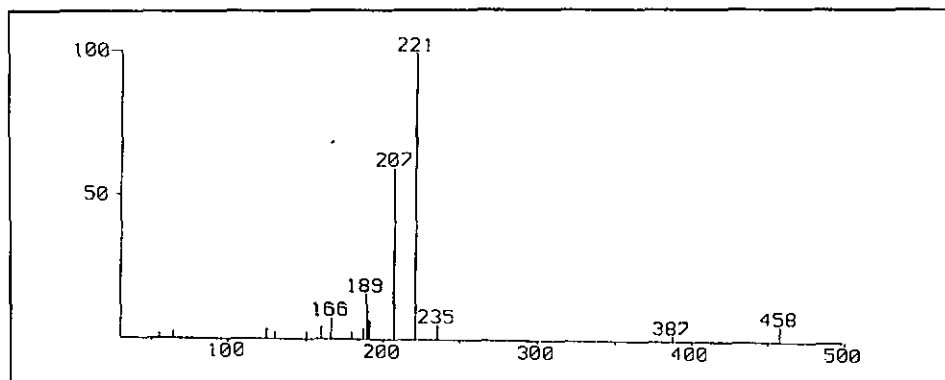


Figure 11.6

Le spectre obtenu est très clair puisque les ions  $m/z$  221,  $m/z$  207 et  $m/z$  189 y sont tous présents.

Nous avons étudié le spectre de collision de l'ion  $m/z$  189. Nous l'avons rapproché des spectres de  $m/z$  189 réalisés lors de l'étude des amyriines (chapitre 13). Les faibles différences montrent que l'ion  $m/z$  189 de ces dernières est principalement formé à partir des cycles A et B.

Nous nous sommes encore attachés à démontrer que dans le cas présent l'ion  $m/z$  189 descendait bien de l'ion  $m/z$  207 en enregistrant le spectre des parents de  $m/z$  189 (figure 11.8).

## Descendants de m/z 189 du produit

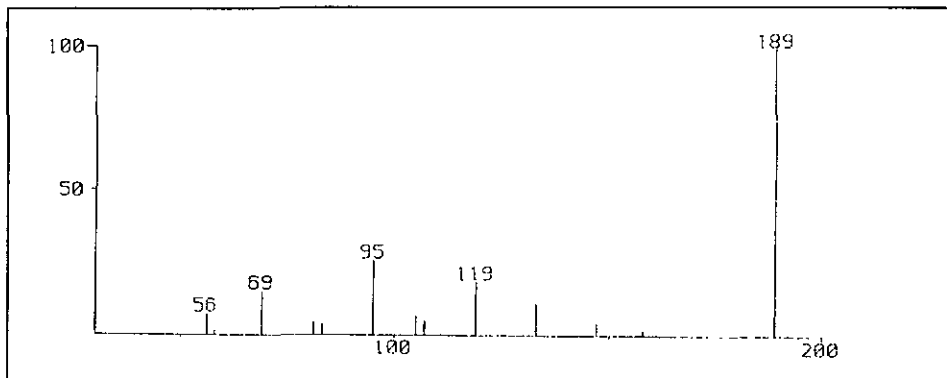


Figure 11.7

## Parents de m/z 189 du produit

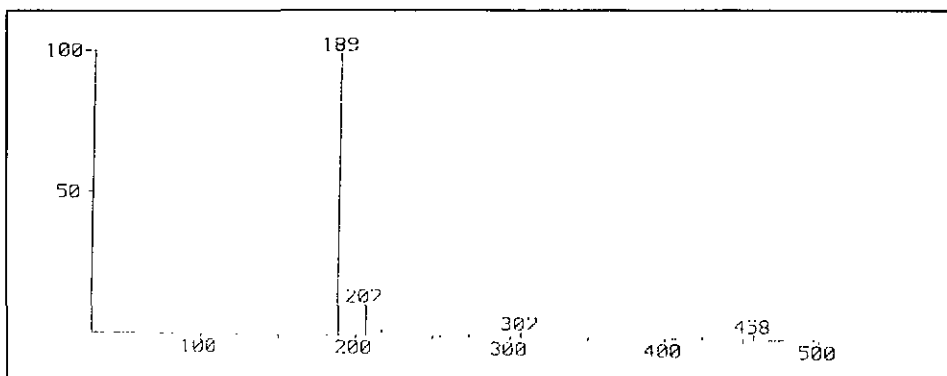


Figure 11.8

En conclusion, nous pouvons dire que notre produit a un squelette de base voisin de celui du lupéol selon la  $^1\text{H-NMR}$ , que les cycles A et B sont confirmés par la présence du fragment à m/z 207 et que ce fragment conduit à m/z 189 par perte d'eau. L'hydroxyle en position 3 est confirmé par le multiplet à 3.22 ppm en  $^1\text{H-NMR}$ .

Le signal à  $m/z$  221 correspond aux cycles D et E. Ce fragment conduit à  $m/z$  147 par perte de la fonction acide  $\alpha$ -méthylée. Le proton sur le carbone C(22) donne un multiplet en  $^1\text{H-NMR}$  à 2.67 ppm. Le méthyle voisin de l'acide donne un doublet à 1.24 ppm, la partie gauche de ce doublet étant cachée sous le signal à 1.28 ppm.

Cette attribution des multiplets a été faite après diverses expériences d'irradiation en  $^1\text{H-NMR}$ . Les spectres correspondants sont détaillés aux figures 11.9 à 11.11.

Irradiation du proton en  $\alpha$  de l'hydroxyle en 3

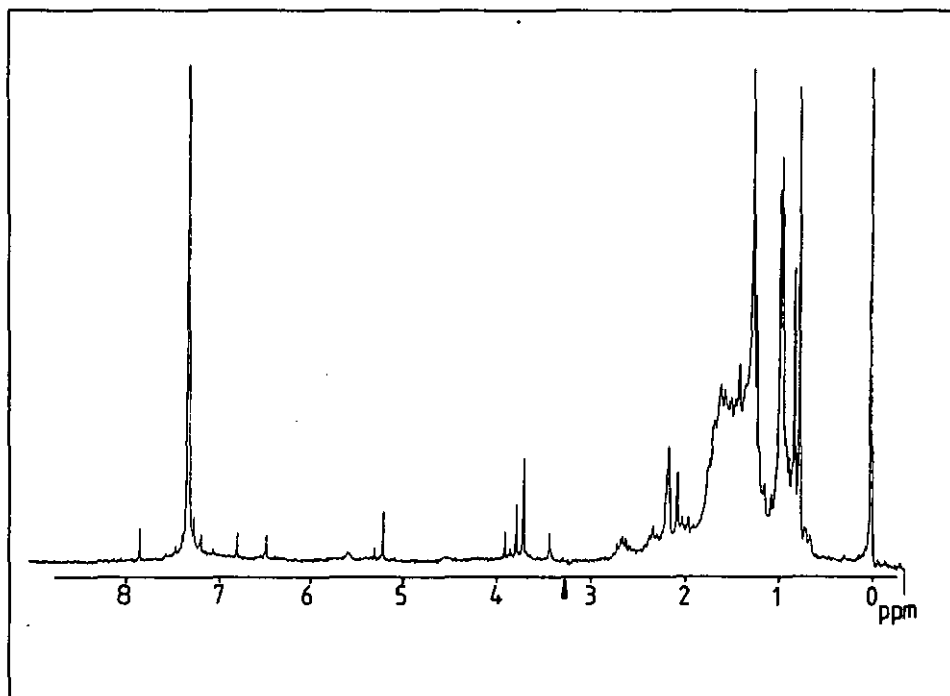


Figure 11.9

La figure 11.9 montre le spectre obtenu lorsqu'on irradie le proton en  $\alpha$  du groupe hydroxyle (à 3.2 ppm). Comme aucun méthyle n'est directement lié au carbone porteur de ce proton, aucune influence de l'irradiation n'est perçue. Seul le  $-\text{CH}_2-$  voisin doit en ressentir l'effet, mais le nombre important

de signaux présents entre 0.5 et 2 ppm couvre son signal.

Nous avons également irradié le proton en  $\alpha$  du méthyle voisin de l'acide (2.67 ppm). Cette fois (figure 11.10), le signal à 1.24 ppm disparaît et un très léger épaulement apparaît sur la droite du signal à 1.28 ppm.

L'expérience inverse, irradiation du signal à 1.24 ppm, a pour effet de transformer le multiplet à 2.67 ppm en un doublet. Ceci confirme notre hypothèse.

Irradiation du proton à 2.67 ppm

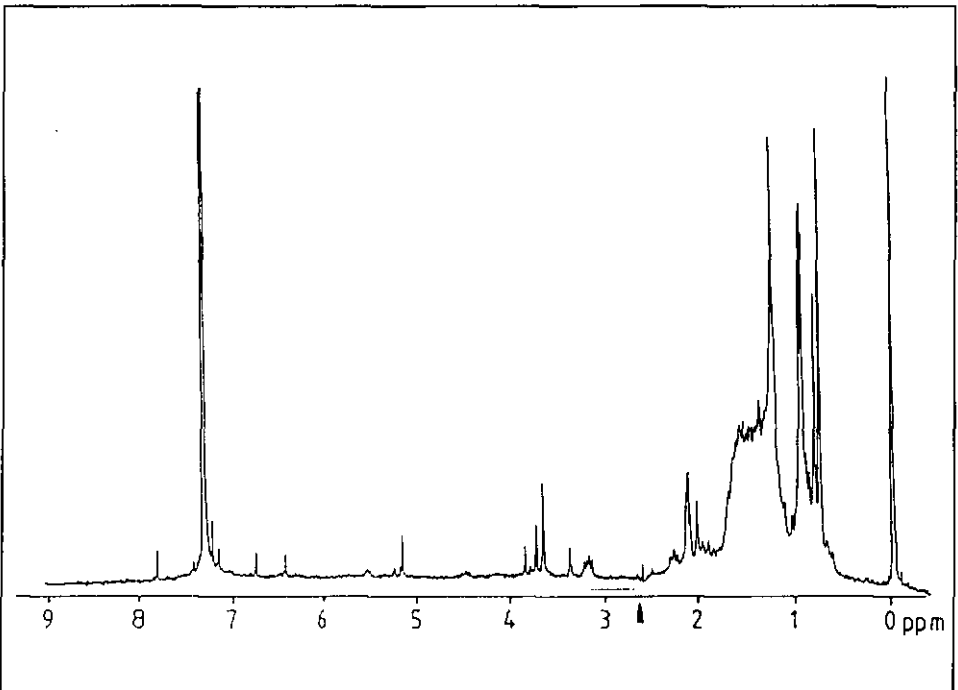


Figure 11.10

Irradiation du méthyle à 1.24 ppm

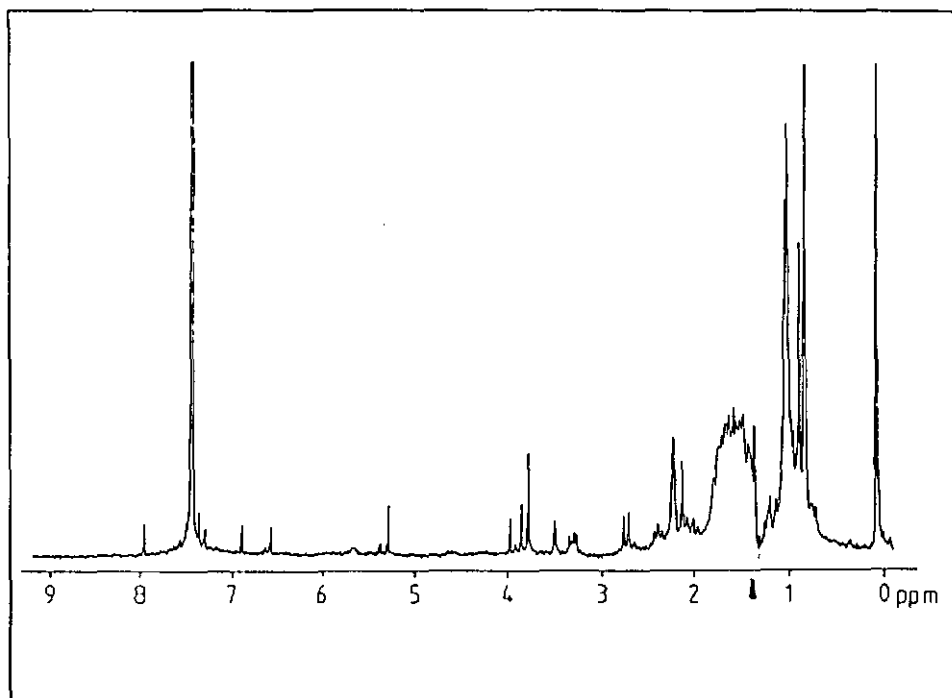


Figure 11.11

Nous pouvons donc dire en conclusion que notre produit répond bien à la structure proposée plus haut puisque la présence de la fonction acide sur la chaîne latérale est confirmée aussi bien par l'étude par spectrométrie de masse que par l'étude par  $^1\text{H-NMR}$ . La substitution des cycles A et B, pour sa part est confirmée par la comparaison des spectres de collision du  $m/z$  189 avec ceux obtenus dans le cadre de l'étude des alpha et bêta amyriines. Le choix de l'appartenance de notre substance à la famille des hopanes ou des lupanes a été dicté par le déplacement chimique du méthyle C(28) qui est de 0.76 ppm pour la famille des hopanes [16] et de 0.93 ppm pour la famille des lupanes [17].

Nous avons encore complété notre étude par l'enregistrement d'un spectre infrarouge (figure 11.12).

### Spectre infrarouge du produit

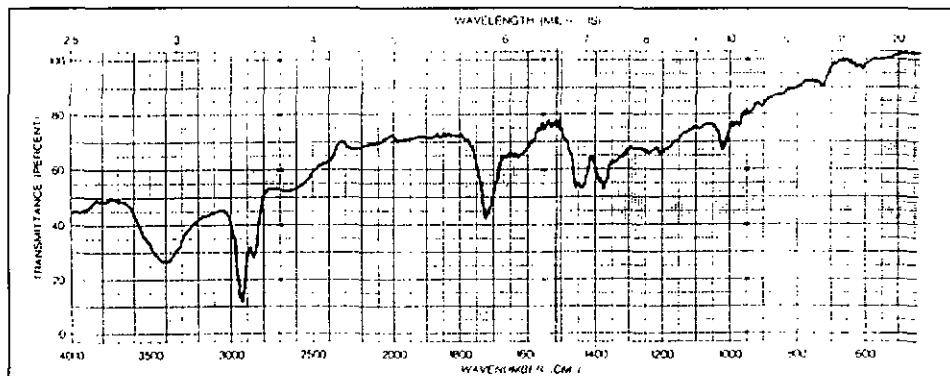


Figure 11.12

La fonction acide est confirmée par les bandes à  $3400\text{ cm}^{-1}$  et le carbonyle à  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Les bandes entre  $3000$  et  $2800\text{ cm}^{-1}$  sont caractéristiques d'un squelette carboné ( $-\text{CH}_2-$ ). Les méthyles sont bien visibles au travers des bandes entre  $1470$  et  $1360\text{ cm}^{-1}$ .

## 12 ANALYSE DE LA FRACTION AC3.4

De la fraction AC3.4, nous avons recueilli par précipitation un produit blanc que nous avons purifié par HPLC (RP-18 MeOH/H<sub>2</sub>O 90-100% MeOH en 30 minutes). Nous avons ainsi obtenu une substance cristalline que nous avons étudiée par <sup>1</sup>H-NMR (figure 12.1) et par spectrométrie de masse (figure 12.2 et 12.3).

Spectre <sup>1</sup>H-NMR du produit

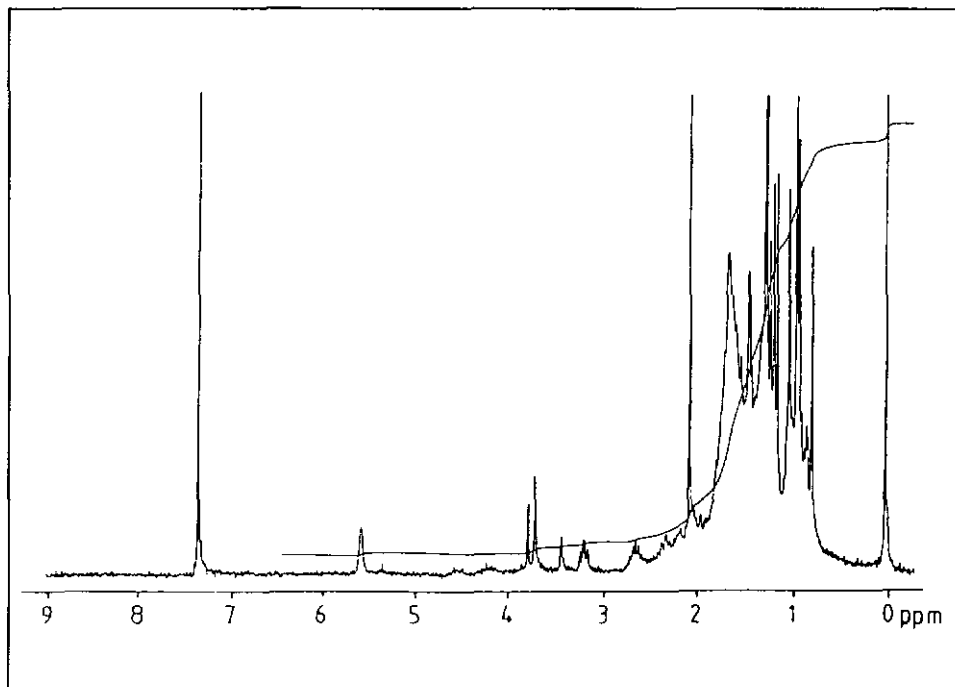


Figure 12.1

Ce spectre ressemble à celui de la fraction CL2.6. Les valeurs des déplacements chimiques des principaux signaux des deux produits sont présentées dans le tableau ci-dessous.

	C(28)	C(25)	C(27)	C(26)	C(24)	C(23)		C(29)
CL2.6	0.67	0.87	0.91	0.98	1.12	1.15	2.02	2.125
AC3.4	0.76	0.87	0.90	0.98	1.12	1.14	2.03	----

Cette comparaison montre que les deux produits doivent avoir des structures très proches. En effet, tous les méthyles ont des déplacements chimiques identiques sauf celui en C(28) qui a un déplacement chimique plus élevé dans le cas de notre nouveau produit. De plus, le signal correspondant au méthyle en C(29) n'est pas présent dans le spectre de la fraction AC3.4. Un nouveau signal apparaît par contre vers 1.25 ppm. Nous pouvons ainsi supposer que le produit isolé doit avoir la même structure que le produit de la fraction CL2.6 avec un substituant sur le cycle E, cette modification ayant pour effet de remplacer le signal à 2.12 ppm par un signal à 1.25 ppm.

De manière à pouvoir mieux cerner notre structure, nous avons enregistré les spectres de masse (EI et CI) (figures 12.2 et 12.3).

## Spectre de masse du produit par impact électronique

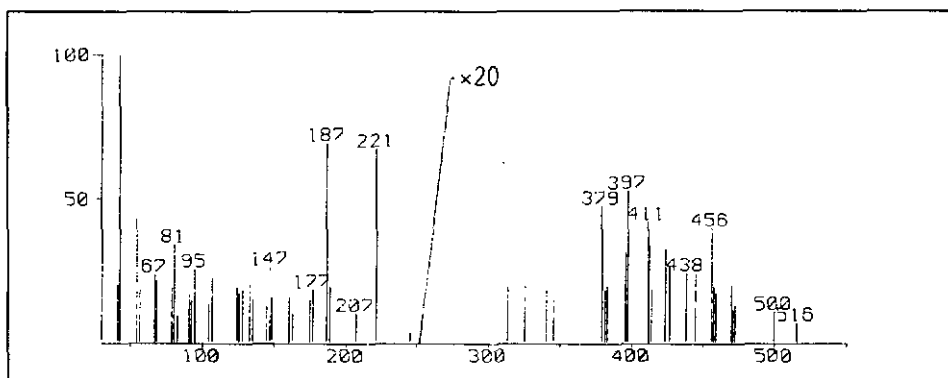


Figure 12.2

D'après ces spectres, on peut conclure que le PM est de 516. Les ions  $m/z$  187 et  $m/z$  221 ont retenu notre attention. Le premier correspond au fragment obtenu dans la fraction CL2.6 à partir des cycles A et B après élimination d' $H_2O$  et de  $CH_3COOH$ . Le second avait été identifié dans la fraction AC3.3 comme correspondant aux cycles D et E d'un triterpène de type hopane substitué en C(22) par une fonction acide.

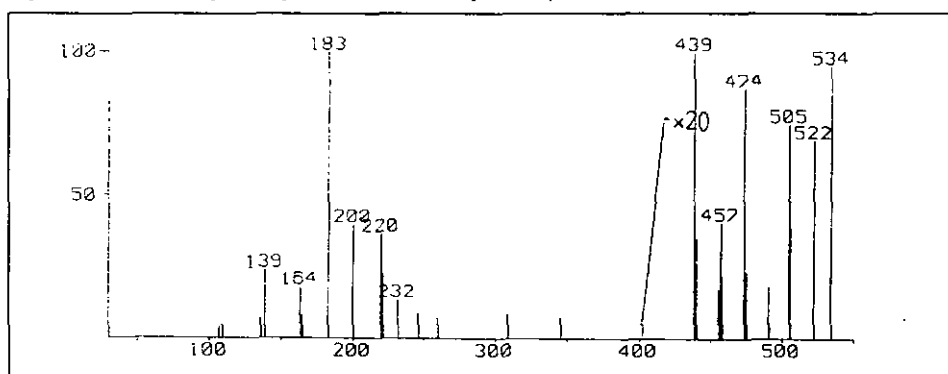
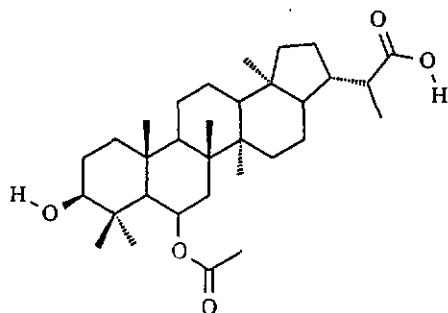
Spectre de masse du produit par ionisation chimique ( $NH_4^+$ )

Figure 12.3

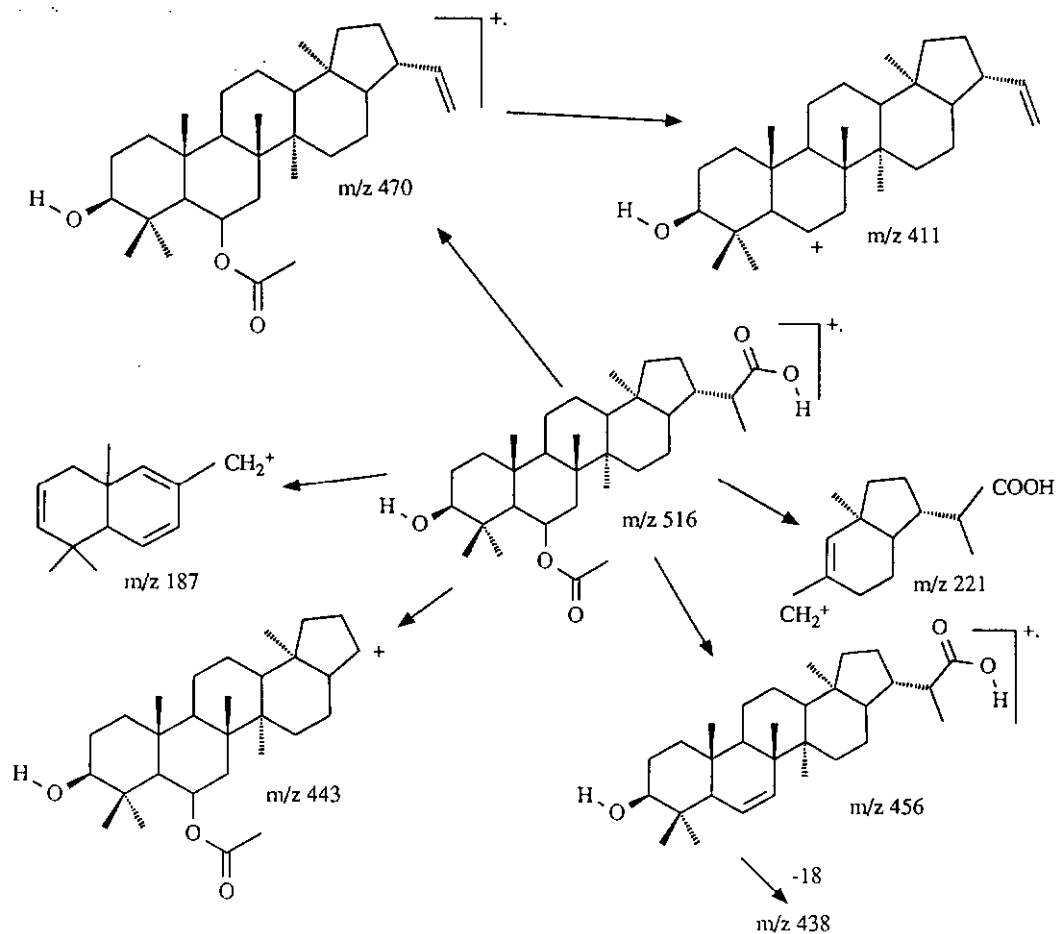
Sur la base de ces considérations, nous proposons donc la structure suivante pour le composé isolé. Il s'agit d'un nouveau triterpène naturel.



Une étude plus approfondie du spectre de masse de la figure 2 nous permet de constater que la perte attendue de 74 unités de masse depuis le fragment  $m/z$  221 conduit à  $m/z$  147. Cette perte est analogue à celle observée pour l'acide 3 $\beta$ -hydroxy-hopan-29-oïque décrit dans la fraction AC3.3.

La présence de l'acide est également confirmée par une perte de 46 unités de masse depuis  $m/z$  516 ( $\rightarrow m/z$  470), et l'élimination de 60 unités de masses depuis  $m/z$  516 pour arriver à  $m/z$  456.

Relevons la perte de 18 unités de masse ( $H_2O$ ) depuis  $m/z$  456 ( $\rightarrow m/z$  438), ainsi que la perte de 59 unités de masse depuis  $m/z$  456 ( $\rightarrow m/z$  397). Ce dernier ion peut donner  $m/z$  379 par élimination d'eau. La perte de 59 unités de masse correspond à l'élimination du substituant en position 6. Les diverses fragmentations présentées ci-dessus sont illustrées ici.

Fragmentation du produit de la fraction AC3.4

Nous avons procédé pour ce produit aux mêmes irradiations en  $^1\text{H-NMR}$  que pour la fraction AC3.3, les résultats obtenus confirmant une fois encore la structure proposée.

### 13 DIFFÉRENCIATION DE L' $\alpha$ -AMYRINE DE LA $\beta$ -AMYRINE PAR MS-MS

Dans le cadre de notre étude de l'extrait d'*Evernia prunastri* frais par GC-MS, nous avons identifié notamment l' $\alpha$ -amyrine et la  $\beta$ -amyrine [18-21]. Ces deux composés donnent des spectres MS identiques. Nous nous sommes ainsi intéressés à différencier ces isomères par MS-MS.

#### Spectre MS simple de l' $\alpha$ -amyrine

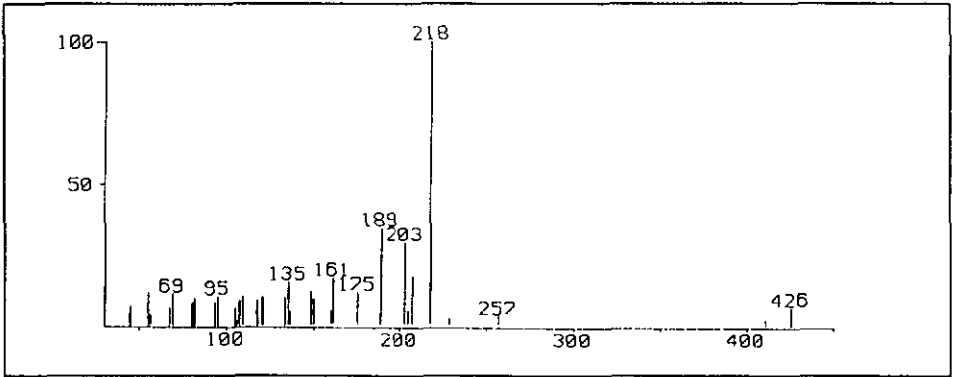


Figure 13.1

#### Spectre MS simple de la $\beta$ -amyrine

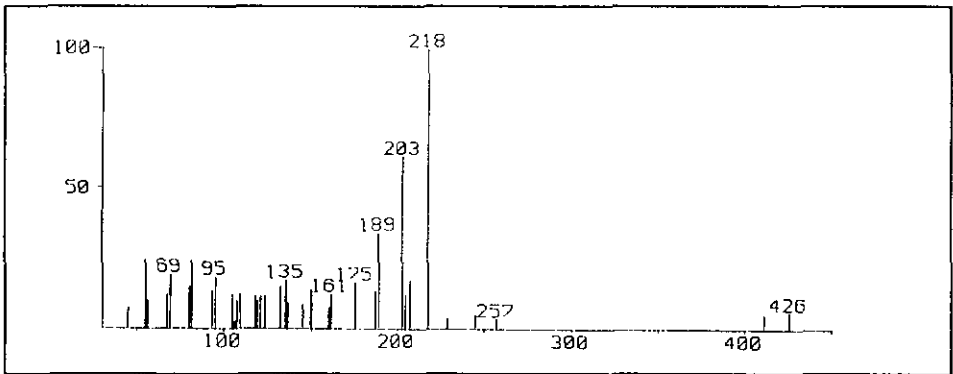
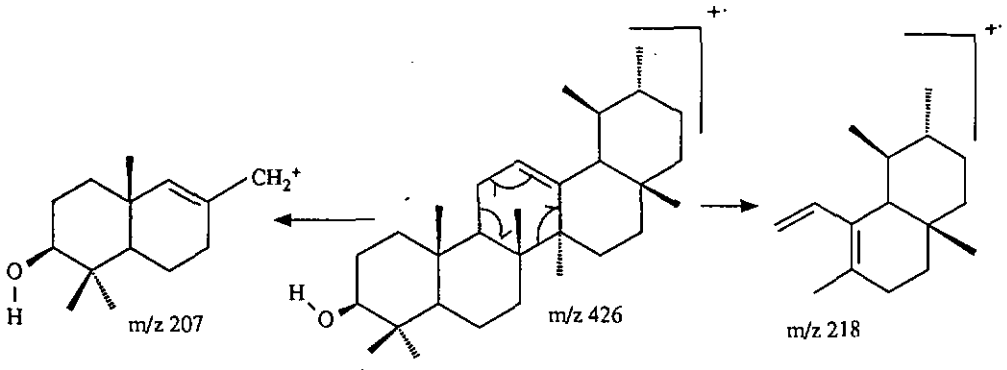


Figure 13.2

Les spectres des deux composés sont présentés aux figures 13.1 et 13.2. La même fragmentation domine dans les deux cas, traduite essentiellement par la formation de  $m/z$  218 selon le schéma suivant (pour l' $\alpha$ -amyrine).



Vu la différence de substitution du cycle E, les deux fragments sont bien de masse identique, et donnent tous deux un signal à  $m/z$  218, mais ils doivent être de structures différentes. Nous nous sommes donc attachés à enregistrer les spectres de collision des deux  $m/z$  218. Les spectres obtenus sont illustrés aux figures 13.3 et 13.4.

#### Spectre MS-MS du $m/z$ 218 de l' $\alpha$ -amyrine

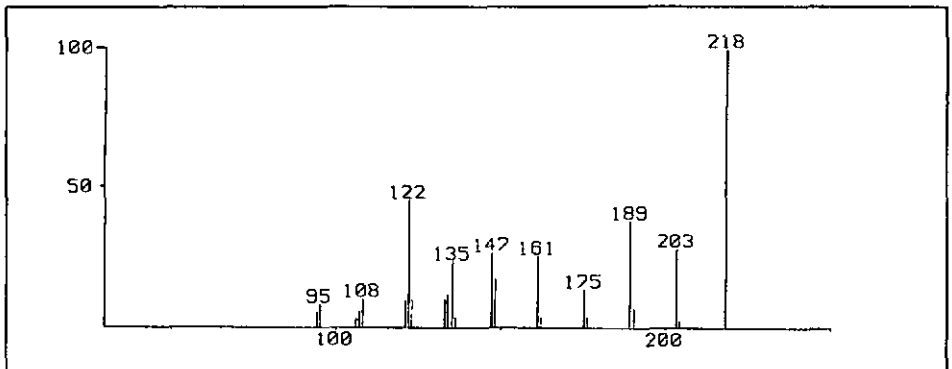


Figure 13.3

Conformément à ce que nous avons prévu, ces spectres montrent une différence marquée aux niveaux des ions 122 et 94. Les autres signaux se recourent, ce qui ne saurait nous surprendre étant donné la grande similitude des deux fragments.

Spectre MS-MS de  $m/z$  218 de la  $\beta$ -amyrine

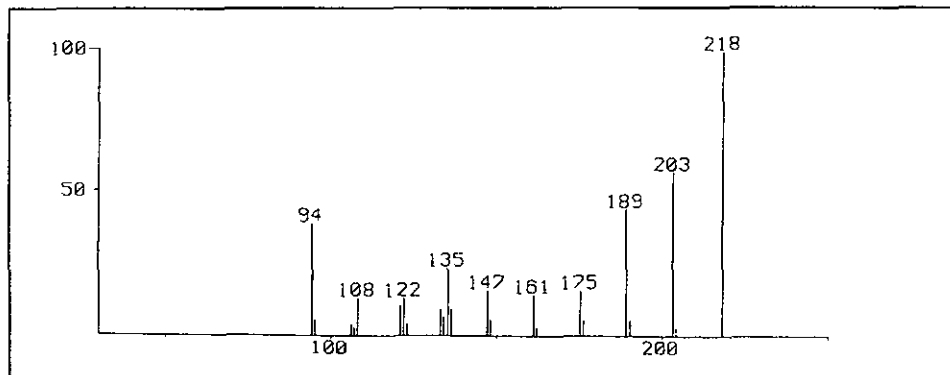
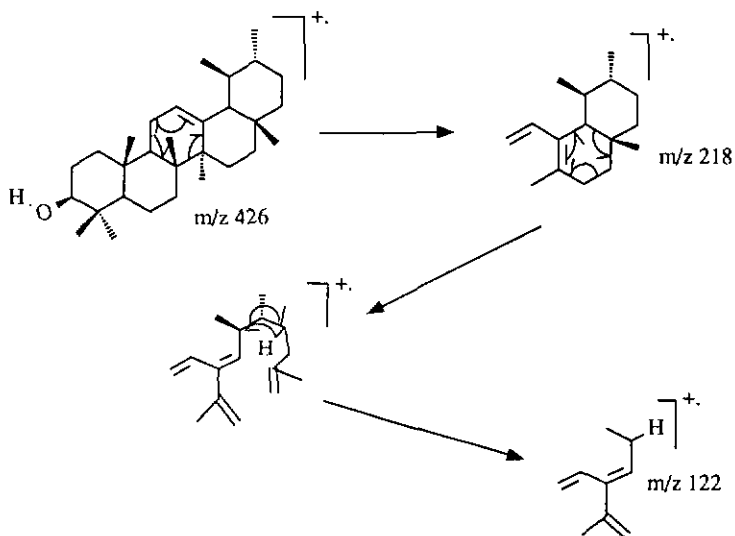
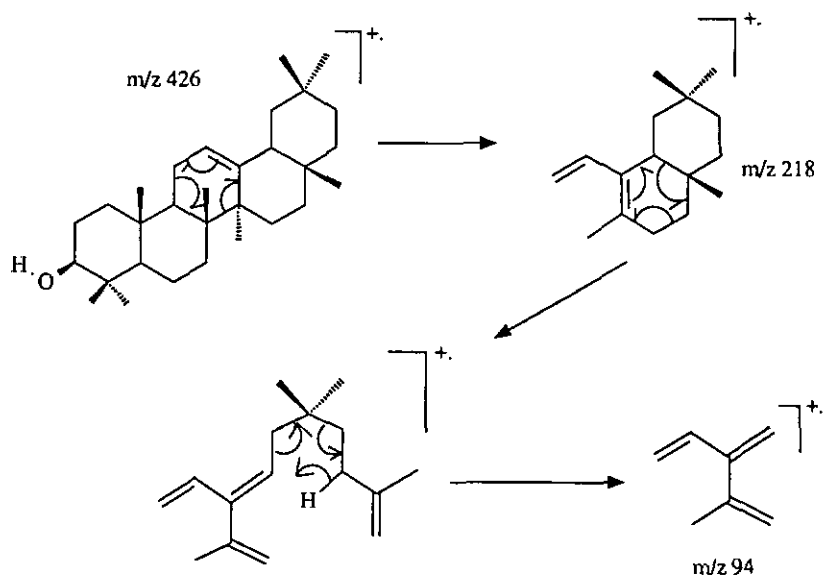


Figure 13.4

La fragmentation proposée pour expliquer la formation de l'ion  $m/z$  122 dans le cas de l' $\alpha$ -amyrine est la suivante:



Dans le cas de la  $\beta$ -amyrine, un mécanisme similaire conduit à la formation du fragment  $m/z$  94:



Dans le cadre des mécanismes que nous avons présentés, nous avons expliqué la formation de  $m/z$  189 à partir de  $m/z$  207 (p 41). Il est important de relever qu'un autre mécanisme est également proposé [22] qui, génère le fragment à  $m/z$  189 à partir du  $m/z$  218. Nous avons complété l'étude des deux composés en enregistrant les spectres de collision des fragments  $m/z$  189 des deux produits. Selon le mécanisme partant de l'ion  $m/z$  207, les fragments doivent être identiques. Le mécanisme décrit [22], par contre, doit conduire à deux spectres différents pour l' $\alpha$ -amyrine et pour la  $\beta$ -amyrine. Les spectres obtenus sont donnés aux figures 13.5 et 13.6. Ils présentent une grande similitude de fragments.

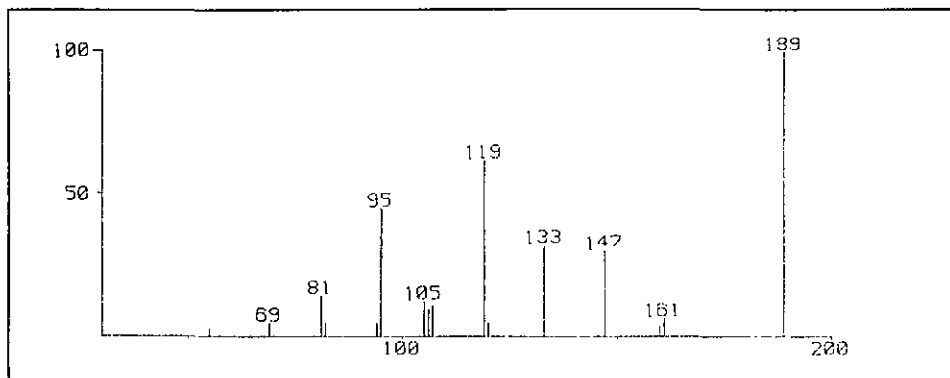
Spectre de collision de  $m/z$  189 de l' $\alpha$ -amyrine

Figure 13.5

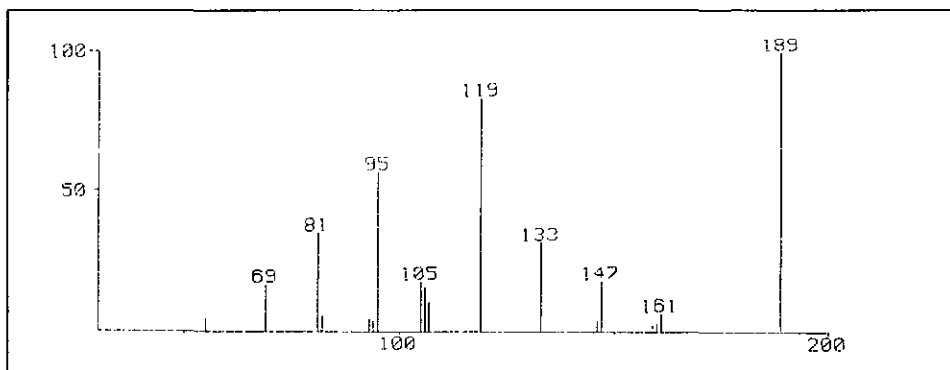
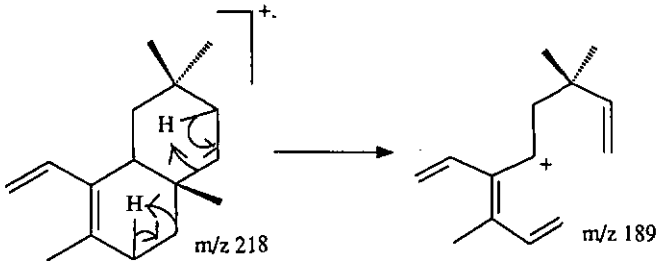
Spectre de collision de  $m/z$  189 de la  $\beta$ -amyrine

Figure 13.6

Pour plus de clarté, nous reproduisons ci-dessous le mécanisme de fragmentation proposé par H. Budzikiewicz et al. [22] pour expliquer l'ion  $m/z$  189.



L'enregistrement des spectres de masse des descendants des fragments  $m/z$  207 et  $m/z$  218 montre bien que tous deux donnent naissance à un fragment  $m/z$  189. Ces spectres sont présentés dans les deux figures 13.7 et 13.8.

#### Descendants de $m/z$ 207

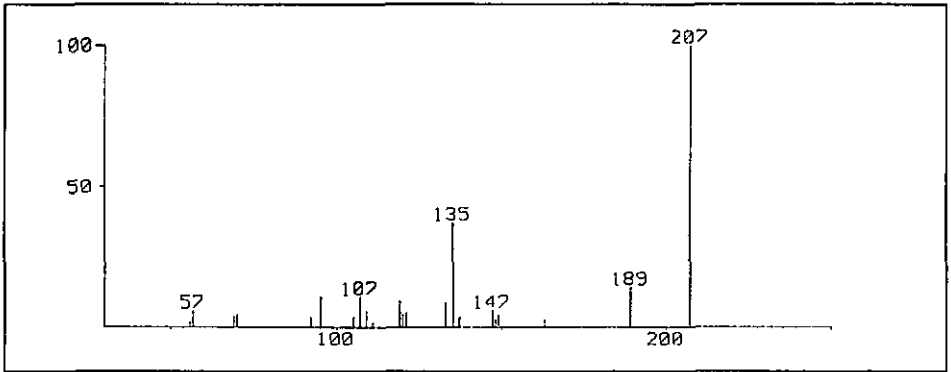


Figure 13.7

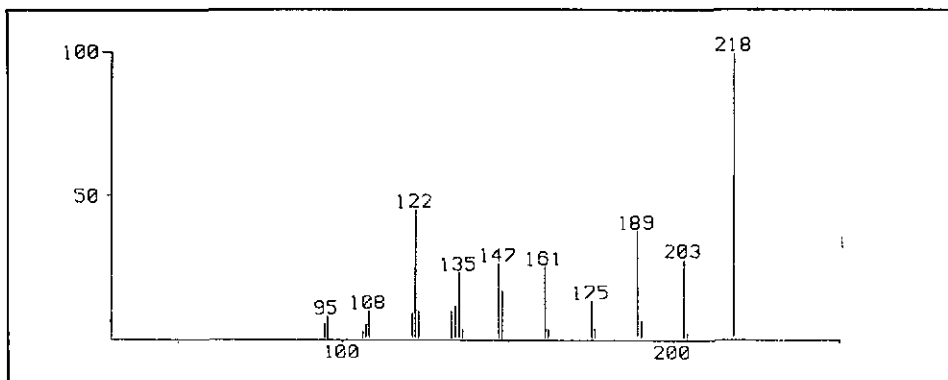
Descendants de  $m/z$  218

Figure 13.8

Nous avons également démontré la filiation de l'ion  $m/z$  189 avec les ions  $m/z$  207 et  $m/z$  218 en enregistrant le spectre des parents de  $m/z$  189 (figure 13.9).

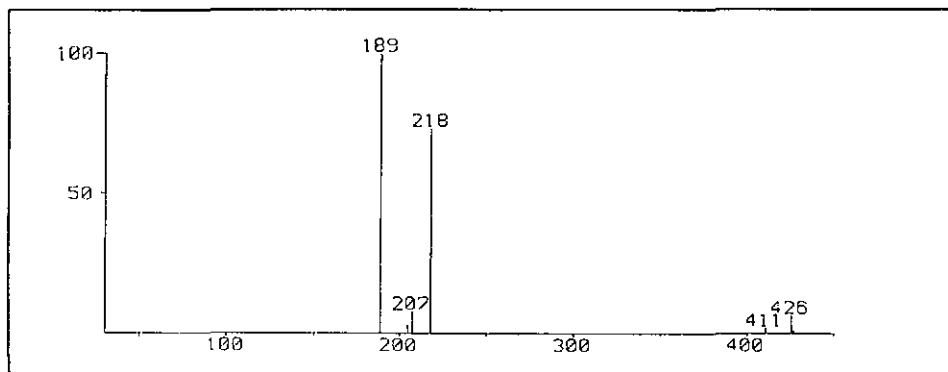
Parents de  $m/z$  189

Figure 13.9

Ce spectre de collision ne laisse aucun doute puisque tous les fragments considérés sont présents. L'ion  $m/z$  207 qui n'est pas toujours visible sur les spectres de masse obtenus par impact électronique est ici clairement présent.

De manière à confirmer que  $m/z$  207 est bien un fragment de  $m/z$  426, et qu'il n'est pas dû à un facteur extérieur, nous avons enregistré le spectre de ses ions parents. Le résultat (figure 13.10), confirme en tous points notre hypothèse.

#### Ions parents de $m/z$ 207

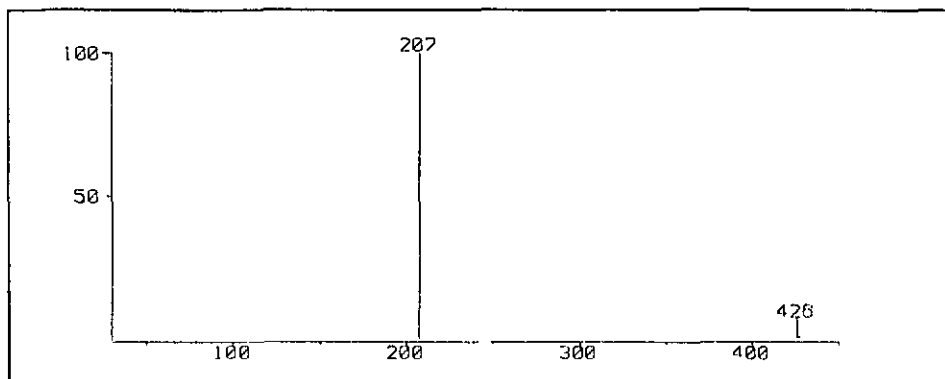


Figure 13.10

Nous pensons donc que l'ion  $m/z$  189 n'est probablement pas dû exclusivement à l'un ou à l'autre des deux mécanismes, mais qu'il correspond plutôt à une contribution des deux. Si l'on compare ses spectres de collision, force est de constater qu'ils sont très proches. Toutefois, de petites différences d'intensité de certains ions ( $m/z$  147 ou  $m/z$  133 par exemple) font penser que l'influence de la position du méthyle qui différencie l' $\alpha$ -amyrine de la  $\beta$ -amyrine intervient ici de la même façon que dans le cas de la fragmentation de l'ion  $m/z$  218.

Ces expériences, qui dans le cas particulier ont servi à la caractérisation des  $\alpha$  et  $\beta$ -amyrines dans nos extrait, nous permettent d'envisager la possibilité de différencier deux isomères par MS-MS, travail souvent impossible en MS simple. De plus les résultats obtenus sont applicables à d'autres molécules du même type. Ce travail a servi de base pour établir l'appartenance de l'une des substances que nous avons isolées à la famille des ursanes ou des oléanes (cf étude de la fraction CL2.4). La connaissance des spectres de collision de divers fragments apporte un complément important à l'étude par MS-MS de produits inconnus. Il arrive souvent que le produit inconnu possède une structure qui ne correspond que partiellement à celles des témoins à disposition. L'étude MS-MS permet de mettre en évidence des fragments qui, comparés à des fragments témoins, peuvent être identifiés, et qui, une fois assemblés, conduisent à la structure complète de la molécule.

14 ETUDE PAR GC-MS DE LA FRACTION NT2.2

Par chromatographie en phase gazeuse, quatre produits principaux peuvent être séparés.

Chromatographie de la fraction NT2.2

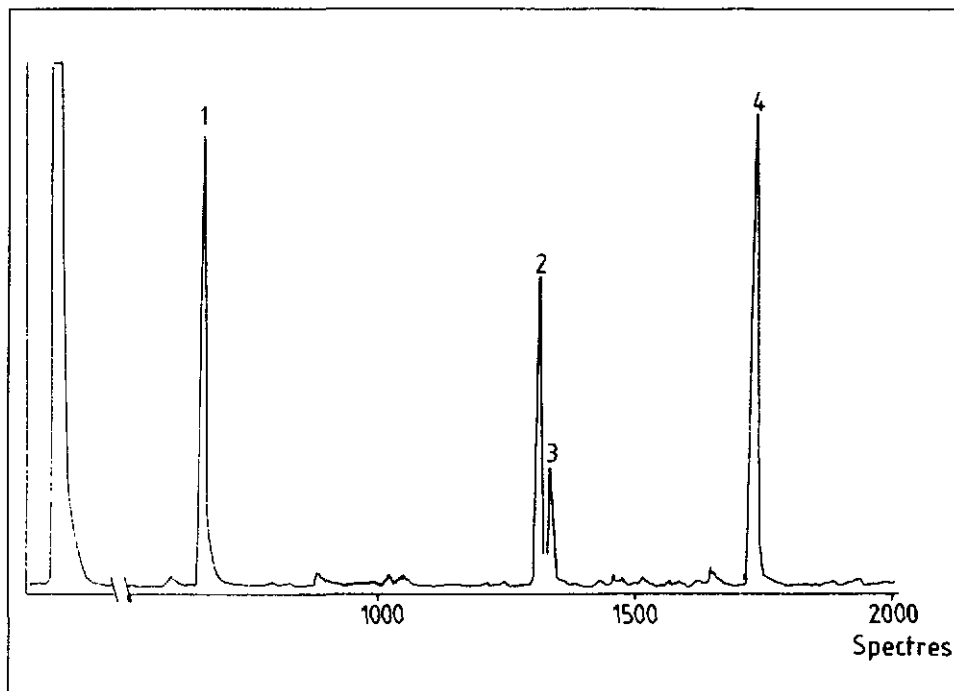


Figure 14.1

Le premier produit élué est un composé alyphatique pour lequel le seul spectre de masse ne suffit pas à l'établissement d'une structure précise.

Le produit suivant a été identifié comme étant du taraxérol par comparaison du spectre avec une référence (Figures 14.2 et 14.3).

Spectre MS du produit 2

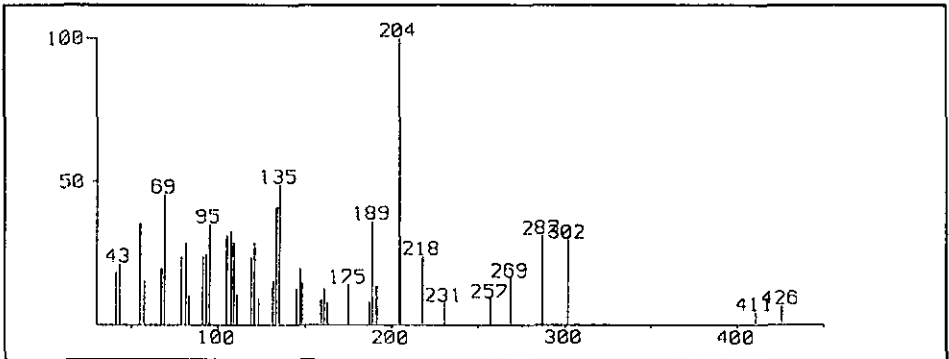


Figure 14.2

Spectre MS du taraxérol[12]

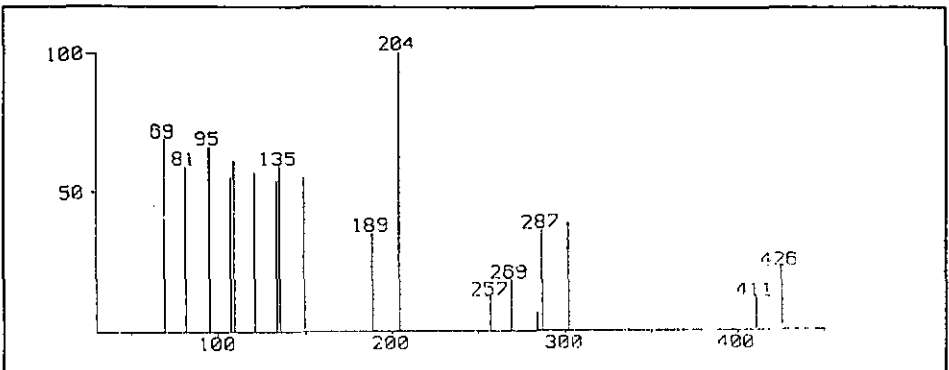


Figure 14.3

Le troisième produit est une amyrine. Les signaux caractéristiques à  $m/z$  218,  $m/z$  203 et  $m/z$  189, ainsi que le signal à  $m/z$  426 ne laissent aucun doute. Le spectre obtenu est présenté à la figure 14.4. L'étude par GC-MS-MS de la fraction nous a permis d'enregistrer le spectre de la figure 14.5. La prédominance du  $m/z$  94 montre clairement qu'il s'agit de  $\beta$ -amyrine. Cette expérience prouve qu'il est possible de différencier l' $\alpha$ -amyrine de la  $\beta$ -amyrine par MS-MS même lorsque les quantités sont faibles.

#### Spectre MS du produit 3

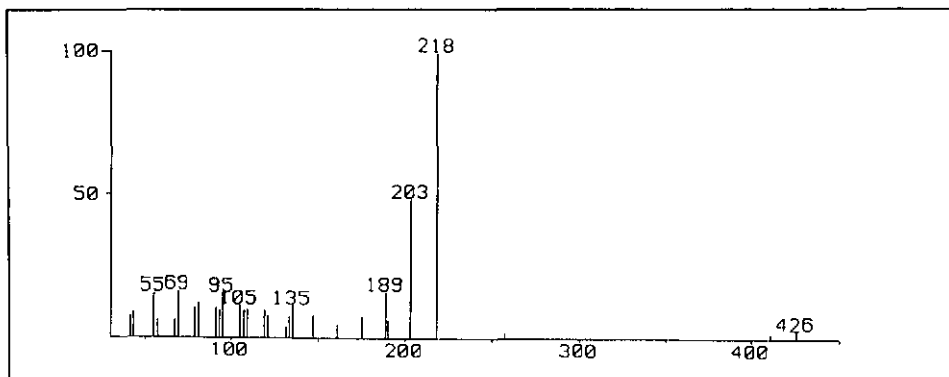


Figure 14.4

#### Spectre GC-MS-MS des descendants de $m/z$ 218

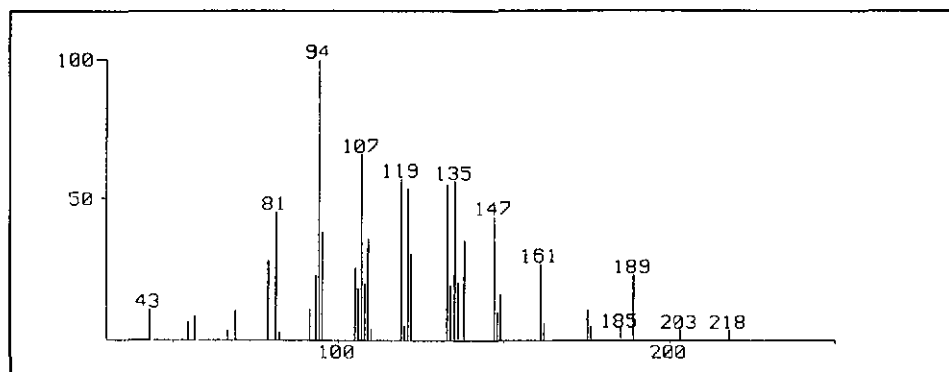


Figure 14.5

Le dernier produit ne correspondait à aucun des témoins dont nous disposions. Nous avons donc cherché à établir sa structure sur la base des fragments caractéristiques que nous pouvions reconnaître.

Spectre MS du produit 4

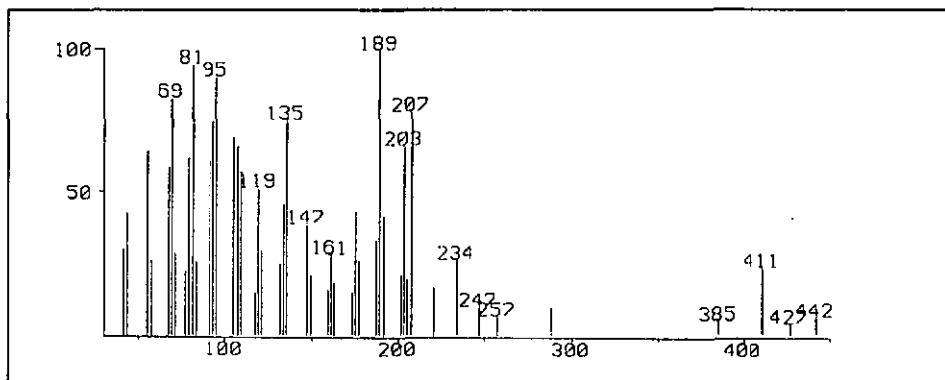


Figure 14.6

Les deux premiers ions importants,  $m/z$  207 et 189, sont caractéristiques des deux cycles A et B d'un triterpène substitué en C(3) par une fonction hydroxyle.

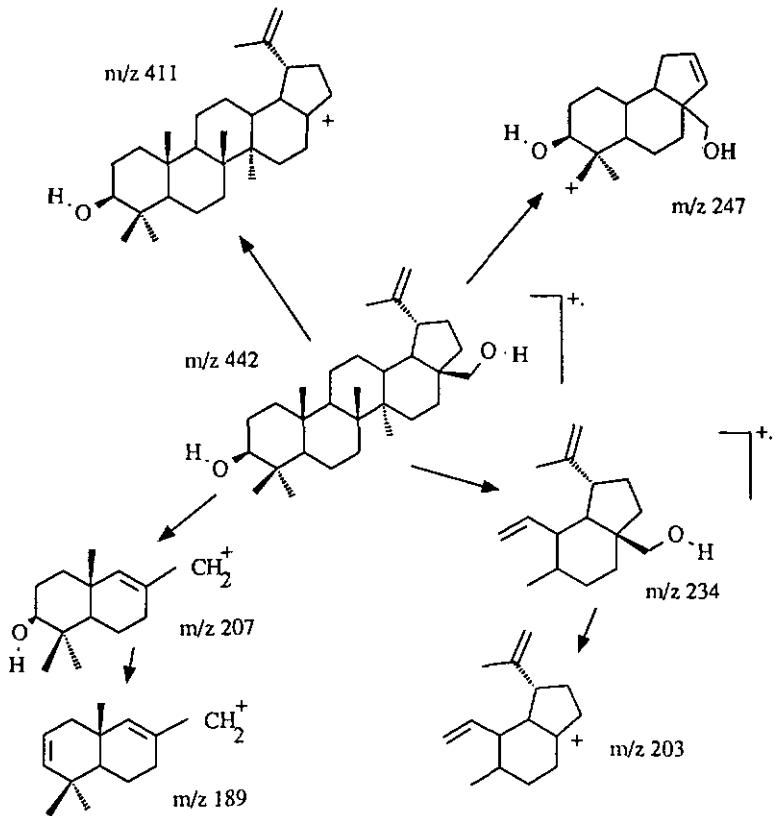
La perte de 31 unités de masse depuis le pic moléculaire nous a suggéré la présence d'une fonction  $-CH_2-OH$  ou  $-O-CH_3$ . Ce substituant doit se trouver sur l'un des cycles C, D ou E puisque les cycles A et B ne sont substitués que par une fonction hydroxyle et les méthyles habituels pour des triterpènes.

Parmi les squelettes possibles, l'ursane, l'oléane, l'hopane et le lupane pouvaient être pris en considération. Les deux premières familles ont été écartées suite à une recherche bibliographique des divers composés de masse 442 répondant aux éléments déjà établis. Ces composés donnent presque tous un  $m/z$  218 important et caractéristique qui est absent de notre spectre.

Sur la base du poids moléculaire, nous avons considéré que le substituant  $-\text{CH}_2\text{-OH}$  ou  $-\text{O-CH}_3$  éliminé depuis le  $\text{M}^+$  occupait la place d'un méthyle du squelette de l'hopanol ou du lupéol. En effet la différence de masse avec ceux-ci n'est que de 16 unités.

Le seul produit correspondant aux caractéristiques mentionnées ci-dessus et appartenant à la famille des hopanes ou des lupanes que nous avons trouvé dans la littérature est la bétuline. Il appartient à la famille des lupanes. Il ne nous a toutefois pas été possible de pousser notre étude plus avant vu les faibles quantités de produit à disposition dans le mélange.

Principales fragmentations de la bétuline



## 15 FRACTION NF1.9

### 15.1 ETUDE PAR GC-MS

La fraction a été chromatographiée sur une colonne capillaire (OV 1, 25 m, injecteur et détecteur 280 °C, programme : 220°C -> 320°C, 3 °C/mn). La figure 15.1 représente un agrandissement de la partie du chromatogramme qui contenait les triterpènes.

Chromatogramme de la fraction NF1.9

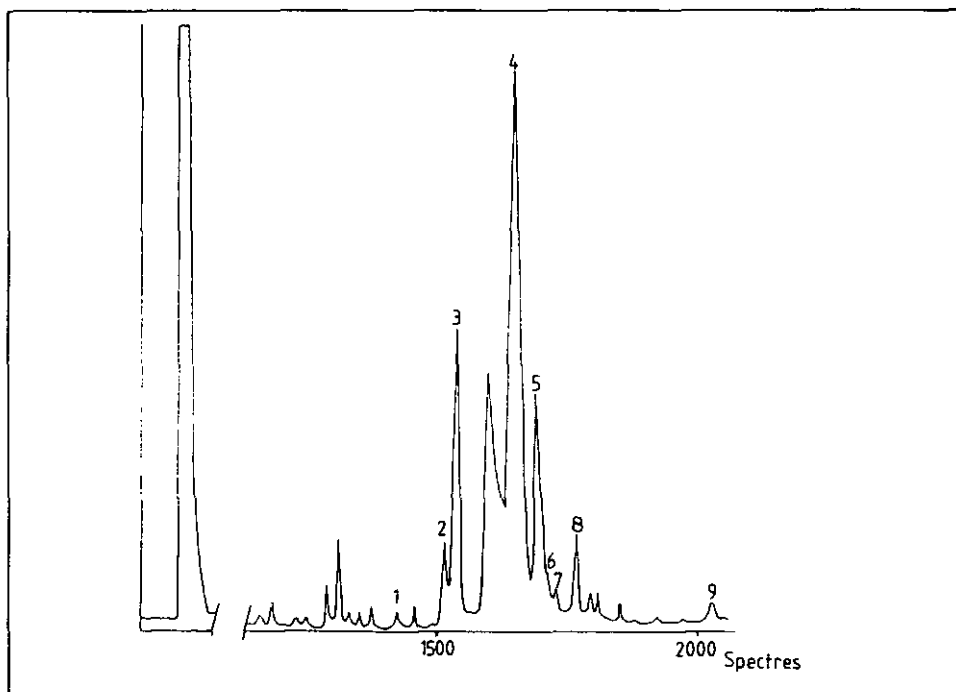
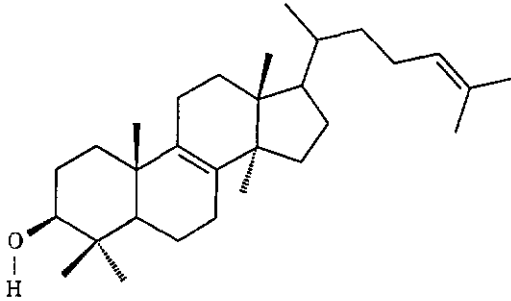


Figure 15.1

Seuls les spectres des produits identifiés sont donnés dans les pages suivantes. L'identification a été effectuée par comparaison avec des spectres de référence [24] ou réalisés dans nos laboratoires sur des échantillons de produits connus [25].

## 15.2 IDENTIFICATION DU LANOSTEROL (I)

### 2.1 Structure



### 2.2 Identification

#### Spectre de masse du produit

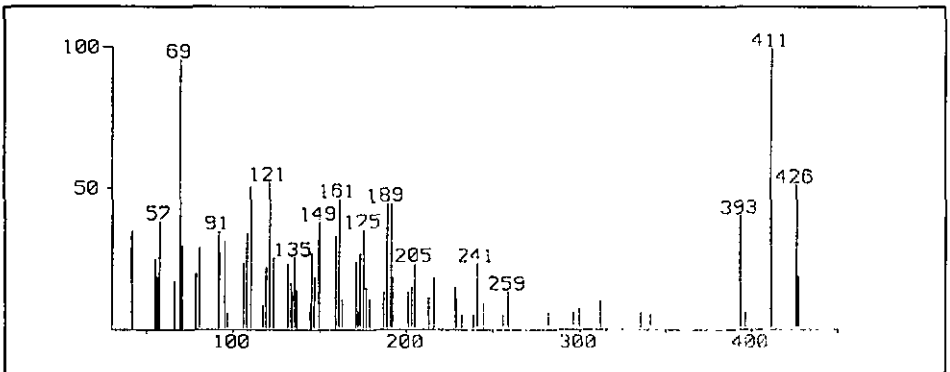
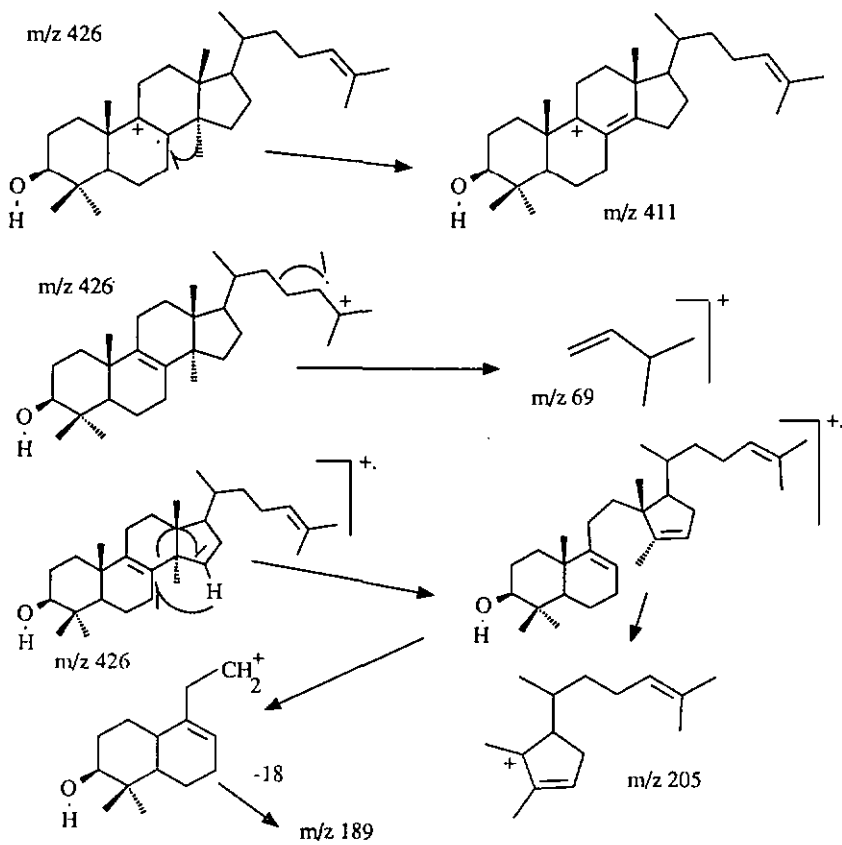


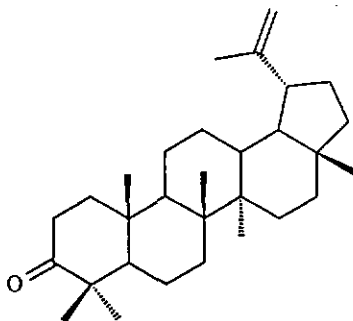
Figure 15.2

2.3 Fragmentations principales [24]



### 15.3 IDENTIFICATION DE LA LUPEN-3-ONE (2)

#### 3.1 Structure



#### 3.2 Identification

Le spectre de masse obtenu est présenté ci-dessous. Le produit a été identifié par comparaison des données spectroscopiques avec celles de la littérature [24].

#### Spectre de masse du produit

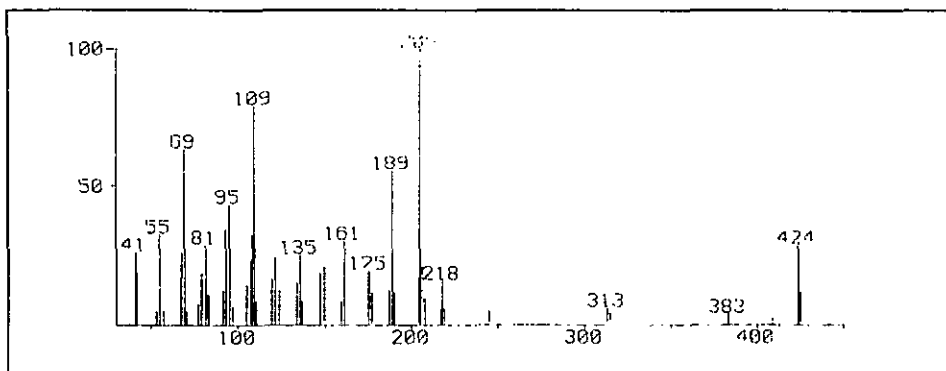
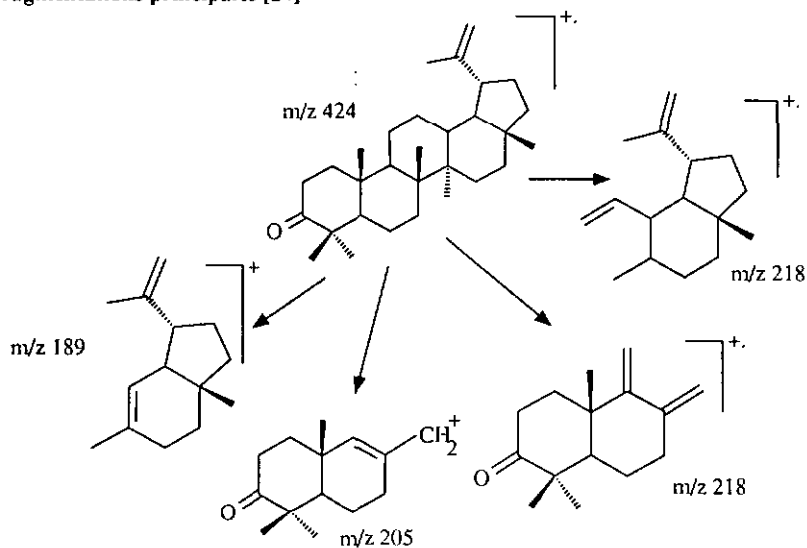


Figure 15.3

Le fragment à  $m/z$  205 est caractéristique des triterpènes ayant une fonction carbonyle en C(3). Le signal à  $m/z$  189 correspond aux cycles C, D, E de la molécule. Le  $m/z$  218 provient d'une part d'un

fragment correspondant aux cycles C, D et E, et d'autre part d'un fragment formé à partir des cycles A et B.

### 3.3 Fragmentations principales [24]



15.4 IDENTIFICATION DE LA  $\beta$ -AMYRENONE (3)

La  $\beta$ -amyrénone a été identifiée par comparaison de son spectre de masse avec celui d'un échantillon connu (notre collection [25]).

Spectre de masse du produit

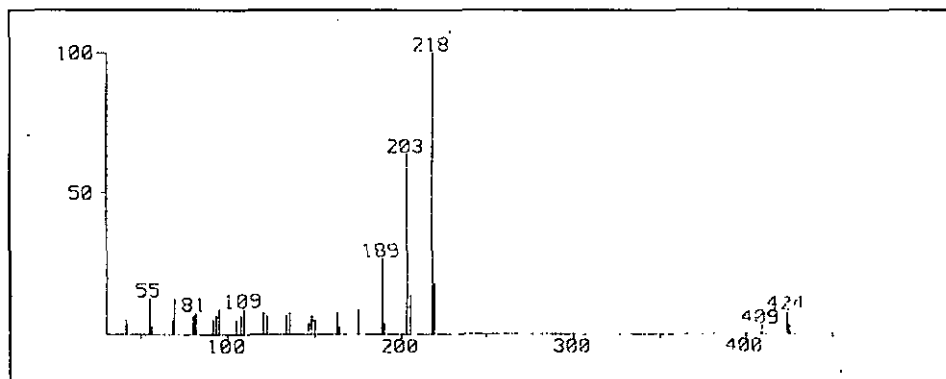


Figure 15.4

Les signaux à  $m/z$  189 et  $m/z$  218 correspondent à des fragments identiques à ceux obtenus pour l' $\alpha$ -amyrine. Le signal à  $m/z$  203 correspond à la perte de 15 unités depuis l'ion  $m/z$  218. L'étude que nous avons réalisée sur l' $\alpha$ -amyrine et sur la  $\beta$ -amyrine nous a montré qu'il était impossible de les distinguer sans avoir recours à la MS-MS. Les quantités dont nous disposons ici ne nous permettaient pas de réaliser une étude MS-MS. Une recherche bibliographique [24] indique que l'intensité du  $m/z$  203 peut varier selon que le squelette de base de la molécule appartient à la famille des oléanes ou des ursanes. Le fait que les structures oléaniques possèdent un méthyle tertiaire de plus explique que  $m/z$  203 soit généralement plus élevé dans les spectres des oléanes que dans ceux de leurs homologues de la famille des ursanes.

L'appartenance de notre substance à la famille des oléanes n'est donc que proposée sur la base de la référence [24].

Spectre de masse de la  $\beta$ -amyronone

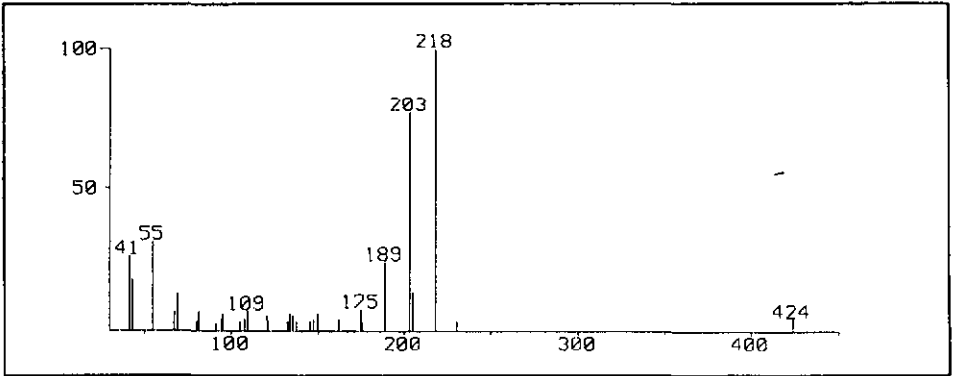
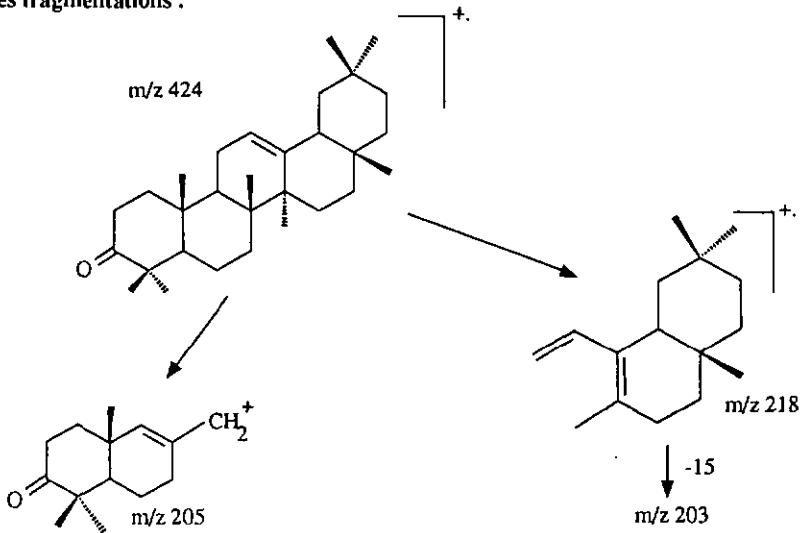


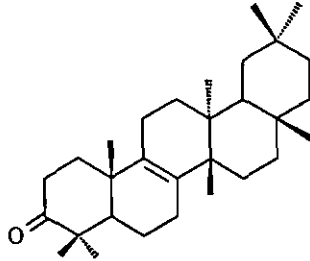
Figure 15.5

Principales fragmentations :



## 15.5 IDENTIFICATION DE L'ISOMULTIFLORENONE (4)

### 5.1 Structure



### 5.2 Etude par spectrométrie de masse

#### Spectre de masse du produit

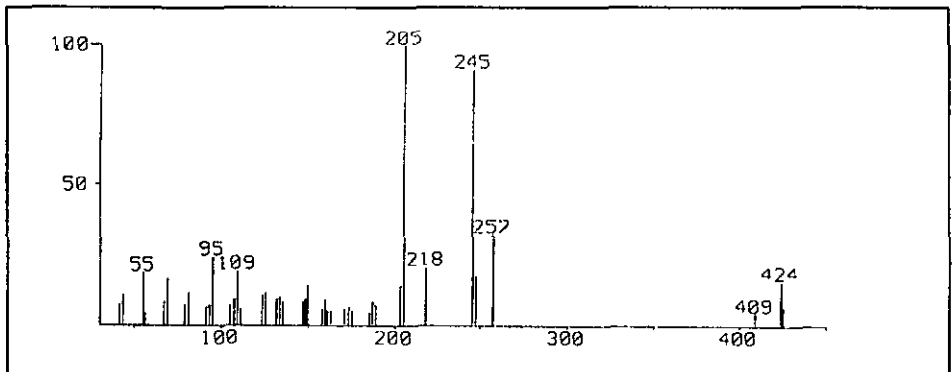


Figure 15.6

La comparaison du spectre de masse obtenu avec celui de la bauérénone montre que le produit doit avoir une structure très voisine de celle-ci. Toutefois l'intensité de l'ion  $m/z$  205 indique que la double liaison qui se trouve entre les carbones C(7) et C(8) dans la bauérénone doit occuper une position différente dans le cas de notre produit. Une recherche bibliographique des squelettes voisins de la bauérénone nous a conduit à l'isomultiflorenone [24].

Spectre de masse de l'isomultiflorénone

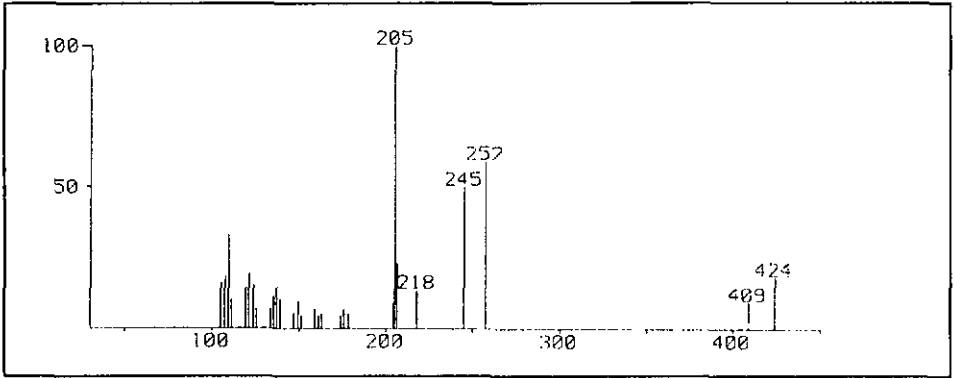
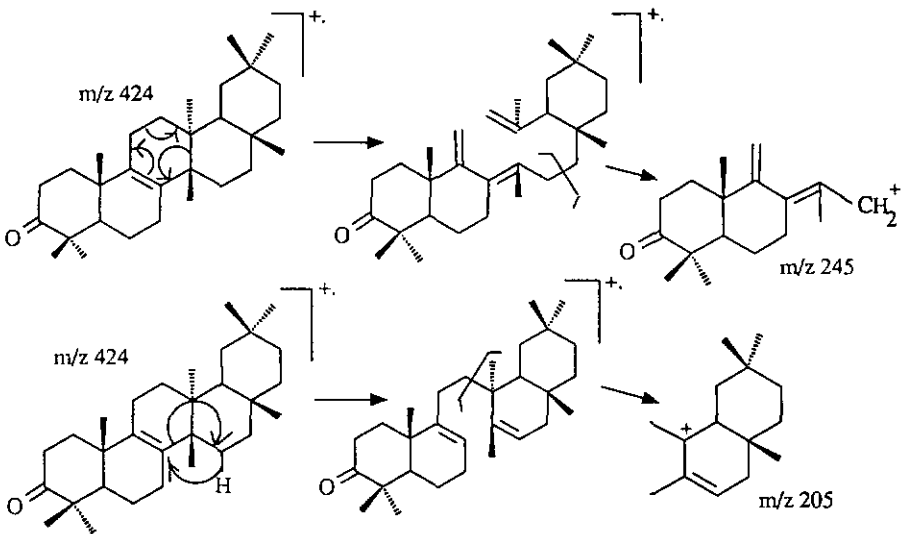


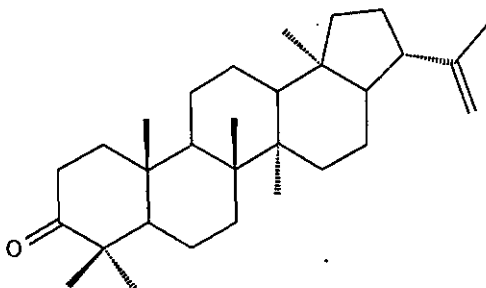
Figure 15.7

5.3 Principales fragmentations



## 15.6 IDENTIFICATION DE LA HOPAN-22-EN-3-ONE (5)

## 6.1 Structure



## 6.2 Analyse par MS

## Spectre de masse du produit

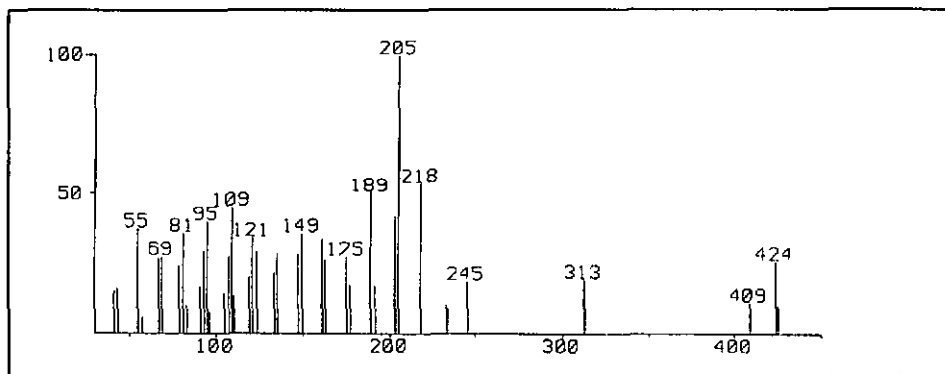


Figure 15.8

Le signal à  $m/z$  218 n'est pas obtenu, comme dans le cas des amyriines, à partir des cycles C, D, E, mais par rupture du cycle C. La structure du fragment est reproduite ci-dessous selon la référence [24]. La figure 15.9 représente le spectre de masse témoin.

Spectre de masse de la hopan-22-en-3-one

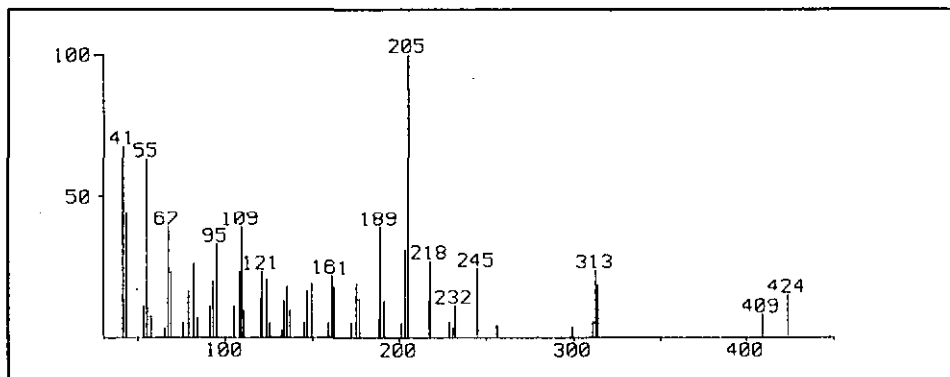
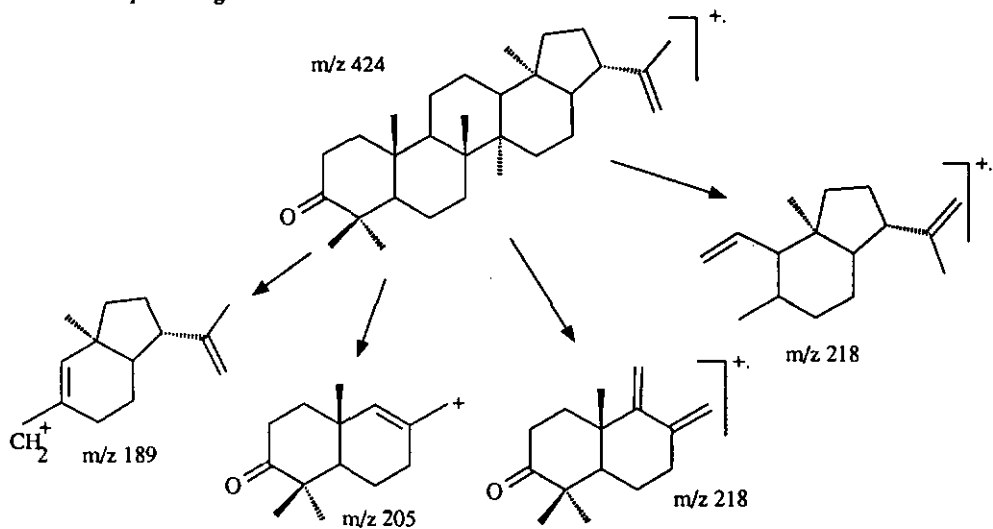


Figure 15.9

### 6.3 Principaux fragments

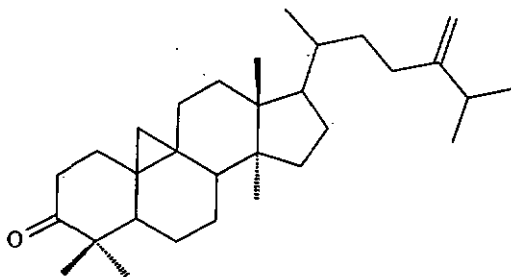


### 15.7 IDENTIFICATION DE L' $\alpha$ -AMYRINE ET DE LA $\beta$ -AMYRINE (6 et 7)

L'analyse de ces deux produits ainsi que leur différenciation par MS-MS a fait l'objet d'une étude approfondie au chapitre 13. Leur identification a été faite ici par comparaison des spectres obtenus par GC-MS avec ceux obtenus précédemment.

### 15.8 IDENTIFICATION DE LA 24-METHYLENE-CYCLOARTANONE (8)

#### 8.1 Structure



## 8.2 Identification

### Spectre de masse du produit isolé

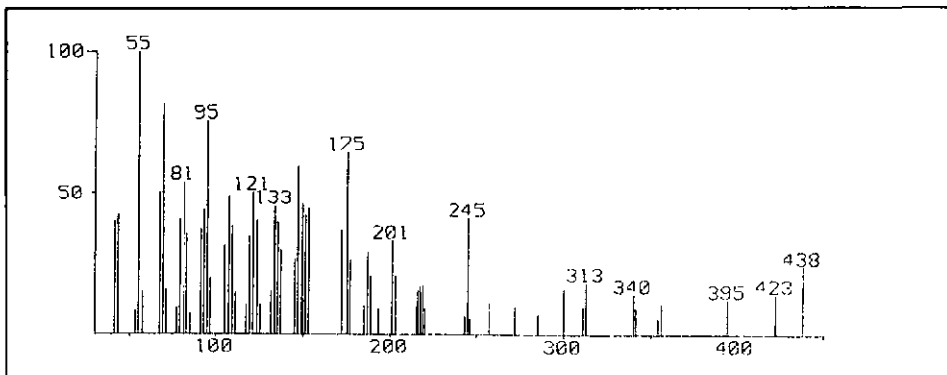
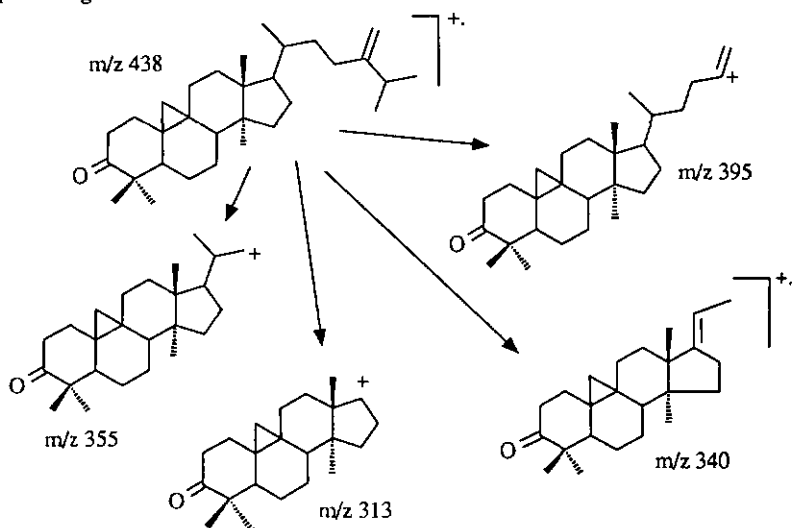


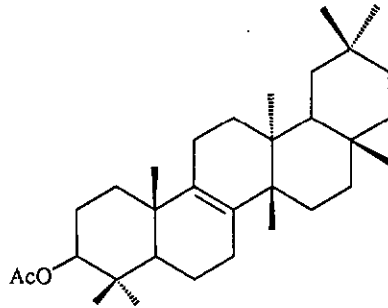
Figure 15.10

## 8.3 Principaux fragments



## 15.9 IDENTIFICATION DE L'ACETYL-ISOMULTIFLORENOL (9)

### 9.1 Structure



### 9.2 Identification

Le spectre de notre produit présente une grande similitude avec celui de l'isomultiflorénone identifiée précédemment. En effet, les signaux à  $m/z$  468, 301, et 289 trouvent tous leur équivalent dans le spectre, décalés chacun de 44 unités de masse. Cette différence correspond au remplacement du groupe céto par un groupe acétyle.

#### Spectre de masse du produit

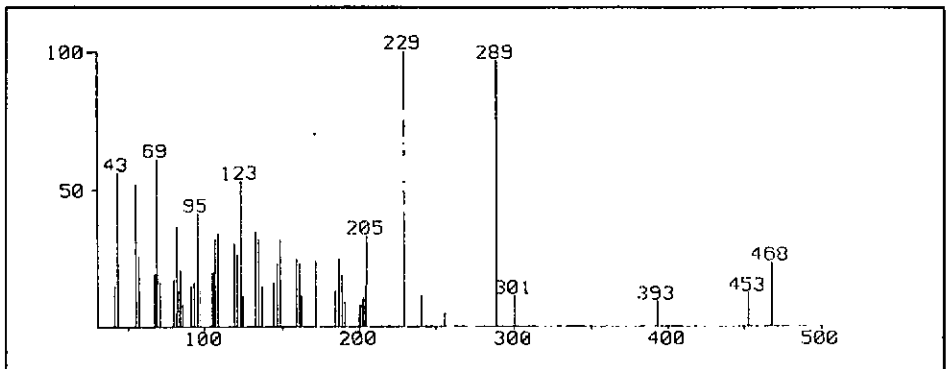
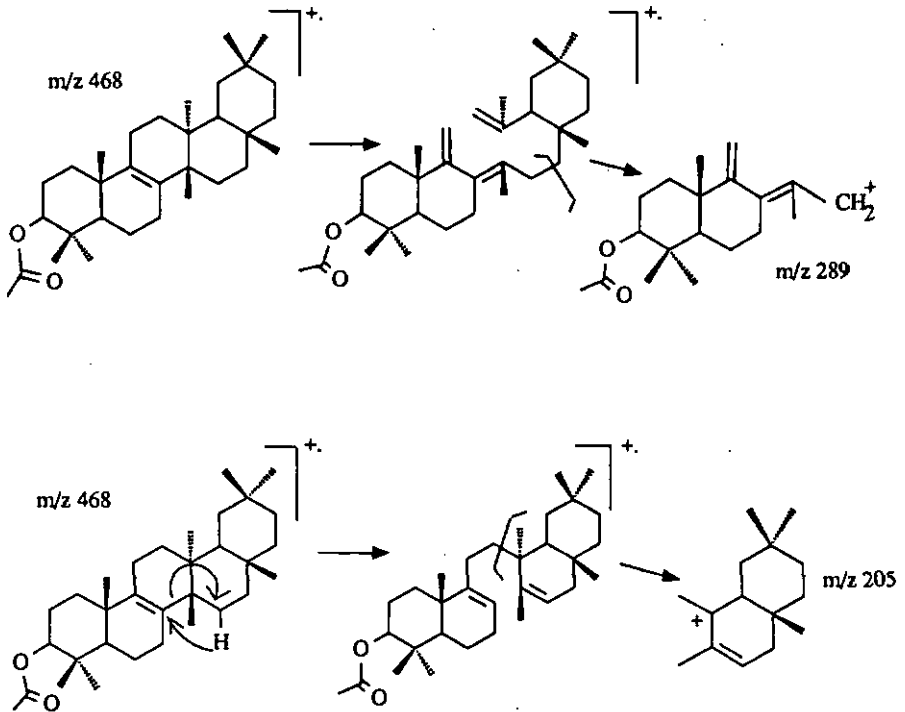


Figure 15.11

Une molécule d'acide acétique est éliminée à partir de  $m/z$  453. Le signal à  $m/z$  289 correspond à une rupture du cycle C identique à celle observée dans le cas de l'isomultiflorénone. Le pic de base à  $m/z$  229 est dû à l'élimination d'acide acétique à partir du fragment responsable du  $m/z$  289. Il est intéressant de constater que le signal à  $m/e$  205 est maintenu malgré la présence du groupement acétyle, prouvant par là qu'il ne provient pas des cycles A et B de la molécule.

### 9.3 Mécanisme de fragmentation



## 16 FRACTION NF2

### 16.1 FRACTION NF2.1

Le spectre  $^1\text{H-NMR}$  de la fraction est présenté à la figure 16.1. Il est typique d'un produit triterpénique. Les signaux apparaissant entre 0.8 et 2.2 ppm correspondent à un squelette carboné substitué par des groupes méthyles. Entre 4 et 7 ppm on observe la présence de protons oléfiniques et voisins d'hétéroatomes.

Spectre  $^1\text{H-NMR}$  de NF2.1

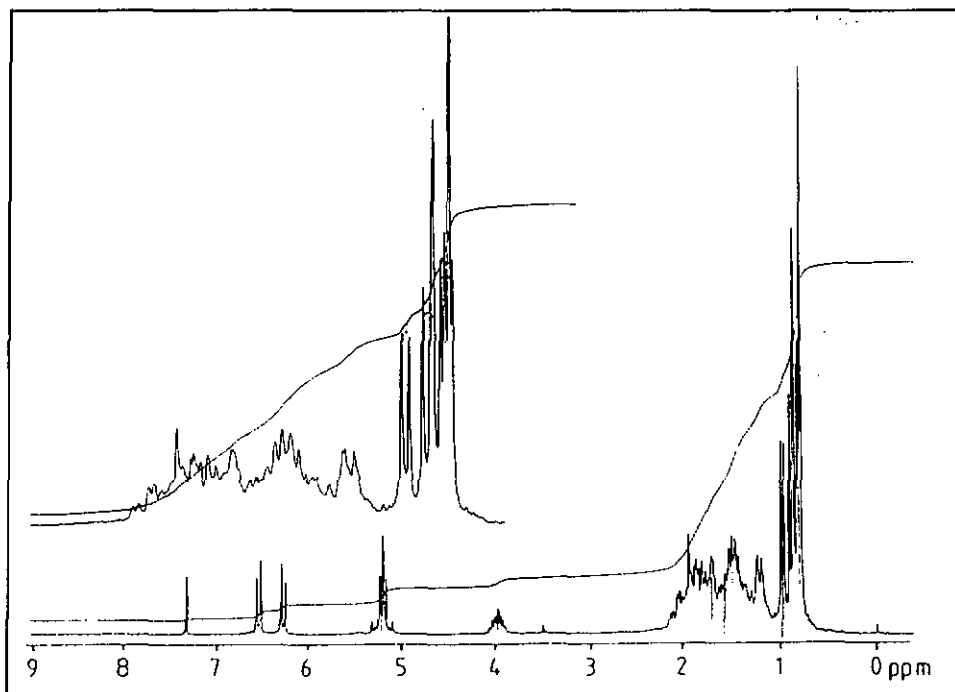


Figure 16.1

Le spectre a été comparé avec celui du peroxyde d'ergostérol [26].

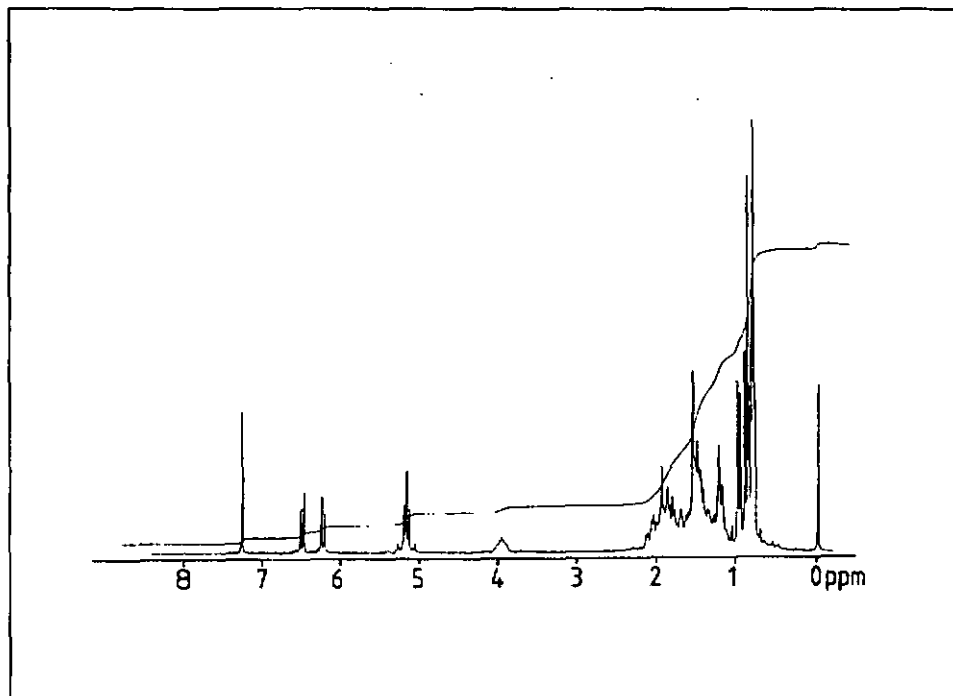
Spectre  $^1\text{H-NMR}$  du peroxyde d'ergostérol [25]

Figure 16.2

Les divers signaux ont été attribués de la manière suivante.

Le système AB centré à environ 6.4 ppm est dû aux protons de la double liaison  $\Delta 6,7$ . Ce signal est caractéristique des composés de la famille du peroxyde d'ergostérol. Le même signal est présent dans le spectre d'un autre isomère que nous avons également isolé. Le signal à 5.21 ppm correspond aux deux protons de la double liaison entre les carbones C(22) et C(23) sur la chaîne latérale. Le proton en alpha du groupe hydroxyle en C(3), donne un signal typique à 3.98 ppm [26-29].

L'isomère que nous avons ici est le plus répandu. Il s'agit du 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -épidioxy-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol.

### Structure du produit

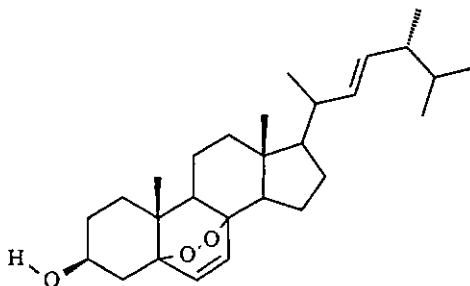


Tableau comparatif des  $^1\text{H-NMR}$  du produit et du témoin ( $-\text{CH}_3$ ) en ppm

Produit	0.8	0.825	0.824	0.895	0.894	0.992
	0.84		0.855		0.93	1.022
Témoin[26]	0.8	0.817	0.817	0.887	0.887	0.987
	0.84		0.855		0.930	1.023

### 16.2 FRACTION NF2.2

Dans la même séparation par HPLC, nous avons pu isoler un deuxième isomère de la famille du peroxyde d'ergostérol. Ce dernier se distingue du précédent par la présence d'une double liaison supplémentaire entre les carbones C(9) et C(11). Celle-ci apparaît sur le spectre  $^1\text{H-NMR}$  sous la forme d'un quadruplet aux environs de 5.4 ppm.

La présence de cette double liaison influence surtout les méthyles C(18) et C(19). En effet son cône d'anisotropie a pour effet de déblinder le méthyle C(19) alors qu'il blinde le méthyle C(18). Ceci se traduit clairement par un déplacement du signal du méthyle C(19) vers des valeurs plus élevées, alors que le méthyle C(18) se voit déplacé vers des valeurs plus basses (en ppm).

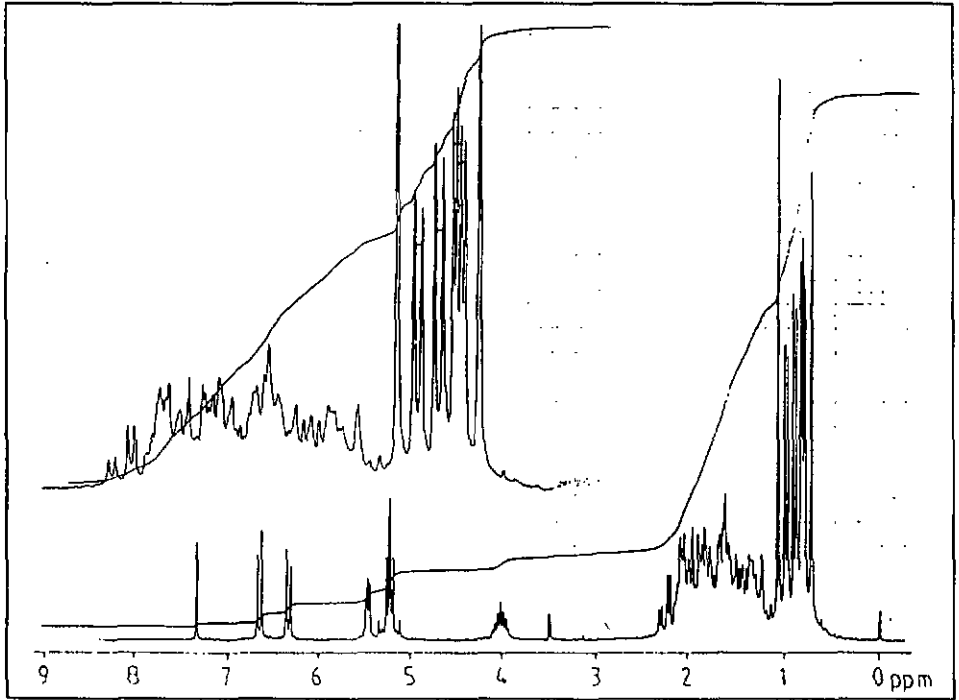
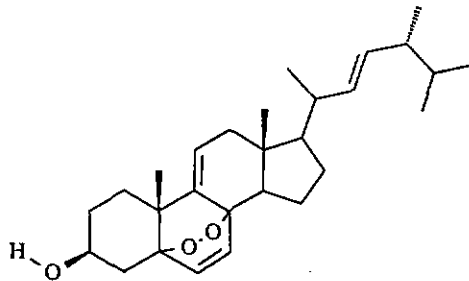
Spectre  $^1\text{H-NMR}$  de NF2.2

Figure 16.3

Structure du  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxy-ergosta-6,9(11),22-triène-3 $\beta$ -ol [29]:



## 17 FRACTION CL2.4

### 17.1 ETUDE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

La fraction CL2.4 a été isolée à partir de l'extrait au chloroforme. Son spectre  $^1\text{H-NMR}$  est présenté à la figure 17.1. Les signaux apparaissant dans la région comprise entre 0.8 et 1.3 ppm correspondent aux signaux des méthyles d'un triterpène pentacyclique.

Spectre  $^1\text{H-NMR}$  du produit

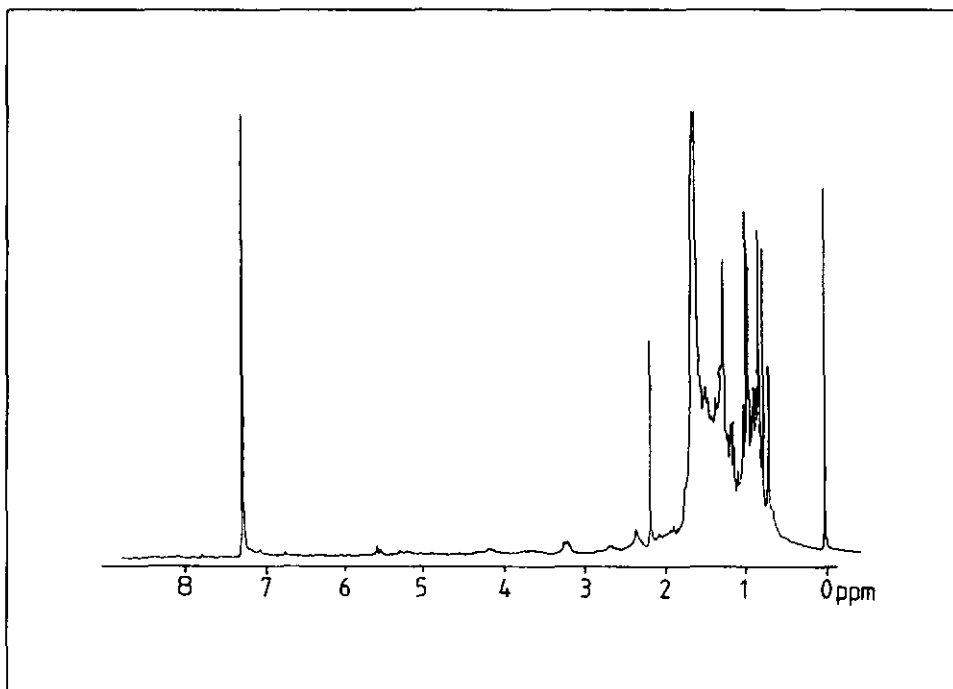


Figure 17.1

Le signal à 2.19 ppm correspond pour sa part à un méthyle voisin d'une fonction cétone. Nous avons rapproché ce spectre de ceux du lupéol et de la nor-30-hopan-3,22-dione.

Le tableau ci-dessous donne une comparaison des signaux des groupes méthyle des trois produits.

TABLEAU COMPARATIF

	C(23)	C(24)	C(25)	C(26)	C(27)	C(28)	C(29)
nor-30-hopan -3,22-dione[25]	1.08	1.01	0.93	1.03	0.95	0.70	2.15
Lupéol[25]	0.76	0.83	0.97	1.09	0.94	0.78	1.68
Produit	0.76	0.81	0.97	0.97	0.94	0.69	2.16

Cette comparaison montre que les trois premiers signaux de notre produit sont dans une situation voisine de celle des groupes méthyles du lupéol. Les méthyles en position 26, 27, 28 et 30 par contre montrent plus de similitudes avec leurs équivalents de la nor-30-hopan-3,22-dione.

Sur la base de ces considérations, nous avons postulé que notre produit devait avoir la structure de la nor-30-hopan-3 $\beta$ -ol-22-one.

Nous avons confirmé cette structure en effectuant une étude par spectrométrie de masse de ces composés.

### Spectre $^1\text{H-NMR}$ du lupéol

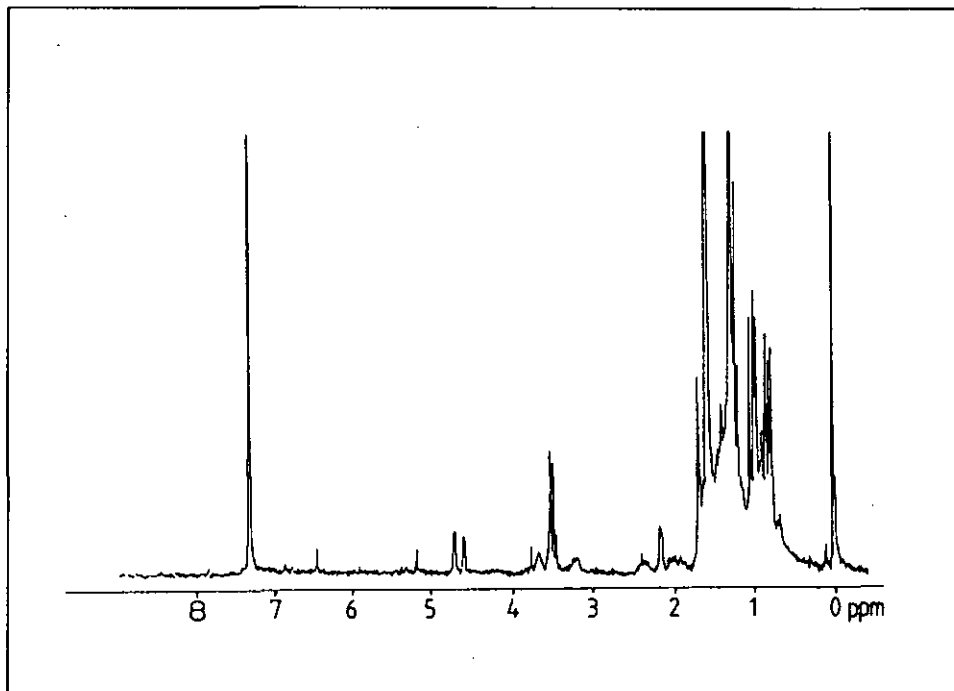


Figure 17.2

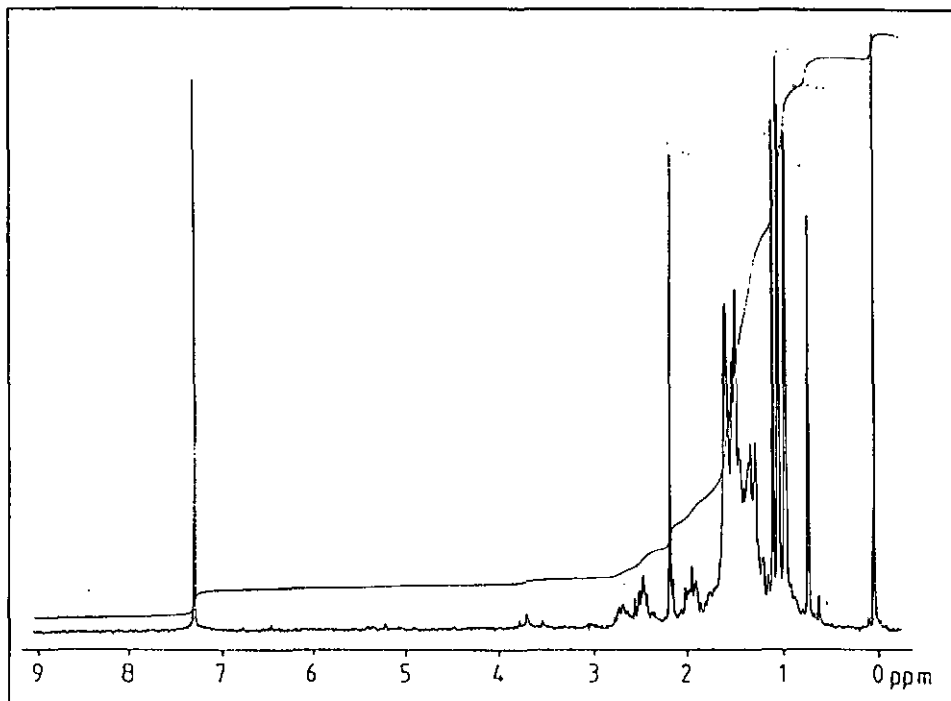
Spectre  $^1\text{H-NMR}$  du nor-30-hopane-3,22-dione

Figure 17.3

(Ces spectres ont été obtenus à partir d'échantillons isolés dans nos laboratoires [25].)

## 17.2 ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Le spectre de masse de notre composé est présenté à la figure 17.4.

Spectre de masse du produit

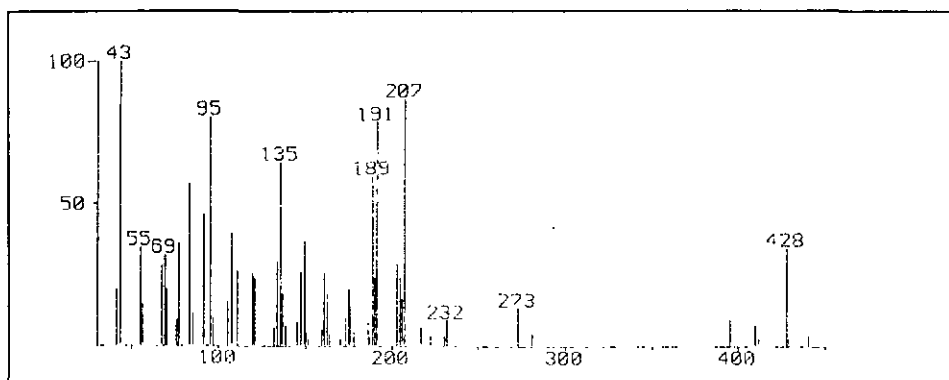
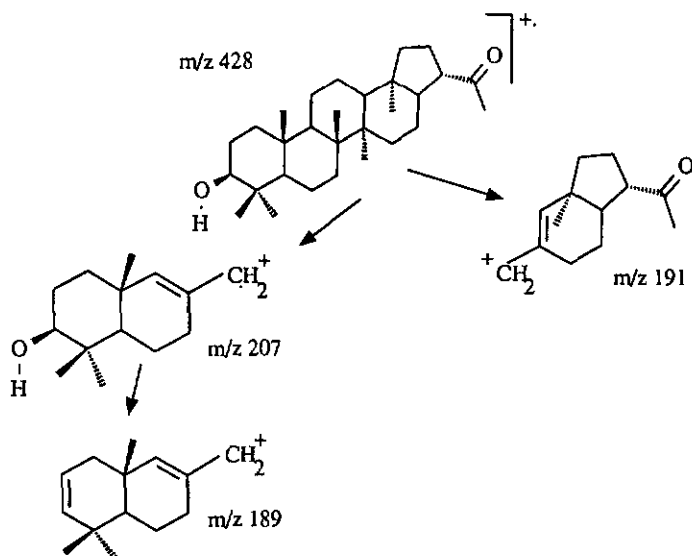


Figure 17.4

Le pic moléculaire à  $m/z$  428 confirme la structure proposée. Nous remarquerons que notre produit contient une impureté ayant un  $M^+$  à  $m/z$  440. Cette dernière sera étudiée plus loin. A l'appui de la structure proposée, nous soulignerons la présence des pics à  $m/z$  207, 191 et 189 qui peuvent être expliqués selon le schéma de fragmentation de la page suivante.



Nous avons également enregistré le spectre MS de la nor-30-hopan-3,22-dione (figure 17.5).

Il est intéressant de constater que dans ce cas le signal à m/z 207 est remplacé par un signal à m/z 205. Ceci est dû au fait que la fonction hydroxyle sur le cycle A de notre produit est remplacée par une cétone dans le cas de la nor-30-hopan-3,22-dione. Le signal à m/z 189 disparaît également; il ne peut en effet y avoir élimination d'eau dans le cas de la dicétone.

Spectre de masse de la nor-30-hopan-3,22-dione.

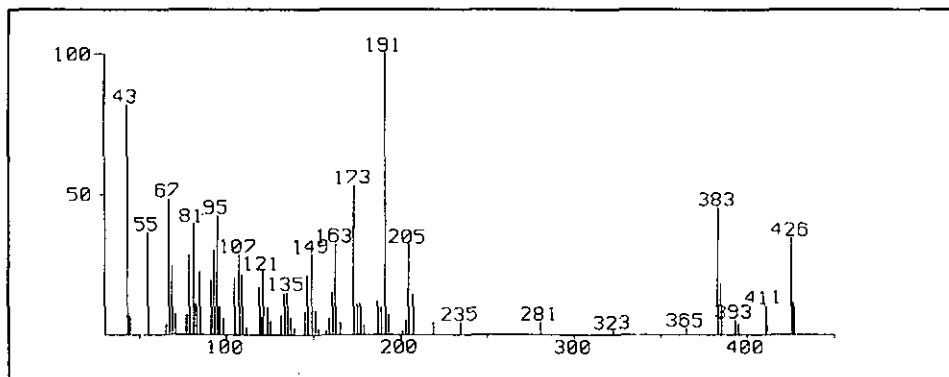
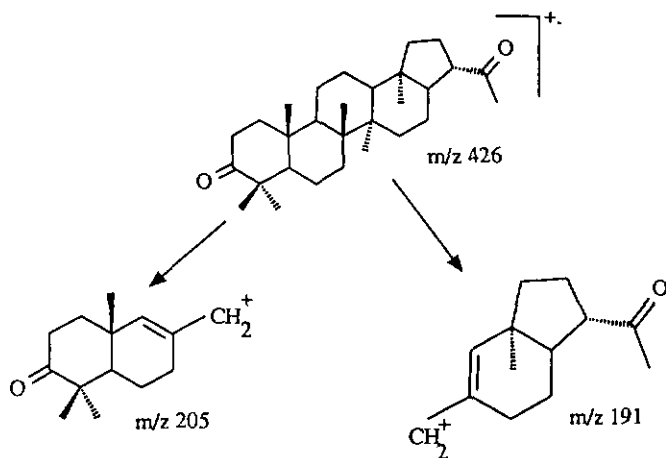


Figure 17.5

Le schéma de fragmentation conduisant à la formation des ions  $m/z$  191 et 205 est proposé ci-dessous.



De manière à confirmer la structure supposée, nous avons procédé à l'étude par MS-MS de nos composés.

Nous avons, dans un premier temps, enregistré les spectres correspondants aux descendants des pics moléculaires. Ces spectres sont présentés aux figures 17.6 et 17.7.

Spectre MS-MS des descendants de  $m/z$  428 (produit)

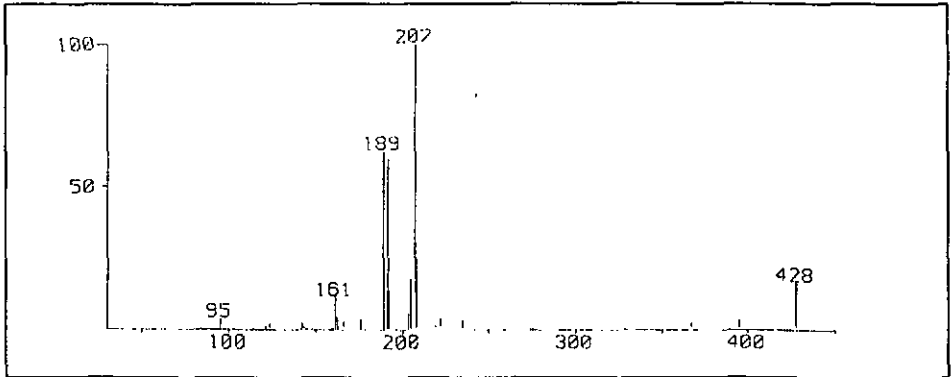


Figure 17.6

Spectre MS-MS des descendants de  $m/z$  426 (témoin nor-30-hopan- 3,22-dione)

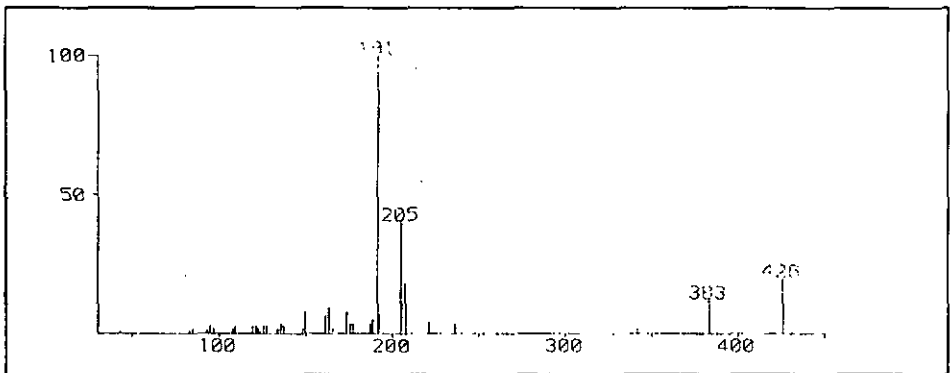


Figure 17.7

Nous constatons que les signaux aux  $m/z$  207, 205, 191 et 189 sont confirmés comme descendants

des pics moléculaires. Si la différence entre les fragments à  $m/z$  207 et  $m/z$  205 était évidente, il nous restait toutefois à confirmer la similitude des fragments à  $m/z$  191 obtenus tant pour le nor-30-hopan-3,22-dione que pour le produit. Nous avons donc étudié les descendants des deux  $m/z$  191. Les spectres obtenus sont présentés aux figures 17.8 et 17.9.

Spectre MS-MS des descendants de  $m/z$  191 (produit)

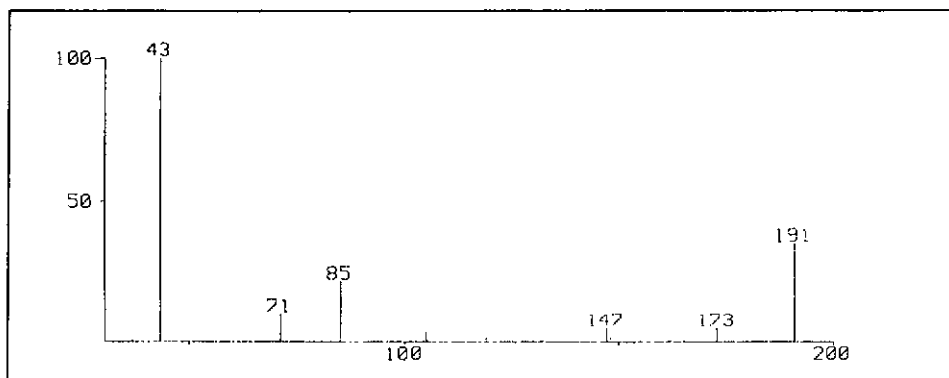


Figure 17.8

Spectre MS-MS des descendants de  $m/z$  191 (témoin)

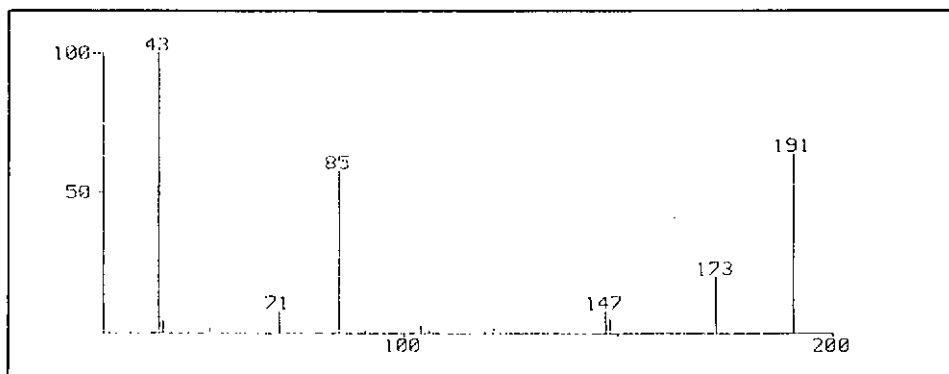
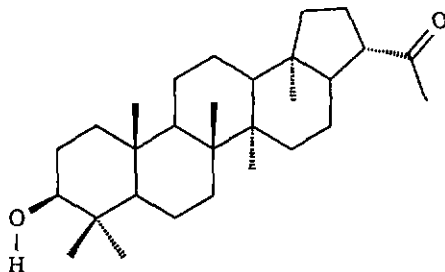


Figure 17.9

La similitude des cycles A et B du produit avec le lupéol, comme nous l'avions supposé sur la base des spectres  $^1\text{H-NMR}$ , est confirmée par les spectres de masses. L'étude MS-MS du fragment à  $m/z$  191 montre bien que celui-ci est identique à celui obtenu à partir de la 30-nor-hopane-3,22-dione. Nous concluons donc que le produit isolé a la structure de la nor-30-hopan-3 $\beta$ -ol-22-one.



## 18 PRODUIT MINEUR DE LA FRACTION CL2.4

Lors de l'enregistrement du spectre MS de la fraction CL2.4, nous avons constaté la présence d'un produit ayant un PM de 440. Par GC-MS, nous avons obtenu le spectre présenté à la figure ci-dessous.

### 18.1 ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (EI)

Spectre de masse du produit minoritaire obtenu par GC-MS

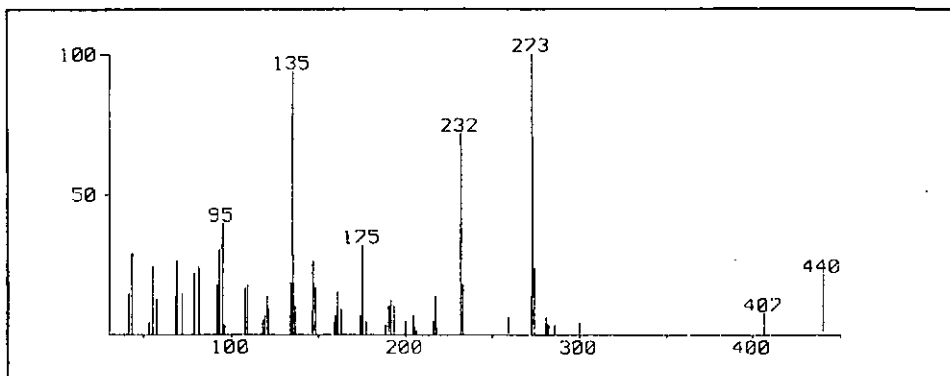


Figure 18.1

Nous avons comparé ce spectre avec celui de la figure 18.2.

Spectre MS de l'oléan-12-en-3,11-dione

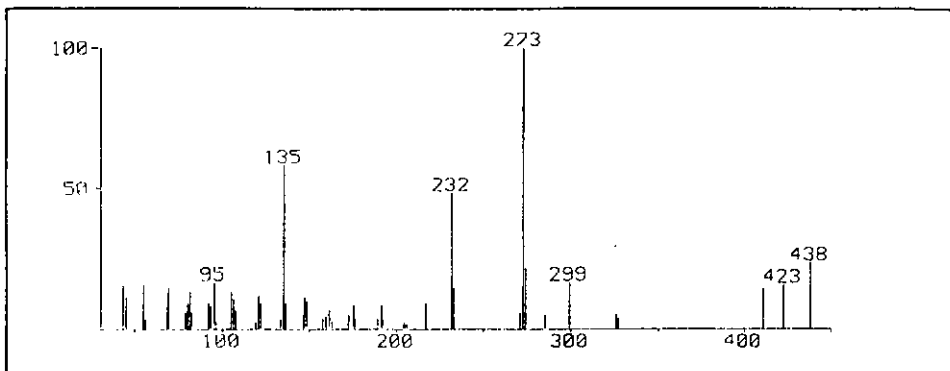
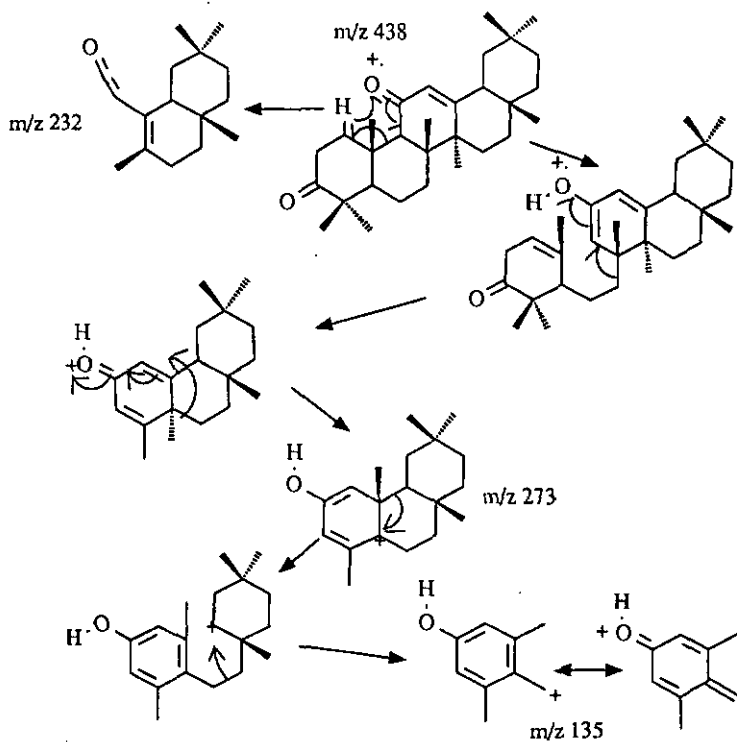


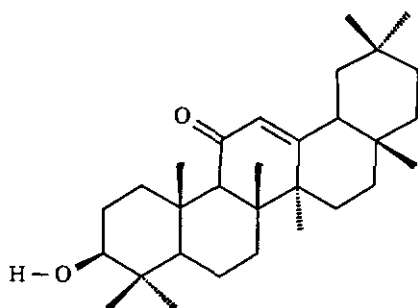
Figure 18.2

L'oléan-12-en-3,11-dione, même s'il diffère de notre produit par son PM, présente un certain nombre de fragments ayant des masses identiques à celles du produit.  $m/z$  232 et 135 notamment sont même comparables au niveau des intensités.

La fragmentation du produit témoin est expliquée ci-dessous [32].



Sur la base de ce schéma de fragmentation, nous pouvons postuler que la différence entre notre produit et le produit témoin est due à une substitution différente au niveau des cycles A ou B. En effet les  $m/z$  273, 232 et 135 correspondent à des fragments obtenus depuis les cycles C, D et E. La perte de 18 depuis le pic moléculaire sur le spectre EI de notre produit suggère la présence d'un hydroxyle. Nous avons donc proposé la structure suivante.



## 18.2 ETUDE MS-MS

Afin de confirmer la structure proposée, nous avons étudié le produit et le témoin en MS-MS. Nous avons premièrement enregistré les spectres des descendants des pics moléculaires (figures 18.3 et 18.4).

Spectre de masse des descendants du  $M^+$  du produit (MS-MS)

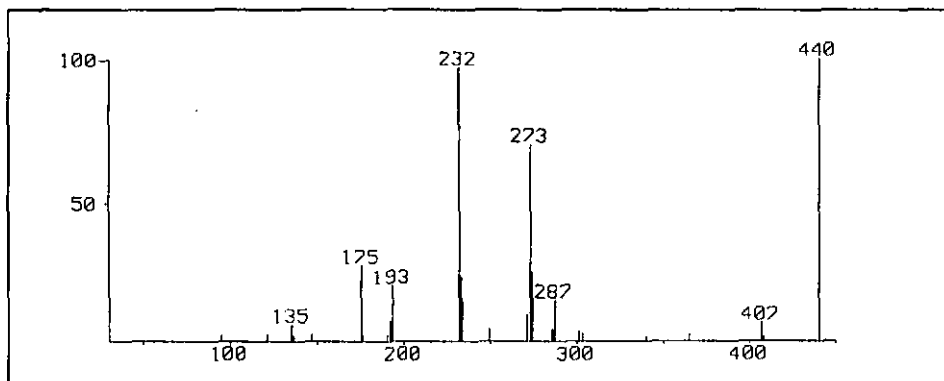


Figure 18.3

Spectre de masse des descendants du  $M^+$  du témoin

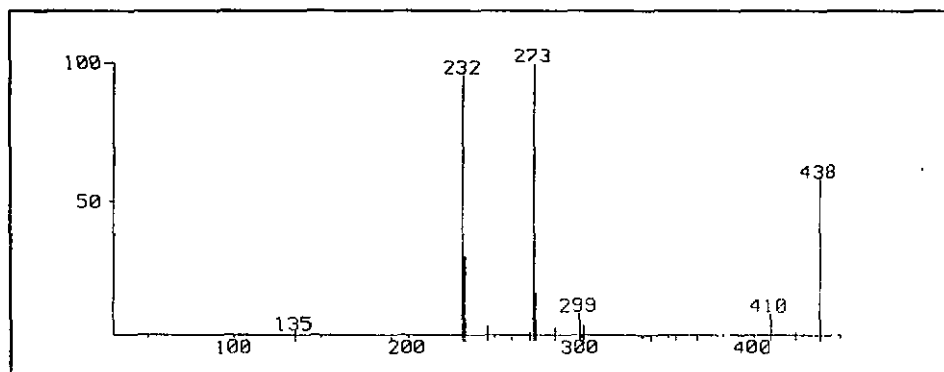


Figure 18.4

Ces spectres confirment que les deux produits se fragmentent de manière à donner les  $m/z$  273, 232 et 135. Il nous restait encore à prouver que ces fragments étaient identiques pour les deux produits.

Nous avons donc enregistré les spectres MS-MS des descendants de l'ion  $m/z$  232 (figures 18.5 et 18.6).

#### Spectre des descendants de $m/z$ 232 pour le produit

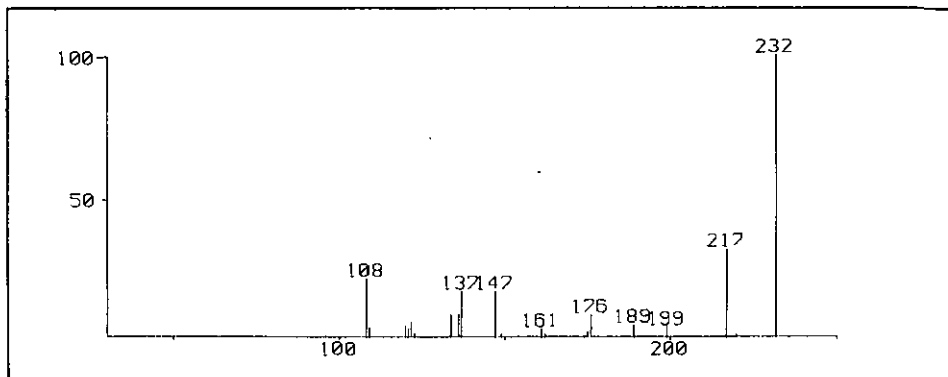


Figure 18.5

#### Spectre des descendants de $m/z$ 232 du témoin

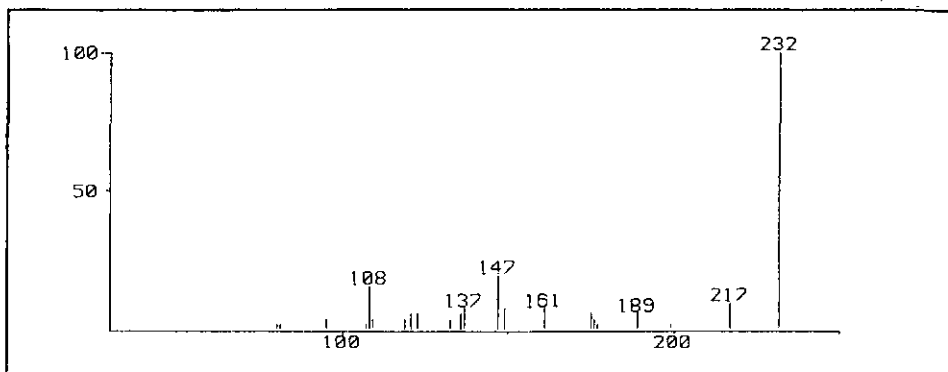


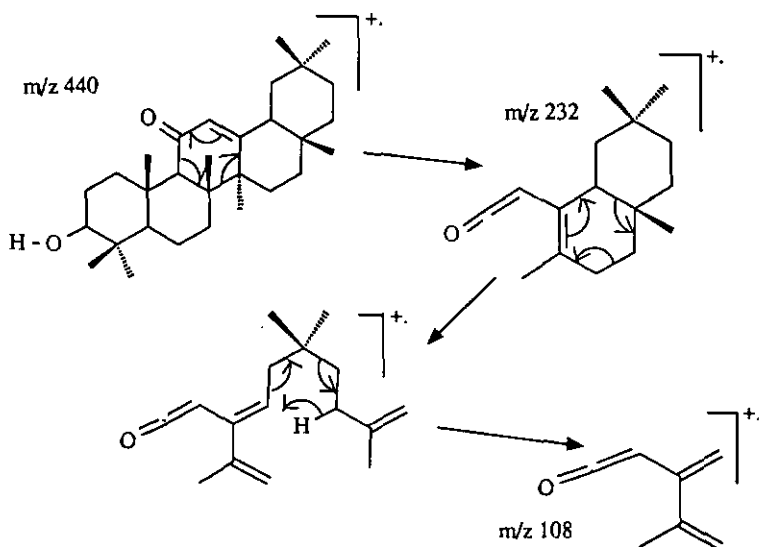
Figure 18.6

Nous constatons que les deux spectres de collision des  $m/z$  232 conduisent à des fragments identiques. Ceci confirme que les deux  $m/z$  232 doivent posséder la même structure.

La similitude des spectres MS simples du témoin et de notre produit n'avait pas suffi à lever le

doute quand à son appartenance à la famille des oléanes ou des ursanes. L'étude MS-MS du  $m/z$  232 nous a permis de trancher. En effet, le spectre de collision produit un fragment ayant un  $m/z$  de 108. Or cet ion  $m/z$  108 correspond au fragment  $m/z$  94 obtenu depuis  $m/z$  218 dans l'expérience réalisée pour distinguer l'oléan-12-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -amyrine) de l'ursan-12-en-3 $\beta$ -ol ( $\alpha$ -amyrine) au chapitre 13. La différence de 14 unités de masse entre les deux fragments est due au remplacement de deux protons par un oxygène, ce qui correspond parfaitement à la situation dans laquelle nous nous trouvons.

#### Formation de $m/z$ 108



Nous avons ensuite enregistré les spectres des descendants de  $m/z$  273. Les deux spectres sont similaires et conduisent à  $m/z$  135. Ce dernier confirme le mécanisme de fragmentation proposé. Sa structure sera démontrée ultérieurement.

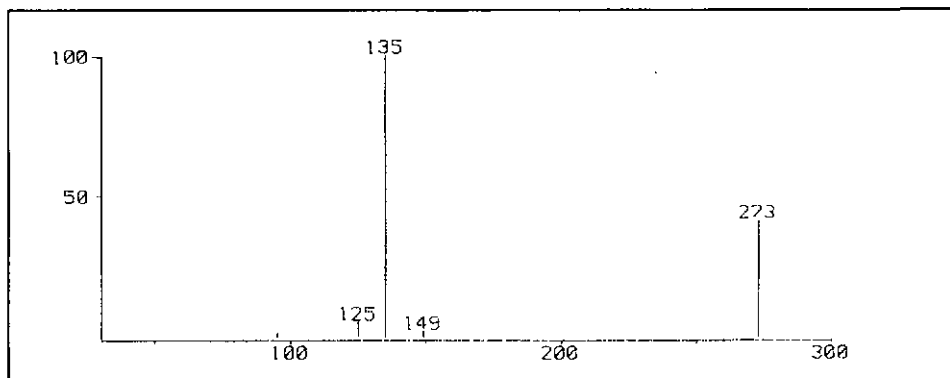
Spectre MS-MS des descendants de  $m/z$  273 du produit

Figure 18.7

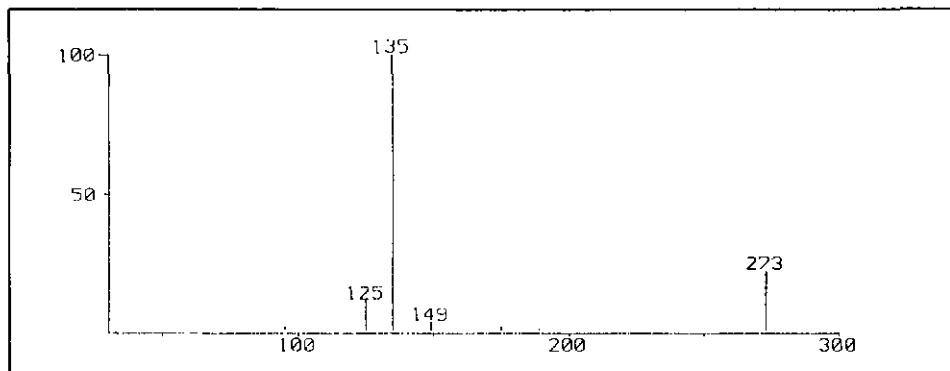
Spectre MS-MS des descendants de  $m/z$  273 du témoin

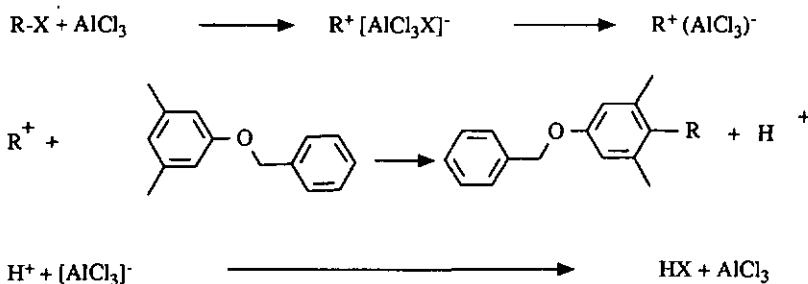
Figure 18.8

18.3 ETUDE DE LA STRUCTURE DE L'ION  $m/z$  135

D'après les schémas de fragmentations du chapitre 18.1, plusieurs réarrangements sont nécessaires pour expliquer la formation de l'ion  $m/z$  135. Dans le dessein de prouver sa structure, nous avons donc cherché un composé susceptible de donner, par une rupture homolytique simple, le même fragment.

## 18.3.1 Synthèse du 4-benzyl-3,5-diméthyl-phénol

Ne disposant pas d'un composé donnant le fragment désiré, nous avons décidé d'en synthétiser un en partant du 3,5-diméthyl-phénol sur lequel nous avons fixé un groupe benzyle par réaction d'alkylation de Friedel-Crafts:



Le mode opératoire est décrit dans la partie expérimentale.

## 18.3.2 Etude par spectrométrie de masse

Les deux isomères du produit monosubstitué sont représentés aux figures 18.9 et 18.10. Nous constatons que si  $m/z$  135 est bien présent pour le produit substitué en para, le mécanisme de fragmentation de l'isomère ortho conduit à un fragment  $m/z$  134. Les deux mécanismes sont décrits ci-dessous.

## Produit synthétisé (substitution para)

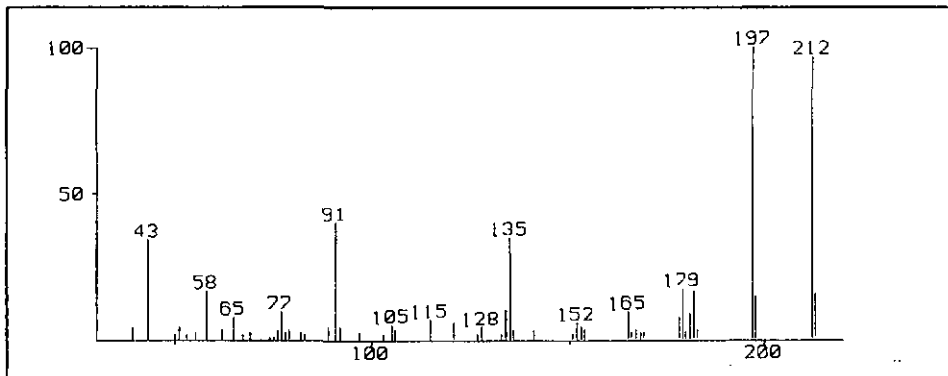


Figure 18.9

## Produit synthétisé (substitution ortho)

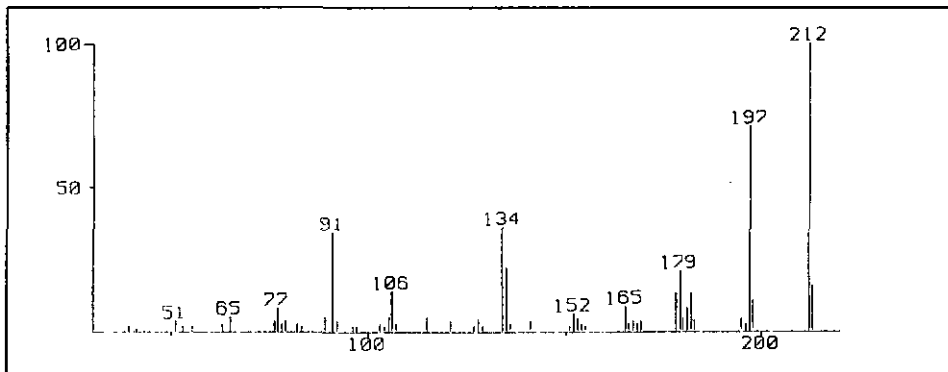
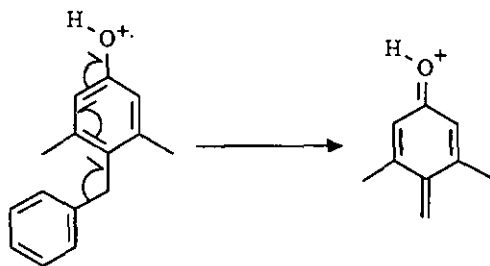
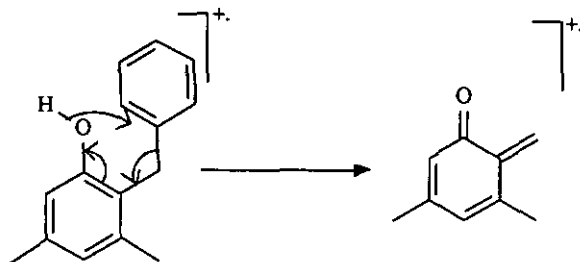


Figure 18.10

Mécanisme de formation de  $m/z$  135Mécanisme de formation de  $m/z$  13418.3.3 Etude de la fragmentation de l'ion  $m/z$  135 par MS-MS

Une fois la structure du produit synthétisé prouvée, nous nous sommes intéressés à comparer la fragmentation des ions  $m/z$  135 obtenus depuis le produit de synthèse, depuis le produit minoritaire de la fraction CL2.4, et depuis l'oléan-12-en-3,11-dione.

Les spectres obtenus dans les mêmes conditions expérimentales (Energie 40 eV, pression d'argon dans la chambre de collision 0.5 Atm) sont représentés aux figures 18.11, 18.12 et 18.13.

Spectre MS-MS des descendants de l'ion 135 du produit synthétisé

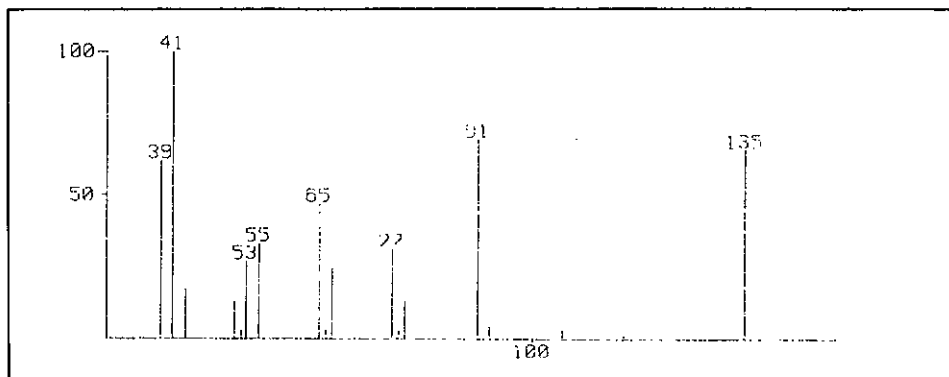


Figure 18.11

Spectre MS-MS des descendants de l'ion m/z 135 du témoin

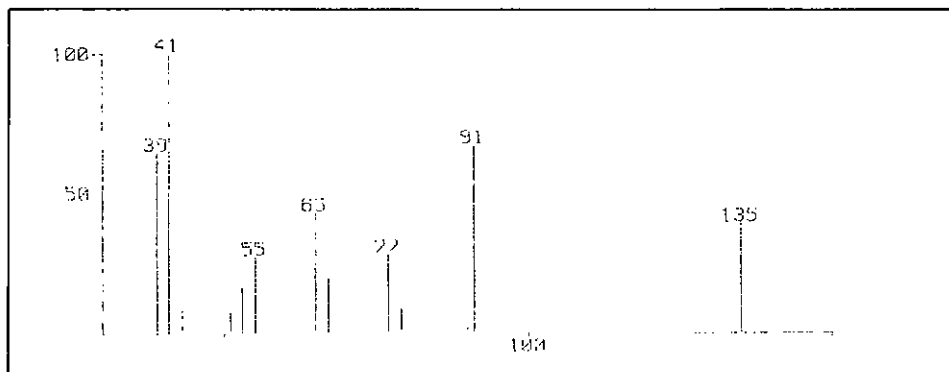


Figure 18.12

MS-MS des descendants du  $m/z$  135 du produit minoritaire de la fraction CL2.4.

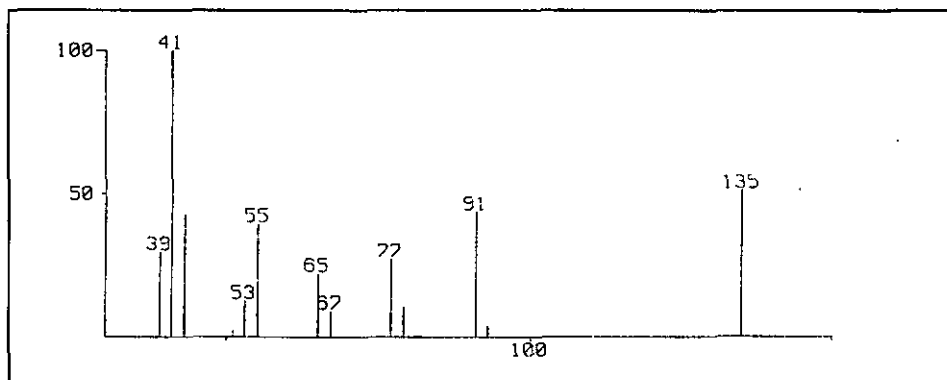


Figure 18.13

#### 18.4 CONCLUSIONS

Grâce à l'utilisation de la MS-MS, il s'est avéré possible d'établir la structure d'un composé minoritaire sans avoir à recourir à des méthodes préalables de séparation. Nous sommes en effet parvenus à enregistrer le spectre complet du produit en sélectionnant les descendants directs du pic moléculaire. Nous avons pu démontrer sa structure en étudiant les divers fragments qui composaient son spectre. Le fait que les  $m/z$  273, 232 et 135 se forment à partir du produit minoritaire, nous est garanti par le spectre de collision du produit majoritaire puisqu'aucun de ces signaux n'apparaît sur celui-ci. Une fois la paternité de l'ion 135 établie comme n'étant due qu'au  $m/z$  273, il ne nous restait plus qu'à prouver la structure de cet ion. La comparaison des spectres de collision des  $m/z$  135 obtenus à partir du produit synthétisé, du produit témoin et de la fraction CL2.4 lève tout doute quand à la similitude des fragments. Nous pouvons donc affirmer que la substance minoritaire contenue dans la fraction CL2.4 possède bien la structure de l'oléan-12-en-3 $\beta$ -ol-11-one.

19 FRACTION CL2.6

## 19.1 ETUDE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Le spectre  $^1\text{H-NMR}$  de notre produit est présenté à la figure 19.1. Son aspect général rappelle le spectre d'un triterpène. Nous retrouvons en effet les signaux de six méthyles tertiaires entre 0.5 et 1.25 ppm, ainsi que de nombreux signaux correspondant à des  $-\text{CH}_2-$ . Les signaux à 2.05 ppm et à 2.13 ppm correspondent à deux méthyles voisins d'une fonction carbonyle. De tels signaux se rencontrent notamment dans les spectres des composés de la famille des hopan-22-one.

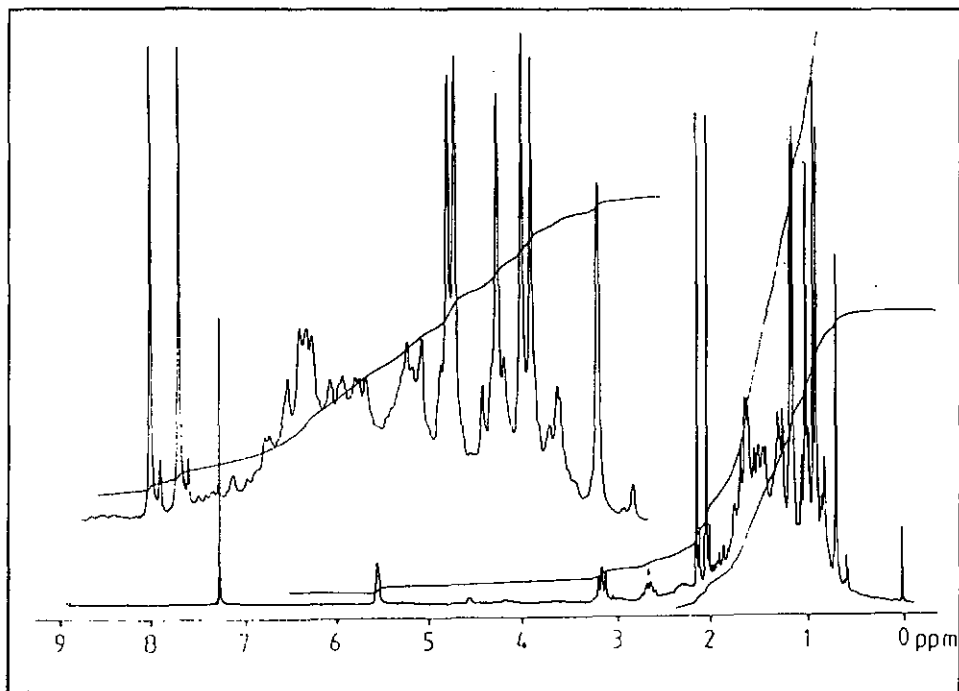
Spectre  $^1\text{H-NMR}$  du produit

Figure 19.1

A titre comparatif, nous avons représenté à la figure 19.2 le spectre  $^1\text{H-NMR}$  de la nor-30-hopan-3,22-dione. Les déplacements chimiques des méthyles des deux composés sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	C(23)	*C(24)	C(25)	*C(26)	C(27)	C(28)	C(29)
nor-30-hopan-dione	1.08	1.01	0.93	1.03	0.95	0.70	2.15
Produit	1.17	1.15	0.90	1.01	0.93	0.69	2.13

\*Ces signaux peuvent être intervertis.

La comparaison des deux spectres montre qu'il est possible de faire correspondre un signal  $^1\text{H-NMR}$  de notre produit à chacun des signaux des méthyles 25 à 30 de la nor-30-hopan-3,22-dione. Nous avons donc postulé que les cycles C, D, E de notre molécule devaient posséder un squelette identique à celui du témoin.

Le triplet à 3.15 a été attribué au signal d'un proton fixé sur un carbone porteur d'une fonction hydroxyle par comparaison avec le spectre du lupéol. Le quadruplet à 2.64 appartient aux signaux attendu pour les composés du type hopane-22-one. Il correspond à un proton en  $\alpha$  de la fonction carbonyle.

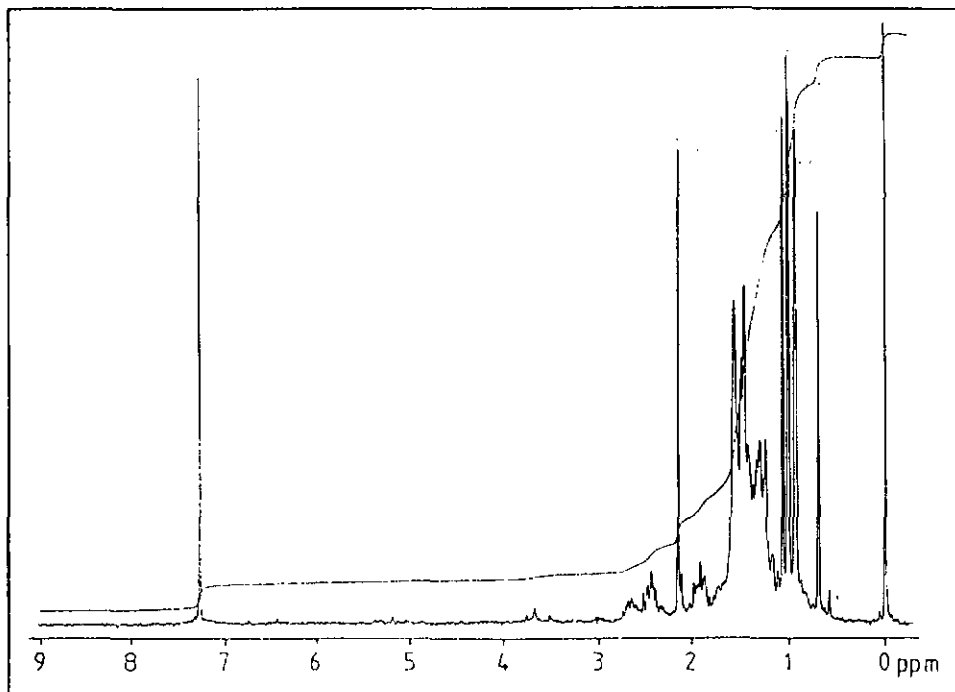
Spectre  $^1\text{H-NMR}$  du nor-30-hopan-3,22-dione

Figure 19.2

Le signal à 5.5 ppm a été attribué à un proton en alpha d'une fonction carboxylique. Il s'agit vraisemblablement du proton en alpha du substituant dont le méthyle donne le signal à 2.05 ppm.

## 19.2 ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Spectre de masse du produit (impact électronique)

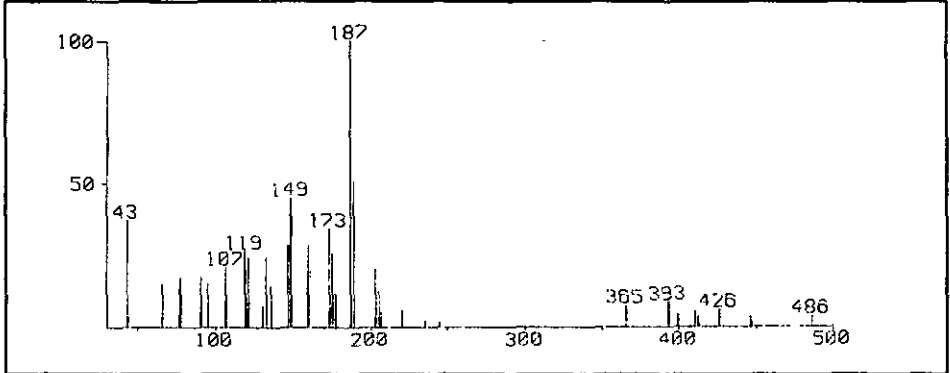


Figure 19.3

Le spectre de masse de notre produit (figure 19.3) indique un poids moléculaire de 486. Ce PM correspond à une structure du type nor-30-hopan-3 $\beta$ -hydroxy-22-one sur laquelle serait fixé un substituant du type -O-CO-CH<sub>3</sub>. Le PM de 486 a été confirmé par l'enregistrement du spectre en ionisation chimique (figure 19.4).

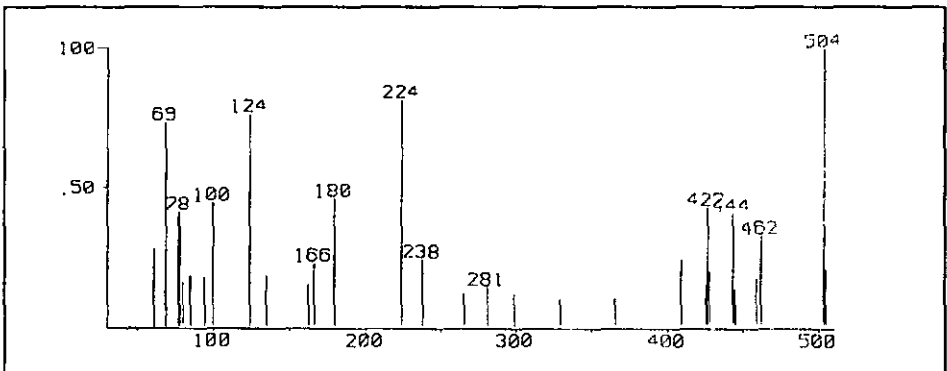
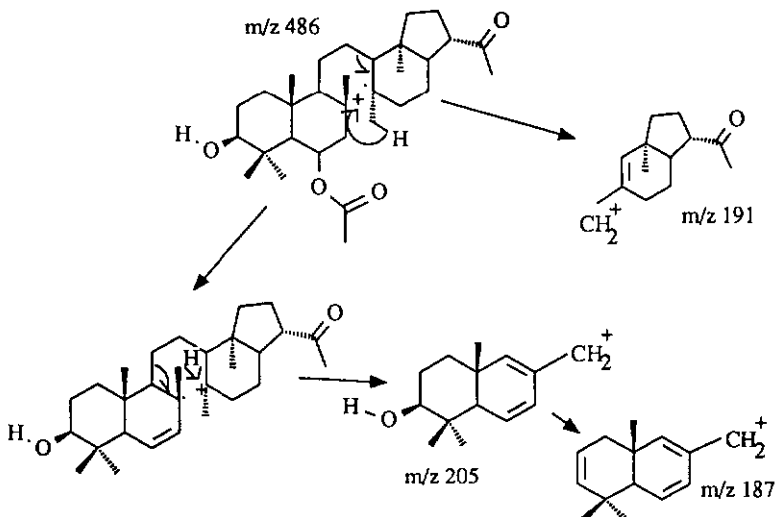
Spectre de masse du produit (ionisation chimique NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)

Figure 19.4

Le  $m/z$  504 correspond au pic quasi-moléculaire obtenu par formation d'un complexe entre  $\text{NH}_4^+$  et le produit ( $486 + 18$ ). Sur la base des considérations ci-dessus, nous avons postulé la structure dont le schéma de fragmentation est proposé ici.

#### Fragmentation proposée



### 19.3 ETUDE PAR MS-MS

De manière à confirmer notre structure, nous avons procédé à l'étude par MS-MS de notre produit et du témoin. Dans un premier temps, nous avons enregistré les spectres des descendants des pics moléculaires. Ces spectres sont présentés aux figures 19.5 et 19.6.

Spectre MS-MS du produit (descendants de m/z 486)

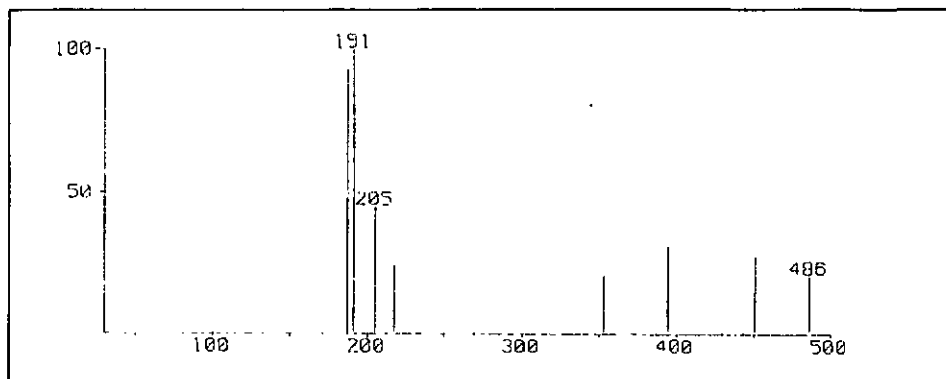


Figure 19.5

Spectre MS-MS du témoin (descendants de m/z 426)

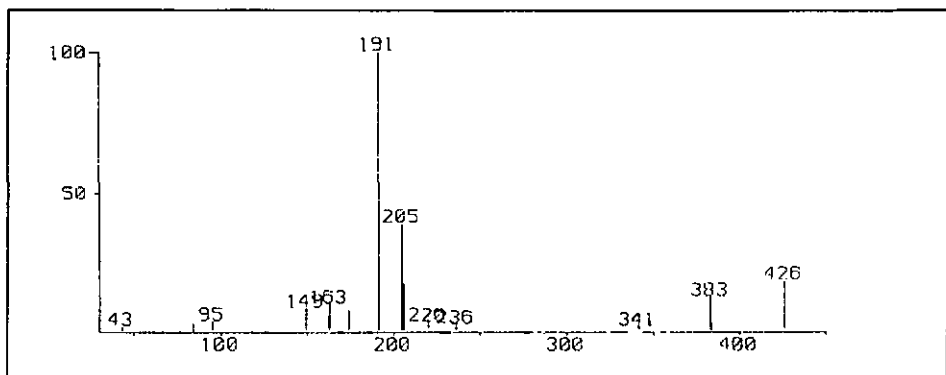
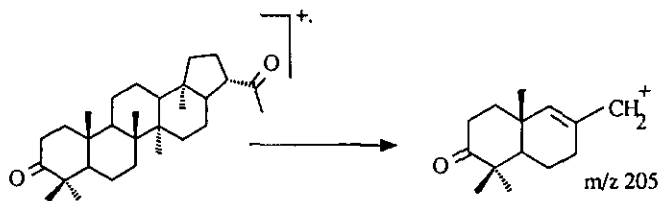


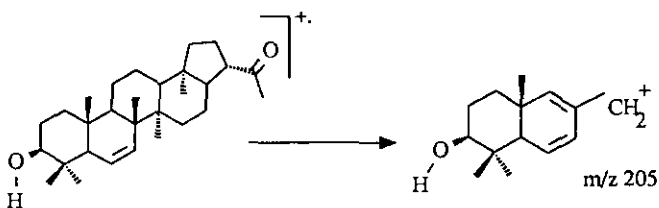
Figure 19.6

Nous constatons pour les deux spectres la présence des signaux connus : m/z 191 et m/z 205. Selon l'étude  $^1\text{H-NMR}$  que nous avons réalisée et selon le schéma de fragmentation que nous avons proposé pour notre produit, nous nous attendons à ce que les fragments m/z 191 du produit et du témoin soient identiques.

Les fragments  $m/z$  205, par contre, doivent être différents puisque dans le cas du témoin le fragment est expliqué comme suit :



Alors que dans le cas du produit il est expliqué de la manière suivante :



Le spectre de masse des descendants de  $m/z$  191 pour notre produit est présenté à la figure 19.7. Nous constatons que celui-ci est en tout point comparable au spectre des descendants du  $m/z$  191 du témoin.

Spectre MS-MS du produit (descendants de m/z 191)

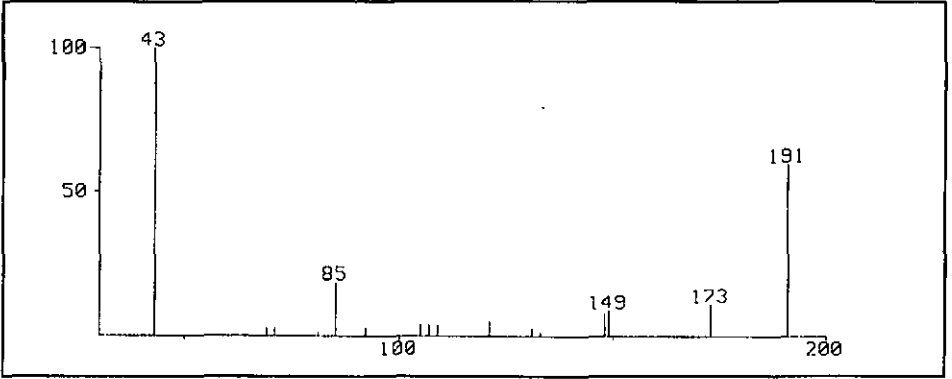


Figure 19.7

Spectre MS-MS du témoin (descendants de m/z 191)

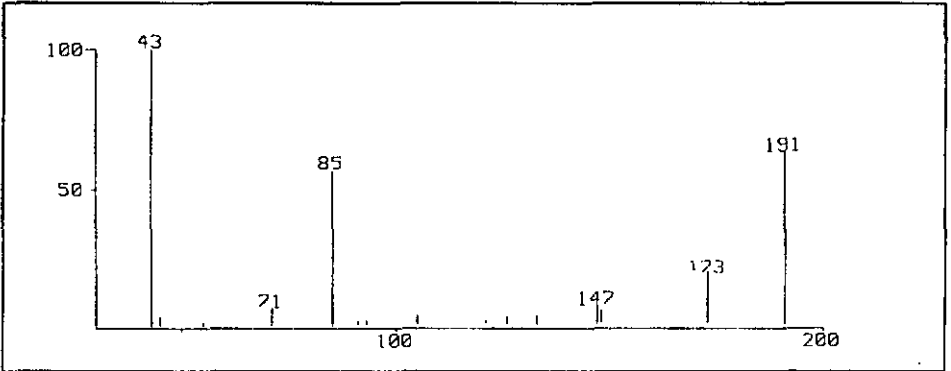


Figure 19.8

Nous avons également enregistré les spectres de MS-MS des descendants des ions m/z 205.

Spectre MS-MS du produit (descendants de m/z 205)

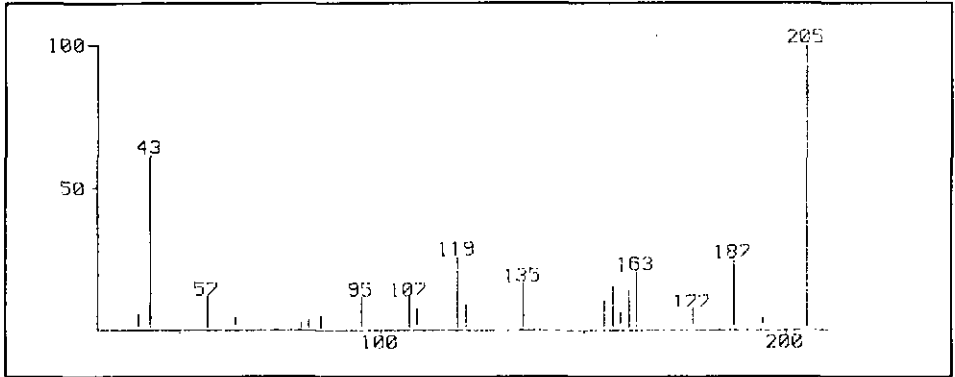


Figure 19.9

Ceux-ci diffèrent. Les signaux enregistrés pour les deux spectres montrent tout de même une certaine similitude, ce qui est normal au vu des faibles différences distinguant les squelettes des deux ions.

Spectre MS-MS du témoin (descendants de m/z 205)

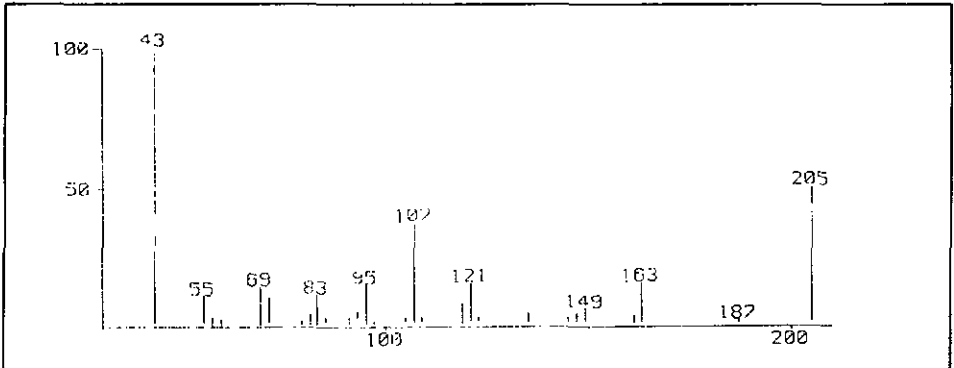


Figure 19.10

#### 19.4 DETERMINATION DE LA POSITION DU SUBSTITUANT -O-CO-CH<sub>3</sub>

Si l'étude que nous avons menée nous indique que le substituant -O-CO-CH<sub>3</sub> doit se trouver rattaché au cycle A ou B, nous n'avons pas encore pour autant déterminé la position exacte qu'il occupe. Nous avons établi cette position par l'étude des constantes de couplage du proton en  $\alpha$  du substituant ainsi que celle de l'influence du substituant sur son voisinage.

**Substitution en C<sub>1</sub>:** Nous l'avons éliminée pour les raisons suivantes : Les constantes de couplages qui interviennent dans le signal du proton en  $\alpha$  du substituant (signal à 5.5 ppm) sont relativement faibles. Un couplage axial-axial entre deux protons donne une constante de couplage d'environ 15 Hz. Nous en concluons donc que le proton voisin de notre substituant doit être en position équatoriale. La construction d'un modèle montre que si le substituant est positionné en 1 de manière axiale, le proton en  $\alpha$  du -OH doit subir un déblindage. Or, le signal de ce proton est à 3.13 ppm, ce qui correspond à une situation normale pour un  $\alpha$ -hydroxy-triterpène.

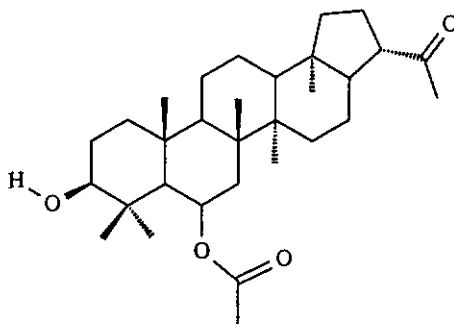
Nous avons écarté la possibilité d'une substitution en C<sub>2</sub> car la valeur du déplacement chimique du signal du proton en  $\alpha$  de l'hydroxyle ne pourrait correspondre à la valeur enregistrée. De plus cette position empêcherait l'élimination d'eau qui conduit du m/z 205 au m/z 187 dans le spectre de masse. Cette perte d'eau est confirmée par l'étude MS-MS des descendants du pic moléculaire.

A ce stade de nos investigations, seules les positions 6 et 7 du cycle B pouvaient encore entrer en considération.

Une recherche bibliographique [16,33,34] nous a permis de déterminer qu'une substitution en C<sub>7</sub> influencerait les déplacements chimiques des méthyles 26 et 27. Nous avons donc écarté cette position.

## 19.5 CONCLUSIONS

Sur la base des spectres  $^1\text{H-NMR}$  et de l'étude par spectrométrie de masse, nous pouvons établir que notre produit a la structure suivante.



Il s'agit d'une structure nouvelle chez les triterpène naturels. Il est intéressant de relever que la technique de MS-MS utilisée ici nous a non seulement permis d'établir la similitude de deux fragments de provenance différentes, mais également de mettre en évidence des différences entre les squelettes de deux fragments de même masse.

**CLADONIA FURCATA (L.) Ach.**

## V CLADONIA FURCATA (L.) Ach.

### 20 PROCEDURE D'ANALYSE

Le lichen a été extrait à l'acétone. Le résultat de l'extraction a été subdivisé en partie soluble et partie insoluble dans l'éther (cf. schéma).

#### 20.1 PARTIE INSOLUBLE

Cette fraction est principalement composée de depsides et de produits polaires. Elle n'était pas d'une grande importance pour nous puisque nous recherchions avant tout les triterpènes. Nous avons néanmoins identifié les composés suivants:

- Acide fumarprotocétrarique
- Atranorine
- Acide éverninique
- Atranol

#### 20.2 PARTIE SOLUBLE

La partie soluble dans l'éther de l'extrait a été séparée en fraction acide et en fraction neutre.

##### 20.2.1 Fraction acide

Le premier composé que nous avons identifié est le  $\beta$ -orcinoicarboxylate de méthyle. La présence de cet ester est probablement due à l'hydrolyse de l'atranorine.

### 20.2.2 Fraction neutre

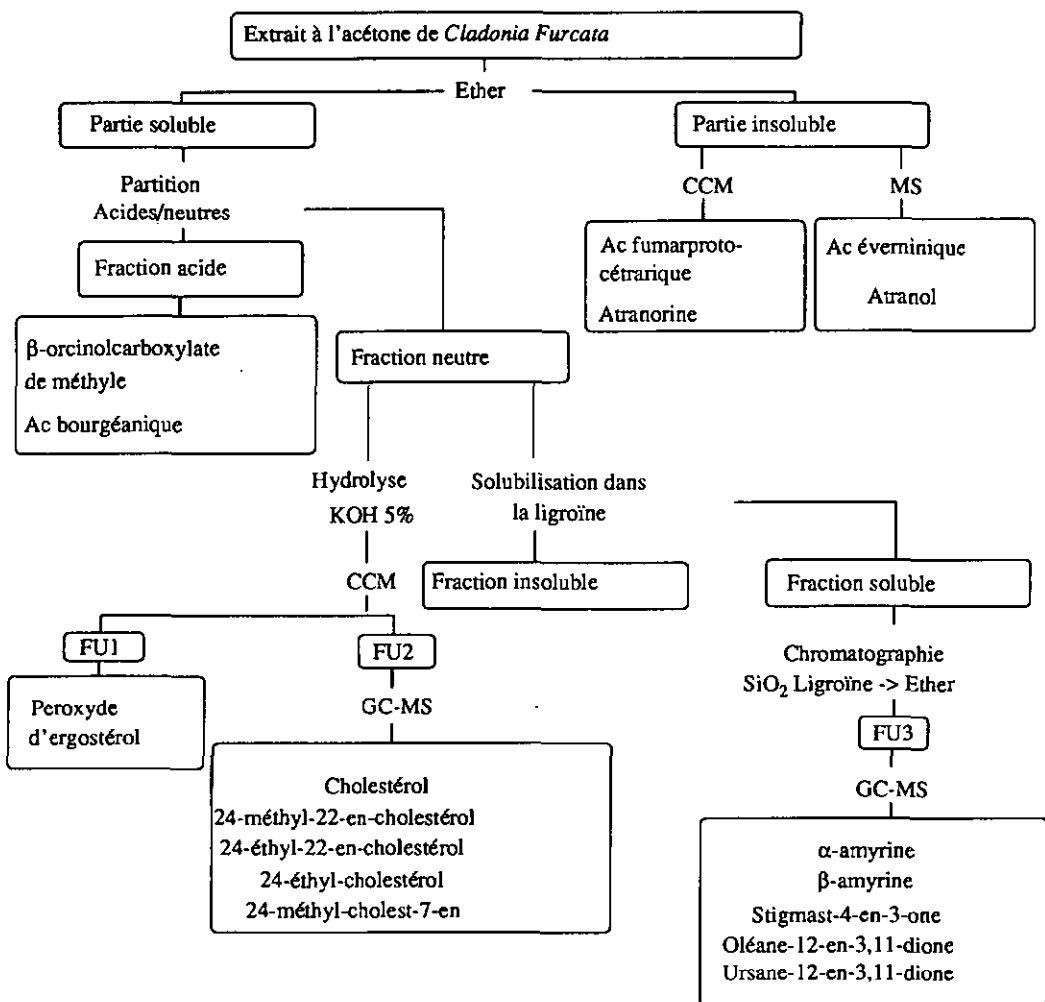
Une partie de la fraction neutre a été extraite à l'éther de pétrole puis passée sur une colonne de silice. L'une des fractions récupérées a pu être injectée en GC-MS et cinq produits ont été identifiés:

- $\beta$ -amyrine
- $\alpha$ -amyrine
- Stigmat-4-en-3-one
- Oléane-12-en-3,11-dione
- Ursane-12-en-3,11-dione

La même fraction a été réétudiée par MS-MS directe de l'échantillon à des fins de comparaison.

La seconde partie de la fraction neutre a été hydrolysée puis éluée par CCMP (chromatographie sur couche mince préparative). Deux fractions ont été récupérées en quantités suffisantes pour être analysées. La première contenait du peroxyde d'ergostérol. La seconde a été analysée par GC-MS. Les substances suivantes ont été identifiées:

- Cholestérol
- 24-méthyl-22-en-cholestérol
- 24-éthyl-22-en-cholestérol
- 24-éthyl-cholestérol
- 24-méthyl-cholest-7-en

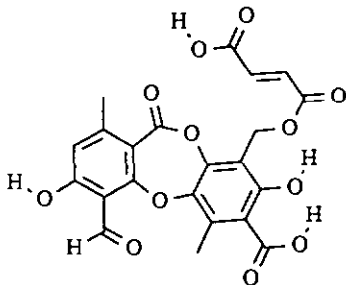


## 21 IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX DEPSIDES

Bien que notre travail porte principalement sur l'étude des composés à structures stéroïdiques et triterpéniques, nous nous sommes également intéressés à identifier les principaux depsides présents dans *Cladonia Furcata*. Ce lichen a en effet peu été étudié et seuls l'acide fumarprotocétranique et l'atranorine ont été signalés [13,35].

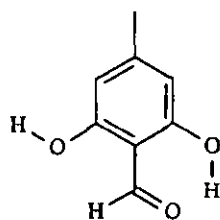
L'étude par CCM des extraits bruts et la comparaison des spots obtenus avec des témoins nous ont permis de mettre en évidence ces deux produits.

L'acide fumarprotocétranique a été isolé à partir de la partie insoluble dans l'éther de l'extrait brut. Il a été recristallisé dans l'acétone et étudié par MS et <sup>1</sup>H-NMR [25].

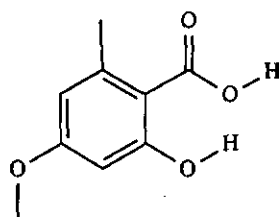


Acide fumarprotocétranique

L'étude de la partie insoluble dans l'éther de l'extrait brut nous a également permis d'identifier l'acide éverninique et l'atranol. Ces deux composés ont été mis en évidence par MS en ionisation chimique.

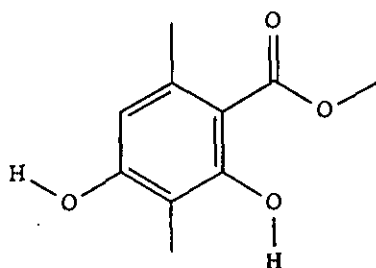


Atranol



Acide éverminique

L'étude de la fraction acide de la partie soluble dans l'éther de l'extrait brut nous a permis d'identifier le  $\beta$ -orcinolcarboxylate de méthyle. Ce composé est souvent rencontré dans les lichens contenant de l'atranorine car il en est l'un des précurseurs.

 $\beta$ -orcinolcarboxylate de méthyle

L'étude de ces fractions nous a amené à isoler un autre composé dont la présence était pour le moins inattendue : il s'agit de l'acide bourgéanique. Cet acide, jusqu'ici rarement rencontré, a également été identifié chez *Cladonia Stéréoclada*, où nous l'avons même isolé en quantités importantes.

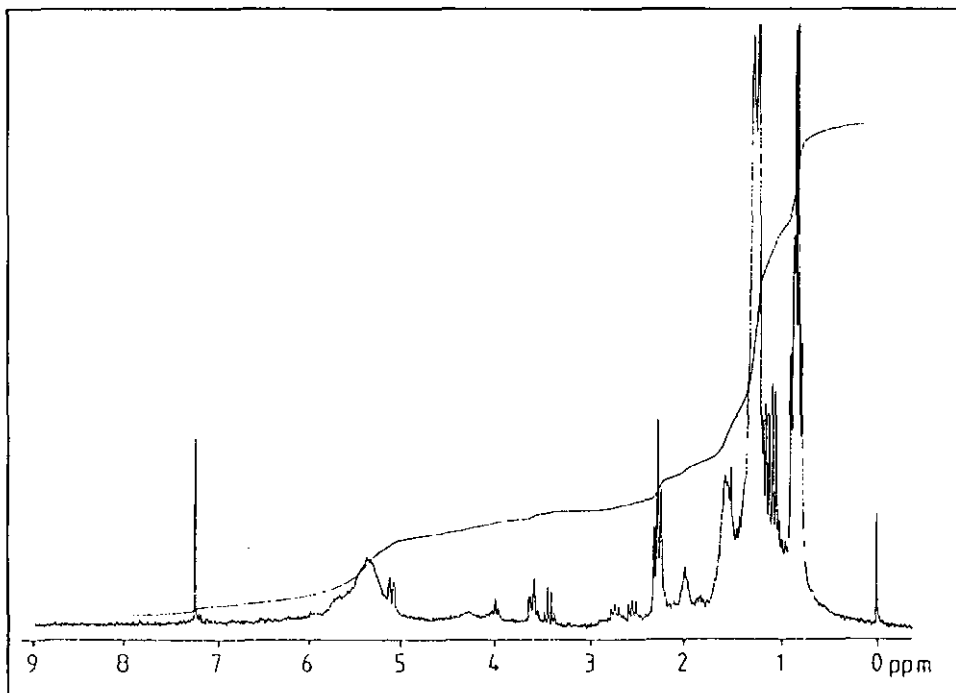
Spectre  $^1\text{H-NMR}$  de l'acide bourgéanique

Figure 21.1

Le spectre  $^1\text{H-NMR}$  (figure 21.1) montre que le produit n'est pas pur, mais son étude par spectrométrie de masse (Figure 21.2) a levé tout doute.

## Spectre de masse de l'acide bourgénéique

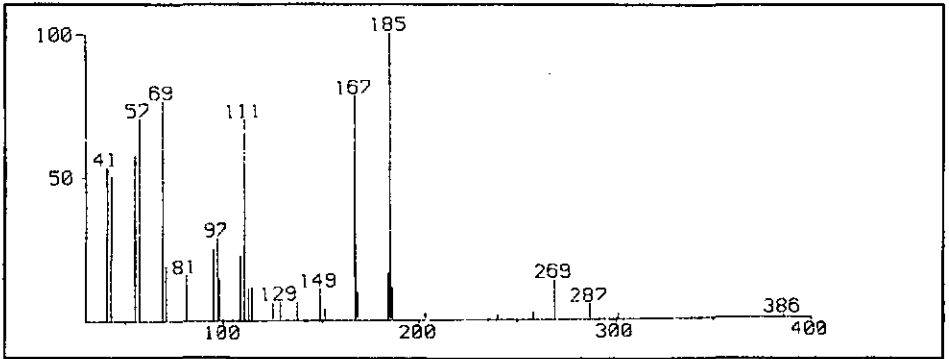


Figure 21.2

Une analyse complète de ce produit sera faite lors de l'étude de *Cladonia Stéréoclada* (chapitre 25).

## 22 FRACTION FU3

### 22.1 ETUDE GC-MS

La fraction FU3 a été analysée par GC-MS. (Colonne OV-1 220 °C à 320 °C, 3°/mn, injecteur et interface à 250 °C). La chromatographie obtenue est présentée à la figure 22.1.

#### Chromatographie de la fraction FU3

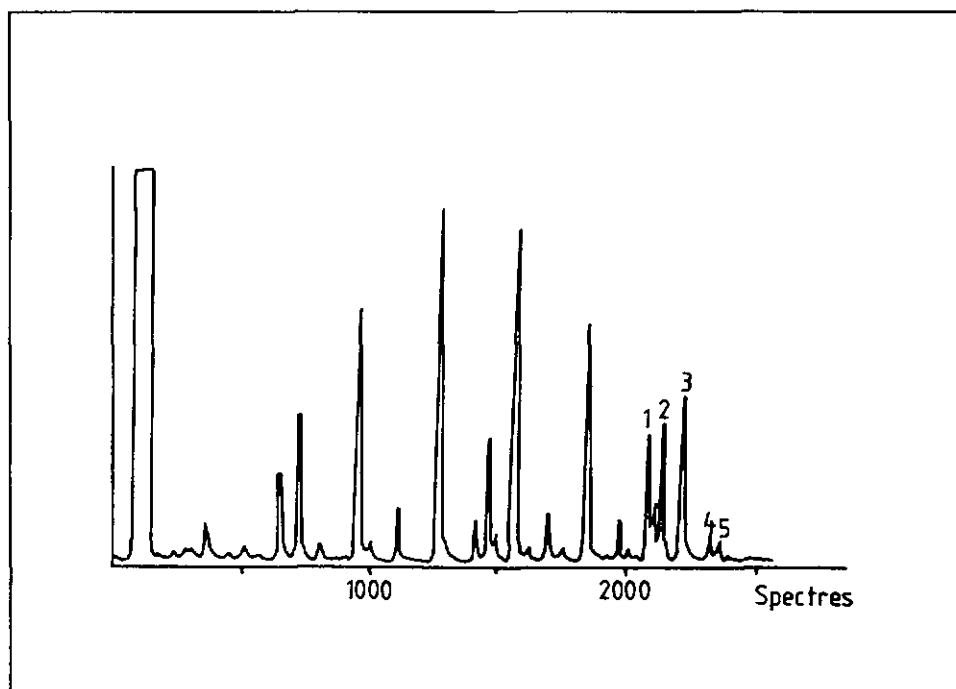


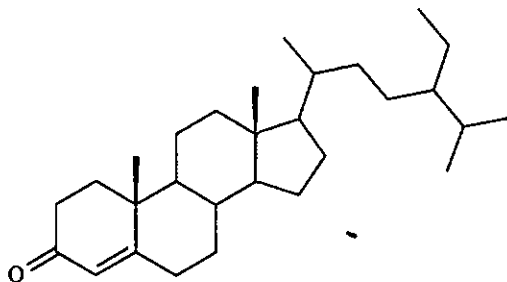
Figure 22.1

### 22.1.1 $\beta$ -amyrine (1) et l' $\alpha$ -amyrine (2)

Les deux premiers produits identifiés sont dans l'ordre d'élution, la  $\beta$ -amyrine (1) et l' $\alpha$ -amyrine (2). Ces deux substances ayant fait l'objet d'une étude approfondie au chapitre 13, nous ne reproduirons pas ici les spectres obtenus.

### 22.1.2 Stigmast-4-en-3-one (3) [25]

#### Structure



#### Spectre

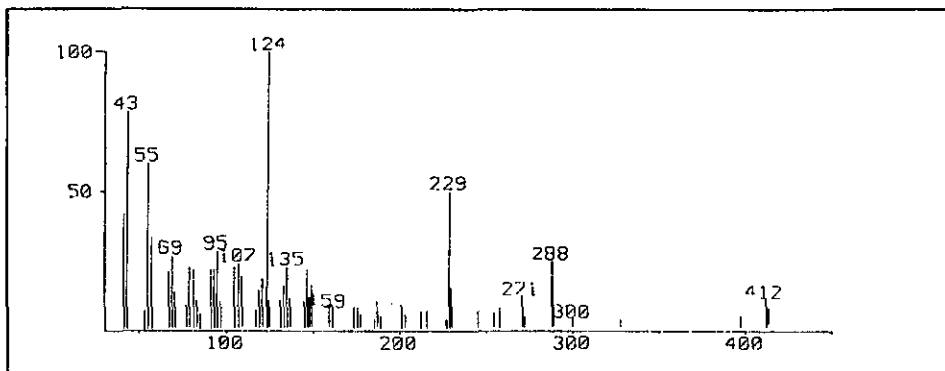
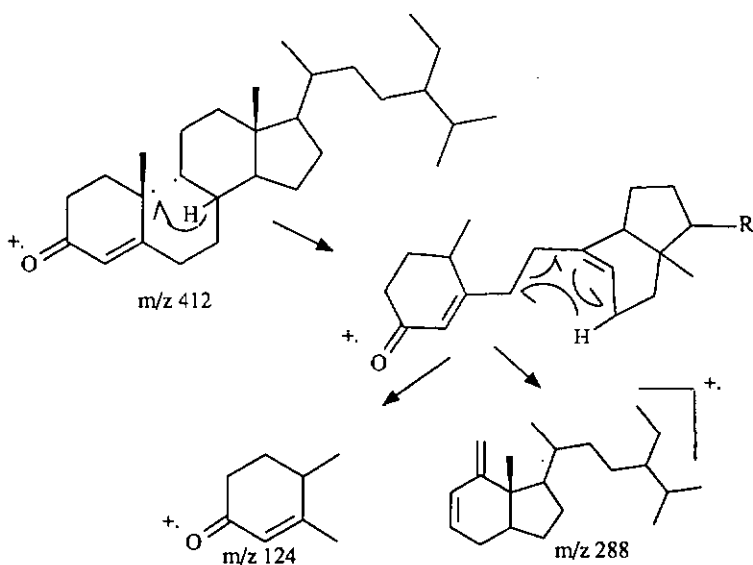


Figure 22.2

Ce spectre de masse est caractérisé par la rupture du cycle B, rupture qui conduit soit à la formation du fragment à  $m/z$  124 (cycle A), soit au fragment à  $m/z$  288 (cycles C et D plus la chaîne). Le signal à  $m/z$  271 correspond à l'élimination de la chaîne depuis le pic moléculaire. Le  $m/z$  300, pour sa part est dû à une fragmentation de celle-ci au niveau du carbone 22. Cette rupture est souvent rencontrée dans cette classe de produits et est nettement favorisée par une double liaison en 22.

### Principales fragmentations [53]



### 22.1.3 Oléane-12-en-3,11-dione et Ursane-12-en-3,11-dione

Le produit (4) a été identifié comme étant de l'Oléane-12-en-3, 11-dione. Le produit (5) lui, correspondait à de l'Ursane-12-en-3, 11-dione. Ces deux substances ayant déjà été commentées au chapitre 13 et 18, nous n'avons pas jugé nécessaire de redonner leurs spectres ici.

## 22.2 ETUDE DE LA FRACTION FU3 PAR MS-MS

Après avoir étudié cette fraction par GC-MS et en avoir identifié les principaux composants, nous nous sommes intéressés à vérifier s'il était possible de retrouver les spectres des produits en travaillant directement sur le mélange. La MS-MS était une technique toute désignée pour réaliser cette expérience.

Nous avons optimisé l'appareil de manière à obtenir les spectres des descendants de  $m/z$  426 ( $\alpha$  et  $\beta$ -amyrines), de  $m/z$  438 (oléanes et ursanes-12-en-3,11-diones) et de  $m/z$  412 (stigmast-4-en-3-one).

Le spectre obtenu pour les descendants de  $m/z$  426 est, avec son  $m/z$  218 important, caractéristique des amyrynes. Il est toutefois très difficile de tirer plus de renseignements d'un tel spectre puisque les autres signaux sont très faibles. Le spectre que nous avons obtenu ici correspond à la combinaison des spectres des deux produits. La seule possibilité de déterminer si les deux sont présents est d'enregistrer les descendants du  $m/z$  218 et d'étudier les signaux à  $m/z$  122 et  $m/z$  94. Nous avons donc enregistré le spectre correspondant (figure 22.4). Les deux signaux sont présents, confirmant l'analyse par GC-MS.

Descendants du m/z 426

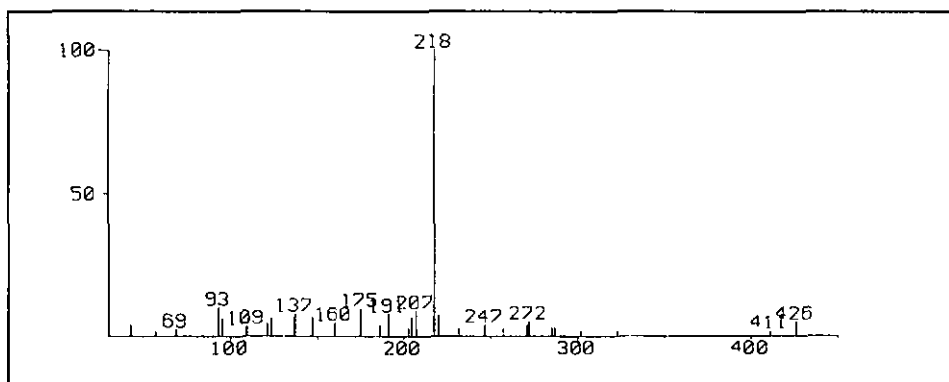


Figure 22.3

Descendants du m/z 218

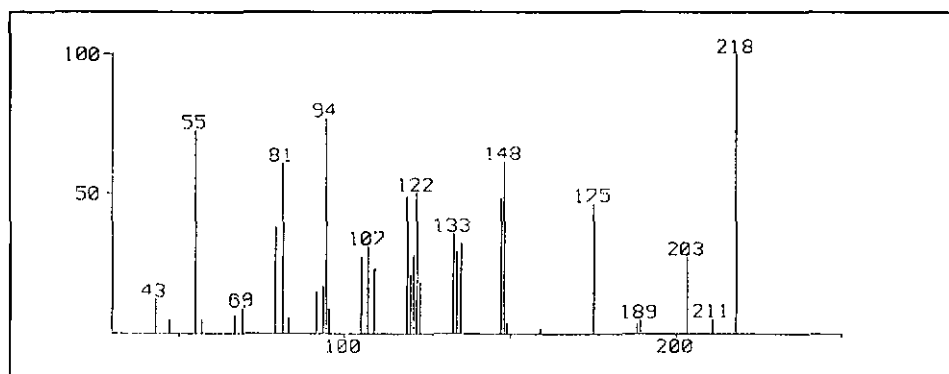


Figure 22.4

Le spectre des descendants du m/z 412 permet de retrouver le stigmat-4-en-3-one. Les m/z 412, 288, 229 et 124 sont présents, ainsi que m/z 271 qui correspond à la perte de la chaîne latérale.

## Descendants du m/z 412

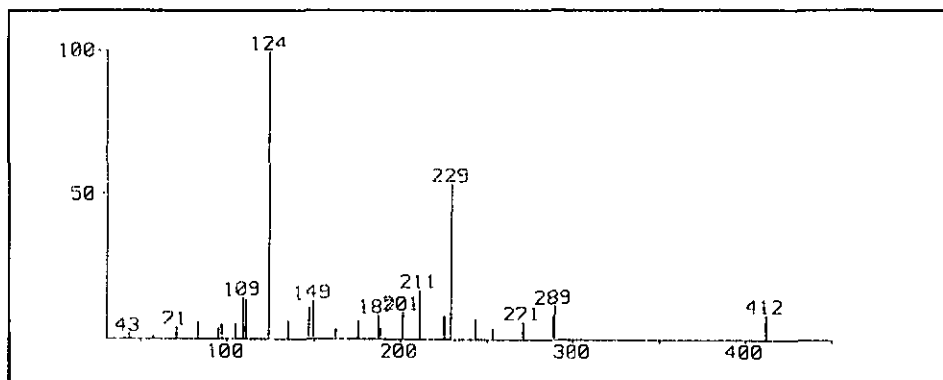


Figure 22.5

L'enregistrement des descendants du m/z 438 a conduit au spectre de la figure 22.10. Comme dans le cas des amyrynes, il présente les caractéristiques des oléanes ou ursanes-12-en-3,11-dione. Pour déterminer s'il s'agit d'oléane ou d'ursane, il est nécessaire d'étudier l'importance du m/z 108 dans les descendants du m/z 232 (cf l'expérience réalisée au chapitre 13). Nous n'avons pas pu réaliser cette expérience car les quantités de substance présentes dans le mélange étaient vraiment trop faibles pour permettre une analyse GC-MS-MS.

## Descendants du m/z 438

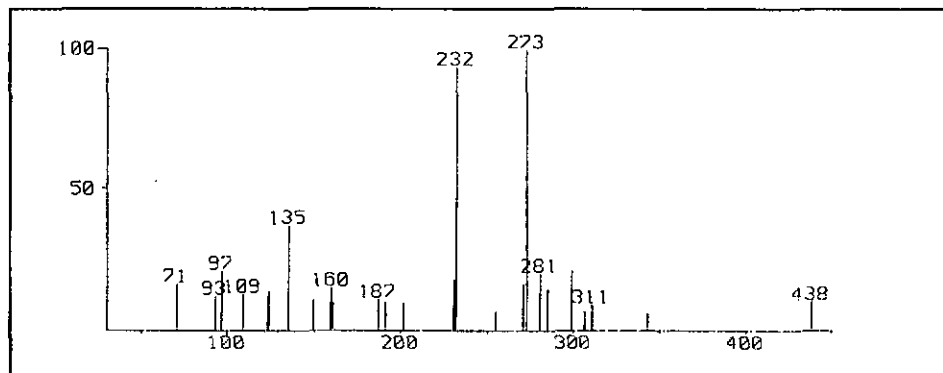


Figure 22.6

## 22.3 ETUDE GC-MS-MS DES AMYRINES

Il était intéressant d'essayer d'établir l'ordre d'élu­tion des amy­rines en s'appuyant sur l'enregistrement des spectres MS-MS des descendants de  $m/z$  218 au cours de la chromatographie de la fraction. Les spectres des figures 22.7 et 22.8 présentent les résultats obtenus. Ils montrent que la  $\beta$ -amy­rine est éluee en premier de la colonne. Le  $m/z$  94 y est en effet nettement dominant. L' $\alpha$ -amy­rine est bien éluee en second comme le prouve le spectre de la figure 22.8 où cette fois c'est le  $m/z$  122 qui prévaut.

Descendants du  $m/z$  218 par GC-MS-MS (premier pic)

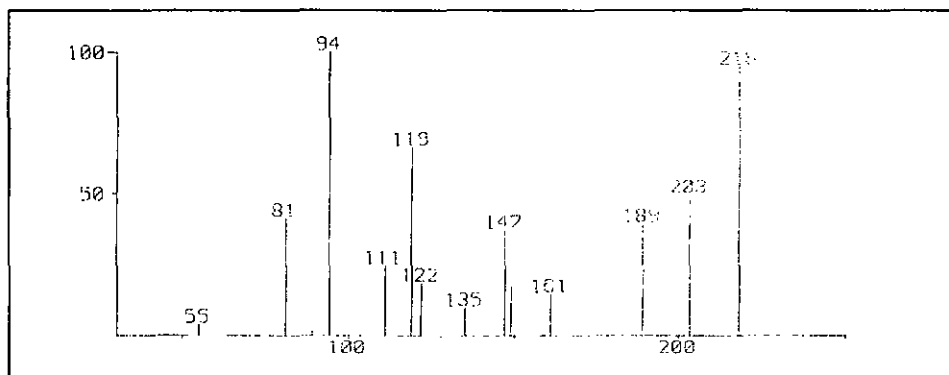


Figure 22.7

Descendants du  $m/z$  218 par GC-MS-MS (deuxième pic)

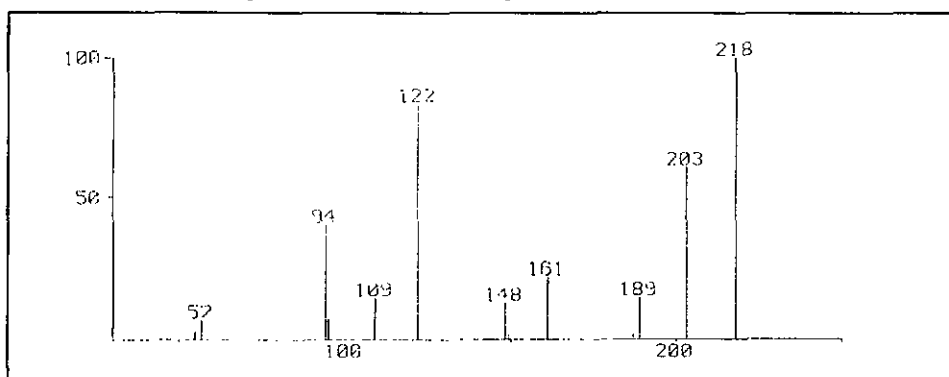


Figure 22.8

## 22.4 CONCLUSIONS

La comparaison de l'analyse de cette fraction par GC-MS et MS-MS était intéressante pour nous puisqu'elle représentait notre première tentative d'étude d'un mélange de substances par cette technique. Elle nous a montré qu'une telle étude était possible mais qu'un certain nombre de restrictions étaient à prendre en considération. Outre le fait que deux substances de même PM ne peuvent pas être séparées uniquement en effectuant des spectres de collision sur les ions moléculaires, nous avons constaté que:

- La méthode est très sensible puisqu'une seule introduction directe dans la source suffit à l'analyse de plusieurs substances.

- Le mélange ne doit pas être trop compliqué

- Si les spectres des substances présentes sont nettement dominés par un signal, les résultats obtenus se prêtent moins facilement à une interprétation immédiate ( $\alpha$  et  $\beta$ -amyrynes).

L'expérience de GC-MS-MS était une tentative intéressante car il n'est pas évident d'obtenir des spectres MS-MS sur des fragments de produits élués par GC. Nous pensons que nous avons pu obtenir un résultat interprétable grâce au fait que le  $m/z$  218 est le signal le plus intense du spectre des amyrynes.

Notons enfin que, du point de vue expérimental, il est très difficile de régler correctement l'appareil si l'on n'a pas déjà une idée du type de substances que l'on va rencontrer.

## 23 FRACTION FU2

Sachant que les stérols sont souvent liés notamment avec des acides gras et des sucres, nous avons procédé à l'hydrolyse de la deuxième partie de la fraction neutre soluble dans l'éther de notre extrait brut.

L'hydrolysate a été séparé par CCM préparative ( $\text{SiO}_2$ , 2 mm, éluant toluène-dioxane-acide acétique 180/45/5). 9 fractions ont été isolées et analysées par  $^1\text{H-NMR}$ . La fraction 2 a été identifiée comme contenant du peroxyde d'ergostérol, composé que nous avons déjà rencontré dans plusieurs lichens.

La fraction 4, elle, a été étudiée par GC-MS. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (figure 23.1 et suivantes).

### 23.1 ETUDE PAR GC-MS

(Colonne OV-1, 220 °C  $\rightarrow$  320 °C, 3 °/min, injecteur et interface à 250 degrés). Le chromatogramme obtenu est présenté à la figure 23.1.

Chromatogramme de la fraction FU2

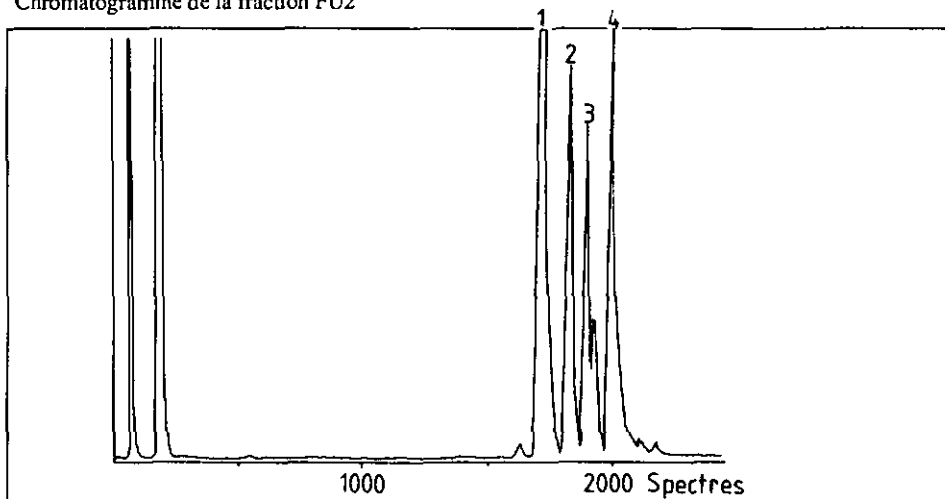
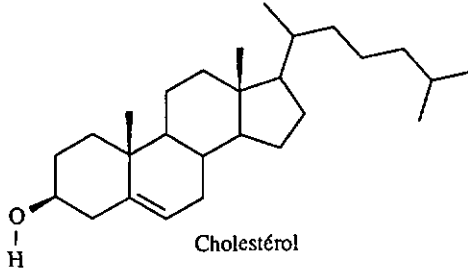


Figure 23.1

## 23.1.1 Cholestérol [25]

## Structure



## Spectre

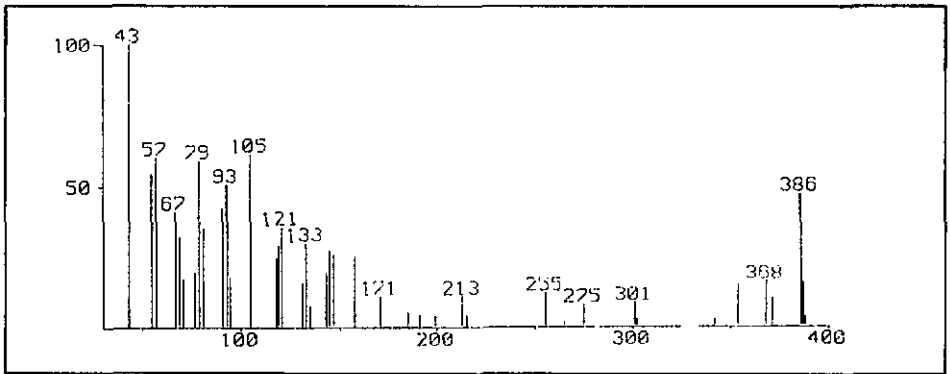
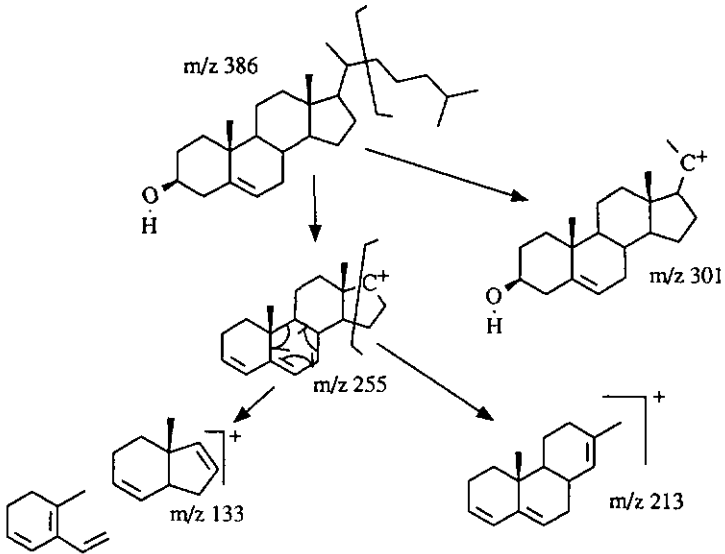


Figure 23.2

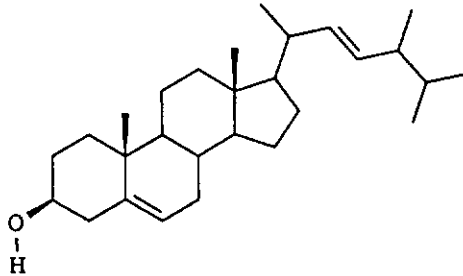
La fragmentation du cholestérol se caractérise principalement par la perte totale ( $m/z$  255) ou partielle ( $m/z$  301) de la chaîne latérale ainsi que par l'élimination d'eau ou la perte d'un méthyle. La présence d'une double liaison en position 5 permet une RDA qui se traduit par la rupture du cycle B.

Principales fragmentations



## 23.1.2 24-méthyl-22-en-cholestérol

## Structure



## Spectre

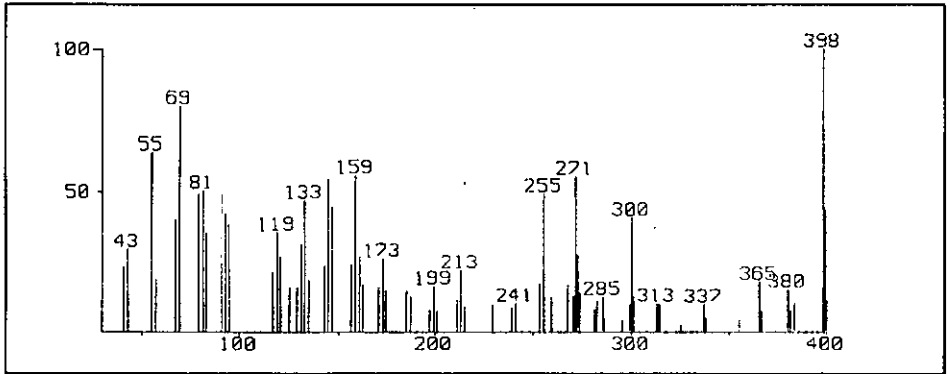
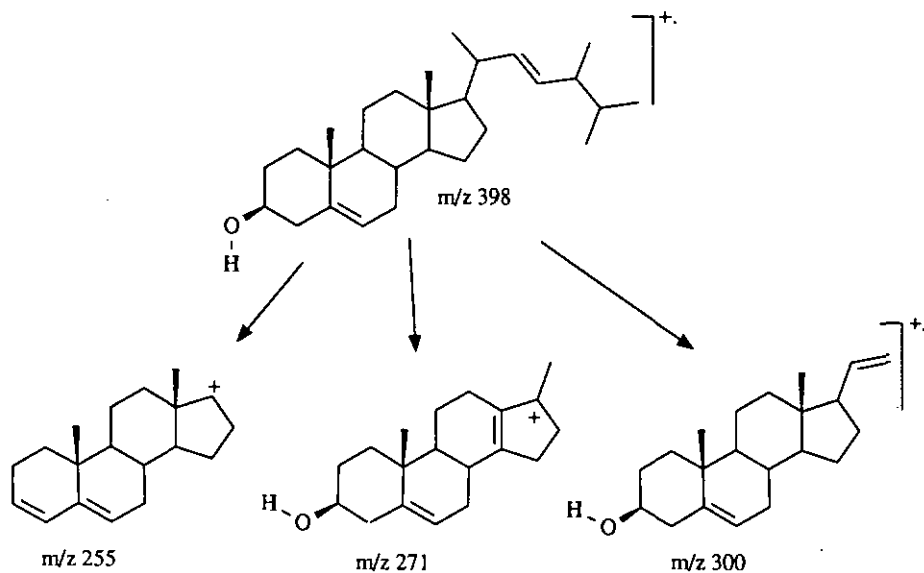


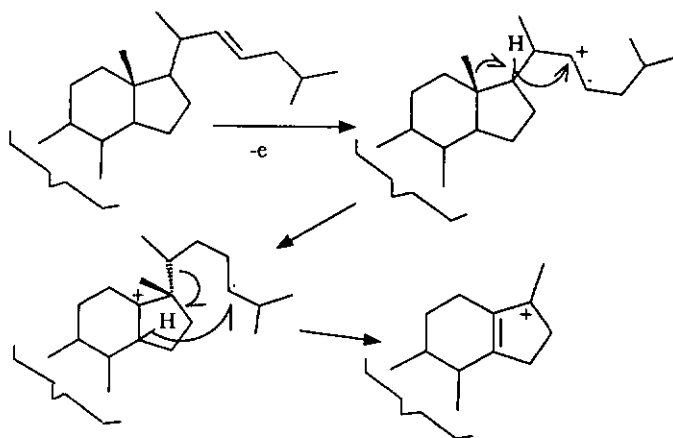
Figure 23.3

Le spectre de masse du 24-méthyl-22-en-cholestérol se caractérise par un  $m/z$  300 abondant dû à la double liaison en C(22). Les autres fragmentations sont très similaires à celles déjà vues pour le cholestérol.

Principales fragmentations

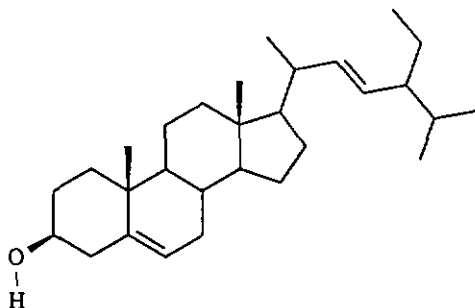


La structure du  $m/z$  271 est obtenue par élimination de la chaîne latérale doublement protonée [36].



## 23.1.3 24-éthyl-22-en-cholestérol

## Structure



## Spectre

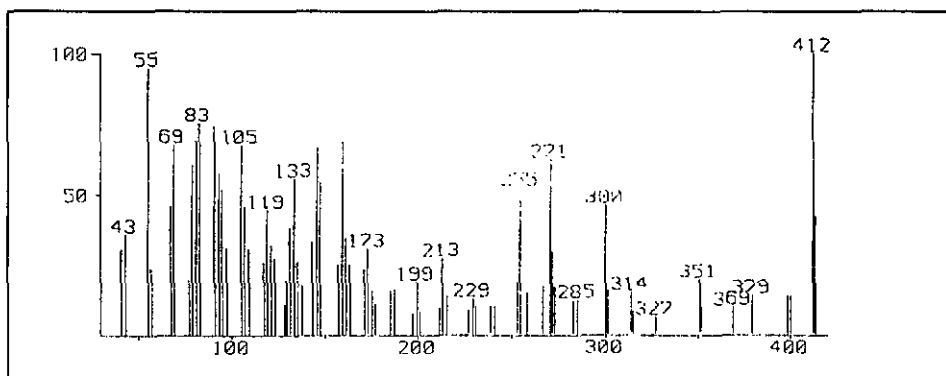
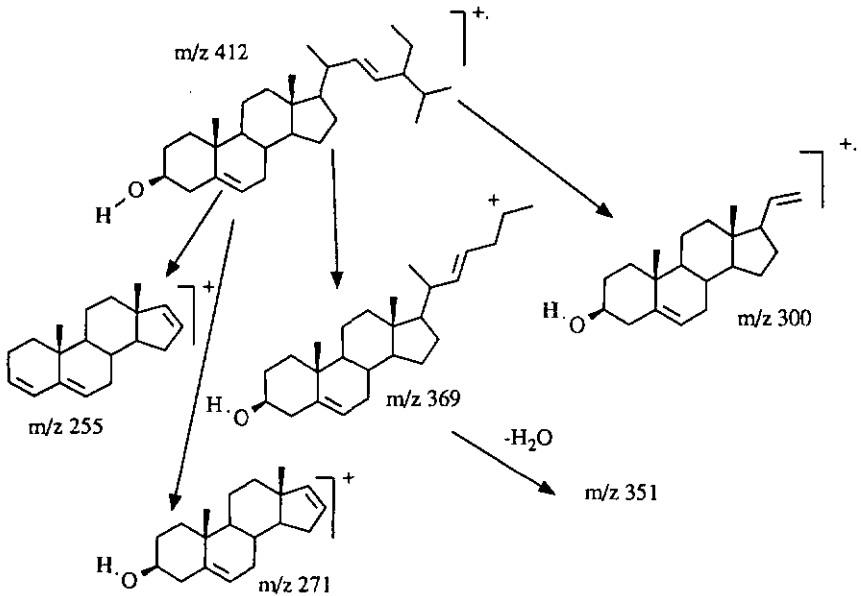


Figure 23.4

Le spectre de masse du 24-éthyl-22-en-cholestérol est, comme on pouvait s'y attendre, très proche du précédent. Ici aussi, le signal à  $m/z$  300 caractérise une double liaison en C(22). Le signal à  $m/z$  355 du spectre précédent correspond à la perte du groupe isopropyle. Dans le spectre de la figure 23.3, cette perte est peu abondante. Dans le spectre de la figure 23.4, le signal est déplacé à  $m/z$  369.

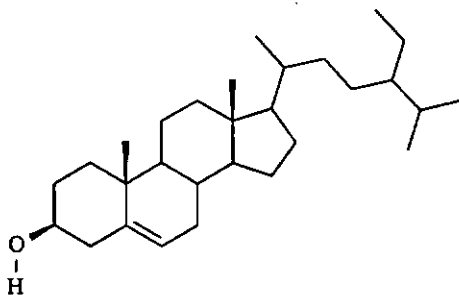
Ce dernier est nettement plus abondant. Par perte de 18 unités de masse, il conduit au  $m/z$  351. Ceci suggère que la présence d'un groupe éthyle en position 24 favorise la rupture de la chaîne entre les carbones C(24) et C(25). Il est probable qu'un transfert de proton sur la double liaison en C(22) est favorisé, facilitant la rupture de la liaison C(24)-C(25).

### Principales fragmentations



## 23.1.4 24-éthyl-cholestérol

## Structure



## Spectre

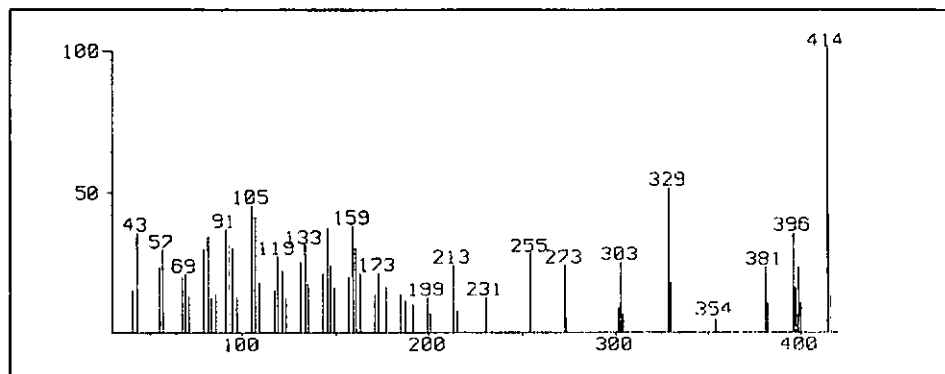
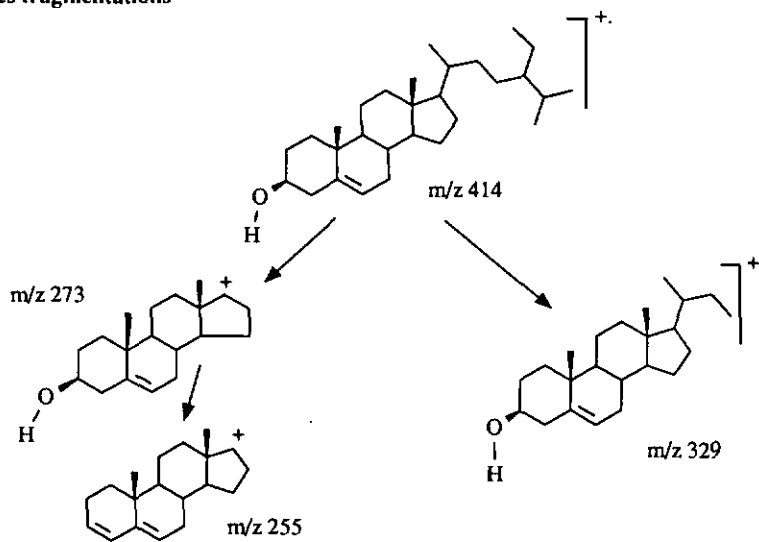


Figure 23.5

Outre les pertes de 18 et 15 unités de masse conduisant aux signaux à  $m/z$  398, 396 et 381, nous relevons la présence de fragmentations plus caractéristiques.  $m/z$  329 est obtenu par l'élimination partielle de la chaîne par rupture de la liaison C(22)-C(23). Les signaux à  $m/z$  273 et  $m/z$  255 correspondent respectivement au squelette après élimination complète de la chaîne et à ce même squelette après élimination d'eau.

Principales fragmentations



**CLADONIA STEREOCLADA des Abb.**

## VI CLADONIA STEREOCLADA des Abb.

### 24 PROCEDURE D'ANALYSE

Le lichen a été ramassé aux îles Canaries (Tenerife, Punta de la Mercedes). Après élimination de tout matériel étranger, 20 g ont été broyés puis extraits dans un Soxhlet successivement par du pentane, de l'éther et de l'acétate d'éthyle (cf. schéma). Les quantités suivantes d'extraits bruts ont été recueillies:

- Extrait au pentane : 350 mg
- Extrait à l'éther : 100 mg
- Extrait à l'acétate d'éthyle : 200 mg

Par précipitation, nous avons éliminé un résidu insoluble de l'extrait à l'éther. L'analyse par  $^1\text{H-NMR}$  a montré qu'il s'agissait d'atranorine. De l'extrait à l'acétate d'éthyle, nous avons également éliminé un résidu insoluble qui s'est avéré être de l'acide fumarprotocétranique.

L'extrait au pentane (partie soluble dans l'éther uniquement) a été chromatographié sur une colonne de gel de silice (gradient pentane  $\rightarrow$  éther). Sept fractions ont ainsi été récupérées. L'analyse par  $^1\text{H-NMR}$  montrera que les fractions 5 à 7 contiennent de l'acide bourgéanique. La fraction 4, elle, sera étudiée par GC-MS. Nous identifierons ainsi l' $\alpha$  et la  $\beta$ -amyrine.

L'extrait à l'acétate d'éthyle, après élimination de l'acide fumarprotocétranique, a été chromatographié sur une colonne de gel de silice (toluène-ligroïne-acide acétique 5/5/1). Quatre fractions principales ont été séparées. L'étude par CCM a montré que la fraction 4 devait contenir du peroxyde d'ergostérol.

Les autres fractions ont été réunies et le mélange a été saponifié. Nous avons choisi cette voie afin de libérer les éventuels stérols présents. Il n'est en effet pas rare que ces substances soient estérifiées. Sous cette forme, elles sont très difficiles à identifier en faibles quantités car trop lourdes pour passer en GC-MS. L'utilisation de la HPLC est souvent limitée par la faible absorption UV de ces

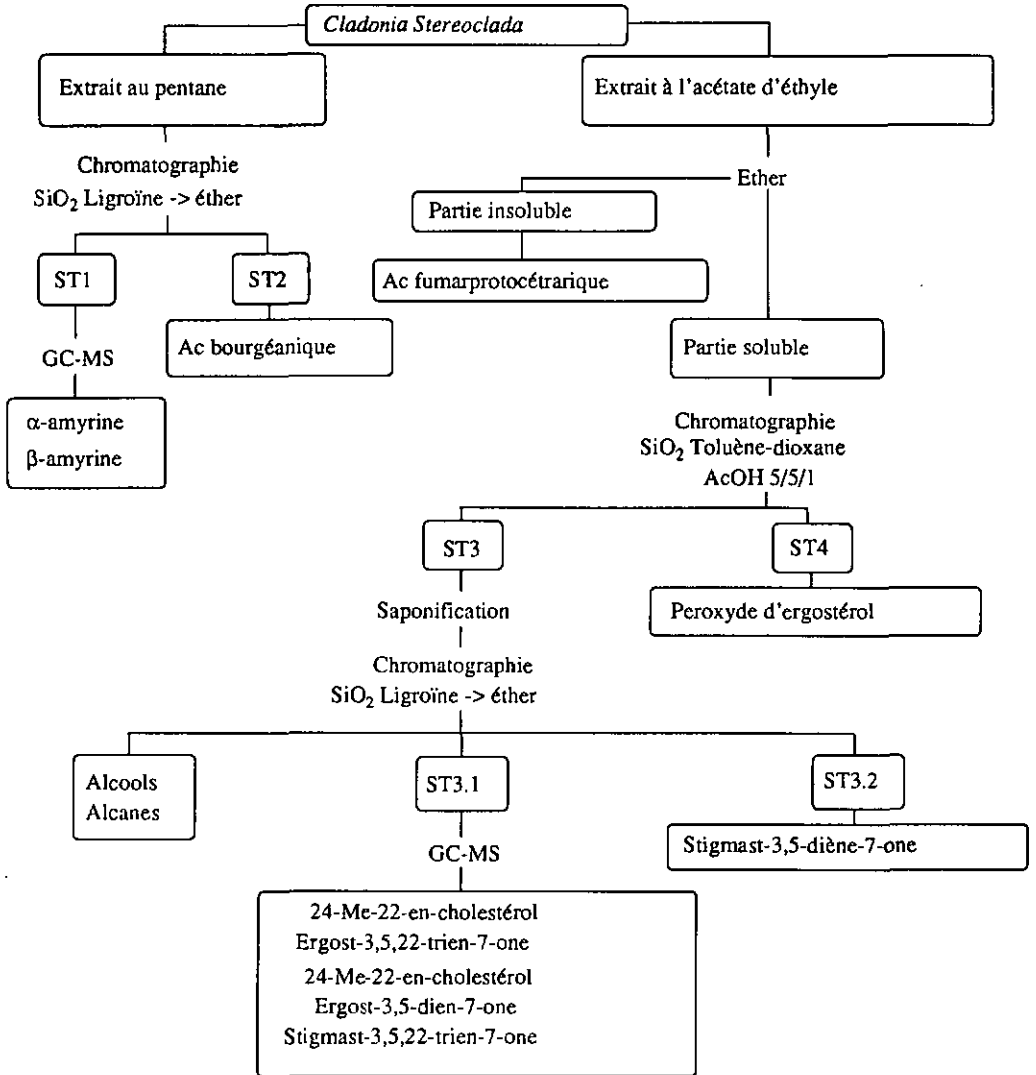
composés.

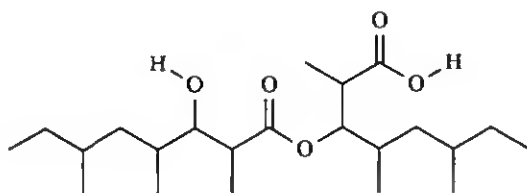
Le mélange obtenu a été chromatographié sur une colonne de gel de silice éluée avec un gradient ligroïne éther.

Les diverses fractions obtenues ont ensuite été analysées par GC-MS. Les premières ne contenaient que des substances peu intéressantes pour nous, alcanes, alcools à longue chaînes, etc. La fraction 9 s'est avérée nettement plus riche. Nous avons pu identifier les spectres de plusieurs produits de la famille du stigmastérol et de l'ergostérol :

- le 24-méthyl-22-en-cholestérol
- l'ergost-3,5,22-trien-7-one
- le 24-éthyl-22-en-cholestérol
- l'ergost-3,5-dien-7-one
- le stigmast-3,5,22-trien-7-one

Dans l'une des fractions suivantes, nous avons pu isoler le stigmast-3,5-dien-7-one. Les dernières fractions étaient constituées d'acide bourgéanique en quantités plus ou moins importantes.



25 ETUDE SPECTRALE DE L'ACIDE BOURGÉANIQUE

L'isolement d'une quantité importante d'acide bourgéalique à partir de *Cladonia Stéréoclada* nous a surpris. Ce composé, très rarement rencontré, a été signalé par Bodo [37]. La comparaison du spectre infrarouge de notre produit avec celui de la littérature [37] montrait une ressemblance frappante.

Spectre IR de l'acide bourgéalique (isolé)

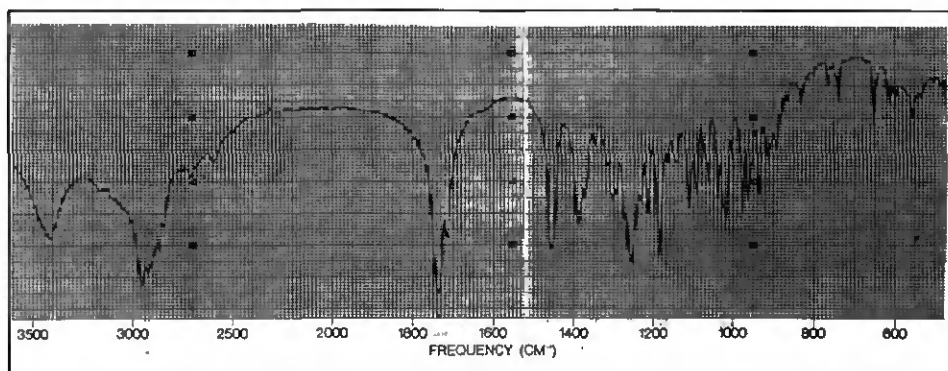


Figure 25.1

## Spectre IR de la littérature [37]

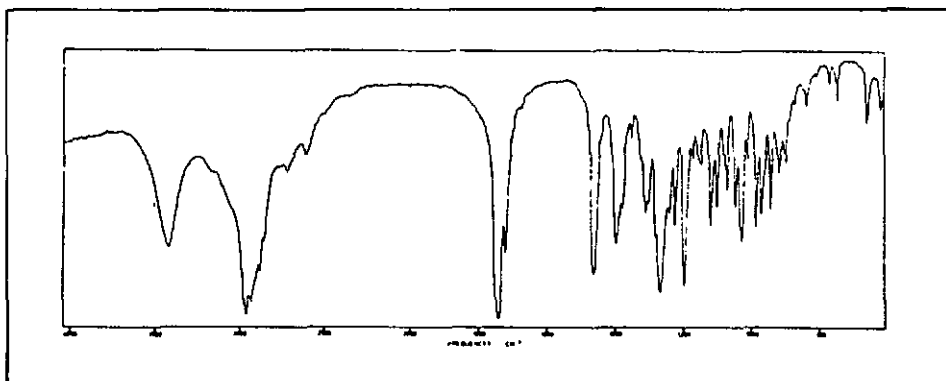


Figure 25.2

La bande à  $3410\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique d'une fonction hydroxyle associée. A  $1740\text{ cm}^{-1}$  une bande intense correspond à un carbonyle (ester, acide). Tant la bande  $\nu_{\text{OH}}$  que celle du  $\nu_{\text{CO}}$  sont accompagnées d'autres bandes qui laissent supposer la présence de plusieurs hétéroatomes. Les bandes intenses à  $2960$  et  $2870\text{ cm}^{-1}$  indiquent une structure aliphatique ramifiée contenant plusieurs méthyles. Aucune bande correspondant à une insaturation n'apparaît.

25.1 ETUDE EN  $^1\text{H-NMR}$ 

Le spectre de la figure 25.3 montre une série de signaux qui nous suggèrent la présence d'un dimère non symétrique formé de deux unités d'acide hémibourgénéique.

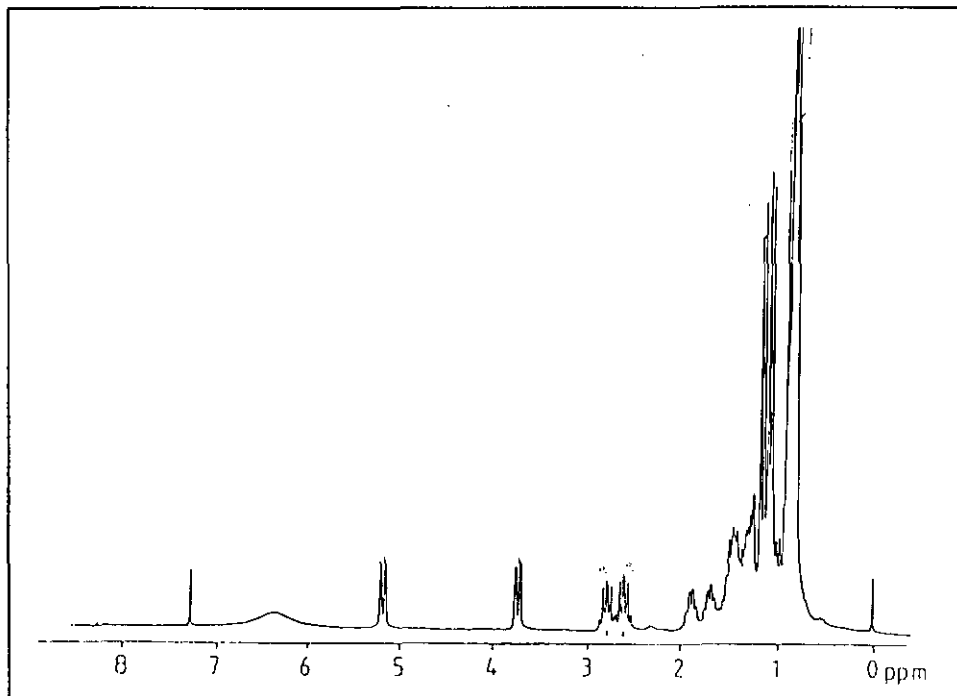
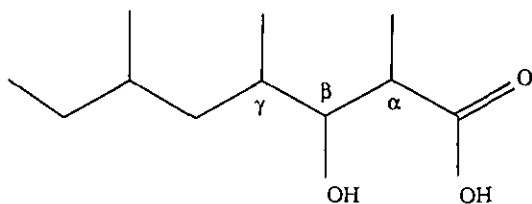
Spectre  $^1\text{H-NMR}$  du produit

Figure 25.3



Le proton  $\alpha$  a un déplacement chimique de 2.6 ou de 2.8 ppm selon qu'il se trouve sur l'une ou l'autre des deux parties. Il est couplé avec un méthyle et avec le proton  $\beta$ .

Irradiation du signal à 2.8 ppm

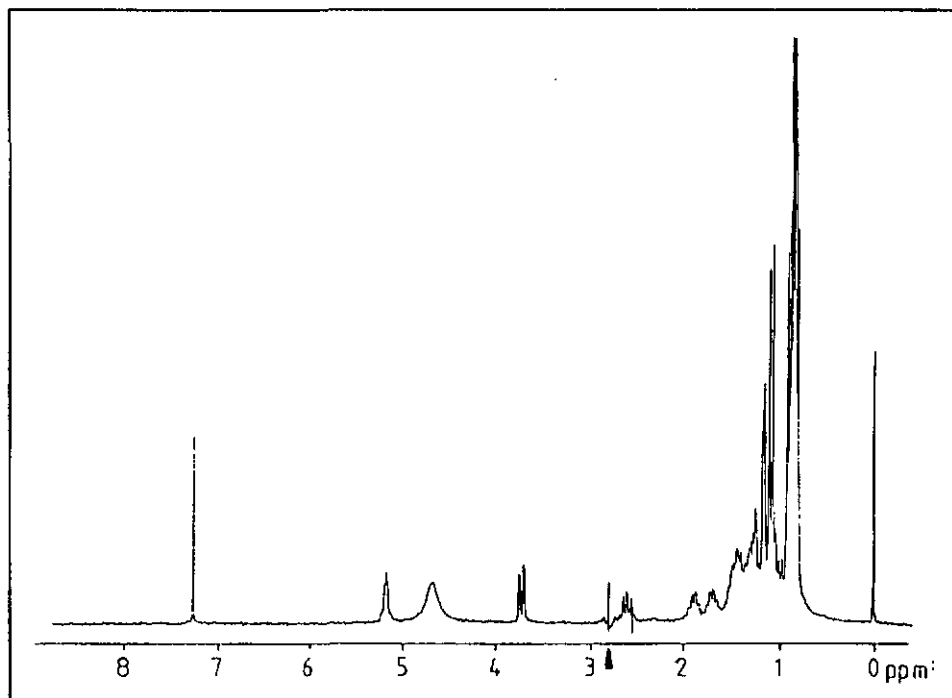


Figure 25.4

Lorsqu'on irradie le signal à 2.8 ppm, le doublet du proton  $\beta$  se simplifie et l'un des deux méthyles voit son signal modifié.

L'irradiation de l'autre proton  $\alpha$  (signal à 2.6 ppm) donne un effet parfaitement identique à celui observé précédemment, mais sur le signal à 3.8 ppm (figures 25.4 et 25.5)

Irradiation du signal à 2.6 ppm

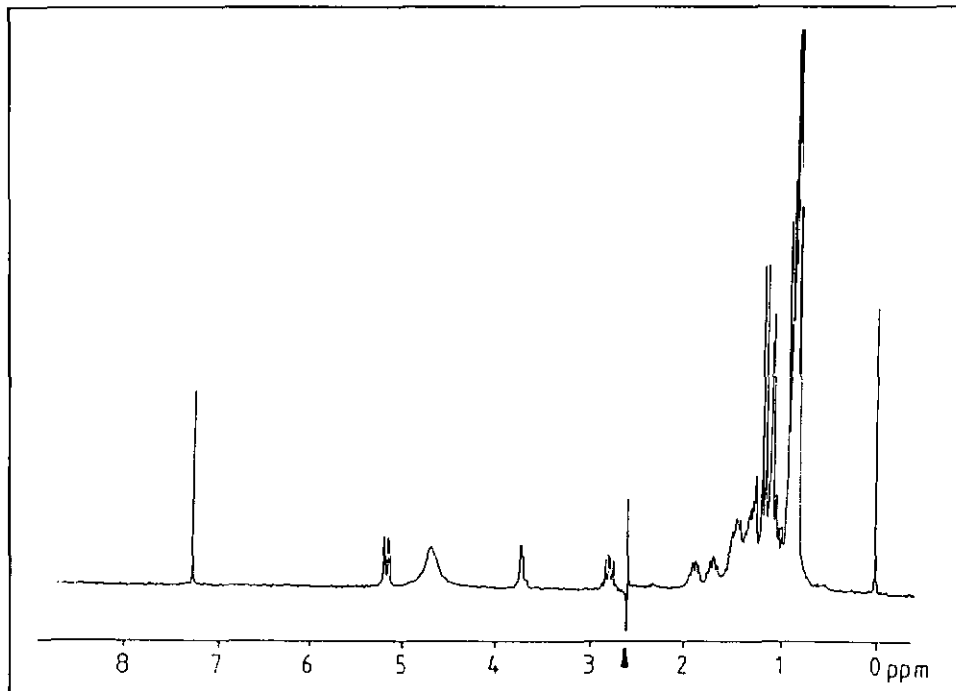


Figure 25.5

L'irradiation du proton à 5.2 ppm (un des deux H( $\beta$ )) simplifie le signal du proton  $\alpha$  correspondant et celui du H( $\gamma$ ) à 1.9 ppm.

Irradiation à 5.2 ppm

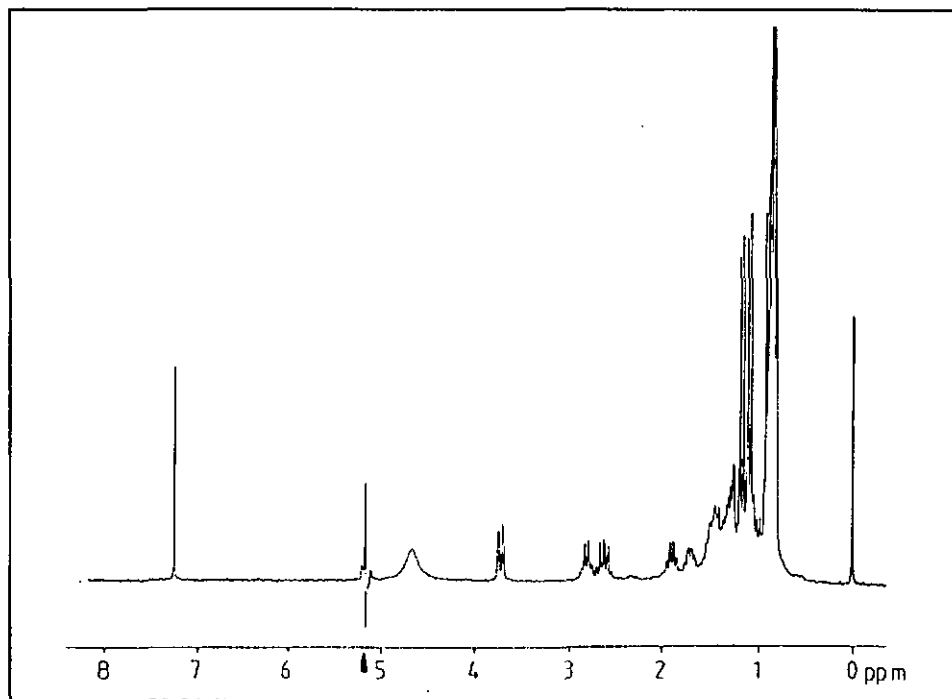


Figure 25.6

L'irradiation du signal à 3.7 ppm influence de la même manière les H( $\alpha$ ) et H( $\gamma$ ) correspondants.

25.2 ETUDE PAR  $^{13}\text{C}$ -NMR

La quantité importante d'acide bourgéalique isolée nous a permis de procéder à son étude  $^{13}\text{C}$ -NMR. La littérature [37] ne donnant que le spectre de l'acide hémibourgéalique, nous avons donc interprété notre spectre par analogie (figure 25.7).

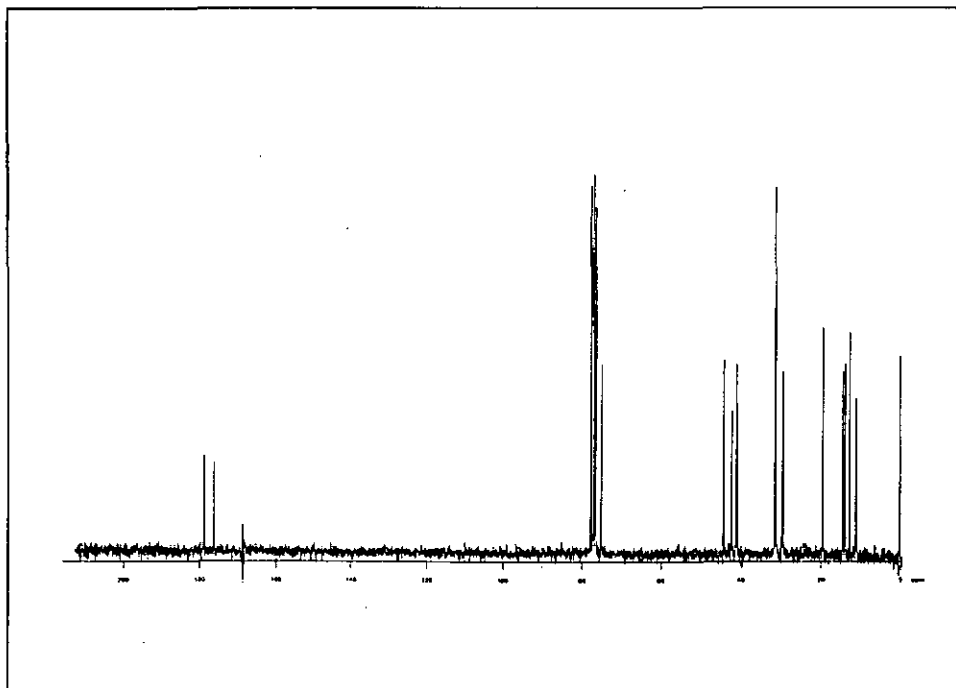
Spectre  $^{13}\text{C}$ -NMR de l'acide bourgéalique

Figure 25.7

L'interprétation proposée par Bodo [37] est basée sur les valeurs calculées à l'aide de la règle de Grant et Paul [38] modifiée par Lindeman et Adams [39], et qui permet de calculer la valeur du déplacement chimique d'un carbone dans un alcane. Il a été tenu compte des différents groupes d'hétéroatomes en utilisant les incréments déterminés par Roberts, Jackman et Hagen [40-42]. La

précision obtenue varie entre 0.2 et 6 ppm. Nous n'avons pas jugé utile de recalculer les valeurs pour l'acide bourgéanique, l'erreur sur les valeurs obtenues étant supérieure à la précision nécessaire pour mieux définir les attributions proposées ci-dessous.

ppm	mult.	Nb. de C	attribution
11.10	4	1	$\underline{\text{CH}_3}\text{-CH}_2\text{-}$
11.23	4	1	$\underline{\text{CH}_3}\text{-CH}_2\text{-}$
12.80	4	1	$\left. \begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{-CH-CH-} \\   \quad \quad \quad \backslash \\ \underline{\text{CH}_3} \quad \quad \quad \text{OR} \end{array} \right\} \text{---CH-CH-COOR}$ $\left. \begin{array}{c} \text{---CH-CH-COOR} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \underline{\text{CH}_3} \end{array} \right\}$
13.83	4	1	
13.87	4	1	
14.45	4	1	
19.46	4	1	$\left. \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-} \\   \\ \underline{\text{CH}_3} \end{array} \right\}$
19.51	4	1	
29.34	3	1	$\left. \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CH-} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array} \right\}$
29.53	3	1	
31.16	2	2	$\left. \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}}\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}}\text{-CH-} \\   \quad \quad \quad   \quad \quad \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{OR} \end{array} \right\}$
31.21	2	1	
31.45	2	1	
40.88	3	1	$\left. \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-}\underline{\text{CH}_2}\text{-} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array} \right\}$
41.19	3	1	
42.23	2	1	$\left. \begin{array}{c} \text{-CH-}\underline{\text{CH}}\text{-COOR} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{CH}_3 \end{array} \right\}$
44.22	2	1	
75.04	2	1	$\left. \begin{array}{c} \text{CH-}\underline{\text{CH}}\text{-CH-COOH} \\ / \quad   \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{OH} \quad \text{CH}_3 \end{array} \right\}$
76.65	2	1	
175.78	1	1	$\left. \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{-}\underline{\text{C}}\text{-OR} \end{array} \right\}$
178.49	1	1	

Nous dirons en conclusion que le spectre  $^{13}\text{C}$ -NMR met bien en évidence la présence de deux unités similaires et confirme notre produit. Ce sont finalement les groupes méthyles fixés sur le carbone en alpha des groupements  $-\text{COOH}$  et  $-\text{COOR}$  qui subissent le plus l'influence de la condensation des deux unités. Il paraît assez logique que le remplacement d'un groupe hydroxyle par un ester, de par l'encombrement stérique ainsi créé et les changements d'affinités électroniques des groupes en présence, modifie la structure spatiale de la molécule de manière suffisante pour que les carbones voisins voient leur environnement électronique perturbé.

### 25.3 ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Le spectre MS de l'acide bourgéalique est relativement difficile à obtenir. En effet sa structure particulière fait qu'il se fragmente très facilement au niveau de l'ester et qu'on enregistre généralement un spectre voisin de celui de l'acide hémibourgéalique.

#### Spectre de masse de l'acide bourgéalique ( $\text{Cl NH}_3$ )

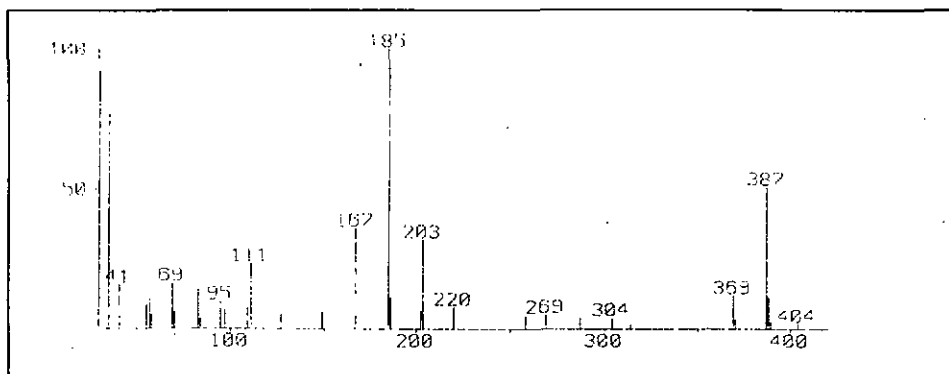


Figure 25.8

Le spectre présenté à la figure 25.8 a été obtenu par ionisation chimique ( $\text{NH}_3$ ). Les principaux signaux sont expliqués dans le tableau suivant:

m/z 404	$\text{M} + \text{NH}_4^+$
m/z 387	$(\text{M} + \text{H})^+$
m/z 369	$(\text{M} - \text{H}_2\text{O})^+$
m/z 220	Hémi + $\text{NH}_4^+$
m/z 203	$(\text{Hémi} + \text{H})^+$ ou m/z 185 + $\text{NH}_4^+$
m/z 185	Rupture de l'ester
m/z 167	m/z 185 - $\text{H}_2\text{O}$

(Abréviation : Hémi = acide hémibourgéalique)

Nous pouvons dire en conclusion que l'acide bourgéalique est très instable et se décompose en deux unités d'acide hémibourgéalique, rendant son étude par MS très difficile. L'ionisation chimique permet d'obtenir le pic moléculaire, mais l'abondance du signal à m/z 185 et la présence des ions m/z 203 et 220 confirment le fait que la molécule se fragmente aisément, et que la décomposition en deux unités d'acide hémibourgéalique existe également dans des conditions d'ionisation douce.

## 26 ETUDE DES FRACTIONS ST3.1 ET ST3.2

Le passage de la fraction saponifiée sur une colonne de chromatographie a permis l'isolement de deux fractions. La première (ST3.1) a été étudiée par GC-MS. La seconde (ST3.2) contenait un produit dont nous avons pu établir la structure par comparaison de son spectre MS avec la littérature [43].

### 26.1 FRACTION ST3.1 GC-MS

La fraction ST3.1 a été étudiée en GC-MS (colonne OV-1 de 35 m 220 °C -> 320 °C, 4°C/mn, injecteur et interface 250 °C).

Chromatogramme de la fraction

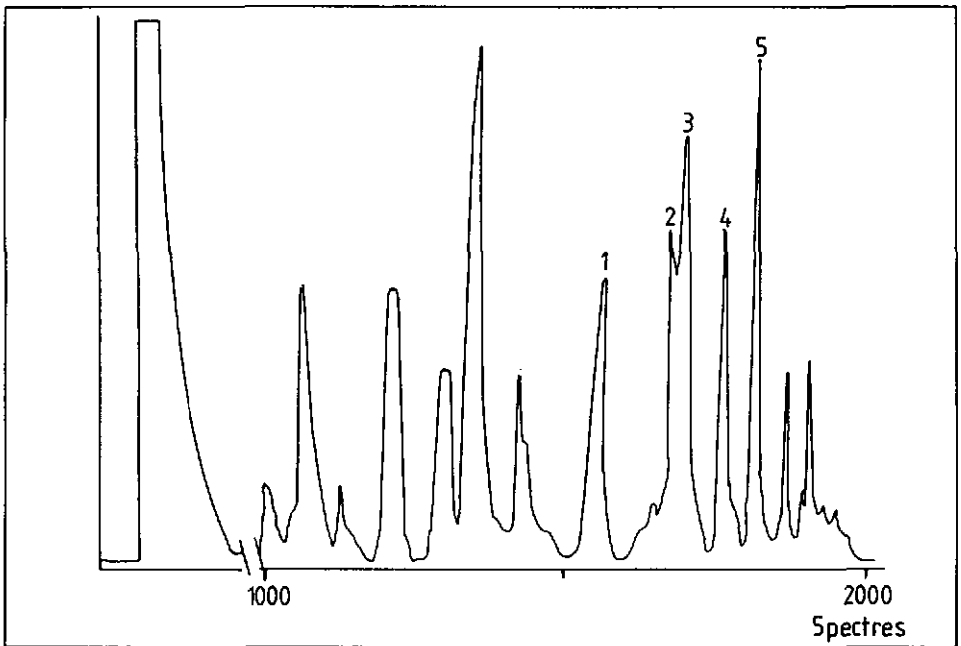


Figure 26.1

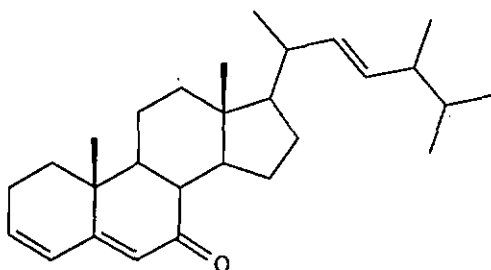
Les premiers produits (pics non numérotés) sont des hydrocarbures que nous n'avons pas cherché à identifier.

## 26.2 24 $\xi$ -METHYL-22-EN-CHOLESTEROL (1)

Comme cette substance a déjà été étudiée au chapitre 23, nous ne reproduirons ici ni son spectre, ni son schéma de fragmentation. Nous rappelons simplement la fragmentation est caractérisée par les signaux à  $m/z$  255 et 271, qui sont typiques des cycles A et B des composés dérivés du cholestérol. La structure a été établie par comparaison avec la littérature [44].

## 26.3 ERGOST-3,5,22-TRIEN-7-ONE (2)

### Structure



### Identification

L'identification du stigmast-3,5-dien-7-one dans la fraction ST3.2 nous a également permis d'identifier d'autres composés de la même famille. Le produit dont le spectre MS est présenté ci-dessous a été identifié comme étant de l'ergost-3,5,22-trien-7-one [25].

## Spectre de masse du produit 2

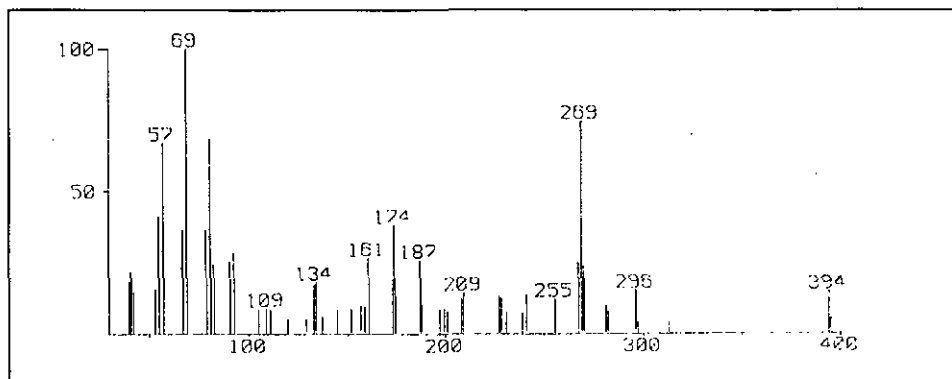
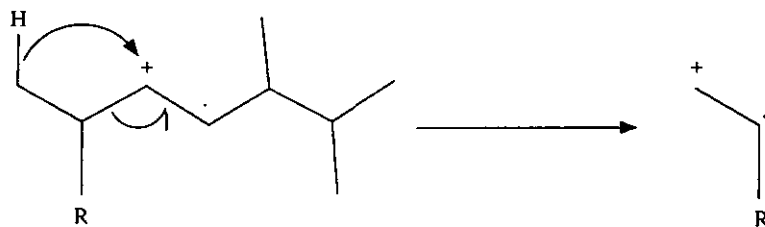


Figure 26.2

L'importance du signal à  $m/z$  269 est due à la présence de la double liaison en 22 qui favorise la perte d'une partie de la chaîne selon le mécanisme suivant.



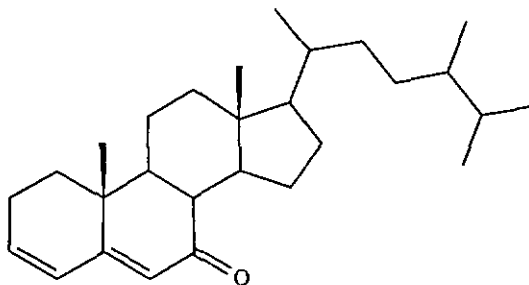
Nous retrouvons les signaux à  $m/z$  161, 174 et 187, caractéristiques d'un produit porteur d'une fonction C(7)-one [44].

## 26.4 24-ETHYL-22-EN-CHOLESTEROL (3)

Le 24-éthyl-22-en-cholestérol a déjà été identifié chez *Cladonia furcata*. Nous ne reproduirons donc pas ici le schéma de fragmentation et le spectres de masse puisqu'ils ont été donnés au chapitre 23.

## 26.5 ERGOST-3,5-DIEN-7-ONE (4)

## Structure



## Identification

## Spectre du produit

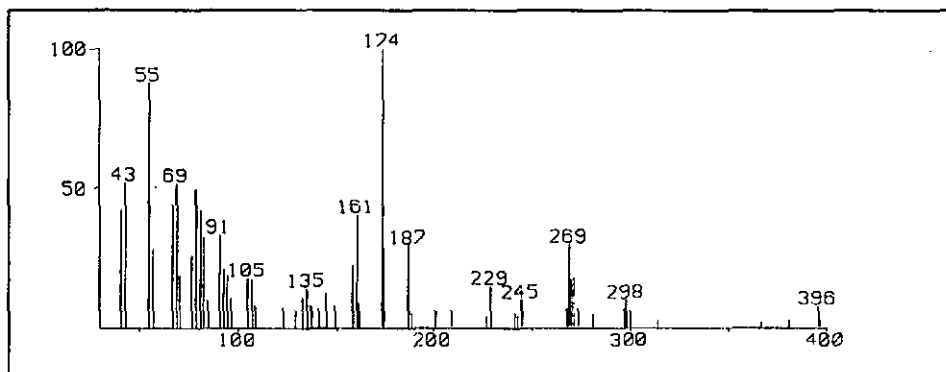
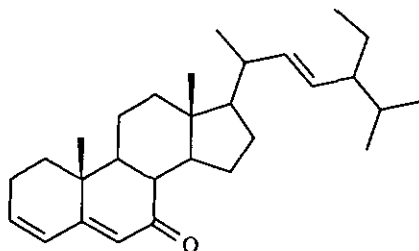


Figure 26.3

Le spectre de masse que nous présentons ci-dessus a été analysé par comparaison avec celui de l'ergosta-triène-7-one que nous avons identifié précédemment. La forte diminution du signal à  $m/z$  269 ainsi que le déplacement du  $m/z$  296 à 298 montrent que c'est bien la double liaison de la chaîne latérale qui a été supprimée.

## 26.6 STIGMAST-3,5,22-TRIEN-7-ONE (5)

### Structure



### Identification

#### Spectre de masse du produit

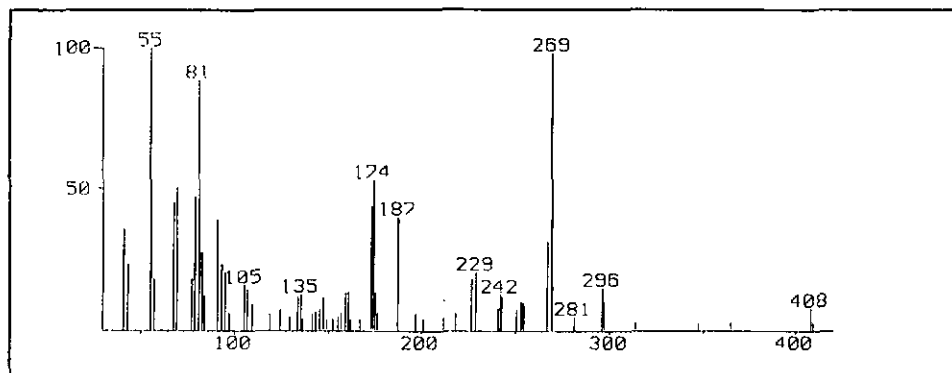
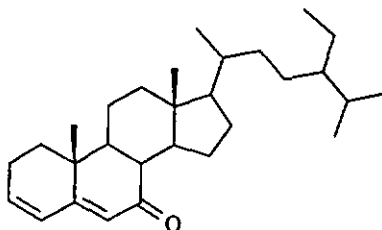


Figure 26.4

Le dernier composé que nous avons pu identifier était le stigma- 3,5,22-triène-7-one. Il a lui aussi été identifié par comparaison de son spectre avec celui des autres composés de la fraction. Le  $M^+$  à 408 indique la présence d'un  $-CH_2-$  supplémentaire par rapport au composé de la même famille identifié précédemment.

## 26.7 FRACTION ST3.2 (STIGMAST-3,5-DIEN-7-ONE)

## Structure



## Identification

Les signaux à  $m/z$  161, 174 et 187 sont typiques des produits porteurs d'une fonction C(7)-one. Selon la référence [44], ils correspondent à une rupture du cycle B avec l'élimination du cycle A (signal à  $m/z$  174) et du C(6) ( $m/z$  161). La référence [44] n'explique pas le  $m/z$  187.

## Spectre de masse du produit

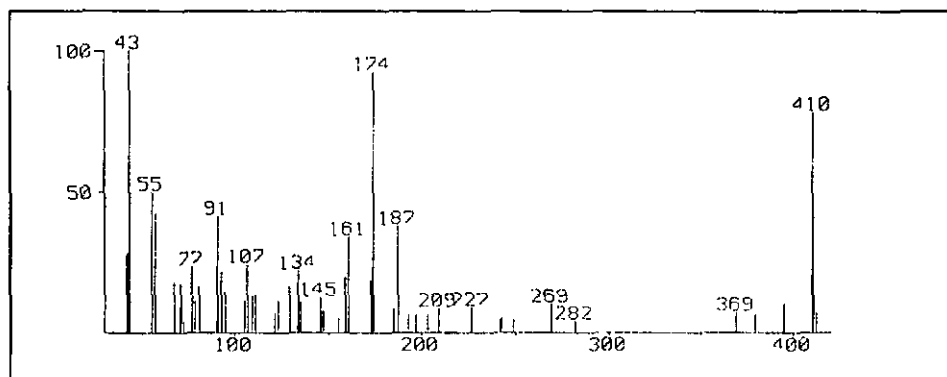


Figure 26.5

**ETUDE DIRECTE DES LICHENS PAR MS-MS**

## VII ETUDE DIRECTE DES LICHENS PAR MS-MS

### 27 INTRODUCTION

Les lichens sont des organismes qui ont une croissance très lente. Bien que largement répandus, il est certaines espèces pour lesquelles il est difficile, voir impossible, de disposer de quantités suffisantes, de matériel de départ pour une étude de leur composition chimique par voie classique (extraction, isolement, identification). Souvent on ne dispose en effet que de quelques fractions de gramme d'échantillon végétal. L'étude directe de la composition chimique par MS-MS, sans passer par les stades de l'extraction et de la séparation des composés, est une idée que nous avons voulu expérimenter au cours de notre travail.

La mise au point de la technique a posé certains problèmes. La présence dans les lichens d'un petit nombre de composés en grande quantité conjointement à de nombreux autres en faible quantité, souvent même à l'état de traces, rend toute analyse directe difficile. La fragmentation importante que subissent certains composés lichéniques typiques (depsides) conduit à de nombreux petits fragments abondants à côté d'ions parents très faibles qui se perdent dans le bruit de fond du spectre total. Cette remarque est valable surtout pour les spectres EI. Nous verrons par exemple que dans le cas des *Cladonia*, la présence d'acide fumarprotocétrarique, composé instable thermiquement et qui se fragmente rapidement, nous a empêchés d'observer les autres composants présents.

En CI positive les résultats sont meilleurs, mais les ions utilisables pour des expériences de MS-MS sont rares. En CI négative, par contre, les résultats semblent plus prometteurs mais malheureusement aucune étude systématique n'a été réalisée sur l'application de cette méthode d'ionisation douce aux composés lichéniques les plus connus (depsides, depsidones, depsones et triterpènes). Il s'agit d'un travail considérable, tant par le volume de mesures qu'il comportera, que pour l'importance des résultats. Un tel travail devrait précéder l'étude MS-MS des lichens. Nous pensons que la MS-MS peut être utilisée comme méthode directe d'analyse de lichens à condition que différentes techniques d'ionisation soient mises en jeu successivement au même titre que des systèmes de solvants en CCM [45]. L'avantage sur cette dernière technique, qui est la seule utilisée aujourd'hui en

chimio-taxonomie des lichens, sera l'obtention de données spectroscopiques (spectres CID) claires et reproductibles, indépendantes de conditions expérimentales facilement modifiables et peu contrôlables tel les valeurs Rf en CCM. Il est évident que l'investissement en moyens techniques et financiers pour les deux méthodes ne supporte pas la comparaison.

Malgré ces difficultés dues au manque de travaux de base dans le domaine de la NCI pour les composés rencontrés, nous avons procédé à quelques mesures.

Pour la mise au point de la méthode, nous avons d'abord choisi l'étude des spectres MS-MS des ions moléculaires de l'atranorine et de la chloratranorine, deux depsides largement répandus chez les lichens (chapitre 27.2).

### 27.1 QUELQUES REMARQUES SUR LA NI ET LA NCI [46]

Pendant très longtemps, l'ionisation négative a été considérée comme une curiosité pour physiciens puisque seules quelques classes de composés, comme les nitroaromatiques et les quinones, donnaient des spectres utilisables lorsqu'elles étaient étudiées sur un spectromètre de masse commercial équipé d'une source EI. Le problème principal était dû au fait qu'avec une source normale EI il est quasiment impossible d'obtenir un faisceau d'électrons à basse énergie (0-5 eV) assez intense pour provoquer une ionisation négative. Dans nos laboratoires, un travail a été effectué par Claude sur un spectromètre de masse à secteur magnétique [47]. L'arrivée des appareils à quadripôles et des sources CI a permis de mieux exploiter la NCI sur des substances organiques. Ces nouveaux appareils permettent un passage aisé du mode positif au mode négatif, et les nouvelles sources permettent une diminution de l'énergie des électrons par collision de ceux-ci avec un gaz inerte (thermalisation des électrons). C'est au cours des années 70 que la NCI s'est vraiment développée. Divers gaz ont été testés pour obtenir des ions moléculaires ou quasimoléculaires qui permettaient l'analyse de traces. Des essais ont été faits avec des gaz réagissant spécifiquement avec certaines fonctions, de manière à pouvoir ioniser sélectivement certains types de substances. Ces dernières années, le nombre de gaz utilisés s'est restreint principalement à un mélange N<sub>2</sub>O/Hydrocarbures pour produire des ions OH<sup>-</sup>, et à des gaz produisant des ions Cl<sup>-</sup> en ce qui concerne les gaz réactants. En ce qui concerne les gaz produisant des électrons thermalisés on utilise essentiellement CH<sub>4</sub>, i-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>, NH<sub>3</sub>.

Lors de l'enregistrement de spectres NCI, il est possible que des électrons thermalysés, poussés vers l'analyseur au même titre que les ions organiques, quittent la source. Ceci peut représenter un problème dans le cas d'un appareil à quadripôles. En effet, l'analyseur de ce type d'appareil ne distingue pas les ions positifs des ions négatifs. Il en résulte que des ions positifs peuvent être formés par EI ou CI *dans l'analyseur*; on parle alors d'ions pseudo- négatifs. Un exemple est l'apparition d'un ion de masse  $\text{CH}_5+\text{M}$  dans certains spectres NCI utilisant le  $\text{CH}_4$  comme gaz thermalisant.

### 27.1.1 Conditions expérimentales

L'aspect d'un spectre NCI peut fortement être influencé par des paramètres tels que le potentiel du repousseur, la pression dans la source ou la température. Les plasmas d'ions formés par collisions voient leur abondance décroître lorsque la pression diminue ou que la température augmente. Il en découle une même influence sur la présence des ions substrats qui en dérivent.

Une élévation de la température implique une augmentation de l'abondance des fragments par rapport à celle du pic quasimoléculaire qui peut même disparaître. L'énergie cinétique des ions diminue avec une augmentation de la pression du gaz, favorisant ainsi la formation de  $\text{M}^+$ , mais dans la plupart des sources conventionnelles, lorsque la pression dépasse un certain seuil, on assiste à une diminution de l'abondance des ions due à la dispersion des électrons par le gaz.

L'effet de mémoire est beaucoup plus important lorsqu'on travaille sur des ions négatifs que pour les ions positifs. Ceci est principalement dû au fait que la facilité qu'offre une molécule d'être ionisée négativement peut varier d'un facteur de  $10^6$ , les composés halogénés étant les plus facilement ionisables. Il en résulte que certaines espèces ioniques peuvent être surreprésentées dans la source et que certaines réactions peuvent apparaître avec des traces de composés mineurs.

### 27.1.2 NCI avec des électrons thermalysés

Le gaz modérateur idéal ne devrait produire que des électrons thermalysés avec une distribution d'énergie bien précise et d'une valeur voisine de zéro. Il ne devrait intervenir ni dans le processus d'ionisation, ni en réagissant avec les molécules substrats. Aucun des gaz utilisés actuellement ne correspond à cet idéal; il en résulte que l'aspect du spectre va dépendre directement du gaz employé. Il y a deux raisons principales à cela :

- Avec les ions de basse énergie, deux types d'interactions se produisent : la capture par résonance (à des énergies proches de zéro eV) qui conduit au  $M^+$ , et la capture dissociative, qui résulte en une ou plusieurs fragmentations. Le rapport entre ces deux mécanismes est directement lié à la distribution d'énergie des électrons qui est elle dépendante du gaz utilisé.
- Les molécules de substrat peuvent réagir avec les différentes espèces d'ions présentes dans la source. Il en résulte toute une série d'ions et de fragments dont la structure est fonction des ions en présence, donc, là aussi, directement liée au gaz utilisé. La recombinaison d'ions sera illustrée par le spectre NCI de l'acide fumarprotocétrarique et par son influence sur l'étude des lichens dans lesquels il est présent.

### 27.1.3 NCI avec des gaz réactants (ions nucléophiles)

Il existe 4 voies principales d'ionisation du substrat : l'échange de charges, l'arrachement d'un proton, l'attaque nucléophile, l'attachement d'un anion par un pont hydrogène.

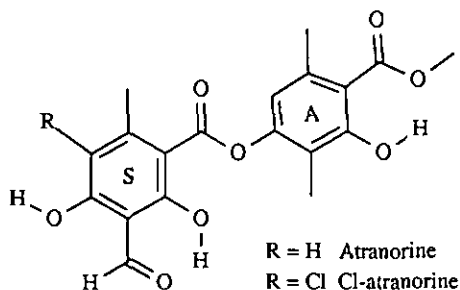
L'échange de charges peut avoir une certaine importance lorsqu'on travaille avec de l'ammoniac comme gaz réactant. En effet, peu de molécules organiques ont une affinité électronique supérieure à 80 kJ/mol. Il en résulte que la plupart des molécules organiques capturent volontiers un électron.

L'arrachement d'un proton peut apparaître lorsque l'acide conjugué à l'anion réactant est un acide faible et que l'anion réactant est une base forte par exemple.

L'attaque nucléophile peut soit conduire à un ion quasimoléculaire ( $[M + Cl]^-$  par exemple), ou à une ou plusieurs fragmentations (réaction de type  $S_N R-COOR' + F^- \rightarrow RCOO^- + R'F$ ).

## 27.2 ETUDE NCI DE L'ATRANORINE ET DE QUELQUES AUTRES DEPSIDES

Cette étude préalable a été effectuée sur des composés connus pour la mise au point de la méthode.



## 27.2.1 Cas de l'atranorine

Le spectre de masse NCI de l'atranorine est principalement composé de deux signaux :  $m/z$  373 ( $(M-H)^-$ ), et  $m/z$  178 (figure 27.1). Le spectre des parents de  $m/z$  178 indique que ce n'est pas l'ion  $m/z$  373 qui se fragmente, mais l'ion  $m/z$  374 (figure 27.2). Ceci montre que l'ionisation négative en présence de  $NH_3$  conduit à deux espèces, l'une formée par arrachement d'un proton, l'autre formée par les électrons thermalysés ( $M^{\cdot-}$ ). La première semble être beaucoup plus stable puisqu'elle ne se fragmente pratiquement pas.

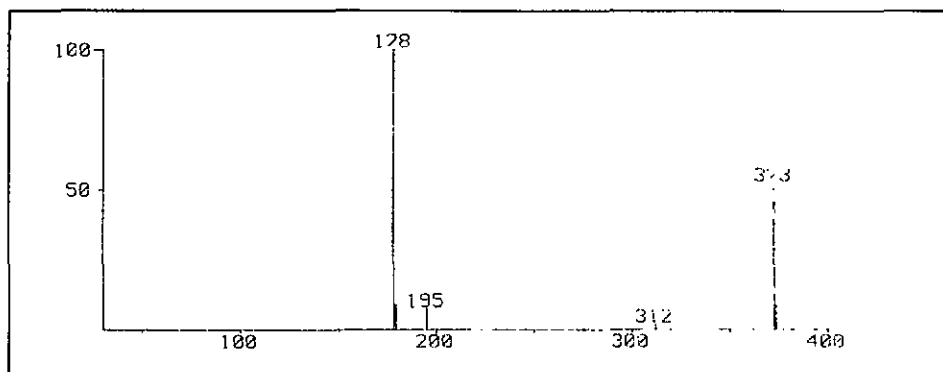
Spectre NCI ( $NH_3$ ) de l'atranorine

Figure 27.1

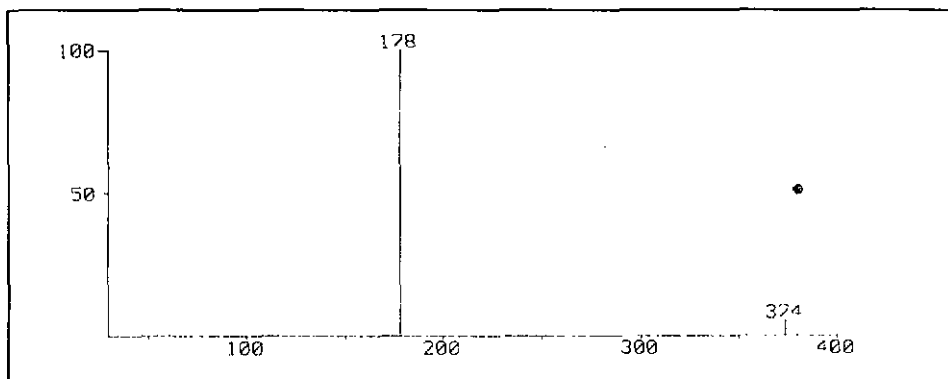
Spectre NCI des parents de  $m/z$  178

Figure 27.2

L'étude des descendants de  $m/z$  373 (figure 27.3) a montré que lorsque l'ion entrant en collision avec l'argon, il conduisait à deux fragments à  $m/z$  177 et  $m/z$  195.

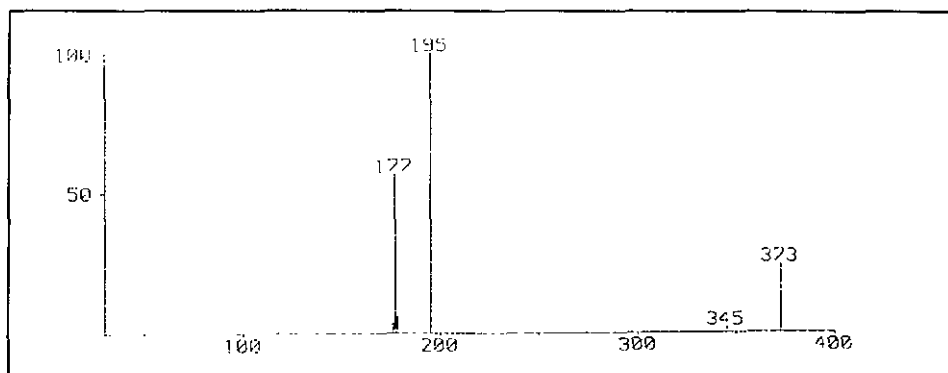
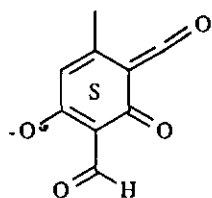
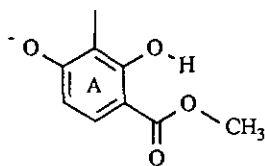
Spectre NCI ( $\text{NH}_3$ ) des descendants de  $m/z$  373

Figure 27.3

Les structures suivantes sont proposées pour ces deux ions :



m/z 177



m/z 195

Le spectre des descendants de m/z 374 (figure 27.4) donne lui aussi des signaux à m/z 177 et 195, mais chaque signal est dédoublé (m/z 178 et m/z 196 figure 27.4).

Spectre NCI ( $\text{NH}_3$ ) des descendants du m/z 374

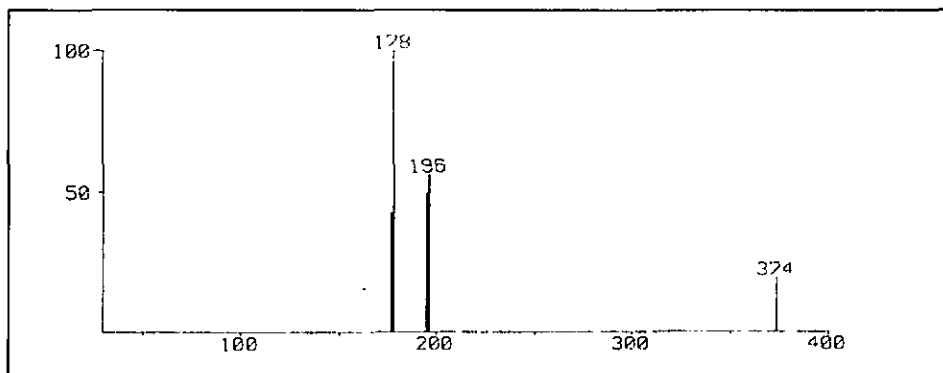


Figure 27.4

Le signal à m/z 374 peut être interprété de deux façons différentes. Il peut correspondre au  $\text{M}^-$  ou au  $(\text{M}-\text{H} + {}^{13}\text{C})^-$ .

Dans ce dernier cas, les abondances relatives des signaux du spectre peuvent être calculées comme suit :

Sur 19 atomes de carbone au total

- le cycle S en contient 9  $9/19 = 47.37\%$  de probabilité de contenir le  $^{13}\text{C}$
- le cycle A en contient 10  $10/19 = 52.63\%$  de probabilité de contenir le  $^{13}\text{C}$ .

Il en résulte que le  $m/z$  195 doit représenter le 90 % de  $m/z$  196 et que le  $m/z$  178 doit représenter le 90 % du  $m/z$  177.

Les rapports effectivement observés (figure 27.4) montrent qu'une partie de  $m/z$  178 provient de M<sup>+</sup> car celui-ci est plus élevé que le  $m/z$  177. Le rapport entre  $m/z$  195 et 196, par contre, correspond assez bien à ce qui a été calculé. Ce résultat est confirmé par le spectre de la figure 27.5 qui montre que sous des conditions d'ionisation ne faisant intervenir que les électrons thermalysés, seul  $m/z$  178 est formé.

Spectre NCI ( $\text{CH}_4$ ) de l'atranorine

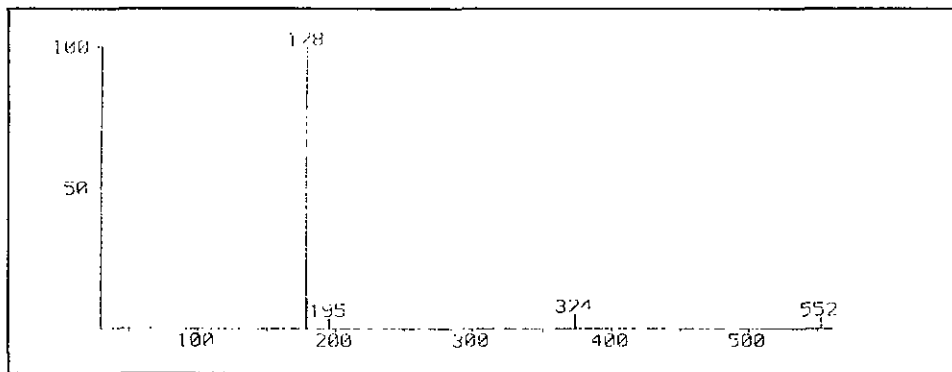


Figure 27.5

Le spectre de la figure 27.5 indique, outre la présence de  $m/z$  178, celle de  $m/z$  195, 373, 374 et 552. Nous avons cherché à savoir quels étaient les signaux qui provenaient vraiment de  $m/z$  374. La figure 27.6 représente le spectre de collision de  $m/z$  374.

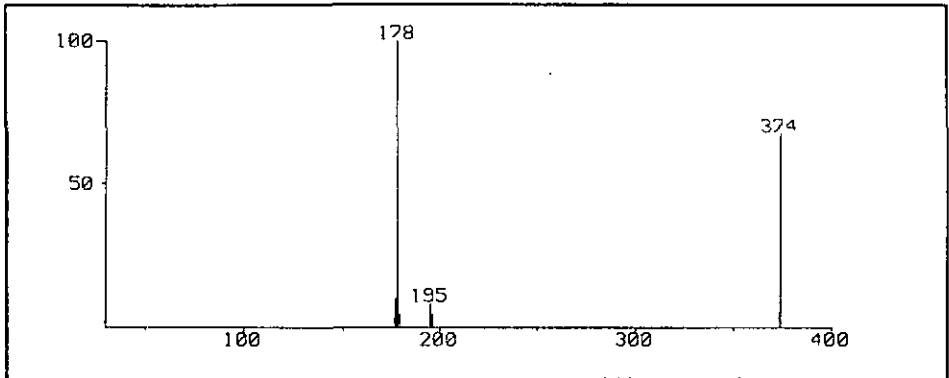
Descendants de  $m/z$  374

Figure 27.6

Nous constatons que  $m/z$  195 descend directement de  $m/z$  374, mais que  $m/z$  373 est absent. L'enregistrement des descendants de  $m/z$  552 (figure 27.7) montre que  $m/z$  373 est formé depuis  $m/z$  552.

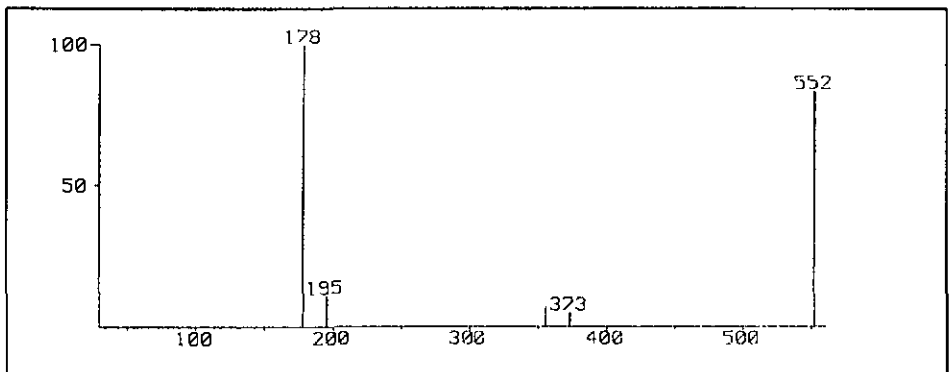
Descendants de  $m/z$  552 NCI ( $\text{CH}_4$ )

Figure 27.7

L'ion  $m/z$  552 correspond à la combinaison d'une molécule d'atranorine avec un fragment basé sur son cycle S. Ce genre de recombinaison d'ions est fréquent en NCI lorsque la concentration du produit dans la source est suffisamment élevée.

Nous en concluons que si les deux signaux  $m/z$  373 et 374 sont présents avec des intensités comparables dans ce spectre, cela est dû au fait que  $m/z$  374 se fragmente beaucoup plus facilement que  $m/z$  373 dans les conditions où nous travaillons. Son intensité est donc faible par rapport aux signaux de ses fragments ( $m/z$  178). L'ion de recombinaison  $m/z$  552, d'autre part, se fragmente en  $m/z$  178, mais également en  $m/z$  373. Comme l'ion  $m/z$  373 est relativement stable, son importance par rapport à  $m/z$  374 augmente, même si ce dernier correspond à la forme favorisée par la NCI avec du méthane. Nous pensons donc que  $m/z$  373 n'est pas dû à la formation de  $(M-H)^+$ , mais à la fragmentation de l'ion  $m/z$  552.

De manière à nous assurer que  $m/z$  552 provenait bien d'une structure basée sur l'atranorine, nous avons enregistré le spectre des descendants de  $m/z$  373 en NCI ( $CH_4$ ).

#### Descendants de $m/z$ 373 en NCI ( $CH_4$ )

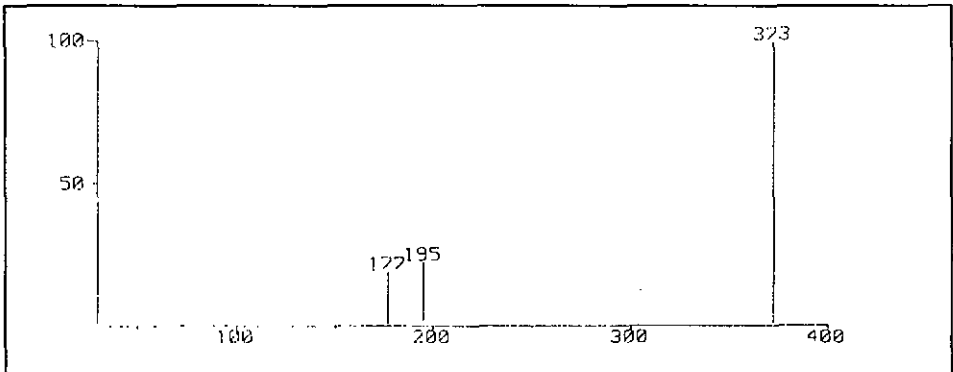


Figure 27.8

Le spectre est en tout point comparable à celui de la figure 27.3. Le fragment  $m/z$  373 obtenu depuis le  $m/z$  552 est bien de l'atranorine; le  $m/z$  552 est donc bien dû à une recombinaison d'ions conduisant à une structure analogue à celle d'un tridepside.

Nous nous sommes encore intéressés aux descendants de  $m/z$  375. Ce dernier en effet, ne correspond qu'à une structure,  $M^+$  contenant un  $^{13}C$ . Le spectre correspondant est présenté à la figure 27.9. Il confirme pleinement les calculs d'abondances relatives que nous avons faits précédemment puisque  $m/z$  179 (cycle S avec un  $^{13}C$ ) représente bien le 90 % du  $m/z$  178 (cycle S sans  $^{13}C$ ).

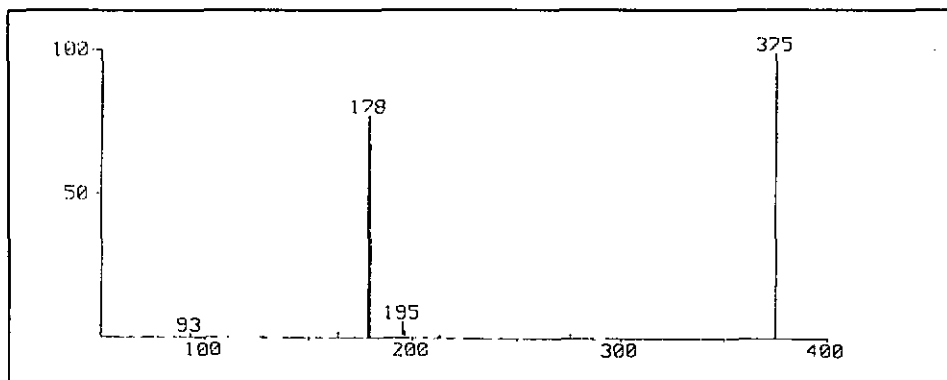
Descendants de  $m/z$  375 NCI ( $\text{NH}_3$ )

Figure 27.9

## 27.2.2 Cas de la chloratranorine

Le spectre de la figure 27.10 donne pour les descendants de  $m/z$  408 des rapports d'intensités relatives qui correspondent exactement à ceux que nous avons calculés dans le cas d'un ( $M-H$  avec  $^{13}\text{C}$ ).

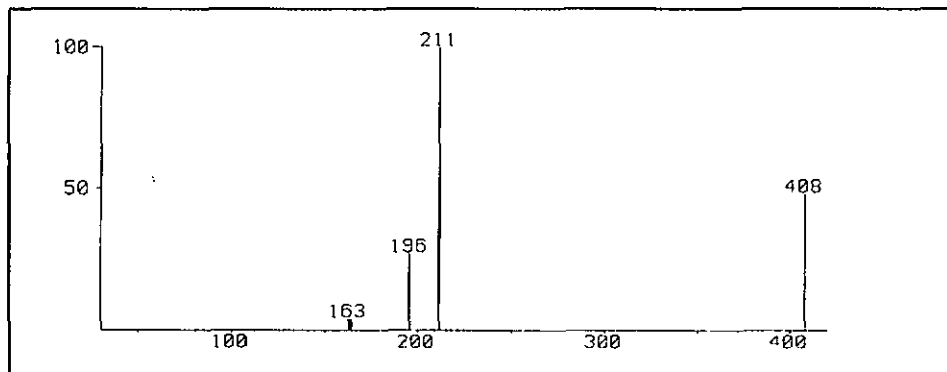
Descendants de  $m/z$  408 NCI ( $\text{NH}_3$ )

Figure 27.10

Cela signifie que dans le cas de la Cl-atranorine, la formation de  $M^+$  en NCI  $NH_3$  est négligeable. Cette différence avec l'atranorine est probablement due à une plus grande labilité des protons des groupes hydroxyles sur le cycle S de la chloratranorine. Cette labilité est mise en évidence par la comparaison des déplacements chimiques de ces protons en  $^1H$ -NMR pour les deux substances. Dans le cas de la chloratranorine, ces valeurs sont toujours plus élevées que celles enregistrées pour l'atranorine dans des conditions similaires. La plus grande labilité de ces protons va favoriser l'ionisation par arrachement d'un proton.

Nous nous sommes encore intéressés aux descendants des  $m/z$  407 et 409. Il devait en effet être possible de séparer par MS-MS les ions selon l'isotope du chlore qu'ils contiennent. Les spectres sont présentés aux figures 27.11 et 27.12. Tous deux montrent un signal à  $m/z$  195, mais le spectre des descendants de  $m/z$  407 conduit à  $m/z$  211 alors que l'autre conduit à  $m/z$  213. Cette expérience prouve également que les deux  $m/z$  observés dans chaque spectre proviennent bien de deux fragments différents.

#### Descendants de $m/z$ 407 NCI ( $NH_3$ )

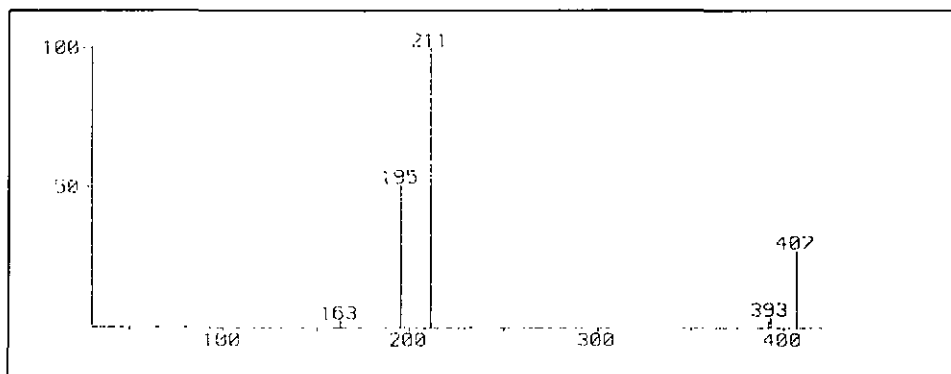


Figure 27.11

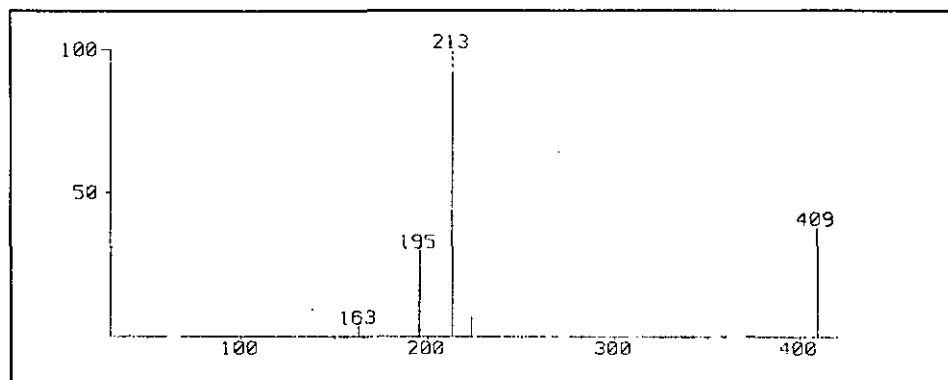
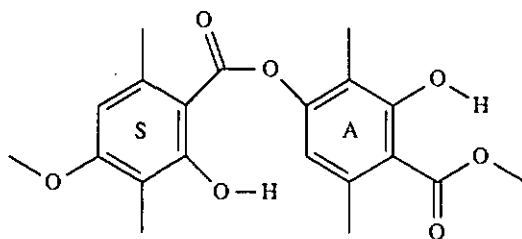
Descendants de  $m/z$  409 NCI ( $\text{NH}_3$ )

Figure 27.12

## 27.2.3 Cas du barbatate de méthyle



Barbatate de méthyle

Le barbatate de méthyle est un composé de même masse que l'atranorine et de structure très voisine. Le remplacement de l'aldéhyde par un méthyle et la transformation d'une fonction hydroxyle en un méthoxy va influencer la fragmentation de manière importante. En effet, l'ion  $m/z$  373 ( $\text{M-H}^-$ ) (figure 27.13) ne conduit plus qu'à un fragment à  $m/z$  195 qui correspond au cycle A. Cette situation peut sans doute être expliquée par le fait qu'il ne reste plus qu'un hydroxyle sur le cycle S. Or, pour obtenir l'équivalent de l'ion  $m/z$  177 de l'atranorine, il est nécessaire d'en avoir deux sur le cycle S. Le premier pour l'ionisation par élimination d'un proton, et le second pour le mécanisme de rupture conduisant à la structure de l'ion  $m/z$  177 chez l'atranorine.

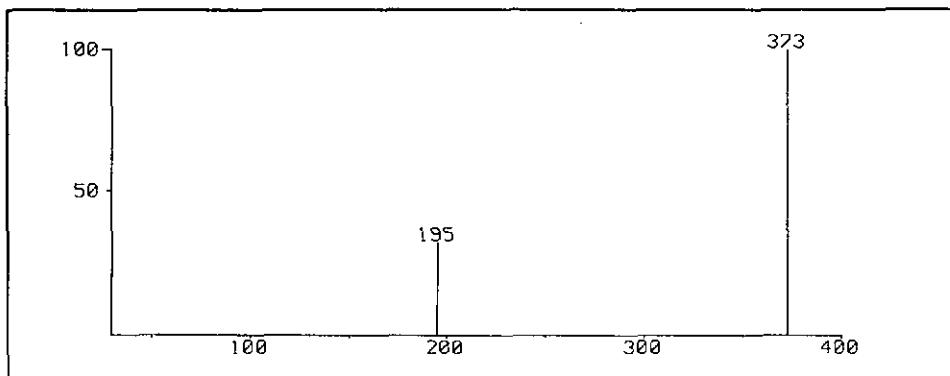
Descendants de  $m/z$  373 NCI ( $\text{CH}_4$ )

Figure 27.13

Le spectre de collision de  $m/z$  374 (figure 27.14) indique que c'est le fragment formé à partir du cycle A qui est favorisé. Nous trouvons donc ici une situation inverse de celle rencontrée pour l'atranorine. Ce renversement est explicable par le fait que l'aldéhyde et l'hydroxyle étaient tous deux des sites susceptibles d'accueillir la charge négative. Leur remplacement par des sites moins électrophiles favorise le déplacement de la charge sur le cycle A et ainsi la formation de  $m/z$  195. Il est à noter que  $m/z$  178 est présent, contrairement au spectre précédent. C'est qu'ici, sa formation est possible, même si elle n'est pas favorisée.

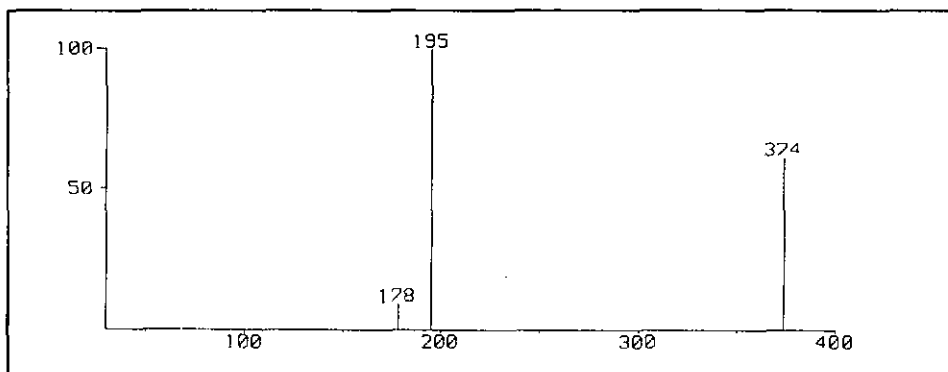
Descendants du  $m/z$  374 NCI ( $\text{CH}_4$ )

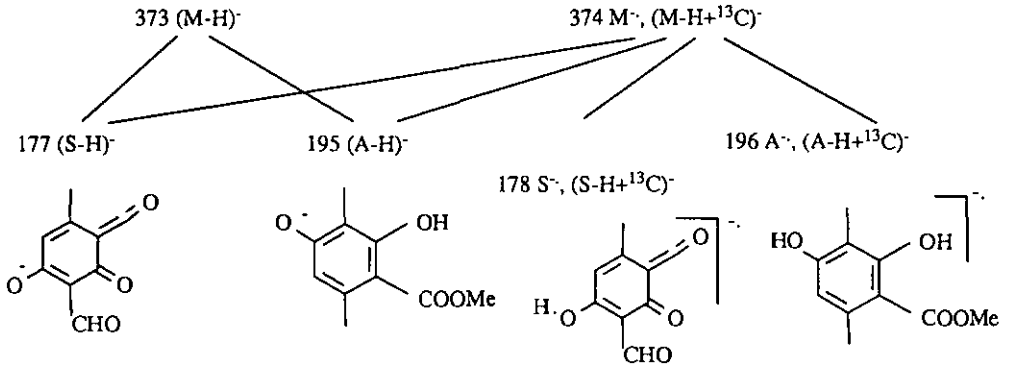
Figure 27.14

#### 27.2.4 Résumé des résultats

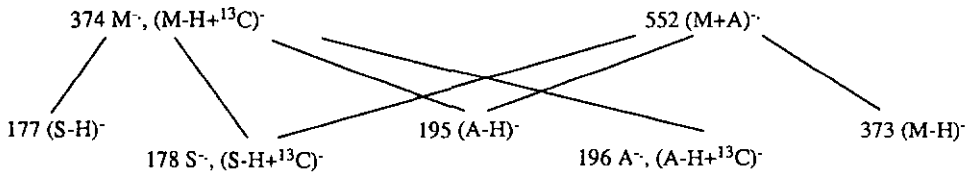
Le tableau de la page suivante résume les résultats obtenus. Ceux-ci montrent que si les trois molécules étudiées se fragmentent toutes au même point (rupture de la liaison entre les deux cycles), les mécanismes eux, diffèrent selon le gaz, le fragment de départ, la substance. Le nombre de fonctions hydroxyle semble jouer un rôle déterminant. La présence de  $m/z$  552 dans le spectre de l'atranorine en NCI ( $\text{CH}_4$ ) montre que les électrons thermalisés favorisent la recombinaison d'ions. Cette recombinaison sera, comme nous le verrons au chapitre suivant, un obstacle majeur à l'étude MS-MS d'extraits bruts.

Fragmentation NCI/MS-MS

Atranorine (NH<sub>3</sub>)

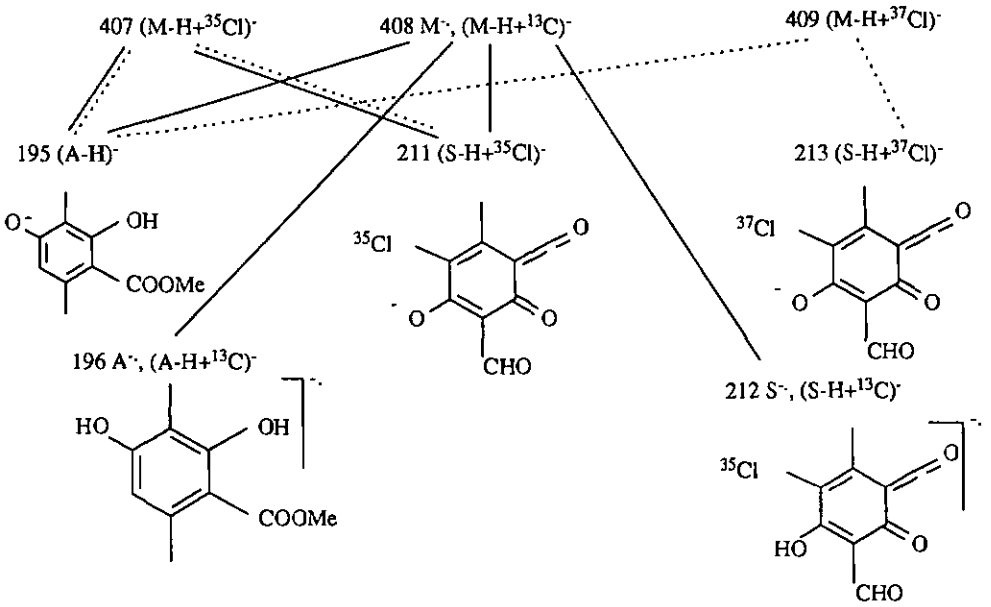
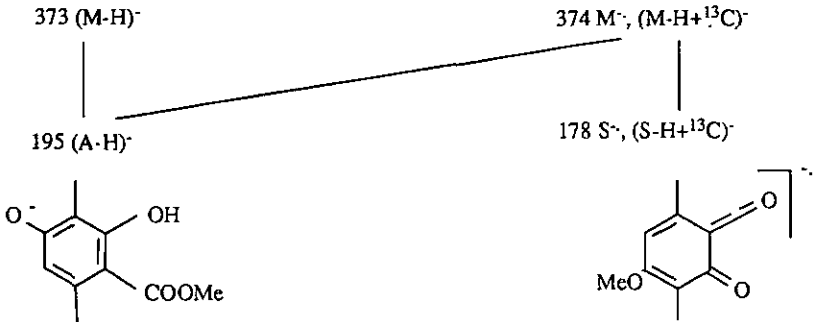


Atranorine (CH<sub>4</sub>)



## Fragmentation NCI/MS-MS

## Cl-atranorine

Barbatate de méthyle ( $\text{CH}_4$ )

## 28 ETUDE DE QUELQUES LICHENS PAR NCI/MS-MS

### 28.1 INTRODUCTION

L'étude en NCI/MS-MS de quelques lichens a montré que si la méthode fonctionnait parfaitement pour *Pseudevernia furfuracea* (L.) Ach par exemple, il existait d'autres cas où un certain nombre de difficultés pouvaient en restreindre l'emploi. Le spectre NCI de l'acide fumarprotocétranique, composé que l'on rencontre notamment dans le genre *Cladonia*, a pour caractéristique de contenir de nombreux ions de recombinaison (figure 28.1) qui conduisent à des fragments ayant parfois un PM supérieur à celui du produit de départ.

#### Spectre NCI (NH<sub>3</sub>) de l'acide fumarprotocétranique

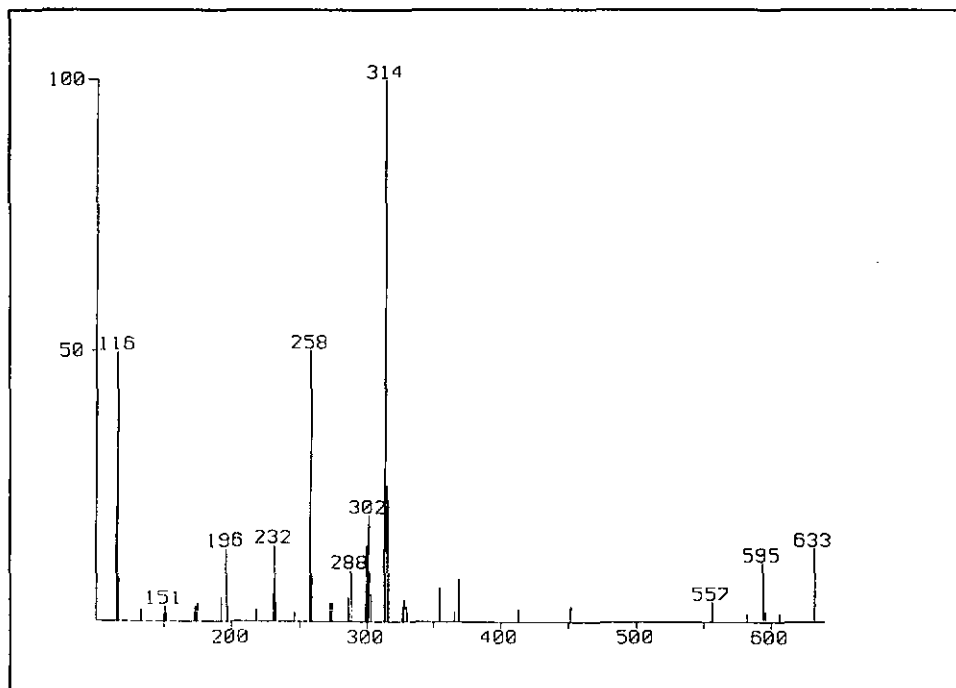
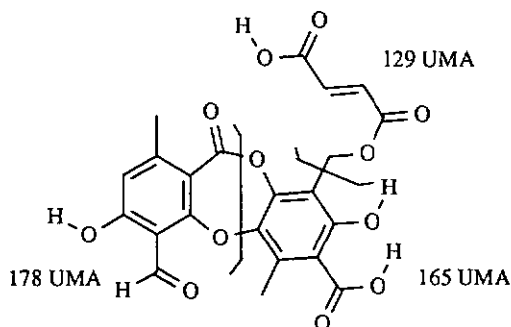


Figure 28.1

Ces divers ions de recombinaison formant à leur tour des fragments intermédiaires, le spectre obtenu devient très difficile à interpréter.

L'acide fumarprotocétrarique a une masse de 472 UMA. Il est formé de 3 unités ayant respectivement des masses de 178, 165 et 129 UMA.



Le spectre présente des signaux à  $m/z$  258 ( $2 * 129$ ),  $m/z$  314 ainsi que 557, 595 et 633. Ces  $m/z$  correspondent pour la plupart à des ions formés par recombinaisons de divers fragments. Il est, dans ces conditions, impossible d'interpréter correctement les spectres obtenus, car il est vraisemblable que lorsque la substance se trouve en présence d'autres composés elle réagit de la même manière, conduisant à une infinité de sous-produits qui masquent les composés appartenant réellement au lichen.

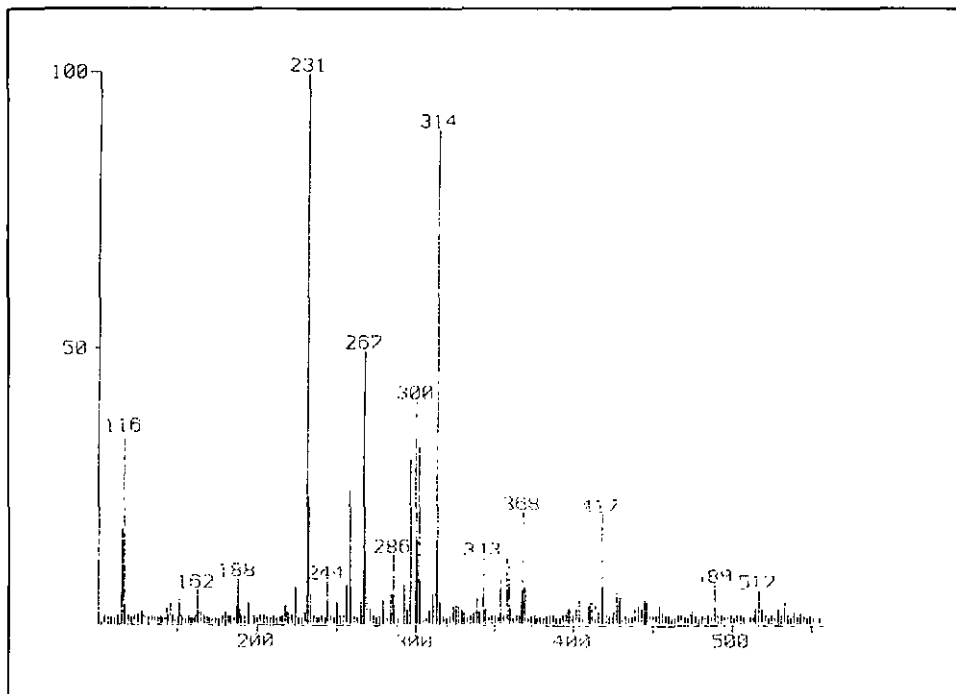
Spectre NCI total de *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad. (env 150 degrés)

Figure 28.2

Nous présentons à titre d'exemple le spectre NCI total du lichen *Cladonia furcata* tout d'abord à une température relativement basse (environ 150 degrés, figure 28.2) puis à une température élevée (environ 300 degrés, figure 28.3). Nous retrouvons dans la figure 28.2 les signaux  $m/z$  258 et  $m/z$  314 que nous avons déjà observés dans le spectre du fumarprotocétrarique. L'étude des autres  $m/z$  par NCI/MS-MS ne nous a pas permis d'identifier d'autres composés; il s'agit vraisemblablement de produits formés par recombinaisons de fragments formés dans la source. L'élévation de la température augmente encore le nombre des recombinaisons et induit sans doute de nouvelles fragmentations car le bruit de fond de la figure 28.3 se trouve nettement augmenté et la moyenne des  $m/z$  s'élève également sensiblement.

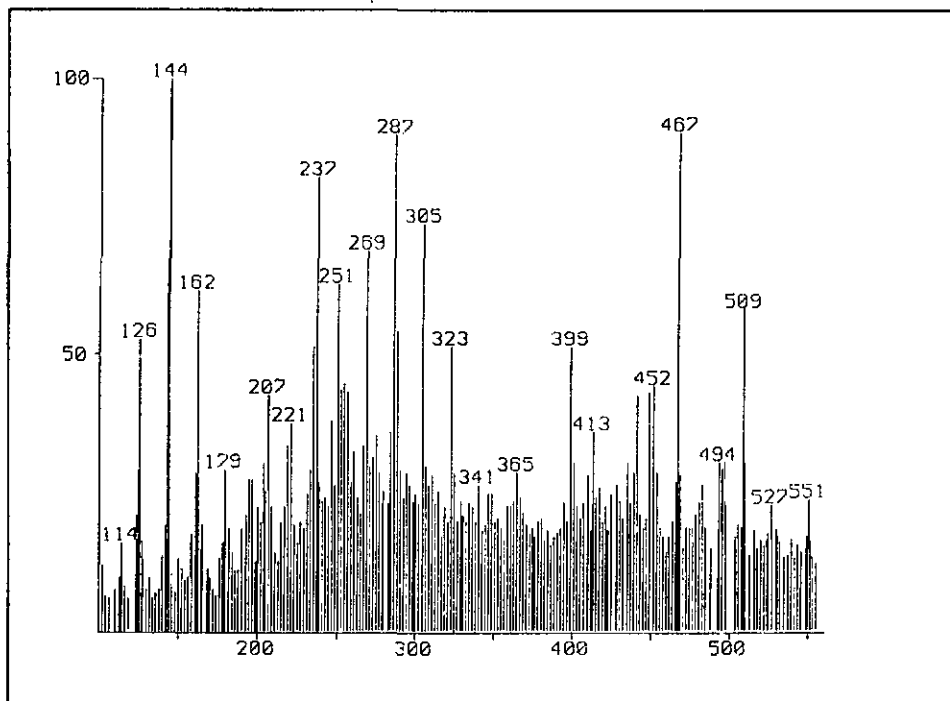
Spectre NCI total de *Cladonia furcata* (env 300 degrés)

Figure 28.3

28.2 ETUDE PAR NCI/MS-MS DIRECTE DE *PSEUDEVERNIA FURFURACEA* (L.)

Ach.

Pour illustrer l'étude d'un lichen par NCI/MS-MS directe, nous avons choisi un exemple dont la composition chimique était déjà bien connue [3]. Il présente l'avantage de contenir plusieurs depsides et depsidones. Le spectre NCI total est présenté à la figure 28.4.

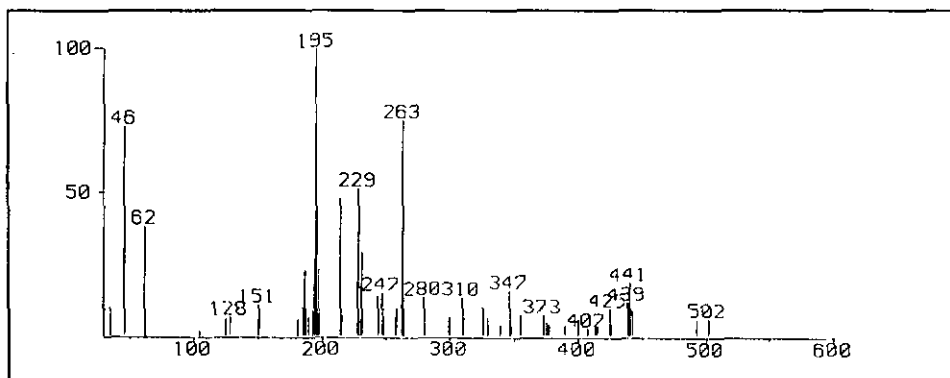
Spectre NCI total de *Pseudevernia furfuracea*

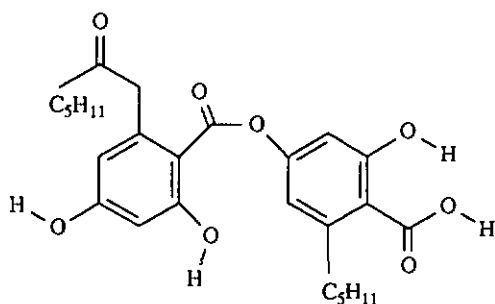
Figure 28.4

Nous pouvons reconnaître les  $(M-1)^+$  des composés suivants :

m/z	Substance
373	Atranorine
407	Cl-atranorine
425	Acide physodique
439	Acide méthyl-2'-O-physodique
	Acide isophysodique
	Méthyl-2'-physodone
441	Acide hydroxy-3-physodique

Chacun de ces cinq ions a fait l'objet d'une étude par NCI/MS-MS. Les spectres obtenus sont présentés ci-dessous.

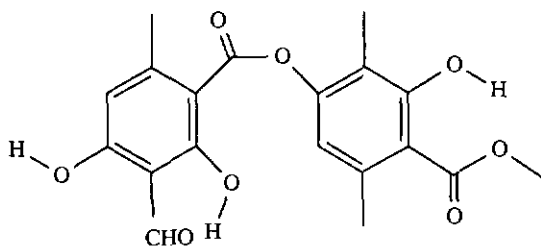
## 28.2.1 Acide olivétorique



Acide olivétorique

L'acide olivétorique a un PM de 472. Ni l'ion  $m/z$  472 ( $M^-$ ), ni l'ion  $m/z$  471 ( $(M-H)^-$ ) ne sont présents dans le spectre total en NCI ( $NH_3$ ) du lichen (figure 28.4). Ceci n'est guère surprenant puisque Gunzinger [3] avait déjà constaté que le produit se fragmente facilement lorsqu'il est introduit dans une source MS. Le spectre total montre un signal à  $m/z$  247 qui correspondrait à un fragment formé par le cycle S du produit. Nous n'avons toutefois pas considéré ce signal comme une preuve de la présence d'acide olivétorique puisque d'autres substances comme l'acide physodique donnent un fragment identique.

## 28.2.2 Atranorine



Atranorine

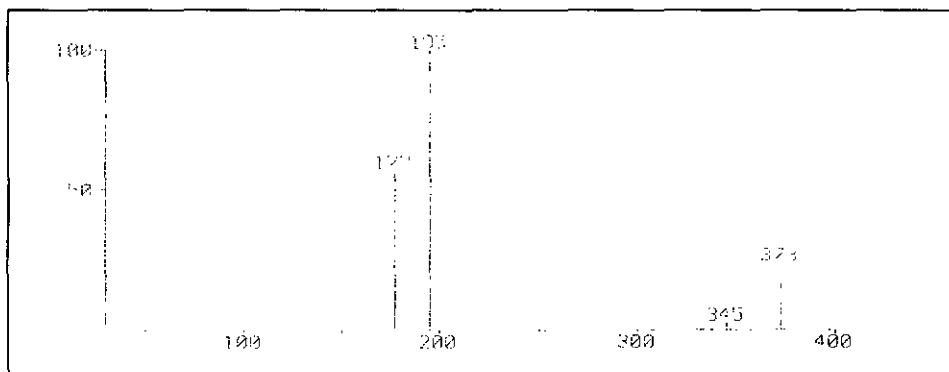
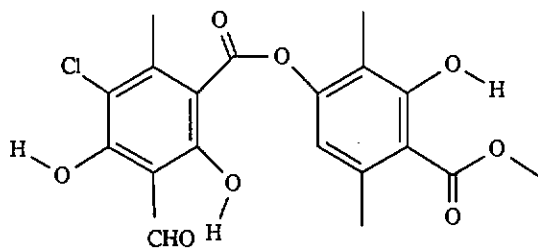
Etude NCI/MS-MS des descendants de  $m/z$  373

Figure 28.5

L'atranorine a été étudiée en détail au chapitre 27. Nous relèverons simplement que le spectre obtenu à partir d'un extrait brut est parfaitement similaire à celui enregistré à partir d'un échantillon pur.

## 28.2.3 Chloratranorine



Cl-Atranorine

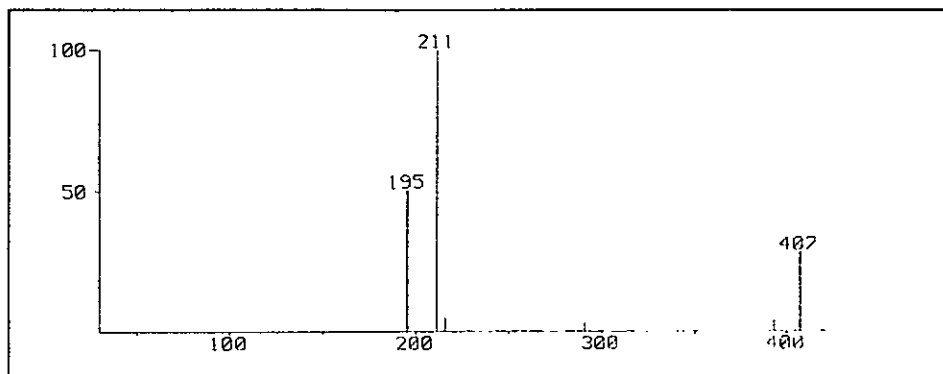
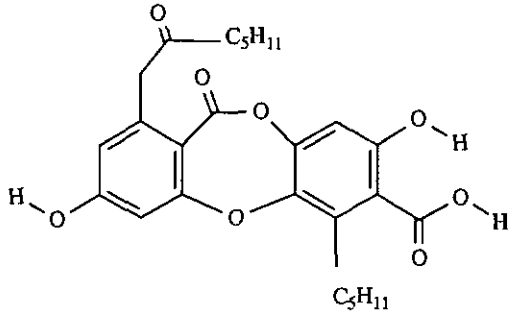
Etude NCI/MS-MS des descendants de  $m/z$  407

Figure 28.6

Ici également, le spectre de la chloratranorine correspond parfaitement à celui présenté au chapitre 27.

28.2.4 Acide physodique



Acide physodique

Etude NCI/MS-MS des descendants de m/z 425

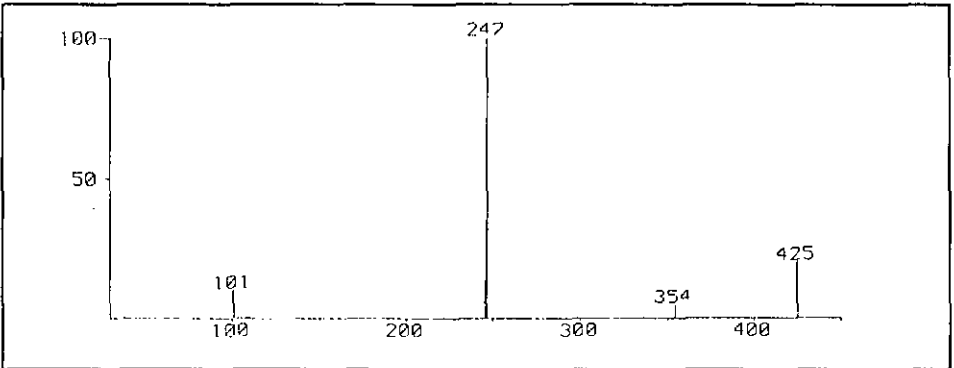
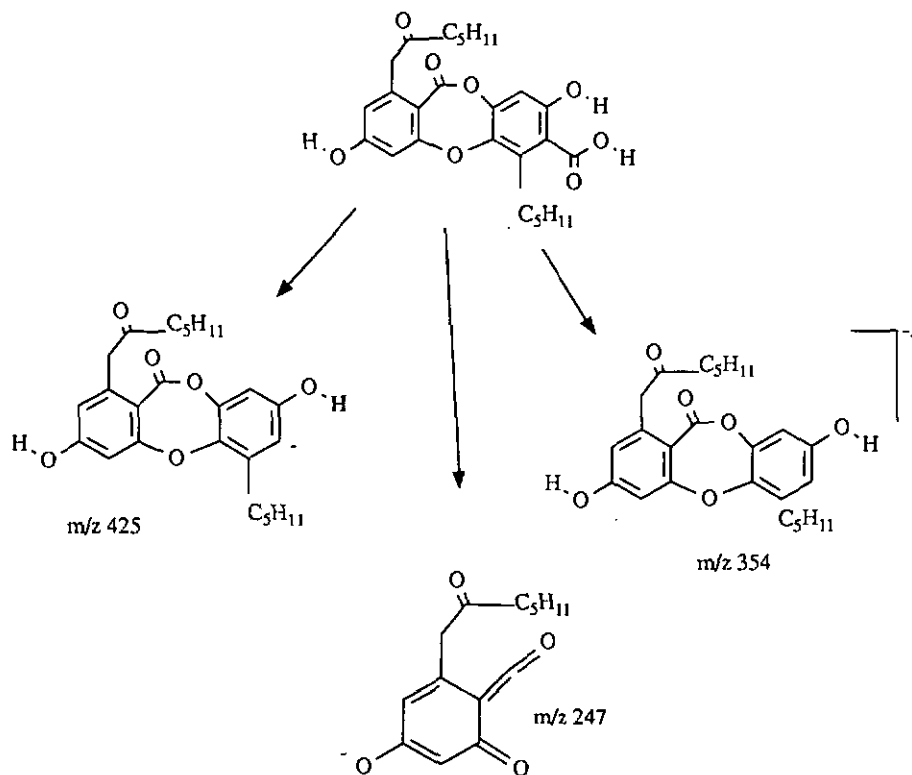
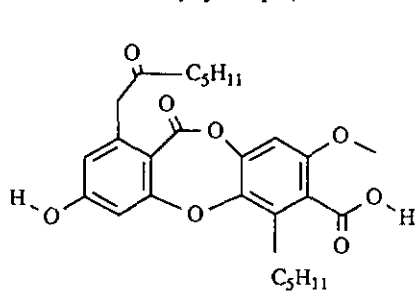


Figure 28.7

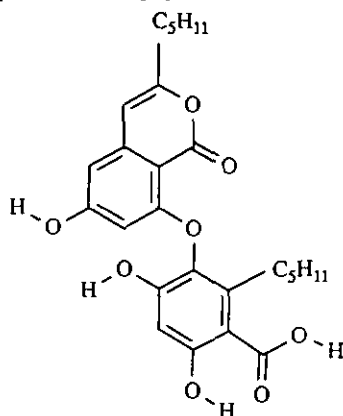
Le  $M^{\cdot-}$  ( $m/z$  470) et le  $(M-H)^{\cdot-}$  ( $m/z$  469) sont tous deux absents du spectre. Le  $m/z$  425 correspond à  $(M-H-CO_2)^{\cdot-}$ . La perte de  $C_5H_{11}$  conduit à  $m/z$  354. L'ion  $m/z$  247 (100 %) correspond à un fragment basé sur le cycle S.



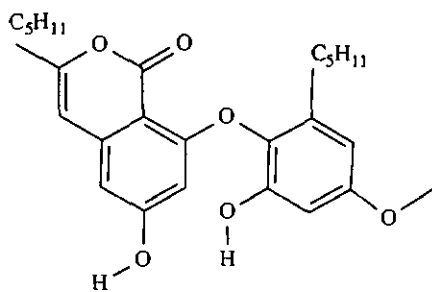
28.2.5 Acide isophysodique, acide Me-2'-O-physodique et Me-2-O-physodone



Acide Me-2'-O-physodique



Acide isophysodique



Me-2'-O-physodone

Etude NCI/MS-MS des descendants de m/z 439

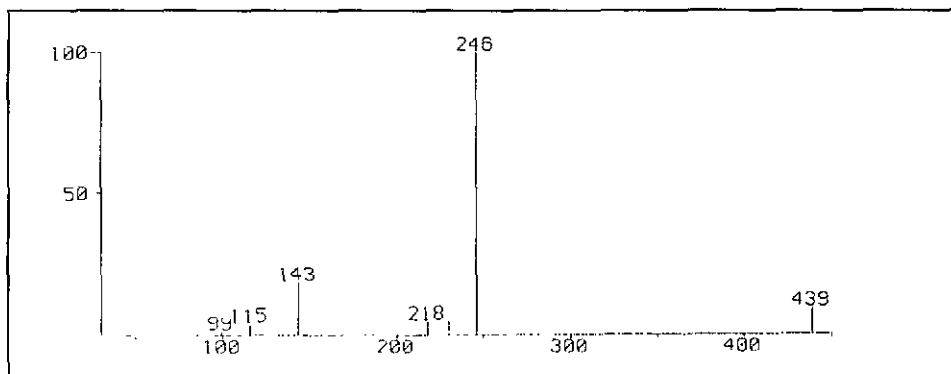
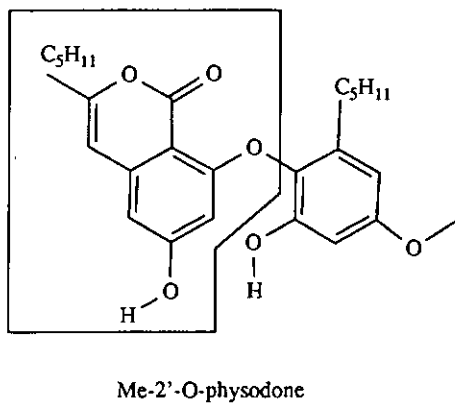
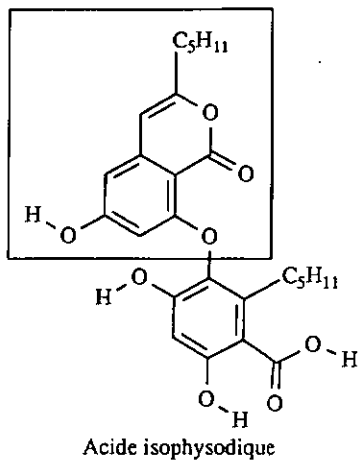
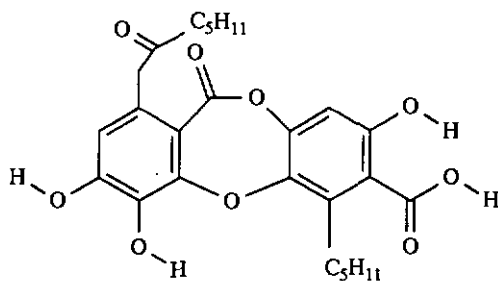


Figure 28.8

Le spectre de la figure 28.8 est très difficile à interpréter car il résulte de la combinaison de trois spectres différents. Nous avons constaté que contrairement aux cas précédents, le pic de base n'est plus  $m/z$  247 mais  $m/z$  246. Deux des trois substances participant au spectre sont susceptibles de donner un tel fragment :



## 28.2.6 Acide hydroxy-3-physodique



Acide hydroxy-3-physodique

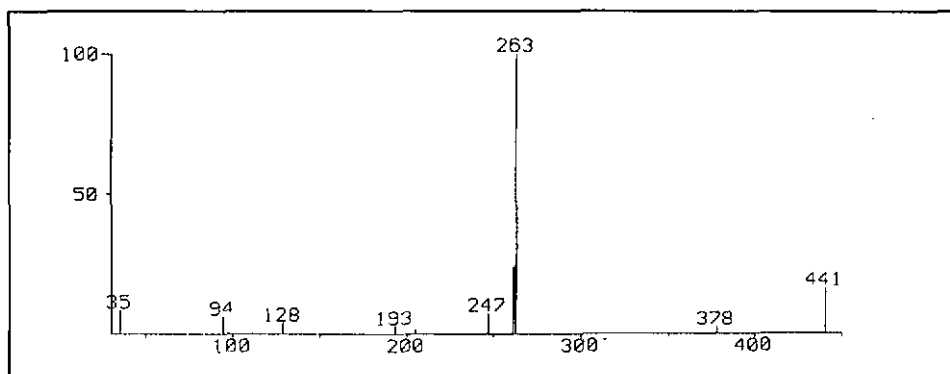
Etude NCI/MS-MS des descendants de  $m/z$  441

Figure 28.9

L'acide hydroxy-3-physodique suit le même schéma de fragmentation que l'acide physodique. Le fragment correspondant à  $m/z$  263 est de structure identique à  $m/z$  247 décrit sous 28.2.4, la seule différence étant la fonction hydroxyle en 3.

29 COMPARAISON DES METHODES D'ANALYSE (*LOBARIA PULMONARIA* (L.) Hoffm.)

## 29.1 INTRODUCTION

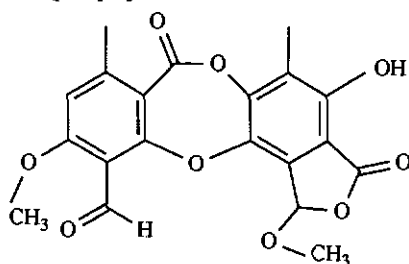
Par l'étude de *Lobaria Pulmonaria*, nous avons cherché à tester notre méthode d'identification par NCI/MS-MS sur un lichen pour lequel nous ne possédions pas d'étude approfondie. Comme il n'existe pas de bibliothèque de spectres NCI/MS-MS des composés lichéniques, nous n'avons pas tenté d'identifier les composés principaux de *Lobaria Pulmonaria* uniquement par cette technique, mais nous avons plutôt cherché à comparer les résultats obtenus par une extraction rapide, suivie d'une purification sommaire de quelques fractions, avec l'étude NCI/MS-MS directe du lichen.

Le lichen (env. 15 g), ramassé dans la région de Berne, a été broyé puis extrait à l'aide d'un mélange MeOH-CHCl<sub>3</sub>. L'extrait ainsi obtenu a été séparé en fractions solubles et insolubles dans l'éther. La fraction soluble a été chromatographiée sur une colonne (SiO<sub>2</sub> éluant : Toluène-dioxane-AcOH 180/45/5). Les diverses fractions obtenues ont été purifiées sur HPLC (RP-18 MeOH-H<sub>2</sub>O 58-100 % MeOH en 35 mn). Quatre produits ont ainsi été récupérés :

- Acide stictique
- Acide 8'-O-Me-stictique
- Acide 2'-O-Me-connorstictique
- Péroxyde d'ergostérol

Le peroxyde d'ergostérol ayant déjà fait l'objet d'une étude, nous ne détaillons ici que les études réalisées sur les autres produits.

## 29.2 ACIDE 8'-O-Me-STICTIQUE [48]



Le premier composé que nous avons identifié est l'acide 8'-O-Me-stictique. Le spectre  $^1\text{H-NMR}$  de la fraction (figure 29.1) permet l'identification des signaux suivants :

2 méthyles aromatiques

2 protons aromatiques

1  $-\text{CH}_2-$

1 méthoxy aromatique

1 aldéhyde

Spectre  $^1\text{H-NMR}$  de l'acide 8'-O-Me-stictique

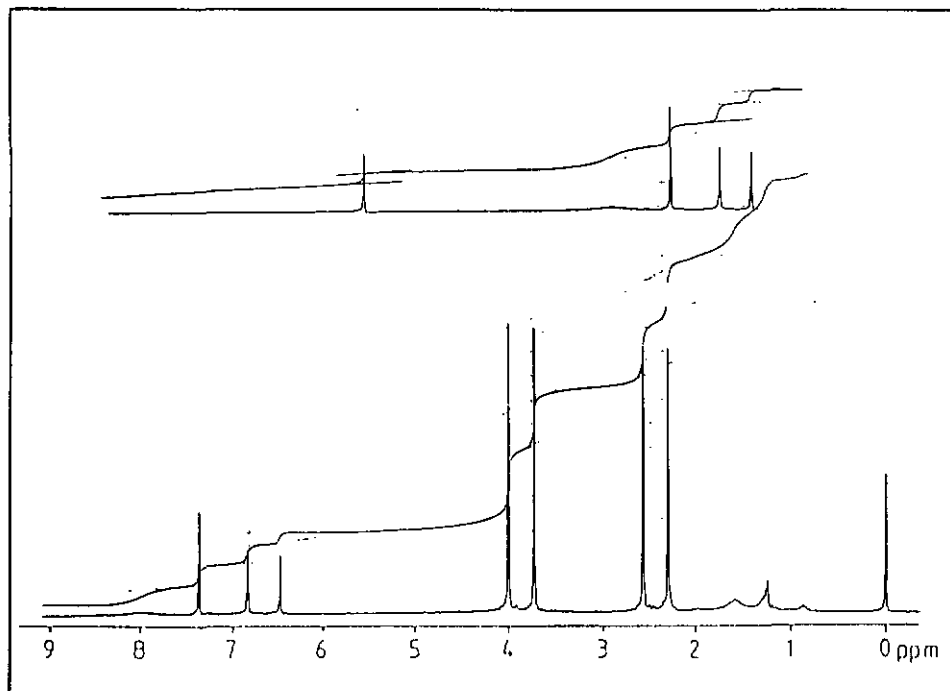


Figure 29.1

Le produit a été identifié par comparaison avec la littérature [48]. Nous avons confirmé sa structure en enregistrant les spectres EI et CI (figures 29.2 et 29.3).

Spectre PCI ( $\text{NH}_3$ ) de l'acide 8'-O-Me-stictique

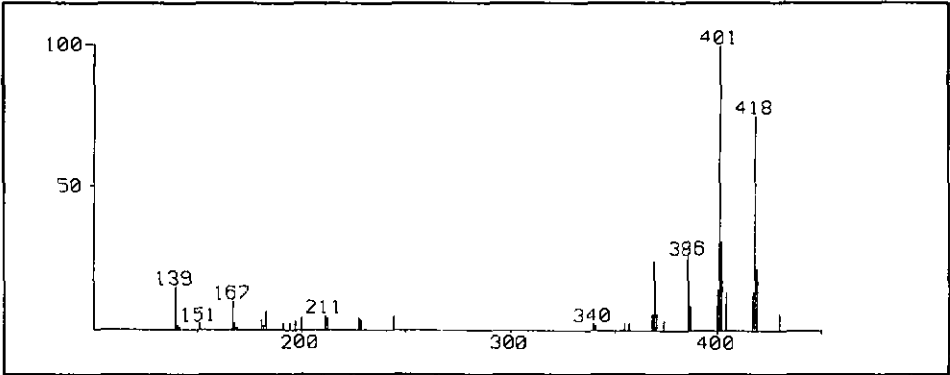


Figure 29.2

Le spectre PCI confirme le PM de 400 correspondant à la structure proposée.

Spectre EI de l'acide 8'-O-Me-stictique

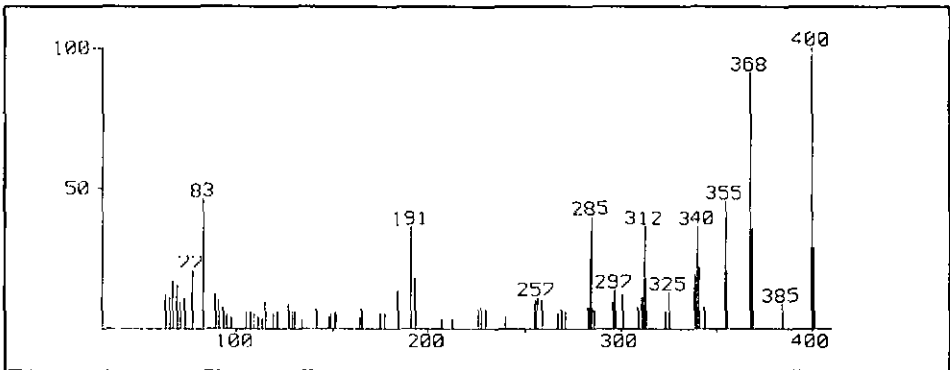
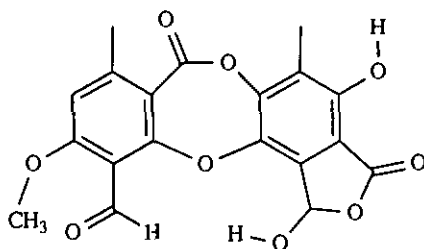


Figure 29.3

Le tableau ci-dessous donne une comparaison des principaux ions du spectre EI avec la littérature [48].

Référence	400 (100)	368 (76)	355 (30)	340 (35)	325 (9)
	312 (29)	297 (10)	285 (20)	191 (42)	
Produit	400 (100)	368 (92)	355 (45)	340 (35)	325 (12)
	312 (35)	297 (14)	285 (40)	191 (35)	

### 29.3 ACIDE STICTIQUE



Le spectre  $^1\text{H-NMR}$  de la fraction (figure 29.4) permet l'identification des signaux suivants :

- 2 méthyles aromatiques
- 1 méthoxy aromatique
- 2 protons aromatiques
- 1 hydroxyle
- 1 aldéhyde

Le signal à 3.49 ppm est dû à une trace de méthanol.

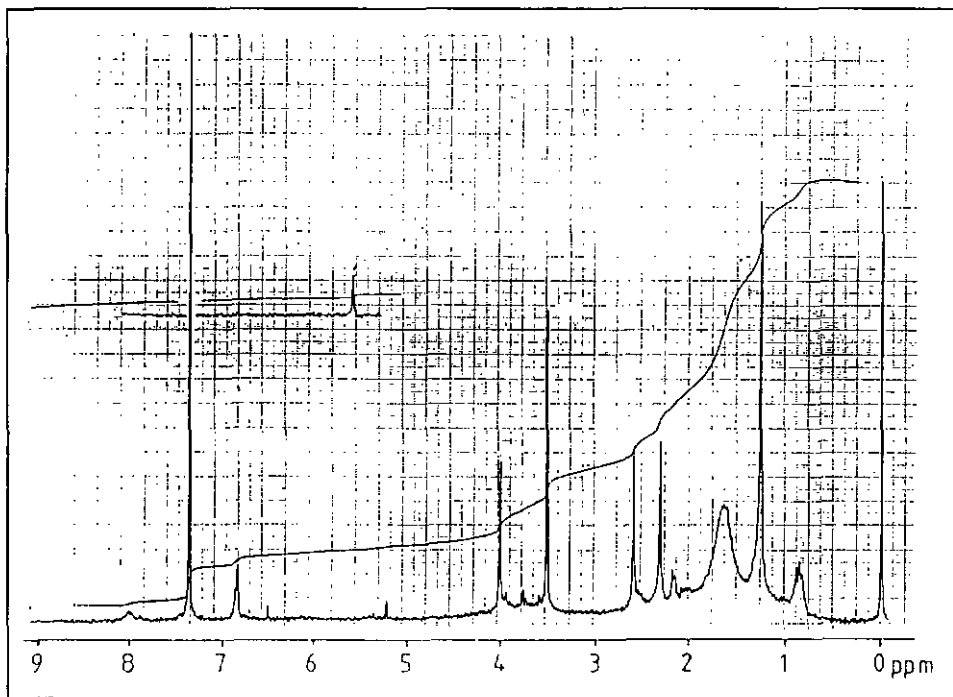
Spectre  $^1\text{H-NMR}$  de l'acide stictique

Figure 29.4

Une rapide recherche des composés susceptibles de correspondre au spectre  $^1\text{H-NMR}$  nous a amenés à postuler la structure de l'acide stictique. De manière à confirmer celle-ci, nous avons enregistré les spectres de masse de notre fraction et d'un échantillon d'acide stictique provenant de notre collection (figures 29.5 et 29.6).

Spectre de masse (EI) de notre fraction

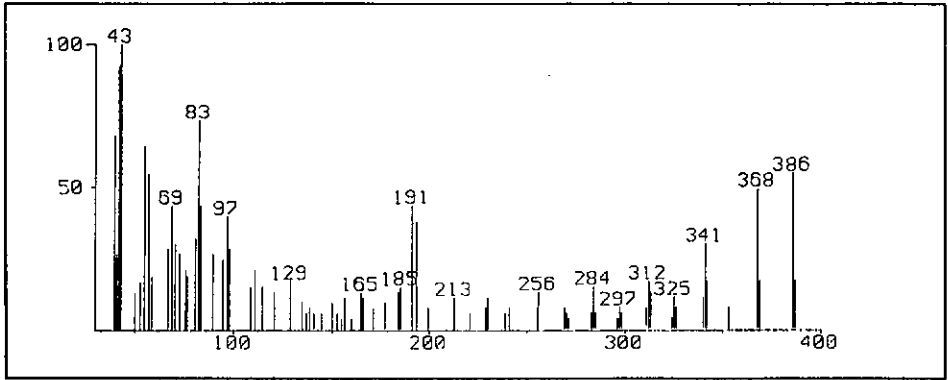


Figure 29.5

Spectre de masse de l'acide stictique

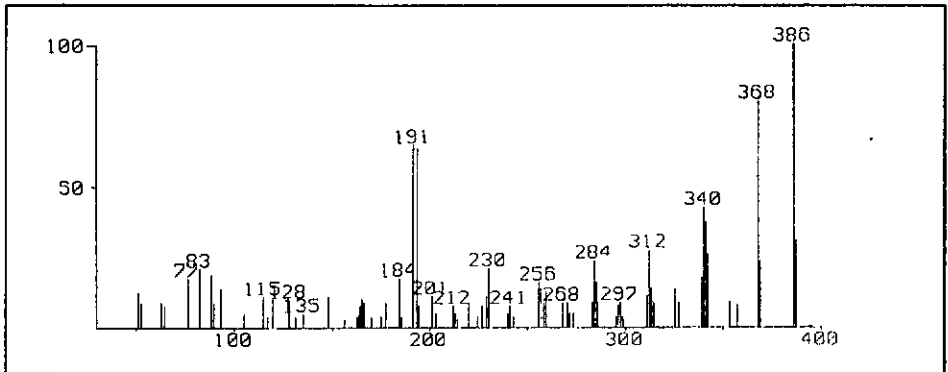
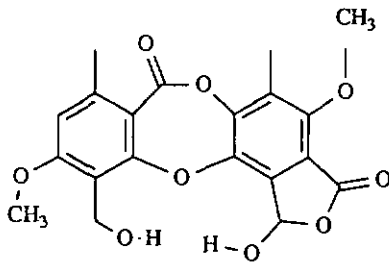


Figure 29.6

Cette comparaison confirme que notre produit est effectivement de l'acide stictique.

## 29.4 ACIDE 2'-O-METHYL-CONNORSTICTIQUE



Le spectre  $^1\text{H-NMR}$  nous a permis d'identifier les signaux suivants :

2 méthyles aromatiques

2 méthoxy

1  $-\text{CH}_2-$

2 protons aromatiques

Spectre  $^1\text{H-NMR}$  du produit

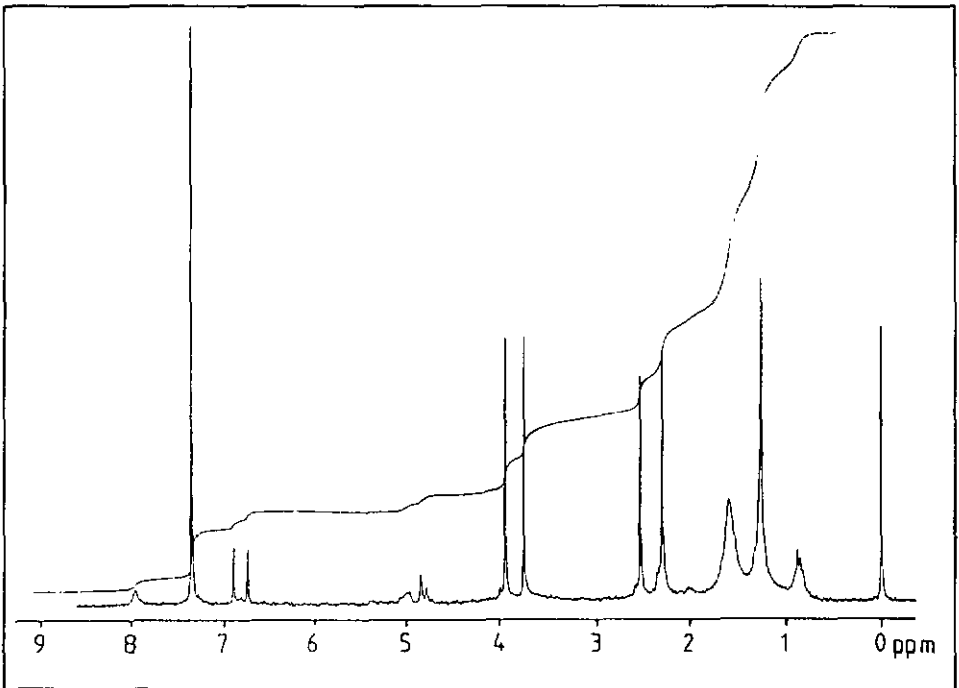


Figure 29.7

La comparaison de ce spectre avec celui du 2'-O-méthyl-stictique montre que les cycles A des deux substances doivent être identiques.

	C(9') Me	C(8)-Me	C(4)- -O-Me	C(2')- -O-Me	C(8')-H	C(5)-H	-CHO
Témoin	2.33	2.58	3.99	4.07	6.64	6.67	10.51
Produit	2.30	2.53	3.75	3.95	6.69	6.84	

Le signal de l'aldéhyde du 2'-O-Me-stictique est absent des spectre de notre produit; par contre, un signal correspondant à un -CH<sub>2</sub>- apparaît.

La comparaison avec la littérature [48,49] montre que la structure de notre produit doit être celle de l'acide 2'-O-Méthyl-connorstictique.

Nous avons encore enregistré le spectre EI de notre produit (figure 29.8). Il confirme le PM de 402. m/z 370 correspond à une perte de méthanol depuis M<sup>+</sup>.

Spectre de masse (EI) de l'acide 2'-O-Me-connorstictique

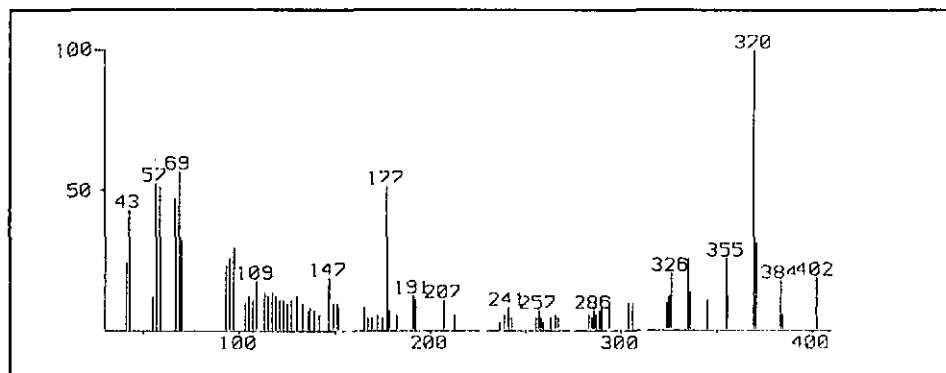


Figure 29.8

## 29.5 ETUDE DU LICHEN PAR NCI/MS-MS

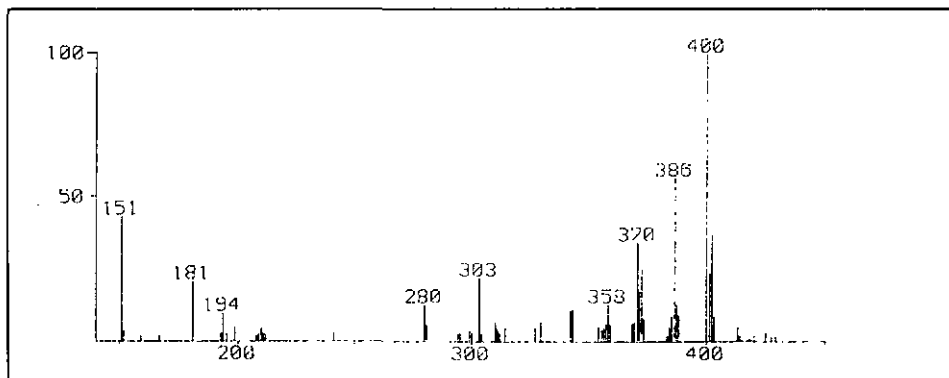
Spectre de masse (NCI) global de *Lobaria Pulmonaria*

Figure 29.9

L'étude par NCI/MS-MS du lichen a été relativement délicate à réaliser. Nous avons premièrement constaté que la composition du lichen pouvait varier légèrement selon la partie étudiée. Ce résultat est très intéressant car il nous ouvre un nouveau champ d'application de la MS-MS : l'étude de la répartition des substances dans le lichen. Il représentait toutefois un obstacle pour nous puisque nous n'avons pas encore pu optimiser la méthode de manière à pouvoir tirer parti de telles nuances. En effet, si la composition de nos échantillons varie d'une fois à l'autre, il nous est très difficile de savoir si les modifications des conditions entre deux expériences ont amélioré les résultats.

Une autre difficulté est due au fait que, pour vaporiser les produits dans la chambre d'ionisation, il est nécessaire de les chauffer. Dans ce cas précis, les produits identifiés se volatilisent en un laps de temps relativement court. Cela rend l'acquisition des spectres difficile, l'optimisation de l'appareil nécessitant un temps souvent supérieur à la durée d'existence des produits dans la source. Il en résulte que l'enregistrement des spectres se fait sur des traces de produits, rendant la détection plus difficile. Il serait utile de pouvoir optimiser l'appareil sur un échantillon autre avant de passer à l'étude du lichen. Hélas, les conditions nécessaires à l'obtention d'un spectre sont si précises que le

fait de sortir la canne d'introduction directe pour remettre de l'échantillon exige de réoptimiser l'appareil. Malgré ces difficultés, nous sommes parvenus à retrouver les produits isolés.

#### Spectre NCI/MS-MS de l'acide stictique (lichen brut)

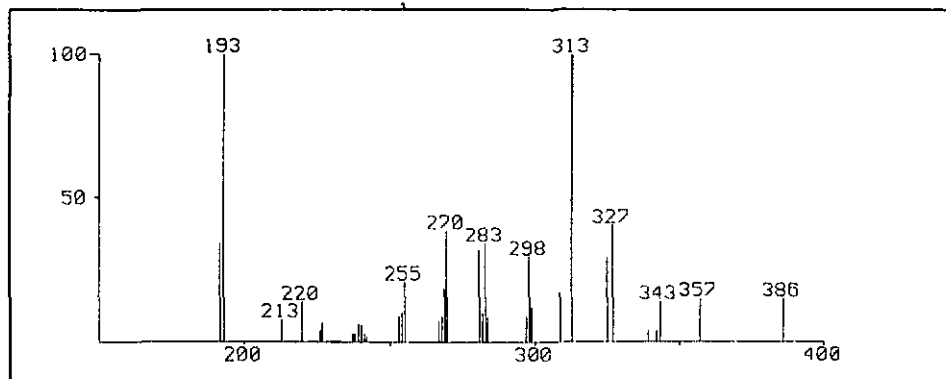


Figure 29.10

Les spectres de l'acide stictique obtenus à partir du lichen brut et de l'échantillon isolé n'ont pas posé de problème (figures 29.10 et 29.11). Ils sont comparables et facilement reproductibles.

#### Spectre NCI/MS-MS de l'acide stictique isolé

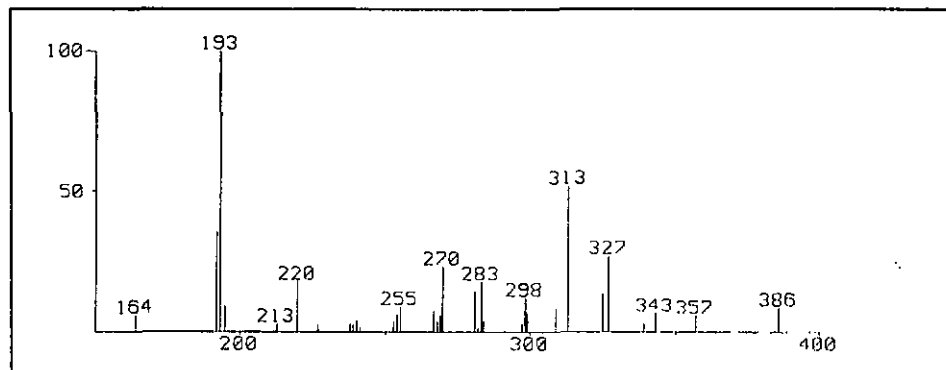


Figure 29.11

Pour les deux autres composés, la mesure s'est révélée moins aisée. En effet, les quantités plus faibles et une plus grande volatilité ont rendu les réglages plus difficiles à réaliser.

#### Spectre NCI/MS-MS de l'acide 8'-O-méthyl-stictique (lichen brut)

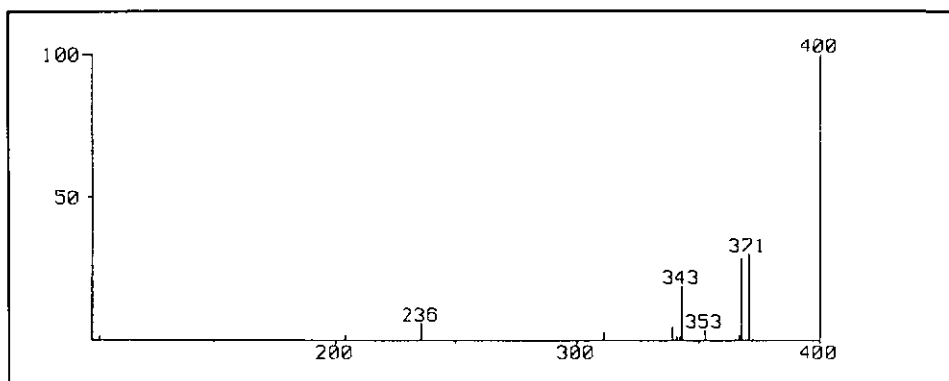


Figure 29.12

Les spectres des figures 29.12 et 29.13 l'illustrent bien. Le signal à  $m/z$  368, qui apparaît dans le spectre du lichen brut, est probablement dû à une perte de méthanol depuis  $M^+$ . Le fait que ce signal n'apparaisse pas dans le spectre du témoin signifie vraisemblablement que les conditions d'enregistrement n'étaient pas rigoureusement identiques, ou qu'un deuxième produit de masse 400 est présent dans le mélange.

Spectre NCI/MS-MS de l'acide 8'-O-méthyl-stictique isolé

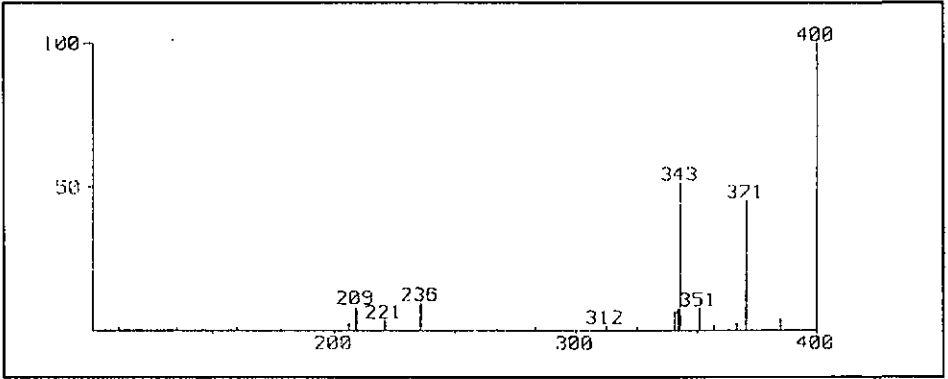


Figure 29.13

Spectre NCI/MS-MS de l'acide 2'-O-Me-connorstictique (lichen brut)

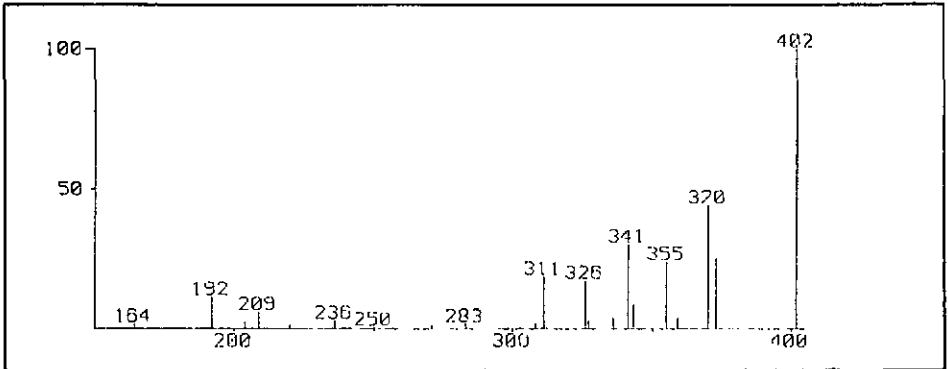


Figure 29.14

Dans le cas de l'acide 2'-O-méthyl-connorstictique, l'analyse s'est avérée encore plus difficile. Ce produit était le moins abondant de tous. Il s'est montré encore plus sensible aux changements de conditions expérimentales que le précédent. Nous avons essayé d'obtenir des spectres reproductibles en optimisant les conditions de la collision (énergie, pression, focalisation) et en ne lançant l'acquisition qu'au moment où nous observions un bon spectre sur l'oscilloscope. Hélas, le temps nécessaire à l'enregistrement du premier spectre était suffisant pour que les réglages ne soient plus optimaux.

#### Spectre NCI/MS-MS de l'acide 2'-O-Me-connorstictique isolé

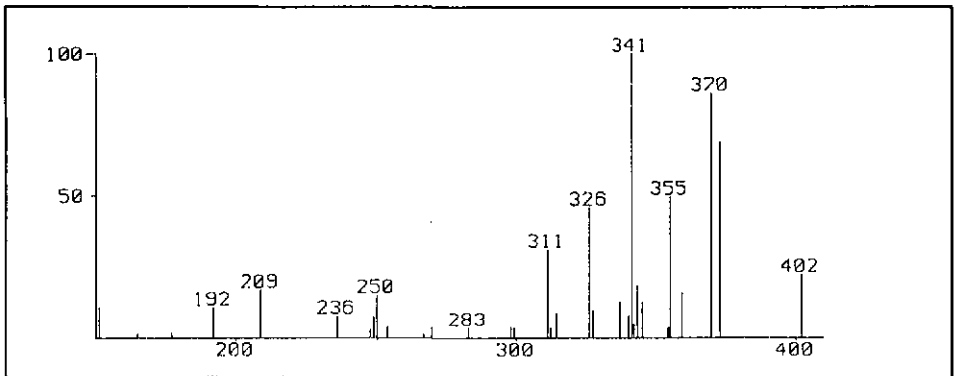


Figure 29.15

## 29.6 CONCLUSIONS

La technique classique EXTRACTION, SEPARATION, ANALYSE est plus lente que l'analyse directe. Elle nécessite de disposer de quantités plus grandes de lichen, mais implique également plus de manipulations. L'un de ses grands avantages est qu'elle permet l'isolement de produits purs et leur analyse par plusieurs techniques spectroscopiques (NMR IR MS UV exemple). L'utilisation de la GC-MS raccourcit sans doute la durée de l'expérience, mais il faut que le mélange de produits étudié s'y prête. Dans ce cas, on perd également la possibilité d'utiliser d'autres méthodes spectroscopiques.

L'étude directe par NCI/MS-MS est rapide et peut être effectuée sur des quantités minimales de lichen. Pour que les résultats soient significatifs, elle nécessite cependant la réunion de plusieurs conditions. Celles-ci sont fortement liées à la structure des molécules présentes dans le mélange, d'où la difficulté de se placer dans des conditions expérimentales optimales. Les différences notables de stabilité observées entre deux depsides comme l'acide stictique et l'acide 8'-O-méthyl-stictique le démontrent bien. La faible stabilité thermique et le manque de volatilité des depsides font l'objet d'une étude particulière [50].

Les lichens ayant, d'après nos résultats, des comportements différents selon leur composition depsidique, nous en concluons que si la NCI / MS-MS peut être appliquée dans certains cas, elle doit l'être avec une extrême prudence.

**PARTIE EXPERIMENTALE**

## VIII PARTIE EXPERIMENTALE

### 30 GENERALITES

#### Chromatographie sur couche mince (CCM)

Support :

Silicagel 60 F<sub>254</sub>, épaisseurs 0.2 mm et 2 mm.

Éluants :

Toluène-dioxane-acide acétique (180/45/5)

Ether de pétrole-éther (diverses compositions)

Chloroforme

Révélateurs :

UV 254 et 311 nm

Acide sulfurique 10 %

#### Chromatographie à moyenne pression

Appareillage :

Büchi LO-BAR

Colonnes de verre sous pression (1-2 bar) d'azote

Les débits ont varié entre 5 et 15 ml/min

Tous les solvants ont été distillés par nos soins avant d'être utilisés

Support :

Silicagel 15-40  $\mu$  (MERCK)

Eluants :

Gradient éther de pétrole-éther-MeOH

Gradient toluène-dioxane

Révélateurs :

Etude des fraction par CCM

### Chromatographie HPLC

Appareillage :

Perkin Elmer série 3 avec détecteur UV LC-55 B de la même marque

Support :

Colonne semipréparative (KNAUER) remplie par nos soins  
RP-18 5 et 7  $\mu$

Eluants :

MeOH-H<sub>2</sub>O 58 % -> 100 % MeOH en 35 mn (2 ml/mn)

MeOH-H<sub>2</sub>O 90 % -> 100 % MeOH en 60 mn (2 ml/mn)

Révélateurs :

UV 254 nm (lorsque c'était possible)

Sinon fractionnement toutes les deux minutes et étude ultérieure par CCM

### Chromatographie en phase gazeuse

Appareillage :

DANI 6500 et 3800

**Support :**

Colonne OV-1/25 m

**Eluant :**

Hélium (220°C à 320°C 3°C/mn, injecteur et détecteur à 250°C)

**Détection :**

Détecteur FID

Spectromètre de masse (MS et MS-MS)

**Analyse instrumentale**

**NMR** Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur un appareil Bruker WP 200, à 200 MHz pour les spectres  $^1\text{H}$ -NMR et à 50.29 MHz pour les  $^{13}\text{C}$ -NMR. Dans les deux cas, les déplacements chimiques ont été calculés par rapport au tétraméthylsilane (TMS).

**IR** Les spectres infrarouges ont été enregistrés en pastilles KBr sur un appareil Perkin-Elmer modèle 521.

**MS/MS-MS** Tous les spectres de masses présentés dans ce travail ont été enregistrés sur un appareil Nermag R30-10.

Le système informatique utilisé pour piloter l'appareil est constitué d'un VAX PDP-11/73 et de la version 3.2 du programme SIDAR.

### Conditions pour les spectres MS

Potentiel d'ionisation : 72-74 eV  
Courant d'émission ionique : 250-500 mA  
Pression :  $4 \cdot 10^{-7}$  Torr  
Température de la source : 60-300 °C  
Echelle de masses : 30-800 UMA

### Spectres en ionisation chimique

Gaz réactants :  $\text{NH}_3$  et  $\text{CH}_4$   
Pression dans la source :  $< 7 \cdot 10^{-6}$  Torr

### Conditions pour les spectres MS-MS

Comme pour la MS simple  
Pression dans la chambre de collision :  $0.5-1.1 \cdot 10^{-1}$  Atm

### Conditions pour la NCI

Potentiel d'ionisation : 20-40 eV  
Courant d'émission ionique : 150-350 mA

Le reste des conditions étaient identiques à celles utilisées en PCI.

### 31 EVERNIA PRUNASTRI

La fraction insoluble dans l'éther de la concrète benzénique a été chromatographiée sur une colonne à moyenne pression (h=40 cm,  $\phi$  6 cm, gel de silice 15-40  $\mu$ ). Nous l'avons éluée en utilisant un gradient toluène -> dioxane.

La fraction acide soluble dans l'éther a été chromatographiée sur une colonne à moyenne pression du même type que ci-dessus. Le gradient était basé sur un mélange d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle.

Les produits de la fraction AC2 ont été séparés sur des plaques chromatographiques couches épaisses (gel de silice MERCK épaisseur 2mm).

La fraction soluble dans l'éther a été saponifiée (KOH 5% dans MeOH (50 ml) + 5 ml d'eau). Elle a ensuite été chromatographiée sur une colonne de gel de silice (h = 25 cm,  $\phi$  = 7.5 cm éluant éther de pétrole 40 %, éther 60%).

La fraction NT2.2 a été purifiée par HPLC (RP-18 7 $\mu$  MeOH-H<sub>2</sub>O, gradient 58 % MeOH à 100 % MeOH en 35 mn).

La fraction neutre de l'extrait à l'éther de lichen frais a été chromatographiée sur une colonne de gel de silice (h = 40 cm,  $\phi$  = 6 cm, gradient éther de pétrole, éther, MeOH). Les fractions obtenues ont été purifiées en HPLC (RP-18 7 $\mu$  MeOH-H<sub>2</sub>O, gradients 58 % MeOH à 100 % MeOH en 35 mn et 90 % à 100 % MeOH en 1 h).

L'extrait au chloroforme a été séparé en parties soluble et insoluble dans l'éther. La partie soluble a été séparée en fraction neutre et en fraction acide comme précédemment. La première a été chromatographiée sur une colonne à moyenne pression remplie de gel de silice. L'éluion a été réalisée à l'aide d'un gradient éther de pétrole, éther, MeOH 10 %.

La fraction 2 de cette colonne a été purifiée par HPLC (RP-18 7 $\mu$  MeOH-H<sub>2</sub>O, gradient 90 % à 100 % MeOH en 1 h).

## 32 SYNTHESE DU 4-BENZYL-3,5-DIMETHYL-PHENOL

Le schéma de synthèse est présenté au chapitre 18.

### Mode opératoire

#### Etape 1 protection du phénol

De manière à éviter toute réaction parasite avec les divers réactifs utilisés lors de la synthèse, nous avons protégé le phénol en le faisant réagir avec le bromure de benzyle. Nous avons opté pour ce groupe protecteur parce qu'il est décrit comme étant facile à enlever par hydrogénolyse.

A 10 g de 3,5-diméthyl-phénol dans 100 ml d'acétone anhydre, on ajoute 20 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sous agitation. 25 ml de bromure de benzyle sont ensuite additionnés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome. La réaction est poursuivie sous agitation et sous courant d'azote durant 20 heures. Le milieu réactionnel, après avoir été concentré sous pression réduite, est extrait à l'éther (éther/NaOH 2N). La phase organique est lavée jusqu'à neutralité.

#### Etape 2 réaction de Friedel-Craft

A un mélange de 15 ml de phénol protégé et de 1.2 g d'AlCl<sub>3</sub>, on ajoute goutte à goutte 10 ml de bromure de benzyle (sous agitation magnétique et à température ambiante). La réaction est poursuivie durant 12 h. Le milieu réactionnel, dissout dans de l'éther, est extrait après addition d'une solution aqueuse 2N de NaOH. La phase étherée est lavée jusqu'à neutralité. Le solvant est évaporé.

### Étape 3 régénération du phénol

Au produit alkylé, nous avons ajouté 0.5 g de palladium / charbon dans de l'acétate d'éthyle. La solution est agitée sous atmosphère d'hydrogène jusqu'à ce que la consommation de celui-ci cesse.

### Purification du produit

Le produit a été purifié par passage sur une colonne HPLC (RP-18 5 $\mu$  semi-préparative, isocratique 80 % Méthanol 20 % H<sub>2</sub>O). Seule la quantité nécessaire à l'analyse spectroscopique a été purifiée.

Le passage en HPLC nous a permis de constater que plusieurs composés s'étaient formés. En effet, la réaction de Friedel-Crafts peut conduire à une mono, mais aussi à une di ou trisubstitution. Nous ne nous sommes intéressés qu'à l'isolement des produits mono- substitués. Deux isomères sont possibles, ils se sont formés statistiquement à raison de 2/3 de substitution ortho (par rapport au phénol) et 1/3 de substitution para. Les deux composés ont été purifiés par HPLC une seconde fois. Les spectres <sup>1</sup>H-NMR correspondants sont présentés aux figures 32.1 et 32.2.

Produit synthétisé (substitution para)

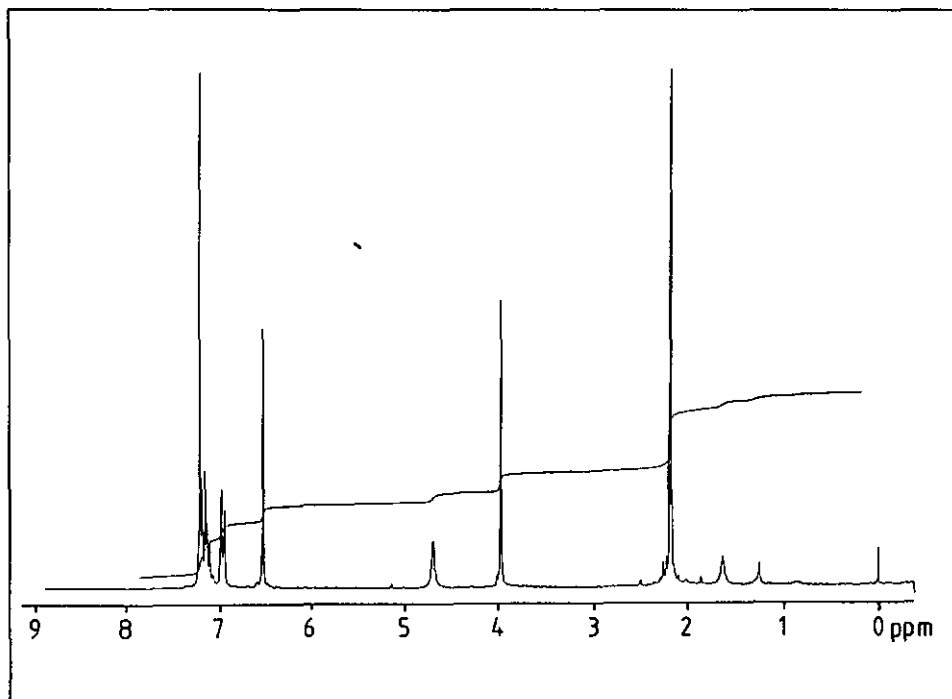


Figure 32.1

Explication du spectre  $^1\text{H-NMR}$  de la figure 32.1.

Signal	Attribution
2.18 ppm	$\text{CH}_3\text{-Ar}$
3.95 ppm	$\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$
4.72 ppm	$\text{-OH}$
6.6 ppm	$\text{Ar-H (cycle substitué)}$
7-7.3 ppm	$\text{Ar-H}$

## Produit synthétisé (substitution ortho)

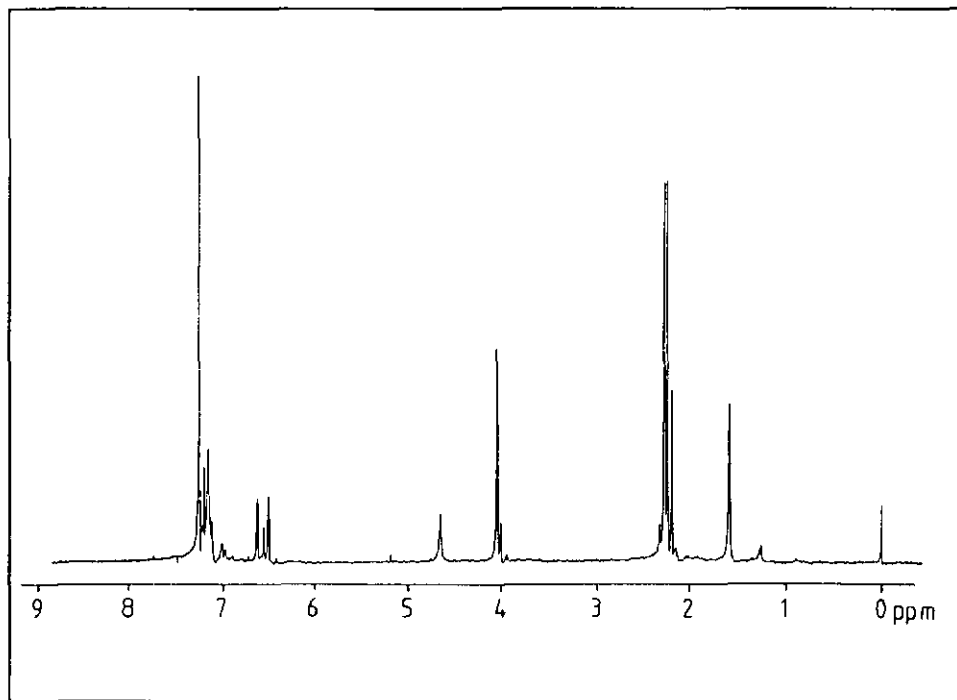


Figure 32.2

Explication du spectre  $^1\text{H-NMR}$  de la figure 32.2

Etant donné la différence de substitution, les deux méthyles ne sont plus isochromes. De même, le  $-\text{CH}_2-$  qui lie les deux cycles est très légèrement déblindé. Les deux protons du cycle phénolique donnent eux aussi des signaux différents.

### 33 CLADONIA FURCATA

Le lichen (290 g), ramassé dans la région de Gurnigel dans la canton de Berne, a été plongé dans de l'azote liquide, broyé, puis extrait à l'acétone.

La fraction neutre soluble dans l'éther a été traitée de deux manières différentes :

- GC-MS (OV-1 220 °C à 320 °C, 3 °C/mn, injecteurs et interface à 250 °C).
- Saponification puis CCM préparative (MERCK SiO<sub>2</sub> 2 mm, toluène - dioxane - acide acétique 180/45/5).

La fraction FU2 a finalement été étudiée par GC-MS (OV-1 220 °C à 320 °C, 3 °C/mn, injecteurs et interface à 250 °C).

L'étude des autres lichens a nécessité moins de manipulations. Nous avons en effet surtout cherché à étudier des mélanges. Les modes opératoires faisant partie intégrante des recherches, (mise au point des méthodes), nous les avons insérés dans les chapitres correspondants.

**CONCLUSION**

## IX CONCLUSION

### 34 RESUME DES RESULTATS

Notre travail s'est articulé autour de deux lignes directrices. D'une part l'étude, principalement par MS-MS et GC-MS, des triterpènes et stéroïdes dans différents lichens, d'autre part quelques tentatives d'analyse des principaux constituants depsidiques par MS-MS directe sur un échantillon brut de végétal.

La méthodologie classique, utilisée par nos prédécesseurs, n'a pas pu être mise en oeuvre. En effet, nous nous sommes occupés de composés présents en traces dans les lichens étudiés. Certaines espèces (*Cladonia*) n'étaient de plus disponibles qu'en quantité très limitée. Il faut également relever que les triterpènes constituent le plus grand groupe, de la famille des terpènes, et qu'il ne cesse de s'agrandir. La difficulté majeure lors de l'identification de ce type de composés est liée à leur structure d'hydrocarbure tétra ou pentacyclique peu ou pas fonctionnalisée.

La méthode qui se prête le mieux à la purification de petites quantités est sans doute la chromatographie liquide à hautes performances. Nous avons utilisé celle-ci pour purifier des depsides. Le fait que les triterpènes présents dans nos fractions n'absorbent pas dans l'UV a rendu caduque le système de détection classique de l'HPLC. Nous avons essayé de travailler avec un détecteur d'indice de réfraction. Cet appareil exige que la composition de l'éluant soit maintenue rigoureusement constante. Nous nous sommes rapidement rendus compte que nous ne pouvions pas concilier efficacité de séparation et régime isocratique. Nous avons finalement dû nous résigner, dans les cas les plus extrêmes, à collecter de petites fractions à la sortie de la colonne, et à étudier celles-ci par chromatographie sur couche mince avant de les réunir selon leurs similitudes.

En ce qui concerne l'identification des composés, parmi les différentes méthodes spectroscopiques existantes, la spectrométrie de masse en tandem paraît être la mieux adaptée lorsqu'on ne dispose que de quantités très faibles de produit pur ou d'un mélange complexe. Ce travail démontre, à notre connaissance pour la première fois, la possibilité d'utilisation de la MS-MS pour l'identification de

triterpènes.

Malgré les nombreuses difficultés rencontrées, nous avons identifié environ 50 composés dont 3 sont des nouveaux triterpènes. La liste complète est dressée dans le tableau ci-dessous :

#### Liste des divers composés identifiés

##### Evernia Prunastri (L.) Ach.

- √  $\alpha$ -amyrine
- √  $\beta$ -amyrine
- √ Nor-30-hopan-3 $\beta$ -ol-22-one
- √ Oléan-12-en-3 $\beta$ -ol-11-one
- √ 6-acétoxy-hopan-3 $\beta$ -ol-22-one\*
- Lanostérol
- √ Lupène-3-one
- √  $\beta$ -amyrénone
- √ Isomultiflorénone
- √ Hopan-22-en-3-one
- √ 24-méthylène-cycloartanone
- √ Isomultiflorénol acétylé
- √ 8-épidioxy-cholesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol
- √ 8-épidioxy-cholesta-6,9,22-trien-3 $\beta$ -ol
- √ 3 $\beta$ -hydroxy-hopan-29-oïque\*
- √ 3 $\beta$ -hydroxy-6-acétoxy-hopane-29-oïque\*
- Taraxérol
- √ Bétuline

Cladonia Furcata (Huds.) Schrad.

- √  $\beta$  amyrine
- √  $\alpha$  amyrine
- √ Stigmast-4-en-3-one
- √ Ursan-12-en-3,11-dione
- √ Oléan-12-en-3,11-dione
- Acide fumarprotocétrarique
- √ Atranol
- √ Acide éverninique
- √  $\beta$ -orcinolcarboxylate de méthyle
- √ Acide bourgéalique
- √ Cholestérol
- √ 24-méthyl-22-en-cholestérol
- √ 24-éthyl-22-en-cholestérol
- √ 24-éthyl-cholestérol

Cladonia Stéréoclada des Abb.

- √ Acide bourgéalique
- √ 24-méthyl-22-en-cholestérol
- √ Ergost-3,5,22-triène-7-one
- √ 24-éthyl-22-en-cholestérol
- √ Ergost-3,5-dien-7-one
- √ Stigmast-3,5,22-trien-7-one

Lobaria Pulmonaria (L.) Hoffm.

Acide stictique

- √ 8'-O-Me-stictique
- √ 2'-O-Me-connorstictique
- √ peroxyde d'ergostérol

√ = La présence de ce composé n'a, à notre connaissance, jamais été signalée dans ce lichen.

\*  $\equiv$  Composé nouveau

L'établissement des différentes structures a été essentiellement réalisé par spectrométrie de masse (GC-MS et MS-MS). Lorsque la possibilité existait nous avons recouru aussi à la  $^1\text{H-RMN}$ .

Nous avons également effectué quelques tentatives d'utilisation de la MS-MS pour l'analyse directe de lichens. Les résultats obtenus montrent que ceci est possible mais que les données nécessaires à une application systématique font encore défaut.

Pour *Pseudevernia furfuracea* (L.) Ach., lichen bien connu dans notre laboratoire, dans lequel environ 15 composés depsidiques ont été identifiés, une étude MS-MS directe nous a permis de mettre en évidence les substances suivantes:

- Atranorine
- Cl-atranorine
- Acide physodique
- Acide méthyl-2'-O-physodique
- Acide isophysodique
- Méthyl-2'-physodone
- Acide hydroxy-3-physodique

Pour la famille de *Cladonia*, par contre, nous nous sommes heurtés à la présence de l'acide fumarprotocétrarique, composé très instable lorsqu'il est ionisé (même avec les méthodes les plus douces), et qui empêche, par ses fragments, l'observation du reste du spectre.

Pour *Lobaria Pulmonaria* (L.) Hoffm. nous avons identifié :

- Acide stictique
- Acide 8'-O-méthyl-stictique
- Acide 2'-O-méthyl-connorstictique

Par les méthodes classiques d'analyse nous avons également identifié du peroxyde d'ergostérol.

## 35 CONCLUSIONS

Lorsque nous avons commencé notre travail, nous pensions mener une étude classique de lichens du groupe *Cladonia* et terminer le travail de nos prédécesseurs, Gavin et Nicollier, sur les fractions apolaires neutres d'*Evernia prunastri*. Les difficultés dues aux faibles quantités de matériel végétal disponibles (pour *Cladonia*), à la faible concentration des triterpènes et stéroïdes dans nos extraits et à la nature particulière de ces molécules, nous ont amenés à prendre une orientation différente. L'introduction dans nos laboratoires d'un appareil moderne de spectrométrie de masse en tandem nous a poussés à explorer les possibilités d'utilisation de cette technique récente pour l'analyse structurale et l'analyse directe de mélanges complexes.

C'est ainsi que nous nous sommes davantage intéressés aux possibilités qu'offrait la MS-MS pour l'établissement de structures, qu'à l'étude proprement dite d'un ou de plusieurs lichens. Nous ne présenterons pas ici de synoptique de la composition des lichens que nous avons étudiés, les techniques mises en oeuvre différant trop d'un cas à l'autre pour autoriser une comparaison scientifiquement significative. Notons simplement que pour *Evernia Prunastri* nos résultats permettent de mettre un point final à un travail commencé il y a plus de dix ans dans nos laboratoires et au cours duquel plus de 150 composés ont été identifiés. *Evernia Prunastri* restera probablement pendant longtemps le lichen ayant fait l'objet de l'étude la plus approfondie.

Nos recherches ont porté sur des domaines allant de l'étude théorique de certains phénomènes en MS-MS à une plus classique identification de composés. Nous avons, d'une part, cherché à mieux comprendre certains mécanismes et certaines techniques, et, d'autre part, essayé d'identifier des composés nouveaux en réduisant au minimum les manipulations nécessaires.

## Les études théoriques

Dans le cadre des études théoriques, nous avons cherché à différencier des isomères, prouver des mécanismes, identifier des composés nouveaux sur la base des spectres MS de leurs fragments caractéristiques.

La différenciation entre deux isomères a surtout été illustrée par l'étude détaillée de l' $\alpha$  et de la  $\beta$ -amyrine. Nos expériences ont montré que si deux composés très proches par leur structure ont des spectres de masse quasi identiques, il n'en va pas forcément de même pour leurs fragments. Nous avons ainsi démontré, par les ions descendants des  $m/z$  218 obtenus par collision (100 % dans les deux spectres), que ces derniers subissaient des fragmentations voisines mais différenciables, permettant ainsi la distinction entre les deux isomères.

La démonstration de mécanismes a été intéressante sous plusieurs aspects. Jusqu'à présent, le travail consistait principalement en la synthèse d'un ou de plusieurs composés marqués et en leur étude par MS. La difficulté d'une telle méthode, notamment pour des molécules complexes, est évidente. L'approche que nous avons adoptée simplifie beaucoup le problème. Il n'est plus nécessaire de synthétiser la molécule étudiée, mais seulement des substances qui, lorsqu'elles seront fragmentées, produiront des ions de mêmes structures que celles des ions importants dans le mécanisme étudié.

On voit immédiatement l'avantage d'une telle méthode. Outre le fait que la synthèse des produits nécessaires est plus simple, il est possible de choisir entre plusieurs produits selon les coûts, les disponibilités et les connaissances.

Un autre avantage est la possibilité qu'offre la MS-MS d'étudier spécifiquement un ion donné. La méthode permettant d'établir la filiation et la paternité de chaque ion de manière certaine. Il devient possible de lever de manière irréfutable le doute pouvant exister sur la participation d'un fragment à un mécanisme.

Il est probable que l'amélioration de la compréhension des mécanismes régissant les fragmentations de composés dans un spectromètre de masse apportera une contribution non négligeable à la chimie.

Le troisième aspect que nous avons abordé dans cette étude théorique (l'étude des fragments isobares entre diverses molécules) trouve une application plus immédiate que les deux précédents. Nous ne l'avons donc pas développé au travers d'une expérience particulière, mais plutôt utilisé au cours de nos diverses recherches.

L'idée était de comparer les spectres des fragments d'une molécule inconnue avec ceux de fragments témoins plutôt que de chercher un spectre témoin pour toute la molécule. De cette manière il n'est plus nécessaire de posséder un spectre témoin de la substance dont on recherche la structure, mais seulement les spectres de ses principaux fragments. Il en découle du point, de vue pratique, une bibliothèque des fragments les plus courants qui nous permet très rapidement d'établir sinon une structure complète, tout au moins un squelette ou une appartenance à une classe de produits.

L'application de cette méthode de travail nous a permis de déterminer la structure de la plupart de nos composés. Il serait intéressant de la systématiser en paramétrant l'appareil de manière à lui faire enregistrer les descendants des fragments les plus courants tout au long d'une chromatographie. Il deviendrait alors possible d'automatiser l'identification de composés complexes même si ceux-ci n'ont encore jamais été rencontrés. La difficulté de réaliser des spectres MS-MS sur les faibles quantités sortant d'une chromatographie en phase gazeuse nous a fait renoncer à une telle expérience. Nous pensons toutefois qu'il doit être possible de la réaliser si l'on se focalise sur une classe de composés.

### L'identification de composés

A la mise au point d'une étude par GC-MS-MS, nous avons préféré la simplification de l'extraction des triterpènes en étudiant la possibilité de remplacer la voie classique EXTRACTION - SEPARATION - ANALYSE par une extraction plus sélective et une étude par GC-MS. Nous nous sommes également consacrés à l'étude de lichens directement par MS-MS.

La première méthode (GC-MS) est courante. Elle fait partie des moyens classiques d'investigation dont nous disposons. Nous avons essayé de simplifier au maximum l'isolement de la fraction triterpénique d'un lichen en évitant les nombreuses chromatographies généralement nécessaires. Nous sommes finalement arrivés à la conclusion qu'en extrayant sélectivement les triterpènes, il était possible d'identifier la plupart de ceux-ci par GC-MS, sans devoir recourir au fractionnement sur colonnes de gel de silice. Le fait d'éviter de longues colonnes économise du temps et évite la dégradation de certains produits.

La MS-MS appliquée directement au lichen, se veut concurrente de l'étude par CCM. Il ne s'agit pas ici d'identifier des composés de traces, mais de déterminer avec certitude les structures des principaux composés d'un lichen.

Nous avons en effet constaté au cours de notre étude que, bien souvent, un spot pouvait être constitué de plusieurs produits. Un spectre, par contre, lève toute ambiguïté d'interprétation.

Les quelques expériences que nous avons réalisées sur *Pseudevernia Furfuracea* et *Lobaria Pulmonaria* nous ont permis de mieux préciser le cadre d'application de cette méthode. La première constatation que nous avons faite est que la méthode ne convient pas dans tous les cas. La recombinaison de certains ions dans le spectromètre de masse, ou la dégradation thermique des substances, peut empêcher une analyse correcte du lichen (cas des *Cladonia* avec l'acide fumarprotocétrarique).

Il serait nécessaire de construire une bibliothèque de spectres des principaux produits rencontrés dans les lichens, mais cela nécessite des conditions expérimentales les plus standardisées possibles, ce qui s'est avéré très difficile. Une étude intéressante consisterait à enregistrer les spectres de composés typiques de diverses classes à différentes combinaisons de paramètres (énergie des électrons, pression de gaz dans la chambre de collision, température, potentiel du repousseur, etc) et de trouver la combinaison idéale pour chaque classe de substances. Il serait alors possible de mettre en évidence une classe de composés en travaillant dans les conditions qui lui conviennent le mieux.

En fait, l'avenir de la NCI-MS-MS comme méthode d'analyse directe des lichens est principalement dépendant de la standardisation des conditions et de la possibilité de créer une bibliothèque de spectres de références. Comme nous l'avons vu dans l'étude de *Lobaria Pulmonaria*, certains produits, comme l'acide sùctique, donnent des résultats facilement reproductibles. D'autres, comme l'acide 2'-O-Me-connorstictique, se montrent plus capricieux. Nous pensons que l'étude plus théoriques des conditions d'analyse devrait permettre de résoudre ces problèmes.

Notre conclusion est que la méthode est prometteuse. Elle est plus difficile à mettre en oeuvre que l'étude par chromatographie sur couche mince, mais elle présente l'avantage de donner des résultats plus précis. Elle permet également de travailler sur des quantités encore beaucoup plus faibles que la CCM.

Il serait aussi intéressant d'étudier le profil du spectre MS du lichen. Il est en effet probable que des recoupements intéressants pourront être faits entre les divers membres d'une même classe. Dans ce cas il sera possible d'avoir une idée de la composition du lichen avant même d'avoir procédé à son étude MS-MS.

Dans l'ensemble, nous estimons que ce travail, outre les nombreux produits identifiés pour la première fois dans les lichens étudiés, constitue un exemple supplémentaire d'applications possibles de la MS-MS. Cette technique avait été annoncée comme remplaçante de la GC-MS. Nous pensons que cette vision est quelque peu optimiste, car l'analyse de mélanges complexes par MS-MS n'est pas encore aussi aisée que par GC-MS. La MS-MS, à notre avis, apporte un complément intéressant à la GC-MS. Il serait toutefois injuste de limiter cette technique à ce rôle de substitut, la MS-MS permettant en effet bien plus que la simple séparation des composants d'un mélange. Nous espérons que notre travail aura contribué à le démontrer.

**BIBLIOGRAPHIE**

## X BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. D. Phillipson, *Phytochemistr* 21 (1982), 2441-2456
- [2] G. Nicollier travail de doctorat (1979), Uni. Neuchâtel
- [3] J. Gunzinger travail de doctorat (1985), Uni. Neuchâtel
- [4] *Encyclopedia Universalis*, E. U. France SA, 9, 997  
P. Clerc & P.-D. Roh, *Saussurea* 11 (1980), 107-139
- [5] K. Huovinen & T. Ahti, *Ann. Bot. Fennici* 19 (1982), 225-234
- [6] J. D. Weete, *Phytochemistry* 12 (1973), 1843-1864
- [7] J.-H. Weil, *Biochimie générale*, Masson, (1979)
- [8] K. B. G. Tersell, *Natural products chemistry*, Wiley (1983)
- [9] D. Jaouen, N. Morin, C. Rolando, *Spectra* N° 115 14 (1986), 23-28
- [10] NERMAG documentation sur l'appareil de MS-MS R 30-10
- [11] P. E. Miller and B. Bonner Denton, *J. Chem. Educ.* 63 (1986), 616-622.
- [12] G. Nicollier & R. Tabacchi, *Helv. Chim. Acta*, 62 (1979), 807-810
- [13] C. F. Culberson, *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*, The University of North Carolina Press (1969)  
*Supplement to Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*, *The Bryologist* 73 (1970), 177-377.
- [14] M. Geyer, *HPLC von Flechten-Sekundärstoffen*, Essen, 1985
- [15] K. Huovinen, R. Hiltunen and M. von Schantz, *Acta Pharm. Fenn.* 94 (1985), 99-112
- [16] *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1963), 1702
- [17] H. Ageta, K. Shiojima, K. Masuda & T. Lin, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981), 2289-2290
- [18] J. Śliwowski & Z. Kasprzyk, *Phytochemistr.* 13 (1974), 1441-1449
- [19] J. de Paiva Campello & A. J. Marsaioli, *Phytochemistr.* 14 (1975), 2300-2302

- [20] T. Suga & T. Shishibori, *Phytochemistr.* 14 (1975), 2411- 2417
- [21] K. P. Madhusudanan, C. Singh & D. Fraisse, *Org. Mass Spectrom.* 21 (1986), 131-135
- [22] H. Budzikiewicz, J. M. Wilson & C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1963), 3688-3699
- [23] J. de Graeve, F. Berthou, M. Prost, *Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse*, Masson (1986).
- [24] H. Budzikiewicz & S. Huneck, *J. Am. Chem Soc.* 85 (1983), 3698
- [25] G. Tsoupras, travaux en cours
- [26] Z. A. Wojciechowski, L. J. Goad & T. Goodwin, *Phytochemistr.* 12 (1973), 1433-1436
- [27] F. R. Sugnaux & C. Djerassi, *J. Chromatogr.* 251 (1982), 189-201
- [28] A. G. Gonzáles, J. D. Martín & C. Pérez, *Phytochemistr.* 13 (1974), 1547-1549
- [29] A. A. L. Gunatilaka, Y. Gopichant, F. j. Schmitz & C. Djerassi, *J. Org. Chem* 46 (1981), 3860-3866
- [30] W-H. Hui & M-M. Li, *Phytochemistr.* 15 (1976), 985-986
- [31] S. Hara & Akiko Ohsawa, *J. Chromatogr.* 200 (1980), 85-94
- [32] H. Hirota, Y. Moriyama & All., *Bull. Chem. Soc. Japan* 48 (1975), 1884
- [33] J. Schmidt & S. Huneck, *Org. Mass Spectrom.* 14 (1979), 656-662
- [34] R. E. Corbett & H. Young, *J. Chem. Soc. C* (1966), 1556- 1563
- [35] C. Brassy, B. Bachet, B. Bodo & D. Molho, *Acta Crystallogr. Sect B*, 38 (1982), 3126-3128
- [36] S. G. Wyllie & C. Djerassi, *J. Org. Chem.* 33 (1968), 305-312
- [37] B. Bodo, *Bulletin du muséum national d'histoire naturelle* 349 (1975)
- [38] D. M. Grant et E. G. Paul, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964), 2984
- [39] L. P. Lindeman et J. Q. Adams, *Anal. Chem.* 43 (1971), 1245
- [40] J. D. Roberts, F. J. Weigert, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970), 1338
- [41] L. M. Jackman et D. P. Kelly, *J. Am. Chem. Soc. Sect. B* (1970), 103
- [42] R. Hagen & J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969), 4504
- [43] EIGHT PEEK INDEX OF MASS SPECTRA, *The Royal Society of Chemistry* (1986).
- [44] P. Koch, *Travail de doctorat*, (1982) Uni. Strasbourg

- 
- [45] C. F. Culberson & K. Ammann, *Herzogia* 5 (1979), 1-24
- [46] H. Budzikiewicz, *Mass Spectrometry Reviews* 5 (1986), 345- 380
- [47] S. Claude, travail de doctorat (1980), Uni. Neuchâtel
- [48] S. Huneck & R. Tabacchi, *Phytochemistr.* 26 (1987) 1131-1138
- [49] D. G. O'Donovan, G. Roberts & M. F. Keogh, *Phytochemistr.* 19 (1980), 2497-2499
- [50] Huneck, Claude, Tabacchi, travaux en cours
- [51] S. Safe & L. M. Safe, *Phytochemistr.* 14 (1975), 1821- 1823
- [52] S. Huneck, *Tetrahedron* 24 (1968), 2707-2755
- [53] H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D. H. Williams, *Structure elucidation of natural products by MS*, Holden Day Inc., San Francisco (1964) vol. II