

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :
Zaïneb JEMMALI

soutenue le : **15 décembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie analytique

Développements méthodologiques en TLC/MALDI-TOF MS et GC/MS pour l'analyse des composés terpénoïdes présents dans les résines végétales

THÈSE dirigée par :
Claire ELFAKIR

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :
Valérie AGASSE
Catherine VIEILLES CAZES

Maître de Conférences, Université de Rouen
Professeur, Université d'Avignon

JURY

Valérie AGASSE
Patrick CHAIMBAULT
Jérôme RANDON
Catherine VIEILLES CAZES
Agnès CHARTIER
Claire ELFAKIR

Maître de Conférences, Université de Rouen
Professeur, Université de Lorraine
Professeur, Université de Lyon
Professeur, Université d'Avignon
Chargée de recherches 1^{ère} classe, Orléans
Professeur, Université d'Orléans

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Valérie Agasse, maître de conférences à l'université de Rouen et Madame Catherine Vieillescazes, professeur à l'université d'Avignon, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Je les remercie pour le temps consacré à la lecture de ma thèse ainsi que pour leurs remarques et suggestions pour l'amélioration du manuscrit.

Je remercie également Monsieur Patrick Chaimbault, professeur à l'Université de Lorraine, et Monsieur Jérôme Randon, professeur à l'université de Lyon, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je les remercie pour les échanges très intéressants et constructifs que nous avons eu lors de la soutenance de thèse.

Mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse, le professeur Claire Elfakir, qui m'a permis de réaliser mon projet de recherche au sein de son équipe. Je la remercie infiniment pour son encadrement, sa disponibilité, sa gentillesse et son regard critique sur mon travail de thèse. Un grand merci à mon encadrante de thèse, Agnès Chartier pour ces conseils constructifs et ses encouragements.

Je remercie David Da Silva et Emilie Destandau pour m'avoir encadré sur la partie TLC et MALDI-TOF-MS. J'ai beaucoup apprécié travailler avec vous. Merci pour vos conseils pertinents et les conversations intéressantes qu'on a pu avoir.

Je tiens à remercier mes collègues de thèse Elise, Syntia, Johanna et Justine pour leur soutien quotidien durant ces trois années de thèse. Merci les filles pour la bonne ambiance de travail ainsi que les bons moments passés ensemble. Je remercie également Syame de m'avoir toujours encouragé (même à distance). Ton soutien m'a toujours aidé à aller de l'avant.

Merci aux stagiaires que j'ai pu encadrer pendant ces trois années : Séma, Caroline et Germain qui ont contribué à faire avancer ce projet.

Merci à tous mes collègues de l'ICOA pour leur accueil chaleureux : Sandrine, Florian, Caroline, Eric, Reine, Bérangère, Cédric, Benoit, Philippe, Cyril, Alain-Michel, Adrien, Suong, Christelle, Laetitia et Josiane.

Enfin, je tiens à remercier mes parents et ma sœur Selma qui ont toujours cru en moi, m'ont toujours soutenu durant ces trois ans de thèse. Merci d'avoir su toujours me mettre dans les meilleures conditions pour réussir. Vos encouragements et votre soutien sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis.

Merci à mes beaux-parents Christine et Marc pour leur grande générosité et leur grande disponibilité toutes les fois où j'ai eu besoin d'eux.

Enfin, je tiens à remercier mon mari Guillaume d'avoir toujours été là à mes côtés et de m'avoir aidé pour la relecture et la mise en page du manuscrit. Tu as été toujours là pour m'encourager et tu as toujours cru en moi. Merci pour ta patience, ton soutien inconditionnel durant ces trois années de thèse.

COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES

Publication dans des journaux internationaux

(1) Identification of triterpenoid markers by TLC-MALDI-TOF-MS associated to GC-MS analyses for the unambiguous differentiation between related close Boswellic resins. Jemmali Z., Da Silva D., Destandau E., Chartier A., Elfakir C. *Phytochemistry Letters* soumis en septembre 2016.

(2) Development of a gas chromatography-mass spectrometry method to monitor in a single run, mono- to triterpenoid compounds distribution in resinous plant materials. Jemmali Z., Chartier A., Elfakir C. *Journal of Chromatography A* (2016) 1443, 241-253.

(3) Optimization of the derivatization protocol of pentacyclic triterpenes prior to their gas chromatography-mass spectrometry analysis in plant extracts. Jemmali Z., Chartier A., Elfakir C. *Talanta* (2016) 147, 35-43.

Communications orales

Congrès internationaux

(1) TLC-MS and GC-MS analysis to highlight differences in phytochemical composition of Boswellia resins. Jemmali Z., Da Silva D., Destandau E., Chartier A., Elfakir C.
10th International Symposium on Chromatography of Natural Products, Juin 2016, Lublin, Pologne

(2) Développement méthodologique en GC-MS en vue d'une caractérisation de la composition terpénique de résines végétales. Jemmali Z., Chartier A., Elfakir C.
34ème Journées Internationales Huiles essentielles et Extraits (APPAM), Septembre 2015, Digne les Bains, France.

Congrès nationaux

(3) Complementary use of TLC-MS and GC-MS for chemical differentiation and identification of Boswellic resins. Jemmali Z., Da Silva D., Destandau E., Chartier A., Elfakir C.
20^{ème} Journées du Club Jeunes de la Société Française de Spectrométrie de Masse (SFSM), Mars 2016, Moustiers Sainte Marie, France.

(4) Optimisation des conditions d'extraction et d'analyse par chromatographie en phase gazeuse de composés terpéniques dans les résines végétales à l'aide d'outils chimiométriques. Jemmali Z., Chartier A., Elfakir C.
VIIIème journée du Club Jeunes de l'AFSEP, Juillet 2015, Lyon, France.

(5) Etude de matrices végétales en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Jemmali Z., Chartier A., Elfakir C.
Journée Jeunes Chercheurs de la Section Régionale Centre-Ouest Société Chimique de France, Février 2015, Orléans, France.

(6) Optimisation de la réaction de dérivation des triterpènes pentacycliques en vue de leur analyse par chromatographie en phase gazeuse. Jemmali Z., Chartier A., Elfakir C.
VIIème journée du Club Jeunes de l'AFSEP, Juillet 2014, Paris, France.

Communications par posters

Congrès internationaux

(1) Determination of Boswellic resins origin and authenticity using two complementary methodologies: TLC-MALDI-TOF and GC-MS. Jemmali Z., Da Silva D., Destandau E., Chartier A., Elfakir C.
31th International Symposium on Chromatography (ISC 2016), Août 2016, Cork, Irlande.

(2) Development of gas chromatography-mass spectrometry method of mono- to triterpenoids analysis ion resinous material. Jemmali Z., Da Silva D., Destandau E., Chartier A., Elfakir C.
10th International Symposium on Chromatography of Natural Products, Juin 2016, Lublin, Pologne

Congrès nationaux

(3) Optimisation de la réaction de dérivation des triterpènes pentacycliques en vue de leur analyse par chromatographie en phase gazeuse. Jemmali Z., Chartier A., Elfakir C.
11ème congrès Francophone de l'AFSEP sur les sciences séparatives et les couplages (SEP 2015), Avril 2015, Paris, France.

(4) Sélection de colonnes en chromatographie en phase gazeuse en vue de l'analyse de matrices complexes – application aux matrices végétales : les résines. Jemmali Z., Chartier A., Elfakir C.
11ème congrès Francophone de l'AFSEP sur les sciences séparatives et les couplages (SEP 2015), Avril 2015, Paris, France.

(5) Optimisation de la réaction de silylation des composés triterpéniques à l'aide d'un plan d'expériences. Identification de triterpènes dans des résidus de pommes (Golden v. Golden et Granny Smith). Jemmali Z., Chartier A., Elfakir C.
Journée Jeunes Chercheurs de la Section Régionale Centre-Ouest Société Chimique de France ,
Février 2015, Orléans, France.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	15
INTRODUCTION GENERALE	17
CHAPITRE I BIBLIOGRAPHIE.....	19
I.1 Introduction – Les résines végétales	20
I.2 Biosynthèse des terpènes et classification.....	21
I.2.1 Origine des unités en C5.....	21
I.2.2 Les terpènes volatils (mono- et sesquiterpènes)	22
I.2.3 Les terpènes non-volatils (di- et triterpènes)	23
I.3 Activités biologiques des terpènes présents dans les résines végétales.....	26
I.3.1 Activités anticancéreuses	26
I.3.2 Activités anti-inflammatoires	26
I.3.3 Activités antivirales et antibactériennes.....	27
I.3.4 Autres activités biologiques	27
I.4 Classification des résines végétales	28
I.4.1 Classification des résines végétales.....	28
I.4.2 Sélection des résines étudiées	32
I.5 Etat de l'art sur l'analyse des terpènes dans les résines végétales.....	33
I.5.1 Méthodes d'extraction directe des terpènes dans les résines végétales	33
I.5.2 Méthodes chromatographiques pour analyser les terpènes dans les résines végétales.....	35
I.6 Conclusion	58
I.7 Références	66
CHAPITRE II DEVELOPPEMENT DU COUPLAGE TLC-(1D ET 2D) AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE (MALDI-TOF-MS).....	73
II.1 Introduction	74
II.2 Aspects fondamentaux de la TLC.....	76
II.2.1 Mise en œuvre de la chromatographie sur couche mince	76
II.2.2 Phase stationnaire.....	77
II.2.3 Phase mobile.....	79
II.2.4 Classification des solvants	80
II.3 Analyse de résines végétales sur gel de silice	83
II.3.1 Optimisation de la composition de la phase mobile	83
II.3.2 Analyse des échantillons de résines végétales.....	97
II.4 Analyse de résines végétales sur silice greffée C18.....	103
II.4.1 Optimisation de la composition de la phase mobile	103
II.4.2 Application à l'analyse des résines de type Frankincense	110
II.5 Conclusion générale sur l'analyse des résines en TLC monodimensionnelle (TLC-1D)	112
II.6 TLC bidimensionnelle (TLC-2D)	114

II.6.1 Principe de la TLC bidimensionnelle :	114
II.6.2 Optimisation des phases mobile pour la TLC-2D:.....	115
II.6.3 Application à l'analyse des standards et des résines :	116
II.7 Développement du couplage TLC-MALDI-TOF-MS pour l'analyse des triterpénoïdes	121
II.7.1 Appareillage MALDI-TOF-MS et mise en place du couplage avec la TLC	122
II.7.2 Optimisation des paramètres MALDI-TOF-MS	124
II.7.3 Application du couplage TLC-MALDI-TOF-MS aux résines de type Frankincense	131
II.8 Conclusion	138
II.9 Références	139
CHAPITRE III DEVELOPPEMENT D'UNE METHODOLOGIE GC-MS POUR L'ANALYSE SIMULTANEE DES MONO-, SESQUI-, DI-ET TRITERPENOÏDES PRESENTS DANS LES RESINES VEGETALES.....	
III.1 Introduction	142
III.2 Optimisation du protocole de dérivation des triterpènes pentacycliques.....	144
III.2.1 Méthodologie mise en place	146
III.2.2 Détermination des facteurs expérimentaux influents.....	148
III.2.3 Optimisation par la méthode du plan composite centré.....	150
III.2.4 Contrôle de la dérivation totale des solutés	155
III.2.5 Conclusion.....	158
III.3 Sélection de la phase stationnaire	160
III.3.1 Détermination de la polarité des colonnes selon McReynolds	161
III.3.2 Analyse en composante principale et classification ascendante hiérarchique.....	164
III.3.3 Sélection de la phase stationnaire par la fonction de Derringer	168
III.3.4 Conclusion.....	171
III.4 Optimisation de l'étape d'injection	172
III.5 Optimisation de la programmation de température de la colonne GC	176
III.6 Evaluation des performances analytiques de la méthode à partir de l'analyse de différents mélanges	177
III.6.1 Taux de recouvrement des monoterpènes après l'étape d'évaporation à sec nécessaire au protocole de dérivation de l'échantillon	177
III.6.2 Analyse GC-MS d'un mélange standard de 27 composés terpéniques dans les conditions optimisées	179
III.6.3 Performances analytiques de la méthode GC-MS.....	180
III.7 Application de la méthode GC-MS développée à l'analyse des résines végétales	184
III.7.1 Optimisation de l'étape d'extraction.....	184
III.7.2 Analyse des résines triterpéniques	190
III.7.3 Analyse des résines diterpéniques	193
III.7.4 Analyse des résines triterpéniques et diterpéniques.....	195
III.7.5 Différenciation des résines de type Frankincense	201
III.8 Conclusion	208
III.9 Références	209
CHAPITRE IV ANALYSE QUANTITATIVE PAR GC-MS DES MARQUEURS MAJORITAIRES DES RESINES DE TYPE FRANKINCENSE	
IV.1 Introduction	212
IV.2 Démarche associée à la validation de méthode	214

IV.3 Méthode GC-MS à valider	218
IV.3.1 Solutés choisis pour la validation de la méthode.....	218
IV.3.2 Paramètres de la méthode à valider.....	219
IV.4 Validation de la méthode GC-MS.....	221
IV.4.1 Spécificité de la méthode GC-MS.....	221
IV.4.2 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)	222
IV.4.3 Linéarité.....	223
IV.4.4 Justesse et précision.....	225
IV.4.5 Stabilité.....	227
IV.4.6 Conclusion	228
IV.5 Quantification des marqueurs majoritaires des résines Frankincense	229
IV.5.1 Analyse de la résine <i>Boswellia serrata</i>	229
IV.5.2 Analyse des résines de type Frankincense	230
IV.6 Conclusion	235
IV.7 Référence.....	236
CONCLUSION GENERALE.....	237
ANNEXES.....	241
Annexe A. Solvants, réactifs et résines	242
Annexe B. Analyse en TLC	244
Annexe C. Extraction des résines	245
Annexe D. Méthode GC (chapitre III)	246
Annexe E. Optimisation de la phase stationnaire (chapitre III)	248
Annexe F. Tableau des résultats de l'évaluation de la linéarité de la méthode d'analyse GC-MS pour les composés volatils (chapitre III)	249

LISTE DES ABBREVIATIONS

1D	Monodimensionnel
2D	Bidimensionnel
2-PrOH	Isopropanol
AcOEt	Acétate d'éthyle
ACP	Analyse en composante principale
ANOVA	Analyse de la variance
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)
APPI	Photo-ionisation à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Photoionisation)
BPO	Peroxyde de benzoyle (Benzoyl peroxide)
BSTFA	N,O-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide
CHCA	Acide α -cyano-4-hydrocinnamique (α -cyano-4-hydrocinnamic acid)
CI	Ionisation chimique (Chemical Ionisation)
CHCl₃	Chloroforme
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DAD	Détecteur à barrette de diode (Diode Array Detector)
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-dihydroxybenzoic acid)
DMAPP	Diphosphate de diméthylallyle (Dimethylallyl pyrophosphate)
DVB	Divinylbenzène (Divinylbenzene)
EI	Ionisation électronique (Electronic Ionization)
ELSD	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière (Evaporative Light Scattering Detector)
ESI	Ionisation par électrospray (Electrospray Ionization)
FID	Détecteur à ionisation de flamme (Flame ionization detector)
FPP	Diphosphate d'isopentényle (Farnesyl diphosphate)
GC	Chromatographie en phase gazeuse (Gas Chromatography)
GGPP	Géranylgéranyldiphosphate (Geranylgeranyldiphosphate)
GPP	Géranyldiphosphate (Geranyldiphosphate)
HMDS	Hexaméthylidisilazane (Hexamethyldisilazane)
HPTLC	Chromatographie sur couche mince à haute performance (High Performance Thin Layer Chromatography)
IPP	Diphosphate d'isopentényle (Isopentenyl pyrophosphate)
LC	Chromatographie en phase liquide (Liquid Chromatography)
LOD	Limite de détection (Limit of detection)
LOQ	Limite de quantification (Limit of quantification)

M	Macération (Maceration)
MAE	Extraction assistée par Micro-ondes (Microwave Assisted Extraction)
MALDI	Source d'ionisation laser assistée par une matrice (Matrix-assisted laser desorption/ionization)
MP	Matrice inorganique
MS	Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
MSTFA	N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (N-methyl-N-trimethyl-trifluoroacetamide)
MTBE	Méthyltertiobutylether (Methyl <i>tert</i> -butyl ether)
MVA	Acétate mévalonate (Acetate mevalonate)
NARP	Phase inverse non aqueuse (Non-Aqueous Reversed Phase)
NP	Phase normale (Normal Phase)
O	Olfatomètre (Olfatometer)
PEG	Polyéthylèneglycol (Polyethylene glycol)
PGC	Carbone Graphite Poreux (Porous Graphitic Carbon)
PDMS	Polydiméthylsiloxane (Polydimethylsiloxane)
PLE	Extraction par solvant pressurisé (Pressurized Liquid Extraction)
PTV	Injecteur à température programmée (Programmed Temperature Vaporizing)
R_f	Rapport frontal (Retention factor)
RP	Phase inverse (Reversed Phase)
RP18	Chaîne alkyle de 18 carbones (Reversed phase C18)
SPME	Micro-extraction sur phase solide (Solid Phase Micro Extraction)
THF	Tétrahydrofurane (Tetrahydrofuran)
TLC	Chromatographie sur couche mince (Thin Layer Chromatography)
TMCS	Triméthylchlorosilane (Trimethylchlorosilane)
TOF	Analyseur à temps de vol (Time Of Flight)
UAE	Extraction par ultrasons (Ultrasound Assisted Extraction)
UV	Ultra-Violet (Ultraviolet)

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure I.1 Structures de l'unité C ₅ , du diphosphate d'isopentényle (IPP) et son isomère allylique, le diméthylallyle pyrophosphate (DMAPP).....	21
Figure I.2 Schéma des deux voies de synthèse des précurseurs IPP et DMAPP et formation des précurseurs de chaque classe de terpènes. Adapté de [14].....	22
Figure I.3 Exemples de squelettes monoterpéniques.	22
Figure I.4 Exemples de structures sesquiterpéniques.	23
Figure I.5 Exemples de structures diterpéniques.	24
Figure I.6 Exemples de structures triterpéniques.	25
Figure I.7 Principales familles de résines végétales.....	28
Figure I.8 Résine Mastic (<i>Pistacia lentiscus</i>) de l'île de Chios.....	29
Figure I.9 Résine Dammar des îles indonésiennes.	29
Figure I.10 Résine Sandaraque du Maroc.	30
Figure I.11 Résine Copal de Manille (Philippine).....	30
Figure I.12 Résine <i>Commiphora wildii</i>	31
Figure I.13 Quelques résines Oliban : <i>Boswellia neglecta</i> du Kenya (A), <i>Boswellia carterii</i> de Somalie (B), <i>Boswellia sacra</i> d'Oman (C) et <i>Boswellia serrata</i> d'Inde (D).....	31
Figure I.14 Chromatogramme de la résine Frankincense obtenue en SPME-GC/MS.	36
Figure I.15 Mécanisme général de la réaction de silylation entraînant la formation du composé silylé.	37
Figure I.16 Structures de quelques agents de dérivation: HMDS, BSTFA et TMCS.....	37
Figure I.17 Schéma de l'injecteur « split/ splitless » (a) et de l'injecteur PTV (b).	39
Figure I.18 Structure des phases stationnaires polysiloxane et polyéthylèneglycol.	39
Figure I.19 Comparaison du mode d'ionisation électronique (EI) et chimique (CI) du composé α -amyrine.	41
Figure I.20 Chromatogrammes en GC-MS de la fraction acides triterpéniques de la résine Mastic après réaction de méthylation.	41
Figure I.21 Structure du carbone graphite poreux PGC (Structure de Warren).....	43
Figure I.22 Chromatogramme de 11 triterpènes en LC-DEDL utilisant une colonne PGC.....	43
Figure I.23 Chromatogramme en LC-UV à 210 nm pour la résine <i>Boswellia carterii</i>	44
Figure I.24 Analyse HPLC-DAD à 210, 250 et 280 nm de la résine <i>Boswellia carterii</i>	45
Figure I.25 Domaine d'utilisation des sources d'ionisation à pression atmosphérique (ESI, APPI et APCI) en fonction de la masse moléculaire et de la polarité des composés à analyser.	46
Figure I.26 Chromatogrammes des résines <i>Canarium madagascariensis</i> (a) et <i>Commiphora mukul</i> (b) en LC-APPI-MS.....	46
Figure I.27 Différentes phases stationnaires utilisées en TLC et classées en fonction de leur polarité.	47
Figure I.28 Analyse de plaque TLC en « gel de silice » F ₂₅₄ sous lampe UV-visible à 254 nm de standards : acide boswellique, acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique et acide 11-kéto- β -boswellique.	48
Figure I.29 Les deux modes de dépôt en TLC. REF : [84].....	49
Figure I.30 Les différents types de cuves disponibles chez CAMAG.	49

Figure I.31 Interface TLC-MS développé par CAMAG.....	52
Figure I.32 TLC-MS analyse de standards triterpéniques : acides ursolique (UA), oléanolique (OA) et bétulinique (BA).....	52
Figure I.33 Spectromètre de masse obtenu pour l' α -amyrine ($R_F = 0.30$) lors de l'analyse TLC-MS utilisant l'interface CAMAG.....	53
Figure I.34 Schéma de principe de l'ionisation MALDI.....	54
Figure I.35 Schéma de principe de l'analyseur à temps de vol (TOF) pour analyser les ions produits par MALDI.....	55
Figure I.36 Schéma de principe du couplage TLC-MALDI-TOF-MS.....	56

Chapitre II

Figure II.1 Les différentes étapes d'une analyse en chromatographie sur couche mince.	76
Figure II.2 Différentes phases stationnaires de silice et silices greffées disponibles commercialement pour l'analyse en TLC.	77
Figure II.3 Les différents types de groupements silanol présents sur un gel de silice.....	78
Figure II.4 Triangle de sélectivité de Snyder.....	81
Figure II.5 Structures des acides triterpéniques étudiés : acide β -boswellique (1), acide α -boswellique (2), acide acétyl- β -boswellique (3), acide acétyl- α -boswellique (4), acide ursolique (5), acide oléanolique (6).	84
Figure II.6 Schéma de la plaque TLC avant migration.....	84
Figure II.7 Elution des acides oléanolique et ursolique sur plaque de silice avec des solvants purs.....	85
Figure II.8 Etape 2 : Ajustement de la force d'élution des solvants purs par ajout d'heptane.....	87
Figure II.9 Etape 3.a : Différents mélanges : dichlorométhane (V)/solvant sous-groupe B testés comme phase mobile.....	89
Figure II.10 Etape 3.a : Différents mélanges toluène (VII)/solvant sous-groupe B testés comme éluant.	90
Figure II.11 Etape 3.a : Différents mélanges Chloroforme (VIII)/ solvant du sous-groupe B testés comme phase mobile.....	91
Figure II.12 Etape 3.b : Différents mélanges AcOEt (VI)/ solvant du sous-groupe B/hexane en proportions (2 : 1 : 7) testés comme phase mobile.....	92
Figure II.13 Etape 4. Mélange de trois solvants de sélectivité différente avec ajout si nécessaire d'hexane pour ajuster la force éluante.	94
Figure II.14 Etape 5. Double élution de la plaque TLC et ajout d'acide.....	95
Figure II.15 Pré-traitement de la plaque de silice à l'iode avant dépôt. Solutés déposés : acide oléanolique (1), mélange d'acides oléanolique et ursolique (2), acide ursolique (3), acide acétyl- α -boswellique (4), mélange des 2 acides acétyles boswelliques α et β (5), acide acétyl- β -boswellique (6).....	96
Figure II.16 Analyse sur gel de silice de cinq standards révélés sous lampe UV à 254 nm(A) et après révélation de la plaque à l'anisaldéhyde (B).....	98
Figure II.17 Analyse sur plaque TLC SiF254 de cinq standards et six résines : acide β -boswellique (1), acide acétyl- β -boswellique (2), acide oléanolique (3), β -amyrine (4), sclaréol (5) résines: Mastic (6), Dammar (7), Commiphora wildii (8), Boswellia serrata (9), Sandarac (10) et Copal (11).	100
Figure II.18 Analyse sur plaque TLC SiF254 de cinq standards et quatre résines : β -amyrine (1), acide β -boswellique (2), acide acétyl- β -boswellique (3), acide 11-kéto- β -boswellique (4), acide	

3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (5). Résines: <i>Boswellia neglecta</i> (6), <i>Boswellia carterii</i> (7), <i>Boswellia sacra</i> (8) et <i>Boswellia serrata</i> (9).....	101
Figure II.19 Elution de la résine <i>Boswellia serrata</i> sur phase stationnaire greffée alkyle en utilisant une phase mobile polaire (RP) (méthanol/eau, 95 :5).....	104
Figure II.20 Elution de la résine <i>Boswellia serrata</i> sur phase stationnaire greffée alkyle en utilisant une phase mobile polaire aqueuse (RP) avec ajout d'acide.....	105
Figure II.21 Elution de la résine <i>Boswellia serrata</i> et de 6 standards sur phase stationnaire greffée alkyle en utilisant une phase mobile polaire non-aqueuse (NARP) en utilisant les compositions de phase mobile acétone/acétonitrile (5 :1, v/v) et acétate d'éthyle/acétonitrile (3 :2, v/v).....	106
Figure II.22 Elution de la résine <i>Boswellia serrata</i> et de 7 standards sur phase stationnaire greffée alkyle avec une phase mobile acétate d'éthyle/heptane (1 :5, v/v).	108
Figure II.23 Elution de 5 standards triterpéniques sur phase stationnaire « gel de silice » et phase greffée alkyle (TLC-RP).....	109
Figure II.24 Analyse TLC de 4 résines <i>Boswellia</i> et de 5 standards sur phase stationnaire Si-C18 avec une phase mobile : acétate d'éthyle/heptane (1 :5, v/v).....	111
Figure II.25 Analyses TLC de la résine <i>Boswellia serrata</i> sur phase stationnaire « gel de silice » et sur phase greffée alkyle.	113
Figure II.26 Représentation de la TLC bidimensionnelle.	114
Figure II.27 Analyse sur plaque TLC SiF254 de cinq standards : acide 11-kéto- β -boswellique (1), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (2), acide β -boswellique (3), acide acétyl- β -boswellique (4), β -amyrine (5)	115
Figure II.28 Analyse sur plaque TLC SiF254 de cinq standards en TLC-2D en testant deux ordres d'élution différents	116
Figure II.29 Analyse sur plaque TLC SiF254 de cinq standards : acide 11-kéto- β -boswellique (1), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (2), acide β -boswellique (3), acide acétyl- β -boswellique (4), β -amyrine (5).....	117
Figure II.30 Analyses TLC-2D des 4 résines <i>Boswellia</i>	118
Figure II.31 Analyses TLC-2D des 4 résines <i>Boswellia</i> après révélation des plaques à l'anisaldéhyde. Avec : acide boswellique (3), acide acétyl boswellique (4).	119
Figure II.32 Principe de l'analyseur TOF en mode réflectron.	123
Figure II.33 Principe pour l'utilisation du couplage TLC-MALDI-TOF-MS pour les composés qui ne sont pas visible sans révélation de la plaque.....	124
Figure II.34 Spectres de masse obtenus pour l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique en MALDI-TOF-MS en mode positif avec 3 matrices : CHCA (A), DHB (B), et la matrice inorganique MP (C).	127
Figure II.35 Spectres de masse de l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique en mode positif utilisant la matrice DHB à 200 mg/mL en mode dipping avec 1 immersion (A) et 3 immersions (B).....	128
Figure II.36 Analyse en mode positif de 5 standards triterpéniques (β -amyrine, acide boswellique, acide acétyl boswellique, acide 11-kéto- β -boswellique et acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique) en utilisant la matrice inorganique MP en MALDI-TOF-MS.	129
Figure II.37 Analyse en mode négatif de 5 standards triterpéniques (β -amyrine, acide boswellique, acide acétyl boswellique, acide 11-kéto- β -boswellique et acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique) en utilisant la matrice inorganique MP en MALDI-TOF-MS.	130
Figure II.38 Analyse de 4 résines <i>Boswellia</i> par TLC-MALDI-TOF-MS.	132

Figure II.39 Schéma de principe pour l'analyse en TLC bidimensionnelle afin de repérer les spots.	134
Figure II.40 Plaque TLC-2D obtenus après élution après lecture sous lampe UV à 254nm et après révélation avec l'anisaldéhyde ainsi que les spectres de masse obtenus après analyse MALDI-TOF-MS de la résine <i>Boswellia serrata</i>	136

Chapitre III

Figure III.1 Structure des triterpènes pentacycliques appartenant aux 3 familles : oléane, ursane et lupane.	144
Figure III.2 Etude graphique des effets sur les différentes réponses : aire du lupéol, de la bétuline et des acides maslinique et ursolique.	150
Figure III.3 Courbe iso-réponse du lupéol et surface de réponse pour le lupéol, la bétuline et les acides ursolique et maslinique.	152
Figure III.4 Analyse en GC-MS (mode d'ionisation électronique) d'un mélange de 11 standards terpéniques après dérivation.	156
Figure III.5 Spectres de masse obtenus en mode d'ionisation chimique (CI) pour le lupéol (a), l'uvaol (b), l'acide oléanolique (c) et acide maslinique (d).	157
Figure III.6 Structure du squalane.	161
Figure III.7 Les 27 standards terpéniques utilisés pour la sélection de la phase stationnaire.	164
Figure III.8 Matrice des données pour l'analyse en ACP.	165
Figure III.9 Analyse en composantes principales (graphique d'observations) basée sur la rétention des 27 solutés sur les 8 phases stationnaires.	166
Figure III.10 Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) pour les 8 phases stationnaires étudiées.	167
Figure III.11 Graphique des observations pour les 27 standards terpéniques.	168
Figure III.12 Analyse GC-FID comparée du mélange : α -pinène (1), β -pinène (2), limonène (3), thuyone (4) et standard interne l'acétate de bornyle (5*) avec l'injecteur split/splitless à 250°C et l'injecteur PTV.	174
Figure III.13 Analyse GC-MS de 27 standards terpéniques dans les conditions de la méthode GC-MS optimisée.	180
Figure III.14 Courbes de linéarité de l' α -pinène, β -pinène, limonène, linalol et thuyone en utilisant l'acétate de bornyle comme standard interne (SI).	182
Figure III.15 Courbes de linéarité de la β -amyrine et de l'acide β -boswellique en utilisant le cholestérol comme standard interne (SI).	182
Figure III.16 Rendements d'extraction pour la résine <i>Boswellia serrata</i> obtenus pour chaque solvant testé et en utilisant la méthode d'extraction par solvant pressurisée (PLE)	185
Figure III.17 Rendements d'extraction pour la résine <i>Boswellia serrata</i> obtenus par extraction par solvant pressurisé (PLE) à 40°C en utilisant 3 et 5 cycles d'extraction.	186
Figure III.18 Distribution relative des terpènes dans la résine <i>Boswellia serrata</i> selon la technique d'extraction.	188
Figure III.19 Analyse en GC-MS de la résine <i>Pistacia Lensticus</i>	190
Figure III.20 Analyse en GC-MS de la résine Dammar.	191
Figure III.21 Spectre de masse du dammaradiénone (56) et du dammaradiénol (57) en mode d'ionisation électronique (EI) et en mode d'ionisation chimique (CI).	192
Figure III.22 Analyse en GC-MS de la résine Copal de Manille. Le carré bleu représente la zone des mono-, sesquiterpènes et le carré rouge la zone des diterpènes.	193
Figure III.23 Analyse en GC-MS de la résine Sandarac.	194

Figure III.24 Analyse en GC-MS de la résine <i>Boswellia serrata</i>	195
Figure III.25 Analyse en GC-MS de la résine <i>Commiphora wildii</i>	196
Figure III.26 Analyse en GC-MS des résines : <i>Boswellia neglecta</i> (a), <i>Boswellia sacra</i> (b), <i>Boswellia carterii</i> (c) et <i>Boswellia serrata</i> (d).....	202

Chapitre IV

Figure IV.1 Cycle d'une méthode d'analyse.	212
Figure IV.2 Etapes pour la validation de méthode.....	214
Figure IV.3 Représentation de la justesse et de la fidélité.	217
Figure IV.4 Analyse GC-MS des 8 standards triterpéniques à 50 mg.mL ⁻¹ avec l'utilisation du cholestérol comme standard interne (IS). Composés : β -amyrine (1), α -amyrine (2), acide α -boswellique (3), acide β -boswellique (4), acide acétyl- α -boswellique (5), acide acétyl- β -boswellique (6), acide 11-kéto- β -boswellique (7) et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (8).....	220
Figure IV.5 Détermination de la spécificité de la méthode avec l'exemple de l'acide β -boswellique dans la résine <i>Boswellia serrata</i>	222
Figure IV.6 Courbes de linéarité des 8 standards triterpéniques en utilisant le cholestérol comme standard interne (SI).	225
Figure IV.7 Analyse GC-MS des 4 résines de type Frankincense avec la distribution relative des composés majoritaires.	231

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau I.1 Résines sélectionnées pour notre étude.....	32
Tableau I.2 Liste non exhaustive des différentes techniques d'extraction et d'analyse mises en œuvre dans la littérature pour la caractérisation de chacune des résines végétales	59

Chapitre II

Tableau II.1 Classification des solvants en fonction de leurs groupes de sélectivité.....	81
Tableau II.2 Tableau récapitulatif des standards majoritaires et identifiés dans les résines de type Frankincense	102
Tableau II.3 Valeurs des rapports frontaux (R_f) des 5 standards terpéniques analysés en TLC 2D.	117
Tableau II.4 Les matrices les plus couramment employées en MALDI.....	125
Tableau II.5 Les biomarqueurs majoritaires identifiés dans les résines de type <i>Boswellia</i> après analyse TLC-MALDI-TOF-MS.	133

Chapitre III

Tableau III.1 Liste non exhaustive de protocoles de dérivation appliqués à l'analyse des triterpènes pentacycliques.	145
Tableau III.2 Matrice expérimentale pour le plan factoriel 2^4 mis en place pour le criblage préliminaire des facteurs expérimentaux.	148
Tableau III.3 Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les trois facteurs étudiés : durée de la réaction, pourcentage en pyridine et pourcentage de BSTFA par rapport au TMCS.	151
Tableau III.4 Valeur optimale obtenue pour chaque réponse ainsi que désirabilité optimale correspondante.	153
Tableau III.5 Evaluation de l'adéquation du modèle pour les quatre réponses : aires du lupéol, bétuline, acide maslinique et acide ursolique.....	154
Tableau III.6 Evaluation de la validité en comparant les aires calculées par le modèle et les aires expérimentales pour chaque soluté.....	154
Tableau III.7 Masses molaires des 11 standards silylés et ion moléculaire obtenu lors de l'ionisation chimique.	158
Tableau III.8 Liste des 9 colonnes sélectionnées pour l'étude.....	160
Tableau III.9 Valeurs des constantes de McReynolds des 5 composés de référence pour les 9 colonnes étudiées et détermination de la polarité globale ($\sum \Delta I$) de chaque colonne.	162
Tableau III.10 Valeurs des constantes de Derringer et de la désirabilité globale, D, des 5 colonnes présélectionnées.	170
Tableau III.11 Température d'ébullition, masse molaire et structure des 5 solutés test utilisés pour optimiser les conditions d'injection avec le PTV.	172
Tableau III.12 Evaluation de la répétabilité de l'injection d'un mélange de standards injecté 3 fois et de trois mélanges préparés indépendamment à une concentration de 25 mg.L ⁻¹	175

Tableau III.13 Aires des pics obtenues (i) SANS et (ii) AVEC évaporation du solvant pour un mélange de 5 standards.	178
Tableau III.14 Différents solvants testés pour l'extraction des composés terpéniques	185
Tableau III.15 Tableau récapitulatif des conditions opératoires pour l'extraction par macération, PLE, microondes et ultrasons.	187
Tableau III.16 Masse d'extrait sec en mg obtenue pour 200mg de résine <i>Boswellia serrata</i> en utilisant quatre techniques d'extraction différentes (conditions en Annexe C) et en utilisant le chloroforme.....	187
Tableau III.17 Liste des composés identifiés dans les résines végétales en GC-MS	197
Tableau III.18 Liste des composés identifiés dans les résines végétales de type Frankincense en GC-MS.....	204

Chapitre IV

Tableau IV.1 Liste des standards utilisés pour la validation de méthode.....	218
Tableau IV.2 Valeurs des LOD et LOQ pour les 8 standards triterpéniques analysés en GC-MS.	223
Tableau IV.3 Résultats obtenus pour les 8 courbes d'étalonnage.....	224
Tableau IV.4 Justesse et précision des analyses le même jour et sur trois jours différents.....	226
Tableau IV.5 Stabilité des 8 standards triterpéniques analysés 1 jour après la dérivation à température ambiante et stockés à -80°C	227
Tableau IV.6 Etude de stabilité pour la résine <i>Boswellia serrata</i> analysée à 4 mois d'intervalle	230
Tableau IV.7 Distribution relative des triterpènes présents dans les résines de type Frankincense.	232
Tableau IV.8 Détermination des concentrations des triterpènes présents dans les résines.....	233
Tableau IV.9 Comparaison des concentrations (g/ 100g de résine sèche) des triterpènes observées dans la littérature [16] et ceux déterminées par la méthode GC-MS mise en place pour la résine <i>Boswellia serrata</i> (Inde).	234

INTRODUCTION GENERALE

Les terpènes constituent le plus vaste ensemble de métabolites secondaires chez les végétaux. Cette classe de composés possèdent de nombreuses propriétés indispensables à la plante et est exploitée par l'homme depuis l'antiquité jusqu'à nos jours dans un large domaine d'applications telles que la cosmétique, l'industrie pharmaceutique et nutraceutique entre autre.

L'objectif de ce travail de thèse est de développer de nouvelles approches pour identifier et quantifier les composés terpéniques présents dans les végétaux (plus précisément les résines végétales) afin d'assurer une caractérisation phytochimique et une authentification plus sûre du matériel végétal. Ce travail sera réalisé en tenant compte de l'évolution des technologies et des outils analytiques pouvant conduire à une facilité et une rapidité d'analyse ou à une simplification des méthodologies analytiques actuelles mises en œuvre.

Parmi la diversité du matériel végétal, on distingue les résines qui sont des sécrétions et exsudats de végétaux possédant une composition terpénique complexe comprenant des composés pouvant être aussi bien très volatils que non-volatils. Du fait de leur utilisation commerciale, la caractérisation des résines est nécessaire afin de certifier leurs origines et d'assurer leur contrôle qualité. L'analyse de ces matrices végétales complexes reste encore un défi, du fait de la grande diversité structurale des molécules les constituant et de la présence de très nombreux isomères. Dans le cas de l'analyse des composés terpénoïdes - métabolites secondaires majoritaires dans les résines -, on retrouve généralement dans la littérature l'application de deux stratégies analytiques différentes selon l'intérêt que l'on porte à l'analyse des composés plutôt volatils ou à celle des composés non volatils et plus polaires. A notre connaissance, aucune méthodologie n'est proposée dans la littérature pour évaluer de façon exhaustive et simultanée l'ensemble des constituants terpéniques (depuis les plus volatils jusqu'au non volatils) présents.

Le besoin de méthodes analytiques rapides et exhaustives pour assurer le contrôle qualité et la certification de ce matériel reste d'actualité dans un contexte d'utilisation de ces matières premières par l'industriel. Tout d'abord, on s'est intéressé à la chromatographie sur couche mince (TLC) appropriée au « screening » d'échantillons car elle permet d'analyser simultanément un grand nombre d'échantillons. Par la suite, dans le but d'avoir une caractérisation plus précise des résines on s'est tourné vers la chromatographie en phase

gazeuse (GC). Pour ces deux techniques chromatographiques on a voulu exploiter toutes les potentialités de leurs couplages à la spectrométrie de masse.

Dans ce manuscrit de thèse, nous présenterons dans le chapitre I l'état de l'art sur la grande diversité structurale des terpènes ainsi que leurs rôles importants pour l'homme. La complexité de l'analyse exhaustive de ces composés dans les résines végétales sera mise en évidence en montrant les limites des méthodes utilisées jusqu'à présent.

Dans le second chapitre, nous présenterons l'analyse du végétal par TLC pour le contrôle rapide des extraits. Tout d'abord, nous montrerons les optimisations effectuées pour obtenir les meilleures conditions de résolution en TLC et par la suite nous démontrerons la faisabilité du couplage à la spectrométrie de masse utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF-MS) pour l'étude des marqueurs majoritaires des résines : les triterpénoïdes.

Le troisième chapitre de thèse sera axé sur la méthodologie mise en place pour analyser de manière exhaustive et simultanée en GC-FID et GC-MS, l'ensemble des terpènes des plus volatils au moins volatils. L'objectif de cette démarche est de pouvoir mettre en évidence des marqueurs minoritaires qui n'auraient pas été révélés par le couplage TLC-MALDI-TOF-MS et dont l'identification participerait à une meilleure connaissance du végétal. Le développement de la méthodologie inclura l'optimisation de l'étape préliminaire de dérivation à l'aide d'un plan d'expérience et l'optimisation des conditions chromatographiques pour la séparation.

Le quatrième chapitre sera dédié à l'analyse quantitative en GC-MS des marqueurs majoritaires des résines de la famille des *Burseraceae* (à savoir les composés triterpéniques). Une démarche complète de validation de la méthode en termes de limites de détection, linéarité, spécificité, répétabilité et stabilité sera présentée préalablement à la quantification.

Pour finir, les conclusions générales et les perspectives de ce travail seront exposées.

Chapitre I BIBLIOGRAPHIE

I.1 INTRODUCTION – LES RESINES VEGETALES

Les résines sont des sécrétions et exsudats de végétaux produites naturellement par des plantes saines (résines physiologiques) ou à la suite de l'attaque d'agents pathogènes (résines pathogènes) [1]. Elles constituent un moyen de défense de la plante et participent également au processus de cicatrisation après une blessure [2].

Elles ont été utilisées par l'homme depuis l'antiquité dans des applications variées car elles possèdent de nombreuses propriétés (adhésives, imperméabilisantes, antiseptiques, aromatiques). Les exsudats de végétaux tels que l'encens ou la myrrhe étaient des produits de haute valeur pour les civilisations anciennes égyptienne, grecque, perse et romaine. A cette époque si l'utilisation des résines était principalement liée à des pratiques religieuses et spirituelles, des propriétés thérapeutiques leur avaient déjà été attribuées. En effet, les résines végétales étaient utilisées lors des rituels d'embaumement. Les égyptiens baignaient directement le corps du défunt ou après une éviscération de la cavité abdominale ou crânienne, dans un mélange de résine et de cires d'abeilles pour bénéficier des vertus antiseptiques de ce matériel et ainsi conserver le corps intact [3]. Les résines, notamment celles de type Frankincense, sont utilisées en médecine traditionnelle chinoise et en médecine ayurvédique pour le traitement de maladies inflammatoires et les douleurs associées [4-6]. Par ailleurs, les résines ont été utilisées dans le domaine artistique depuis l'antiquité [7]. On les retrouve dans de nombreuses œuvres d'art mélangées à des pigments mais également en tant que vernis et liants (meublier, peinture, sculpture) afin d'assurer leur protection et d'améliorer leurs qualités adhésives [8]. De ce fait, elles constituent le matériel végétal souvent présent dans les objets retrouvés en archéologie [9]. De nos jours, les résines végétales sont utilisées dans de nombreuses applications : médicaments, compléments alimentaires, parfumerie ainsi qu'en cosmétique.

Possédant une composition complexe, les résines sont constituées principalement de terpènes. Ces composés constituent le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux comprenant environ 40 000 composés identifiés. La grande diversité structurale de ces métabolites conduit à une large palette d'activités biologiques.

Il apparaît évident que les résines végétales représentent un potentiel très riche pour développer de nouvelles applications cosmétiques et pharmaceutiques mais ceci ne peut se faire qu'en disposant de méthodes analytiques très performantes et robustes pour identifier, caractériser et quantifier leurs teneurs en composés terpéniques.

I.2 BIOSYNTHESE DES TERPENES ET CLASSIFICATION

Les résines ou exsudats végétaux qui font l'objet de notre étude, sont constitués principalement de composés terpéniques. La structure des terpènes d'origine naturelle a été élucidée par deux chimistes Wallach (Prix Nobel de chimie 1910) et Ruzicka (Prix Nobel de Chimie 1938). A partir de leurs observations expérimentales, ils ont développé ce que l'on appelle la règle de l'isoprène « the isoprene rule ». En effet chaque terpène est constitué d'unités en C₅ (2-méthyl,1-3 butadiène), assemblées « tête-à-queue » [10]. Le diphosphate d'isopentényle (IPP) et son isomère allylique, le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) sont les précurseurs conduisant par une succession de réactions enzymo-catalysées aux différents constituants terpéniques [11, 12] (figure I.1).

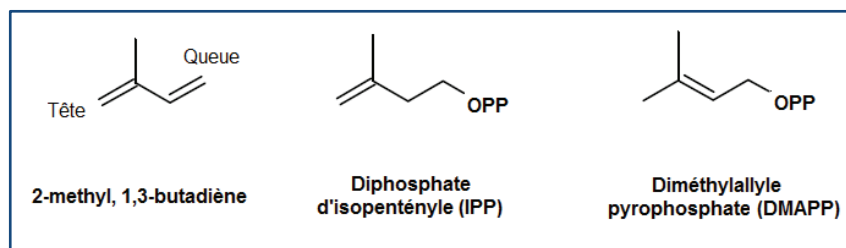


Figure I.1 Structures de l'unité C₅, du diphosphate d'isopentényle (IPP) et son isomère allylique, le diméthylallyle pyrophosphate (DMAPP).

I.2.1 ORIGINE DES UNITES EN C₅

Il existe deux voies distinctes de formation du diphosphate d'isopentényle (IPP) et de son isomère allylique le diméthylallyle pyrophosphate (DMAPP) :

- Voie de l'acétate mévalonate (MVA) (cadre vert figure I.2): Cette voie de synthèse est localisée dans le cytosol de la cellule végétale. L'étape initiale est la condensation de l'acétyl-CoenzymeA qui conduit à la formation intermédiaire du mévalonate sous l'action de nombreuses enzymes puis à la formation de l'IPP et du DMAPP [13]. Ces molécules ainsi formées, constituent les précurseurs pour la synthèse des sesquiterpènes (C₁₅) et des triterpènes (C₃₀).
- Voie du GAP (pyruvate + phosphate de glycéraldéhyde) (cadre bleu figure I.2): Dans le plaste de la cellule végétale, l'IPP et le DMAPP sont formés à partir du pyruvate et du phosphate glycéraldéhyde et constituent les précurseurs pour la synthèse des monoterpènes (C₁₀) et des diterpènes (C₂₀).

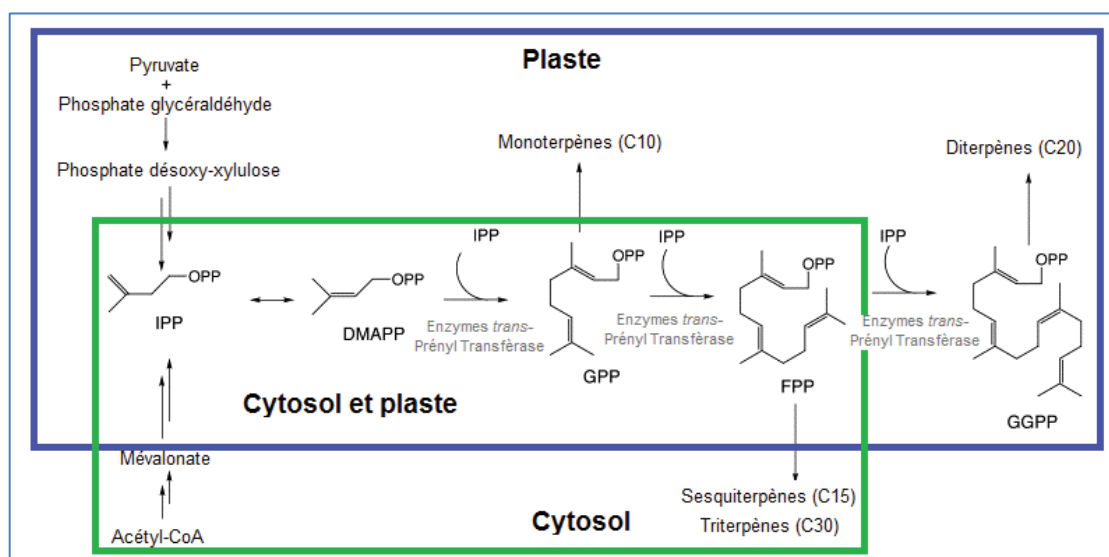


Figure I.2 Schéma des deux voies de synthèse des précurseurs IPP et DMAPP et formation des précurseurs de chaque classe de terpènes. Adapté de [14]

A partir de ces précurseurs principaux, la diversification des terpènes est assurée par des mécanismes de condensation de type « tête-à-queue » via l'action d'enzymes de type trans-Prényl Transférase. On distingue les terpènes volatils (mono- et sesquiterpènes) et les terpènes non-volatils (di- et triterpènes).

I.2.2 LES TERPENES VOLATILS (MONO- ET SESQUITERPENES)

- **MONOTERPENES (C10)**

Les monoterpènes (figure I.3) sont obtenus à partir de la réaction de condensation d'une unité DMAPP avec une unité IPP ce qui entraîne la formation du géranyldiphosphate (GPP, figure I.2). Composés de 10 atomes de carbone comprenant deux unités isopréniques, les monoterpènes peuvent être : linéaires, acycliques (myrcane, etc.) ou monocycliques avec généralement un cycle à 6 atomes de carbone (p-menthane, etc.) ou encore bicycliques (pinane, etc.) (figure I.3). Cette large classe de terpènes est composée de nombreux isomères et comporte des fonctionnalités variées (alcools, aldéhydes, cétones, esters).

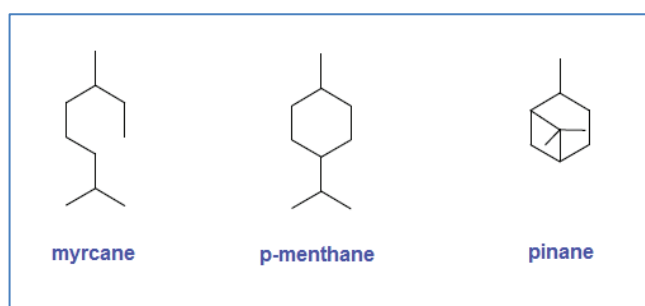


Figure I.3 Exemples de squelettes monoterpéniques.

- **SESQUITERPENES (C15)**

Les sesquiterpènes (figure I.4) sont composés de 15 atomes de carbone et sont issus du précurseur diphosphate d'isopentényle (FPP, figure I.2) correspondant à l'ajout de deux unités IPP à une unité DMAPP. Comme pour les monoterpènes, les cyclisations intramoléculaires additionnelles, réarrangements et oxydations conduisent à un grand nombre de structures se rattachant à plus de 100 squelettes différents décrits (figure I.4).

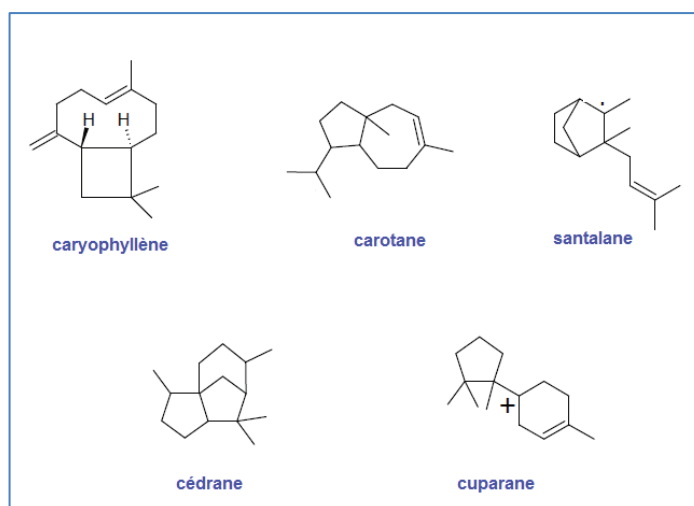


Figure I.4 Exemples de structures sesquiterpéniques.

I.2.3 LES TERPENES NON-VOLATILS (DI- ET TRITERPENES)

- **DITERPENES (C20)**

Formant un vaste ensemble de composés, les diterpènes (figure I.5) sont issus du métabolisme du géranylgeranyldiphosphate (GGPP, figure I.2). Ils possèdent une grande diversité de structures dépendant de leur biogenèse en termes de fonctionnalisation et de stéréochimie. On retrouve différents types structuraux en fonction du nombre de cycles: acycliques linaires (capsianoside) et acycliques avec un cycle lactonique (zoapatanol), macrocycliques (type cembrane), bicycliques (structure labdanes), tricycliques (structures abiétanes, pimaranes, etc) ou tétracycliques (gibberellines) (figure I.5). Dans la nature, les diterpènes sont souvent sous la forme d'alcools ou de leurs dérivés glycosylés, d'éthers, d'aldéhydes, de cétones, d'acides carboxyliques ou d'esters [15].

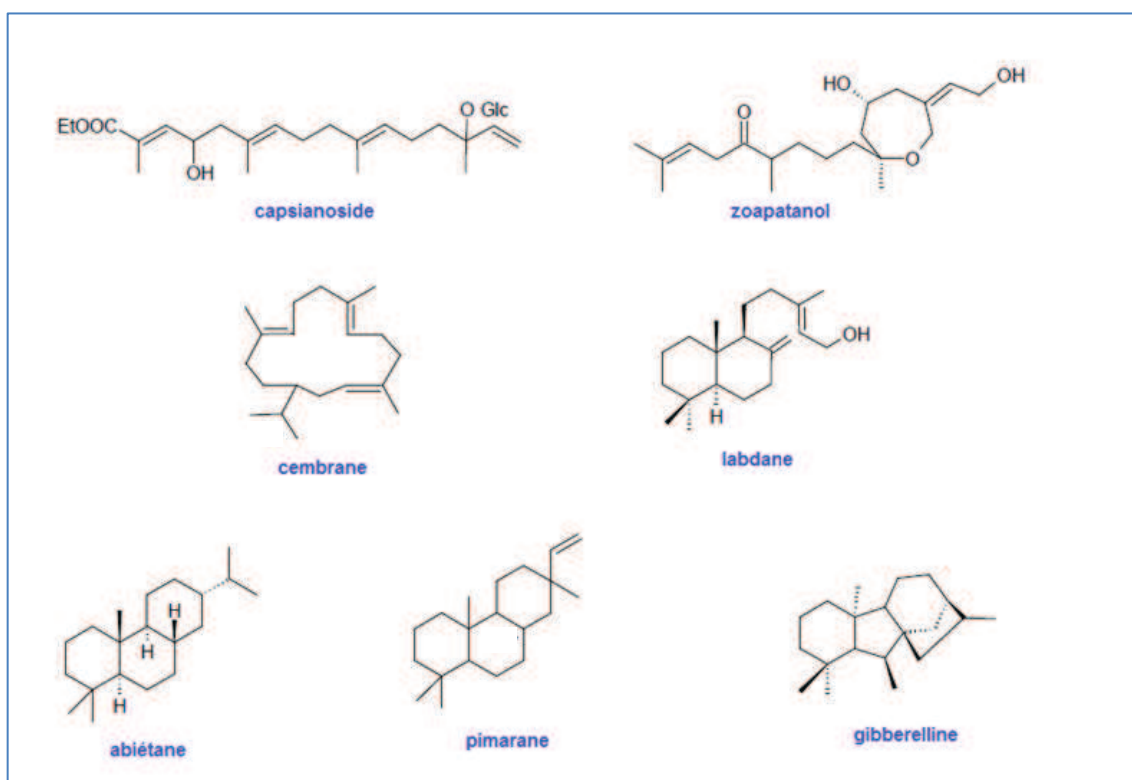


Figure I.5 Exemples de structures diterpéniques.

- **TRITERPENES (C30)**

Les triterpènes (figure I.6) sont issus du couplage réductif de deux unités FPP ($2 \times C_{15} = C_{30}$) (figure I.2). Une succession de cyclisation conduit à la formation de structures triterpénoïdiques variées qui sont regroupées en différentes familles. En fonction du nombre de cyclisation, on distingue les composés appartenant aux séries tétracycliques (dammaranes) ou pentacycliques (oléananes, lupanes, ursanes, friedelanes, taraxastanes) (figure I.6). Les triterpènes pentacycliques sont agencés soit en 5 cycles à 6 atomes de carbone (oléananes, lupanes, ursanes, friedelanes, gammaceranes) soit en 4 cycles à 6 atomes de carbone et 1 cycle à 5 atomes de carbone (ursanes, hopanes).

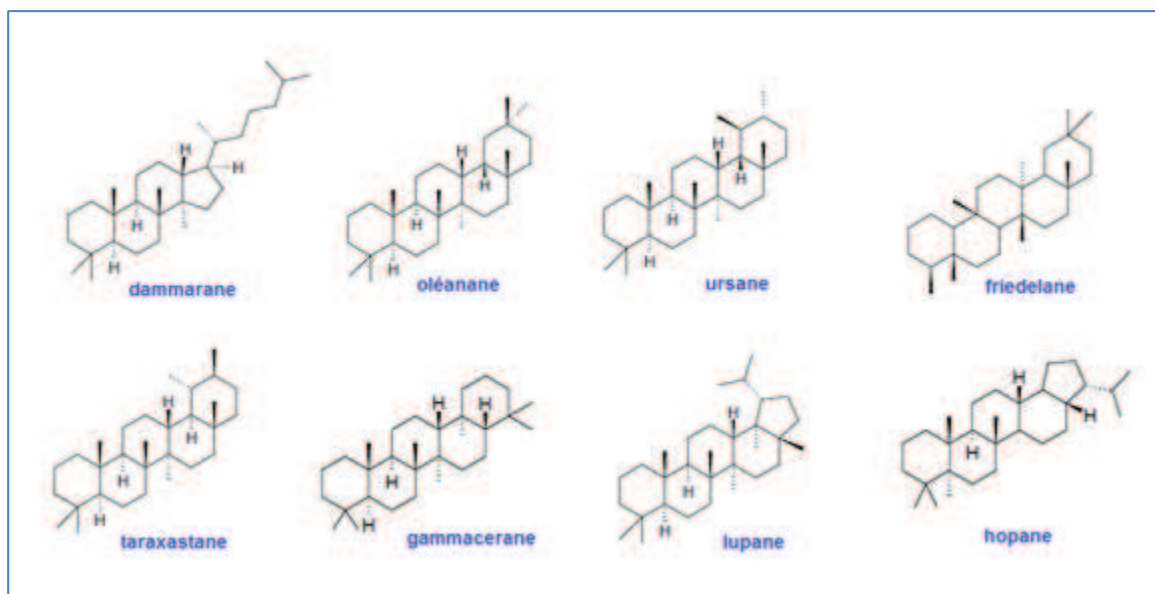


Figure I.6 Exemples de structures triterpéniques.

La famille des terpènes est ainsi constituée de molécules possédant une grande diversité structurale liée à l'agencement de différents cycles, la présence et la position d'insaturations, la position de groupements méthyles, les isoméries dues aux différentes configurations (α ou β , chaise ou bateau) ainsi que la présence de groupements fonctionnels (alcools, cétones, acides carboxyliques, esters) voire d'autres entités moléculaires associées telles que les sucres et acides gras.

I.3 ACTIVITES BIOLOGIQUES DES TERPENES PRESENTS DANS LES RESINES VEGETALES

L'extrême diversité structurale des composés terpéniques, leur confère une large palette d'activités biologiques. En effet, l'intérêt thérapeutique d'un certain nombre de ces terpènes constitue un groupe de métabolites secondaires de première importance pour des applications pharmaceutiques, cosmétiques ou agroalimentaires.

I.3.1 ACTIVITES ANTICANCEREUSES

Utilisés depuis longtemps en médecine traditionnelle de par leurs propriétés antiprolifératives, de nombreuses études ont montrées que certains composés terpéniques sont de puissants agents anticancéreux.

Ils inhibent sélectivement la croissance des cellules cancéreuses comme par exemple l'acide bétulinique qui possède un effet cytostatique freinant la croissance des cellules impliquées dans les tumeurs de la peau [16].

Le lupéol, alcool triterpénique présent dans un certain nombre de résines végétales, montre des effets chimiopréventifs en activant une série d'enzymes antioxydantes (catalase, glutathione peroxidase) qui inhibent le benzoylperoxide (BPO) à l'origine du cancer de la peau [17].

Les monoterpènes ont été décrits comme agents thérapeutiques et chimiopréventifs envers de nombreuses tumeurs cellulaires comme le limonène [18, 19] ou encore le carvone qui a montré un rôle préventif contre le cancer du poumon et de l'estomac [20]. Une autre étude a également montré que les sesquiterpènes présentent des activités pharmacologiques et peuvent être considérés comme agents anticancéreux [21].

I.3.2 ACTIVITES ANTI-INFLAMMATOIRES

Outre leurs propriétés anti-cancéreuses, les terpènes sont bien connus pour leurs activités anti-inflammatoires.

L'acide boswellique, triterpène présent dans les résines de type Frankincense, ou encore l'acide oléanolique présent dans la résine *Pistacia lentiscus* permettent d'inhiber les enzymes 5-lipoxygénase et élastase impliquées dans la synthèse de la leucotriène [22-24], molécule responsable de réponses inflammatoires et d'hypersensibilité comme l'asthme et le rhumatisme.

Ces résines ont été utilisées en médecine traditionnelle seules ou parfois associées avec du curcuma diminuant les symptômes de l'arthrose [25].

Une autre enzyme, la phospholipase A2, est également impliquée dans les réponses inflammatoires. L'inhibition de l'activité de cette enzyme a été mise en évidence en présence de la bétuline et de l'acide bétulinique qui se retrouvent dans différentes espèces de résines [26] ou encore les acides masticadienonique, masticadienolique et morolique présents dans la résine *Pistacia Lentiscus* [24, 26].

I.3.3 ACTIVITES ANTIVIRALES ET ANTIBACTERIENNES

Les effets antimicrobiens et antibactériens des terpènes sont connus depuis longtemps de façon empirique grâce à l'usage traditionnel d'un grand nombre de plantes en tant que désinfectant. Un certain nombre d'huiles essentielles de résines contenant des terpènes volatils sont connues depuis longtemps pour leurs propriétés antiseptiques et utilisées en phytothérapie pour traiter les maladies infectieuses d'origine bactérienne ou antivirale.

De nos jours, ces propriétés ont été démontrées dans plusieurs études. Par exemple, l'huile essentielle de la résine *Pistacia Atlantica* Desf. (Algérie) a montré une activité antimicrobienne vis-à-vis des agents pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* et de souches fongiques avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) inférieures à 10 µg/mL [27]. Tandis que la résine *Pistacia Lentiscus* (Chios) possède des activités antibactériennes dues notamment à la présence du verbénone, α -terpinéol et linalol [28, 29]. De plus, les acides boswelliques, composés majoritaires des résines *Boswellia*, ont montré des activités antibactériennes vis-à-vis de plus d'une centaine de bactéries pathogènes [30].

I.3.4 AUTRES ACTIVITES BIOLOGIQUES

En plus de ces activités anticancéreuses, anti-inflammatoires et antimicrobiennes, les triterpènes possèdent des activités variées : anti-ulcérogénique (amyrine (α et β) et acides oléanolique et ursolique) [31], virostatique (acide bétulinique et ses dérivés) [32, 33], antalgique (acide ursolique, amyrine (α et β)) [34] ou hépatoprotecteur (lupéol, acides ursolique et oléanolique) [35, 36].

Compte tenu de leur large palette d'activités biologiques, les terpènes sont particulièrement attractifs pour un usage pharmacologique. Dans la suite de ce chapitre, nous allons donc introduire les résines terpéniques.

I.4 CLASSIFICATION DES RESINES VEGETALES

Les résines sont des mélanges complexes de substances organiques et constituées notamment de composés terpéniques tels que les mono-, sesqui-, di- et triterpènes. Cependant dans la plus grande majorité des résines, les composés di- et triterpènes ne sont pas présents simultanément [37]. On distingue ainsi deux grands groupes de résines : les résines triterpéniques issues de l'embranchement des Angiospermes et les résines diterpéniques issues de l'embranchement des Gymnospermes (figure I.7).

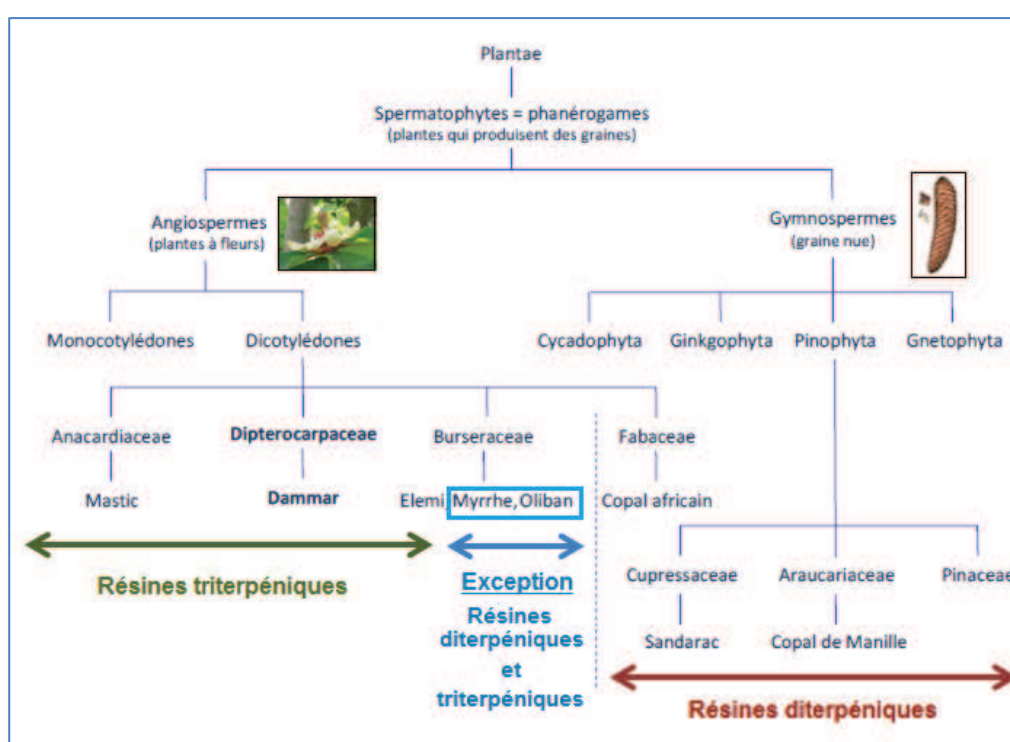


Figure I.7 Principales familles de résines végétales.
Adapté de [38]

I.4.1 CLASSIFICATION DES RESINES VEGETALES

- **LES RESINES TRITERPENIQUES**

Les résines triterpéniques sont formées par des familles du sous embranchement des Angiospermes (plantes à fleurs) tels que les familles Anacardiaceae et Dipterocarpaceae.

Mastic : Cette résine est obtenue par incision répétée des tiges de l'arbuste méditerranéen de l'île de Chios *Pistacia lentiscus* de la famille des Anacardiaceae (figure I.8). Très utilisé dans l'antiquité comme masticatoire parfumé, le mastic a été depuis utilisé en médecine

traditionnelle, en pâtisserie et en cosmétique. Cette résine de couleur jaune clair est caractérisée par la présence de composés de la série des oléananes, lupanes et dammaranes [39-41].



Figure I.8 Résine Mastic (*Pistacia lentiscus*) de l'île de Chios.

Dammar : Cette résine est produite par plusieurs centaines d'espèces appartenant à la famille des Dipterocarpaceae présente notamment sur les îles indonésiennes (figure I.9). Sa brillance, sa transparence naturelle, ainsi que la stabilité de sa couleur au vieillissement font que cette résine est très utilisée en tant que vernis ou adjuvant pour la peinture à l'huile ou à la cire. Proche de la résine mastic, elle est constituée majoritairement de triterpènes pentacycliques appartenant à la série des dammaranes, oléananes et ursanes [42].



Figure I.9 Résine Dammar des îles indonésiennes.

Elemi : Les résines Elémi appartiennent à la famille des Burseraceae dont la plus connue est l'Elémi de Manille, exsudat d'espèces de *Canarium* notamment le *Canarium Luzonicum* de Philippines [43]. Elle a été utilisée en tant que vernis depuis le 19^{ème} siècle [44] et à partir du 20^{ème} siècle, elle est mélangée à la cire dans les procédés de rebasage afin d'augmenter l'adhésivité [45]. La résine fraîche contient environ 20 à 30% d'huile essentielle quant à la partie non-volatile, elle est principalement constituée d' α -amyrine, β -amyrine et d'acides appartenant au groupe des euphanes [46].

- **LES RESINES DITERPENIQUES**

Les producteurs de ces résines sont des plantes qui appartiennent à la famille du sous embranchement des Gymnospermes (graine nue). Ces résines sont constituées majoritaires de diterpènes de la série des abiétanes, pimaranes et labdanes.

Sandaraque (Sandarac): Cette résine de la famille des Cupressaceae est extraite d'arbustes conifères du nord de l'Afrique tel que le cyprès d'Atlas (*Tetraclinis articulata*) (figure I.10). Très utilisée depuis l'antiquité, elle est toujours utilisée en tant que vernis et peinture. Elle est composée principalement d'acides de la série des pimaranes (acide sandaracopimarique, acide callistrique, acide sandaracinique) [47].



Figure I.10 Résine Sandaraque du Maroc.

Copal: résine que l'on retrouve principalement en Inde, en Afrique ou encore en Amérique. Il existe un grand nombre de copals nommés en fonction du lieu d'origine de la résine (copals d'Afrique, copal de Manille, copals d'Amérique du sud) (figure I.11). Ces résines qui sont très dures et avec un point de fusion élevée, connaissent un fort succès pour la confection de bijoux ou encore pour la fabrication de vernis. Du fait de la grande diversité de ces résines, leur composition chimique est très variée. Par exemple, la composition de la résine copal de Manille est plus proche de celle de la sandaraque que de celle des copals africains ou américains et contient majoritairement des acides sandaracopimariques, agathiques et communiques [48].



Figure I.11 Résine Copal de Manille (Philippine).

- **SINGULARITE DE CERTAINS GENRES DE LA FAMILLE DES BURSERACEAE**

Certains genres de la famille des Burseraceae (angiospermes) constituent une exception en synthétisant en plus des mono- et sesquiterpènes, des di- et des triterpénoïdes simultanément [11].

Myrrhe: Les résines Myrrhe sont issues de sécrétion d'arbres du genre *Commiphora* appartenant à la famille des Burseraceae. Provenant d'Afrique telles que la *Commiphora myrrha*, la *Commiphora molmol* ou la *Commiphora wildii* (figure I.12), ces résines sont utilisées en

parfumerie en tant que senteur orientale mais également dans les médicaments pour leurs propriétés thérapeutiques. Cependant, malgré leur utilisation dans de nombreuses applications, il n'existe pas de caractérisation précise de ces résines à l'exception de la *Commiphora myrrha* qui reste la résine la plus étudiée. Généralement, les résines Myrrhe contiennent des mono-, sesqui- et furanosesquiterpenoides avec une teneur importante en triterpénoides [39].



Figure I.12 Résine *Commiphora wildii*.

Oliban ou Frankincense: Ce sont des oléo-gommes aromatiques recueillies à partir des arbres du genre *Boswellia*. Regroupant près d'une vingtaine d'espèces différentes, les résines boswelliques sont originaires d'Afrique (*Boswellia neglecta*, *Boswellia carterii*), du Moyen-Orient (*Boswellia sacra*) ou d'Asie (*Boswellia serrata*) [49] (figure I.13).

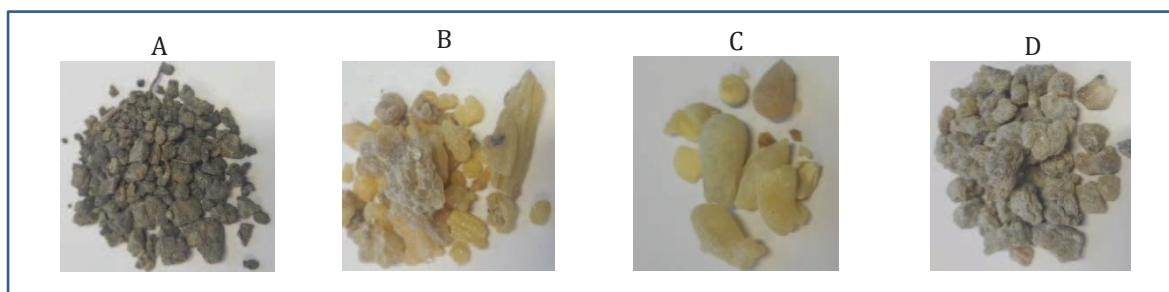


Figure I.13 Quelques résines Oliban : *Boswellia neglecta* du Kenya (A), *Boswellia carterii* de Somalie (B), *Boswellia sacra* d'Oman (C) et *Boswellia serrata* d'Inde (D).

Elles sont utilisées depuis l'antiquité en tant qu'encens dans les cérémonies religieuses et également dans la médecine traditionnelle. De nos jours, elles rentrent dans la composition de médicaments, de compléments alimentaires et sont également utilisées en cosmétique. Les olibans possèdent une riche fraction volatile mais également des triterpènes pentacycliques (acides boswelliques et leurs acétates) que l'on retrouve uniquement dans ces résines [50].

I.4.2 SELECTION DES RESINES ETUDIEES

Compte tenu de la diversité des résines végétales tant du point de vue de leur provenance que de leur composition phytochimique, de leurs usages et activités biologiques, il est important de disposer de méthodes analytiques performantes pour bien caractériser et différencier les résines diterpéniques des résines triterpéniques et ce, d'autant plus que pour certains échantillons l'aspect physique est peu différenciant.

Notre étude s'est donc portée dans un premier temps sur une première sélection de résines représentatives des différentes familles : 4 résines du groupe des Angiospermes (Mastic, Dammar, Myrrhe et Oliban) et 2 résines du groupe des Gymnospermes (Copal de Manille et Sandaraque). Dans un deuxième temps, constatant qu'au sein d'une même famille les similitudes pouvaient être très importantes (c'est notamment le cas pour les résines *Boswellia* appartenant à la famille des Burseraceae), nous avons sélectionné quatre résines *Boswellia* (*Boswellia serrata*, *Boswellia carterii*, *Boswellia sacra* et *Boswellia Neglecta*) très souvent confondues dans le but de développer des stratégies analytiques plus ciblées permettant de caractériser leurs principaux marqueurs moléculaires. Sont regroupées dans le tableau I.1 les neuf résines qui ont été étudiées en tant que modèles pour les développements analytiques que nous avons réalisés. Pour chacune est précisée sa famille botanique et son origine géographique.

Tableau I.1 Résines sélectionnées pour notre étude.

	Résines sélectionnées	Famille	Zone géographique de provenance
Résines triterpéniques	1. Mastic (<i>Pistacia lentiscus</i>)	Anacardiaceae	Europe
	2. Dammar	Dipterocarpaceae	Iles Indonésiennes
Résines triterpéniques et diterpéniques	3. <i>Commiphora wildii</i> (Myrrhe)	Burseraceae	Afrique
	4. <i>Boswellia serrata</i> (Oliban)	Burseraceae	Asie (Inde)
	5. <i>Boswellia carterii</i> (Oliban)	Burseraceae	Afrique (Somalie)
	6. <i>Boswellia neglecta</i> (Oliban)	Burseraceae	Afrique (Kenya)
	7. <i>Boswellia sacra</i> (Oliban)	Burseraceae	Moyen-Orient (Oman)
Résines diterpéniques	8. Copal de Manille	Araucariaceae	Asie (Philippine)
	9. Sandaraque	Cupressaceae	Afrique du nord (Maroc)

I.5 ETAT DE L'ART SUR L'ANALYSE DES TERPENES DANS LES RESINES VEGETALES

Dans ce paragraphe seront présentées les méthodes d'extraction directes des terpènes usuellement utilisées pour caractériser les résines végétales (hydrodistillation, macération, Soxhlet, extraction par ultrasons, extraction micro-ondes et extraction par solvant pressurisé), ainsi que les techniques séparatives (GC, HPLC et TLC) pour analyser les extraits obtenus. Le tableau I. regroupe en fin de chapitre, un état de l'art des différentes techniques d'extraction et d'analyse mises en œuvre dans la littérature pour la caractérisation de chacune des résines végétales (liste non exhaustive).

I.5.1 METHODES D'EXTRACTION DIRECTE DES TERPENES DANS LES RESINES VEGETALES

Pour analyser les résines végétales et identifier les terpènes présents, une première étape préalable d'extraction s'avère indispensable afin d'assurer la désorption des molécules d'intérêt de la matrice solide et parmi les techniques d'extraction les plus utilisées, on retrouve la distillation, la macération ou encore le Soxhlet (tableau I.2).

La **distillation** reste couramment utilisée pour extraire les composés volatils des résines afin d'étudier leurs huiles essentielles. Il existe deux techniques de distillation : *l'hydrodistillation* (le végétal est immergé dans l'eau) et *l'entraînement à la vapeur* (le végétal n'est pas en contact avec l'eau mais avec la vapeur d'eau). Ces procédés conventionnels d'obtention d'huiles essentielles, sont décrits dans la pharmacopée européenne [51] et constituent les procédés de référence. Depuis quelques années, de nouvelles technologies ont été développées afin d'obtenir les huiles essentielles tel que *l'hydrodistillation par micro-ondes sous vide* permettant une réduction considérable du temps d'extraction [52].

Pour l'analyse des terpènes les moins volatils présents dans les résines, l'étape d'extraction est souvent réalisée par dissolution immédiate en utilisant des solvants polaires tels que le méthanol [53-55] ou l'éthanol [56] suivie d'une filtration. Ce protocole est certes rapide pour une identification mais il peut entraîner un biais au niveau de la répétabilité de l'essai et du rendement d'extraction ce qui n'est pas favorable pour l'identification des composés minoritaires ou leur quantification.

La méthode par **macération** utilisant des solvants adaptés pour extraire les composés d'intérêt constitue une amélioration de la dissolution directe. Cette technique se base sur une

dissolution de la résine en la laissant séjourner pendant une durée déterminée (de quelques heures à plusieurs jours) dans le solvant, avec ou sans agitation, à température ambiante ou élevée. Les résines Sandaraque et Copal de Manille ont été ainsi extraites selon ce procédé dans du méthanol à température ambiante pendant 1 heure et l'opération a été répétée avec du méthanol et ensuite du chlorure de méthylène [57]. La méthode de macération peut être longue et peut nécessiter plusieurs extractions successives afin d'épuiser la matière.

La **méthode du Soxhlet** peut être une alternative intéressante pour obtenir un résultat équivalent à des macérations successives. Cette technique utilisant un extracteur Soxhlet qui est une pièce de verrerie permet de faire une extraction en continu de l'espèce à extraire. Dans ces conditions, l'échantillon rentre plus rapidement en contact avec le solvant ce qui permet de déplacer l'équilibre de transfert des molécules d'intérêt vers le solvant. Pour l'extraction des triterpènes contenus dans les résines de type Frankincense, la méthode Soxhlet a été réalisée en 3 heures [58].

En dépit de leur efficacité, ces procédés conventionnels d'extraction des composés naturels sont plutôt longs, fastidieux et consomment un grand volume de solvant. La macération ainsi que le Soxhlet sont de plus en plus remplacés par des techniques d'extraction alternatives plus rapides et plus vertes tel que l'extraction assistée par ultra-sons (UAE).

L'utilisation de **l'extraction assistée par ultra-sons** (UAE, Ultrasound Assisted Extraction) se basant sur l'énergie ultra-sonique permet de faciliter le transfert de matière depuis la matrice vers le solvant d'extraction en créant des cycles de compression et d'expansion. Cette méthode a permis de réduire le temps d'extraction à quelques dizaines de minutes lors de l'étude de triterpènes issus de résines de type Frankincense [59].

D'autres méthodes d'extraction plus rapides et plus modernes telles que **l'extraction assistée par micro-ondes** (MAE, Microwave Assisted Extraction) utilisant l'énergie micro-onde comme source de chauffage du couple solvant-matrice ou encore **l'extraction par fluide pressurisé** (PLE, Pressurized Liquid Extraction) faisant intervenir un fluide comprimé, sont de plus en plus utilisées pour extraire sélectivement les matrices végétales, cependant, ces techniques n'ont pas encore été utilisées pour extraire les terpènes des résines. Nous envisagerons donc dans la suite de notre travail de tester ces méthodes pour extraire les résines.

I.5.2 METHODES CHROMATOGRAPHIQUES POUR ANALYSER LES TERPENES DANS LES RESINES VEGETALES

Compte tenu de la composition phytochimique très riche des résines végétales, des techniques analytiques performantes sont nécessaires pour la séparation et l'identification des composés d'intérêt. Différentes méthodes chromatographiques ont été utilisées dans la littérature pour la caractérisation des terpènes présents tels que la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie en phase liquide (LC, TLC) en couplage avec différents modes de détection.

I.5.2.1 ANALYSE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (GC)

La chromatographie en phase gazeuse est la méthode la plus appropriée à l'analyse des terpènes volatils mais elle peut être utilisée également pour analyser les terpènes les moins volatils (di- et triterpénoïdes) après une réaction de dérivation. Il s'agit de la méthode analytique la plus ancienne et la plus couramment développée pour l'analyse des résines car elle est sensible et spécifique.

A. Préparation d'échantillon avant analyse GC :

- *Composés volatils :*

Dans les publications analysant les composés volatils en GC, l'introduction de l'échantillon (liquide ou gazeux) peut se faire directement ou après une étape de pré-concentration.

Il existe plusieurs techniques de pré-concentration comme la **SPME** (Micro-extraction sur phase solide, Solid Phase Micro Extraction) qui reste largement utilisée. Cette technique développée en 1990 par Catherine Arthur et Janusz Pawliszyn [60] permet d'effectuer à la fois une extraction et une concentration de l'échantillon liquide ou gazeux sur une fibre recouverte d'une phase polymérique. Une étude a permis l'optimisation des conditions SPME en mode espace de tête afin d'analyser les composés volatils à semi-volatils d'une résine olibanum utilisant une fibre de type PDS/DVB (Polydiméthylsiloxane/Divinylbenzène) associée à un temps d'extraction de 60 minutes à 80°C [61]. La figure I.14 met en évidence effectivement une composition riche en composés volatils (mono et sesquiterpènes) pour la résine olibanum tandis que pour les composés semi-volatils tels que les diterpènes, l'information est moins riche et aucune information n'est obtenue à partir de ce mode de préparation d'échantillon sur la présence possible ou non de composés triterpéniques. Cette technique adaptée essentiellement aux composés volatils a permis de déterminer la fraction volatile de 6 résines de type Frankincense ainsi que les marqueurs permettant de les différencier [62].

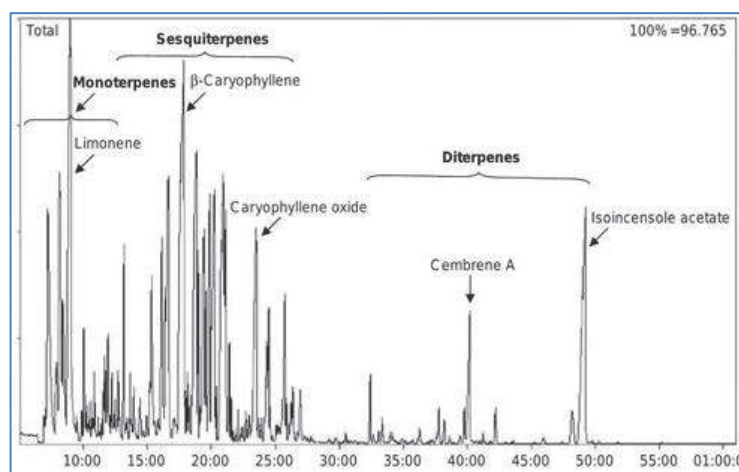


Figure I.14 Chromatogramme de la résine Frankincense obtenue en SPME-GC/MS.
REF [61]

L'utilisation de la SPME a été appliquée à d'autres types de résines permettant d'identifier les furanosesquiterpènes comme composés caractéristiques de la résine Myrrhe (Anacardiaceae) représentant plus de 35% de la fraction volatile ainsi que la forte teneur en α -pinène (59.4% des terpènes volatils) pour la résine Mastic (Anacardiaceae) [63].

Cette étape non-destructive et non-invasive permet de reconcentrer les composés et de les détecter même à faible teneur ce qui est particulièrement intéressant dans le contexte d'analyse d'échantillons archéologiques [62, 63].

- *Composés non-volatils :*

Pour l'étude des composés les moins volatils, une étape de dérivation est nécessaire avant l'analyse en GC. Cette réaction permet de modifier la fonctionnalité des terpènes comportant un groupement hydroxyle afin d'augmenter leur volatilité et de diminuer leur polarité ainsi que d'apporter une stabilité des composés vis-à-vis de la température.

L'étape de dérivation peut être une réaction d'alkylation [41, 56, 57] ou de silylation [64-66]. Ce dernier type de réaction reste le plus utilisé pour les composés terpéniques et notamment les triterpénoïdes. La réaction de silylation consiste à remplacer l'atome d'hydrogène labile du groupement hydroxyle sur la molécule initiale par un groupement silyle (R_3Si-). Cela correspond à une attaque nucléophile (SN_2) sur l'atome de silicium conduisant la molécule à passer par un état de transition avant de se stabiliser sous la forme silylée comme présenté sur la figure I.15.

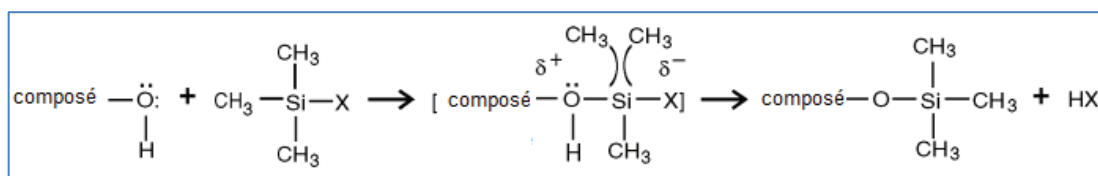


Figure I.15 Mécanisme général de la réaction de silylation entraînant la formation du composé silylé.
X: $\text{CF}_3\text{C}=\text{NSi}(\text{CH}_3)_3$ dans le cas l'utilisation du BSTFA. REF [67]

Pour la réaction de silylation il existe différents types d'agent de dérivation : le N,O-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (BSTFA), l'hexaméthylidisilazane (HMDS) ou le N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (MSTFA). Le MSTFA est un puissant agent de dérivation souvent utilisé pour les composés volatils et thermiquement stables car les sous-produits de la réaction sont très volatils et ainsi le plus souvent non détectés dans le chromatogramme. Quant au HMDS [50] ou BSTFA [9], ils ont souvent été utilisés en association avec du triméthylchlorosilane (TMCS) agissant comme catalyseur pour améliorer le rendement de la réaction (figure I.16). Le BSTFA reste l'agent de dérivation le plus largement utilisé car les sous-produits de la réaction entraînent très peu d'interférence dans le chromatogramme.

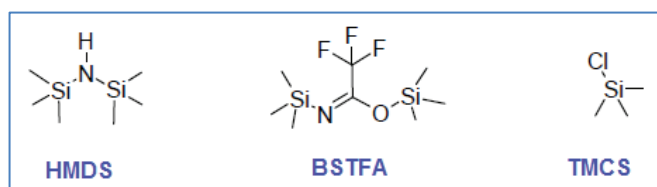


Figure I.16 Structures de quelques agents de dérivation: HMDS, BSTFA et TMCS.

Dans le contexte de l'analyse en GC d'extraits de résines après une dérivation, aucune étude publiée n'a pris en compte, jusqu'à présent, les différences de réactivité des hydrogènes labiles des fonctions alcool ou acide présentes dans les structures terpéniques. Il est donc d'intérêt d'optimiser cette étape de dérivation des extraits afin de s'assurer que les conditions choisies permettent une dérivation totale effective de l'ensemble des composés terpéniques. L'objectif étant d'éviter de créer un biais lors de l'identification et la quantification de ces constituants.

Au vue de l'absence de protocole de dérivation unique permettant l'analyse simultanée de l'ensemble des composés terpéniques, l'optimisation de cette étape de dérivation constituera une partie de notre étude développée dans le chapitre III.

B. Analyse GC

Un appareil de GC est globalement constitué de trois modules : l'injecteur, le four et le détecteur réunis dans un même bâti. La colonne capillaire où s'effectue la séparation est installée dans le four. Le gaz vecteur qui entraîne l'échantillon à l'entrée de la colonne est un gaz inerte, qui dans notre cas a été principalement l'hydrogène ou l'hélium.

- *Injecteur*

L'injecteur permet de vaporiser l'échantillon et de l'introduire en tête de colonne via le flux de gaz vecteur. En GC, il existe trois principaux types d'injecteurs : l'injecteur « split/splitless », l'injecteur-vaporisation à température programmée (PTV) et l'injecteur « on-column ». Ce dernier possède de nombreuses variantes et est peu utilisé pour l'analyse des résines. Nous allons donc nous intéresser plus spécifiquement aux deux injecteurs « split/splitless » et PTV.

L'injecteur « split/splitless » est le plus couramment utilisé en GC. Il permet d'introduire en mode splitless la totalité du contenu de la micro-seringue en tête de colonne ou en mode split d'éliminer une majeure partie de l'échantillon trop concentré par une vanne de fuite dont l'ouverture peut être modulée (figure I.17a). Le facteur de division (split) varie le plus souvent entre 1/20 et 1/500. Pour l'étude des résines végétales en GC, on constate d'après le tableau I.2 qu'il s'agit de l'injecteur le plus utilisé et ce, le plus souvent en mode split.

L'injecteur-vaporisation à température programmée (PTV) est un injecteur « split/splitless » amélioré avec la possibilité de réaliser un gradient de température au niveau de la chambre d'injection (figure I.17b). Initialement, les conditions de température sont choisies de telle sorte que le solvant soit vaporisé et éliminé par la vanne de fuite. Cette vanne est ensuite fermée et l'insert chauffé afin que les solutés soient transférés dans la colonne. Ce type d'injecteur est adapté notamment pour l'étude des composés thermolabiles qui risquent de se dégrader à haute température. Compte tenu du nombre de paramètres à optimiser, ce mode d'injection reste le plus délicat à mettre en place.

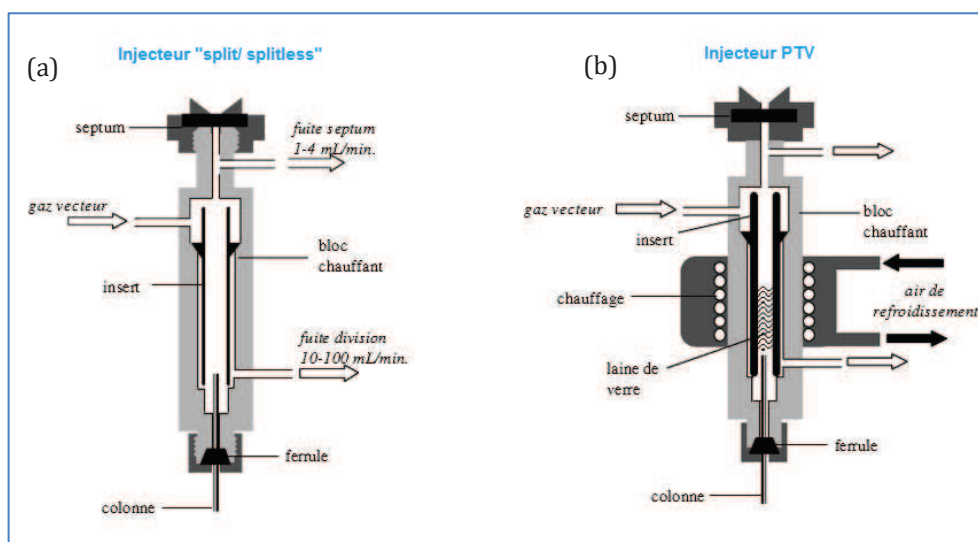


Figure I.17 Schéma de l'injecteur « split/ splitless » (a) et de l'injecteur PTV (b).
REF [68]

Nous montrerons par la suite l'importance du choix du type d'injecteur notamment pour l'étude des composés volatils et thermolabiles en comparant les injecteurs split/splitless et PTV après optimisation des différents paramètres (chapitre III).

- *Phase stationnaire*

La séparation des terpènes a lieu généralement dans des colonnes capillaires utilisant une phase stationnaire apolaire tel que les phases polysiloxanes greffées de type diméthylpolysiloxane (95%) / diphénylpolysiloxane ou diméthylpolysiloxane (5%) [41, 69-71] (figure I.18). Néanmoins pour la séparation de terpènes volatils, des phases stationnaires polaires de type polyéthylèneglycol (PEG) peuvent être également utilisées [72] (figure I.18). En effet, une grande majorité des monoterpènes possèdent des fonctions polaires et l'utilisation des phases PEG permet d'avoir une rétention plus forte et des pics de meilleure symétrie pour ces solutés. Pendant longtemps cette phase n'a pas été utilisée pour le couplage avec le spectromètre de masse car elle était non greffée entraînant alors un niveau de bruit de fond élevé du fait du relargage régulier de la phase (bleeding).

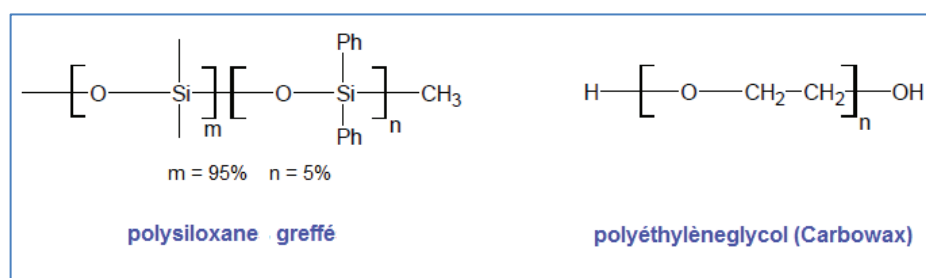


Figure I.18 Structure des phases stationnaires polysiloxane et polyéthylèneglycol.

Les phases stationnaires chirales qui sont des polysiloxanes contenant entre 10 et 25 % de cyclodextrine modifiée ont également été utilisées pour l'analyse des composés volatils des résines. Ainsi l'utilisation d'une colonne chirale a permis de différencier 2 résines olibanum très proches, souvent confondues et assimilées à une seule et même espèce végétale à savoir les résines *Boswellia carterii* et *Boswellia sacra*. [73].

- *Détecteur*

L'étude de matrices complexes est souvent réalisée en utilisant le détecteur à ionisation de flamme (FID) ou le spectromètre de masse (MS).

Le détecteur FID est le plus courant des détecteurs en GC de par sa bonne sensibilité et son caractère quasi universel pour les composés organiques. Les composés carbonés véhiculés dans le gaz vecteur en sortie de colonne sont brûlés dans une flamme air-hydrogène, produisant des ions qui sont collectés pour produire un signal électrique proportionnel à la concentration des ions détectés. Ce type de détecteur est très simple d'emploi et très intéressant pour effectuer une première approche de la complexité des mélanges analysés et des proportions relatives des différents constituants présents mais il ne permet pas d'accéder à une information sur la structure des composés élués. Il nécessite donc de disposer d'un large panel de standards pour l'identification des solutés séparés.

L'utilisation de la spectrométrie de masse permet d'obtenir une information chimique et structurale des composés très utile lors de l'absence de standards. En effet, la GC-MS constitue un puissant outil permettant d'obtenir un spectre de fragmentation pour chaque composé. En sortie de colonne, le composé élué est tout d'abord ionisé utilisant l'ionisation électronique (EI, Electron Ionization) ou l'ionisation chimique (CI, Chemical Ionization) fonctionnant sous vide. Pour le mode EI, un faisceau d'électrons de 70 eV entraîne une fragmentation importante riche en information structurale. En revanche le mode CI, réputé plus doux, utilise pour l'ionisation un gaz réactif auxiliaire (généralement du méthane pour le mode positif) ce qui conduit à des réactions de type ions-molécules. Ce type d'ionisation permet d'avoir une ionisation plus douce et d'observer l'ion moléculaire. Par la suite, les ions formés sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) utilisant des analyseurs de type quadripôle (simple ou triple) ou trappe d'ions. La figure II.19, représente les spectres de masse obtenus pour l' α -amyrine après dérivation ($M_w = 498 \text{ g.mol}^{-1}$) en mode d'ionisation électronique (EI) et chimique (CI). L'ion moléculaire déprotoné $m/z 497.5 [M+H-H_2]^+$ est observé uniquement en mode CI.

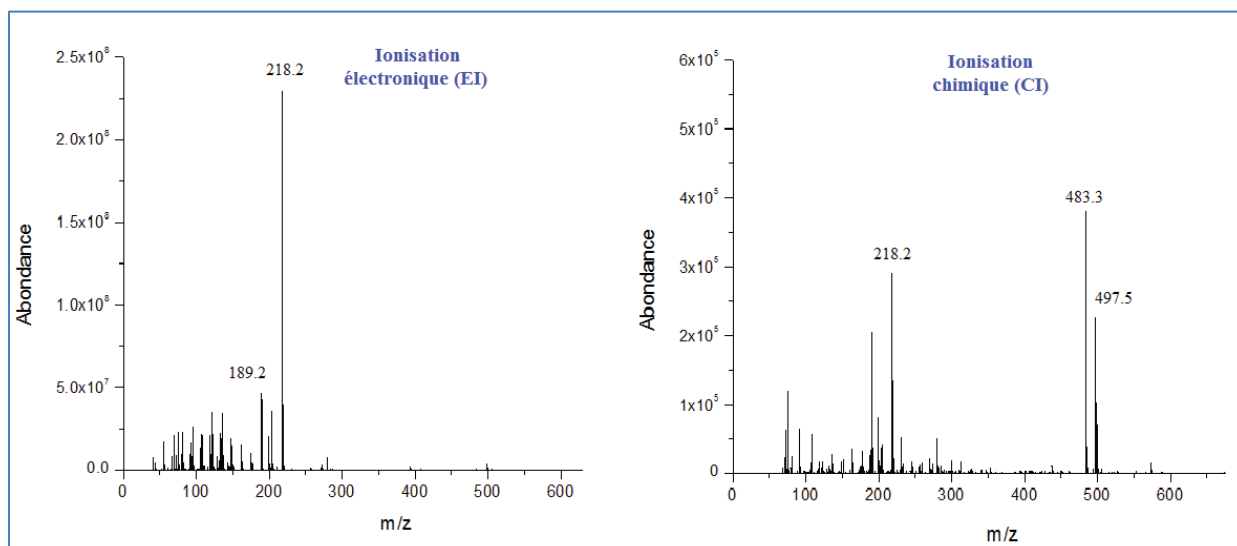


Figure I.19 Comparaison du mode d'ionisation électronique (EI) et chimique (CI) du composé α -amyrine.

Le couplage GC-MS a été beaucoup utilisé pour la caractérisation de résines provenant d'échantillons archéologiques disponibles en très faible quantité. Par exemple, l'étude de la fraction triterpénique des résines *Boswellia* après dérivation avec le BSTFA a permis d'identifier les acides boswelliques et leurs *O*-acétates comme étant les marqueurs caractéristiques des résines de type Frankincense ce qui a permis ensuite de mettre en évidence la présence de ce type de résines dans des échantillons archéologiques [50, 64, 65]. La GC-MS a permis également de caractériser les triterpènes penta- et tétracycliques présents dans la résine *Pistacia lentiscus* de la variété Chia [40, 41] avec l'identification des acides moronique (1), oléanolique (2), isomasticadienonique (3) et masticadienonique (4) (figure I.20).

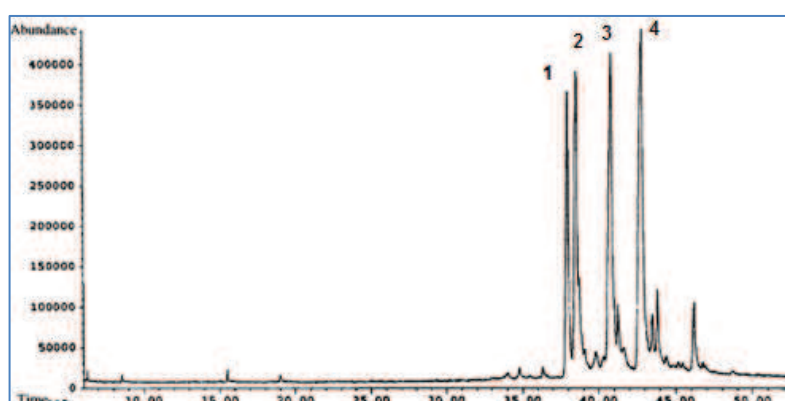


Figure I.20 Chromatogrammes en GC-MS de la fraction acides triterpéniques de la résine Mastic après réaction de méthylation.

Identification des acides moronique (1), oléanolique (2), isomasticadienonique (3) et masticadienonique (4).
Conditions : colonne HP-5ms (30m x 0.25 mm ID x 0.11 μ m), injecteur à 280°C, gradient de température (de 180°C à 300°C) REF : [40]

D'autre part, les résines possédant des odeurs caractéristiques plus ou moins intenses en fonction de leur origine, très souvent le nez humain est utilisé pour identifier et différencier les résines selon leur provenance. Dans ce contexte, le couplage GC/olfactométrie (GC/O) s'avère très intéressant et très utile. En permettant d'associer les odeurs à la présence de composés actifs, une validation plus sûre des matières premières caractérisées par le nez humain peut être obtenue par ce couplage ainsi que la possibilité d'approfondir les études sur l'impact olfactif des terpènes volatils. Considérant la richesse des composés odorants de la résine *Boswellia sacra*, une étude aromatique utilisant la GC bidimensionnelle (2D-GC-MS/O) a permis d'identifier plus d'une vingtaine de composés [74]. Par ailleurs, l'utilisation de la pyrolyse couplée à la GC-MS/O a permis d'identifier les odeurs des composés non-volatils des résines de type Frankincense [75] utilisées en tant qu'encens lors des cérémonies religieuses.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est un outil puissant pour l'identification structurale et la quantification de composés terpéniques volatils ou non volatils après dérivation dans des matrices complexes. Néanmoins il ressort de notre étude bibliographique que la méthode GC-MS bien que très largement utilisée pour l'analyse des résines végétales, ne l'a été que dans le cadre d'analyses ciblées sur une ou au plus deux familles terpéniques données. Aucune approche méthodologique visant l'analyse simultanée de l'ensemble des familles terpéniques présentes dans une résine n'a été développée et optimisée. Dans ces conditions une partie importante de notre travail expérimental a consisté à proposer une méthodologie optimisée pour répondre à ce manque en vue de caractériser la composition phytochimique d'une résine donnée par une empreinte chromatographique la plus exhaustive et la plus riche possible.

1.5.2.2 ANALYSE EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE (LC)

A la différence de la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie en phase liquide (LC, Liquid Chromatography) est une méthode bien adaptée pour l'analyse directe (sans dérivation) des composés peu volatils tels que les di- et triterpénoïdes. Si l'efficacité des colonnes est moindre en LC comparée à la GC, la LC présente l'avantage de pouvoir ajuster les sélectivités entre solutés en modifiant la composition de la phase mobile liquide. Par ailleurs, la LC offre un large choix de phases stationnaires pour obtenir des sélectivités différentes dans le cadre de l'analyse de mélanges complexes.

- *Phases stationnaires*

Pour l'étude des composés terpéniques, le mode chromatographie à polarité de phases inversée est le mode de séparation le plus courant et les phases stationnaires composées de silices greffées avec des chaînes carbonées comprenant 8 ou 18 atomes de carbone sont celles

principalement utilisées [59]. Cependant, ces colonnes n'offrent pas de sélectivité satisfaisante dans le cas de la séparation des nombreux isomères présents dans la classe des terpènes. Pour résoudre ces problèmes particuliers, de nouveaux supports ont été développés tel que le Carbone Graphite Poreux (PGC, Porous Graphitic Carbon) sélectif vis-à-vis des isomères. Ce support possède une structure rigide en feuillets et une absence de groupements silanol (figure I.21) lui conférant ainsi un fort potentiel d'hydrophobeconjugué à une possibilité unique d'interactions polaires et ioniques.

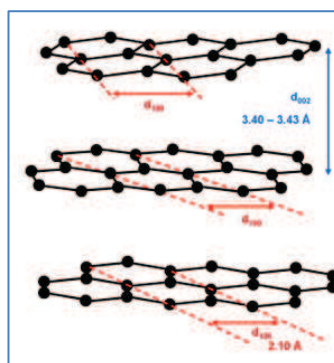


Figure I.21 Structure du carbone graphite poreux PGC (Structure de Warren).
REF : [76]

La séparation des isomères de position tels que les acides oléanolique, bétulinique et ursolique, ainsi que celle du lupéol, de la β -amyrine et de l' α -amyrine est possible sur la colonne de type PGC (Figure I.22). Ce type de phase stationnaire a été utilisé avec succès pour étudier des résines végétales permettant de séparer 11 triterpènes dont certains isomères [77].

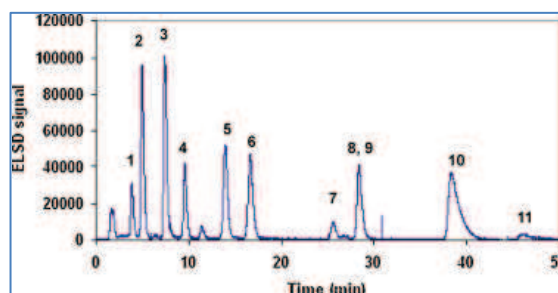


Figure I.22 Chromatogramme de 11 triterpènes en LC-ELSD utilisant une colonne PGC.

Condition : Colonne Hypercarb (100 mm × 2.1 mm; 5 μ m) avec un gradient d'élution acétonitrile/isopropanol à 25°C et un débit de 0.2 mL/min: acide bétulinique (1), bétuline (2), acide danielique (3), acide oléanolique (4), acide ursolique (5), friedline (6), erythrodiol (7), uvaol (8), lupéol (9), β -amyrine (10) et α -amyrine (11). REF : [77]

- *Phase mobile*

Pour l'analyse des composés di- et triterpéniques en chromatographie à polarité de phases inversée les phases mobiles sont constituées le plus souvent d'eau (solvant A) et de méthanol [58] ou d'acétonitrile [59] (solvant B). Les analyses sont réalisées soit en mode isocratique soit en gradient d'élution. De plus, souvent un faible pourcentage d'acide (acide acétique ou acide

phosphorique) est ajouté dans la phase mobile afin de diminuer le pH de la phase mobile pour améliorer l'efficacité des séparations des composés acides (amélioration de la symétrie et de la finesse des pics chromatographiques) [78].

- *Détecteur*

Il existe plusieurs types de détecteurs qui peuvent être couplés à la chromatographie liquide tels que le détecteur UV-visible, le détecteur à barrette de diode (DAD), le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD) ou le spectromètre de masse (MS).

Le système de détection le plus courant en chromatographie liquide est le détecteur UV-visible. Les terpénoïdes n'ayant pas de groupement chromophore fort, leur analyse par LC-UV est souvent réalisée à faibles longueurs d'ondes. Un exemple d'application de ce couplage est l'analyse des acides boswelliques dans les résines de type *Boswellia* à 210nm (figure I.23) [59].

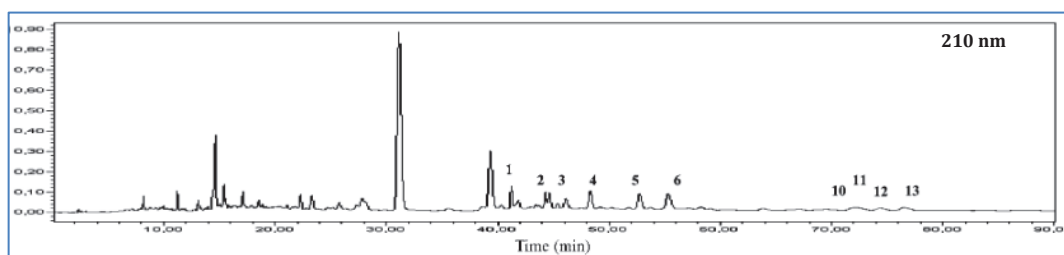


Figure I.23 Chromatogramme en LC-UV à 210 nm pour la résine *Boswellia carterii*.

Composés identifiés : acide lupéolique (1), acide α -boswellique (2), acide β -boswellique (3), acide 3-O-acétyl lupéolique (4), acide 3-O-acétyl acide α -boswellique (5), acide 3-O-acétyl acide β -boswellique (6), β -amyrenone (10), α -amyrenone (11), 3-épi- β -amyrine (12), 3-épi- α -amyrine (13). Conditions : Colonne C18 à 30°C, gradient d'élution : eau/acide phosphorique (A) et acétonitrile/acide phosphorique(B) REF : [59]

Le détecteur à barrettes de diodes (DAD, Diode Array Detector) a été également utilisé permettant de mesurer directement l'absorbance des solutés en sortie de colonne chromatographique simultanément à plusieurs longueurs d'onde. Pour l'analyse des triterpènes dans les résines de type Frankincense, l'analyse a été réalisée à 210, 250 et 280 nm permettant la séparation et la quantification de 12 composés [58]. En fonction des propriétés des composés la détection à 210 nm est adaptée aux acides boswelliques (α et β) et lupéolique, celle à 250 nm pour l'acide 11-kéto- β -boswellique et celle à 280 nm pour les acides 9,11-dehydro- α/β boswellique (figure I.24) [58].

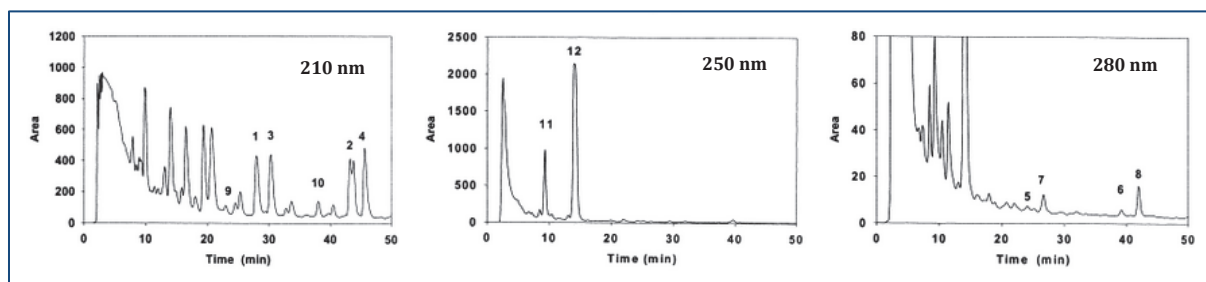


Figure I.24 Analyse HPLC-DAD à 210, 250 et 280 nm de la résine *Boswellia carterii*.

Conditions : Phase stationnaire : ReproSil-Pur ODS-3 et phase mobile en gradient d'élution: eau/acide acétique (A) et méthanol/acide acétique (B) à 28°C. REF :[58]

D'autres détecteurs couplés à la LC sont mieux adaptés à l'étude des composés qui n'ont pas de groupement chromophore tel que le Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière (ELSD, Evaporative Light Scattering Detector). Ce détecteur quasi-universel permet de détecter une molécule dès lors qu'elle est moins volatile que la phase mobile. Le détecteur ELSD fonctionne en trois étapes : nébulisation de l'échantillon mélangé à un gaz inerte, évaporation de la phase mobile puis détection des solutés en fonction de la lumière diffusée par leurs particules solides. Ce type de détecteur a été utilisé pour l'étude des résines de type Frankincense et notamment lors de l'optimisation des conditions de séparation de différents standards de type triterpènes pentacycliques [77].

En vue d'identifier les différents terpènes présents dans les extraits de résines, la spectrométrie de masse apporte une information structurale complémentaire qui reste essentielle et indispensable.

Le couplage de la LC à la spectrométrie de masse (MS) est possible via l'utilisation de différentes sources d'ionisation à pression atmosphérique: ESI (Electrospray Ionization), APPI (Atmospheric Pressure Photoionisation) et APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation). La source d'ionisation ESI est la plus adaptée aux composés polaires renfermant des fonctions avec des protons mobiles (acides) ou des molécules facilement protonables (bases) (figure I.25). Cela implique pour cette source que l'ionisation des acides triterpéniques est favorisée par rapport à celle des triterpènes diols ou alcools.

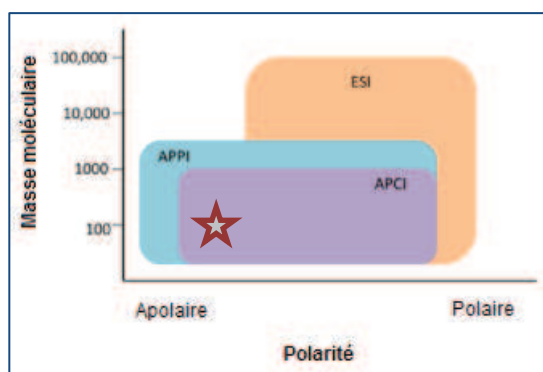


Figure I.25 Domaine d'utilisation des sources d'ionisation à pression atmosphérique (ESI, APPI et APCI) en fonction de la masse moléculaire et de la polarité des composés à analyser.
Adapté de [79]

D'après la figure I.25, on constate que les sources APPI et APCI sont adaptées à l'étude de l'ensemble des composés triterpéniques dans les matrices végétales [80]. Une étude a permis d'analyser par LC-MS sur colonne PGC, les résines (*Commiphora mukul* et *Canarium madagascariensis*) et de caractériser leurs constituants triterpéniques majoritaires en utilisant le mode d'ionisation APPI [77]. D'après la figure I.26, on constate que pour la résine *Canarium madagascariensis* les composés isomères (1 et 2) sont bien séparés et que pour la résine *Commiphora mukul*, 4 triterpènes sont identifiés dont un couple d'isomères (composés (4)-(5)).

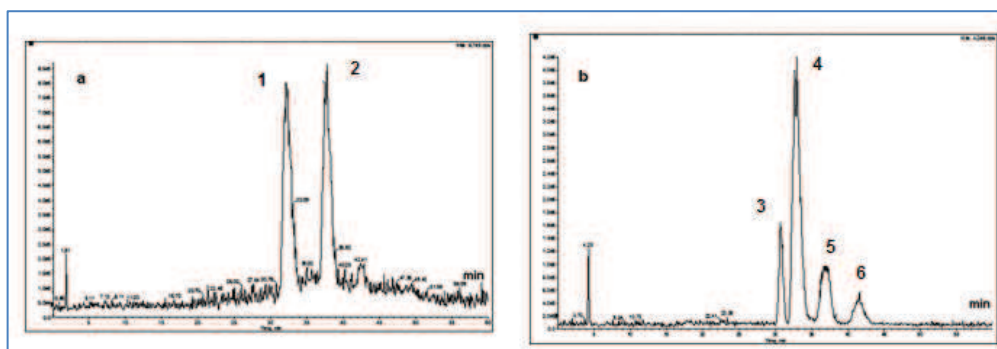


Figure I.26 Chromatogrammes des résines *Canarium madagascariensis* (a) et *Commiphora mukul* (b) en LC-APPI-MS. Conditions : 25°C sur une colonne PGC utilisant MeCN-iPrOH en gradient. Les ions moléculaires $[M+H]^+$ des pics : m/z 425.5 (1), m/z 425.5 (2), m/z 425.5 (3), m/z 441.5 (4), m/z 441.5 (5), m/z 423.5 (6). REF : [77]

La chromatographie en phase liquide permet la séparation de nombreux composés di et triterpéniques mais son pouvoir résolutif reste néanmoins insuffisant vis à vis des nombreux composés terpéniques présentant des structures très proches. Même en utilisant un support tel que le PGC dont la planéité est favorable à la séparation selon la conformation spatiale des molécules, les 2 isomères, uvaol et lupéol, très présents dans les extraits végétaux, restent co-élus. De plus, la chromatographie en phase liquide n'étant pas adaptée à l'analyse des composés volatils, cette technique ne nous est pas apparue pertinente en première intention pour réaliser de nouveaux développements méthodologiques en vue de la caractérisation simultanée de l'ensemble des terpènes (des mono aux triterpènes) de la façon la plus exhaustive possible.

I.5.2.3 ANALYSE EN CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (TLC)

La chromatographie sur couche mince (TLC, Thin Layer Chromatography) est une technique complémentaire à la LC car basée sur les mêmes principes de distribution du soluté entre une phase solide et une phase mobile liquide. Elle est souvent utilisée pour le « screening » rapide d'extraits végétaux. En effet, cette technique est rapide, peu coûteuse et la seule permettant d'analyser simultanément plusieurs échantillons. Cette technique est devenue une méthode incontournable pour l'analyse et le contrôle rapide des matières premières et ce, d'autant plus que l'automatisation maintenant possible des différentes étapes de l'analyse conduit à une amélioration certaine de la reproductibilité. L'analyse en TLC est organisée en trois étapes : le dépôt, l'élution et la révélation.

- Les plaques TLC, le dépôt et les conditions d'élution

La phase stationnaire est étalée en fine couche (100 à 200 µm d'épaisseur) sur une plaque (rectangulaire ou carré) d'aluminium ou de verre. Actuellement, il existe une large variété de phases stationnaires polaires à non polaires : phase de silice vierge et phases greffées (propyl-diols, amino-propyl, cyano-propyl, alkyle) (figure I.27).

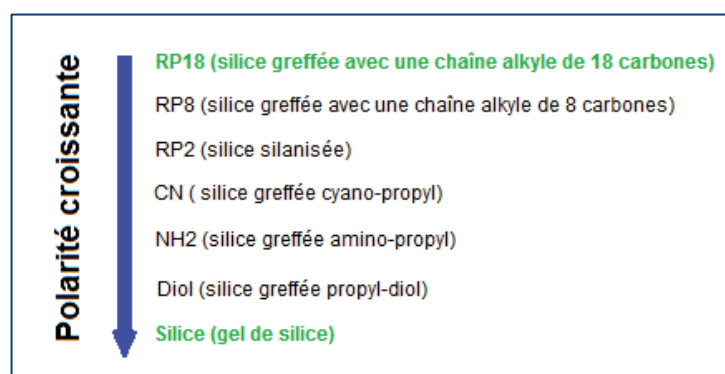


Figure I.27 Différentes phases stationnaires utilisées en TLC et classées en fonction de leur polarité.

La granulométrie de la phase stationnaire définit deux types de plaque : la plaque TLC ordinaire (10 à 15 µm) ou la plaque TLC haute performance (HPTLC) (3 à 10 µm). La diminution de la granulométrie et l'amélioration de l'homogénéité du dépôt de la phase stationnaire sur la plaque support permettent d'augmenter la résolution des séparations (gain d'efficacité) et la sensibilité de la méthode.

Pour faciliter la détection, la couche active peut être additionnée au moment de son dépôt d'un indicateur fluorescent (sel de zinc activé) ce qui permet l'identification de composés par inhibition de la fluorescence à 254 nm (d'où l'appellation F 254 pour ces plaques).

Pour l'étude des composés terpéniques dans les résines végétales, les phases de silice vierge restent les plus utilisées [54, 55, 81, 82]

La figure I.28 présente un exemple de plaque TLC de silice 60 F 254 analysée à 254 nm après le dépôt et la migration de 3 acides triterpéniques : les acides boswellique (1), 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (2) et 11-kéto- β -boswellique (3).

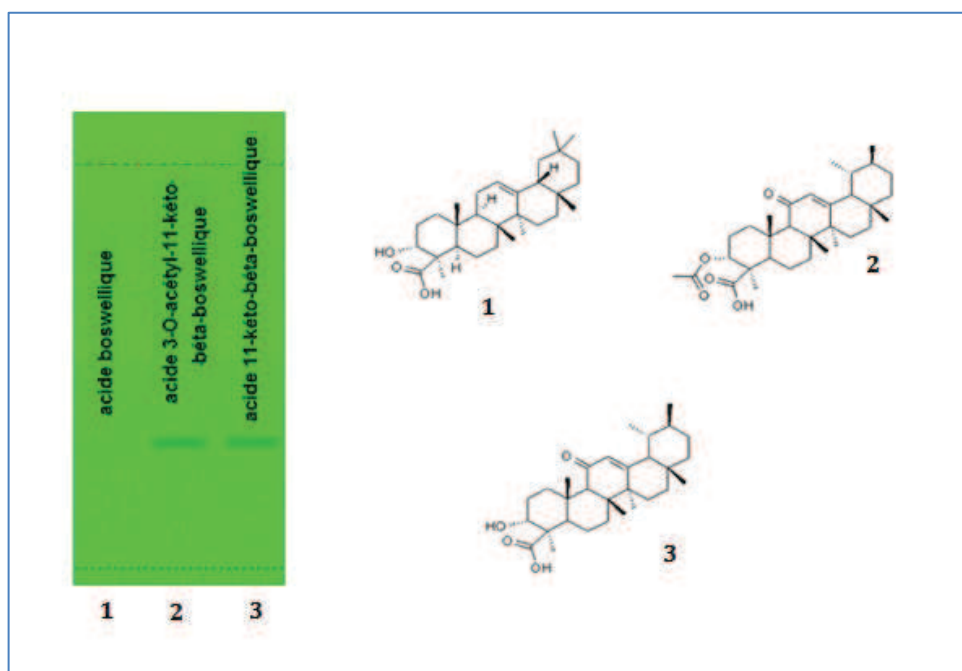


Figure I.28 Analyse de plaque TLC en « gel de silice » F₂₅₄ sous lampe UV-visible à 254 nm de standards : acide boswellique, acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique et acide 11-kéto- β -boswellique.

Conditions : Phase mobile : acide formique-heptane-acétate d'éthyle-toluène (3 : 10 : 20 : 80, v/v/v/v). REF : [83]

Le dépôt de l'échantillon est effectué à environ 1 cm du bord inférieur de la plaque et peut se faire de 2 façons :

- sous forme d'une tâche de 1 à 3 mm de diamètre (Mode SPOT). Le composé est alors déposé par un capillaire entraînant sa pénétration dans la plaque (figure I.29).

- ou sous forme d'une bande horizontale de quelques mm de largeur par pulvérisation de l'échantillon à la surface de la plaque (Mode SPRAY) en utilisant un courant d'azote. Ce courant de gaz permet de déposer l'échantillon sous forme de fines gouttelettes tout en séchant au fur et à mesure le dépôt limitant ainsi le phénomène de diffusion et d'élargissement de bande sur la plaque. Ce dernier mode automatisable est de plus en plus utilisé permettant d'améliorer la résolution et la sensibilité (figure I.29).

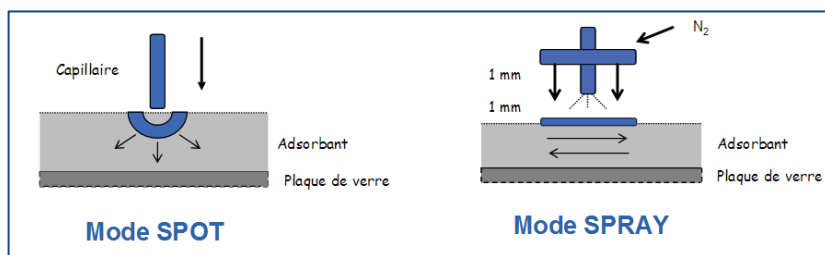


Figure I.29 Les deux modes de dépôt en TLC. REF : [84]

En TLC, la **phase mobile** se déplace par capillarité. L'élution a lieu dans des cuves d'immersion qui peuvent être verticales (cuves à fond plat ou double bac) ou horizontales (figure I.30). De nos jours, les systèmes ont évolués et il existe désormais des cuves automatiques permettant les développements séquentiels qui peuvent être utilisées en mode gradient avec possibilité de contrôle de l'humidité. Ces améliorations et différentes automatisations permettent maintenant de garantir une bonne reproductibilité de l'analyse, d'améliorer la sensibilité et de limiter la consommation de solvant.



Figure I.30 Les différents types de cuves disponibles chez CAMAG.
REF : catalogue CAMAG

La composition de la phase mobile doit tenir compte de la polarité du soluté et de sa solubilité dans les solvants. Un mélange de solvants est généralement utilisé comme éluant afin de moduler la force d'élution comme en HPLC. Pour des analyses d'échantillon sur plaque « gel de silice », un solvant apolaire est souvent utilisé (hexane, heptane ou pentane) comme « solvant de base » permettant d'ajuster la rétention (valeur du rapport frontal, R_f) en association avec un autre solvant plus polaire qui permet d'apporter la sélectivité recherchée par des interactions spécifiques (solvant protique, aprotique, donneur de protons, interactions dipôle-dipôle...). Par exemple, pour l'étude des résines végétales, les phases mobiles de type : n-hexane/acétate d'éthyle [54, 85], hexane/chloroforme/méthanol [86] ou pentane/éther diéthylique [55] en association avec des phases stationnaires de silice vierge sont les plus couramment choisies. Un acide est souvent ajouté à l'éluant tel que l'acide phosphorique ou l'acide acétique pour limiter les phénomènes de diffusion (élargissement des spots, trainées diffuses) et augmenter ainsi la résolution.

- *La révélation*

Les composés terpéniques étant incolores (non détectables en lumière blanche), il est donc nécessaire de les révéler soit sous une lampe UV soit après dérivation à l'aide d'un révélateur chimique spécifique. Seules les molécules qui absorbent à 254 nm seront visibles sous lampe UV en utilisant une plaque TLC fluorescente (comme par exemple les acides 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique et le 11-kéto- β -boswellique présents dans les résines de type *Boswellia* (figure I.28).

Pour la majorité des composés terpéniques ne possédant pas de groupement chromophore, une réaction de dérivation post-chromatographique est nécessaire afin d'introduire des groupements chromophores ou fluorophores. Pour l'étude des composés terpéniques, l'anisaldéhyde en milieu acide sulfurique est généralement utilisé permettant la révélation des fonctions cétones, aldéhydes, alcools présentes sous forme de tâches ou bandes violettes visibles en lumière blanche. Dans ces conditions, l'attribution des spots se fait par comparaison des rapports frontaux avec ceux de composés de référence.

Par ailleurs, pour aller plus loin dans un contexte d'analyse quantitative ou pour archiver tout simplement les plaques TLC, il est possible d'en faire une lecture en utilisant des scanners densitométriques permettant de visualiser les spots sur la plaque sous forme de pics chromatographiques. Les composés peuvent être détectés soit avant révélation de la plaque s'ils absorbent en UV-visible soit à 560 nm si la plaque est révélée à l'anisaldéhyde. Cette technique de détection est précise permettant de réaliser des études quantitatives. En effet, l'utilisation de la détection densitométrique a permis la détection et la quantification des quatre composés majoritaires présents dans deux échantillons de résine *Boswellia serrata* d'Inde [54].

Un certain nombre de travaux ont déjà été publiés en utilisant la TLC comme outil de screening pour différencier certaines résines végétales. Par exemple les travaux de Paul et al., ont permis d'analyser différentes résines de type Frankincense permettant d'identifier des marqueurs spécifiques à la *Boswellia serrata*, *Boswellia papyrifera* et *Boswellia carterii/sacra*. Dans l'ensemble de ces résines, l'acide acétyl-boswellique, l'acide boswellique, l'acide 11-kéto-boswellique et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto-boswellique ont été identifiés et sont des marqueurs des résines de type *Boswellia*. En revanche, certains composés sont caractéristiques d'une espèce de résine comme l'acétate incensole que l'on retrouve uniquement dans la *Boswellia papyrifera* et l'oxyde β -caryophyllène dans les résines *Boswellia carterii/sacra*. Par ailleurs, les résines *Boswellia carterii* et *Boswellia sacra* n'ont pas pu être différenciées et ont été assimilées à une seule et même espèce [55].

- *Couplage TLC à la spectrométrie de masse*

L'attribution des spots lors de l'analyse en TLC d'un mélange inconnu est basée le plus couramment sur la comparaison du rapport frontal (R_f) d'une tâche révélée avec celui d'un standard. Dans le but de confirmer et/ou certifier l'identification des composés faite selon ce protocole, la spectrométrie de masse apparaît comme un outil complémentaire indispensable pour élucider leur structure. Développés depuis les années 1980, différents types de couplage sont possibles entre la chromatographie sur couche mince (TLC) et la spectrométrie de masse.

Contrairement aux méthodes chromatographiques LC ou GC où le composé récupéré en sortie de colonne chromatographique est véhiculé dissous dans la phase mobile (liquide ou gazeuse) en TLC, les composés sont adsorbés sur la silice et leur détection se fait à la surface même du support solide qui les « piègent ». En vue du couplage à la spectrométrie de masse, il devient nécessaire de désorber les composés de la phase stationnaire solide pour effectuer leur ionisation indispensable à toute détection par MS. Longtemps, cette étape de désorption a été réalisée par grattage manuelle de la plaque afin d'isoler les spots à analyser suivi d'une reprise sélective des composés dans un solvant approprié. Ce mode opératoire est évidemment assez fastidieux, long et peut entraîner des risques de contamination. Deux principaux appareillages sont maintenant commercialisés pour faciliter la désorption automatique des solutés et leur transfert vers la source d'ionisation du spectromètre de masse : l'interface TLC-MS développée par la société CAMAG d'une part et d'autre part, le spectromètre de masse de type MALDI-TOF MS permettant l'introduction directe de la plaque dans la source d'ionisation (société Bruker). Ces deux approches sont très complémentaires car chacune est compatible avec des sources d'ionisation et des analyseurs différents. Selon le type d'appareillage MS disponible au laboratoire, il est possible de s'orienter alors vers le choix de l'un ou de l'autre type d'instrument pour assurer un couplage TLC-MS.

Couplage TLC-MS via l'interface CAMAG

L'interface TLC-MS développée par la société CAMAG (figure I.31) permet d'extraire et d'aspirer sélectivement de la plaque TLC, les composés élués dans un spot donné pour les véhiculer ensuite en phase liquide soit directement vers la source d'ionisation d'un spectromètre de masse soit vers l'injecteur d'un système séparatif LC couplé à un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API). D'un point de vue pratique, l'interface comprend un piston mobile qui est positionné sur le spot au moment de l'aspiration et permet simultanément d'apporter au niveau de la surface de la plaque la veine de solvant issu d'un système de pompage LC secondaire. L'excès de silice qui peut se détacher de la plaque au moment de l'aspiration est filtré en ligne.

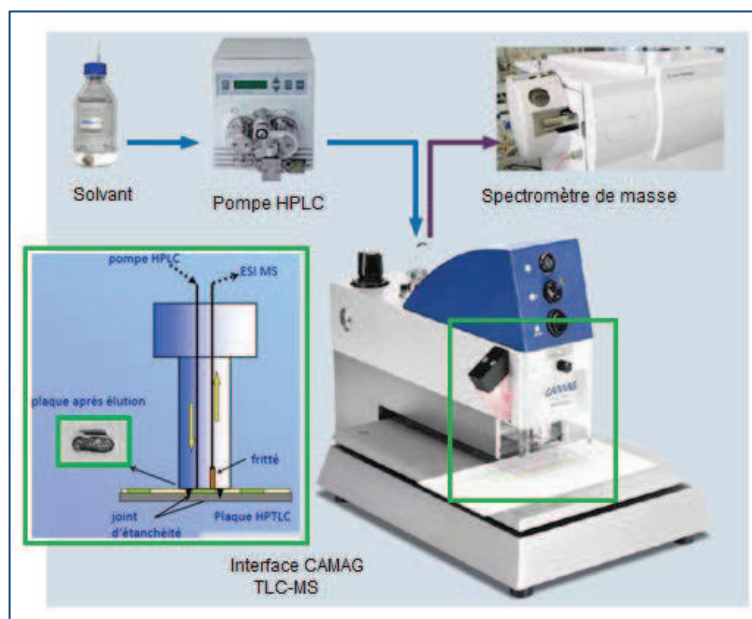


Figure I.31 Interface TLC-MS développé par CAMAG.
Adapté de [87].

L'utilisation de ce dispositif en couplage avec un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation de type APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique) en mode négatif a permis avec succès de confirmer la présence de 3 standards triterpéniques (acides oléanolique, bétulinique et ursolique) dans divers extraits de plantes [88]. Les différents constituants présents dans ces extraits avaient été préalablement séparés sur plaque HPTLC C₁₈ RP et élués avec une phase mobile constituée d'un mélange n-hexane/acétate d'éthyle (5 :1, v/v) (figure I.32).

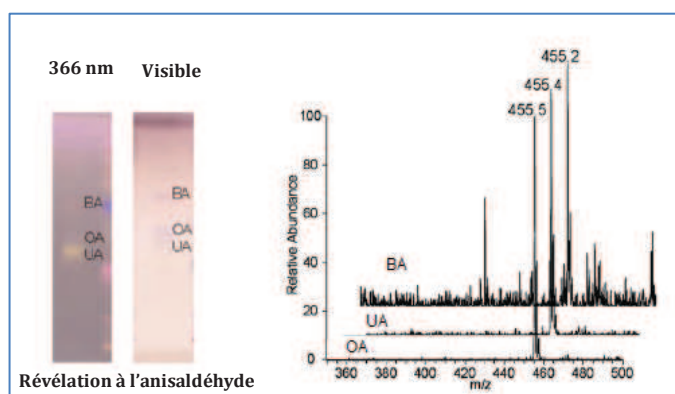


Figure I.32 TLC-MS analyse de standards triterpéniques : acides ursolique (UA), oléanolique (OA) et bétulinique (BA).
Conditions: Elution sur plaque HPTLC C₁₈ RP élution avec n-hexane-acétate d'éthyle (5 :1, v/v). REF :[88]

Une deuxième étude publiée par la même équipe de recherche [89] a permis d'étendre les premiers résultats à l'analyse d'autres composés triterpénoïdes renfermant des fonctions alcool secondaire.

La figure I.33 illustre sur l'exemple de l' α -amyrine (R_F de 0.30) comment peut être associé un spectre de masse à un rapport frontal donné.

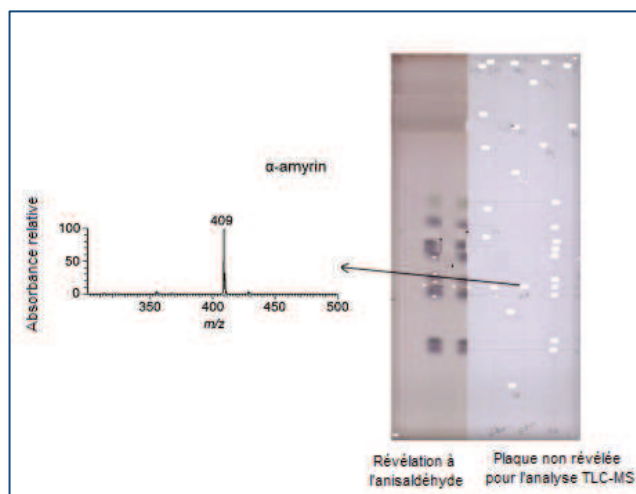


Figure I.33 Spectromètre de masse obtenu pour l' α -amyrine ($R_F = 0.30$) lors de l'analyse TLC-MS utilisant l'interface CAMAG.

Condition : Plaque HPTLC C18 RP éluée avec de l'acétate d'éthyle-acétonitrile (3 :2, v/v). REF : [89]

Comme il l'a déjà été mentionné, les composés triperpéniques n'étant pas visibles à la lumière blanche, il n'est pas possible de repérer directement leur position sur la plaque après leur élution. Une étape de dérivation est indispensable pour leur détection visuelle. Dans le cas du couplage avec la spectrométrie de masse, cette étape de dérivation n'est plus nécessaire au principe même de la détection (c'est-à-dire aux modes d'ionisation et d'acquisition du spectre de masse caractéristique de chaque soluté) mais reste néanmoins indispensable pour faire le repérage de la position des spots à analyser et positionner correctement l'interface CAMAG au-dessus de chaque bande éluée. Pour cette raison chaque analyse est dupliquée sur la plaque. Après l'étape d'élution et de séchage, une partie de la plaque est dérivée (partie gauche de la plaque, figure I.33) pour servir de référence pour l'autre partie de la plaque qui sera analysée en spectrométrie de masse. La figure I.33 permet également de visualiser l'état de la plaque TLC au niveau de chaque spot analysé après l'utilisation de l'interface CAMAG. Les bandes blanches observées sur la partie droite de la plaque, mettent en évidence la détérioration irréversible de la phase stationnaire après le transfert des solutés vers la source d'ionisation du spectromètre de masse. Par ailleurs, la largeur des bandes aspirées ne pouvant être ajustée au niveau de l'interface, cela constitue une limite dans le cas de la caractérisation de bandes d'élution possédant une faible résolution. Des re-mélanges de composés pourront alors être observés lors de la détection et venir compliquer l'interprétation des spectres de masse.

Couplage direct TLC-MALDI-TOF-MS :

L'utilisation d'une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF-MS) peut constituer une alternative intéressante pour le couplage TLC-MS. Le format plan des plaques TLC est un atout indéniable pour le couplage direct de cette technique séparative avec une source d'ionisation de surface telle que la source MALDI. Le couplage direct LC-MALDI a été développé dans les années 90 en premier lieu pour l'analyse des peptides (800-1300 Da) et celle des petites protéines (3000-19 000 Da). Nous présenterons tout d'abord le principe du MALDI-TOF-MS avant de nous intéresser à son couplage avec la TLC.

Principe du MALDI-TOF-MS

La source de désorption et d'ionisation assistée par matrice (MALDI) a été introduite en 1988 par Karas et Hillenkamp [90]. Cette technique d'ionisation se décompose en deux étapes majeures (figure I.34):

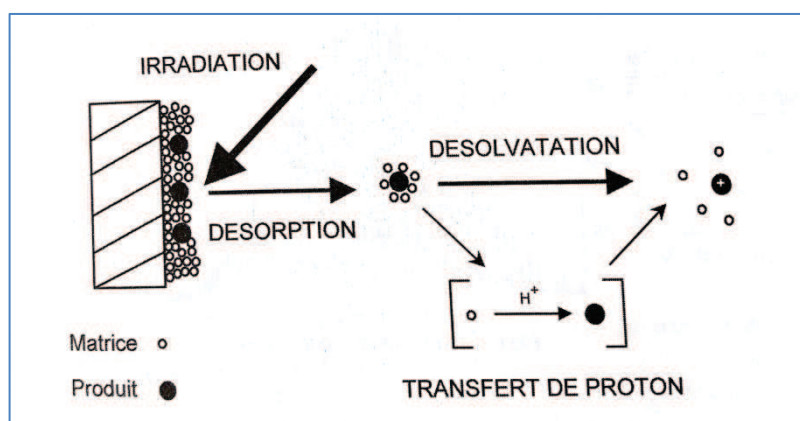


Figure I.34 Schéma de principe de l'ionisation MALDI.
REF : [91]

(1) l'échantillon à analyser est mélangé à une matrice présente en large excès qui a la propriété d'absorber dans le domaine d'émission du laser. Ce mélange est déposé sur une cible MALDI métallisée ou bien une plaque TLC. Le solvant est évaporé à l'air libre avant l'analyse.

(2) Sous vide, le faisceau laser (généralement laser azote à la longueur d'onde de 337 nm et une énergie de 3.68 eV) entraîne l'ablation du dépôt échantillon-matrice par des impulsions rapides. Les ions sont formés par transfert de proton entre la matrice photo excitée et la substance à analyser lors de l'étape de désolvatation. Ils sont par la suite éjectés de la surface et accélérés vers l'analyseur à temps de vol (TOF) à l'aide d'un champ électrostatique.

Les ions pulsés obtenus par la source MALDI ne permettent pas le couplage de cette méthode d'ionisation avec tous les types d'analyseurs. L'analyseur à temps de vol (TOF) est bien adapté pour analyser les ions produits par MALDI car il permet de déterminer un spectre de masse pour chaque paquet d'ions produits dans la source. Le principe du TOF repose sur la séparation des ions qui sont accélérés dans le tube de vol (zone libre de champ) en fonction de leurs rapports masse/charge. Le détecteur recueille les ions qui arrivent à des temps différents et enregistre le spectre de masse (figure I. 35).

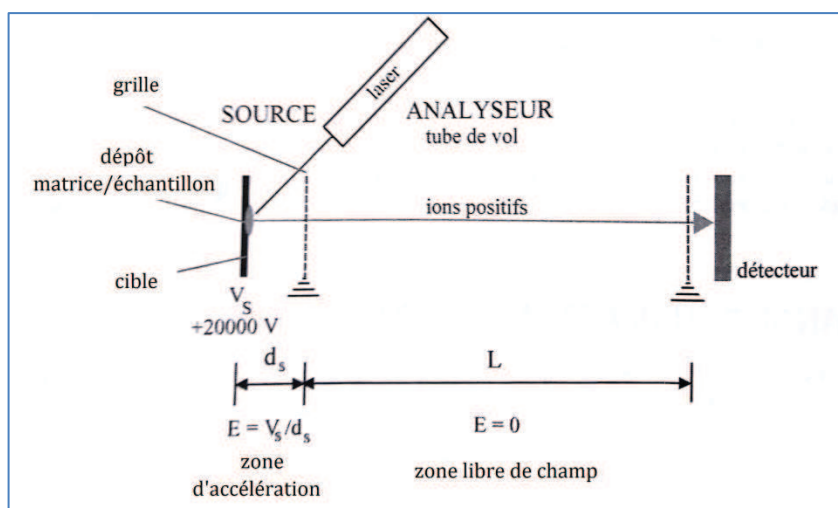


Figure I.35 Schéma de principe de l'analyseur à temps de vol (TOF) pour analyser les ions produits par MALDI.
REF : [91]

Couplage TLC-MALDI-TOF-MS

Comme on a pu le voir précédemment, l'utilisation du MALDI-TOF-MS permet de réaliser une ionisation de surface du mélange échantillon-matrice. Ce type d'ionisation est bien adapté au couplage avec la chromatographie planaire (TLC). En effet, on peut réaliser une analyse directe des spots adsorbés sur la plaque TLC et obtenir leurs spectres de masse correspondants.

La figure I.36 présente le principe du couplage TLC-MALDI-TOF-MS. Tout d'abord, une séparation des échantillons à analyser est effectuée sur la plaque TLC. Après élution et séchage de la plaque, la matrice est déposée sur les bandes d'intérêt puis la plaque TLC est placée dans un adaptateur qui est ensuite introduit dans le spectromètre de masse (MALDI-TOF-MS). La source laser va alors désorber directement sur la plaque TLC et ioniser le dépôt échantillon-matrice. Les ions formés seront ensuite triés en fonction de leur rapport respectif masse sur charge (m/z) dans l'analyseur à temps de vol avant d'atteindre le détecteur. Un spectre de masse pourra alors être associé à chaque spot.

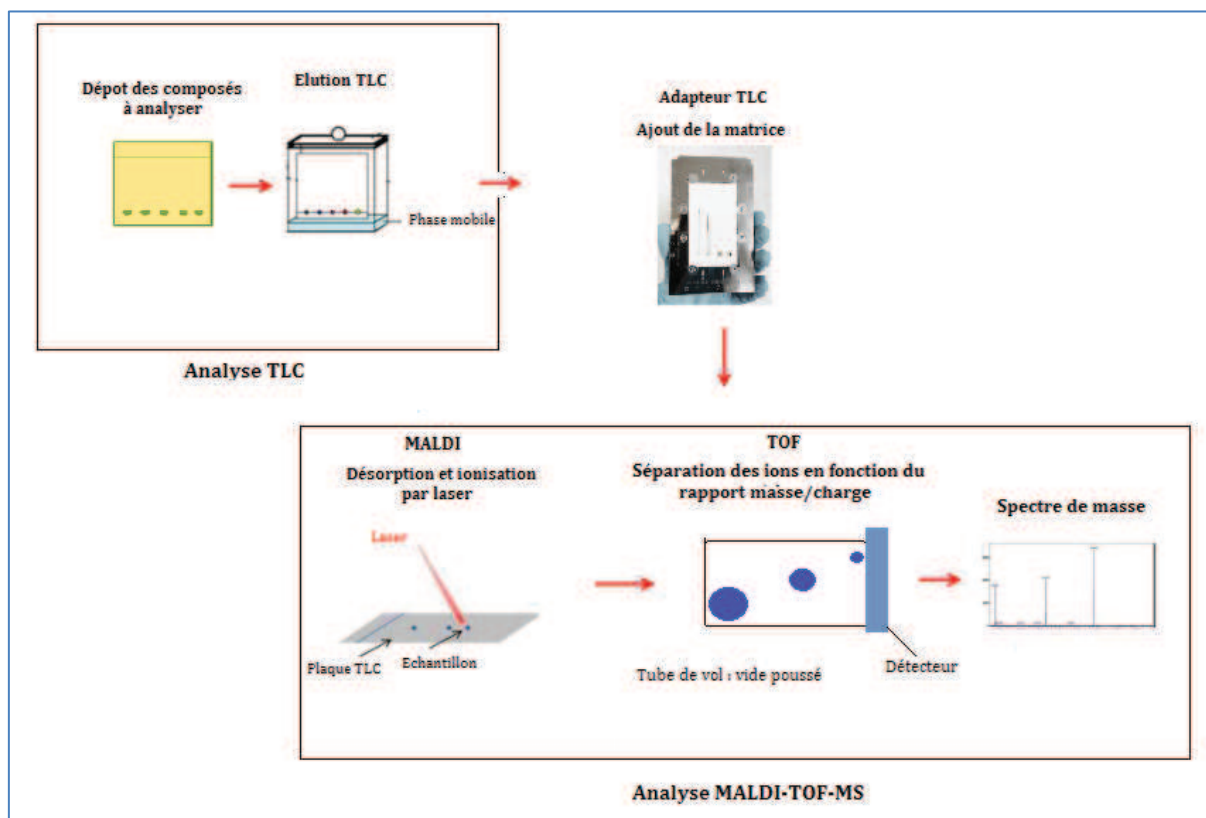


Figure I.36 Schéma de principe du couplage TLC-MALDI-TOF-MS.
Adapté de [92]

L'avantage de l'utilisation du couplage TLC-MALDI-TOF-MS par rapport à l'interface CAMAG est le faible impact du laser (100 μm) [93] permettant d'obtenir une résolution spatiale significative. Les spots peuvent être identifiés même s'ils ne peuvent pas être différenciés visuellement sur la plaque.

Afin de réaliser ce couplage, il y a plusieurs paramètres à optimiser notamment la préparation de la plaque TLC et l'optimisation des conditions opératoires. Par la suite, il est important d'optimiser les paramètres MALDI.

En MALDI, le choix de la matrice d'ionisation est une étape importante et dépend des échantillons à analyser ainsi que de la nature du laser. De plus, une matrice doit répondre à plusieurs critères comme par exemple : être stable sous vide, avoir une faible masse moléculaire pour faciliter la vaporisation et absorber dans le domaine d'émission du laser.

L'ionisation en MALDI se faisant le plus généralement via des réactions acido-basiques (protonation et déprotonation) de l'analyte et de la matrice (même si des réactions de coordination et d'oxydation peuvent être observées), les matrices les plus courantes sont l'acide sinapique (SA), l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) [94].

Considérant les propriétés de ces matrices de faible poids moléculaire, le couplage TLC-MALDI-TOF-MS a été en premier lieu utilisé pour l'analyse de molécules de poids moléculaires élevés (protéines, peptides, acides nucléiques, ADN, carbohydrates...) [95]. Pour les molécules de faibles poids moléculaires (inférieure à 1500 Da) l'analyse en MALDI est beaucoup plus délicate car il y a un risque d'interférence des ions moléculaires de l'échantillon avec les ions de la matrice qui se situent dans les mêmes zones de rapports m/z .

Plusieurs alternatives ont été mises en place pour réduire les interférences dus à la matrice comme l'utilisation de nanotubes de carbone [96], liquide ionique [97, 98], d'additifs aux matrices usuelles [99, 100] ou encore d'outils mathématiques pour supprimer les ions interférant [101]. Cependant, ces applications restent difficiles à mettre en place et entraînent une faible reproductibilité ainsi qu'un risque de contamination de la source d'ionisation [101].

Une amélioration de la méthode de préparation du ratio échantillon-matrice et des modes de dépôts ont permis au MALDI d'être appliqué avec succès à l'analyse de petites molécules telles que des alcaloïdes, flavonoïdes ou encore anthocyanes [102]. En revanche, en ce qui concerne les composés terpéniques, aucune étude à notre connaissance, ne décrit leur analyse via l'utilisation du MALDI-TOF-MS pour l'ionisation des composés. En effet, en plus de leurs faibles masses moléculaires, ses composés possèdent peu de sites de protonation ou de déprotonation.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au couplage TLC-MALDI-TOF-MS en optimisant plusieurs paramètres afin d'étudier les composés terpéniques.

I.6 CONCLUSION

Dans ce premier chapitre de bibliographie, nous avons pu présenter la famille des terpènes présents dans de nombreuses matrices végétales et notamment dans les résines végétales. Ces sécrétions et exsudats de végétaux ont été utilisés depuis l'Antiquité jusqu'à nos jours dans un large domaine d'application (dans les cérémonies religieuses, dans le domaine pharmaceutique et cosmétique, peinture,...). On a pu constater la très grande variété des résines en étudiant leurs classifications ainsi que de la diversité des structures des terpènes les constituants. Les mono- et sesquiterpénoïdes constituent les composés minoritaires des résines et les di- et triterpénoïdes les composés majoritaires.

Afin de pouvoir analyser les terpènes constituants les résines, différentes méthodes de préparation d'échantillon et de méthodes d'analyse ont été utilisées (GC, LC et TLC). Nous avons ainsi pu mettre en évidence les possibilités qui s'offrent à nous pour mener ce travail de thèse.

Tout d'abord, nous avons voulu développer le couplage de la TLC et du MALDI-TOF-MS pour analyser les composés majoritaires des résines. Ce couplage permettant d'associer à chaque spot un spectre de masse n'a encore jamais été appliqué à l'analyse des composés terpéniques.

D'autre part, on a pu voir que les méthodes d'analyses permettent l'étude des terpènes volatils ou les moins volatils. Nous avons voulu au cours de cette thèse pouvoir développer une méthode unique permettant l'analyse de l'ensemble des terpènes. Compte tenu de la composition phytochimique très riche, l'objectif est de pouvoir avoir en une seule analyse une information sur les composés majoritaires et minoritaires présents dans les résines.

Afin d'optimiser nos méthodes et de valider nos résultats, nous avons utilisé des outils statistiques. Ces derniers pourront nous permettre de gagner en temps et en robustesse.

Chapitre I - Bibliographie

Tableau I.2 Liste non exhaustive des différentes techniques d'extraction et d'analyse mises en œuvre dans la littérature pour la caractérisation de chacune des résines végétales

Matériel végétal	Méthode d'extraction	Analyse	Composés identifiés (liste non exhaustive)	Réf
<i>Boswellia serrata</i> (Inde)	Hydrodistillation de 100g d'échantillon pendant 6 heures L'extrait est séché au sulfate de sodium et stocké à 4°C	GC <i>Colonne</i> : Supelcowax (60 m x 0.25 mm DI x 0.25 µm) <i>Gaz vecteur</i> : hélium (18 psi pression) <i>Températures</i> : injecteur : 250°C, four : 40°C à 180°C (5°C/min) <i>Volume échantillon injecté</i> : 0.5 µL avec un split de 1 :40. MS Simple quadripôle, ionisation électronique à 70eV <i>Températures</i> : Ligne de transfert : 220°C, détecteur : 230°C	Monoterpènes : Tricyclène, α-pinène, α-thuyène, camphrène, limonène, β-phellandrène, p-cymène, linalol, acétate de linalyle, α-terpinéol, géraniol Sesquiterpènes : épi-cubénol, méthyl isoeugénol, eudesmol, élémol	[72]
<i>Boswellia carterii</i> (Somalie)	Hydrodistillation	GC <i>Colonne</i> : AT-5MS (60 m x 0.25 mm DI x 0.25 µm) <i>Gaz vecteur</i> : hélium à 1 ml/min <i>Températures</i> : injecteur : 250°C, four : 50°C à 250°C (3°C/min) et à 250°C pendant 10 min <i>Volume échantillon injecté</i> : 1 µL avec un split de 1 :100 MS Micromasse ultima Q-TOF	Monoterpènes : α-pinène, α-thuyène, camphrène, sabinène, β-pinène, β-myrcène, α-phellandrène, limonène, p-cymène, linalol, sabinol, terpinen-4-ol, α-terpinéol, eugénol, acétate de bornyle Sesquiterpènes : α-cubébène, α-cédrène, δ-cadinène, oxyde de caryophyllène Diterpènes : Isoincensole et acétate d'isoincensole	[69]
<i>Boswellia neglecta</i> (Kenya)	Hydrodistillation pendant 3 heures L'extrait est séché au sulfate de sodium et stocké à 4°C	GC <i>Colonne</i> : HP-5MS (30 m x 0.32 mm DI x 0.25 µm) <i>Gaz vecteur</i> : azote <i>Températures</i> : injecteur : 210°C, four : 50°C à 210°C (3°C/min) <i>Volume échantillon injecté</i> : non spécifié FID <i>Température</i> : 260°C	Monoterpènes : α-pinène, α-thuyène, β-pinène, sabinène, p-cymène, terpinen-4-ol, verbenone	[53]
<i>Boswellia carterii</i> (Bcar, Somalie)	SPME : extraction sur une fibre PDMS/DVB à 80°C	GC <i>Colonne</i> : DB5 (60 m x 0.25 mm DI x 0.25 µm) <i>Gaz vecteur</i> : hélium à 10 psi	Monoterpènes : α-pinène, α-thuyène (Bfre, Bsac, Bser), camphrène (Bcar, Bfre, Bsac, Bser), sabinène (Bcar, Bfre, Bsac, Bser), β-pinène (Bcar,	[62]

Chapitre I - Bibliographie

<i>Boswellia frereana</i> (Bfre, Somalie) <i>Boswellia sacra</i> (Bsac, Oman) <i>Boswellia serrata</i> (Bser, Inde)	pendant 1 heure	<i>Températures</i> : injecteur : 250°C, four : 40°C pendant 1 min, de 40°C à 130°C (9°C/min) et de 130°C à 230°C (2°C/min) <i>Volume échantillon injecté</i> : injection en mode splitless MS Simple quadripôle, ionisation électronique à 70eV <i>Températures</i> : Ligne de transfert : 250°C, détecteur : 150°C	Bfre, Bsac, Bser), β -myrcène (Bcar, Bfre, Bsac, Bser), α -phellandrène, limonène, p-cymène, linalol, verbenol (Bcar, Bfre, Bsac, Bser), sabinol (Bcar, Bfre, Bsac, Bser), terpinen-4-ol (Bcar, Bfre, Bsac, Bser) Sesquiterpènes : β -bourbonene (Bcar, Bfre, Bsac, Bser), methylegenol (Bser), β -caryophyllène (Bcar, Bsac), oxyde de caryophyllène (Bcar, Bfre, Bsac) Diterpènes : isoincensole + acétate d'isoincensole (Bcar, Bsac, Bser)	
Mastic (<i>Pistacia lentiscus</i>)	Hydrodistillation de 100g d'échantillon pendant 2 heures L'extrait est séché au sulfate de sodium et stocké à 4°C	GC <i>Colonne</i> : DB5 (30 m x 0.25 mm DI x 0.25 μ m) <i>Gaz vecteur</i> : hélium (120 Kpa pression) <i>Températures</i> : injecteur : 250°C, four : 60°C à 65°C (1°C/min), de 65°C à 120°C (3°C/min), de 120°C à 180°C (5°C/min), à 180°C pendant 5min, de 180°C à 250 (5°C/min) et à 250°C pendant 20min <i>Volume échantillon injecté</i> : 1 μ L avec un split de 1 :35. ITMS Trappe d'ion, ionisation électronique <i>Températures</i> : Ligne de transfert : 220°C, détecteur : 230°C <i>Mode</i> : ionisation électronique à 70eV	Monoterpènes : Tricyclène, α -pinène, α -thuyène, camphrène, sabinène, β -pinène, β -myrcène, α -phellandrène, limonène, β -phellandrène, p-cymène, linalol, terpinen-4-ol, α -terpinéol, bornéol, acétate de bornyle Sesquiterpènes : β -caryophyllène, cubénol, δ -cadinène, D-germacrène	[70]
Commiphora Myrrha	Hydrodistillation de 200g d'échantillon pendant 5 heures L'extrait est séché au sulfate de sodium et stocké à 4°C	GC <i>Colonne</i> : TG-5MS (30 m x 0.25 mm DI x 0.25 μ m) <i>Gaz vecteur</i> : hélium à 1 ml/min <i>Températures</i> : four : 40°C pendant 3 min, de 40°C à 280°C (5°C/min) et à 280°C pendant 5 min <i>Volume échantillon injecté</i> : 1 μ L en mode splitless MS Simple quadripôle, ionisation électronique à 70eV	Monoterpènes : acétate d'octyle Sesquiterpènes : α -élèmene, 7-isopropyl-1,4-dimethyl-2-azulenol, curzèrene, acide germacra-1(10)7,11-trien-15-oïque, δ -élèmene, δ -neoclovène, B-germacrène, éremophilène	[71]
<i>Boswellia sacra</i>	Broyage de la résine en poudre	2D-GC Pré-colonne : capillaire en silice désactivé (2-3 m x 0.53 mm) Interface de la 2D-GC: système cryo-trappe <i>GC 1</i> :		[74]

Chapitre I - Bibliographie

	Macération : 400 mg de résine sont extraits dans 50 mL de dichlorométhane pendant 2 heures	<i>Colonne</i> : DB-FFAP (30 m x 0.32 mm DI x 0.25 µm) <i>GC 2</i> : <i>Colonne</i> : Rxi-5HT (30 m x 0.25 mm DI x 0.25 µm) Détecteurs : MS – O – FID		
<i>Olibanum</i> (Ol), <i>Myrrhe</i> (My), <i>Mastic</i> (Ma), <i>Galbanum</i> (Ga) et <i>Lanbdanum</i> (La)	SPME : extraction sur une fibre PDMS (100 µm) à 80°C pendant 40 minutes Désorption dans l'injecteur à 250°C pendant 5 minutes	GC <i>Colonne</i> : DB5 (30 m x 0.25 mm DI x 0.25 µm) <i>Gaz vecteur</i> : hélium à 10 psi <i>Températures</i> : injecteur : 250°C, four : 40°C pendant 1 min, de 40°C à 130°C (9°C/min) et de 130°C à 230°C (2°C/min) <i>Volume échantillon injecté</i> : 1 µL en mode splitless MS Simple quadripôle, ionisation électronique à 70eV, scan <i>m/z</i> 29 - 400 <i>Températures</i> : Ligne de transfert : 250°C, détecteur : 150°C	Monoterpènes : α-pinène (Ol, Ma, Ga), camphène (Ol, My, Ma), β-pinène (Ol, Ma, Ga), β-myrcène (Ol, Ma), α-phellandrène (Ol), p-cymène (Ol, Ma, Ga, La), limonène (Ol, Ma, Ga, La), linalol (Ol, Ma), verbenol (Ol, Ma), terpinène-4-ol (Ol, My, Ga), verbenone (Ol, Ma, La), carvone (Ol), acétate de bornyl (Ol, Ga, La) Sesquiterpènes : δ-elémène (Ol, My), β-bourbonène (Ol, My, Ga), furanoeudesma-1,3-diène (My) Diterpènes : cembrène A (Ol), cembrène C (Ol)	[63]

Chapitre I - Bibliographie

Matériel végétal	Méthode d'extraction	Analyse	Composés identifiés (liste non exhaustive)	Réf
Frankincense	Extraction par ultra-sons : 0.5 g de résine dans 3 mL de méthanol pendant 10 min. Récupération du surnageant après centrifugation	HPLC <i>Colonne :</i> Colonne C18 (Merck : Superspher 100 RP-18e 250 x 4 mm) <i>Températures :</i> 30°C <i>Phase mobile :</i> A : eau + 0.01% acide phosphorique, B : acétonitrile + 0.01% d'acide phosphorique <i>Débit phase mobile :</i> 1 mL.min ⁻¹ <i>Gradient d'élution :</i> de 85% à 15% de A en 14 min, 20 min de période isocratique et 53 min en isocratique à 100% de B <i>Détecteur :</i> UV 210 nm	Triterpènes : acide lupéolique, acide boswellique (α et β), acide 3-O-acetyl lupéolique, acide 3-O-acetyl boswellique (α et β, lupénone, lupéol, amyrenone (α et β), 3-épi-amyrine (α et β), amyrine (α et β),	[59]
Frankincense	Extraction par Soxhlet : 10 g de résine dans 150 mL de méthanol pendant 3 heures Evaporation à sec de l'extrait et reprise dans 1 mL de diméthylsulfoxyde	HPLC <i>Colonne :</i> ReproSil-pur 120 ODS-3 (250 x 3 mm, taille des particules 5 μm) <i>Températures :</i> 28°C <i>Phase mobile :</i> A : méthanol-eau-acide acétique (80 :20 :2, v/v/v), B : méthanol-acide acétique (100 :0.2, v/v) <i>Débit phase mobile :</i> 0.56 mL.min ⁻¹ <i>Gradient d'élution :</i> de 62% de A et 38% de B à 100% de B <i>Détecteur :</i> DAD 210, 250 et 280 nm	Triterpènes : acide lupéolique, acide boswellique (α et β), acide 3-O-acetyl lupéolique, acide 3-O-acetyl boswellique (α et β, acide 11-kéto-β-boswellique, acide acétyl 11-kéto-β-boswellique, acide 9,11-déhydro-boswellique (α et β), acide acétyl 9,11-déhydro-boswellique (α et β)	[58]
<i>Boswellia neglecta</i> (Kenya)	Dissolution de 2 g de résine dans 30 mL de méthanol à température ambiante. L'extrait est concentré à l'évaporateur rotatif	GC <i>Colonne :</i> DB-17 (30 m x 0.25 μm DI) <i>Gaz vecteur :</i> hélium <i>Températures :</i> injecteur : 250°C, four : 80°C à 280°C (10°C/min) <i>Volume échantillon injecté :</i> non spécifié MS Simple quadripôle, ionisation électronique à 70eV <i>Températures :</i> Ligne de transfert : 220°C, détecteur : 230°C	Triterpènes : amyrenone (α et β), α-amyrin	[53]
<i>Boswellia serrata</i> (Inde)	Dissolution de la résine dans 2 mL de méthanol (10 mg/mL).	TLC Plaque : Plaque de silice sur support en verre 60 F 254 (10 cm x 10 cm) Volume déposé : 2 μL déposé, bandes de 6mm et espace de 10	Triterpènes : acide boswellique, acide 3-O-acetyl boswellique, acide 11-kéto-β-boswellique, acide acétyl 11-kéto-β-boswellique	[54]

Chapitre I - Bibliographie

		mm entre les bandes Solvant d'élution : n-hexane-acétate d'éthyle-acide acétique (85 :20 :5) Mode d'élution : élution horizontale avec saturation de la chambre 20 min Visualisation : à 254 nm sans révélation et à 366nm après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique acide		
<i>Boswellia serrata</i> (Bser, Inde) <i>Boswellia papyrifera</i> (Bpap, Ethiopie) <i>Boswellia carterri</i> / <i>Boswellia sacra</i> (Bcar/Bser Somalie)	Dissolution de 1 g de résine dans 80 mL de méthanol Centrifugation pendant 20 min pour dissoudre partiellement la résine Puis ajout de 20 mL de méthanol	TLC Plaques : Plaque de silice sur support en verre 60 F 254 (5 cm x 10 cm) Volume déposé : 10 µL déposé Solvant d'élution : pentane-éther diéthylique-acide acétique (2 :1 :0.001) Mode d'élution : élution horizontale sur 8.5 cm avec saturation de la chambre Visualisation : à 254 nm sans révélation et à 366nm après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique acide	Sesquiterpènes : oxyde de caryophyllène (Bcar/Bsac) Diterpènes : incensole (Bpap, Bser, Bcar/Bsac), acétate d'incensole (Bpap), acide 3-oxo-8,24-dien-tirucallique (Bpap, Bser, Bcar/Bsac) Triterpènes : acide boswellique (Bpap, Bser, Bcar/Bsac), acide 3-O-acetyl boswellique (Bpap, Bser, Bcar/Bsac), acide 11-kéto-β-boswellique (Bpap, Bser, Bcar/Bsac), acide acétyl 11-k éto-β-boswellique (Bpap, Bser, Bcar/Bsac)	[55]
<i>Pistacia lentiscus</i> (Chios, Grèce)	Fractionnement des résines en fractions neutre et acide. Dérivation : méthylation de la fraction acide : mélange de 800 mg de la fraction acide avec 9 mL d'iodométhane dans de l'acétonitrile en présence de 1.5 g de carbonate de potassium à 60°C pendant 3h Dilution de tous les échantillons dans du chloroforme	GC Colonne : HP-5ms (30 m x 0.25 µm DI x 0.2 µm) Gaz vecteur : hélium à 1mL/min Températures : injecteur : 250°C, four : 80°C pendant 1 min, de 80°C à 290°C (12°C/min) et à 290°C pendant 30 min Volume échantillon injecté : non spécifié MS Simple quadripôle, ionisation électronique à 70eV, scan <i>m/z</i> 35 - 650 Températures : Ligne de transfert : 290°C	Triterpènes : Fraction acide : acide oléanolique, acide masticadienonique, acide isomasticadienonique, acide moronique, acide 3-O-acetyl-3-epi-(iso)masticadienolique, acide masticadienolique, acide oléanolique Fraction neutre : β-amyrine, tirucallol, dipterocarpol, lupéol, β-amyrone, aldéhyde oléanolique, germanicol, dammaradiénone, nor-β-amyrone, nor-β-amyrine	[41]

Chapitre I - Bibliographie

Sandaraque (<i>tetraclinis articulata</i>) Copal de Manille (<i>Agathis dammara</i>)	100 mg de résine dans 200 mL d'éthanol 1.Dérivation off-line: méthylation 2.Dérivation in-situ avec pyrolyse Pyrolyse à 600°C pendant 10 secondes Interface de la pyrolyse : 250°C	GC Colonne : HP-1ms (30 m x 0.25 µm DI x 0.25 µm) Gaz vecteur : hélium à 1.2 mL/min Températures : injecteur : 250°C, four : 120°C pendant 2 min, de 120°C à 300°C (10°C/min) et à 300°C pendant 20 min Volume échantillon injecté : injection mode splitless MS Simple quadripôle, ionisation électronique à 70eV, scan <i>m/z</i> 50 - 550 Températures : Ligne de transfert : 300°C, détecteur : 210°C GC après la pyrolyse Injection : en mode split (1 :80) Gaz vecteur : hélium à 1.6 mL/min Conditions chromatographique : de 100°C à 295°C (5°C/min) et à 295°C pendant 8 min MS Simple quadripôle, ionisation électronique à 70eV, scan <i>m/z</i> 20 - 800 Températures : Ligne de transfert : 300°C, détecteur : 210°C	Diterpènes : manool (sandaraque), 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oate (copal), acide sandaracopimarique (sandaraque et copal), acide isopimarique (sandaraque et copal), totarol (sandaraque), acide agathique (copal), acide agathalique (copal), agatholique acetoxo (copal)	[56]
Sandaraque (<i>tetraclinis articulata</i>) Copal de Manille (<i>Agathis dammara</i>)	Macération : mélange de la résine avec du méthanol pendant 1 heure puis filtration (répétition de l'étape 2 fois avec du méthanol puis du chlorure de méthylène) 1.Dérivation off-line: méthylation utilisant le triméthylsilyl-diazométhane	GC Colonne : HP-5ms (30 m x 0.25 µm DI x 0.25 µm) Gaz vecteur : hélium à 1.0 mL/min Températures : injecteur : 250°C, four : 40°C pendant 2 min, de 40°C à 150°C (8°C/min), de 150°C à 280°C (3°C/min) Volume échantillon injecté : non précisé MS Simple quadripôle, ionisation électronique à 70eV, scan <i>m/z</i> 40 - 800	Diterpènes : méthyle cis-communate, méthyle trans-communate, méthyle sandaracopimarate, méthyle agathalate, diméthyle agathate	[57]

Chapitre I - Bibliographie

	2.Dérivation in-situ avec pyrolyse : méthylation utilisant le TMAH (25% aqueux) Pyrolyse à 600°C pendant 10 secondes Interface de la pyrolyse : 300°C et injecteur : 280°C			
--	---	--	--	--

I.7 REFERENCES

- [1] M. Hovaneissian, P. Archier, C. Mathe, C. Vieillescazes, Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin, *Comptes Rendus Chimie*, 9 (2006) 1192-1202.
- [2] L. C.D, The characterisation and radiocarbon dating of archaeological resins on Southeast Asian ceramics. Ph.D. Thesis, University of Bradford. , 2003.
- [3] L. Roger, Les momies d'Égypte, *Études sur la mort* 1/2006 (no 129), (2006) p. 23-31
- [4] K.R. Kirtikar, Indian Medicinal Plants: By K.R. Kirtikar, B.D. Basu, and An I.C.S. In 4 Volumes, Lalit Mohan Basu 1935.
- [5] W. Zhao, F. Entschladen, H. Liu, B. Niggemann, Q. Fang, K.S. Zaenker, R. Han, Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells, *Cancer Detection and Prevention*, 27 (2003) 67-75.
- [6] T. Shen, G.-H. Li, X.-N. Wang, H.-X. Lou, The genus *Commiphora*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *Journal of Ethnopharmacology*, 142 (2012) 319-330.
- [7] A.H. Sabin, The industrial and artistic technology of paint and varnish, John Wiley & Sons, Ltd 1928.
- [8] G. Chiavari, D. Fabbri, R. Mazzeo, P. Bocchini, G.C. Galletti, Pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry of natural resins used for artistic objects, *Chroma*, 41 (1995) 273-281.
- [9] F. Modugno, E. Ribechini, M.P. Colombini, Aromatic resin characterisation by gas chromatography-mass spectrometry: Raw and archaeological materials, *Journal of Chromatography A*, 1134 (2006) 298-304.
- [10] L. Růžička, Perspektiven der Biogenese und der Chemie der Terpene, *Pure and Applied Chemistry*, 6 (1963) 493-524.
- [11] J.H. Langenheim, Plant resins. Chemistry, evolution, ecology, ethnobotany, Timber Editions 2003.
- [12] M.S.P.a.P. C.U., Organic Reactive Intermediates, Mc Manus S.P. (Eds.), New York. 1973.
- [13] J.D. Newman, J. Chappell, Isoprenoid Biosynthesis in Plants: Carbon Partitioning Within the Cytoplasmic Pathway, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 34 (1999) 95-106.
- [14] M.A. Phillips, R.B. Croteau, Resin-based defenses in conifers, *Trends in Plant Science*, 4 (1999) 184-190.
- [15] J. Bruneton, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales, Tec & Doc ed. 2009.
- [16] E. Pisha, H. Chai, I.-S. Lee, T.E. Chagwedera, N.R. Farnsworth, G.A. Cordell, C.W.W. Beecher, H.H.S. Fong, A.D. Kinghorn, D.M. Brown, M.C. Wani, M.E. Wall, T.J. Hieken, T.K. Das Gupta, J.M. Pezzuto, Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, *Nat Med*, 1 (1995) 1046-1051.

- [17] M. Saleem, A. Alam, S. Arifin, M.S. Shah, B. Ahmed, S. Sultana, Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin, *Pharmacological Research*, 43 (2001) 127-134.
- [18] C.J. Fabian, Breast cancer chemoprevention: beyond tamoxifen, *Breast Cancer Research*, 3 (2001) 99-103.
- [19] P.L. Crowell, Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes, *The Journal of Nutrition*, 129 (1999) 775.
- [20] L.W. Wattenberg, V.L. Sporn, G. Barany, Inhibition of N-Nitrosodiethylamine Carcinogenesis in Mice by Naturally Occurring Organosulfur Compounds and Monoterpenes, *Cancer Research*, 49 (1989) 2689-2692.
- [21] S.S. Aneta Modzelewska, Srinivas K Kumar, Saeed R Khan, Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth, *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 5 (2005) 477.
- [22] H. Safayhi, B. Rall, E.-R. Sailer, H.P.T. Ammon, Inhibition by Boswellic Acids of Human Leukocyte Elastase, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 281 (1997) 460-463.
- [23] H. Safayhi, T. Mack, J. Sabieraj, M.I. Anazodo, L.R. Subramanian, H.P. Ammon, Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261 (1992) 1143-1146.
- [24] E.M. Giner-Larza, S. Mnez, M.C. Recio, R.M. Giner, J.M. Prieto, M. Cerd-Nicols, J.L. Ros, Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity, *European Journal of Pharmacology*, 428 (2001) 137-143.
- [25] H.P. Ammon, H. Safayhi, T. Mack, J. Sabieraj, Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and boswellic acids, *J Ethnopharmacol*, 38 (1993) 113-119.
- [26] P. Bernard, T. Scior, B. Didier, M. Hibert, J.-Y. Berthon, Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors, *Phytochemistry*, 58 (2001) 865-874.
- [27] M. Benabderrahmane, M. Benali, H. Aouissat, M.-J. Jordn Bueso, Antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria, *Phytothrapie*, 7 (2009) 304-308.
- [28] C. Koutsoudaki, M. Krsek, A. Rodger, Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil and the Gum of *Pistacia lentiscus* Var. *chia*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 7681-7685.
- [29] P. Magiatis, E. Melliou, A.L. Skaltsounis, I.B. Chinou, S. Mitaku, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*, *Planta Med.* 1999 Dec;65(8):749-52.
- [30] A.F. Raja, F. Ali, I.A. Khan, A.S. Shahl, D.S. Arora, B.A. Shah, S.C. Taneja, Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from *Boswellia serrata*, *BMC Microbiology*, 11 (2011) 1-9.
- [31] J.A. Rodrguez, L. Astudillo, G. Schmeda-Hirschmann, Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats, *Pharmacological Research*, 48 (2003) 291-294.
- [32] F. Li, R. Goila-Gaur, K. Salzwedel, N.R. Kilgore, M. Reddick, C. Matallana, A. Castillo, D. Zoumplis, D.E. Martin, J.M. Orenstein, G.P. Allaway, E.O. Freed, C.T. Wild, PA-457: A potent HIV

inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (2003) 13555-13560.

[33] J. Zhou, L. Huang, D.L. Hachey, C.H. Chen, C. Aiken, Inhibition of HIV-1 Maturation via Drug Association with the Viral Gag Protein in Immature HIV-1 Particles, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2005) 42149-42155.

[34] P. Dzubak, M. Hajdуч, D. Vydra, A. Hustova, M. Kvasnica, D. Biedermann, L. Markova, M. Urban, J. Sarek, Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications, *Natural Product Reports*, 23 (2006) 394-411.

[35] X. Tang, J. Gao, J. Chen, F. Fang, Y. Wang, H. Dou, Q. Xu, Z. Qian, Inhibition of ursolic acid on calcium-induced mitochondrial permeability transition and release of two proapoptotic proteins, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337 (2005) 320-324.

[36] H.G. Jeong, Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury, *Toxicology Letters*, 105 (1999) 215-222.

[37] J.S. Mills, R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Butterworth-Heinemann 1994.

[38] Burger. P., Caractérisation moléculaire de résines végétales archéologiques et actuelles: étude de résines de Diptérocarpaceae, Ph.D. Thesis, Université Louis Pasteur, Strasbourg, (2008).

[39] S. Bruni, V. Guglielmi, Identification of archaeological triterpenic resins by the non-separative techniques FTIR and ¹³C NMR: The case of Pistacia resin (mastic) in comparison with frankincense, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121 (2014) 613-622.

[40] V.P. Papageorgiou, M.N. Bakola-Christianopoulou, K.K. Apazidou, E.E. Psarros, Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum, *Journal of Chromatography A*, 769 (1997) 263-273.

[41] A.N. Assimopoulou, V.P. Papageorgiou, GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part I. Pistacia lentiscus var. Chia, *Biomedical Chromatography*, 19 (2005) 285-311.

[42] J.S. Mills, R. White, *Natural Resins of Art and Archaeology Their Sources, Chemistry, and Identification*, *Studies in Conservation*, 22 (1977) 12-31.

[43] R.W. J.S. Mills, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Butterworths, London 1994.

[44] R. Mayer, S. Sheehan, *The Artist's Handbook of Materials and Techniques*, Viking 1991.

[45] R.J. Gettens, G.L. Stout, *Painting Materials: A Short Encyclopedia*, Dover Publications 2012.

[46] J. De la Cruz-Cañizares, M.-T. Doménech-Carbó, J.-V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo-Castro, F. Bosch-Reig, Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1093 (2005) 177-194.

[47] J.S. Mills, Diterpenes of Larix oleoresins, *Phytochemistry*, 12 (1973) 2407-2412.

[48] C. Azémard, Photodégradation des résines naturelles: application au domaine artistique, Ph.D. Thesis, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, (2014).

- [49] N. Howes, Vegetable gums and resins, *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 39 (1950) 481-482.
- [50] C. Mathe, G. Culioli, P. Archier, C. Vieillescazes, Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1023 (2004) 277-285.
- [51] C.d. l'Europe, Pharmacopée Européenne 8.0 Conseil de l'Europe 2013.
- [52] M.E. Lucchesi, F. Chemat, J. Smadja, Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, *Journal of Chromatography A*, 1043 (2004) 323-327.
- [53] D. Bekana, T. Kebede, M. Assefa, H. Kassa, Comparative Phytochemical Analyses of Resins of *Boswellia* Species (*B. papyrifera* (Del.) Hochst., *B. neglecta* S. Moore, and *B. rivae* Engl.) from Northwestern, Southern, and Southeastern Ethiopia, *ISRN Analytical Chemistry*, 2014 (2014) 9.
- [54] O.N. Pozharitskaya, S.A. Ivanova, A.N. Shikov, V.G. Makarov, Separation and quantification of terpenoids of *Boswellia serrata* Roxb. extract by planar chromatography techniques (TLC and AMD), *Journal of Separation Science*, 29 (2006) 2245-2250.
- [55] M. Paul, G. Brüning, J. Bergmann, J. Jauch, A Thin-layer Chromatography Method for the Identification of Three Different Olibanum Resins (*Boswellia serrata*, *Boswellia papyrifera* and *Boswellia carterii*, respectively, *Boswellia sacra*), *Phytochemical Analysis*, 23 (2012) 184-189.
- [56] J. Romero-Noguera, I. Martín-Sánchez, M.T. Doménech-Carbó, L. Osete-Cortina, M.M. López-Miras, F. Bolívar-Galiano, Analytical characterisation of the biodeterioration of diterpenoid labdanic varnishes used in pictorial techniques: Sandarac and Manila copal, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90 (2014) 99-105.
- [57] D. Scalarone, M. Lazzari, O. Chiantore, Ageing behaviour and analytical pyrolysis characterisation of diterpenic resins used as art materials: Manila copal and sandarac, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 68-69 (2003) 115-136.
- [58] B. Büchele, W. Zugmaier, T. Simmet, Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene, *Journal of Chromatography B*, 791 (2003) 21-30.
- [59] C. Mathe, G. Culioli, P. Archier, C. Vieillescazes, High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Triterpenoids in Commercial Frankincense, *Chromatographia*, 60 (2004) 493-499.
- [60] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 2145-2148.
- [61] S. Hamm, E. Lesellier, J. Bleton, A. Tchaplà, Optimization of headspace solid phase microextraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum, *Journal of Chromatography A*, 1018 (2003) 73-83.
- [62] S. Hamm, J. Bleton, J. Connan, A. Tchaplà, A chemical investigation by headspace SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples, *Phytochemistry*, 66 (2005) 1499-1514.
- [63] S. Hamm, J. Bleton, A. Tchaplà, Headspace solid phase microextraction for screening for the presence of resins in Egyptian archaeological samples, *Journal of Separation Science*, 27 (2004) 235-243.

- [64] P.F. van Bergen, T.M. Peakman, E.C. Leigh-Firbank, R.P. Evershed, Chemical evidence for archaeological frankincense: Boswellic acids and their derivatives in solvent soluble and insoluble fractions of resin-like materials, *Tetrahedron Letters*, 38 (1997) 8409-8412.
- [65] R.P. Evershed, P.F. van Bergen, T.M. Peakman, E.C. Leigh-Firbank, M.C. Horton, D. Edwards, M. Biddle, B. Kjolbye-Biddle, P.A. Rowley-Conwy, Archaeological frankincense, *Nature*, 390 (1997) 667-668.
- [66] M.P. Colombini, F. Modugno, E. Ribechini, Direct exposure electron ionization mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry techniques to study organic coatings on archaeological amphorae, *Journal of Mass Spectrometry*, 40 (2005) 675-687.
- [67] F. Orata, Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications, InTech2012, pp. 460.
- [68] P. Richardin, La chromatographie en phase gazeuse : en route vers un nouveau millénaire *Spectra Analyse*, 222 (2001) 19-26.
- [69] L. Camarda, T. Dayton, V. Di Stefano, R. Pitonzo, D. Schillaci, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Some Oleogum Resin Essential Oils from *Boswellia* SPP. (Burseraceae), *Annali di chimica*, 97 (2007) 837-844.
- [70] A. Barra, V. Coroneo, S. Dessi, P. Cabras, A. Angioni, Characterization of the Volatile Constituents in the Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. from Different Origins and Its Antifungal and Antioxidant Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 7093-7098.
- [71] A.A. Mohamed, S.I. Ali, F.K. El-Baz, A.K. Hegazy, M.A. Kord, Chemical composition of essential oil and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of *Commiphora myrrha* resin, *Industrial Crops and Products*, 57 (2014) 10-16.
- [72] B. Singh, R. Kumar, S. Bhandari, S. Pathania, B. Lal, Volatile constituents of natural *Boswellia serrata* oleo-gum-resin and commercial samples, *Flavour and Fragrance Journal*, 22 (2007) 145-147.
- [73] C.L. Woolley, M.M. Suhail, B.L. Smith, K.E. Boren, L.C. Taylor, M.F. Schreuder, J.K. Chai, H. Casabianca, S. Haq, H.-K. Lin, A.A. Al-Shahri, S. Al-Hatmi, D.G. Young, Chemical differentiation of *Boswellia sacra* and *Boswellia carterii* essential oils by gas chromatography and chiral gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1261 (2012) 158-163.
- [74] J. Niebler, A. Buettner, Identification of odorants in frankincense (*Boswellia sacra* Flueck.) by aroma extract dilution analysis and two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry, *Phytochemistry*, 109 (2015) 66-75.
- [75] J. Niebler, A. Buettner, Pyrolysis-GC-MS-Olfactometry: A new approach to identify thermally generated odorants in frankincense, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 113 (2015) 690-700.
- [76] J.H. Knox, B. Kaur, G.R. Millward, Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 352 (1986) 3-25.
- [77] B. Rhourri-Frih, P. Chaimbault, D. Dequeral, P. André, M. Lafosse, Investigation of porous graphitic carbon for triterpenoids and natural resinous materials analysis by high performance liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1240 (2012) 140-146.

- [78] I.A.K. Markus Ganzera A Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Boswellic Acids in *Boswellia serrata*, *Planta Med*, 67 (2001) 778-780.
- [79] W. C., The Ionization Technology of LC-MS, Advantages of APPI on Detection of PPCPs and Hormones, *Austin Chromatography*, 2 (2015).
- [80] B. Rhourri-Frih, P. Chaimbault, B. Claude, C. Lamy, P. André, M. Lafosse, Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI, *Journal of Mass Spectrometry*, 44 (2009) 71-80.
- [81] S.S. Pawar R.K., Singh K.C., Sharma Rajeev KR., Development and validation of HPTLC method for the determination of b-boswellic acid from *Boswellia serrata* Roxb. (exudate), *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4 (2011) 72-76.
- [82] K. Krohn, M.S. Rao, N.V. Raman, M. Khalilullah, High-performance thin layer chromatographic analysis of anti-inflammatory triterpenoids from *Boswellia serrata* Roxb, *Phytochemical Analysis*, 12 (2001) 374-376.
- [83] D.A. Frommenwiler, One HPTLC Method for Identification of Seven Different Resin Species, in: CAMAG (Ed.), 2004.
- [84] S. aventis, Du dépôt à la séparation, Club de CCM JournéeNeuville/Saône, 23 octobre 2008.
- [85] O.P. Alexander Shikov, Svetlana Ivanova, Valery Makarov, Kera Kosman, A comparison between HPLC and HPTLC for the separation and quantification of *Boswellia* acids in *Boswellia serrata* extracts, *Camag Bibliography Service*, 104 (2010) 2-4.
- [86] S.A. Shah, I.S. Rathod, B.N. Suhagia, D.A. Patel, V.K. Parmar, B.K. Shah, V.M. Vaishnavi, Estimation of boswellic acids from market formulations of *Boswellia serrata* extract and 11-keto β -boswellic acid in human plasma by high-performance thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography B*, 848 (2007) 232-238.
- [87] P. Bernard-Savary, HPTLC is today no more what TLC used to be: it became now and hypernated open liquid chromatographyI, *High Performance Thin Layer Chromatography*Lyon, 2014.
- [88] K. Naumoska, B. Simonovska, A. Albreht, I. Vovk, TLC and TLC-MS screening of ursolic, oleanolic and betulinic acids in plant extracts, *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 26 (2013) 125-131.
- [89] K. Naumoska, I. Vovk, Analysis of triterpenoids and phytosterols in vegetables by thin-layer chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1381 (2015) 229-238.
- [90] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Analytical Chemistry*, 60 (1988) 2299-2301.
- [91] S.V. Hoffmann E., *Spectrométrie de masse*, 3 ed.2005.
- [92] Y.B. D. Ropartz, F. Daligault, C. Tellier, H. Rogniaux, Coupling Thin-Layer Chromatography to MALDI Mass Spectrometry: a straight and performant method for the analysis of regio-isomeric oligosaccharides.
- [93] F. Hillenkamp, E. UnsoLd, R. Kaufmann, R. Nitsche, Laser microprobe mass analysis of organic materials, *Nature*, 256 (1975) 119-120.

- [94] J.K. Lewis, J. Wei, G. Siuzdak, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis, Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd2006.
- [95] B. Fuchs, R. Süß, A. Nimptsch, J. Schiller, MALDI-TOF-MS Directly Combined with TLC: A Review of the Current State, Chroma, 69 (2008) 95-105.
- [96] S. Xu, Y. Li, H. Zou, J. Qiu, Z. Guo, B. Guo, Carbon Nanotubes as Assisted Matrix for Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, Analytical Chemistry, 75 (2003) 6191-6195.
- [97] M. Mank, B. Stahl, G. Boehm, 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Butylamine and Other Ionic Liquid Matrixes for Enhanced MALDI-MS Analysis of Biomolecules, Analytical Chemistry, 76 (2004) 2938-2950.
- [98] A. Tholey, E. Heinzle, Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry—applications and perspectives, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386 (2006) 24-37.
- [99] Z. Guo, L. He, A binary matrix for background suppression in MALDI-MS of small molecules, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387 (2007) 1939-1944.
- [100] Z. Guo, Q. Zhang, H. Zou, B. Guo, J. Ni, A Method for the Analysis of Low-Mass Molecules by MALDI-TOF Mass Spectrometry, Analytical Chemistry, 74 (2002) 1637-1641.
- [101] S. Zhang, J.a. Liu, Y. Chen, S. Xiong, G. Wang, J. Chen, G. Yang, A Novel Strategy for MALDI-TOF MS Analysis of Small Molecules, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 21 (2010) 154-160.
- [102] R. Silva, N.P. Lopes, D.B. Silva, Application of MALDI Mass Spectrometry in Natural Products Analysis, Planta Med, 82 (2016) 671-689.

Chapitre II DEVELOPPEMENT DU COUPLAGE
TLC-(1D ET 2D) AVEC LA SPECTROMETRIE DE
MASSE (MALDI-TOF-MS)

II.1 INTRODUCTION

Dans l'objectif de proposer de nouvelles méthodes innovantes pour caractériser les nombreux composés terpéniques présents dans le matériel végétal, nous avons choisi d'évaluer dans un premier temps les potentialités du couplage de la chromatographie sur couche mince (TLC) à la spectrométrie de masse et en particulier au MALDI-TOF-MS. La TLC est une technique séparative très utilisée en phytochimie comme technique exploratoire pour une identification rapide des familles moléculaires présentes dans les extraits végétaux. La TLC, technique complémentaire à l'HPLC et de faible coût, possède l'avantage de permettre une rapide différenciation visuelle des constituants d'un extrait soit grâce à la fluorescence naturelle de certaines familles moléculaires soit grâce à l'utilisation de révélateurs spécifiques. De plus la TLC permet, à la différence de l'HPLC, d'analyser simultanément plusieurs extraits et standards tout en conservant l'intégralité des échantillons sur la plaque après séparation. Le couplage de cette technique séparative à la spectrométrie de masse est encore trop peu développé mais permet de donner une information structurale spécifique en complément sur les analytes séparés. Cette information est d'autant plus précieuse que de très nombreux composés terpéniques ne sont pas disponibles commercialement comme standards. Puisque la TLC est une chromatographie planaire, il paraît logique de se tourner vers une forme de spectrométrie de masse de surface pour analyser les plaques TLC telle que la spectrométrie de masse à temps de vol avec ionisation assistée par désorption laser (MALDI-TOF MS).

Compte tenu de la complexité chimique des résines végétales que nous avons sélectionnées comme modèles pour notre étude, la première étape de notre démarche a été l'optimisation des différents paramètres expérimentaux influant sur le pouvoir résolutif de la TLC. L'objectif étant d'obtenir les meilleures conditions de séparation possible pour les différentes classes de composés terpéniques présentes incluant de nombreux isomères et isobares au sein de chaque famille.

Le pouvoir résolutif de la TLC monodimensionnelle (TLC-1D), s'étant avéré insuffisant pour un certain nombre de composés, nous avons ensuite exploré les potentialités de la TLC bidimensionnelle (TLC-2D) en ciblant plus particulièrement la séparation des constituants structuralement proches dans l'espoir d'avoir une meilleure différenciation des résines di et triterpéniques et des résines appartenant à la famille Frankincense.

Enfin, nous avons envisagé de nous intéresser au couplage de la TLC à la spectrométrie de masse et notamment au MALDI-TOF-MS avec l'objectif d'associer une information structurale aux spots élués et d'accéder ainsi à une première caractérisation des composés présents. Ce couplage innovant pour l'étude des triterpènes permettra la caractérisation des marqueurs majoritaires des résines végétales.

II.2 ASPECTS FONDAMENTAUX DE LA TLC

II.2.1 MISE EN ŒUVRE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Le principe de la chromatographie sur couche mince ou TLC consiste à effectuer une séparation chromatographique sur une fine couche de phase stationnaire solide maintenue à l'aide d'un liant organique, à la surface d'une plaque de verre ou d'aluminium. L'échantillon est déposé en solution diluée au bas de la plaque soit sous forme de spot circulaire soit sous forme d'un fin trait horizontal de quelques millimètres à l'aide d'un déposeur automatique. La phase mobile liquide progresse principalement par capillarité au travers de la phase stationnaire. La figure II.1 récapitule les différentes étapes d'une séparation TLC:

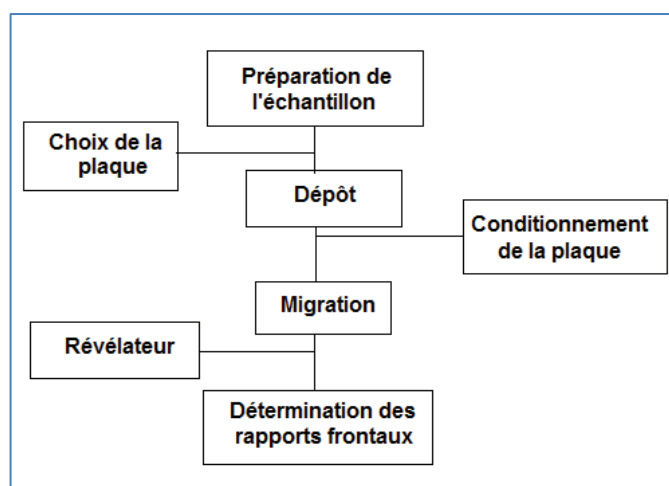


Figure II.1 Les différentes étapes d'une analyse en chromatographie sur couche mince.
(Adaptation de documents CAMAG)

- *étape 1* : une préparation de l'échantillon solide est tout d'abord nécessaire pour le faire passer en solution en ajustant le choix du solvant afin d'avoir une bonne adéquation avec la polarité des familles moléculaires à extraire du matériel végétal ;

- *étape 2* : le choix de la phase stationnaire sur laquelle le dépôt de l'échantillon est à effectuer ainsi que celui de la phase mobile permettant des conditions optimales de séparation;

- *étape 3* : le dépôt de l'échantillon sur la plaque puis la migration de la phase mobile dans une cuve fermée verticale ou horizontale sont réalisés. La migration peut être effectuée éventuellement après un conditionnement préalable de la cuve de migration ;

- *étape 4* : après migration du front de solvant jusqu'à une certaine distance, la localisation des composés séparés se fait sur la plaque séchée et les rapports frontaux (R_f)

peuvent être calculés directement si les composés sont visibles ou dans le cas contraire, après utilisation d'un révélateur pour repérer les différentes bandes de migration.

Si les composés donnant des tâches invisibles possèdent des groupements chromophores, il est possible de les révéler par lecture de la plaque à 254 nm sous une lampe UV. Mais dans le cas où il y a absence de groupement chromophore, comme c'est le cas pour la plupart des composés terpéniques que nous avons étudiés, il faut alors pulvériser sur la plaque un réactif permettant d'introduire des groupements fluorophores ou chromophores sur les différents composés. Dans notre cas, nous avons utilisé le p-Anisaldehyde qui est un révélateur non-spécifique d'une famille moléculaire donnée mais qui permet la révélation de composés ayant des groupements nucléophiles.

Le choix de la phase stationnaire et celui de la phase mobile s'avèrent cruciaux pour obtenir les meilleures conditions de séparation des composés.

II.2.2 PHASE STATIONNAIRE

Le choix de la phase stationnaire conditionnant le choix de la phase mobile, il convient donc dans un premier temps de sélectionner le type de phase stationnaire offrant le maximum de sélectivité envers les composés terpéniques à séparer de sorte à ce que les différences entre les rapports frontaux soient maximales.

Même s'il existe un large choix de phases stationnaires disponibles (figure II.2) couvrant un large domaine de polarité, celles à base de silice vierge restent encore les plus utilisées en TLC car elles possèdent une importante résistance mécanique, une grande surface spécifique de l'ordre de 300 à 600 m².g⁻¹, une taille des particules de l'ordre de 10 µm (4 µm pour la HPTLC) et un volume poreux de l'ordre de 60 Å.

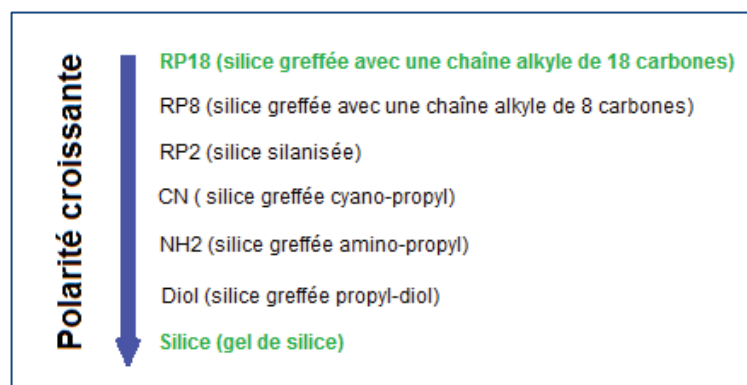


Figure II.2 Différentes phases stationnaires de silice et silices greffées disponibles commercialement pour l'analyse en TLC.

En vert, les plaques utilisées pour l'étude.

Pour l'analyse des composés terpéniques, objets de notre étude, nous avons choisi de tester la résolution de leur séparation sur deux types de phases de polarité extrême : le « gel de silice » (phase la plus polaire) et la silice greffée avec une chaîne alkyle de 18 carbones (RP18) (phase la plus apolaire). Nous avons testé en premier lieu le « gel de silice » car c'est une phase robuste couramment utilisée en chromatographie d'adsorption [2-4] et ensuite, nous avons évalué les performances de la chromatographie à polarité de phases inverse en retenant le support de silice greffée de type RP18, support sur lequel de nombreuses applications sont développées aussi bien en chromatographie liquide [5, 6] qu'en TLC [7, 8].

Le « gel de silice » est de la silice hydroxylée et hydratée de formule $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ présentant à la surface différents types de groupements silanol : silanol libre, silanols liés, pont siloxane, silanol libre hydraté (figure II.3).

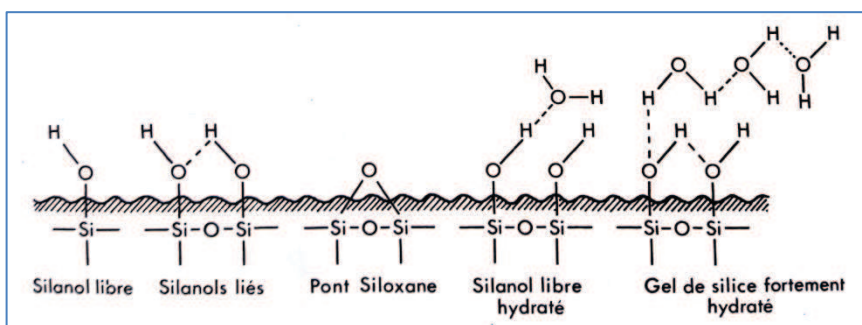


Figure II.3 Les différents types de groupements silanol présents sur un gel de silice.
REF : [9]

En l'absence de greffage, cette phase possède un caractère polaire et légèrement acide à neutre (pH : 5-7) permettant la formation de liaisons hydrogène. Son mécanisme d'action repose sur l'adsorption, phénomène qui consiste en l'accumulation d'un composé polaire à l'interface entre la phase stationnaire et la phase mobile. En TLC, sur ce type de phase stationnaire, la distance de migration d'un soluté est d'autant plus faible que sa polarité est élevée. Nous avons sélectionné de la silice de type F254 dans laquelle est incorporé un indicateur (sel de zinc généralement) qui émet une fluorescence verte lorsque la plaque est éclairée sous une lampe UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Toute substance qui absorbe même faiblement à cette longueur d'onde apparaît alors sous la forme d'une tache sombre (ou quelque fois colorée) sur un fond vert. Cet indicateur est particulièrement utile dans notre cas car la plupart des composés terpénoïdes sont difficiles à détecter du fait qu'ils ne possèdent pas de groupement chromophore fort.

La silice greffée avec une chaîne alkyle à 18 carbones (Si-C18) permet de faire de la TLC sur phases de polarité inversée. Des chaînes alkyles sont greffées par des liaisons covalentes aux fonctions silanol de la surface de la silice et la plupart des silanols sont sous la forme $(\text{Si}-\text{O}-\text{C}_{18}\text{H}_{37})$ ce qui permet de diminuer la polarité de la silice. La phase stationnaire greffée devient

apolaire et hydrophobe permettant de développer des interactions lipophiles avec les composés à analyser et d'utiliser des phases mobiles hydro-organiques plutôt polaires pour l'élution. La silice greffée se comporte comme un liquide et la séparation met en jeu les coefficients de partage et non plus les coefficients d'adsorption. Sur ce type de support, la distance de migration d'un soluté est d'autant plus faible que le soluté est peu polaire. Quelques travaux antérieurs [7, 8] ont montré l'intérêt de ce type de support pour la séparation en TLC de composés terpéniques notamment pour la résolution de certaines formes isomériques.

En vue du couplage des systèmes TLC optimisés à la spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS), il est nécessaire d'avoir un support qui ne soit pas inerte vis-à-vis de la conductivité du courant - comme le verre peut l'être - aussi, les différentes plaques TLC sélectionnées pour notre étude sont toutes sur support aluminium. De plus, les dimensions de ces plaques ont été imposées de sorte à pouvoir directement introduire la plaque dans la source du MALDI après l'élution.

II.2.3 PHASE MOBILE

Afin d'assurer la meilleure résolution possible d'un mélange de composés terpéniques, il est nécessaire d'associer à la phase stationnaire sélectionnée (gel de silice ou Si-C18), la phase mobile la mieux adaptée à la séparation. En fonction de la phase mobile choisie, de grandes variations au niveau de la nature et de l'intensité des interactions soluté-solvant peuvent en effet être observées modifiant ainsi la séparation des composés, l'ordre d'élution et les sélectivités.

La phase mobile doit offrir une bonne sélectivité vis-à-vis des composés pour les désorber de la phase stationnaire (chromatographie d'adsorption) ou pour déplacer l'équilibre de partage phase stationnaire/phase mobile en faveur d'une solubilisation en phase mobile (chromatographie de partage). La solubilité des composés dans la phase mobile est donc un facteur important qui conditionnera la vitesse de migration des composés à séparer.

Pour aider à la sélection des différents solvants constituant la phase mobile et comparer les phases mobiles les unes par rapport aux autres, la notion de force éluante a été introduite. La définition en a été faite en premier lieu dans le cas de la chromatographie d'adsorption sur gel de silice, et correspond à la capacité d'un solvant à s'adsorber sur la phase stationnaire et à déplacer les composés à séparer.

L'optimisation du ou des solvants adéquats en TLC n'est pas une méthode systématique et repose sur des séries d'essais-tests. Afin de ne pas multiplier le nombre d'essais, nous avons choisi d'utiliser la classification de Snyder pour sélectionner les solvants à tester.

II.2.4 CLASSIFICATION DES SOLVANTS

La polarité d'un solvant pur peut être exprimée de différentes manières : soit par sa force éluante sur silice (ϵ_0), soit par sa polarité globale P' (résultante de différentes interactions) soit également par son paramètre de solubilité de Hildebrand δ [10]. Ce sont principalement sur les 2 premières évaluations de polarité que l'on s'appuie pour les choix de phase mobile liquide en chromatographie.

La plus ancienne des échelles de polarité de solvants a été définie dans le cadre de la chromatographie d'adsorption sur gel de silice. Elle est basée sur la capacité d'un solvant à désorber les molécules de méthyl tert-butyl éther (MTBE, soluté de référence) adsorbées sur la phase stationnaire de silice. Une force éluante (ϵ_0) est ainsi définie pour chaque solvant avec arbitrairement une force éluante nulle ($\epsilon_0=0$) attribuée au pentane.

Une classification plus fine des solvants a été établie par Snyder qui a calculé pour chaque solvant une polarité globale (P') à partir de valeurs expérimentales établies par Rohrschneider en chromatographie en phase gazeuse [1, 11]. La valeur de P' pour chaque solvant est la résultante de 3 termes principaux caractérisant respectivement sa capacité à être accepteur de protons (x_e) ou donneur de protons (x_d) et sa capacité à établir des interactions dipolaires (x_n).

Le caractère donneur de protons a été établi en prenant l'éthanol comme soluté test, le caractère accepteur à partir du dioxane et les interactions dipolaires ont été établies avec le nitrométhane. Pour chaque solvant, on a : $x_e + x_d + x_n = 1$; où x_e représente la part du caractère accepteur de protons par rapport à la polarité globale P' et de même pour x_d et x_n . D'où la polarité globale P' d'un solvant peut être représentée par la formule suivante :

$$P' = x_e P'_e + x_d P'_d + x_n P'_n$$

Cette classification établie par Snyder [1], permet de regrouper les solvants sur un diagramme ternaire en fonction des interactions soluté-solvant (figure II.4) : chaque côté du triangle reportant pour un solvant donné l'intensité de l'un de ses 3 caractères : accepteur de protons (x_e), donneur de protons (x_d) et les interactions dipolaires (x_n).

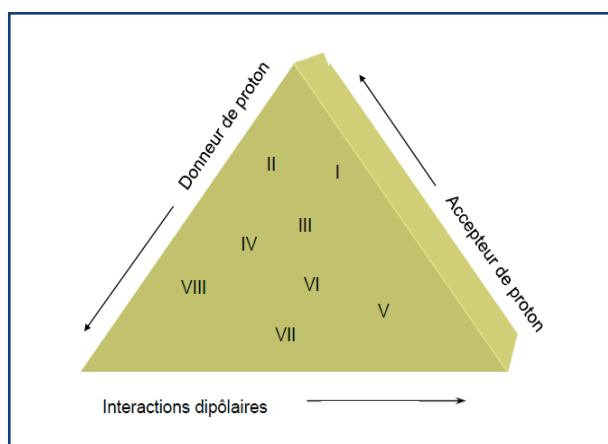


Figure II.4 Triangle de sélectivité de Snyder.
REF : [1]

Les solvants sont répartis en huit groupes selon leur sélectivité et l'intensité de leurs interactions (tableau II.1). Par exemple, le groupe I regroupe les solvants accepteurs de protons pour 46% en moyenne de leur polarité globale P' tandis qu'on retrouve les solvants donnant des interactions dipolaires fortes (51%) dans le groupe V et les solvants donneurs de protons pour 41% de leur polarité globale dans le groupe VIII. Les solvants des autres groupes ont des valeurs intermédiaires pour x_e , x_d et x_n et ont donc une sélectivité moins spécifique. Pour un même groupe, les solvants donneront des interactions voisines et entraîneront peu de variation de sélectivité envers les solutés étudiés. Par ailleurs, pour une polarité P' donnée, il sera possible de trouver des solvants présentant des interactions spécifiques différentes ce qui permettra alors d'obtenir des sélectivités différentes. On pourra également en mélangeant différents solvants ajuster la force éluante de la phase mobile.

Tableau II.1 Classification des solvants en fonction de leurs groupes de sélectivité.
REF : [10].

Groupe de sélectivité	Solvant	Polarité globale P'	Force relative des différentes interactions			Force éluante sur silice (ϵ_0)
			x_e	x_d	x_n	
Solvants de « base »	<i>n</i> -hexane	0.1	-	-	-	0
	<i>n</i> -heptane	0.1	-	-	-	0
	Cyclohexane	0.2	-	-	-	-
Groupe I	Éther de <i>n</i> -butylique	2.1	0.44	0.18	0.38	-
	Éther d'isopropyle	2.4	0.48	0.14	0.38	0.32
	Méthyl tert-butyl éther (MTBE)	2.5	0.50	0.12	0.34	0.47
	Éther éthylique	2.8	0.53	0.13	0.34	-
Groupe II	<i>n</i> -butanol	3.9	0.59	0.19	0.25	-
	Propan-2-ol	3.9	0.55	0.19	0.27	-
	Propan-1-ol	4.0	0.54	0.19	0.28	-
	Éthanol	4.3	0.52	0.19	0.29	-
	Méthanol	5.1	0.48	0.22	0.31	0.70

Groupe III	Tétrahydrofurane (THF)	4.0	0.38	0.20	0.42	0.53
	Pyridine	5.3	0.41	0.22	0.36	
	Méthoxyéthanol	5.5	0.38	0.24	0.38	
	Diméthylformamide (DMF)	6.4	0.39	0.21	0.40	
Groupe IV	Acide acétique	6.0	0.30	0.31	0.30	> 0.70
	Formamide	9.6	0.36	0.33	0.30	
Groupe V	Dichlorométhane	3.5	0.30	0.20	0.50	
	1,2-dichloroéthane	3.5	0.30	0.21	0.49	0.34
Groupe VI	Acétate d'éthyle	4.4	0.34	0.23	0.43	0.48
	Butanone	4.7	0.35	0.22	0.43	
	Dioxanne	4.8	0.36	0.24	0.40	0.51
	Acétonitrile	5.8	0.31	0.27	0.42	0.52
Groupe VII	Toluène	2.4	0.25	0.28	0.47	
	Benzène	2.7	0.23	0.32	0.45	
	Nitrobenzène	4.4	0.26	0.30	0.44	
Groupe VIII	Chloroforme	4.1	0.25	0.41	0.33	0.26
	Nitrométhane	6.0	0.28	0.31	0.40	
	Eau	10.2	0.37	0.37	0.25	> 0.70

En chromatographie d'adsorption ou de partage classique, on choisit préférentiellement les solvants de la phase mobile parmi ceux appartenant aux 3 groupes I, V et VIII tandis qu'en chromatographie à polarité de phases inversée, on privilégie les solvants des groupes II, III et VI.

C'est en s'appuyant sur cette classification de solvants que nous avons optimisé la composition des phases mobiles pour analyser en TLC les différentes résines végétales sélectionnées. Nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus en chromatographie à polarité de phase normale (NP) sur gel de silice.

II.3 ANALYSE DE RESINES VEGETALES SUR GEL DE SILICE

II.3.1 OPTIMISATION DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE

L'optimisation de la composition de la phase mobile a été effectuée dans un premier temps en testant séparément la force éluante et la sélectivité d'un solvant pur représentatif de chaque groupe de sélectivité à l'exception du groupe IV qui n'est pas adapté à l'analyse par TLC. En effet cette classe regroupe des solvants protiques hydrophiles tels que l'acide acétique ou le formamide qui, utilisés en tant que solvant pur, entraînent une valeur de pH de la phase mobile non compatible avec le gel de silice qui se détériore ou se dissout dans le cas d'un pH extrême trop acide ou trop basique. Dans un second temps, un ajustement de la force éluante de ces solvants a été évalué par dilution du solvant pur avec de l'heptane considéré comme solvant de base en chromatographie d'adsorption sur silice (solvant n'apportant aucune sélectivité). Enfin différentes combinaisons de solvants de sélectivités différentes ont été testées en tant que phase mobile.

II.3.1.1 *CHOIX DES SOLUTES MODELE*

L'objectif de notre étude étant de séparer les composés terpéniques présents dans les résines en s'intéressant plus particulièrement à ceux de haut poids moléculaire (diterpènes ou triterpènes) qui sont les marqueurs majoritaires des résines [12], nous avons sélectionné pour effectuer l'optimisation de la composition de la phase mobile, deux standards triterpéniques: l'acide oléanolique et l'acide ursolique, disponibles commercialement. Ces composés sont connus pour être présents dans un grand nombre de végétaux [13] et possèdent une structure proche des acides triterpéniques présents dans les résines (figure II.5). Par ailleurs ces 2 composés étant 2 isomères, ils ont la même masse moléculaire. L'optimisation de leur séparation par TLC sera délicate mais nécessaire pour les distinguer lors du couplage du système TLC optimisé à la spectrométrie de masse. En effet, il n'est pas possible de distinguer 2 composés en spectrométrie de masse dès lors qu'ils ont la même masse moléculaire. Le choix de ces 2 standards nous permettra donc d'évaluer la capacité de la TLC à séparer les nombreux cas d'isomérisie rencontrés parmi les di- et triterpènes présents dans les résines végétales.

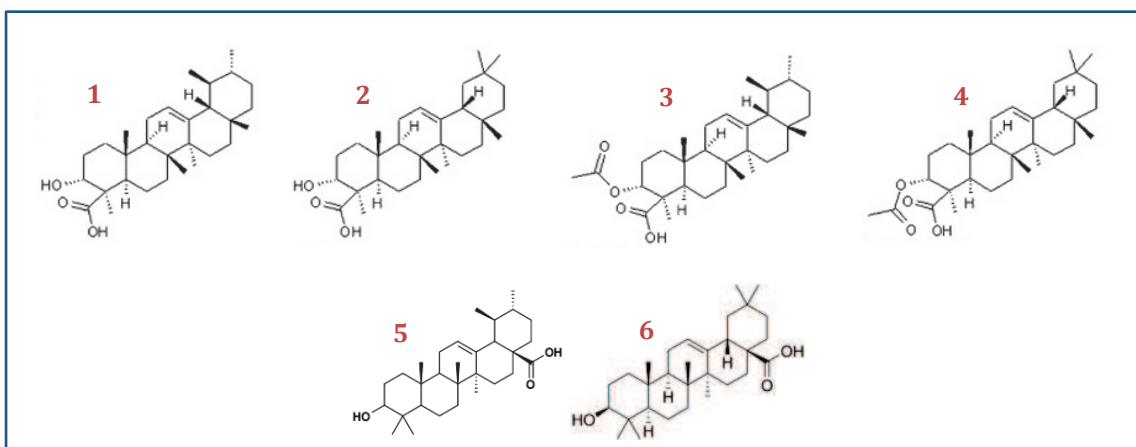


Figure II.5 Structures des acides triterpéniques étudiés : acide β -boswellique (1), acide α -boswellique (2), acide acétyl- β -boswellique (3), acide acétyl- α -boswellique (4), acide ursolique (5), acide oléanolique (6). Les acides 1-4 sont les acides majoritaires les plus décrits comme présents dans les résines Frankincense tandis que les acides 5-6 sont les 2 standards commerciaux modèles pour notre étude.

II.3.1.2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Sur une plaque de « gel de silice » traitée avec un réactif fluorescent F_{254} de 10 cm de hauteur et de 5 cm de largeur, 3 dépôts sont effectués selon l'ordre indiqué figure II.6. Chaque tâche correspond au dépôt de 2 μL d'une solution standard à 500 mg.L^{-1} dans le méthanol. L'élution se fait sur 8 cm sans saturation préalable de la cuve verticale. Une première lecture de la plaque est réalisée sous lampe UV à 254 nm et à 366 nm et ensuite après révélation à l'anisaldéhyde (Annexe B).

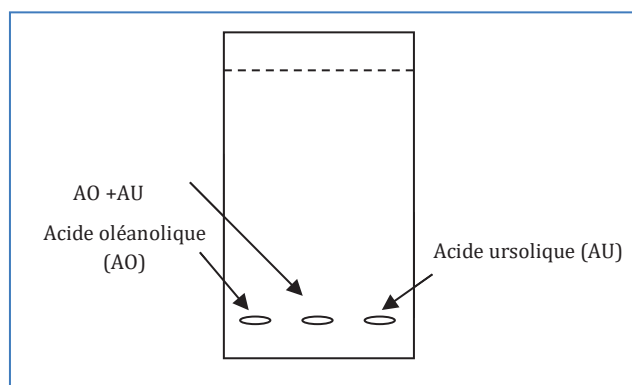


Figure II.6 Schéma de la plaque TLC avant migration.

Chaque spot révélé est défini par son rapport frontal (R_f) qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant.

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

Cette valeur comprise entre 0 et 1 est caractéristique du soluté analysé sur une phase stationnaire et une phase mobile données. Il est démontré par ailleurs que la résolution entre deux tâches très proches est optimale pour une valeur de $R_f = 0.33$ pour le composé le plus retenu.

II.3.1.3 STRATEGIE MISE EN PLACE

Afin de ne pas multiplier le nombre d'expériences, nous nous sommes inspirées de la procédure mise en place par la société CAMAG pour l'optimisation de la phase mobile en TLC [14]. Tout d'abord, on a réalisé l'élution des solutés par des solvants purs appartenant à chaque groupe de sélectivité (sauf le groupe IV pour les raisons indiquées précédemment). Les solvants choisis dans chaque groupe sont les suivants : méthyl tert-butyl éther MTBE (I), isopropanol (2-PrOH) (II), tétrahydrofurane (THF) (III), dichlorométhane (CH_2Cl_2) (V), acétate d'éthyle (AcOEt) (VI), toluène (VII) et chloroforme (CHCl_3) (VIII). Par la suite, en fonction des résultats obtenus, on a ajusté la force éluante en ajoutant un solvant de « base » n'apportant pas de sélectivité particulière tel que l'heptane ou l'hexane dans le cas d'une force éluante trop élevée et dans le cas contraire, on a ajouté de l'acide (solvant polaire protique) en petites quantités afin de désactiver la surface du gel de silice et ainsi réduire le nombre de liaisons hydrogène accessibles aux solutés. L'objectif visé est d'avoir des rapports frontaux (R_f) pour nos solutés compris entre 0.2 et 0.8. Si cette étape ne suffit pas pour séparer les composés, des mélanges binaires voire ternaires sont effectués.

- **ETAPE 1 : ETUDE DE LA FORCE ELUANTE DES SOLVANTS SELECTIONNES.**

La figure II.7 récapitule les 7 résultats obtenus pour la séparation des 2 acides triterpéniques à partir des solvants purs utilisés comme phase mobile.

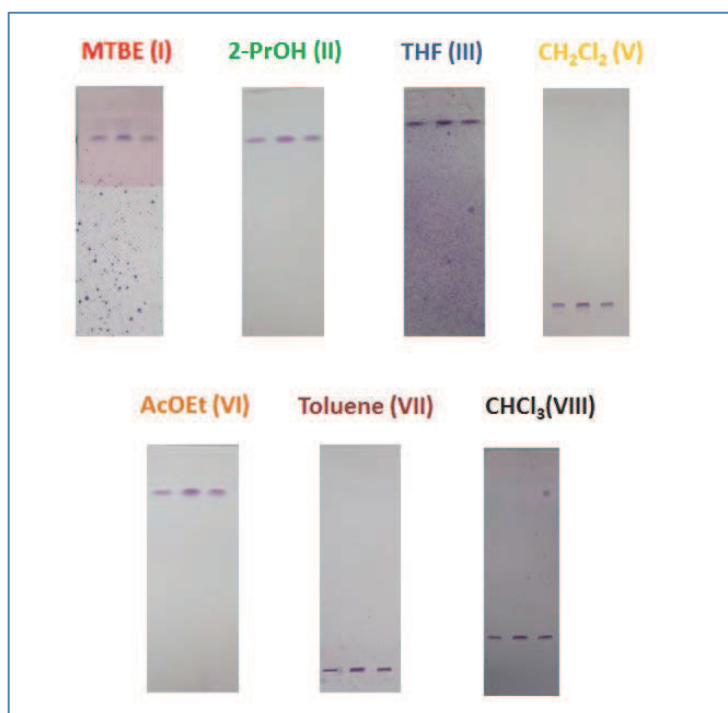


Figure II.7 Elution des acides oléanolique et ursolique sur plaque de silice avec des solvants purs.
Conditions expérimentales : plaque silice sur support aluminium F254 ; élution verticale sur 8 cm ; pas de pré-saturation de la cuve ; immersion de la plaque dans l'anisaldéhyde pour la révélation

L'adsorption sur gel de silice étant réalisée par interaction de type accepteur-donneur de protons, cela implique une grande affinité possible de ce support avec les acides triterpéniques donneurs de protons qui peut se traduire par une rétention plus ou moins importante sur la plaque selon la nature du solvant de migration. On constate que les éluants du groupe I, II, III, VI possèdent une grande force d'élution sur silice vis-à-vis des 2 acides triterpéniques modèle (élution des solutés en haut de plaque) contrairement aux solvants du groupe V, VII et VIII (faible élution des solutés par rapport à la ligne de dépôt). Les résultats obtenus sont en bonne corrélation avec les propriétés des solvants reportés sur le triangle de Snyder. En effet, les solvants des groupes I, II, III, sont des solvants à caractère accepteurs de protons marqué. Ils favorisent donc la solubilisation en phase mobile des 2 solutés donneurs de protons tout en pouvant interagir fortement avec la silice et ainsi désorber les deux acides triterpéniques. A l'opposé, les solvants dichlorométhane (V), toluène (VII) possèdent un fort moment dipolaire et un plus faible caractère accepteur/donneur de protons, ce qui est moins favorable à la solubilisation des solutés et ne permet pas d'interactions fortes avec la silice pour faciliter la désorption de la surface de la silice des composés à analyser.

Quel que soit le solvant pur utilisé, ces conditions d'analyse conduisent à une séparation non satisfaisante qui se traduit pour les 2 solutés soit par un R_f supérieur à 0.8 soit inférieur à 0.2. Cette première étape n'étant pas concluante nous avons procédé à une deuxième étape qui consiste à ajuster la force éluante de chaque solvant pur.

- **ETAPE 2 : AJUSTEMENT DE LA FORCE ELUANTE DES SOLVANTS PURS**

Dans un premier temps on commencera par moduler les solvants de plus grande force éluante (les solvants des groupes I, II, III et VI) en ajoutant un solvant de polarité faible et de force éluante nulle (solvant de base) par rapport au support de silice. Pour cela, on diluera le solvant sélectionné au demi avec de l'hexane. Si cela ne suffit pas, on diluera au quart avec l'hexane.

Dans le cas contraire, si la force d'élution est trop faible (solvants des groupes V, VII et VIII), on ajoute 10% de modificateur acide (par exemple de l'acide phosphorique). L'exploitation de ce dernier cas, n'a pas conduit à une augmentation significative des valeurs de R_f pour les acides oléanolique et ursolique et en conséquence cette voie a été abandonnée.

La figure II.8 présente les résultats obtenus avec les phases mobiles constituées des différents mélanges binaires obtenus par ajout d'hexane dans les solvants représentatifs des groupes I, II, III et VI.

A la lecture des 3 premières plaques (Figure II.8) éluées avec des mélanges binaires (solvant X : hexane) en proportions semblables (1 :4, v/v), une classification des 4 solvants sélectifs peut être établie selon leur force éluante croissante : AcOEt < THF, MTBE < 2-PrOH. On retrouve bien les solvants des groupes I, II et III comme étant les plus éluants et donc plus appropriés pour le mode chromatographie à polarité de phases inversée que pour le mode chromatographie d'adsorption sur gel de silice. Il n'est pas observé de séparation des acides triterpéniques pour le mélange MTBE/hexane (1:4, v/v), ni pour les mélanges THF/hexane (1:4, v/v) et 2-PrOH/hexane (1:4, v/v). En revanche, une amorce de séparation est observée pour le mélange AcOEt/hexane (1 :4, v/v) mais qui s'accompagne d'une légère diffusion des bandes. Afin de mieux cerner cette piste de séparation, nous avons testé des proportions différentes pour ce mélange AcOEt/hexane [(3 :7) ; (4 :6) et (5 :5)] conduisant à des conditions de séparation plus favorables pour la composition AcOEt/heptane (3:7, v/v). Un élargissement et une diffusion des bandes restent néanmoins observés.

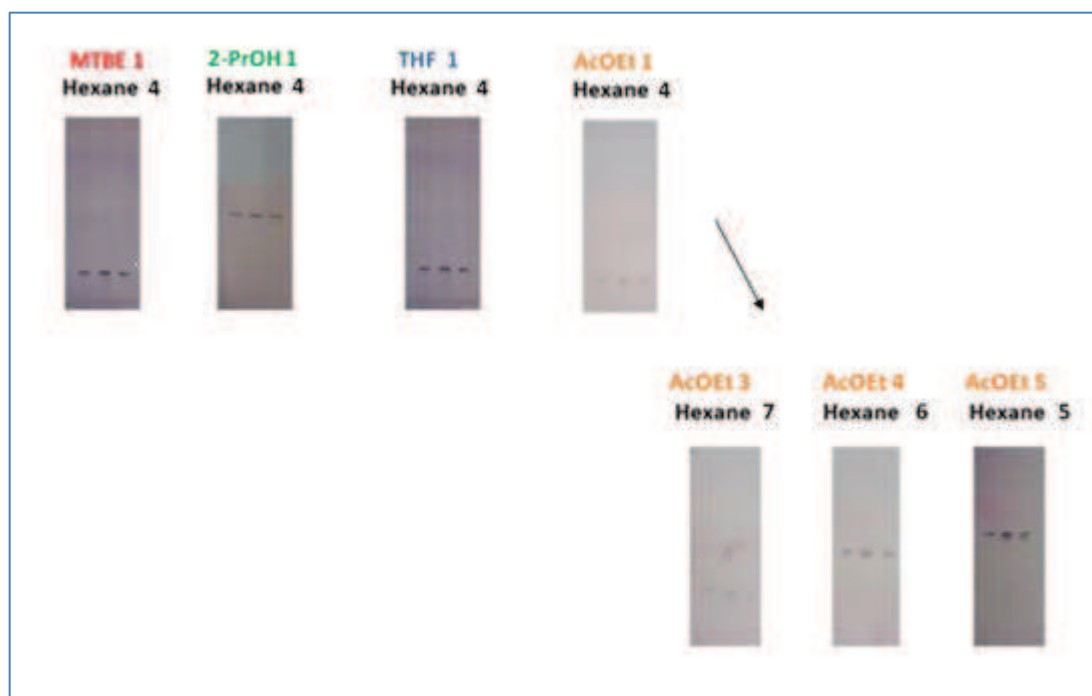


Figure II.8 Etape 2 : Ajustement de la force d'élution des solvants purs par ajout d'heptane.
Conditions expérimentales : plaque silice sur support aluminium F254 ; élution verticale sur 8 cm ; pas de saturation de la cuve ; immersion de la plaque dans l'anisaldéhyde pour la révélation

En conclusion de ces 2 premières étapes, on peut retenir deux points principaux :

- Les 7 solvants purs étudiés peuvent être répartis en deux sous-groupes : les solvants à force d'élution faible (dichlorométhane (V), toluène (VII) et chloroforme (VIII)) constituant le sous-groupe A et les solvants à force d'élution forte (MTBE (I), isopropanol (II), tétrahydrofurane (III) et acétate d'éthyle (VI)) constituant le sous-groupe B.
- Parmi les sept groupes de solvants purs testés en mélange binaire avec un acide ou de l'hexane pour moduler leur force éluante, c'est l'acétate d'éthyle (groupe VI) avec des forces relatives d'interactions intermédiaires entre celles du chloroforme (groupe VIII) et du dichlorométhane (groupe V), qui serait le solvant le plus prometteur du point de vue de la sélectivité entre les 2 acides oléanolique et ursolique. Néanmoins dans ces conditions, des trainées de pics et de mauvaises efficacités sont observées.

Afin d'améliorer les efficacités et la sélectivité, différents mélanges binaires et ternaires entre solvants de groupes de sélectivité différents ont ensuite été testés.

- **ETAPE 3.A : COMBINAISONS DE SOLVANTS DE SELECTIVITE DIFFERENTE ET DE FORCE ELUANTE CONTRAIRE (MELANGE D'UN SOLVANT DU SOUS-GROUPE A AVEC UN SOLVANT DU SOUS-GROUPE B)**

Dans un premier temps ont été testés comme phase mobile, différents mélanges constitués d'un solvant du sous-groupe A et d'un solvant du sous-groupe B en proportion (1 :1 , v/v). Les différentes combinaisons de solvants ont été réalisées en vérifiant préalablement leur miscibilité.

Mélanges Dichlorométhane (V) / solvant sous-groupe B (1 :1, v/v)

4 mélanges binaires ont été préparés en ajoutant au dichlorométhane du MTBE, de l'isopropanol, du tétrahydrofurane ou de l'acétate d'éthyle.

La figure II.9 met en évidence pour ces 4 mélanges, une force d'élution trop importante (élution en haut de plaque des solutés). Une amorce de séparation est constatée pour la phase mobile CH_2Cl_2 /AcOEt. Pour ce mélange binaire, des ajustements de force éluante par ajout d'hexane ont alors été effectués. La composition ternaire suivante : CH_2Cl_2 /AcOEt/hexane (2:3:5, v/v/v) est apparue la plus favorable du point de vue de la sélectivité avec cependant un effet important d'élargissement de bandes.

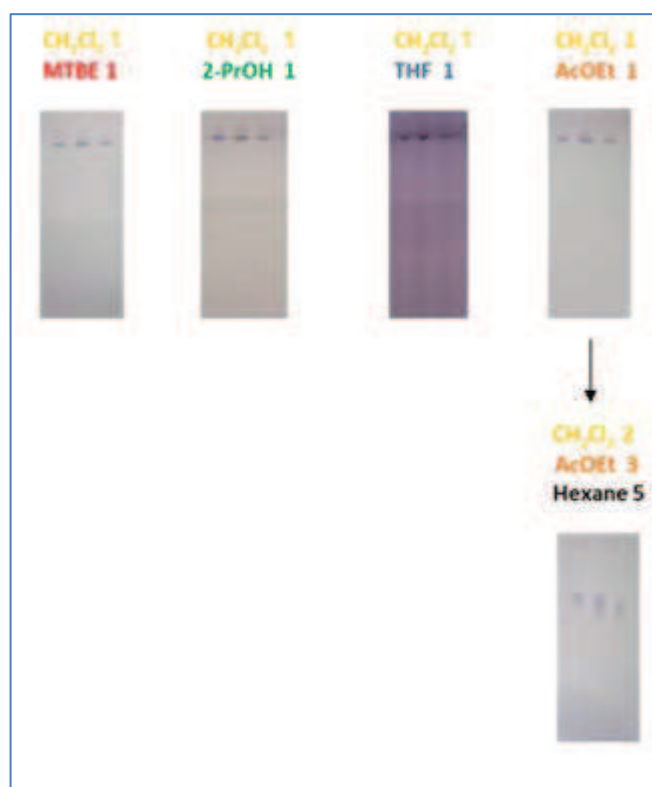


Figure II.9 Etape 3.a : Différents mélanges : dichlorométhane (V)/solvant sous-groupe B testés comme phase mobile.

Conditions expérimentales : plaque silice sur support aluminium F254 ; élution verticale sur 8 cm ; pas de pré-saturation de la cuve ; immersion de la plaque dans l'anisaldéhyde pour la révélation

Mélanges Toluène (VII) / solvant sous-groupe B (1 :1, v/v)

La figure II.10 reporte les résultats obtenus pour les 4 mélanges binaires différents. On peut observer avec le binaire toluène/AcOEt, (1:1, v/v), une amorce de séparation des solutés avec des rapports frontaux (R_f) de l'ordre de 0.6. Pour ajuster la force d'élution de ce dernier mélange, de l'hexane a été ajouté dans différentes proportions. Le mélange toluène/AcOEt/hexane (2 :3 :5, v/v/v) a bien permis de diminuer les valeurs de R_f comme attendu mais sans amélioration de la qualité de séparation par rapport au mélange toluène/AcOEt (1 :1, v/v).

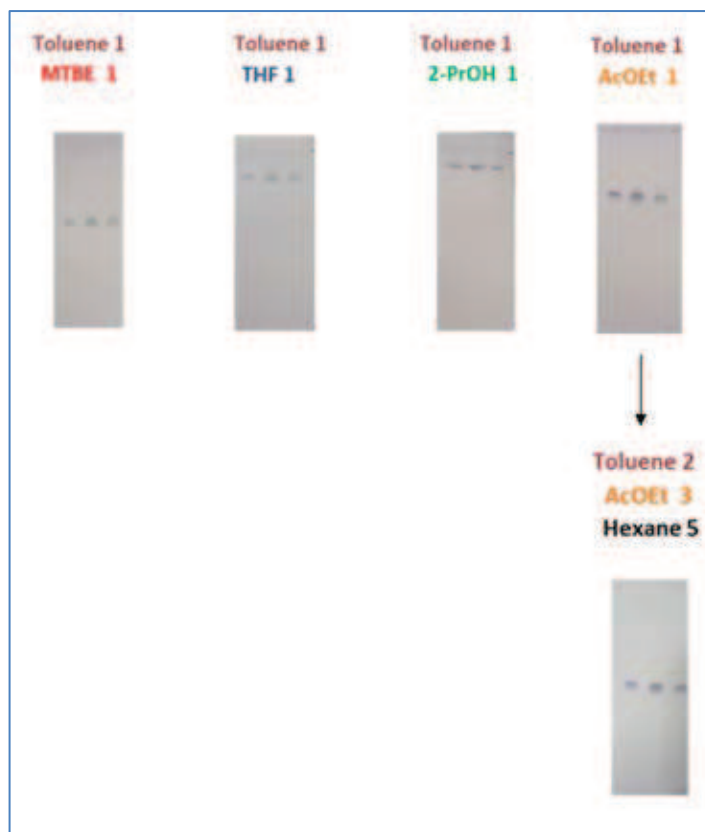


Figure II.10 Etape 3.a : Différents mélanges toluène (VII)/solvant sous-groupe B testés comme éluant.
Conditions expérimentales: plaque silice sur support aluminium F254 ; élution verticale sur 8 cm ; pas de saturation de la cuve ; immersion de la plaque dans l'anisaldéhyde pour la révélation

Mélanges Chloroforme (VIII) / solvant sous-groupe B / hexane (1 :1 :2, v/v/v)

Les différents mélanges binaires Chloroforme/solvant du sous-groupe B testés étant trop éluants, de l'hexane a été ajouté dans le mélange afin de réguler la force éluante tout en gardant une proportion (1 :1, v/v) entre le chloroforme et le solvant du sous-groupe B.

A partir des résultats reportés dans la figure II.11, on constate que les 2 mélanges CHCl_3 /MTBE/Hexane et CHCl_3 /AcOEt/hexane permettent d'obtenir des conditions de migration des solutés dans la zone la plus favorable (R_f compris entre 0.3 et 0.4) mais avec une légère diffusion des bandes. On observe une amorce de séparation des formes isomères avec un R_f de 0.34 pour l'acide oléanolique et de 0.32 pour l'acide ursolique.

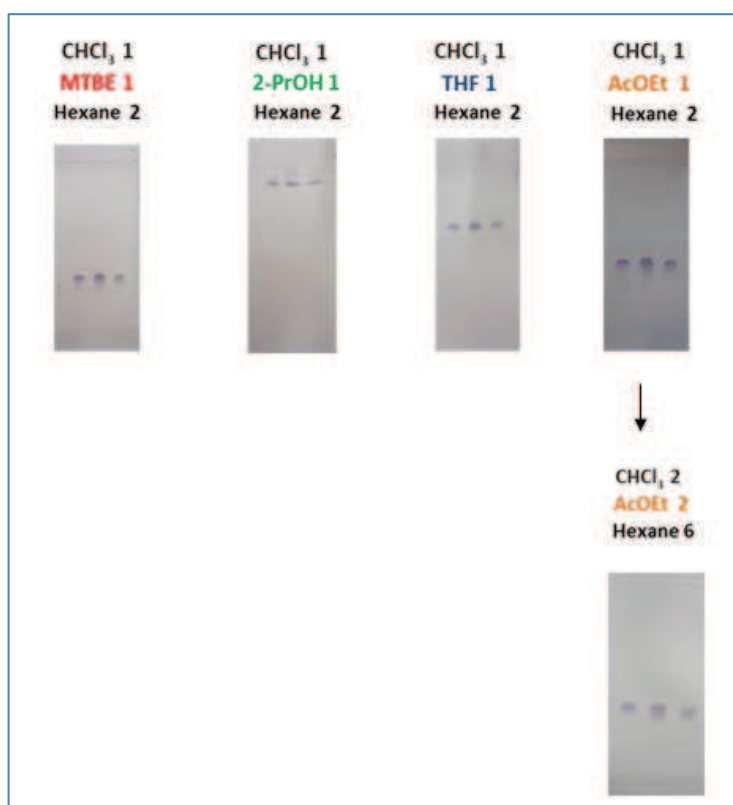


Figure II.11 Etape 3.a : Différents mélanges Chloroforme (VIII)/ solvant du sous-groupe B testés comme phase mobile.

Conditions expérimentales : plaque silice sur support aluminium F254 ; élution verticale sur 8 cm ; pas de saturation de la cuve ; immersion de la plaque dans l'anisaldéhyde pour la révélation

A partir de ces différents essais, il apparait que la combinaison en mélange binaire de solvants de force éluante et de sélectivité différentes serait favorable à un début de séparation des acides triterpéniques. Parmi les différents mélanges envisagés, on constate que les combinaisons de l'acétate d'éthyle (VI) avec le dichlorométhane (V), le chloroforme (VIII) ou le toluène (VII) seraient les plus prometteuses.

- **ETAPE 3.B : COMBINAISONS DE SOLVANTS DE SELECTIVITE DIFFERENTE ET DE FORCE ELUANTE SIMILAIRE (MELANGE DE 2 SOLVANTS DU SOUS-GROUPE B)**

Ces mélanges en combinaison binaire étant trop éluants, ils ont tous été testés après ajout d'hexane afin d'ajuster la force d'élution. Nous présentons en figure II.12 uniquement trois combinaisons ternaires avec l'acétate d'éthyle (VI) en proportion constante dans les 3 mélanges.

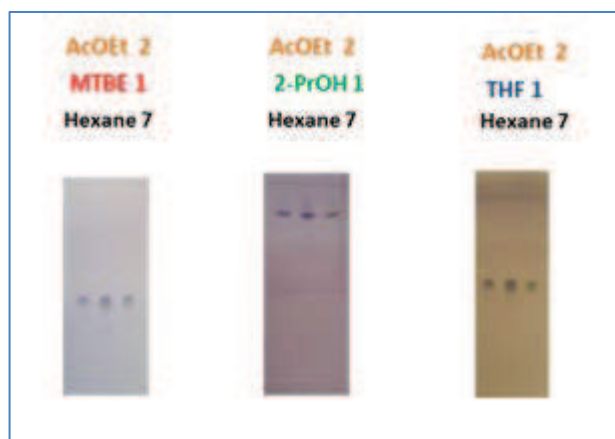


Figure II.12 Etape 3.b : Différents mélanges AcOEt (VI)/ solvant du sous-groupe B/hexane en proportions (2 : 1 : 7) testés comme phase mobile.

Conditions expérimentales: plaque silice sur support aluminium F254 ; élution verticale sur 8 cm ; pas de saturation de la cuve ; immersion de la plaque dans l'anisaldéhyde pour la révélation

On observe un début de séparation des composés avec les phases mobiles AcOEt/MTBE/Hexane (2 : 1 : 7, v/v/v) et AcOEt/THF/Hexane (2 : 1 : 7, v/v/v) dans une plage de valeurs de R_f satisfaisantes (R_f compris entre 0.3 et 0.5). Avec la phase mobile AcOEt/MTBE/Hexane (2 : 1 : 7, v/v/v), les valeurs des R_f sont respectivement de 0.33 et de 0.31 pour l'acide oléanolique et l'acide ursolique. Pour la composition AcOEt /THF/Hexane (2 : 1 : 7, v/v/v) les R_f sont de 0.50 pour l'acide oléanolique et de 0.47 pour l'acide ursolique.

En conclusion de cette étape 3, on constate que la présence d'acétate d'éthyle dans la composition de la phase mobile est favorable dans tous les cas à un début de séparation des 2 acides triterpéniques. Les systèmes suivants correspondant au mélange d'un solvant du sous-groupe A et d'un solvant du sous-groupe B: dichlorométhane/AcOEt; toluène/AcOEt; et chloroforme/AcOEt ainsi que ceux correspondant au mélange de deux solvants du sous-groupe B: AcOEt/MTBE et AcOEt/THF sont en effet ceux avec lesquels un début de séparation peut être atteint.

Au regard de l'ensemble des résultats obtenus et examinés de façon plus approfondie, nous avons retenu le mélange ternaire constitué de 2 solvants de sélectivité différente: l'acétate d'éthyle du groupe VI et le toluène du groupe VII en présence d'hexane comme étant celui le plus prometteur pour résoudre notre problématique. En effet, ce mélange ternaire

permet d'avoir la meilleure amorce de séparation des isomères (acides oléanolique et ursolique) tout en limitant la diffusion des bandes (figure II.10).

Le choix de l'acétate d'éthyle est en accord avec ce que l'on retrouve dans la littérature pour l'étude des résines de type Frankincense (voir tableau récapitulatif chapitre I). En effet, ce solvant possède une polarité globale moyenne ($P' = 4.4$) avec un caractère accepteur de protons intermédiaire ($x_e = 0.34$) et des interactions de type dipôle-dipôle ($x_n = 0.43$) renforcées.

Compte tenu que les résines végétales que nous souhaitons caractériser sont des mélanges complexes de composés terpéniques de polarité variable et pour certains de structure très proche, nous avons poursuivi le développement méthodologique autour de l'optimisation de la composition de la phase mobile. L'objectif est donc d'évaluer de façon plus approfondie toutes les potentialités de la TLC sur gel de silice pour la séparation de formes isomériques.

- **ETAPE 4 : COMBINAISON DE PLUS DE 2 SOLVANTS DE SELECTIVITE DIFFERENTE**

L'association de trois solvants de sélectivité différente avec ajout de l'hexane si nécessaire pour ajuster les facteurs de rétention a ainsi été testée.

Sur la base de nos conclusions précédentes et pour limiter le nombre de combinaisons de solvants à tester, tous les mélanges que nous avons évalués en tant que phase mobile pour cette étape contiennent de l'acétate d'éthyle. De plus, nous avons choisi les différentes associations de sorte à explorer les différentes zones du triangle de Snyder. La figure II.13 présente trois combinaisons différentes : (AcOEt/CHCl₃/Toluène), (AcOEt/CH₂Cl₂/THF/Hexane) et (AcOEt/2-PrOH/THF/Hexane). La première combinaison de mélange ternaire choisie permet de tester les 3 interactions possibles à part à peu près comparable. Pour la deuxième combinaison, on a renforcé les interactions dipôle-dipôle et accepteur de protons et pour la troisième combinaison les interactions accepteur de protons ont été encore plus amplifiées.

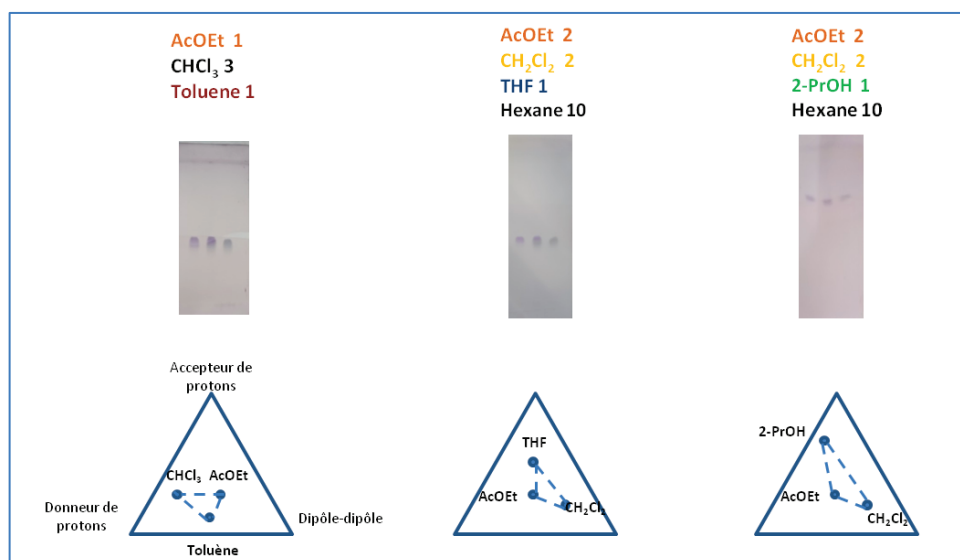


Figure II.13 Etape 4. Mélange de trois solvants de sélectivité différente avec ajout si nécessaire d'hexane pour ajuster la force éluante.

Conditions expérimentales : plaque silice sur support aluminium F254 ; élution verticale sur 8 cm ; pas de saturation de la cuve ; immersion de la plaque dans l'anisaldéhyde pour la révélation

Dans ces conditions on ne constate pas d'amélioration de la séparation des formes isomères par rapport aux résultats obtenus avec les mélanges de deux solvants de sélectivité différente.

• **ETAPE 5 : DOUBLE ELUTION ET AJOUT D'ACIDE**

Après avoir exploré toutes les combinaisons de solvants possibles, nous avons voulu tester si une double élution de la plaque pourrait améliorer la séparation des composés tout en réduisant la diffusion des bandes. Cette étape consiste en deux migrations successives des solutés en séchant la plaque entre chaque développement et en modifiant la composition de la deuxième phase mobile par rapport à la première.

La méthode de double élution n'a été testée que pour certaines compositions de phase mobile utilisant de l'acétate d'éthyle et un autre solvant de sélectivité différente.

Lors du premier développement, 3 mélanges différents ont été testés: (AcOEt/Hexane), (AcOEt/CH₂Cl₂/Hexane) et (AcOEt/ CH₂Cl₃/Hexane). Pour le deuxième développement de la plaque, la même composition de phase mobile a été testée dans les 3 cas : AcOEt/Hexane avec ajout d'une faible proportion d'acide acétique ou formique afin d'affiner l'étalement des bandes.

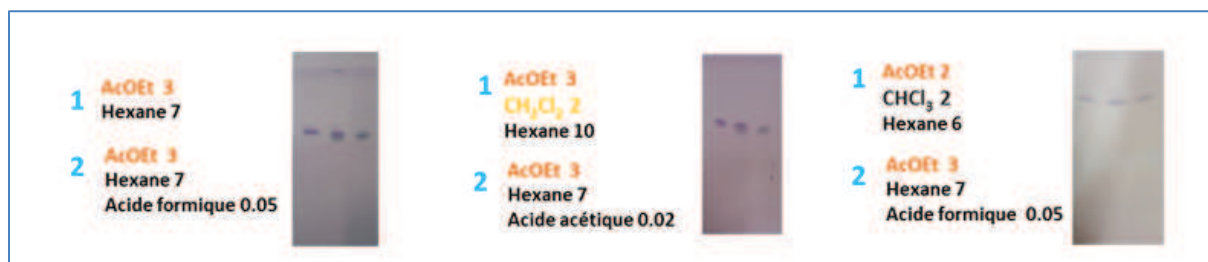


Figure II.14 Etape 5. Double élution de la plaque TLC et ajout d'acide.

Le chiffre 1 correspond à la composition de la phase mobile lors de la première élution et le chiffre 2 correspond à celle de la phase mobile lors de la deuxième élution.

D'après la figure II.14, on constate pour les deux premières plaques (acétate d'éthyle/hexane) et (acétate d'éthyle/dichlorométhane/hexane), qu'une double élution est favorable à une amélioration de la séparation des composés isomères par rapport à une simple élution. Les bandes se sont affinées comparées à une simple élution (fig II. 8 ou fig II.11). Néanmoins on observe l'apparition d'effets de bord plus importants (très visible sur la troisième plaque).

En complément de toute cette étude d'optimisation de la phase mobile, nous avons en dernier lieu, évalué l'effet que pouvait apporter sur la séparation une modification de l'accessibilité des silanols du « gel de silice » par pré-traitement à l'iode de la plaque.

• **ETAPE 6 : PRETRAITEMENT DE LA PLAQUE DE SILICE : DERIVATION DE LA PLAQUE**

Au vu de la littérature [15, 16], une séparation des acides oléanolique et ursolique (2 formes isomériques, α et β) (composés **5** et **6** figure II.5) serait possible après une dérivation de la plaque de silice à l'iode. Nous avons donc essayé d'appliquer cette technique à la séparation d'un autre couple d'isomères de la famille des terpénoïdes à savoir les 2 formes α et β de l'acide acétyle boswellique (composés **3** et **4** figure II.5). Ces composés sont décrits comme présents dans les résines végétales de type Frankincense (cf chapitre I). Ces 4 composés très proches, possèdent tous un même squelette carboné porteur de 2 groupements fonctionnels. Ils ne diffèrent que par la nature et la position de ces substituants sur les cycles (acétyle et acide pour les acides boswelliques ou hydroxyle et acide pour les acides oléanolique et ursolique).

Le protocole expérimental que nous avons suivi pour l'analyse, reprend celui de la littérature [15]:

Une solution d'iode à 1% dans du chloroforme a été préparée et placée dans la cuve de migration. L'iode est utilisé au préalable afin de réaliser une réaction de dérivation. Une première élution de la plaque de gel de silice est alors réalisée sur une distance de 1,2 cm avant le dépôt des échantillons. La plaque est ensuite recouverte de feuille d'aluminium et laissée à

l'abri de la lumière pendant 10 min. Après séchage de la plaque, le dépôt de chaque isomère et de leur mélange est effectué. Nous avons ainsi réalisé 2 plaques, la première pour reproduire l'analyse des 2 acides oléanolique (forme α) et ursolique (forme β) [15] et la deuxième pour l'analyse des 2 acides acétyles boswelliques (forme α et β). L'élution des plaques a été faite en utilisant comme phase éluante un mélange ternaire constitué d'éther de pétrole/acétate d'éthyle/acétone (8.2 : 1.8 : 0.1, v/v/v) puis une pulvérisation d'une solution d'acide sulfurique à 10% dans de l'éthanol a été appliquée sur la plaque après séchage pour révéler les solutés.

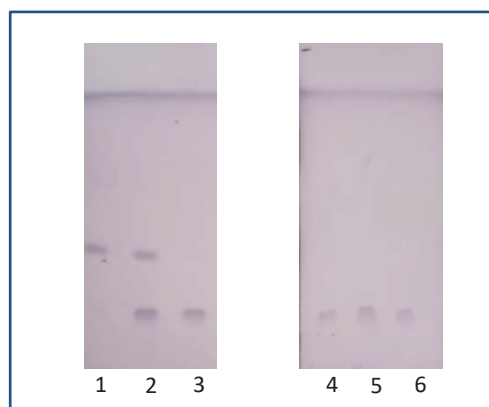


Figure II.15 Pré-traitement de la plaque de silice à l'iode avant dépôt. Solutés déposés : acide oléanolique (1), mélange d'acides oléanolique et ursolique (2), acide ursolique (3), acide acétyl- α -boswellique (4), mélange des 2 acides acétyles boswelliques α et β (5), acide acétyl- β -boswellique (6).

Conditions: Elution sur 8 cm avec comme phase mobile : (éther de pétrole : acétate d'éthyle : acétone, 8.2 : 1.8 : 0.1, v/v/v). Révélation avec 10% d'acide sulfurique dans de l'éthanol

La figure II.15 reporte les résultats d'analyse obtenus pour les 2 plaques. Il apparaît clairement que les conditions de pré-traitement du gel de silice sont très satisfaisantes pour la séparation des acides oléanolique et ursolique avec des R_f de 0.46 et 0.17, respectivement. Nos résultats sont en bon accord avec la littérature [15, 16]. En revanche, aucune séparation satisfaisante n'est observée pour les 2 formes α et β de l'acide acétyle boswellique. Il aurait été intéressant pour interpréter ces résultats, de disposer des résultats d'analyse dans les mêmes conditions, des 2 formes α et β de l'acide boswellique (composés **1** et **2** figure II.5). En effet, ces 2 derniers composés ne diffèrent des acides oléanolique et ursolique (composés **5** et **6** figure II.5) que par la position sur le squelette carboné des 2 groupements -OH et -COOH qu'ils ont en commun. Ces 2 groupements sont sur 2 carbones voisins pour les 2 formes α et β de l'acide boswellique alors qu'ils sont très éloignés dans le cas des acides oléanolique et ursolique. Cela aurait permis de s'assurer si la perte de séparation observée entre les 2 formes α et β de l'acide acétyle boswellique était ou non liée à la position voisine des 2 groupements acétyle et acide.

Ce résultat reste néanmoins intéressant à garder en mémoire pour la différenciation de certaines résines contenant des formes isomériques de même structure que l'acide oléanolique ou ursolique.

II.3.1.4 CONCLUSION

Les acides oléanolique et ursolique ont été les deux standards triterpéniques que nous avons sélectionnés comme solutés modèles pour notre étude d'optimisation de la composition de la phase mobile. Ils sont en effet connus pour être très présents dans de nombreux végétaux et présentent la particularité d'être isomères (formes α et β) ce qui représente du point de vue analytique une difficulté supplémentaire pour leur séparation.

Après de nombreux essais, nous avons sélectionné comme phase éluante la plus prometteuse pour l'analyse sur « gel de silice » des terpénoïdes de structure très proche, un mélange ternaire de solvants composés de 2 solvants de sélectivité différente (acétate d'éthyle (groupe VI) et toluène (groupe VII)) et d'un solvant de base (hexane) pour ajuster la force éluante. Les combinaisons plus complexes de type mélanges quaternaires n'ont pas abouti à de meilleures conditions de séparation ni du point de vue de la sélectivité ni de celui de l'efficacité. Une double élution de la plaque avec deux éluants différents et l'ajout de traces d'acide dans le deuxième éluant pourrait être une approche utile dans certains cas pour affiner les bandes éluées. D'autre part, un prétraitement à l'iode de la plaque de silice peut s'avérer intéressant dans le cas de la séparation spécifique de certains isomères d'acides triterpéniques. Cette méthode n'a pas apporté d'amélioration dans le cas de la séparation des 2 formes isomériques de l'acide acétyle boswellique.

II.3.2 ANALYSE DES ECHANTILLONS DE RESINES VEGETALES

La composition phytochimique des résines végétales étant très complexe et très riche en de nombreux composés terpéniques, nous nous sommes intéressées dans un premier temps à caractériser leurs marqueurs majoritaires à savoir les triterpénoïdes. Néanmoins, cette sous-famille de composés reste encore très variée dans leur structure ce qui conduit à des différences de polarité assez grandes et donc à des difficultés prévisibles pour atteindre une résolution totale de tous les constituants de ces mélanges extraits.

Afin d'optimiser les conditions d'analyse sur « gel de silice », nous sommes reparties dans un premier temps, de la composition de phase mobile (acétate d'éthyle/toluène/heptane) précédemment optimisée pour la séparation spécifique des deux solutés modèle. Nous avons cherché à ajuster les proportions relatives de ces 3 solvants pour obtenir les meilleures conditions de séparation d'un mélange de 5 composés terpéniques standard connus pour être présents dans les résines végétales. Ensuite seulement nous avons analysé les différents échantillons de résines sur plaque de « gel de silice ».

II.3.2.1 AJUSTEMENT DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE (ACÉTATE D'ÉTHYLE, TOLUENE, HEPTANE)

Cinq triterpénoïdes connus pour être présents dans les résines végétales de type Frankincense: β -amyrine, acide β -boswellique, acide acétyl- β -boswellique, acide 11-kéto- β -boswellique et acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique ont donc constitué un premier mélange standard à séparer.

Pour l'ajustement des proportions de la phase mobile, on est parti du mélange binaire acétate d'éthyle – toluène en ajoutant un diluant (hexane ou heptane) et de l'acide formique pour éviter la diffusion des bandes. L'utilisation de l'heptane a été privilégiée par rapport à celle de l'hexane car moins toxique tout en étant un alcane donc un « solvant de base ». La figure II.16 présente les meilleures conditions de séparation obtenues après avoir ajusté les proportions relatives des 3 solvants aux valeurs suivantes : Toluène/AcOEt/Heptane/Acide formique (8 :2 :1 :0.3, v/v/v/v).

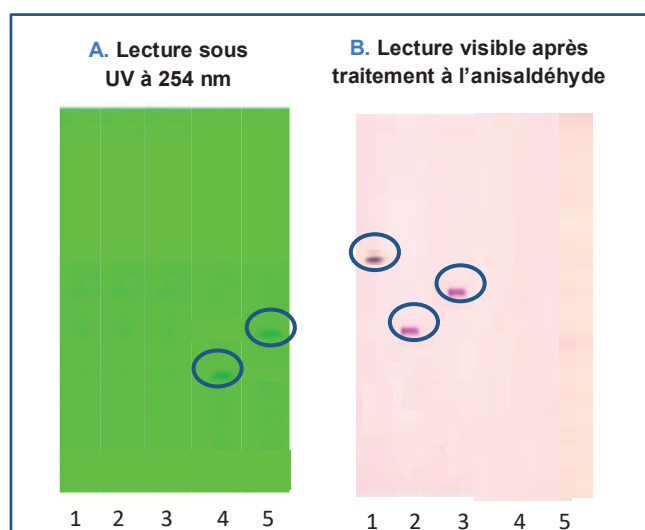


Figure II.16 Analyse sur gel de silice de cinq standards révélés sous lampe UV à 254 nm(A) et après révélation de la plaque à l'anisaldéhyde (B).

Attribution des dépôts: β -amyrine (1), acide β -boswellique (2), acide acétyl- β -boswellique (3), acide 11-kéto- β -boswellique (4), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (5).

Conditions: Plaque de silice F254, dépôt de 2 μ L de standards à 500 mg.L⁻¹, élution sur 8 cm, phase mobile : toluène-acétate d'éthyle-heptane-acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v)

D'après la figure II. 16, on observe que les facteurs de rétention sont bien compris entre 0.2 et 0.8 et que les bandes sont fines. L'acide 11-kéto- β -boswellique (4) et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (5) peuvent être observés sans dérivation sous lampe UV à 254 nm avec des R_f respectivement de 0.29 et 0.41. Après dérivation de la plaque avec de l'anisaldéhyde, on observe les 3 autres solutés : β -amyrine (1), acide β -boswellique (2) et acide acétyl- β -boswellique (3) avec des R_f de 0.55, 0.44 et 0.46 respectivement.

En conclusion, les conditions optimisées retenues pour l'analyse sur « gel de silice » des échantillons de résines sont les suivantes : une phase mobile constituée d'un mélange de Toluène/AcOEt/Heptane/Acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v) ; une élution sur 8 cm avec une saturation préalable de cuve pendant 20 minutes. Après visualisation de la plaque à 254 nm, la plaque est dérivée avec de l'anisaldéhyde pour révéler l'ensemble des composés.

II.3.2.2 APPLICATION A L'ANALYSE DE DIFFERENTES FAMILLES DE RESINES VEGETALES

Nous avons appliqué les résultats obtenus à l'étude des résines végétales appartenant à des familles différentes telles que les résines de la famille Anacardiaceae (Mastic), Dipterocarpaceae (Dammar), Cupressaceae (Sandarac), Araucaricae (Copal de Manille) ainsi que des résines qui sont assez proches de type Frankincense telles que les résines *Boswellia Serrata*, *Boswellia sacra*, *Boswellia neglecta* et *Boswellia carterii*.

- **ANALYSE COMPARATIVE DE DIFFERENTES FAMILLES DE RESINES DI- ET/OU TRITERPENIQUES**

Nous avons analysé au total six résines : deux résines triterpéniques (Mastic et Dammar), deux résines triterpéniques et diterpéniques (*Boswellia serrata* et *Commiphora wildii*) et deux résines diterpéniques (Sandarac et Copal). Certains standards ont été ajoutés sur la plaque pour servir de références (acide β -boswellique, acide acétyl- β -boswellique, acide oléanolique, β -amyrine et sclaréol) (figure II.16).

La figure II.17 met en évidence dès la première lecture, des différences visuelles dans la composition chimique de l'ensemble des résines analysées. En affinant la lecture, de fortes similitudes de composition chimique sont observées pour les deux résines diterpéniques Sandarac et Copal (dépôts **10** et **11**) mais la distinction par famille de résines triterpéniques, diterpéniques n'apparaît pas si évidente. Compte tenu de la richesse des extraits de résines, il n'est pas aisé d'identifier clairement les spots puisque que certains decs composés ne sont pas disponibles sous forme de standards commerciaux. En comparant la couleur et les rapports frontaux des spots avec ceux des standards dont nous disposons, on retrouve par exemple, l'acide β -boswellique, l'acide acétyle β -boswellique et la β -amyrine présents dans la résine *Boswellia serrata* (dépôt 9). En revanche, le sclaréol qui est un alcool diterpénique n'est pas retrouvé dans les résines végétales étudiées.

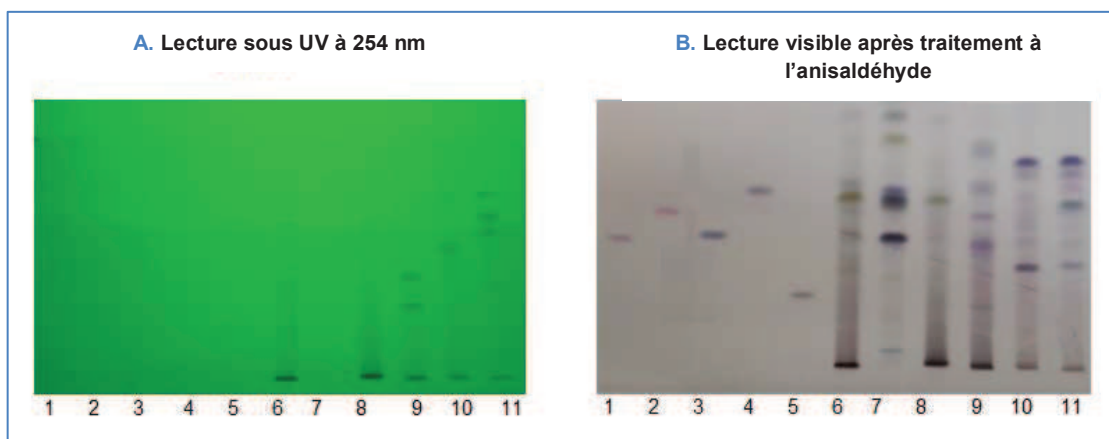


Figure II.17 Analyse sur plaque TLC SiF254 de cinq standards et six résines : acide β -boswellique (1), acide acétyl- β -boswellique (2), acide oléanolique (3), β -amyrine (4), sclaréol (5) résines: Mastic (6), Dammar (7), *Commiphora wildii* (8), *Boswellia serrata* (9), Sandarac (10) et Copal (11).

A 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et B 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anysaldéhyde. **Conditions :** Plaque de silice F254, dépôt de 2 μ L de standards à 500 mg.L⁻¹ et 1 μ L de résines à 50 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm, phase mobile : toluène-acétate d'éthyle-heptane-acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v)

- ANALYSE COMPARATIVE DE RESINES DI- ET TRITERPENIQUES (*BOSWELLIA*)**

Quatre résines de type Frankincense provenant de différentes régions géographiques: *Boswellia neglecta* (Kenya), *Boswellia carterii* (Somalie), *Boswellia sacra* (Oman) et *Boswellia serrata* (Inde) ont été analysées.

D'après la figure II.18, on constate que les résines de type Frankincense peuvent être rapidement différenciées des autres résines car elles renferment toutes l'acide boswellique (2) (bande de couleur violette au Rf de 0.44) et l'acétate associé (3) (bande de couleur violette au Rf de 0.52) que l'on peut visualiser après dérivation de la plaque à l'anisaldéhyde. Ces composés sont caractéristiques de cette famille [17]. La présence de la β -amyrine (1) dans ces 4 résines est aussi mise en évidence par la bande marron au Rf de 0.60.

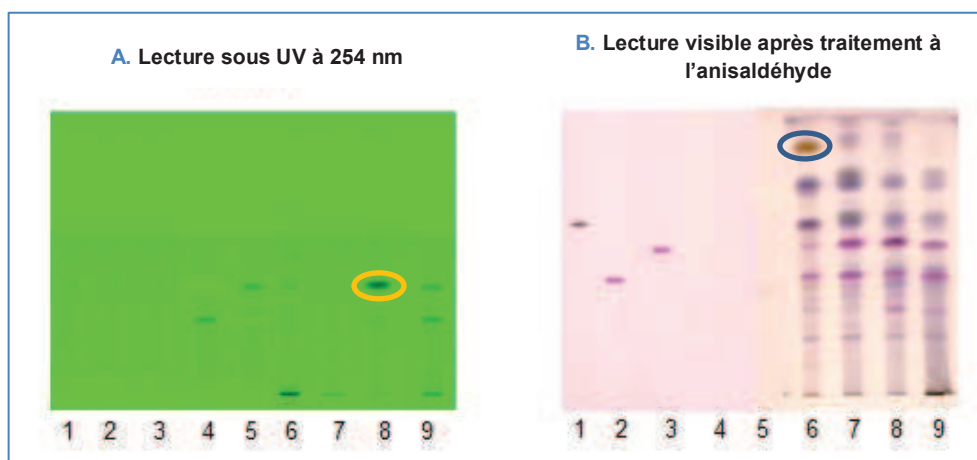


Figure II.18 Analyse sur plaque TLC SiF254 de cinq standards et quatre résines : β -amyrine (1), acide β -boswellique (2), acide acétyl- β -boswellique (3), acide 11-kéto- β -boswellique (4), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (5). Résines: *Boswellia neglecta* (6), *Boswellia carterii* (7), *Boswellia sacra* (8) et *Boswellia serrata* (9). **A** 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et **B** 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anysaldéhyde. Conditions : Plaque de silice F254, dépôt de 2 μ L de standards à 500 mg.L⁻¹ et 1 μ L de résines à 50 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm, phase mobile : toluène-acétate d'éthyle-heptane-acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v)

Malgré leurs très fortes similitudes observées en première lecture, il est possible néanmoins de distinguer visuellement la provenance géographique de ces résines très proches.

La résine *Boswellia neglecta* (6) provenant du Kenya peut être rapidement différenciée des 3 autres résines. Cette résine se caractérise par un spot spécifique de couleur jaune intense avec un Rf de 0.85 (spot entouré en bleu). Par ailleurs les résines *Boswellia carterii* (8) et *sacra* (9) apparaissent après la révélation à l'anisaldéhyde comme étant celles les plus proches du point de vue de leur composition chimique ce qui est en bon accord avec le fait que ces deux résines ont souvent été confondues et assimilées à une seule et même résine. Cependant lors de la 1^{ère} révélation sur UV à 254 nm, une petite différenciation peut être observée avec la présence de l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (spot entouré en orange) dans la résine *Boswellia sacra* d'Oman et son absence dans la résine *Boswellia carterii* de Somalie. L'ensemble des résultats d'identification est reporté dans le tableau II.2.

Tableau II.2 Tableau récapitulatif des standards majoritaires et identifiés dans les résines de type Frankincense

Biomarqueurs majoritaires	R _f	Détection	Couleur du spot	B. Neglecta (Kenya)	B. Carterii (Somalie)	B. Sacra (Oman)	B. Serrata (Inde)
Acide 11-keto- β -boswellique	0.30	Sous lampe UV à 254 nm	Noir				X
Acide 3-O-acetyl-11-keto- β -boswellique	0.43	Sous lampe UV à 254 nm	Noir			X	X
Acide α/β boswellique	0.44	Dans le visible après révélation à l'anisaldéhyde	Violet	X	X	X	X
Acide acétyl- α/β boswellique	0.52	Dans le visible après révélation à l'anisaldéhyde	Violet	X	X	X	X
α/β amyrine	0.60	Dans le visible après révélation à l'anisaldéhyde	Violet - bleu	X	X	X	X
Composé non identifié	0.85	Dans le visible après révélation à l'anisaldéhyde	Jaune	X			

Un premier screening de la composition des résines peut être réalisé en TLC sur plaque de silice dans les conditions optimisées de phase mobile : Toluène/AcOEt/Heptane/Acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v). Ce criblage exploratoire s'avère instructif et permet de distinguer les résines de différentes origines mêmes celles qui sont souvent confondues telles que les résines *Boswellia sacra* et *carterii*. Dans le cadre de la différenciation des résines appartenant à la même famille, il nous a semblé intéressant de compléter notre étude par l'évaluation du potentiel de sélectivité apporté par un système TLC basé sur phase stationnaire de silice greffée C18. L'objectif est de pouvoir atteindre un niveau de différenciation encore plus fin et abouti pour ces résines.

II.4 ANALYSE DE RESINES VEGETALES SUR SILICE GREFFEE C18

Dans le but d'améliorer la sélectivité et l'efficacité de la séparation des composés triterpéniques, nous avons complété notre étude par l'évaluation des performances d'un système séparatif TLC fonctionnant selon le mode « à polarité de phases inversée » (TLC-RP). Ce mode se base sur l'association d'une phase stationnaire apolaire et d'une phase mobile à caractère polaire. Nous avons ainsi retenu comme phase stationnaire, une silice greffée alkyle de type C18 pour effectuer nos différents essais. Ce type de phase stationnaire a déjà été utilisé en chromatographie liquide (HPLC) pour l'analyse des résines de type Frankincense [6] utilisant un gradient d'élution de deux phases mobiles (A : eau + 0.01% acide phosphorique, B : acétonitrile + 0.01% acide phosphorique). A notre connaissance, l'utilisation de phase stationnaire de type C18 n'a pas encore fait l'objet d'étude en TLC pour ce type d'échantillons.

Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions sur des standards avant d'appliquer la méthode choisie à l'étude des résines végétales de type Frankincense.

II.4.1 OPTIMISATION DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE

L'optimisation de l'élution sur une phase stationnaire de silice greffée s'est faite selon 3 types de phases mobiles. Tout d'abord, nous avons considéré le mode RP-TLC (mode phase inverse habituel) en utilisant des éluants polaires hydro-organiques (eau/méthanol, eau/acétonitrile ou eau/THF) puis le mode NARP (phase inverse non aqueuse). Par la suite, nous avons utilisé le support C18 associé à une phase mobile peu polaire comparable à celle utilisée en phase normale sur silice. Dans cette troisième approche, nous avons considéré le support Si-C18 comme une silice modifiée n'ayant plus qu'un faible taux de silanols pour établir des interactions secondaires de type polaire avec les solutés.

II.4.1.1 CHOIX DES SOLUTES MODELE

Les différents essais de composition de phase mobile ont été réalisés soit à partir directement d'un échantillon de résine *Boswellia serrata* considéré comme un modèle de complexité soit à partir du mélange standard de 5 triterpénoïdes connus pour être présents dans les résines végétales de type Frankincense: β -amyrine, acide β -boswellique, acide acétyl- β -boswellique, acide 11-kéto- β -boswellique et l'acide 3-O-acétyl--11-kéto- β -boswellique (voir fig. II.5 pour la structure des composés).

II.4.1.2 PHASE MOBILE POLAIRE DE TYPE RP (METHANOL/EAU)

Sur la base des données décrites dans la littérature pour la séparation des acides oléanolique et ursolique en HPLC sur phase inverse [18], nous avons retenu comme composition de phase mobile pour nos premiers essais, un mélange eau/méthanol (5 :95, v/v).

Cette composition de phase mobile (eau/méthanol (5 :95, v/v)) a permis une première analyse de la résine *Boswellia serrata* afin d'avoir rapidement une idée de l'intérêt que pourrait apporter un tel système par rapport à l'analyse sur « gel de silice ». D'après la figure II.19, on constate tout d'abord une diffusion importante des bandes entraînant une perte de résolution en lien avec la perte d'efficacité. On constate de plus une coloration intense au niveau de la ligne de dépôt suggérant que de nombreux constituants du mélange n'ont pas migré avec cette phase mobile et n'ont donc pas d'affinité avec elle.

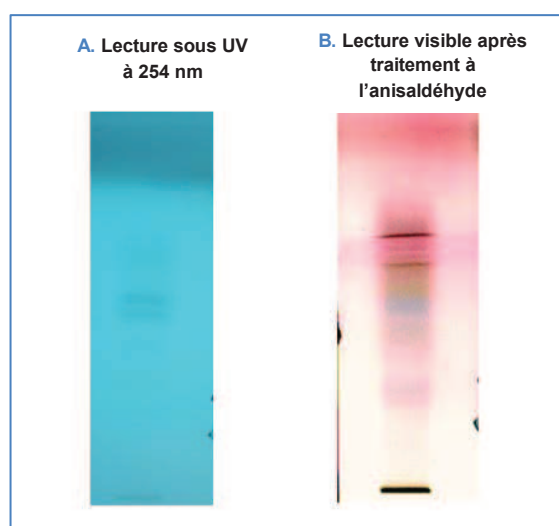


Figure II.19 Elution de la résine *Boswellia serrata* sur phase stationnaire greffée alkyle en utilisant une phase mobile polaire (RP) (méthanol/eau, 95 :5)

A 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et **B** 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anysaldéhyde. Conditions : Plaque TLC RP-18WF254 (Merck) : dépôt de 1 μ L de résine *Boswellia serrata* à 50 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm, phase mobile : eau/méthanol (5 : 95, v/v)

Afin de limiter le phénomène d'élargissement des bandes, nous avons testé l'ajout d'acide en faible proportion dans la phase mobile. La composition de la phase éluante que nous avons préparée a été la suivante : méthanol/eau/acide formique (95 :5 :0.2, v/v/v). La figure II.20 ne met pas en évidence d'amélioration de la séparation des composés de la résine *Boswellia serrata* dans ces conditions de phase mobile acide. La diffusion des bandes étant importante, nous avons donc conclu que l'utilisation de phase mobile hydro-organique de type RP n'est pas adaptée à l'étude des triterpénoïdes présents dans les résines. La polarité de ces composés n'est pas suffisante pour un partage efficace entre phase stationnaire et phase mobile.

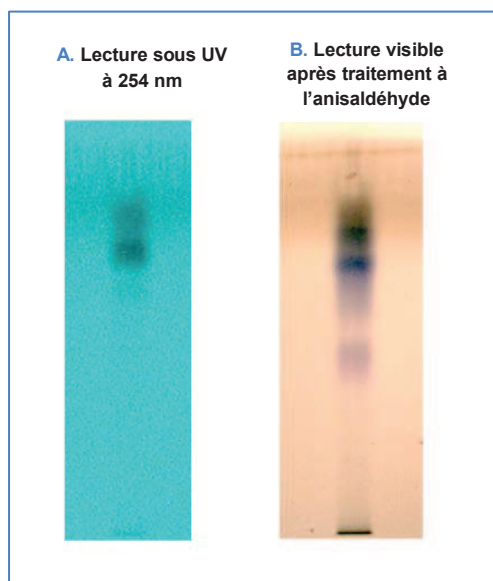


Figure II.20 Elution de la résine *Boswellia serrata* sur phase stationnaire greffée alkyle en utilisant une phase mobile polaire aqueuse (RP) avec ajout d'acide.

A 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et B 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anysaldéhyde. Conditions : Plaque TLC RP-18WF254 (Merck) : dépôt de 1 μ L de résine *Boswellia serrata* à 50 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm, phase mobile : eau/méthanol/acide formique (5 : 95 : 0.2, v/v/v)

II.4.1.3 PHASE MOBILE POLAIRE DE TYPE NARP (ACETONITRILE/ACETONE OU ACETONITRILE/ACETATE D'ETHYLE)

Les performances de différents systèmes associant la phase stationnaire Si-C18 à des phases mobiles polaires non aqueuses ont ensuite été évaluées.

En se basant sur les conditions de phase mobile (Acétone/Acétonitrile et AcOEt/Acétonitrile) utilisées précédemment dans la littérature [8] pour la séparation et l'identification par TLC de certains isomères de triterpénoïdes présents dans des plantes, nous avons analysé un mélange standard de 7 triterpénoïdes (acide β -boswellique (**1**), acide acétyl- α -boswellique (**2**), acide 11-kéto- β -boswellique (**3**), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**4**), acide acétyl- β -boswellique (**5**), α -amyrine (**6**), β -amyrine (**8**)), ainsi que la résine *Boswellia serrata* (dépôt **7**) en retenant comme composition de phase mobile les 2 mélanges binaires suivants : acétone/acétonitrile (5 : 1, v/v) et acétate d'éthyle/acétonitrile (3 : 2, v/v).

La figure II.21 récapitule les différents résultats obtenus. La première lecture des plaques met clairement en évidence que ces 2 compositions de phase mobile ne sont pas favorables à la séparation des composés triterpéniques présents dans la résine *Boswellia serrata* (dépôt **7**).

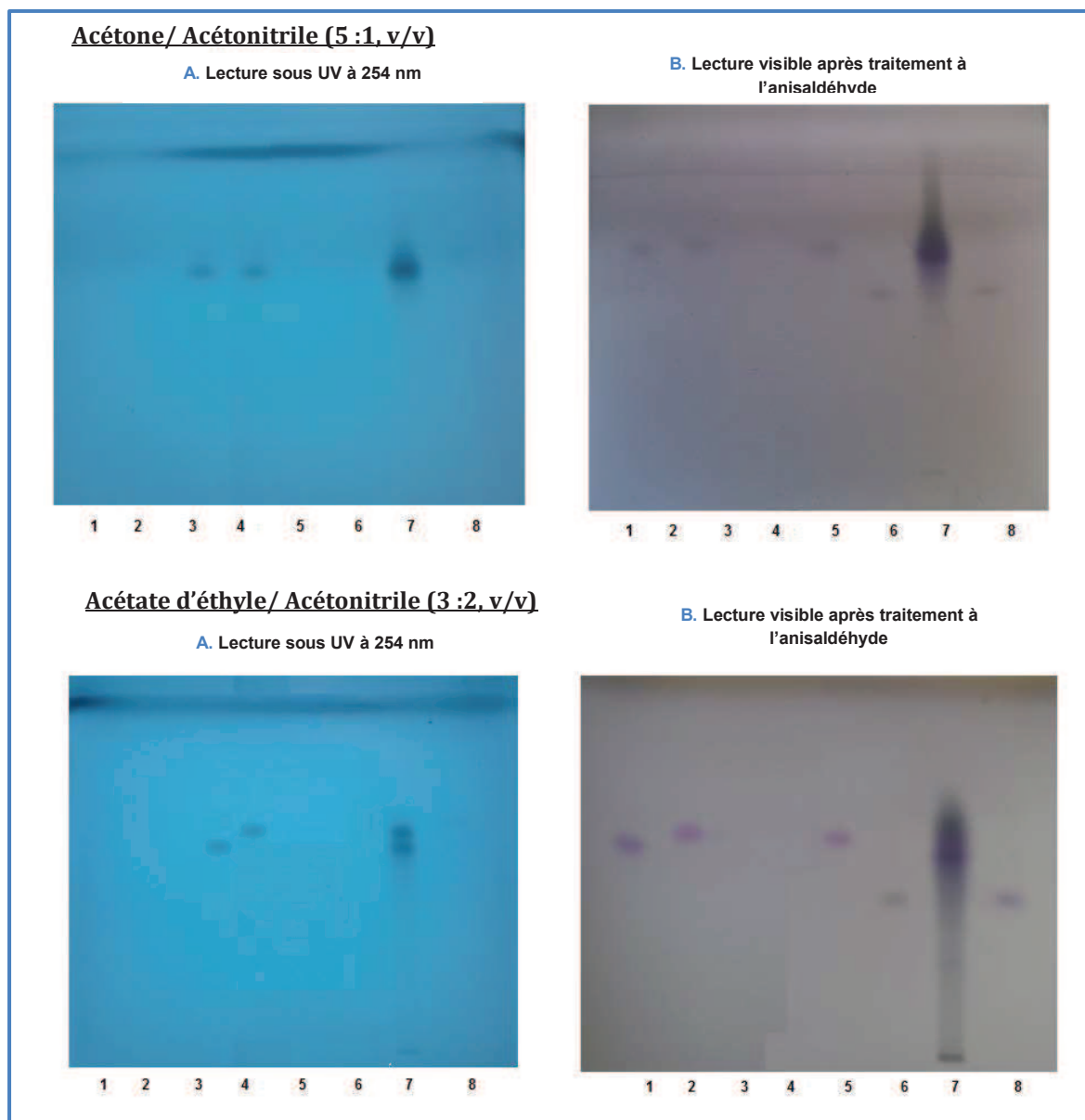


Figure II.21 Elution de la résine *Boswellia serrata* et de 6 standards sur phase stationnaire greffée alkyle en utilisant une phase mobile polaire non-aqueuse (NARP) en utilisant les compositions de phase mobile acétone/acétonitrile (5 :1, v/v) et acétate d'éthyle/acétonitrile (3 :2, v/v).

A 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et B 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anysaldéhyde. Attribution des dépôts : acide boswellique (1), acide acétyl- α -boswellique (2), acide 11-kéto- β -boswellique (3), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (4), acide acétyl- β -boswellique (5), α -amyrine (6), *Boswellia serrata* (7) et β -amyrine (8). Conditions : Plaque TLC RP-18WF254 (Merck) : dépôt de 2 μ L de standards à 500 mg.L⁻¹ et dépôt de 1 μ L de résine *Boswellia serrata* à 50 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm.

En ce qui concerne l'élution des standards avec la composition de phase mobile Acétone/Acétonitrile (5 :1, v/v), la 1^{ère} lecture de plaque à 254 nm avant dérivation, permet d'observer que les composés 11-kéto- β -boswellique (3) et acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (4) possèdent les mêmes rapports frontaux (R_f = 0.63). Après révélation de la plaque à l'anisaldéhyde, on constate que l'acide boswellique (1) et les 2 formes α et β de l'acide acétyl boswellique (2 et 5) ont eux aussi des rapports frontaux très proches de 0.60 et 0.61

respectivement ne permettant pas de les distinguer et d'identifier leur présence lors de l'analyse de la résine *Boswellia serrata* (7). De plus, on n'observe aucune séparation des 2 formes isomères α et β pour l'acide acétyle boswellique et pour l'amyrine.

Si on s'intéresse à la composition AcOEt/Acétonitrile (3 :2, v/v), la séparation de certains composés triterpéniques est améliorée (figure II.21). Les composés 11-kéto- β -boswellique (3) et acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (4) possèdent des rapports frontaux distincts de 0.58 et 0.62 respectivement lors de la lecture de la plaque à 254 nm. Après la révélation de la plaque à l'anisaldéhyde, on constate également une meilleure séparation entre l'acide β -boswellique (1) et les 2 formes α et β de l'acide acétyle boswellique (2 et 5) cependant avec toujours une diffusion de bandes ne permettant pas l'exploitation des résultats. Cette deuxième approche de composition de phase mobile n'a donc pas retenu notre attention et nous l'avons abandonné.

Aucune condition prometteuse d'analyse des triterpénoïdes en TLC n'ayant pu être dégagée en mode de polarité de phases inversée, nous nous sommes tournées vers la préparation de phase mobile encore moins polaire. Nous avons ainsi évalué le support silice C18 associé à ces éluants plus typiques d'un mode de séparation phase normale. Le raisonnement de cette troisième approche s'apparente donc plus à évaluer l'effet sur la sélectivité et l'efficacité des séparations, d'une modification de l'état de surface d'une silice vierge en considérant que les chaînes alkyle greffées diminuent le nombre et l'accessibilité des silanols présents initialement.

II.4.1.4 PHASE MOBILE APOLAIRE DE TYPE PHASE NORMALE (NP) (ACETATE D'ETHYLE/HEPTANE)

L'utilisation d'une phase mobile apolaire avec une phase stationnaire apolaire a déjà été décrite dans la littérature pour la séparation d'isomères, tels que les acides ursolique, oléanolique et bétulinique, présents dans des extraits de plantes [7]. Nous avons repris ces conditions et les avons appliquées à l'analyse de 7 standards triterpéniques et de la résine *Boswellia serrata*. La phase mobile retenue pour notre étude est un mélange d'acétate d'éthyle et d'heptane (1 :5, v/v).

La figure II.22 récapitule les différents résultats obtenus. L'association d'un support Si-C18 avec une phase mobile organique type phase normale apparaît nettement plus favorable à l'analyse des résines que les 2 précédentes associations Si-C18 avec phase mobile polaire hydro-organique ou organique. On retrouve des bandes fines comme sur support gel de silice. La première lecture de plaque sous lampe UV à 254 nm met en évidence que les composés 11-kéto- β -boswellique (3) et acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (4) possèdent des rapports frontaux distincts de valeur égale à 0.03 et 0.15 respectivement. Après la révélation de la plaque à l'anisaldéhyde il apparaît clairement que ce système TLC ne permet toujours pas la séparation

des formes isomères α et β de l'acide acétyl-boswellique (**2** et **5**) comme de l'amyrine (**6** et **8**). L'acide boswellique (**1**) se distingue des 2 formes α et β de l'acide acétyl boswellique (**2** et **5**) par la valeur de son rapport frontal ($R_f = 0.1$) très différente de celle des 2 autres composés ($R_f = 0.27$). Pour les 2 formes α et β de l'acide acétyl boswellique (**2** et **5**) et celles de l'amyrine (**6** et **8**), les rapports frontaux ont des valeurs très proches (0.27 et 0.26 respectivement) mais compte tenu de la finesse des bandes, une meilleure résolution est observée en comparaison avec l'utilisation de phases mobiles polaires aqueuse (mode RP).

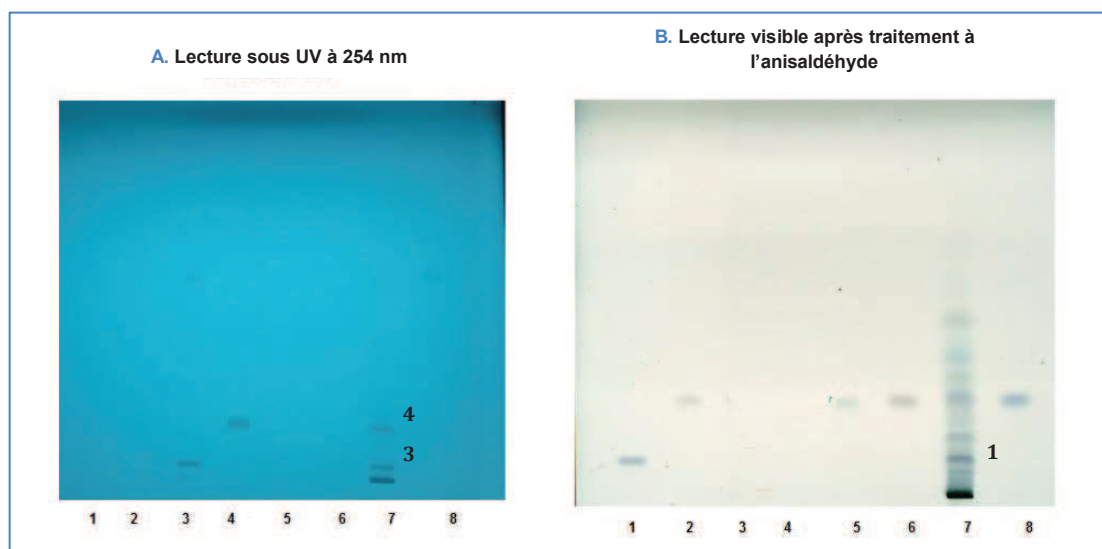


Figure II.22 Elution de la résine *Boswellia serrata* et de 7 standards sur phase stationnaire greffée alkyle avec une phase mobile acétate d'éthyle/heptane (1 :5, v/v).

A 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et B 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anisaldéhyde. Attribution des dépôts : acide β -boswellique (**1**), acide acétyl- α -boswellique (**2**), acide 11-kéto- β -boswellique (**3**), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**4**), acide acétyl- β -boswellique (**5**), α -amyrine (**6**), résine *Boswellia serrata* (**7**) et β -amyrine (**8**). Conditions : Plaque TLC RP-18WF254 (Merck) : dépôt de 2 μ L de standards à 500 mg.L⁻¹ et dépôt de 1 μ L de résine *Boswellia serrata* à 50 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm.

Pour compléter cette étude et caractériser le type d'interactions mises en jeu dans ce système associant la silice greffée C18 à une phase mobile organique de faible polarité nous avons comparé l'ordre de rétention de 5 standards triterpéniques sur silice (Si) et sur silice greffée (Si-C18) avec le même type de phase mobile. A partir de la figure II.23 qui présente les résultats comparatifs pour ces 2 systèmes on remarque à partir de la lecture de la plaque sous UV 254 nm, le même ordre d'élution sur les 2 systèmes pour l'acide 11-kéto- β -boswellique (**4**), et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**5**) mais avec des valeurs de rapports frontaux différents. De même, après révélation des plaques à l'anisaldéhyde, l'ordre de rétention est identique pour l'acide β -boswellique (**1**), l'acide acétyl- β -boswellique (**2**) et pour la β -amyrine (**3**) pour les 2 systèmes. Cette comparaison permet de vérifier que dans ces conditions d'utilisation de la silice C18, la séparation a bien lieu selon un mode phase normale et met en jeu des interactions polaires avec les silanols résiduels non greffés.

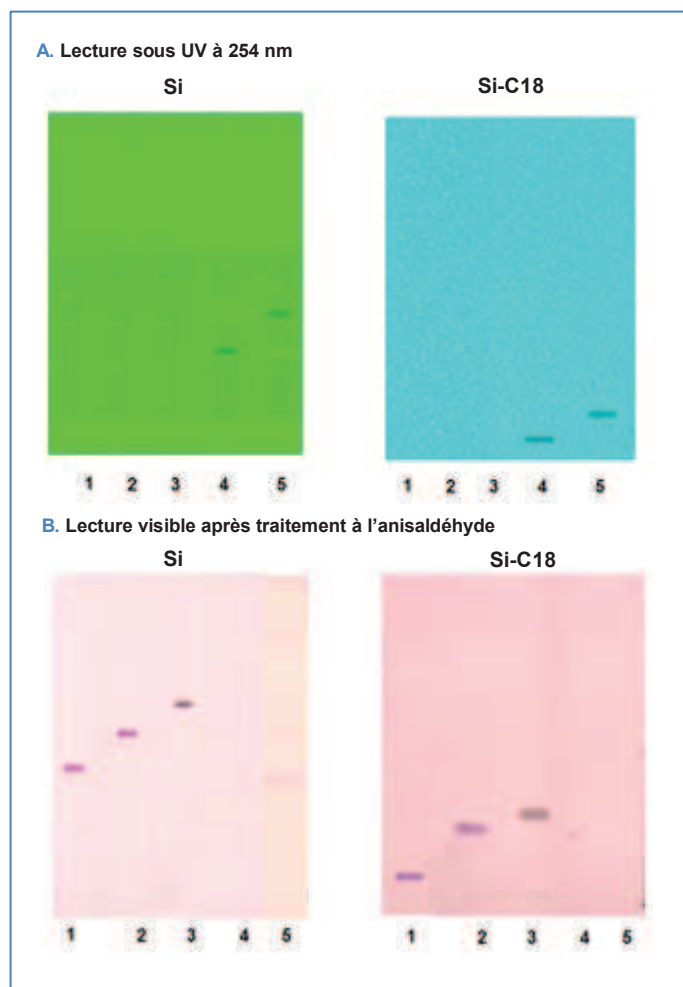


Figure II.23 Elution de 5 standards triterpéniques sur phase stationnaire « gel de silice » et phase greffée alkyle (TLC-RP).

A. 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et B 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anysaldéhyde. Attribution des dépôts : acide β -boswellique (1), acide acétyl- β -boswellique (2), β -amyrine (3), acide 11-kéto- β -boswellique (4), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (5).

Conditions : Plaque TLC F254 (Merck) : dépôt de 2 μ L de standards à 500 mg.L^{-1} , élution sur 8 cm, phase mobile : toluène/acétate d'éthyle/heptane/acide formique (8 :2 :1 :0.3, v/v/v/v). Plaque TLC RP-18WF254 (Merck) : dépôt de 2 μ L de standards à 500 mg.L^{-1} , élution sur 8 cm, phase mobile : acétate d'éthyle/heptane (1:5 v/v)

On constate par ailleurs que pour les standards analysés, les rapports frontaux ont des valeurs plus faibles sur le support de silice greffée C18 (Si-C18) que sur le support Si, même si sur Si-C18 le nombre de silanols disponibles pour des interactions avec les solutés est plus faible que sur silice. Dans un contexte d'interactions polaires avec la phase stationnaire pour ces 2 systèmes, ce constat peut s'expliquer simplement par la différence de composition des 2 phases mobiles. La phase mobile associée au support de silice est beaucoup plus riche en proportion de solvants sélectifs (toluène et acétate d'éthyle) par rapport à l'heptane (10 :1, v/v) que la phase mobile associée au support Si-C18 (1 :5, v/v) et de ce fait elle possède une force éluante nettement plus importante.

II.4.1.5 CONCLUSION

Les conditions d'analyse en TLC sur phase stationnaire Si-C18 associée à une phase mobile type RP-TLC et NARP sont ni performantes ni adaptées à la séparation des terpénoïdes. Une diffusion trop importante des bandes est observée dans ces conditions pour l'analyse de standards et se traduit lors de l'analyse de la résine modèle, par des trainées continues. En revanche, l'association du support Si-C18 et d'une phase mobile acétate d'éthyle/heptane (1 :5, v/v) est très prometteuse. Dans ces conditions d'analyse, l'ordre d'élution des triterpénoïdes est similaire à celui noté en phase normale et un gain en efficacité (affinement des bandes) et donc en résolution est observé.

II.4.2 APPLICATION A L'ANALYSE DES RESINES DE TYPE FRANKINCENSE

Après l'étape d'optimisation de la composition de la phase mobile pour analyser les terpénoïdes sur plaque Si-C18, nous avons appliqué les meilleures conditions (éluant : acétate d'éthyle/heptane (1 :5, v/v)) à l'analyse de 4 échantillons de résines, toutes de type Frankincense (*Boswellia serrata*, *Boswellia neglecta*, *Boswellia carterii* et *Boswellia sacra*). Les résultats d'analyse sont reportés figure II.24. Les profils chromatographiques obtenus pour ces quatre échantillons mettent clairement en évidence des différences visuelles dans les compositions phytochimiques liées à la différence de provenance de ces résines très proches.

Une tentative d'identification des composés séparés a été effectuée en comparant la couleur des bandes révélées et les valeurs correspondantes de rapports frontaux R_f observées pour les résines et pour les 5 standards commerciaux dont nous disposions. A la 1^{ère} lecture de plaque sous lampe UV à 254 nm, on identifie la présence de l'acide 11-kéto- β -boswellique (**4**) (R_f = 0,02) uniquement dans la résine *Boswellia serrata* (dépôt **6**) ainsi que celle de l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**5**) (R_f = 0,15) dans les 2 résines *Boswellia serrata* (dépôt **6**) et *Boswellia sacra* (dépôt **9**).

Après utilisation de l'anisaldéhyde comme agent de révélation, on constate la richesse des extraits de résines. On identifie, l'acide α/β -boswellique (**1**) (R_f = 0,09), l'acide acétyl- α/β -boswellique (**2**) (R_f = 0,27) et la β -amyrine (**3**) (R_f = 0,30) dans l'ensemble des 4 résines. Nos résultats sont bien conformes à la littérature qui présente ces 3 composés comme caractéristiques des résines de type Frankincense.

Malgré la finesse des bandes d'élution obtenues dans ces conditions chromatographiques, on constate que certains composés restent co-élus. Si l'on compare la couleur du spot de la β -amyrine (**3**) déposé en tant que standard et celle de la bande éluee au même R_f pour la résine

Boswellia neglecta (dépôt 7), on relève une différence de coloration conduisant à une indétermination. Il n'est pas possible à ce stade de trancher si le composé élué à ce R_f dans la résine est différent de la β -amyrine ou si c'est une coélution avec d'autres composés qui modifie la coloration de la bande.

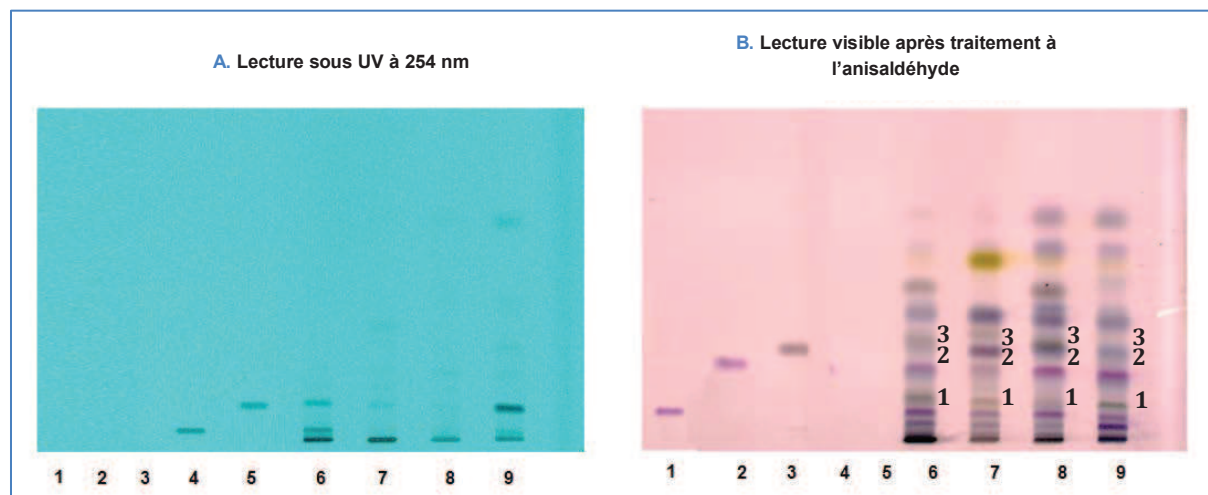


Figure II.24 Analyse TLC de 4 résines *Boswellia* et de 5 standards sur phase stationnaire Si-C18 avec une phase mobile : acétate d'éthyle/heptane (1 :5, v/v).

A 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et **B** 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anysaldéhyde. Attribution des dépôts : acide β -boswellique (1), acide acétyl- β -boswellique (2), β -amyrine (3), acide 11-kéto- β -boswellique (4), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (5), *Boswellia serrata* (6), *Boswellia neglecta* (7), *Boswellia carterii* (8) et *Boswellia sacra* (9).

Conditions : Plaque TLC RP-18WF₂₅₄(Merck) dépôts : 2 μ L de standard à 500 mg.L⁻¹ et 1 μ L de résine à 50 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm.

Les résultats obtenus confirment que les 2 résines *Boswellia carterii* (dépôt 8) et *Boswellia sacra* (dépôt 9) sont celles qui ont la composition chimique la plus similaire néanmoins des différences visuelles sur les intensités relatives des différentes bandes révélées permettent de les distinguer.

Nous n'avons pu identifier la présence que de quelques composés dans les résines du fait de la difficulté à trouver ces molécules très variées en tant que standards commercialisés. Dans ces conditions, il est clair que pour aller plus loin dans la caractérisation des composés présents dans les résines, une méthode de détection pouvant apporter une information structurale est indispensable. La simple utilisation d'agent de révélation ne permet qu'une comparaison visuelle plus ou moins subjective de la complexité de la composition phytochimique des résines.

II.5 CONCLUSION GENERALE SUR L'ANALYSE DES RESINES EN TLC MONODIMENSIONNELLE (TLC-1D)

Afin d'analyser les résines végétales en TLC, nous avons évalué le potentiel de sélectivité complémentaire apporté par la séparation sur deux phases stationnaires différentes : « gel de silice » et phase greffée alkyle.

A l'issu d'un criblage exploratoire, nous avons sélectionné les conditions optimisées de phase mobile pour ces 2 types de phases stationnaires. Sur silice, nous avons retenu le mélange de solvants suivants: toluène/acétate d'éthyle/heptane/acide formique (8 :2 :1 :0.3, v/v/v/v) et sur silice greffée C-18 un mélange binaire composé d'acétate d'éthyle et d'heptane (1 :5, v/v). Dans ces 2 systèmes séparatifs, les solutés interagissent avec les silanols libres présents de manière majoritaire sur la phase stationnaire gel de silice ou minoritaire s'il s'agit de la phase greffée.

La figure II.25 présente les analyses du même échantillon de résine *Boswellia serrata* selon les 2 systèmes chromatographiques optimisés. La comparaison des 2 plaques met en évidence une meilleure efficacité (bandes plus fines) pour le système chromatographique sur Si-C18 que pour le système sur Si. Le même ordre d'élution est observé dans les 2 systèmes pour les 5 standards avec l'acide 11-kéto- β -boswellique (**4**) élué en premier puis l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**5**), l'acide β -boswellique (**1**), l'acide acétyl- β -boswellique (**2**) et enfin la β -amyrine (**3**). En revanche, les sélectivités entre solutés ne sont pas identiques dans les 2 systèmes séparatifs ce qui peut s'expliquer par une composition différente des phases mobiles s'ajoutant à une nature de phase stationnaire différente.

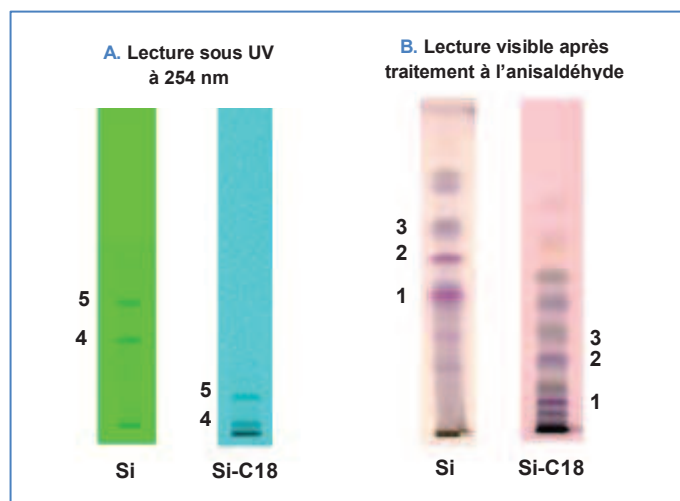


Figure II.25 Analyses TLC de la résine *Boswellia serrata* sur phase stationnaire « gel de silice » et sur phase greffée alkyle.

A 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et **B** 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anysaldéhyde.

Conditions : Plaque TLC F254 (Merck) : dépôt de 1 μL de résine *Boswellia serrata* à 50 mg.mL^{-1} , élution sur 8 cm, phase mobile : toluène/acétate d'éthyle/heptane/acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v). Plaque TLC RP-18WF254 (Merck) : dépôt de 1 μL de résine *Boswellia serrata* à 50 mg.mL^{-1} , élution sur 8 cm, phase mobile : acétate d'éthyle/heptane (1:5 : 1 v/v)

A la 1^{ère} lecture des plaques sous lampe UV à 254 nm, deux bandes d'élution distinctes (en plus de la ligne de dépôt) sont observées pour les 2 systèmes. Après révélation des plaques à l'anisaldéhyde, 11 bandes d'élution sont visualisées sur phase Si et seulement 9 sur phase Si-C18 et une meilleure répartition des composés élués sur l'ensemble de la plaque « gel de silice » est constatée par rapport à la plaque Si-C18.

Au vu de l'ensemble de ces résultats comparatifs, nous avons choisi de privilégier pour la suite de notre étude et la mise au point du couplage TLC-MALDI-TOF-MS, le système séparatif sur « gel de silice ».

En dépit de la finesse des bandes d'élution obtenues pour les standards, un manque de résolution entre spots aussi bien sur « gel de silice » que sur phase silice greffée est constaté dans le cas de l'analyse des résines végétales. Ainsi, quel que soit les conditions d'analyse TLC appliquées, les limites résolutive de la technique sont atteintes avant même d'avoir réalisé une séparation complète de l'ensemble des terpènes constitutifs. Afin d'augmenter la capacité de pics et la résolution des mélanges, nous avons complété notre étude en TLC par l'évaluation des potentialités d'un système d'analyse TLC en bidimensionnel.

II.6 TLC BIDIMENSIONNELLE (TLC-2D)

L'approche TLC bidimensionnelle que nous avons favorisée lors de notre étude à consister à sélectionner comme phase stationnaire une plaque de « gel de silice » et à effectuer une double élution de cette plaque en utilisant 2 phases mobiles de composition différente.

II.6.1 PRINCIPE DE LA TLC BIDIMENSIONNELLE :

Le principe de la chromatographie bidimensionnelle consiste en deux séparations chromatographiques distinctes permettant d'avoir une première séparation d'un mélange dans une première dimension et de soumettre à nouveau les composés élués à une deuxième séparation dans des conditions de phase mobile différentes. Ce procédé a été appliqué à la chromatographie sur colonne (GC ou LC) et à la chromatographie planaire (TLC).

Il existe plusieurs techniques pour réaliser l'analyse bidimensionnelle (TLC-2D) où une plaque ne peut servir qu'à l'analyse d'une seule résine à la fois [19].

La méthode la plus utilisée en TLC-2D est celle qui consiste à utiliser une même plaque avec des solvants différents. Une première élution est réalisée suivie d'un séchage de la plaque. Après avoir fait pivoter la plaque de 90°C, une deuxième élution est menée en utilisant une phase mobile de composition différente et mettant en jeu des interactions différentes avec les solutés de telle sorte à avoir une séparation orthogonale (figure II. 26).

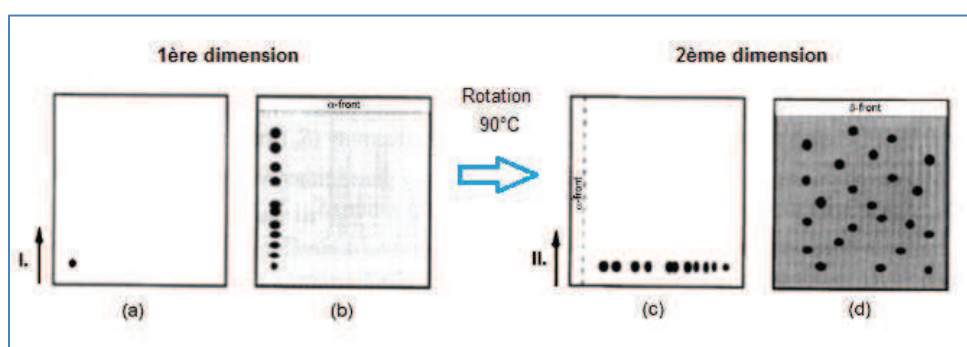


Figure II.26 Représentation de la TLC bidimensionnelle.
1^{ère} dimension (a, b) et 2^{ème} dimension (c, d). REF : [19]

Pour optimiser la séparation en TLC-2D, le point crucial consiste donc à pouvoir sélectionner une deuxième phase éluante orthogonale à la première.

II.6.2 OPTIMISATION DES PHASES MOBILE POUR LA TLC-2D:

La phase mobile que nous avons précédemment optimisée sur phase « gel de silice » a constitué notre premier choix pour les essais en TLC-2D. Dans le mélange de solvants la constituant: toluène, acétate d'éthyle, heptane et acide formique dans les proportions (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v), ce sont le toluène (groupe de sélectivité VII) et l'acétate d'éthyle (groupe VI) qui assurent le rôle de solvants sélectifs. Afin de réaliser de l'orthogonalité avec cet éluant, les solvants que nous avons retenus pour optimiser la composition de la deuxième phase mobile ne feront donc pas partie de ces 2 groupes de sélectivité. Nous avons ainsi testé différentes combinaisons de solvants des groupes de I, II, III et VIII en présence d'heptane pour réguler la force éluante des différents mélanges. Nos essais nous ont conduit à retenir le mélange Méthanol/Chloroforme/Heptane (0.5 : 7 : 1, v/v/v) comme étant le plus adapté pour remplir la fonction de 2^{ème} choix de phase mobile.

La figure II.27 présente les résultats obtenus dans ces conditions de phase mobile pour l'analyse des 5 composés triterpéniques standards : l'acide 11-kéto- β -boswellique (**1**), l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**2**), l'acide β -boswellique (**3**), l'acide acétyl- β -boswellique (**4**) et le β -amyrine (**5**). On note que cette 2^{ème} composition de phase mobile entraîne une inversion d'ordre de rétention entre l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**2**) et l'acide β -boswellique (**3**) et une augmentation importante de sélectivité entre l'acide acétyl- β -boswellique (**4**) et la β -amyrine (**5**).

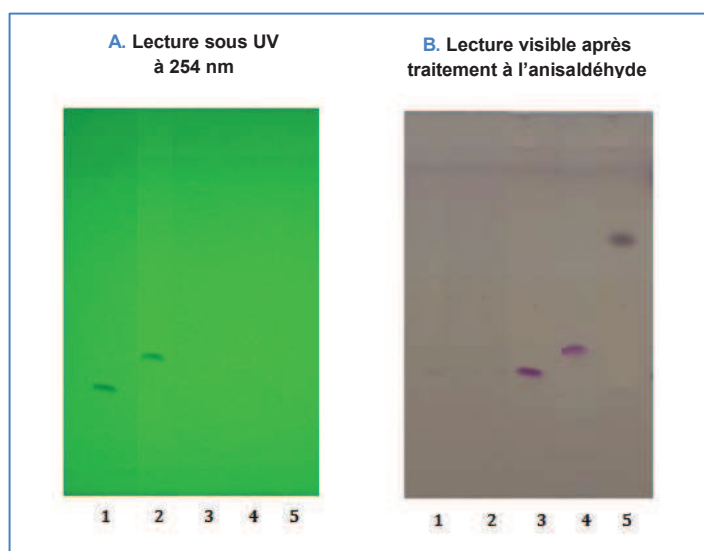


Figure II.27 Analyse sur plaque TLC SiF254 de cinq standards : acide 11-kéto- β -boswellique (**1**), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**2**), acide β -boswellique (**3**), acide acétyl- β -boswellique (**4**), β -amyrine (**5**)

A 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et **B** 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anysaldéhyde. Conditions : Plaque de silice F254, dépôt de 2 μ L de standards à 500 mg.L⁻¹, élution sur 8 cm, phase mobile : méthanol-chloroforme-heptane (0.5: 7 : 1 : 0.3, v/v/v)

II.6.3 APPLICATION A L'ANALYSE DES STANDARDS ET DES RESINES :

Disposant de 2 phases mobiles de sélectivités différentes, nous avons alors entrepris les essais en TLC-2D tout d'abord dans le cadre de l'analyse des 5 standards puis dans celui de l'analyse des différents échantillons de résine.

Tout d'abord, nous avons voulu déterminer dans quel ordre utilisé les phases mobiles pour l'élution. Nous avons donc testé deux possibilités différentes sur un mélange de cinq standards (acide 11-kéto- β -boswellique, acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique, acide β -boswellique, acide acétyl- β -boswellique, β -amyrine) :

- **(i) éluant 1D:** Méthanol/Chloroforme/Heptane (0.5 : 7 : 1, v/v/v) et **éluant 2D:** Toluène/AcOEt/Heptane/Acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v)
- **(ii) éluant 1D:** Toluène/AcOEt/Heptane/Acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v) et **éluant 2D:** Méthanol/Chloroforme/Heptane (0.5 : 7 : 1, v/v/v)

D'après la figure II.28, on constate que la séparation en TLC-2D avec l'ordre d'élution (i) conduit à une meilleure séparation des composés sans phénomène de diffusion comparé avec l'ordre d'élution (ii). En effet, cela est dû à l'utilisation de l'acide formique dans la première dimension (1D) pour le mode (ii) qui est un solvant difficile à sécher. La plaque TLC n'est pas complètement sèche avant l'analyse pour la deuxième dimension.

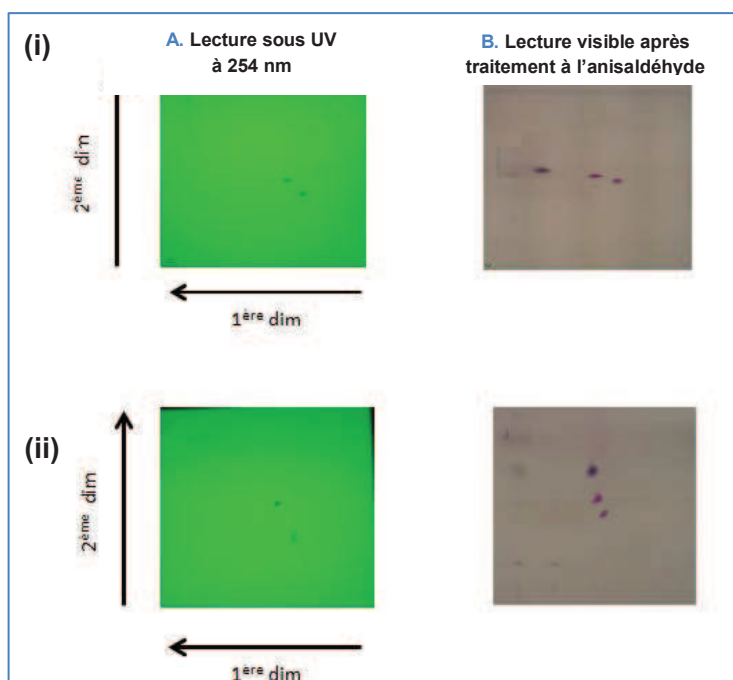


Figure II.28 Analyse sur plaque TLC SiF254 de cinq standards en TLC-2D en testant deux ordres d'élution différents.

(i) 1D : Méthanol/Chloroforme/Heptane (0.5 : 7 : 1, v/v/v) et 2D : Toluène/AcOEt/Heptane/Acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v) et (ii) 1D : Toluène/AcOEt/Heptane/Acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v) et 2D : Méthanol/Chloroforme/Heptane (0.5 : 7 : 1, v/v/v)

A 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et **B** 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anisaldéhyde. Conditions : Plaque de silice F254, dépôt de 2 μ L de standards à 500 mg.L⁻¹ élution sur 8 cm

Pour la suite, nous avons choisi de travailler avec le système **(i)** : éluant 1D : Méthanol/Chloroforme/Heptane (0.5 : 7 : 1, v/v/v) et éluant 2D : Toluène/AcOEt/Heptane/Acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v).

• **ANALYSE DES STANDARDS TRITERPENIQUES :**

Les résultats obtenus pour l'analyse TLC-2D du mélange des 5 composés triterpéniques (acide 11-kéto- β -boswellique (**1**), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**2**), acide β -boswellique (**3**), acide acétyl- β -boswellique (**4**) et β -amyrin (**5**)) sont présentés figure II.29 et les rapports frontaux correspondants pour les deux dimensions sont reportés dans le tableau II.3.

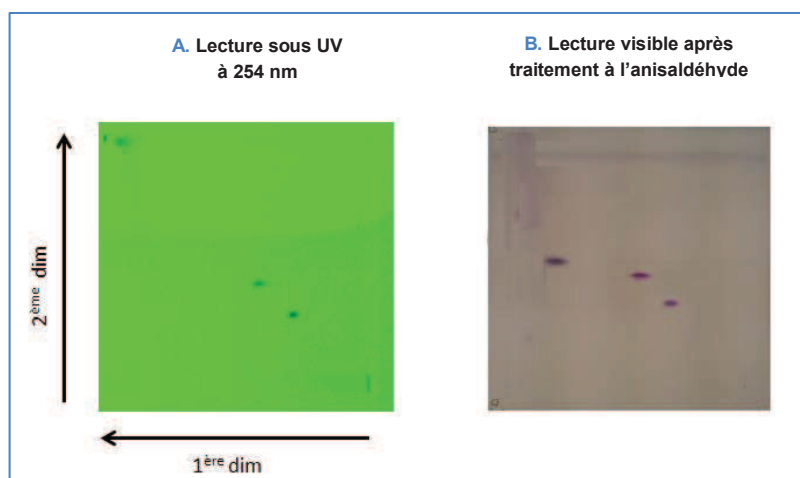


Figure II.29 Analyse sur plaque TLC SiF254 de cinq standards : acide 11-kéto- β -boswellique (**1**), acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**2**), acide β -boswellique (**3**), acide acétyl- β -boswellique (**4**), β -amyrine (**5**).

A 1^{re} révélation par lecture sous lampe UV à 254 nm et **B** 2^{ème} révélation dans le visible après dérivation à l'anysaldéhyde. Conditions : Plaque de silice F254, dépôt de 2 μ L de standards à 500 mg.L⁻¹ élution sur 8 cm, phase mobile : méthanol-chloroforme-heptane (0.5: 7 :1 : 0.3, v/v/v) Voir le tableau II.1 pour le détail sur les rétentions des spots en 1^{ère} et 2^{ème} dimension.

Tableau II.3 Valeurs des rapports frontaux (R_f) des 5 standards terpéniques analysés en TLC 2D.

	Composés	R_f 1 ^{ère} dimension	R_f 2 ^{ème} dimension
1	Acide 11-kéto- β -boswellique	0.30	0.29
2	Acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique	0.41	0.43
3	Acide β -boswellique	0.40	0.44
4	Acide acétyl- β -boswellique	0.46	0.52
5	β -amyrine	0.74	0.58

Chacun de ces 5 solutés se positionne sur la plaque dans la zone médiane. Les signaux révélés pour les 5 standards mettent en évidence le gain d'efficacité apporté par la 2^{ème} dimension (resserrement des bandes d'élution). Nos analyses illustrent bien le fait que l'utilisation de la TLC-2D permet d'améliorer la résolution entre les composés.

• **ANALYSE DES RESINES DE TYPE FRANKINCENSE :**

Les mêmes conditions d'analyse TLC-2D ont été ensuite appliquées à l'étude des 4 résines de la famille *Boswellia* de composition terpénique proche. La figure II.30, reporte l'image des 4 plaques obtenue lors de la 1^{ère} lecture sous lampe UV à 254 nm. Pour les 2 résines africaines (*Boswellia neglecta* et *carterii*), aucun spot n'est révélé. Pour la résine *Boswellia sacra*, un seul spot est observé. Il est caractérisé par des valeurs de *R_f* dans les 2 dimensions, identiques à celles observées pour le standard 2 (tableau II.3) à savoir l'acide 3-O-acetyl-11-kéto-β-boswellique. Pour la résine indienne (*Boswellia serrata*) deux spots sont révélés et identifiés par leurs *R_f* respectifs comme étant les acides 3-O-acetyl-11-kéto-β-boswellique (2) et 11-kéto-β-boswellique (1). Ces résultats sont en bon accord avec ceux obtenus lors de l'analyse TLC monodimensionnelle à 254 nm. La présence des mêmes solutés est révélée dans les 2 systèmes d'analyse.

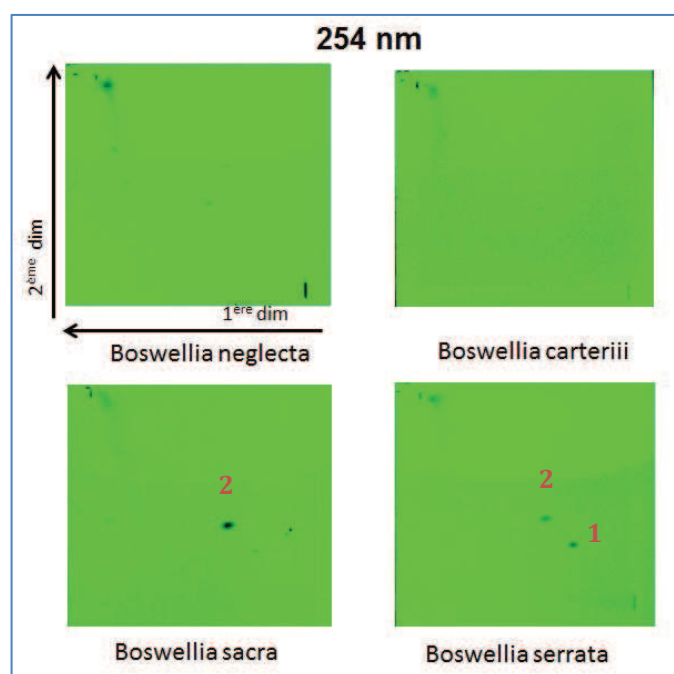


Figure II.30 Analyses TLC-2D des 4 résines *Boswellia*.

Lecture des plaques sous UV à 254 nm sans révélation préalable. Avec : l'acide 11-kéto-β-boswellique (1) et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto-β-boswellique (2). Voir le tableau II.3 pour le détail sur les rapports frontaux des spots en 1^{ère} et 2^{ème} dimension. Conditions : Plaque de silice F254, dépôt de 1 µL de la résine *Boswellia serrata* à 50 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm. Phases mobiles : 1^{ère} dimension : méthanol-chloroforme-hexane (0.5 : 7 : 1, v/v/v), 2^{ème} dimension : toluène-acétate d'éthyle-heptane-acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v)

Après révélation de la plaque à l'anisaldéhyde, on obtient une information plus riche sur la composition terpénique des résines (figure II.31). Beaucoup de similitudes entre ces résines apparaissent en première intention. Après une lecture plus approfondie, on relève la présence de certains composés permettant de discriminer les résines en fonction de leur origine. On retrouve par ailleurs comme attendu, les acides boswellique (3), acétyl boswellique (4) présents dans l'ensemble des résines de type *Boswellia*.

On constate que l'utilisation de la stratégie TLC-2D par rapport à celle de la TLC-1D apporte effectivement une amélioration des résolutions entre composés. Par exemple, après révélation à l'anisaldéhyde, sur la plaque correspondant à l'analyse de la résine *Boswellia carterii* (figure II.31), la présence de deux spots notés 4 et 4' est détectée. Ces 2 spots sont co-élus dans la première dimension mais séparés grâce à la deuxième dimension. On observe la même chose dans le cas de l'analyse de la résine *Boswellia sacra*.

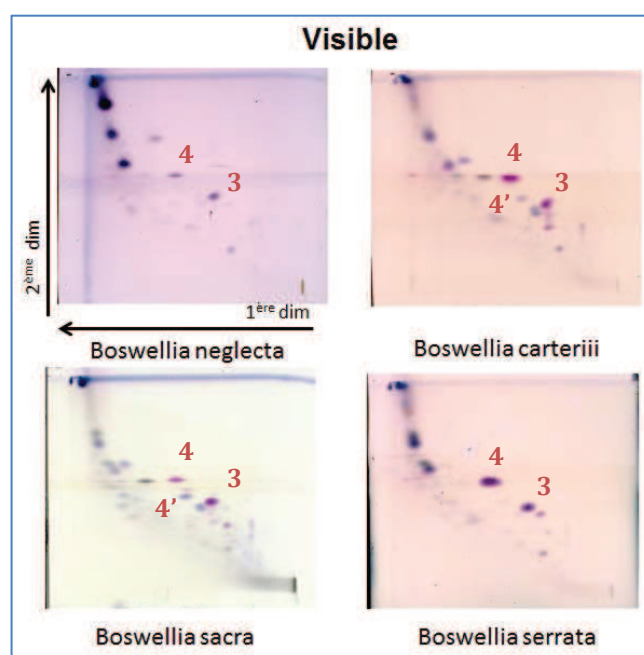


Figure II.31 Analyses TLC-2D des 4 résines *Boswellia* après révélation des plaques à l'anisaldéhyde. Avec : acide boswellique (3), acide acétyle boswellique (4).

Voir le tableau II.3 pour le détail sur les rapports frontaux des spots en 1^{ère} et 2^{ème} dimension.

Conditions : Plaque de silice F254, dépôt de 1 μ L de la résine *Boswellia serrata* à 50 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm. Phases mobiles : 1^{ère} dimension : méthanol-chloroforme-hexane (0.5 : 7 : 1, v/v/v), 2^{ème} dimension : toluène-acétate d'éthyle-heptane-acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v)

• CONCLUSION

La TLC et la TLC-2D sont 2 approches analytiques intéressantes et rapides à mettre en œuvre pour caractériser la composition chimique des résines végétales, notamment celles appartenant à une même famille et pour détecter les marqueurs majoritaires de ces matériaux. L'utilisation d'une 1^{ère} lecture sous UV à 254 nm après élution de la plaque couplée à une 2^{ème} révélation dans le visible après pulvérisation de la plaque par un agent de dérivation, permet d'obtenir une rapide différenciation visuelle des échantillons. Cependant, en absence de standards commerciaux, l'identification des composés révélés reste impossible à réaliser car la révélation à l'anisaldéhyde n'est pas spécifique. L'identification des composés présents basée sur une comparaison des rapports frontaux (R_f) à ceux de standards disponibles élués dans les mêmes conditions, atteint rapidement ses limites et ne permet pas une détermination sans

équivoque d'un composé car la détermination des R_f d'une analyse de plaque à une autre n'est pas hautement reproductible.

Pour aller plus loin dans l'identification, la spectrométrie de masse apparaît comme un outil incontournable pour apporter des informations structurales complémentaires. Nous présenterons dans le paragraphe suivant les résultats que nous avons obtenus en couplant la séparation TLC des différents échantillons à la spectrométrie de masse.

II.7 DEVELOPPEMENT DU COUPLAGE TLC-MALDI-TOF-MS POUR L'ANALYSE DES TRITERPENOÏDES

Le couplage de la TLC avec la spectrométrie de masse est encore très peu développé compte tenu des contraintes importantes qui lui sont associées. En effet, en TLC les composés séparés restent adsorbés sur le support solide après leur élution contrairement à la chromatographie gaz ou liquide pour lesquelles les solutés sont détectés en sortie de colonne et véhiculés dans une phase mobile gazeuse ou liquide. Comme on a pu le voir dans le chapitre bibliographique, il existe principalement deux approches pour le couplage de la TLC à la spectrométrie de masse : (1) soit la désorption des spots (grattage manuel des spots ou utilisation de l'interface CAMAG) suivie d'une analyse par spectrométrie de masse après redissolution dans un solvant approprié et une ionisation dans une source à pression atmosphérique (API) la plupart du temps, soit (2) l'ionisation directe à la surface de la plaque avec une source de type MALDI et une analyse en TOF des ions produits.

Pour ce travail, nous avons choisi de travailler directement sur la plaque TLC en associant la technique MALDI-TOF-MS qui permet de s'affranchir de l'étape de désorption des spots. Le développement de ce type de couplage est particulièrement délicat à réaliser dans le cadre de l'analyse des triterpénoïdes, du fait des faibles masses moléculaires de ces composés et du faible nombre de sites de protonation/déprotonation présents dans leur structure. Leur analyse par MALDI-TOF-MS présente de ce fait un défi important à relever. De plus, suite à l'étude bibliographique que nous avons menée, ce couplage serait le premier réalisé pour cette famille de composés.

Nous présenterons tout d'abord l'appareillage MALDI-TOF-MS utilisé ainsi que la mise en place du couplage avec la TLC. Par la suite, nous présenterons les différentes étapes effectuées à partir de composés triterpéniques standards, pour optimiser les paramètres d'ionisation et de détection par MALDI-TOF-MS. Et enfin, nous appliquerons l'ensemble des paramètres retenus à l'analyse des résines végétales.

II.7.1 APPAREILLAGE MALDI-TOF-MS ET MISE EN PLACE DU COUPLAGE AVEC LA TLC

Notre étude, a été réalisée en utilisant l'appareil Autoflex (MALDI-TOF MS) commercialisé par la société Bruker. Cet appareillage permet une introduction directe dans la source d'ionisation de la plaque TLC sur support aluminium dès lors que ses dimensions géométriques sont ajustées à celles de la cible support habituellement utilisée.

II.7.1.1 APPAREILLAGE MALDI-TOF-MS

Le MALDI-TOF-MS couple une source d'ionisation assistée par matrice (MALDI) à un analyseur à temps de vol (TOF). Son principe a été plus particulièrement développé dans le chapitre I de ce manuscrit. Nous ne détaillerons dans ce paragraphe que les caractéristiques particulières à l'appareillage dont nous disposons pour notre étude.

L'ionisation MALDI de l'échantillon se fait directement à la surface de la plaque après l'avoir mélangé avec une matrice composée de petites molécules organiques ayant une forte absorption à la longueur d'onde d'un laser donné. Le solide cristallisé ainsi obtenu à la surface de la plaque est soumis aux impulsions d'un laser pour l'ioniser. La source laser dont nous disposons est une source à azote possédant une longueur d'onde de 337 nm et une durée d'impulsions de quelques nanosecondes. Le diamètre d'impact laser étant d'environ 100 µm ceci permet d'avoir une bonne résolution spatiale à chaque tir laser.

Une fois les ions formés, l'analyseur TOF permet de les accélérer à l'entrée d'un tube vide de gaz sous une pression de 10^{-7} mbar environ. Nous avons utilisé cet analyseur en mode réflectron adapté pour l'étude des molécules de faibles masses molaires ($m/z < 5000$). Le réflectron est un miroir électrostatique qui s'oppose à la progression des ions en les réfléchissant permettant la focalisation temporelle des ions avec le même rapport m/z mais possédant des dispersions d'énergie cinétique différentes (figure II.32). L'utilisation de ce mode permet ainsi d'augmenter la résolution de l'appareil par rapport au mode linéaire.

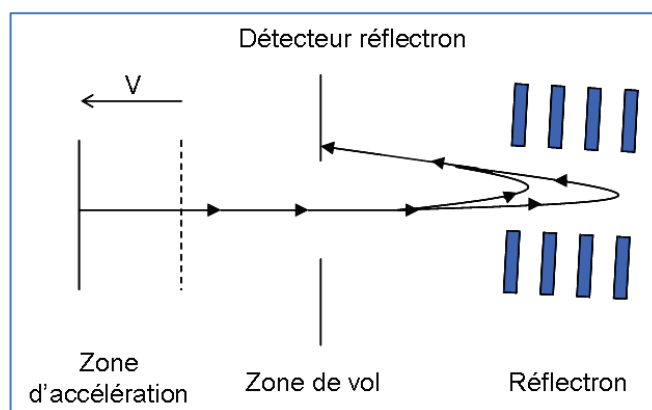


Figure II.32 Principe de l'analyseur TOF en mode réflectron.
REF : [20]

II.7.1.2 MISE EN PLACE DU COUPLAGE TLC-MALDI-TOF-MS

Le couplage TLC-MALDI-TOF consiste à ioniser directement la surface de la plaque TLC après élution et dépôt de la matrice sur les spots d'intérêt à identifier. Les ions formés sont par la suite analysés par le TOF.

Pour que la plaque TLC puisse directement être introduite dans la source MALDI il est indispensable d'ajuster dès le début de la manipulation, ses dimensions géométriques pour qu'elles soient compatibles avec celles de l'entrée dans la source. Toutes les plaques TLC que nous avons utilisées ont donc été découpées aux dimensions suivantes 5 cm x 7.5 cm.

Comme nous avons pu le voir précédemment lors des analyses TLC, les composés triterpéniques ne sont pas directement visibles sur la plaque TLC après leur élution. La combinaison d'une 1^{ère} étape de lecture directe de la plaque sous lumière UV à 254 nm suivie d'une 2^{ème} étape de lecture dans le visible après dérivation est alors nécessaire pour révéler l'ensemble des composés de cette famille. L'un des avantages de l'utilisation de la spectrométrie de masse en plus de celui d'une identification possible des composés en absence de standards, est de s'affranchir de l'utilisation d'agents révélateurs pour leur détection. Néanmoins, l'absence de repérage visuelle des solutés directement après leur élution, engendre une difficulté importante à résoudre dans le cas de l'ionisation MALDI puisqu'il faut positionner la cible laser juste au-dessus des dépôts à ioniser.

Pour cette raison, les analyses sont dupliquées sur chaque plaque. Après la séparation TLC, une partie de la plaque est dérivée avec le révélateur et sert de référence pour l'autre partie de la plaque qui sera analysée par la suite en spectrométrie de masse (figure II.33). Cette duplication d'analyse permet de repérer les spots qui ne sont pas visibles et de réaliser une analyse ciblée des spots élués afin de ne pas faire des tirs laser sur toute la plaque.

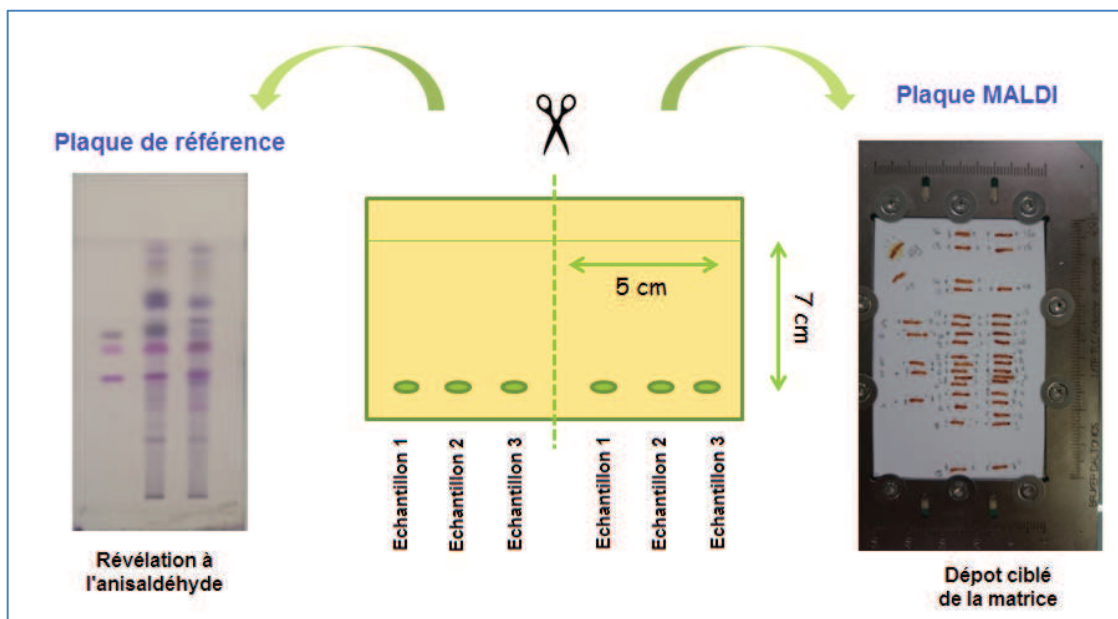


Figure II.33 Principe pour l'utilisation du couplage TLC-MALDI-TOF-MS pour les composés qui ne sont pas visible sans révélation de la plaque

Les conditions d'analyse en TLC des résines végétales ayant été préalablement optimisées sur « gel de silice », il nous reste à optimiser les paramètres de détection par MALDI-TOF-MS afin d'appliquer la méthode couplée à l'étude de la caractérisation phytochimique de ces échantillons. Le choix de la matrice la plus adaptée à l'ionisation des triterpènes ou encore le choix du mode d'ionisation sont des paramètres à définir.

II.7.2 OPTIMISATION DES PARAMETRES MALDI-TOF-MS

Les triterpénoïdes n'ont jusqu'à présent jamais été étudiés en MALDI-TOF-MS. En effet, ils possèdent une faible masse moléculaire (inférieure à 1000 Da) entraînant des possibilités d'interférences avec la matrice constituée elle aussi de molécules organiques de faible masse moléculaire. De plus, ces composés présentent peu de sites de protonation ou de déprotonation ce qui peut rendre leur ionisation difficile.

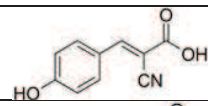
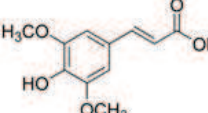
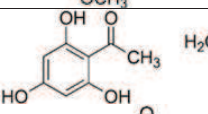
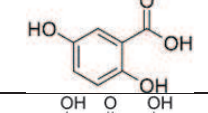
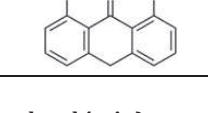
Plusieurs paramètres sont à considérer et à optimiser pour la détection des composés triterpéniques en MALDI-TOF-MS en vue du couplage avec la TLC. Le premier défi est la sélection d'une matrice adaptée à l'ionisation de ces petites molécules tout en évitant les interférences en masse avec les molécules de la matrice. Par la suite, il est important de choisir le mode d'ionisation (positif ou négatif) le plus favorable pour l'ionisation des triterpénoïdes.

II.7.2.1 CHOIX DE LA MATRICE

La matrice utilisée en MALDI a plusieurs rôles : (1) elle isole les molécules d'analyte afin de limiter la formation d'agrégats et favorise ainsi la formation des ions moléculaires, (2) elle minimise les dommages de l'échantillon en absorbant l'énergie du faisceau laser, (3) elle favorise le transfert de protons vers l'analyte. Le choix de la matrice est donc une étape clé pour les analyses en MALDI.

En fonction de l'échantillon à analyser, le choix de la matrice est à adapter. Les matrices les plus couramment utilisées sont présentées dans le tableau II.4 avec le type de composés pour lesquelles elles ont été employées. On constate que l'ionisation MALDI est une technique de choix pour l'analyse des molécules de poids moléculaires supérieur à 600 Da.

Tableau II.4 Les matrices les plus couramment employées en MALDI.
REF : [20]

Composé	Abréviation	Structure	Analyte
Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique	CHCA		Peptide Hydrate de carbone
Acide sinapique	SA		Protéine, dendrimères, fullerènes
2,4,6-trihydroxyacétophénone	THAP	 H ₂ O	Oligonucléotide, hydrate de carbone, glycoprotéine
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque	DHB		Polymère synthétique polaire, hydrate de carbone
Dithranol	DIT		Polymère synthétique non polaire, lipide, dendrimères

Le choix d'une méthode (matrice + méthode de dépôt) reste empirique. Toutefois, pour améliorer la réponse spectrale, le choix de la matrice, le mode de dépôts et la limite de suppression de signal par les pics de matrice sont des critères essentiels. C'est pourquoi, dans le contexte de notre étude, la caractérisation de la famille des triterpénoïdes par TLC-MALDI-MS, l'évaluation de trois matrices a été réalisée. Pour cela, nous avons sélectionné les deux matrices organiques (commerciales) les plus communément employés en MALDI-MS et TLC-MALDI-MS (l'acide 2,5 dihydroxy-benzoïque (DHB) et l'acide α -cyano-4-hydrocinnamique (CHCA) puis une matrice inorganique synthétisée au sein de notre laboratoire.

La matrice acide α -cyano-4-hydrocinnamique (CHCA) est très utilisée en MALDI pour l'analyse protéomique. Lors de l'étape de co-cristallisation avec l'échantillon celle-ci présente l'avantage de former un dépôt homogène avec des petits îlots de cristaux et conduit à une

ionisation homogène sur l'ensemble du dépôt (ou spot). La matrice acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), quant à elle, présente une co-cristallisation plus hétérogène formant de plus gros cristaux entraînant un effet temps de vol plus important et par conséquent une résolution plus faible qu'avec la matrice CHCA [21]. Néanmoins, la matrice DHB possède l'avantage d'être tolérante aux contaminations (tampons, sels,...) avec un bon rapport sur bruits. De plus, cette matrice est la plus communément employée lors d'analyse de lipides en TLC-MALDI-TOF-MS [22, 23].

Ces différentes propriétés, nous ont amené à sélectionner ces deux matrices afin de déterminer les meilleures conditions d'analyses. Afin de compléter cette étude, une troisième matrice a été évaluée. Il s'agit d'une matrice inorganique synthétisée au sein du laboratoire dans le cadre de la thèse d'Aleksander Salwinski et présentant de bonne propriété d'ionisation, en particulier pour de petites molécules comprises entre $200 < m/z < 1500$ [24]. Il s'agit d'une nanoparticule magnétique d'oxyde de fer (Fe_3O_4) enrobée de fine couche de silice.

Ces trois matrices ont été testées en solution saturée. En effet, la matrice doit être présente en large excès par rapport à l'analyte afin de minimiser la fragmentation de ce dernier [25]. Pour la matrice CHCA et MP, nous avons préparé des solutions saturées (soit environ 8 mg/ml). Pour la matrice DHB, le domaine de concentrations dans lequel il faut se placer pour que la matrice soit performante, est encore plus élevé. Dans la littérature, une concentration de 100 mg/ml est recommandée dans un mélange eau/acétonitrile (1 :1, v/v) [26].

Pour le mode de dépôt de la matrice, il existe différent type de préparation de l'échantillon pour la TLC-MALDI-TOF : (i) une application de la matrice sur chaque composés élués que l'on appellera approche ciblée. Cette méthode consiste à déposer la matrice sur l'analyte indépendamment au même endroit sur la plaque MALDI ou TLC-MALDI avant d'être introduite dans le MALDI-TOF-MS. La deuxième approche (ii) consiste quant à elle à une application de la matrice uniforme sur l'ensemble de la plaque TLC par immersion (dipping) que l'on appellera l'approche non ciblée [27].

En première approche c'est plutôt une analyse ciblée des composés terpéniques que nous avons envisagée. En effet, l'analyse ciblée représente un gain de temps d'analyse en MALDI ainsi qu'une consommation réduite de matrice. Pour nos premiers essais, nous avons donc favorisé le mode « *dried-droplet method* » pour effectuer le mélange analyte/matrice sur une plaque TLC en « gel de silice ». Nous avons déposé 1 μ L d'analyte puis 1 μ L de matrice.

Pour le choix de la matrice, les tests ont été réalisés à partir du standard de l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (M_w 512.5 g.mol⁻¹), connu pour être présent dans les résines de type *Boswellia*.

Dans un premier temps, l'ionisation a été réalisée en mode positif. Ce mode est le plus souvent utilisé avec les 2 matrices organiques CHCA et DHB qui, en tant que donneurs de protons, favorisent la formation des ions $[M+H]^+$ [28]. La figure II.34 présente les spectres de masse obtenus en mode positif pour le soluté en présence des trois matrices. Aucune ionisation du composé n'est observée avec les 2 matrices organiques (CHCA et DHB) tandis qu'avec la matrice inorganique (MP), on remarque la présence d'un ion à m/z 513.5 correspondant à l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ du soluté et celle d'un ion à m/z 535.3 correspondant à l'adduit sodium $[M+Na]^+$.

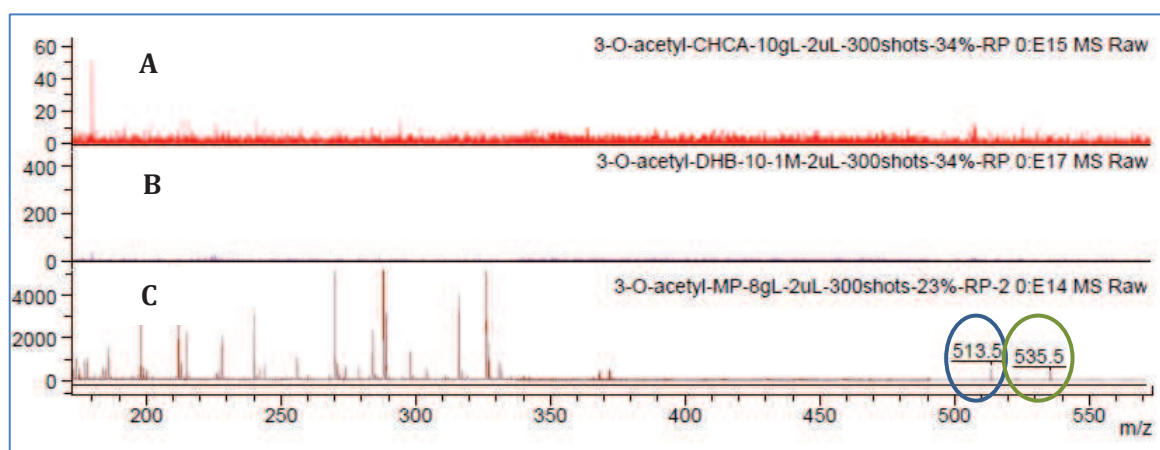


Figure II.34 Spectres de masse obtenus pour l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique en MALDI-TOF-MS en mode positif avec 3 matrices : CHCA (A), DHB (B), et la matrice inorganique MP (C). Préparation de l'échantillon selon le mode « dried-droplet method ». Analyse sur plaque TLC « gel de silice », dépôt de 1 μ L de standards à 500 mg.L⁻¹ et 1 μ L de matrice.

Dans un deuxième temps, nous avons aussi testé le mode « *dipping* » avec le même soluté et la matrice DHB. En effet, la DHB est efficace en très grande concentration et notamment lorsqu'on plonge l'intégralité de la plaque TLC dans la solution de matrice. La figure II.35 présente les spectres de masse obtenus pour le soluté après avoir immergé entièrement la plaque TLC une fois dans la solution de DHB à 200 mg/mL (trace rouge, figure II.35) ou trois fois dans la solution (trace bleue, figure II.35).

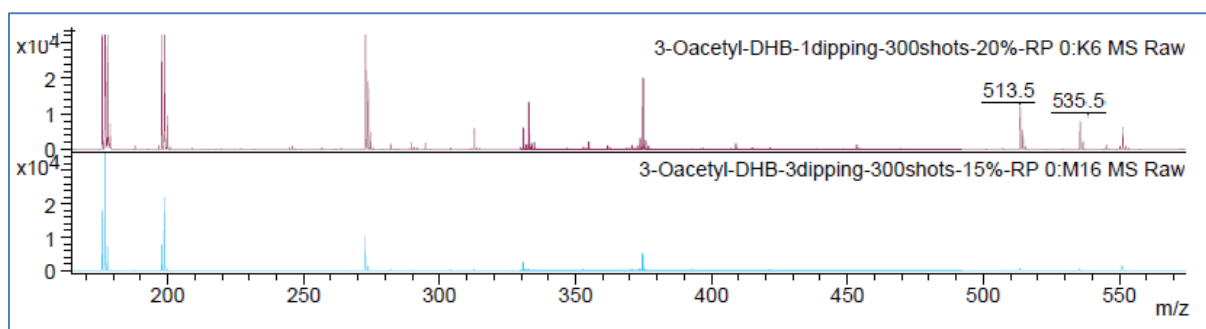


Figure II.35 Spectres de masse de l'acide 3-O-acétyl-11-kéto-β-boswellique en mode positif utilisant la matrice DHB à 200 mg/mL en mode dipping avec 1 immersion (A) et 3 immersions (B).

Analyse sur plaque TLC « gel de silice », dépôt de 1μL de standards à 500 mg.L⁻¹ et 1μL de matrice DHB à 200 mg.mL⁻¹.

Les conditions de « *dipping* » les plus favorables pour l'ionisation du soluté apparaissent clairement comme étant celles correspondant à un seul trempage de la plaque (trace rouge, figure II.35). On observe l'ion moléculaire à m/z 513.5 $[M+H]^+$ et l'adduit sodium à m/z 535.5 $[M+Na]^+$ de l'acide 3-O-acétyl-11-kéto-β-boswellique. La DHB étant une matrice non homogène qui se cristallise, le trempage de la plaque 3 fois dans la solution de matrice entraîne le masquage de l'échantillon par la matrice et se traduit par une ionisation quasi inexistante du soluté (trace bleue figure II.35).

Une ionisation des acides triterpéniques est ainsi envisageable en déposant la matrice DHB en mode « *dipping* » et non plus en mode « *dried-droplet method* » cependant, ce mode opératoire nécessite de disposer d'un volume et d'une quantité très importants de solution de matrice en comparaison du mode « *dried-droplet method* » plus adapté pour une analyse ciblée.

La préparation de l'échantillon selon le mode « *dried-droplet method* » restera notre choix pour réaliser une analyse ciblée des acides triterpéniques en conséquence nous avons sélectionné la matrice inorganique MP pour la suite des optimisations puisque c'est la seule matrice permettant l'ionisation du soluté modèle dans ces conditions de dépôt.

II.7.2.2 CHOIX DU MODE D'IONISATION

Pour la comparaison des différentes matrices nous nous sommes basées sur l'analyse d'un seul composé standard (l'acide 3-O-acétyl-11-kéto-β-boswellique) et le mode positif pour l'ionisation. Afin de s'assurer que la matrice MP pouvait ioniser d'autres composés triterpéniques, nous l'avons testé pour analyser un mélange de 5 standards triterpéniques connus pour être présents dans les résines de type Frankincense [29, 30] : β-amyrine (Mw 426.7 g.mol⁻¹), acide boswellique (Mw 465.5 g.mol⁻¹), acide acétyl boswellique (Mw 493.4 g.mol⁻¹), acide 11-kéto-β-boswellique (Mw 470.5 g.mol⁻¹) et acide 3-O-acétyl-11-kéto-β-boswellique (Mw 512.5 g.mol⁻¹).

- **IONISATION EN MODE POSITIF**

Nous avons tout d'abord testé la matrice MP en mode positif (figure II.36) avec ces 5 composés en mélange et en présence de NaCl afin de favoriser la formation des adduits sodium.

La figure II.36 met en évidence la détection de seulement 3 ions sur les 5 attendus. Les valeurs des rapports m/z des ions observés correspondent respectivement aux adduits sodium $[M+Na]^+$ de l'acide 11-kéto- β -boswellique (m/z 493.4), de l'acide acétyl- β -boswellique (m/z 521.5) et de l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (m/z 535.5). L'acide boswellique et la β -amyrine ne sont donc pas ionisés en mode positif avec cette matrice MP.

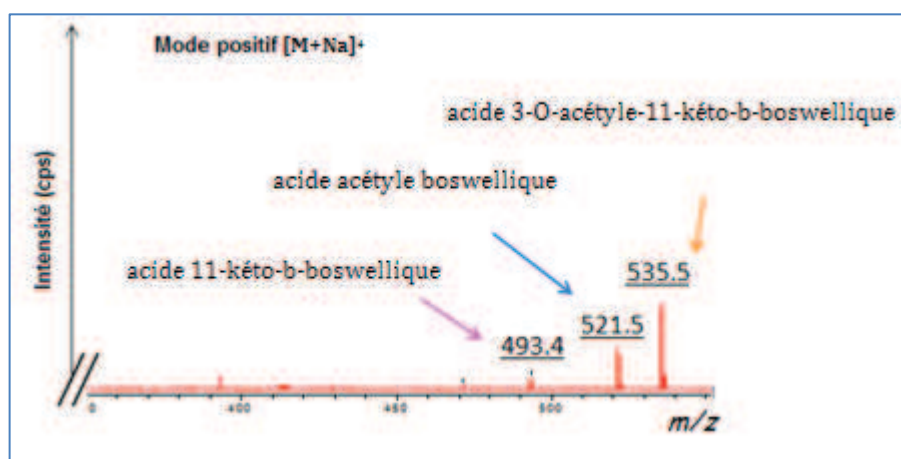


Figure II.36 Analyse en mode positif de 5 standards triterpéniques (β -amyrine, acide boswellique, acide acétyl-boswellique, acide 11-kéto- β -boswellique et acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique) en utilisant la matrice inorganique MP en MALDI-TOF-MS.

Conditions : Analyse sur plaque TLC « gel de silice », dépôt de 1 μ L de standards à 500 ppm et 1 μ L de matrice MP à 8 mg.mL⁻¹

- **IONISATION EN MODE NEGATIF**

L'utilisation du mode négatif n'est pas usuel pour les matrices organiques en MALDI néanmoins nous avons voulu le tester pour évaluer si dans ces conditions il serait possible d'ioniser les 2 composés non détectés en mode positif.

La figure II.37 met en évidence la détection dans ces conditions de seulement 2 ions sur les 5 attendus. Les valeurs des rapports m/z des ions observés correspondent respectivement aux ions pseudomoléculaires $[M-H]^-$ de l'acide boswellique (m/z 455.3) et de l'acide 11-kéto- β -boswellique (m/z 469.5).

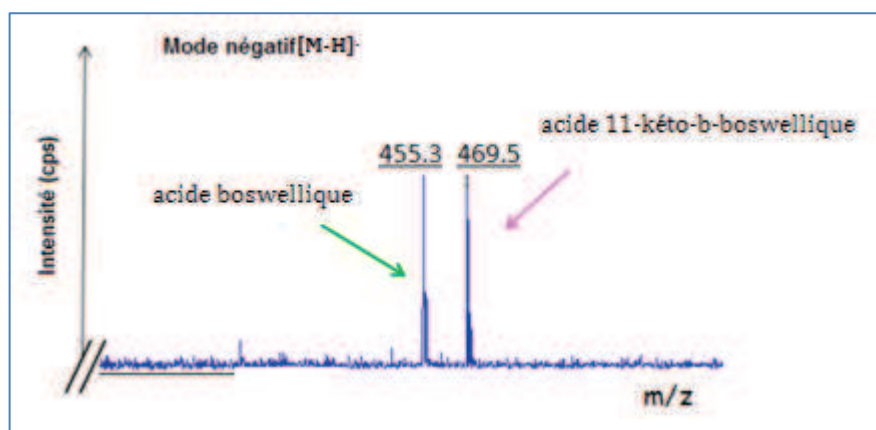


Figure II.37 Analyse en mode négatif de 5 standards triterpéniques (β -amyrine, acide boswellique, acide acétyl boswellique, acide 11-kéto- β -boswellique et acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique) en utilisant la matrice inorganique MP en MALDI-TOF-MS.

Conditions : Analyse sur plaque TLC « gel de silice », dépôt de 1 μ L de standards à 500 ppm et 1 μ L de matrice MP à 8 mg.mL⁻¹

On constate que les alcools triterpéniques dont un représentant est la β -amyrine, ne sont pas ionisés en présence de la matrice MP aussi bien en mode positif qu'en mode négatif contrairement aux acides triterpéniques. En l'absence de fonction acide sur le squelette carboné terpénique, les fonctions alcool ne semblent pas posséder de protons suffisamment labiles pour s'ioniser dans ces conditions de MALDI. De nouvelles matrices restent encore à découvrir pour résoudre cette problématique. Les conditions d'ionisation MALDI que nous avons optimisées se limitent pour l'instant à l'analyse d'acides triterpéniques.

Parmi les trois matrices testées seule la matrice inorganique « home-made » (MP) convient pour ioniser les acides triterpéniques. L'analyse ciblée du mélange de 5 acides triterpéniques standard réalisée en MALDI-TOF-MS après avoir déposé la matrice inorganique MP selon le mode « *dried droplet method* », met clairement en évidence qu'il n'y a pas de mode d'ionisation à privilégier car aucun ne permet l'ionisation de tous les standards. Afin d'obtenir l'information la plus exhaustive possible sur la composition en acides triterpéniques d'échantillons de résines végétales, il sera donc nécessaire d'analyser la plaque TLC sur laquelle la séparation aura été faite, en utilisant la matrice inorganique (MP) et les 2 modes d'ionisation possibles. Compte tenu du fait que la technique MALDI-TOF-MS n'entraîne qu'une ablation partielle des solutés lors des tirs laser, plusieurs analyses successives de la même plaque peuvent être envisagées. Chaque plaque pourra donc être analysée 2 fois pour effectuer des analyses MALDI-TOF MS dans les deux modes d'ionisation sans qu'il y ait perte d'informations.

II.7.3 APPLICATION DU COUPLAGE TLC-MALDI-TOF-MS AUX RESINES DE TYPE FRANKINCENSE

Nous venons de démontrer la faisabilité de l'analyse MALDI-TOF-MS des acides triterpéniques en utilisant la matrice inorganique MP développée dans notre laboratoire en mode d'ionisation positif et négatif. Nous pouvons désormais appliquer cette technique en couplage avec la TLC pour l'identification des composés présents majoritairement dans les résines végétales et notamment les résines de type Frankincense.

Nous avons sélectionné 4 résines *Boswellia* proches dans la classification (*Boswellia serrata*, *Boswellia neglecta*, *Boswellia carterii* et *Boswellia sacra*) pour notre étude afin d'évaluer le potentiel du couplage TLC-MALDI-TOF-MS dans un contexte d'analyse d'une nouvelle famille très riche en composés de faible masse moléculaire et dans celui d'une authentification et différenciation du matériel végétal.

Comme décrit précédemment au paragraphe II.7.1.2., les analyses de résine sont faites en double sur chaque plaque. Après la séparation TLC, la 1^{ère} moitié de la plaque est dérivée avec le révélateur et sert de référence pour l'autre moitié qui sera analysée par spectrométrie de masse (figure II.33). Cette duplication d'analyse permet de repérer la position des spots qui ne sont pas détectés dans le visible et de réaliser ensuite une analyse ciblée par MALDI-TOF-MS. Le dépôt de la matrice MP est ciblé sur les spots d'intérêt permettant d'analyser rapidement les différences entre les résines.

Nous avons tout d'abord réalisé le couplage de la TLC monodimensionnelle (1D-TLC) avec le MALDI-TOF-MS pour les 4 résines de type Frankincense puis testé le potentiel d'un couplage de la TLC bidimensionnelle (TLC-2D) à la spectrométrie de masse à partir de l'analyse de la résine *Boswellia serrata*.

II.7.3.1 ANALYSE DES RESINES DE TYPE FRANKINCENSE PAR LE COUPLAGE TLC-MALDI-TOF-MS

Le couplage TLC-MALDI-TOF optimisé a été appliqué à l'identification des résines de type Frankincense provenant de différentes régions (Afrique, Asie et Moyen-Orient). L'objectif étant de pouvoir identifier les différences entre les résines.

Le couplage TLC-MALDI-TOF permet d'associer à chaque spot révélé en UV ou après dérivation dans le visible, un spectre de masse. D'après la figure II.38, il est ainsi possible de confirmer la présence (ou l'absence) de 4 acides triterpéniques majoritaires dans les résines. Après la 1^{ère} lecture de plaque sur UV, 2 composés triterpéniques sont révélés. Le spectre de masse en mode d'ionisation positif du composé élué au $R_f = 0.41$ est caractérisé par un ion dont

la valeur du rapport m/z est égale à 535,4 ce qui permet l'identification de l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique détecté sous la forme de son adduit $[M+Na]^+$. L'acide 11-kéto- β -boswellique peut être identifié par son spectre de masse obtenu en mode négatif. Il correspond au composé élué sur la plaque TLC au R_f 0.29.

Après dérivation à l'anisaldéhyde, les composés révélés respectivement avec des valeurs de R_f égales à 0.44 et 0.56 sont identifiés d'après les spectres de masse comme étant l'acide boswellique (ionisation en mode négatif) et l'acide acétyl boswellique (ionisation en mode positif).

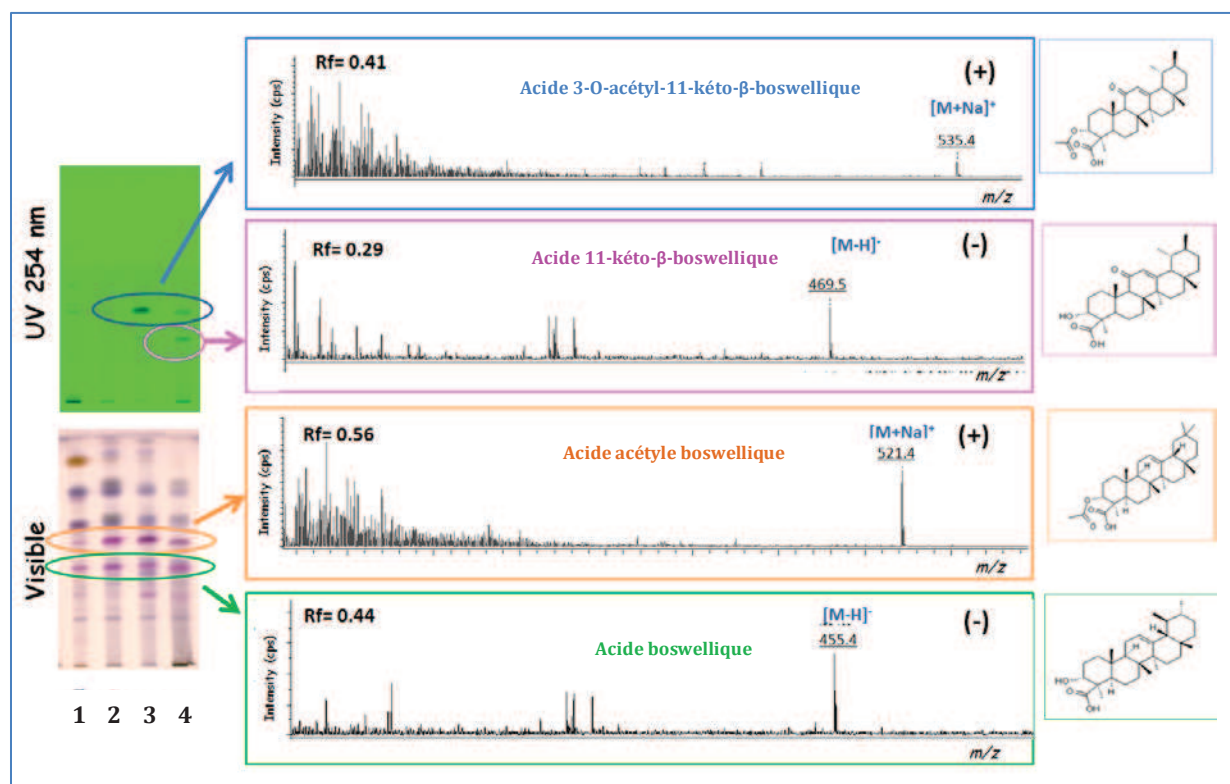


Figure II.38 Analyse de 4 résines *Boswellia* par TLC-MALDI-TOF-MS.

Repérage des spots par une 1^{ère} lecture de plaque sous lampe UV à 254 nm et une 2^{ème} lecture dans le visible après révélation à l'anisaldéhyde. Spectres de masse associés aux spots.

Attribution des dépôts : *Boswellia neglecta* (1), *Boswellia carterii* (2), *Boswellia sacra* (3) et *Boswellia serrata* (4).

Conditions : Plaque de silice F254, dépôt 1 μ L de résine à 50 mg.mL⁻¹ et 1 μ L de matrice MP à 8 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm, phase mobile : toluène-acétate d'éthyle-heptane-acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v)

Cette étude a permis une première différenciation des quatre résines *Boswellia* d'origine différente. L'analyse TLC des différentes résines permet de les différencier visuellement en associant une lecture de plaque sous lampe UV à 254 nm suivi d'une révélation dans le visible après dérivation à l'anisaldéhyde. Le couplage TLC-MALDI-TOF-MS permet par ailleurs d'associer un spectre de masse à un spot donné. L'identification de certains composés présents dans les résines est alors possible par comparaison des rapports frontaux et des spectres de masses à ceux de standards. Le tableau II.5 regroupe les biomarqueurs majoritaires identifiés avec l'analyse TLC-MALDI-TOF-MS.

Tableau II.5 Les biomarqueurs majoritaires identifiés dans les résines de type *Boswellia* après analyse TLC-MALDI-TOF-MS.

Biomarqueurs majoritaires	B. Neglecta (Kenya)	B. Carterii (Somalie)	B. Sacra (Oman)	B. Serrata (Inde)
Acide α/β boswellique	X	X	X	X
Acide α/β acétyle- boswellique	X	X	X	X
Acide 11-keto- β -boswellique				X
Acide 3-O-acetyl-11-keto- β - boswellique			X	X

D'après ce tableau, la présence de l'acide boswellique et de l'acide acétyle boswellique est confirmée dans les 4 échantillons de résines. Ces 2 composés sont bien des marqueurs caractéristiques pour les résines de type *Boswellia*. Les 2 résines *Boswellia neglecta* et *Boswellia carterii* se distinguent des 2 autres résines par le fait qu'elles ne contiennent ni l'une ni l'autre, d'acide 11-keto- β -boswellique et d'acide 3-O-acetyl-11-keto- β -boswellique. Les résines *Boswellia sacra* et *Boswellia serrata* peuvent être distinguées l'une de l'autre du fait de l'absence d'acide 11-keto- β -boswellique dans la résine *Boswellia sacra*. En revanche, pour les 2 résines africaines (*Boswellia neglecta* et *Boswellia carterii*), ce n'est pas par l'identification de leurs composés majoritaires que l'on peut les distinguer mais par des différences visuelles observées par comparaison des bandes révélées sur les plaques TLC.

L'analyse en TLC-MALDI-TOF-MS permet d'identifier dans les résines végétales, les acides triterpéniques présents en tant que composés majoritaires. Les informations obtenues par la spectrométrie de masse sont suffisantes pour différencier les résines entre elles, même si elles appartiennent à une même famille. Le couplage TLC-MALDI-TOF-MS est approprié pour un contrôle rapide de la provenance d'un échantillon de résine. Cependant, beaucoup d'autres composés dont la présence est révélée sur la plaque TLC par l'anisaldéhyde, restent non identifiables car impossibles à ioniser dans ces conditions MALDI. Pour avoir une identification plus exhaustive du contenu moléculaire des résines, il est nécessaire d'aller jusqu'à l'identification des composés minoritaires. Pour atteindre cet objectif plus complexe, la sensibilité du couplage TLC-MALDI-TOF-MS n'est plus suffisante et il faudra faire appel à une autre technique d'analyse. C'est par des analyses en chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse que nous avons pu aller plus loin dans la caractérisation de ces échantillons de résines (chapitres 3 et 4).

De très nombreuses bandes d'élution sont observées (figure II.38) lors de l'analyse d'une résine par TLC et comme nous venons de le dire, il n'est pas possible d'associer à toutes ces bandes, un spectre de masse car seuls les acides triterpéniques s'ionisent dans ces conditions MALDI. En poussant plus loin le raisonnement, on peut aller jusqu'à dire que la seule identification de la présence d'un acide triterpénique dans une bande d'élution n'exclut pas que cet acide triterpénique puisse être co-élué avec un ou plusieurs autres composés non ionisables donc non détectés dans le spectre de masse associé à cette bande. Dans ce contexte de complexité possible, il nous a semblé intéressant de compléter notre étude par des analyses en TLC-2D couplées au MALDI-TOF-MS.

II.7.3.2 ANALYSE DE LA RESINE *BOSWELLIA SERRATA* PAR LE COUPLAGE TLC-2D-MALDI-TOF-MS

Nous montrerons tout d'abord le principe et la mise en place du couplage TLC-2D-MALDI-TOF-MS pour ensuite donner un exemple d'application à l'analyse de la résine *Boswellia serrata*.

- **PRINCIPE :**

L'analyse en TLC bidimensionnelle couplée au MALDI-TOF-MS est plus difficile à mettre en œuvre que l'analyse TLC simple. En effet, il est indispensable de repérer les spots sur la plaque sachant qu'ils ne sont pas visibles sans dérivation à l'anisaldéhyde.

Compte tenu du fait que deux éluions sont réalisées dans deux directions différentes, il faut réaliser un spot de référence pour chaque direction (figure II.39). Après élution de la plaque et dérivation à l'anisaldéhyde des deux spots de références, on peut identifier l'emplacement des spots sur la plaque TLC-2D. On place ensuite la matrice sur les composés à analyser en spectrométrie de masse.

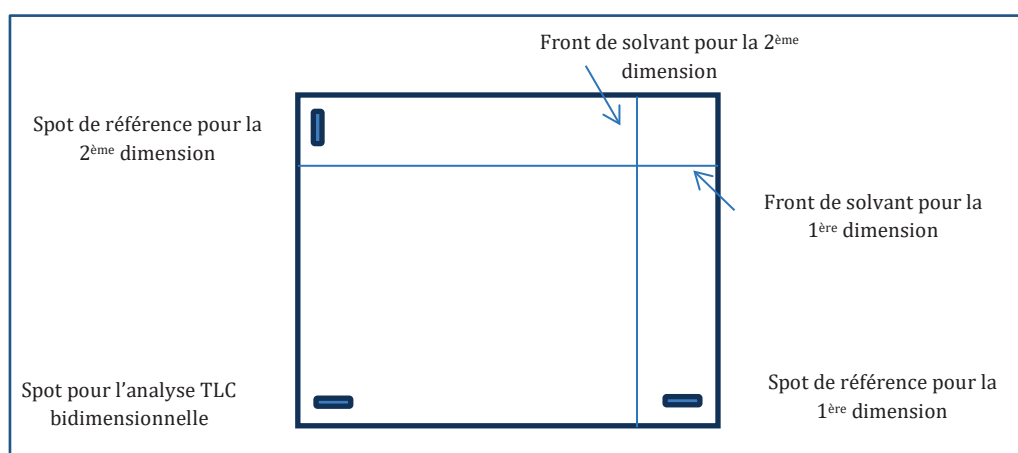


Figure II.39 Schéma de principe pour l'analyse en TLC bidimensionnelle afin de repérer les spots.

-

- **ETUDE DE LA RESINE *BOSWELLIA SERRATA* EN TLC-2D-MALDI-TOF-MS EN UTILISANT LA MATRICE MP**

Nous avons analysé la plaque TLC bidimensionnelle obtenue en MALDI-TOF-MS pour la résine *Boswellia serrata* afin de montrer la faisabilité du couplage.

Tout d'abord, la plaque TLC sur « gel de silice » a été analysée en première dimension avec la phase éluante méthanol-chloroforme-hexane (0.5 : 7 : 1, v/v/v) et dans la deuxième dimension en utilisant le mélange toluène-acétate d'éthyle-heptane-acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v) comme deuxième phase mobile.

Les spots ont été repérés sur la plaque TLC-2D par rapport à une plaque analysée dans les conditions identiques mais révélée sous lumière UV et à l'anisaldéhyde. La matrice a été ensuite déposée afin de réaliser une analyse ciblée. La figure II.40.a, présente la plaque TLC-2D de la résine avec les spectres de masses associés aux composés majoritaires. Les composés **1** et **2** visibles sous lampe UV à 254 nm ont pu être identifiés comme étant l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (**1**) et l'acide 11-kéto- β -boswellique (**2**) respectivement grâce à leurs spectres de masse.

Après dérivation à l'anisaldéhyde des spots de références, les spots ont pu être repérés et la matrice déposée sur la plaque non dérivée et destinée à l'analyse par spectrométrie de masse. Sur la figure II.40.b, on retrouve la plaque TLC-2D dérivée à l'anisaldéhyde et les spectres de masses correspondant à certains composés. L'identification de l'acide acétyle boswellique (**3**) et l'acide boswellique (**4**) est confirmée à nouveau.

Nous avons déjà mis en évidence à partir de l'analyse du mélange de 5 standards (paragraphe II.6 de ce chapitre), la capacité résolutive plus grande de la TLC bidimensionnelle par rapport à une analyse 1D du fait de sa capacité de pics supérieure. Sur la figure II-40 nous avons souligné deux cas de co-élutions différents : celle des 2 spots **3** et **5** qui ne sont pas séparés dans la 1^{ère} dimension et qui le deviennent grâce à la 2^{ème} dimension et le cas des 2 spots **4** et **6** qui sont séparés dans la 1^{ère} dimension mais ne le sont plus après la 2^{ème} analyse.

L'analyse MALDI-TOF du spot **5** (figure II.40) conduit à l'obtention d'un spectre de masse qui n'est pas différent de celui observé pour la matrice seule. Le soluté élué dans cette bande n'arrive pas à être ionisé que cela soit en utilisant le mode positif ou le mode négatif. Il ne fournit aucun signal supplémentaire en masse. Ce composé n'est donc pas un acide triterpénique et sa présence n'est révélée que par la séparation en 2^{ème} dimension. Lors de l'analyse de la même résine en TLC-1D, sa présence n'était pas suspectée ni révélée puisque seul le composé associé au spot **3** avait été détecté et identifié comme étant l'acide acétyle boswellique. Seule l'analyse en TLC-2D couplé au MALDI-TOF-MS a permis de révéler cette co-élution.

Un constat semblable peut être établi pour le spot 6 qui co-élue en deuxième dimension avec le spot 4 identifié quant à lui par son spectre de masse comme étant l'acide boswellique. Le composé associé au spot 6 ne s'ionise pas non plus car il doit posséder peu de site de protonation/déprotonation comme c'est le cas des alcools ou des diols triterpéniques. De ce fait, c'est bien la technique séparative TLC 2D qui par sa résolution permet d'apporter une information sur les co-élutions qui ne sont pas mises en évidence lors d'une détection MALDI couplée à la TLC-1D.

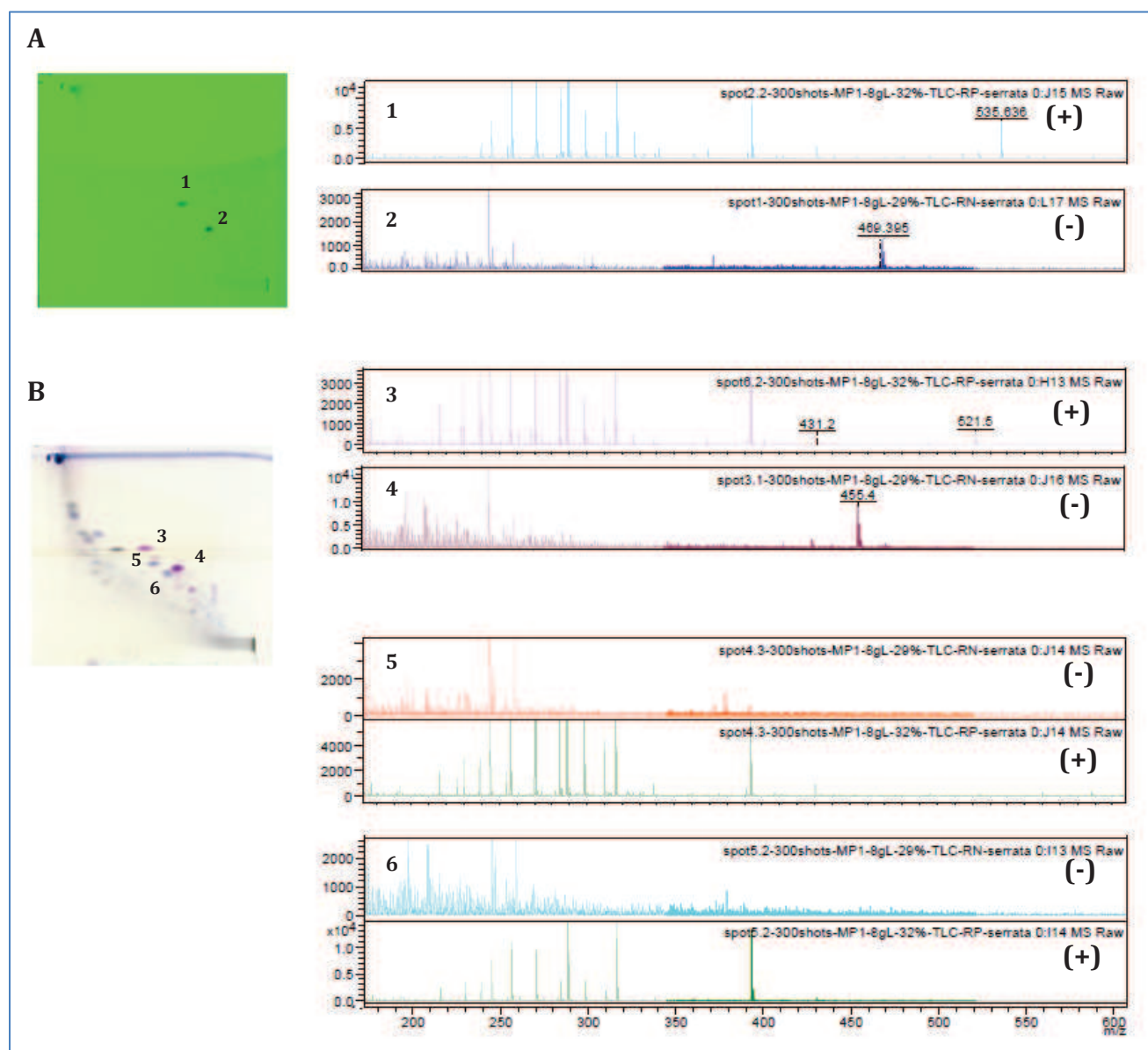


Figure II.40 Plaque TLC-2D obtenus après élution après lecture sous lampe UV à 254nm et après révélation avec l'anisaldéhyde ainsi que les spectres de masse obtenus après analyse MALDI-TOF-MS de la résine *Boswellia serrata*. **Conditions:** Plaque de silice F254, dépôt de 1 μ L de résine à 50 mg.mL⁻¹ et 1 μ L de matrice MP à 8 mg.mL⁻¹, élution sur 8 cm dans les deux dimensions, phase mobile : 1^{ère} dimension : méthanol-chloroforme-hexane (0.5 : 7 : 1, v/v/v), 2^{ème} dimension : toluène-acétate d'éthyle-heptane-acide formique (8 : 2 : 1 : 0.3, v/v/v/v).

Le couplage d'une méthode séparative avec une méthode de détection par spectrométrie de masse permet d'obtenir une identification plus sûre des composés. En effet, l'analyse TLC couplée au MALDI-TOF-MS permet une caractérisation des composés présents en attribuant à chaque rapport frontal un spectre de masse.

Le couplage de la TLC-1D à la spectrométrie de masse a permis l'identification des marqueurs majoritaires présents dans les résines. En revanche, compte tenu de la richesse des extraits, la TLC-1D s'est avérée limitée en termes de résolution.

Afin de d'améliorer la séparation des composés, on s'est intéressé à la TLC-2D et à son couplage à la spectrométrie de masse. Cette méthode a permis la séparation de composés co-élués lors de leurs analyses en une seule dimension. En revanche, le couplage TLC-2D-MALDI-TOF-MS est difficile à mettre en place. En effet, une seule plaque est utilisée pour analyser une seule résine à la fois et repérer les spots sur la plaque est beaucoup plus compliquée.

II.8 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons pu optimiser les conditions d'analyse en TLC des composés triterpéniques. Le choix des conditions de phase mobile ainsi que l'influence de la nature de la phase stationnaire sur la séparation de ces composés ont été déterminés. Les conditions optimisées d'analyse ont été appliquées avec succès pour le screening rapide de plusieurs résines appartenant à des classes de famille différentes ainsi que des résines de la même classe et permettent de distinguer visuellement ces échantillons. Compte tenu de la grande richesse de ces résines, on a développé une méthode en TLC bidimensionnelle (TLC-2D) qui a permis d'améliorer la résolution des spots.

La détermination des composés en TLC-1D et TLC-2D est basée sur la comparaison des rapports frontaux à ceux de standards. Cependant, afin d'avoir une identification structurale des composés nous avons développé le couplage TLC-MALDI-TOF-MS permettant d'analyser directement la plaque TLC après élution. Ce couplage n'avait encore jamais été appliqué à l'étude de molécules de faible masse moléculaire et notamment à celle des composés triterpéniques. Le choix de la matrice ainsi que le mode d'ionisation ont été fixés et ont permis l'ionisation en MALDI des seuls acides triterpéniques. Les composés triterpéniques de type alcool ou diol ne peuvent être détectés dans ces conditions faute de pouvoir être ionisés.

Nous avons montré les potentialités de la TLC ainsi que celles du couplage TLC-MS pour l'analyse de matrices complexes contenant des acides triterpéniques et l'identification de leurs marqueurs majoritaires. Nous avons pu faire correspondre à certains spots un spectre de masse et obtenir ainsi une identification structurale des composés majoritaires présents dans les résines de type Frankincense. Afin de différencier les résines très proches de façon plus exhaustive et caractériser les différences visuelles qu'on a pu observer en TLC sans toutefois pouvoir toutes les mettre en évidence en MALDI-TOF-MS, il est indispensable de s'intéresser à l'ensemble des composés terpéniques y compris les minoritaires et les terpènes les plus volatils. Nous présenterons dans le chapitre suivant les travaux que nous avons réalisés en chromatographie en phase gazeuse pour explorer de façon plus systématique et approfondie la composition terpénique des résines allant des composés monoterpéniques aux composés triterpéniques.

II.9 RÉFÉRENCES

- [1] L.R. Snyder, Classification of the Solvent Properties of Common Liquids, *Journal of Chromatographic Science*, 16 (1978) 223-234.
- [2] M. Paul, G. Brüning, J. Bergmann, J. Jauch, A Thin-layer Chromatography Method for the Identification of Three Different Olibanum Resins (*Boswellia serrata*, *Boswellia papyrifera* and *Boswellia carterii*, respectively, *Boswellia sacra*), *Phytochemical Analysis*, 23 (2012) 184-189.
- [3] O.N. Pozharitskaya, S.A. Ivanova, A.N. Shikov, V.G. Makarov, Separation and quantification of terpenoids of *Boswellia serrata* Roxb. extract by planar chromatography techniques (TLC and AMD), *Journal of Separation Science*, 29 (2006) 2245-2250.
- [4] S.S. Pawar R.K., Singh K.C., Sharma Rajeev KR., Development and validation of HPTLC method for the determination of b-boswellic acid from *Boswellia serrata* Roxb. (exudate), *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4 (2011) 72-76.
- [5] B. Rhourri-Frih, C. West, L. Pasquier, P. André, P. Chaimbault, M. Lafosse, Classification of natural resins by liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry using chemometric analysis, *Journal of Chromatography A*, 1256 (2012) 177-190.
- [6] C. Mathe, G. Culioli, P. Archier, C. Vieillescazes, High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Triterpenoids in Commercial Frankincense, *Chroma*, 60 (2004) 493-499.
- [7] B.S. Katerina Naumoska, Alen Albreht, Irena Vovk, TLC and TLC-MS screening of ursolic, oleanolic and betulinic acids in plant extracts, *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 26 (2013) 125-131.
- [8] M. Martelanc, I. Vovk, B. Simonovska, Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 6662-6670.
- [9] R.R. Alain Jardy, Marcel Caude, *Chromatographies en phases liquide et supercritique* Elsevier Masson 1991.
- [10] M.C. R Rosset, A.Jardy *Chromatographie en phase liquide et supercritique*, 1991.
- [11] L. Rohrschneider, Solvent characterization by gas-liquid partition coefficients of selected solutes, *Analytical Chemistry*, 45 (1973) 1241-1247.
- [12] S. Bruni, V. Guglielmi, Identification of archaeological triterpenic resins by the non-separative techniques FTIR and ¹³C NMR: The case of Pistacia resin (mastic) in comparison with frankincense, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121 (2014) 613-622.
- [13] S. Jäger, H. Trojan, T. Kopp, M. Laszczyk, A. Scheffler, Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts, *Molecules*, 14 (2009) 2016.
- [14] P.B.-. Savary, *Chromatographie Couche Mince Haute Performance. Mise au point du solvant: approche pratique et questions fréquentes* Camag Laboratory.
- [15] P.M. aji, M. Nagy, Contribution to the TLC separation of ursolic and oleanolic acid mixture, *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, (2011).

- [16] M. Wójciak-Kosior, Separation and determination of closely related triterpenic acids by high performance thin-layer chromatography after iodine derivatization, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (2007) 337-340.
- [17] C. Mathe, G. Culioli, P. Archier, C. Vieillescazes, Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1023 (2004) 277-285.
- [18] X.-H. Xu, Q. Su, Z.-H. Zang, Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of *Eriobotrya japonica* Lindl, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2 (2012) 238-240.
- [19] Ł. Cieśla, M. Waksmundzka-Hajnos, Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 1035-1052.
- [20] S.V. Hoffmann E., *Spectrométrie de masse*, 3 ed.2005.
- [21] S.J. Fuchs B, Recent developments of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of apolar compounds., *Curr Org Chem* 13 (2009) 1664-1681.
- [22] B. Fuchs, J. Schiller, R. Süß, M. Schürenberg, D. Suckau, A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (2007) 827-834.
- [23] J. Schiller, R. Süß, J. Arnhold, B. Fuchs, J. Leßig, M. Müller, M. Petković, H. Spalteholz, O. Zschörnig, K. Arnold, Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research, *Progress in Lipid Research*, 43 (2004) 449-488.
- [24] A. Salwinski, Development of novel mass spectrometry-based approaches for searching for low-mass tyrosinase inhibitors in complex mixtures, *University of Orléans*, 2014.
- [25] B. Fuchs, R. Süß, A. Nimptsch, J. Schiller, MALDI-TOF-MS Directly Combined with TLC: A Review of the Current State, *Chroma*, 69 (2008) 95-105.
- [26] J.S. Beate Fuchs, Rosmarie Süß, Ariane Nimptsch, Martin Schürenberg, and Detlev Suckau, Capabilities and Disadvantages of Combined Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry(MALDI-TOF MS) and High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC): Analysis of Egg Yolk Lipids, *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 22 (2009) 35-42.
- [27] T. Kowalska, M. Sajewicz, J. Sherma, *Planar Chromatography - Mass Spectrometry*, CRC Press2015.
- [28] G. Siuzdak, *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Elsevier Science1996.
- [29] A. Moussaieff, R. Mechoulam, Boswellia resin: from religious ceremonies to medical uses; a review of in-vitro, in-vivo and clinical trials, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61 (2009) 1281-1293.
- [30] U. Knaus, H. Wagner, Effects of Boswellic acid of *Boswellia serrata* and other triterpenic acids on the complement system, *Phytomedicine*, 3 (1996) 77-81.

Chapitre III DEVELOPPEMENT D'UNE
METHODOLOGIE GC-MS POUR L'ANALYSE
SIMULTANEE DES MONO-, SESQUI-, DI-ET
TRITERPENOÏDES PRESENTS DANS LES
RESINES VEGETALES

III.1 INTRODUCTION

Le couplage de la chromatographie sur couche mince (TLC) à la spectrométrie de masse avec le MALDI-TOF-MS, nous a permis dans un premier temps d'analyser les acides triterpéniques présents majoritairement dans les résines végétales et de les caractériser.

Néanmoins, comme nous l'avons présenté dans le chapitre I, les résines végétales sont constituées de monoterpènes, sesquiterpènes di et triterpènes. Certains de ces composés, comme les monoterpènes sont des marqueurs minoritaires. Pour avoir une caractérisation plus précise des résines, il est donc indispensable de pouvoir analyser et identifier ces derniers. La méthode d'analyse qui s'est imposée est donc la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. En effet, cette technique est largement utilisée pour l'analyse de composés terpénoïdes volatils et semi-volatils mais à notre connaissance, n'a jamais été mise en œuvre pour une analyse exhaustive de composés terpénoïdes allant des monoterpènes aux triterpènes. Dans ce chapitre nous présenterons les développements analytiques que nous avons effectués pour caractériser et identifier en une seule analyse, l'ensemble des terpènes présents dans les résines végétales.

Comme on a pu le voir dans le chapitre I, les terpènes constituent un vaste ensemble de métabolismes secondaires possédant une grande diversité structurale ainsi qu'une large gamme de polarité et donc de volatilité. La séparation de tous ces composés en une seule analyse s'avère complexe. Nous avons donc mis en œuvre l'approche décrite ci-dessous.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressées à l'analyse des triterpénoïdes par GC. Ces composés renfermant dans leur structure chimique plusieurs fonctionnalités polaires de type alcools, diols et/ou acides carboxyliques sont très peu volatils. Une analyse de ces composés par GC n'est donc possible que si une étape préalable de dérivation est effectuée pour les rendre plus volatils et moins polaires. Etant donné la différence de réactivité de ces fonctions vis-à-vis d'agents de dérivation, l'optimisation de cette étape s'est avérée indispensable et constitue donc la première partie de ce chapitre.

Puis, les conditions de séparations en GC des monoterpénoïdes et des di- et triterpénoïdes dérivés ont été étudiées. Cette étude a démontré l'importance du type d'injecteur et un plan d'expérience a permis d'optimiser le choix de la phase stationnaire pour permettre l'analyse de tous les terpènes.

Enfin, nous avons appliqué ces résultats à l'analyse de résines végétales par GC-MS ce qui nous a conduits à :

- (i) Evaluer les techniques d'extraction des terpénoïdes à partir du matériel végétal en vue de leur analyse
- (ii) Identifier les principaux marqueurs minoritaires et majoritaires de ces résines en utilisant deux techniques d'ionisation en spectrométrie de masse : l'ionisation électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI).

III.2 OPTIMISATION DU PROTOCOLE DE DERIVATION DES TRITERPENES PENTACYCLIQUES

Comme on a pu le voir dans le chapitre I, la famille des triterpènes dont la structure est composée de 30 atomes de carbone possède une très grande diversité structurale dépendante de l'agencement des différents cycles et des groupements fonctionnels présents sur les cycles.

Cette première étude s'est concentrée sur les triterpènes pentacycliques appartenant à la famille des oléanane, ursane et lupane qui sont non seulement les triterpènes les plus fréquemment rencontrés dans le monde végétal mais aussi plus spécifiquement dans les résines. Pour exemple, les acides boswelliques, marqueurs spécifiques des résines Frankincense ont une structure de type oléanane.

Ces composés sont agencés en 5 cycles à 6 atomes de carbone avec la présence de groupements fonctionnels variés (alcools, diols, acides carboxyliques). Les structures sont représentées figure III.1. D'après cette figure, on peut se rendre compte que ces composés sont peu volatils et que la présence de groupement fonctionnels polaires va rendre leur analyse par GC difficile. Par conséquent, une étape de dérivation est nécessaire et implique le remplacement des hydrogènes labiles des fonctions alcools et acides carboxyliques par un groupement apolaire, permettant d'augmenter la volatilité de ces composés et de réduire leur polarité.

Il existe quatre types de réaction de dérivation précédant une analyse en GC : la silylation, l'acylation, l'alkylation et l'estérification.

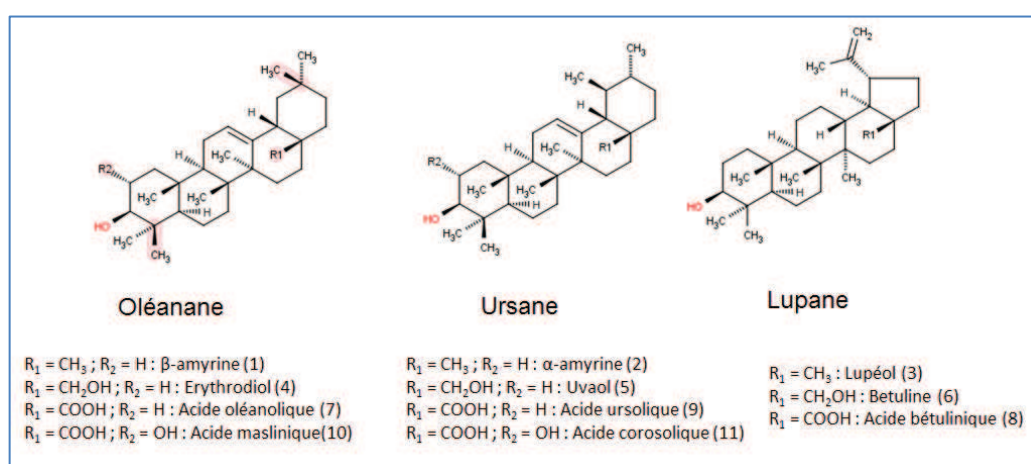


Figure III.1 Structure des triterpènes pentacycliques appartenant aux 3 familles : oléanane, ursane et lupane.

Comme on a pu le voir dans le chapitre I, l'analyse des triterpènes en GC utilise soit une réaction de dérivation d'alkylation [1] ou de silylation [2-4]. Cette dernière est la plus couramment employée, elle fait appel à des agents dérivant tel que le BSTFA (N,O-bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide), le HMDS (hexaméthylidisilazane) ou encore plus rarement le MSTFA (N,O-bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide) qui est plutôt adapté aux composés amides et amines secondaires [5].

Ainsi, on a répertorié dans le tableau III.1 une liste non exhaustive des différents protocoles de dérivation utilisés pour l'analyse des triterpènes pentacycliques dans une large variété de matrices végétales.

Tableau III.1 Liste non exhaustive de protocoles de dérivation appliqués à l'analyse des triterpènes pentacycliques.

Matrice	Famille	Groupe chimique	Agent dérivant	Ratio de l'agent dérivant par rapport au TMCS	Volume du solvant de la réaction	Température de la réaction (°C)	Temps de réaction (min)	REF
Complément alimentaire	Ursane Oléanane Lupane	Acide	BSTFA	99 :1 (v/v)	100 µL DMF	90°C	60 min	[6]
Lamiaceae	Ursane Oléanane	Acide	BSTFA	99 :1 (v/v)	200 µL pyridine	80°C	120 min	[7]
Lamiacea	Ursane Oléanane Lupane	Acide	MSTFA	-	50 µL pyridine	70°C	120 min	[8]
Argan (fruit et feuille)	Ursane Oléanane	Diol, Acide	HMDS	3 :1 (v/v)	9 mL pyridine	80° C	120 min	[9]
Olivier (fruit et feuille)	Ursane Oléanane Lupane	Diol, Acide	HMDS	3 :1 (v/v)	9 mL pyridine	80°C	120 min	[5]
Quinoa	Ursane Oléanane	Alcool, Diol, Acide	BSTFA	99 :1 (v/v)	20 µL pyridine	Température ambiante	1-5 min	[10]
Olivier (feuille)	Ursane Oléanane	Diol, Acide	BSTFA	98 :2 (v/v)	250 µL pyridine	80°C	120 min	[11]
Ginseng	Oléanane Lupane	Alcool	HMDS	2 :1(v/v)	500 µL pyridine	60°C	30-60 min	[12]

Tout d'abord, on constate qu'il n'existe pas dans la littérature de protocole permettant de dériver tous les groupements fonctionnels des triterpènes de la famille des ursane, oléanane et lupane en une seule analyse. Par exemple dans la référence [5], le protocole de dérivation a été appliqué uniquement aux diols (érythrodiol, uvaol) et aux acides carboxyliques (acides ursolique, oléanolique et maslinique) de structures oléanane, lupane et ursane. De même pour la référence [12] où uniquement les alcools de la famille des oléananes et lupanes sont étudiés.

On remarque également que les conditions décrites sont très variées d'une référence à l'autre en termes d'agent de dérivation et de catalyseur, de solvant, de température et de durée de réaction. Le besoin d'optimisation de l'étape de dérivation pour l'ensemble des triterpènes pentacycliques est bien réel et cette démarche est indispensable en préambule pour établir des conditions standard d'analyse contrôlée et répétable du matériel végétal.

Au vu du nombre de paramètres à prendre en considération, la stratégie que nous avons appliquée pour optimiser la réaction de dérivation est basée sur l'utilisation de la méthode des plans d'expérience. Elle s'inscrit dans le contexte actuel de développement de méthodes à la fois rapides, efficaces et robustes.

III.2.1 METHODOLOGIE MISE EN PLACE

La technique des plans d'expériences est basée sur l'élaboration d'une série de tests expérimentaux qui consiste à faire varier simultanément les niveaux de un à plusieurs facteurs à chaque essai. Cette technique permet de réduire le nombre d'essais par rapport à une méthodologie d'optimisation classique où l'on doit faire varier les paramètres les uns après les autres. La recherche expérimentale planifiée permet ainsi d'augmenter le nombre de renseignements obtenus sans altérer la qualité des résultats. L'intérêt de cette méthodologie est également l'étude d'un grand nombre de facteurs, la détection des interactions entre facteurs et la modélisation des réponses étudiées.

La méthodologie se base sur plusieurs étapes : choix des facteurs et des réponses, criblage des facteurs, modélisation, choix de l'optimum par les fonctions de Derringer en cas de plusieurs réponses étudiées et enfin validation du modèle.

- **CHOIX DES FACTEURS ET DES REPONSES**

Cette première étape dans la conduite du plan d'expérience est primordiale. Elle exige de recenser l'ensemble des paramètres pouvant influencer les réponses et de fixer leur domaine d'étude (valeur haute et valeur basse). Une étude préliminaire s'avère nécessaire pour dégager les paramètres expérimentaux qui serviront ensuite à construire le plan d'expériences.

- **CRIBLAGE DES FACTEURS**

Parmi les facteurs recensés, l'étape de criblage permet de définir ceux qui ont une réponse significative sur la variation de la réponse. Il s'agit d'une simplification implicite du problème. Pour étudier l'influence des facteurs sur la réponse et choisir ceux qui sont significatifs (intervalle de confiance de 95%), nous avons choisi de travailler avec un plan factoriel à deux

niveaux. Pour n facteurs étudiés à 2 niveaux, 2^n expériences sont réalisées. Cette démarche se base sur un modèle mathématique qui exprime la fonction réponse Y en fonction des facteurs X :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_n X_n$$

- Y est la réponse
- β_0 est la valeur de la réponse au centre du domaine
- β_i est l'effet du facteur i
- X_i est le niveau attribué au facteur i

Les expériences ont été réalisées dans un ordre aléatoire afin de minimiser des contraintes extérieures inconnues.

• **MODELISATION**

La modélisation se basant sur les surfaces de réponse permet d'obtenir une visualisation d'une réponse optimum vis-à-vis des facteurs étudiés. Elle sert de base à la recherche des conditions optimales. A l'aide du logiciel NemrodW® (LPRAI, Marseille, France), un modèle composite centré utilisant une fonction polynomiale d'ordre 2 est mis en place. Ce modèle se base sur 2^n expériences avec l'ajout de 6 points axiaux et 6 points au centre. Il est de la forme suivante :

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^n \beta_j x_j + \sum_{j=1}^n \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{0 < j < k \leq n} \beta_{jk} x_j x_k$$

• **FONCTION DE DERRINGER**

Si la méthode des plans d'expérience se base sur l'étude de plusieurs réponses, la fonction de désirabilité de Derringer permet de trouver le meilleur compromis [13]. Une fonction de désirabilité individuelle (croissante ou décroissante) est associée à chaque réponse. Cette fonction (d_j) varie de 0 à 1. Par la suite, les fonctions individuelles de désirabilité (d_j) sont combinées en utilisant une moyenne géométrique ce qui permet d'obtenir une désirabilité globale D.

$$D = \left(\prod_{j=1}^n d_j \right)^{1/n}$$

- D est la fonction de désirabilité globale
- d_j est la fonction de désirabilité
- n est le nombre de réponses étudiées

III.2.2 DETERMINATION DES FACTEURS EXPERIMENTAUX INFLUENTS

Pour cette étude préliminaire, nous avons retenu comme variables quatre paramètres expérimentaux : la température, la durée de réaction, le pourcentage de solvant (pyridine) ainsi que la proportion de l'agent de dérivation (BSTFA) par rapport au catalyseur TMCS (triméthylchlorosilane). En effet, nous avons sélectionné le BSTFA car cet agent de dérivation présente l'avantage de ne pas former de précipité comme c'est le cas avec le HMDS (chlorure de pyridinium) lors de la réaction. Nous avons ainsi réalisé un premier criblage de ces 4 paramètres en utilisant un plan factoriel à 2 niveaux (-1, 0, +1).

III.2.2.1 CHOIX DES VALEURS EXPERIMENTALES DES 4 VARIABLES DU PLAN FACTORIEL 2⁴ ET DES REPONSES

D'après notre étude bibliographique, la durée de réaction varie principalement entre 30 et 120 min et la température entre 30 et 90°C. Il a été décidé de fixer les limites basses à 30 min pour la durée de réaction et à 30°C pour la température et les limites hautes respectivement à 120 min et 90°C. Pour la proportion de pyridine dans le mélange, les limites haute et basse ont été fixées à 80% et 0% respectivement. Les proportions de BSTFA et de TMCS ont été ensuite définies en complément de celle de la pyridine et de telle manière que la proportion de BSTFA dans le mélange soit toujours supérieure à celle du TMCS. Ainsi les 2 limites haute et basse pour la proportion relative du BSTFA par rapport au TMCS varient de 100% à 50% dans le mélange. L'ensemble des valeurs fixées pour ces paramètres sont répertoriées dans le tableau III.2.

Tableau III.2 Matrice expérimentale pour le plan factoriel 2⁴ mis en place pour le criblage préliminaire des facteurs expérimentaux.
Les niveaux -1, 0 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur, le centre, et le niveau supérieur du domaine d'étude.

Niveau	Temperature (°C)	Temps de la réaction de dérivation (min)	Pourcentage de pyridine (%)	Proportion relative du BSTFA par rapport au TMCS (%)
-1	30	30	0	50
0	60	75	40	75
1	90	120	80	100

Cette étape préliminaire a été menée à partir d'un mélange standard de 5 composés comprenant le cholestérol comme standard interne et 4 composés représentatifs des 3 familles chimiques de triterpènes pentacycliques (lupéol, bétuline, acide ursolique et acide maslinique). Chacun de ces composés renferme des fonctions chimiques spécifiques (alcool, diol et acide carboxylique). Les réponses qui ont permis d'évaluer le rendement de la réaction de dérivation des 4 solutés modèles ont été les aires relatives de leurs pics chromatographiques exprimées par rapport à l'aire du pic du standard interne. Toutes les expériences ont été menées dans un ordre aléatoire

III.2.2.2 CRIBLAGE DES FACTEURS INFLUENTS

L'étape de criblage ou de screening permet de sélectionner parmi les facteurs définis précédemment, les éléments influents.

Nombre de facteurs : $n = 4$ Nombre de niveaux : $m = 2$ Nombre d'expériences : $2^4 = 16$ expériences
--

Les résultats du plan factoriel complet à deux niveaux sont représentés sous forme de diagrammes en bâtons où la surface de chaque bâton est proportionnelle à l'influence de ce facteur sur la réponse. Sur le diagramme, les limites de confiance indiquées par deux droites en pointillés correspondent à un seuil de signification fixé à 95% de confiance. Si le bâton dépasse cette limite, le facteur est considéré comme significatif.

D'après la figure III.2, on constate qu'en fonction du groupement fonctionnel présent sur la structure du triterpène, l'influence des paramètres est différente. Pour les triterpènes de type alcool (lupéol), diol (bétuline) et acide avec un groupement hydroxyle (acide ursolique), les paramètres significatifs sont la durée de la réaction, le pourcentage en pyridine et la concentration en agent dérivant. En revanche, on observe pour les triterpènes ayant une fonction acide et deux groupements hydroxyle (acide maslinique), un comportement différent des autres composés. Pour ce type de composés, le seul facteur significatif est le pourcentage en pyridine. La pyridine apparaît ainsi comme le facteur le plus influent pour l'ensemble des solutés modèle en jouant un rôle clé dans la réaction de dérivation. Ceci peut aisément s'expliquer par le fait que la pyridine est d'une part le solvant aprotique indispensable pour solubiliser l'agent de dérivation et les formes dérivés ou non dérivés des solutés et d'autre part, par son caractère de base faible, cette molécule peut se combiner avec le proton du nucléophile facilitant ainsi sa dérivation. Le mécanisme de la réaction est détaillé dans le chapitre I.

A l'opposé de la variable « pyridine » le facteur « température » apparaît pour l'ensemble des solutés, comme un facteur sans effet significatif sur le rendement de la réaction de dérivation.

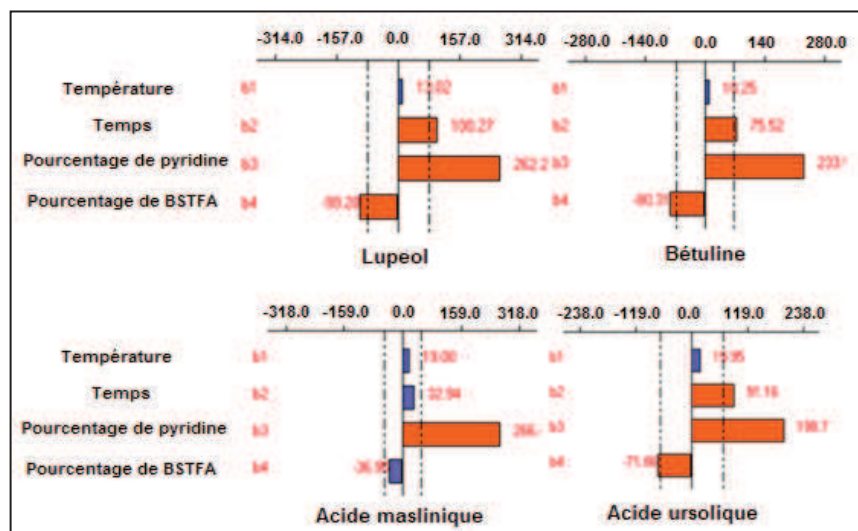


Figure III.2 Etude graphique des effets sur les différentes réponses : aire du lupéol, de la bétuline et des acides maslinique et ursolique.

En nous appuyant sur ces résultats préliminaires, 3 facteurs expérimentaux (le temps de réaction, le pourcentage de pyridine et le pourcentage relatif de BSTFA par rapport au TMCS) ont été retenus par la suite pour l'étude plus approfondie réalisée selon un plan composite centré. Pour toutes ces manipulations complémentaires, la valeur de la température du mélange a été fixée à 30°C, valeur la plus basse qui puisse être contrôlée de façon aisée sans être impactée par les variations de température ambiante du laboratoire.

III.2.3 OPTIMISATION PAR LA METHODE DU PLAN COMPOSITE CENTRE

III.2.3.1 ETABLISSEMENT DU PLAN COMPOSITE CENTRE

Les interactions entre les trois paramètres expérimentaux retenus : la durée de la réaction, le pourcentage de pyridine ainsi que le pourcentage de BSTFA par rapport au TMCS ont été ensuite plus spécifiquement étudiées en mettant en place un modèle polynomial d'ordre 2 dont les caractéristiques sont les suivantes :

Nombre de facteurs : n = 3
Nombre de niveaux : m = 2
Forme du domaine : cubique
Nombre d'expériences : $2^3 + 6$ points axiaux + 6 points au centre = 20 expériences

Le tableau III.3 présente la matrice expérimentale du plan d'expérience factoriel complet à deux niveaux qui a été appliquée. Les 20 expériences ont été réalisées dans un ordre aléatoire.

Tableau III.3 Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les trois facteurs étudiés : durée de la réaction, pourcentage en pyridine et pourcentage de BSTFA par rapport au TMCS. Les niveaux -1, 0 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur, le centre, et le niveau supérieur du domaine d'étude.

Numéro de l'expérience	Analyse aléatoire	Durée de la réaction (min)	Pourcentage de pyridine (%) en volume	proportions relatives BSTFA/TMCS (%) en volume
1	10	30	0	50
2	3	120	0	50
3	13	30	80	50
4	11	120	80	50
5	14	30	0	100
6	5	120	0	100
7	2	30	80	100
8	8	120	80	100
9	1	30	40	75
10	9	120	40	75
11	4	75	0	75
12	17	75	80	75
13	15	75	40	50
14	6	75	40	100
15	18	75	40	75
16	7	75	40	75
17	12	75	40	75
18	19	75	40	75
19	20	75	40	75
20	16	75	40	75

Le domaine expérimental étant défini à partir de la variation simultanée de trois facteurs, il est difficile de restituer de façon simple la variation de la réponse (effet des trois paramètres sur les valeurs des aires des pics chromatographiques). La visualisation de l'optimum sous forme graphique peut se faire en fixant un niveau donné à l'un des 3 facteurs et en reportant la variation des 2 autres facteurs de deux manières complémentaires soit en 2 dimensions soit en 3 dimensions tel que représenté sur la figure III.3. Les espaces de représentation des surfaces de réponse sont alors définis à partir de la variation de deux facteurs, le troisième étant fixé à une valeur constante.

Pour la représentation en 2 dimensions, l'analyse graphique du modèle consiste à restituer l'équation de ce dernier sous forme de courbes iso-réponses.

Dans la représentation en 3 dimensions, le plan horizontal de la figure matérialise le domaine de variation de deux facteurs et l'axe vertical matérialise la variation de la surface de réponse à partir du modèle.

Ainsi les graphiques 3D présentés en figure III.3, sont tous associés à une valeur constante du paramètre « *proportion relative du BSTFA par rapport au TMCS* ». Cette valeur est fixée à 75 % correspondant à la valeur centrée du plan composite.

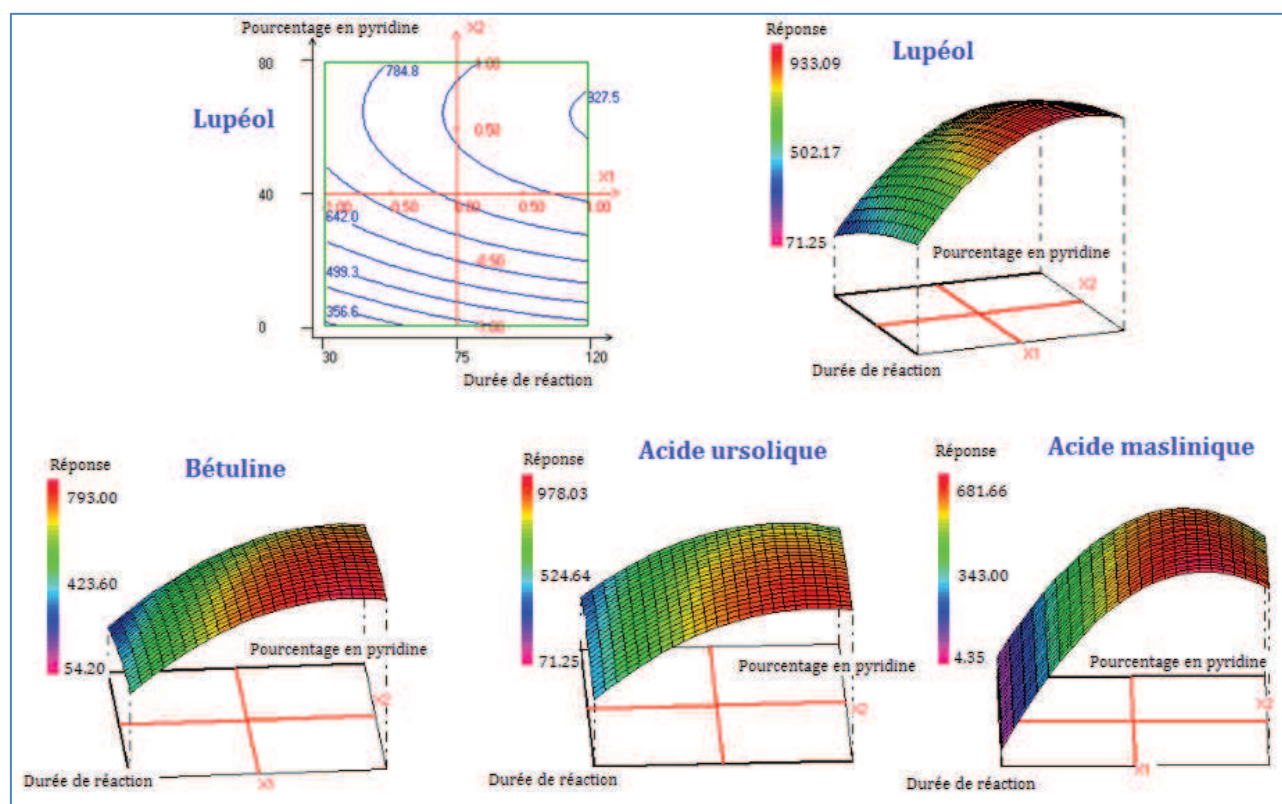


Figure III.3 Courbe iso-réponse du lupéol et surface de réponse pour le lupéol, la bétuline et les acides ursolique et maslinique.

Variation de la durée de réaction (20 – 120 min) et du pourcentage de pyridine (0 – 80%) et la proportion de BSTFA par rapport au TMCS a été fixée à 75%.

L'effet du temps de la réaction (30-120 min) et du pourcentage de pyridine (0-80%) sur les intensités d'aires de pics représentés figure III.3 met clairement en évidence que pour tous les solutés testés, il existe une zone de valeurs plutôt élevées (zone en rouge sur les diagrammes 3D) pour ces paramètres qui conduit à un optimum pour le rendement de la réaction de dérivation. Toutefois, la valeur absolue de chaque paramètre à l'optimum apparaît spécifique à chaque soluté ce qui rend difficile l'exploitation directe de tous ces diagrammes. Pour traiter l'ensemble des résultats et trouver le meilleur compromis pour l'optimum des 3 facteurs, nous avons fait appel à la fonction de désirabilité de Derringer.

III.2.3.2 FONCTION DE DERRINGER

La dérivation est optimale lorsque l'aire du pic est grande. De ce fait nous avons attribué à chaque réponse une fonction linéaire croissante (d) avec 0 assimilé à la valeur basse (non désirable) et +1 pour la valeur haute (désirable). L'ensemble des fonctions linéaires correspondant à chacune des réponses a été combiné en une fonction de désirabilité globale (D).

On obtient une valeur maximale de la fonction de Derringer pour $D = 0.91$ correspondant aux conditions optimales (voir tableau III.4). Ce qui correspond en valeur codée à 0.99 en temps, 0.62 en pourcentage de pyridine et -0.50 pour le rapport BSTFA/TMCS. A partir de ces valeurs codées, on peut déterminer les paramètres optimisés pour la réaction de dérivation : une durée de réaction de 2h, une température de réaction de 30°C et l'ajout de 250 μ L d'agent dérivant constitué de BSFTA, TMCS et pyridine dans les proportions (22 :13 :65 v/v/v).

Pour obtenir ces valeurs, 50 μ L de chaque standard à 1000 mg.L⁻¹ ont été évaporés à sec puis repris dans les 250 μ L d'agent dérivant cela correspond à 50 μ g de chaque standard. Les 250 μ L d'agent dérivant dérive donc 5x50 μ g du mélange des 5 standards.

Tableau III.4 Valeur optimale obtenue pour chaque réponse ainsi que désirabilité optimale correspondante.

Réponse	Valeur optimale (en aire de pic)	Désirabilité optimale (d)
Lupéol	737.72	0.76
Betuline	793.69	0.99
Acide maslinique	667.08	1.00
Acide ursolique	647.26	0.95
Désirabilité globale optimale $D = 0.91$		

III.2.3.3 VALIDATION DU MODELE

Avant de pouvoir utiliser les conditions optimisées pour la réaction de dérivation, il faut s'assurer de la validité du modèle. Pour cela, nous nous sommes basées tout d'abord sur une analyse de la variance et par la suite sur l'étude de l'adéquation entre les variables expérimentales et celles calculées par la modèle.

- ANALYSE DE LA VARIANCE**

L'analyse de la variance (ANOVA) permet d'avoir une idée sur la relation entre les variables expliquées et résiduelles, en tenant compte des degrés de liberté. Ce test permet de savoir si l'équation établit une relation entre la variation des facteurs et la réponse ou s'il s'agit d'une fluctuation aléatoire de la réponse. Le modèle ANOVA est estimé à partir des N= 20 expériences du plan composite centré et a été déterminé directement par le logiciel NemrodW®.

Le coefficient de détermination R^2 ajusté permet de juger de la qualité descriptive du modèle. Plus sa valeur est proche de 1 (100%) et plus la qualité descriptive du modèle est satisfaisante.

D'après le tableau III.5, on a pu évalué R^2 ajusté qui varie entre 0.772 (acide ursolique) et 0.903 (acide maslinique). L'écart du R^2 à la valeur optimale de 1 s'explique par la complexité du modèle (3 facteurs étudiés).

Tableau III.5 Evaluation de l'adéquation du modèle pour les quatre réponses : aires du lupéol, bétuline, acide maslinique et acide ursolique.

	Lupéol	Bétuline	Acide maslinique	Acide ursolique
Ecart type de la réponse	144.589	123.724	90.836	124.932
R ²	0.861	0.864	0.929	0.833
R ² ajusté	0.810	0.814	0.903	0.772
R ² prédit	0.705	0.712	0.849	0.646
Nombre de degré de liberté	11	11	11	11

• **EVALUATION DE L'ADEQUATION ENTRE LES REPONSES EXPERIMENTALES ET CELLES PREDITES PAR LE MODELE**

L'étude des coefficients du modèle peut donner des indications importantes. Ainsi, l'évaluation de l'adéquation entre la réponse expérimentale et la réponse calculée permet de porter un jugement sur la qualité descriptive du modèle. Plus ces deux valeurs sont proches et plus la qualité descriptive du modèle est bonne.

Pour confirmer le modèle, le mélange des 4 standards et de l'étalon interne a été à nouveau dérivé en fixant pour les 3 paramètres influents, les valeurs optimales suggérées par le modèle plan composite centré et l'expérience a été reconduite 5 fois. Les valeurs expérimentales obtenues pour les aires de pics des 4 solutés et les valeurs prédites par le modèle sont reportées dans le tableau III.6.

On constate pour les 4 solutés, que les valeurs absolues des aires calculées et des aires expérimentales sont très proches avec des valeurs de déviation standard comprises entre 2% (acide ursolique) et 13% (bétuline). Nos résultats permettent de confirmer la validité du modèle.

Tableau III.6 Evaluation de la validité en comparant les aires calculées par le modèle et les aires expérimentales pour chaque soluté.

Composé	Valeur de l'aire calculée par le modèle	Valeur expérimentale de l'aire (<i>n</i> =5)	Taux de recouvrement	Déviation standard (%CV)
Lupéol	738	780 ± 40	105.7%	4%
Bétuline	793	662 ± 30	83.5%	13%
Acide maslinique	667	578 ± 34	86.6%	10%
Acide ursolique	647	630 ± 29	97%	2%

III.2.4 CONTROLE DE LA DERIVATION TOTALE DES SOLUTES

Après avoir déterminé les conditions optimales pour silyler les 4 standards triterpéniques et validé le modèle, il reste à vérifier que la réaction chimique de dérivation est totale (et non pas partielle) et qu'elle conduit bien à l'obtention d'un seul produit dérivé par soluté. Ce contrôle a été effectué en analysant en GC-MS, un mélange de 11 standards triterpéniques après dérivation dans les conditions optimales définies. L'utilisation du détecteur massique a permis d'associer une masse à chaque pic chromatographique observé et d'accéder ainsi au degré de silylation de chacun des composés.

Les 11 standards triterpéniques sélectionnés pour l'étude peuvent être répartis en sous-groupes de similitude selon le nombre et la nature des groupements polaires qu'ils contiennent : sous-groupe I (β -amyrine, α -amyrine et lupéol) caractérisé par la présence d'une fonction alcool dans la structure; sous-groupe II (érythrodiol, uvaol et bétuline) caractérisé par la présence de deux fonctions alcool; sous-groupe III (acide oléanolique, acide bétulinique et acide ursolique) caractérisé par la présence d'une fonction acide et une fonction alcool et sous-groupe IV (acide maslinique et acide corosolique) regroupant les composés caractérisés par la présence d'une fonction acide et de deux fonctions alcool.

Dans un premier temps, nous avons analysé ce mélange de 11 standards en GC-MS en mode d'ionisation électronique (voir annexe D pour les paramètres expérimentaux d'analyse). Le chromatogramme associé à cette première analyse est présenté figure III.4. 11 pics chromatographiques différents sans dédoublement sont détectés. Cette première observation nous montre que la réaction de dérivation conduit à l'obtention pour chaque composé d'un seul produit de dérivation.

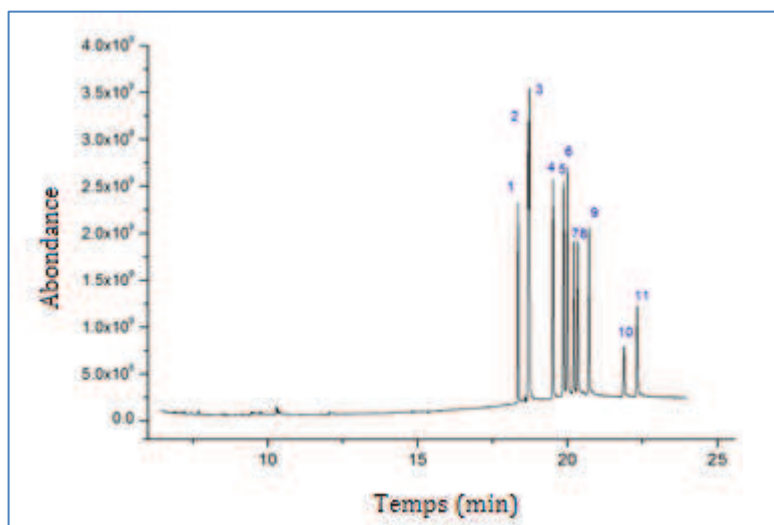


Figure III.4 Analyse en GC-MS (mode d'ionisation électronique) d'un mélange de 11 standards terpéniques après dérivation.

Ordre d'élution : β -amyrine (1), α -amyrine (2), lupéol (3), érythrodiol (4), uvaol (5), bétuline (6), acide oléanolique (7), acide bétulinique (8), acide ursolique (9), acide maslinique (10) et acide corosolique (11).

Conditions : colonne DB-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), gaz vecteur : Hydrogène avec un débit de 1.2 mL.min⁻¹.
Températures : injecteur : 300°C, four : 200°C pendant 1 min, de 200°C à 290°C (25°C/min) et de 290°C à 330°C (10°C/min) et à 330°C pendant 1 minute.

Afin de confirmer ce premier résultat et de caractériser pour chaque composé son degré de silylation (total ou partiel), nous avons analysé le même mélange de 11 standards triterpéniques en GC-MS en utilisant l'ionisation chimique (CI) en mode positif avec le méthane comme gaz réactant. Comme on a pu déjà l'évoquer dans le chapitre I, le mode d'ionisation CI est en effet réputé plus doux que le mode d'ionisation électronique et produit principalement des $[MH]^+$ et $[M+\text{adduit}+H]^+$ permettant ainsi d'accéder à la masse moléculaire de chaque composé détecté. Dans le cas où la dérivation ne serait pas totale (silylation préférentielle d'un seul groupement hydroxyle par exemple), il sera donc possible de le mettre en évidence.

D'après la figure III.5, pour l'acide maslinique on retrouve lors de l'analyse en CI l'ion moléculaire m/z 687 qui correspond à $[M+H-H_2]^+$ avec M la masse du composé totalement silylé. Le spectre de masse est celui du composé complètement silylé avec une dérivation de l'hydrogène labile du groupement acide et des deux groupements hydroxyle. Pour l'acide oléanolique possédant une fonction acide et une seule fonction hydroxyle, on observe l'ion moléculaire m/z 599 correspondant à la masse du produit complètement silylé. Pour l'alcool (lupéol) et le diol (uvaol) ce sont les ions moléculaires de m/z de 497 et 585 respectivement qui sont observés montrant la dérivation totale des fonctions alcools.

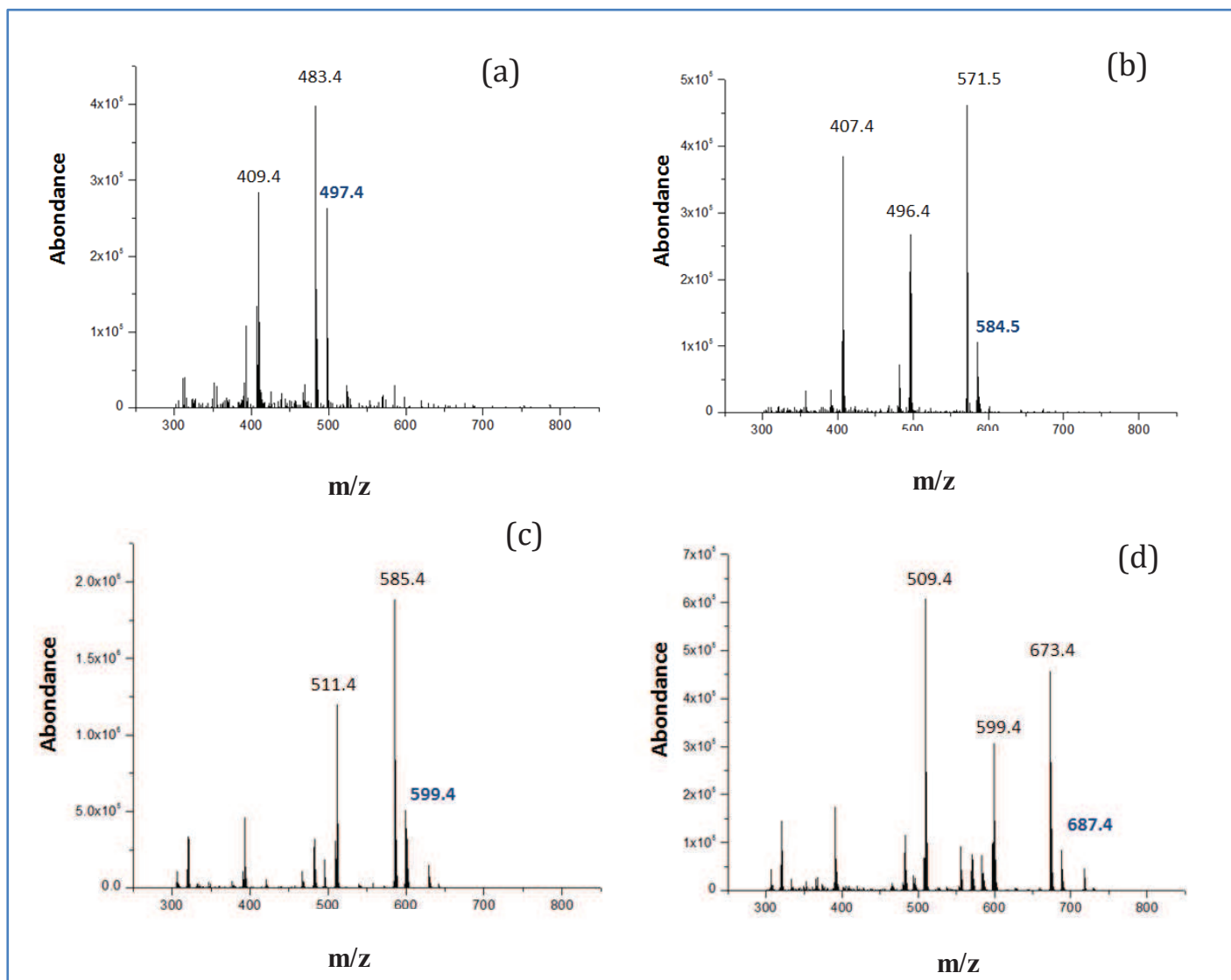


Figure III.5 Spectres de masse obtenus en mode d'ionisation chimique (CI) pour le lupéol (a), l'uvaol (b), l'acide oléanolique (c) et acide maslinique (d).
Conditions : Acquisition en mode full scan avec une température de ligne de transfert de 300°C et une température de source de 225°C utilisant comme gaz réactant le méthane en mode positif.

Le tableau III.7 regroupe l'ensemble des masses molaires des 11 standards terpéniques silylés observées sur le spectre de masse en mode d'ionisation chimique (CI).

Tableau III.7 Masses molaires des 11 standards silylés et ion moléculaire obtenu lors de l'ionisation chimique.
La masse moléculaire du groupement silylé (-TMS) est de 73 g.mol⁻¹.

Fonction chimique	Composés	Masse molaire du composé (g.mol ⁻¹)	Masse molaire du composé silylé (g.mol ⁻¹)	Ionisation chimique en mode positif CI
Alcool	β-amyrine	426	498	497 [M+H-H ₂] ⁺
	α-amyrine	426	498	497 [M+H-H ₂] ⁺
	Lupéol	426	498	497 [M+H-H ₂] ⁺
Diol	Érythrodiol	442	586	585 [M+H-H ₂] ⁺
	Uvaol	442	586	585 [M+H-H ₂] ⁺
	Bétuline	442	586	585 [M+H-H ₂] ⁺
Acide + 1 fonction hydroxyle	acide oléanolique	456	600	599 [M+H-H ₂] ⁺
	acide bétulinique	456	600	599 [M+H-H ₂] ⁺
	acide ursolique	456	600	599 [M+H-H ₂] ⁺
Acide + 2 fonctions hydroxyles	acide maslinique	472	688	687 [M+H-H ₂] ⁺
	acide corosolique	472	688	687 [M+H-H ₂] ⁺

Ainsi ces résultats confirment que toutes les fonctions polaires (alcool et acide), quel que soit le sous-groupe d'appartenance des composés terpéniques, sont totalement silylées en mélange dans les conditions optimisées de la réaction de dérivation.

III.2.5 CONCLUSION

L'objectif fixé à cette première partie d'étude était le développement d'une procédure unique convenant à la dérivation d'un ensemble non volatil de triterpénoïdes pentacycliques de type ursane, oléane et lupane présents simultanément en mélange. La démarche méthodologique que nous avons adoptée pour atteindre ce but a été basée sur l'utilisation des plans factoriels permettant de mettre en évidence de façon simple et rapide l'existence d'interactions entre les facteurs expérimentaux agissant sur les conditions de silylation.

Après validation du modèle établi à partir de 4 standards représentatifs, les conditions optimales que nous proposons pour la dérivation des triterpénoïdes sont les suivantes : une durée de réaction de 2h, une température de réaction de 30°C et l'ajout de 250 µL d'agent dérivant constitué de BSFTA, TMCS et pyridine dans les proportions (22 :13 :65 v/v/v).

Ces conditions optimisées de dérivation appliquées à l'analyse d'un mélange standard de 11 triperpénoïdes (dérivation globalement d'une prise d'essai de terpénoïdes égale à 550 µg) ont conduit à confirmer qu'elles conviennent bien à la silylation totale des fonctions polaires acides et alcools présentes dans la structure des solutés. Chaque soluté est détecté dans le mélange sous la forme d'un seul produit de dérivation.

Cette étude a fait l'objet d'une première publication parue en 2016 dans le journal Talanta.

Talanta 147 (2016) 35–43



Optimization of the derivatization protocol of pentacyclic triterpenes prior to their gas chromatography–mass spectrometry analysis in plant extracts



Zaineb Jemmali, Agnes Chartier*, Christelle Dufresne, Claire Elfakir

Univ-Orleans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067 Orléans, France

III.3 SÉLECTION DE LA PHASE STATIONNAIRE

Pour analyser l'ensemble des composés terpéniques susceptibles d'être présents dans un échantillon de résine végétale allant des monoterpénoïdes très volatils aux sesquiterpènes et composés triterpéniques dérivés plus ou moins apolaires, il est primordial de sélectionner une phase stationnaire adaptée à la séparation de ces composés couvrant une large gamme de polarité. Nous avons montré en effet, dans le Chapitre I, que la majorité des monoterpènes possédant des fonctions polaires de type alcool ou cétones étaient plutôt analysés sur des colonnes à caractère polaire tandis que les sesquiterpènes et composés triterpéniques dérivés plutôt analysés sur des colonnes apolaires. De plus, la phase stationnaire à sélectionner doit offrir une sélectivité suffisante pour éviter les co-élutions entre les nombreuses formes isomériques possibles pour ces familles de composés. Devant la très grande diversité de colonnes disponibles commercialement, un choix raisonné s'avère nécessaire.

Pour commencer notre étude, nous avons sélectionné un panel de neuf colonnes de mêmes dimensions géométriques (tableau III.8) et représentatives autant que possible de la diversité des phases stationnaires commerciales. Pour certaines de ces colonnes, nous ignorions la nature exacte du greffage car non fournie par le fabricant. Dans ces conditions, nous nous sommes attachées en premier lieu à caractériser la polarité de ces phases stationnaires de façon classique à savoir selon la classification de McReynolds. Dans un deuxième temps, nous avons analysé sur ces colonnes, un set de 27 solutés représentatifs et à l'aide d'outils statistiques nous avons classifié les colonnes et sélectionné un premier ensemble de phases stationnaires plus adaptées à la séparation des terpénoïdes. Enfin, l'utilisation des fonctions de Derringer nous a aidé à établir le meilleur compromis pour choisir la phase stationnaire la plus adaptée à l'analyse simultanée de l'ensemble des terpènes allant des mono aux triterpènes.

Tableau III.8 Liste des 9 colonnes sélectionnées pour l'étude.
Dimensions géométriques identiques pour toutes : 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm.

Colonnes	Source	Nature de la phase stationnaire
Rtx-1ms	Restek	100% diméthylpolysiloxane
HP-5ms	Agilent	5% diphényle, 95% diméthylpolysiloxane
DB-5ms	Agilent	5% phényle, 95% diméthylpolysiloxane
Zb-MultiResidue	Phenomenex	Type de greffage non spécifié
Optima δ 6	Machery-Nagel	Type de greffage non spécifié
DB-35ms	Agilent	35% phényle, 75% diméthylpolysiloxane
VF-200ms	Varian	Trifluoropropyle méthylpolysiloxane
CP-SIL24	Varian	50% diphényle, 50% diméthylpolysiloxane
Tr-Wax	Thermo Fisher	Polyéthylène glycol

III.3.1 DETERMINATION DE LA POLARITE DES COLONNES SELON McREYNOLDS

Une première caractérisation de la polarité globale des colonnes choisies a été établie de façon classique selon le principe mis en place par McReynolds et permettant d'étudier les interactions soluté/phase stationnaire.

III.3.1.1 PRINCIPE DE LA CLASSIFICATION DE McREYNOLDS

La caractérisation de la polarité des phases stationnaires est basée sur la détermination de la différence de rétention de 5 solutés témoins sur la phase à étudier et sur une phase de référence considérée comme étant la plus apolaire à savoir le squalane (fig. III.6).

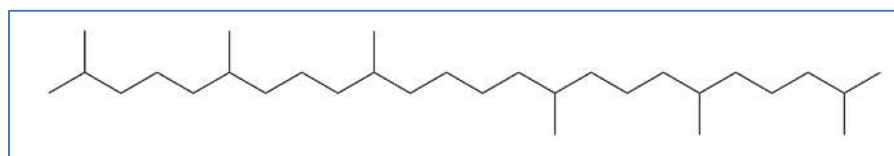


Figure III.6 Structure du squalane

Les 5 composés de référence possèdent des fonctionnalités différentes et permettent de caractériser chacun, un type d'interactions plus spécifiques avec une phase stationnaire donnée. Ainsi le benzène permettra d'évaluer les interactions de type π - π , le n-butanol les interactions hydrogène, le 2-pentanone les interactions dipolaires, le nitropropane l'effet donneur d'électrons et la pyridine l'effet accepteur de protons [14, 15].

- **INDICE DE RETENTION DE KOVATS**

Pour exprimer de façon systématique la rétention d'un composé donné sur une phase stationnaire donnée on utilise la mesure d'indice de rétention ou indice de Kovats. L'indice de Kovats caractérise la rétention d'un soluté par rapport à celle de n-alcanes analysés sur la même phase stationnaire [16]. Pour les n-alcanes linéaires analysés sur une colonne donnée, il est vérifié que le logarithme du temps de rétention réduit varie linéairement et de façon croissante avec le nombre de carbones dès lors que ce nombre est supérieur à 5. A partir de la droite dite « droite de Kovats » établie, on peut déterminer l'indice de Kovats de tout soluté x analysé en encadrant la valeur de son temps de rétention réduit par celles des 2 n-alcanes à n et (n+1) atomes de carbone de la façon suivante :

$$I_x = 100 \times n + 100 \frac{\log t'_{R(x)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}}$$

- n : nombre d'atomes de carbone de l'alcane linéaire ayant un temps de rétention précédant celui du soluté x

- $t'_{R(x)}$: temps de rétention réduit du soluté x
- $t'_{R(n)}$: temps de rétention réduit de l'alcane linéaire précédant le soluté x
- $t'_{R(n+1)}$: temps de rétention réduit de l'alcane linéaire suivant le soluté x

• **CONSTANTE DE McREYNOLDS**

La constante de McReynolds (ΔI) s'obtient en calculant pour chaque soluté témoin, la différence entre la valeur d'indice de Kovats déterminée sur la phase étudiée et celle sur le squalane.

$$\text{Pour chaque composé témoin : } \Delta I = (I_{ps} - I_{\text{squalane}})$$

La somme des 5 constantes de McReynolds ($\sum \Delta I$) établies pour les 5 solutés témoin permet d'évaluer la polarité globale de la phase étudiée :

$$\sum \Delta I = x' + y' + z' + u' + s'$$

- x' constante de McReynolds du benzène
- y' constante de McReynolds du n-butanol
- z' constante de McReynolds du 2-pentanone
- u' constante de McReynolds du nitropropane
- s' constante de McReynolds de la pyridine

Plus la valeur de $\sum \Delta I$ est élevée, plus la phase étudiée est polaire. Ainsi, les colonnes possédant une polarité globale ($\sum \Delta I$) entre 0 et 100 sont dites apolaires, celles ayant une polarité globale comprise entre 100 et 400 sont moyennement polaires et celles de polarité globale supérieure à 400 sont considérées comme polaires.

III.3.1.2 1ERE CLASSIFICATION DES 9 COLONNES EN FONCTION DE LEUR POLARITE

Les constantes de McReynolds pour les 5 composés témoins ont été déterminées sur les 9 colonnes capillaires et leurs valeurs sont reportées dans le tableau III.9.

Tableau III.9 Valeurs des constantes de McReynolds des 5 composés de référence pour les 9 colonnes étudiées et détermination de la polarité globale ($\sum \Delta I$) de chaque colonne.

	Tr-Wax	CP-SIL24	VF-200ms	DB-35ms	Optima 8 6	ZB-multi residue	DB-5ms	HP-5ms	RTx-1ms
x' (benzène)	393	136	88	102	82	52	29	33	11
y' (n-butanol)	494	138	130	74	97	69	67	48	25
z' (2-pentanone)	348	177	240	150	126	89	74	63	91
u' (nitropropane)	519	263	309	255	181	135	103	112	52
s' (pyridine)	435	206	84	178	119	82	64	50	16
$\sum \Delta I$	2189	921	850	758	604	428	338	307	194

D'après le tableau III.9, on constate que la phase stationnaire la moins polaire est la Rtx-1ms avec une polarité globale de 194 et que la plus polaire est la Tr-Wax avec une valeur de polarité de 2189. Il s'agit de résultats attendus compte tenu de la nature de la phase stationnaire de ces colonnes.

Les 3 phases stationnaires : Rtx-1ms, HP-5ms et DB-5ms ayant une polarité globale comprise entre 100 et 400 peuvent être qualifiées de moyennement polaires tandis que les 6 phases : ZB-MultiResidue, Optima δ6, DB-35ms, VF-200ms, CP-SIL24 et Tr-Wax ayant une polarité globale supérieure à 400 sont polaires.

Cette approche nous permet de classer des colonnes dont on n'a aucune information sur la nature de leurs phases stationnaires. C'est le cas des colonnes ZB-MultiResidue et Optima δ6 qui ont des polarités globales de 428 et 604 respectivement. Les deux colonnes développent plutôt des interactions à caractère donneur d'électrons avec une valeur de u' (nitropropane) de 135 pour la ZB-MultiResidue et de 181 pour l'Optima δ6.

On constate également que certaines colonnes ont des polarités globales assez similaires mais possèdent des sélectivités différentes. C'est notamment le cas des colonnes CP-SIL24 et VF-200ms. En effet, la valeur s' (pyridine) qui prend compte du caractère accepteur de proton H^+ est de 84 pour la colonne VF-200ms et de 206 pour la CP-SIL24. Cette valeur est compensée par les valeurs de z' (2-pentanone) et de u' (nitropropane) qui sont de 177 et 263 respectivement pour la CP-SIL24 et de 240 et 309 pour la VF-200ms.

Cependant, à partir de cette première classification, il est difficile de prévoir quels seront les mécanismes de rétention et les sélectivités de ces phases stationnaires vis-à-vis des composés terpéniques. En effet, les constantes de McReynolds évaluent la sélectivité de composés de référence qui ont des structures très différentes des composés d'intérêt. En déterminant les temps de rétention sur ces phases stationnaires de composés terpéniques standards judicieusement sélectionnés en fonction de leur structure, nous pourrions évaluer de façon plus ciblée la nature des interactions développées. À l'aide d'outils statistiques adaptés, il sera alors possible de classer les phases stationnaires en fonction de leur sélectivité plus spécifique vis-à-vis des composés terpéniques.

III.3.2 ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE ET CLASSIFICATION ASCENDANTE HIERARCHIQUE

Dans un premier temps, la pré-sélection des colonnes a été établie en se basant sur leurs sélectivités vis-à-vis de 27 composés témoins, standards terpéniques possédant des fonctionnalités différentes (alcènes, alcools, diols, acides) (figure III.7). Ces composés représentatifs de la diversité moléculaire des terpènes, appartiennent aux familles des monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes et ne sont donc pas tous volatils. Une étape préliminaire de dérivation s'est avérée nécessaire avant l'analyse de leur mélange en GC. Dans ces conditions, il est à noter que toutes les fonctions alcools, diols ou acides portées par ces molécules sont silylées même celles des composés très volatils tels que les monoterpènes. Par ailleurs, la phase stationnaire Tr-Wax a été écartée de suite de notre étude comme n'étant pas adaptée à l'étude des composés dérivés.

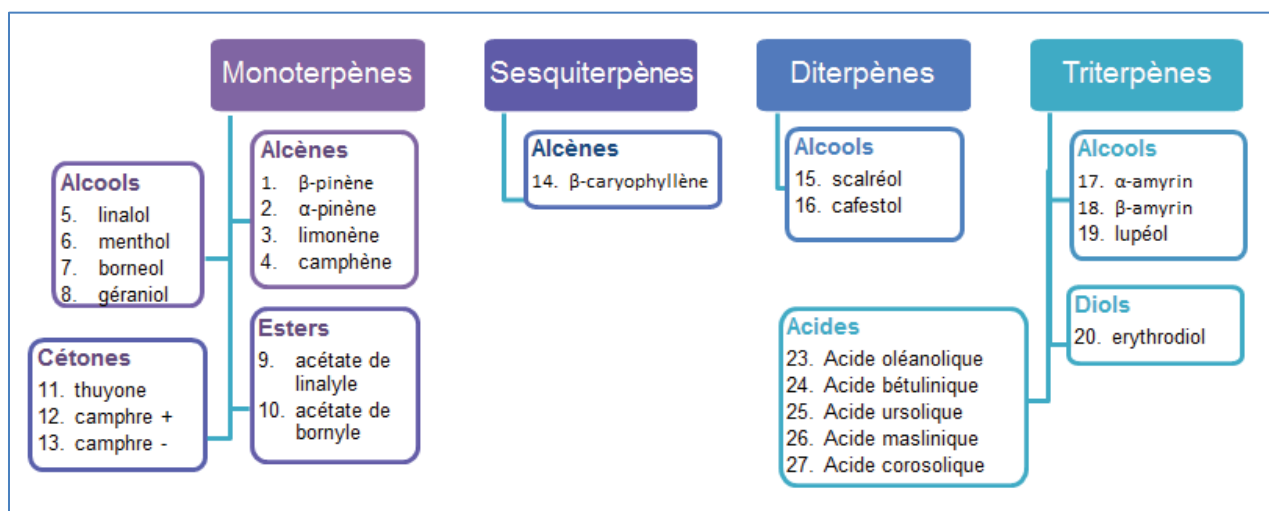


Figure III.7 Les 27 standards terpéniques utilisés pour la sélection de la phase stationnaire.

Compte tenu du nombre important de données générées, nous nous sommes appuyées sur des outils statistiques pour mettre en évidence des similitudes ou des dissimilitudes sur l'ensemble constitué de 27 standards analysés sur 8 colonnes (analyse en composante principale et classification hiérarchique). Dans un premier temps, nous allons décrire les outils statistiques utilisés pour la présélection des phases stationnaires. Par la suite, nous montrerons la méthodologie mise en place pour l'analyse de l'ensemble des terpènes.

III.3.2.1 OUTILS STATISTIQUES UTILISES

- ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (ACP)**

L'Analyse en Composante Principale (ACP) est une méthode statistique qui consiste à transformer des variables corrélées en nouvelles variables indépendantes les unes des autres. Cette méthode a été introduite par Pearson en 1901 [17] et développée par la suite par Hotelling [18]. La matrice des données est formée de n individus (phases stationnaires) et de p variables (composés terpéniques) (figure III.8). On condense les informations de la matrice de façon à obtenir une projection du nuage de points dans un espace de dimension réduite en déformant le moins possible la réalité. Pour cela, on réalise un changement de repère sur p axes factoriels corrélés (souvent $p=2$).

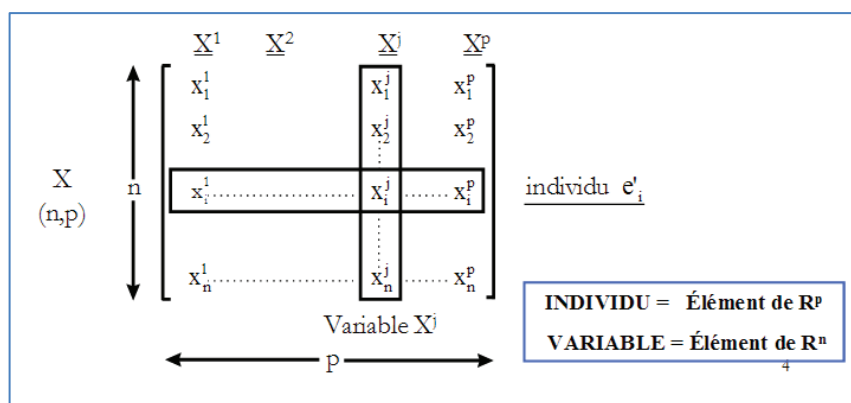


Figure III.8 Matrice des données pour l'analyse en ACP.
REF : [19]

Il existe deux types de graphes à exploiter pour les ACP : le graphique des individus et le graphique des variables.

- CLASSIFICATION ASCENDANTE HIERARCHIQUE (CAH)**

La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) est une méthode de classification qui permet de classer les individus dans des classes homogènes et les plus distinctes possibles entre elles. Cela nécessite de calculer à chaque regroupement la distance ou la dissimilarité entre les individus ainsi que celle entre deux classes. Le regroupement entre individus se fait de manière hiérarchique, car les individus sont classés deux à deux des plus proches vers les plus éloignés. Il en résulte un dendrogramme regroupant tous les individus selon leurs similitudes en un ensemble de classes.

III.3.2.2 CLASSIFICATION DES PHASES STATIONNAIRES PAR ACP ET CAH

L'analyse en composante principale (ACP) a été réalisée à l'aide du programme XLStat en combinant toutes les données concernant la rétention des 27 composés terpéniques sur les 8 colonnes ce qui représente le traitement de 216 données (8 x 27). Pour l'ACP, les calculs ont été effectués à partir des logarithmes des facteurs de rétention après avoir centré et réduit leurs valeurs pour donner à toutes les variables la même importance. De ce fait cette opération garantit que la position des colonnes dans le graphique de l'ACP est bien liée à leurs propriétés séparatives. Les 27 composés terpéniques ont été analysés après dérivation sur les différentes colonnes de même dimension et dans les conditions de dérivation optimisées précédemment. Compte tenu de la grande diversité des terpènes et de la large gamme de volatilité de ces composés, l'analyse GC-FID a été effectuée dans des conditions de gradient de température. Les mêmes conditions (voir Annexe D) ont été appliquées à toutes les colonnes. L'ensemble des résultats figurent en Annexe E.

Les deux axes principaux PC1-PC2 du graphique d'observations présentés figure III.9 couvrent ensemble environ 94% de la variance et peuvent être considérés comme une représentation complète de l'ensemble des résultats, donc le graphe PC1-PC2 se prête à l'interprétation.

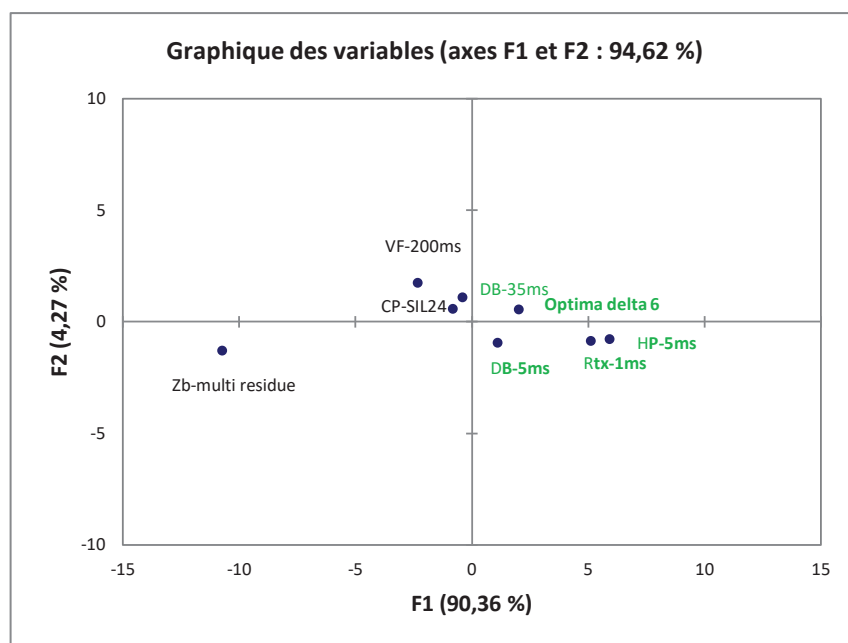


Figure III.9 Analyse en composantes principales (graphique d'observations) basée sur la rétention des 27 solutés sur les 8 phases stationnaires

La proximité des points dans le plan montre la similarité des phases stationnaires. Ainsi la colonne ZB-MultiResidue est très différente des autres colonnes car elle se retrouve éloignée vers la gauche de l'ensemble des autres colonnes.

La lecture complémentaire du dendrogramme établi en CAH (figure III.10) et pour lequel une limite arbitraire de dissimilarité a été fixée automatiquement à 0.08 (ligne horizontale en pointillé), nous permet de distinguer quatre clusters de colonnes. Les différents clusters peuvent être considérés comme des groupes de phases stationnaires possédant des propriétés de rétention similaires. Les colonnes RTx-1ms et HP-5ms (cluster 3) qui se trouvent à droite dans le graphique des individus sont assez similaires. En effet, ces deux colonnes sont les plus apolaires du set de colonnes avec des polarités de 194 et 307 pour les colonnes RTx-1ms et HP-5ms respectivement. Dans le cluster 5, on retrouve les colonnes Optima 86, DB-35ms et DB-5ms, qui sont caractérisées par une polarité intermédiaire avec des indices de McReynolds compris entre 337 et 758. Ainsi les colonnes qui sont bien connues pour avoir des sélectivités semblables apparaissent bien dans le graphique des individus comme proches les unes des autres.

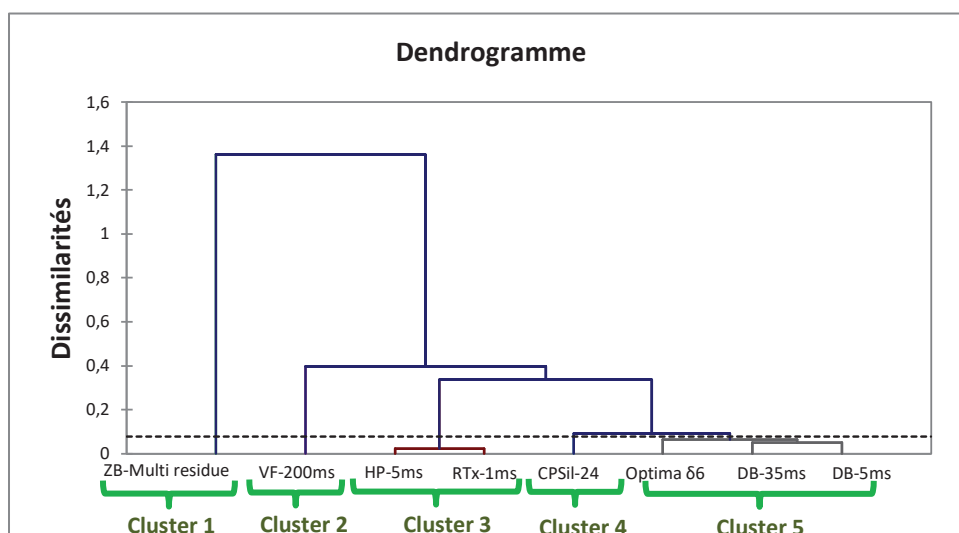


Figure III.10 Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) pour les 8 phases stationnaires étudiées.

Pour une meilleure compréhension de la position des phases stationnaires, nous avons ensuite considéré le cercle de corrélation des variables (les 27 solutés) (figure III.11). Les composés terpéniques se positionnent tous sur le cercle de corrélation ce qui montre que l'ensemble des données est parfaitement représenté par les deux axes F1 et F2 de l'ACP. Pour les 8 colonnes, les 27 composés de l'étude constitue bien un set homogène. On peut également constater que la proximité des points montre des similitudes entre les composés. Tous les composés apparaissent dans le côté droit du graphe et sont classés des plus polaires (en haut) au moins polaires (en bas). Les cétones et esters sont en haut du graphe des variables alors que les acides et les alcools silylés sont proches de l'horizontale et enfin les fonctions alcènes se situent en bas.

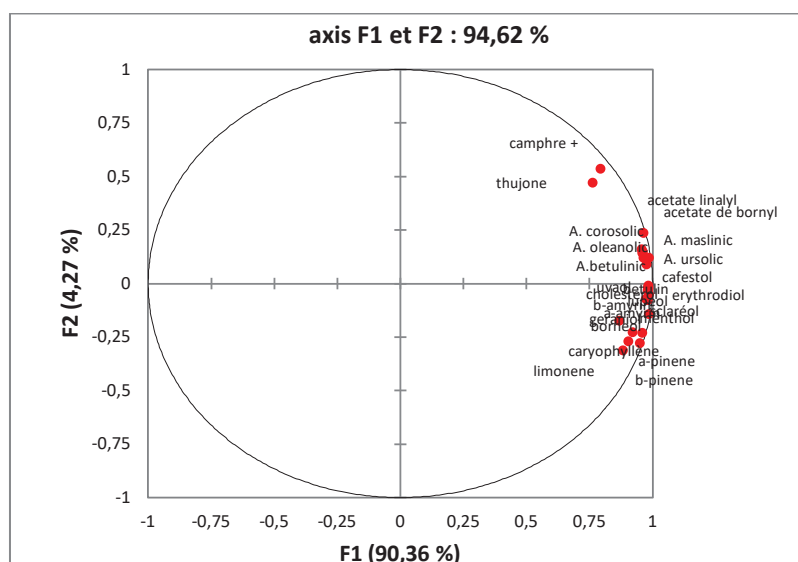


Figure III.11 Graphique des observations pour les 27 standards terpéniques.

En combinant l'ensemble des informations obtenues, on constate que les interactions apolaires sont responsables de la rétention des composés dérivés. Dès que la phase stationnaire contient plus de groupements polaires, la colonne se retrouve à gauche du graphique d'observations et devient inappropriée pour l'étude des terpènes dérivés. Nous avons ainsi sélectionné les quatre colonnes qui présentent les meilleures sélectivités vis-à-vis des composés terpéniques dérivés : HP-5ms, RTx-1ms, DB-5ms, Optima 86. Ces colonnes se retrouvent dans la partie la plus à droite du graphique des observations et appartiennent aux clusters 3 et 5 définis d'après le dendrogramme. La colonne DB-35ms appartenant elle aussi au cluster 5, nous avons décidé de l'inclure au set de colonnes présélectionnées.

L'étape suivante a consisté à utiliser la fonction de Derringer pour classer les 5 phases stationnaires présélectionnées selon leurs performances chromatographiques et ainsi mettre en évidence la phase stationnaire la mieux adaptée à l'analyse des composés terpénoïdes dérivés pris dans leur ensemble.

III.3.3 SELECTION DE LA PHASE STATIONNAIRE PAR LA FONCTION DE DERRINGER

- **PRINCIPE**

Nous avons sélectionné quatre critères pour classer les colonnes (nombre de composés résolus, nombre de composés élusés, nombre de composés symétriques ainsi que l'efficacité de la colonne) et la fonction de Derringer nous a permis d'établir le meilleur compromis pour trouver des solutions à des optimisations multicritères.

Le premier critère (d₁) que nous avons sélectionné est le nombre des composés résolus. Pour établir ce premier critère, la résolution entre deux pics voisins A et A+1 a été calculée selon la formule suivante :

$$R_{A,A+1} = 2 \frac{|t_{R,A+1} - t_{R,A}|}{|w_{A+1} + w_A|}$$

- $R_{A,A+1}$: résolution entre les pics A et A+1
- $t_{R,A}$ et $t_{R,A+1}$: temps de rétention des pics A et A+1,
- w_A et w_{A+1} : largeurs des pics A et A+1.

puis le nombre de pics résolus sur la base d'une résolution supérieure à 1.5 a été comptabilisé.

Le deuxième critère (d₂) que nous avons sélectionné est le nombre de composés élués sur les phases stationnaires étudiées.

Le troisième critère (d₃), correspond au nombre de pics symétriques (gaussien) observés. Le pic est considéré symétrique si son facteur d'asymétrie A_s est compris entre 0.8 et 1.3.

Le facteur d'asymétrie a été calculé pour chaque pic sur la base de la formule suivante :

$$A_s = \frac{b}{a}$$

- A_s : facteur d'asymétrie
- Rapport b/a : largeur des demi-largeurs à 10% de la hauteur totale du pic

Le quatrième critère (d₄), correspond à l'efficacité moyenne de la colonne exprimée en nombre moyen de plateaux théoriques (N) :

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_n} \right)^2$$

- N : nombre de plateaux théoriques
- t_R : temps de rétention du soluté
- w_n : largeur du pic à mi-hauteur

Comme on a pu le voir précédemment lors de l'optimisation de l'étape de dérivation, on attribue pour chaque critère une fonction croissante de Derringer (d_i) comprise entre 0 (valeur indésirable) et 1 (valeur désirable). La désirabilité globale est la moyenne géométrique des fonctions de Derringer pour chaque critère :

$$D = (d_1 * d_2 * d_3 * d_4)^{1/4}$$

• **RESULTAT**

Pour le premier critère (d_1), un score de 1 a été attribué à la colonne qui possède le plus grand nombre de composés résolus (HP-5ms) et un score légèrement au-dessus de 0 à la colonne Optima $\delta 6$ qui a le plus faible nombre de composés élués afin de ne pas discriminer ce critère pour la colonne. On a réitéré cette approche pour les autres critères. La désirabilité globale (D) est évaluée pour chaque colonne (tableau III.10).

On constate d'après le tableau que la colonne Optima $\delta 6$ est la moins adaptée à l'étude de l'ensemble des terpènes avec une désirabilité globale de 0.067. Cette colonne possède les plus faibles valeurs pour les critères d_1 , d_2 et d_4 . De la même manière la colonne DB-35ms n'est pas adaptée car elle possède une désirabilité globale de 0.293. Les colonnes donnant les meilleurs caractéristiques sont la DB-5ms et la HP-5ms avec des désirabilités globales de 0.687 et 0.795 respectivement. Ces deux phases stationnaires ont le même groupement apolaire (diméthylpolysiloxane) à 95% et diffèrent par la nature du greffage de leur groupement polaire (5%). La phase stationnaire HP-5ms possède un groupement diphényle intercalé dans la chaîne diméthylpolysiloxane et la DB-5ms un groupement phényle greffé au polysiloxane. On constate que la colonne HP-5ms est la plus adaptée, car d'après le graphique des observations (figure III.8), elle se situe à droite et la plus proche des composés terpéniques dérivés que l'on observe sur le graphique des variables (figure III.11).

Tableau III.10 Valeurs des constantes de Derringer et de la désirabilité globale, D, des 5 colonnes présélectionnées.

Colonnes présélectionnées	Nombre des composés résolus		Nombre des composés élués		Nombre des pics symétriques		Efficacité de la colonne		Désirabilité globale D
	Valeur	d_1	Valeur	d_2	Valeur	d_3	Valeur	d_4	
DB-5ms	21	0,556	27	1,000	27	1,000	601058	0,400	0,687
HP-5ms	25	1,000	27	1,000	27	1,000	600887	0,400	0,795
Optima $\delta 6$	17	0,111	22	0,167	18	0,400	500679	0,003	0,067
Rtx-1ms	18	0,222	27	1,000	27	1,000	641481	0,560	0,594
DB-35ms	18	0,222	24	0,500	13	0,067	752502	1,000	0,293

III.3.4 CONCLUSION

En se basant sur des outils statistiques (analyse en composantes principales, classification ascendante hiérarchique et fonction de Derringer), nous avons pu mettre en place une méthodologie conduisant *in fine* à la sélection de la phase stationnaire la mieux adaptée (colonne HP-5ms) à l'analyse de l'ensemble des terpènes allant des mono aux triterpènes.

Après cette première étape-clé du choix de la phase stationnaire, deux autres points essentiels restent à optimiser avant d'envisager d'analyser des échantillons de résines végétales : le mode d'injection pour assurer les meilleures conditions de transfert des composés dans la colonne et les conditions de programmation de température pour la colonne.

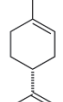
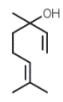
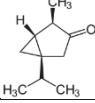
III.4 OPTIMISATION DE L'ETAPE D'INJECTION

Etant donné que nous avons à analyser un ensemble de composés de volatilité très différente allant de très volatils à non volatils, le choix des paramètres d'injection est crucial pour obtenir une analyse représentative et fidèle de la composition des échantillons.

L'injecteur split/splitless est l'injecteur le plus couramment utilisé en chromatographie gazeuse cependant son utilisation à haute température peut produire une dégradation thermique des composés thermolabiles. De plus des discriminations peuvent être également observées. Certains des composés analysés étant en effet très volatils, ils pourront potentiellement diffuser vers le haut de l'injecteur et être balayés par la ligne de purge du septum avant d'arriver en tête de colonne.

On s'est donc intéressé à l'injecteur à température programmée (PTV) qui, de par sa programmation en température est particulièrement adapté à l'analyse des composés volatils et limitera les phénomènes de discrimination par rapport aux autres composés. Afin d'évaluer les différents paramètres de l'injecteur PTV, 5 monoterpènes thermolabiles parmi les plus volatils ont été sélectionnés pour cette étape d'optimisation : α -pinène, β -pinène, limonène, linalol et thuyone (tableau III.11) et on a choisi l'acétate de bornyle comme standard interne. Un mélange de ces standards à la concentration de 25 mg.L⁻¹ a été réalisé dans de l'hexane afin d'être dans les mêmes conditions que les extraits de résines.

Tableau III.11 Température d'ébullition, masse molaire et structure des 5 solutés test utilisés pour optimiser les conditions d'injection avec le PTV.

Composé	Température ébullition (°C)	Mw (g.mol ⁻¹)	Structure
α-pinène	156°C	136.2	
β-pinène	166°C	136.2	
Limonène	176°C	136.2	
Linalol	198 à 200 °C	154.2	
Thuyone	201°C	152.2	

- **PARAMETRES DE REGLAGE DE L'INJECTEUR PTV**

L'injection de solutés via un injecteur PTV peut être divisée en quatre phases : introduction de l'échantillon dans le liner, vaporisation du solvant, transfert des composés dans la colonne et étape de nettoyage avant l'injection suivante. Pendant l'étape d'injection, la vanne de split est ouverte et l'échantillon est introduit dans l'injecteur à la température de 55°C, valeur inférieure à la température d'évaporation de l'hexane (68°C). Ensuite, l'étape de vaporisation du solvant est réalisée à une température fixée à 75°C afin d'éliminer le solvant tout en évitant la perte des composés les plus volatils. Le transfert des composés dans la colonne se fait enfin à 350°C avec la vanne de split fermée pendant 1.50 minutes. Par la suite, la vanne de split est ouverte pendant 3 minutes à 350°C procédant ainsi à l'étape de nettoyage.

- **COMPARAISON INJECTEUR PTV / INJECTEUR SPLIT-SPLITLESS**

Nous avons voulu dans un premier temps comparer les résultats obtenus pour l'analyse d'un même mélange injecté soit avec l'injecteur PTV utilisé dans les conditions décrites ci-dessus soit avec l'injecteur split/splitless chauffé à 250°C et réglé en mode splitless afin d'éviter au maximum la perte des composés très volatils.

La figure III.12 reporte les 2 chromatogrammes obtenus pour l'analyse du mélange des 5 composés terpéniques en concentration de 25 mg.L⁻¹ injecté selon les 2 modes d'injection. On constate que l'injecteur PTV en mode « solvant vent » est mieux adapté à l'analyse des composés très volatils que l'injecteur split/splitless. Même en mode splitless, cet injecteur dont la température constante est fixée à 250°C, entraîne une détérioration des composés très volatils qui se traduit par une perte de signal pour les 4 composés les plus volatils : l'α-pinène (1), le β-pinène (2), le limonène (3) et le thuyone (4).

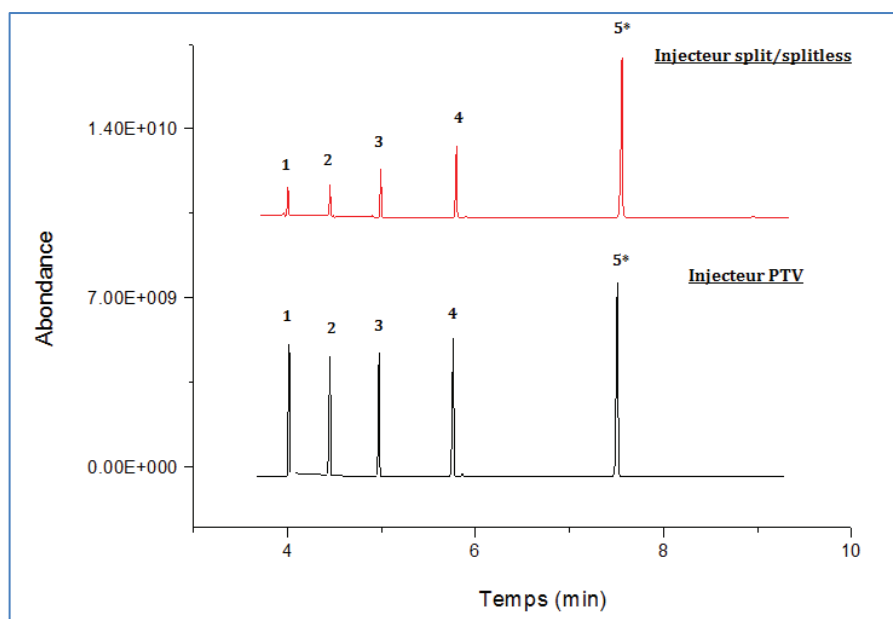


Figure III.12 Analyse GC-FID comparée du mélange : α -pinène (1), β -pinène (2), limonène (3), thuyone (4) et standard interne l'acétate de bornyle (5*) avec l'injecteur split/splitless à 250°C et l'injecteur PTV.

Conditions : Colonne HP-5ms, gaz vecteur hélium débit de 1.2 mL.min⁻¹. Gradient de température : température initiale de 40°C pendant 2 min pour rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 165°C. Les deux injections sont réalisées en mode splitless (Conditions détaillées en Annexe D).

Pour essayer d'évaluer cette perte de signal, les rapports entre les aires obtenues avec l'injecteur PTV et celles obtenues avec l'injecteur split/splitless en mode splitless ont été déterminés. Des valeurs égales à 32.1 pour l' α -pinène et le β -pinène, 29.8 pour le limonène et 12.5 pour le thuyone ont été observées. Ce résultat confirme que l'injecteur à gradient de température est l'injecteur approprié à l'analyse des terpènes des plus volatils au moins volatils.

- **REPETABILITE DE L'INJECTION PTV**

La répétabilité de l'injection PTV a été évaluée en analysant : (i) un même mélange de standards injecté trois fois à une teneur de 25 mg.L⁻¹ et (ii) 3 mélanges de standards préparés indépendamment. Pour chaque analyse, l'aire relative du pic chromatographique de chaque soluté a été calculée (rapport de l'aire absolue du pic chromatographique du soluté sur l'aire du pic observé pour l'étalon interne (acétate de bornyle)), puis la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation.

D'après le tableau III.12, on obtient une valeur de RSD% inférieur à 1% (pour le même mélange de standard injecté trois fois) et inférieur à 3% (pour les mélanges différents).

Tableau III.12 Evaluation de la répétabilité de l'injection d'un mélange de standards injecté 3 fois et de trois mélanges préparés indépendamment à une concentration de 25 mg.L⁻¹.
Détermination de la moyenne, écart-type et déviation standard relative (RSD)

(i) Répétition de l'injection du même mélange 3 fois										
Composés		Aire du composé			Aire du composé/ Aire standard interne			Moyenne	Ecart-type	RSD
	t _R	1	2	3	1	2	3			
α-pinène	4.05	9.84E+09	9.95E+09	1.01E+10	7.71E-01	7.72E-01	7.65E-01	7.69E-01	3.50E-03	0%
β-pinène	4.49	1.07E+10	1.07E+10	1.10E+10	8.36E-01	8.29E-01	8.28E-01	8.31E-01	4.57E-03	1%
limonène	5.01	6.01E+09	6.03E+09	6.17E+09	4.71E-01	4.68E-01	4.65E-01	4.68E-01	2.94E-03	1%
thuyone	5.80	6.17E+09	6.12E+09	6.31E+09	4.84E-01	4.75E-01	4.76E-01	4.78E-01	5.18E-03	1%
Acétate de bornyle	7.54	1.28E+10	1.29E+10	1.33E+10						
(ii) Injection de trois mélanges différents										
Composés		Aire du composé			Aire du composé/ Aire standard interne (acétate de bornyle)			Moyenne	Ecart-type	RSD
	t _R	1	2	3	1	2	3			
α-pinène	4.05	9.95E+09	1.02E+10	1.03E+10	7.72E-01	7.94E-01	7.98E-01	7.88E-01	1.42E-02	2%
β-pinène	4.49	1.07E+10	1.05E+10	1.04E+10	8.29E-01	8.16E-01	8.02E-01	8.16E-01	1.33E-02	2%
Limonène	5.01	6.03E+09	8.28E+09	7.95E+09	4.68E-01	6.42E-01	6.13E-01	6.27E-01	2.04E-02	3%
Thuyone	5.80	6.12E+09	9.62E+09	1.00E+10	4.75E-01	7.47E-01	7.73E-01	7.60E-01	1.88E-02	2%
Acétate de bornyle	7.54	1.29E+10	1.29E+10	1.30E+10						

Nos résultats confirment qu'il n'y a pas de perte significative en composés les plus volatils en utilisant l'injecteur de type PTV dans les conditions décrites précédemment.

III.5 OPTIMISATION DE LA PROGRAMMATION DE TEMPERATURE DE LA COLONNE GC

Le choix de la colonne conditionne par la suite le choix des paramètres de température du four qui sont à déterminer. Compte tenu de la richesse des résines en composés terpéniques, il s'avère indispensable de faire l'analyse en mode gradient de température pour analyser en un temps raisonnable l'ensemble des composés très volatils à peu volatils et pour ne pas perdre trop en efficacité pour les composés élués en dernier.

Les paramètres à fixer pour le gradient de température sont : la plage de durée de l'analyse, la température initiale de la colonne avec le temps de maintien, la rampe de température ainsi que la température finale de la colonne.

Afin de ne pas dégrader et perdre les composés les plus volatils, la température initiale de la colonne a été fixée à la valeur la plus basse que l'on puisse fixer sans refroidissement cryogénique soit 40°C et maintenue pendant une durée d'une minute. Par la suite, nous avons ajusté la pente du gradient à 15°C/min permettant de réaliser une analyse rapide sans altérer la résolution des composés qui sont élués au milieu du chromatogramme. Enfin, la température finale a été fixée à la température maximale compatible pour la colonne choisie et permettant l'élution de tous les composés. La température finale a donc été fixée à la valeur de 330°C pendant 5 minutes.

Le choix de l'injecteur étant justifié et les conditions opératoires pour la programmation de température de la colonne étant maintenant optimisées pour l'analyse des terpènes en GC-FID, la méthode développée a été appliquée ensuite à l'analyse de différents mélanges de composés terpéniques en vue d'évaluer les performances analytiques de la méthode développées.

III.6 EVALUATION DES PERFORMANCES ANALYTIQUES DE LA METHODE A PARTIR DE L'ANALYSE DE DIFFERENTS MELANGES

La méthode GC que nous avons mise au point nécessite une étape de dérivation préalable, appliquée à l'ensemble des terpènes analysés. Cette réaction de dérivation nécessite en préambule à l'ajout de l'agent dérivant, une étape d'évaporation à sec du solvant dans lequel les terpènes sont dissous (soit le solvant utilisé pour préparer les mélanges standards soit le solvant utilisé pour extraire les terpènes contenu dans l'échantillon de résine). Si cette étape d'évaporation à sec ne pose pas de problème dans le cas de l'analyse des seuls composés triterpéniques non volatils, elle pourrait contribuer à une erreur systématique lors de la détermination des teneurs en composés les plus volatils (les monoterpènes). Nous avons donc réalisé avant la pré-validation de la méthode, un suivi du taux de récupération des composés monoterpénoïdes les plus volatils tout au long du processus afin de s'assurer de l'absence d'erreur systématique dans la détermination des teneurs en monoterpènes.

III.6.1 TAUX DE RECOUVREMENT DES MONOTERPENES APRES L'ETAPE D'EVAPORATION A SEC NECESSAIRE AU PROTOCOLE DE DERIVATION DE L'ECHANTILLON

Cette étude a été menée à partir d'un mélange de 5 standards monoterpéniques volatils : alcènes (α -pinène, β -pinène, limonène), alcool (linalol) et cétone (thuyone) en présence d'acétate de bornyle comme standard interne. Le mélange préparé dans l'hexane a été analysé en GC-MS (méthode décrite en Annexe D) de 2 façons différentes : (i) soit directement, (ii) soit après évaporation à sec du mélange à l'évaporateur rotatif suivi d'une reconstitution dans le même volume de solvant. Chaque analyse a été répétée trois fois. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau III.13.

Tableau III.13 Aires des pics obtenues (i) SANS et (ii) AVEC évaporation du solvant pour un mélange de 5 standards. L'acétate de bornyle est utilisé comme standard interne. Ont été calculés après détermination des aires relatives : la moyenne (M), l'écart-type (ET) et la déviation standard (RSD). Condition GC de l'analyse en Annexe D

(i) Analyse sans évaporation du mélange de standards

Composés	Aire 1	Aire 2	Aire 3	Aire 1/Asi ₁	Aire 2/ Asi ₂	Aire 3/ Asi ₃	M	ET	RSD
α-pinène	1.33E+10	1.28E+10	1.4E+10	1.50E+00	1.32E+00	1.31E+00	1.37E+00	1.12E-01	8%
β-pinène	8.65E+09	1.08E+10	1.05E+10	9.81E-01	1.11E+00	9.80E-01	1.02E+00	7.75E-02	8%
Limonène	6.46E+09	6.49E+09	7.79E+09	7.31E-01	6.70E-01	7.28E-01	7.10E-01	3.47E-02	5%
Linalol	1.07E+10	1.17E+10	1.29E+10	1.21E+00	1.21E+00	1.20E+00	1.21E+00	5.52E-03	0%
Thuyone	5.75E+09	6.61E+09	7.29E+09	6.52E-01	6.82E-01	6.81E-01	6.72E-01	1.73E-02	3%
A. Bornyle (SI)	8.82E+09	9.69E+09	1.07E+10	-	-	-	-	-	-

(ii) Evaporation à sec du mélange de standards à l'évaporateur rotatif

Composés	Aire 1	Aire 2	Aire 3	Aire 1/Asi ₁	Aire 2/ Asi ₂	Aire 3/ Asi ₃	M	ET	RSD
α-pinène	2.79E+09	2.39E+09	3.23E+09	2.65E-01	1.98E-01	2.58E-01	2.61E-01	4.65E-03	2%
β-pinène	3.63E+09	3.37E+09	4.51E+09	3.44E-01	2.79E-01	3.61E-01	3.53E-01	1.19E-02	3%
Limonène	4.42E+09	5.38E+09	5.51E+09	4.19E-01	4.45E-01	4.41E-01	4.35E-01	1.42E-02	3%
Linalol	9.59E+09	1.04E+10	1.17E+10	9.09E-01	8.58E-01	9.35E-01	9.01E-01	3.96E-02	4%
Thuyone	6.94E+09	7.43E+09	6.76E+09	6.58E-01	6.15E-01	5.41E-01	6.36E-01	3.05E-02	5%
A. Bornyle (SI)	1.06E+10	1.21E+10	1.25E+10	-	-	-	-	-	-

On constate que les aires relatives des solutés les plus volatils (α-pinène, β-pinène, limonène, linalol) sont plus faibles dans le cas de l'analyse du mélange reconstitué comparée à l'analyse directe néanmoins, ce phénomène n'est pas observé pour le thuyone et l'acétate de bornyle (standard interne). Par ailleurs, les valeurs de déviations standards calculées à partir des résultats correspondant d'une part (i) à l'analyse sans évaporation et d'autre part (ii) à celle après évaporation, mettent clairement en évidence que chaque type d'analyse est répétable avec des RSD inférieurs à 8% et 5% respectivement. Les écarts de valeurs ne proviennent donc pas de la méthode d'analyse mais semblent plutôt associés au processus d'évaporation du solvant.

Afin d'évaluer la perte en composés volatils après évaporation, un taux de recouvrement a été calculé pour les 5 standards selon la formule suivante :

$$R (\%) = 1 - \frac{(Aire_i/Aire_{SI})_{SE} - (Aire_i/Aire_{SI})_{AE}}{(Aire_i/Aire_{SI})_{SE}}$$

- R : pourcentage de recouvrement en %
- $(Aire_i/Aire_{SI})_{AE}$: aire relative du standard i sans évaporation
- $(Aire_i/Aire_{SI})_{SE}$: aire relative du standard i après évaporation

Après calcul, on obtient un taux de récupération de 20% pour l'α-pinène, de 34% pour le β-pinène, de 61% pour le limonène, de 75% pour le linalol et de 100% pour le thuyone.

On constate qu'on a une perte partielle et contrôlée des composés les plus volatils notamment les alcènes et les alcools terpéniques après l'évaporation. Les pertes les plus importantes sont observées pour les composés élués en début de chromatogramme. Cependant cette perte est contrôlée car on a un RSD de 6% pour les alcènes.

Connaissant la variabilité de la méthode, nous pouvons envisager de réaliser une étape de pré-validation en déterminant la linéarité de la réponse ainsi que les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ).

III.6.2 ANALYSE GC-MS D'UN MELANGE STANDARD DE 27 COMPOSES TERPENIQUES DANS LES CONDITIONS OPTIMISEES

Une première analyse du set de 27 composés terpéniques à une concentration de 50 mg.L⁻¹ chacun (voir liste des composés figure III.6) a été réalisée en GC-MS en utilisant tout d'abord le mode d'ionisation électronique. Les 27 composés terpéniques représentent une large gamme de masse allant de 136.2 g.mol⁻¹ (α/β pinène et camphène) à 472.7 g.mol⁻¹ (acides maslinique et corosolique). L'ensemble des conditions opératoires optimisées ont été appliquées et le profil type du chromatogramme résultant (courant ionique total), enregistré en mode d'acquisition « full scan », est présenté figure III.13. L'hélium est utilisé en gaz vecteur avec un débit de 1.2 mL.min⁻¹. La colonne HP-5ms est placée dans le four avec la programme de température suivant : température initiale de 40°C pendant 2 min puis rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 330°C maintenue pendant 5 minutes.

La spectrométrie de masse a été utilisée afin de pouvoir analyser un mélange inconnu et de pouvoir identifier les composés en comparant leurs temps de rétention et spectres de masse à ceux de standards. Compte tenu, de la présence de nombreux isomères, on a choisi de travailler en mode d'ionisation électronique (EI). Ce mode d'ionisation permet d'obtenir un nombre de fragments pouvant distinguer les composés de structures proches en fonctions de leurs intensités. La température de la ligne de transfert est de 315°C et la température de la source est de 250°C. L'acquisition en mode full scan a lieu sur une gamme de valeurs pour les rapports m/z comprise entre 35 et 700 amu avec un dwell time de 0.0204 s et un délai de solvant de 3.8 min.

La spécificité de la spectrométrie de masse diminuant l'exigence de séparation totale entre tous les composés d'intérêt, le temps d'analyse peut être réduit. Seuls certains couples de solutés doivent être séparés en lien direct avec les problèmes intrinsèques d'une détection par SM (solutés isobares et isomères). La figure III.13 montre une séparation satisfaisante du mélange de l'ensemble des composés en moins de 22 minutes dans les conditions chromatographiques sélectionnées. Dans ces conditions, les mono- et les sesquiterpènes sont élués entre 3.7 min et

13 min, les diterpènes de 13.5 min à 17 min et les triterpènes sont élués après 18.5 min. On retrouve bien les 27 solutés du mélange en vérifiant leurs spectres de masse. Cette méthode nous permet de distinguer des isomères en fonction de leurs temps de rétention comme c'est le cas de l'acide maslinique (5) et corosolique (6).

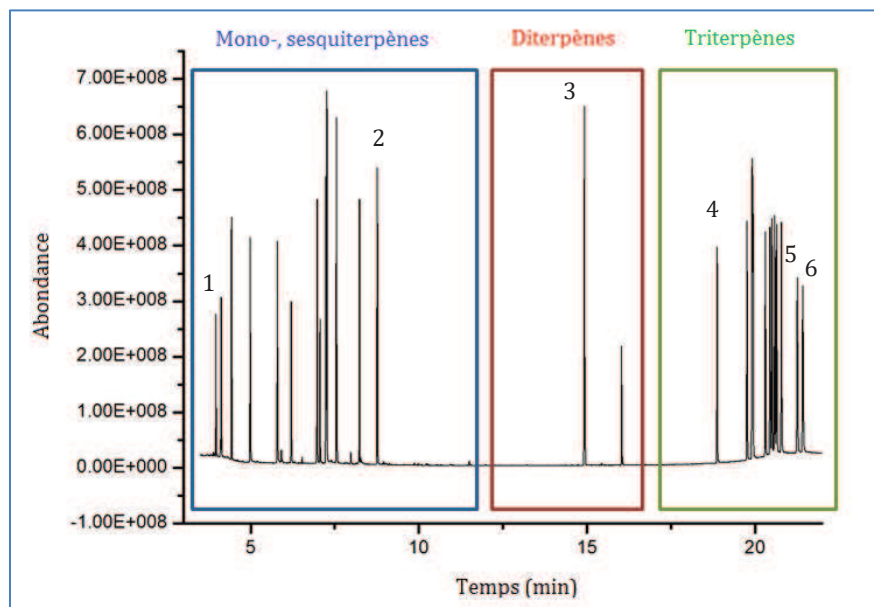


Figure III.13 Analyse GC-MS de 27 standards terpéniques dans les conditions de la méthode GC-MS optimisée. Attribution de quelques pics : α -pinène (1), β -caryophyllène (2), sclaréol (3), β -amyrine (4), acide maslinique (5) et acide corosolique (6).

Conditions : Colonne HP-5ms, gaz vecteur hélium débit de 1.2 mL.min⁻¹ Gradient de température : température initiale de 40°C pendant 2 min pour rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 330°C pendant 5 minutes (Conditions expérimentales détaillées en Annexe D).

III.6.3 PERFORMANCES ANALYTIQUES DE LA METHODE GC-MS

Les performances analytiques de la méthode GC-MS ont été évaluées en termes de limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ainsi que de linéarité de la réponse. Un mélange de 7 standards en présence de l'acétate de bornyle comme standard interne pour les 5 composés volatils (α -pinène, β -pinène, limonène, linalol et le thuyone) et du cholestérol comme standard interne pour les 2 standards non volatils (β -amyrine et acide β -boswellique) a constitué l'objet de cette étude.

III.6.3.1 EVALUATION DES LIMITES DE DETECTION (LOD) ET DE QUANTIFICATION (LOQ)

La limite de détection (LOD) correspond à la plus petite quantité de soluté que l'on peut détecter et cette valeur est obtenue pour une valeur du rapport signal sur bruit égale à 3. Quant à la limite de quantification (LOQ), il s'agit de la plus petite quantité que l'on peut quantifier et on peut l'obtenir pour un rapport signal sur bruit de 10.

Pour les composés les plus volatils, des valeurs de LOD de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l' α -pinène, 160 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le β -pinène et le limonène, 120 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le linalol et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le thuyone sont observées. Les LOQ ont également été déterminées et correspondent à une valeur de 660 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l' α -pinène, 540 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le β -pinène et le limonène, 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le linalol et 340 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le thuyone.

Pour les composés les moins volatils, des LOD respectivement de 130 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le β -amyrine et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'acide β -boswellique et des LOQ respectivement de 430 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le β -amyrine et 320 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'acide β -boswellique sont déterminées.

Comme attendu, les limites les plus hautes pour les LOD (160-200 $\mu\text{g.L}^{-1}$) sont observées pour les monoterpènes alcènes (α -pinène, β -pinène et limonene) mais ces valeurs restent acceptables et peu différentes de celles obtenues pour les composés les moins volatils (100-130 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Par ailleurs les valeurs de LOD et LOQ que nous avons obtenues sont tout à fait comparables à celles des différentes méthodes GC-MS que l'on peut trouver dans la littérature.

III.6.3.2 REPETABILITE ET LINEARITE DE LA METHODE

La linéarité de la méthode a été établie dans les conditions les moins favorables à savoir celles obtenues à partir de l'analyse d'un mélange de cinq standards représentatifs des monoterpènes volatils et en utilisant l'acétate de bornyle comme standard interne.

Chaque courbe d'étalonnage a été construite à partir de six niveaux de concentration dans la gamme 0.8 mg.L^{-1} à 25 mg.L^{-1} et en répétant l'analyse de chaque solution étalon trois fois. Le tableau de résultats figure dans l'Annexe F.

D'après la figure III.14, pour les alcènes on a un coefficient de détermination R^2 égal à 0.9929 pour l' α -pinène, 0.9956 pour le β -pinène et de 0.9952 pour le limonène. Malgré la perte partielle de composés très volatils lors de l'étape d'évaporation, une bonne linéarité des droites est observée avec un coefficient de variation (RSD%) inférieur à 11%. Pour les cétones et alcools on a un R^2 de 0.9961 pour le linalol et 0.995 pour le thuyone avec un RSD% inférieur à 9%.

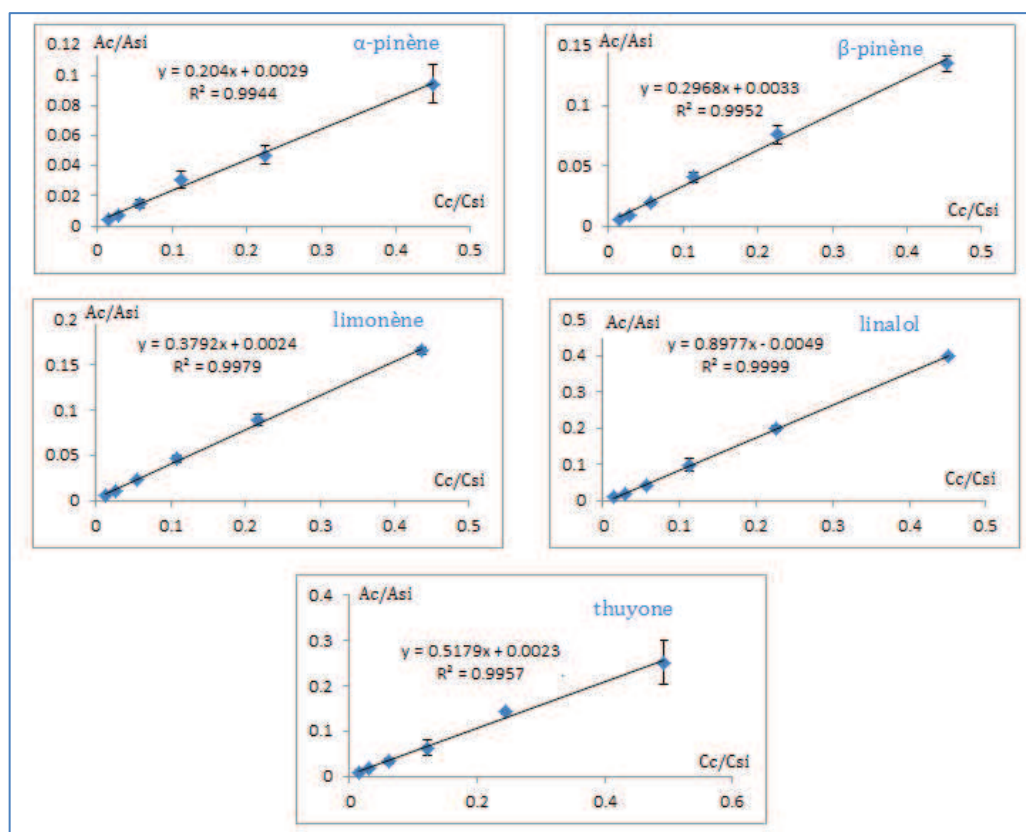


Figure III.14 Courbes de linéarité de l'α-pinène, β-pinène, limonène, linalol et thuyone en utilisant l'acétate de bornyle comme standard interne (SI).

Les graphes représentent l'aire du composé par rapport à l'aire du standard interne en fonction de la concentration du composé par rapport à la concentration du standard interne.

Pour les composés les moins volatils, nous avons également vérifié la linéarité de la méthode en s'intéressant au β-amyrine et à l'acide β-boswellique avec le cholestérol comme standard interne. La linéarité a été évaluée dans une gamme de concentration allant de 5 mg.L⁻¹ à 80 mg.L⁻¹ avec une concentration en standard interne de 40 mg.L⁻¹. D'après la figure III.15, on constate qu'on a un coefficient de détermination R² de 0.9946 pour la β-amyrine et de 0.9916 pour l'acide β-boswellique et une déviation standard relative qui n'excède pas 7%.

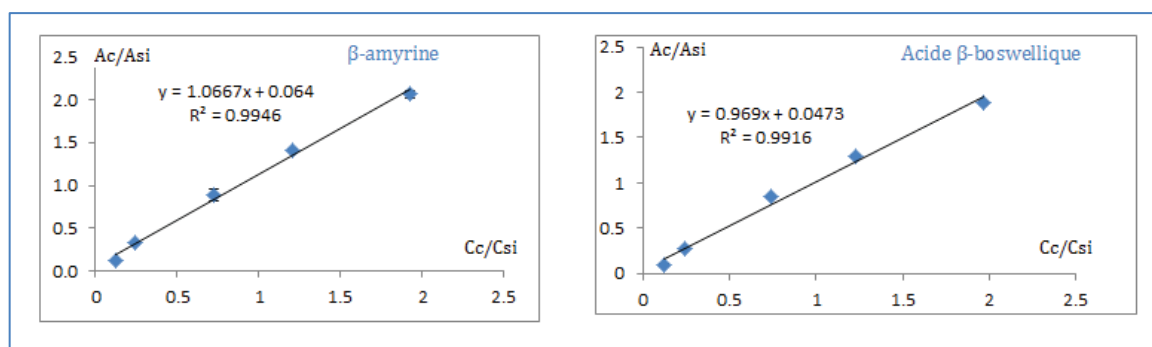


Figure III.15 Courbes de linéarité de la β-amyrine et de l'acide β-boswellique en utilisant le cholestérol comme standard interne (SI).

Les graphes représentent l'aire du composé par rapport à l'aire du standard interne en fonction de la concentration du composé par rapport à la concentration du standard interne.

La linéarité de la réponse (aire relative du signal de chaque soluté par rapport à un standard interne) en fonction de la concentration étant avéré, il est donc possible d'utiliser cette méthode pour quantifier ces solutés dans des échantillons réels.

Après avoir déterminé les performances analytiques de la méthodologie en termes de taux de recouvrement des composés les plus volatils, de limites de détection et de quantification, de répétabilité et linéarité de réponse pour les composés des plus volatils au moins volatils, il nous reste à appliquer cette méthodologie d'analyse à l'étude de la distribution de ces composés terpéniques dans des résines végétales.

III.7 APPLICATION DE LA METHODE GC-MS DEVELOPPEE A L'ANALYSE DES RESINES VEGETALES

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification des molécules présentes dans un matériau végétal, l'étape d'extraction qui permet la désorption spécifique des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice, est primordiale. C'est en effet cette étape qui déterminera la nature et la quantité de molécules extraites et par conséquent qui conditionnera le succès des étapes suivantes. L'extraction de produits naturels se fait généralement selon un procédé de partage des solutés entre le solide (la matrice végétale) et un liquide (le solvant d'extraction). Cette étape nécessite donc à la fois le choix du solvant le plus approprié pour solubiliser sélectivement les molécules d'intérêt et le choix d'une technique d'extraction. Comme on a pu le voir dans le chapitre I, différentes techniques d'extraction solide-liquide sont disponibles. La macération (M) et le Soxhlet sont les méthodes traditionnelles les plus simples mais longues et fastidieuses. Le développement de nouveaux procédés alternatifs a permis de réduire le temps d'extraction ainsi que la consommation de solvant telles que l'extraction par ultrasons (UAE) [20], l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) [21] et l'extraction assistée par solvant pressurisé (PLE) [22].

Nous aborderons donc dans ce paragraphe les choix que nous avons fait en termes de solvant et de technique d'extraction pour isoler à partir de différentes résines végétales, l'ensemble des terpènes présents et ce, de façon la moins discriminante possible par rapport à la grande variété de polarité et de volatilité de ces composés. Ensuite nous caractériserons la distribution terpénique des différents extraits obtenus et nous nous assurerons que l'outil analytique que nous avons développé est bien approprié à la différenciation et l'authentification de ces échantillons de résines.

III.7.1 OPTIMISATION DE L'ETAPE D'EXTRACTION

III.7.1.1 SELECTION DU SOLVANT D'EXTRACTION

Différents solvants couvrant une large gamme de polarité P' allant de l'hexane ($P'=0.0$) à l'éthanol ($P'=5.2$) (tableau III.14 [23]) ont été testés pour extraire le matériel végétal. La résine *Boswellia serrata*, très riche en composés terpéniques, nous a servi d'échantillon modèle pour nos différents essais et les extractions ont été réalisées par la technique d'extraction par solvant pressurisé (PLE), technique rapide et automatisée ne nécessitant pas de filtration de l'échantillon après son extraction puisque cette étape est incluse dans le processus automatisé.

Tableau III.14 Différents solvants testés pour l'extraction des composés terpéniques

Solvant	Polarité globale P'	Viscosité (cP)	Température d'ébullition (°C)
Hexane	0.0	0.33	68
Dichlorométhane	3.1	0.44	39.6
Chloroforme	4.1	0.57	61.2
Acétate d'éthyle	4.4	0.45	77.1
Ethanol	5.2	1.20	78.3

Les rendements d'extraction obtenus pour chaque solvant ont été calculés par le rapport entre la masse d'extraire sec et la masse de végétal sec de départ. La figure III.16 représente pour chaque solvant et à deux températures d'extraction testées (40°C et 90°C), ces rendements d'extraction obtenus à partir d'une masse initiale de 200 mg de résine *Boswellia serrata* finement broyée. Les conditions expérimentales fixées sont décrites en Annexe C.

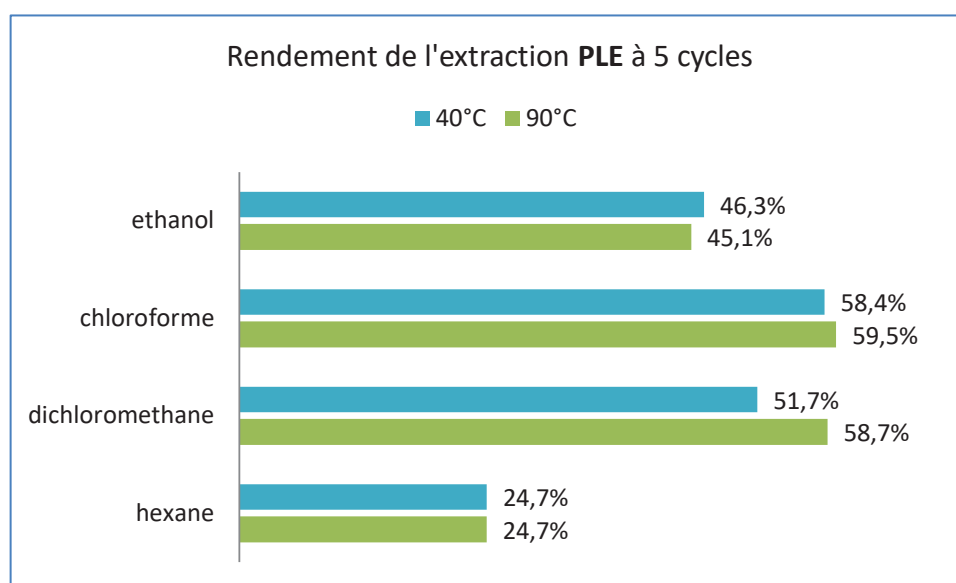


Figure III.16 Rendements d'extraction pour la résine *Boswellia serrata* obtenus pour chaque solvant testé et en utilisant la méthode d'extraction par solvant pressurisée (PLE) (5 cycles d'extraction à 40°C et 90°C)

On constate que le rendement d'extraction le plus faible est obtenu pour l'extraire hexane (solvant apolaire) et les rendements les plus élevés pour les 2 solvants de polarité intermédiaire (chloroforme et dichlorométhane). Une perte de rendement est observée lors de l'extraction dans l'éthanol qui est le solvant le plus polaire parmi ceux testés. Les terpènes, bien que couvrant une large gamme de polarité, restent réputés pour être des composés de polarité moyenne et il est bien vérifié par nos essais qu'ils auront plus d'affinité pour les solvants de polarités moyennes.

La figure III.16 met également en évidence que l'effet sur le taux de recouvrement, d'une élévation de température du solvant d'extraction (passage de 40°C à 90°C) est très faible aussi pour la suite de notre travail, la température d'extraction a été fixée à la valeur de 40°C afin de ne pas entraîner de risques de dégradation des composés terpéniques thermolabiles.

D'autre part, concernant les cycles d'extraction en PLE, ils peuvent être répétés plusieurs fois afin d'optimiser l'extraction. Nous avons voulu évaluer ce paramètre en travaillant avec 3 et 5 cycles pour les deux solvants sélectionnés à savoir le chloroforme et le dichlorométhane et définir le nombre de cycles minimum à effectuer pour épuiser la matière végétale.

D'après la figure III.17, on constate que pour le chloroforme, le passage de 3 à 5 cycles n'entraîne pas d'amélioration importante en termes de masse d'extract sec récupéré. Pour le dichlorométhane on constate une amélioration plus marquée lors du passage de 3 à 5 cycles d'extraction néanmoins le meilleur rendement d'extraction dans ce solvant reste plus faible que celui obtenu avec le chloroforme.

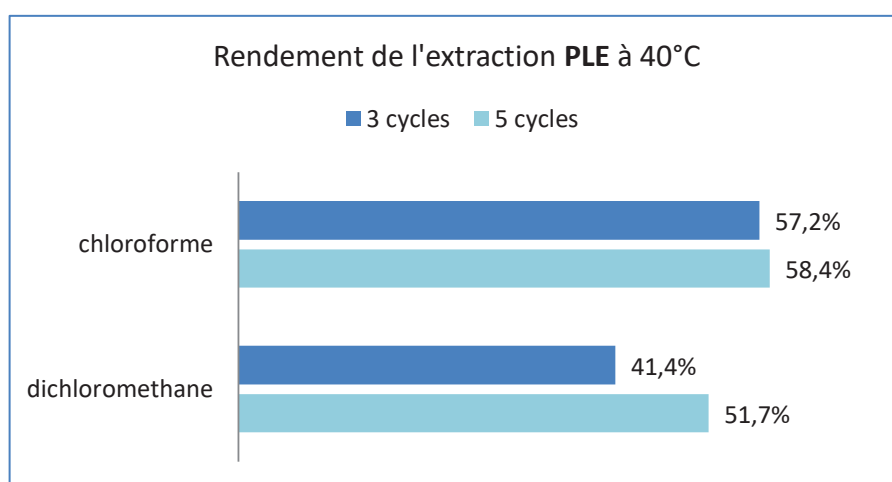


Figure III.17 Rendements d'extraction pour la résine *Boswellia serrata* obtenus par extraction par solvant pressurisé (PLE) à 40°C en utilisant 3 et 5 cycles d'extraction

Pour la suite de notre étude, nous avons sélectionné le chloroforme comme solvant d'extraction avec une température de 40°C et seulement 3 cycles d'extraction appliqués afin d'avoir une méthode plus rapide.

Les résultats de rendements d'extraction obtenus par PLE, montrent que les solvants de polarité intermédiaire sont ceux qui permettent d'obtenir les rendements les plus élevés. Pour la suite de l'étude, nous avons choisi de travailler avec le chloroforme. Ce solvant a été choisi du fait de sa capacité à solubiliser l'ensemble des composés terpéniques. Pour la méthode PLE, nous avons choisi de travailler avec 3 cycles d'extraction à 40°C.

III.7.1.2 SELECTION DE LA TECHNIQUE D'EXTRACTION

- Conditions opératoires

Un solvant d'extraction (le chloroforme) ayant été retenu pour évaluer le contenu terpénique des résines, nous avons ensuite cherché une méthode d'extraction rapide afin de réaliser les nombreuses extractions dans un temps raisonnable tout en permettant des rendements d'extraction suffisants. Ainsi des extraits de résine *Boswellia serrata* ont été réalisés par macération, par ultra-sons, par PLE et par microondes. Nous avons sélectionné pour chaque technique, les conditions adaptées pour l'extraction des terpènes (Annexe C). Le tableau III.15 récapitule les conditions opératoires pour les différentes extractions.

Tableau III.15 Tableau récapitulatif des conditions opératoires pour l'extraction par macération, PLE, microondes et ultrasons.

	Macération	PLE	Microondes	Ultrasons
Quantité de résine	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg
Volume de solvant d'extraction	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL
Conditions	Température ambiante pendant 1 heure	40°C à 3 cycles pendant 20 min	1000 W à 3 cycles de 1 min avec une température qui atteint les 80°C	Bain ultrasons pendant 30 min avec une température qui atteint les 50°C

- COMPARAISON ENTRE LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION

Afin de déterminer l'influence de la technique d'extraction sur l'extraction des composés terpéniques issus de résines végétales, nous avons soumis la résine *Boswellia serrata* à l'extraction par différentes techniques : macération (M), extraction par solvant pressurisé (ASE), extraction assistée par ultrasons (UAE), extraction assistée par microondes (MAE) en utilisant comme solvant d'extraction sélectionné précédemment : le chloroforme.

Rendement d'extraction : La comparaison des rendements d'extraction reportés tableau III.16, met en évidence peu de différences entre les rendements obtenus et ce, quel que soit la technique d'extraction. Pour 200 mg de résine initiale, on obtient après extraction une masse d'extrait sec d'environ 120 mg soit un rendement de 60%.

Tableau III.16 Masse d'extrait sec en mg obtenue pour 200mg de résine *Boswellia serrata* en utilisant quatre techniques d'extraction différentes (conditions en Annexe C) et en utilisant le chloroforme

Technique d'extraction	PLE	MAE	M	UAE
Masse sèche / 200mg d'extrait (mg)	121.6	120.0	121.1	123.6

Distribution des terpènes dans la résine *Boswellia serrata* : Précédemment, on a vu que les rendements d'extraction sont similaires quelle que soit la méthode utilisée et cela pour un même solvant qui est le chloroforme. Nous nous sommes donc intéressées à évaluer la distribution des terpènes dans les différents extraits obtenus de résine *Boswellia Serrata* afin de vérifier que l'ensemble des terpènes était bien extrait sans discrimination spécifique d'une famille donnée et ce quelle que soit la technique d'extraction.

Les différents extraits ont été analysés en GC-MS selon la méthodologie d'analyse que nous avons mis au point dans ce chapitre ce qui nous a permis d'évaluer le pourcentage relatif de mono-, sesqui-, di- et triterpènes dans chacun des extraits obtenus par les 4 techniques d'extraction.

D'après la figure III.18, on constate que la distribution relative en terpène de la résine *Boswellia serrata* reste similaire d'une technique d'extraction à l'autre avec une teneur importante en composés triterpéniques et une faible teneur en composés volatils (mono- et sesquiterpènes).

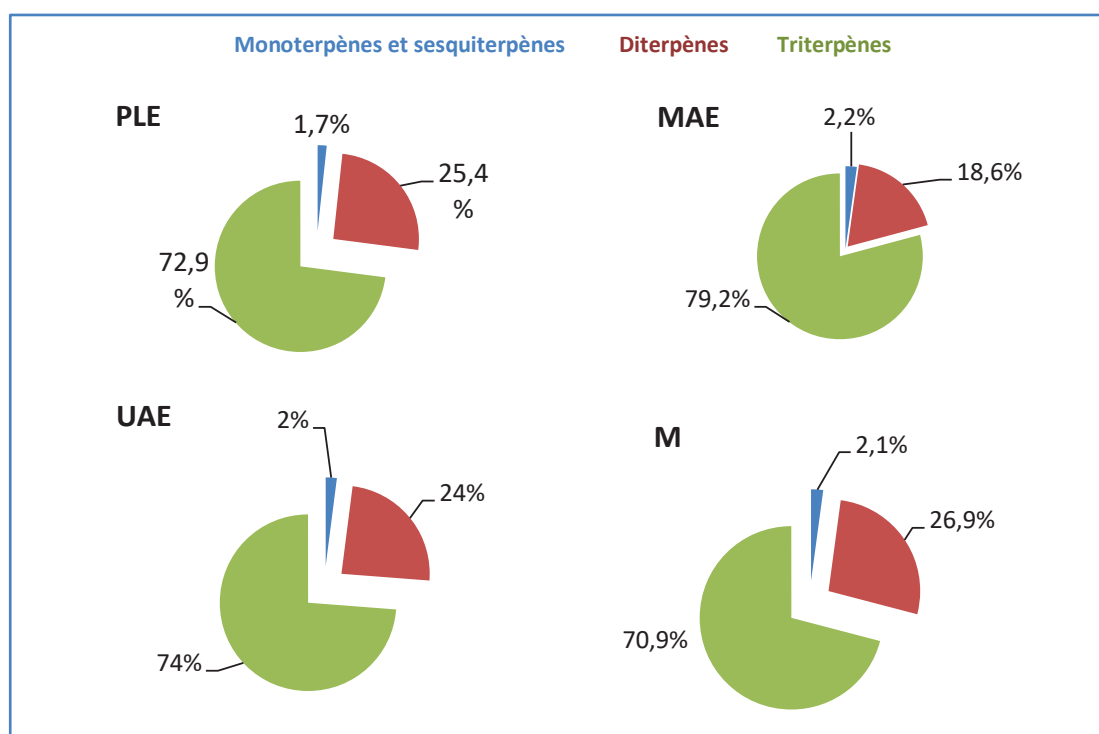


Figure III.18 Distribution relative des terpènes dans la résine *Boswellia serrata* selon la technique d'extraction.

Les 4 méthodes d'extraction testées (macération, extraction par solvant sous pression, extraction microondes, extraction par ultrasons) conduisent à des résultats semblables en termes de rendement d'extraction et de distribution terpénique relative dans les 4 extraits de résine *Boswellia serrata*. Les critères que nous avons retenus pour la sélection de la méthode d'extraction la plus efficace seront donc son coût, sa simplicité ainsi que sa rapidité.

Nous avons choisi pour la suite de travailler avec la méthode d'extraction par solvant pressurisé (PLE) (avec 3 cycles d'extraction et une température de solvant de 40°C) qui est une méthode simple d'utilisation et rapide et qui présente l'avantage par rapport aux 3 autres méthodes de ne pas nécessiter d'étape de filtration ultérieure à l'extraction.

Les résultats optimisés et validés sur des standards peuvent être appliqués à l'étude des résines végétales.

Cette méthode de screening va nous permettre d'analyser l'ensemble des terpènes présents dans différents échantillons de résines végétales. Tout d'abord, nous allons analyser six échantillons de résines appartenant à différentes familles (deux résines triterpéniques, deux résines diterpéniques et deux résines diterpéniques et triterpéniques). L'ensemble des composés identifiés dans chacune de ces 6 résines figure dans le tableau III.16.

Nous avons ensuite appliqué la méthode à l'étude de 4 échantillons de résines appartenant à la même famille Frankincense afin d'évaluer l'aptitude de la méthode à mettre en lumière les différences mêmes les plus subtiles pouvant exister à l'intérieur d'une même famille en fonction de la provenance géographique. L'ensemble des composés identifiés dans chacune de ces 4 résines figure dans le tableau III.17.

III.7.2 ANALYSE DES RESINES TRITERPENIQUES

2 résines triterpéniques ont été étudiées : la résine *Pistacia Lentiscus* provenant de l'île de Chios (Grèce) et la résine Dammar (Indonésie).

La résine *Pistacia Lentiscus* a fait l'objet de nombreuses publications concernant sa composition terpénique. Son analyse nous permettra donc de comparer les performances en terme de screening de la méthodologie GC-MS que nous avons optimisée aux valeurs données dans la littérature.

Après analyse GC-MS de cette résine en utilisant le mode d'ionisation chimique avec le méthane comme gaz réactant (figure III.19), on constate tout d'abord que la résine *Pistacia Lentiscus* ne contient que 3.9% (RSD 2.2%, n=3) de mono et sesquiterpènes et 95.9% (RSD 2.1%, n=3) de triterpènes avec majoritairement la présence de l'acide moronique (**64**), l'acide oléanolique (**65**), l'acide isomasticadienonique (**72**) et l'acide masticadienonique (**74**). Cette identification des composés est basée sur la comparaison des spectres de masse obtenues au cours de l'analyse à ceux disponibles dans la littérature [1, 24].

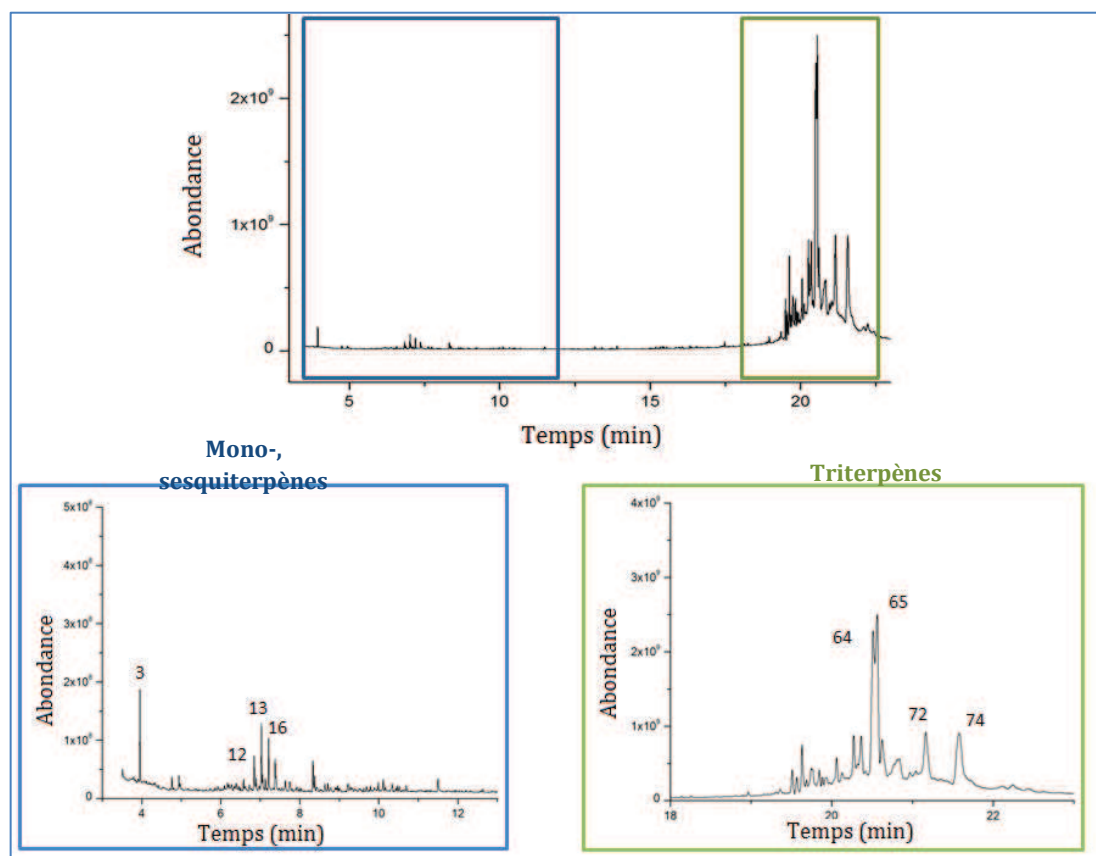


Figure III.19 Analyse en GC-MS de la résine *Pistacia Lentiscus*.

Le carré bleu représente la zone des mono-, sesquiterpènes et le carré vert la zone des triterpènes.

Conditions : Colonne HP-5ms, gaz vecteur hélium débit de 1.2 mL.min⁻¹ Gradient de température : température initiale de 40°C pendant 2 min pour rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 330°C pendant 5 minutes (annexe D).

La résine Dammar, dont l'analyse par GC-MS est présentée en figure II.20, est une résine qui possède encore une plus faible teneur en mono-, et sesquiterpènes avec 1.45% (RSD 6.9%, n=3) que la résine *Pistacia lenticus*. C'est une résine constituée majoritairement de triterpènes à 98.5% (RSD 0.2%, n=3).

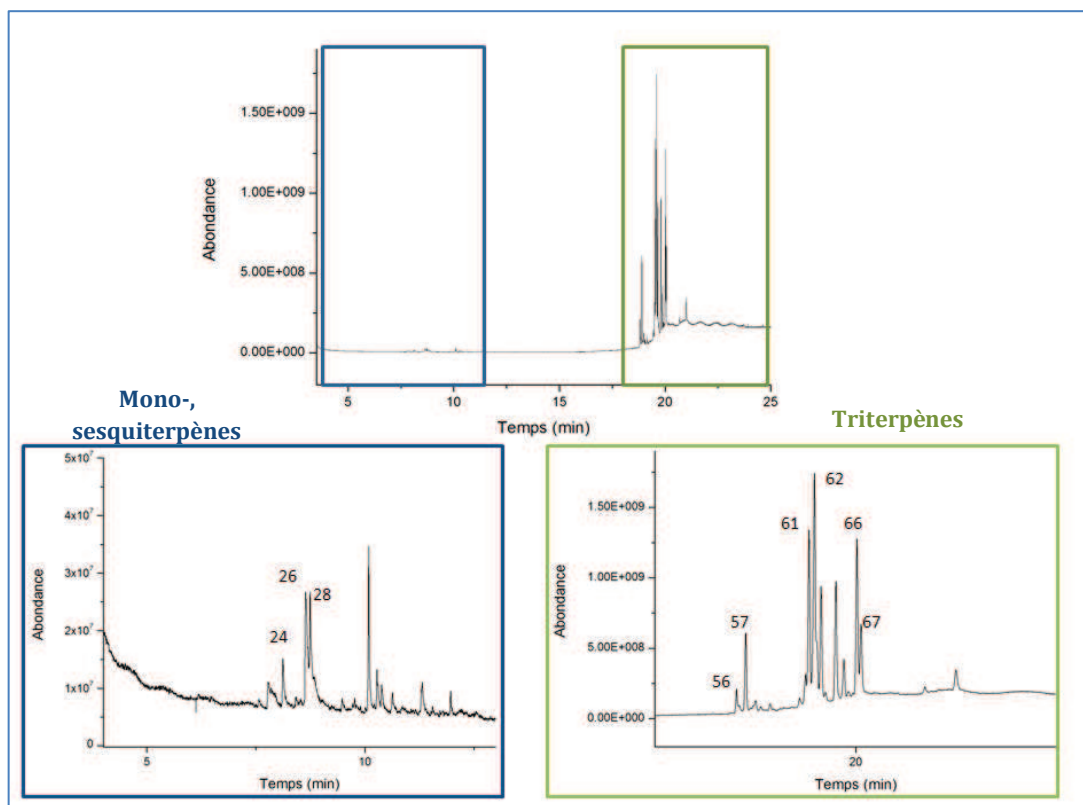


Figure III.20 Analyse en GC-MS de la résine Dammar.

Le carré bleu représente la zone des mono-, sesquiterpènes et le carré vert la zone des triterpènes.

Conditions: Colonne HP-5ms, gaz vecteur hélium débit de 1.2 mL.min⁻¹. Gradient de température : température initiale de 40°C pendant 2 min puis rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 330°C pendant 5 minutes (annexe D).

Après son analyse en GC-MS selon les 2 modes d'ionisation (EI et CI) on identifie le dammaradiénone (**56**) par son ion moléculaire $[M+H]^+$ (m/z 425) et le dammaradiénol (**57**) par son ion pseudomoléculaire $[M+H-H_2]^+$ (m/z 497) (figure III.21). Les triterpènes présents majoritairement sont l'acide dammarénolique (**61**) et l'hydroxydammarenone (**62**) avec une teneur de 11.7% et de 17.3% respectivement dans la résine. Ces résultats confirment ce qu'on observe dans la littérature [25-27].

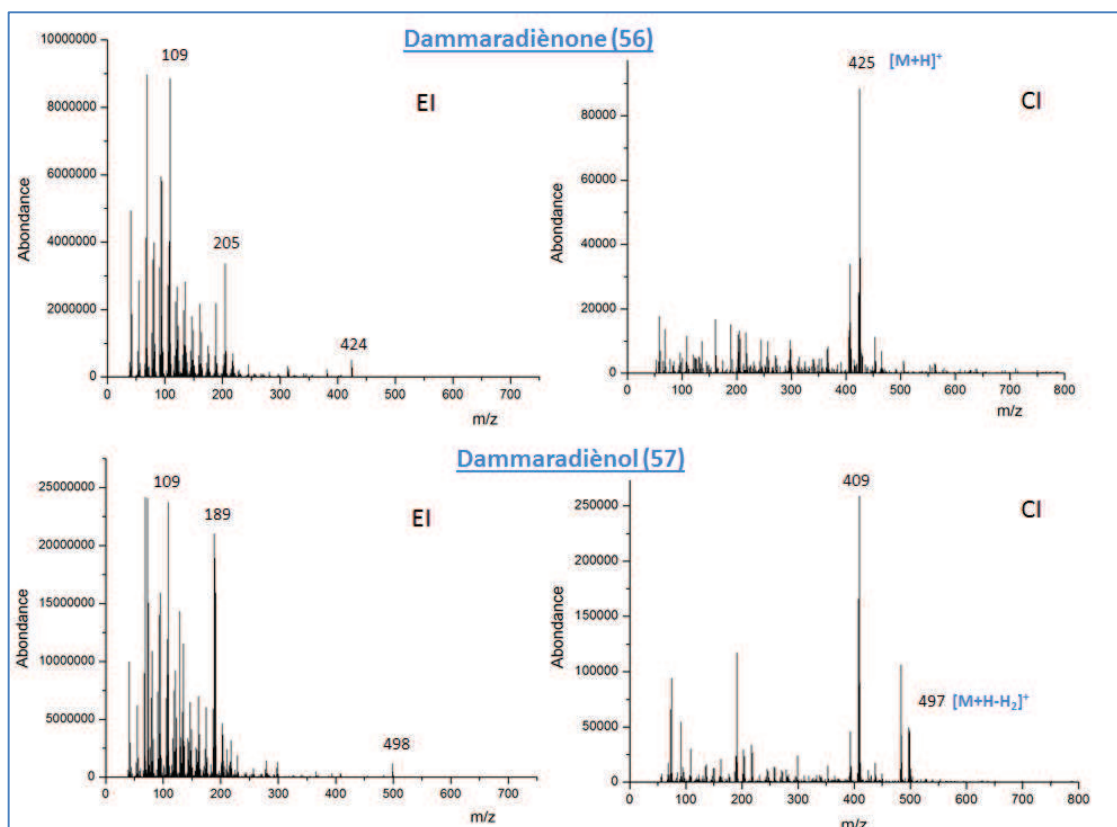


Figure III.21 Spectre de masse du dammaradiénone (56) et du dammaradiénol (57) en mode d'ionisation électronique (EI) et en mode d'ionisation chimique (CI).

Conditions : solvant délais de 3.8 min. EI : température de ligne de transfert 315°C, température de source 250°C. Gamme de masse de m/z 35 – 700 amu en full scan. CI : température de ligne de transfert 300°C, température de source 225°C. Gamme de masse de m/z 50-750 amu en full scan.

III.7.3 ANALYSE DES RESINES DITERPENIQUES

Résine Copal de Manille (figure III.22) : Les monoterpènes majoritaires sont le limonène (**8**), le p-carvone (**15**) et des composés oxygénés (**19**, **27**). Comme diterpènes, on retrouve l'acide pimarique (**36**) et 8 diterpènes oxygénés avec une structure de type labdane (**38**, **40**, **42**, **45**, **49**, **51**, **52**, **53**). Cette identification est basée sur la comparaison des spectres de masses des composés avec ceux de la littérature [28, 29].

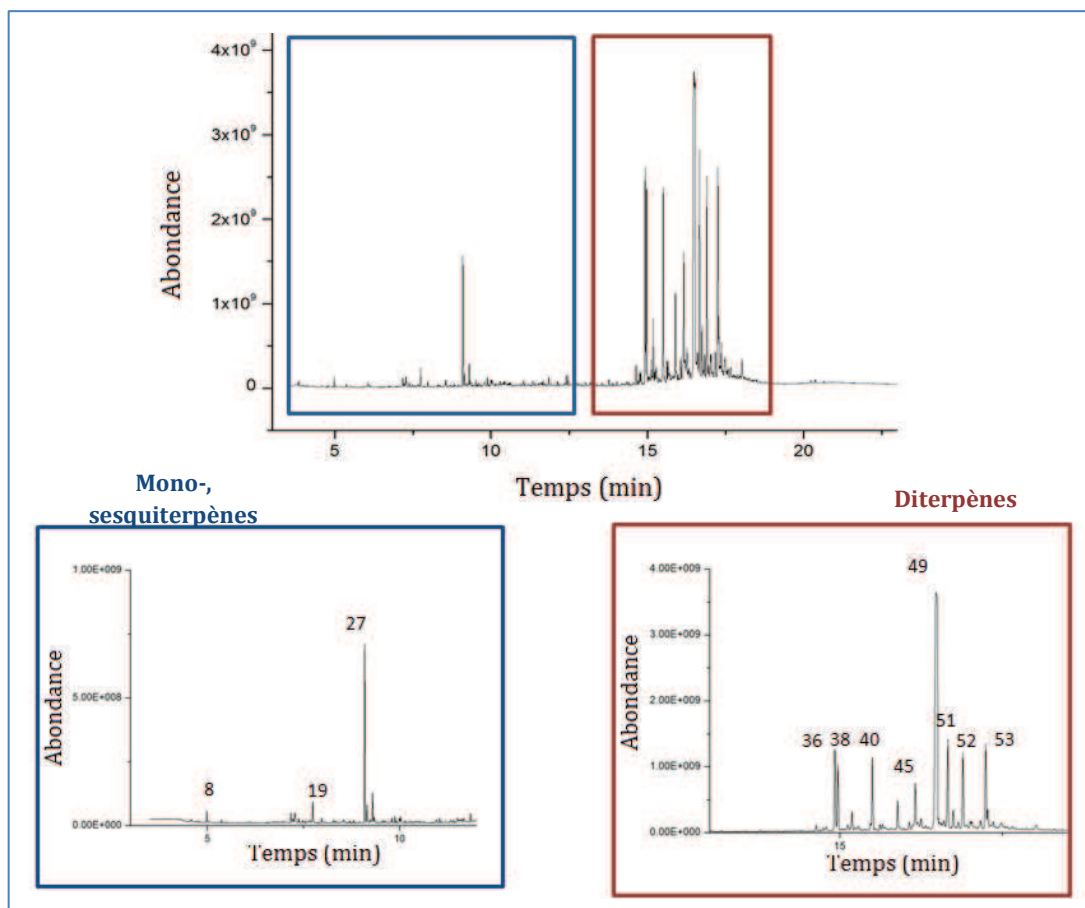


Figure III.22 Analyse en GC-MS de la résine Copal de Manille. Le carré bleu représente la zone des mono-, sesquiterpènes et le carré rouge la zone des diterpènes.

Conditions : Colonne HP-5ms, gaz vecteur hélium débit de 1.2 mL.min⁻¹. Gradient de température : température initiale de 40°C pendant 2 min puis rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 330°C pendant 5 minutes (annexe D).

Sandarac (figure III.23) : La résine sandarac contient 3.8% (RSD 5.8%, n=3) et majoritairement des diterpènes à 94.7% (RSD 7.7%, n=3). On retrouve les acides sandaracopimarique (**35**), dihydro-agathalique (**39**), dihydro-agatholique (**43**) et dihydro-agathique (**48**). L'acide isopimarique (**44**) est le composé majoritairement présent avec une teneur de 19.8%. En absence de standards, on a pu se baser sur la littérature pour avoir une idée des composés présents [30, 31].

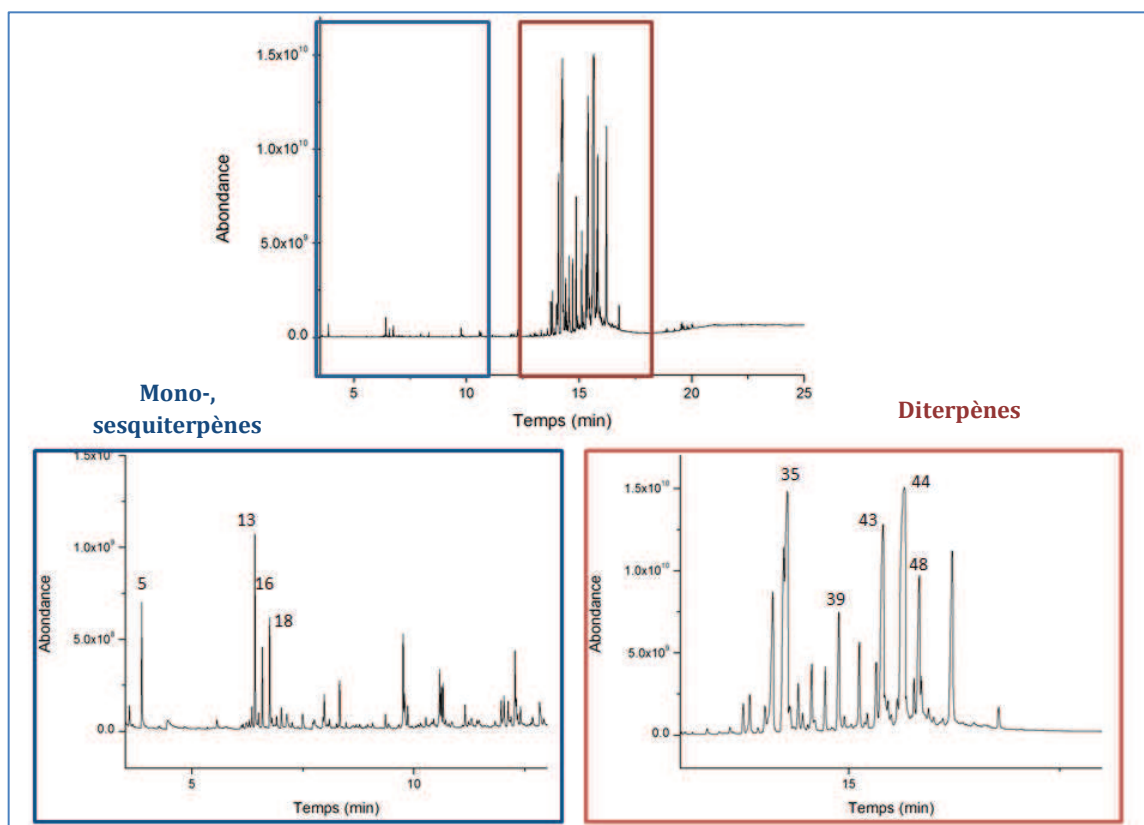


Figure III.23 Analyse en GC-MS de la résine Sandarac.

Le carré bleu représente la zone des mono-, sesquiterpènes et le carré rouge la zone des diterpènes.

Conditions : Colonne HP-5ms, gaz vecteur hélium débit de 1.2 mL.min⁻¹. Gradient de température : température initiale de 40°C pendant 2 min puis rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 330°C pendant 5 minutes (annexe D).

III.7.4 ANALYSE DES RESINES TRITERPENIQUES ET DITERPENIQUES

Nous avons sélectionné les résines *Boswellia serrata* et *Comiphora wildii*. Ces résines possèdent la particularité de contenir les mono-, sesqui-, di et triterpènes simultanément.

Boswellia serrata (figure III.24) : Pour cette résine, on constate que l'on a une teneur de 3.6% (RSD 1.2%, n=3) de mono- et sesquiterpènes avec la présence majoritaire de l' α -thuyène (2), α -pinène (3), p-cymène (7), verbenone (12), verbénol (13), sabinol (16). Concernant les composés diterpéniques, on retrouve majoritairement l'incensole (32) et le serratol (33). Quant aux triterpènes, ils sont présents majoritairement dans cette résine avec une forte teneur en triterpènes de 75.5% (RSD 4.6%, n=3). On retrouve notamment le 3-épi- β -amyrine (54), 3-épi- α -amyrine (55), les acides α -boswellique (60) et β -boswellique (63) ainsi que les acides acétyle- α -boswellique (68) et acétyle- β -boswellique (70). Ces composés sont connus pour être présents majoritairement dans la résine *Boswellia serrata*.

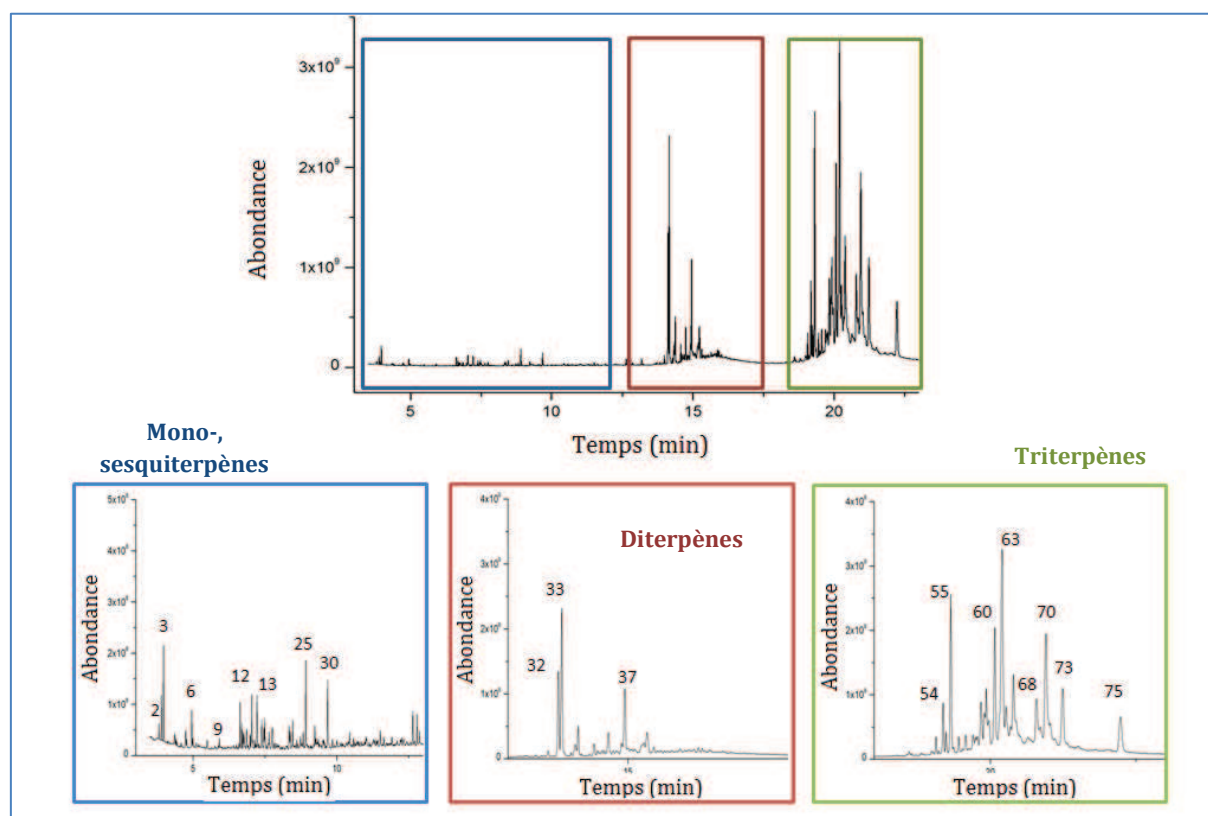


Figure III.24 Analyse en GC-MS de la résine *Boswellia serrata*.

Le carré bleu représente la zone des mono-, sesquiterpènes, le carré rouge la zone des diterpènes et le carré vert la zone des triterpènes. Conditions : Colonne HP-5ms, gaz vecteur hélium débit de 1.2 mL.min⁻¹. Gradient de température : température initiale de 40°C pendant 2 min puis rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 330°C pendant 5 minutes (annexe D).

Commiphora wildii (figure III.25) : Contrairement à la résine *Boswellia serrata*, la résine *Commiphora wildii* est beaucoup moins étudiée. Beaucoup d'études concernent la résine *Commiphora myrrha* qui contient de nombreux mono-, sesqui et furanosesquiterpénoides. Pour la résine *Commiphora wildii*, nous avons pu caractériser comme monoterpènes majoritaires l' α -pinène (**3**), le β -pinène (**5**), le β -phéllandrène (**6**), le p-cymène (**7**), la verbenone (**12**) et le verbénol (**13**). La fraction diterpénique représente 16.8% de l'ensemble des terpènes et les composés observés n'ont pas pu être identifiés du fait de l'absence de standards correspondants et de spectres de masse comparables en bibliothèque. Quant à la fraction triterpénique qui est à une teneur de 40.3% (RSD 3.8%, n=3), il a été possible d'identifier l'acide moronique (**64**) et un acide triterpénique (**69**) possédant les fragments caractéristiques m/z 320 et 203 (ionisation électronique) et un ion moléculaire m/z 509 qui correspond à $[M+H-H_2]^+$.

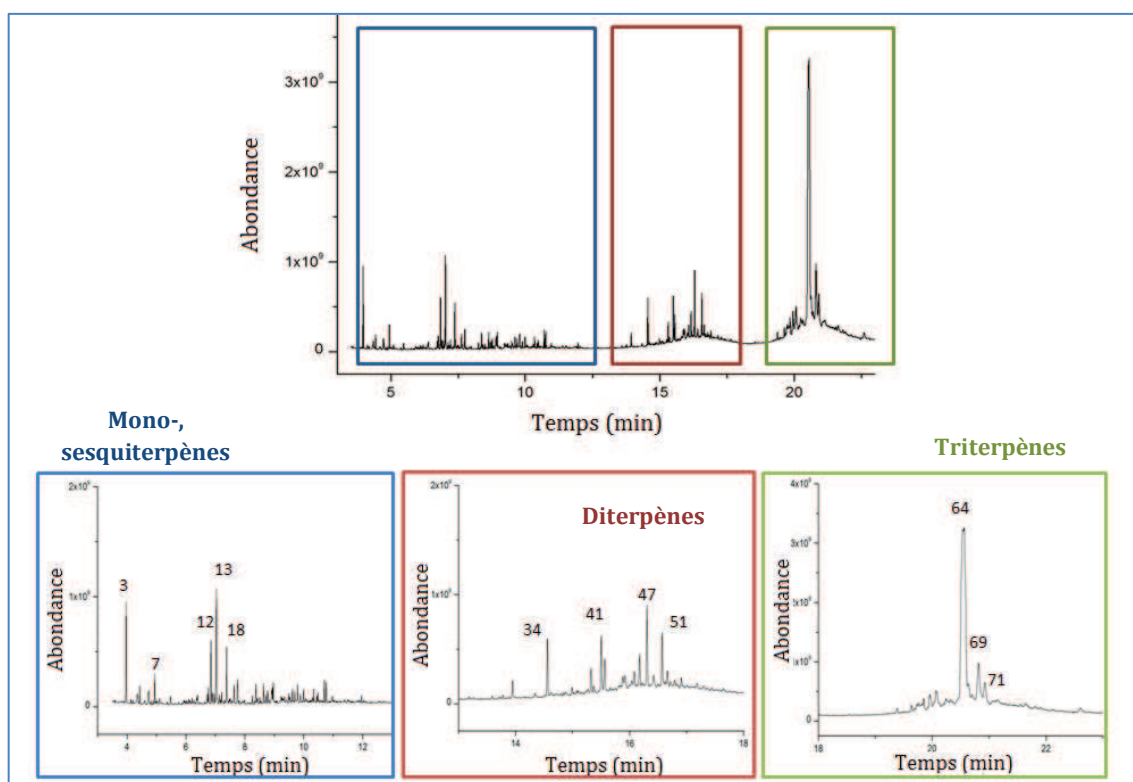


Figure III.25 Analyse en GC-MS de la résine *Commiphora wildii*.

Le carré bleu représente la zone des mono-, sesquiterpènes, le carré rouge la zone des diterpènes et le carré vert la zone des triterpènes. Conditions : Colonne HP-5ms, gaz vecteur hélium débit de 1.2 mL.min⁻¹. Gradient de température : température initiale de 40°C pendant 2 min puis rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 330°C pendant 5 minutes (annexe D).

Chapitre III – Développement GC-MS pour l'analyse des mono- aux triterpènes

Tableau III.17 Liste des composés identifiés dans les résines végétales en GC-MS

Pic	t _R *	Composé	Mw*	Pourcentage relative (%)						Données spectres de masse (70 eV) Ions caractéristiques m/z (%)	Ionisation chimique (positive)	ID*
				Résines triterpénique		Résines diterpénique		Résines di- et triterpénique				
				<i>Pistacia lentiscus</i>	Dammar	Copal	Sandarac	<i>Boswellia Serrata</i>	<i>Commiphora wildii</i>			
Mono- and sesquiterpènes												
1	3.85	Tricyclène	136			0.09				77 (25), 91 (35), 93 (100), 121 (20), 136 (20)	137 [M+H ⁺]	L
2	3.90	α-thuyène	136					0.16		77 (42), 93 (100), 136 (10)	135 [M+H ⁺ -H ₂]	L
3	3.97	α-pinène	136	0.53				0.35	2.34	77 (30), 91 (50), 93 (100), 121 (10), 136 (10)	135 [M+H ⁺ -H ₂]	S
4	4.13	Camphène	146				0.05	Tr		67 (35), 93 (100), 121 (70), 136 (20)	-	S
5	4.44	β-pinène	136				0.25	Tr	0.40	41 (52), 69 (30), 93(100), 121 (10), 136 (10)	135 [M+H ⁺ -H ₂]	S
6	4.73	β-phellandène	136					0.07	0.53	77 (40), 91 (40), 93 (100), 136 (15), 145 (10)	137 [M+H ⁺]	L
7	4.95	p-cymène	134	0.06				0.13	0.71	91 (30), 119 (100), 134 (30)	133 [M+H ⁺ -H ₂]	L
8	4.99	D-limonène	136			0.20		0.02		67 (65), 93 (100), 121 (35), 136 (30)	135 [M+H ⁺ -H ₂]	S
9	5.48	Υ-terpinène	136					0.02	0.24	43 (45), 77 (40), 93 (100), 121 (25), 136 (30)	135 [M+H ⁺ -H ₂]	L
10	5.92	Thuyone	152					0.02		41 (100), 67 (55), 110 (50), 152 (10)	153 [M+H ⁺]	S
11	6.74	Estragol	148					0.05		77 (55), 117 (55), 148 (100)	149 [M+H ⁺]	L
12	6.86	Verbénone	150	0.21				0.10	1.67	91 (70), 107 (100), 135 (65), 150 (40)	151 [M+H ⁺]	L
13	7.04	Verbénol-TMS	224	0.49			0.40	0.22	3.23	73 (100), 91 (25), 119 (30), 144 (90), 165 (20), 181 (30), 209 (15)	223 [M+H ⁺ -H ₂]	L
14	7.07	Linalol-TMS	226					Tr		73 (100), 93 (50), 121 (15), 143 (100), 211 (5)	-	S
15	7.17	Carvone	150			0.18				54 (55), 82 (100), 93 (50), 108 (35), 134 (15), 150 (10)	151 [M+H ⁺]	L
16	7.22	Sabinol-TMS	224	0.29			0.17	0.22		73 (100), 119 (25), 156 (20), 181 (20), 209 (25), 224 (10)	223 [M+H ⁺ -H ₂]	L
17	7.28	Monoterpène oxygéné	182			Tr				73 (100), 155 (60), 183 (75), 209 (15)	183 [M+H ⁺]	-
18	7.38	Monoterpène oxygéné	224	0.26			0.27		1.46	73 (100), 92 (30), 119 (20), 134	223 [M+H ⁺ -H ₂]	-

Chapitre III – Développement GC-MS pour l'analyse des mono- aux triterpènes

						(20), 155 (70), 181 (10) 73 (100), 91 (30), 119 (30), 181 (30), 209 (25), 224 (20)	225 [M+H ⁺]	-
19	7.75	Monoterpène oxygéné	224		0.46	73 (100), 131 (90), 159 (20), 201 (20)	200 [M+H ⁺ -H ₂]	-
20	8.34	Monoterpène oxygéné	201	0.22		81 (100), 123 (60), 161 (25), 178 (10)	203 [M+H ⁺ -H ₂]	L
22	8.47	β-bourbonène	204		0.10	77 (20), 91 (40), 141 (40), 163 (35), 178 (100)	179 [M+H ⁺]	L
23	8.61	Méthyl-eugenol	178		0.02	79 (80), 91 (70), 105 (75), 119 (45), 133 (85), 161 (30), 189 (20), 204 (10)	205 [M+H ⁺]	S
24	8.65	β-caryophyllène		0.1		73 (75), 143 (15), 231 (100), 232 (20)	231 [M+H ⁺ -H ₂]	-
25	8.92	Monoterpène oxygéné	232		0.34	79 (45), 91 (70), 105 (70), 119 (45), 133 (25), 161 (100), 204 (15)	205 [M+H ⁺]	L
26	9.06	D-Germacrène	204	0.6		73 (85), 143 (100), 184 (20), 224 (10), 314 (10)	225 [M+H ⁺]	-
27	9.10	Monoterpène oxygéné	224		2.84	77 (40), 79 (55), 93 (80), 121 (100), 161 (40), 189 (10), 204 (15)	205 [M+H ⁺]	L
28	9.15	Elémène	204	0.4		73 (30), 143 (100)		-
29		Sesquiterpène oxygéné	-		X	43 (100), 81 (40), 108 (90), 126 (70), 149 (15)		-
30	9.68	Sesquiterpène	-		0.28	73 (90), 131 (20), 143 (100), 187 (15), 202 (20)		-
31	10.76	Sesquiterpène oxygéné	-		0.54			
Diterpènes								
32	14.13	Incensole-TMS	378		0.20	43 (85), 73 (95), 125 (100), 228 (15), 378 (15)	377 [M+H ⁺ -H ₂]	L
33	14.17	Serratol-TMS	362		8.99	73 (100), 143 (35), 158 (95), 224 (30), 362 (10)	361 [M+H ⁺ -H ₂]	L
34	14.55	Diterpène oxygéné	374		1.61	73 (100), 93 (45), 149 (25), 213 (20), 257 (20), 374 (15)	375 [M+H ⁺]	-
35	14.60	Acide sandaracopimarique-TMS	374		19.44	73 (100), 175 (60), 242 (45), 256 (40), 359 (40), 374 (30)	375 [M+H ⁺]	L
36	14.93	Acide pimarique - TMS	374		5.77	73 (100), 121 (65), 156 (55), 230 (70), 359 (15), 374 (15)	375 [M+H ⁺]	L
37	14.96	Diterpène oxygéné	376		3.67	73 (100), 143 (20), 158 (20), 171 (40), 335 (10)	377 [M+H ⁺ -H ₂]	-
38	14.98	Diterpène oxygéné	362		4.96	73 (100), 81 (85), 156 (80), 172 (60), 215 (50), 230 (95), 347	363 [M+H ⁺]	-

Chapitre III – Développement GC-MS pour l'analyse des mono- aux triterpènes

						(15)		
39	15.00	Acide dihydroagathalique-TMS	392	4.09		73 (100), 121 (95), 274 (25), 377 (25)	375 [M+H] ⁺	L
40	15.19	Diterpène oxygéné	362	1.74		73 (100), 123 (50), 156 (55), 172 (50), 230 (50), 347 (10)	363 [M+H] ⁺	-
41	15.50	Diterpène oxygéné	362		1.57	73 (100), 211 (20), 255 (10), 419 (10)	465 [M+H] ⁺	-
42	15.51	Diterpène oxygéné	464	5.52		73 (80), 121 (25), 143 (100), 257 (10), 449 (10)	465 [M+H] ⁺	-
43	15.91	Acide Dihydroagatholique-TMS	366	11.82		73 (95), 121 (100), 143 (50), 348 (30), 451 (20)	367 [M+H] ⁺	L
44	16.01	Acide isopimarique-TMS	374	19.84		73 (100), 121 (65), 241 (70), 256 (60), 359 (20), 374 (20)	375 [M+H] ⁺	L
45	16.17	Diterpène oxygéné	450	4.65		73 (100), 143 (35), 156 (20), 229 (30), 244 (40), 311 (15)	451 [M+H] ⁺	-
47	16.30	Diterpène oxygéné	-		2.27	73 (100), 143 (20), 169 (70), 211 (20), 462 (5)		-
48	16.36	Acide dihydroagathique TMS	480	6.78		73 (100), 121 (80), 362 (50), 465 (20), 480 (5)	481 [M+H] ⁺	L
49	16.49	Diterpène oxygéné	420	27.50		73 (100), 121 (50), 189 (35), 271 (20), 302 (25), 307 (30)	421 [M+H] ⁺	-
50	16.56	Diterpène oxygéné	462		1.56	73 (100), 143 (20), 211 (20), 255 (10)	463 [M+H] ⁺	-
51	16.67	Diterpène oxygéné	464	6.06		73 (100), 156 (25), 172 (30), 189(10), 332 (5), 361 (5)	465 [M+H] ⁺	-
52	16.90	Acide Agathique-TMS	478	5.49		73 (100), 121 (20), 189 (15), 244 (20), 307 (10), 346 (15)	479 [M+H] ⁺	L
53	17.25	Diterpène oxygéné	434	7.62		73 (100), 107 (45), 156 (60), 172 (65), 302 (30)	435 [M+H] ⁺	-
Triterpènes								
54	19.19	3-épi-β-amyrine-TMS	498		2.15	73 (50), 190 (50), 203 (45), 218 (100), 281 (10)	497 [M+H-H ₂] ⁺	L
55	19.32	3-épi-α-amyrine-TMS	498		8.19	73 (40), 190 (50), 203 (20), 218 (100), 498 (10)	497 [M+H-H ₂] ⁺	L
56	19.38	Dammaradiénone	424	2.1		69 (100), 109 (100), 161 (30), 189 (30), 205 (35)	425 [M+H] ⁺	L
57	19.47	Dammaradiénol-TMS	498	4.6		73 (100), 109 (95), 129 (60), 135 (50), 189 (85), 498 (5)	497 [M+H-H ₂] ⁺	L
58	19.60	β-amyrone	424	0.6		129 (20), 189 (25), 203 (45), 218 (100)	425 [M+H] ⁺	L

Chapitre III – Développement GC-MS pour l'analyse des mono- aux triterpènes

59	19.93	α -amyrine-TMS	498	0.6	6.13	73 (40), 189 (35), 218 (100), 279 (5), 498 (5)	497 [M+H-H ₂] ⁺	S
60	20.07	Acide α -boswellique-TMS	600		6.92	73 (74), 203 (20), 218 (100), 292 (70), 585 (10)	599 [M+H ⁺ -H ₂]	S
61	20.10	Acide dammarénolique-TMS	602	11.7		69 (50), 73 (20), 199 (100), 388 (10), 431 (10)	601 [M+H ⁺ -H ₂]	L
62	20.12	Hydroxydammarénone-TMS	514	17.3		69 (50), 73 (20), 199 (100), 388 (10), 431 (10)	515 [M+H ⁺]	L
63	20.18	Acide β -boswellique-TMS	600		15.69	73 (70), 203 (40), 218 (100), 292 (55), 585 (10)	599 [M+H ⁺ -H ₂]	S
64	20.51	Acide moronique-TMS	526	18.43	40.37	73 (100), 189 (80), 203 (30), 307 (15), 409 (15), 526 (15)	527 [M+H ⁺]	L
65	20.56	Acide oleanolique-TMS	600	18.66		73 (80), 189 (65), 203 (100), 320 (15), 408 (45), 526 (15)	599 [M+H ⁺ -H ₂]	S
66	20.65	Acide ursonique-TMS	562	9.3		105 (20), 133 (50), 203 (100), 232 (10)		L
67	20.68	Aldéhyde ursonique-TMS	510	4.2		73 (40), 133 (40), 190 (40), 203 (100), 232 (10)	511 [M+H ⁺]	L
68	20.76	Acide α -acétyle boswellique-TMS	570		4.32	73 (70), 203 (20), 218 (100), 292 (40), 352 (10), 475 (5)	569 [M+H ⁺ -H ₂]	S
69	20.82	Acide triterpène -TMS	600		5.25	73 (100), 133 (65), 203 (80), 320 (20), 436 (10)	599 [M+H ⁺ -H ₂]	-
70	20.91	Acide β -acétyle boswellique-TMS	570		9.86	73 (100), 203 (55), 218 (100), 292 (40), 352 (10), 475 (5)	569 [M+H ⁺ -H ₂]	S
71	20.92	Acide Triterpène -TMS	526		2.44	73 (100), 119 (60), 189 (40), 245 (25), 526 (15)	527 [M+H ⁺]	-
72	21.16	Acide isomasticadiénolique-TMS	526	8.60		73 (100), 207 (80), 421 (40), 511 (60), 526 (20)	527 [M+H ⁺]	L
73	21.19	Acide 11-keto- β -boswellique-TMS	614		5.02	73 (100), 232 (30), 273 (75), 485 (25), 614 (20)	615 [M+H ⁺]	S
74	21.58	Acide masticadiénolique -TMS	526	10.98		73 (100), 207 (80), 421 (30), 511 (50), 526 (10)	527 [M+H ⁺]	L
75	22.17	Acide 3-O-acetyl-11-keto- β -boswellique -TMS	584		3.74	73 (40), 135 (45), 232 (40), 273 (100), 525 (15), 584 (10)	585 [M+H ⁺]	S

*(t_R = temps de rétention; Mw = masse molaire (g.mol⁻¹); ID =Identification : L, librairie NIST et spectres de masse publiés dans la littérature; S, composés standards)

III.7.5 DIFFERENCIATION DES RESINES DE TYPE FRANKINCENSE

Nous allons utiliser la méthodologie GC-MS mise en place pour différencier les résines de type de Frankincense qui sont assez proches en composition : *Boswellia neglecta*, *Boswellia carterii*, *Boswellia sacra* et *Boswellia serrata*. D'après le chapitre II, l'analyse TLC a montré une grande similitude entre ces résines du point de vue de leur composition en acides triterpéniques mais également des différences visuelles que l'on n'a pas pu associer à des structures de composés par l'absence de standards correspondants et par l'impossibilité d'ioniser ces composés en MALDI-TOF-MS. De ce fait, nous nous sommes intéressées pour ces résines à caractériser l'ensemble de leur contenu terpénique par l'analyse GC-MS afin d'avoir une information structurale la plus exhaustive possible.

Les chromatogrammes obtenus sont représentés figure III.26. Tout d'abord, on constate que pour l'ensemble de ces 4 résines, la teneur en triterpènes est élevée et du même ordre de grandeur avec des valeurs de 88.1%, 71.1%, 79.0% et 77.2% pour la *Boswellia neglecta*, *Boswellia carterii*, *Boswellia sacra* et *Boswellia serrata* respectivement. Cependant, la teneur en mono-, sesqui- et diterpènes varie d'une résine à l'autre mettant en évidence leurs différences. En effet, les résines *Boswellia neglecta* et *Boswellia serrata* possèdent les plus faibles teneurs en diterpènes avec une valeur de 0.6% et de 2.4% respectivement. En revanche, les résines *Boswellia carterii* et *Boswellia sacra* possèdent toutes les deux une teneur de l'ordre de 18% en diterpènes. Concernant, la fraction volatile (mono- et sesquiterpènes), la résine *Boswellia sacra* a une teneur de 18.6%, *Boswellia neglecta* et *Boswellia carterii* environ 11% et la *Boswellia neglecta* de 4.1% comme observée dans le paragraphe précédent.

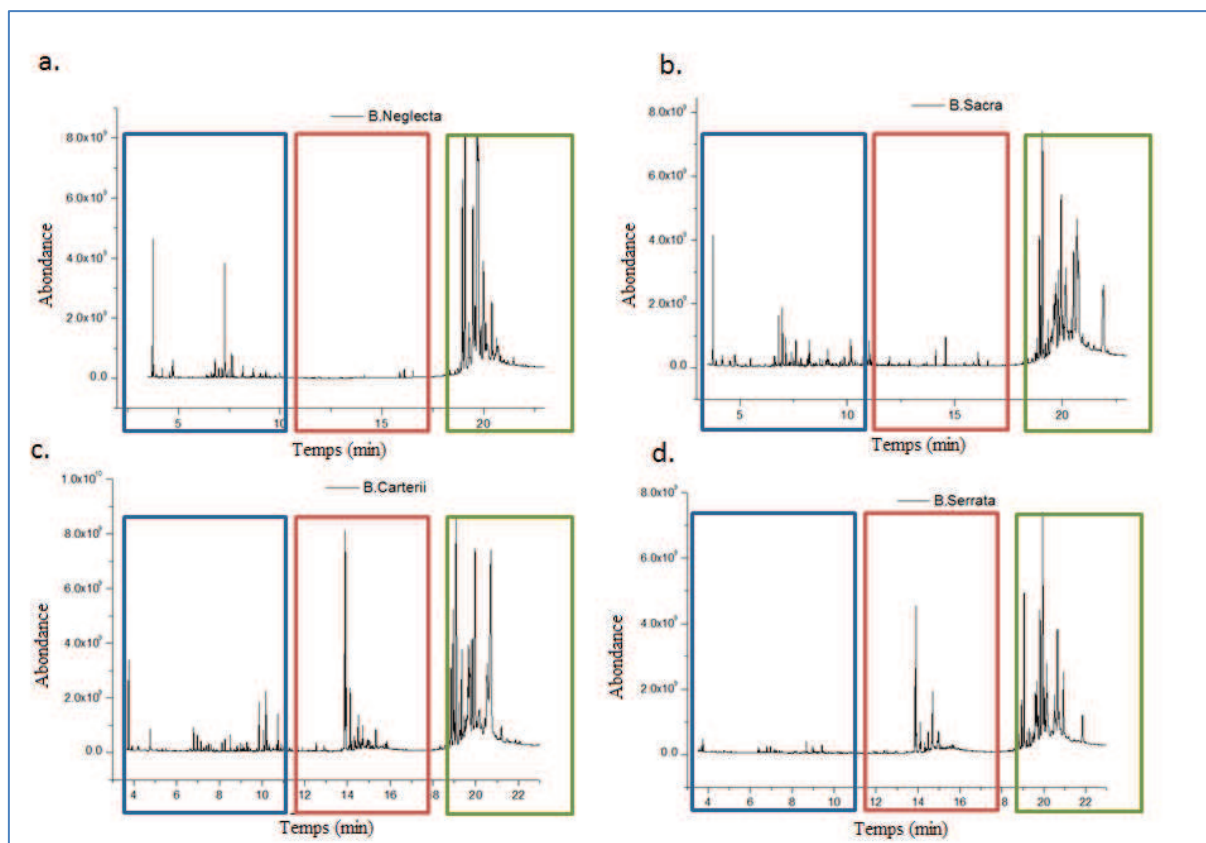


Figure III.26 Analyse en GC-MS des résines : *Boswellia neglecta* (a), *Boswellia sacra* (b), *Boswellia carterii* (c) et *Boswellia serrata* (d).

Le carré bleu représente la zone des mono-, sesquiterpènes, le carré rouge la zone des diterpènes et le carré vert la zone des triterpènes. Conditions: Colonne HP-5ms, gaz vecteur hélium débit de 1.2 mL.min⁻¹. Gradient de température : température initiale de 40°C pendant 2 min puis rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 330°C pendant 5 minutes (annexe D).

Afin de caractériser les différences, nous avons appliqué la méthode GC-MS en modes ionisation électronique (EI) et ionisation chimique (CI) pour identifier les composés en se basant sur la comparaison de leurs temps de rétention et de leurs spectres de masse avec ceux de standards ou de données disponibles dans la littérature. L'ensemble des composés identifiés est regroupé dans le tableau III.17.

Tout d'abord, en s'intéressant aux composés triterpéniques, on constate que l'acide α -boswellique (44) et l'acide β -boswellique (45) sont présents dans l'ensemble des résines comme on a pu l'observer lors de l'analyse TLC et TLC-MALDI-TOF-MS (chapitre II). D'autre part, on observe la présence de triterpènes de type alcool (3-épi- β -amyrine (39), 3-épi- α -amyrine (40), β -amyrine (42), α -amyrine (43)) dans l'ensemble des résines à différentes teneurs. Ces composés n'ont pas pu être identifiés en MALDI-TOF-MS car ils présentent peu de protons labiles et ne sont donc pas compatibles avec une ionisation par MALDI.

On constate par ailleurs que l'acide acétyl- α -boswellique (47) et l'acide acétyl- β -boswellique (48) sont uniquement présents dans les résines *Boswellia carterii*, *Boswellia sacra* et *Boswellia serrata*. Ce qui permet de différencier ces 3 résines de la *Boswellia neglecta*.

L'identification des mono-, sesqui- et diterpènes permet de mettre en évidence les différences qu'on a observé sur plaque TLC dans le chapitre précédent. Tout d'abord, on constate que la résine *Boswellia sacra* possède une teneur importante en composés volatils comparée aux autres résines avec la présence de l' α -pinène (2), du verbénol (13) et du sabinol (15). La résine *Boswellia serrata* étudiée précédemment, possède quant à elle, la fraction la plus faible en mono- et sesquiterpènes (0.6%) dont la composition a déjà été détaillée (§III.7.3).

Les 2 résines africaines ont la même teneur en composés volatils. Les composés volatils majoritaires de la résine *Boswellia neglecta* sont l' α -pinène (2), le 3-carène (6), le p-cymène (7), le D-limonène (8), le verbénone (12), le verbénol (13), le sabinol (15), le terpinène-4-ol (16) et des sesquiterpènes oxygénés (23, 25 et 29). La fraction volatile de la résine *Boswellia carterii* est assez semblable mais avec des proportions différentes. La présence spécifique du α -copaène (18) et du β -élémane (20) comme sesquiterpénoïdes dans la résine *Boswellia carterii* permet de différencier les deux résines africaines.

En analysant la fraction diterpénique de ces résines, on constate la présence de l'incensole (31) et du serratol (32) dans la résine *Boswellia carterii* et *Boswellia serrata*. Ces deux composés sont absents dans les 2 autres résines *Boswellia sacra* et *Boswellia neglecta*.

Pour cette application, on a pu voir que la méthode GC-MS confirme les résultats obtenus en TLC et TLC-MALDI-TOF-MS pour les composés triterpéniques. De plus, on peut mettre en évidence de nombreuses différences entre des résines proches en considérant la fraction volatile et les diterpènes.

Chapitre III – Développement GC-MS pour l'analyse des mono- aux triterpènes

Tableau III.18 Liste des composés identifiés dans les résines végétales de type Frankincense en GC-MS

Pic	tr*	Nom	Mw*	Pourcentage relative (%)				Données spectres de masse (70 eV) Ions caractéristiques m/z (%)	Ionisation chimique (positive)	ID*
				Boswellia Neglecta	Boswellia Carterii	Boswellia Sacra	Boswellia Serrata			
Mono- and sesquiterpènes										
1	3.68	α-thuyène	136	0.57			0.16	77 (42), 93 (100), 136 (10)	135 [M+H- H_2] ⁺	L
2	3.75	α-pinène	136	2.77	1.53	2.95	0.36	77 (30), 91 (50), 93 (100), 121 (10), 136 (10)	135 [M+H- H_2] ⁺	S
3	3.92	Camphène	146	0.10	0.05	0.12	Tr	67 (35), 93 (100), 121 (70), 136 (20)	-	S
4	4.22	β-pinène	136	0.20	0.12		Tr	41 (52), 69 (30), 93(100), 121 (10), 136 (10)	135 [M+H- H_2] ⁺	S
5	4.53	β-phellandène	136			0.21	0.02	77 (40), 91 (40), 93 (100), 136 (15), 145 (10)	137 [M+H] ⁺	L
6	4.57	3-carène	136	0.11		0.14		77 (35), 91 (50), 93 (100), 121 (20), 136 (20)	135 [M+H- H_2] ⁺	L
7	4.74	p-cymène	134	0.57	0.07		0.16	91 (30), 119 (100), 134 (30)	133 [M+H- H_2] ⁺	L
8	4.77	D-limonène	136	0.14	0.41	0.27		67 (65), 93 (100), 121 (35), 136 (30)	135 [M+H- H_2] ⁺	S
9	5.27	γ-terpinène	136			0.08	0.02	43 (45), 77 (40), 93 (100), 121 (25), 136 (30)	135 [M+H- H_2] ⁺	L
10	5.82	Thuyone	152				0.02	41 (100), 67 (55), 110 (50), 152 (10)	153 [M+H] ⁺	S
11	6.50	Estragol	148				0.05	77 (55), 117 (55), 148 (100)	149 [M+H] ⁺	L
12	6.62	Verbénone	150	0.18			0.10	91 (70), 107 (100), 135 (65), 150 (40)	151 [M+H] ⁺	L
13	6.79	Verbénol-TMS	224	0.39	0.44	1.23	0.22	73 (100), 91 (25), 119 (30), 144 (90), 165 (20), 181 (30), 209 (15)	223 [M+H- H_2] ⁺	L
14	6.83	Linalol-TMS	226	0.07				73 (100), 93 (50), 121 (15), 143 (100), 211 (5)	-	S
15	6.97	Sabinol-TMS	224	0.22	0.32	1.49	0.22	73 (100), 119 (40), 156 (20), 181 (20), 209 (40), 224 (10)	223 [M+H- H_2] ⁺	L
16	7.28	Terpinen-4-ol-TMS	226	2.74	Tr			73 (100), 93 (90), 143 (70), 158 (75), 183 (70), 226 (10)	225 [M+H- H_2] ⁺	-
17	7.64	α-Terpinéol-TMS	226	0.64				73 (80), 93 (25), 131 (100), 136 (30), 211 (5)	225 [M+H- H_2] ⁺	L
18	8.13	α-copaène	204		0.20			93 (60), 105 (100), 119 (100), 133 (30), 161 (80), 204 (20)	203 [M+H- H_2] ⁺	L
19	8.21	β-bourbonène	204			0.69	0.08	81 (100), 123 (60), 161 (25), 178 (10)	203 [M+H- H_2] ⁺	L
20	8.26	β-élémente	204		0.24	0.32		67 (65), 81 (95),k 93 (100), 107 (65), 121 (55), 161 (40), 189 (25)	205 [M+H] ⁺	L

Chapitre III – Développement GC-MS pour l'analyse des mono- aux triterpènes

22	8.49	Methyl-eugénol	178			0.02	77 (20), 91 (40), 141 (40), 163 (35), 178 (100)	179 [M+H] ⁺	L	
23	8.67	Sesquiterpène oxygéné	232	0.21		0.35	73 (75), 143 (15), 231 (100), 232 (20)	231 [M+H-H ₂] ⁺	-	
24	8.98	Monoterpène oxygéné	-	0.15		0.20	73 (55), 130 (20), 183 (80), 198 (100)	-	-	
25	9.30	Sesquiterpène oxygéné	-	0.21			73 (70), 147 (15), 156 (100), 181 (80)	-	-	
26	9.42	Sesquiterpène	222			0.32	43 (100), 81 (40), 108 (90), 126 (70), 149 (15)	221 [M+H-H ₂] ⁺	-	
27	10.15	Sesquiterpène oxygéné	294	1.31			73 (100), 95 (75), 119 (65), 143 (40), 167 (80), 204 (50)	293 [M+H-H ₂] ⁺	-	
28	10.17	Sesquiterpène oxygéné	294	1.31			73 (65), 143 (50), 161 (55), 209 (55), 279 (100)	293 [M+H-H ₂] ⁺	-	
29	10.74	Sesquiterpène oxygéné	-	0.29			73 (100), 147 (25), 171 (50), 181 (20), 261 (40)	-	-	
30	11.01	Sesquiterpène oxygéné	-	0.72			73 (25), 131 (100)	-	-	
Diterpènes										
31	13.87	Incensole-TMS	378	5.89		3.14	43 (40), 73 (95), 125 (100), 228 (15), 378 (15)	377 [M+H-H ₂] ⁺	L	
32	13.91	Serratol-TMS	362	4.88		5.64	73 (65), 143 (35), 158 (100), 224 (20), 362 (10)	361 [M+H-H ₂] ⁺	L	
33	14.12	Diterpène oxygéné	-			1.05	73 (60), 121 (20), 131 1(100), 272 (10),	-	-	
34	14.57	Diterpène oxygéné	-	0.79			73 (30), 157 (100), 201 (5)	-	-	
35	14.70	Diterpène oxygéné	376	0.99		3.14	73 (100), 143 (20), 158 (20), 171 (40), 335 (10)	377 [M+H-H ₂] ⁺	-	
36	15.88	Diterpène oxygéné	314	0.13			79 (50), 94 (100), 108 (50), 205 (20)	315 [M+H] ⁺	-	
37	16.10	Diterpène oxygéné	388	0.19			73 (100), 93 (80), 108 (70), 190 (60), 279 (10), 293 (10)	387 [M+H-H ₂] ⁺	-	
38	16.53	Diterpène oxygéné	-	0.16			94 (100), 108 (60), 189 (35), 255 (20), 283 (10)	-	-	
Triterpènes										
39	18.93	3-épi-β-amyrine-TMS	498	8.61	4.78	4.23	2.08	73 (30), 190 (50), 203 (45), 218 (100), 281 (10)	497 [M+H-H ₂] ⁺	L
40	19.06	3-épi-α-amyrine-TMS	498	13.40	10.82	9.40	8.42	73 (20), 190 (50), 203 (20), 218 (100), 498 (10)	497 [M+H-H ₂] ⁺	L
41	19.48	β-amyrinènone-TMS	425	8.82	0.75			189 (20), 203 (60), 218 (100), 409 (5), 424 (10)	425 [M+H] ⁺	L

Chapitre III – Développement GC-MS pour l'analyse des mono- aux triterpènes

42	19.52	β-amyrine-TMS	498	2.97	Tr	Tr	0.74	73 (20), 189 (30), 203 (55), 218 (100), 279 (5), 498 (5)	497 [M+H-H ₂] ⁺	S
43	19.67	α-amyrine-TMS	498	17.65	2.63	1.96	2.97	73 (40), 189 (35), 218 (100), 279 (5), 498 (5)	497 [M+H-H ₂] ⁺	S
44	19.82	Acide α-boswellique TMS	600	1.79	3.87	3.56	6.73	73 (70), 203 (40), 218 (100), 292 (55), 585 (10)	599 [M+H-H ₂] ⁺	S
45	19.95	Acide β-boswellique TMS	600	6.00	9.82	9.02	16.44	73 (74), 203 (20), 218 (100), 292 (70), 585 (10)	599 [M+H-H ₂] ⁺	S
46	20.41	Triterpène oxygéné TMS	-	2.40				73 (100), 185 (80), 218 (60), 422 (10), 497 (10)	-	-
47	20.51	Acide α-acétyl boswellique TMS	570		4.78	5.81	3.65	73 (100), 203 (55), 218 (100), 292 (40), 352 (10), 475 (5)	569 [M+H-H ₂] ⁺	S
48	20.66	Acide β-acétyl boswellique TMS	570		14.86	8.22	7.30	73 (70), 203 (20), 218 (100), 292 (40), 352 (10), 475 (5)	569 [M+H-H ₂] ⁺	S
49	20.93	Acide 11-kéto-β-boswellique TMS	614		0.10	-	4.92	73 (100), 232 (30), 273 (75), 485 (25), 614 (20)	615 [M+H] ⁺	S
50	21.84	Acide 3-O-acétyl-11-kéto-β-boswellique TMS	584		0.12	6.72	2.39	73 (40), 135 (45), 232 (40), 273 (100), 525 (15), 584 (10)	585 [M+H] ⁺	S

*(t_R = temps de rétention; Mw = masse molaire (g.mol⁻¹); ID =Identification : L, librairie NIST et spectres de masse publiés dans la littérature; S, composés standards)

Cette étude a fait l'objet d'une deuxième publication parue en 2016 dans le journal Journal of Chromatography A.

Journal of Chromatography A, 1443 (2016) 241–253



Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Development of a gas chromatography–mass spectrometry method to monitor in a single run, mono- to triterpenoid compounds distribution in resinous plant materials



Zaineb Jemmali, Agnes Chartier*, Claire Elfakir

Univ-Orleans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067 Orléans, France

III.8 CONCLUSION

Nous avons pu à travers cette étude mettre en place une méthode analytique allant de l'analyse des monoterpènes (C10) aux triterpènes (C30). Le développement analytique a comporté différentes étapes d'optimisation : celle de l'extraction des composés terpéniques, celle de leur réaction de dérivation, l'optimisation des conditions d'analyse chromatographique GC, et celle du mode d'ionisation en spectrométrie de masse.

Nous avons sélectionné la méthode d'extraction adaptée à l'étude de l'ensemble des terpènes : extraction par solvant pressurisé (PLE) (à 3 cycles avec une température de 40°C). Nous avons pu par la suite analyser 6 résines terpéniques : 2 résines triterpéniques, 2 résines diterpéniques et 2 résines di- et triterpéniques. En moins de 22 min, il est possible d'identifier en GC-MS simultanément l'ensemble des terpènes présents : les majoritaires (généralement les di- ou triterpènes) ainsi que les composés minoritaires (mono- et sesquiterpènes).

Afin de mettre en place des méthodes rapides, robustes et efficaces, nous nous sommes appuyés sur des outils statistiques. L'utilisation de la méthode des plans d'expériences a permis de choisir les conditions optimales pour la réaction de dérivation : une réaction de 2h, 30°C en température et l'ajout de 250 µL d'agent dérivant constitué de BSFTA, TMCS et pyridine dans les proportions (22 :13 :65 v/v/v).

Par la suite, l'analyse en composante principale (ACP, CAH) et les fonctions de Derringer ont permis la classification des phases stationnaires et le choix de celle la mieux adaptée à la séparation des terpènes. Nous avons ainsi sélectionné la colonne HP-5ms.

La méthode mise au point a été validée dans un premier temps, en évaluant les limites de détection (LOD compris entre 100 et 200 µg.L⁻¹) et de quantification (LOQ de 320 à 660 µg.L⁻¹) ainsi que la linéarité de la réponse et sa répétabilité.

Afin de poursuivre l'analyse des composés terpéniques dans les résines, nous avons voulu poursuivre ce travail par une démarche complète de validation. Le travail qui sera développé dans le chapitre suivant permettra de quantifier les marqueurs des résines apportant un outil supplémentaire pour les différencier.

III.9 RÉFÉRENCES

- [1] A.N. Assimopoulou, V.P. Papageorgiou, GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part I. Pistacia lentiscus var. Chia, Biomedical Chromatography, 19 (2005) 285-311.
- [2] P.F. van Bergen, T.M. Peakman, E.C. Leigh-Firbank, R.P. Evershed, Chemical evidence for archaeological frankincense : Boswellic acids and their derivatives in solvent soluble and insoluble fractions of resin-like materials, Tetrahedron Letters, 38 (1997) 8409-8412.
- [3] R.P. Evershed, P.F. van Bergen, T.M. Peakman, E.C. Leigh-Firbank, M.C. Horton, D. Edwards, M. Biddle, B. Kjolbye-Biddle, P.A. Rowley-Conwy, Archaeological frankincense, Nature, 390 (1997) 667-668.
- [4] M.P. Colombini, F. Modugno, E. Ribechini, Direct exposure electron ionization mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry techniques to study organic coatings on archaeological amphorae, Journal of Mass Spectrometry, 40 (2005) 675-687.
- [5] A.n. Guinda, M. Rada, T. Delgado, P. Gutiérrez-Adánez, J.M.a. Castellano, Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (2010) 9685-9691.
- [6] G. Cartoni, M.V. Russo, F. Spinelli, F. Talarico, GC-MS Characterisation and Identification of Natural Terpenic Resins Employed in Works of Art, Annali di Chimica, 94 (2004) 767-782.
- [7] G. Janicsák, K. Veres, A. Zoltán Kakasy, I. Máthé, Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae, Biochemical Systematics and Ecology, 34 (2006) 392-396.
- [8] M. Razboršek, D. Vončina, V. Doleček, E. Vončina, Determination of Oleanolic, Betulinic and Ursolic Acid in Lamiaceae and Mass Spectral Fragmentation of Their Trimethylsilylated Derivatives, Chroma, 67 (2008) 433-440.
- [9] A. Guinda, M. Rada, T. Delgado, J.M. Castellano, Pentacyclic triterpenic acids from Argania spinosa, European Journal of Lipid Science and Technology, 113 (2011) 231-237.
- [10] M. Burnouf-Radosevich, N.E. Delfel, R. England, Gas chromatography-mass spectrometry of oleanane- and ursane-type triterpenes—application to Chenopodium quinoa triterpenes, Phytochemistry, 24 (1985) 2063-2066.
- [11] N. Sánchez Ávila, F. Priego Capote, M.D. Luque de Castro, Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography-mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves, Journal of Chromatography A, 1165 (2007) 158-165.
- [12] T.H.J. Beveridge, T.S.C. Li, J.C.G. Drover, Phytosterol Content in American Ginseng Seed Oil, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (2002) 744-750.
- [13] S.R. Derringer G, Simultaneous Optimization of Several Response Variables, Journal of Quality Technology, 12 (1980) 214-219.
- [14] M.H. Abraham, C.F. Poole, S.K. Poole, Classification of stationary phases and other materials by gas chromatography, Journal of Chromatography A, 842 (1999) 79-114.
- [15] C.F. Poole, S.K. Poole, Separation characteristics of wall-coated open-tubular columns for gas chromatography, Journal of Chromatography A, 1184 (2008) 254-280.

- [16] E. Kováts, Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1 : Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone, Helvetica Chimica Acta, 41 (1958) 1915-1932.
- [17] K. Pearson, On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space, Philosophical Magazine, 2 (1901) 559 – 572.
- [18] H. Hotelling, Analysis of a complex of statistical variables into principal components, Journal of Educational Psychology, 24 (1933) 417-441.
- [19] P.-L. GONZALEZ, L'analyse en composantes principales (A.C.P.).
- [20] M. Vinatoru, Toma, M., Radu, O., Filip, P.I., Lazurca, D. and Mason, T.J. , The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials, Ultrasonics Sonochemistry, 4 (1997) 135-139.
- [21] C.a.B. Sparr Eskilsson, E., Analytical-scale microwave-assisted extraction, Journal of Chromatography A, 902 (2000) 227-250.
- [22] J.A. Mendiola, Herrero, M., Cifuentes, A. and Ibañez, E. , Use of compressed fluids for sample preparation : Food applications. , Journal of Chromatography A, 1152 (2007) 234-246.
- [23] C.M.e.J.A. Rosset R., Chromatographies en phases liquide et supercritique, Masson 1991.
- [24] V.P. Papageorgiou, M.N. Bakola-Christianopoulou, K.K. Apazidou, E.E. Psarros, Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum, Journal of Chromatography A, 769 (1997) 263-273.
- [25] C.H. Patrick Dietemann, Moritz Kalin, Michael J. Edelman, Richard Knochenmuss, Renato Zenobi, Aging and yellowing of triterpenoid resin varnishese. Influence of aging conditions and resin composition, Journal of cultural heritage, 10 (2009) 30-40.
- [26] G.A.v. Doelen, Molecular studies of fresh and aged triterpenoid varnishes, Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics (IBED), 1999.
- [27] P.M.P. Colombini, F. Modugno, Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology, Wiley 2009.
- [28] D. Scalarone, M. Lazzari, O. Chiantore, Ageing behaviour and analytical pyrolysis characterisation of diterpenic resins used as art materials : Manila copal and sandarac, Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 68–69 (2003) 115-136.
- [29] L. Osete-Cortina, M.T. Doménech-Carbó, Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry with on line trimethylsilylation, Journal of Chromatography A, 1065 (2005) 265-278.
- [30] N. Sugimoto, M. Kuroyanagi, T. Kato, K. Sato, A. Tada, T. Yamazaki, K. Tanamoto, Identification of the Main Constituents in Sandarac Resin, a Natural Gum Base, Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), 47 (2006) 76-79.
- [31] I.K.a.d.V.R. Walter, Qualitative and quantitative studies of chemical composition of sandarac resin by GC-MS, Art and Cultural Heritage, (2016) 1-6.

Chapitre IV ANALYSE QUANTITATIVE PAR
GC-MS DES MARQUEURS MAJORITAIRES DES
RESINES DE TYPE FRANKINCENSE

IV.1 INTRODUCTION

Dans le but d'apporter un outil supplémentaire pour différencier les résines végétales et notamment les résines assez proches issues d'une même famille, nous avons voulu poursuivre notre étude par une démarche complète de validation.

La première étape consiste à sélectionner et à optimiser la méthode d'analyse en mettant au point le mode opératoire. Par la suite, la méthode est validée en se basant sur la vérification d'un ensemble de critères définis permettant de s'assurer que la méthode est juste et reproductible. La figure IV.1 montre le cycle de vie d'une méthode d'analyse avec deux types de validation : intralaboratoire (obligatoire pour toute validation) et interlaboratoires (pour des résultats qui seront utilisés par plusieurs laboratoires).

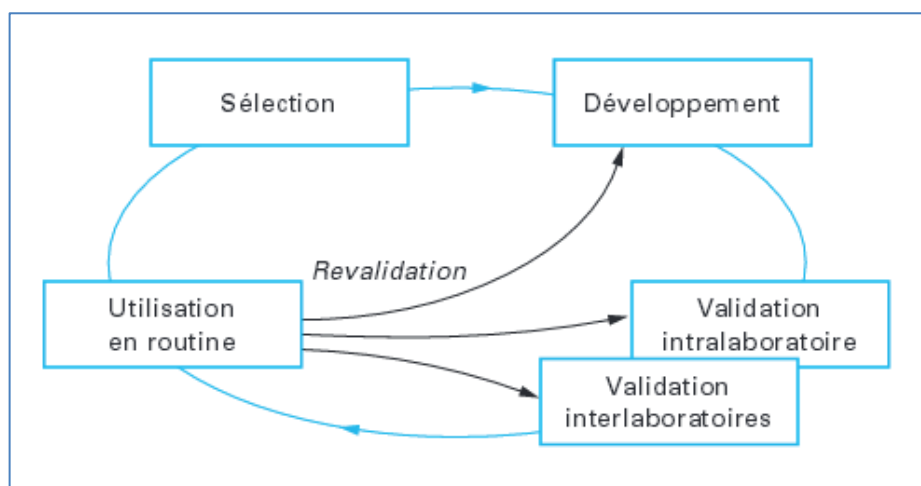


Figure IV.1 Cycle d'une méthode d'analyse.
REF :[1]

Nous avons choisi d'appliquer cette méthodologie à la quantification des marqueurs majoritaires des résines de type Frankincense. Comme on a pu le voir dans le chapitre II, ces résines provenant d'Afrique (*Boswellia neglecta* et *Boswellia carterii*), du Moyen-Orient (*Boswellia sacra*) et d'Asie (*Boswellia serrata*) ont des compositions en composés triterpéniques assez proches et sont souvent confondues [2]. D'autre part, il s'agit des rares résines dont les standards triterpéniques sont disponibles commercialement permettant ainsi de les quantifier. La méthode GC-MS développée au chapitre III a permis d'apporter une première distinction de ces résines en fonction de leur provenance en identifiant leurs marqueurs minoritaires. Dans ce chapitre IV nous nous focaliserons sur la quantification de leurs marqueurs majoritaires afin de proposer une méthode complémentaire de confirmation de la composition chimique de ces échantillons très proches. La méthode analytique que nous avons validée est une simple adaptation de la méthode GC-MS optimisée précédemment pour l'analyse de l'ensemble des

terpènes présents dans un échantillon. Le but de cette adaptation a été d'éluer dans un temps plus court les composés d'intérêt (composés triterpéniques) tout en conservant une sélectivité suffisante entre eux.

Après une présentation de la démarche générale de la validation d'une méthode analytique, nous développerons dans le cadre de ce chapitre, son application à la validation complète de l'analyse quantitative des triterpènes. La quantification de ces marqueurs majoritaires dans les résines Frankincense permettra d'apporter des éléments supplémentaires pour distinguer ces résines.

IV.2 Démarche associée à la validation de methode

La validation est définie comme la « confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue de l'utilisation prévue déterminée sont remplies » [3]. Cette étape permet de s'assurer que la méthode analytique développée fournira des résultats fiables et reproductibles permettant leurs traçabilités. Il y a donc plusieurs critères à vérifier selon la réglementation utilisée.

Nous nous sommes basés sur la réglementation ICH (International Council for Harmonisation) pour la validation de la méthode développée en GC. Nous avons utilisé deux référentiels du Q2 « Analytical Validation » [4] :

- Q2A : « Text on Validation of Analytical Procedures » : Caractéristiques à prendre en compte pour la validation de méthodes analytiques.
- Q2B : « Methodology » : Contenant l'ensemble de la méthodologie et les différentes caractéristiques pour la validation de méthodes analytiques.

La figure IV.2 récapitule les différentes étapes de la validation de méthode :

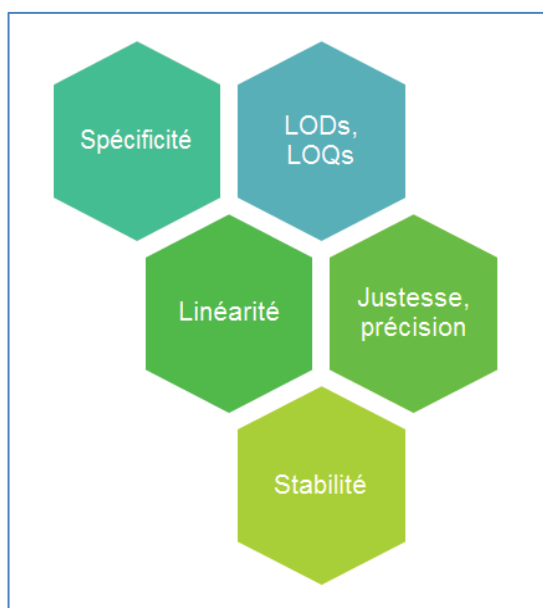


Figure IV.2 Etapes pour la validation de méthode

- **ETAPE 1 : SPECIFICITE**

La spécificité est un paramètre important à déterminer. Il faut s'assurer tout d'abord que la méthode produit une réponse uniquement pour le composé d'intérêt [5].

Le manque de spécificité peut-être dû à la présence de composés indésirables qui peuvent entraîner des effets de matrice et ainsi brouiller le signal du composé d'intérêt. Ce manque de spécificité peut engendrer soit une surestimation de la concentration dans l'échantillon soit une sous-estimation si les parasites entraînent un masquage du signal. Il est donc essentiel de vérifier qu'il n'y a pas d'interférences.

Pour déterminer la spécificité de la méthode, il existe plusieurs méthodes notamment la comparaison du signal du composé avant et après dopage dans la matrice blanche ou en se basant sur la spécificité du spectromètre de masse pour vérifier la pureté du pic [6].

- **ETAPE 2 : LIMITE DE DETECTION (LOD) ET DE QUANTIFICATION (LOQ)**

La détermination de la limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) permet d'évaluer la capacité de détection de la méthode analytique.

La limite de détection (LOD) correspond à la plus petite quantité détectable mais non quantifiable. Quant à la limite de quantification (LOQ), elle correspond à la plus petite quantité quantifiable comme étant différente du blanc dans les conditions décrites par la méthode [7].

Ces valeurs se déterminent à partir du calcul du rapport signal-sur-bruit. La LOD est atteinte lorsque le rapport signal-sur-bruit est de 3 et la LOQ lorsque il est égal à 10 [8].

$$LOD = 3 \times \frac{S}{N} \qquad LOQ = 10 \times \frac{S}{N}$$

- S est la hauteur du signal
- N est la hauteur du bruit

- **ETAPE 3 : LINEARITE**

La courbe d'étalonnage permet d'établir une relation entre la concentration de l'analyte et la réponse. Dans la majorité des cas, on peut se baser sur un modèle linéaire dans un domaine donné et limité de concentrations.

Par la suite, il est indispensable de vérifier la relation entre la concentration calculée et la concentration introduite afin de s'assurer de la linéarité de la méthode. Ces évaluations sont basées sur l'étude des courbes de régression linéaires et les coefficients de détermination (R^2).

• **ETAPE 4 : JUSTESSE ET PRECISION**

La justesse et la fidélité permettent de vérifier que les valeurs déterminées expérimentalement sont proches des valeurs de référence. Ces deux notions définissent l'exactitude.

La justesse est « l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée » [9]. Cette notion mesure l'accord entre la valeur obtenue et la valeur vraie qui est exprimée en taux de recouvrement entre ces deux valeurs.

$$\text{Justesse (\%)} = \frac{C_{exp}}{C_{nom}} \times 100\%$$

- C_{exp} est la concentration expérimentale évaluée à partir des courbes de régression linéaires
- C_{nom} est la concentration nominale du standard

La précision (fidélité) est « l'étroitesse d'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées » [9]. Elle permet d'évaluer les caractéristiques de dispersion de la réponse. Cette notion correspond au coefficient de variation (CV) concernant le recouvrement entre la valeur vraie et la valeur expérimentale pour n répétitions.

$$\text{Précision (\%)} = CV (\%)$$

Il existe trois niveaux de fidélité : la répétabilité (même série d'analyse), la fidélité intermédiaire (opérateur ou jour ou appareillage différents) et la reproductibilité (opérateur et jour et appareillage différents).

La figure IV.3 représente la notion de justesse et de précision (fidélité) et illustre les quatre situations auquel on peut se retrouver confronter lors des analyses pouvant entraîner dans 3 cas sur 4 des incertitudes de mesure.

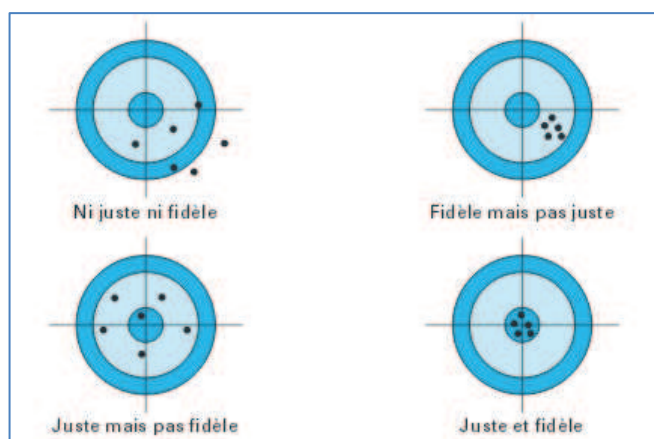


Figure IV.3 Représentation de la justesse et de la fidélité.
REF : [1]

- **ETAPE 5 : STABILITE DE L'ANALYSE**

Afin de s'assurer qu'il n'y a pas de détérioration de la réponse dans les conditions d'utilisation, il est important de vérifier la stabilité de la méthode d'analyse. On s'assure ainsi que la méthode peut supporter des petites variations de certains paramètres sans entraîner une déviation de la réponse.

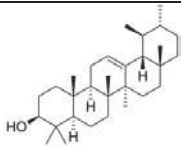
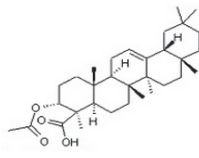
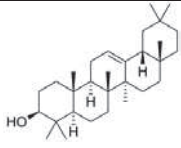
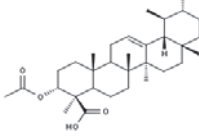
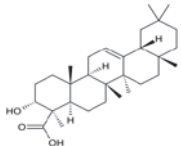
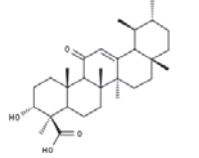
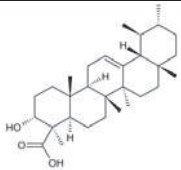
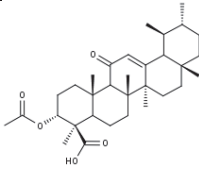
IV.3 METHODE GC-MS A VALIDER

Dans le chapitre III, nous avons mis en place une méthodologie permettant d'analyser en une seule analyse l'ensemble des terpènes présents dans les résines végétales. Cette méthode a été précédemment pré-validée pour les monoterpènes et les triterpènes. Afin de quantifier les marqueurs majoritaires des résines Frankincense [10], nous avons choisi de valider la méthode mise en place en la réduisant à la seule analyse quantitative des triterpènes permettant ainsi de différencier les résines très proches. Nous nous baserons sur la méthode mise en place dans le chapitre III mais nous l'adapterons à l'analyse des seuls composés triterpéniques.

IV.3.1 Solutés choisis pour la validation de la méthode

La validation de la méthode sera appliquée à la quantification des marqueurs majoritaires des résines de type Frankincense. Nous avons sélectionné 8 composés triterpéniques qui sont présents dans ces résines comme on a pu le voir lors de l'analyse TLC (Chapitre II) et GC-MS (Chapitre III) : α -amyrine, β -amyrine, acide α -boswellique, acide β -boswellique, acide acétyl- α -boswellique, acide acétyl- β -boswellique, acide 11-kéto- β -boswellique et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (tableau IV.1)

Tableau IV.1 Liste des standards utilisés pour la validation de méthode

Composé	Structure	Mw (g.mol ⁻¹)	Composé	Structure	Mw (g.mol ⁻¹)
α -amyrine		426.7	acide acétyl- α -boswellique		498.7
β -amyrine		426.7	acide acétyl- β -boswellique		498.7
acide α -boswellique		456.7	acide 11-kéto- β -boswellique		470.7
acide β -boswellique		456.7	acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique		512.7

Ces composés ont été préparés indépendamment à une concentration de 500 mg.L⁻¹ dans du MTBE. Le cholestérol a été utilisé comme standard interne car il possède une structure similaire aux composés triterpéniques sans pour autant être présents dans les résines végétales.

Les résines Frankincense étudiées sont : *Boswellia serrata*, *Boswellia sacra*, *Boswellia carterii* et *Boswellia neglecta*. L'extraction de ces résines est réalisée par extraction par solvant pressurisée (PLE) dont le protocole est décrit en Annexe C.

IV.3.2 Paramètres de la méthode à valider

La méthode à valider concerne la réaction de dérivation ainsi que l'analyse en GC-MS. Nous allons rappeler rapidement les conditions de ces étapes :

- **ETAPE DE DERIVATION**

Pour préparer le mélange de standard à une concentration de 50 mg.L⁻¹ chacun, on prélève 100 µL de chaque solution mère à 500 mg.L⁻¹. Le mélange est évaporé à sec sous courant d'azote et on ajoute 250 µL d'agent dérivant constitué de BSTFA, TMCS et pyridine (22 :14 :65, v/v/v) pendant 2 heures à 30°C. Les paramètres de la dérivation ont été optimisés par la méthode des plans d'expérience dans le chapitre III. Par la suite, 750 µL d'hexane est ajouté à la solution avant l'analyse GC [11].

- **ANALYSE GC-MS**

Pour l'analyse GC-MS, nous sommes repartis des conditions optimisées dans le chapitre III [12] et nous les avons adaptées à l'analyse des triterpènes pour réduire le temps d'analyse tout en conservant une sélectivité suffisante. Nous avons utilisé l'injecteur PTV à température constante de 300°C en mode splitless, avec l'hélium comme gaz vecteur (débit de 1.2 mL.min⁻¹) et le gradient de GC suivant : 200°C (1 min) suivi d'une rampe de température de 15°C.min⁻¹ jusqu'à 330°C (3 min). La séparation a été effectuée sur la colonne HP-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm).

Au niveau du spectromètre de masse, le mode d'ionisation retenu pour les triterpènes est l'ionisation électronique et l'acquisition des signaux est réalisée en mode « full scan » dans la gamme de masse m/z 35 – 700 amu. La température de la ligne de transfert est fixée à 315°C et la température de source à 250°C. En mode d'ionisation électronique, les ions moléculaires ne sont pas observés pour les triterpènes et de nombreux fragments d'intensité proches sont détectés. Dans ces conditions, le mode full scan permet de ne pas perdre d'intensité de signal puisque l'ensemble des ions fragments seront détectés. Avec ce mode d'acquisition, il sera

également possible en une seule analyse de quantifier la molécule et de confirmer son identité à partir du spectre de masse associé au temps de rétention.

- **APPLICATION A L'ANALYSE DU MELANGE DES 8 COMPOSES TRITERPENIQUES**

Nous avons appliqué la méthode GC-MS à l'analyse des 8 standards triterpéniques en mélange à 50 mg.L⁻¹ chacun.

D'après la figure IV.4, on constate que l'analyse des 8 standards triterpéniques est réalisée en moins de 12 min avec une résolution satisfaisante. Comme attendu, on observe l'élution tout d'abord des alcools possédant les masses molaires les plus faibles (β -amyrine (1) et α -amyrine (2)), puis après les acides boswelliques (acide α -boswellique (3), acide β -boswellique (4)) et leurs acétates (acide acétyl- α -boswellique (5), acide acétyl- β -boswellique (6)). Enfin, l'acide 11-kéto- β -boswellique (7) et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (8) sont élués en dernier.

La résolution la plus faible est de 1.77 entre les pics (3) et (4) avec un retour à la ligne de base permettant de les quantifier.

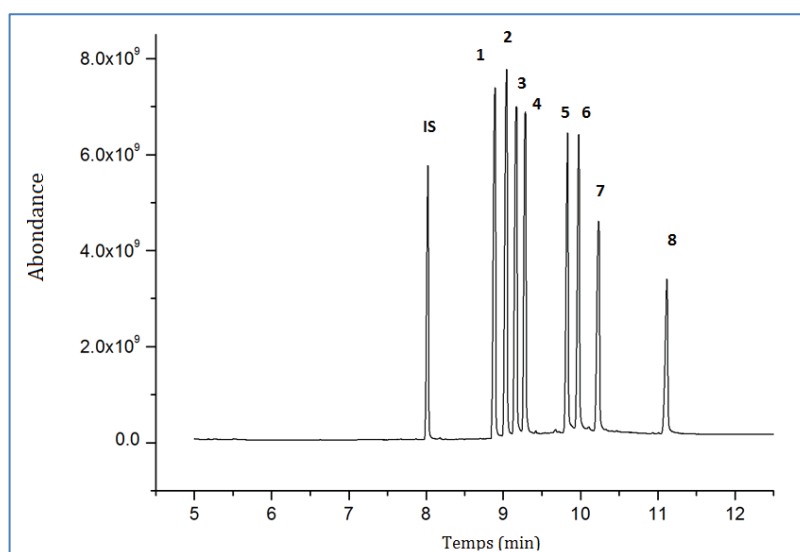


Figure IV.4 Analyse GC-MS des 8 standards triterpéniques à 50 mg.mL⁻¹ avec l'utilisation du cholestérol comme standard interne (IS). Composés : β -amyrine (1), α -amyrine (2), acide α -boswellique (3), acide β -boswellique (4), acide acétyl- α -boswellique (5), acide acétyl- β -boswellique (6), acide 11-kéto- β -boswellique (7) et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (8).

Conditions GC-MS : hélium gaz vecteur avec un débit de 1.2 mL.min⁻¹. Gradient : 200°C (1 min) suivi d'une rampe de température de 15°C.min⁻¹ jusqu'à 330°C (3 min). Pour le spectromètre de masse acquisition en mode ionisation en mode full scan sur m/z 35 – 700 amu. Température de la ligne de transfert de 315°C et température de la source de 250°C.

Après avoir présenté les conditions d'analyse GC-MS adaptées pour l'analyse des triterpènes, nous allons nous intéresser maintenant à la validation complète de cette méthode avant de l'appliquer à la quantification des marqueurs majoritaires des résines Frankincense.

IV.4 Validation de la méthode GC-MS

Nous allons réaliser une validation complète de la méthode d'analyse en termes de spécificité, de limites de détection et de quantification, de linéarité, de justesse et de précision et de stabilité.

IV.4.1 Spécificité de la méthode GC-MS

Afin de déterminer la spécificité de la méthode GC-MS, on s'est basé sur les spectres de masse des standards analysés que l'on a ajoutés à la base de données.

Ces composés ont été ensuite identifiés dans les quatre résines Frankincense en comparant leurs temps de rétention et leurs spectres de masse à ceux des standards. Afin de vérifier la pureté des pics de chaque composé terpénique détecté dans l'échantillon de résine, on a généré trois spectres de masses pour chaque pic : un au début du pic (à 10% de la hauteur du pic), un au sommet du pic et un à la fin du pic (à 10% de la hauteur du pic). Les trois spectres obtenus ont été comparés au spectre de masse du standard correspondant disponible dans la base de données et un facteur de correspondance (match factor) a été calculé [13].

La figure IV.5 représente un exemple d'application pour le composé acide β -boswellique présent dans la résine *Boswellia serrata*. On obtient un facteur de correspondance de 908 pour le spectre de masse obtenu en début de pic (1), de 949 pour le sommet du pic (2) et de 913 pour la fin du pic (3). On obtient des valeurs supérieures à 900 sur 1000 pour le facteur de correspondance ce qui met en évidence la pureté du pic chromatographique.

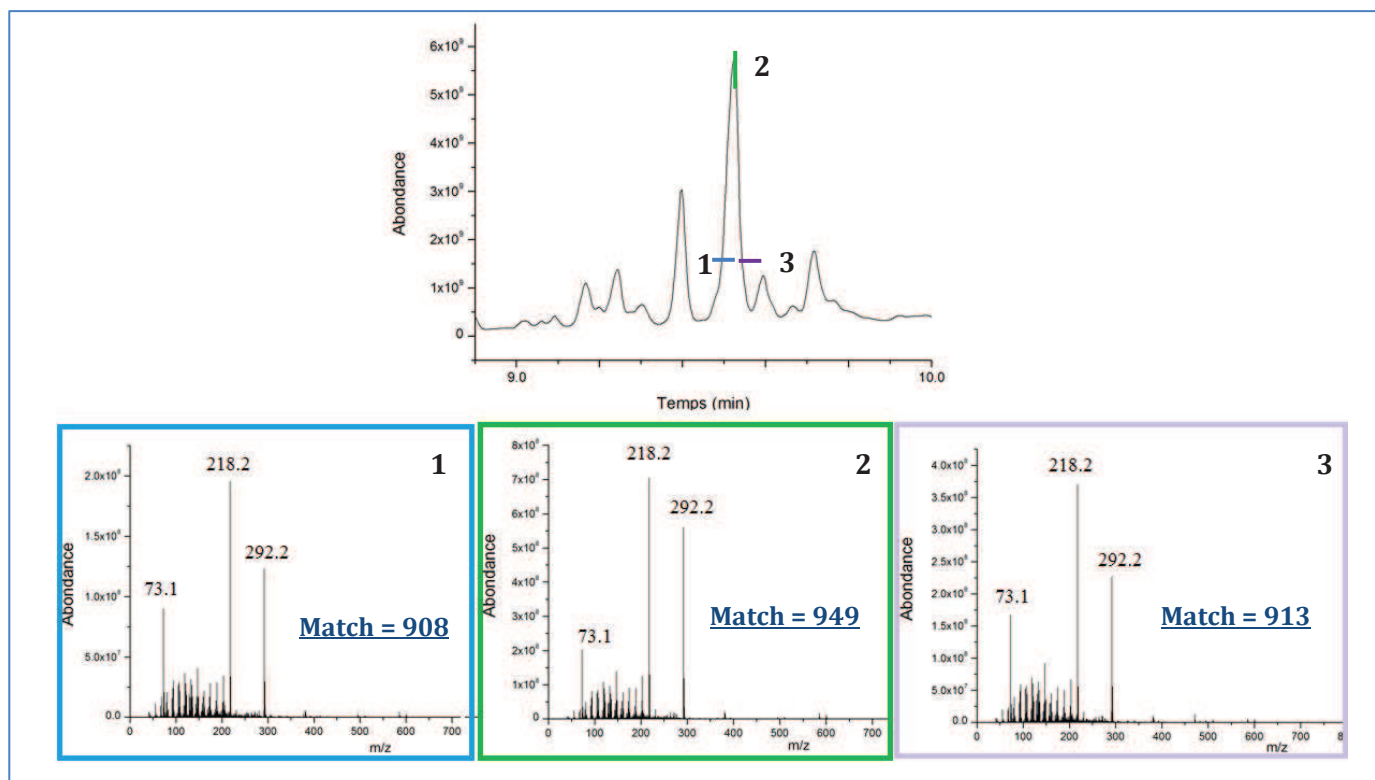


Figure IV.5 Détermination de la spécificité de la méthode avec l'exemple de l'acide β -boswellique dans la résine *Boswellia serrata*

3 spectres de masse obtenus à 10% de la hauteur du pic dans la partie ascendante (1), au sommet du pic (2) et à 10% de la hauteur du pic dans la partie descendante (3). **Conditions GC-MS :** hélium gaz vecteur avec un débit de 1.2 mL.min⁻¹. Gradient : 200°C (1 min) suivi d'une rampe de température de 15°C.min⁻¹ jusqu'à 330°C (3 min). Pour le spectromètre de masse acquisition en mode full scan sur m/z 35 – 700 amu. Température de la ligne de transfert de 315°C et température de la source de 250°C.

Nous avons répété le processus pour les 8 composés à quantifier dans les 4 échantillons de résines. Pour l'ensemble des pics identifiés, on obtient des valeurs de facteur de correspondance supérieures à 800 sur un total de 1000 possible. La valeur de 800 étant la valeur limite à dépasser pour avoir un facteur de correspondance acceptable [14], nos données montrent la spécificité des pics identifiés en se basant sur la spectrométrie de masse.

IV.4.2 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été établies pour l'ensemble des 8 standards. On a déterminé les rapports signal sur bruit de 3 :1 et 10 :1 pour déterminer les concentrations de la LOD et de la LOQ respectivement.

Le rapport signal sur bruit a été déterminé après analyse en GC-MS des 8 composés à une concentration de 5 mg.L⁻¹ chacun. Les analyses ont été répétées trois fois.

D'après le tableau IV.2, on constate que les LODs sont compris entre 70 μ g.L⁻¹ (β / α -amyrine) et 215 μ g.L⁻¹ (acide 11-kéto- β -boswellique). En revanche pour l'acide 3-O-acétyl-11-keto- β -

boswellique, la valeur de la LOD a été évaluée à 690 μL^{-1} . En effet, ce composé possède un coefficient de réponse faible qui peut s'expliquer par son haut poids moléculaire silylé (M_w 584.7 g.mol^{-1}) peu favorable à une analyse en GC. Cela montre les limites de la GC pour l'analyse des composés non-volatils même après une réaction de dérivation.

Concernant la LOQ, on obtient des valeurs comprises entre 230 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (β/α -amyrine) et 720 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (acide 11-kéto- β -boswellique). La LOQ pour l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique est calculée à 2.3 mg.L^{-1} .

Tableau IV.2 Valeurs des LOD et LOQ pour les 8 standards triterpéniques analysés en GC-MS. Avec le rapport signal sur bruit (S/N) évalué à partir d'une concentration de standards à 5 mg.L^{-1} chacun. Les limites de détection et de quantification sont exprimées en mg.L^{-1} .

	β - amyrine	α - amyrine	Acide α - boswellique	Acide β - boswellique	Acide α - acétyle boswellique	Acide β - acétyle boswellique	Acide 11- kéto- β - boswellique	Acide 3-O- acétyl-11-kéto- β -boswellique
S/N 1	257	248	209	166	119	111	84	25
S/N 2	193	209	171	136	87	98	82	28
S/N 3	194	212	147	128	71	90	69	22
LOD 1	0.05	0.06	0.07	0.09	0.13	0.13	0.18	0.60
LOD 2	0.07	0.07	0.09	0.11	0.17	0.15	0.18	0.53
LOD 3	0.07	0.07	0.10	0.12	0.21	0.17	0.22	0.70
LOD (mg.L^{-1})	0.0716	0.0718	0.1018	0.1168	0.2119	0.1675	0.2158	0.6952
LOQ 1	0.18	0.20	0.24	0.30	0.42	0.45	0.59	2.01
LOQ 2	0.24	0.24	0.29	0.37	0.57	0.51	0.61	1.76
LOQ 3	0.24	0.24	0.34	0.34	0.71	0.56	0.72	2.32
LOQ (mg.L^{-1})	0.239	0.239	0.339	0.367	0.706	0.558	0.719	2.317

IV.4.3 Linéarité

La linéarité de la méthode a été évaluée en étudiant les courbes de régression linéaires qui correspondent au rapport de l'aire du pic du standard sur l'aire du standard interne en fonction de la concentration. Pour chaque courbe de régression, on évalue le coefficient de détermination (R^2) permettant d'apprécier la qualité de la régression linéaire.

En tenant compte des valeurs de LOQs déterminées précédemment, nous avons défini trois courbes de régression à considérer. En effet, pour l' α -amyrine et la β -amyrine on a une LOQ de 0.23 mg.L^{-1} , nous avons donc choisi six points pour la courbe d'étalonnage compris entre 0.5 mg.L^{-1} et 50 mg.L^{-1} . De la même manière, on a défini une deuxième courbe d'étalonnage de 1.25 mg.L^{-1} à 50 mg.L^{-1} pour les acides triterpéniques et leurs acétates (acide α -boswellique, acide β -boswellique, acide acétyl- α -boswellique, acide acétyl- β -boswellique) et enfin une troisième

courbe d'étalonnage entre 5 mg.L⁻¹ et 80 mg.L⁻¹ pour l'acide 11-kéto-β-boswellique et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto-β-boswellique.

Pour chaque courbe d'étalonnage, on a préparé le mélange des 8 standards à la concentration correspondante en triplicata de manière indépendante (n=3).

Le tableau IV.3 regroupe l'ensemble des équations des courbes d'étalonnage, le coefficient de détermination (R²) ainsi que le coefficient de variation (%RSD). On constate que la réponse analytique est linéaire avec un R² compris entre 0.9961 (l'acide 3-O-acétyl-11-kéto-β-boswellique) et 0.9997 (α-amyrine). Le coefficient de variation pour l'ensemble des points des courbes d'étalonnage est inférieur à 10% pour les alcools, 12% pour les acides et les acétates et de 11% pour l'acide 3-O-acétyl-11-kéto-β-boswellique. On constate qu'en dépit de la faible réponse de ce composé, on obtient des valeurs de RSD assez similaires permettant sa quantification.

Tableau IV.3 Résultats obtenus pour les 8 courbes d'étalonnage

N°	Composés	tr (min)	LOD (μL.L ⁻¹)	LOQ (μL.L ⁻¹)	Courbe d'étalonnage		
					Equation de la courbe (n=3)	R ²	Coefficient de variation (%RSD)
1	β-amyrine	8.9	70	240	y= 1.065x + 0.0006	0.9983	2% - 10%
2	α-amyrine	9.0	70	240	y= 1.204x - 0.0029	0.9997	1% - 9%
3	Acide α-boswellique	9.2	100	340	y= 1.188x - 0.0440	0.9983	0.5% - 9%
4	Acide β-boswellique	9.3	120	370	y= 1.164x - 0.0193	0.9962	0.5% - 7%
5	Acide α-acétyl-boswellique	9.8	210	700	y= 0.776x - 0.0297	0.9995	1% - 12%
6	Acide β-acétyl-boswellique	10.0	170	560	y= 0.852x - 0.0451	0.9947	0.5% - 9%
7	Acide 11-kéto-β-boswellique	10.2	215	720	y= 0.712x - 0.0345	0.9954	1% - 9%
8	Acide 3-O-acétyl-11-kéto-β-boswellique	11.1	690	2300	y= 0.4234x + 0.0429	0.9961	3% - 11%

Afin d'illustrer la linéarité de la méthode, on a comparé les valeurs expérimentales aux valeurs théoriques. Pour cela, on a tracé le rapport de la concentration expérimentale du standard à celle de l'étalon interne en fonction du rapport de la concentration théorique du standard à celle de l'étalon interne.

D'après la figure IV.6, on constate que l'on obtient d'excellente corrélation entre la réponse expérimentale et la réponse théorique avec une pente de 1 et une ordonnée à l'origine de l'ordre de 10⁻⁵ pour l'ensemble des standards. Les coefficients de détermination (R²) sont compris entre 0.9996 (α-amyrine) et 0.9947 (acide β-boswellique).

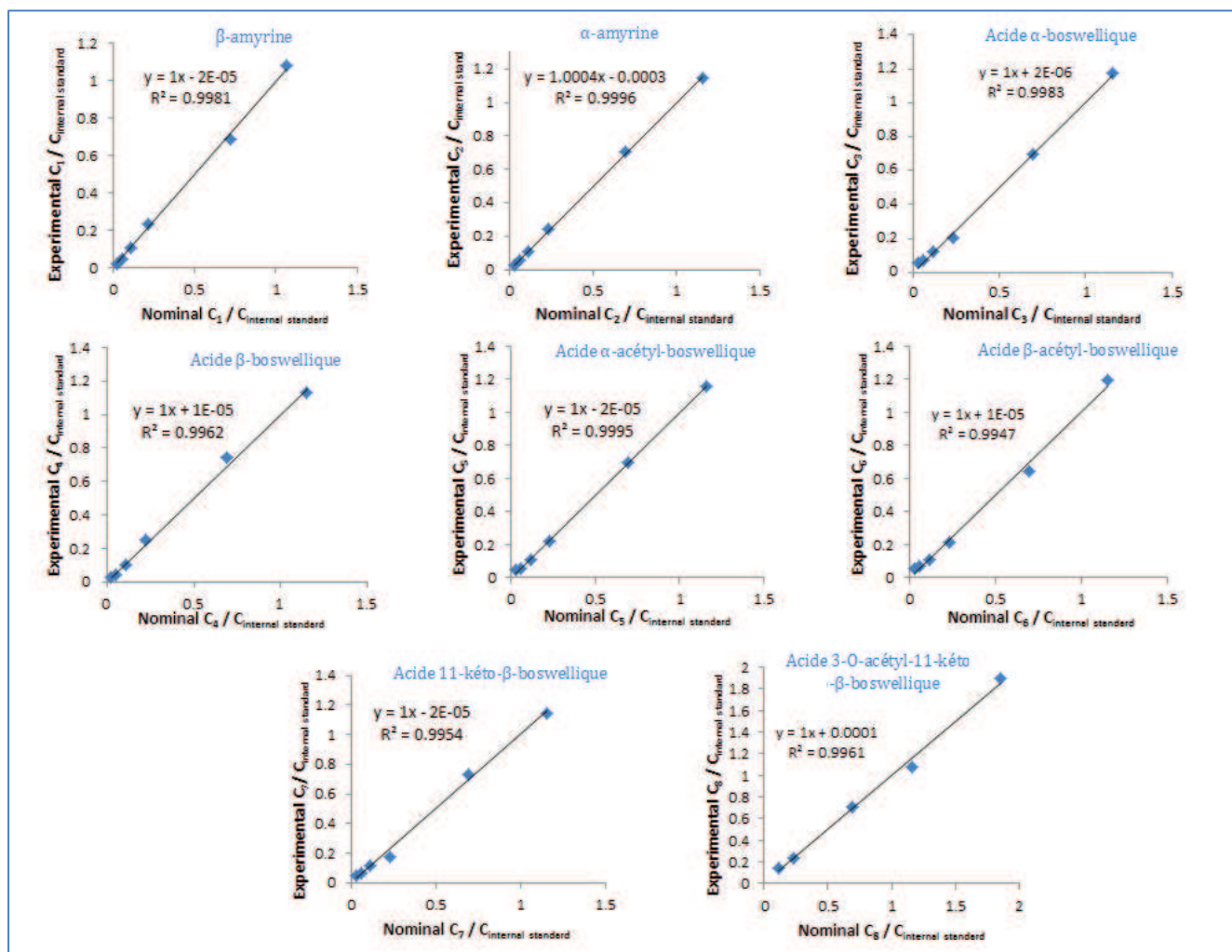


Figure IV.6 Courbes de linéarité des 8 standards triterpéniques en utilisant le cholestérol comme standard interne (SI).

Les graphes représentent le rapport expérimental de l'aire du composé par rapport à l'aire du standard interne en fonction du rapport de la concentration théorique du composé par rapport à celle du standard interne

IV.4.4 Justesse et précision

La justesse et la précision ont été déterminées en répétant l'analyse des standards le même jour (intra-batch) et aussi sur des jours différents (inter-batch).

Pour déterminer ces deux critères, on a choisi de travailler avec trois niveaux de concentration pour les 8 standards triterpéniques et trois répétitions (n=3) pour chaque niveau : un niveau bas à 5 mg.L⁻¹, un niveau intermédiaire à 30 mg.L⁻¹ et un niveau haut à 50 mg.L⁻¹. La justesse de la méthode a été évaluée en comparant les concentrations nominales avec les concentrations calculées à partir des courbes de régression linéaires et la détermination du taux de recouvrement entre ces deux valeurs. La précision a été évaluée par la détermination du coefficient de variation pour trois répétitions. Le critère d'acceptation n'étant pas indiqué dans les directives ICH, nous nous sommes basées sur la limite fixée par la FDA (Food and Drug

Administration) qui correspond à un écart maximum de $\pm 15\%$ pour la valeur expérimentale par rapport à la concentration attendue [15].

D'après le tableau IV.4, on constate que pour l'analyse des standards la même journée avec 3 répétitions (intra-batch), les moyennes de recouvrement sont comprises entre 86.2 (acide β -boswellique) et 113.0% (acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique) et les coefficients de variation (%CV) sont compris entre 0.5 – 8.7%. Lors de l'analyse sur 3 jours consécutifs (inter-batch), on a une justesse comprise entre 91.7% et 108.9% et des valeurs de précision comprises entre 0.1% et 10.2%.

Tableau IV.4 Justesse et précision des analyses le même jour et sur trois jours différents

N°	Composés	Concentration théorique (mg.L ⁻¹)	Intra-batch			Inter-batch		
			Concentration expérimentale (mg.L ⁻¹) (n=3)	Justesse (%) pour n=3	Précision (%CV) pour n=3	Concentration expérimentale (mg.L ⁻¹) (n=3)	Justesse (%) pour n=3	Précision (%CV) pour n=3
1	β -amyrine	4.6	4.8	104.4	7.3	4.7	103.2	4.7
		31.2	35.1	112.7	2.9	33.3	106.9	0.1
		52	51.7	99.5	1.7	52.4	100.8	7.3
2	α -amyrine	5	4.8	96.7	4.8	12.0	100.6	2.3
		36	38.7	107.6	2.3	37.0	102.9	2.4
		60	58.0	96.6	2.0	60.6	101.0	0.5
3	Acide α -boswellique	5	5.0	100.7	2.9	5.1	102.9	3.1
		35.4	37.4	105.7	0.5	38.1	107.7	3.6
		59	58.6	99.4	1.3	60.7	102.9	0.9
4	Acide β -boswellique	5	4.3	86.2	8.4	4.6	91.7	5.9
		31.8	34.3	108.0	0.7	33.9	106.8	2.3
		53	51.9	98.1	1.7	52.5	99.1	0.2
5	Acide α -acétyl-boswellique	5	4.7	93.6	6.0	4.3	87.0	5.5
		32.4	35.6	110.1	0.7	34.9	107.9	1.8
		54	52.1	96.9	0.9	55.2	102.2	3.2
6	Acide β -acétyl-boswellique	5	5.2	104.3	0.3	4.8	96.1	3.7
		33	37.7	114.3	4.3	36.2	106.9	2.7
		55	53.4	97.2	0.7	55.5	100.8	2.9
7	Acide 11-kéto- β -boswellique	5	4.9	99.7	3.5	4.8	96.0	3.7
		30	33.2	110.7	3.9	31.8	106.2	1.5
		50	49.1	98.3	2.7	49.6	99.2	1.8
8	Acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique	5	5.6	113.0	1.7	5.4	108.8	2.2
		30	32.5	108.5	8.7	29.4	98.1	10.2
		50	50.7	101.5	4.5	51.1	102.4	9.0

On peut considérer que la méthode est juste et précise avec une bonne adéquation entre les valeurs expérimentales et les valeurs nominales car l'écart entre ces deux valeurs est inférieur à $\pm 15\%$ pour tous les triterpènes étudiés.

IV.4.5 Stabilité

Il est connu que les composés silylés peuvent rapidement se dégrader au cours du temps. Dans le cadre de la validation de méthode, on a voulu évaluer la stabilité des composés triterpéniques silylés dans des conditions susceptibles d'être rencontrées lors de l'analyse.

La stabilité des composés dérivés a été déterminée après stockage 1 jour à température ambiante et 1 jour à -80°C à deux niveaux de concentrations (10 et 50 mg.L⁻¹) et l'écart entre les concentrations expérimentales de ces expériences et leurs valeurs théoriques a été calculé afin d'évaluer s'il y a une déviation de la réponse. Le critère d'acceptation est fixé à un écart de la valeur expérimentale de $\pm 15\%$ par rapport à la concentration attendue [15].

D'après le tableau IV.5, on constate que les standards sont stables dans ces conditions avec un coefficient de variation entre les valeurs expérimentales et théoriques variant entre 0.4 et 12.5%. Cependant, pour l'acide 3-O-acétyl-11-kéto-boswellique la déviation de la réponse est supérieure à 15%. Ce composé se détériore rapidement après dérivation même stocké à -80°C. De ce fait, l'analyse des échantillons de résines devra se faire directement après la réaction de dérivation pour éviter tout biais sur la concentration en acide 3-O-acétyl-11-kéto-boswellique.

Tableau IV.5 Stabilité des 8 standards triterpéniques analysés 1 jour après la dérivation à température ambiante et stockés à -80°C

N°	Composés	Concentration théorique (mg.L ⁻¹)	Conditions de la stabilité	Pourcentage par rapport à la valeur initiale (%)
1	β -amyrine	10.4	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	107.0 $\pm$ 12.5% 99.0 $\pm$ 6.4%
		52	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	101.4 $\pm$ 4.4% 99.2 $\pm$ 4.2%
2	α -amyrine	12	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	97.1 $\pm$ 1.0% 87.0 $\pm$ 3.7%
		60	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	103.0 $\pm$ 3.0% 98.6 $\pm$ 3.0%
3	Acide α -boswellique	11.8	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	96.5 $\pm$ 1.6% 87.2 $\pm$ 2.4%
		59	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	99.4 $\pm$ 5.1% 100.9 $\pm$ 0.8%
4	Acide β -boswellique	10.6	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	96.0 $\pm$ 1.1% 89.3 $\pm$ 0.4%
		53	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	101.2 $\pm$ 5.2% 103.6 $\pm$ 1.6%

5	Acide α -acétyl-boswellique	10.8	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	103.4 $\pm$ 1.5% 96.3 $\pm$ 11.5%
		54	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	98.6 $\pm$ 5.4% 114.2 $\pm$ 3.0%
6	Acide β -acétyl-boswellique	11	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	101.0 $\pm$ 1.6% 98.0 $\pm$ 8.7%
		55	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	97.9 $\pm$ 6.0% 108.9 $\pm$ 6.5%
7	Acide 11-kéto- β -boswellique	10	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	96.8 $\pm$ 0.2% 101.3 $\pm$ 10.5%
		50	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	100.9 $\pm$ 9.8% 108.8 $\pm$ 4.4%
8	Acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique	10	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	Supérieur à 15% de variabilité
		50	Stabilité après un 1 jour à température ambiante Stabilité après 1 jour à -80°C	Supérieur à 15% de variabilité

IV.4.6 Conclusion

La méthode GC-MS mise en place pour l'analyse des marqueurs majoritaires (triterpènes) présents dans les résines a pu être validée en se basant sur les directives ICH. La spécificité, les limites de détection et quantification, la linéarité, la justesse et la précision ont été évaluées et validées. D'autre part, l'étude de stabilité du mélange des 8 standards triterpéniques dérivés a permis de constater que l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique se détériore très vite dans le temps après sa dérivation. Les échantillons d'extraits de résines devront donc être analysés immédiatement après la réaction de dérivation.

Pour la suite, nous allons appliquer la méthode validée à la quantification des composés présents majoritairement dans les résines de type Frankincense.

IV.5 Quantification des marqueurs majoritaires des résines Frankincense

Après avoir validé la méthode d'analyse, nous allons tout d'abord évaluer la répétabilité de l'étape d'extraction ainsi que la stabilité dans le temps de la résine *Boswellia serrata* considérée comme modèle. Puis la méthodologie sera appliquée à l'évaluation de la distribution des composés triterpéniques dans les 4 variétés de résines de type Frankincense dont nous disposons, afin d'identifier et de quantifier leurs marqueurs spécifiques.

IV.5.1 Analyse de la résine *Boswellia serrata*

La méthode d'analyse étant validée, il nous reste à évaluer la répétabilité de l'étape d'extraction des terpènes contenus dans l'échantillon de résine. La méthode d'extraction retenue est celle correspondant à l'extraction par solvant pressurisé (PLE) comme décrit précédemment dans le chapitre III et le solvant d'extraction sélectif choisi est le chloroforme. Après répétition de cette étape trois fois, la valeur calculée du rendement d'extraction est de $65.1\% \pm 4.1\%$ ($n=3$).

Afin de s'assurer que les composés terpéniques (des mono- aux triterpènes) sont bien extraits dans leur ensemble par ce protocole, une analyse des 3 extraits obtenus a été effectuée en appliquant la méthode GC-MS mise au point dans le chapitre III. On constate que les mono- et sesquiterpènes représentent 3.6 % de l'extrait (RSD 1.2%, $n=3$), la fraction diterpénique 22.0% (RSD 2.7%, $n=3$) et la fraction triterpénique 75.5% (RSD 4.6%, $n=3$). Les valeurs de RSD% ne dépassant pas 5%, ces résultats montrent que l'étape d'extraction est répétable et n'entraînera pas de biais durant la quantification des différentes résines.

Il est important également de s'assurer que les résines étudiées ne se dégradent pas dans le temps afin de pouvoir comparer entre elles les différentes résines de type Frankincense. Pour vérifier ce point, nous avons analysé l'échantillon de résine *Boswellia serrata* à 4 mois d'intervalle et évalué l'évolution de la distribution relative de ses constituants.

D'après le tableau IV.6, la résine *Boswellia serrata* reste stable après 4 mois concernant la distribution des triterpènes avec un coefficient de variation compris entre 0.3% (β -amyrine) et 9.6% (Acide 11-kéto- β -boswellique).

Tableau IV.6 Etude de stabilité pour la résine *Boswellia serrata* analysée à 4 mois d'intervalle

Provenance		Asie		
Résine		<i>B. Serrata</i> (Inde)		
N°	Composés	Distribution relative % (n=3)	Distribution relative % après quatre mois (n=3)	Déviati on standard $\left(\frac{x_{n+1} - x_n}{\bar{x}}\right) \times 100$
1	β -amyrine	0.86 $\pm$ 0.05	0.86 $\pm$ 0.02	0.3%
2	α -amyrine	2.92 $\pm$ 0.07	3.19 $\pm$ 0.03	9.0%
3	Acide α -boswellique	8.32 $\pm$ 0.08	8.87 $\pm$ 0.04	6.5%
4	Acide β -boswellique	20.79 $\pm$ 0.04	21.56 $\pm$ 0.03	3.7%
5	Acide α -acétyl-boswellique	3.37 $\pm$ 0.04	3.41 $\pm$ 0.04	1.2%
	Acide β -acétyl-boswellique			
	Acide 11-kéto- β -boswellique			
6	Acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique	9.26 $\pm$ 0.07	8.84 $\pm$ 0.06	4.6%
7	β -amyrine	5.63 $\pm$ 0.08	6.20 $\pm$ 0.03	9.6%
8	α -amyrine	2.44 $\pm$ 0.08	2.58 $\pm$ 0.04	5.5%
	Acide α -boswellique			

IV.5.2 Analyse des résines de type Frankincense

La méthode validée a été appliquée à la détermination des composés terpéniques présents dans les 4 résines de type Frankincense dont nous disposons : *Boswellia neglecta*, *Boswellia carterii*, *Boswellia sacra* et *Boswellia serrata*.

• ASPECT QUALITATIF DE L'ANALYSE GC-MS DES RESINES

Les résines ont été analysées en GC-MS et les distributions relatives évaluées (figure IV.7 et tableau IV.7). Un simple examen visuel de la figure IV.7 met en évidence des différences dans la composition des résines.

Tout d'abord, la résine *Boswellia neglecta* peut être facilement distinguée des autres résines dues à l'absence de l'acide acétyl- α -boswellique (5), l'acide acétyl- β -boswellique (6), l'acide 11-kéto- β -boswellique (7) et l'acide 3-O-11-kéto- β -boswellique (8).

Par la suite, on peut également distinguer la résine *Boswellia serrata* des résines *Boswellia carterii* et *sacra*. En effet, l'acide β -boswellique (4) est le composé majoritaire de cette résine indienne avec une distribution relative de 21.6%.

Pour les résines d'Oman et de Somalie, l'acide α -boswellique (3) et l'acide β -boswellique (4) ont des teneurs similaires. Toutefois ces deux résines assez proches peuvent être distinguées par la forte teneur en acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (8) dans la résine *Boswellia sacra* avec une distribution relative de 7.7% en comparaison avec la résine *Boswellia carterii* qui possède une distribution pour cet acide de 0.12%.

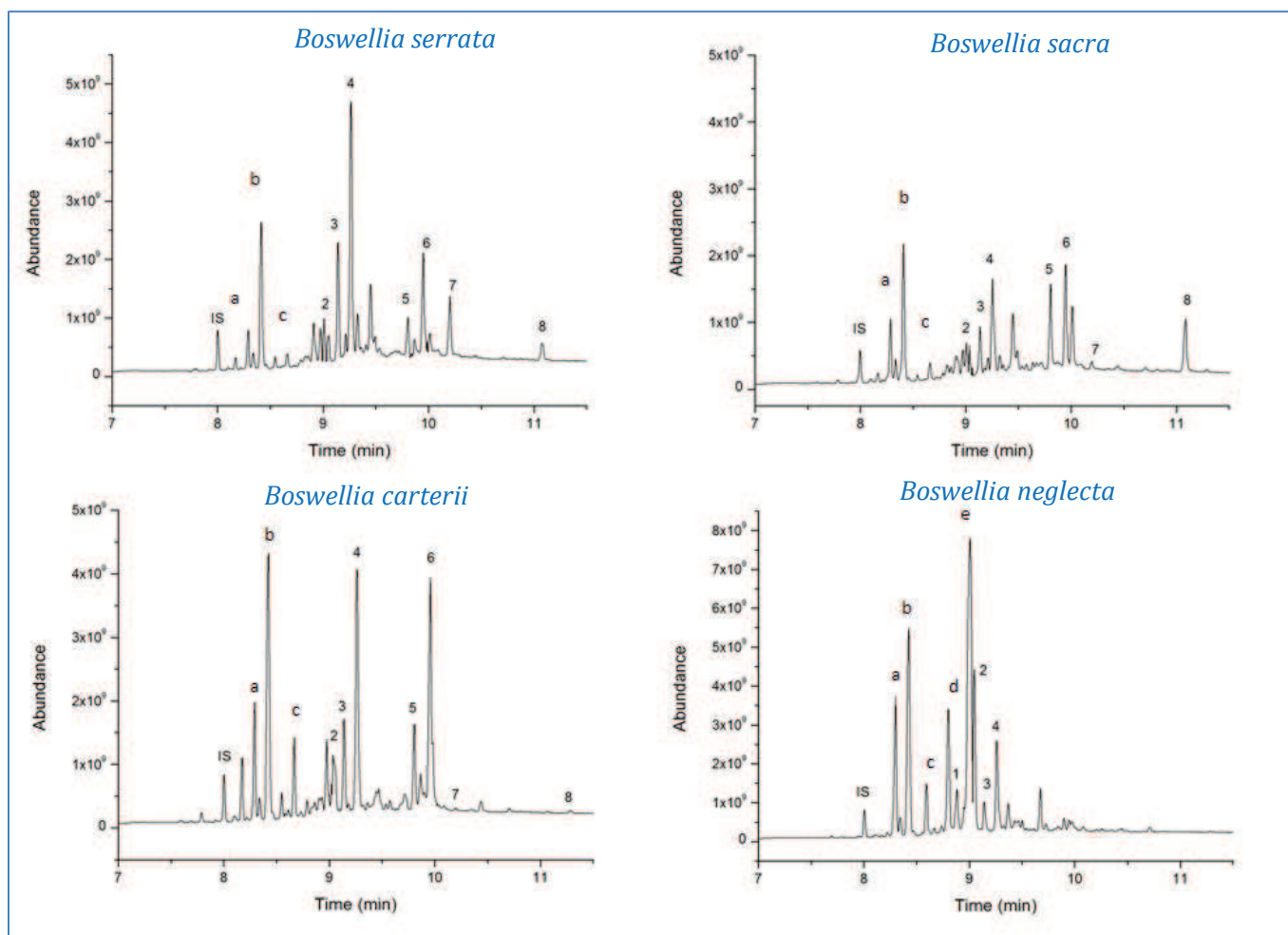


Figure IV.7 Analyse GC-MS des 4 résines de type Frankincense avec la distribution relative des composés majoritaires.

Composés : β -amyrine (1), α -amyrine (2), acide α -boswellique (3), acide β -boswellique (4), acide acétyl- α -boswellique (5), acide acétyl- β -boswellique (6), acide 11-kéto- β -boswellique (7) et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique (8), 3-épi- β -amyrine (a), 3-épi- α -amyrine (b), triterpène non identifié (c), α -amyrenone (d), β -amyrenone (e) et cholestérol (IS).

Conditions GC-MS : hélium gaz vecteur avec un débit de 1.2 mL.min⁻¹. Gradient : 200°C (1 min) suivi d'une rampe de température de 15°C.min⁻¹ jusqu'à 330°C (3 min). Pour le spectromètre de masse acquisition en mode ionisation en mode full scan sur m/z 35 – 700 amu. Température de la ligne de transfert de 315°C et température de la source de 250°C.

En plus des 8 standards triterpéniques, on a pu identifier d'autres composés en se basant sur la comparaison des spectres de masse avec ceux de la base de données du NIST et ceux publiés dans la littérature. La présence du 3-épi- β -amyrine (a), du 3-épi- α -amyrine (b) et d'un triterpène non identifié (c) a été observée dans les quatre résines avec une forte teneur en 3-épi-

β -amyrine (**a**) pour l'ensemble des espèces. De plus, le β -amyrenone (**e**) et l' α -amyrenone (**d**) sont présents spécifiquement à forte teneur dans la résine *Boswellia neglecta* avec des distributions relatives de 8.1% et 35.9% respectivement.

Tableau IV.7 Distribution relative des triterpènes présents dans les résines de type Frankincense.

N°	Composé	Distribution relative % (n=3)			
		<i>B. serrata</i>	<i>B. sacra</i>	<i>B. carterii</i>	<i>B. neglecta</i>
1	β -amyrine	0.86 $\pm$ 0.02	0.83 $\pm$ 0.06	0.93 $\pm$ 0.05	2.6 $\pm$ 0.03
2	α -amyrine	3.19 $\pm$ 0.03	3.55 $\pm$ 0.07	1.88 $\pm$ 0.06	9.48 $\pm$ 0.02
3	Acide α -boswellique	8.87 $\pm$ 0.04	4.36 $\pm$ 0.03	5.14 $\pm$ 0.02	1.64 $\pm$ 0.02
4	Acide β -boswellique	21.56 $\pm$ 0.03	9.14 $\pm$ 0.03	14.55 $\pm$ 0.03	6.07 $\pm$ 0.04
5	Acide α -acétyl-boswellique	3.41 $\pm$ 0.04	7.72 $\pm$ 0.01	4.98 $\pm$ 0.02	-
6	Acide β -acétyl-boswellique	8.84 $\pm$ 0.06	9.81 $\pm$ 0.02	14.63 $\pm$ 0.02	-
7	Acide 11-kéto- β -boswellique	6.20 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.03	-
8	Acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique	2.58 $\pm$ 0.04	7.72 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.07	-
a	3-épi- β -amyrine	2.70 $\pm$ 0.08	4.91 $\pm$ 0.02	6.91 $\pm$ 0.03	9.80 $\pm$ 0.12
b	3-épi- α -amyrine	11.39 $\pm$ 0.03	10.89 $\pm$ 0.05	16.41 $\pm$ 0.03	15.65 $\pm$ 0.01
c	Triterpène non identifié	1.22 $\pm$ 0.06	1.44 $\pm$ 0.01	3.84 $\pm$ 0.02	2.76 $\pm$ 0.05
d	β -amyrenone	-	-	-	8.05 $\pm$ 0.14
e	α -amyrenone	-	-	-	35.88 $\pm$ 0.03

L'analyse qualitative des 4 résines de type Frankincense effectuée selon la méthodologie GC-MS que nous avons validé pour l'analyse des triterpènes est déjà très informative. Elle permet très rapidement de distinguer les résines les unes par rapport aux autres par simple comparaison de leurs chromatogrammes et évaluation des teneurs relatives des différents composés terpéniques les constituant.

- **ASPECT QUANTITATIF DE L'ANALYSE GC-MS DES RESINES**

Afin d'affiner la différenciation des résines, les concentrations absolues des triterpènes ont été évalués pour les quatre résines.

L'ensemble des résultats est rassemblé dans le tableau IV.8. En premier lieu, il faut noter que toutes les valeurs de concentrations ont été déterminées avec des coefficients de variations inférieures à 20% lors de l'analyse de triplicata. Dans ces conditions de répétabilité de l'analyse, il est donc permis de discuter et comparer les valeurs absolues de ces concentrations entre elles. Les résultats obtenus montrent une forte teneur en acide β -boswellique (**4**) dans la résine

Boswellia serrata (3.44 g/ 100 g de résine sèche), la résine *Boswellia sacra* (1.66 g/ 100 g de résine sèche) et *Boswellia carterii* (3.09 g/ 100 g de résine sèche). La β -amyrine et l'acide α -boswellique possèdent des concentrations variant de 0.08 à 0.56 g/100 g de résine sèche et de 0.66 à 1.23 g/100 g de résine sèche respectivement. Compte tenu de leurs faibles teneurs dans les résines, ces 2 composés ne sont pas les plus pertinents comme marqueurs pour différencier les résines contrairement aux acides 11-kéto- β -boswellique et 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique présents en forte teneur et en quantité significative dans les résines *Boswellia serrata* et *Boswellia sacra* et qui peuvent donc être considérés comme des marqueurs plus sûrs.

D'autre part, l'acide acétyl- β -boswellique et l' α -amyrine sont des marqueurs des résines *Boswellia carterii* et *Boswellia neglecta* respectivement.

Concernant les résines proches *Boswellia sacra* et *Boswellia carterii* qui ont souvent été confondus, l'analyse quantitative semble similaire à premier coup d'œil. Afin de mettre en évidence les différences entre ces deux résines, nous avons déterminé le rapport entre les concentrations des marqueurs de la résine *Boswellia carterii* (acide acétyl- β -boswellique) et celui de la résine *Boswellia sacra* (acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique). On obtient des ratios de 2.20 pour l'acide acétyl- β -boswellique et de 0.037 pour l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique.

Tableau IV.8 Détermination des concentrations des triterpènes présents dans les résines

Provenance		Asie	Moyen Orient	Afrique	
N°	Composés	<i>B. Serrata</i> (Inde)	<i>B. Sacra</i> (Oman)	<i>B. Carterii</i> (Somalie)	<i>B. Neglecta</i> (Kenya)
		Concentration en g / 100 g de résine sèche			
1	β -amyrine	0.08 $\pm$ 0.08	0.13 $\pm$ 0.10	0.18 $\pm$ 0.12	0.56 $\pm$ 0.20
2	α -amyrine	0.42 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.11	0.80 $\pm$ 0.02	3.19 $\pm$ 0.08
3	Acide α -boswellique	1.23 $\pm$ 0.05	0.74 $\pm$ 0.03	1.08 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.14
4	Acide β -boswellique	3.44 $\pm$ 0.01	1.66 $\pm$ 0.12	3.09 $\pm$ 0.03	1.80 $\pm$ 0.09
5	Acide α -acétyl-boswellique	0.73 $\pm$ 0.05	1.97 $\pm$ 0.03	1.56 $\pm$ 0.04	-
6	Acide β -acétyl-boswellique	1.73 $\pm$ 0.08	2.27 $\pm$ 0.05	4.98 $\pm$ 0.03	-
7	Acide 11-kéto- β -boswellique	2.36 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.04	-
8	Acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique	1.05 $\pm$ 0.16	3.66 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.14	-

D'autre part, nous avons comparé les résultats que nous avons obtenus pour la composition triterpénique de la résine *Boswellia serrata* (la résine la plus étudiée de la famille des Frankincense) aux valeurs proposées dans la littérature[16]. Les concentrations obtenues dans la littérature et les concentrations des triterpènes présents dans la résine *Boswellia serrata* que nous avons déterminés précédemment sont présentés dans le tableau IV.9.

Tableau IV.9 Comparaison des concentrations (g/ 100g de résine sèche) des triterpènes observées dans la littérature [16] et ceux déterminées par la méthode GC-MS mise en place pour la résine *Boswellia serrata* (Inde).

	Echantillon	Acide α/β boswellique	Acide α/β acétyl-boswellique	Acide 11-kéto- β -boswellique	Acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique
Valeurs dans la littérature	<i>Boswellia serrata</i>	2.52 ± 0.0036	0.56 ± 0.0021	1.47 ± 0.0018	0.04 ± 0.0022
Valeurs déterminées	<i>Boswellia serrata</i>	1.23 ± 0.05 (α) 3.44 ± 0.01 (β)	0.73 ± 0.05 (α) 1.73 ± 0.08 (β)	2.36 ± 0.10	1.05 ± 0.16

Les valeurs de concentrations que l'on retrouve dans la littérature et qui ont été déterminées par analyse en chromatographie sur couche mince (TLC) en utilisant l'anisaldéhyde comme révélateur et l'analyse au densitomètre sont du même ordre de grandeur que celles que nous avons obtenues avec la méthode GC-MS validée. Cependant, comme nous l'avons montré au chapitre II, les isomères ne sont pas séparés en TLC ainsi, les structures α et β des triterpènes sont associées à un seul et même composé, ce qui conduit à définir une teneur globale. De ce fait, les teneurs sont plus faibles en TLC du fait que la méthode est moins sensible que la méthode GC. De plus, parmi les triterpènes analysés, de nombreux présentent des structures assez similaires ce qui peut entraîner en TLC des co-élutions du fait de la plus faible résolution vis-à-vis de cette famille moléculaire de cette technique par rapport à la GC.

L'ensemble des résultats montre que la méthode que nous avons optimisée en GC-MS était spécifique puisque la spectrométrie de masse permet de vérifier la pureté des pics chromatographiques. Chaque composé quantifié en GC-MS l'a été à partir d'un signal spécifique. Cette méthode mise en place est plus adaptée à la quantification de l'ensemble des composés présents dans les résines végétales permettant de différencier les formes isomères.

IV.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en place la validation complète de la méthode GC-MS permettant d'analyser les marqueurs majoritaires présents dans les résines. Pour cela nous avons déterminé plusieurs critères : la spécificité, limite de détection et de quantification, la linéarité, la justesse et précision et la stabilité de la méthode. Nous avons utilisé 8 standards triterpéniques connus pour être présents dans les résines de type Frankincense.

La méthode GC-MS validée peut être utilisée comme méthode pour le contrôle qualité des résines concernant leurs concentrations en composés triterpéniques. Tout d'abord l'identification des composés a permis de distinguer assez rapidement la résine *Boswellia neglecta* des trois autres résines par l'absence spécifique à cette résine de l'acide acétyl- α -boswellique, l'acide acétyl- β -boswellique, l'acide 11-kéto- β -boswellique et l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique. D'autre part, la détermination des distributions relatives a permis de différencier la résine *Boswellia serrata* des résines *Boswellia carterii* et *Boswellia sacra*. Afin d'affiner la distinction des résines, la quantification a permis d'évaluer des marqueurs spécifiques. La teneur élevée en acide 11-kéto- β -boswellique peut être considérée comme un marqueur pour la résine *Boswellia serrata*, tout comme l'acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique pour la résine *Boswellia sacra* et l'acide acétyl- β -boswellique pour la résine *Boswellia carterii*.

Ces résultats peuvent permettre par la suite de construire une banque de données pour les résines en termes de concentration en marqueurs majoritaires afin de tracer la provenance des résines de type Frankincense.

IV.7 Référence

- [1] M. Feinberg, Validation interne des méthodes d'analyse, Techniques de l'ingénieur, (2001).
- [2] M. Paul, G. Brüning, J. Bergmann, J. Jauch, A Thin-layer Chromatography Method for the Identification of Three Different Olibanum Resins (*Boswellia serrata*, *Boswellia papyrifera* and *Boswellia carterii*, respectively, *Boswellia sacra*), *Phytochemical Analysis*, 23 (2012) 184-189.
- [3] ISO/CEI17025, Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, (2005).
- [4] ICH, Validation of analytical procedures : Text and methodology (Q2), (November 2005).
- [5] Western European Laboratory Accreditation Cooperation. Guidance Document No. WG D2. EURACHEM/WELAC Chemistry, Teddington, (1993).
- [6] P. Araujo, Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 2224-2234.
- [7] D.A. Armbruster, T. Pry, Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation, *The Clinical Biochemist Reviews*, 29 (2008) S49-S52.
- [8] A. Shrivastava, V. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles of Young Scientists*, 2 (2011) 21-25.
- [9] M.P. M.Désenfant, C. Rivier, De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure, 11e congrès international de métrologieToulon, 20-23 octobre 2003.
- [10] C. Mathe, G. Culioli, P. Archier, C. Vieillescazes, Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1023 (2004) 277-285.
- [11] Z. Jemmali, A. Chartier, C. Dufresne, C. Elfakir, Optimization of the derivatization protocol of pentacyclic triterpenes prior to their gas chromatography-mass spectrometry analysis in plant extracts, *Talanta*, 147 (2016) 35-43.
- [12] Z. Jemmali, A. Chartier, C. Elfakir, Development of a gas chromatography-mass spectrometry method to monitor in a single run, mono- to triterpenoid compounds distribution in resinous plant materials, *Journal of Chromatography A*, 1443 (2016) 241-253.
- [13] S.E. Stein, An integrated method for spectrum extraction and compound identification from GC/MS data, *Mass Spectrometry Data Center*.
- [14] S.E. Stein, NIST Standard Reference Database The NIST Mass Spectrometry Data Center (June 2008).
- [15] Guidance for Industry : Analytical procedures and Methods validation for Drugs and Biologics. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), (July 2015).
- [16] K. Krohn, M.S. Rao, N.V. Raman, M. Khalilullah, High-performance thin layer chromatographic analysis of anti-inflammatory triterpenoids from *Boswellia serrata* Roxb, *Phytochemical Analysis*, 12 (2001) 374-376.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de cette thèse était de développer de nouvelles approches analytiques pour d'une part, mettre en évidence les espèces terpéniques minoritaires présentes dans les extraits végétaux et d'autre part permettre le screening chimique rapide d'un extrait brut donné afin de distinguer le plus tôt possible dans l'extrait, les molécules nouvelles des molécules déjà connues. Neuf échantillons de résines végétales variées : deux résines triterpéniques (*Pistacia Lentiscus* et *Dammar*), deux résines diterpéniques (*Copal de Manille* et *Sandarac*) et cinq résines di-et tri-terpéniques (*Comiphora wildii*, *Boswellia neglecta*, *Boswellia carterii*, *Boswellia sacra* et *Boswellia serrata*) nous ont servi de modèles pour valider cette étude et évaluer l'aptitude des méthodologies développées à mettre en lumière les différences mêmes les plus subtiles pouvant exister à l'intérieur d'une famille botanique donnée.

La richesse des résines végétales a été mise en évidence dans le chapitre I ainsi que la complexité de l'étude de ces matrices dû notamment à leur très grande variété et la présence de nombreuses espèces différentes. Afin de simplifier le problème, on s'est tout d'abord focaliser sur les marqueurs majoritaires de ces résines en nous intéressant aux terpènes de haut poids moléculaires.

La méthode d'analyse la plus rapide et la plus simple à mettre en œuvre pour caractériser la composition phytochimique d'extraits végétaux reste la TLC. La première partie de notre travail (chapitre II) a consisté à mettre en place la méthode TLC et son couplage à un spectromètre de masse de type MALDI-TOF-MS pour l'analyse des marqueurs majoritaires des résines. Une optimisation systématique des paramètres principaux (natures de la phase stationnaire et de la phase mobile) influant sur la séparation des composés a été tout d'abord effectuée. Une simple lecture de plaque sous lumière UV puis dans le visible après une dérivation à l'anisaldéhyde, a permis déjà une première différenciation visuelle des résines en fonction de leur composition terpénique. Pour obtenir des informations structurales plus sûres sur les différents composés séparés nous nous sommes intéressées ensuite au couplage de la TLC à la spectrométrie de masse. La mise en place de ce couplage avec le MALDI-TOF-MS n'a encore jamais été décrite pour les composés terpéniques. Ces composés possèdent en effet une faible masse moléculaire et peu de sites de protonation ou déprotonation ce qui n'est pas favorable à leur ionisation MALDI. L'utilisation d'une matrice inorganique développée dans notre laboratoire a rendu possible l'ionisation des acides triterpéniques et a permis l'identification de marqueurs importants contenus dans les résines de type Frankincense (acide boswellique, acide acétyl-

boswellique, acide 11-kéto- β -boswellique et acide 3-O-acétyl- β -boswellique). Cependant, toutes les différences de composition chimique entre les échantillons de résines qui ont pu être visualisées sur les plaques d'analyse TLC n'ont pas pu être caractérisées en couplage TLC-MALDI-TOF-MS. En perspective de travail, il serait intéressant de développer d'autres types de matrice pour le MALDI ou de travailler avec des mélanges de matrices (inorganique-organique) afin de réussir à ioniser les composés terpéniques possédant des structures de type alcool et diol avec peu de protons labiles.

Pour obtenir une identification la plus exhaustive possible des terpènes présents dans les résines végétales, nous nous sommes intéressées à caractériser non seulement leurs marqueurs majoritaires mais également leurs marqueurs minoritaires en développant une méthodologie d'analyse permettant simultanément la caractérisation des terpènes des plus volatils aux non-volatils. Le couplage de la chromatographie gazeuse à la spectrométrie de masse s'est avéré la technique la plus appropriée pour optimiser de nouveaux outils rapides et performants pour une différenciation approfondie des résines (chapitre III). La méthodologie a été développée et optimisée depuis l'étape d'extraction spécifique du matériel végétal jusqu'aux conditions de séparation analytique et de détection. Dans le but d'établir un protocole standardisé et robuste applicable à tous les échantillons,, nous avons adopté une stratégie d'optimisation des étapes basée sur l'utilisation des plans d'expérience (optimisation de la réaction de dérivation) et une approche statistique (choix de phase stationnaire). La méthode d'extraction par solvant pressurisé (PLE) utilisant le chloroforme comme solvant d'extraction s'est avérée la plus pertinente pour récupérer rapidement l'ensemble du contenu terpénique des résines. Après évaporation à sec de chaque extrait, un protocole de silylation de l'extrait a été optimisé et les conditions optimales conduisant à une dérivation totale de toutes les fonctions acides et alcools présentes dans les composés terpéniques ont été dégagées : le résidu solide est dérivé par l'ajout de 250 μ L d'un mélange d'agent dérivant constitué de BSFTA, TMCS et pyridine dans les proportions (22 :13 :65 v/v/v) pendant 2h à 30°C. Pour la séparation GC-MS, les paramètres d'injection ont été sélectionnés afin de limiter la perte en composés les plus volatils et le choix d'une injection de type PTV a été justifié. Une phase stationnaire de type diméthylpolysiloxane greffée à 5% par un groupement polaire diphényle (la phase HP-5ms) a été sélectionnée. En utilisant ces conditions, l'ensemble des terpènes a pu être analysé en moins de 22 min. Une prévalidation de la méthode en terme de limites de détection et de quantification, de linéarité et de répétabilité a été également conduite. La méthodologie a été appliquée ensuite à la différenciation de plusieurs classes de résines (triterpénique, diterpéniques, tri- et diterpéniques) afin de montrer la faisabilité de la méthode.

Dans un souci d'affiner la différenciation des résines et notamment les espèces très proches du point de vue botanique, nous nous sommes intéressés à l'aspect quantitatif (chapitre IV). La validation complète des marqueurs triterpéniques a permis de déterminer leurs concentrations exactes dans les résines. Cette méthodologie a été appliquée à l'étude des résines Frankincense dont on dispose des standards triterpéniques. Les résultats obtenus ont permis la distinction de ces résines en définissant des marqueurs spécifiques pour chaque espèce en fonction de la concentration déterminée. Cette étude peut être étendue à l'analyse de résines très proches en composition apportant ainsi un outil supplémentaire pour les différencier.

En conclusion, nos travaux ont permis de développer de nouvelles stratégies d'analyse de matrices végétales : couplage TLC-MALDI-TOF-MS pour les acides triterpéniques et méthodologie d'analyse GC-MS pour une caractérisation simultanée des composés minoritaires et majoritaires allant des mono- aux triterpènes. Ces méthodes complémentaires permettent une identification complète des composés et un gain de temps. Selon la problématique à résoudre, on peut soit se tourner vers l'analyse en TLC (détermination rapide et visuelle de la complexité en constituants non volatils ou détermination des acides triterpéniques en couplage à la masse (MALDI-TOF-MS)) soit se tourner vers l'analyse en GC-MS pour identifier les marqueurs minoritaires ou encore pousser jusqu'à déterminer la concentration des marqueurs majoritaires présents en utilisant la méthode GC-MS validée.

ANNEXES

ANNEXE A. SOLVANTS, REACTIFS ET RESINES

L'hexane, l'heptane, le méthyltertiobutylether (MTBE), l'isopropanol (2-PrOH), le tetrahydrofurane (THF), le dichlorométhane (CH₂Cl₂), l'acétate d'éthyle (AcOEt), le toluène, le chloroforme (CHCl₃), le méthanol (MeOH) et l'acétonitrile (ACN) tous de qualité analytique, ont été fournis par Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). L'eau utilisée est de l'eau ultra-pure (résistance < 18 MΩ) produite par l'appareil Elgastat UHQ II (Elga)

Le tableau A.1 regroupe les autres réactifs utilisés au cours de ces travaux. Tous les standards ont une pureté de 99%. Et le tableau A.2 regroupe l'ensemble des résines étudiées.

Tableau A. 1 Listes des composés utilisés pour ces travaux de thèse

Composé	Fournisseur
α-amyrine	Extrasynthèse (Geney, France)
β-amyrine	Extrasynthèse (Geney, France)
β-caryophyllène	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
α-pinène	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
β-pinène	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Acétate de bornyle	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Acétate de linalyle	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Acide bétulinique	Extrasynthèse (Geney, France)
Acide acétique glacial	Carlo Erba (Val-de-Reuil, France)
Acide acétyl- α-boswellique	Extrasynthèse (Geney, France)
Acide acétyl- β -boswellique	Extrasynthèse (Geney, France)
Acide 3-O-acétyl-11-kéto- β -boswellique	Extrasynthèse (Geney, France)
Acide α-boswellique	Extrasynthèse (Geney, France)
Acide β-boswellique	Extrasynthèse (Geney, France)
Acide corosolique	Glenthams Sciences (Londres, Royaume Unis)
Acide 11-kéto- β -boswellique	Extrasynthèse (Geney, France)
Acide maslinique	Glenthams Sciences (Londres, Royaume Unis)
Acide oléanolique	Extrasynthèse (Geney, France)
Acide sulfurique	Carlo Erba (Val-de-Reuil, France)
Acide ursolique	Extrasynthèse (Geney, France)
Anisaldéhyde	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Bétuline	Extrasynthèse (Geney, France)
Bornéol	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Cafestol	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Camphrène	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Cholestérol	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Erythrodol	Extrasynthèse (Geney, France)
Géranol	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Limonène	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Linalol	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Lupéol	Extrasynthèse (Geney, France)
N,O-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (BSTFA)	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Pyridine	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Sclaréol	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)

Trimethylchlorosilane (TMCS)	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Thuyone	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Uvaol	Extrasynthèse (Geney, France)

Tableau A. 2 Listes des résines analysées avec le nom des fournisseurs

Résines sélectionnées	Zone géographique de provenance	Fournisseur
1. Mastic (<i>Pistacia lentiscus</i>)	Europe	LVMH-recherche (Saint Jean de Braye, France)
2. Dammar	Afrique du Nord	Art Chimie (Hendaye, France)
3. <i>Commiphora wildii</i> (Myrrhe)	Afrique	LVMH-recherche (Saint Jean de Braye, France)
4. <i>Boswellia serrata</i> (Oliban)	Asie (Inde)	LVMH-recherche (Saint Jean de Braye, France)
5. <i>Boswellia carterii</i> (Oliban)	Afrique (Somalie)	Arbor'Essences (Eugénie-Les-Bains, France)
6. <i>Boswellia neglecta</i> (Oliban)	Afrique (Kenya)	Arbor'Essences (Eugénie-Les-Bains, France)
7. <i>Boswellia sacra</i> (Oliban)	Moyen-Orient (Oman)	Arbor'Essences (Eugénie-Les-Bains, France)
8. Copal de Manille	Asie (Philippine)	LVMH-recherche (Saint Jean de Braye, France)
9. Sandaraque	Afrique du nord (Maroc)	Art Chimie (Hendaye, France)

Préparation des standards :

Chaque standard terpénique a été préparé indépendamment dans de l'hexane (mono-, sesqui- et diterpènes) et dans du MTBE (triterpènes) à une concentration de 1000 mg.L⁻¹. Les solutions ont été stockées à 4°C.

Préparation des résines :

Les résines solides ont été tout d'abord broyées dans un mortier avec de l'azote liquide. Par la suite, on a obtenu de la poudre très fine avec un moulin à café domestique (Bosch). La poudre de résine a été stockée dans un sac hermétique à température ambiante à l'abri de la lumière.

ANNEXE B. ANALYSE EN TLC

Dépôts et séparation

Un déposeur semi-automatique Linomat IV (Camag, Suisse) a été utilisé pour réaliser les dépôts à une vitesse de 4 sec/ μ L en utilisant du diazote comme gaz de vaporisation. Les échantillons ont été déposés en bandes fines de 6 mm de largeur à une hauteur de 10 mm et à 10 mm du bord gauche de la plaque. Entre deux bandes un espace de 5 mm a été laissé.

Echantillon de résine: 1 μ L à 50 mg/L (poudre fine de résine broyée dissoute dans du méthanol et filtrée après centrifugation)

Standard: 2 μ L à 500 mg/L

Plaque silice 60 F 254 (Merck): (10 cm x 10 cm, sur support aluminium)

Plaque RP18 WF 254s (Merck): (10 cm x 10 cm, sur support aluminium)

Toutes les séparations ont été effectuées dans une chambre d'élution horizontale.

Réactif pour la révélation : anisaldéhyde

Pour la préparation de l'anisaldéhyde, on a ajouté à un mélange de 85 mL de méthanol et de 10 mL acide acétique glacial, 5 mL de H₂SO₄ concentré (96%) et 0.5 g mL d'anisaldéhyde. La solution est conservée au frais.

Pour la révélation, on a plongé la plaque à analyser dans la solution d'anisaldéhyde, puis la plaque a été chauffée à 110°C pendant 5 à 10 minutes dans l'étuve. La lecture de la plaque se fait dans le visible.

ANNEXE C. EXTRACTION DES RESINES

PLE (Pressurised Liquid Extraction) :

Le système ASE 150 de chez Dionex (Voisins le Bretonneux, France) a été utilisé pour l'extraction PLE. 200 mg de résine mélangée avec une quantité identique de terre diatomée a été introduite dans une cellule de 5 mL en acier inoxydable en testant la température de 40°C et de 90°C. Différents cycles statiques d'extraction ont été testés (3 et 5) de 5 min chacun avec un volume de fuite de 65% et une purge d'azote de 100 sec.

MAE (Microwave Assisted Extraction)

L'extraction assistée par micro-ondes a été réalisée dans un four micro-onde de type MycroSynth (Milestone, Sorisole, Italie) en travaillant en mode puissance d'irradiation. 200 mg de résine dans 15 mL de solvant ont été placées dans le réacteur avec un agitateur. Le logiciel easyCONTROL permet de piloter l'ensemble des paramètres (puissance d'irradiation, agitation, le temps d'extraction,...). Nous avons testé deux puissances d'irradiation (500W et 1000W) avec 3 cycles de 1 min chacun. Le réacteur est refroidi entre chaque cycle dans un bac à glace pendant 10 min.

Après extraction MAE, les extraits ont été filtrés sur un filtre seringue de type Millipore Millex-HV (0,45 µm, Billerica, États-Unis).

UAE (Ultrasound Assisted Extraction)

L'extraction assistée par ultrasons a été réalisée dans un bac à ultrasons en ajoutant un volume de 200 mL pour le bain. La température du milieu est contrôlée. 200 mg de résine dans 15 mL de solvant ont été placées un erlenmeyer. Nous avons fait varier le temps d'extraction (30 min et 60 min).

Par la suite, la solution a été filtrée sur un filtre seringue de type Millipore Millex-HV (0,45 µm, Billerica, États-Unis).

M (macération)

200 mg de résine a été placée dans 15 mL de solvant avec un agitateur sur une plaque chauffante à température ambiante et à 50°C pendant une durée déterminée de 60 min. Après extraction, la solution a été filtrée sur un filtre seringue de type Millipore Millex-HV (0,45 µm, Billerica, États-Unis).

ANNEXE D. METHODE GC (CHAPITRE III)

Différentes méthodes GC ont été utilisées en fonction de l'étape à optimiser. Nous avons utilisé la GC-FID pour la sélection de colonnes stationnaires et l'optimisation de l'étape de dérivation par la méthode des plans d'expériences. La GC-MS a été utilisée lors du choix de la technique d'extraction ainsi que pour la caractérisation des résines. Pour l'ensemble des méthodes 1 μL de solution a été injectée lors de l'analyse.

Méthode GC-FID pour la sélection de colonne stationnaire:

La séparation chromatographique a été réalisée en chromatographie en phase gazeuse, Ultra-Trace (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France) utilisant un injecteur à température programmable (PTV) et détecteur FID.

- Le PTV liner (Restel) possède un diamètre de 2 mm et est programmée en température de la manière suivante : température initiale de 55°C pendant 0.05 minutes (mode injection), suivi d'une rampe à 14°C.min⁻¹ jusqu'à 75°C (étape évaporation) avec un débit de fuite de 50 mL.min⁻¹, puis après une deuxième rampe de température de 14°C.min⁻¹ la température de 350°C est atteinte en mode splitless.
- L'hélium est utilisé en gaz vecteur avec un débit de 1.2 mL.min⁻¹.
- Programme du four GC : Température initiale de 40°C pendant 2 min avec rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température maximale de la colonne étudiée.
- Paramètres du FID : Température du détecteur à 350°C avec un débit de 35 mL.min⁻¹ pour l'hydrogène et de 350 mL.min⁻¹ pour l'air. L'azote est utilisé comme gaz de make-up avec un débit de 40 mL.min⁻¹

GC-FID: pour l'optimisation de l'étape de dérivation

La séparation chromatographique a été réalisée en chromatographie en phase gazeuse de type Agilent (Santa Barbara, CA, USA) utilisant un injecteur de type split/splitless et un détecteur FID.

- L'injecteur split/splitless a été fixé à 300°C utilisant un liner de type Sky™ (Restek) avec un diamètre de 2 mm.
- Hydrogène est utilisé en gaz vecteur avec un débit de 1.2 mL.min⁻¹.
- Colonne capillaire DB-5ms (Agilent) (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)

- Programme du four GC : Température initiale de 200°C pendant 1 min avec une rampe de 25°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température 290°C, puis une rampe de 10°C.min⁻¹ jusqu'à 330°C pendant 1 min.
- Paramètres du FID : Température du détecteur à 350°C avec un débit de 35 mL.min⁻¹ pour l'hydrogène et de 350 mL.min⁻¹ pour l'air. L'azote est utilisé comme gaz de make-up avec un débit de 40 mL.min⁻¹

GC-MS: pour la caractérisation des résines et l'optimisation de l'étape d'extraction

La séparation chromatographique a été réalisée sur un appareil de chromatographie gazeuse Ultra-Trace (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France) utilisant un injecteur à température programmable (PTV) et couplé à un spectromètre de masse.

- Le PTV liner (Restek) possède un diamètre de 2 mm et est programmée en température de la manière suivante : température initiale de 55°C pendant 0.05 minutes (mode injection), suivi d'une rampe à 14°C.min⁻¹ jusqu'à 75°C (étape évaporation) avec un débit de fuite de 50 mL.min⁻¹, puis après une deuxième rampe de température de 14°C.min⁻¹ la température de 350°C est atteinte en mode splitless.
- L'hélium est utilisé en gaz vecteur avec un débit de 1.2 mL.min⁻¹.
- Colonne capillaire HP-5ms (Restek) (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)
- Programme du four GC : Température initiale de 40°C pendant 2 min pour rampe de 3°C.min⁻¹ jusqu'à atteindre la température de 330°C pendant 5 minutes.
- Paramètres du spectromètre de masse : analyse en mode ionisation électronique (EI), avec une température de ligne de transfert de 315°C et une température de source de 250°C. L'acquisition en mode full scan a lieu sur une gamme de masse de m/z 35 – 700 amu avec un dwell time de 0.0204 s. Pour l'analyse en mode ionisation chimique (CI), type de gaz et pression ou débit la température de ligne de transfert est de 300°C et la température de source est de 225°C. L'acquisition en mode full scan est réalisée sur une gamme de masse de m/z 50-750 amu avec un dwell time de 0.0204 s. Pour les deux modes d'ionisation, un délai de solvant de 3.8 minutes est appliqué.

ANNEXE E. OPTIMISATION DE LA PHASE STATIONNAIRE (CHAPITRE III)

Matrice obtenue pour l'analyse en composante principale (ACP). Le logarithme du temps de rétention a été évalué pour chaque standard sur les 8 colonnes étudiées.

Fonction chimique		Alcène					Cétone			Acétate		Alcool										Diol			Acide				
Composé		α -pinène	Camphrène	β -pinène	Limonène	Caryophyllène	Thuyone	Camphre +	Camphre -	Acétate de linalyle	Acétate de bornyle	Linalool	Menthol	Borneol	Geraniol	Sclaréal	Cafestol	Cholestérol	α -amyrine	β -amyrine	Lupéol	Erythrodiol	Betuline	Uvaol	Acide oléanolique	Acide bétulinique	Acide ursolique	Acide maslinique	Acide corosolique
Phase stationnaire étudiée	HP-5ms	0,79	0,8	0,86	0,94	1,29	1,04	1,07	1,07	1,18	1,2	1,15	1,17	1,14	1,26	1,61	1,66	1,74	1,76	1,76	1,76	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78	1,79	1,8	1,8
	DB-35ms	0,8	0,84	0,89	0,97	1,3	1,1	1,15	1,16	1,2	1,23	0,99	1,00	1,01	1,13	1,44	1,52	1,56	1,6	1,59	1,6	1,62	1,63	1,63	1,72	1,72	1,72	1,72	1,72
	CP-SIL 24	0,81	0,86	0,91	0,99	1,31	1,13	1,19	1,19	1,22	1,26	1,00	1,01	0,99	1,13	1,45	1,54	1,59	1,63	1,62	1,63	1,63	1,63	1,63	1,64	1,64	1,64	1,64	1,65
	VF-200 ms	0,58	0,63	0,68	0,76	1,18	1,07	1,11	1,11	1,13	1,18	0,95	0,98	0,95	1,08	1,45	1,53	1,58	1,61	1,6	1,61	1,62	1,62	1,62	1,63	1,63	1,64	1,65	1,65
	Optima δ 6	0,89	0,92	0,97	1,04	1,33	1,15	1,19	1,19	1,23	1,26	1,07	1,17	1,05	1,18	1,49	1,55	1,62	1,65	1,64	1,65	1,65	1,66	1,66	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69
	ZB multi résidus	1,04	1,06	1,1	1,17	1,44	1,25	1,29	1,29	1,35	1,37	0,86	0,88	0,85	0,96	1,28	1,33	1,41	1,44	1,43	1,44	1,45	1,45	1,45	1,45	1,45	1,46	1,46	1,47
	DB-5ms	0,85	0,87	0,91	0,98	1,29	1,07	1,11	1,11	1,19	1,21	1,09	1,14	1,09	1,19	1,50	1,54	1,62	1,65	1,64	1,65	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66	1,67	1,68	1,68
	RTx-1ms	0,87	0,88	0,93	1,00	1,31	1,07	1,10	1,10	1,20	1,22	1,18	1,19	1,16	1,27	1,59	1,62	1,71	1,73	1,73	1,73	1,74	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,77	1,76

ANNEXE F. TABLEAU DES RESULTATS DE L'EVALUATION DE LA LINEARITE DE LA METHODE D'ANALYSE GC-MS POUR LES COMPOSES VOLATILS (CHAPITRE III)

50 mg.L⁻¹	tr (min)	Aire 1	Aire 2	Aire 3	Aire 1/Asi₁	Aire 2/ Asi₂	Aire 3/ Asi₃	M	ET	RSD
α-pinène	3.99	1.27E+09	1.00E+09	1.40E+09	2.21E-01	1.51E-01	2.02E-01	2.12E-01	1.30E-02	6%
β-pinène	4.44	1.68E+09	1.50E+09	2.08E+09	2.92E-01	2.27E-01	3.01E-01	2.97E-01	6.35E-03	2%
Limonène	4.98	2.16E+09	2.51E+09	2.56E+09	3.76E-01	3.78E-01	3.70E-01	3.73E-01	3.90E-03	1%
Linalol	5.73	5.25E+09	5.42E+09	6.27E+09	9.14E-01	8.18E-01	9.08E-01	9.11E-01	4.50E-03	0%
Thujone	5.80	3.48E+09	3.55E+09	3.13E+09	6.06E-01	5.35E-01	4.52E-01	5.71E-01	4.99E-02	9%
A, Bornyle	7.55	5.75E+09	6.63E+09	6.91E+09						
25 mg.L⁻¹	tr (min)	Aire 1	Aire 2	Aire 3	Aire 1/Asi₁	Aire 2/ Asi₂	Aire 3/ Asi₃	M	ET	RSD
α-pinène	3.99	4.04E+08	4.21E+08	6.11E+08	8.58E-02	7.58E-02	9.43E-02	9.01E-02	6.01E-03	7%
β-pinène	4.44	5.48E+08	5.89E+08	8.74E+08	1.17E-01	1.06E-01	1.35E-01	1.11E-01	7.51E-03	7%
Limonène	4.98	6.48E+08	9.42E+08	1.04E+09	1.38E-01	1.69E-01	1.61E-01	1.65E-01	5.92E-03	4%
Linalol	5.73	1.56E+09	2.15E+09	2.66E+09	3.32E-01	3.87E-01	4.10E-01	3.99E-01	8.09E-03	2%
Thujone	5.80	1.20E+09	1.38E+09	1.34E+09	2.55E-01	2.48E-01	2.06E-01	2.52E-01	4.56E-03	2%
A, Bornyle	7.55	4.70E+09	5.56E+09	6.48E+09						
12.5 mg.L⁻¹	tr (min)	Aire 1	Aire 2	Aire 3	Aire 1/Asi₁	Aire 2/ Asi₂	Aire 3/ Asi₃	M	ET	RSD
α-pinène	3.99	2.38E+08	2.02E+08	2.64E+08	6.09E-02	4.27E-02	5.11E-02	4.69E-02	5.94E-03	13%
β-pinène	4.44	3.07E+08	2.83E+08	3.77E+08	7.85E-02	5.97E-02	7.30E-02	7.58E-02	3.95E-03	5%
Limonène	4.98	3.64E+08	4.19E+08	4.44E+08	9.33E-02	8.85E-02	8.59E-02	8.92E-02	3.77E-03	4%
Linalol	5.73	8.30E+08	8.53E+08	1.06E+09	2.13E-01	1.80E-01	2.04E-01	1.99E-01	1.70E-02	9%
Thujone	5.80	5.98E+08	6.18E+08	5.61E+08	1.53E-01	1.30E-01	1.09E-01	1.42E-01	1.61E-02	
A, Bornyle	7.55	3.90E+09	4.74E+09	5.17E+09						
6.35 mg.L⁻¹	tr (min)	Aire 1	Aire 2	Aire 3	Aire 1/Asi₁	Aire 2/ Asi₂	Aire 3/ Asi₃	M	ET	RSD

α-pinène	3.99	1.10E+08	9.24E+07	1.17E+08	3.27E-02	2.34E-02	2.88E-02	3.08E-02	2.80E-03	9%
β-pinène	4.44	1.41E+08	1.24E+08	1.59E+08	4.19E-02	3.14E-02	3.91E-02	4.05E-02	1.94E-03	5%
Limonène	4.98	1.61E+08	1.83E+08	1.87E+08	4.79E-02	4.65E-02	4.62E-02	4.63E-02	1.96E-04	0%
Linalol	5.73	3.39E+08	3.48E+08	3.87E+08	1.01E-01	8.83E-02	9.55E-02	9.80E-02	3.62E-03	4%
Thujone	5.80	2.62E+08	2.67E+08	2.35E+08	7.78E-02	6.78E-02	5.80E-02	6.29E-02	6.90E-03	11%
A, Bornyle	7.55	3.37E+09	3.95E+09	4.06E+09						
3.12 mg.L⁻¹	tr (min)	Aire 1	Aire 2	Aire 3	Aire 1/Asi₁	Aire 2/ Asi₂	Aire 3/ Asi₃	M	ET	RSD
α-pinène	3.99	6.41E+07	4.99E+07	7.03E+07	1.69E-03	1.38E-03	2.05E-03	1.87E-03	2.50E-04	13%
β-pinène	4.44	8.18E+07	6.79E+07	9.55E+07	2.16E-03	1.87E-03	2.78E-03	2.47E-03	4.38E-04	18%
Limonène	4.98	9.06E+07	9.76E+07	1.04E+08	2.39E-03	2.70E-03	3.03E-03	2.71E-03	3.16E-04	12%
Linalol	5.73	1.78E+08	1.67E+08	2.02E+08	4.71E-03	4.62E-03	5.88E-03	5.07E-03	7.03E-04	14%
Thujone	5.80	1.48E+08	1.41E+08	1.34E+08	3.91E-03	3.91E-03	3.91E-03	3.91E-03	0.00E+00	0%
A, Bornyle	7.55	3.78E+10	3.62E+10	3.44E+10						
1.5 mg.L⁻¹	tr (min)	Aire 1	Aire 2	Aire 3	Aire 1/Asi₁	Aire 2/ Asi₂	Aire 3/ Asi₃	M	ET	RSD
α-pinène	3.99	3.06E+07	2.54E+07	3.34E+07	8.10E-03	6.43E-03	7.63E-03	7.39E-03	8.63E-04	12%
β-pinène	4.44	3.82E+07	3.32E+07	4.40E+07	1.01E-02	8.42E-03	1.01E-02	9.53E-03	9.60E-04	10%
Limonène	4.98	4.12E+07	4.34E+07	4.57E+07	1.09E-02	1.10E-02	1.05E-02	1.08E-02	2.95E-04	3%
Linalol	5.73	7.92E+07	7.36E+07	8.65E+07	2.10E-02	1.86E-02	1.98E-02	1.98E-02	1.16E-03	6%
Thujone	5.80	6.85E+07	6.78E+07	6.19E+07	1.81E-02	1.72E-02	1.41E-02	1.77E-02	6.69E-04	4%
A, Bornyle	7.55	3.78E+09	3.95E+09	4.38E+09						
0.79 mg.L⁻¹	tr (min)	Aire 1	Aire 2	Aire 3	Aire 1/Asi₁	Aire 2/ Asi₂	Aire 3/ Asi₃	M	ET	RSD
α-pinène	3.99	1.49E+07	1.11E+07	1.53E+07	4.61E-03	3.50E-03	3.95E-03	3.72E-03	3.22E-04	9%
β-pinène	4.44	1.77E+07	1.37E+07	1.99E+07	5.47E-03	4.33E-03	5.15E-03	5.31E-03	2.29E-04	4%
Limonène	4.98	1.75E+07	1.83E+07	1.94E+07	5.42E-03	5.78E-03	5.02E-03	5.41E-03	3.82E-04	7%
Linalol	5.73	2.82E+07	2.53E+07	3.41E+07	8.74E-03	7.98E-03	8.81E-03	8.51E-03	4.62E-04	5%
Thujone	5.80	3.16E+07	2.89E+07	2.61E+07	9.80E-03	9.11E-03	6.74E-03	9.46E-03	4.87E-04	5%
A, Bornyle	7.55	3.23E+09	3.17E+09	3.87E+09						

Développements méthodologiques en TLC-MALDI-TOF MS et GC-MS pour l'analyse des composés terpénoïdes présents dans les résines végétales

Résumé : (1700 max)

Les résines végétales sont des sécrétions de végétaux qui ont été utilisées par l'homme de l'Antiquité à nos jours dans de nombreuses applications (pharmaceutique, cosmétique et artistique). Ces exsudats sont composés majoritairement de terpènes. L'identification et la quantification de l'ensemble de ces composés dans les extraits végétaux reste un défi du fait de leur très grande diversité structurale. L'objectif de ce travail a été de développer de nouvelles approches analytiques pour identifier et quantifier les composés terpéniques présents dans ce matériel végétal afin d'en assurer le contrôle qualité et la certification. Deux méthodes séparatives ont été sélectionnées: la TLC et la GC. Pour ces deux techniques on s'est intéressé à toutes les potentialités de leur couplage avec la spectrométrie de masse. Le développement en TLC-1D et TLC-2D a permis le « screening » rapide des résines végétales et la faisabilité du couplage avec le MALDI-TOF-MS a été mise en évidence pour l'identification des marqueurs majoritaires (acides triterpéniques). La GC a permis une caractérisation plus aboutie des résines en mettant en place une méthode d'analyse exhaustive des terpènes des plus volatils au non-volatils. L'optimisation des différentes étapes de la méthodologie GC-MS s'est effectuée en se basant sur la méthode des plans d'expérience ainsi que sur des analyses statistiques tels que l'ACP et la CAH. Dans un souci d'apporter des éléments plus précis pour distinguer les résines les plus proches, la quantification de leurs marqueurs majoritaires a été établie après une validation complète de la méthode GC. L'ensemble de ce travail a permis de développer des outils pour une caractérisation rapide des extraits de résines permettant de différencier les espèces même les plus proches.

Mots clés : résine végétale, terpènes, TLC, TLC-MALDI-TOF-MS, GC-MS

Development of TLC-MALDI-TOF-MS and GC-MS methodologies to analyze terpenoids in resinous materials

Summary: (1700 max)

Resins are hydrocarbon secretions of many plants and well known for their protective benefits. They have been used as raw materials for a wide range of applications (pharmaceutic, cosmetic and artistic). Plant resins are complex mixtures of organic substances mainly terpenoid compounds which constitute the most abundant and structurally diverse group of plant secondary metabolites. The chemical characterization of this material results in long and difficult separation due to the wide range of polarity and volatility of its constituents. The aim of this work was to develop new analytical approaches to improve the identification of resins certifying their origin and ensuring the quality control. For that purpose two analytical methods were selected: TLC and GC approaches hyphenated to mass spectrometry. TLC-1D and TLC-2D allow a rapid screening and first visual differences of resins. The innovating TLC coupling to MALDI-TOF-MS gives a clear identification of major markers (triterpenic acids). In order to have complementary information about the composition of resins, a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method was developed to analyze volatile to non-volatile compounds. The various stages of optimization were based on experimental design and statistical (PCA and HAC) approaches. For closely related resins, a quantitative approach was investigated based on a complete validation for major markers. This work allows the development of two complementary techniques that give a powerful approach for fast and reliable differentiation of various resins even the closest ones.

Keywords: resinous material, terpenoids, TLC, TLC-MALDI-TOF-MS, GC-MS



**Institut de Chimie Organique et Analytique
Université Orléans, UMR 7311,
rue de Chartres, BP 67059, 45067 Orléans
Cedex 2, France**