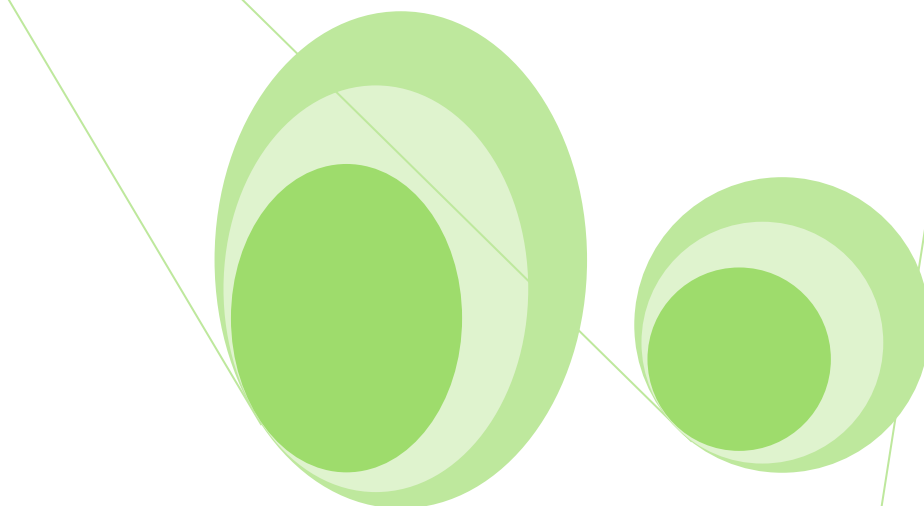


Université Larbi Ben M'hidi Oum el Bouaghi

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Sciences de la Matière

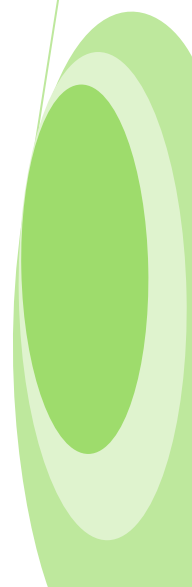


*Terpènes/Terpenoides*  
**Terpènes/Terpenoides**

Cours dirigé par

*Dr. SID Assia*

Niveau : Master 1 Chimie Pharmaceutique



## **AVANT PROPOS**

Les terpènes / terpénoïdes constituent une des plus grandes classes de produits naturels, ceci est dû à leur diversité chimique énorme qui peut résulter des transformations biochimiques des unités de départ prényl diphosphate relativement simples. Tous les terpènes / terpénoïdes comprennent un squelette hydrocarboné qui est généré à partir des différents types de prényl diphosphates (une chaîne polymère d'unités prényl). Lors de l'ionisation (élimination) du groupe diphosphate, les intermédiaires de carbocation allyliques restants peuvent être amadoués par des cascades chimiques complexes conduisant à divers squelettes hydrocarbonés linéaires et cyclisés, qui peuvent ensuite être modifiés par des groupes fonctionnels (par exemple alcool, cétones, etc.) et des ajouts de substituants (par exemple sucres, acides gras). En raison de cette diversité chimique, les terpènes / terpénoïdes ont de grandes utilisations industrielles comme arômes, parfums, lubrifiants de haute qualité, biocarburants, produits chimiques agricoles et médicaments. Les protocoles présentés ici se concentrent sur l'extraction de terpènes / terpénoïdes provenant de diverses sources végétales et ont été divisés en méthodes d'extraction de terpènes / terpénoïdes avec divers niveaux de présentation chimique, des petits hydrocarbures non volatils relativement volatils aux molécules de grande taille avec une plus grande complexité due à leurs modifications chimiques.

## **INTRODUCTION**

Les terpènes sont le groupe le plus important et le plus diversifié de composés secondaires végétaux; au moins 15 000 terpénoïdes ont été décrits, et des milliers d'autres attendent indubitablement une découverte (Gershenzon et Croteau, 1991). Les terpènes sont généralement constitués d'unités de cinq carbones, de structures C5, C10, C15, C20, C25, C30 et C40, qui sont généralement libres, mais peuvent être modifiées ou transformées en esters et glycosides, ou attachées aux protéines. Les terpènes existent dans la plupart des plantes et des champignons, mais ils s'accumulent rarement dans les bactéries (Bell et Charlwood, 1980, Poulter et Rilling, 1981). Les stéroïdes chez les mammifères sont des produits du métabolisme terpénoïde.

### **I. *PROTOCOLES D'EXTRACTION***

#### ***I.I. Extraction et analyse d'un terpène non polaire***

##### ***a/ Matériels :***

1. Échelle capable de peser avec précision  $\pm 0,1$  mg.
2. Laine de verre.
3. Pipettes sérologiques en verre.
4. Pipettes en verre Pasteur.
5. Flacons en verre avec couvercles scellés .
6. L'azote liquide.
7. Azote gazeux.
8. Gel de silice, taille des pores 60 Å, 230-400 mesh , 500 mg préparé dans un verre Pasteur pipette bouchée avec de la laine de verre.

##### ***b/ Extraction de matières végétales avec un solvant organique :***

1-Mesurer entre 100 mg et 1 g de matériel végétal.

La quantité de matériel végétal que vous utilisez dépend du but de votre extraction. Le niveau de squalène dans les plantes de tabac de type sauvage est habituellement compris entre 0,5  $\mu\text{g}$  / g poids frais et 10  $\mu\text{g}$  / g poids vif. Ainsi, au moins 50 mg de feuille de tabac doivent être utilisés pour la détection en aval appropriée.

2-Broyer le matériel végétal en poudre dans de l'azote liquide dans un flacon en verre ou en utilisant un mortier et un pilon.

Assurez-vous que l'échantillon est dans un récipient en verre avant d'ajouter du solvant car les récipients en plastique lixivieront les composants dans le solvant organique qui peuvent confondre les analyses analytiques et endommager les colonnes et l'équipement GC / HPLC.

3- Ajouter le solvant d'extraction (50: 1 mg / mL, matière végétale / solvant) d'un mélange hexane: acétate d'éthyle (85:15 [v / v]) immédiatement après que le matériau a été broyé.

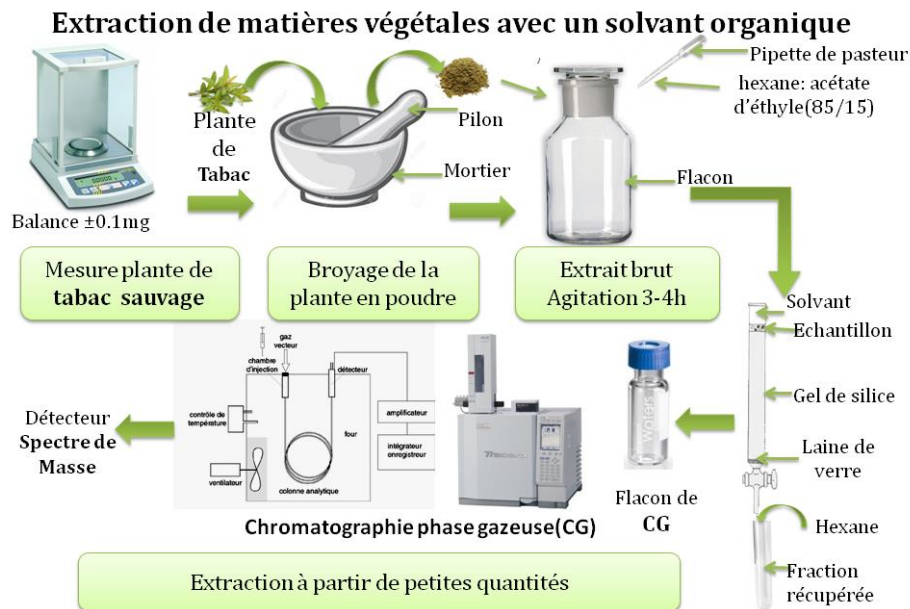
L'extrait brut doit être transféré dans un flacon de verre ou des flacons pour agitation pendant au moins 3-4 heures ou toute la nuit.

**Pour l'extraction à partir de petites quantités de tissu:**

- Ajouter le solvant d'extraction (50: 1 mg / mL, matière végétale / solvant) d'un mélange hexane: acétate d'éthyle (85:15 [v / v]) immédiatement après que le matériau a été broyé.
- L'extrait brut doit être transféré dans un flacon de verre ou des flacons pour agitation pendant au moins 3-4 heures ou toute la nuit.
- Concentrer les extraits d'hexane à ~ 500 ul sous un courant d'azote sans sécher les échantillons.
- Ensuite, chargez l'échantillon concentré sur une petite colonne de silice.
- Laisser l'échantillon à absorber dans la colonne, puis ajouter 1-3 ml d'hexane et recueillir l'éluant de la colonne.
- Sécher l'éluant sous un courant d'azote et remettre en suspension dans 100-200 uL d'hexane.
- Transférer ceci dans un flacon approprié pour l'analyse GC. Si vous utilisez une configuration GC l'échantillon peut être analysé en utilisant une température d'injecteur de 250 ° C avec une température de four de 150 °.
- Si couplé à un détecteur MS, les spectres peuvent être détectés en mode d'ionisation positive, 70 eV, balayage 50-500 m / z.
- Si le GC est couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID), il faut alors exécuter un standard vérifié pour connaître le temps de rétention exact du squalène.
- Si le terpène est volatil, toutes les étapes de concentration et de séchage sous un flux d'azote doivent être effectuées avec le flacon d'échantillon dans la glace.

**Pour purifier de grandes quantités de terpène cible à partir d'une plus grande quantité de matière végétale:**

concentrer l'extrait dans un volume aussi réduit que possible, tout en conservant un volume suffisant pour que tous les composants chimiques restent solubilisés et peut être facilement chargé dans la colonne à l'étape suivante.



7

### c/ Purification par chromatographie sur silice à plus grande échelle :

1- Préparer la colonne de silice et charger le solvant sur la colonne en utilisant au moins deux fois le volume de silice dans la colonne, en veillant à ce que la silice est complètement saturée de solvant.

2- Chargez les extraits concentrés sur le dessus de la colonne. Ensuite, attendez que l'extrait soit complètement entré dans la colonne.

La concentration de l'extrait dans un volume aussi petit que possible garantit que l'échantillon pénètre dans la colonne sous la forme d'une bande acérée et empêche l'étalement du composé sur plus de fractions que nécessaire.

3- Ajouter un volume d'hexane égal au volume de silice et permettre à celui-ci d'entrer dans la colonne. Répétez plusieurs fois.

- N'ajoutez pas d'hexane tant que tout l'extrait n'est pas complètement entré dans la colonne, sinon l'hexane introduit diluera l'échantillon concentré.

La durée de l'élution totale dépendra de l'affinité des molécules de terpènes cibles avec le gel de silice. Habituellement, les molécules avec moins de polarité et de plus petite taille prendront moins de temps à éluer.

- Par exemple, le squalène peut nécessiter l'élution complète de plusieurs volumes de colonnes. Il est préférable de vérifier empiriquement en utilisant un standard purifié si possible.
- Si un étalon ne peut pas être obtenu, un composé de composition chimique similaire peut être utilisé comme point de départ.

4- Recueillir l'ensemble de l'éluant ou des fractions de même taille, pour chaque tour d'addition d'un volume de colonne d'hexane, dans des flacons / fioles en verre propres, en prenant **soin** de garder une trace de la fraction ou de l'ordre d'éluant.

Assurez-vous que le volume du flacon / flacon de collecte d'éluant est 2 fois plus grand que le volume de prélèvement attendu.

5- Transférer une aliquote de 100-200  $\mu\text{L}$  de chaque fraction dans un flacon de GC. Analyser l'échantillon en utilisant un GC (équipé d'un MSD ou FID), pour déterminer quelle fraction contient le squalène.

Dans cette étape, si la plante a une concentration relativement élevée du terpène souhaité, une Chromatographie sur couche mince, CCM peut être utilisée pour montrer directement quelle fraction a la plus grande quantité de terpène souhaité. Cependant, dans l'exemple présenté ici, les niveaux de squalène dans les plantes sont généralement faibles et la CCM n'est pas suffisamment sensible pour le détecter.

6- Combiner toutes les fractions qui contiennent du squalène ou le terpénoïde d'intérêt. Ensuite, concentrer les fractions sous un courant d'azote.

7-

- L'échantillon concentré devrait contenir la plus grande partie du squalène. La quantité et la pureté du squalène peuvent être évaluées en analysant une petite fraction de l'échantillon par chromatographie en phase gazeuse (GC).
- L'échantillon peut contenir d'autres molécules qui co-éluent avec du squalène et celles-ci affecteront la pureté de l'échantillon.
- La chromatographie liquide haute performance (HPLC) peut être utilisée pour une purification plus poussée.

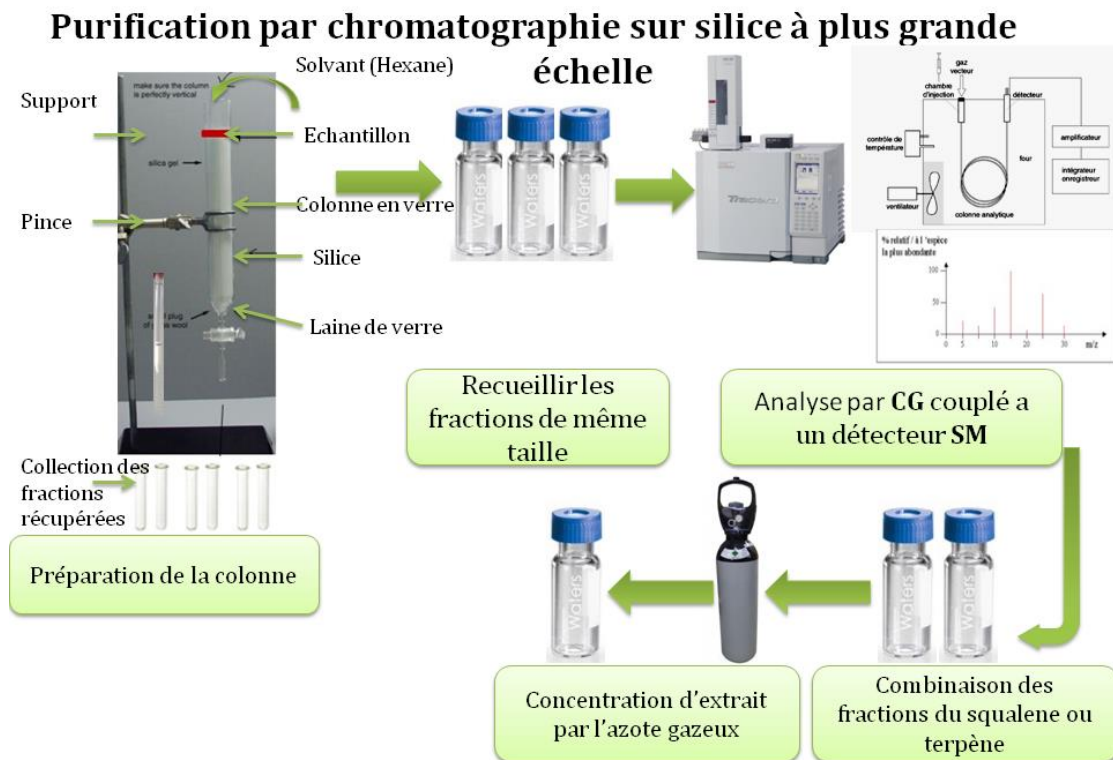


Figure: schéma de purification d'échantillon par chromatographie sur silice 8

### Purification du squalène par HPLC :

- 1- Transférer l'extrait concentré dans un flacon approprié pour la séparation par HPLC.
- 2- Injecter l'échantillon entier et passer en mode isocratique (100% n-hexane) à 8 ml / min.
- 3- L'élution du squalène peut être détectée en suivant l'absorbance maximale des UV entre 200 et 215 nm.
- 4- Recueillir les fractions d'éluat, concentrer sous un courant d'azote et évaluer les fractions individuelles pour ceux contenant la plus grande quantité de squalène. L'analyse GC est la méthode préférée pour cela, mais la CCM peut également être utilisée.
- 5- Des passages chromatographiques répétitifs peuvent être utilisés pour augmenter et augmenter la pureté du composé terpénoïde souhaité, dans ce cas le squalène.

## Purification du squalène par L'HPLC

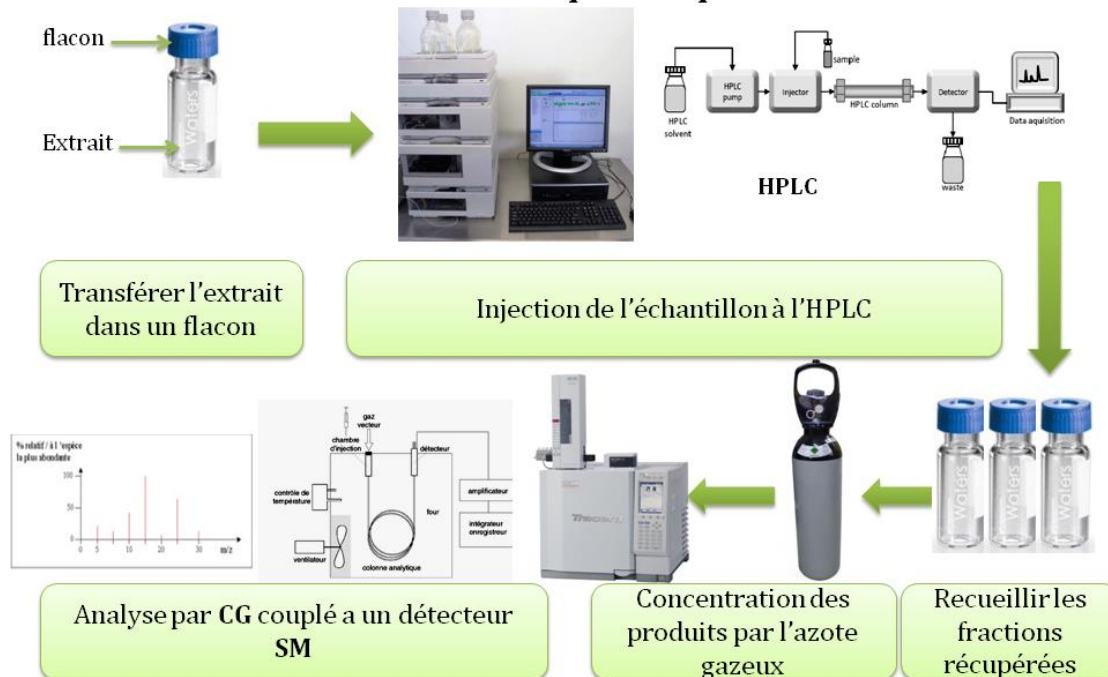


Figure :schéma de purification du squalène par l'HPLC

9

## II. PROTOCOLE ALTERNATIF 1

### II.I. extraction et analyse d'un terpène volatil

#### a/ Matériels:

1. Étanche au gaz.
2. Chambre de verre avec deux ports capables de fixer les tubes.
3. Résine Tenax 20-35 mesh, ,150 mg (numéro de catalogue Sigma-Aldrich: 11049-U).
4. Air comprimé ou fourni par la maison (vitesse: 300-500 mL / min).
5. Ligne de vide (vitesse: 300-500 ml / min).
6. Pipettes en verre Pasteur (numéro de catalogue Fisherbrand: 13-678-20A).
7. Acétate d'éthyle.
8. Hexane.

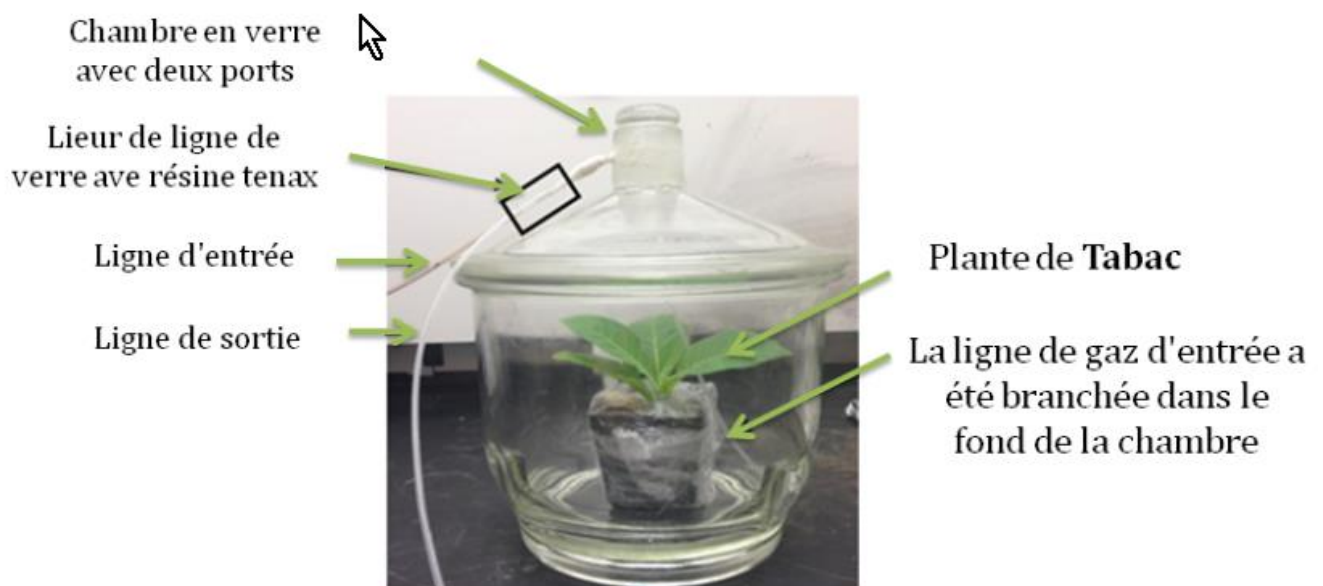
#### b/ Collecte des terpénoïdes volatiles :

**1-** Placez l'installation dans une chambre hermétique avec deux orifices.

- Connectez un port à un réservoir d'air comprimé (ou à une source d'air interne) et connectez l'autre à une ligne de vide avec une vitesse d'écoulement de gaz adaptée d'environ 300-500 mL / min.



- Mettre en place une pipette en verre Pasteur emballé avec 150 mg de la résine Tenax (similaire à la mise en place utilisée pour la colonne de silice présentée à la figure 2) et d'aplomb en ligne avant l'air entrant dans la chambre. Cela va pré-filtrer l'air entrant dans la chambre.
  - Utilisez des connecteurs simples pour permettre un échange facile des pièges. Plomb la ligne de gaz d'entrée dans le fond de la chambre. Soyez sûr d'envelopper le pot de plante dans une pellicule de plastique, couvrant tout le sol et envelopper autour de la tige de la plante.
  - Cela ne devrait laisser que les parties aériennes de la plante exposées à l'air en circulation.
- 2- Assurez-vous que l'air est pompé à l'intérieur et à l'extérieur de la chambre, car la petite tubulure utilisée peut créer une résistance.
- 3- Recueillir les composés volatils en plombant une pipette en verre Pasteur remplie de 150 mg de résine Tenax (la même que celle filtrant l'air entrant dans la chambre) connectée en ligne avec la ligne de gaz de sortie via des connecteurs simples pour permettre un échange facile de la piège.
- 4- Echangez les pièges toutes les 1-4 heures, et éluez les terpènes piégés avec 2 lavages ou plus de 0,5 ml d'hexane ou d'hexane: acétate d'éthyle (85:15 [v / v]). Examiner l'éluates en utilisant GC-MS ou GC-FID comme décrit dans le protocole 1.



**Figure: Analyse des gaz dans l'espace de tête pour les terpènes volatiles.**

### III EXTRACTION ET ANALYSE DE TERPENOÏDES POLAIRES

Dans la nature, de nombreux terpénoïdes intéressants seront décorés avec un ou plusieurs groupes polaires ou molécules, ce qui augmentera de manière significative la taille et la polarité de la molécule terpénoïde. L'extraction à l'aide d'un solvant non polaire (hexane) et l'analyse par GC-MS ne peuvent pas être utilisées pour ces types de terpénoïdes en raison de leur incapacité générale à se répartir dans la phase organique ainsi que de l'impossibilité d'une volatilisation efficace en utilisant GC. Par conséquent, un solvant plus polaire doit être utilisé pour l'extraction (par exemple le méthanol) et un système LC-MS sera plus approprié pour l'analyse. Dans ce protocole, nous allons décrire brièvement une méthode simplifiée pour l'extraction et l'analyse de l'artémisinine, qui est l'un des plus importants terpénoïdes médicinaux. Lapkin et al. (2006) ont évalué différentes méthodes d'extraction de l'artémisinine d'*Artemisia annua* en examinant des paramètres tels que les coûts d'exploitation, la toxicité, le risque et la sécurité, les émissions de gaz à effet de serre et les coûts en capital. Ces auteurs ont déduit que certaines technologies émergentes (par exemple l'extraction par liquide ionique) seront capables de concurrencer les extractions traditionnelles (par exemple l'hexane), mais en termes de paramètres considérés, l'hexane est meilleur que l'éthanol. Cependant, le protocole présenté ci-dessous est une méthode reproductible utilisant la spectrométrie de masse en tandem quadripolaire à temps de vol (Q-TOF MS / MS) pour l'extraction de l'artémisinine à partir de tissu végétal, tirée de Van Nieuwerburgh et al. (2006), et est approprié pour une extraction à l'échelle d'un laboratoire où le débit élevé et la récupération élevée prévalent sur des considérations d'échelle commerciale / industrielle.

- **Produits et Matériels:**

- Chloroform
- Méthanol
- Acétate d'ammonium, 1 mM, pH 5,5
- $\beta$ -artéméthér
- HPLC (par exemple Waters Alliance 2695 équipé de deux pompes [pompe 1: 1 mM tampon d'acétate d'ammonium, pH 5,5 réglé avec de l'acide acétique, pompe 2: méthanol] et une colonne de garde Waters XTerra MS C18 5  $\mu$ m (10 mm  $\times$  2,1 mm) à une colonne Alltech Ultrasphere C18 IP 5

$\mu\text{m}$  (150 mm  $\times$  2,1 mm) avec un séparateur post-colonne LC Packings ACUrate ICP-04-20 envoyant un quart de l'éluat de la colonne dans le LC-MS

- ESI Q-TOF MS / MS (par exemple Ultima MS avec source ESI fonctionnant en mode positif avec une tension capillaire de 2,7 kV, une température de source de 130 ° C et une température de désolvation de 300 ° C, l'azote comme gaz de désolvant avec un débit débit de 500 L / h, MS / MS avec collision d'argon (0,9 bar), tension de cône réglée pour 40 V et une énergie de collision de 7 eV est optimale pour l'artémisinine)

- **Extraction et analyse de l'artémisinine :**

- ✓ Immerger 1 gramme de matériel foliaire dans 6 ml de chloroforme pendant 1 min. Retirer une aliquote de 10  $\mu\text{l}$  à 1 ml de méthanol: tampon acétate d'ammonium 1 mM, pH 5,5 ajusté avec de l'acide acétique (1: 1 [v / v]).
- ✓ La solution de méthanol: acétate d'ammonium peut contenir 0,4 mg / mL d'un étalon interne, le  $\beta$ -artéméther. Cette brève extraction est considérée comme possible en raison du fait que la majorité de l'artémisinine dans *A. annua* réside dans les glandes sous-cuticulaires qui sont facilement accessibles au solvant. Notez que l'homogénéisation des tissus avant l'extraction sera probablement nécessaire pour la plupart des autres méthodes d'extraction.
- ✓ Injectez 100  $\mu\text{L}$  de l'échantillon sur le système HPLC et séparez les composants en utilisant un gradient d'élution de 0,2 mL / min. La composition initiale de 1 mM d'acétate d'ammonium (1 mM, ajusté à pH 5,5 avec de l'acide acétique): méthanol était de 50:50 et maintenue pendant 1 minute. La concentration en méthanol a été augmentée linéairement à 80% en 6 minutes et maintenue pendant 18 minutes. La colonne a été laissée s'équilibrer pendant 10 minutes entre les échantillons.

- ✓ Analyser la teneur en artémisinine en utilisant le signal MS / MS comme la somme des intensités des pics m / z de 219, 229, 247 et 265 fragmentés à partir du m / z parent de 283.

## • Discussion des résultats

Les terpénoïdes comprennent un grand groupe de métabolites naturels distincts, dont beaucoup ont été découverts dans les plantes. Les terpènes découverts et isolés des plantes ont été largement utilisés dans les aliments, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et dans diverses applications biotechnologiques. La capacité d'isoler et de purifier ces précieuses molécules des plantes est la clé pour élucider leurs applications potentielles. Par exemple, le médicament anticancéreux, le paclitaxel, qui a été extrait de l'écorce de l'if du Pacifique continue d'être développé pour améliorer son efficacité d'extraction à partir de cultures de cellules végétales (Theodoridis et al., 1998, Kawamura et al. 1999, Oh et al., 2012, Taura et al., 2013, Kim et Kim, 2015). Ceci réitère les points soulevés dans l'introduction, à savoir que plus le terpène cible est complexe, plus la procédure d'extraction peut être complexe pour optimiser la récupération.

Dans la nature, un terpénoïde peut contenir de multiples structures cyclisées et divers types de groupes (par exemple des groupes hydroxyle, des acides gras, des sucres, des cycles benzyle). Ces décorations vont augmenter de manière significative la polarité de la molécule. La polarité de la molécule est la caractéristique la plus importante à considérer lors de la détermination de la façon de purifier le terpénoïde désiré. En outre, la volatilité et la taille sont des facteurs critiques, qui dicteront des aspects importants de la méthode ainsi que le type d'équipement d'analyse qui devrait être utilisé. Les méthodes décrites dans les protocoles de base 1 et 2 conviennent pour la plupart des terpénoïdes non polaires, tandis que les méthodes décrites dans le protocole de base 3 et le protocole alternatif 2 peuvent être utilisées pour les terpénoïdes polaires. Encore une fois, la figure 1 peut être utilisée comme guide général - vous pouvez voir quel terpène correspond le mieux à votre structure (prévue), et la région ombrée dans laquelle elle tombe devrait servir de guide général pour savoir quel protocole peut être utilisé pour l'extraction: les molécules les mieux extraites et analysées en utilisant

un protocole similaire à ceux présentés en 1, 2 ou 3 sont surlignées en vert, rouge ou bleu, respectivement.

Cependant, l'extraction de n'importe quel terpénoïde de manière efficace et économique nécessite habituellement une méthode plus spécifique et optimisée. En raison des restrictions de longueur de ce rapport et de la possibilité qu'une procédure d'extraction optimisée puisse être développée pour chaque composé terpénique en fonction de ses propriétés et de son tissu progéniteur, ce protocole doit être considéré comme un point de départ initial pour l'extraction de tout terpène / composé terpénoïde. On pourrait également consulter d'autres matériaux de référence comme ceux décrivant des protocoles d'extraction spécifiques pour les caroténoïdes (Rodriguez, 2001, Taylor et al., 2006), les terpénoïdes lactones (tels que ceux utilisés pour le Ginkgo biloba, Ding et al., 2004; Sun et al., 2005, Croom et al., 2008) et les terpènes glycosides (Kodama et al., 1981). De nombreux articles de recherche principaux continuent de rapporter des améliorations dans les méthodes d'extraction qui offrent des avantages significatifs par rapport aux méthodes conventionnelles (réduction de l'utilisation de solvants organiques, évitement de la dégradation des échantillons et élimination des étapes supplémentaires de nettoyage et de concentration avant analyse chromatographique).

- **Problèmes rencontrés**

Les protocoles présentés dans cette unité sont basés sur des procédures standard qui ont été minutieusement testées dans notre laboratoire ou dérivées de littérature publiée évaluée par des pairs. Cependant, l'extraction optimale de n'importe quel terpène / terpénoïde spécifique souhaité nécessitera des changements spécifiques et un réglage fin de ces protocoles. D'autres considérations importantes à prendre en compte lors de l'extraction sont l'intégrité et la pureté du composé cible, qui peut être dégradé par oxydation due à l'exposition à l'atmosphère ou dégradation due aux traitements sévères utilisés lors des processus d'extraction ou d'analyse (lyophilisation, chauffage pendant la saponification ou hautes températures utilisées pendant l'analyse GC). Comme indiqué dans le premier protocole, le meilleur indicateur pour comprendre et estimer les pertes est l'inclusion d'une norme externe qui a des propriétés chimiques similaires au composé cible avant l'extraction.

Idéalement, on aimerait utiliser un étalon purifié ayant des caractéristiques chimiques similaires au composé cible, qui peut ensuite être utilisé pour déterminer l'efficacité globale de l'extraction. Cela fournirait alors un guide précieux pour évaluer le pourcentage de récupération réel, qui pourrait être diminué par une mauvaise répartition entre les solvants d'extraction, la dégradation et d'autres facteurs atténuants.

- **Résultats prévus :**

Suivre les protocoles décrits ci-dessus en tant que lignes directrices devrait permettre de détecter les terpènes désirés en utilisant la méthode analytique suggérée. Il est essentiel de comprendre les limites de détection pour la méthode analytique désirée et les efficacités de récupération des méthodes pour déterminer la quantité de tissu nécessaire pour les extractions initiales. Une fois que cela a été vérifié, les volumes de protocole peuvent facilement être mis à l'échelle pour répondre à ses besoins. A titre d'exemple, un minimum de 20 mg de tissu FW serait nécessaire dans le protocole alternatif 2 avec une récupération de 30-60% de l'étalon externe (5- $\alpha$ -cholestane), afin de détecter et de quantifier de manière fiable les principaux composants du phytostérol (c.-à-d. sitostérol, campestérol et stigmastérol).

- **Considérations de temps :**

Le processus d'extraction complet prendra de 1 à 2 jours selon le protocole d'extraction choisi. L'extraction avec des solvants organiques prend généralement de la moitié à une journée complète, tandis que l'inclusion de la purification ajoute, au minimum, un ou deux jours de plus.

## *Conclusion*

La plus part des terpènes se trouvent dans les plantes.

- L'utilisation de la silice comme phase stationnaire en chromatographie est un outil parfait pour séparer ces terpènes des autres composés de l'extrait.
- L'extraction des terpènes volatiles se fait par des techniques plus modernes.
- les terpènes qui sont émis dans l'atmosphère ne s'accumulent que temporairement dans les phases aqueuses et lipidiques des feuilles et ne sont donc présents qu'à de faibles concentrations dans les échantillons de tissus.
- La chromatographie liquide haute performance (HPLC) peut être utilisée pour une purification plus poussée.

## SOMMAIRE

• <b>AVANT PROPOS</b> .....	2
• <b>INTRODUCTION</b> .....	3
• <b><u>PROTOCOLE D'EXTRACTION 1 :</u></b>	
<i>EXTRACTION ET ANALYSE D'UN TERPENE NON POLAIRE</i> .....	4
✓ Matériels.....	4
✓ <i>Extraction de matières végétales avec un solvant organique :</i> .....	4
<i>A-Pour l'extraction à partir de petites quantités de tissu</i> .....	4
<i>B-Pour purifier de grandes quantités de terpène cible à partir d'une plus grande quantité de matière végétale</i> .....	5
✓ <i>Purification par chromatographie sur silice à plus grande échelle</i> .....	6
✓ <i>Purification du squalène par HPLC</i> .....	8
• <b><u>Protocole alternatif 1 :</u></b>	
<i>Extraction et analyse d'un terpène volatil</i> .....	9
✓ <i>Matériel</i> .....	9
✓ <i>Collecte des terpénoïdes volatiles</i> .....	9
✓	
• <b>CONCLUSION</b> .....	11
• <b>SOMMAIRE</b> .....	15