

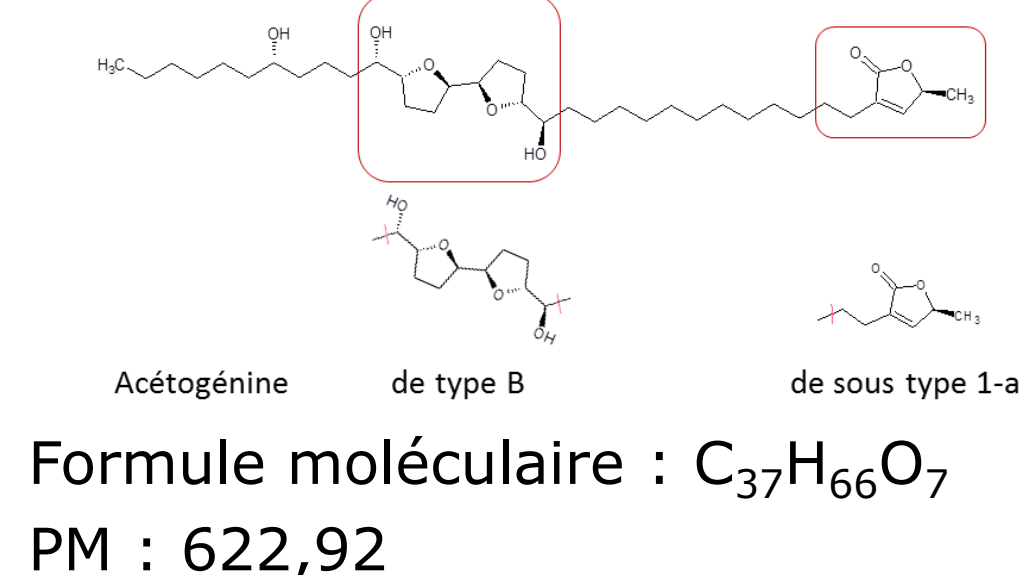
Introduction

Le premier objectif de ce projet consiste à développer une méthode analytique basée sur l'UPLC[®]-MS permettant d'évaluer la teneur en squamocine des feuilles de chérimolier (*Annona cherimolia* Miller.). Cet outil analytique devra permettre la caractérisation complète de cette plante dont les propriétés biologiques sont notamment liées à la présence de cette molécule. Devant la difficulté à se procurer un standard de squamocine, la recherche des molécules présentant la masse de la squamocine a été envisagée. Cette recherche doit permettre d'isoler les molécules d'intérêt en vue d'en constituer des références analytiques.

Matériel et méthode

Molécules d'intérêt

Acétogénines, dont la squamocine



Échantillons et extraction

Échantillon
Tiges et feuilles de Chérimolier (*Annona cherimolia* Miller.)
- ou *Annona cherimola* -, syn. *Annona triplata* Ait.)

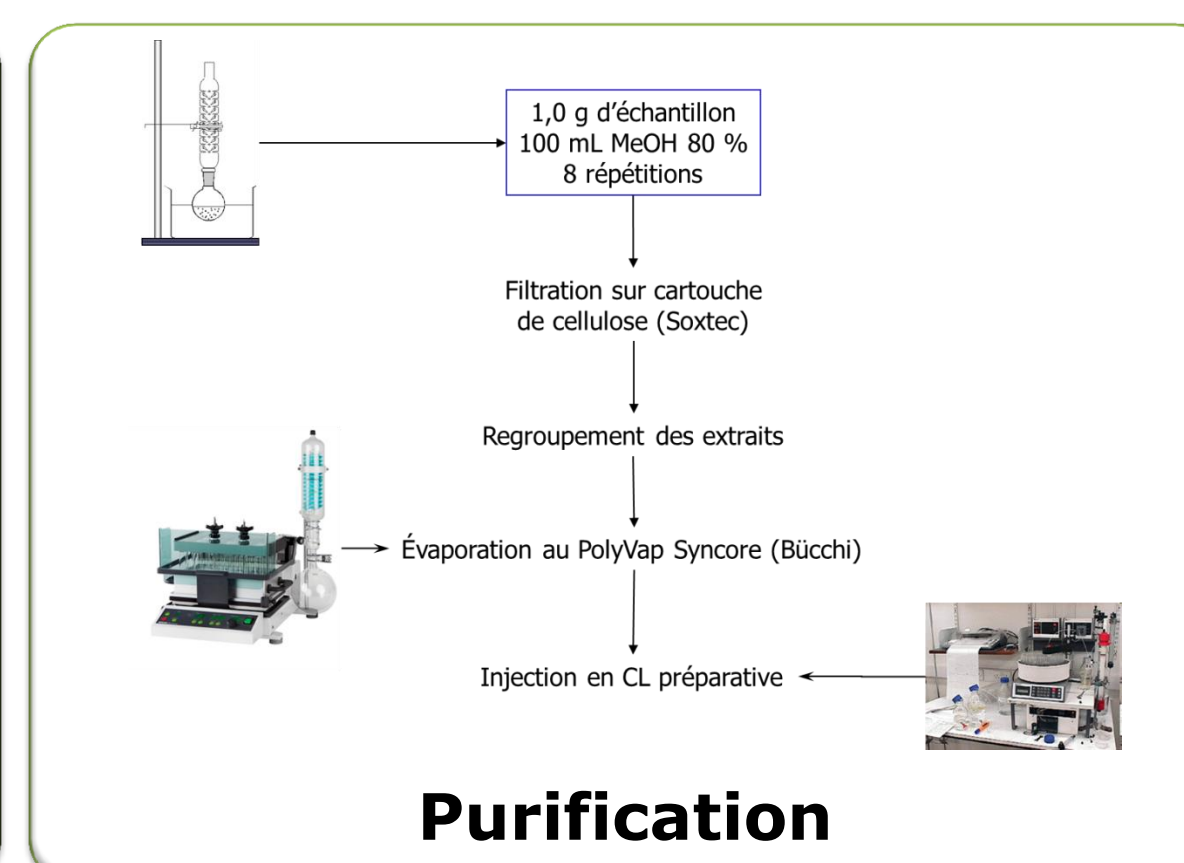
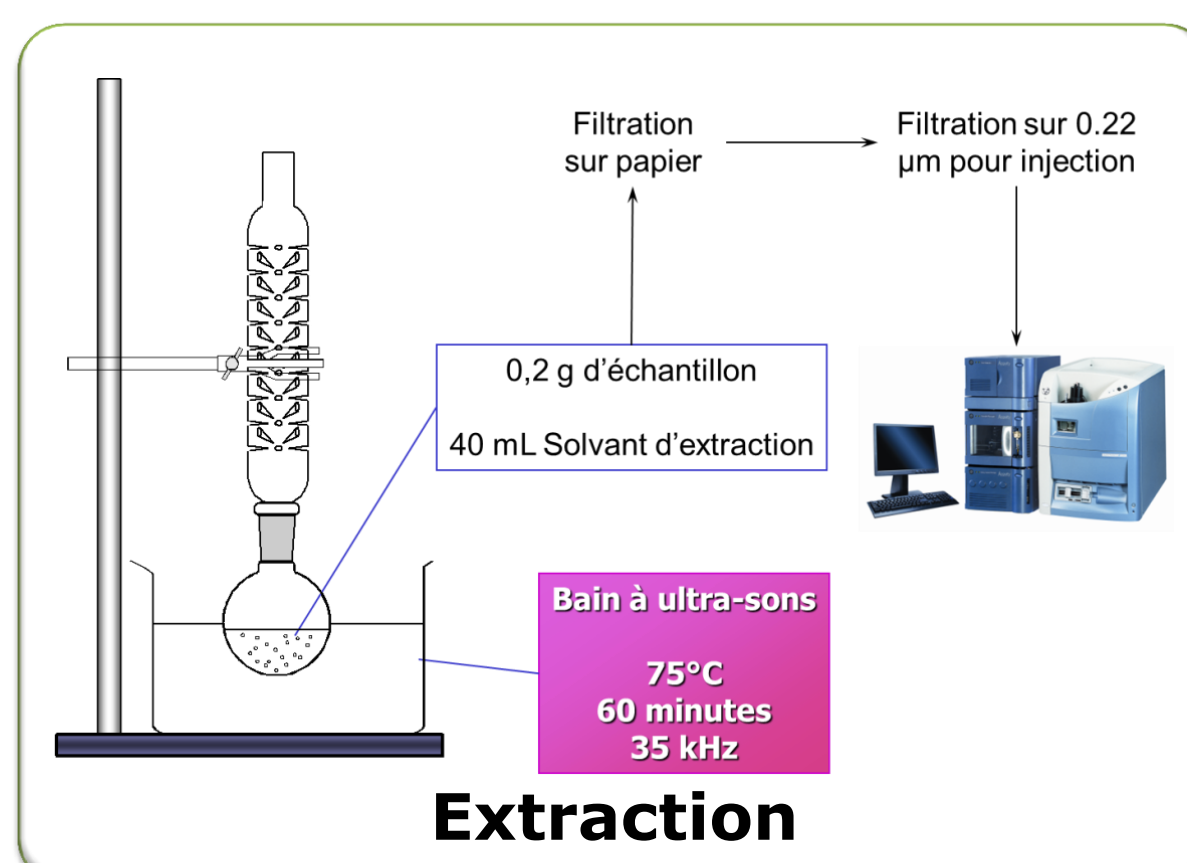
Gélules de *Graviolla* (2 origines)

Gélules de *Paw Paw*

Solvant d'extraction

Essai 1 : Méthanol 80%

Essai 2 : Hexane



Conditions chromatographiques analytiques

Colonne : UPLC[®]HSS T3 1.8 µm – 2.1 * 100 mm (Waters SA)

Injection : 10 µL

Température de la colonne : 45°C

Durée d'analyse : 20 minutes

Solvants d'élution :

A : Eau – Acétonitrile – Acide formique 95-4,5-0,5

B : Acétonitrile – Eau – Acide formique 95-4,5-0,5

Stockage des échantillons : 4°C

Détection : spectrométrie de masse

Scan mass de 500 à 700 uma (ESI +)

Gradient :

Time (min)	Flow (mL·min ⁻¹)	% A	% B	Curve
Initial	0.7	50	50	6
18.50	0.7	1	99	6
19.00	0.7	50	50	6
20.00	0.7	50	50	6

Conditions chromatographiques préparatives

Colonne : Atlantis Prep T3 5 µm ODB – 19 * 250 mm (Waters SA)

Injection : 2 mL

Température de la colonne : 25°C

Durée d'analyse : 100 minutes

Solvants d'élution :

A : Eau / Acétonitrile 95/5

B : Acétonitrile / Eau 95/5

Stockage des échantillons : 4°C

Détection : contrôle des fractions par UPLC-MS

Collecte des fractions : de 40 à 110 minutes (70 fractions de 10 mL)

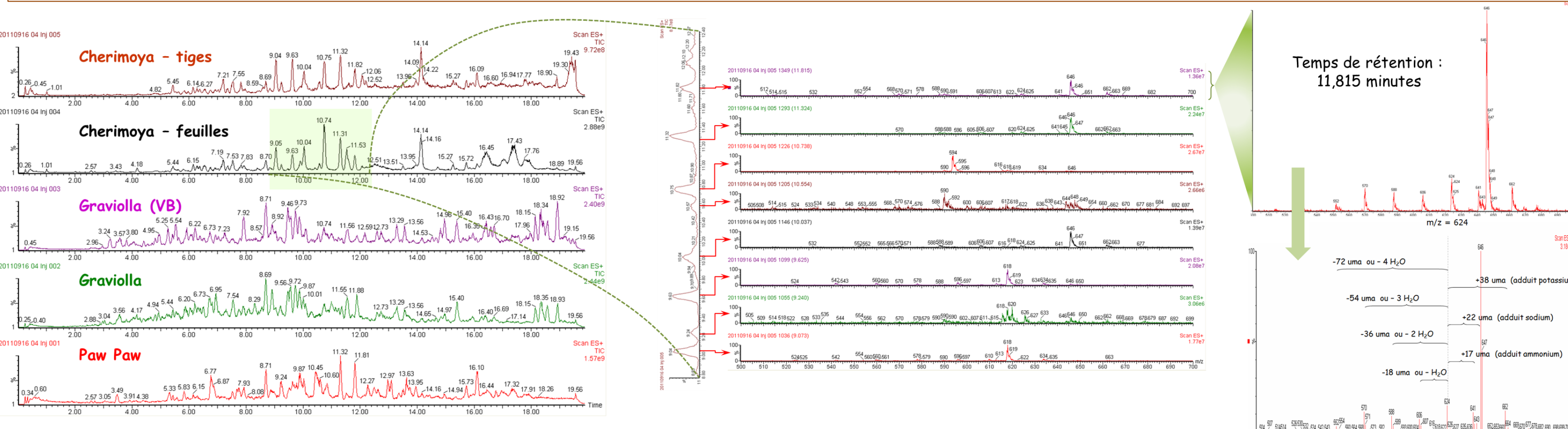
Gradient :

Time (min)	Flow (mL·min ⁻¹)	% A	% B
Initial	10	50	50
5	10	50	50
15	10	25	75
70	10	10	90
100	10	5	95
110	10	0	100
120	10	0	100
121	10	50	50

Résultats

Extraction méthanolique : comparaison des différents échantillons (Scan mass)

Similitude entre les chromatogrammes TIC obtenus pour les deux échantillons de *Graviolla* (nom portugais du corossolier *Annona muricata* L.)



Similitude entre les chromatogrammes TIC obtenus pour *Paw Paw*, nom populaire de l'asiminier [*Asimina triloba* (L.) Dunal] et les deux échantillons de Chérimolier (tiges et feuilles)

Définition et analyse d'un volume spectral [*Intensité = f(temps, m/z)*] pour identifier les molécules présentant le même profil massique

Projection du volume spectral

Mise en évidence dans l'extrait d'un profil massique particulier : présence systématique d'adduits (potassium, sodium, ammonium, de masse 27) et perte de 4 ou 5 molécules d'eau

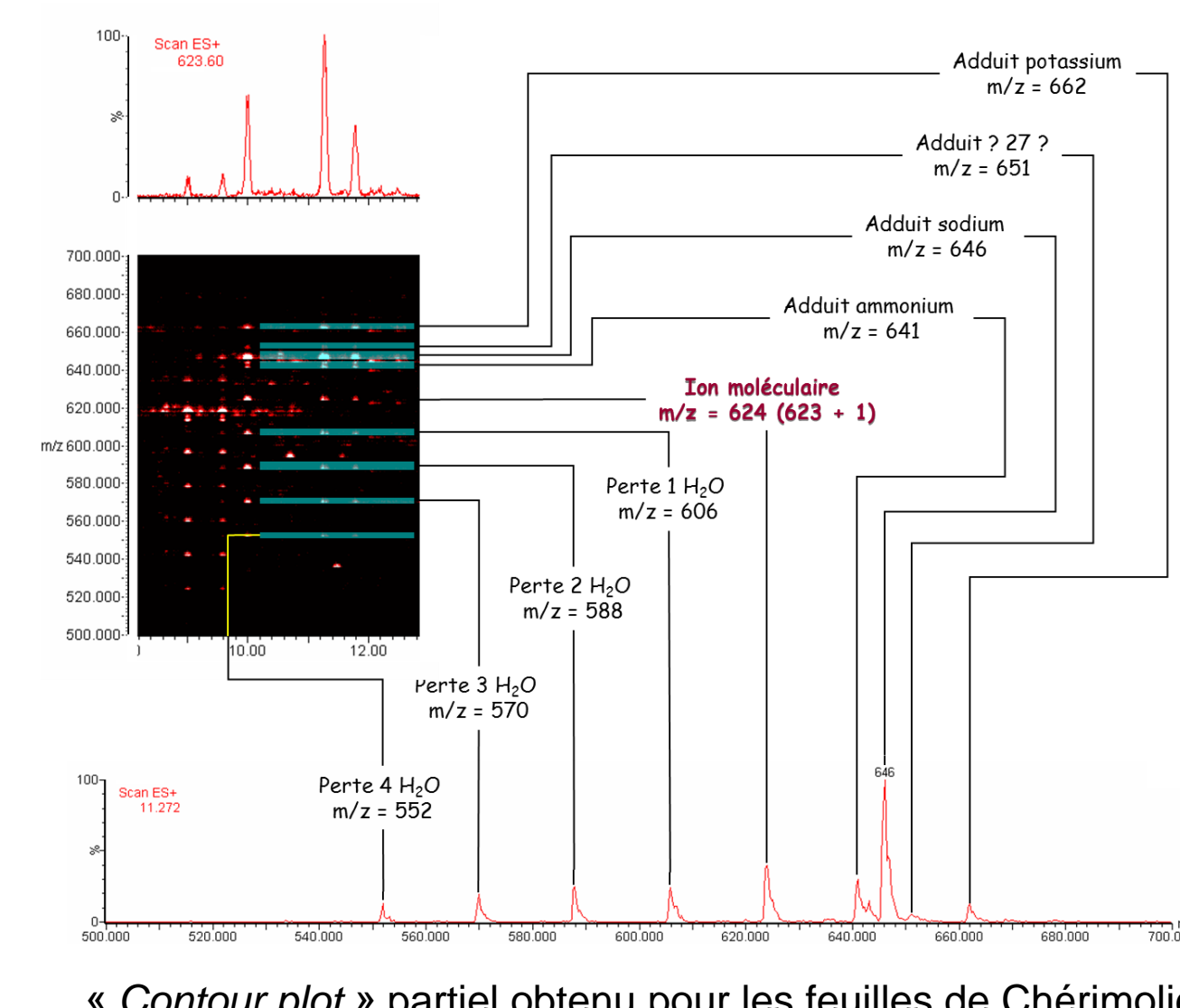
Profil retrouvé pour une vingtaine de molécules présentes dans les extraits

Présence de 7 masses différentes au sein du groupe des molécules d'intérêt : 595 – 597 – 607 – 609 – 621 – 623 et 639 uma

Présence de molécules possédant une insaturation (delta de 2 uma entre deux composés)

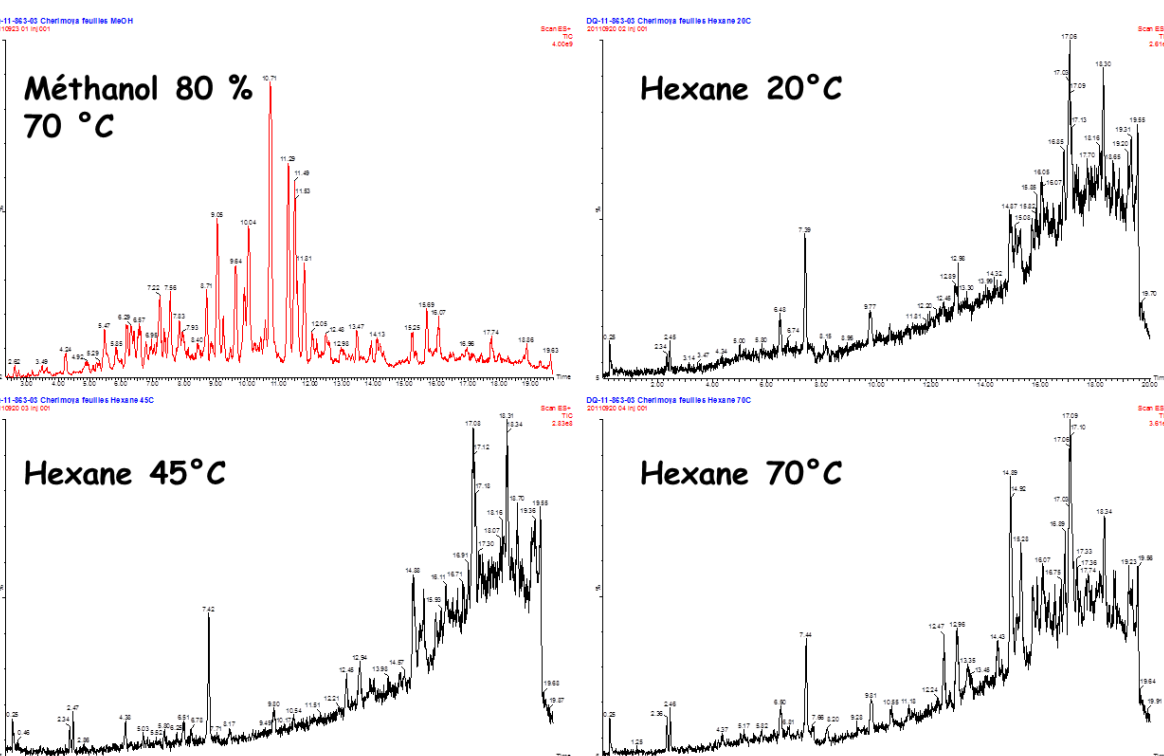
Présence de plusieurs molécules de même masse (à isoler et à identifier)

Nécessité d'expliquer l'adduit de masse 27



Comparaison de deux solvants d'extraction : MeOH 80 % et Hexane

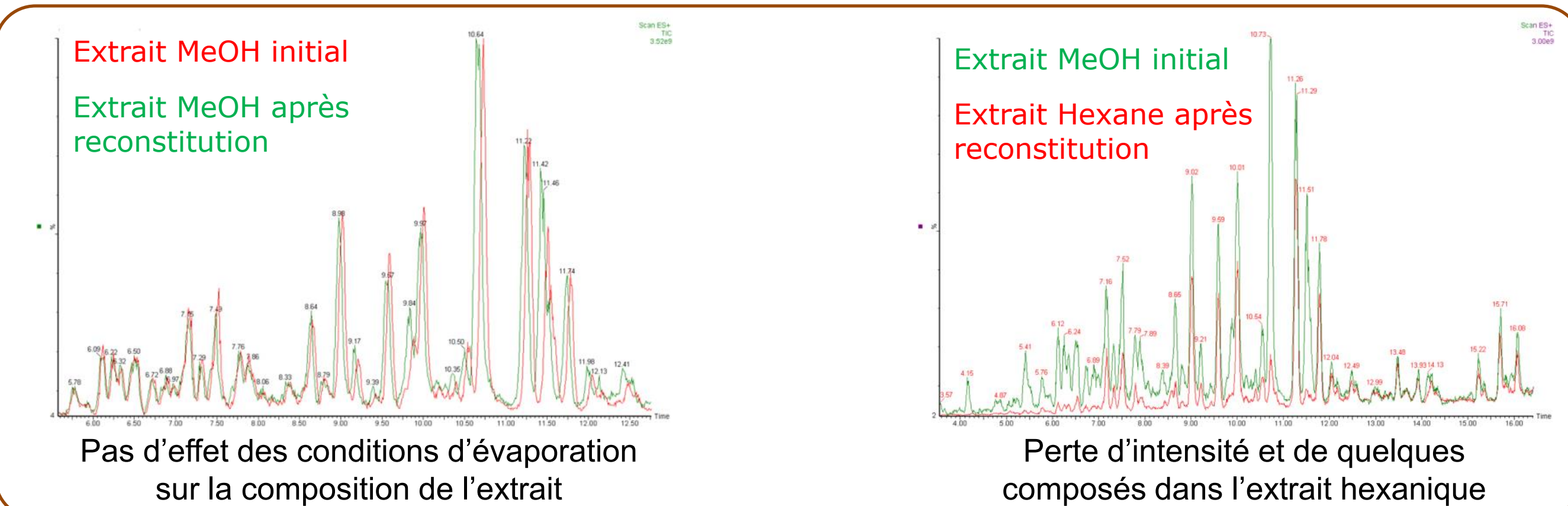
Choix de l'hexane pour se rapprocher des conditions du CO₂ supercritique, envisagé pour l'extraction à grande échelle.



Chromatogrammes TIC « Hexane » très similaires pour les trois températures d'extraction

Chromatogrammes TIC « Hexane » et « MeOH » très différents

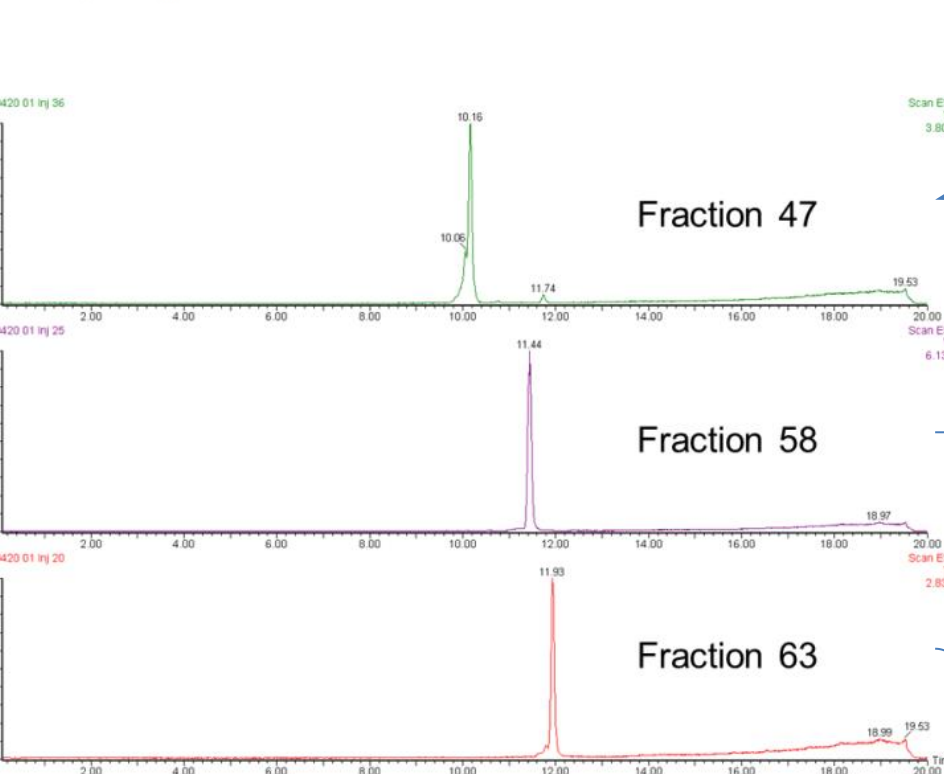
Évaporation du solvant d'extraction et reconstitution dans MeOH 80%



Fractionnement et purification

Passage de la colonne UPLC[®] HSS T3 à la colonne Atlantis Prep T3 ODB : même chimie de colonne

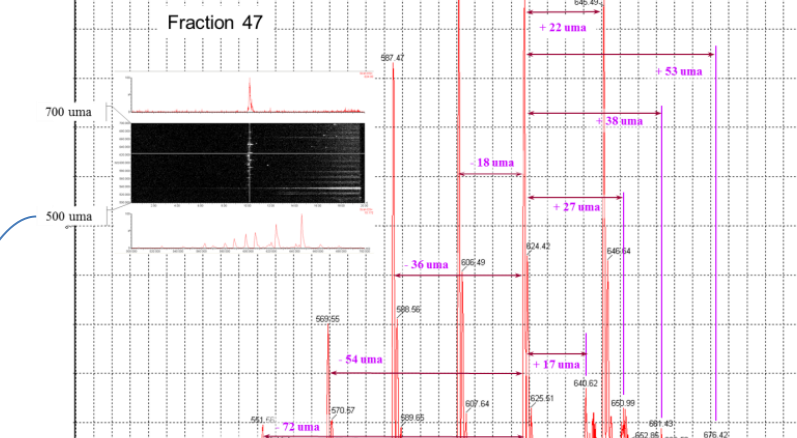
Acquity → Atlantis



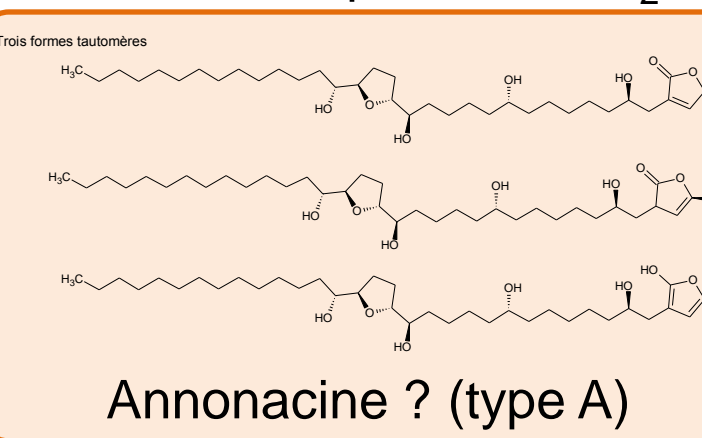
Obtention de 4 fractions de masse 622,9 uma, pures à plus de 95 % (vérification en scan mass - ESI+ et ESI- de 50 à 2.000 uma - et en UV-DAD – 200 à 600 nm -)

Perte de 4 H₂O pour trois composés et de 5 H₂O pour une molécule (fraction 47)

Fraction 47 : perte de 5 H₂O



Fraction 58 et fraction 63 : perte de 4 H₂O



Annonacine ? (type A)

Bullatacine ? (type B)

Squamocine ? (type B)

Conclusions et perspectives

La méthode développée (extraction méthanolique sous ultra-sons et LC-MS) visait, dans un premier temps, la détermination de la teneur en squamocine par UPLC-MS dans des échantillons de diverses origines végétales. Devant la difficulté à se procurer les standards d'acétogénines susceptibles de se trouver dans les extraits, une caractérisation globale de l'extrait a été envisagée. Ainsi, la comparaison des chromatogrammes (TIC) obtenus en spectrométrie de masse (ESI+) a permis de montrer de très fortes similitudes entre les extraits de tiges et de feuilles de chérimolier, de même entre deux échantillons de *Graviolla* d'origines différentes. L'analyse des profils massiques obtenus montrent une vingtaine de composés présentant les mêmes adduits et les mêmes pertes. Ces 20 composés se répartissent entre 7 masses, comprises entre 595 et 639 uma. Un des adduits n'a cependant pas encore été expliqué (masse + 27 uma). Le laboratoire a évalué le potentiel de l'extraction à 100 % d'hexane pour un transfert ultérieur vers l'extraction au CO₂ supercritique, envisagé pour l'extraction à grande échelle. Les résultats obtenus montrent que le passage à une extraction plus verte ne devrait pas diminuer la teneur en acétogénines d'intérêt dans l'extrait. Le transfert vers la LC préparative a permis d'isoler quatre composés de la masse de la squamocine. Ces composés doivent encore faire l'objet d'une identification par RMN et SM.