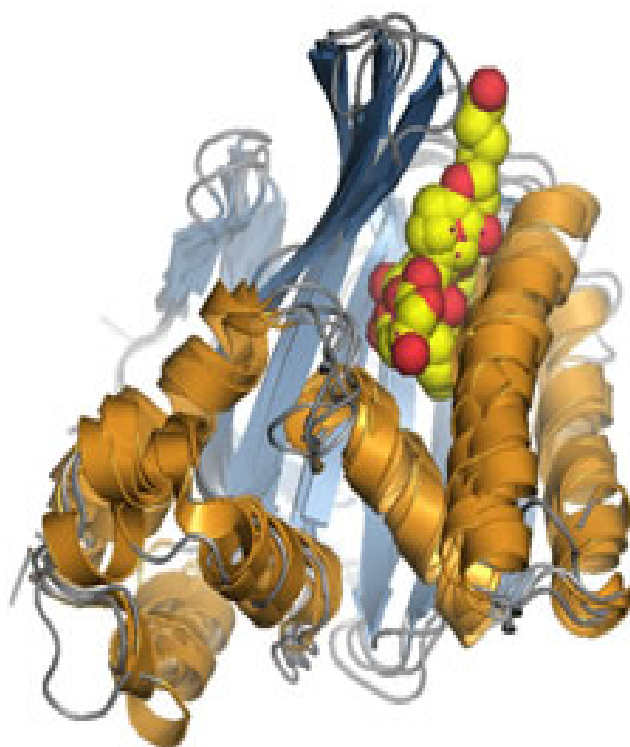


PhytoChem & BioSub Journal

Peer-reviewed research journal on Phytochemistry & Bioactives Substances

ISSN 2170 - 1768



PCBS Journal

Volume 8 N° 1, 2 & 3

2014

PhytoChem & BioSub Journal

Peer-reviewed research journal on Phytochemistry & Bioactives Substances

ISSN 2170 - 1768

PCBS Journal

*PCBS
Journal*

Volume 8 N° 2

2014



Edition LPSO
Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory
<http://www.pcbsj.webs.com> , Email: phytochem07@yahoo.fr

Dosage des méroditerpènes à noyau hydroquinonique de l'algue brune *Cystoseira stricta* par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier

N. BOUZIDI^{†*}, H. CHERFI^{*}, H. SERIDI^{‡*}, Y. DAGHBOUCHE^{†*} & M. EL HATTAB^{*}

* Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de BioMolécules (LCSN-BioM)

† Laboratoire de Plantes Médicinales et Aromatiques

Université de Blida 1, P.O.B. 270 Soumâa (Blida 09000). Algérie.

‡ Laboratoire de Biologie marine, Université de Sciences et Technologie Houari Boumediene. Algérie

Received: December 24, 2013; Accepted: April 03, 2014

Corresponding author M. El Hattab

Copyright © 2014-POSL

DOI:10.163.pcbsj/2014.8.2.108

Résumé. L'objectif de ce travail est le développement d'une nouvelle méthode analytique pour le dosage des méroditerpènes à noyau hydroquinonique, contenus dans la fraction lipidique extraite par solvant à partir de l'algue brune sèche *Cystoseira stricta*, par la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), en utilisant la préconcentration basée sur l'extraction liquide-liquide selon le protocole de Blich et Dyer. Les méroditerpènes à noyau hydroquinonique sont analysés sous forme d'hydroquinone en exploitant l'aire de la bande spécifique à 1512cm^{-1} caractéristique de la vibration du groupement C=C du noyau hydroquinonique. Les valeurs d'absorbances sont corrigés avec une ligne de base stabilisée entre 1500 et 1530cm^{-1} et en considérant le background du blanc analytique. Le taux des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires est de 4.0 eg/g et celui des méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires est de 2.8 eg/g . Le taux des méroditerpènes à noyau hydroquinonique obtenu est en accord avec ceux trouvés dans la documentation pour quelques méroditerpènes à noyau hydroquinonique et qui sont déterminés par chromatographie liquide à haute performance en phase normale (CLHP).

Mots clés: Méroditerpènes, noyau hydroquinonique, Algue brune, *Cystoseira stricta*, IRTF

Dosage by IRTF spectroscopy of Meroditerpens with hydroquinon nucleus in Brown Alga *Cystoseira stricta*

Abstract. The objective of this work is the development of a new analytical method for the dosage of Meroditerpens in brown alga *Cystoseira stricta*. Meroditerpens are analyzed as hydroquinone by exploiting the specific area of the band 1512cm^{-1} , characteristic of the C = C vibration of hydroquinone nucleus. The yield of the moderately polar meroditerpens with hydroquinon nucleus is 4.0 eg/g and that of polar meroditerpens is 2.8 eg/g .

Key Words: Meroditerpens, hydroquinon nucleus, Brown alga, *Cystoseira stricta*, IRTF

I. Introduction

L'intérêt grandissant de la recherche dans le domaine de la chimie des substances naturelles trouve son explication dans les trois objectifs visés: l'investigation de composés à haute valeur ajoutée; la découverte de nouveaux modèles chimiques; et la recherche de composés biologiquement actifs [1].

Les algues présente un intérêt particulier parce qu'ils renferment des métabolites secondaires qui possèdent des activités biologiques et qui jouent un rôle important en chimiotaxonomie et en médiateurs chimiques [2,3]. Les algues brunes du genre *Cystoseira* ont fait l'objet de nombreuses études sur la composition chimique de leur extrait lipidique, mettant en évidence la présence de substances terpéniques à côté des stérols. On trouve essentiellement des diterpènes linéaires dérivés du géranylgeraniol. Une grande diversité des méroditerpènes (linéaires, monocyclisés, bicyclisés....etc.) est également constatée dans ce genre [4-6]. Sachant que les méroditerpènes issus d'algues brunes de la famille de cystoseiracées présentent deux séries; les méroditerpènes à noyau hydroquinonique et les méroditerpènes à noyau chromanol [7], l'algue brune *Cystoseira stricta* est caractérisée par l'isolement de nombreuses molécules de méroditerpènes à noyau hydroquinonique [8]. Le dosage de cette classe de produits chimiques présente une grande importance afin de pouvoir valoriser les végétaux marins ou même de savoir s'il existait des possibilités de différenciation entre les espèces, et par conséquent, le développement de nouvelles méthodes d'analyse est indispensable et toujours nécessaire pour les chercheurs travaillant dans ce large domaine de recherche. La technique habituelle utilisée pour le dosage des méroditerpènes dans les algues brunes est la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) [9]. L'objectif de cette étude est le développement d'une nouvelle méthode fiable et rapide pour la détermination des méroditerpènes à noyau hydroquinonique contenus dans la fraction lipidique de l'algue brune sèche *Cystoseira stricta* par la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Cette étude constitue une continuité des travaux de recherche réalisés au sein de notre équipe de recherche sur le développement de nouvelles méthodes pour la détermination des métabolites secondaires dans les algues par spectrométrie IRTF [10,11],

II. Position systématique de l'algue brune *Cystoseira stricta*

Embranchement: *Chromphytes*
 Classe: *Phéophycées*
 Ordre: *Fucales*
 Famille: *Cystoseiracées*
 Genre: *Cystoseira*
 Espèce: *Stricta* Montagne Sauvageau



Description : *Cystoseira stricta*, à une base discoïde, avec plusieurs tiges par base (espèce cespiteuse), à des rameaux d'ordres supérieurs, pouvant eux porter des différenciations particulières (aérocytes, épines plus ou moins grandes classiquement appelées "feuilles"), les parties distales sont caduques alors que les axes constituent la portion vivace. Cette espèce se localise principalement en ceinture sur les côtes rocheuses et exposées de l'étage infralittoral supérieur.

III. Extraction des méroditerpènes à noyau hydroquinonique à partir de l'extrait lipidique de l'algue brune *Cystoseira stricta*

III.1. Préparation de l'extrait lipidique de l'algue brune

L'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* est obtenu par macération de l'algue sèche dans le dichlorométhane à une température fixe, ce dernier est évaporé et le résidu sera traité pour l'extraction des méroditerpènes à noyau hydroquinonique.

III.2. Extraction des méroditerpènes à noyau hydroquinonique

Sachant que les méroditerpènes à noyau hydroquinonique sont constitués d'une fraction polaire et d'une fraction moyennement polaire, le protocole de Bligh et Dyer utilise trois solvants de polarité différente (chloroforme, méthanol et eau), en combinant deux à deux de façon à obtenir une phase moyennement polaire (CHCl₃/MeOH) et une autre polaire (H₂O/MeOH), afin d'obtenir des fractions moyennement polaire et polaire respectivement. Dans ce procédé l'hexane est utilisé pour éliminer les composés totalement apolaires ainsi que les La figure 1 illustre les différentes étapes de traitement de l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta*.

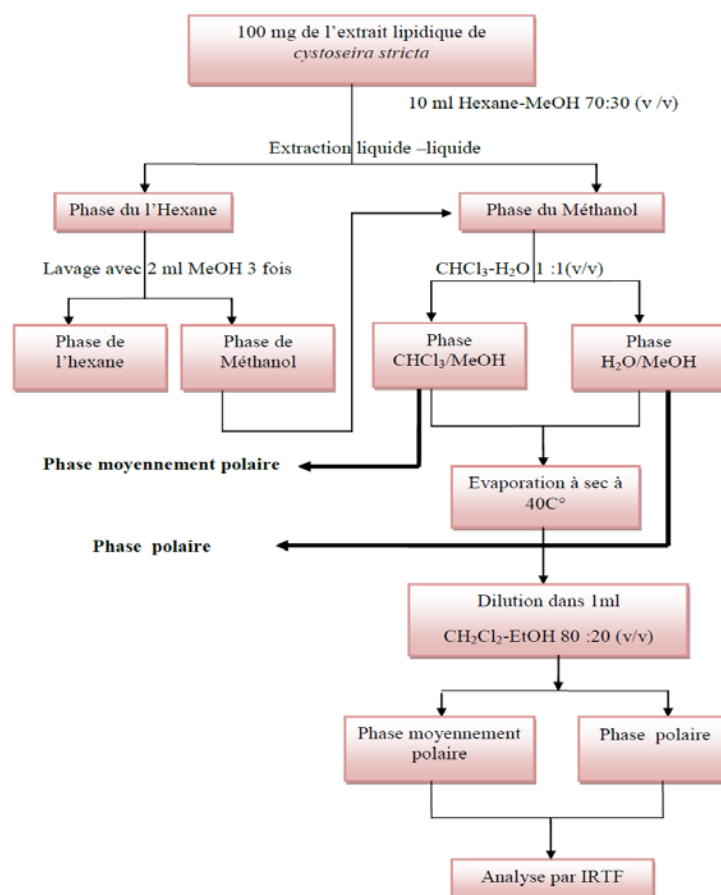


Figure 1 : Protocole de Bligh et Dyer utilisé pour l'extraction des méroditerpènes à noyau hydroquinonique

III.3. Identification des méroditerpènes à noyau hydroquinonique par (CCM)

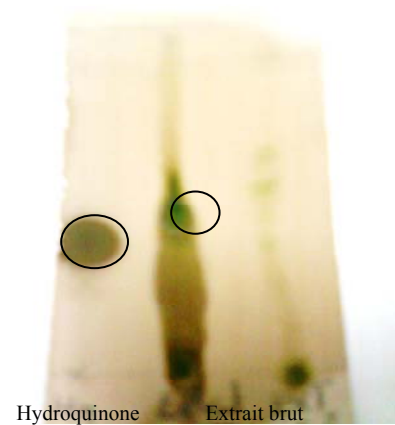


Figure 2: Plaque CCM de l'extrait brut et l'hydroquinone

Avant d'entamer l'étude par la spectrométrie IRTF, on a procédé à l'identification préliminaire qualitative des méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* par CCM, en exploitant la présence du groupement phénolique dans la structure des méroditerpènes à noyau hydroquinonique. La chromatographie sur couche mince est effectuée sur les feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice Si 60, et en utilisant le mélange binaire acétate d'éthyle - iso-octane 2 :3 (v/v) comme solvant d'éluion. La révélation est faite par la pulvérisation des plaques CCM avec le réactif de Gibbs (révélateurs des phénols et leurs dérivés) puis l'exposition de plaque CCM au vapeur d'ammoniaque.

Nous avons observés l'apparition de tache bleue pour l'extrait à un niveau presque que celui de l'hydroquinone (figure 2), les rapports frontales sont respectivement R_f Extrait = 0.29 et R_f Hydroquinone = 0.33, Les taches bleues sont caractéristiques des phénols et leurs dérivés.

IV. Choix de l'étalon pour le dosage des méroditerpènes à noyau hydroquinonique

Il est important de rappeler que dans ce travail, nous nous intéressons au dosage d'une classe de molécules appelées méroditerpènes à noyau hydroquinonique, qui sont caractérisés par la liaison d'un noyau hydroquinone et une chaîne diterpénique, l'hydroquinone a été choisie comme standard représentant de cette classe de produit du fait que toutes les molécules possèdent le même environnement chimique au niveau du groupement phénolique (voire figure 3) et c'est ce dernier qui va être exploiter pour les

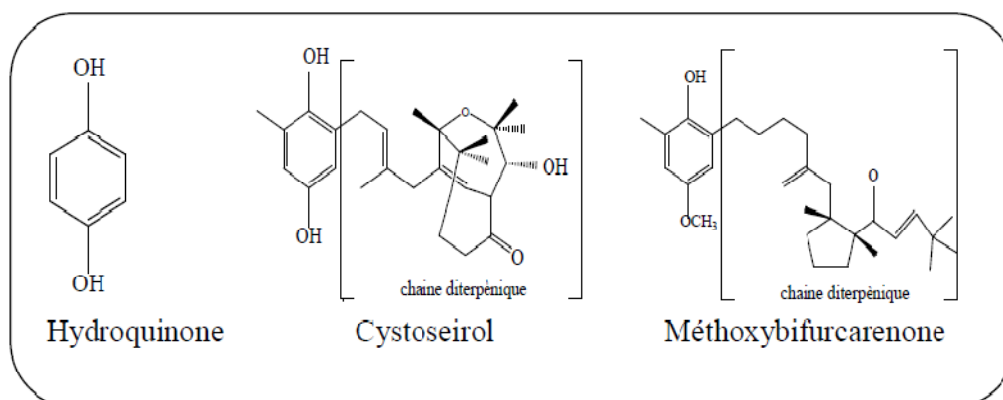


Figure 3: Structure d'hydroquinone et de deux méroditerpènes à noyau hydroquinonique

V. Tests de solubilité de l'hydroquinone dans le solvant de l'analyse

La première difficulté rencontrée lors de la réalisation de ce travail était la solubilité de l'étalon (hydroquinone) dans le solvant adéquat pour les analyses par la spectrométrie IRTF à savoir les solvants chlorés. Pour résoudre ce problème une série de tests de solubilité a été effectuée dans le sens à modifier la polarité du solvant d'analyse (CH_2Cl_2) en ajoutant des proportions différentes d'EtOH (l'hydroquinone est très soluble dans l'éthanol). Il y a lieu de noter que l'ajout de l'éthanol à CH_2Cl_2 à un effet néfaste sur la qualité des spectres infrarouge,

cependant l'amélioration et la correction de ces spectres peut se faire en établissant un background avec le blanc analytique. Le tableau 1 résume le mélange CH₂Cl₂- EtOH dans différentes proportions et en considérant deux concentrations différentes.

Tableau 1 : Solubilité de l'hydroquinone

Solvant	Solubilité de l'hydroquinone	
	5mg.ml ⁻¹	15mg.ml ⁻¹
CH ₂ Cl ₂	Partiellement soluble	Partiellement soluble
CH ₂ Cl ₂ -EtOH 96 :4 (v/v)	Partiellement soluble	Partiellement soluble
CH ₂ Cl ₂ -EtOH 95 :5 (v/v)	Soluble	Partiellement soluble
CH ₂ Cl ₂ -EtOH 90 :10 (v/v)	Soluble	Partiellement soluble
CH ₂ Cl ₂ -EtOH 80 :20 (v/v)	Soluble	Soluble

VI. Analyse par spectrométrie IRTF

VI.1. Spectre IRTF de l'hydroquinone

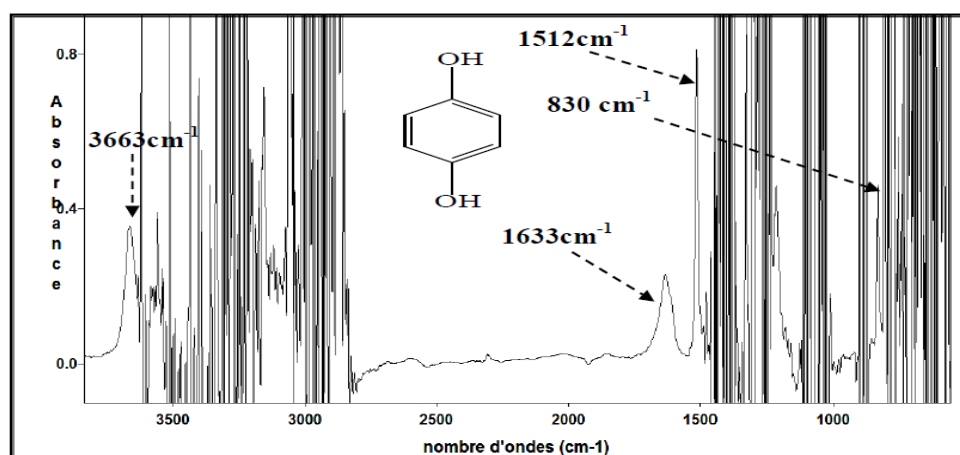


Figure 4: Spectre IRTF de l'hydroquinone (4mg ml⁻¹) préparée directement dans CH₂Cl₂-EtOH 80:20 (v/v).

Le spectre infrarouge de l'hydroquinone obtenue directement dans CH₂Cl₂-EtOH 80 :20 (v/v) montre des bandes d'absorptions à 3663 cm⁻¹ bande moyenne d'élongation de la liaison O-H d'un phénol, 1633 cm⁻¹ bande moyenne d'élongation de la liaison C=C, 1512 cm⁻¹ bande forte d'élongation de la liaison C=C d'un cycle aromatique, et une bande à 830 cm⁻¹ bande forte de déformation de la liaison C-H d'un aromatique p- disubstitué.

Comme l'illustre la figure 4 les bandes qui apparaissent à 830 cm⁻¹ et 3663 cm⁻¹ sont interférées par les bandes d'absorbance de l'éthanol qui apparaissent à 820 cm⁻¹ (C-O de déformation), et 3600 cm⁻¹ (O-H d'élongation) respectivement. De ce fait nous utilisant la bande à 1512 cm⁻¹ pour la détermination de mérodiertèpènes à noyau hydroquinonique de l'algue brune *cystoseira stricta*.

VI.2. Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone préparée directement dans le solvant

Les caractéristiques analytiques de l'hydroquinone préparée directement dans CH₂Cl₂-EtOH 80:20 (v/v) sont résumés dans le tableau 2. Les résultats obtenus montrent que les caractéristiques analytiques d'hydroquinone préparée directement dans CH₂Cl₂-EtOH 80:20 (v/v) sont optimums en considérant l'aire du pic au lieu que la hauteur du pic à 1512 cm⁻¹. Les Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons d'hydroquinone préparée directement dans CH₂Cl₂-EtOH 80:20 (v/v), pour un domaine de concentration compris entre 0.5-4mg.ml⁻¹ sont montrés sur la figure 5.

Tableau 2 : Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone préparée directement dans CH₂Cl₂

Paramètres analytiques	Mode de mesure	Hauteur du pic	Aire du pic
Droite de calibration		0.27427C+0.01223	2.53370C+0.00176
Coefficient de corrélation		0.9992	0.9999
limite de détection (en µg.ml ⁻¹)		0.04	0.02
Déviatoin standard relative (en % pour n=10)		2.1	2.5
Domaine de Concentration (en mg.ml ⁻¹)		0.5-4	

L.D : limite de détection(en µg.ml⁻¹) obtenue par un niveau de confiance de 99.6% (k=3)

D.S.R (%) : Déviatoin standard relative (pour C=1.5 mg.ml⁻¹) , **D.C :** Domaine de Concentration en mg.ml⁻¹

Conditions expérimentales : Résolution nominale 4cm⁻¹, nombre de balayage (10 scan), chemin optique 0.5 mm, background de la cellule remplie avec le solvant de dilution CH₂Cl₂-EtOH 80:20 (v/v).

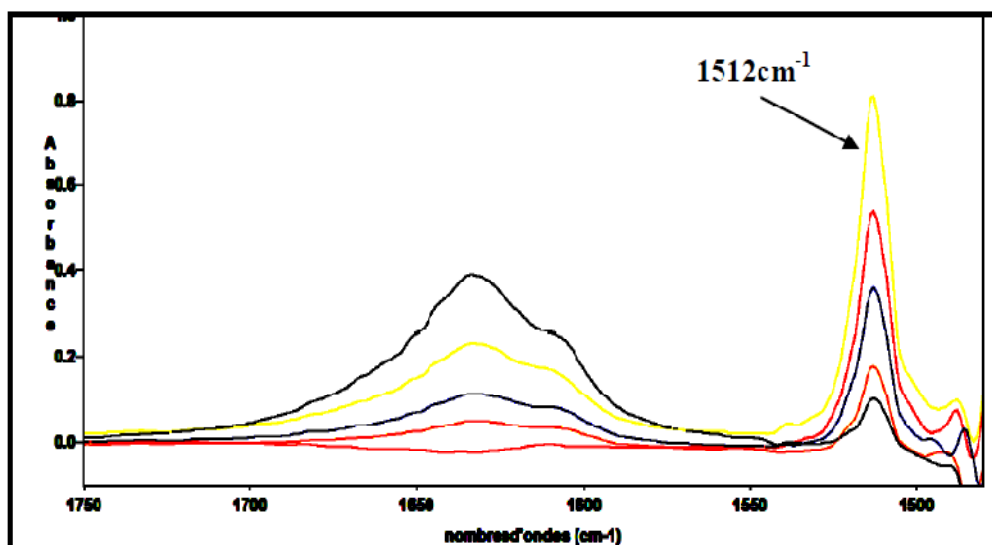


Figure 5: Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons d'hydroquinone préparée directement dans CH₂Cl₂-EtOH 80:20 (v/v), pour un domaine de concentration compris entre 0.5-4mg.ml⁻¹.

VI.3. Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire (CHCl₃/MeOH)

Le tableau 3 présente les caractéristiques analytiques de la série des solutions d'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire de concentration allant de 0.5 à 4 mg.ml⁻¹. La figure 6 présente les spectres de la série des solutions d'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire de concentration allant de 0.5 à 4 mg.ml⁻¹.

Tableau 3 : Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire (CHCl₃/MeOH)

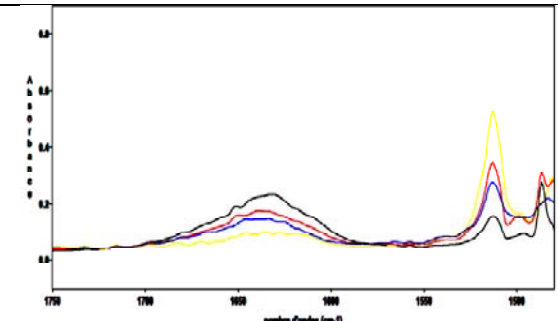
Droite de calibration	1.91027C+0.10890	
Coefficient de corrélation	0.9976	
L.D. (en µg.ml ⁻¹)	0.03	
D.S.R (en % pour n=10)	1.7	
D. C. (en mg.ml ⁻¹)	0.5-4	
Pourcentage de récupération (en %)	75.4	

Figure 6 : Spectres IRTF d'absorbance de la série des solutions d'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire (CHCl₃/MeOH) pour un domaine de concentration compris entre 0.5-4mg.ml⁻¹

L.D : limite de détection(en µg.ml-1) obtenue par un niveau de confiance de 99.6% (k=3)

D.S.R (%) : Déviation standard relative (pour C=1.5 mg.ml⁻¹). **D.C :** Domaine de Concentration en mg.ml⁻¹

VI.4. Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H₂O/MeOH)

Les caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H₂O/ MeOH) sont établies et résumés dans le tableau 4.

Tableau 4: Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H₂O/MeOH)

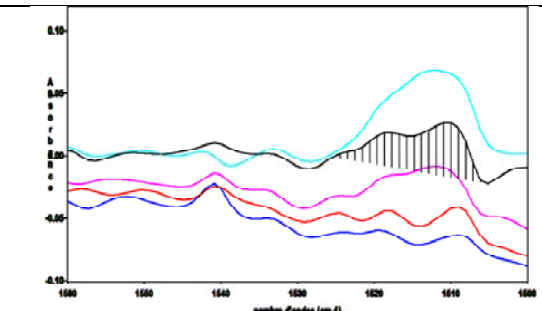
Droite de calibration	0.27099C+0.02607	
Coefficient de corrélation	0.9996	
L.D. (en µg.ml ⁻¹)	0.18	
D.S.R (en % pour n=10)	1.03	
D. C. (en mg.ml ⁻¹)	0.5-4	
Pourcentage de récupération (en %)	10.7	

Figure 7 : Spectres IRTF d'absorbance de la série des solutions d'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H₂O/MeOH) pour un domaine de concentration compris entre 0.5-4mg.ml⁻¹

Comme on peut bien le voir sur la figure 7, l'allure du pic à 1512cm^{-1} n'est pas gaussienne et ne ressemble pas à celle de l'étalon mais ceci est dû au fait que la concentration de l'hydroquinone dans ce cas est trop faible et ce phénomène est toléré en spectroscopie IRTF. Il est évident dans ce cas que la considération de l'aire du pic à 1512cm^{-1} est plus correcte pour la détermination.

Les pourcentages de récupération ont été calculés en considérant le rapport des pentes de droites de calibration obtenues pour les solutions étalons traitées et les solutions étalons préparées directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-EtOH } 80:20$ (v/v).

Cette étude confirme la répartition de l'hydroquinone entre les deux phases moyennement polaire et polaire ce qui permet le dosage de méroditerpènes à noyau hydroquinonique de l'algue brune *cystoseira stricta* dans les deux phases.

VI.5. Détermination des méroditerpènes à noyau hydroquinonique de l'algue brune *cystoseira stricta*

Environ 100 mg d'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* préalablement traité selon le protocole décrit dans la partie expérimentale ont été analysées par IRTF. Les spectres donnés par la figure 8 illustre la présence des méroditerpènes à noyau hydroquinonique récupérés dans la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) (Fig.8a) et dans la phase polaire ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$) (Fig.8b) en considérant la bande spécifique à 1512cm^{-1} et en utilisant la méthode de calibration externe et la méthode des ajouts standards.

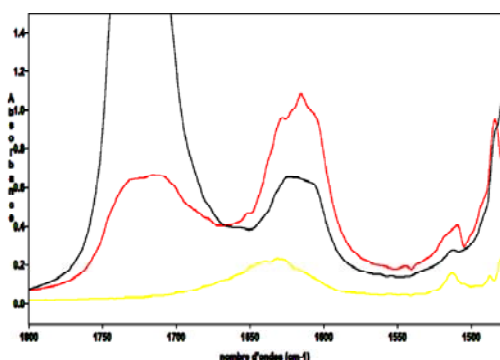


Figure 8a : Spectres IRTF comparatifs de l'hydroquinone ($C=0.5\text{mg.ml}^{-1}$) récupérée de la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) (jaune), de l'extrait brut (noir) et de la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) obtenus après traitement de l'extrait (rouge).

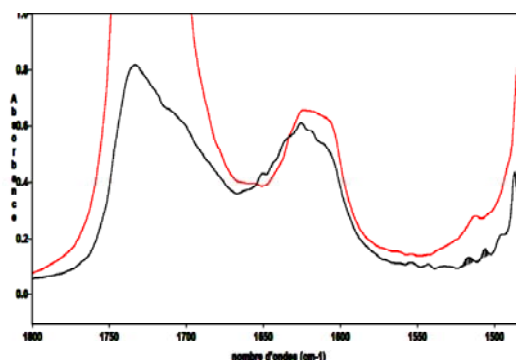


Figure 8b : Spectres IRTF comparatifs de l'extrait brut (rouge) et de la phase polaire ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$) obtenus après traitement de l'extrait (noir).

Tableau 5 : Détermination des méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* après traitement

Méroditerpènes à noyau hydroquinonique	Taux par calibration externe (eg/g)*	Taux par ajout standard (eg/g)*
polaires	2.8	/
moyennement polaires	$4.0 \pm 0.1 \ddagger$	5.8

*équivalent gramme d'hydroquinone dans 1g d'extrait

‡valeur moyenne \pm déviation standard de deux mesures indépendantes

Les résultats résumés dans le tableau 5 montrent un taux des méroditerpènes à noyau hydroquinonique qui est en accord avec ceux trouvés dans la documentation pour quelques méroditerpènes à noyau hydroquinonique et qui sont déterminés par chromatographie liquide à haute performance en phase normale (CLHP) [9].

VII. Conclusion

Cette étude a été focalisée au dosage spécifique de deux fractions des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaire et polaire d'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* par la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

Les méroditerpènes à noyau hydroquinonique sont analysés globalement sous forme d'hydroquinone en exploitant la bande spécifique à 1512cm^{-1} caractéristique de la vibration du groupement C=C du noyau hydroquinonique. Il a été vérifié que les paramètres analytiques sont meilleurs en considérant les valeurs de l'aire de la bande à 1512cm^{-1} au lieu des valeurs de la hauteur du pic. Les valeurs d'absorbances sont corrigées avec une ligne de base stabilisée entre 1500 et 1530cm^{-1} et en considérant le background du blanc analytique.

Le taux des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires est de 4.0 eg/g obtenu par la méthode de calibration externe est de même ordre que celui obtenu par la méthode des additions standards et qui est de 5.8 eg/g .

Le taux des méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires a été déterminé par contre seulement par la méthode de calibration externe (2.8 eg/g).

Le taux des méroditerpènes à noyau hydroquinonique obtenu est en accord avec ceux trouvés dans la documentation pour quelques méroditerpènes à noyau hydroquinonique et qui sont déterminés par chromatographie liquide à haute performance en phase normale (CLHP).

La méthode développée, pour la détermination de méroditerpènes à noyau hydroquinonique de l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* par spectrométrie IRTF, est rapide disponible et fiable.

Références

- [1] S. Moussoukhoye, Thèse de doctorat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, (2003).
- [2] I. B. Keij et H. Kanji, Food Reviews International, 5(1), 101-104, (1989).
- [3] J. M. Kornprobst, Édition Tec & Doc, Paris, France, (2005).
- [4] A. Praud, R. Valls, L. Piovetti, B. Banaigs, J.-Y Benaim, Phytochemistry, 40 (2), 495-500, (1995).
- [5] R. Valls, V. Mesguiche, L. Piovetti, M. Prost, G. Peiffer, Phytochemistry, 41(5), 1367-1371, (1996).
- [6] V. Mesguiche, R. Valls, L. Piovetti et B. Banaigs, Phytochemistry, 45(7), 1489-1494, (1996).
- [7] T. Ainane, Thèse de doctorat, Université Hassan II Casablanca, Maroc, (2011).
- [8] V. Amico et M. Piatelli, Journal of Natural Products, Vol.52 (5), 962-969, (1989).
- [9] L. Piovetti et P. Deffo, Journal of Chromatography, 588, 99-105, (1991)
- [10] N. El Hattab, Y. Daghbouche, M. El Hattab, L. Piovetti, S. Garrigues et M.de la Guardia, Talanta, 68, 1230-1235,(2006).
- [11] N. El Hattab, Y. Daghbouche, M. El Hattab, Z. Aliche, G.Culioli, L. Piovetti, S. Garrigues et M.de la Guardia, analytica chimica acta, 616, 185-189, (2008).

PhytoChem & BioSub Journal

Peer-reviewed research journal on Phytochemistry & Bioactives Substances

ISSN 2170 - 1768



*PCBS
Journal*



Edition LPSO

Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory
<http://www.pcbsj.webs.com> , Email: phytochem07@yahoo.fr