

Chimia 47 (1993) 221–226
 © Neue Schweizerische Chemische Gesellschaft
 ISSN 0009–4293

Analyse par chromatographie gazeuse de mélanges racémiques au moyen de cyclodextrines peralkylées

Claude Saturnin^{a)}, Raffaele Tabacchi^{a)}* et Andreas Saxer^{b)}

Abstract. Chromatographic performances of chiral capillary columns obtained by dilution in OV 1701 of permethylated and perpropylated β -cyclodextrine or the mixture of the two are compared. Attention has been paid to reproducibility of chromatographic properties after long storage under He.

Introduction

L'importance de la chiralité dans les systèmes biologiques, ajoutée aux exigences légales visant à vérifier les différences d'activités entre les émantiomères, im-

sent la disponibilité de moyens fiables et rapides, à même d'établir la pureté optique.

L'avènement des colonnes chirales à base de cyclodextrines substituées, a marqué un progrès décisif, grâce aux travaux

de Schurig et son groupe [1][2], König et son groupe [3–5], Armstrong et son groupe [6][7] entre autres. De telles analyses sont de ce fait devenues routinières.

Cependant, des problèmes subsistent. Le mécanisme de la résolution reste mal connu [8][9], et un changement de colonne demeure nécessaire pour réaliser certaines séparations. Enfin, se pose la question de la reproductibilité des résultats, en particulier après le stockage plus ou moins prolongé des colonnes. S'agissant de ce dernier point, Bicchi *et al.* [10] font état de variations parfois notables en ce qui concerne le temps de rétention, la température minimum de travail, et la faculté de séparation. Ils constatent l'indépendance de ces phénomènes du pourcentage de cyclodextrine perméthylée présent dans la colonne et de l'épaisseur du film.

*Correspondance: Prof. R. Tabacchi^{a)}

^{a)} Institut de Chimie
 Université de Neuchâtel
 Avenue de Bellevaux 51
 CH–2000 Neuchâtel

^{b)} Institut für organische Chemie der
 Universität Bern
 Freiestrasse 3
 CH–3012 Bern

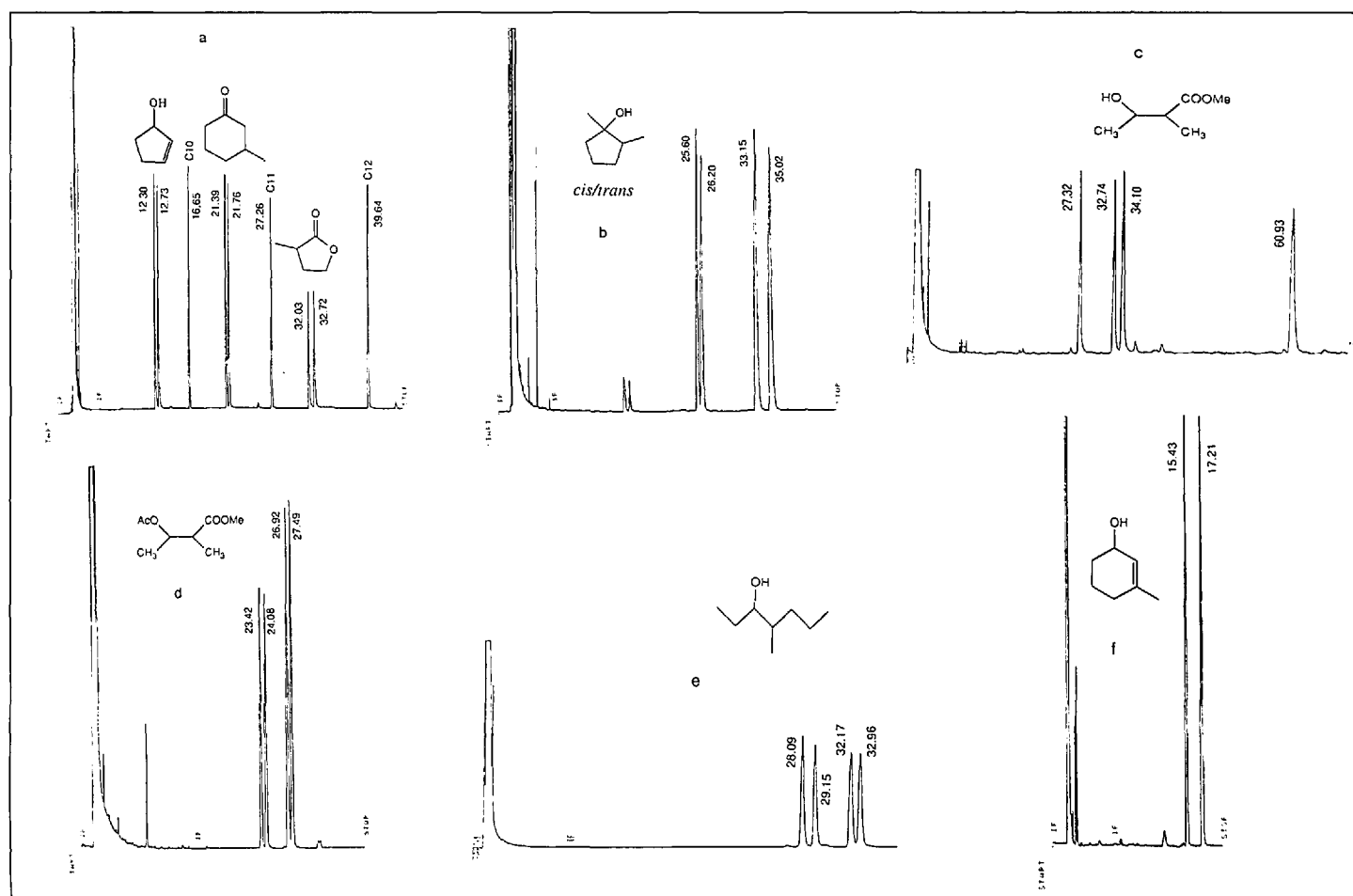


Fig. 1. Gaz vecteur He, colonne B, longueur 25 m, d.i. 0,2 mm, épaisseur de film 0,15 μ m. a, b) 107 KPa, 40 $^{\circ}$; c) 83 KPa, 45 $^{\circ}$; d) 107 KPa, 70 $^{\circ}$; e) 83 KPa, 45 $^{\circ}$; f) 63 KPa, 70 $^{\circ}$. Temps de rétention en min

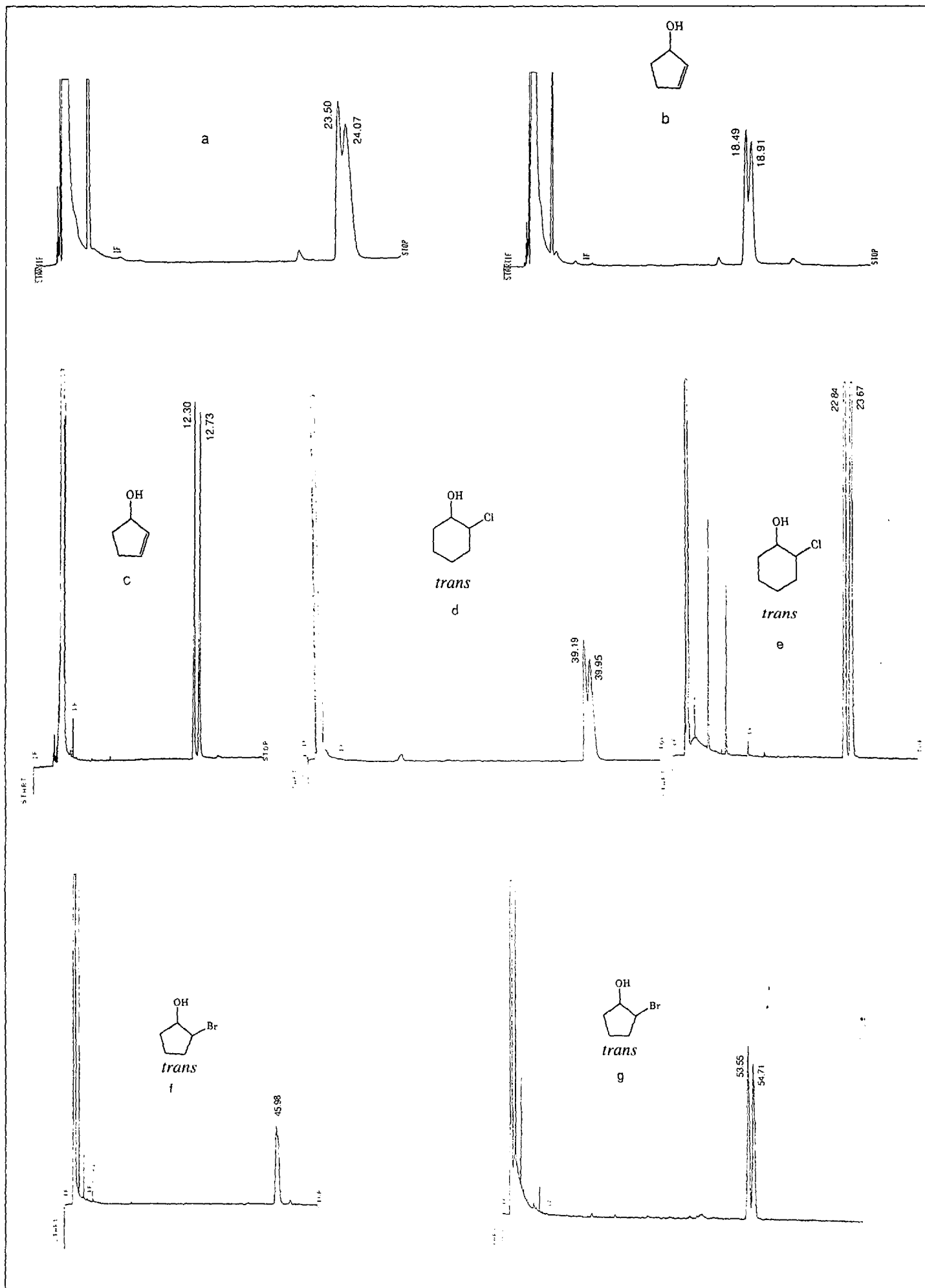


Fig. 2. a) Gaz vecteur He, colonne A, longueur 25 m, d.i. 0,3 mm, épaisseur de film 0,3 mm, 105 KPa, 70°; b) mêmes conditions que a sauf la température 75°; c) gaz vecteur He, colonne B, 105 KPa, 40°; d) gaz vecteur He, colonne A, 62 KPa, 80°; e) gaz vecteur He, colonne B, 60 KPa, 70°; f) gaz vecteur He, colonne A, 62 KPa, 100°; g) gaz vecteur He, colonne B, 60 KPa, 70°

Résultats et discussion

De toutes les β -cyclodextrines (β -CD) peralkylées, la perméthylée (colonne A, v. partie expér.) est de loin la plus utilisée [1][11][12].

Les colonnes réalisées au moyen de cette substance diluée dans OV 1701, en général à raison de 10% par poids, présentent l'inconvénient d'avoir une mauvaise efficacité en dessous de 75°, due à son point de fusion élevé. Pour obvier à ce défaut et aussi obtenir d'autres sélectivités, König et al. [13] proposent l'usage du dérivé perpropylé.

Nous avons pour notre part choisi la perpropylation (colonne B). Les colonnes ainsi obtenues possèdent une bonne sélectivité et efficacité dès 25°, ce qui constitue un avantage pour l'examen des produits très volatils. Ainsi, un grand nombre de mélanges racémiques deviennent analysables à des températures n'excédant par 70° (fig. 1). Ces colonnes se prêtent à l'examen de composés non ou difficilement séparés sur la β -CD perméthylée (colonne A) (fig. 2). Les fig. 2a, 2b comparées à 2c mettent bien en évidence le manque d'efficacité de la colonne A aux basses températures. Un exemple remarquable de la sélectivité de la β -CD perpropylée est celui du 2-(hydroxyméthyl)-5-méthyltetrahydrofurane.

Pour son analyse, Römer et al. [14] utilisent des colonnes de 50 m renfermant l' α - ou la β -CD perméthylée, ou un mélange des deux. Des quatre pics attendus, seuls trois sont obtenus par l'usage de la β -CD perméthylée.

La colonne B permet une meilleure résolution à 45° (fig. 3).

Dans une tentative d'associer les particularités de la β -CD perméthylée d'une part et perpropylée d'autre part, nous avons procédé au mélange de ces deux entités en quantité équimolaire dans un même colonne (colonne C, dite mixte).

Relativement à l'OV 1701, nous introduisons en poids 17,3% de perméthylée et 25,24% de perpropylée. A titre d'illustration, trois exemples de séparation sont présentés (fig. 4).

Dans un but comparatif, différents mélanges racémiques ont été examinés sur les colonnes A, B et C. Les fig. 5-8 représentent quelques-uns des résultats obtenus. La considération de l'ensemble des substances soumises à chromatographie sur ces trois colonnes permet d'établir que les mélanges racémiques résolus sur la colonne A le demeurent sur la mixte. Par contre, parmi les mélanges séparés sur B mais pas sur A seuls ceux qui l'étaient avec un grand facteur de séparation le restent.

Le tableau fournit l'explication de ce

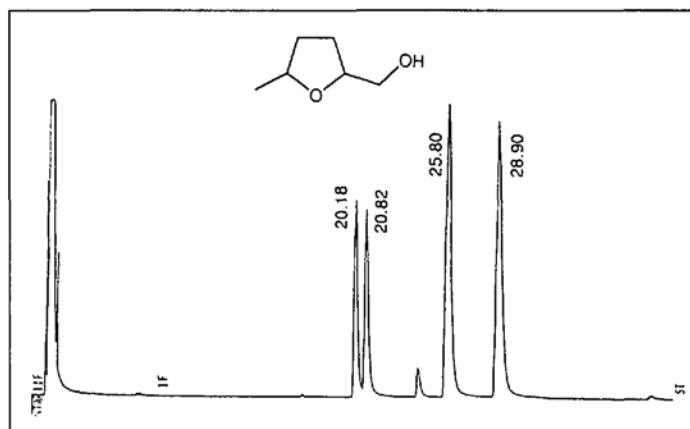


Fig. 3. Gaz vecteur He, colonne B, 83 KPa, 45°

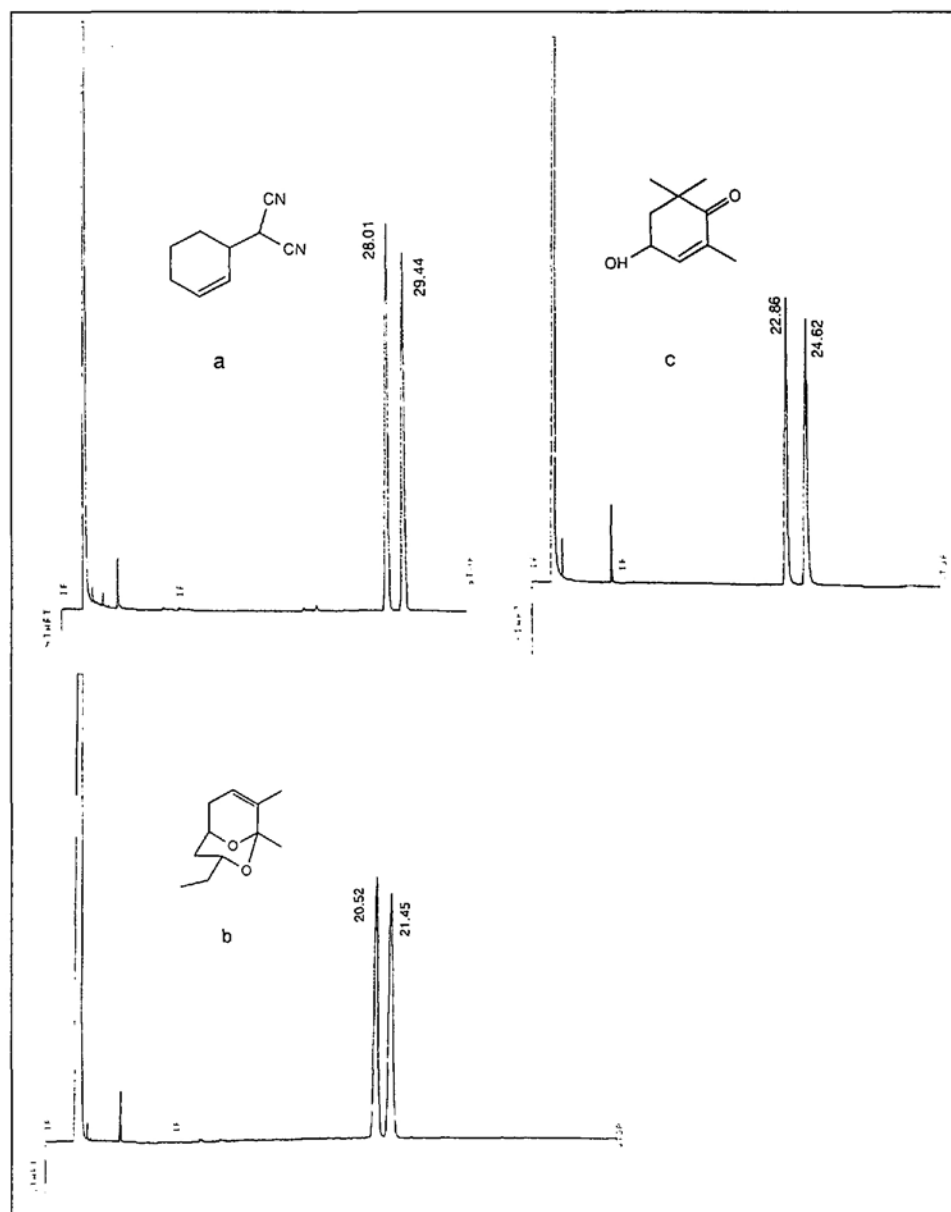


Fig. 4. Gaz vecteur He, colonne C, longueur 25 m, d.i. 0,2 mm, épaisseur de film 0,15 μ m; a, c) 104 KPa, 130°; b) 105 KPa, 100°

Tableau

	Colonne A	Colonne B	Colonne C
% en poids de β -CD perméthylée	10	-	17,3
% en poids de β -CD Perpropylée	-	42,86	25,24
molalité:			
β -CD perméthylée	0,070	-	0,125
β -CD perpropylée	-	0,212	0,088

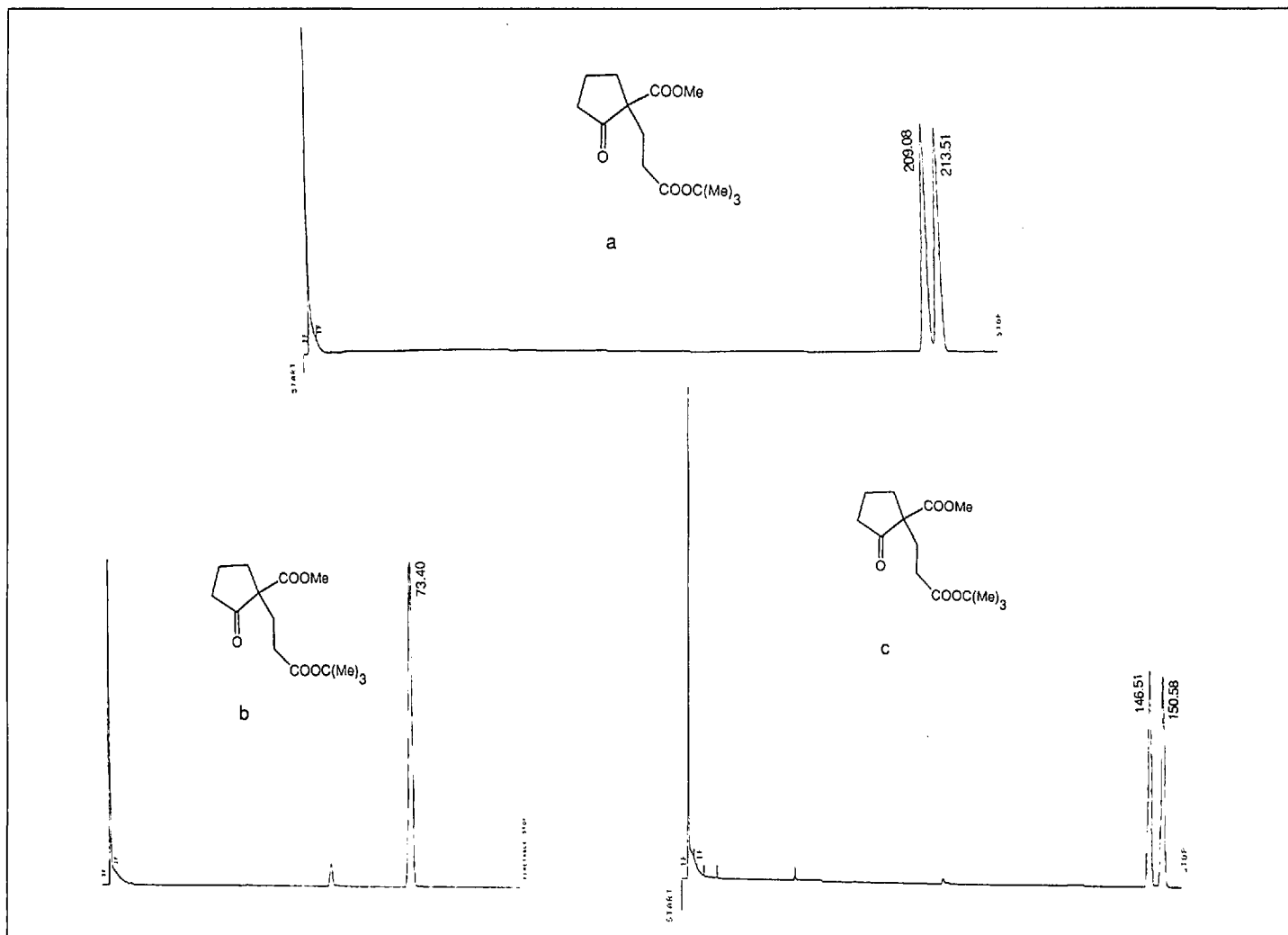


Fig. 5. Gaz vecteur He; a) colonne A, 65 KPa, 130°C; b) colonne B, 107 KPa, 130°C; c) colonne C, 104 KPa, 130°C

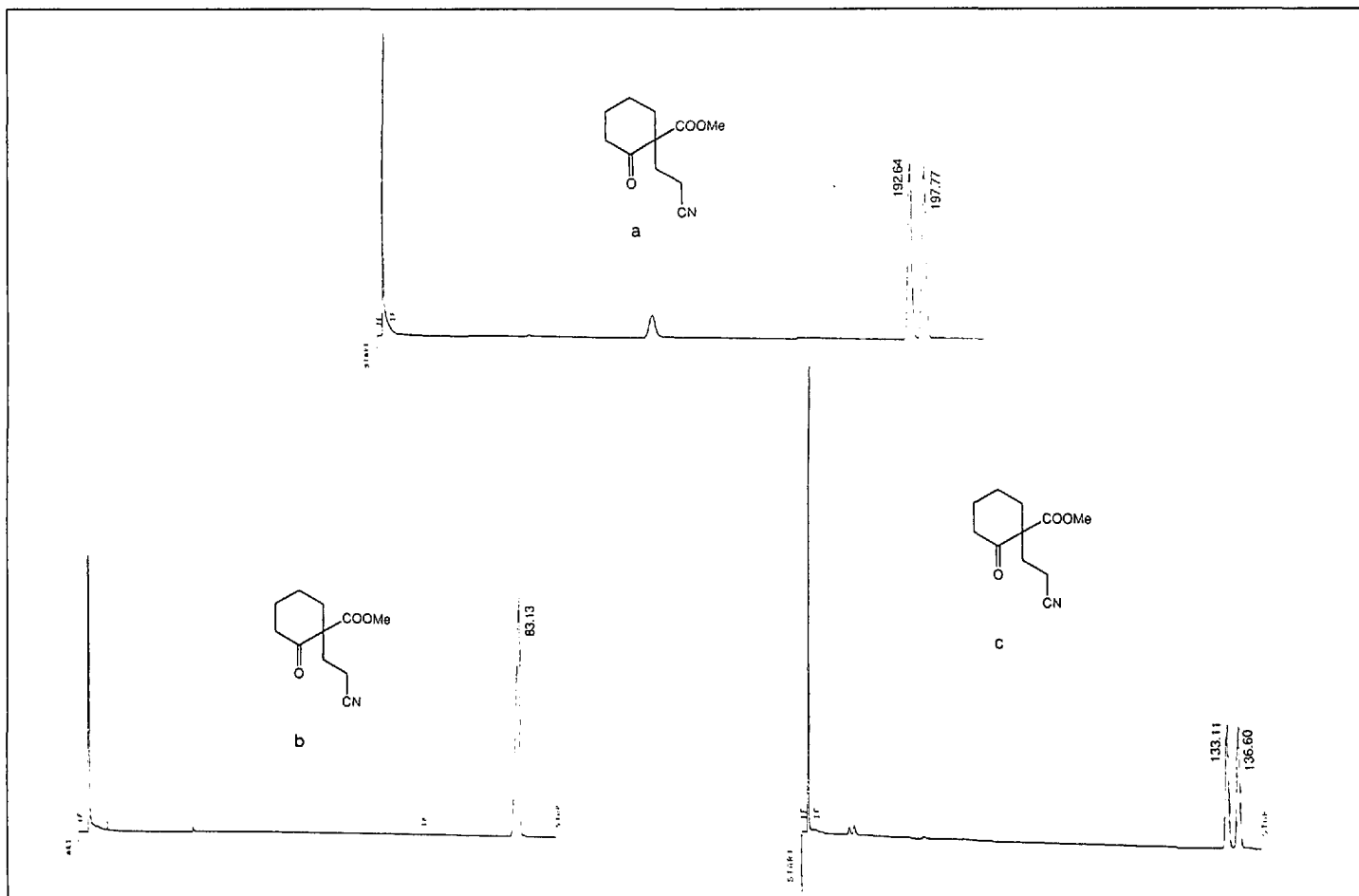


Fig. 6. Gaz vecteur He; a) colonne A, 65 KPa, 130°C; b) colonne B, KPa, 130°C; c) colonne C, 104 KPa, 130°C

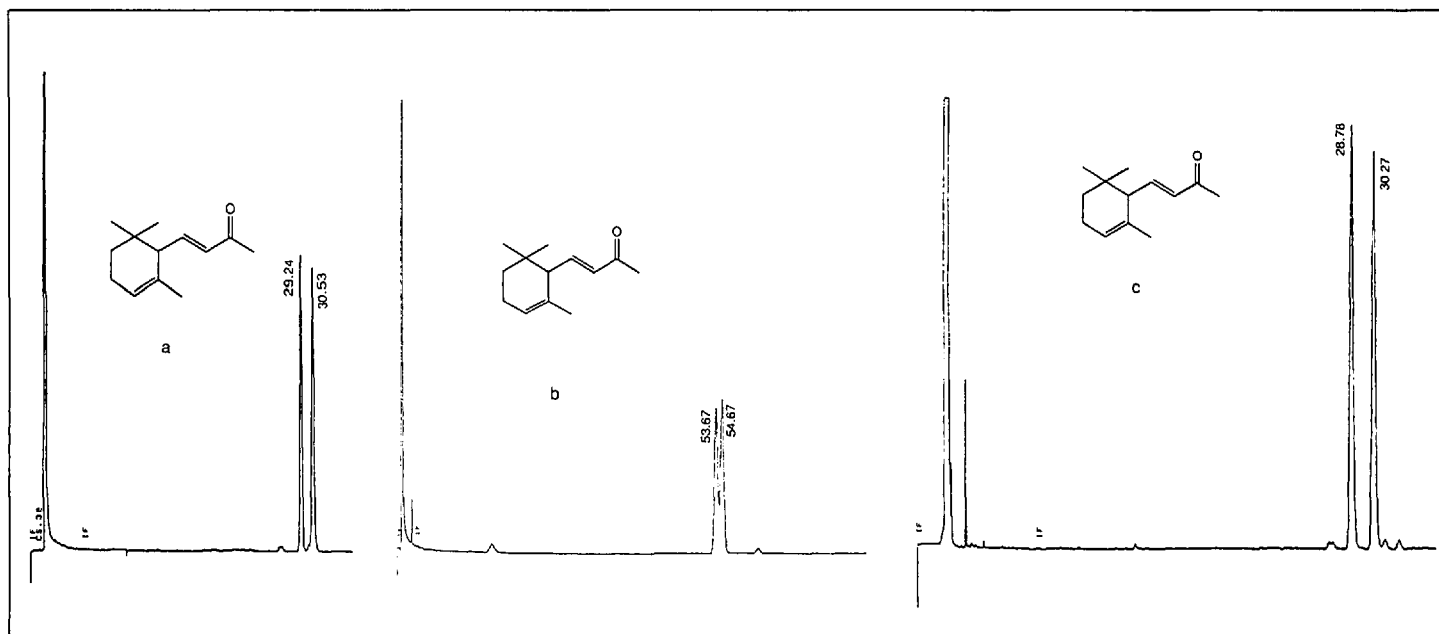


Fig. 7. Gaz vecteur He; a) colonne A, 66 KPa, 130°; b) colonne B, 45 KPa, 70°; c) colonne C, 105 KPa, 120°

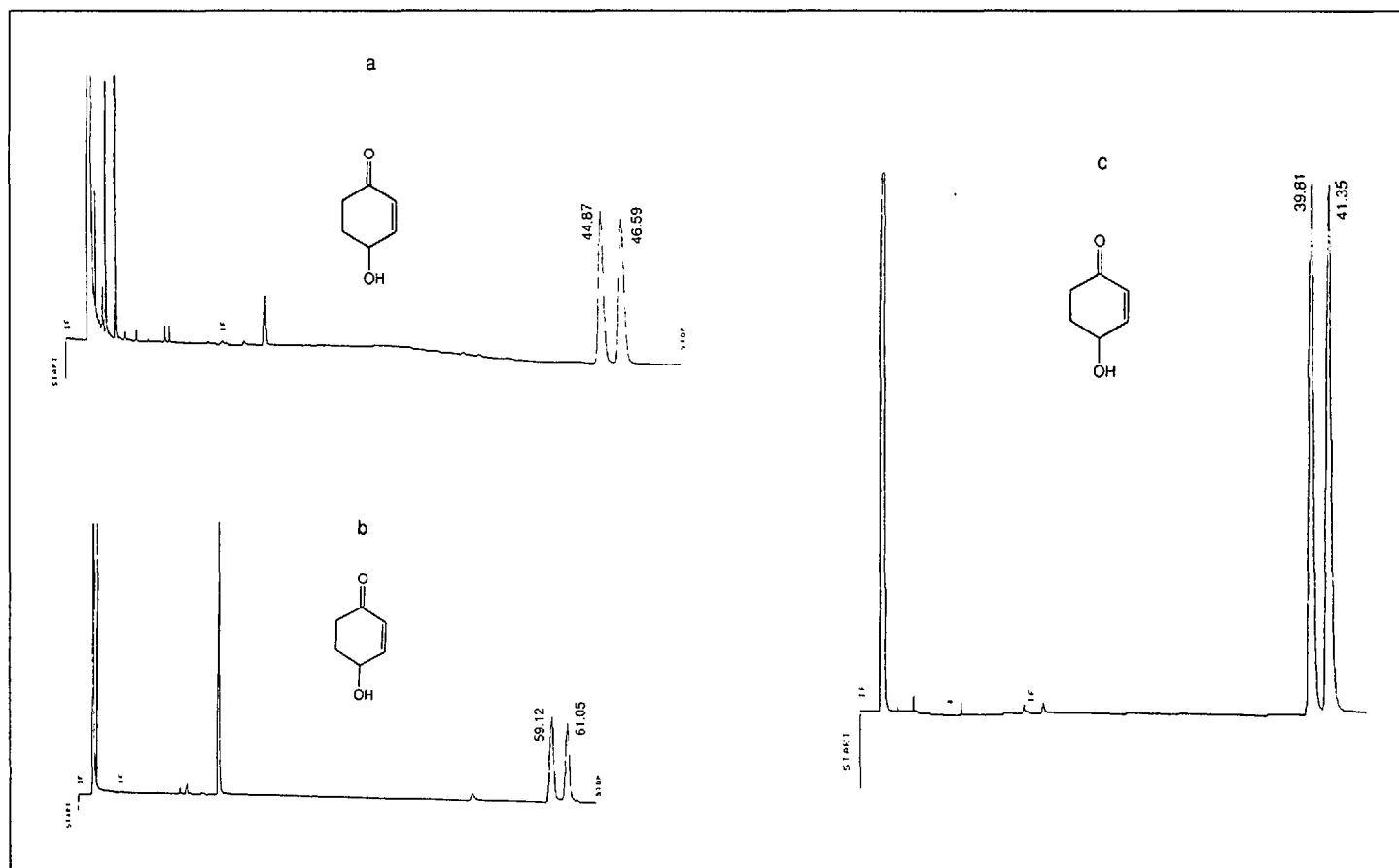


Fig. 8. Gaz vecteur He; a) colonne A, 65 KPa, 120°; b) colonne B, 107 KPa, 90°; c) colonne C, 104 KPa, 115

comportement. La molalité de la β -CD perméthylée dans la colonne C est 1,78 fois celle dans A, d'où le maintien du pouvoir séparateur. A l'inverse la concentration de la β -CD perpropylée est 2,4 fois inférieure dans la colonne C comparée à la B.

Il en résulte une moindre aptitude à séparer les mélanges présentant un faible α sur la colonne B.

En conclusion, un ajustement judicieux de la proportion des cyclodextrines utili-

sées, devrait permettre de conjuguer les performances des colonnes A et B en une seule. Les colonnes à base de β -CD perpropylée, mixte ou non, montrent une bonne reproductibilité des performances chromatographiques: temps de rétention, résolution, température minimale admissible. Ces performances se révèlent non affectées après usage prolongé ou stockage répété pendant un, deux mois, sous atmosphère d'hélium.

Compte tenu des fluctuations signa-

lées par *Bicchi et al.* [10], on peut attribuer ce comportement à une meilleure solubilité et stabilité de la β -CD perméthylée dans le mélange OV 1701, β -CD perpropylée.

Conclusion

L'usage du dérivé perpropylé élargit la possibilité d'analyser des mélanges racémiques volatiles. Son association au perméthylé en proportion convenable ouvre

d'intéressantes perspectives. D'autres combinaisons de cyclodextrines substituées peuvent être envisagées. De telles investigations sont poursuivies dans nos laboratoires.

Partie expérimentale

Généralités. La β -CD et les solvants utilisés dans les synthèses ont été séchés préalablement, et les purifications chromatographiques réalisées sur gel de silice 60 Merck (0,06–0,2 mm). Les spectres RMN ont été enregistrés dans CDCl_3 sur Brucker AMX 400, en utilisant le TMS comme référence interne.

Préparation des colonnes. Les colonnes en verre Pyrex, longueur 25 m, d.i. 0,2 mm et 0,3 mm sont préparées (traitement acide, rinçage, désactivation au moyen d'un mélange HMDS/DPTMDS 1/1) selon le protocole établi par Grob *et al.* [12]. Le dépôt de la phase stationnaire est fait par la méthode statique, à partir d'une soln. de β -CD peralkylée et d'OV 1701 [1] dans CH_2Cl_2 en concentration appropriée. Trois colonnes sont conçues:

colonne A	10% β -CD perméthylée dans OV 1701, df 0,3 μm , d.i. 0,3 mm
colonne B	42% β -CD perpropylée dans OV 1701, df 0,15 μm , d.i. 0,2 mm
colonne C	25% β -CD perpropylée, 17,3% β -CD perméthylée dans OV 1701, df 0,15 μm , d.i. 0,2 mm

Les analyses sont réalisées au moyen d'un chromatographe HP 5890, équipé d'un détecteur FID avec pour gaz vecteur He. Chaque colonne est conditionnée en utilisant la programmation de

température suivante : 50–230°, 1°/min. La temp. max. est maintenue pendant 10 h.

Synthèse de la β -CD perméthylée et perpropylée. Ces synthèses sont faites selon la méthode décrite par Szejtli *et al.* [15], en utilisant le iodure de méthyle et le bromure de propyle respectivement.

La β -CD perméthylée, est purifiée par recristallisation dans CHCl_3 /ligroïne, puis cyclohexane (85%) (p.f. 151–153°). $^1\text{H-NMR}$: 5,13 (d, $J(1,2) = 3,5$, 7 H–C(1)); 3,65 (s, 7 $\text{CH}_3\text{O-C}(2)$); 3,51 (s, 7 $\text{CH}_3\text{O-C}(3)$); 3,39 (s, 7 $\text{CH}_3\text{O-C}(6)$). $^{13}\text{C-NMR}$: 99,55 (C(1)); 82,65 (C(2)); 82,36 (C(3)); 80,90 (C(4)); 72,00 (C(5)); 71,52 (C(6)); 62,03 ($\text{CH}_3\text{O-C}(3)$); 59,54 ($\text{CH}_3\text{O-C}(6)$); 59,09 ($\text{CH}_3\text{O-C}(2)$).

La purification de la β -CD perpropylée est réalisée au moyen de gel de silice Merck 60 (0,06–0,2 mm), avec pour éluant le mélange acétone/ligroïne 1/5 (v/v), et la caractérisation par NMR: ^1H , ^{13}C , DEPT 135, DEPT 90, COSY H,H. Il s'agit d'une huile très visqueuse: 80%. $^1\text{H-NMR}$: 5,21 (d, $J(1,2) = 3,4$, 7 H–C(1)); 4,0–3,36 (m, 7 H–C(3), 7 H–(4), 7 H–C(5), 7 $\text{CH}_2(6)$, 21 $\text{CH}_2(1')$); 3,23 (dd, $J(2,3) = 9,7$, $J(1,2) = 3,4$, 7 H–C(2)); 1,7–1,52 (m, 2 $\text{CH}_2(2')$); 0,95–0,82 (3t, $J = 7,4$ chacun, 21 $\text{CH}_3(3')$). $^{13}\text{C-NMR}$: 98,60

(C(1)); 81,06 (C(2)); 80,87 (C(3)); 78,83 (C(4)); 76,1 (C(5)); 73,70, 73,64, 71,95, 70,11 ((C(1'))), (C(6)); 24,07, 23,99, 23,51 (C(2')); 11,26, 11,10, 10,97 (C(3')).

Nous remercions le Dr. M. Pfau et le Prof. R. Scheffold pour la mise à disposition d'échantillons.

Reçu le 6 avril 1993

- [1] V. Schurig, H.P. Nowotny, *J. Chromatogr.* **1988**, *441*, 155.
- [2] V. Schurig, D. Schmalzing, U. Mühleck, M. Jung, M. Schleimer, P. Mussche, C. Duvekot, J.C. Buyten *HRC* **1990**, *13*, 713.
- [3] W.A. König, S. Lutz, G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 979.
- [4] W.A. König, R. Krebber, R. Evers, G. Brühn, *HRC* **1990**, *13*, 328.
- [5] W.A. König, R. Krebber, G. Wenz, *HRC* **1989**, *12*, 41.
- [6] D.W. Armstrong, W. Li, S. Pitha, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 217.
- [7] D.W. Armstrong, W. Li, C.D. Chang, J. Pitha, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 914.
- [8] M. Jung, D. Schalzing, V. Schurig, *J. Chromatogr.* **1991**, *14*, 94.
- [9] A. Berthod, W. Li, D. Armstrong, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 87.
- [10] C. Bicchi, G. Artuffo, A. D'Amato, A. Galli, M. Galli, *HRC* **1992**, *15*, 655.
- [11] W. Keim, A. Köhnes, W. Meltzow, *HRC* **1991**, *14*, 507.
- [12] C. Bicchi, G. Artuffo, A. D'Amato, G.M. Nano, A. Galli, M. Galli, *HRC* **1991**, *14*, 301.
- [13] W.A. König, S. Lutz, G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 979.
- [14] H. Römer, W. Meltzow, A. Köhnes, *GIT Spezial Chromatographie* **1991**, *1*, 33.
- [15] J. Szejtli, A. Lipták, I. Jodál, P. Fügedi, P. Náhási, A. Neszemelyi, *Starch/Stärke* **1980**, *32*, 165.
- [16] K. Grob, G. Grob, W. Blum, W. Walther, *J. Chromatogr.* **1982**, *244*, 197.

Chimia 47 (1993) 226–229
© Neue Schweizerische Chemische Gesellschaft
ISSN 0009–4293

Introduction

Fungal contamination of *Ceratocystis ulmi*, responsible for the Dutch elm disease, with *Penicillium brevi-compactum* was observed to inhibit the growth of *Ceratocystis ulmi* [1]. We have recently observed fungal contamination of two strains of *Ceratocystis fimbriata platani* which is responsible for the plane tree cancer disease. The fungal contaminant was later identified as *Penicillium chrysogenum* THOM. Although it is not yet known whether *P. chrysogenum* THOM did inhibit the growth of *C. fimbriata*, its propagation was far more rapid and, therefore, had

Nitrogen-Containing Aromatic Compound from the Culture Medium of *Penicillium chrysogenum* THOM

Meilleko C. Dai, Raffaele Tabacchi* and Claude Saturnin

Abstract. Investigation of the culture medium of *Penicillium chrysogenum* THOM (contaminant of two strains of *Ceratocystis fimbriata*) led to the isolation of the sesquiterpene PR toxin (1) and 2-[(2-hydroxypropionyl)amino]benzamide (2) which have never been isolated as a natural product.

*Correspondence: Prof. R. Tabacchi
Institut de Chimie
Université de Neuchâtel
Avenue de Bellevaux 51
CH–2000 Neuchâtel