

IDENTIFICATION ET DOSAGE DES CONSTITUANTS AMERS DES RACINES DE *GENTIANA LUTEA* L.

J. BRICOUT

Institut de Recherches Appliquées aux Boissons Zone Industrielle des Bouvets-120, avenue Foch-94000-Creteil,
France

(Received 1 March 1974)

Key Word Index—*Gentiana lutea*, Gentianaceae, secoiridoid glucosides

Abstract—The bitter constituents of *Gentiana lutea* L. roots were isolated and identified by mass spectrometry. Gentiopicroside, swertiamarin, amarogentin were characterized and their abundance evaluated. Amarogentin was shown to be the main bitter constituent of the roots. By cultivation of *Gentiana lutea*, roots with a high content in amarogentin can be obtained in 2 yr.

Résumé—Les substances amères des racines de *Gentiana lutea* L. ont été isolées et identifiées en particulier par le spectre de masse de leurs dérivés acétylés. La présence de gentiopicroside, swertiamarine et amarogentine (ester de l'acide 3,5,3' trihydroxy-biphényl carboxylique avec le sweroside) a été mise en évidence, et une technique de dosage de ces substances a été mise au point. L'amarogentine présente une saveur amère très intense et à ce titre est la principale substance responsable de l'amertume des racines. Par mise en culture de *Gentiana lutea* L., on obtient après deux ans, des racines particulièrement riches en amarogentine.

INTRODUCTION

LA RACINE de *Gentiana lutea* possède une saveur extrêmement amère ce qui a entraîné son utilisation pour la préparation de diverses boissons. Dès 1862, Kromayer¹ a isolé un constituant amer dénommé gentiopicrosine, que Tanret² a caractérisé comme étant un glucoside facilement hydrolysable par l'émulsine. La structure de cette substance dénommée maintenant gentiopicroside a été fort longue à établir. En 1961 Canonica *et al.*³ lui ont attribué la formule 1. Cependant deux équipes indépendantes^{4,5} ont montré que la formule de Canonica n'était pas exacte et ont proposé la formule 2a qui rend mieux compte des propriétés spectrales de cette substance. Celle-ci fait partie du groupe des "seco-iridoïdes". Il s'agit de β -glucosides dont l'aglycone facilement oxydable est de nature monoterpénique, et est biosynthétisé à partir de la mévalonolactone.⁶ Cependant le gentiopicroside ne suffit pas à lui seul à rendre compte de l'amertume de la racine de gentiane: Bridel⁷ a montré que la racine de gentiane restait amère même après un assez long stockage pendant lequel la β -glucosidase de la racine avait pu hydrolyser tout le gentiopicroside. Aussi a-t-on suspecté la présence d'un deuxième constituant amer et dès 1955 Korte⁸ a isolé de *Gentiana lutea* une substance très amère qu'il a nommée amarogentine mais dont il n'a pu préciser

¹ KROMAYER, A. (1862) *Arch. Pharm.* **160**, 27.

² TANRET, G. (1905) Thèse doctorat Médecine, Paris.

³ CANONICA, L., PELIZONI, F., MANITO, P. et JOMMI, G. (1961) *Tetrahedron* **16**, 192.

⁴ INOUE, H., YOSHIDA, T., NAKAMURA, Y. et TOBITA, S. (1968) *Tetrahedron Letters* **4429**.

⁵ COSCIA, C., GUARNACCIA, R. et BOTTA, L. (1969) *Biochemistry* **8**, 5036.

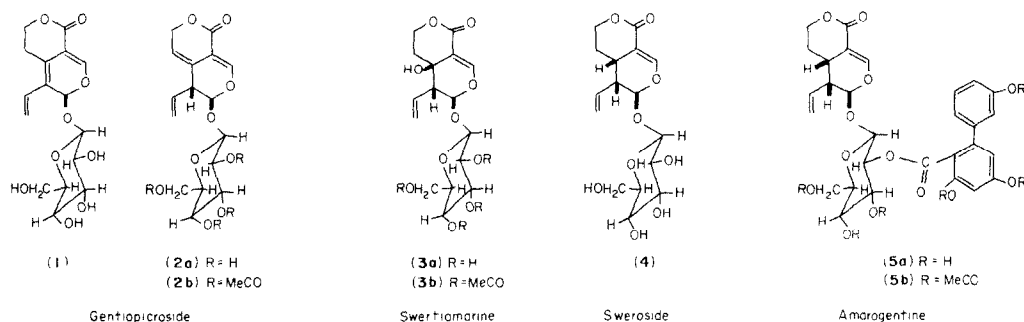
⁶ INOUE, H., UEDA, S. et NAKAMURA, Y. (1967) *Tetrahedron Letters* **33**, 3221.

⁷ BRIDEL, M. (1911) Thèse pharmacie, Paris.

⁸ KORTE, F. (1955) *Chem. Ber.* **88**, 704.

la structure. Cette structure a été établie à la suite des travaux entrepris par Inouye *et al*^{9,10} sur une plante de la famille des gentianacées poussant au Japon *Swertia japonica* Mak. Ces chercheurs ont mis en évidence dans cette espèce la gentiopicroside **2a**, la swertiamarine **3a**, le sweroside **4**, et 2 esters de l'acide 3,5,3'-trihydroxybiphényl-2 carboxylique, soit avec la swertiamarine (amaroswerine), soit avec le sweroside, et ils ont indiqué que ce dernier ester devait être identique à l'amarogentine isolé de la gentiane par Korte.

A la suite de ces résultats, nous avons estimé qu'une nouvelle étude des constituants amers des racines de *Gentiana lutea* devait être entreprise afin de déterminer leur nature et leur importance respective.



Il nous a paru en effet nécessaire de vérifier si l'amarogentine isolée des racines de *Gentiana lutea* d'origine européenne était bien l'ester de l'acide 3,5,3'-trihydroxybiphényl-2-carboxylique avec le sweroside et de rechercher la présence éventuelle d'autres glucosides seco-iridoïdes. Une technique de dosage de ces constituants s'avérait également indispensable, car nous désirions suivre l'évolution de ces substances amères dans des plantes cultivées expérimentalement.

RESULTATS ET DISCUSSION

Isolément et identification des constituants amers

Gentiopicroside et swertiamarine. Par chromatographie sur colonne d'alumine de l'extrait butanolique, nous avons obtenu une substance qui, en chromatographie sur couche mince migre au même niveau qu'un échantillon authentique de gentiopicroside. Cependant après acétylation on observe la présence de deux substances que nous avons purifiées par chromatographie sur colonne d'acide silicique.

La substance éluee en premier lieu est la plus abondante. Son spectre dans l'UV présente 2 maximums à 250 et 270 nm, son spectre IR est caractérisé par des bandes d'absorption à 3060, 1750, 1720, 1680, 1610, 1015 et 940 cm^{-1} . Sur le spectre de masse on décèle la présence d'un pic moléculaire peu intense à $m/e = 524$ ($\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$). De nombreux pics proviennent de l'ion fragment tétraacétylglucoxonium ($m/e = 331, 289, 271, 229, 211, 187, 169, 109$) et le pic caractéristique de l'aglycone apparaît à $m/e = 177$ ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3$). L'ensemble de ces données montre que cette substance est le tétraacétylgentiopicroside.

La substance éluee en second lieu est beaucoup moins abondante. Elle présente un seul maximum d'absorption de la lumière UV à 232 nm. Son spectre IR présente des bandes d'absorption à 3540, 3070, 1750, 1710, 1620, 1005, 905 cm^{-1} . Sur le spectre de masse on

⁹ INOUE, H., UEDA, S. et NAKAMURA, Y. (1970), *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 1856.

¹⁰ INOUE, H. et NAKAMURA, Y. (1971), *Tetrahedron* **27**, 1951.

observe un pic moléculaire peu intense à $m/e = 542$ et les pics importants provenant de l'ion fragment tétraacétylglucoxonium. L'aglycone est caractérisé par les ions à $m/e = 195$ et $m/e = 177$. Ces données spectroscopiques indiquent que cette substance devrait être la tétraacétylswertiamarine et nous avons vérifié que le produit isolé des racines de *Gentiana lutea* présentait le même spectre de masse et le même comportement en chromatographie sur couche mince qu'un échantillon authentique de tétraacétylswertiamarine.

Amarogentine. L'extrait à l'acétate d'éthyle a été chromatographié sur colonne d'acide silicique et nous avons ainsi obtenu, outre du gentiopicroside, une substance très fortement amère qui présente 3 maximums d'absorption de la lumière UV vers 230, 260 et 305 nm. Nous en avons préparé le dérivé acétylé dont le spectre IR présente des bandes d'absorption à 3070, 990, 900 cm^{-1} (radical vinyl) et à 1750, 1710, 1620, 1605, 1580 cm^{-1} . Sur le spectre de masse de ce dérivé on décèle un pic moléculaire peu intense à $m/e = 838$ auquel on peut attribuer la formule brute $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{O}_{19}$. On observe à $m/e = 643$ un ion provenant de l'élimination d'un radical $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4$ et parallèlement on constate la présence d'un ion à $m/e = 179$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3$). Ces deux ions montrent que cette molécule contient une unité monoterpénique caractérisée comme l'aglycone du sweroside **4**. La présence des ions à $m/e = 355$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{O}_7$) 313, 271 et 229 caractérise le groupement acyl d'un acide triacétyl-biphénylcarboxylique. La présence de glucose est indiquée par les ions à $m/e = 169$ et $m/e = 109$ qui, d'après Haslam,¹² montrent que l'hydroxyle en position 2 du glucose est estérifié par l'acide polyphénolique. Nous pouvons donc considérer que cette substance est bien le dérivé acétylé de l'amarogentine (**5b**) et nous avons vérifié que le produit isolé de *Gentiana lutea* présentait avant acétylation le même r_f en chromatographie sur couche mince qu'un échantillon authentique d'amarogentine **5a**.

Dosage des constituants amers

Nous venons de voir qu'au moins 3 glucosides seco-iridoides contribuent à conférer sa saveur amère à la racine de gentiane. Il paraissait nécessaire d'évaluer l'importance organoleptique de chacun d'eux. Le gentiopicroside et la swertiamarine n'ayant pu être séparés sans recourir à une acétylation préalable modifiant leurs propriétés gustatives nous ne considérons que leur mélange, dans lequel d'ailleurs la swertiamarine est environ dix fois moins importante que le gentiopicroside. La concentration minimale pour laquelle nous avons constaté qu'une solution aqueuse de gentiopicroside est amère est de l'ordre de 10 mg/l alors que l'amertume de l'amarogentine a pu être encore décelée pour une concentration de l'ordre de 0,075 mg/l. L'amarogentine est donc environ 100 fois plus amère que le gentiopicroside. Nous avons alors dosé l'amarogentine et le gentiopicroside dans diverses racines de gentiane en opérant de la manière suivante: un extrait alcoolique de racines est chromatographié sur colonne d'acide silicique en utilisant, comme solvant d'élution, du chloroforme contenant des quantités croissantes de méthanol et en mesurant l'absorbance à 270 nm des fractions recueillies. Dans le tableau, nous indiquons les résultats de deux dosages successifs d'amarogentine et de gentiopicroside, réalisés sur divers échantillons de racines de *Gentiana lutea*.

La technique d'analyse utilisée est satisfaisante puisqu'elle permet de doser le gentiopicroside avec une erreur relative de $\pm 3\%$ sans pertes notables. Pour l'amarogentine, l'erreur est plus importante ($\pm 10\%$) et d'autant plus que cette substance est moins abondante.

On constate que la teneur en amarogentine est la plus élevée dans les racines les plus

¹¹ BARRALIS, G. et CHADOEUF, R. (1973) *C. R. Acad. Agr. France* 79–88.

¹² HASLAM, E. (1967) *Carbohydr. Res.* 5, 161–165.

jeunes. Les racines sauvages âgées sont par contre plus riches en gentiopicroside que les racines provenant de semis. Dans le cas des racines sauvages, l'amarogentine contribue pour 60% environ à l'amertume totale de la racine, tandis que pour les jeunes racines de culture, elle intervient dans 95% pour l'amertume. L'influence organoleptique du gentiopicroside peut alors être considérée comme négligeable.

CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'amarogentine isolée de *Gentiana lutea* est bien identique à l'ester de l'acide 3,5,3'-trihydroxybiphényl-2-carboxylique avec le sweroside. Cette substance est une des plus amères que l'on connaisse puisque sa saveur est décelable à une concentration de 0,1 mg/l. Bien qu'elle soit peu abondante, c'est elle qui est presque totalement responsable de la saveur amère de la racine. Les deux autres glucosides seco-iridoides caractérisés: gentiopitrine et swertiamarine ne contribuent que fort peu à cette amertume. On constate enfin que la culture de *Gentiana lutea* permet d'obtenir après deux années des racines plus riches en amarogentine que celles obtenues à partir de plantes sauvages.

PARTIE EXPERIMENTALE

Techniques d'identification. La chromatographie sur couche mince de gel de silice (HF 254) est effectuée en utilisant comme solvant de développement soit l'éther éthylique (solvant A), soit un mélange en volume de 80% de chloroforme avec 20% de méthanol (solvant B). Après développement les plaques sont examinées à la lumière ultra-violet (254 nm). Les spectres ultra violets des produits purs ont été obtenus en solution méthanolique à l'aide d'un spectromètre Beckmann DU 2. Les spectres infra rouges ont été déterminés à l'aide d'un spectromètre Perkin-Elmer 157 G sur des pastilles de KBr pressées. Les spectres de masse ont été déterminés sur les appareils AEF MS 30 ou AEF MS 9 du Centre d'Etudes et de Recherches des Chimistes de France: les excitations étaient introduites directement dans la source d'ions à travers un sas étanche.

Fractionnement des glucosides amers. 300 g de racines de *Gentiana lutea* arrachées depuis peu en Auvergne sont broyées 2 fois en présence de méthanol (1,5 l). On décante celui-ci puis on concentre sous vide. Le résidu est alors dissous dans 0,5 l d'eau puis extrait à 3 reprises par 100 ml CH_2Cl_2 et ensuite par le même volume d'HOAc et de *n*-BuOH.

TABLEAU 1. DOSAGES DE GENTIOPICTROSIDE ET AMAROGENTINE DANS LES RACINES DE GENTIANE

| Nature et origine de l'échantillon | Gentiopicroside en g/kg de racines fraîches | Amarogentine en g/kg de racines fraîches |
|--|---|--|
| Racines sauvages d'Auvergne (diamètre des racines > 15 mm) | 13,3 | 0,24 |
| Racines sauvages d'Auvergne (diamètre des racines < 5 mm) | 30,1-30,3 | 0,6-0,8 |
| Racines sauvages du Jura (diamètre des racines \approx 10 mm) | 29,0-29,9 | 0,5-0,7 |
| Racines de culture âgées de 1 an | 8,9-9,1 | 2,1-2,2 |
| Racines de culture âgées de 2 ans | 7,8 | 1,9 |
| Echantillon identique au précédent mais renforce en gentiopicroside à raison de 8,1 g/kg de racines fraîches | 16,8 | 1,6 |

Fractionnement de l'extrait butanolique. Cet extrait est évaporé à sec et le résidu redissous dans l'acétone à 50% d'eau est chromatographié sur une colonne de 100 g d'alumine (Woelm W 200) en utilisant l'acétone à 50% d'eau comme solvant de développement. Les deux premières fractions de 50 ml contiennent une substance présentant en chromatographie sur couche mince (solvant B) le même R_f 0,47 qu'un échantillon de gentiopicroside. 500 mg de cette substance sont acétylés 48 hr par 10 ml de pyridine et 10 ml HOAc; le produit d'acétylation

est chromatographie sur colonne d'acide silicique (Mallinckrodt 100 mesh 50 g) en utilisant CHCl_3 comme solvant d'élution. On recueille des fractions de 20 ml. Les fractions 10, 11, 12, contiennent une seule substance (R_f 0,57 en chromatographie sur couche mince avec le solvant A). La fraction 14 contient un produit qui présente en chromatographie sur couche mince le même R_f 0,34 (solvant A) qu'un échantillon authentique de tétraacétyl swertiamarine.

Fractionnement de l'extrait à acétate d'éthyle. Cet extrait est évaporé à sec et le résidu est chromatographié sur colonne d'acide silicique (Mallinckrodt 100 mesh 100 g) en utilisant comme solvant de développement 80 ml de CHCl_3 à 1% de MeOH, 160 ml de CHCl_3 à 3% de MeOH, 160 ml de CHCl_3 à 5% de MeOH, 400 ml de CHCl_3 à 10% de MeOH, 200 ml de CHCl_3 à 20% de MeOH. On recueille des fractions de 40 ml. Les fractions 24 à 27 contiennent du gentiopicroside. Les fractions 17 à 20 sont très fortement amères. Elles contiennent une seule substance qui présente en chromatographie sur couche mince le même R_f 0,69 (solvant B) qu'un échantillon authentique d'amarogentine. Cette substance a été acétylée dans le mélange de 1 ml de pyridine avec 1 ml Ac_2O pendant 48 hr et le dérivé acétylé a été purifié par chromatographie sur colonne d'acide silicique (Mallinckrodt 100 mesh 30 g) en utilisant comme solvant de développement du CHCl_3 contenant 1% MeOH. On recueille des fractions de 25 ml et la fraction 6 est constituée d'un seul composé présentant en chromatographie sur couche mince un R_f de 0,3 (solvant A).

Dosage du gentiopicroside et de l'amarogentine dans les racines de gentiane. 50 g de racines coupées en petits morceaux sont épuisées par le l'alcool à 96° GL dans un appareil de Soxhlet pendant 7 hr et l'extrait alcoolique est ajusté à 500 ml. 5 ml de cet extrait sont évaporés à sec, repris par le minimum de MeOH et déposés sur 0,5 g d'acide silicique (Mallinckrodt 100 mesh) en évaporant le solvant sous courant d'air chaud. On remplit alors une colonne chromatographique de 9 mm de diamètre interne avec 6 g d'acide silicique (Mallinckrodt 100 mesh activé 1 hr à 100°) et on dépose en haut de cette colonne les 0,5 g d'acide silicique contenant l'extrait de gentiane. On élue alors la colonne par des portions de 50 ml CHCl_3 contenant respectivement 0, 5, 7,5, 10, 15% MeOH. On recueille des fractions de 5 ml qu'on dilue 5 fois dans le MeOH et dont on détermine l'absorbance à 270 nm. Les fractions contenant soit l'amarogentine, soit le gentiopicroside sont réunies, évaporées à sec, reprises par un volume connu d'eau et leur absorbance à 270 nm est comparée à celle de solutions étalons d'amarogentine et de gentiopicroside. On peut alors calculer la teneur de la racine de gentiane en ces deux principes amers.

Remerciements.—Nous remercions tout particulièrement Monsieur le Professeur H. Inoue—Faculté des sciences pharmaceutiques de l'Université de Kyoto (Japon) pour les échantillons de gentiopicroside, amarogentine et tétraacétylswertiamarine. Monsieur Mazza—Centre d'Etudes et de Recherches des Charbonnages de France, 60-Verneuil en Halatte, pour la détermination des spectres de masse. Monsieur Barallis—Laboratoire de Malherbologie, I.N.R.A. 21-Dijon, pour les échantillons de racines de gentiane de culture. Mademoiselle Y. Mouazé pour sa collaboration technique.