

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A CHICOUTIMI  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES**

**PAR  
MOHAMMED BOUHAJIB  
B.Sc. (CHIMIE)**

**ANALYSE DES GLYCOSIDES DE  
*PICEA MARIANA* (Mill.) B.S.P.**

**MAI 1992**



### Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

## RÉSUMÉ

Dans ce projet de recherche nous avons analysé les glycosides de l'épinette noire. Cette analyse comporte deux parties:

1) - l'analyse des glycosides sans transformation chimique.

Les glycosides sont extraits du matériel végétal sec par solvant. Par des techniques de chromatographie liquide (CCM, CLP et CLHP), quatre glycosides phénoliques sont purifiés. Des structures basées sur des données spectroscopiques ( RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et SM) sont proposées. Dans les quatre glycosides, le sucre est le  $\beta$ -D-glucose.

2) - l'analyse des aglycones des glycosides après hydrolyse.

Une fois les substances volatiles éliminées de l'extrait des glycosides, ce dernier subit un hydrolyse enzymatique pour libérer les aglycones. Deux enzymes sont utilisées pour comparer leur efficacité de l'hydrolyse des glycosides. Les aglycones libérées sont extraites par le pentane et le pentane et l'éther (1:1/v:v), et analysées par chromatographie en phase gazeuse sur deux colonnes capillaires (DB-5 et Supelco-10). La comparaison des pourcentages relatifs des aglycones a révélé que la  $\beta$ -glucosidase est plus efficace pour hydrolyser les glucosides phénoliques et la cellulase est plus efficace pour hydrolyser les glucosides monoterpéniques.

Étant donné l'importance des glycosides comme source supplémentaire de produits volatils de l'épinette noire, l'objectif de ce travail était d'évaluer la qualité et la quantité des aglycones des glycosides et d'analyser la structure de certains glycosides par des méthodes spectroscopiques.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce projet. Ces remerciements vont principalement à mon directeur de thèse, le professeur François-Xavier Garneau pour sa disponibilité, son esprit critique, son enthousiasme et son soutien financier manifestés lors de la réalisation de l'ensemble du projet. Je remercie également le professeur Guy J. Collin pour ses conseils et son support logistique qui m'ont permis de mener à bien cette recherche.

J'offre également mes remerciements au professeur Michel J. Gagon pour sa collaboration technique sur le CG-SM et le professeur John ApSimon pour sa collaboration sur le SM et RMN. Je tiens aussi à remercier Mmes. Francine Belleau, et Hélène Gagnon et M. André Barrette pour leur soutien technique.

Ce travail a été réalisé grâce à l'appui cité plus haut, mais aussi grâce à mes parents et mon frère Abdelah qui m'ont donné la chance d'entreprendre un tel travail hors de mon pays. Et je remercie grandement la fondation de l'Université du Québec à Chicoutimi (FUQAC) pour avoir subventionné ce projet de recherche.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ANNEXES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
SECTION I : REVUE DE LITTÉRATURE ET MATÉRIEL.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE SUR LES GLYCOSIDES PRÉCURSEURS D'ARÔMES .....	2
INTRODUCTION.....	2
1.2 MÉTHODES D'EXTRACTION DES GLYCOSIDES .....	5
1.3 MÉTHODES D'ANALYSE DES GLYCOSIDES .....	9
CHAPITRE II : DESCRIPTION BOTANIQUE DE <i>PICEA MARIANA</i> (Mill) B.S.P. ....	12
2.1 GÉNÉRALITÉS.....	12
2.2 DESCRIPTION DE L'ARBRE .....	13
2.3 DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE.....	15
2.4 SITE D'ÉCHANTILLONNAGE.....	16
SECTION II : MÉTHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES GLYCOSIDES.....	17
CHAPITRE I : QUELQUES PRINCIPES ET THÉORIES DES MÉTHODES D'EXTRACTION DE PURIFICATION ET D'ANALYSE.....	18
1.1 MÉTHODES D'EXTRACTION .....	18

1.1.1	Extraction au Soxhlet .....	19
1.1.2	Extraction liquide-liquide.....	19
1.1.3	Extraction avec un appareil Likens-Nickerson.....	21
1.2	LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE.....	22
1.2.1	La chromatographie liquide sur couche mince (CCM).....	24
1.2.2	Chromatographie liquide à basse pression sur colonne préparative .....	28
1.2.2.1	Remplissage de la colonne préparative.....	28
1.2.2.2	Paramètres d'optimisation d'une séparation sur colonne .....	31
1.2.2.3	Séparation sur la colonne préparative à basse pression.....	32
1.2.3	Chromatographie liquide à haute pression (CLHP).....	33
1.2.3.1	Quelques principes et théorie de la chromatographie.....	36
1.2	LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG) ET LA CG-SM.....	41
1.2.1	Chromatographie en phase gazeuse (CG).....	41
1.2.2	La CG couplée à un spectromètre de masse (CG-SM) .....	42
1.3	LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN) $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ .....	44
a)	Théorie de la RMN.....	45
b)	Déplacement chimique.....	46
c)	Couplage de deux spins .....	48
CHAPITRE II : MÉTHODES EXPÉRIMENTALES APPLIQUÉES À L'ÉTUDE DES GLYCOSIDES DE <i>PICEA MARIANA</i> .....		
2.1	EXTRACTION DES GLYCOSIDES INTACTS .....	50
2.2	ANALYSE DES GLYCOSIDES INTACTS.....	53
2.2.1	Analyses et séparation des glycosides par CL.....	53
2.2.1.1	Analyse par CCM .....	53

2.2.1.2 Séparation sur colonne préparative .....	55
2.2.1.3 Chromatographie CLHP .....	56
2.2.2 Analyse des glycosides par RMN ( $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ ) et SM.....	57
<b>2.3 ANALYSE DES AGLYCONES DES GLYCOSIDES .....</b>	<b>57</b>
2.3.1 Hydrolyse enzymatique des glycosides .....	57
2.3.2 Hydrolyse acide des glycosides .....	58
2.3.3 Analyse des aglycones par CG et CG-SM .....	58
<b>SECTION III : Résultats.....</b>	<b>61</b>
<b>CHAPITRE 1 : EXTRACTION, PURIFICATION ET ANALYSES</b>	
<b>DES GLYCOSIDES INTACTS.....</b>	<b>62</b>
<b>1.1 EXTRACTION ET PURIFICATION DES</b>	
<b>GLYCOSIDES INTACTS.....</b>	<b>62</b>
1.1.1 Extraction et pré-purification des glycosides.....	62
1.1.2 Purification des glycosides par CLHP.....	65
<b>1.2 ANALYSES DES GLYCOSIDES PAR</b>	
<b>LA RMN DU <math>^1\text{H}</math> ET <math>^{13}\text{C}</math> ET SM.....</b>	<b>68</b>
<b>CHAPITRE 2 : EXTRACTIONS ET ANALYSES DES AGLYCONES</b>	
<b>LIBÉRÉES PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE.....</b>	<b>77</b>
<b>2.1 ANALYSE DES AGLYCONES LIBÉRÉES PAR</b>	
<b>HYDROLYSE ENZYMATIQUE.....</b>	<b>77</b>
<b>2.2 ANALYSE DES AGLYCONES LIBÉRÉES</b>	
<b>PAR HYDROLYSE ACIDE .....</b>	<b>82</b>
<b>SECTION IV : DISCUSSION.....</b>	<b>84</b>
<b>CHAPITRE I : EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOSIDES.....</b>	<b>85</b>
<b>1.1 EXTRACTION DES GLYCOSIDES.....</b>	<b>85</b>

1.2 PURIFICATION DES GLYCOSIDES.....	86
<b>CHAPITRE II : INTERPRÉTATION DES DONNÉES</b>	
<b>SPECTROSCOPIQUES.....</b>	<b>90</b>
2.1 DÉTERMINATION DES STRUCTURES DES GLYCOSIDES.....	90
2.2 INTERPRÉTATION DES DÉPLACEMENTS	
CHIMIQUES DU $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ .....	99
2.2.1 GLUCOSIDE #1.....	99
2.2.2 GLUCOSIDE #2.....	107
2.2.3 GLUCOSIDE #3.....	111
2.2.4 GLUCOSIDE #4.....	115
<b>CHAPITRE III : ANALYSES DES AGLYCONES LIBÉRÉES</b>	
<b>PAR HYDROLYSES.....</b>	<b>119</b>
3.1 EXTRACTION ET ANALYSES DES AGLYCONES.....	119
3.2 AGLYCONES LIBÉRÉES PAR HYDROLYSES ENZYMATIQUES ....	121
3.2.1 Comparaison de l'efficacité des deux enzymes.....	122
3.2.2 Nature et abondance des aglycones dans les conifères .....	123
a) Alcools aliphatiques non terpéniques .....	123
b) Alcools aromatiques .....	124
c) Les monoterpènes .....	125
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>131</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>134</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>169</b>



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Voie de métabolisme de d-néomenthyl- $\beta$ -D-glucoside dans les rhizomes de la menthe .....	4
Figure 2 : Voie de conversion du camphre en glucoside.....	5
Figure 3 : Photos des différentes parties de <i>Picea mariana</i> .....	14
Figure 4 : Distribution naturelle de l'épinette noire .....	15
Figure 5 : Site de l'échantillonnage de <i>Picea mariana</i> .....	16
Figure 6 : Schéma d'un extracteur de Soxhlet .....	20
Figure 7 : Schéma d'un extracteur de Likens-Nikerson .....	20
Figure 8 : Montage de remplissage des colonnes à haute pression .....	30
Figure 9 : Les composantes principales d'un système CLHP.....	35
Figure 10: Mesure du degré de séparation entre deux pics .....	40
Figure 11: Plan d'extraction, de purification et d'analyse des glycosides intacts .....	51
Figure 12: Plan d'extraction et d'hydrolyse des glycosides intacts et analyse des aglycones libérées.....	52
Figure 13: Analyse des fractions de CLP par CCM.....	64
Figure 14: Optimisation de la séparation des fractions 32 à 42 regroupées.....	66
Figure 15: Séparation des glycosides des fractions 74 à 109 regroupées.....	67
Figure 16: Quelques glucosides aromatiques modèles.....	96
Figure 17: Mécanisme de fragmentation du glucose .....	100
Figure 18: Les six structures possibles pour le glucoside #1 .....	103
Figure 19: Structure complète du glucoside #1 .....	106
Figure 20: Mécanisme de fragmentation de l'aglycone .....	106
Figure 21: Structure complète du glucoside #2.....	110
Figure 22: Mécanisme de fragmentation de l'aglycone .....	110
Figure 23: Structure complète du glucoside #3.....	114
Figure 24: Structure complète du glucoside #4.....	118

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison entre deux méthodes d'extraction des aglycones après hydrolyse.....	8
Tableau 2 : Conditions d'opérations typiques de la CLBP-P .....	31
Tableau 3 : Caractéristiques des principaux détecteurs de la CG.....	43
Tableau 4 : Conditions chromatographiques.....	60
Tableau 5 : Déplacements chimiques de RMN du Glucoside #1.....	70
Tableau 6 : Déplacements chimiques de RMN du Glucoside #2.....	73
Tableau 7 : Déplacements chimiques de RMN du Glucoside #2 et #3.....	74
Tableau 8 : Déplacements chimiques de RMN du Glucoside #4.....	76
Tableau 9 : Aglycones volatiles libérées par hydrolyse enzymatique des glycosides des ramilles.....	78
Tableau 10: Aglycones volatiles libérées par hydrolyse enzymatique des aiguilles.....	80
Tableau 11: Aglycones volatiles libérées par hydrolyse .....	83
acide des glycosides.....	83
Tableau 12: Déplacements chimiques du <sup>13</sup> C des glucosides aromatiques .....	94
Tableau 13: Déplacements chimiques du <sup>1</sup> H et (constantes de couplages).....	95
de trois D-aldohexoses .....	95
Tableau 14: Noyaux benzéniques di-substitués en positions 1 et 4 .....	97
Tableau 15: Noyaux benzéniques di-substitués en positions 1 et 2 .....	97
Tableau 16: Noyaux benzéniques tri-substitués en positions 1, 2 et 4.....	98
Tableau 17: Valeurs calculées de d (ppm) des six structures possibles.....	104
Tableau 18: Valeurs calculées de d (ppm) des six structures possibles.....	113
Tableau 19: Aglycones volatiles libérées par hydrolyses enzymatiques .....	127
Tableau 20: Les aglycones terpéniques libérées par des hydrolyses enzymatiques .....	129
Tableau 21: Aglycones volatiles libérées par hydrolyse acide des glycosides .....	130

## **LISTE DES ANNEXES**

<b>ANNEXE I : SPECTRES DES GLUCOSIDES PURIFIÉS.....</b>	<b>134</b>
<b>ANNEXE II : EXEMPLE DE CHROMATOGRAMMES DE CPG.....</b>	<b>149</b>
<b>ANNEXE III: SPECTRES DE MASSE DES AGLYCONES.....</b>	<b>153</b>

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<b>CL :</b>	<b>CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE</b>
<b>CLP :</b>	<b>CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE PRÉPARATIVE</b>
<b>CLHP :</b>	<b>CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PRÉSSION</b>
<b>CG :</b>	<b>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</b>
<b>CG-SM :</b>	<b>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLÉE À UN SPECTRE DE MASSE</b>
<b>CCM :</b>	<b>CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SUR COUCHES MINCES</b>

**SECTION I**

**REVUE DE LITTÉRATURE  
ET MATÉRIEL**

## CHAPITRE I

### REVUE DE LA LITTÉRATURE SUR LES GLYCOSIDES PRÉCURSEURS D'ARÔMES

#### INTRODUCTION

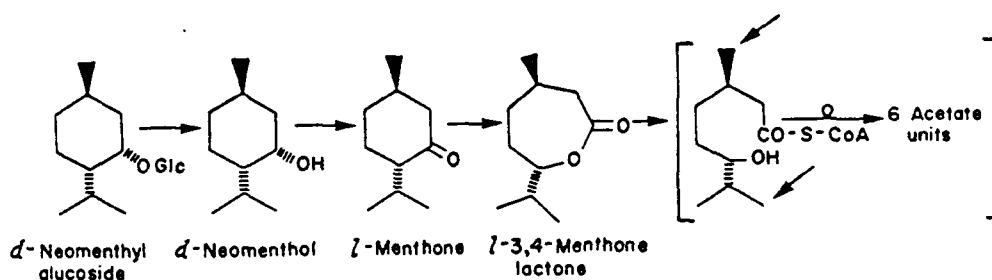
Les arômes ou les substances odorantes occupent une place très importante dans la vie quotidienne de l'homme. Malgré la concurrence des arômes de synthèse il y a toujours une plus forte demande pour les substances d'origine naturelle. L'orientation actuelle des industries agroalimentaires et cosmétologiques implique un recours croissant à l'aromatique. Les plantes aromatiques, les fruits et les fleurs constituent la source principale de ces produits. À côté de cette source traditionnelle, le développement des technologies et l'intérêt croissant des scientifiques pour l'étude des formes liées des composés d'arômes et/ou de parfums, offrent aujourd'hui des opportunités de création de nouvelles méthodes de production des substances odorantes. Ces substances, liées à un ou plusieurs sucres, sont restées longtemps inconnues. Les travaux de Francis et Allcock sur la détection des glucosides de géranyle, néryle et de citronellyle dans les pétales de rose<sup>1</sup>, signalaient le début de la recherche dans ce domaine. E. Stahl-Biskup<sup>2</sup> a publié en 1987 un inventaire des études qui ont été réalisées dans ce domaine et elle n'a rapporté que 25 publications portant sur l'identification de vingt deux monoterpènes glycosides différents provenant de 25 plantes d'espèces différentes. Certaines études ont été réalisées pour comprendre le rôle que ces substances jouent dans la plante, leurs liens avec les produits volatils qui ne sont pas liés à des sucres et leur importance dans le métabolisme de la plante.

## 1.1 LE RÔLE DES GLYCOSIDES DANS LA PLANTE

Les glycosides sont des substances constituées d'un ou plusieurs glucides et une substance non glucidique, l'aglycone. En ce qui concerne la nature des sucres qui constituent la partie glucidique de ces glycosides, les études basées sur l'utilisation des techniques de séparation et d'identification comme la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie liquide, la résonance magnétique nucléaire, la spectrométrie de masse... démontrent que dans 80 % des cas les aglycones sont liées au glucose sous la forme " $\beta$ -D-glucopyranoside" <sup>2,5</sup>. Les aglycones identifiées sont principalement des monoterpènes acycliques ou cycliques, des composés à noyau aromatique et des molécules norisoprénoïdiques à 13 atomes de carbone<sup>5</sup>. Stahl-Biskup<sup>2</sup> a présenté vingt deux structures de monoterpènes qui sont trouvés sous forme de glucoside et qu'elle a classé en deux catégories, quatorze monoterpènes habituels, ceux qu'on trouve souvent, et les non habituels. Cependant, le plus important c'est que certains produits sont retrouvés dans les plantes sous forme de glycosides plus souvent que les autres; le géraniol, le nérol, le linalol, le  $\alpha$ -terpinéol ainsi que des alcools benzyliques. Les quatre premiers produits ont un rapport étroit avec la biosynthèse des monoterpènes libres dans les plantes. Quelques études ont été réalisées pour démontrer l'implication directe ou indirecte des glycosides dans la biosynthèse des produits volatils libres dans les plantes.

Pour déterminer le rôle des glycosides, R. Croteau<sup>3</sup> a réalisé des expériences sur les feuilles de sauge (*Salvia officinalis*) et de la menthe (*Mentha piperita*) *in vivo* et *in vitro* en introduisant des monoterpènes marqués, (*d*-)camphre et le (*l*-)menthone, pour déterminer leurs transformations dans différentes parties de la plante. Les résultats ont démontré une première évidence, qui confirme les suggestions qui avaient été proposées auparavant par d'autres chercheurs, que les monoterpènes glycosides sont des dérivés qui transportent les monoterpènes à travers les tissus de la plante. Les monoterpènes libres sont des

substances lipophiliques; pour pouvoir se déplacer dans la plante des sites de production aux sites de stockage ils doivent être solubles dans l'eau. La forme glycosidique leur confère cette propriété. La grande partie de *l*-menthone introduit dans la plante se transforme en *d*-néomenthol puis en *d*-néomenthyl glucoside par des enzymes spécifiques. Au niveau des rhizomes dans les feuilles de *M. piperita* le glucoside est hydrolysé et l'aglycone est reconvertie en menthone avant de subir d'autres transformations (fig. 1).

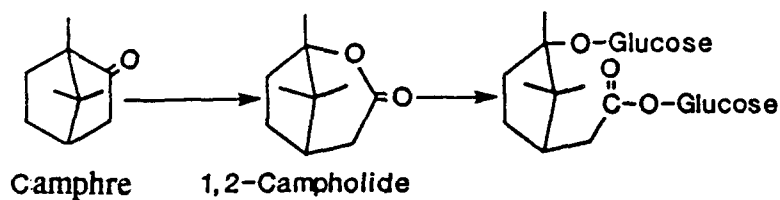


**Figure 1:** Voie de métabolisme de *d*-néomenthyl-β-D-glucoside dans les rhizomes de la menthe

Dans la sauge, le *d*-camphre se transforme en glucoside suivant le mécanisme indiqué dans la figure 2. Il est accepté que les glandes de chaque espèce sont capables de produire les constituants majeurs caractéristiques de l'espèce à partir d'un précurseur grâce à leurs enzymes spécifiques<sup>3</sup>. L'observation que les glycosides agissent comme dérivés de transport des monoterpènes a été mise en évidence en injectant du géraniole dans le trognon d'une pomme; le



géraniol a été rapidement transformé en géranyl  $\beta$ -D-glucoside et transporté dans la chair de la pomme où il est métabolisé en d'autres produits<sup>4</sup>.



**Figure 2:** Voie de conversion du d-camphre en glucoside.

Le rôle des monoterpènes glycosides dans les plantes ne se limite pas seulement à des dérivés de transport de ces produits. Stahl-Biskup<sup>2</sup> concluait en s'appuyant sur les travaux d'autres chercheurs, que les monoterpènes glycosides peuvent jouer plusieurs rôles. Les monoterpènes glycosides ont un lien étroit avec la biosynthèse des monoterpènes libres. Dans les voies biosynthétiques suggérées dans la littérature, les produits intermédiaires sont présentés sous forme d'ions qui ne peuvent pas exister dans la plante à l'état libre. C'est sous forme de glycosides que ces produits intermédiaires existent puisqu'ils présentent aussi un moyen de transport.

## 1.2 MÉTHODES D'EXTRACTION DES GLYCOSIDES

Les glycosides, précurseurs d'arômes, sont des substances qu'on trouve dans les plantes caractéristiques des huiles essentielles. Le matériel végétal est une matrice de substances

organiques très complexe. L'extraction des glycosides d'une plante nécessite l'élimination d'un très grand nombre de substances lipophiliques (huiles essentielles, lipides, alcanes, acides gras etc..) et d'autres produits hydrophiliques (sucres, pigments etc..) dont certains peuvent être solubles dans les mêmes solvants que les glycosides. Lors de l'extraction des glycosides, la destruction des tissus de la plante est inévitable provoquant ainsi l'activation de certains enzymes, surtout les hydrolases et les glycosidases, qui peuvent affecter la structure des glycosides<sup>2</sup>. Pour cette raison le broyage des tissus de la plante doit se faire dans des conditions qui permettent l'inactivation des enzymes. Le broyage du matériel végétal dans le méthanol bouillant<sup>2</sup> ou dans l'eau bouillante<sup>6</sup> permet d'arrêter immédiatement l'activité des enzymes. Cela peut se faire aussi dans de l'azote liquide pour éviter l'hydrolyse des glycosides par les enzymes naturelles de la plante<sup>7,8</sup>. La présence des acides organiques dans la plante peut aussi affecter la structure des aglycones ou provoquer une hydrolyse acide des glycosides. Par conséquent la stabilisation du pH de la solution, dans laquelle la plante est broyée est nécessaire. L'addition d'un sel stabilise le pH de la solution et évite l'hydrolyse des glycosides. Svendsen <sup>6</sup> a utilisé 6 g de carbonate de calcium dans 2 l d'eau bouillante pour 300 g de matière végétale pour extraire et analyser les glycosides de quatre variétés de plante, sans donner de détails sur le pH. Williams et al<sup>9,10</sup> utilisent du NaCl pour saturer la solution aqueuse dans laquelle le matériel végétal est homogénéisé et une solution de NaOH ou de KOH pour ajuster l'acidité de la solution à pH 7 afin de prévenir l'hydrolyse des glycosides.

Une fois le matériel végétal broyé et que l'hydrolyse acide ou enzymatique est évitée, il faut procéder à l'élimination des substances indésirables et à l'extraction des glycosides. La complexité du mélange obtenu et la faible quantité des glycosides dans la solution rendent la tâche très difficile. Plusieurs méthodes ont été développées pour extraire et analyser les glycosides dans les plantes. Chaque méthode utilisée pour l'extraction des glycosides d'une plante n'est pas nécessairement exclusive pour cette dernière. Les différences entre les méthodes

d'extraction se situent au niveau des techniques et des solvants utilisés. L'élimination des produits volatils libres peut se faire par extraction exhaustive avec un solvant apolaire<sup>10</sup> (le pentane, l'hexane, l'oxyde d'éthyle, le fréon F11 etc). L'hydrodistillation est aussi un moyen d'éliminer les produits volatils libres, suivie par l'extraction de la phase aqueuse avec un solvant apolaire<sup>6,13</sup>. D'autres méthodes font appel à la chromatographie en phase liquide. Stahl-Biskup et al<sup>7</sup> ont utilisé la chromatographie liquide pour éliminer les substances volatiles. Un extrait de méthanol d'une plante broyée dans l'azote liquide (*Hyssopus officinalis*) est réduit à 5 mL et mélangé avec du gel de silice, le tout est déposé sur une phase stationnaire de gel de silice d'une colonne préparative (1,5 X 10 cm). Les substances volatiles libres sont éliminées par élution avec un mélange de n-hexane-acétate d'éthyle (1:1) et de dichlorométhane. Les glycosides sont récupérés par élution avec des solvants plus polaires, l'acétate d'éthyle suivi du méthanol. Williams et al<sup>9-12</sup> ont procédé par extraction exhaustive, avec le fréon F11, du matériel végétal broyé dans une solution aqueuse saturée avec du NaCl. Le volume de la phase aqueuse est réduit et élué avec du méthanol sur une colonne préparative à phase inversée C<sub>18</sub> pour éliminer le sel ainsi que d'autres produits et ne récupérer que les glycosides. Svendsen<sup>13</sup> a fait une étude comparative de deux méthodes d'extraction des glycosides de la même plante (*Mentha spicata*) et les résultats qu'il a obtenus sont présentés dans le tableau 1. Dans la méthode (A) 50 g de matériel végétal est stabilisé dans 500 mL d'eau bouillante avec 2,5 g de carbonate de calcium. Les produits volatils sont éliminés par distillation pendant 4 heures. La solution aqueuse est filtrée et extraite avec 250 mL de pentane suivi de 250 mL d'oxyde d'éthyle pour éliminer les traces des produits volatils. Les solvants organiques qui restent dans la phase aqueuse sont éliminés par évaporation sur un évaporateur rotatif à la température de la pièce. Dans la méthode (B) la même quantité de matériel végétal est broyée dans l'azote liquide et extraite avec deux quantités différentes de méthanol (100 mL et 200 mL). Après filtration, l'extrait brut est lavé avec de l'eau et la solution aqueuse-méthanol est évaporée sous vide à 45 °C pour évaporer le méthanol. La solution aqueuse est filtrée et diluée avec de l'eau à

100 mL. Pour les deux solutions aqueuses obtenues avec 100 mL et 200 mL de méthanol, les produits volatils sont éliminés par extraction avec (2 x 100 mL) de pentane suivi de (2 x 100 mL) d'oxyde d'éthyle. Les solvants organiques dans chaque phase aqueuse sont évaporés sur un rota-vapeur à 45 °C. D'après les résultats des analyses des extraits obtenus par les deux méthodes, la méthode (A) est de loin la plus efficace pour extraire les glycosides (voir Tableau 1). Cette même méthode a été utilisée par Svendsen pour extraire et analyser les glycosides dans 16 conifères<sup>14</sup>.

**Tableau 1**  
 Comparaison entre deux méthodes d'extraction  
 des aglycones de *M. spicata* après hydrolyse.  
 (t <0,5 % et - = 0 %)

Produit	Procédures d'extractions		
	A (eau)	B (méthanol : 100 mL)	B (méthanol : 200 mL)
Hexan-1-ol	t	-	t
trans-Hex-3-en-1-ol	t	-	-
cis-Hex-3-en-1-ol	4,1	t	2,1
Octan-3-ol	t	-	t
Oct-1-en-3-ol	1,1	t	1,1
Linalool	t	-	t
néo-Dihydrocarvéol (?)	0,8	3,0	19,0
Dihydrocarvéol	6,2	1,9	2,9
iso-Dihydrocarvéol (?)	0,5	-	0,5
néo-iso-Dihydrocarvéol (?)	1,0	-	t
trans-Carvéol	2,1	5,4	3,4
cis-Carvéol	16,3	5,6	6,2
Benzyl alcool	6,3	9,2	9,1
<u>Non identifié</u>	8,1	2,0	3,6
β-Phényléthanol	3,8	2,2	7,2
Eugénol	18,0	6,7	5,6
<u>Non identifié</u>	6,5	-	2,8
2-Méthoxy-4-vinylphénol	1,1	-	0,6

### 1.3 MÉTHODES D'ANALYSE DES GLYCOSIDES

L'analyse des glycosides peut se faire de deux façons. On peut analyser les aglycones après les avoir séparés des sucres par hydrolyse acide ou enzymatique, ou analyser les glycosides intacts après les avoir purifiés.

#### a) Analyse des aglycones après hydrolyse

Le résidu obtenu après l'élimination des substances volatiles libres est soumis à une hydrolyse enzymatique ou acide. Pour analyser les aglycones originales des glycosides, sans qu'elles subissent des transformations chimiques, l'hydrolyse enzymatique est de loin la plus utilisée. L'hydrolyse dans un milieu acide provoque des réarrangements, des éliminations et des cyclisations des aglycones<sup>15</sup>. Les systèmes enzymatiques utilisés sont nombreux, cependant les plus utilisés sont ceux qui contiennent le  $\beta$ -glucosidase ou la cellulase comme enzyme principale dans le système. Des études de comparaison des systèmes enzymatiques ont été réalisées par certains auteurs. Fabre et al<sup>16</sup> ont étudié l'activité enzymatique de quinze systèmes enzymatiques produits industriellement. La concentration en système enzymatique est telle que l'activité  $\beta$ -glucosidasique est la même dans tous les cas. Les résultats obtenus ont démontré que le système Rohament CW, cellulase comme enzyme principal, est le plus efficace. Williams et al<sup>15</sup> ont comparé la performance de cinq enzymes: Emulsin,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$  glucouronidase, Pectinase et cellulase. La cellulase s'est avérée encore la plus commode pour les analyses qualitatives. Svendsen<sup>13</sup> par contre a comparé la performance entre le  $\beta$ -glucosidase et le Pécitol. La quantité des produits volatils libérés par le Pécitol est très faible par rapport à celles libérées par le  $\beta$ -glucosidase. Une préparation d'une émulsion d'amandes douces dont le  $\beta$ -glucosidase est l'enzyme active est utilisée.

Les produits volatils qui sont libérés après hydrolyse sont extraits de la phase aqueuse

soit par un solvant apolaire, par hydrodistillation ou par un appareil de type Likens-Nickerson. La chromatographie en phase gazeuse est la technique principale utilisée pour la séparation et l'analyse des aglycones. Un spectromètre de masse est souvent utilisé comme détecteur.

#### b) Analyse des glycosides intacts après purification

L'analyse des glycosides intacts fait appel surtout aux techniques spectroscopiques, RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), SM, IR et UV. La séparation et la purification des glycosides est une étape déterminante. Les glycosides, qui ont été séparés et analysés, constituent deux groupes; les glycosides dont la partie glycosidique est constituée d'un seul sucre et ceux qui ont plus qu'un sucre. La partie aglycone est en général un monoterpène cyclique ou acyclique, ou un phénol. L'examen d'une dizaine de travaux publiés (réf. 17 à 26) sur les méthodes de séparation et de purification des glycosides par chromatographie liquide montre que la nature de la phase stationnaire utilisée est très souvent le gel de silice. Nous allons citer quelques exemples de purification des glycosides.

Miyakado et al<sup>17</sup> ont isolé le (-)-cis-chrysanthénol O- $\beta$ -D-Glucopyrannoside de *Dicoria canescens*. Après extraction du matériel végétal avec du  $\text{CHCl}_3$  pour éliminer les substances volatiles, 22 g de résidu brut sont obtenus et séparés sur une colonne de gel de silice (800 g) avec le système de solvant  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (9:1). La récupération par fractionnement a donné 3,10 g de produit brut qui est recristallisé deux fois par la suite pour donner 0,81 g de produit pur. Trois autres glucosides dont l'aglycone est un monoterpène non oxydé (non polaire) sont séparés sur une colonne de gel de silice avec un système de solvant  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (20:1 et 10:1)<sup>18</sup>. La phlébotricoside, arbutine et la glucolutéoline (aglycones polaires) sont isolées de la plante, *Viburnum phlebortrichum*<sup>19</sup>. Le résidu obtenu de l'extrait du MeOH (25 g) est élué d'une colonne de gel silice (1 kg) avec  $\text{CHCl}_3$  : MeOH en augmentant progressivement le pourcentage du MeOH. Les fractions qui ont été éluées avec  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (19:1) sont

regroupées à l'aide d'analyses sur couches minces. Le produit obtenu (7 g) est séparé sur une deuxième colonne de gel silice (300 g) avec le même système de solvant. Une quantité de 1,1 g de phlébotricoside brut est obtenue. La purification est achevée par recristallisation dans le MeOH-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>. Le *para*-hydroxyquinone, arbutine et la glucolutéoline sont obtenus par l'éluant CHCl<sub>3</sub> : MeOH (20:1-10:1). La phlébotricoside (phlébotrichine) a été isolée de la même plante mais en combinant la chromatographie liquide sur gel de silice et la chromatographie liquide contre courant, RLCCC (Rotation Locular Counter Current Chromatography)<sup>20</sup>. Le Sephadex LH-20 (éluant: MeOH) est aussi utilisé comme phase stationnaire pour purifier des fractions obtenues par chromatographie sur une colonne de gel de silice (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O) pour séparer des glycosides phénoliques et non phénoliques et dont la partie glycosidique est composée d'un ou deux sucres<sup>21,23</sup>. Par contre des glycosides de même nature que les précédents ont été séparés en utilisant strictement le gel de silice comme phase stationnaire<sup>22,24</sup>. Leong et al<sup>25</sup> ont comparé la séparation de quatre glycosides phénoliques en utilisant des colonnes HPLC, une colonne à phase inversée (C<sub>18</sub>) et l'autre à phase normale (gel de silice). Sur la colonne de gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CHCl<sub>3</sub>-8:1) les quatre glucosides sont parfaitement séparés (Aglycone = vanilline, *para*-hydroxybenzaldéhyde, acide vanillique et acide *para*-hydroxy benzoïque). Sur la colonne à phase inversée C<sub>18</sub> avec des conditions isocratiques (MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>10<sup>-3</sup>M-35:65), la séparation ne permettait pas de distinguer les quatre produits. Pour purifier six glucosides de *Pinus sylvestris* dont quatre sont phénoliques et deux ne le sont pas, Andersson et al<sup>26</sup> ont eu recours à la chromatographie liquide sur colonne HPLC-C<sub>18</sub> (35 % aq. MeOH et MeOH-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O 25:1:75). Cependant le Sephadex LH-20 et gel de silice ont été utilisés respectivement pour fractionner l'extrait méthanolique brut de la plante.

Pour la détermination des structures des glycosides purs, la combinaison des méthodes spectroscopiques, mentionnées plus haut, est utilisée dans tous les cas.

## CHAPITRE II

### DESCRIPTION BOTANIQUE DE *PICEA MARIANA* (Mill.) B.S.P.

#### 2.1 GÉNÉRALITÉS

Le *Picea mariana* (mill) B.S.P. fait partie des Spermatophytes qui comprennent la masse des plantes vasculaires qui se divisent en deux sous-divisions: les Gymnospermes, avec 700 espèces, et les Angiospermes, avec 200 000 espèces. La plupart des Gymnospermes sont communément désignées sous le nom des conifères. Au Québec elles sont constituées du groupe des arbres toujours verts et le plus souvent résineux. Ce groupe se répartit en trois familles dans les genres<sup>27</sup>.

Plus précisément, *Picea mariana* (mill) B.S.P., communément appelée épinette noire, fait partie de la famille d'épinettes qui comprend environ 40 espèces, connu aussi sous le nom d'Épicéas. On trouve sept espèces en Amérique du Nord, et cinq au Canada. Outre les espèces, plusieurs variétés ont été signalées dans diverses parties du Canada. On trouve généralement des hybrides de l'épinette de *Sitka*, de l'épinette blanche et de l'Épinette d'Engelmann là où leurs aires chevauchent. L'épinette noire et l'épinette rouge également forment des hybrides dans les endroits où poussent en commun ces deux espèces, mais on ne signale pas d'hybridation entre l'épinette blanche et l'épinette noire, ni entre l'épinette blanche et l'épinette rouge<sup>28</sup>.



## 2.2 DESCRIPTION DE L'ARBRE [1]

*Le Picea mariana* est un arbre de 8-20 m, en peuplement il a le tronc droit et dépourvu de branches sur une grande partie de sa hauteur. La cime étroite est formée de branches retombantes dont les bouts sont redressés. L'écorce est mince, écailleuse et d'une couleur brun grisâtre foncé. Les rameaux sont d'une couleur brun foncé couverts de poils denses et courts; écailles extérieures des bourgeons grisâtres et duveteuses, à pointe longue et étroite dépassant le bout du bourgeon. Les cônes sont d'une longueur de 2 à 3 cm et d'une couleur violâtre à brun foncé. Ils sont ovoïdes et pointus, presque sphériques lorsqu'ils sont ouverts, contenant environ 30 écailles étroitement imbriquées et grossièrement denticulées. Les cônes peuvent persister 20-30 ans sur les branches, mais périodiquement ils libèrent des graines au cours de l'hiver. Toutefois il y a des graines qui restent dans les cônes pendant plusieurs années. Floraison printanière. Les aiguilles sont persistantes et restent sur l'arbre cinq ans ou plus. Elles ont une longueur de 6-13 mm, très fines, presque aciculaires, solitaires et disposées en spirale, formant une crête décurrente et persistante à la base. Leurs sections sont quadrangulaires et elles roulent facilement entre le pouce et l'index. Les crêtes décurrentes visibles sur les rameaux aident à distinguer l'épinette des autres conifères. Seuls les Pruches et les Ifs ont des feuilles dont la base ressemble à celle des épinettes, mais leurs feuilles sont plates ou à section semi-circulaire. Les autres conifères à feuilles plates, le sapin de Douglas (*Pseudotsuga*) et les vrais sapins (*Abies*), ont des rameaux lisses (fig. 3).

---

[1] Informations prises des références 27 et 28.



Aiguilles assez droites, à bout mousse

Écailles de cône denticulées; cône fermé (gauche) et cône ouvert (droite)



Noter la forte pubescence du rameau et les bases des aiguilles très saillantes



La graine est presque noire



A maturité, l'écorce est mince et écailleuse



Epinette noire en forêt; quelques cimes en forme de plumeau

Figure 3: Photos des différentes parties de *Picea mariana*

### 2.3 DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

Le *Picea mariana* ou l'épinette noire est l'un des conifères les plus abondants du nord de l'Amérique. Son aire de distribution est très vaste puisqu'on la retrouve dans toutes les provinces du Canada jusqu'à la limite septentrionale des arbres<sup>29</sup> (fig. 4). Elle est l'espèce prédominante de la forêt boréale de l'est du pays. Sa distribution transcontinentale témoigne de sa capacité à s'adapter à des conditions climatiques. Elle ne forme généralement de peuplements purs que sur des sols superficiels, mal drainés et froids où la compétition est faible. Une espèce qui colonise un aussi vaste territoire a le potentiel de démontrer une forte variabilité génétique de par ses populations qui possèdent des stabilités génétiques ainsi que des capacités différentes à coloniser des sites variés<sup>30</sup>. Cependant l'épinette noire trouvera son développement optimal sur un sol assez bien aéré et sous un climat frais et humide.

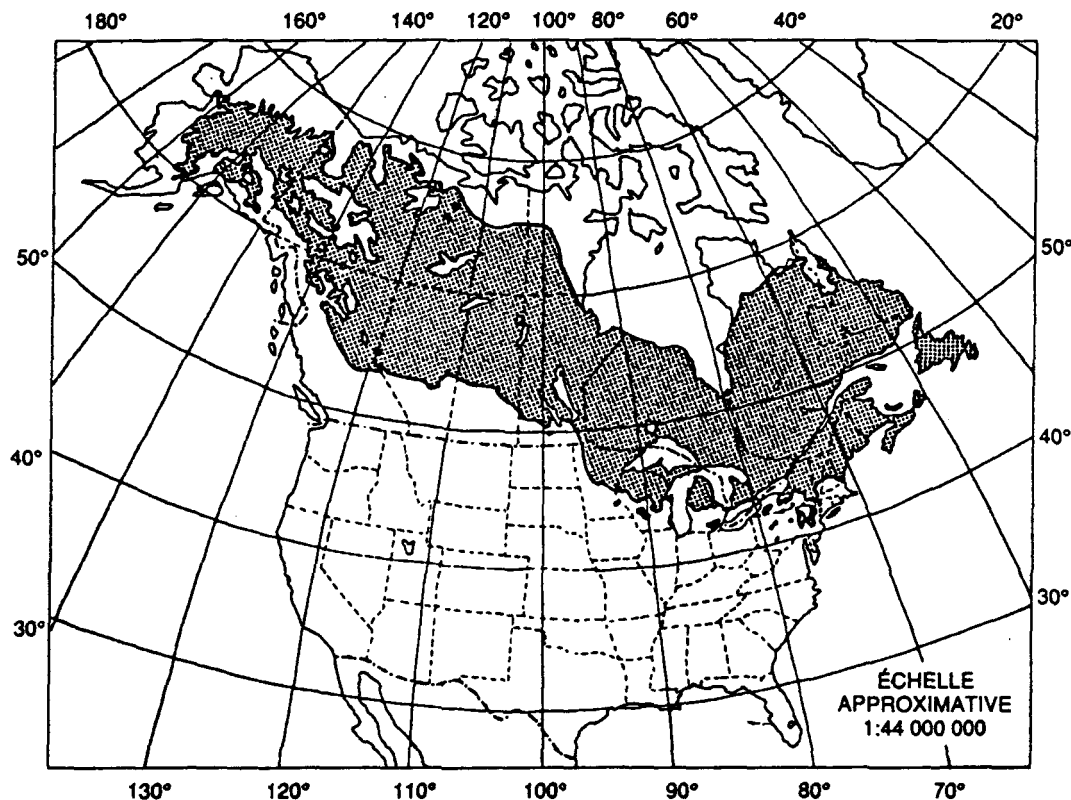


Figure 4: Distribution naturelle de l'épinette noire<sup>29</sup>

Dans la forêt boréale, l'épinette noire forme fréquemment des peuplement purs qui occupent de vastes superficies. Dans la partie sud du Québec, on retrouve les pessières à épinettes noires dans des conditions édaphiques particulières; elles occupent alors des superficies restreintes. De plus, l'épinette noire se trouve très souvent associée au sapin baumier, au pin gris, à l'épinette blanche, au mélèze, au peuplier faux-tremble et au bouleau blanc<sup>29</sup>.

## 2.4 SITE D'ÉCHANTILLONNAGE

La cueillette de *Picea mariana* (mill) B.S.P. a été effectuée dans la région du Saguenay et le Lac-St-Jean qui englobe, en les entourant, le Saguenay le Lac-St-Jean ainsi que les parcs Haute-Mauricie, Chibougamau et Chicoutimi. Elle est comprise entre les parallèles 48° et 49° 30' N et les méridiens 70° et 75° O<sup>30</sup>. Le site d'échantillonnage se situe au Lac Simoncouche, station de recherche de l'Université du Québec à Chicoutimi, à l'entrée nord de la réserve faunique des Laurentides (fig. 5).

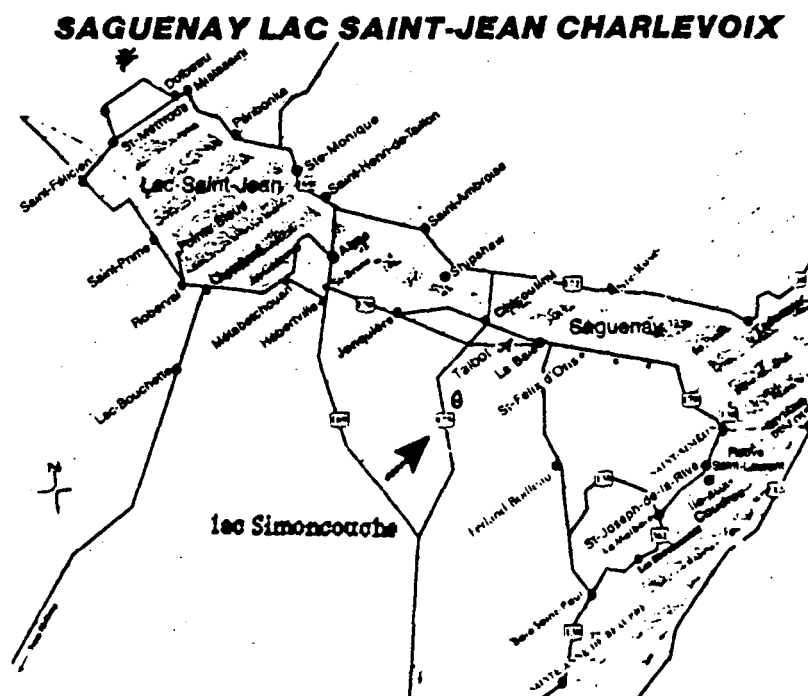


Figure 5: Site de l'échantillonnage de *Picea mariana*

## **SECTION II**

### **MÉTHODES D'EXTRACTION, ET D'ANALYSE DES GLYCOSIDES**

## **CHAPITRE I**

### **QUELQUES PRINCIPES ET THÉORIES DES MÉTHODES D'EXTRACTION DE PURIFICATION ET D'ANALYSE**

Ce chapitre décrit quelques principes et théories de base des méthodes qui ont été utilisées dans ce projet d'étude sur les glycosides de l'épinette noire. La chromatographie en phase liquide a été utilisée comme méthode de séparation et de purification et la chromatographie en phase gazeuse a été utilisée comme méthode de séparation et d'identification. La résonance magnétique nucléaire a été utilisée pour déterminer la structure des produits purifiés par chromatographie liquide.

#### **1.1 MÉTHODES D'EXTRACTION**

L'extraction par solvant est une technique très utilisée dans les laboratoires de chimie. Pour analyser n'importe quel produit naturel ou mélange de produits naturels, il faut d'abord procéder par une extraction. Un mélange complexe qui contient des produits de différente nature peut être simplifié. Par exemple, un solvant non polaire va extraire les produits non polaires. Les trois méthodes d'extraction qui ont été utilisées dans ce travail sont décrites dans les paragraphes suivants.

### **1.1.1 Extraction au Soxhlet**

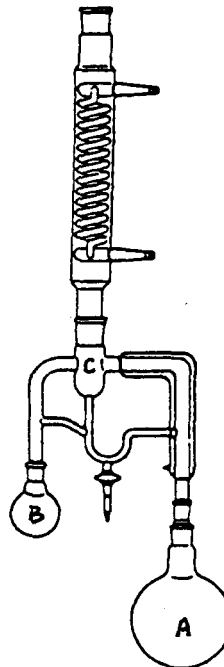
L'extracteur de Soxhlet (fig. 6) est un appareil conçu pour l'extraction continue solide liquide. Le matériel à extraire est pulvérisé et mis dans une cartouche de papier épais et le tout est mis dans un réservoir à siphon qui est surmonté d'un réfrigérant. Sous l'ensemble, un ballon qui contient le solvant pour extraire les produits. Une fois prêt le solvant est porté à ébullition pour procéder à l'extraction. Les vapeurs du solvant sont condensées dans le réfrigérant et le solvant s'accumule dans le réservoir à siphon. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant les substances dissoutes. La même opération se répète jusqu'à ce qu'on arrête l'ébullition du solvant. Cette méthode est efficace parce que le contact entre le matériel végétal et le solvant est long (période de remplissage du réservoir à siphon); aussi elle est très économique au point de vue solvant mais nécessite plus de temps pour un rendement maximal.

### **1.1.2 Extraction liquide-liquide**

L'extraction liquide-liquide est un moyen de faire passer une ou plusieurs substances d'un solvant, dans lequel elles sont souvent difficiles à séparer, à un autre, où elles seront facilement isolables. L'extraction est habituellement réalisée dans une ampoule à décanter par agitation des deux solvants. Les deux solvants doivent être très peu ou pas miscibles l'un dans l'autre. Une fois que l'ampoule est au repos, les deux phases se séparent et on peut récupérer les deux solvants. L'extraction est d'autant plus efficace que les substances à extraire sont plus solubles dans le solvant d'extraction que dans leur solvant original.



**Figure 6:** Schéma d'un extracteur de Soxhlet



**Figure 7:** Schéma d'un extracteur de Likens-Nikerson



Il arrive que la séparation entre deux phases n'est pas complète, mais qu'il se forme une émulsion, c'est-à-dire une zone intermédiaire contenant des gouttelettes d'une phase suspendue dans l'autre. Par exemple, la présence d'agents tensioactifs (produits naturels, protéines, etc.) dans une phase aqueuse entraîne la formation d'émulsion.

Diverses méthodes peuvent être employées pour briser une émulsion<sup>31</sup>.

- l'attente : en laissant reposer l'ampoule pendant une longue période les deux phases peuvent se séparer;
- filtration : l'émulsion peut être filtrée sur la laine de verre ou simplement sur un filtre plissé. Il existe également des papiers séparateurs de phase, imprégnés d'un composé siliconé, retenant la phase aqueuse et laissant passer la phase organique;
- les agents chimiques : l'addition d'un sel inorganique ou l'introduction, directement dans l'émulsion, de quelques gouttes d'alcool peuvent provoquer la rupture d'une émulsion;
- la centrifugation : l'émulsion, lorsqu'elle est importante, peut être brisée par centrifugation.

### 1.1.3 Extraction avec un appareil Likens-Nickerson

L'appareil Likens-Nickerson est utilisé exclusivement pour l'extraction des produits volatils d'une solution aqueuse par un solvant organique non miscible et dont la densité est inférieure à celle de l'eau (fig. 7). L'avantage majeur de cette technique est de pouvoir concentrer jusqu'à mille fois les produits volatils en une seule étape<sup>32</sup>. En portant à ébullition la solution aqueuse (ballon A) et le solvant organique (ballon B), la vapeur de l'eau se mélange avec les vapeurs du solvant organique (C) dans lesquels les produits volatils vont se dissoudre. Après condensation dans le réfrigérant, les deux phases sont séparées (D). Les jonctions entre les deux ballons sont conçues de manière à ce que le solvant organique, dont la densité est inférieure à celle de l'eau, revienne à son point de départ (ballon B) et l'eau aussi retourne à son point de

départ (ballon A) sans les produits volatils. Ainsi tout le long de l'extraction vapeur-vapeur les produits volatils passent de la phase aqueuse à la phase organique où ils sont parfaitement solubles. C'est le fait d'utiliser un petit volume de solvant organique sans le changer au cours de toute l'opération de l'extraction qui rend cette technique très efficace pour concentrer des produits volatils qui se trouvent en très petite quantité dans un grand volume.

## 1.2 LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE (CL)

La séparation et la purification des produits organiques sont des étapes très importantes qui précèdent la détermination de leur structure par des méthodes spectroscopiques. Jusqu'en 1960, les techniques de cristallisation et de distillation très efficaces étaient largement utilisées pour cette fin.

Ces méthodes qui sont lentes nécessitent des bonnes quantités de produits à séparer. La distillation, limitée aux produits volatils, est une technique exigeant beaucoup de dextérité surtout lorsqu'il s'agit de séparer des produits ayant des points d'ébullition très voisins. La cristallisation a aussi ses limites. Quand il s'agit de séparer deux isomères, ce n'est pas toujours facile à réaliser, mais surtout la purification d'un produit en trace (ex. un métabolite) dans un mélange complexe (ex. plasma) est une tâche difficile à réaliser.

Bien que les premiers travaux sur la chromatographie liquide (CL), furent publiés en 1906, par un botaniste Russe <sup>33</sup>, on considère, en général, que l'utilisation de cette technique a suivi la publication de Huber et Hulsman en 1967 <sup>34</sup>. Jusqu'à nos jours la chromatographie n'a pas cessé de gagner en popularité. Cela est dû à son efficacité, sa rapidité à résoudre des problèmes, ses séparations et analyses de mélanges complexes et sa simplicité d'utilisation.

En chromatographie liquide, il y a toujours deux phases, une stationnaire (liquide ou solide) et l'autre mobile (liquide). La désignation CL réfère à l'état physique de la phase mobile. On peut distinguer trois formes de CL: sur colonne, sur couches minces et sur papier. Mais les trois formes obéissent aux mêmes principes théoriques. Un des avantages majeur de la chromatographie liquide sur d'autres techniques de séparation se trouve dans la multiplicité des mécanismes différents avec lesquels la séparation chromatographique peut être effectuée. On peut choisir une forme de chromatographie en fonction des propriétés physico-chimiques des différents constituants de l'échantillon à analyser ou à séparer. Les mécanismes de la chromatographie varient en fonction de la nature et de la forme du matériel qui est utilisé comme phase stationnaire.

La nature de la phase stationnaire peut varier, de apolaire (ex. ODS: gel d'octadécyle silane) à très polaire (ex. gel de silice). Le mécanisme qui intervient dans la séparation est l'adsorption. Une phase stationnaire polaire a tendance à retenir (adsorber) plus fortement les produits polaires que les produits non polaires ce qui est l'inverse d'une phase non polaire. On peut aussi utiliser des phases stationnaires ioniques pour réaliser une chromatographie d'échange ionique, pairage ionique ou suppression ionique, dont les mécanismes reposent essentiellement sur des échanges d'ions entre la phase stationnaire et l'échantillon à séparer qui est transporté par la phase mobile. Le choix approprié de pH des deux phases et des ions de la phase stationnaire est une étape très importante qui doit tenir compte de la nature de l'échantillon et sous quelle forme on veut récupérer les produits séparés.

La chromatographie de perméation moléculaire ou tamisage moléculaire est une forme de chromatographie liquide où les solutés d'intérêt sont séparés par un mécanisme de perméation. Les plus grosses molécules ne sont pas retenues et dites totalement exclues; les plus petites sont dites totalement incluses. La séparation se fait donc uniquement selon la taille des molécules. Le

support est en général un polymère (ex. polystyrène, polyacrilamide) dont on connaît la taille des pores des particules. Plus les pores sont petits plus les petites molécules vont être retenues.

Les différents types de chromatographies utilisés dans ce travail pour séparer et analyser les glycosides, extraits de l'épinette noire, vont être traités dans les paragraphes qui suivent.

### **1.2.1 La chromatographie liquide sur couche mince (CCM)**

La chromatographie liquide sur un support planaire comporte deux techniques populaires: la chromatographie sur papier (CP) et la chromatographie sur couches minces (CCM). La CP a précédé la CCM de 10 à 15 ans, et un grand nombre de séparations ont été réalisées avec cette technique. Mais au début de 1957, la CCM a été découverte, et on a réalisé que cette technique était rapide, plus facile d'utilisation, plus reproductible et représentait moins d'inconvénients <sup>33</sup>.

Dans la chromatographie sur couches minces le débit de la phase mobile ne peut pas être contrôlé comme on peut le faire sur une colonne. Le débit ou la vitesse de migration dépend de la tension de surface et de la viscosité de la phase mobile et aussi de la nature de la phase stationnaire. Cette dernière contient des capillaires, inter-reliés, de différents diamètres. Au départ la phase stationnaire est sèche et une fois que la partie inférieure touche la phase mobile on a une migration du liquide vers le haut par action capillaire. L'homogénéité de la phase stationnaire minimise les variations capillaires, ce qui permet une migration convenable du front de la phase mobile.

La phase stationnaire la plus utilisée dans la CCM est le gel de silice. Une couche mince est appliquée sur une plaque de verre ou de plastique (rectangulaire ou carrée). Pour avoir une

couche stable l'addition d'un fixatif est nécessaire. En général on utilise du gypse (désigné par G) ou l'alcool polyvinyle (PVA).

L'utilisation de la CCM comporte quatre étapes : (a) le choix de la phase stationnaire et de la phase mobile, (b) l'application du produit, (c) le développement et (d) la visualisation ou la révélation des produits.

**a) Le choix de la phase stationnaire**

Pour avoir une bonne séparation on doit optimiser l'affinité entre le mélange à séparer, la phase mobile et la phase stationnaire. La première chose à considérer, c'est la nature des groupements fonctionnels des produits qu'on veut séparer et les solvants qu'on peut utiliser. Cela permettra de définir la nature de la phase stationnaire et mobile en se basant sur les informations qu'on peut trouver dans la littérature.

**b) L'application des produits**

Le mélange des produits qu'on veut séparer doit être complètement soluble dans la phase mobile. Le mélange, préalablement dissous dans un minimum de solvant, peut être appliqué à l'aide d'une micro-pipette ou d'un tube capillaire sur la phase stationnaire. L'application doit se faire sous forme de petites taches à une distance de 1 à 1,5 cm du bord de la plaque (côté qui va être introduit dans la phase mobile). Les taches ne doivent pas toucher la phase mobile. Comme solvant pour l'application on peut utiliser la phase mobile, mais de préférence il faut choisir le solvant le plus volatil possible avec un minimum de volume. Ces deux dernières conditions facilitent la formation de petites taches: un solvant volatil sèche plus rapidement, ce qui permet plusieurs applications très rapprochées et avec de très petites quantités au même endroit. Des taches plus larges, ou une grande quantité de produit appliqué, influence beaucoup la séparation.

### c) Le développement de la couche mince

Le développement de la plaque se fait dans une chambre fermée, préalablement saturée. Pour la préparer, on couvre les parois de la chambre (ex. un bocal transparent) par un papier absorbant (ex. papier filtre) et on laisse une fenêtre pour surveiller la plaque au moment du développement. Une fois que la chambre est saturée par la vapeur de la phase mobile, on peut introduire la plaque séchée qu'on veut développer. La plaque doit être placée d'une manière à ce que le côté qui va être dans la phase mobile soit horizontal, pour que le front de la phase mobile migre de façon égale sur la phase stationnaire. Cette condition nous permettra de comparer ou de mesurer avec plus de précision les distances de migration des produits sur des plaques différentes.

### d) Révélation ou visualisation des produits

Quand le front de la phase mobile atteint le niveau désiré, on retire la plaque. Il arrive parfois que les produits sont apparents par leur propre couleur, mais le plus souvent ce n'est pas le cas, alors il faut les rendre visibles. Avant de visualiser les produits, en général la plaque doit être sèche, surtout si le révélateur utilisé est un réactif. Les techniques de révélation sont très nombreuses. On peut visualiser des produits fluorescents en exposant la plaque sous une lampe UV. Quand ce n'est pas le cas, on peut utiliser une plaque qui contient du phosphore. En exposant la plaque à une lampe UV, on peut voir les produits sous forme de taches non fluorescentes, mais cette fois nous ne pouvons pas voir les produits qui absorbent la lumière UV. Ce problème peut être résolu par l'utilisation des réactifs comme révélateurs. Cette méthode de révélation est largement répandue. Touchstone et Dobbins ont décrit l'utilisation de 207 réactifs<sup>35</sup>. Les réactifs en solution sont pulvérisés sur la plaque par un atomiseur. En chauffant la plaque, les taches des produits séparés apparaissent. Les réactifs universels sont le réactif de Liebermann ( $\text{H}_2\text{SO}_4:(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}; (1:9)$ ), l'acide cérique et l'iode. Ce dernier est utilisé surtout sous forme de vapeur. Il suffit de mettre la plaque dans une chambre qui contient de la vapeur

d'iode et les taches deviennent visibles. Le seul inconvénient est l'évaporation de l'iode après un certain temps, et les taches disparaissent .

La CCM est encore très populaire. On l'utilise surtout pour l'analyse qualitative rapide des mélanges et comme moyen de choisir la phase mobile et la phase stationnaire en vue de séparer un mélange sur une colonne de même que pour contrôler l'efficacité d'une colonne préparative.

Pour un produit donné, l'indice de rétention ( $R_f$ ) est toujours le même si on utilise la même phase mobile et le même type d'adsorbant. Cependant, même en respectant ces conditions, le paramètre  $R_f$  peut être influencé par l'activité de l'adsorbant. Cette dernière dépend du pourcentage d'eau que l'adsorbant peut absorber de l'atmosphère, et particulièrement dans le cas des phases stationnaires polaires (ex: gel de silice et alumine). Pour les analyses qualitatives on peut remédier au problème de l'activité variable de l'adsorbant par l'utilisation d'un standard. Dans des cas où l'utilisation des standards n'est pas possible il faut garder les plaques dans un endroit sec ou les préparer en contrôlant la quantité d'eau adsorbée pour éviter ce problème.

$$R_f = \frac{\text{Distance de migration d'un composé}}{\text{Distance de migration du solvant}}$$

La valeur de  $R_f$  d'un produit varie avec la phase mobile. Si on prend le gel de silice ( $\text{SiOH}$ ) comme phase stationnaire, la valeur de  $R_f$  augmente en augmentant la polarité de la phase mobile. Cette dernière peut être composée de plus d'un solvant et on peut varier sa polarité en variant le pourcentage d'un solvant ou plus. Les solvants qui composent une phase mobile doivent être obligatoirement miscibles. On peut utiliser deux solvants non miscibles avec un troisième, intermédiaire, miscible avec les deux pour obtenir un système de solvant homogène.

## **1.2.2 Chromatographie liquide à basse pression sur colonne préparative**

La CLBP- préparative est très utilisée comme moyen pour séparer les produits d'un mélange en plus grande quantité. La phases stationnaire et la phase mobile peuvent être choisies à l'aide de la CCM décrite plus haut. L'optimisation de la phase mobile par CCM est achevée quand les valeurs des  $R_f$  des produits séparés se situent entre 0,3 et 0,5. Afin d'assurer le succès du passage de la CCM à la CLBP, il convient d'utiliser l'adsorbant provenant du même fabricant.

La colonne utilisée est souvent en verre transparent qui respecte, en général, le rapport hauteur : diamètre de 8 : 1 ou 10 : 1. Les deux bouts de la colonne sont filtrés pour pouvoir les fermer avec des embouts en Téflon où l'on peut visser des adaptateurs munis de tubes qui assurent la circulation du solvant. Un embout est muni d'un injecteur pour introduire le mélange qu'on veut séparer sur la phase stationnaire.

### **1.2.2.1 Remplissage de la colonne préparative**

Le remplissage de la colonne est très important. Pour obtenir un maximum de rendement, la granulométrie des particules doit être le plus homogène possible. Il ne doit pas y avoir des poches d'air dans la phase stationnaire pendant l'élution. Avant de procéder au remplissage de la colonne, cette dernière doit être propre. Le nettoyage peut se faire en cinq étapes <sup>36</sup>: (a) éliminer les graisses et les particules, sur les parois internes de la colonne, avec une solution d'acide chlorhydrique (2 molaire), puis du chloroforme; (b) sécher avec de l'azote; (c) laver avec une solution de détergent à l'aide d'une brosse ou du coton qu'on peut passer dans la colonne à l'aide d'un fil; (d) éliminer le détergent avec de l'eau; (e) finalement, laver avec du méthanol et sécher avec de l'azote.



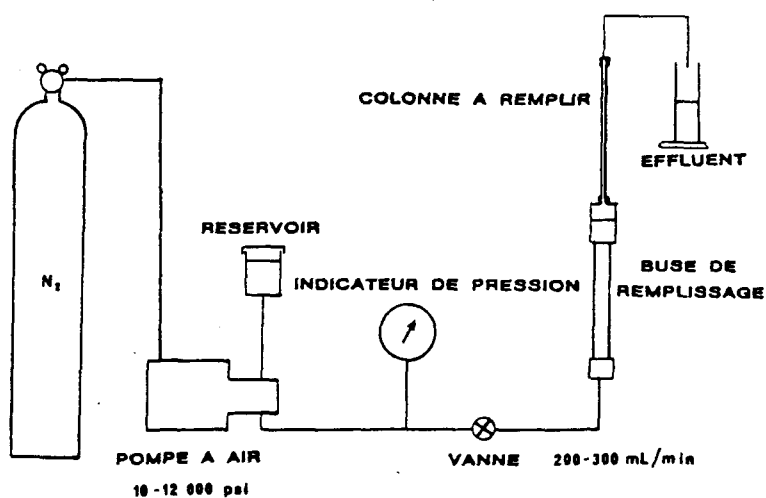
Il y a deux techniques de remplissage de la colonne : remplissage à sec et remplissage par suspension dans un solvant.

Dans le cas du remplissage à sec l'adsorbant est ajouté par petites quantités dans la colonne maintenue dans une position verticale afin de favoriser un remplissage uniforme. Il faut bien compacter l'adsorbant en donnant des petits coups avec la colonne, sur le comptoir ou le plancher, en la tournant en même temps. On peut aussi utiliser un moteur qui va générer des vibrations qui vont permettre aux particules de la phase stationnaire d'occuper les espaces vides. Cette dernière technique est non recommandée pour le remplissage des colonnes destinées à des séparations plus difficiles. Les vibrations provoquent une ségrégation de la grosseur des particules et donnent une distribution granulométrique non homogène le long de la colonne<sup>36</sup>. Une fois la colonne est remplie, il faut procéder à l'élution du système de solvant pour déloger l'air de la phase stationnaire. Comme mentionné plus haut, il ne doit pas y avoir des bulles d'air dans la colonne pour maximiser son rendement. Nous avons constaté que l'air est facilement éliminé si le solvant circule de bas en haut dans la colonne. Pour cela il faut maintenir la colonne verticale et faire circuler le solvant, à l'aide d'une pompe, du bout inférieur vers le haut. Une fois la colonne remplie et les raccords installés, il suffit de la tourner à 180° et commencer l'élution. Quand il ne reste aucune bulle d'air dans la phase stationnaire la colonne est prête pour séparer un mélange. Le temps nécessaire pour éliminer l'air comme mentionné est très court par rapport à l'élution de solvant de haut en bas.

Le remplissage de la colonne par suspension de la phase stationnaire dans un solvant est plus facile. C'est la méthode la plus utilisée pour le remplissage des colonnes. La phase stationnaire est mélangée avec un solvant adéquat (ex. l'alcool isobutylique pour le gel de silice) et le mélange est agité pendant cinq à dix minutes. Une fois les particules déposées au fond, le solvant qui surnage la phase stationnaire est versé lentement pour éliminer les très petites

particules qui restent suspendues. Cette opération augmente l'homogénéité des particules, on peut la répéter plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant qui surnage les particules déposées soit transparent avant de procéder au remplissage de la colonne. La phase stationnaire peut être introduite dans la colonne préparative de plusieurs façons. La façon la plus simple est d'utiliser deux colonnes de verre montées en série à l'aide d'un adaptateur conçu pour cette fin. En fermant le bout inférieur, on peut introduire la phase stationnaire, suspendue dans le solvant, par le bout supérieur. Lorsque cette étape est terminée on procède à l'élution du solvant (le même utilisé pour la suspension) à l'aide d'une pompe. On peut utiliser un système fermé pour que le solvant qui traverse la colonne revienne dans le même contenant d'où il était pompé. Quand le niveau de la phase stationnaire dans la colonne supérieure reste constant, cette dernière est enlevée et le bout supérieur de la colonne remplie est fermé.

D'autres méthodes de remplissage font appel à un système composé de pompe à haute pression et à débit élevé pour pousser une suspension de la phase stationnaire dans un solvant approprié vers la colonne à remplir (voir fig. 8).



**Figure 8:** Montage de remplissage des colonnes à haute pression

### 1.2.2.2 Paramètres d'optimisation d'une séparation sur colonne

Avant de procéder au remplissage d'une colonne, il faut considérer la quantité de produit qu'on veut séparer à la fois. Si on veut séparer une grande quantité d'un mélange, il faut utiliser une plus grande quantité de phase stationnaire, donc une plus grande colonne. Le débit de l'élution est très important pour avoir une bonne séparation. Pour optimiser les conditions d'une séparation, il faut bien choisir les paramètres de grosseur de la colonne en fonction de la quantité de l'échantillon et le débit de l'élution (voire Tab. 2).

**Tableau 2 : Conditions d'opérations typiques de la CLBP-P**

D.I de la colonne	1-4 cm
Longueur de la colonne	20-100 cm
Poids de la phase stationnaire	50-500 g
Grosseur des particules	> 40 mm
Pression	10 à 300 kPa
Débit de la phase mobile	2 à 20 mL/min
Vélocité linéaire	0,1 à 1,0 mm/sec
Nombre de plateaux	200 à 2000
Quantité d'échantillon	0,1 à 10 g
Volume injecté	0,5 à 20 mL

Tableau tiré de la référence 33.

Une fois la phase stationnaire et la phase mobile déterminées à l'aide de la chromatographie sur couches minces, on peut procéder à la séparation sur la colonne. Avant d'introduire l'échantillon dans la colonne, il est nécessaire de le nettoyer. Cette étape est très importante pour éliminer les substances indésirables, surtout si on veut utiliser la colonne plusieurs fois. À titre d'exemple, un extrait aqueux d'un matériel végétal est un mélange très complexe. Il contient des substances très polaires (ex: pigments, lignine, etc..). Si la phase stationnaire utilisée est le gel de silice, on risque d'avoir une adsorption irréversible des substances très polaires. De ce fait, les sites de l'adsorbant sont désactivés et la colonne perd son efficacité de séparation.

Pour nettoyer un échantillon, avant la séparation, il y a plusieurs techniques et articles disponibles chez les fournisseurs du matériel de la chromatographie. Une colonne de quelques centimètres peut être utilisée à pression atmosphérique pour nettoyer une bonne quantité d'un échantillon. Cependant, on peut tout simplement utiliser, environ, cinq grammes de la phase stationnaire (la même utilisée pour le remplissage de la colonne) pour un gramme de mélange. Ce dernier, dissous dans un petit volume du système de solvant et mélangé avec la phase stationnaire, est agitée pendant quelque minutes. Le mélange est filtré et l'adsorbant est lavé avec le même solvant. Il faut s'assurer que les produits qu'on veut séparer sont tous récupérés. La solution obtenue est évaporée à sec.

### **1.2.2.3 Séparation sur la colonne préparative à basse pression**

La colonne, préalablement conditionnée avec le système de solvant, est prête pour recevoir l'échantillon. Après avoir été pesé et dissous dans un minimum de solvant, l'échantillon est prêt à être injecté dans la colonne. À l'aide d'une seringue, le mélange est introduit sur la phase stationnaire. En actionnant la pompe, réglée au débit désiré, le mélange est poussé à

travers la phase stationnaire. La séparation des différentes substances constituant le mélange prend place dans la colonne. Les produits qui sont injectés dans la colonne vont être séparés en fonction de leur nature et celle de la phase stationnaire utilisée.

Pour récupérer les produits qui ont été séparés, il faut les détecter au moment où ils sortent de la colonne. Cette étape fait appel à un détecteur et un collecteur de fractions. Dans le présent travail, la chromatographie sur colonne préparative est utilisée pour des pré-purifications. Les produits sont récupérés par fractionnement. La phase mobile est récupérée à la sortie de la colonne en fractions égales, à l'aide d'un collecteur à fraction automatique. Les fractions sont analysées par chromatographie sur couches minces. En comparant les  $R_f$  des produits, les fractions qui contiennent les mêmes produits sont regroupées.

L'efficacité des colonnes préparatives est limitée. Il est très difficile de séparer des produits qui ont des structures chimiques ou des polarités semblables sur une colonne préparative. Cette limite est due à la grosseur des particules et au remplissage de la colonne. Pour augmenter l'efficacité, il faut des particules de très petites tailles et un remplissage à une très grande pression. Donc il faut une grande pression pour éluer un solvant à travers cette colonne. Cette nécessité d'avoir une grande efficacité a mené à la chromatographie à haute pression (CLHP).

### **1.2.3 Chromatographie liquide à haute pression (CLHP)**

Les techniques chromatographiques modernes sont caractérisées par leur critère de haute performance. La signification de ce terme prête parfois à confusion<sup>37</sup>. Pourtant ce concept recouvre deux termes qui, additionnés, caractérisent la haute performance:

- haute résolution, et - grande vitesse d'analyse.

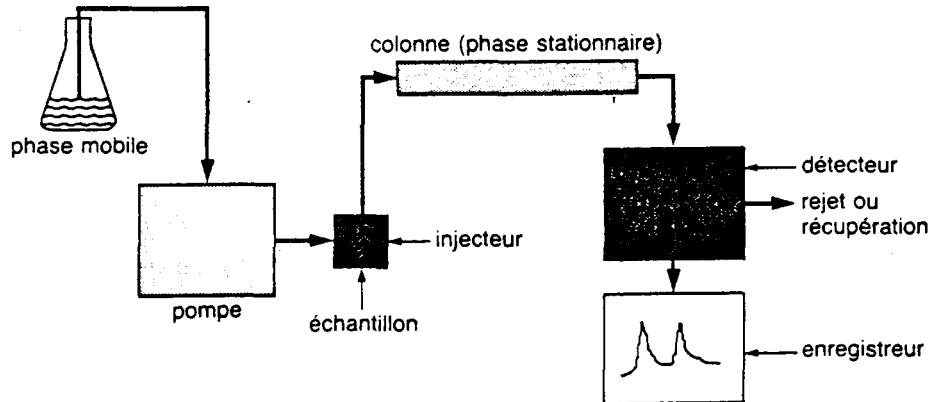
Dans un dispositif chromatographique, la grande résolution est le résultat de la combinaison de deux termes : grande efficacité et grande sélectivité<sup>33</sup>.

Pour des séparations difficiles, la CLHP est requise. Les deux caractéristiques importantes d'une colonne CLHP sont : les particules de la phases stationnaires sont très petites, de 2 à 20  $\mu\text{m}$ , et le remplissage se fait à une très grande pression, de 10-12 000 KPa <sup>38,39</sup>, d'où la nécessité d'une colonne en métal (acier inoxydable). La grosseur des particules est très importante. Plus une particule est petite plus le rapport surface/poids est grand. Le remplissage à haute pression permet d'introduire une plus grande quantité de la phase stationnaire dans la colonne. Donc, dans une colonne de CLHP la surface active de la phase stationnaire est de loin plus grande que celle qu'on peut avoir avec une colonne de verre préparative, toutes choses étant égales par ailleurs.

La chromatographie liquide moderne (CLHP) doit son évolution à plusieurs domaines: la sophistication de l'équipement, le remplissage de la colonne et la compréhension des mécanismes de séparation et les paramètres qui l'influencent. La haute pression et le faible volume mort de l'équipement (colonne, conduits, raccords et la cellule du détecteur) avec des détecteurs sensibles jouent un rôle vital dans l'efficacité du CLHP<sup>39</sup>. Un système de CLHP se compose de six éléments de base essentiels à son fonctionnement: un filtre pour le solvant, une pompe à haute pression pour pousser le solvant, un injecteur pour introduire le mélange à séparer dans le colonne, une pré-colonne, la colonne, un détecteur et finalement un enregistreur (voir fig. 9).

Un solvant avant d'être pompé dans un système CLHP, doit être dégazé et filtré par un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$ . Comme les conduits du système sont très petits, des particules solides, même microscopiques peuvent bloquer les conduits du système en s'accumulant. De l'air dissout dans

le solvant peut former des bulles dans la pompe et empêcher le passage du solvant. À la sortie de la colonne le solvant n'est plus sous une grande pression. S'il contient de l'air dissout, ce dernier peut former des bulles d'air. Comme le détecteur réagit aux variations de l'absorption des ondes de la lumière (détecteurs à lampe), les bulles vont être détectées et enregistrées comme s'il s'agit d'un produit. La pré-colonne (colonne de garde) qui en général contient la même phase stationnaire que la colonne, joue un rôle de protection pour la colonne. S'il y a des produits qui peuvent être adsorbés irréversiblement ou des particules microscopiques, la pré-colonne va les empêcher d'atteindre la colonne.



**Figure 9:** Les composantes principales d'un système CLHP

Le développement de la théorie est à l'origine de l'évolution de la chromatographie. Dans ce travail le concept théorique ne va pas être détaillé, par contre nous allons aborder les paramètres qui jouent directement sur la séparation des produits.

### 1.2.3.1 Quelques principes et théorie de la chromatographie <sup>[1]</sup>

En chromatographie linéaire et idéale, on suppose qu'il existe un équilibre du soluté entre les phases en tout point de la colonne. Cet équilibre est caractérisé par le coefficient de distribution (ou coefficient de partage)  $K$  à une température donnée :

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (1)$$

$C_s$  et  $C_m$  désignant respectivement les concentrations du soluté dans les phases stationnaires et mobiles.

Lorsqu'un soluté (produit à séparer) a une affinité nulle pour la phase stationnaire, il n'est pas retenu et sa vitesse de migration est celle de la phase mobile. Au contraire, pour un produit qui a une affinité non nulle pour la phase stationnaire le processus de migration est discontinu. La vitesse de migration moyenne observée est proportionnelle à la fraction non retenue exprimée par le terme  $C_m$ . Le soluté va être plus retenu par la phase stationnaire lorsque son coefficient de partage va être élevé. Pour traduire quantitativement la rétention, l'une des trois grandeurs suivantes est utilisée :

- le temps de rétention  $t_r$
- le volume de rétention  $V_r$
- le facteur de capacité  $k'$

---

[1] Ces informations sont prises dans les références 36 à 38



a) Grandeur de rétention  $t_r$

Le temps de rétention  $t_r$  d'un composé correspond au temps passé par le composé dans la phase mobile ( $t_m$ ) et le temps passé dans la phase stationnaire ( $t'_r$ ) :

$$t_r = t_m + t'_r \quad (2)$$

Les molécules progressent à la vitesse de la phase mobile quand elles y sont en solution et restent immobiles quand elles sont dans la phase stationnaire. Le temps  $t_m$  est le même pour tous les composés. Par contre, le temps  $t_r$  diffèrent selon les composés.

Le volume de rétention  $V_r$  d'un composé correspond au volume de la phase mobile nécessaire pour éluer ce composé. Il est donné par la relation :

$$V_r = V_m + K V_s = V_m + \left( \frac{C_s}{C_m} \right) V_s \quad (3)$$

$V_m$  désignant le volume de la colonne

$V_s$  désignant le volume la phase stationnaire.

Il peut être aussi exprimé par :

$$V_r = t_r \times F_c \quad (4)$$

$F_c$  est le débit de la phase mobile.

**b) Facteur de capacité k'**

Le facteur de capacité k' est défini comme le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire  $m_s$  à la quantité de soluté dans la phase mobile  $m_m$ . On l'exprime par :

$$k' = \frac{m_s}{m_m} = \frac{C_s \cdot V_m}{V_m \cdot C_m} = K \frac{V_s}{V_m} \quad (5)$$

ce qui donne d'après les relations (1), (3) et (4)

$$\begin{aligned} V_r &= V_m (1 + k') \\ t_r &= t_m (1 + k') \end{aligned} \quad (6)$$

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m} \quad (7)$$

Le facteur de capacité k' désigne simplement le temps passé par le soluté dans la phase stationnaire par rapport à celui passé dans la phase mobile. Il représente le nombre de fois qu'il faut faire passer le volume de la phase mobile ( $V_m$ ) pour éluer le soluté, l'étalement du pic exclu. On peut déterminer k' expérimentalement à l'aide de la relation (7), une fois le temps mort ( $t_m$ ) est déterminée. Cette mesure, si elle est facile en CG, n'est pas évidente en CL pour des raisons de définition du composé non retenu.

$$\text{Sachant que le temps mort est déterminé par : } t_m = \frac{L}{u} \quad (8)$$

u est la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile et L est la longueur de la colonne.

$$\text{On peut déduire pour le temps de rétention : } t_r = \frac{L}{u} (1+k') \quad (9)$$

Le rapport  $V_m/V_s$ , étant désigné par  $\beta$ , on peut écrire d'après la relation (5) :

$$k' = \frac{K}{\beta} \quad (10)$$

$$t_r = t_m + \frac{K}{\beta} t_m \quad (11)$$

La relation (11) a de nombreuses implications pratiques :

- l'efficacité requise pour obtenir une séparation dépend du facteur de capacité  $k'$ . En générale, plus  $k'$  est petite plus la séparation est difficile à réaliser,
- la capacité de travail de la colonne, c'est-à-dire la quantité de soluté qui peut être analysée sans surcharger la colonne, est directement fonction de la quantité de la phase stationnaire contenue dans la colonne.

### c) Sélectivité et résolution

La séparation de deux substances est définie par deux grandeurs :

- rétention ou sélectivité
- résolution

Si on considère deux substances 1 et 2 qu'on veut séparer, la sélectivité  $a$  est définie par la relation :

$$a = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad (12)$$

Ces différences dans la distribution des solutés entre les deux phases résultent de l'ensemble des interactions mises en cause. La résolution entre deux pics est, par convention, fonction de deux termes : la sélectivité et l'efficacité :

$$R = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_1 + \omega_2} \quad (13)$$

$\omega_1$  et  $\omega_2$  étant les largeurs à la base des pics correspondant aux solutés 1 et 2 (fig. 10).

#### d) Efficacité

L'aspect cinétique de la chromatographie concerne la largeur ou "finesse" du pic chromatographique qui est souvent exprimée par le nombre de plateaux théoriques de la colonne  $n$  :

$$n = 16 \left( \frac{t_r}{\delta} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_r}{\delta} \right) \quad (14)$$

$\delta$  étant la largeur d'un pic à mi-hauteur.

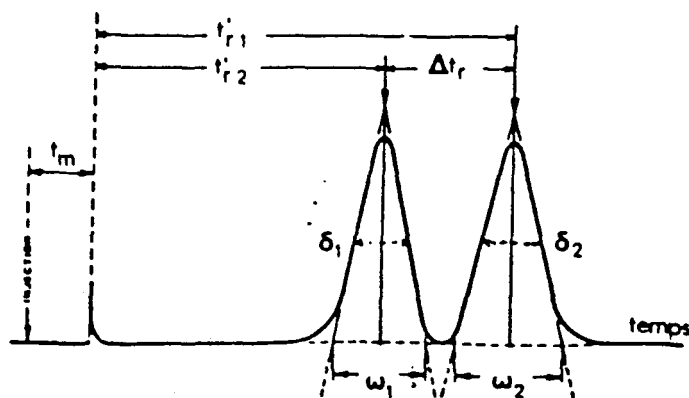


Figure 10: Mesure de degré de séparation entre deux pics

Cette notion de plateaux théoriques, bien qu'elle repose sur un modèle parfaitement théorique, est d'un usage général car elle reflète très bien la finesse des pics. Aussi on peut l'utiliser pour s'assurer qu'une colonne ne représente pas de défaut de fabrication ou qu'elle est encore en bonne état pour être utilisée. Le nombre de plateaux théoriques de la colonne utilisée dans ce travail pour la purification des glycosides est vérifié en utilisant les standards et les conditions de séparation du manufacturier.

## **1.2 LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG) ET LA CG-SM**

### **1.2.1 Chromatographie en phase gazeuse (CG)**

La chromatographie en phase gazeuse est surtout une technique de séparation des produits volatils ou semi-volatils selon les mêmes principes que la CL. Cependant certains produits non volatils peuvent être séparés par la CG en les transformant, par réactions chimiques, en dérivés volatils. Contrairement à la CL où la phase mobile joue un rôle très important dans les processus de séparations, dans la CG la phase mobile est un gaz neutre et ne joue aucun rôle dans les mécanismes de la séparation et c'est pour cette raison qu'on appelle la phase mobile le gaz porteur ou gaz vecteur. En général, l'hélium, l'hydrogène ou l'azote sont utilisés comme phase mobile.

La chromatographie en phase gazeuse moderne utilise principalement des colonnes capillaires, en verre flexible, à très petits diamètres (0,20 à 0,35 mm). La colonne capillaire offre le moyen de séparation le plus efficace et / ou le plus rapide. Dans ce type de colonne, la phase liquide stationnaire est répartie sur la paroi interne du tube capillaire en une couche homogène de faible épaisseur. La caractéristique importante est que le tube est ouvert c'est-à-dire non occupé par un remplissage<sup>37</sup>. Si le gaz vecteur ne joue aucun rôle dans les mécanismes de

séparation des produits constituant un mélange, il en est tout autre avec le débit et la température auxquelles l'analyse s'effectue. Pour une colonne capillaire précise, l'optimisation de séparation est fonction du débit du gaz vecteur et surtout de la température. La possibilité de programmer la température de la colonne a conféré à la CG un très grand avantage pour la séparation des mélanges très complexes et en un temps relativement court. Les produits séparés sur la colonne sont détectés à la sortie par un détecteur. Il existe plusieurs types de détecteurs dont le choix est basé sur la nature et la quantité des produits à séparer (tableau 3).

### **1.2.2 La CG couplée à un spectromètre de masse (CG-SM)**

Le premier couplage CG/SM fut réalisé en 1957 par HOLMES<sup>50</sup> en Suède ; depuis des progrès spectaculaires ont été réalisés. De nos jours la CG-SM est la technique de premier choix pour l'analyse des produits volatils. Cela est dû à la grande spécificité des analyses effectuées par un tel ensemble. La chromatographie en phase gazeuse en étant une méthode de séparation remarquable, la détection des produits à la sortie de la colonne, par des détecteurs conventionnels, présentait une limite de détection ainsi que la spécificité de la réponse.

La CG et la SM sont deux techniques analytiques compatibles dans la mesure où elles analysent toutes deux des composés à l'état gazeux. Le couplage de ces deux techniques est rendu possible grâce à un dispositif qui permet de réduire la pression à la sortie de la colonne de 760 torr jusqu'à la pression de fonctionnement d'une source de SM qui est de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  torr<sup>37</sup>.

Le dispositif de couplage fonctionne très souvent selon le principe de l'élimination préférentielle du gaz vecteur. Il en résulte un enrichissement de celui-ci en soluté. Cette opération n'a pas pour but direct d'améliorer la réponse du spectre de masse lequel a une réponse

Tableau 3 : Caractéristiques des principaux détecteurs de la CG.

Type de détecteur	Principe de détection	sélectivité	sensibilité (g/s)	Linéarité
Conductivité thermique (TCD)	Mesure la conductivité thermique des gaz	Tout composé	$10^{-10}$	$10^4$
Ionisation de flamme (FID)	Mesure des ions créés par la combustion des produits dans la flamme de $H_2/O_2$ $200^{\circ}C$	Tout composé organique oxydable	$10^{-12}$	$10^7$
Capture d'électrons	Mesure des changements du courant d'électrons causé par les produits qui réagissent avec les électrons	Tout produit qui peut réagir avec les électrons	$10^{-14}$	$10^3$
Spectre de masse	Mesure le courant ionique des ions créés par ionisation ou fragmentation des produits	Tout composé organique	$10^{-12}$	$10^3$

Information prise dans les références 37 et 43.

qui dépend de la quantité de soluté traversant par unité de temps et non pas de la concentration de soluté dans le gaz porteur<sup>37</sup>. Contrairement aux autres détecteurs, le spectre de masse a une réponse différente et spécifique pour chacun des composés qui ont été séparés sur la colonne capillaire. Ce qui rend le couplage de la CG et SM très efficace pour l'analyse des mélanges complexes qui contiennent des fois plus que trois cents produits est la possibilité de compiler les spectres des produits séparés dans la mémoire d'un ordinateur et de les comparer individuellement avec des spectres de référence disponibles dans la mémoire de l'ordinateur.

### 1.3 LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN) <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C [2]

L'histoire de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est un exemple classique du développement d'une découverte originale dans un seul domaine scientifique qui s'est transformé en une technique de routine dans tous les domaines de la science de la chimie.

Depuis la première détection des signaux en 1945, par Bolch et al. en Californie et par Purcell et al. à Harvard, à nos jours, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est devenue une méthode d'analyse de choix dans les laboratoires pour l'identification des structures des produits simples et complexes. Les techniques de la RMN se sont multipliées rapidement pour améliorer l'efficacité et étendre l'application à d'autres domaines comme la biologie, pour les macromolécules, et la biomédicale, pour la reproduction des images. Dans ce chapitre nous nous intéressons à l'application de la RMN du proton (<sup>1</sup>H) et la RMN du Carbone (<sup>13</sup>C) dans la détermination de structures chimiques des produits organiques.

---

[2] Ces informations sont prises dans les références 44 à 46



### a) Théorie de la RMN

La spectroscopie de la RMN, à la base, est une spectrométrie d'absorption qui ressemble à la spectrométrie infrarouge ou ultraviolet. Sous des conditions appropriées, un échantillon peut absorber des radiations radiofréquences à des fréquences déterminées par la nature de l'échantillon. Bien qu'en spectrométrie de RMN on utilise différentes techniques pour la détection, la théorie de base est commune pour toutes les expériences. La propriété fondamentale du noyau atomique implique le spin nucléaire ( $I$ ), qui prend les valeurs  $0, \frac{1}{2}, 1, 1\frac{1}{2}$ , etc. La valeur du spin nucléaire dépend du nombre de masse et du nombre atomique du noyau d'un atome quelconque, comme suit:

nombre de masse	nombre atomique	spin nucléaire ( $I$ )
impair	pair ou impair	$\frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots$
pair	pair	0
pair	impair	1, 2, 3, ...

Le moment magnétique nucléaire ( $\mu$ ) est directement proportionnel au spin suivant l'équation:

$$\mu = \frac{\gamma I h}{2\pi}$$

ou  $\gamma$ , est la constante de proportionnalité, appelé le ratio magnétogérique, caractéristique pour chaque noyau, et  $h$  est la constante de Planck. Dans un champs magnétique  $H_0$ , suivant la direction d'un axe  $z$ , l'énergie du moment magnétique nucléaire est donnée par  $E$ .

$$E = -\mu H_0 = -\frac{h \gamma H_0 I_z}{2\pi}$$

Le spin nucléaire  $I$  peut prendre  $(2I + 1)$  valeurs permises  $I_z$ , de  $I$  à  $-I$ , avec un intervalle de 1. Dans le cas de l'hydrogène et du  $^{13}\text{C}$  (1% d'abondance dans la nature)  $I = 1/2$ . Une radiation électromagnétique, d'une polarisation souhaitable et avec une fréquence  $\nu$  respectant l'équation de Bohr, peut provoquer des transitions entre les niveaux d'énergie du système.

$$h \nu = \Delta E$$

Ce processus est appelé résonance magnétique nucléaire. En combinant les deux dernières équations, on obtient la fréquence d'absorption de la résonance.

$$\nu = \frac{\gamma H_0 \Delta I_z}{2\pi}$$

Pour la détection de l'état de transition de n'importe quel noyau dont,  $|\Delta I_z| = 1$ , il faut que le champ magnétique appliqué et la fréquence respectent l'équation suivante:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \gamma H_0$$

### b) Déplacement chimique

Quand une molécule, qui contient le noyau sous observation, est placée dans un champ magnétique, d'après la dernière équation, tous les noyaux de même spin nucléaire devraient

présenter des résonances de même fréquences. En fait, ces valeurs dépendent de l'environnement électronique (ou environnement chimique) de chaque noyau. Les électrons dans la molécule forment un écran contre le champ magnétique extérieur.

Le déplacement chimique est défini par  $\delta$  (ppm: partie par million): il est seulement fonction du noyau et de son environnement. On mesure ce déplacement par rapport à un produit dont on connaît son déplacement chimique, qu'on appelle référence interne. Le solvant lui même peut être considéré comme référence interne. Le paramètre  $\delta$  est défini par:

$$\delta = \frac{(V_{\text{référence}} - V_{\text{échantillon}})}{(\text{fréquence du spectromètre en Hz})} \times 10^6$$

Si on utilise un champ magnétique de 60 MHz, par exemple dans la RMN du  $^1\text{H}$ , et si nous avons une différence de 60 Hz entre deux absorptions (deux pics), alors nous avons une différence de 1 ppm. Le déplacement chimique dépend seulement des conditions de l'échantillon, du solvant, de la concentration et la température, et non pas de la fréquence du spectromètre.

Le déplacement chimique du proton ( $^1\text{H}$ ) est un cas particulier, son noyau possède une seule couche électronique (orbitale s), c'est pour cette raison que son électron de valence ne possède pas de propriétés paramagnétiques. C'est la raison fondamentale pour laquelle l'échelle des déplacements chimiques ne dépassent pas 10 ppm, comparativement à d'autres noyaux qui possèdent la couche électronique p et dont l'échelle est de 200 ppm ou plus, comme dans le cas du  $^{13}\text{C}$ .

Dans une molécule, la densité électronique d'un proton est affectée par des mécanismes inductives et mésomériques. Les rotations des électrons, induit par le champ magnétique

extérieur ( $H_0$ ), des atomes et des groupements voisins vont provoquer une augmentation des moments magnétiques, *i.e.* des champs secondaires qui influencent le champ magnétique local du proton. De plus, des champs électriques et les effets de van der Waals peuvent être considérés. Par exemple, un hydrogène lié à un carbone, qui à son tour est lié à un atome ou un groupement électronégatif, va subir une diminution de la densité électronique autour de son noyau, cela va lui permettre de résonner à un champ magnétique bas, d'où une augmentation de la valeur du déplacement chimique ( $\delta$ ).

Dans un cycle aromatique, la contribution de la densité électronique est très importante. Si on considère le cycle du benzène, au moment où le plan de la molécule est perpendiculaire au champ magnétique appliqué, les électrons p sont libres et s'orientent dans le même sens. La circulation des électrons autour du cycle crée un courant circulaire qui à son tour va créer un champ magnétique isotropique (distribution sphériquement symétrique) opposé au champ appliqué <sup>44</sup>. Les hydrogènes du benzène qui se trouvent à l'extérieur vont être déblindés, ce qui se traduit par une résonance dans un champ magnétique plus bas. Le champ magnétique du benzène (isotopique) est plus ou moins perturbé par un substituant, selon la nature de ce substituant, et il devient anisotropique (distribution spatiale non symétrique). De cela il résulte un effet différent sur chaque proton du noyau, dépendamment de sa position sur le cycle par rapport à un ou des substituants.

### c) Couplage de deux spins

Dans une molécule donnée, n'importe quel hydrogène peut avoir un spin  $+\frac{1}{2}$  ou  $-\frac{1}{2}$ . Si on considère deux hydrogènes A et B sur deux carbones voisins, chacun influence l'environnement magnétique de l'autre. L'influence de l'un sur l'autre dépend de leurs spins<sup>45</sup>. Ils peuvent avoir tous les deux, en même temps, les mêmes spins ou des spins opposés. Le proton A

va être déblindé par le proton B, si le spin de ce dernier est aligné avec le champ magnétique appliqué ce qui va créer un champ supplémentaire. Par contre si le spin du proton B est inversement aligné au champ magnétique appliqué, on aura une diminution du champ magnétique. De cela va résulter un blindage au niveau du proton A. Dans chaque cas le proton A va avoir un déplacement chimique différent. Ce phénomène est appelé couplage entre deux protons. La différence entre les deux déplacements chimiques, du proton A, donne la valeur de la constante de couplage. Bien entendu le proton A va avoir le même effet sur le proton B. Pour que deux protons puissent se coupler, il faut qu'ils soient dans deux environnements magnétiques différents. Leurs déplacements chimiques vont être différents, mais les constantes de couplage entre eux vont être les mêmes.

Le couplage peut être affecté par l'électronégativité des substituants, leurs orientations relatives aux protons couplés, l'hybridation des atomes de carbone, les angles des liaisons et les longueurs des liaisons<sup>46</sup>.

## CHAPITRE II

### MÉTHODES EXPÉRIMENTALES APPLIQUÉES À L'ÉTUDE DES GLYCOSIDES DE *PICEA MARIANA*

Les glycosides de *Picea mariana*, ont été étudiés pour identifier les produits volatils, liés aux sucres, qui ne sont pas extraits par les méthodes ordinaires d'extractions des huiles essentielles. Les sous-chapitres suivants décrivent les procédures expérimentales qui ont été utilisées pour l'extraction, la séparation et l'identification soit des glycosides intacts ou des aglycones séparées des sucres.

La description des techniques et des principes des méthodes expérimentales qui sont utilisées dans ce projet de recherche est donnée au chapitre 1. Les méthodes d'extraction et d'analyse des glycosides ont été utilisées pour les aiguilles et les ramilles individuellement. Pour simplifier, nous allons faire référence uniquement aux aiguilles pendant toutes les procédures expérimentales; les ramilles ont subi les mêmes traitements. Les figures 11 et 12 résument schématiquement les étapes des procédures expérimentales.

#### 2.1 EXTRACTION DES GLYCOSIDES INTACTS

Le matériel végétale est séché à la température de la pièce pendant quarante huit heures. Une fois sèches, les aiguilles et les ramilles sont séparées. Les aiguilles sont broyées au malaxeur jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine. La poudre, récupérée et pesée (100 g),

Figure 11

**PLANT D'EXTRACTION, DE PURIFICATION ET  
D'ANALYSE DES GLYCOSIDES INTACTS**

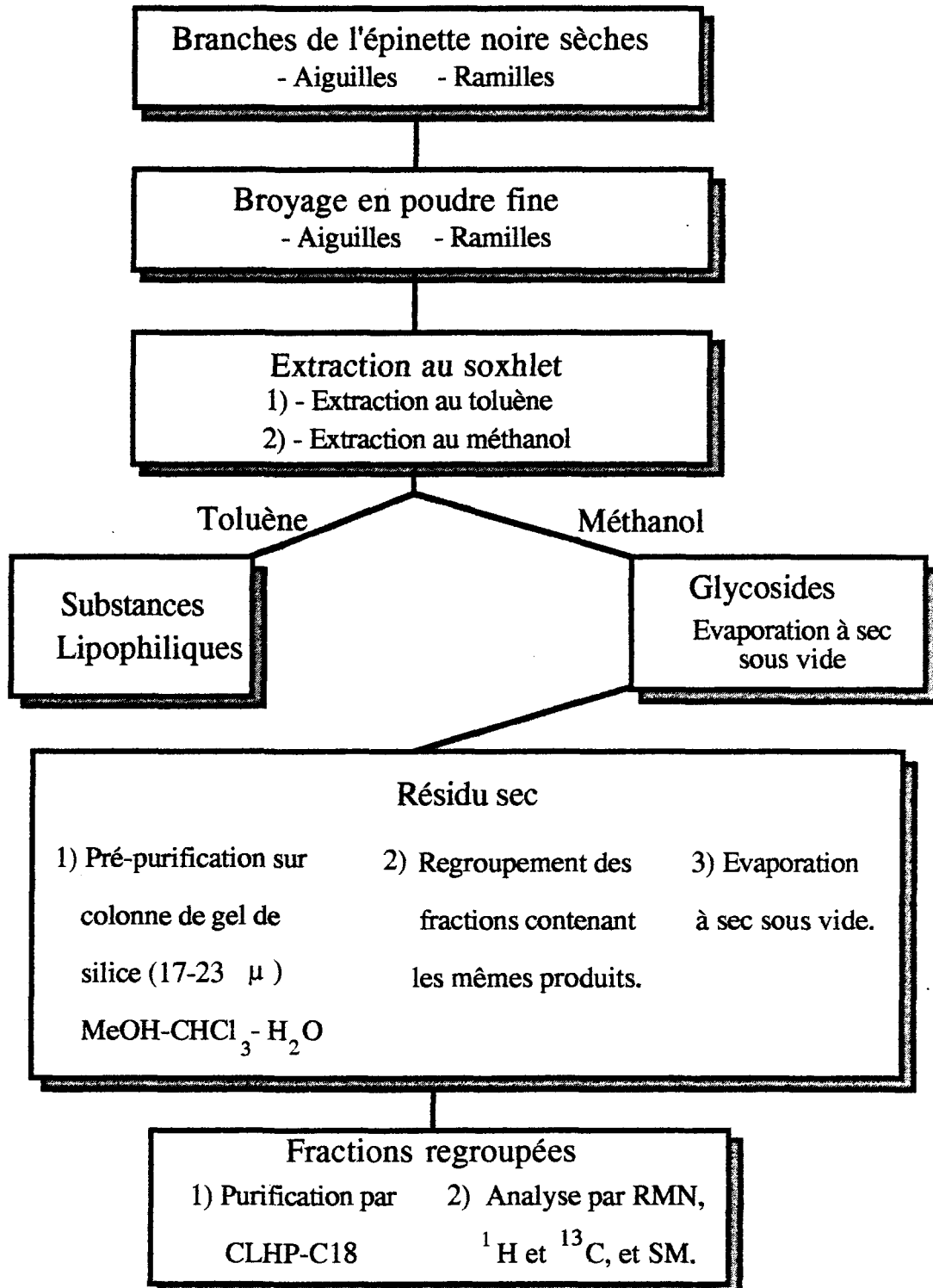
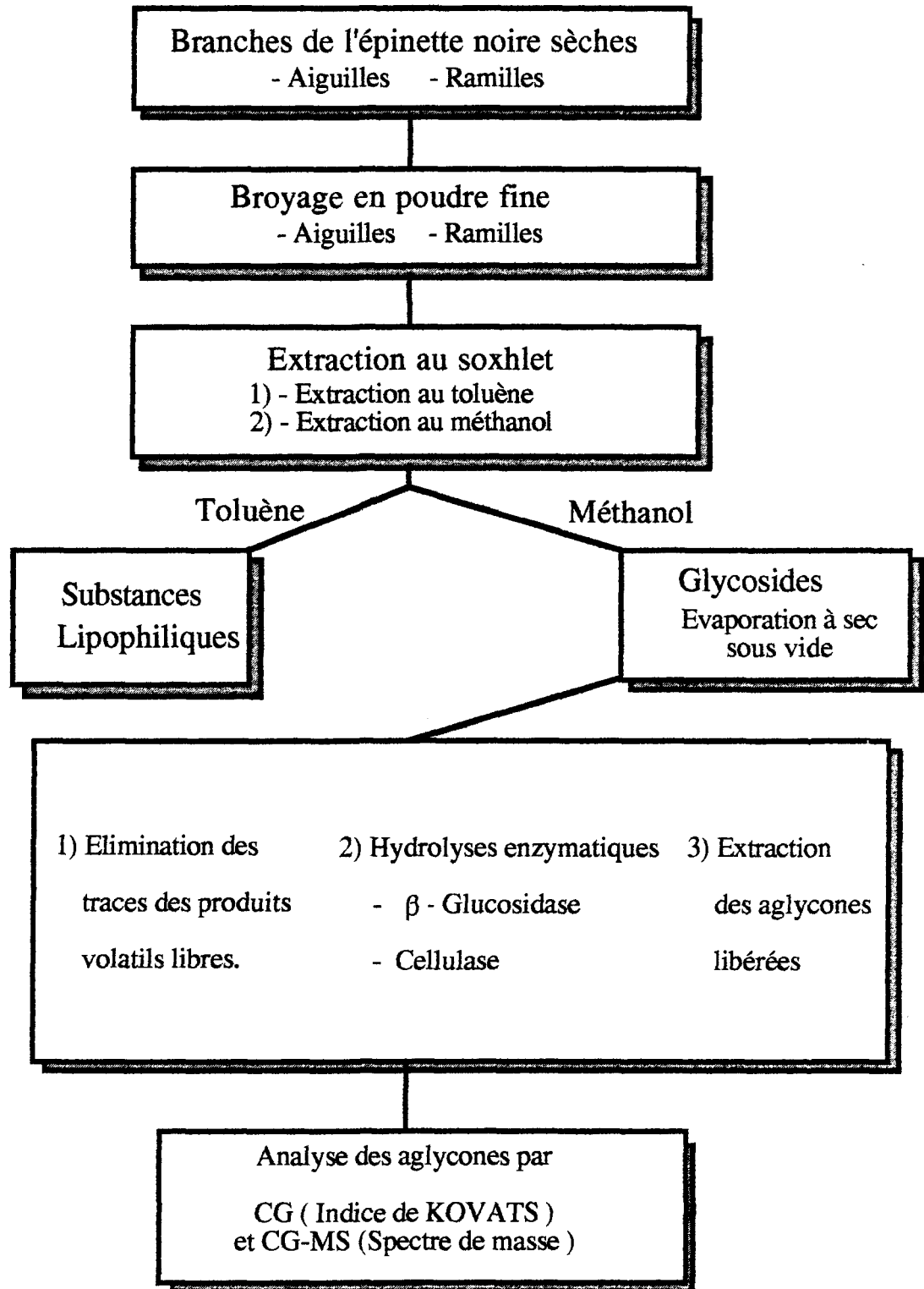


Figure 12

**PLAN D'EXTRACTION ET D'HYDROLYSE DES  
GLYCOSIDES INTACTS ET ANALYSE  
DES AGLYCONES LIBÉRÉES**





est extraite au toluène (500 mL), dans un Soxhlet pendant quarante huit heures. Après avoir retiré le filtre qui contient la poudre, le Soxhlet est lavé et séché. La poudre subit une deuxième extraction au Soxhlet, cette fois avec du méthanol (500 mL) pendant la même période de temps qu'avec le toluène.

Le méthanol récupéré est évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif à 40 °C jusqu'à l'obtention d'un résidu sirupeux. De l'acétone (10 mL ) est additionné et le mélange est évaporé à sec. Le résidu sous forme de mousse est pesé avant de continuer les procédures d'analyses.

## **2.2 ANALYSE DES GLYCOSIDES INTACTS**

Dans cette partie expérimentale les produits ne subissent aucune transformation chimique. La CCM est utilisée pour déterminer la phase mobile qui sera utilisée pour séparer les glycosides par la CLP, ainsi que pour regrouper les fractions qui contiennent les mêmes produits. La CLHP est utilisée pour la purification des produits obtenus par la CLP.

### **2.2.1 Analyses et séparation des glycosides par CL**

#### **2.2.1.1 Analyse par CCM**

Pour les analyses qualitatives par la CCM, une petite quantité (environ 1 g) du résidu est utilisée. Les quatre étapes d'analyse par la CCM, décrites dans le chapitre 1, sont utilisées.

Pour le choix de la phase mobile, ou le système de solvant, plusieurs mélanges de différentes proportions de méthanol, dichlorométhane et d'eau sont testés. Dans chaque cas le

résidu doit être soluble au moins en parties. Le matériel non soluble est éliminé par filtration.

Le résidu est solubilisé dans le système de solvant. Après l'élimination du matériel non soluble, le filtrat est évaporé à sec sous vide dans un évaporateur rotatif à 40 °C. Le mélange sec obtenu est dissout dans un minimum de méthanol. Sur une plaque de Gel de Silice (60 F-254 de BDH : 5x10 cm), un très petit volume ( 3 à 5 mL ) est appliqué à l'aide d'une micropipette. Le produit est appliqué sur une ligne tracée à 1,5 cm du bas de la plaque. Une fois les taches sèches, la plaque est introduite dans la chambre de développement préalablement saturée avec le système de solvant. Il faut se rappeler que le niveau de la phase mobile dans la chambre chromatographique n'atteint pas la ligne de l'application des produits.

Quand le front de la phase mobile atteint le niveau désiré ( 7 cm à partir de la ligne d'application de produit sur une plaque de 10 cm) la plaque est retirée de la chambre chromatographique. Dans un four chauffé à 80 °C, la plaque est séchée pendant environ une minute. Comme révélateur une solution de 1% d'acide cérrique est vaporisée, à l'aide d'un atomiseur, sur la plaque pendant qu'elle est chaude pour ne pas avoir besoin de la chauffer une deuxième fois. Les produits apparaissent sous formes de taches de différentes couleurs et distances de migration ( $R_f$ ).

Nous avons comparé les plaques chromatographiques développées en utilisant plusieurs systèmes de solvants. Nous avons retenu le système de solvant ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  / 60 : 20 : 2) qui a donné la meilleure séparation des produits avec des valeurs des  $R_f$  entre 0,2 et 0,5 pour les produits majeurs (taches plus foncées).

### 2.2.1.2 Séparation sur colonne préparative: CLP

Une colonne de verre ( d.i. = 5 cm et L = 75 cm ) est remplie à sec, avec une phase stationnaire du gel de silice 24-37 mm, suivant la méthode décrite dans le chapitre I. La colonne est éluée avec de l'eau déminéralisée à l'aide d'une pompe (Altex), pour éliminer l'air dans la colonne. Environ 500 mL d'eau ont été nécessaire avec un débit de 2 mL/min. Il est très important de placer la colonne à l'envers de manière à ce que l'eau circule par le bas vers le haut. Une fois l'air éliminé, la colonne est éluée avec du méthanol ( 50 mL ), suivi du système de solvant ( environ 300 mL ).

Une quantité de l'extrait des aiguilles ( 2 g ) est dissoute dans 20 mL de la phase mobile ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  / 60 : 20 : 2) à laquelle sont additionnés 10 g de la phase stationnaire. Après une agitation vigoureuse la suspension est introduite dans une burette de 10 mL dont le bout inférieur est rempli de fibres de verre. La solution est récupérée, et la phase stationnaire est lavée avec 10 mL de la phase mobile. Les deux solutions sont regroupées et évaporées à sec à 40 °C. Le matériel sec est de nouveau dissout dans un minimum de volume de la phase mobile. La solution est injectée dans la colonne à l'aide d'une seringue. Le débit est de 2 mL/min. Des fractions de 10 mL sont récoltées par un collecteur automatique de fractions (ISCO : Modèle 568).

Quand l'éluion est terminée, après 1200 mL d'éluant, les fractions sont analysées par la CCM avec le même système de solvant et de la même façon que dans le paragraphe précédent. Les fractions qui contiennent des produits avec le même  $R_f$  sont regroupées et évaporées à sec.

### 2.2.1.3 Chromatographie CLHP

Cette étape consiste à purifier les produits obtenus par la chromatographie sur colonne préparative. Les fractions qui ont été regroupées, ( paragraphe précédent), sont analysées individuellement. Une première analyse est réalisée par la CCM à phase inversée (100 % C<sub>18</sub>-Gel de silice sililé, diamètre moyen de pore de 60 Å, Sigma Chemical company ) en utilisant comme éluant le MeOH : H<sub>2</sub>O/ 60 : 40. Pour la séparation des produits sur la colonne plusieurs phases mobiles sont utilisées. Des mélanges du méthanol et de l'eau à des proportions variant de 60 : 40 à 80 : 20 / H<sub>2</sub>O : MeOH, en augmentant de 5 le premier et diminuant le deuxième de la même proportion. Les débits utilisés est de 1,5 mL/min.

Une petite quantité (0,1 mg) de la fraction à séparer est dissoute dans 1 mL du système de solvant. Le mélange est filtré sur un Sep-Pak (Supelclean LC-18) et suivi de 1mL du même solvant. Séchés et pesés les produits sont à nouveau complètement dissous dans un minimum de solvant. Le volume injecté est calculé pour avoir 10 mg de produit dans chaque injection.

Une colonne CLHP semi préparative à phase inversée ( C<sub>18</sub> - Spherisorbe 5 ODS 2 : d.i. = 1 cm et l = 25 cm, de la compagnie Phenomenex ) est utilisée pour la purification des produits des fractions regroupées. Pour l'élution une pompe (LKB 2150 HPLC PUMP) et pour détecter les produits un détecteur à UV (LKB 2238 UVICORD S II) sont utilisés. Les conditions de détection sont : la longueur d'onde 254 µm, Time const : 0,5 et l'ABS : range 2.

Les produits sont récupérés individuellement lorsqu'ils sont parfaitement séparés des autres produits. Dans le cas des pics larges de chromatogramme, la récupération des produits se fait en trois parties, le début du pic, le centre et la fin. Les produits ainsi récupérés sont injectés de nouveau.

### **2.2.2 Analyse des glycosides par RMN ( $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ ) et SM**

Trois produits purs et un autre mélangé avec un de ces trois produits sont obtenus par les procédures expérimentales décrites précédemment et analysés au Laboratoire d'Agriculture Canada à Ottawa à l'aide d'un spectromètre RMN de  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de 250 MHz, ainsi qu'un SM. Le solvant utilisé pour les quatre produits est le méthanol.

## **2.3 ANALYSE DES AGLYCONES DES GLYCOSIDES**

Cette partie décrit les procédures expérimentales utilisées pour l'extraction et l'analyse des aglycones des glycosides extraits plus haut. Pour analyser les aglycones sans les sucres nous avons eu recours à des hydrolyses enzymatiques pour des analyses qualitatives et des hydrolyses acides pour des analyses quantitatives. Seulement les aglycones solubles dans le pentane ou l'hexane sont extraites et analysées par la CG et la CG-SM.

### **2.3.1 Hydrolyse enzymatique des glycosides**

L'hydrolyse enzymatique du résidu est réalisé avec deux enzymes, le  $\beta$ -Glucosidase et la Cellulase. Une quantité de 4 g du résidu est dissoute dans 100 mL d'eau déminéralisée. La solution aqueuse est extraite, dans une ampoule à décanter, avec du pentane et pentane et l'éther (1:1). Après les cinq premières extractions de 30 mL chacune, le pentane (de la sixième extraction) est récupéré et séché avec du  $\text{MgSO}_4$ . Le volume est concentré à 0,5 mL avec un évaporateur rotatif dans un bain de glace. Une fois l'analyse par CG confirme l'absence des produits volatils dans l'extrait de pentane, la solution aqueuse est évaporée à sec. Le produit sec récupéré est dissout dans une solution aqueuse (100 mL) de 0,1 N d'acétate de sodium à pH 5 d'acide acétique. Chaque enzyme, 25 mg de  $\beta$ -Glucosidase (4,8 unité/mg, une unité hydrolyse

un mg d'un glucoside) et de 0,4 g de cellulase (0,6 u/mg), est utilisée pour hydrolyser 4 g de résidu. L'enzyme est additionnée à la phase aqueuse et la solution est incubée à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, chaque solution est extraite par 3x50 mL de pentane. Les phases de pentane sont regroupées (pour chaque solution aqueuse) et le volume est réduit à 1mL.

### **2.3.2 Hydrolyse acide des glycosides**

Pour des analyses quantitatives nous avons utilisé les aiguilles séchées ( 50 g ). Après broyage en poudre très fine dans un malaxeur, le matériel végétal est introduit dans un ballon de 1 l qui contient 500 mL d'eau déminéralisée et 2 g de bicarbonate de calcium. Dans un extracteur du type Likens-Nickerson la solution est portée à reflux pendant 20 heures. Les produits volatiles entraînés par la vapeur d'eau sont récupérés dans 50 mL d'hexane. La solution de l'hexane séchée ( avec  $MgSO_4$  ) et additionnée d'un standard interne ( tétradecane ) est analysée par la CG. Une deuxième extraction de la solution aqueuse est réalisée de la même manière que la première pendant 6 heures.

La solution aqueuse est acidifiée ( 2 M : HCl ) et est extraite une troisième fois dans l'extracteur de type Likens-Nickerson. Les aglycones libérées sont extraites dans 50 mL d'hexane. La phase de l'hexane est séchée avec du  $MgSO_4$  et additionnée d'une même quantité du standard interne que celle de l'extrait des produits volatils des aiguilles avant l'hydrolyse.

### **2.3.3 Analyse des aglycones par CG et CG-SM**

L'extrait de chaque hydrolyse, soit acide ou enzymatique, est analysé par la chromatographie en phase gazeuse. Toutes les analyses sont effectuées sur deux colonnes capillaires, une a-polaire (DB-5, 30 m x 0,25 mm) et l'autre polaire (Supelcowax 10, 30 m x

0,25 mm). Les temps de rétentions des produits séparés, sur les deux colonnes, sont transformés en indice de KOVATS (I.K.) pour identifier les produits en utilisant une banque de produits volatils, environ quatre cent cinquante, avec leurs I.K. sur les deux colonnes. Cette banque a été établie par le groupe de recherche du laboratoire d'analyses des essences végétales "LASÈVE" à l'UQAC. L'identification des produits est complétée par des analyses réalisées sur deux CG-SM, VG 1250 MS à l'UQAC et Finnigan-Mat 4500 du Laboratoire d'Agriculture Canada à Ottawa. Les spectres de masse des produits sont comparés avec d'autres spectres retrouvés dans la littérature (40-42). Les conditions d'analyse sur le CG apparaissent au tableau 4.

<b>TABLEAU 4</b>		
<b>CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES</b>		
Chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire		
	Analyse non-polaire	Analyse polaire
<b>Chromatographes</b>	Hewlett-Packard (5890 A)	Hewlett-Packard (5890 A)
<b>Injecteurs</b>	" Split-splitless "	" On column "
Température	200 °C	40 °C
<b>Colonnes</b>		
Type	DB-5 (non-polaire)	Supelcowax™ 10 (polaire)
Longueur	30 mètres	30 mètres
Diamètre	0,25 mm	0,25 mm
Film	0,25 µm	0,25 µm
	Polyméthyl (5%Phényl) Siloxane	Polyéthylène glycol
<b>Détecteur</b>	À ionisation de flammes	À ionisation de flammes
Température	250 °C	250 °C
Gaz : Azote	35 psi	35 psi
Air zéro	40 psi	40 psi
Hydrogène	15 psi	20 psi
<b>Gaz porteur</b>	Hélium	Hélium
	45 psi	45 psi
<b>Programmation de la température du four</b>		
T. initiale	40 °C pendant 2 min. 2 °C / min.	40°C pendant 2 min. 2°C / min.
T. finale	210 °C pendant 33 min.	210 °C pendant 33 min.
<b>Intégrateur</b>	HP 3390 A	HP 3390 A
<b>Programmation</b>	Début : 0,00 min Intégration : 6,00 à 120,00 min	Début : 0,00 min Intégration : 6,00 à 120,00 min

Tableau tiré de la référence 47.



## SECTION III

### Résultats

Dans cette section les résultats sont présentés en deux chapitres. Le chapitre 1 est consacré aux résultats obtenus par la chromatographie liquide, la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse des glycosides intacts. Le chapitre 2 est consacré aux résultats des analyses par la CG et CG-SM des aglycones, obtenus par hydrolyse des glycosides.

## **CHAPITRE 1**

### **EXTRACTION, PURIFICATION ET ANALYSES DES GLYCOSIDES INTACTS**

Les résultats obtenus sont présentés dans le même ordre que les procédures expérimentales ( section II-Chap.2 ). Il faut se rappeler que les analyses qui ont été réalisées ne sont pas des analyses quantitatives mais plutôt qualitatives, c'est-à-dire il s'agit de la détermination de structure de certains glycosides intacts qui ont été purifiés par la chromatographie liquide ( CLP et CLHP ).

#### **1.1 EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOSIDES INTACTS**

Les extraits des aiguilles et des ramilles ont subi les mêmes procédures expérimentales. Il faut se rappeler que dans cette partie les glycosides n'ont subi aucune transformation chimique. Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées dans des conditions qui permettent de conserver les produits dans leur état original.

##### **1.1.1 Extraction et pré-purification des glycosides**

Les extractions par le soxhlet de 100 g de matériel végétal sec, décrites dans le chapitre 2 de la section II, ont donné 35,05 et 13,4 g de résidus secs pour les aiguilles et les ramilles respectivement. Les aiguilles contiennent une plus grande quantité de produits que les ramilles.

Comme il est décrit à la partie expérimentale, une petite quantité du produit est analysée sur couches minces pour déterminer le système des solvants qui peut nous donner une meilleure séparation sur une colonne préparative de gel de silice. Une quantité de 2 g de résidu est injectée sur la colonne préparative de gel de silice dans un volume de 5 mL du système de solvants  $\text{CHCl}_3$  : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  / 60:20:2 avec un débit de 2 mL / min. Les fractions de 10 mL collectées sont analysées sur couches minces pour regrouper celles qui contiennent les mêmes produits. Les résultats de la CCM des fractions obtenues par la chromatographie sur colonne sont présentés à la figure 13.

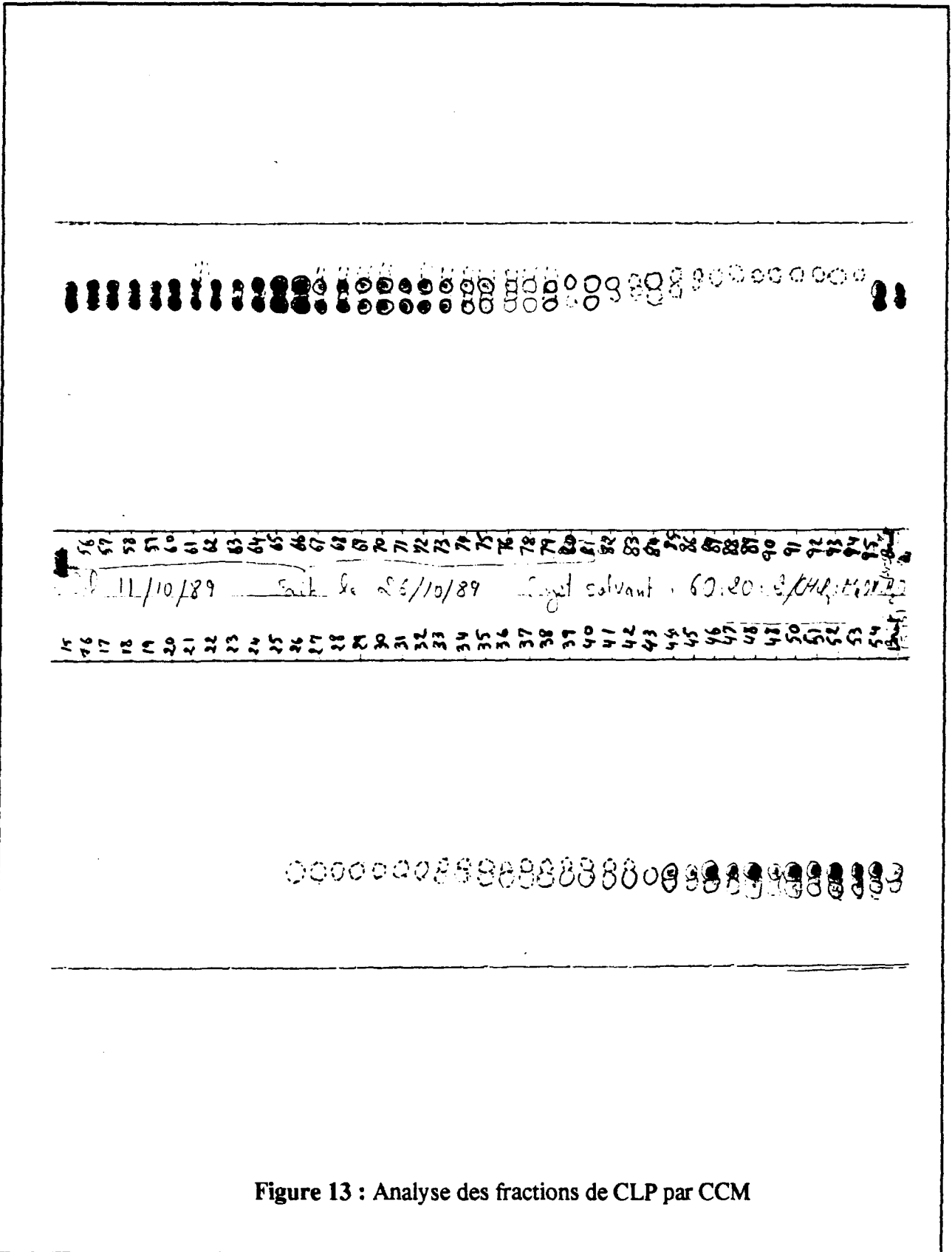
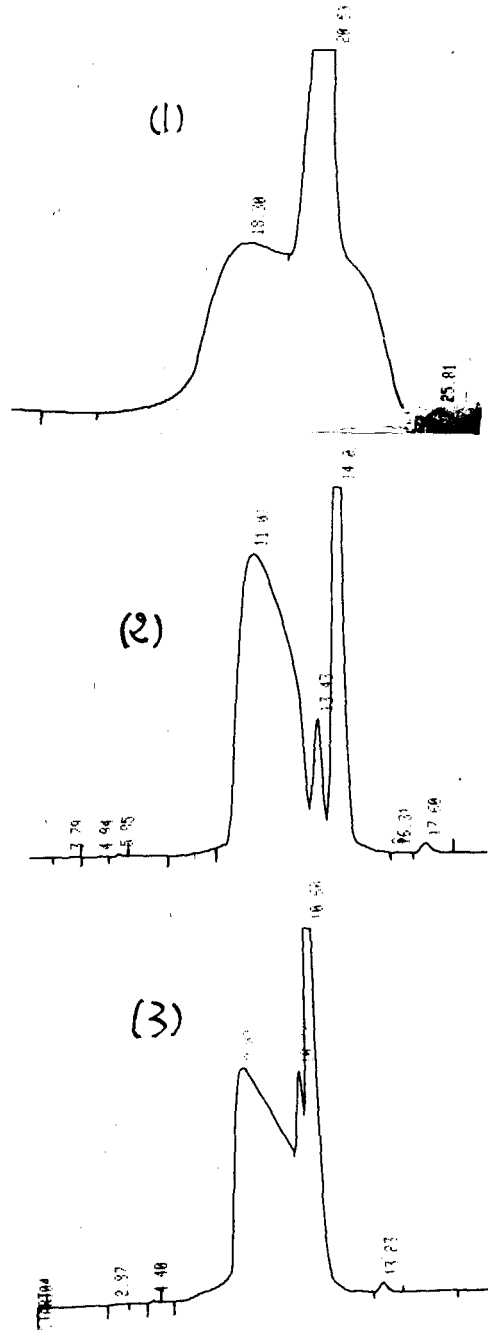


Figure 13 : Analyse des fractions de CLP par CCM

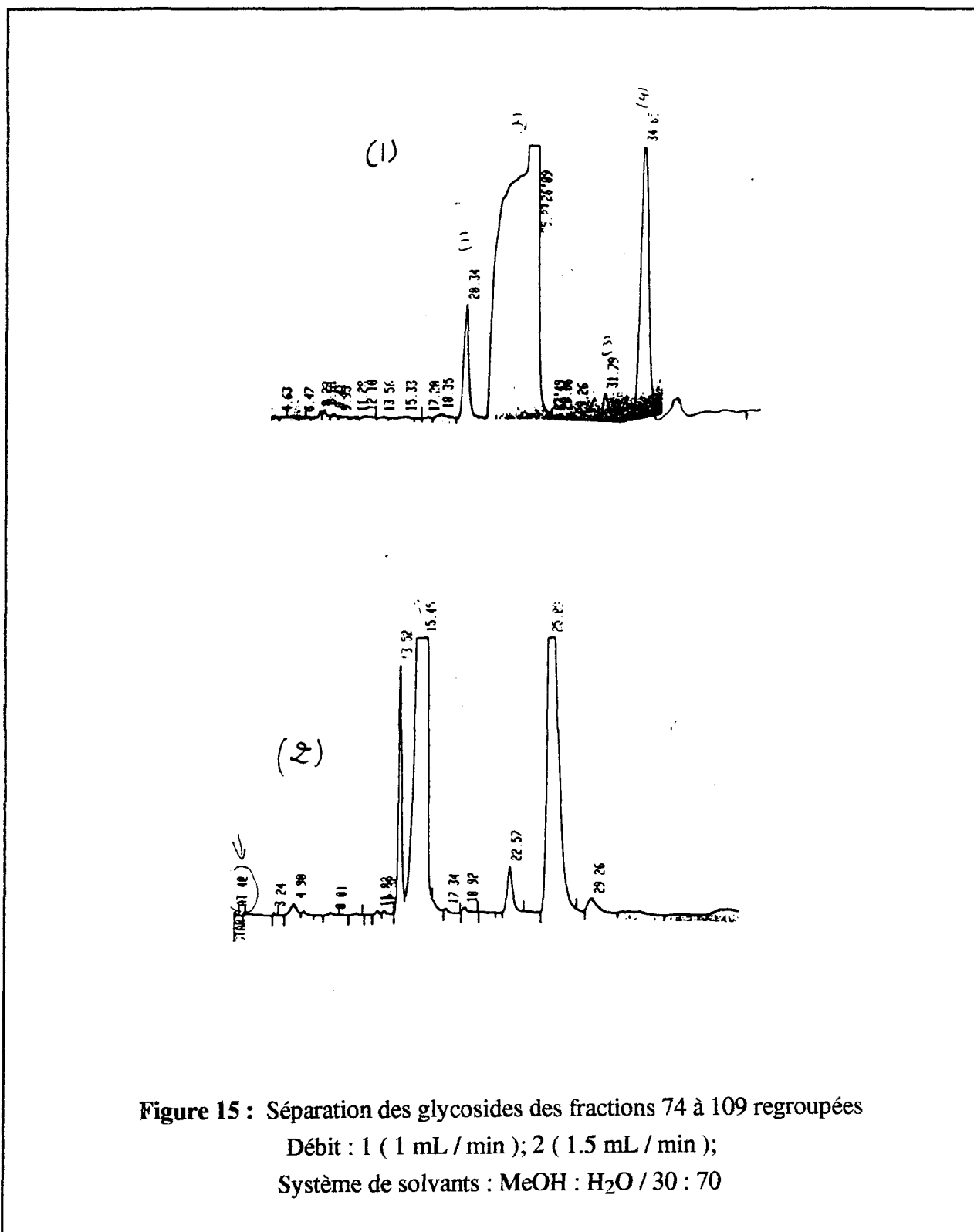
### 1.1.2 Purification des glycosides par CLHP

Les fractions de la colonne préparative qui contiennent les mêmes produits sont regroupées. Pour déterminer le système de solvants dans le but de purifier les glycosides, nous avons fait appel à la chromatographie sur couches minces à phase inversée. Le système de solvants qui a donné une meilleure séparation des produits des fractions 32 à 42 regroupées, se compose de MeOH : H<sub>2</sub>O / 30 : 70. Cependant, pour une séparation sur la colonne semi préparative CLHP- C<sub>18</sub> le système de solvants n'est qu'un seul paramètre parmi d'autres pour optimiser une séparation ( voir discussion). Une fois le système de solvants est déterminé on doit chercher le débit idéal pour avoir une meilleure séparation. Un débit de 1,5 mL a donné la meilleure séparation lors d'une étude d'optimisation de la séparation des fractions 32 à 42 regroupées (Fig. 15 ).

Les glycosides que nous avons purifiés afin de les analyser ont été obtenus des fractions 74 à 109 regroupées. La figure 15 montre l'influence' du débit sur la séparation de ces fractions. Un débit de 1 mL / min a été utilisé pour collecter les produits. Nous avons collecté quatre fractions: le glycoside #1 ( R<sub>t</sub> = 20,34 min ), le glycoside #2 et 3 ( R<sub>t</sub> = 26min ) et le glycoside #4 ( R<sub>t</sub> = 34,65 min ) (voir figure 15 ).



**Figure 14 : Optimisation de la séparation des fractions 32 à 42 regroupées**  
Débit : 1 ( 1 mL / min ) ; 2 ( 1.5 mL / min ) ; 3 ( 2 mL / min )  
Système de solvants : MeOH : H<sub>2</sub>O / 30 : 70



**Figure 15 :** Séparation des glycosides des fractions 74 à 109 regroupées  
 Débit : 1 ( 1 mL / min ); 2 ( 1.5 mL / min );  
 Système de solvants : MeOH : H<sub>2</sub>O / 30 : 70

## 1.2 ANALYSES DES GLYCOSIDES PAR LA RMN DU $^1\text{H}$ ET $^{13}\text{C}$ ET SM

Les quatre échantillons dont trois sont des glycosides purs et l'autre un mélange d'un des trois et un autre glycoside, sont analysés dans les mêmes conditions de solvant, le méthanol.

Les résultats présentés dans le tableau 5, 6, 7 et 8 représentent les déplacements chimiques des glycosides. Pour chaque déplacement chimique il y a une ou des structures chimiques qui contiennent le carbone ou le proton qui peut lui correspondre. On peut trouver dans chaque tableau, les déplacements chimiques du  $^{13}\text{C}$  à gauche et ceux du  $^1\text{H}$  à droite. Dans les deux cas on trouve les mêmes structures partielles caractéristiques de ces déplacements chimiques. Les déplacements chimiques ainsi que les constantes de couplage sont soit indiqués sur les spectres (voir annexe 1) ou ont été obtenus des tableaux de valeurs enregistrées par l'appareil. Nous avons aussi analysé trois glycosides par spectrométrie de masse à ionisation chimique pour déterminer leurs masses molaires.

### - Glycoside #1

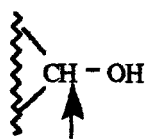
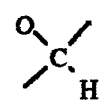
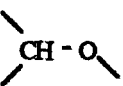
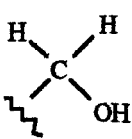
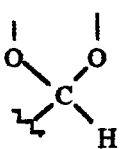
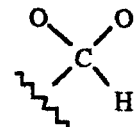
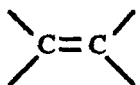
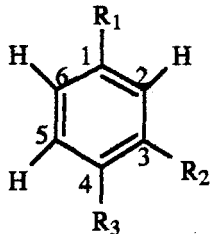
Dans le tableau 5 les déplacements chimiques du  $^{13}\text{C}$  ( 62,46 à 10,22 ppm ) sont caractéristiques d'un hexose, sucre monomérique de six carbones. Les déplacements chimiques du  $^1\text{H}$  ( 3,40 à 4,87 ppm) confirment aussi la présence du hexose. La constante de couplage  $\Delta J$  ( 7,4 Hz ) à 4,8 ppm est caractéristique d'un sucre où l'hydrogène sur le carbone de l'acétal est en position  $\beta$ , il s'agit du glucose (voir discussion). Le méthyle à 26,36 ppm est lié à une cétone où le carbone à un déplacement chimique à 199,35 ppm. Les protons du méthyle ont un déplacement chimique sous forme de singulet à 2,55 ppm (voir annexe 1; pages 137 et 138).



Les déplacements chimiques du  $^{13}\text{C}$  qui se situent entre 117,08 et 154,35 ppm sont caractéristiques de carbones aromatiques. Dans la partie de déplacements chimiques du proton on trouve la même information à propos des protons aromatiques. Les constantes de couplage donnent plus de précisions sur la nature de ces protons. Comme on peut voir nous avons deux doublets et un doublet dédoublé. Les valeurs de ces constantes confirment la présence d'un noyau benzénique tri-substitué, où deux substituants sont en ortho et l'autre est en méta avec un des deux. Les deux substituants qui sont en ortho ne peuvent être déterminés en s'appuyant seulement sur ces résultats. Nous allons discuter avec plus de précision les différentes possibilités qui permettront de trouver la structure complète du glycoside.

Tableau 5

## Déplacements chimiques de RMN du Glucoside#1

RMN du $^{13}\text{C}$		RMN du $^1\text{H}$		
$\delta_{\text{exp}}$ (ppm)	Nature des groupements	$\delta_{\text{exp}}$ (ppm), $\Delta J$ (Hz)	Nature des group.	
26,36	$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} -$	2,55	3H (s)	$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} -$
48,49 à 49,51	Solvant : 7 pics du MeOH	3,32 à 3,34	5H (m)	MeOH
62,46	$-\text{CH}_2-\text{O}-$	3,40	3H (m)	
71,38		3,57		
74,90	 Aromatique	3,74	1 H (d,d)	
77,67		à	$\Delta J = 5,6$	
78,50		à	$\Delta J = 12,2$	
104,22	 Acétal	3,93	1 H (d,d)	
117,08	 Aromatique	3,95	$\Delta J = 2,2$	
119,16		à	$\Delta J = 12,1$	
126,51		à	$\Delta J = 7,4$	
130,56	Ar-Y (Y = Subst. polaire)	4,86	1 H (d)	
146,63		à	$\Delta J = 8,4$	
154,35		à	$\Delta J = 2$	
199,35	$\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} -$ Cétone $\alpha, \beta$ insat.	7,66	1 H (d)	$\Delta J_{5,6} = 6-10$ $\Delta J_{2,6} = 1-3$ $\Delta J_{2,5} = 0-1$
		7,68	$\Delta J = 8,4$	
		7,87	1 H (d) $\Delta J = 2,2$	

### - Glycosides #2 et #3

Dans le tableau 6, les déplacements chimiques du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  représentent le glycoside #2 pur et le tableau 7 les deux glycosides #2 et 3 qui sont en mélange. Les valeurs qui sont soulignées dans le tableau 7 représentent le glycoside #2 pur ( voir annexe 1; Glyc.#2, pages 141 et 142 ) et en mélange avec le glycoside #3 (voir annexe 1: Glyc.#2 et #3, pages 143 et 144).

Dans la colonne du  $^{13}\text{C}$  ( tableau 7 ; colonne à gauche ) le déplacement chimique à 26,44 ppm est un méthyle lié à une cétone. On trouve dans la colonne de droite deux  $\delta$  à 2,55 et 2,58 qui sont caractéristiques de méthyles liés à une cétone. Nous avons onze carbones dans la région des déplacements chimiques du sucre. Ces carbones représentent les deux sucres des deux glycosides où deux carbones ont le même déplacement chimique à 71,34 ppm. Le spectre du  $^1\text{H}$  montre aussi des dédoublements dans la région entre 3,42 et 5,05 ppm. Les plus importants sont les deux doublets à 4,94 et 5,05 ppm qui confirment la présence de deux sucres avec des constantes de couplage  $\Delta J$  de 7,5 et 7,4 Hz (respectivement) et qui sont caractéristiques des deux hydrogènes des deux glucoses en orientation  $\beta$ . Dans le spectre du glycoside #2 pur, la constante de couplage à 5,05 ppm est de 7,66 Hz.

Dans la zone des carbones aromatiques on trouve neuf carbones où les deux soulignés appartiennent au glycoside #2. Pour les sept autres il y a ceux qui appartiennent au glycoside #2 et les autres au glycoside #3. Les déplacements chimiques de la colonne du  $^1\text{H}$  confirment la présence de noyaux aromatiques. On peut distinguer deux doublets dédoublés à 7,19 et 7,99 ppm avec les mêmes constantes de couplage de 2 et 8,9 Hz qui sont caractéristiques d'un noyau benzénique di-substitué en positions para qui représentent le glycoside #2. Les autres déplacements 7,26, 7,48 et 7,52 ppm sous forme de deux doublets et un doublet dédoublé avec

des constantes de couplage de 8,4, 2,1, et 8,5 et 2,2 Hz respectivement, sont caractéristiques d'un noyau benzénique tri-substitué aux positions 1, 2 et 4 du glycoside #3.

Tableau 6

## Déplacements chimiques de RMN du Glucoside #2

RMN du $^{13}\text{C}$		RMN du $^1\text{H}$	
$\delta_{\text{exp}}$ (ppm)	Nature des groupements	$\delta_{\text{exp}}$ (ppm), $\Delta J$ (Hz)	Nature des group.
26,40	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	2,58	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$
47,97 à 50,00	Solvant : 7 pics du MeOH	3,32 à 3,34	MeOH
62,44	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{O}-$	3,42 à 3,56	Mêmes déplacements chimiques que le Gly.#1
71,26	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$	3,71 à 3,95	
75,00 78,00 78,30	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array}$		
101,60	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \end{array}$ Acétal	5,05	1H(d) $\Delta J = 7,66$ $\Delta J_{5,6} = 6-10$ $\Delta J_{2,6} = 1-3$ $\Delta J_{2,5} = 0-1$
117,23 131,63	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagdown \end{array}$ Aromatique ou oléfine conj.	7,19 7,99	2H(d,d) $\Delta J = 8,9, 2$ 2H(d,d) $\Delta J = 8,8, 2$

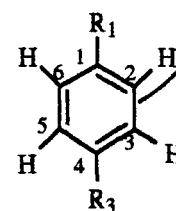


Tableau 7

## Déplacements chimiques de RMN des Glucosides #2 et #3

RMN du $^{13}\text{C}$		RMN du $^1\text{H}$	
$\delta_{\text{exp}}$ (ppm)	Nature des groupements	$\delta_{\text{exp}}$ (ppm), $\Delta J$ (Hz)	Nature des group.
26,44	$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} -$	2,55	$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} -$
48,49 } à 49,51 }	Solvant : 7 pics du MeOH	2,58	
62,46 } 62,50 }		$\text{R} - \text{CH}_2 - \text{O} -$	3,32 } à 3,34 }
71,34	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} - \\   \\ \text{H} \end{array}$		3,42 } à 3,56 }
74,78 } 74,83 }	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH} - \text{O} \\ \diagdown \end{array}$	3,71 } à 3,95 }	2H(m)
77,58 } 77,98 } 78,36 } 78,47 }		Acétal	
101,65 } 103,10 }	$\begin{array}{c}   \quad   \\ \text{O} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \end{array}$		5,05
116,80 } 117,03 } 117,30 } 122,51 }	Aromatique ou oléfine conj.	7,19	2H(d,d) $\Delta J = 8,9, 2$
131,63 } 133,00 } 134,00 }		$\text{C} = \text{C}$	7,99
149,00 } 151,50 } 163,10 }	Ar-Y (Y = Subst. polaire) ou oléfine conj.	7,26	1H(d) $\Delta J = 8,4$
199,40		$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} -$	7,48
	Cétone $\alpha, \beta$ insat.	7,52	(d,d) $\Delta J = 8,5, 2,2$

Mêmes déplacements chimiques que le Gly.#1

$\Delta J_{5,6} = 6-10$   
 $\Delta J_{2,6} = 1-3$   
 $\Delta J_{2,5} = 0-1$


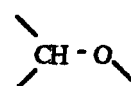
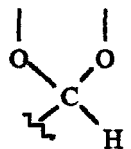
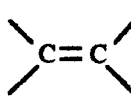
$R_2 = \text{H}$

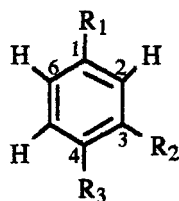
#### - Glycoside #4

Le tableau 8 présente les déplacements chimiques du glycoside #4 (voir annexe 1; pages 149 et 150). On trouve les mêmes déplacements qui représentent le sucre dans les deux colonnes. Cependant il y a des groupements qui ne sont pas présents dans les trois autres glycosides. Nous avons un méthoxyle dont les valeurs caractéristiques sont 56,35 et 3,88 ppm pour le  $^{13}\text{C}$  et le  $^1\text{H}$  respectivement. Nous avons aussi huit signaux caractéristiques de carbones aromatiques et de liaisons doubles conjuguées. Le déplacement chimique du  $^{13}\text{C}$  à 71,01 ppm représente un méthylène lié à un groupement polaire. Les deux protons sont dans deux environnements magnétiques différents. Ils absorbent à 4,33 et 4,51 ppm chacun sous forme d'un doublet deux fois dédoublés. Les deux protons à 6,22 et 6,61 ppm avec leurs constantes de couplages représentent deux hydrogènes en trans dont l'un d'eux est couplé avec les deux hydrogènes du méthylène. Un noyau benzénique tri-substitué est confirmé par la présence des trois protons 6,75, 6,88 et 7,04 ppm avec leurs constantes de couplages qui caractérisent les positions 2, 5 et 6. Sur les spectres du  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  on peut voir les déplacements chimiques d'un sucre. L'absorption à 4,38 ppm avec une constante de couplage de 7,66 Hz correspond à l'hydrogène du glucose en position  $\beta$ .

Tableau 8

## Déplacements chimiques de RMN du Glucoside #4

RMN du $^{13}\text{C}$		RMN du $^1\text{H}$	
$\delta_{\text{exp}}$ (ppm)	Nature des groupements	$\delta_{\text{exp}}$ (ppm), $\Delta J$ (Hz)	Nature des group.
47,98 } à 49,68 }	Solvant : 7 pics du MeOH	3,24 } à 3,93 }	MeOH et (CH <sub>3</sub> -O) ?
56,35	CH <sub>3</sub> -O-	3,88	(S) CH <sub>3</sub> -O-R
62,82	R-CH <sub>2</sub> -O-	4,33	(ddd) } $\Delta J = 6,86, 1,26$
71,01 } 71,72 }	 ou -CH <sub>2</sub> -O-	4,51	(ddd) } $\Delta J = 5,88$
75,15 } 78,00 } 78,15 }		4,38	(d) $\Delta J = 7,66$
103,16	 Acétal	6,22 <sup>b</sup> } 6,61 <sup>c</sup> }	(ddd) $\Delta J = 16, 6,77, 5,88$ -CH <sup>c</sup> =CH <sup>b</sup> -CH <sub>2</sub> -O-? ( les deux H sont en cis)
110,58 } 116,19 } 121,16 } 123,72 } 130,37 }	 Aromatique ou oléfine conj.	6,75 } 6,88 }	(d) $\Delta J = 8,13$ (d,d) $\Delta J = 1,96$ et 8,16
134,30 } 147,72 } 148,00 }	Ar-Y (Y = Subst. polaire) ou oléfine conj.	7,04	(d) $\Delta J = 1,93$



$\Delta J_{5,6} = 6-10$   
 $\Delta J_{2,5} = 1-3$   
 $\Delta J_{2,6} = 0-1$



## **CHAPITRE 2**

### **EXTRACTIONS ET ANALYSES DES AGLYCONES LIBÉRÉES PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE**

Les résultats des analyses des produits volatils libérés par hydrolyses enzymatiques des aiguilles et des ramilles ne permettent pas une quantification globale ni individuelle de ces produits dans le matériel végétal. Par contre les analyses des produits volatils obtenus par hydrolyse acide permettent une quantification de la masse relative des produits volatils à l'état libre ( voir discussion ).

#### **2.1 ANALYSE DES AGLYCONES LIBÉRÉES PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE**

Les hydrolyses enzymatiques avec le  $\beta$ -D-Glucosidase et la Cellulase, des aiguilles et des ramilles, présentent un très grand nombre de produits ( voir annexe 2, pages 152 et 153 ). Seuls les produits identifiés sont présentés dans les tableaux 9 et 10. Les spectres de masses de ces substances sont reproduits dans l'annexe 3.

Les produits qui apparaissent dans les tableaux 9 et 10, sont ceux des hydrolyses enzymatiques pour chaque partie de la l'arbre, respectivement les ramilles et les aiguilles. Les produits sont identifiés par CG et CG-SM avec leur pourcentage relative pour les deux hydrolyses enzymatiques ( $\beta$ -D-Glucosidase et Cellulase).

TABLEAU 9

Aglycones volatiles libérées par hydrolyse enzymatique  
des glycosides des ramilles

No	Identification	I.K.Spx-10	I.K.DB-5	% H.E. <sup>a</sup>	% H.E. <sup>b</sup>
1	Santène	-	891	3,49	0,13
2	2,3-Diméthylpentan-2-ol	1124	?	0,41	0,06
3	2-Méthylbut-2-én-1-ol	1329	?	0,29	0,17
4	Hexan-1-ol	1357	876	4,22	2,04
5	cis-Hex-3-én-1-ol	1382	862	2,25	0,59
6	Benzaldéhyde	1522	960	0,10	0,11
7	2,4-Diméthyl- heptane-2,4-diol	1526	?	2,78	0,12
8	Linalool	1571	1095	18,42	3,61
9	Terpine-4-én-1-ol	1595	1176	0,49	5,89
10	trans-Pinocarvéol	1642	1142	-	1,58
11	$\alpha$ , 4-Diméthylcyclohex-3- èn-1-acétaldéhyde	1660	1112	0,83	0,06 ?
12	$\alpha$ -Terpinéol	1684	1189	0,25	1,33
13	Bornéol	1698	1166	0,28	8,38
14	Campholénal	1767	1126	0,66	0,74
15	Citronello	1781	1231	1,08	1,70
16	Myrténol	1784	1191	0,49	0,87
17	Monoterpéno ?	1794	1198	1,50	3,37
18	para-Cymén-8-ol	1842	1181	0,76	0,45
19	Géranio	1842	1258	0,13	1,04
20	Phénylméthanol	1871	1036	2,22	2,48
21	2-Phényléthanol	1902	1120	2,48	2,54
22	Alcool perillique	1993	1295	0,38	0,51
23	Eugéno	2158	1358	1,52	1,47

24	2-Hydroxy-5-méthyl- acétophénone	2188	?	1,08	0,31
25	p-(2-Méthylallyl)- Phénol	2277	?	1,62	1,19
26	trans-Cinnamyl alcool	2284	1308	1,59	0,65
27	iso-Eugénol	2330	1460	0,79	1,48
28	Vanilline	2560	1389	3,33	1,23
29	4-Hydroxy-3-méthoxy- acétophénone	2626	1482	4,79	1,99
30	4(4-Hydroxy- 3-méthoxyphényl)-butan-2-one	2771	1640	8,70	3,33

---

**% H.E.<sup>a</sup>** : % obtenu par hydrolyse enzymatique avec la  $\beta$ -Glucosidase;

**% H.E.<sup>b</sup>** : % obtenu par hydrolyse enzymatique avec la Cellulase;

**I.K.DB-5** : Indice de KOVATS sur la colonne a-polaire DB-5;

**I.K.Spx** : Indice de KOVATS sur la colonne Supelcowax 10.

TABLEAU 10

Aglycones volatiles libérées par hydrolyse  
enzymatique des aiguilles

No	Identification	I.K.Spx-10	I.K.DB-5	% HLE <sup>a</sup>	% HLE <sup>b</sup>
1	Santène	-	891	5,17	1,38
2	2,3-Diméthylpentan-2-ol	1124	?	0,32	0,09
3	2,4-Diméthylpentan-3-ol	1187	?	0,12	-
4	2-Méthylbut-2-én-1-ol	1329	?	0,23	0,50
5	Hexan-1-ol	1357	876	0,17	-
6	2-Méthylhexan-2-ol	1362	?	0,98	1,12
7	cis-Hex-3-én-1-ol	1382	862	1,80	1,88
8	Benzaldéhyde	1522	960	1,03	0,07
9	Linalool	1571	1095	20,08	7,42
10	Terpine-4-én-1-ol	1595	1176	-	0,13
11	trans-Tinocarvéol	1642	1142	-	0,13
12	$\alpha$ , 4-diméthylcyclohex-3- èn-1-acétaldéhyde	1660	1095	5,92	1,24
13	$\alpha$ -Terpinéol	1684	1189	-	0,22
14	Bornéol	1698	1166	0,28	9,49
15	Campholénal	1767	?	0,89	1,26
16	Citronellol	1781	1231	0,09	-
17	Myrténol	1784	1191	0,38	2,92
18	Monoterpénol ?	1794	1198	5,20	9,03
19	ara-Cymén-8-ol	1842	1181	0,09	0,16
20	Géraniol	1842	1258	0,06	0,71
21	Phénylméthanol	1871	1036	1,99	2,12
22	2-Phénylethanol	1902	1120	0,19	0,80
23	Alcool perillique	1993	1295	0,73	1,69
24	Eugénol	2158	1358	0,56	4,53

25	2-Hydroxy-5-méthyl- acétophénone	2188	?	0,85	0,65
26	p-(2-Méthylallyl)- Phénol	2277	?	0,26	0,30
27	trans-Cinnamyl alcool	2284	1308	1,71	0,67
28	iso-Eugénol	2330	1460	0,15	-
29	Vanilline	2560	1389	3,30	2,17
30	4-Hydroxy-3-méthoxy- acétophénone	2626	1482	26,90	12,89
31	4-(4-Hydroxy- 3-méthoxyphényl)-butan-2-one	2771	1640	4,38	2,16

---

**% H.E.<sup>a</sup>** : % obtenu par hydrolyse enzymatique avec la  $\beta$ -Glucosidase;

**% H.E.<sup>b</sup>** : % obtenu par hydrolyse enzymatique avec la Cellulase;

**I.K.DB-5** : Indice de KOVATS sur la colonne a-polaire DB-5;

**L.K.Spx** : Indice de KOVATS sur la colonne Supelcowax 10.

## 2.2 ANALYSE DES AGLYCONES LIBÉRÉES PAR HYDROLYSE ACIDE

Les résultats de l'hydrolyse acide de l'extrait des glycosides sont présentés dans le tableau 11 ( voir annexe 2; page 154 ). Seuls les produits identifiés sont présentés avec leur pourcentage relative dans les aiguilles et les ramilles. Les extractions des aglycones sont faites par l'extracteur Likens-Nickerson et les analyses sont effectuées dans les mêmes conditions que les aglycones libérées par hydrolyse enzymatique. Pour déterminer le pourcentage relatif des produits volatils dans les aiguilles, nous avons hydrolysé les glycosides de 50 g d'aiguilles sèches après avoir extrait pendant 20 et 6 heures les produits libres. Les produits volatils libres représentent 2,33 % , et ceux libérés par hydrolyse acide ne représentent que 0,33 % du poids des aiguilles sèches. Les produits volatils libres sont sept fois plus importants en poids que les produits sous forme de glycosides.

Contrairement à l'hydrolyse enzymatique, l'hydrolyse acide ne donne pas la composition réelle des produits volatils. Dans le milieu acide les produits subissent des transformations structurales. Comme les aglycones sont des alcools, certains constituants peuvent subir l'élimination d'une molécule d'eau, un réarrangement de la structure ou une perte de tout autre groupement.

TABLEAU 11

Aglycones volatiles libérées par hydrolyse  
acide des glycosides

No	Identification	I.K.Spx-10	I.K.DB-5	% Ra.	% Ai.
1	Santène	-	891	1,46	4,03
2	Ppara-Cymne	1275	1024	5,89	5,80
3	Hexan-1-ol	1357	876	1,82	-
4	cis-Hex-3-én-1-ol	1382	862	1,26	0,08
5	Citronéllal	1483	1162	1,61	3,36
6	Benzaldéhyde	1521	960	4,07	2,50
7	Linalool	1571	1095	5,61	10,82
8	Terpine-4-én-1-ol	1595	1176	0,32	0,04
9	trans-Pinocarvéol	1642	1142	0,40	1,06
10	$\alpha$ -terpinéol	1684	1189	2,43	1,11
11	Bornéol	1698	1166	3,11	2,38
12	Pipéritone	1716	1257	2,64	2,31
13	Campholénal	1767	?	1,48	0,21
14	Phénylméthanol	1871	1036	3,38	0,86
15	2-Phényléthanol	1902	1120	0,28	1,89
16	Carvacrol ?	2210	1308	2,26	0,42

% Ra. : % obtenu par hydrolyse acide de ramilles;

% Ai. : % obtenu par hydrolyse acide des aiguilles;

I.K.DB-5 : Indice de KOVATS sur la colonne a-polaire DB-5;

I.K.Spx : Indice de KOVATS sur la colonne Supelcowax 10.

## SECTION IV

### Discussion



## CHAPITRE I

### EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOSIDES

#### 1.1 EXTRACTION DES GLYCOSIDES

Les glycosides sont des substances constituées de deux parties distinctes: une partie glycosidique et l'autre non glycosidique. Dans une plante on trouve une multitude de produits de nature différente ( huiles essentielles, lipides, alcanes, acides gras etc..). L'extraction des glycosides nécessite l'élimination de ces substances. Les méthodes d'extractions utilisées par différents chercheurs quoiqu'elles font appel à plusieurs techniques, ont toutes un point commun: la conservation intacte de la structure des glycosides au cours des différentes étapes de l'extraction. La destruction des tissus de la plante est inévitable pour extraire ces produits provoquant ainsi l'activation de certains enzymes, surtout les hydrolases et les glycosidases <sup>2</sup>. Le rôle de ces derniers en temps normal est de libérer les aglycones des glycosides. En broyant le matériel végétal dans le méthanol <sup>2</sup> ou l'eau <sup>6</sup> à une température proche de leur point d'ébullition, les enzymes sont inactivées immédiatement. Aussi, à température très basse, les enzymes ne sont pas actives. Le broyage du matériel végétal dans l'azote liquide est aussi une méthode courante <sup>7,8</sup>. Pour prévenir l'hydrolyse des glycosides par les enzymes de la plante, nous avons utilisé du matériel préalablement séché. La pulvérisation de la plante est réalisée à sec dans un malaxeur. Les glycosides ne sont pas affectés par la présence des enzymes puisqu'ils ne sont pas en solution. L'extraction des glycosides à partir du matériel pulvérisé est réalisée dans un extracteur Soxhlet avec du méthanol pendant quarante huit heures. Les substances lipophiliques sont éliminées en premier lieu avec du toluène de la même manière. Cette méthode ne nécessite

pas de grande quantité de solvant, surtout pour éliminer les traces des substances lipophiliques qui persistent dans la matrice végétale. La réutilisation d'une même quantité du solvant par distillation et condensation rend cette méthode très économique. Toutefois il faut toujours qu'il reste une quantité suffisante dans le ballon où les produits extraits s'accumulent pour éviter la destruction de ces derniers par effet de chaleur qui doit être juste suffisante pour faire bouillir le solvant.

La détermination de la quantité réelle des glycosides ne peut se baser sur la quantité de l'extrait des glycosides. Non seulement parce que le résidu se compose de plusieurs substances qui ne sont pas toutes des glycosides, mais aussi parce que la méthode d'extraction utilisée n'est pas nécessairement efficace pour extraire la totalité des glycosides. Svendsen <sup>13</sup> a fait une étude comparative entre deux méthodes d'extraction ( Section I : revue de littérature ). Dans la méthode (A) les glycosides sont extraits dans l'eau et la méthode (B) dans le méthanol ( 100 mL et 200 mL ). La première méthode est de loin la plus efficace ( voir tableau 1, page 8 ). La quantification des glycosides ou les substances volatiles sous forme de glycosides est basée surtout sur l'analyse des produits volatils libérés par hydrolyse ( Voir Chapitre 3 ).

## 1.2 PURIFICATION DES GLYCOSIDES

Pour analyser les glycosides intacts il est primordiale de les séparer individuellement. Cette opération nécessite plusieurs opérations. L'extrait des glycosides est souvent un mélange complexe de d'autres substances. Même s'ils sont solubles dans le même solvant d'extraction, ils ont des structures et des poids moléculaires très différents. Pour séparer les produits d'un mélange, la chromatographie solide-liquide est la technique par excellence pour arriver à cette fin. Cependant les produits doivent être assez semblables pour être retenus sur la même phase stationnaire ( adsorbant ) et assez différents pour être séparés sur cette dernière. Une séparation

de deux substances est possible quand la résolution est optimale. L'expression suivante représente la relation entre la résolution et certains paramètres chromatographiques:

$$R = \frac{1}{4} \left[ \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \sqrt{N} \left[ \frac{k'}{k'+1} \right]$$

Comme on peut le constater, le facteur de capacité ( $k'$ ) ( celui du produit qui a le temps de rétention le plus élevé ), la sélectivité ( $\alpha$ ) et le nombre de plateaux théoriques ( $N$ ) sont les paramètres qui peuvent influencer la résolution <sup>38</sup>. Comme nous avons vu dans le paragraphe des principes et théorie de la chromatographie ( page 43 ),  $k'$  se traduit par le temps passé par une substance ( soluté ) sur l'adsorbant par rapport à celui passé dans la phase mobile ( éluant ). Un soluté qui a une plus grande affinité pour l'adsorbant va mettre plus de temps à être élué qu'un autre qui a plutôt une plus grande affinité pour l'éluant. On peut varier le facteur de capacité (  $k'$  ) d'un soluté pour un adsorbant donné, en changeant la composition de l'éluant. Un soluté apolaire va avoir une grande affinité pour une phase inversée ( apolaire ) avec un éluant polaire. Par contre, plus on diminue la polarité de l'éluant plus l'affinité du soluté pour ce dernier va augmenter, et cela va entraîner une diminution de la valeur du facteur de capacité. Mais pour un même éluant la composition de deux adsorbants de même nature a une grande influence sur  $k'$ . Un adsorbant poreux va donner une valeur de  $k'$  plus grande qu'un adsorbant pelliculaire à poids égal pour un même soluté <sup>38</sup>. La raison est qu'un adsorbant poreux a une plus grande surface de contact avec le soluté.

La sélectivité ( facteur de séparation ) a une influence plus importante sur la résolution. Une faible variation de ce paramètre peut entraîner un changement considérable sur la séparation d'un mélange <sup>38</sup>. La sélectivité est influencée directement par la nature et la composition de l'éluant, la nature de l'adsorbant et la température. Pour séparer un mélange de deux produits ou plus, la nature de l'adsorbant est choisie en fonction de leur nature. En règle générale, les

produits polaires sont séparés sur un adsorbant non polaire et vice versa. Quand le choix de l'adsorbant est fixé, c'est l'éluant qui va être le paramètre déterminant pour optimiser la sélectivité sans varier la température. La sélectivité est le rapport des facteurs de capacité de deux produits qu'on vise à séparer. S'ils ont des  $k'$  égaux, il n'y a pas de séparation ( $\alpha = 1$ ). Pour les séparer il faut changer la composition de l'éluant jusqu'à ce que le rapport soit supérieur à 1. Finalement, pour optimiser la résolution il faut maintenir  $k'$  entre 2 et 8 et  $\alpha$  entre 1,5 et 2,0<sup>38</sup>. Une valeur de  $k'$  supérieure à 8 n'améliore pas beaucoup la résolution, mais elle augmente le temps nécessaire pour éluer les produits.

Le débit de l'éluant est aussi un paramètre important pour optimiser la séparation de produits dans un mélange. La figures 14 ( page 66 ) illustre bien l'influence de ce paramètre. On peut voir la variation de la séparation des produits en fonction du débit pour un même système de solvant, le meilleur débit étant 1,5 ml / min.

Comme déjà mentionné plus haut, les glycosides sont composés de deux parties, un ou plusieurs sucres et une aglycone qui est principalement un monoterpène acyclique ou cyclique, un composé à noyau aromatique ou molécules norisoprénoïques à 13 atomes de carbones<sup>5</sup>. Comme l'aglycone est en général une molécule non polaire ou peu polaire et le sucre est très polaire, le glycoside se trouve avec deux pôles qui lui permettent d'être séparé sur un adsorbant polaire ou apolaire. Cependant la phase stationnaire qui est la plus utilisée par les chercheurs est le gel de silice à phase normale ( voir revue de littérature, page 10 ).

Pour séparer les glycosides extraits de l'épinette noire, nous avons eu recours à la chromatographie liquide préparative à phase normale pour simplifier le mélange. Une colonne de verre ( d.i. = 5 cm, et l = 75 cm ) remplie à sec avec du gel de silice 24 - 37  $\mu\text{m}$ . Nous avons remarqué que pour éliminer l'air de l'adsorbant plus facilement il faut que l'éluant circule de bas

en haut dans la colonne qui est maintenue verticalement. Si l'éluant circule dans le sens contraire, c'est-à-dire de haut en bas, l'air résiste plus longtemps puisqu'il a tendance à monter à cause de sa faible densité par rapport à l'éluant aussi pour éliminer les bulles d'air qui sont emprisonnées dans l'adsorbant, il faut une très grande quantité de l'éluant.

L'extrait des glycosides ( 2 g ) a été fractionné sur la colonne avec l'éluant (  $\text{CH}_3\text{Cl} : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} / 60 : 20 : 2$  ) dont la composition est déterminée par des analyses de l'extrait sur des couches minces de gel de silice. Pour avoir une bonne séparation sur la colonne des produits visés, il faut que leur  $R_f$  soit inférieur à 0.4. Plusieurs éluants sont testés en augmentant ou en diminuant leur polarité. Le débit était de 2 ml/min. et nous avons utilisé la chromatographie sur couches minces pour identifier les fractions qui contiennent les produits qui ont les mêmes  $R_f$ . Les fractions 74 à 109 ont été regroupées et séparées sur une colonne semi-préparative CLHP- $\text{C}_{18}$ . Les conditions de séparation des produits ont été déterminées en suivant les principes d'optimisation de la résolution. L'adsorbant que nous avons choisi est le gel de silice phase inversée  $\text{C}_{18}$  malgré que la plupart des chercheurs ont utilisé le gel de silice phase normale pour séparer les glycosides extraits des plantes <sup>17-19, 22, 24</sup>. Leong et al <sup>25</sup> ont comparé des colonnes CLHP, une à phase inversée (  $\text{C}_{18}$  ) et l'autre à phase normale (  $\text{SiOH}$  ), pour séparer quatre glycosides phénoliques ( polaires ). Ils ont réalisé une séparation parfaite sur le gel de silice. Par contre il n'y a pas eu de séparation sur la phase inversée. Cependant, Andersson et al <sup>26</sup> ont réalisé la séparation de glycosides phénoliques sur une colonne semi-préparative à phase inversée.

## CHAPITRE II

### INTERPRÉTATION DES DONNÉES SPECTROSCOPIQUES

#### 2.1 DÉTERMINATION DES STRUCTURES DES GLYCOSIDES

Le déplacement chimique de chaque noyau, proton ou carbone, dépend de son environnement magnétique qui est déterminé par la nature des autres noyaux qui l'entourent. L'intensité de chaque déplacement chimique dépend du nombre de noyaux qui absorbent au même endroit pour la RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . Aussi elle dépend du nombre de protons liés au carbone dans le cas de la RMN du  $^{13}\text{C}$ .

Les constantes de couplage sont très importantes pour déterminer la structure d'un produit. Nous pouvons distinguer les orientations spatiales relatives de chaque noyau (ici c'est le  $^1\text{H}$ ) en s'appuyant sur les valeurs de leurs constantes de couplage. Dans la littérature les constantes de couplage sont données pour la majorité des orientations possibles. L'interprétation des déplacements chimiques d'une substance est très difficile quand il s'agit de différencier entre deux isomères qui ont des déplacements chimiques très proches et des constantes de couplage semblables. Lorsqu'on est en présence de plusieurs protons qui ont des déplacements chimiques confondus et des constantes des couplages différentes, il devient difficile de déterminer avec précision les constantes de couplage pour chaque proton.

Un des objectifs dans le présent travail est de déterminer les structures des glycosides intacts extraits de l'épinette noire. Chaque structure est constituée d'un sucre et d'une aglycone.

L'identification ou la détermination des structures des sucres, monosaccharides ou oligosaccharides, avec la spectroscopie de RMN du  $^1\text{H}$  n'est pas chose facile. La localisation des protons à la périphérie des molécules cause des effets de blindage et de déblindage très importants <sup>49</sup>. Dans le cas des sucres monomériques, on peut obtenir des résultats satisfaisants en utilisant un spectromètre de RMN avec un champ magnétique élevé qui permet d'obtenir les constantes de couplage ( $\Delta J$ ) avec précision. La configuration d'un sucre peut être identifiée en se basant sur les valeurs des ( $\Delta J$ ) qui sont caractéristiques pour chaque orientation. Dans un cycle à six membres, on peut différencier un hydrogène axial d'un hydrogène équatorial en sachant la valeur de la constante de couplage de celui-ci avec un hydrogène lié au carbone adjacent: la valeur de  $J_{a,a}$  est en général observée dans l'intervalle 8-13 Hz, par contre les valeurs de  $J_{a,e}$  et  $J_{e,e}$  sont plus faibles, ils se situent entre les valeurs 2-6 Hz et 1-4 Hz, respectivement <sup>46</sup>. Comme on peut le constater, il est difficile de déterminer l'orientation d'un hydrogène si la constante de couplage se trouve dans les deux intervalles ( $J_{a,e}$  et  $J_{e,e}$ ). Contrairement aux ( $\Delta J$ ) les ( $\delta$ ) sont plus affectés par la nature du solvant et de la température et il faut en tenir compte. Pour certaines structures on peut calculer les déplacements chimiques du  $^{13}\text{C}$  ou/et du  $^1\text{H}$  en sachant les valeurs différentielles des substituants qui entrent en jeu dans une structure. Les valeurs de ces derniers sont données dans la littérature <sup>45, 48</sup>.

La RMN du  $^{13}\text{C}$  est très utilisée pour l'identification des sucres. Les carbones ne produisent pas les effets de blindage et de déblindage que produisent les protons <sup>49</sup>. Les valeurs des déplacements chimiques ( $^{13}\text{C}$ ) des sucres sont plus fréquemment comparées avec celles des sucres modèles pour déterminer leurs structures que dans le cas de la RMN du  $^1\text{H}$  <sup>49</sup>. Cependant, il faut s'assurer que les valeurs ( $\delta$ ) des structures modèles sont obtenues dans des conditions de solvant et température similaires à celles du sucre qu'on veut identifier. Dans la littérature la valeur des déplacements chimiques des sucres de glycosides sont souvent obtenues dans des solvants différents. L'identification de la structure d'un sucre par comparaison avec des

structures modèles peut être très difficile si la nature des deux solvants est très différente. Cependant, en combinant les valeurs obtenues par la RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et en tenant compte de l'effet du solvant, on peut identifier la structure d'un sucre monomérique.

Dans ce travail, les spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des glycosides ont été pris dans le méthanol comme solvant. Étant donné que ce dernier a une polarité proche de celle de l'eau, nous avons pu comparer nos résultats avec ceux des structures modèles prises dans la littérature pour identifier les sucres. Les structures modèles sont choisies en fonction des structures possibles déterminées par l'interprétation du RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) des glycosides obtenus expérimentalement. Les valeurs de ces modèles sont présentées dans les tableaux 12 et 13.

Pour nous aider à déterminer la structure des aglycones des quatre glycosides, nous avons utilisé des structures modèles dont nous avons calculé les déplacements chimiques ( voir les tableaux 14, 15 et 16 ). Ces structures modèles sont toutes des glucosides aromatiques où le  $\beta$ -D-glucopyranoside est un des substituants ( Figure 16; réf. 19, 20, 24, 25, 52 ). Dans la littérature les valeurs différentielles du  $\beta$ -D-glucoside sont obtenues dans l'eau comme solvant <sup>51</sup>. Les valeurs différentielles des autres substituants sont obtenues dans le chloroforme <sup>45, 48</sup>. Ces valeurs différentielles sont obtenues d'une façon approximative en appliquant le principe d'additivité des substituants.

Dans les tableaux 14, 15 et 16, les colonnes de  $\Delta\delta$  expriment la différence entre le déplacement chimique expérimental et calculé pour chaque carbone du noyau benzénique dans chaque structure. La valeur de  $\Delta\delta$  qui correspond au carbone  $\text{C}_1$  est toujours positive et elle est supérieure à 5 ppm dans la moitié des structures. Dans le cas des autres carbones dans toutes les structures, sans exception, la valeur absolue de  $\Delta\delta$  est toujours inférieure à 5 ppm. Pour les carbones  $\text{C}_2$  et  $\text{C}_6$  dans chaque structure, c'est-à-dire en positions ortho avec le substituant de  $\text{C}_1$ ,



les valeurs de  $\Delta\delta$  sont négatives à quelques exceptions près. Pour le carbone C<sub>4</sub>, position para, les valeurs de  $\Delta\delta$  sont presque toujours positives. Ces valeurs de  $\Delta\delta$  nous servent d'exemples des écarts attendus entre les valeurs calculées et expérimentales de différents glycosides.

Les déplacements chimiques expérimentaux de chaque glucoside extrait de l'épinette noire peuvent correspondre à plusieurs structures. Pour pouvoir distinguer entre elles nous avons calculé leurs déplacements chimiques de la même façon que nous avons fait pour les glucosides modèles 45, 48, 51. Les valeurs calculées des différentes structures possibles sont comparées avec les valeurs expérimentales des glucosides de l'épinette noire. Les structures modèles qui ont des valeurs proches des valeurs expérimentales sont retenues.

Tableau 12: Déplacements chimiques du  $^{13}\text{C}$  des glucosides aromatiques <sup>a</sup>

Sucre	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
$\alpha$ -glu.	92,9	72,5	73,8	70,6	72,3	61,6
$\beta$ -glu.	96,7	75,1	76,7	70,6	76,8	61,7
$\alpha$ -gal.	93,2	69,4	70,2	70,3	71,4	62,2
$\beta$ -gal.	97,3	72,9	73,8	69,7	76,0	62,0
$\alpha$ -glu-phényl	97,9	72,0	73,3	70,2	73,9	61,1
$\beta$ -glu-phényl	103,1	75,8	79,5	72,4	79,3	63,6
$\beta$ -gal-phényl	104,0	73,6	76,4	71,3	78,3	63,7

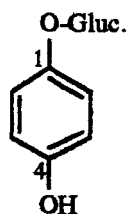
<sup>a</sup> Valeurs tirées de la référence 49.

**Tableau 13:** Déplacements chimiques du  $^1\text{H}$  et (constantes de couplages)  
de trois D-aldohexoses <sup>a</sup>

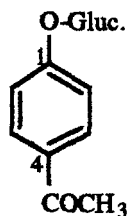
Sucre	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>6</sub>	H <sub>6'</sub>
$\alpha$ -glu.	5,09 (3,6)	3,41 (9,5)	3,61 (9,5)	3,29 (9,5)	3,72 -	3,72 (2,8)	3,63 (5,7,12,8)
$\beta$ -glu.	4,51 (7,8)	3,13 (9,5)	3,37 (9,5)	3,30 (9,5)	3,35 -	3,75 (2,8)	3,60 (5,7,12,8)
$\alpha$ -man.	5,05 (1,8)	3,79 (3,8)	3,72 (10,0)	3,52 (9,8)	3,70 -	3,74 (2,8)	3,63 (6,8,12,2)
$\beta$ -man.	4,77 (1,5)	3,85 (3,8)	3,53 (10,0)	3,44 (9,8)	3,25 -	3,74 (2,8)	3,60 (6,8,12,2)
$\alpha$ -gal.	5,16 (3,8)	3,72 (10,0)	3,77 (3,8)	3,90 (1,0)	4,00 -	3,70 (6,4)	3,62 (6,4)
$\beta$ -gal.	4,48 (8,0)	3,41 (10,0)	3,56 (3,8)	3,84 (1,0)	3,61 -	3,70 (3,8)	3,62 (7,8)

<sup>a</sup> Valeurs tirées de la référence 49;  
Valeurs mesurées à 400 MHz dans D<sub>2</sub>O.

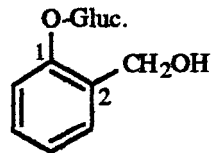
Noyau benzénique di-substitué.



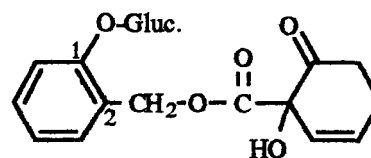
Arbutine  
Prod. 1, 1' et 1''



Picéine  
Prod. 2

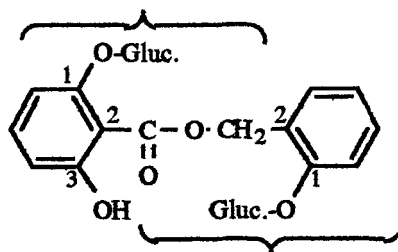


Salicin  
Prod. 3



Salicortine  
Prod. 5

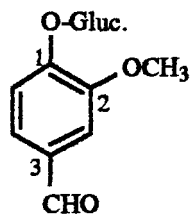
Prod. 4a



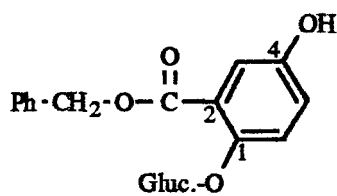
Henryoside

Prod. 4b

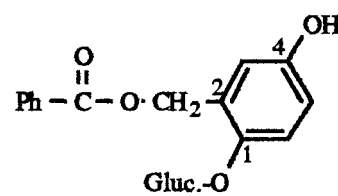
Noyau benzénique tri-substitué.



Glucovanilline  
Prod. 6



Trichocarpine  
Prod. 7



Salireposide  
Prod. 8

Figure 16 : Quelques glucosides aromatiques modèles

Tableau 14 : Noyaux benzéniques di-substitués en positions 1 et 4

δ(ppm)	Prod. 1 (MeOH-d <sub>4</sub> ) <sup>52</sup>			Prod. 1' (C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N-D <sub>5</sub> ) <sup>20</sup>			Prod. 1'' (D <sub>2</sub> O) <sup>19</sup>			Prod. 2 (DMSO-d <sub>6</sub> ) <sup>52</sup>		
	Carb.	δ <sub>cal.</sub>	δ <sub>exp.</sub>	Δδ	δ <sub>cal.</sub>	δ <sub>exp.</sub>	Δδ	δ <sub>cal.</sub>	δ <sub>exp.</sub>	Δδ	δ <sub>cal.</sub>	δ <sub>exp.</sub>
C <sub>1</sub>	146,2	152,4	+ 6,2	146,2	154,0	+ 7,8	146,2	152,4	+ 6,2	157,7	161,0	+ 3,3
C <sub>2</sub>	120,4	119,4	- 1,0	120,4	116,9	- 3,5	120,4	119,4	- 1,0	119,0	115,8	- 3,2
C <sub>3</sub>	119,5	116,6	- 2,9	119,5	118,8	- 0,7	119,5	117,2	- 2,3	132,3	130,2	+ 0,6
C <sub>4</sub>	151,5	153,8	+ 2,3	151,5	151,8	+ 0,3	151,5	151,4	- 0,1	133,7	130,8	- 2,9
C <sub>5</sub>	119,5	116,6	- 2,9	119,5	118,8	- 0,7	119,5	117,2	- 2,3	132,3	130,2	- 2,0
C <sub>6</sub>	120,4	119,4	- 1,0	120,4	116,9	- 3,5	120,4	119,4	- 1,0	119,0	115,8	- 3,2

Tableau 15 : Noyau benzénique di-substitué en positions 1 et 2

δ(ppm)	Prod. 3 (D <sub>2</sub> O) <sup>52</sup>			Prod. 3' (D <sub>2</sub> O) <sup>24</sup>			Prod. 4b (D <sub>2</sub> O) <sup>24</sup>			Prod. 5 (DMSO-d <sub>6</sub> ) <sup>52</sup>		
	Carb.	δ <sub>cal.</sub>	δ <sub>exp.</sub>	Δδ	δ <sub>cal.</sub>	δ <sub>exp.</sub>	Δδ	δ <sub>cal.</sub>	δ <sub>exp.</sub>	Δδ	δ <sub>cal.</sub>	δ <sub>exp.</sub>
C <sub>1</sub>	152,1	154,9	+ 2,8	152,1	155,5	+3,4	153,5	155,8	+ 2,3	153,5	154,9	+ 1,4
C <sub>2</sub>	131,3	129,7	- 1,6	131,3	-	-	126,7	125,5	- 1,2	126,7	124,5	- 2,2
C <sub>3</sub>	130,8	130,0	- 0,8	130,8	130,5	- 0,3	132,2	131,5	- 0,7	132,2	129,4	- 2,8
C <sub>4</sub>	123,2	123,6	+ 0,4	123,2	124,2	+ 1,0	124,6	124,1	- 0,5	124,6	121,7	- 2,9
C <sub>5</sub>	130,8	130,0	- 0,8	130,8	130,5	- 0,3	132,2	131,5	- 0,7	132,2	128,8	- 3,4
C <sub>6</sub>	117,6	115,6	- 2,0	117,6	116,3	- 1,3	119,0	116,5	- 2,5	119,0	115,0	- 4,0

Tableau 16 : Noyau benzénique tri-substitué en positions 1, 2 et 4

$\delta$ (ppm)	Prod. 6 (Me <sub>2</sub> CO-d <sub>6</sub> ) <sup>25</sup>			Prod. 7 (Me <sub>2</sub> CO-d <sub>6</sub> ) <sup>52</sup>			Prod. 8 (Me <sub>2</sub> CO-d <sub>6</sub> ) <sup>52</sup>			Prod. 4a (D <sub>2</sub> O) <sup>24</sup>		
	Carb.	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$
C <sub>1</sub>	144,6	151,7	+ 7,1	145,7	152,2	+ 6,5	146,2	152,4	+ 6,2	154,4	156,0	+ 1,4
C <sub>2</sub>	151,0	149,3	- 1,7	121,7	116,9	- 4,8	128,1	127,5	- 0,6	107,6	111,1	+ 3,7
C <sub>3</sub>	116,4	114,5	- 1,9	119,0	121,4	+ 2,4	119,5	116,4	- 3,1	158,6	156,8	- 1,8
C <sub>4</sub>	134,2	130,5	- 3,7	151,0	150,2	- 0,8	151,5	148,9	- 2,6	111,4	111,9	+ 0,5
C <sub>5</sub>	125,8	125,4	- 0,4	123,0	122,6	- 0,4	119,5	118,7	- 0,8	137,1	134,2	- 2,9
C <sub>6</sub>	106,2	110,5	+ 4,3	119,9	120,3	+ 0,4	120,4	116,0	- 4,4	111,2	108,0	- 3,2

## 2.2 INTERPRÉTATION DES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DU $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$

### 2.2.1 GLUCOSIDE #1

#### a) Spectre de masse

Le spectre de masse obtenu par ionisation chimique présente trois ions caractéristiques de l'ionisation chimique avec le méthane,  $M + \text{H}^+$  (315),  $M + \text{C}_2\text{H}_5^+$  (343) et  $M + \text{C}_3\text{H}_5^+$  (355). On peut déduire que le produit a une masse molaire  $M$  (314) (Fig. 20).

Le spectre de masse obtenu par ionisation électronique présente des fragments ( $m/z=163$ , 145 et 127) qui peuvent être celles d'un sucre monomérique, un hexose (Fig. 17).

Nous pouvons aussi distinguer des ions qui peuvent provenir de l'aglycone (la partie liée au sucre),  $M_a$  (152), et  $M_a+1$  (153),  $M_a+2$  (154) et le fragment  $M_a-15$  (137).

#### b) Spectres de RMN du $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$

Sur le spectre de la RMN du  $^{13}\text{C}$  on distingue les déplacements chimiques de six carbones qui peuvent être ceux d'un hexose (62,46 à 104,22 ppm). Pour la détermination de la structure du sucre, nous avons procédé par comparaison avec des modèles trouvés dans la littérature (tableaux 12 et 13; réf.49). Les comparaisons au niveau du  $^{13}\text{C}$  suggèrent que le sucre peut être soit le  $\beta$ -D-glucose ou le  $\beta$ -D-galactose avec le déplacement chimique du  $\text{C}'_1$  ( $^{13}\text{C}$ ) de 104 ppm qui est typique de la configuration  $\beta$ . La comparaison des valeurs des déplacements chimiques des protons ne peut donner plus de précision que celles du  $^{13}\text{C}$ .

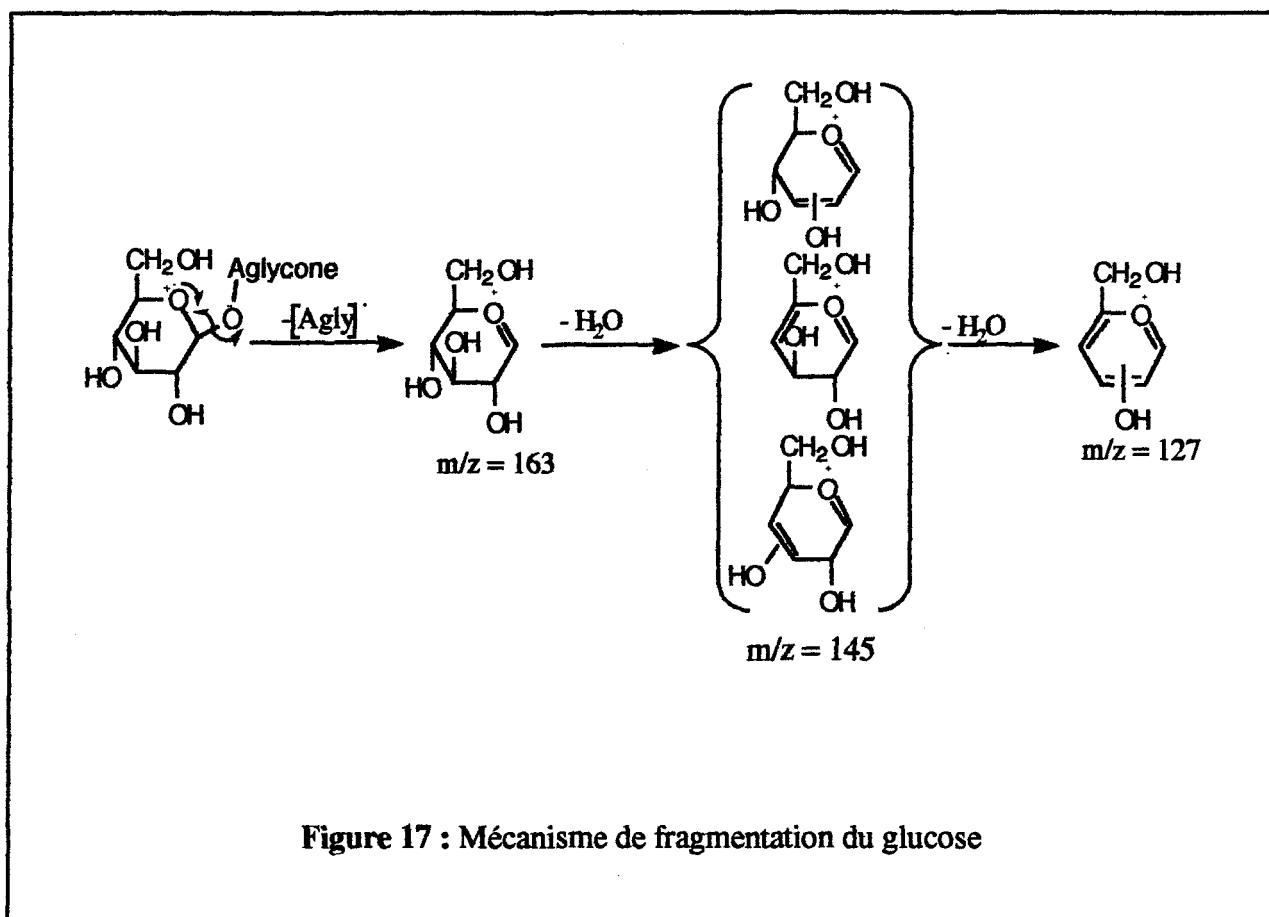


Figure 17 : Mécanisme de fragmentation du glucose



Contrairement aux déplacements chimiques les constantes de couplages sont plus précises: elles sont moins affectées par la nature du solvant utilisé (voir tableau 5). Cela a permis de proposer comme sucre, le  $\beta$ -D-glucose en se basant d'abord sur le proton qui absorbe vers 4,8 ppm avec une constante de couplage ( $\Delta J = 7,4$  Hz) qui représente le couplage de l'hydrogène axial sur  $C'_1$  et l'hydrogène axial sur  $C'_2$  aussi, les deux protons du  $C'_6$  qui absorbent entre 3,74 et 3,95 ppm ont une constante de couplage ( $\Delta J = 12$  Hz) caractéristique de deux protons géminés non équivalents magnétiquement, et deux autres qui représentent les couplages différents de chacun d'eux avec l'hydrogène axial sur  $C'_5$  ( $\Delta J = 2,2$  et  $5,6$  Hz). Ces derniers couplages plus voisins de ceux du  $\beta$ -D-glucose ( $\Delta J = 2,8$  et  $5,7$  Hz) que ceux du  $\beta$ -D-galactose ( $\Delta J = 3,8$  et  $7,8$  Hz)

Les déplacements chimiques du spectre  $^{13}C$  qui se situent entre 117,08 et 154,34 ppm correspondent à des carbones aromatiques. Le déplacement à 26,36 ppm est caractéristique d'un méthyle lié à un groupement polaire. Nous avons aussi une cétone à 199,4 ppm.

Les résultats obtenus par le spectre de la RMN du  $^1H$  donnent plus d'informations sur la structure de l'aglycone. La présence de trois protons aromatiques avec leurs constantes de couplage nous confirment la présence d'un noyau benzénique tri-substitué en position 1, 3 et 4. Le doublet dédoublé entre 7,66 et 7,68 ppm (tableau 5) représente un proton ( $H_6$ ) couplé avec un deuxième ( $H_5$ ) en position ortho avec  $\Delta J = 8,4$  Hz et avec un troisième ( $H_2$ ) en position méta avec  $\Delta J = 2$  Hz. Le proton  $H_5$  couplé avec  $H_6$ ,  $\Delta J = 8,4$  Hz, a un déplacement chimique de 6,93 ppm. Et le  $H_2$  à 7,87 ppm est couplé avec  $H_6$ ,  $\Delta J = 2,2$  Hz. On ne voit pas la constante de couplage entre les protons  $H_5$  et  $H_2$  en position para. Le méthyle sous forme de singulet à 2,55 ppm est lié à un groupement polaire (le carbonyle), ce qui explique son déplacement chimique vers un champ magnétique plus bas.

Le nombre de pics distincts, sur le spectre du  $^{13}\text{C}$ , est de quatorze (sans compter les 7 pics du méthanol). Si on considère qu'il n'y a pas de carbones équivalents magnétiquement dans la structure, nous pouvons conclure que l'aglycone possède huit carbones, ce qui représente le noyau benzénique, la cétone et le méthyle (six carbones appartiennent au hexose). Les déplacements chimiques de trois carbones (130.56, 146.63 et 154.35 ppm) et deux protons (7,66 à 7,87 ppm) indiquent la présence de substituants polaires. Toujours en se basant sur le fait qu'il y a seulement quatorze carbones, on peut dire que l'un des trois substituants du noyau aromatique est la cétone liée au méthyle.

La majorité du temps, l'aglycone d'un glucoside est liée au sucre par un oxygène. La somme des masses des structures partielles, le hexose (163), le benzène tri-substitué (75) et la cétone avec le méthyle (43), donne une masse de (281). Nous avons une différence de (33) avec la masse molaire du glucoside intact (314), ce qui représente l'oxygène qui lie le glucose et l'aglycone, et un hydroxyle (OH). Donc l'hydroxyle se trouve à être le troisième substituant. Il y a six possibilités pour placer trois substituants sur le benzène en respectant les constantes de couplage ( Fig. 18 ).

Pour distinguer entre les six structures possibles nous avons calculé les déplacements chimiques des carbones du noyau benzénique dans chaque structure en se servant de l'effet des substituants de la même façon que nous avons fait pour les glycosides modèles (Fig. 16; tableaux 14, 15 et 16). Pour chaque structure, les déplacements chimiques calculés et expérimentaux sont comparés entre eux ( Tableau 17 ). Les valeurs expérimentales sont celles du glycoside #1 mais placées dans un ordre pour les faire correspondre autant que possible avec les valeurs calculées de chaque structure possible. Comme on peut le voir, en examinant les valeurs de  $\Delta\delta$ , les structures III et V sont les moins probables. Elles présentent des différences significatives entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales au niveau de plusieurs

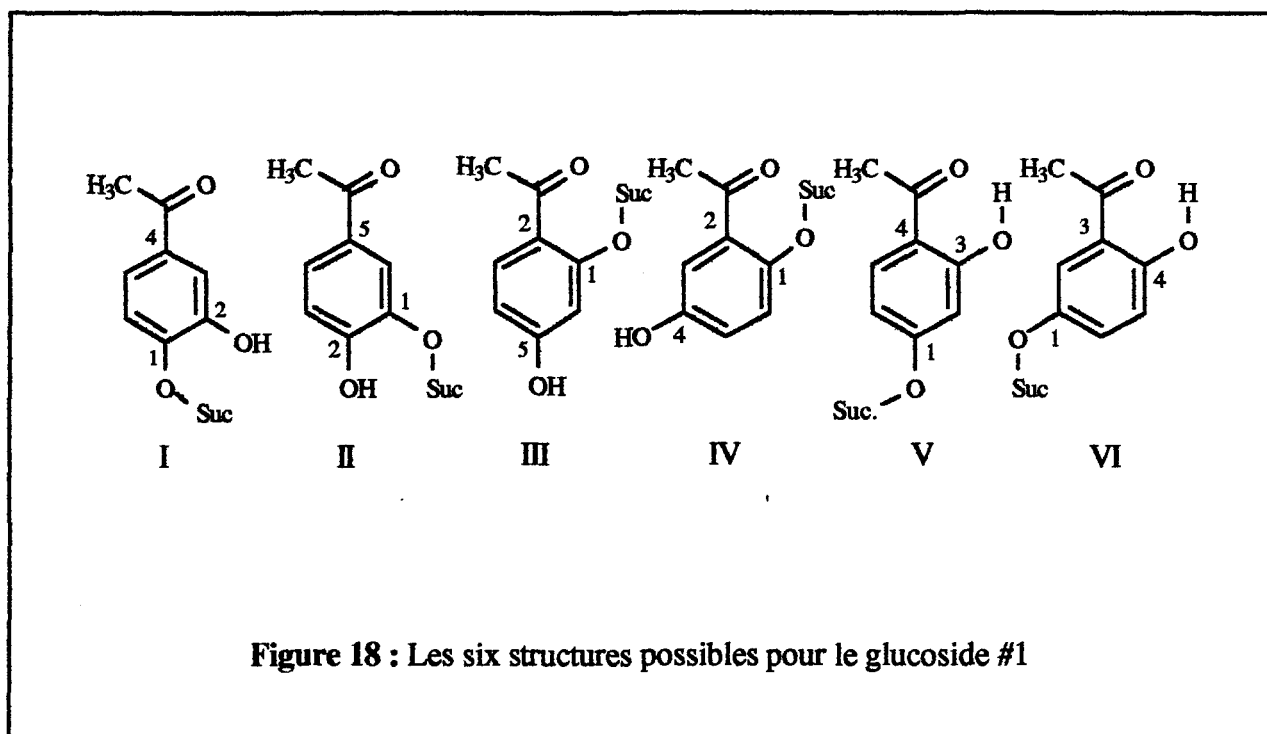


Tableau 17 : Valeurs calculées de  $\delta$  (ppm) des six structures possibles

	Structure I			Structure II			Structure III		
Carb.	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$
C <sub>1</sub>	145,0	154,4	+ 9,4	140,8	154,4	+ 13,5	155,0	146,6	- 8,4
C <sub>2</sub>	145,9	146,6	+ 0,7	150,1	146,6	- 3,5	120,8	126,5	+ 5,7
C <sub>3</sub>	119,6	119,2	- 0,4	119,5	117,1	- 2,4	133,7	130,5	- 3,2
C <sub>4</sub>	135,1	130,5	- 4,6	126,1	126,5	+ 0,4	111,9	119,2	+ 7,3
C <sub>5</sub>	125,0	126,5	+ 1,5	134,0	130,5	- 3,5	163,3	154,4	- 8,9
C <sub>6</sub>	120,4	117,1	- 3,3	120,5	119,2	- 1,3	106,3	117,1	+ 10,8
	Structure IV			Structure V			Structure VI		
Carb.	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$
C <sub>1</sub>	146,3	146,6	+ 0,3	159,1	146,6	- 12,5	146,2	146,6	+ 0,4
C <sub>2</sub>	129,5	130,5	+ 1,0	106,3	119,2	+ 12,9	120,5	119,2	- 1,3
C <sub>3</sub>	119,6	117,1	- 2,5	159,2	154,4	- 4,8	128,6	130,5	+ 1,9
C <sub>4</sub>	151,5	154,4	+ 2,9	121,0	126,5	+ 5,5	151,6	154,4	+ 2,8
C <sub>5</sub>	123,7	126,5	+ 2,8	133,7	130,5	- 3,2	119,5	117,1	- 2,4
C <sub>6</sub>	120,4	119,2	- 1,2	111,7	117,1	+ 5,4	124,6	126,5	+ 1,9

carbones. Dans le cas des deux structures I et II, les valeurs absolues de  $\Delta\delta$  sont inférieures à 5 ppm sauf pour le carbone  $C_1$  qui a une valeur de 9,4 et 13,5 ppm pour les structures I et II respectivement. Pour les structures modèles, la valeur de  $\Delta\delta$  pour le carbone  $C_1$  la plus élevée est de 7,8 ppm ( tableau 14; produit 1' ). Parmi les six structures possibles, les deux structures IV et VI sont les plus probables. Elles ont des valeurs absolues de  $\Delta\delta$  inférieures à 3 ppm, c'est à dire que les déplacements chimiques calculés sont très proches des déplacements chimiques expérimentaux. Cependant, la distinction entre les deux structures pour déterminer la structure la plus probable du glucoside #1, en comparant les valeurs de  $\Delta\delta$ , n'est pas possible.

Si on tient compte du fait que les glucosides #1 et #3 sont deux isomères ( voir glucoside #3 ) où les deux substituants, l'hydroxyle et le  $\beta$ -O-D-glucopyrannoside, sont intervertis, on peut les distinguer en se basant sur leur temps de rétention sur la colonne CLPH- $C_{18}$ . Le glucoside #1 a un temps de rétention de 20,34 min et le glucoside #3 a un temps de rétention de 26 min ( voir figure 15, page 67 ). Donc le glucoside #1 est plus polaire que le glucoside #3 puisque sur la colonne de CLHP- $C_{18}$  les produits polaires sont moins retenus que les non polaires. Dans la structure VI, l'hydroxyle est en position ortho par rapport à l'acétyle ce qui favorise la formation d'un pont hydrogène dans un cycle de six membres. La formation de ce pont hydrogène rend la structure VI moins polaire que la structure IV. Donc le glucoside #1, de formule brute  $C_{14}H_{18}O_8$ , de masse molaire 314 g/mole et de nombre d'insaturation six ( $14 - 18/2 + 1$ ), est identifié comme étant le 5-hydroxy-2-O- $\beta$ -D-glucopyrannosylacétophénone ( Fig. 19).

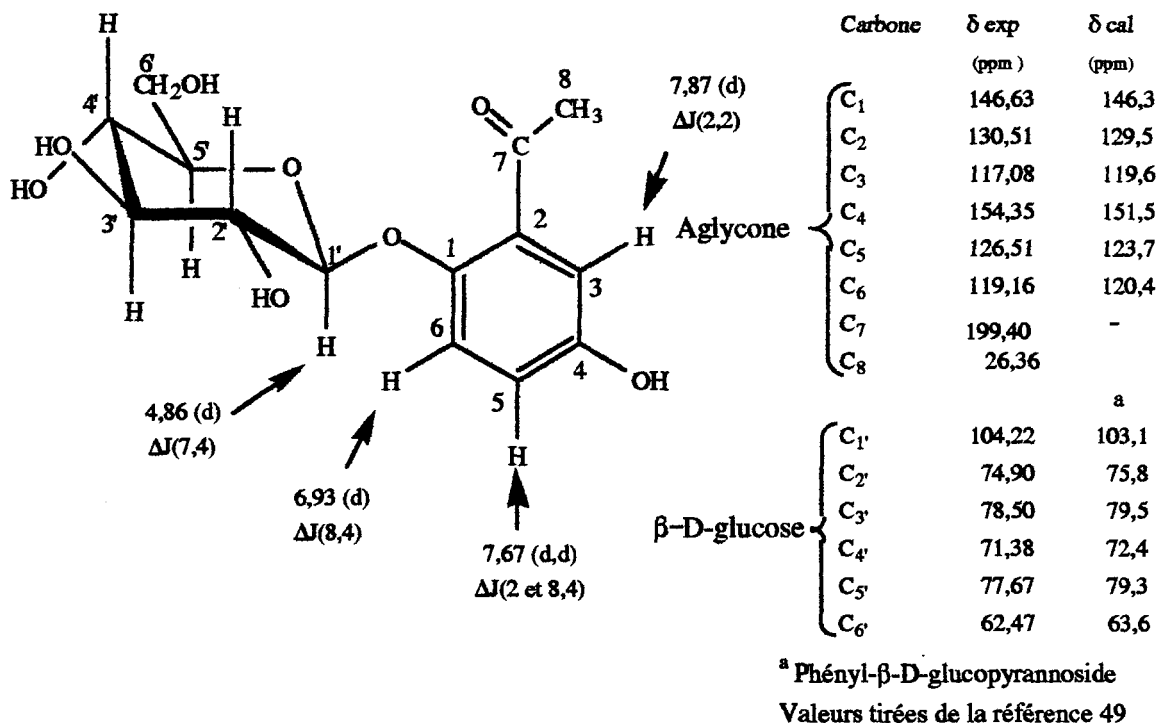


Figure 19 : Structure complète du glucoside #1

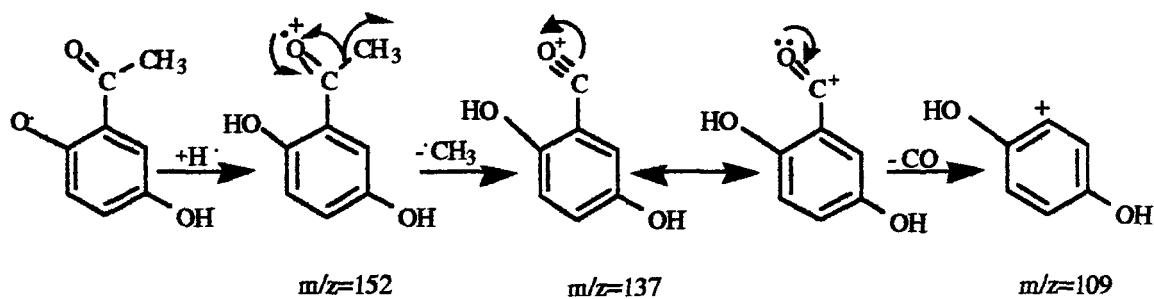


Figure 20 : Mécanisme de fragmentation de l'aglycone

## 2.2.2 GLUCOSIDE #2

### a) Spectre de masse

Le spectre de masse obtenu par ionisation chimique présente les trois ions caractéristiques, comme dans le cas du glucoside #1,  $M + H^+$ (299),  $M + C_2H_5^+$ (327) et  $M + C_3H_5^+$ (339). Nous avons un glucoside de masse molaire  $M$ (298)(Fig. 22).

Sur le spectre obtenu par ionisation électronique on voit les mêmes fragments (163, 145 et 127) qui proviennent du glucose, comme dans le glucoside #1. Nous pouvons aussi distinguer  $M_a$ (136) et  $M_a-15$ (121). La masse molaire de l'aglycone peut être  $M_a$  (136).

### b) Spectre RMN du $^1H$ et $^{13}C$

Les déplacements chimiques présentés dans le tableau 6 (Section résultats; Glyc. #2 ) représentent le glucoside #2 pur. On trouve aussi les déplacements chimiques du glucoside #2 dans le tableau 7 qui représente les déplacements chimiques des deux glucosides #2 et #3 non séparés ( voir annexe 1, pages 145 et 146; Glucosides #2 et #3: RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  ).

Sur le spectre du  $^{13}C$  nous avons les mêmes déplacements chimiques des six carbones du glucose (voir glucoside #1). Il y a une légère différence (2,62 ppm) au niveau du carbone  $C'_1$ . Donc nous pouvons déjà dire que le sucre du glucoside #2 est le  $\beta$ -D-glucopyrannoside puisque les spectres des deux produits sont pris dans les mêmes conditions expérimentales.

Les déplacements chimiques des protons à 7,99 et 7,19 ppm en deux doublets dédoublés, avec les mêmes constantes de couplages ( $\Delta J = 2$  et 8,9 Hz) correspondent aux hydrogènes d'un

noyau benzénique di-substitué en position 1 et 4, dans tel cas on a un plan de symétrie. Les quatre hydrogènes sont équivalents deux à deux et les carbones auxquels ils sont liés le sont aussi. Sur le spectre du  $^{13}\text{C}$  (Voir annexe 1, page 142; glucoside #2 RMN  $^{13}\text{C}$ ), nous pouvons distinguer seulement la présence de deux carbones aromatiques (117,23 et 131,63 ppm) cela est dû au fait que la quantité de produit utilisée est insuffisante puisque les signaux des trois autres carbones (cétone et deux carbones aromatiques) n'apparaissent pas. Le déplacement chimique d'un méthyle à 2,55 ppm (spectre du  $^1\text{H}$ ) et à 26,4 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) correspond au méthyle de l'acétyle.

Sur le spectre du  $^{13}\text{C}$  des glucosides #2 et #3), on distingue parfaitement la présence de deux hexoses. Les différences des déplacements chimiques des carbones sont très faibles. Les deux  $\text{C}'_4$  sont confondus (7,34 ppm) et la différence entre les deux carbones  $\text{C}'_1$  est seulement de 1,45 ppm (101,65 et 103,10 ppm), donc il s'agit de deux glucoses. Dans la zone des carbones aromatiques, on distingue 10 carbones qui représentent les aglycones des deux glucosides. La présence d'un méthyle à 26,44 ppm lié à une cétone (199,40 ppm) confirme la présence de l'acétyle.

Les résultats obtenus par la RMN du  $^1\text{H}$ , des deux produits non séparés, nous confirment ceux obtenus par la RMN  $^{13}\text{C}$ . La présence de deux singulets (2,55 et 2,58 ppm) qui représentent deux méthyles confirme l'existence de deux acétyles dont les carbonyles sont confondus sur le spectre de  $^{13}\text{C}$  (on peut voir un léger dédoublement du pic à 199,40 ppm) et les deux méthyles le sont aussi (26,44 ppm). Nous avons donc deux glucosides qui contiennent chacun une cétone et qui se trouvent dans des environnements magnétiques semblables. Les protons situés à 4,94 ppm ( $\Delta J = 7,5$  Hz) et 5,05 ppm ( $\Delta J = 7,4$  Hz) correspondent aux deux protons ( $\text{H}_1'$ ) des deux  $\beta$ -D-glucoses. Les pics qui se trouvent entre 3,42 et 3,94 ppm qui représentent les protons (en position axial) du cycle du glucose, sont tous dédoublés si on les



compare avec le spectre du  $^1\text{H}$  (glucoside #1). Cela démontre la présence de deux  $\beta$ -D-glucosides.

En s'appuyant aussi sur les résultats obtenus par la RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du glucoside #2 pur, nous avons identifié le produit 4-O- $\beta$ -D-glucopyrannosyl acétophénone. Sur le spectre du  $^{13}\text{C}$  du mélange nous pouvons voir les déplacements chimiques (163.1, 131.63, 117.3 ppm) qui correspondent aux carbones du noyau benzéniques ( $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_2$  et  $\text{C}_3$  respectivement). Le carbone  $\text{C}_1$  (quaternaire) peut être assigné au petit pic vers 133 ppm (ou 143 ppm) qui n'a pas été signalé. La comparaison des déplacements chimiques du  $^{13}\text{C}$  du glucoside #2 et ceux du produit 2, dans le tableau 14 (voir figure 21, référence 52) suggère qu'il s'agit de la picéine. Tous les déplacements chimiques entre les deux produits sont similaires. La différence la plus importante est de 3.2 ppm au niveau du déplacement chimique du carbonyle ( $\text{C}_7$ ).

Le glucoside #2, de formule brute  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_7$ , de masse molaire 298 g/mole et de nombre d'insaturation six ( $14 - 18/2 + 1$ ), est identifiée comme étant le 4-O- $\beta$ -D-glucopyrannosyl-acétophénone ou Picéine<sup>52</sup> ( Fig. 21).

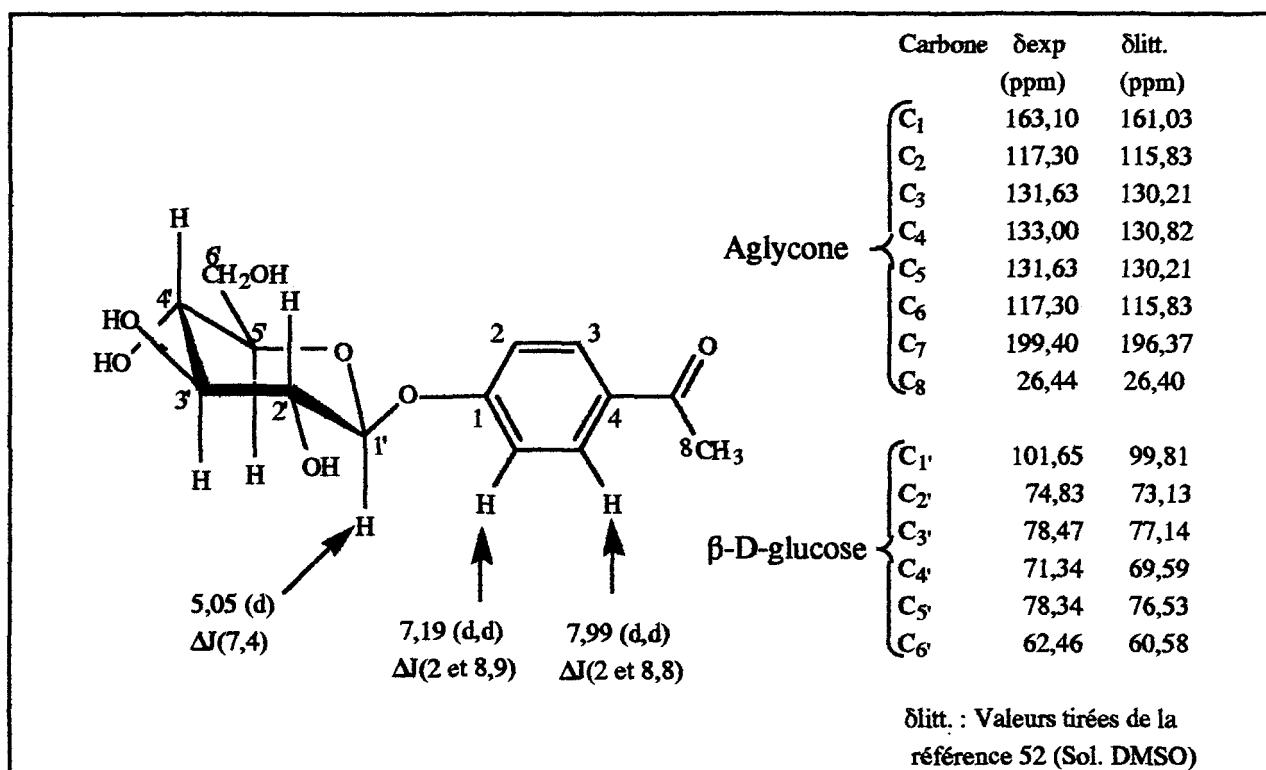


Figure 21 : Structure complète du glucoside #2

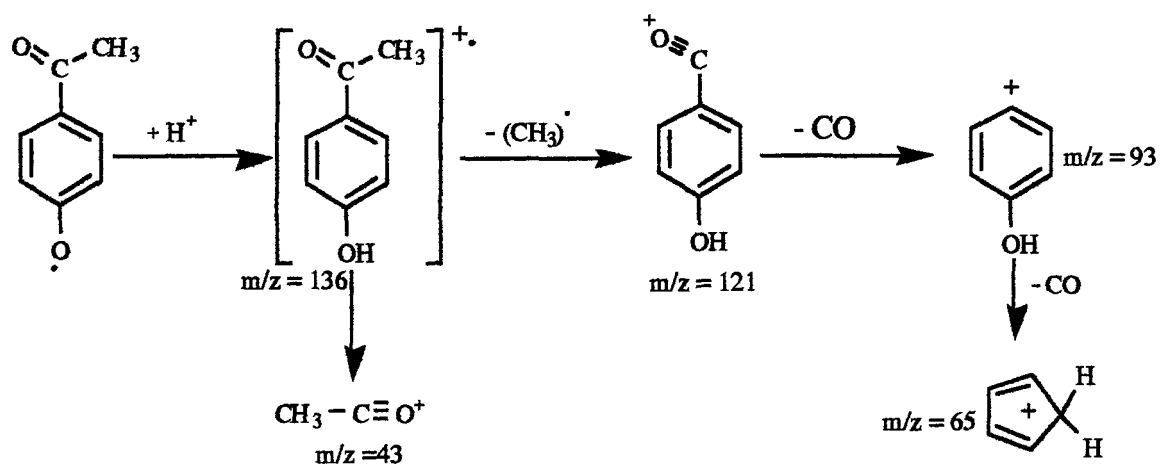


Figure 22 : Mécanisme de fragmentation de l'aglycone

### 2.2.3 GLUCOSIDE #3

#### a) Spectres RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ .

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange, les déplacements chimiques qui correspondent au glucoside #3 représentent un noyau benzénique tri-substitué en position 1, 2 et 4 avec les mêmes constantes de couplage que celui du glucoside #1. Les déplacements chimiques des protons aromatiques des deux glucosides (#1 et #3) présentent des différences significatives. Nous sommes en présence de deux noyaux aromatiques où les protons sont dans deux environnements magnétiques différents. Si on compare les déplacements chimiques situés entre 2,5 et 5,0 ppm, en excluant celles du glucoside #2, il n'y a pas de différences significatives, c'est-à-dire qu'il s'agit du  $\beta$ -D-glucose et le méthyle de l'acétyle dans les deux structures.

Au niveau des déplacements chimiques du  $^{13}\text{C}$  de l'aglycone, nous avons seulement trois carbones aromatiques qui sont signalés (carbones tertiaires). Par contre nous pouvons distinguer trois pics très faibles (133,0 ou 134,0, 149,0 et 151,5 ppm) qui sont probablement ceux des trois autres carbones aromatiques (carbones quaternaires). Comme pour les valeurs du RMN du  $^1\text{H}$ , celles du  $^{13}\text{C}$  présentent aussi des différences significatives avec ceux de l'aglycone du glucoside #1. Ces différences entre les deux aglycones ne se situent pas au niveau de la nature des trois substituants, mais plutôt au niveau de leurs positions relatives sur le noyau du benzène puisqu'il n'y a aucun autre déplacement chimique d'un carbone ou d'un proton.

Comme nous avons vu dans le cas du glucoside #1, il y a six possibilités pour placer trois substituants différents sur le benzène en respectant les constantes de couplage (voir figure 18). Les déplacements chimiques calculés, des carbones du noyau benzénique de chaque structure

(voir tableau 17), sont comparés avec les déplacements chimiques expérimentaux du glucoside #3 (voir tableau 18). Comme dans le cas du glucoside #1 les structures IV et VI sont les plus probables. Donc le glucoside #3 peut avoir la structure VI.

Le glucose a les mêmes valeurs des déplacements chimiques ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) dans les deux glucosides #1 et #3 sauf pour les deux carbones  $\text{C}'_1$  et les deux hydrogènes  $\text{H}'_1$  qui représentent des différences très faibles. Ces différences sont dues au fait que la cétone comme groupement polaire a tendance à influencer la valeur de ( $\delta$ ) des protons et des carbones qui sont sous son influence. Le glucose en position méta par rapport à la cétone dans le glucoside #3 subit moins d'influence que dans le cas du glucoside #1 où il est en position ortho.

Le glucoside #3 est identifié comme étant le 1-hydroxy-5-O- $\beta$ -D-glucopyrannosyl-acétophénone ( Fig. 23 ).

Tableau 18 : Valeurs calculées de  $\delta$  (ppm) des six structures possibles

Carb.	Structure I			Structure II			Structure III		
	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$
C <sub>1</sub>	145,0	149,0	+ 4,0	140,8	149,0	+ 8,2	155,0	149,0	- 6,0
C <sub>2</sub>	145,9	151,5	+ 5,6	150,1	151,5	+ 1,4	120,8	122,5	+ 1,7
C <sub>3</sub>	119,6	116,8	- 2,8	119,5	116,8	- 2,7	133,7	133,0*	- 0,7
C <sub>4</sub>	135,1	133,0*	- 2,1	126,1	122,5	- 3,6	111,9	117,0	+ 5,1
C <sub>5</sub>	125,0	122,5	- 2,5	134,0	133,0*	- 1,0	163,3	151,5	- 11,8
C <sub>6</sub>	120,4	117,0	- 3,4	120,5	117,0	- 3,5	106,3	116,8	+ 10,5
Carb.	Structure IV			Structure V			Structure VI		
	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$	$\delta_{cal.}$	$\delta_{exp.}$	$\Delta\delta$
C <sub>1</sub>	146,3	149,0	+ 2,7	159,1	149,0	- 10,1	146,2	149,0	+ 2,8
C <sub>2</sub>	129,5	133,0*	+ 3,5	106,3	116,8	+ 10,5	120,5	117,0	- 3,5
C <sub>3</sub>	119,6	116,8	- 2,8	159,2	151,5	- 7,7	128,6	133,0*	+ 4,4
C <sub>4</sub>	151,5	151,5	0,0	121,0	122,5	+ 1,5	151,6	151,5	- 0,1
C <sub>5</sub>	123,7	122,5	- 1,2	133,7	133,0*	- 0,7	119,5	116,8	- 2,7
C <sub>6</sub>	120,4	117,0	- 3,4	111,7	117,0	+ 5,3	124,6	122,5	- 2,1

\* ou 134.0

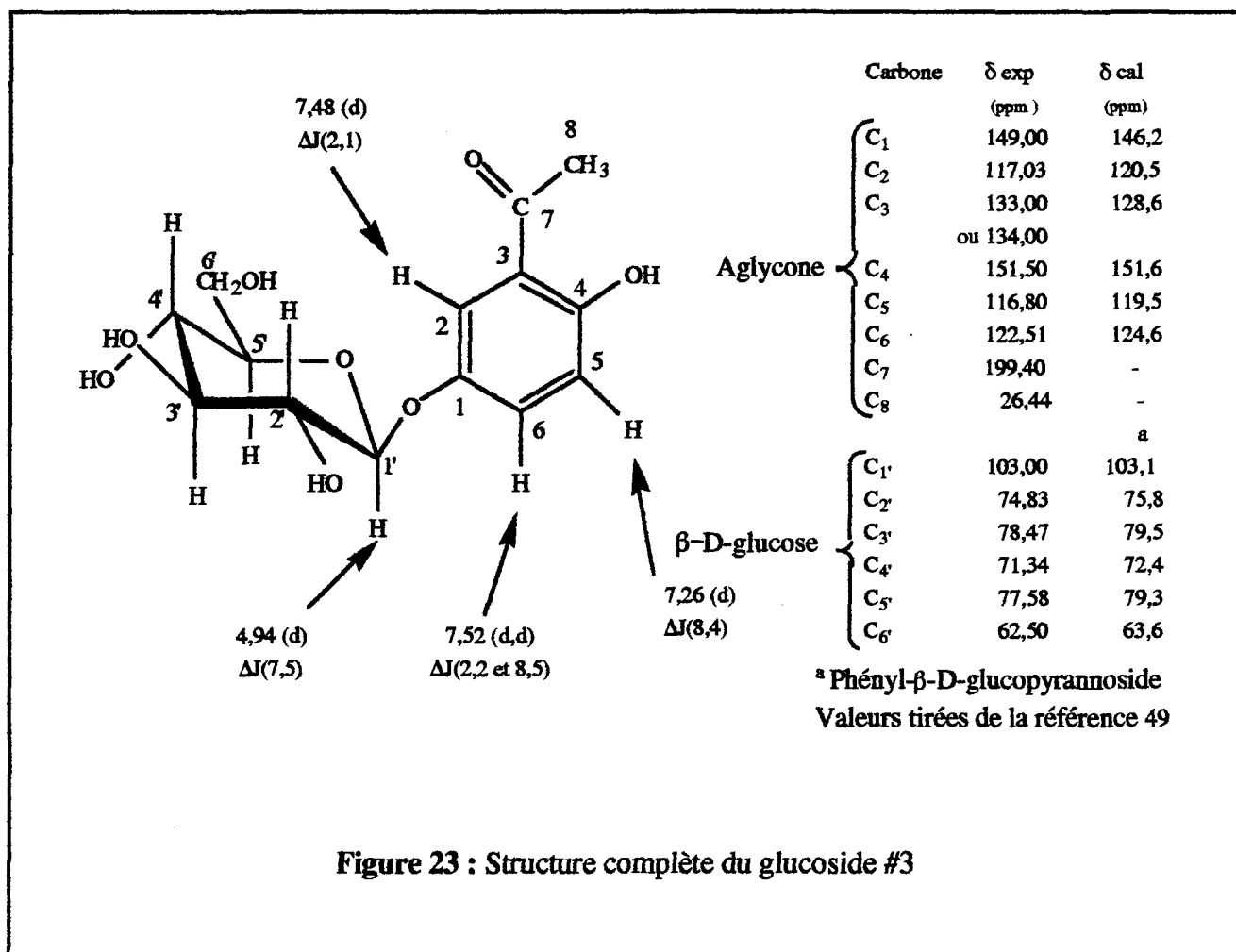


Figure 23 : Structure complète du glucoside #3

## 2.2.4 GLUCOSIDE #4

### a) Spectre de masse.

Avec l'ionisation chimique (IC) du glucoside #4, avec le méthane, nous n'avons pas pu identifier des ions caractéristiques qui peuvent nous permettre de déterminer la masse molaire du produit.

L'ionisation électronique (IE) du produit laisse présager que la masse molaire du produit peut être 342 et cela par la présence d'un ions à cet endroit. Sur le spectre de masse à IC, nous avons un pic important à 343 qui peut représenter l'ion moléculaire du glucoside plus un hydrogène qui provient du méthane.

### b) Spectres RMN du $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$

Nous pouvons facilement reconnaître les déplacements chimiques des trois protons du noyau benzénique tri-substitué aux positions 1, 3 et 4, ( $^1\text{H}$ : 6,75 ppm, d,  $\Delta J = 8,13$  Hz), ( $^1\text{H}$ : 6,88 ppm, dd,  $\Delta J = 1,96$  et 8,16 Hz) et ( $^1\text{H}$ : 7,04 ppm, d,  $\Delta J = 1,93$  Hz) (voir tableau 8). En tenant compte du fait que toutes les conditions d'analyse sont identiques pour tous les glucosides que nous avons purifiés nous sommes en présence d'un noyau aromatique tri-substitué où les substituants sont de nature différente de ceux du glucoside #1, basée en partie sur les déplacements chimiques différents des hydrogènes des deux noyaux benzéniques.

Nous avons aussi deux protons oléfiniques conjugués (6.61 ppm, d,  $\Delta J = 15,96$  Hz et 6,22 ppm, ddd,  $\Delta J = 5,88$ , 6,77 et 16 Hz). La constante ( $\Delta J = 1,96$  Hz) représente le couplage entre deux hydrogènes en trans d'une double liaison non cyclique. L'hydrogène à 6,22 ppm est

couplé avec les deux hydrogènes du méthylène (-CH<sub>2</sub>-O-) non équivalents magnétiquement ( 1H à 4,51 ppm avec  $\Delta J = 5,88$  Hz et 1H à 4,33 ppm avec  $\Delta J = 6,86$  Hz) et l'hydrogène à 6,61 ppm. Cela explique la présence d'un doublet deux fois dédoublés (ddd) à 6.22 ppm. Nous avons identifié le déplacement chimique du méthoxyle en singulet à 3.88 ppm. Nous n'avons pas observé le couplage de l'hydrogène à 6.61 ppm avec les deux hydrogènes non équivalents magnétiquement (-CH<sub>2</sub>-O-) via la double liaison.

Les résultats obtenus par le spectre du <sup>13</sup>C présentent un carbone à 56.35 ppm qui correspond au méthyle d'un méthoxy-phénol dont les protons absorbent vers 3.8 ppm, par contre ils absorbent vers 3.2 ppm quand le méthoxyle est lié à un groupement aliphatique <sup>45</sup>. Le carbone signalé à 71.72 ppm correspond au méthylène lié d'une part à la double liaison (voir couplage H-H) et d'autre part à un oxygène.

Nous avons huit pics (110.58 à 148.88 ppm) qui représentent les déplacements chimiques des carbones du noyau benzénique tri-substitué et les deux carbones de la double liaison conjugué avec le benzène ( 123.72 et 130.37 ppm).

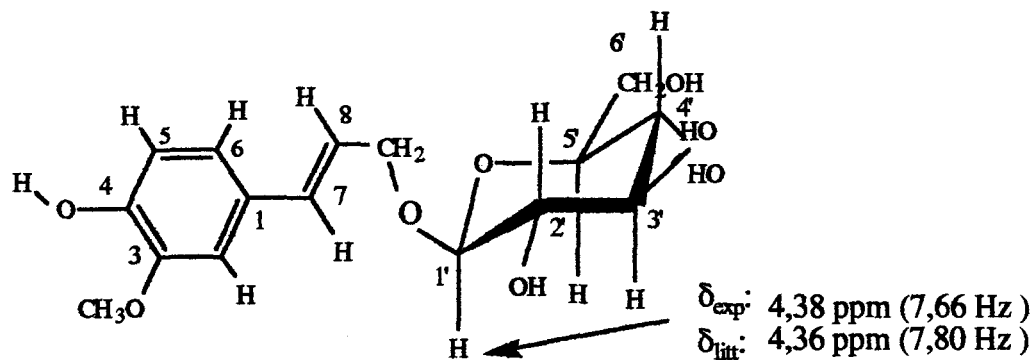
L'identification du sucre, le  $\beta$ -D-glucose est basée surtout sur la comparaison des déplacements chimiques du <sup>13</sup>C avec le glucose des glucosides #1 et #2. Nous avons les mêmes pics avec des différences inférieures à 0,5 ppm pour tous les carbones du glucose sauf pour le carbone C<sub>1'</sub> qui a 1,06 ppm de moins que celui du glucoside #1.

Jusqu'à présent nous avons déterminé la présence d'un noyau benzénique tri-substitué en position 1, 2 et 4 où, en supposant que la masse molaire du glucoside est 342, les trois substituants peuvent être soit les groupements -HC=CH-CH<sub>2</sub>O-H ( les deux H de la double liaison sont en trans ), le méthyle et le  $\beta$ -D-glucose ou le groupement -HC=CH-CH<sub>2</sub>O- $\beta$ -D-



glucose, le méthoxyle et un hydroxyle (phénol). La comparaison des déplacements chimiques du  $^1\text{H}$  avec ceux de la référence 26 suggère qu'il s'agit de guaiacylpropényl glucoside (un phénol) qui diffère de la coniférine où l'hydroxyle est lié avec le méthylène de la chaîne latérale et le glucose est lié au benzène. Tous les déplacements chimiques des hydrogènes de l'aglycone sont similaires aux déplacements chimiques de la guaiacylpropényl glucoside La différence la plus importante est de 0,04 ppm. L'hydrogène  $\text{H}'_1$  du glucose absorbe à 4,38 ppm avec une constante de couplage de 7,66 Hz et dans la référence 26, il absorbe à 4,36 ppm avec  $\Delta J = 7,8$  Hz.

Le glucoside #4 est identifié comme étant le guaiacylpropényl glucoside de formule brute  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_8$ , de masse molaire 342 g/mole et de nombre d'insaturation six ( $16-22/2+1$ ).



Proton	$\delta_{\text{exp}}$ (ppm)	$\delta_{\text{lit}}$	Couplages Hz	Carbone	$\delta_{\text{exp}}$ (ppm)	$\delta_{\text{cal}}$ (ppm)	
H <sub>2</sub>	7,04	7,01	1,93	Aglycone	C <sub>1</sub>	134,30	131,7
H <sub>5</sub>	6,75	6,73	8,13		C <sub>2</sub>	110,58	113,5
H <sub>6</sub>	6,88	6,85	1,96, 8,16		C <sub>3</sub>	148,00	147,4
H <sub>7</sub>	6,61	6,58	15,96		C <sub>4</sub>	147,72	140,5
H <sub>8</sub>	6,22	6,19	5,88, 6,77, 16		C <sub>5</sub>	116,19	117,0
H <sub>9</sub>	4,51	4,49	5,88		C <sub>6</sub>	121,16	120,2
H <sub>9'</sub>	4,33	4,29	6,86		C <sub>7</sub>	130,37	-
					C <sub>8</sub>	123,71	-
					C <sub>9</sub>	71,01	-
				β-D-glucose		a	
					C <sub>1'</sub>	103,16	103,1
					C <sub>2'</sub>	75,15	75,8
					C <sub>3'</sub>	78,15	79,5
					C <sub>4'</sub>	71,73	72,4
					C <sub>5'</sub>	78,00	79,3
				C <sub>6'</sub>	62,82	63,6	

$\delta_{\text{lit}}$ : Valeurs tirées de  
la référence 26, MeOH comme solvant

<sup>a</sup> Phényl-β-D-glucopyranoside  
Valeurs tirées de la référence 49

Figure 24 : Structure complète du glucoside #4

## CHAPITRE III

### ANALYSES DES AGLYCONES LIBÉRÉES PAR HYDROLYSES

#### 3.1 EXTRACTION ET ANALYSES DES AGLYCONES

Pour analyser les glycosides quantitativement et qualitativement nous avons eu recours à deux méthodes. La première méthode est qualitative et consiste à libérer les aglycones par hydrolyse enzymatique des glycosides préalablement extraits du matériel végétal. La deuxième méthode est quantitative et consiste à libérer les aglycones par hydrolyse acide.

L'hydrolyse enzymatique des glycosides ne permet pas une analyse quantitative, puisque les glycosides ne sont pas hydrolysés en totalité. Cela est mis en évidence par le pourcentage relatif obtenu de chaque aglycone pour chacune des deux enzymes utilisées, c'est-à-dire qu'une enzyme va hydrolyser plus efficacement une substance qu'une autre (voir plus loin). Cependant un hydrolyse enzymatique permet une analyse qualitative puisque les structures des aglycones ne sont pas supposées d'être affectées pendant et après l'hydrolyse. Une fois libérées par hydrolyse enzymatique, les aglycones sont extraites à partir de la solution de l'hydrolyse avec du pentane et l'éther ( 1:1/v:v ). Nous avons choisi le pentane et l'éther comme solvants d'extraction parce que leur point d'ébullition est très bas et permet d'éviter de perdre des aglycones très volatiles pendant l'évaporation pour réduire le volume à 0,5 mL avant de procéder à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. Comme le pentane est apolaire et ne peut pas extraire efficacement les aglycones très polaire, l'utilisation de l'éther nous a permis d'extraire des aglycones phénoliques polaires (voir tableau 19).

La deuxième méthode est quantitative et qualitative et repose sur l'analyse des aglycones libérées par hydrolyse acide (HCl : 2M) complet des glycosides contenus dans 50 g d'aiguilles. Les aiguilles sèches sont broyées en poudre fine et les substances volatiles sont extraites par l'extracteur Likens-Nickerson dans l'hexane. Après acidification de la solution qui contient les glycosides, les aglycones libérées sont extraites à leurs tours de la même façon que les substances volatiles. Les substances récupérées dans l'hexane avant et après l'hydrolyse acide sont quantifiées par la méthode d'addition d'un standard interne (tétradécane) et analysées par chromatographie en phase gazeuse. Les fraction des substances libres représente 2,33 % et la fraction liée 0,33 %. Comme on peut le constater la fraction liée des substances volatiles ne représente que le un septième de la fraction libre. Cela ne nous permet pas de dire que la fraction des substances liées ne représente pas un potentiel additionnel de substances volatiles puisqu'il est démontré, dans le cas d'autres plantes, que cette dernière varie au cours des saisons et du développement de la plante <sup>5,9</sup>. Les substances volatiles qui ont été libérées par hydrolyse acide subissent des transformations chimiques importantes. Si on compare les substances identifiées dans l'hydrolyse enzymatique (tableau 19) et l'hydrolyse acide (tableau 21), on constate que certaines substances disparaissent au profit d'autres. Dans cette étude nous n'avons pas cherché à identifier les mécanismes de transformation des structures des aglycones après hydrolyse dans un milieu acide. Comme mentionné plus haut, la raison pour laquelle nous avons utilisé l'hydrolyse acide, qui assure un hydrolyse plus efficace, est de quantifier les substances volatiles de la fraction liée. Cependant, il faut préciser que les aglycones, après hydrolyse acide, sont extraites par l'extracteur Likens-Nickerson où les substances volatiles sont entraînées par la vapeur d'eau qui se mélange avec la vapeur de l'hexane dans le réfrigérant et après condensation et séparation des deux phases, les aglycones sont récupérées dans l'hexane. Autrement dit, seules les substances très peu solubles dans l'eau sont extraites, c'est à dire les substances qui constituent les huiles essentielles. Les substances qui sont plus ou moins solubles dans l'eau ne sont pas entraînées par la vapeur d'eau. C'est la raison pour laquelle les aglycones phénoliques

(tableau 19; #25 à #31) extraites après l'hydrolyse enzymatique par des extractions liquide-liquide sont absents dans le cas de l'hydrolyse acide où les aglycones sont entraînées par la vapeur d'eau avant d'être extraites par l'hexane.

### 3.2 AGLYCONES LIBÉRÉES PAR HYDROLYSES ENZYMATIQUES

Dans le tableau 19, seules les aglycones identifiées sont présentées avec leur pourcentage relatif dans les aiguilles et les ramilles. Dans chacune des deux parties de la plante les glycosides sont hydrolysés séparément par deux enzymes, la  $\beta$ -glucosidase et la cellulase. Nous avons identifié 31 aglycones dont 14 monoterpènes. À l'exception du santène (#1) et du campholénal (#15) les autres monoterpènes sont des alcools. Le reste des aglycones sont des alcools aliphatiques et des phénols.

Sur l'ensemble des 31 aglycones quatre ne sont pas des alcools (#1, 8, 12 et 15). Deux de ces aglycones ont un pourcentage relatif important: le santène (#1) et le  $\alpha$ ,4-diméthylcylohex-3-èn-1-acétaldéhyde (#12) sont respectivement à 5,17 % et 5,92 % dans les aiguilles obtenus avec la  $\beta$ -glucosidase. La présence de ces aglycones qui ne sont pas des alcools est un phénomène très peu rencontré lorsque les glycosides d'origine végétale sont hydrolysés avec une enzyme. Le rôle principal d'une enzyme glycosidase est de couper le lien entre le sucre et l'aglycone en gardant les structures de ces derniers intactes. Le sucre et l'aglycone sont liés par un oxygène où l'enzyme attaque pour séparer les deux molécules. Après hydrolyse, l'aglycone se retrouve avec une fonction alcool. Les conditions de l'hydrolyse enzymatique, à 37 °C et pH 5, ne justifient pas la présence de substances qui n'ont pas au moins un hydroxyle. À l'exception du santène (#1) les trois autres aglycones (#8, 12 et 15) sont des aldéhydes. Cela peut laisser croire qu'il y a eu transformation des alcools en aldéhydes correspondants. Feron <sup>5</sup> a compilé 26 aglycones odorantes libérées après hydrolyse des glycosides extraits des plantes dont deux sont des

cétones, le cyclohexenone et le cyclohexadiènone, et un aldéhyde, le 3-oxo  $\alpha$ -ional. Stahl-Biskup <sup>7</sup> a identifié le  $\alpha$ -ionone après hydrolyse des glycosides, avec la  $\beta$ -glucosidase, dans les feuilles et les tiges de *Hyssopus officinalis* L.

### 3.2.1 Comparaison de l'efficacité des deux enzymes

Dans chacune des parties de l'épinette noire, aiguilles et ramilles, nous pouvons comparer l'efficacité de chacune des deux enzymes, pour une aglycone donnée, en se basant sur le pourcentage relatif obtenu par chaque enzyme. Dans les aiguilles comme dans les ramilles, en général, l'efficacité de chaque enzyme varie dans le même sens pour une aglycone donnée. Prenant l'exemple du 4-hydroxy-3-méthoxyacétophénone (#30), il est à 26,90 % et 12,89 % avec la  $\beta$ -glucosidase et la cellulase respectivement. Comme on peut le voir la  $\beta$ -glucosidase est deux fois plus efficace que la cellulase. Cette tendance est principalement respectée pour les aglycones phénoliques di-substitués: 2-hydroxy-5-méthoxyacétophénone (#25), vanilline (#29) et 4-(4-hydroxy, 3-méthoxyphényl)-butan-2-one (#31). Pour les autres aglycones aromatiques, phénylméthanol (#21) et 2-phényléthanol (#22), l'efficacité des deux enzymes est comparables sauf dans le cas de l'eugénol (#24) qui est à 0,56 % pour la  $\beta$ -glucosidase et 4,53 % pour la cellulase dans les aiguilles. Stahl-Biskup et al <sup>7</sup> ont étudié les aglycones volatiles des glycosides dans les feuilles, les tiges, les fleurs et les racines de *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae). Les aglycones ont été libérées par hydrolyse enzymatique en utilisant séparément la  $\beta$ -glucosidase et la Pectinol C. La  $\beta$ -glucosidase s'est avérée plus spécifique et elle a une grande affinité pour les glycosides phénoliques que les autres substances. Svendsen <sup>13</sup> a aussi comparé l'efficacité de ces deux enzymes pour hydrolyser des glycosides d'origine végétal. Il a trouvé que la Pectinol libère très peu d'aglycones en terme de quantité que la  $\beta$ -glucosidase. Dans notre investigation, le pourcentage relatif des aglycones terpéniques libérées par hydrolyse enzymatique est nettement plus élevé avec la cellulase que la  $\beta$ -glucosidase à l'exception du santène et le linalool. Cette

efficacité est très marquée pour le bornéol (#14), dans les aiguilles, qui est de 9,49 % avec la cellulase et 0,28 % avec la  $\beta$ -glucosidase. Quoique les différences entre les pourcentages dans chacune des deux parties de la plante pour les autres terpènes sont moins importantes, la cellulase est plus efficace que la  $\beta$ -glucosidase. Williams et al <sup>15</sup> ont comparé cinq enzymes dont la  $\beta$ -glucosidase et la cellulase. Ils ont qualifié la cellulase comme étant la plus commode pour des analyses qualitatives des aglycones volatiles des glycosides d'origine végétale. Dans une autre étude comparative de l'efficacité de quinze systèmes enzymatiques produits industriellement, compte tenu des résultats obtenus, le Rohament CW avec la cellulase dont l'activité enzymatique dominante est le plus efficace. Pour les aglycones qui ne sont ni aromatiques ni terpénique (#3 à #7), la  $\beta$ -glucosidase est plus efficace.

### 3.2.2 Nature et abondance des aglycones dans les conifères

Svendsen et al <sup>14</sup> ont étudié les aglycones libérées par hydrolyse enzymatique avec la  $\beta$ -glucosidase dans les feuilles et les aiguilles de 16 conifères dont trois sont des épinettes (*Picea abies* (L.) Karst., *Picea omorika* (Panic) Purkyne et *Picea pungens* Engelm.). Seulement 8 aglycones sont identifiées pour l'ensemble des 16 conifères. Quatre d'entre elles sont des aglycones aliphatiques, deux aromatiques et deux monoterpènes. Nous allons comparer les aglycones que nous avons identifié dans l'épinette noire (*Picea mariana*) avec ceux identifiées par Svendsen dans les 16 espèces de conifères.

#### a) Alcools aliphatiques non terpéniques

Les aglycones, ( cis-hex-3-én-1-ol, hexan-1-ol, oct-1-én-3-ol, octan-3-ol ) identifiées par Svendsen, sont détectées dans presque toutes les espèces de conifères étudiés <sup>14</sup>. Dans l'épinette noire qui est le sujet de notre recherche, nous n'avons pas détecté le oct-1-én-3-ol et le octan-3-ol. Par contre nous avons identifié d'autres alcools ramifiés, le 2,3-diméthylpentan-2-ol (#2), 3,4-

d'autres chercheurs semble conduire aux mêmes conclusions; que sous forme de glycosides les phénols sont plus stables et plus solubles dans l'eau que les phénols libres, et une fois séparés des sucres ils sont oxydés et se polymérisent en lignine.

### c) Les monoterpènes

Sur les 16 espèces étudiées par Svendsen le  $\alpha$ -terpinéol est détecté seulement dans cinq d'entre elles. Dans les trois épinettes, seulement un des deux monoterpènes est détecté, le  $\alpha$ -terpinéol à un pourcentage inférieur à 0,5 %. Dans *Picea Mariana* qui est le sujet de notre investigation, le  $\alpha$ -terpinéol est détecté dans les aiguilles seulement avec la cellulase à 0,22 %. Dans les ramilles il est de 1,33 % libéré avec la cellulase et il n'est que de 0,25 % avec la  $\beta$ -glucosidase. Le deuxième monoterpène, le terpine-4-én-1-ol, est détecté dans la moitié des conifères mais il n'est détecté dans aucune des trois épinettes. Dans l'épinette noire nous l'avons détecté à 5.89 % dans les ramilles, avec la cellulase.

Contrairement à certaines études des substances volatiles sous forme de glycosides dans les plantes, la présente étude révèle un grand nombre de monoterpènes sous forme de glycosides. Le fait le plus important à souligner est relatif aux structures de ces monoterpènes glycosides détectés dans l'épinette noire (voir tableau 20). Dans la majorité des plantes étudiées, on trouve au moins un de ces monoterpènes sous forme de glycoside. Stahl-Biskup <sup>2</sup> en 1987 a fait une étude statistique des monoterpènes glycosides et les a énuméré avec le nombre de fois détectées dans les plantes. Parmi ces monoterpènes on trouve, le géraniol (10 fois), le linloul (7 fois), le  $\alpha$ -terpinéol (4 fois), le citronellol (3 fois), le terpine-4-én-1-ol(1 fois) et le bornéol (1 fois). Il est accepté que ces monoterpènes jouent un rôle clé dans la biosynthèse des monoterpènes qu'on trouve dans les huiles essentielles <sup>7</sup>. Il est intéressant qu'un grand nombre de substances volatiles glycosidiques ne se trouvent pas sous forme libre dans une plante <sup>6</sup>. Le groupe de recherche



"LASEVE" a étudié la composition de l'huile essentielle de l'épinette noire échantillonné dans le même site que celui étudié dans le présent travail, et 39 terpènes ont été identifiés <sup>54</sup>. Aucune des aglycones aliphatiques non terpénique ou phénolique n'a été détectée dans l'huile essentielle. Dans notre investigation dans l'épinette noire, nous avons trouvé seulement six monoterpènes (#1, 9, 10, 13, 14 et 20) sur quatorze qui sont présents dans l'huile essentielle (voir tableau 20). Cependant, il est à noter que l'acétate de bornyle représente jusqu'à 41,8 % de l'huile essentielle, et il est de 9,49 % sous forme de glycoside (dans les aiguilles hydrolysé avec la cellulase). Le monoterpène qui représente une différence très importante est le linalool. On le trouve sous forme de glycoside à 20,08 % (dans les aiguilles hydrolysées avec la  $\beta$ -glucosidase) et il est inférieur à 0,1 % dans l'huile essentielle. La différence entre les pourcentages des monoterpènes sous forme liée et libre, principalement pour le bornéol et le linalool dans l'épinette noire, soutient le rôle suggéré pour les monoterpènes glycosides.

TABLEAU 19

**Aglycones volatiles libérées par  
hydrolyses enzymatiques**

No	Identification	Aiguilles		Ramilles	
		% H.E. <sup>a</sup>	% H.E. <sup>b</sup>	% H.E. <sup>a</sup>	% H.E. <sup>b</sup>
1	<u>Santène</u>	5,17	1,38	3,49	0,13
2	2,3-Diméthylpentan-2-ol	0,32	0,09	0,41	0,06
3	2,4-Diméthyl-pentan-3-ol	0,12	-	-	-
4	2-Déthylbut-2-én-1-ol	0,23	0,50	0,29	0,17
5	Hexan-1-ol	0,17	-	4,22	2,04
6	2-Déthylhexan-2-ol	0,98	1,12	-	-
7	cis-Hex-3-én-1-ol	1,80	1,88	2,25	0,59
8	<u>Benzaldéhyde</u>	1,03	0,07	0,10	0,11
9	Linalool	20,08	7,42	18,42	3,61
10	Terpine-4-én-1-ol	-	0,13	0,49	5,89
11	trans-Pinocarvéol	-	0,13	-	1,58
12	<u>α,4-Diméthylcyclohex-3- én-1-acétaldéhyde</u>	5,92	1,24	0,83	0,06
13	α-Terpinéol	-	0,22	0,25	1,33
14	Bornéol	0,28	9,49	0,28	8,38
15	<u>Campholénal</u>	0,89	1,26	0,66	0,74
16	Citronellol	0,09	-	1,08	1,70
17	Myrténol	0,38	2,92	0,49	0,87
18	<b>Monoterpénol ?</b>	5,20	9,03	1,50	3,37
19	para-Cymén-8-ol	0,09	0,16	0,76	0,45
20	Géraniol	0,06	0,71	0,13	1,04
21	Phénylméthanol	1,99	2,12	2,22	2,48
22	2-phényléthanol	0,19	0,80	2,48	2,54
23	Alcool erillique	0,73	1,69	0,38	0,51
24	Eugénol	0,56	4,53	1,52	1,47

25	2-Hydroxy-5-méthyl- acétophénone	0,85	0,65	1,08	0,31
26	p-(2-Méthylallyl)- Phénol	0,26	0,30	1,62	1,19
27	trans-Cinnamyl alcool	1,71	0,67	1,59	0,65
28	iso-Eugénol	0,15	-	0,79	1,48
29	Vanilline	3,30	2,17	3,33	1,23
30	4-Hydroxy-3-méthoxy- acétophénone	26,90	12,89	4,79	1,99
31	4(4hydroxy, 3-méthoxyphényl)-Butan-2-one	4,38	2,16	8,70	3,33

---

% H.E.<sup>a</sup> : % obtenu par hydrolyse enzymatique avec le  $\beta$ -Glucosidase;

% H.E.<sup>b</sup> : % obtenu par hydrolyse enzymatique avec la Cellulase;

\_\_\_\_\_ Les produits soulignés ne sont pas des alcools.

TABLEAU 20

**LES AGLYCONES TERPÉNIQUES LIBÉRÉES PAR  
HYDROLYSES ENZYMATIQUES**

No	Identification	Formule (M <sup>t</sup> )	% (β-glu.)	% (Cel.)	% HE.
1	Santène	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> (122)	5,17	1,38	1,9
9	Linalool	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O (154)	20,08	7,42	< 0,1
10	Terpine-4-én-1-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O (154)	-	0,13	< 0,1
11	Trans-pinocarvéol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (152)	-	0,13	-
12	α,,4-DiméthylCyclohex-3- én-1-acétaldéhyde	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (152)	5,92	1,24	-
13	α-Terpinéol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O (154)	-	0,22	0,5
14	Bornéol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O (154)	0,28	9,49	0,8
15	Campholénal	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (152)	0,89	1,26	-
16	Citronello	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O (156)	0,09	-	-
17	Myrténo	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (152)	0,38	2,92	-
18	Monoterpéno ?	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (152)	5,20	9,03	?
19	para-Cymén-8-ol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O (150)	0,09	0,16	-
20	Géranio	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O (154)	0,06	0,71	< 0,1
21	Alcool perillique	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (152)	0,73	1,69	-

M<sup>t</sup> : Poids moléculaire;

% (β-glu.) : % obtenu par hydrolyse enzymatique avec la β-Glucosidase;

% (Cel.) : % obtenu par hydrolyse enzymatique avec la Cellulase;

% HE. : Monoterpènes identifiés dans l'huile essentielle de l'épinette noire.

TABLEAU 21

**AGLYCONES VOLATILES LIBÉRÉES PAR HYDROLYSE  
ACIDE DES GLYCOSIDES**

No	Identification	Formule (M <sup>+</sup> )	%	% HE.
1	Santène	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> (122)	4.03	1.9
2	para-Cymène	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> (134)	5.80	< 0.5
4	cis-Hex-3-én-1-ol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O (100)	0.08	-
5	Citronellal	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O (154)	3.36	< 0.5
6	Benzaldéhyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O (106)	2.50	-
7	Linalool	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> (158)	10.82	< 0.5
8	Terpine-4-én-1-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O (154)	0.04	< 0.5
9	trans-Pinocarvéol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (152)	1.06	-
10	α-Terpinéol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O (154)	1.11	0.5
11	Bornéol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O (154)	2.38	0.8
12	Pipéritone	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (152)	2.31	< 0.5
13	Campholénal	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (152)	0.21	-
14	Phénylméthanol	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O (108)	0.86	-
15	2-Phényléthanol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O (122)	1.89	-

**M<sup>+</sup>** : Poids moléculaire;

**%** : % obtenu par hydrolyse acide des aiguilles;

**% HE.** : Monoterpènes identifiés dans l'huiles essentielle de l'épinette noire.

**CONCLUSION**

Tel que cité dans le titre du projet, celui-ci portait sur l'analyse chimique des glycosides extraits de *Piceae mariana* (Mill.) B.S.P. L'analyse et la nature des résultats obtenus ne nous permettent pas d'établir une conclusion unique et définitive, mais plutôt de présenter différentes conclusions possibles dont la réponse finale nécessiterait une continuité au projet.

Ainsi, l'analyse chimique des extraits de l'épinette noire nous a révélé la présence de substances volatiles sous forme de glycosides qui ne sont pas extraites par les méthodes conventionnelles utilisées pour l'extraction des huiles essentielles.

Les résultats obtenus par les deux méthodes d'analyse des glycosides, avec ou sans transformation chimiques, ne nous permettent pas de faire un lien entre les deux. Par contre, cela nous permet d'appuyer le fait que le sucre majeur qui constitue les glycosides est le  $\beta$ -D-glucose. Dans les quatre glycosides qui sont purifiés et analysés, le sucre est le  $\beta$ -D-glucose. Nous avons proposé une structure pour chacun de ces quatre glycosides basée sur des données spectroscopiques, en l'occurrence la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13. Quoique ces données ne nous permettent pas d'identifier définitivement les glycosides, les structures proposées pour les glucosides #1 et #4, des produits connus, sont conformes aux données de la littérature. Aussi les substances libérées par hydrolyse enzymatique sont supposées être des substances liées au  $\beta$ -D-glucose puisque les deux enzymes utilisées, la  $\beta$ -glucosidase et la cellulase, sont spécifiques pour hydrolyser les  $\beta$ -D-glucopyranosides. Il reste que la  $\beta$ -glucosidase est plus efficace pour hydrolyser les glucosides phénoliques et la cellulase les glucosides terpéniques.

Les substances hydrolysées et extraites, des aiguilles et des ramilles, ne présentent pas de différences au niveau des structures. Cela nous permet de conclure que les mêmes glycosides se trouvent dans les deux parties de la plante. Nous avons identifié 31 aglycones comparativement

à Svendsen <sup>14</sup> qui a identifié huit aglycones dans 16 conifères. Comme nous l'avons indiqué dans la discussion, la méthode d'extraction liquide-liquide permet d'extraire plus efficacement les aglycones polaires et non polaires que l'extracteur Likens-Nickerson. Dans ce dernier, les substances sont entraînées par la vapeur d'eau qui est portée à ébullition et par conséquent on court le risque de transformer les structures chimiques des aglycones.

Dans l'éventualité d'une poursuite de l'étude des glycosides de l'épinette noire, il serait intéressant d'explorer:

- La variation de la nature et de la concentration, au cours des saisons, des substances volatiles liées aux sucres, dans les aiguilles comme dans les ramilles, par rapport à celle des produits qui ne sont pas liées à des sucres.

- L'influence de l'hydrolyse enzymatique sur les structures de certaines aglycones qu'on ne trouve pas sous forme d'alcools.

- L'analyse spectroscopique de glucosides monoterpènes purifiés par chromatographie en phase liquide.

Dans la réalisation de ce projet de recherche, les objectifs personnels ont été atteints. En plus de me permettre la finalisation de ma Maîtrise en Ressources Renouvelables, j'ai acquis et approfondi des connaissances dans certaines techniques d'extraction, de purification et d'analyses spectroscopiques. Mais le plus important c'est de réaliser que sans la patience et la persévérance, que tout chercheur ou chercheuse doivent posséder, on ne peut mener à terme un projet de recherche dans lequel il y a toujours des obstacles qu'il faut franchir pour avancer.

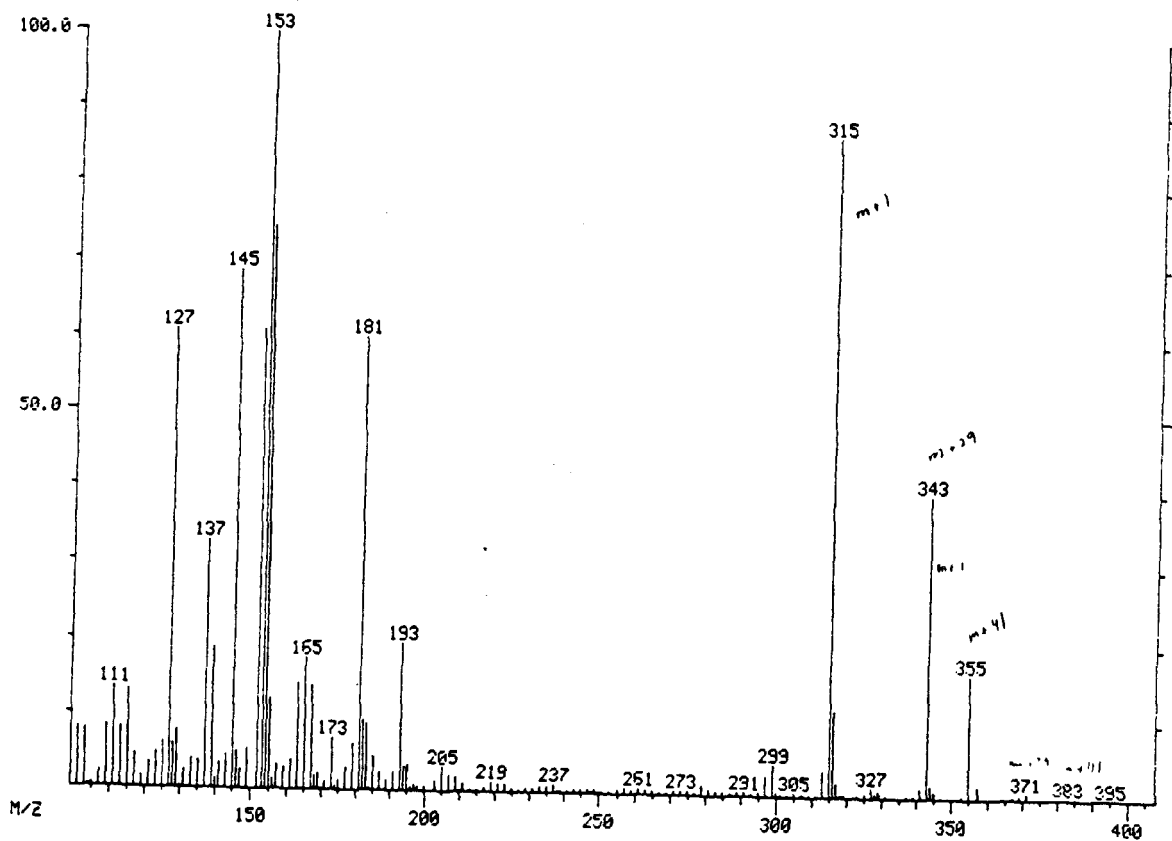
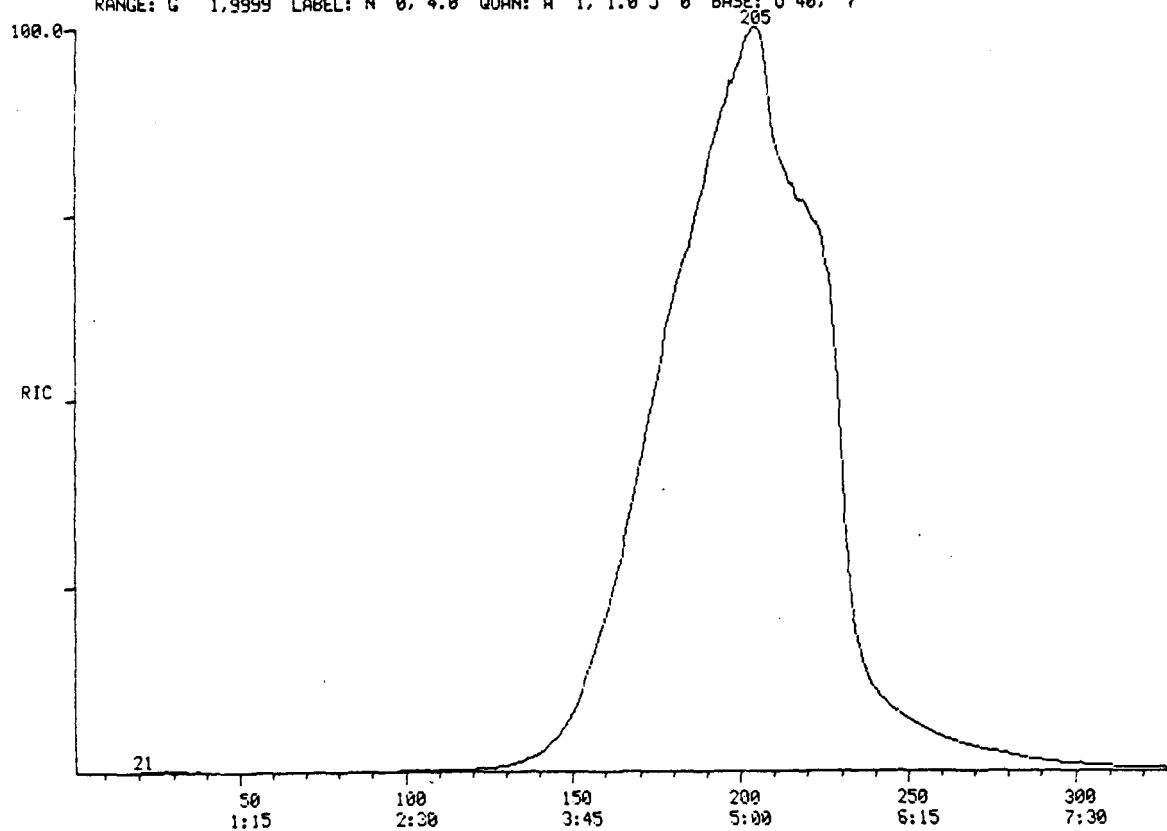


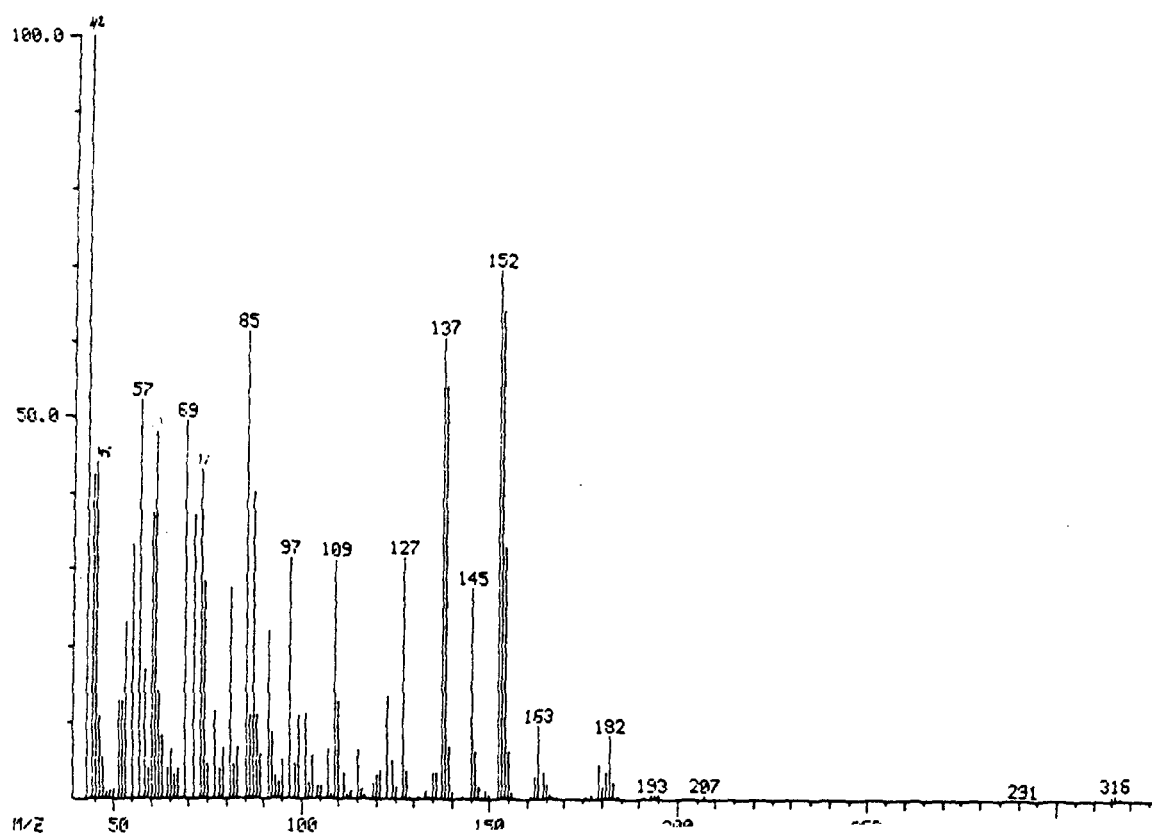
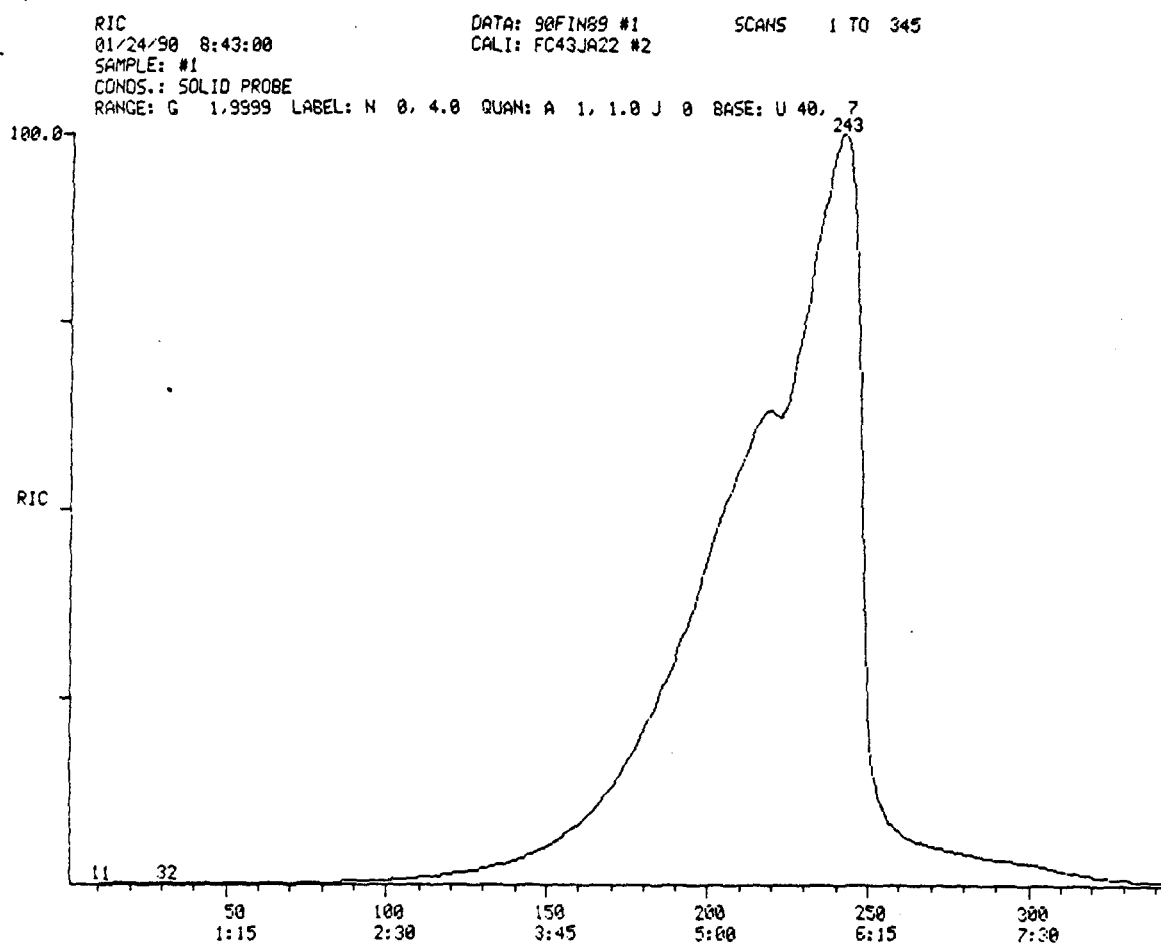
**ANNEXE I**

**SPECTRES DES GLUCOSIDES PURIFIÉS.**

### Glucoside #1: Spectre de masse à ionisation chimique.

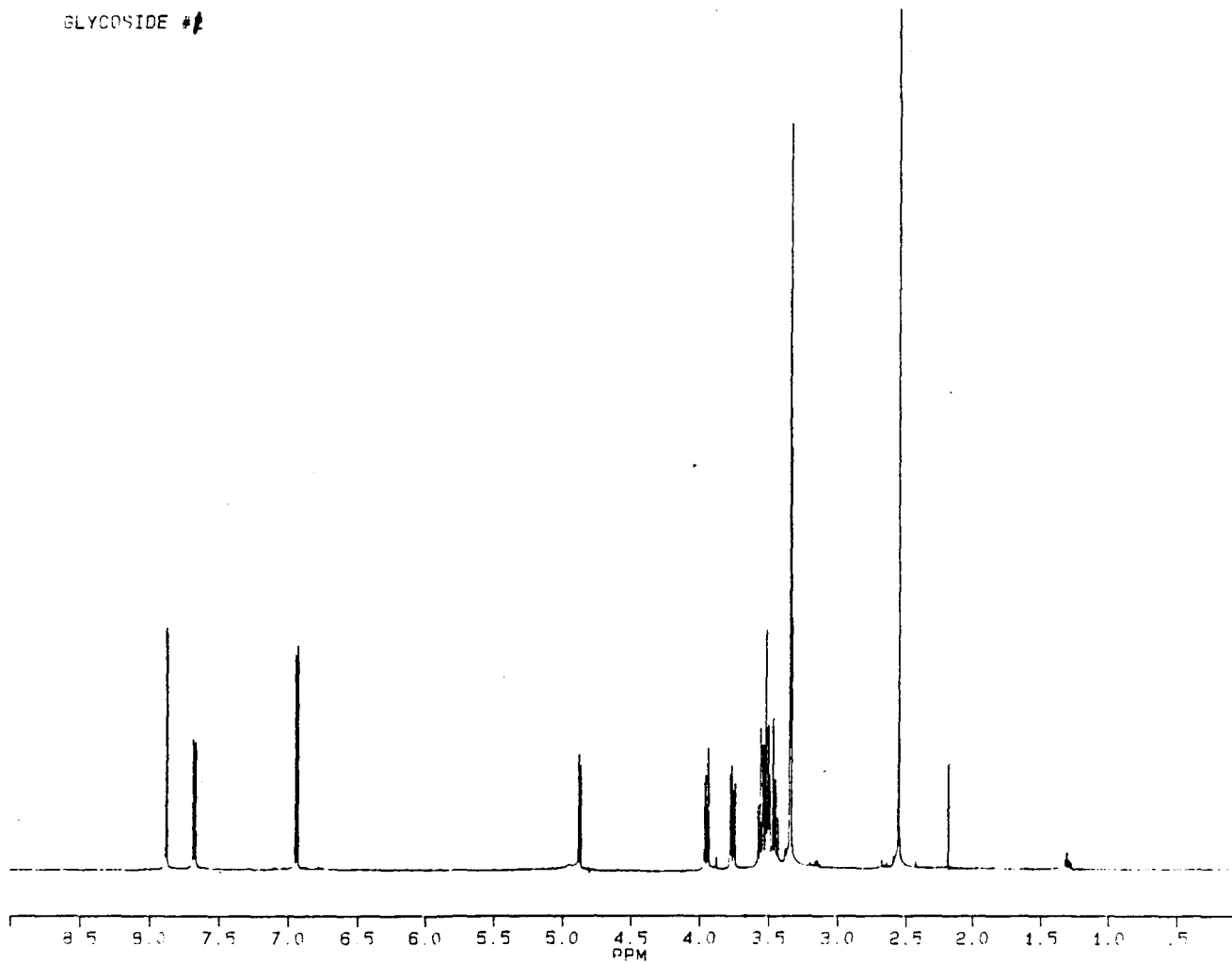
RIC DATA: 90FIN92 #169 SCANS 1 TO 330  
 01/24/90 10:53:00 CALI: FC43J17 #3  
 SAMPLE: #1  
 CONDS.: SOLID PROBE CI-ME  
 RANGE: G 1.9999 LABEL: N 0, 4.0 QUAN: A 1, 1.0 J 0 BASE: U 40, 7

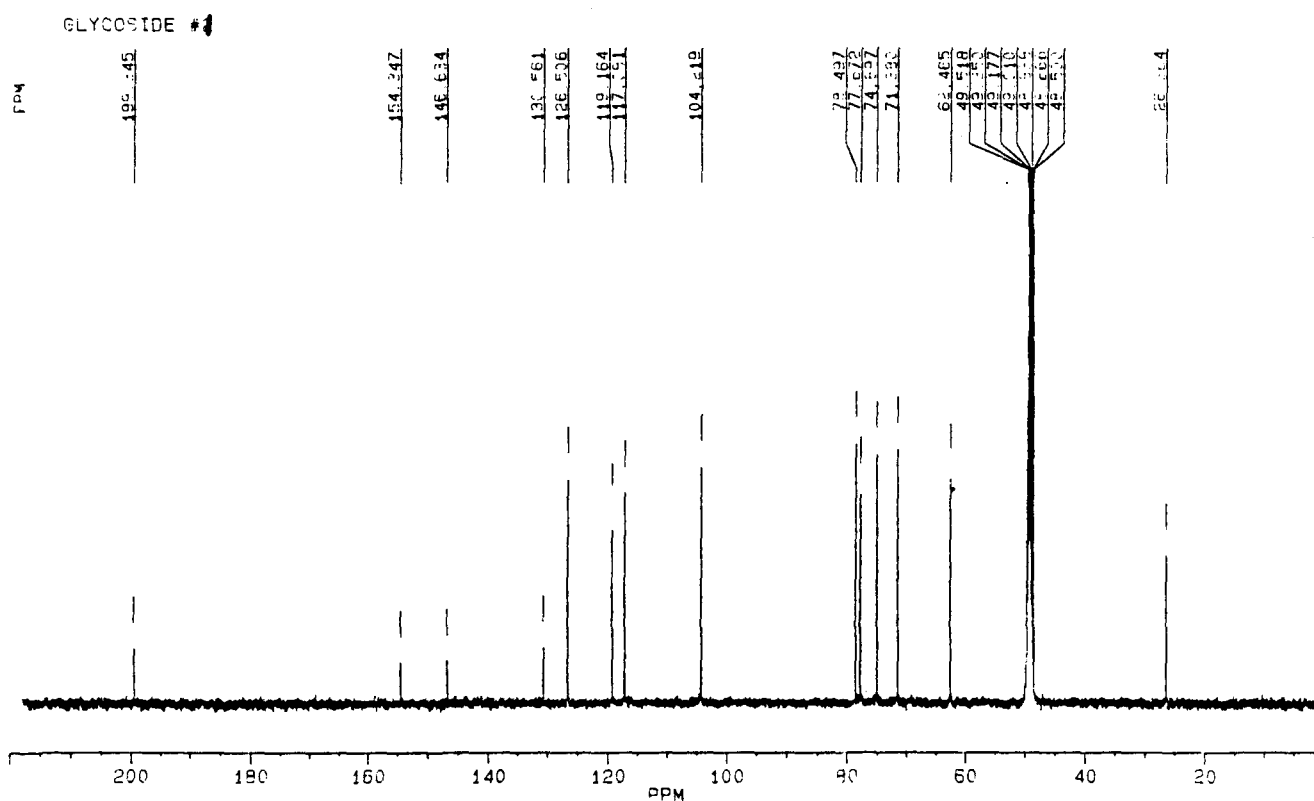


**Glucoside #1: Spectre de masse à ionisation électronique.**

Glucoside #1: Spectre de RMN  $^1\text{H}$ .

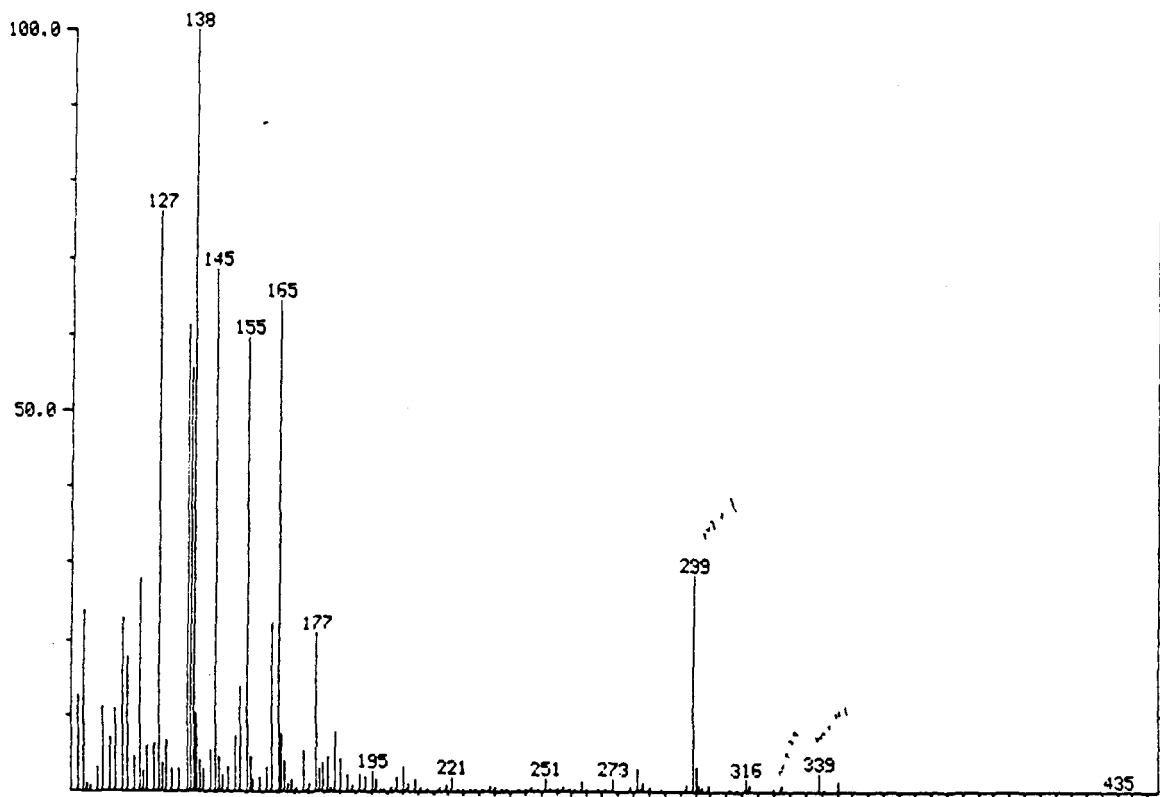
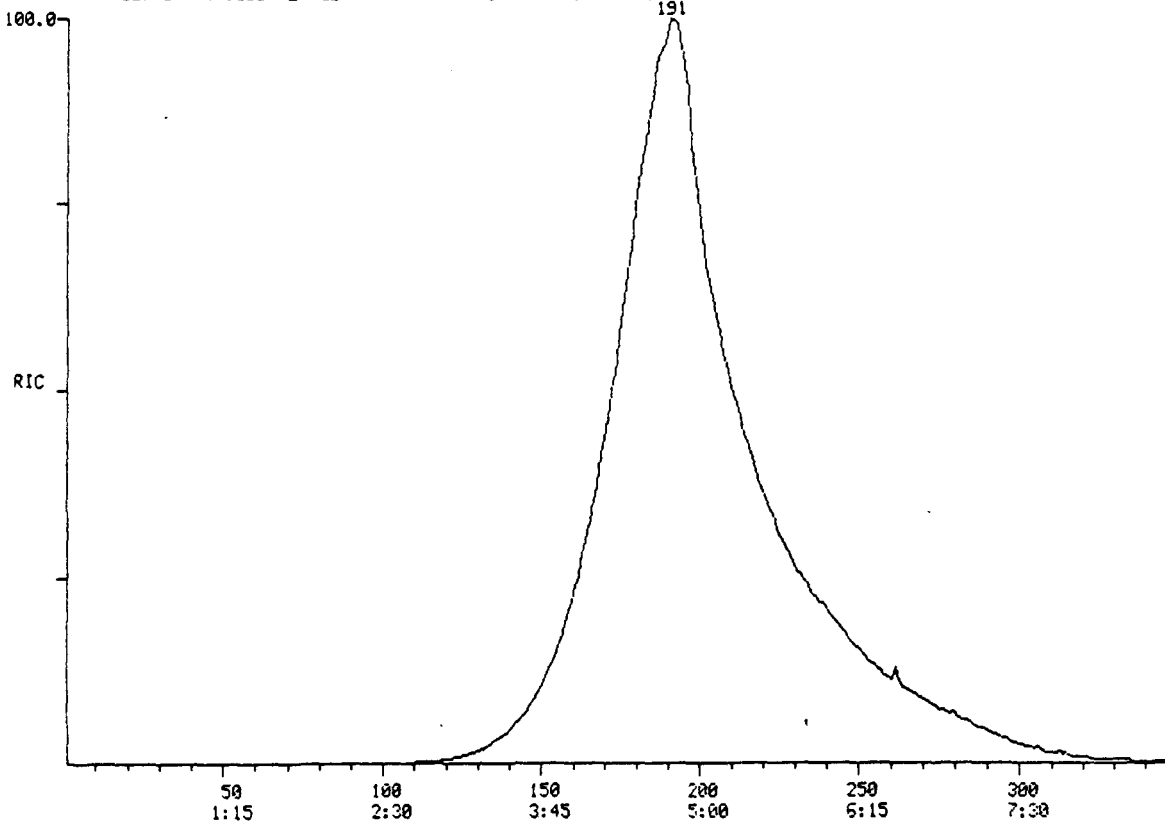
GLYCOSIDE #1

ADSK148H.2  
Jan 20/21

Glucoside #1: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ .APSRM8C.2  
Jan 20/91

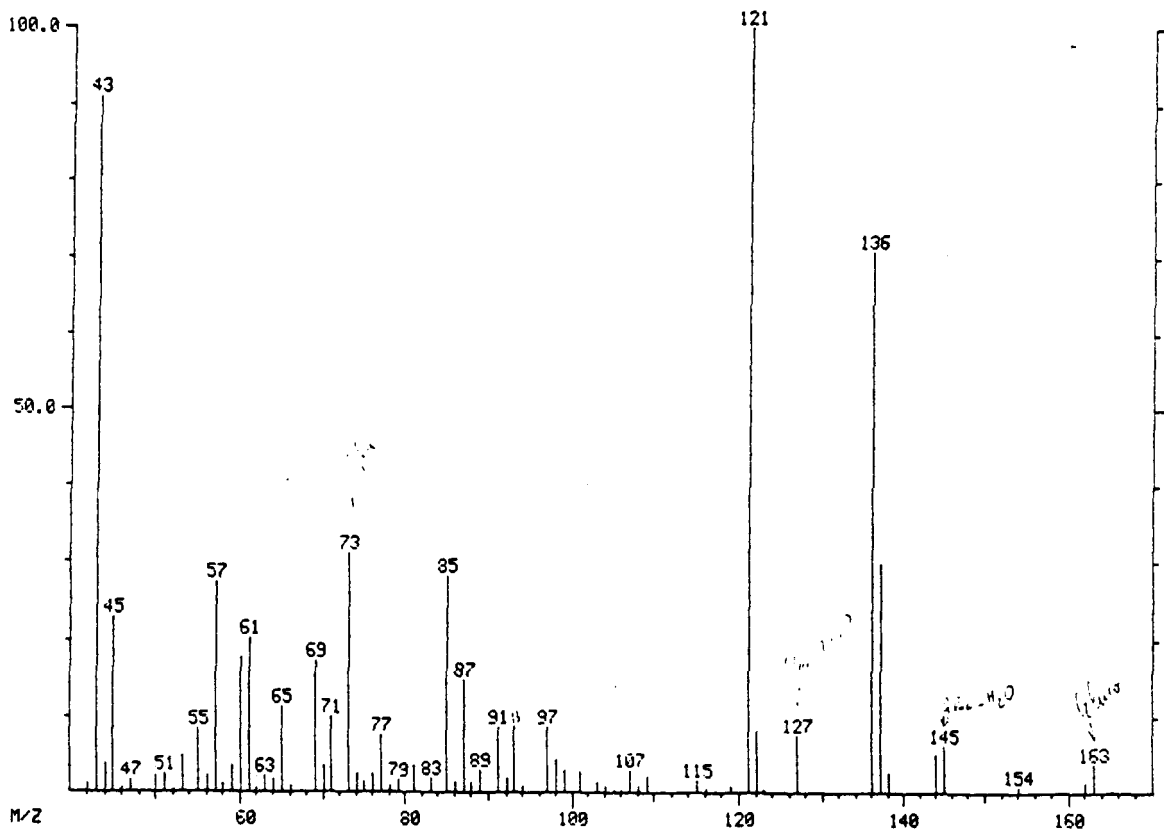
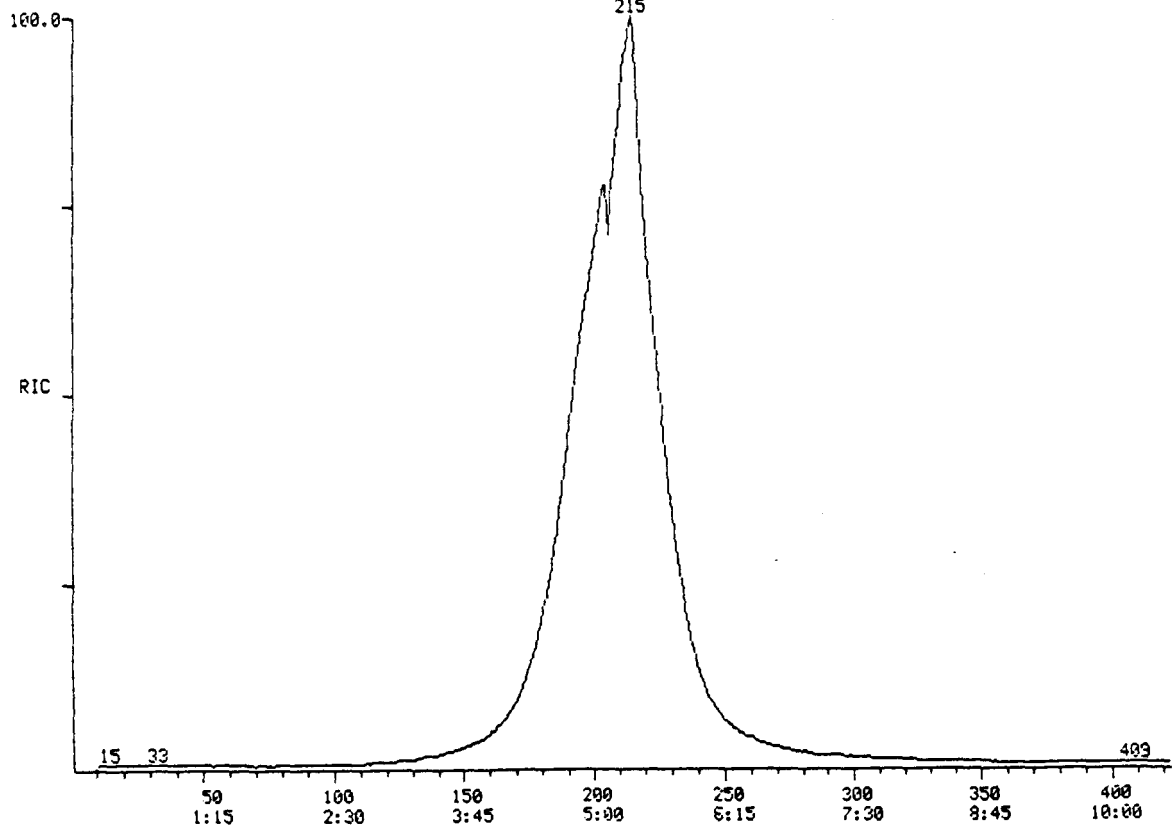
**Glucoside #2: Spectre de masse à ionisation chimique.**

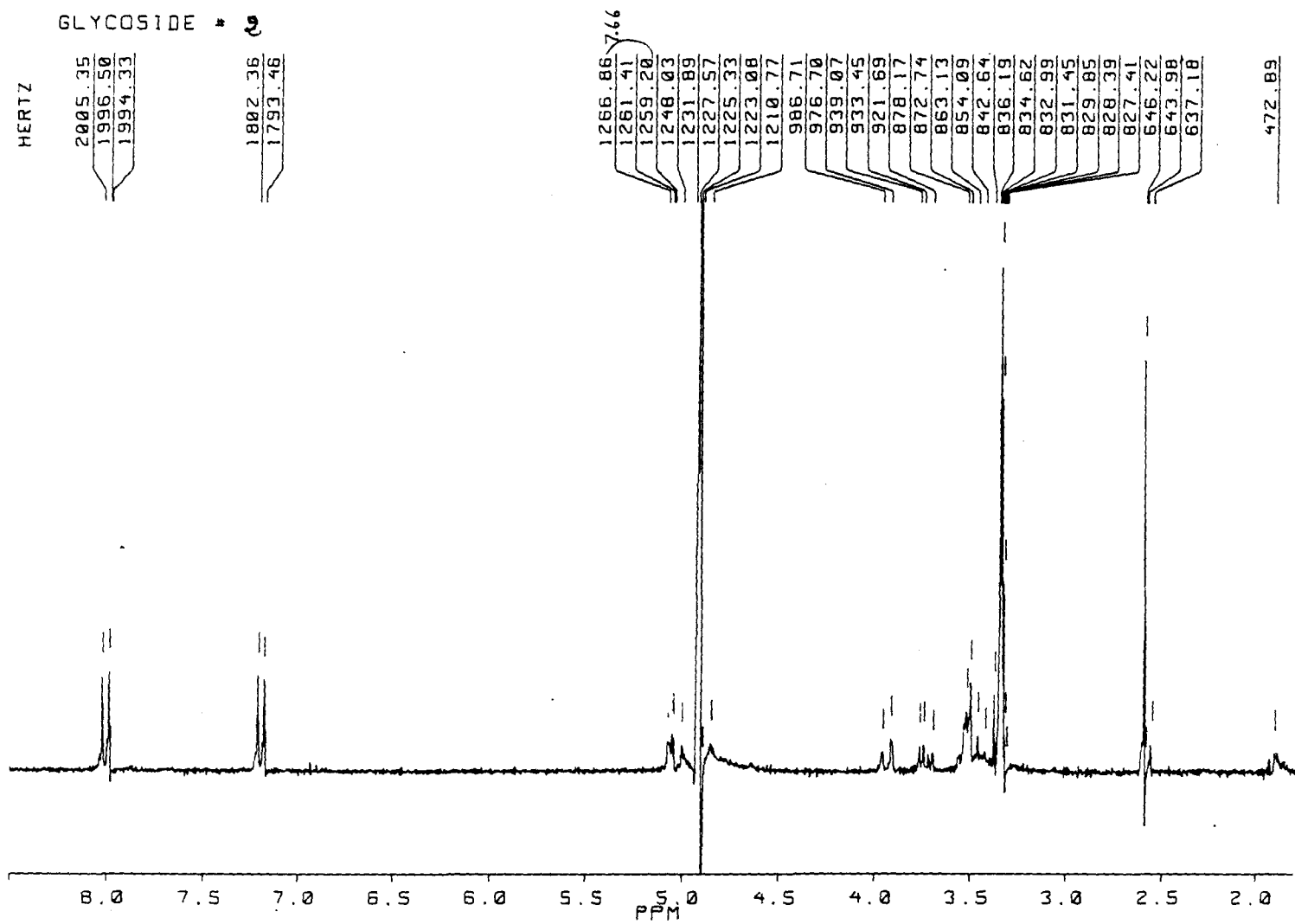
RIC DATA: 90FIN98 #1 SCANS 1 TO 347  
 01/24/90 14:16:00 CALI: FC43J17 #3  
 SAMPLE: #2  
 CONDS.: SOLID PROBE CI-ME  
 RANGE: G 1.9999 LABEL: N 0, 4.0 QUAN: A 1, 1.0 J 0 BASE: U 40, 7



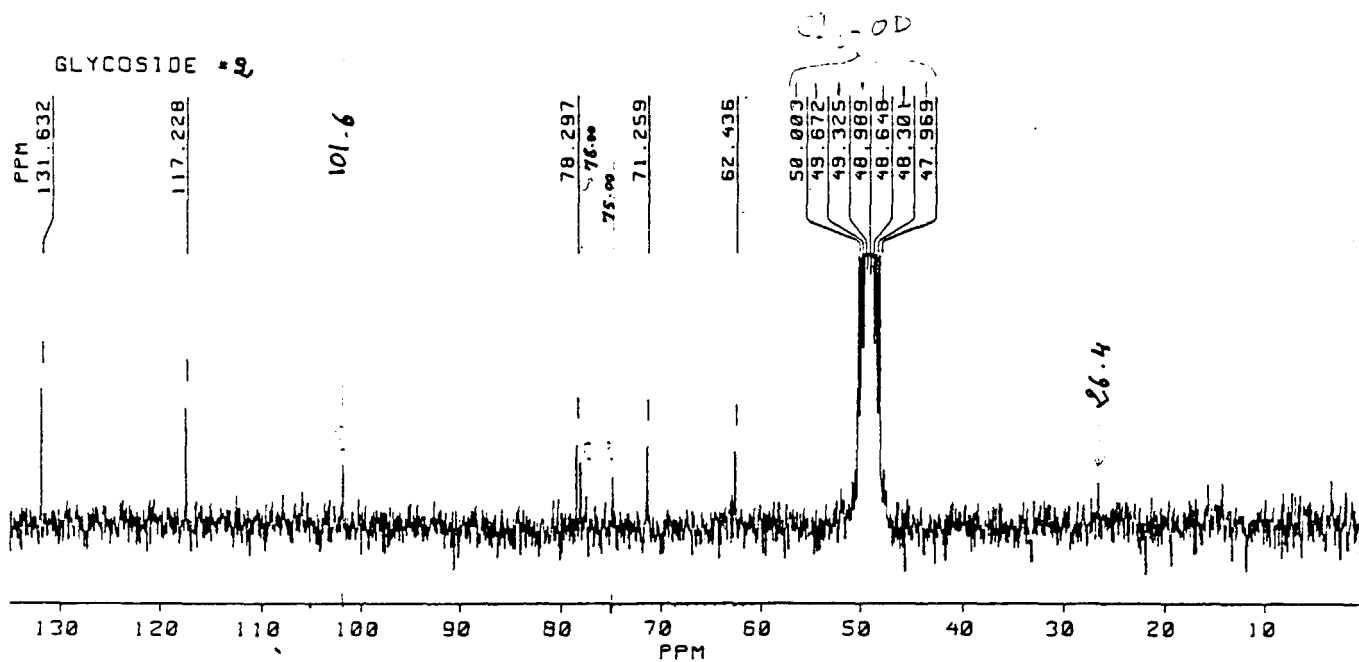
### Glucoside #2: Spectre de masse à ionisation électronique.

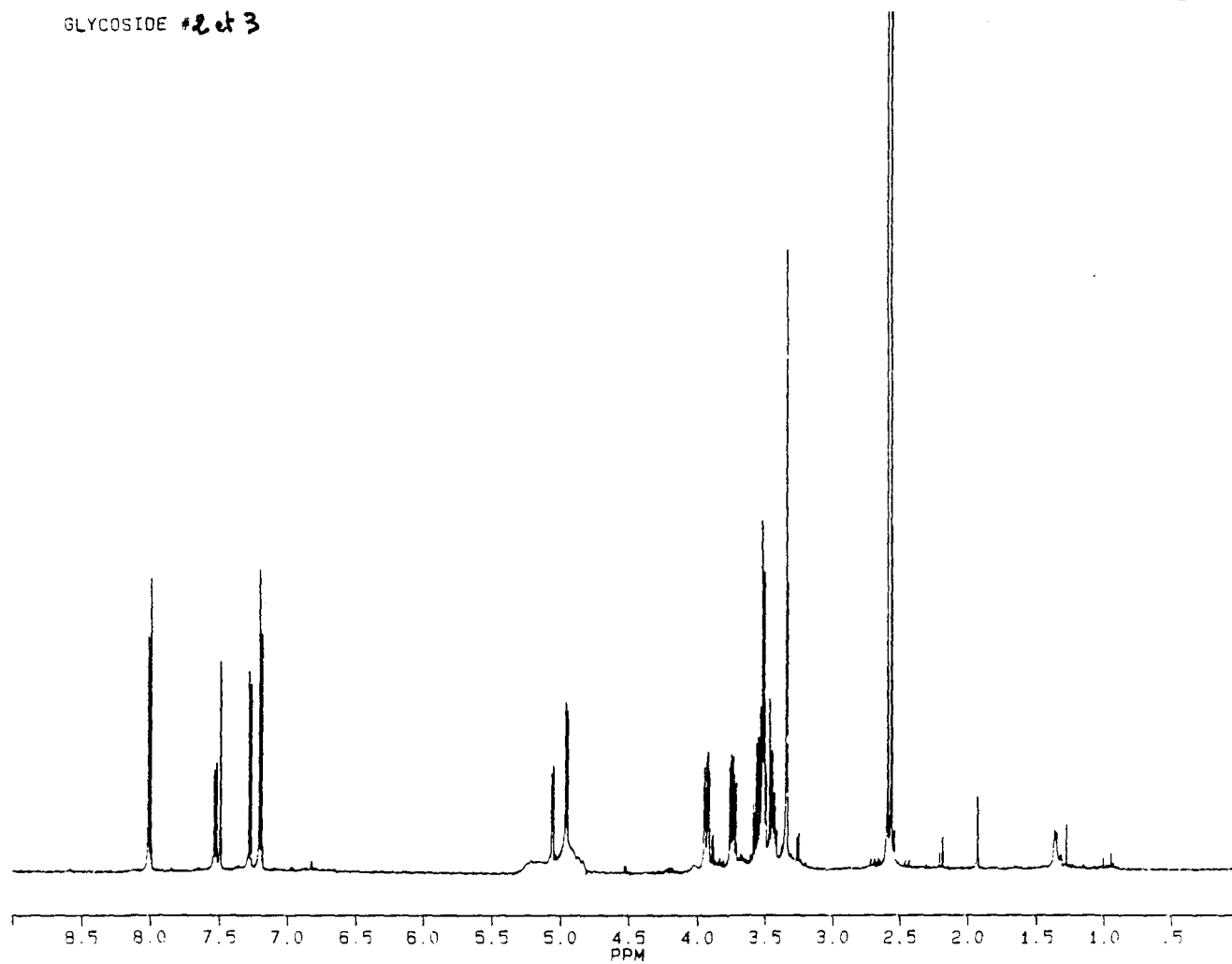
RIC DATA: 98FIN84 #1 SCANS 1 TO 423  
01/23/90 14:32:00 CALI: FC43JA22 #2  
SAMPLE: #3  
COND.: SOLID PROBE  
RANGE: G 1.9999 LABEL: N 0, 4.0 QUAN: A 1, 1.0 J 0 BASE: U 40, 7

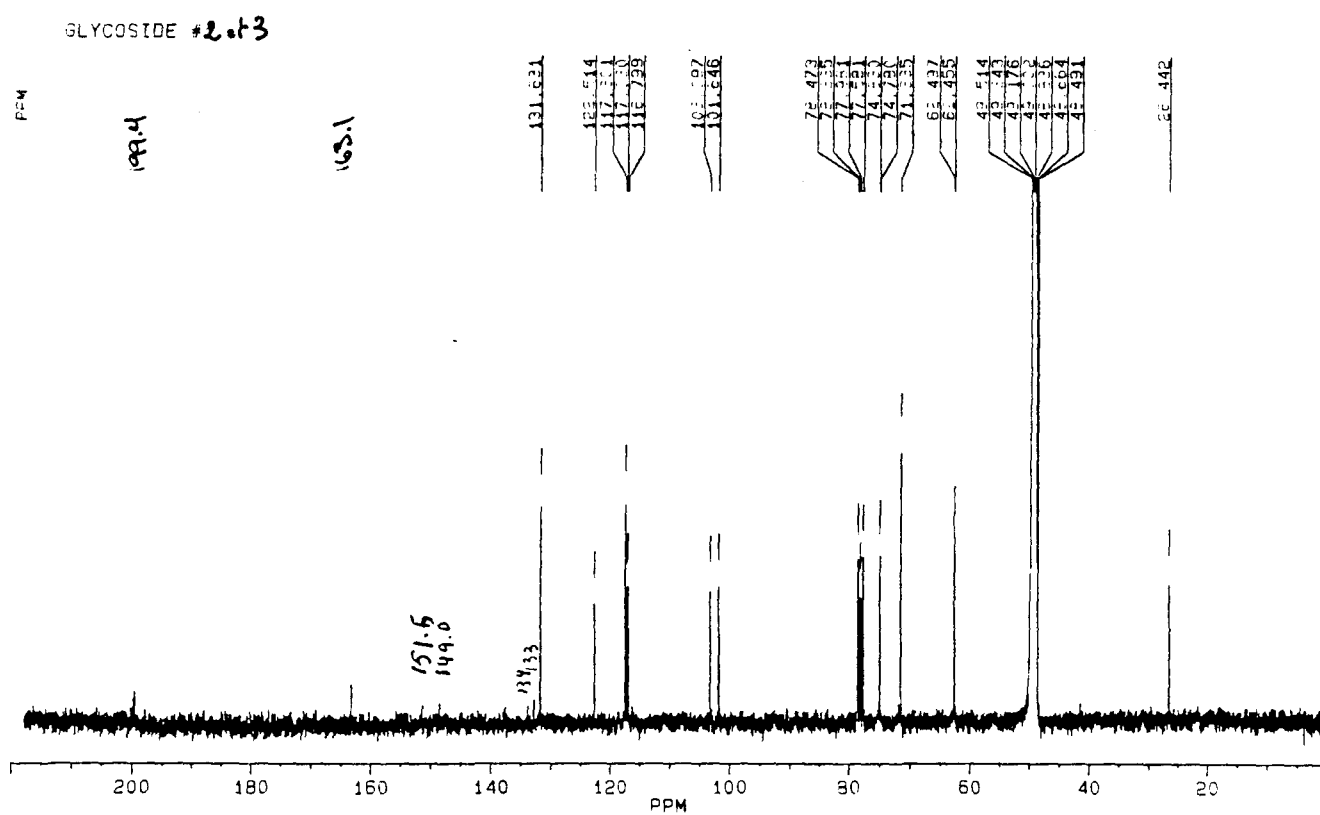


Glucoside #2: Spectre de RMN <sup>1</sup>H.



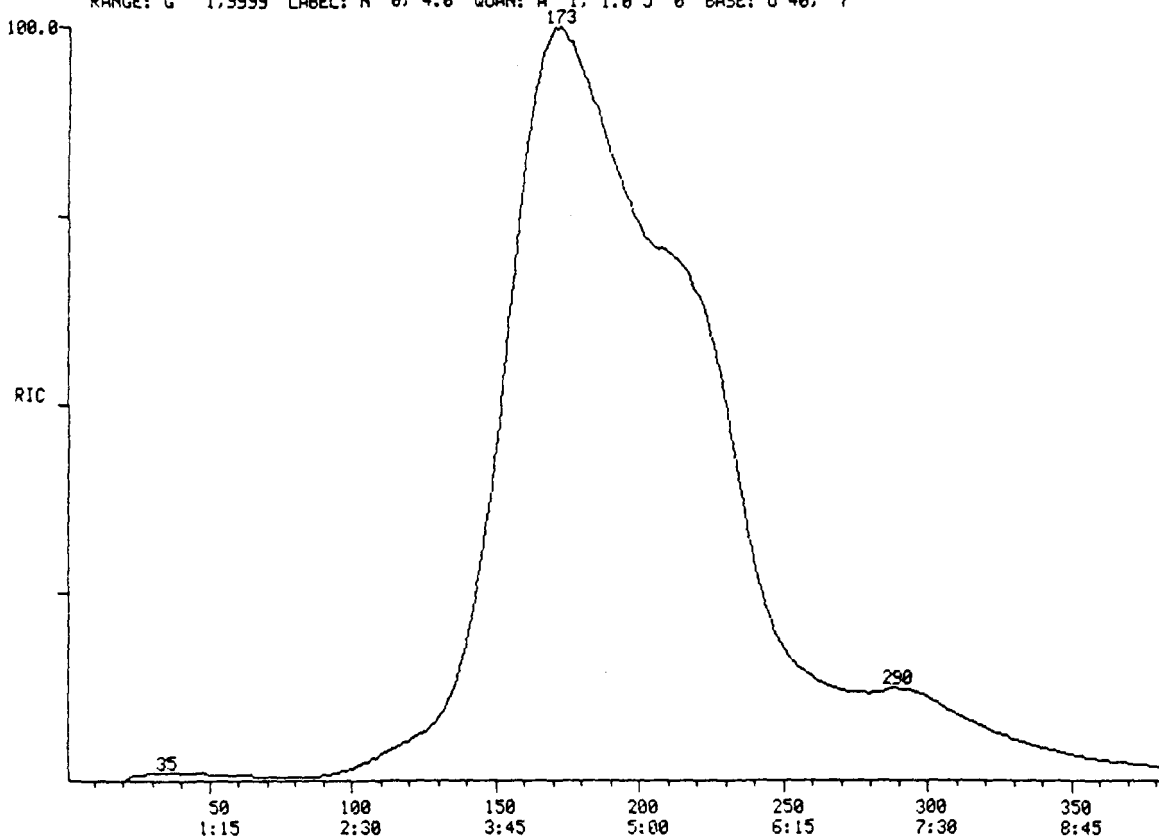
Glucoside #2: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ .

Glucosides #2 et #3: Spectre de RMN  $^1\text{H}$ .

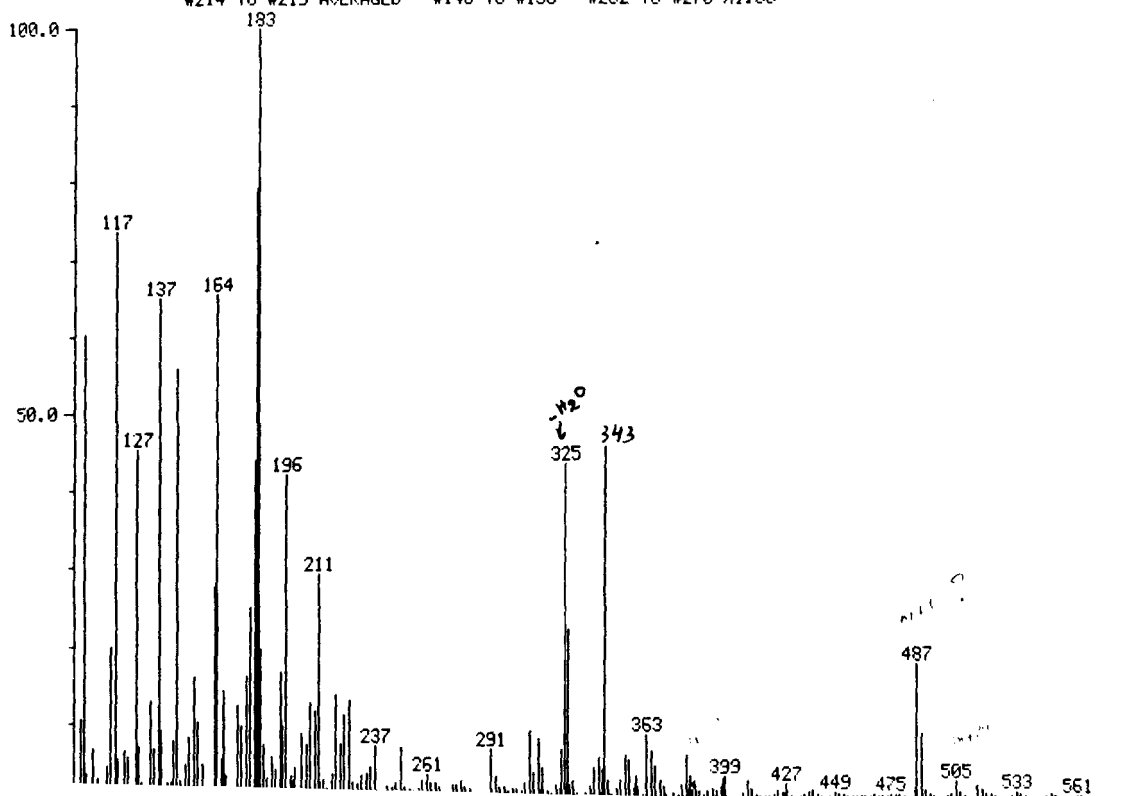
Glucosides #2 et #3: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ .H22/48C.1  
Jan 2012

**Glucoside #4: Spectre de masse à ionisation chimique.**

RIC DATA: 90FIN95 #1 SCANS 1 TO 383  
 01/24/90 12:28:00 CALI: FC43J17 #3  
 SAMPLE: #4  
 CONDS.: SOLID PROBE CI-ME  
 RANGE: G 1.9999 LABEL: N 0, 4.0 QUAN: A 1, 1.0 J 0 BASE: U 40, 7

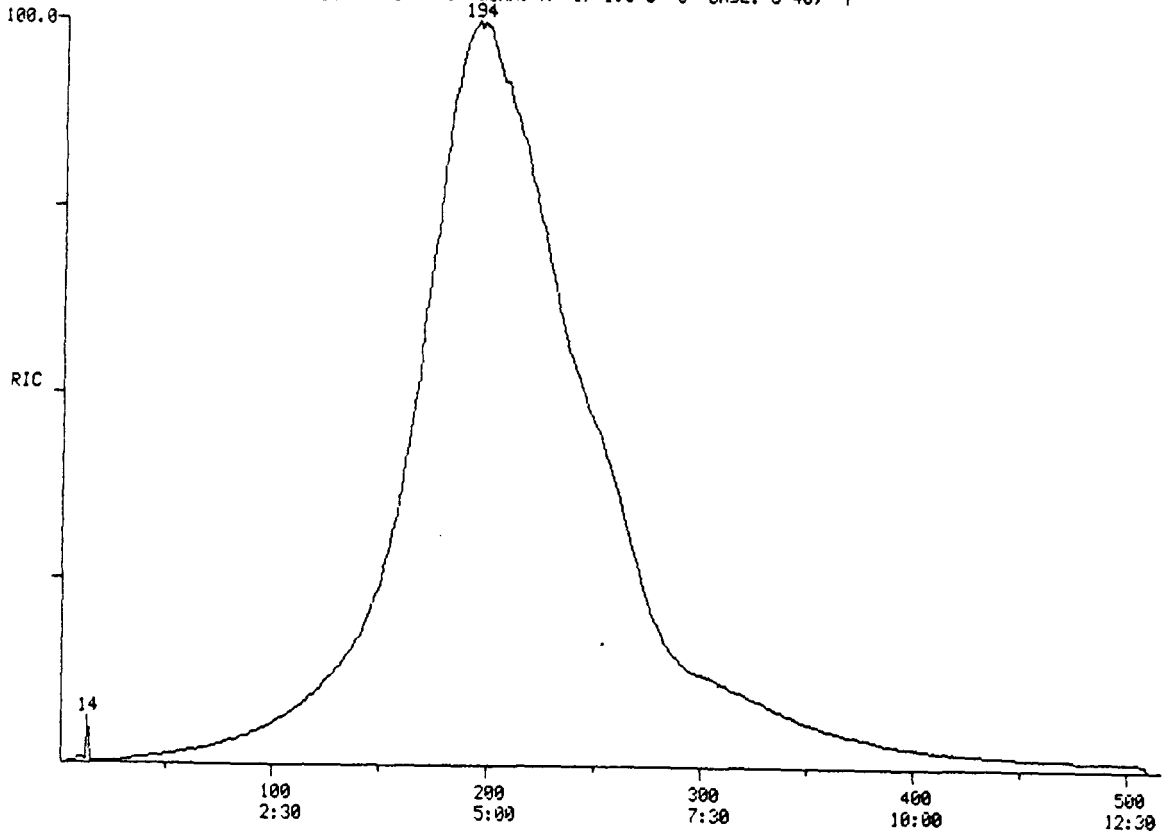


SAMPLE: #4  
 CONDS.: SOLID PROBE CI-ME  
 #214 TO #219 AVERAGED - #148 TO #156 - #262 TO #270 X1.00

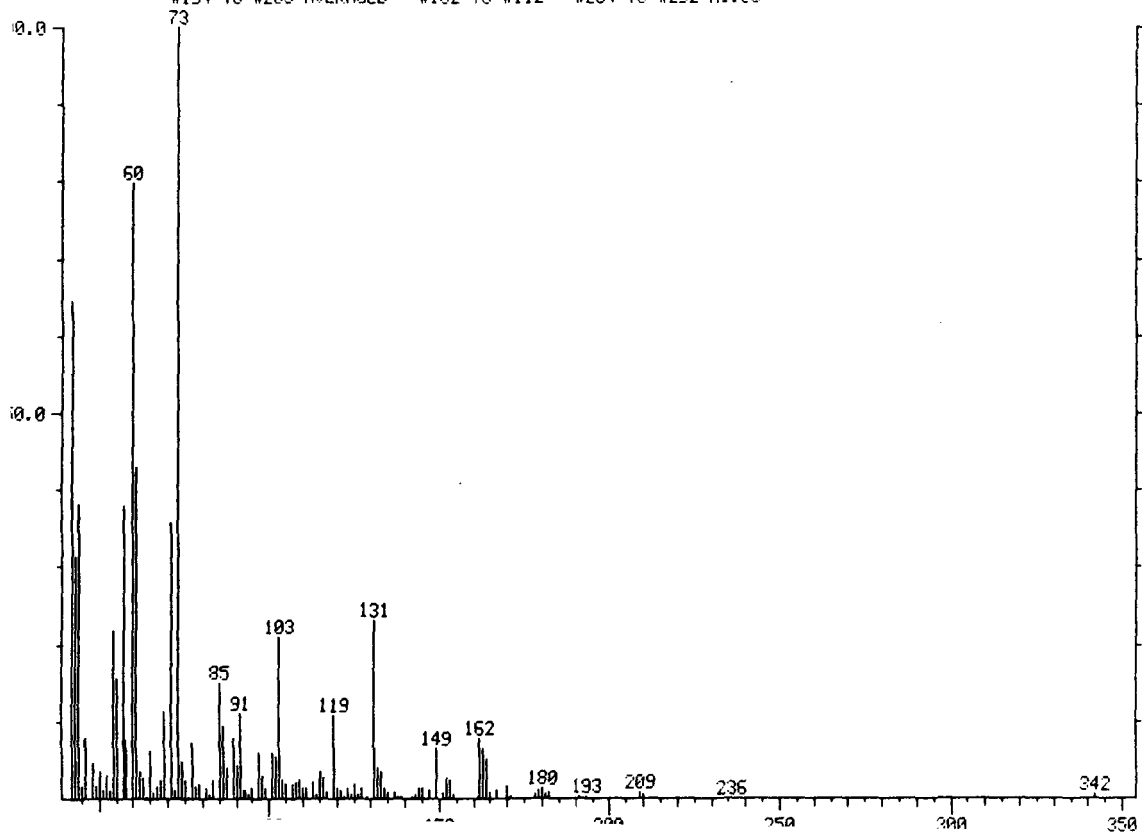


**Glucoside #4: Spectre de masse à ionisation électronique.**

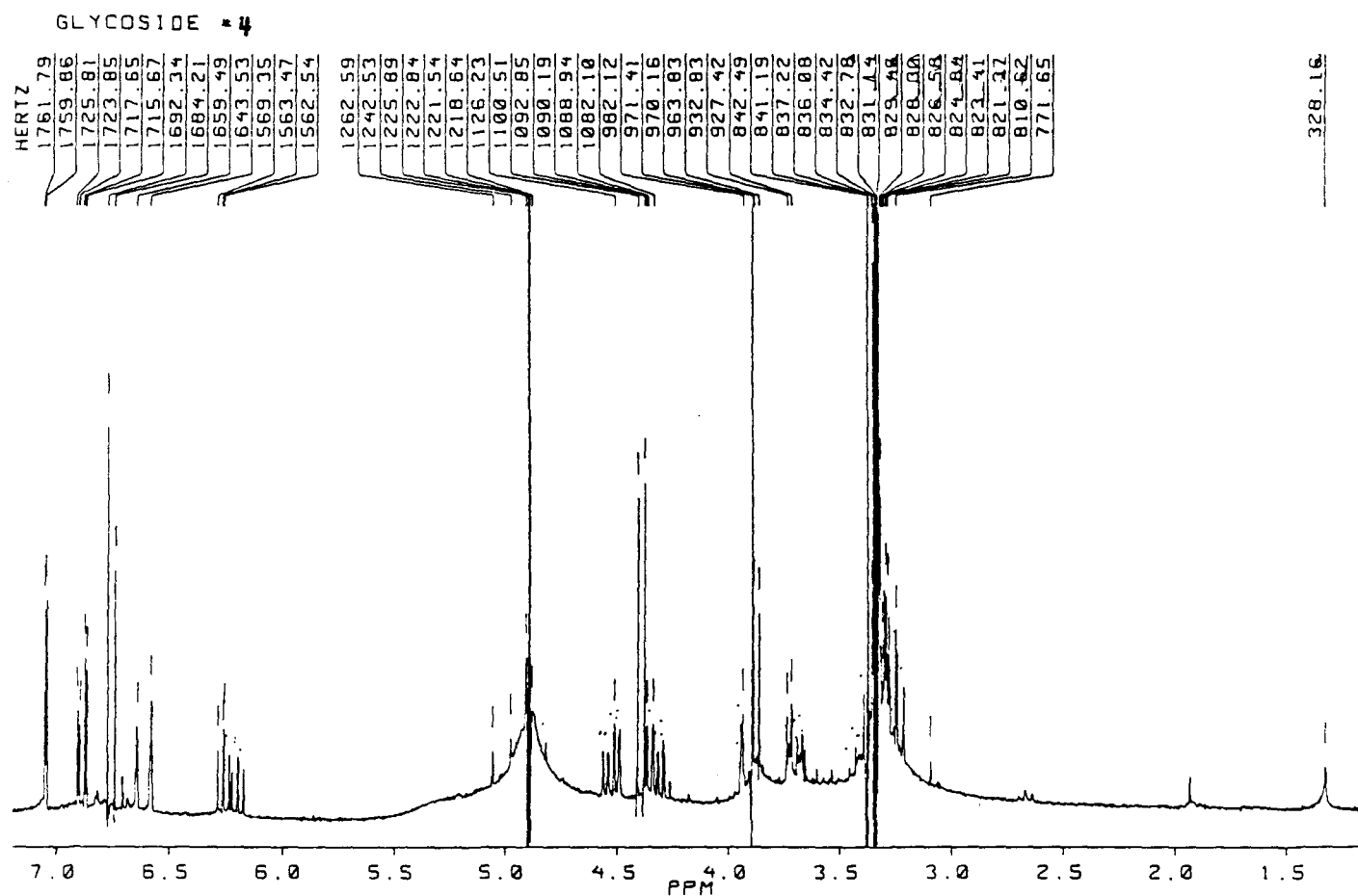
RIC 01/23/90 12:42:00 DATA: 90FIN80 #1 SCANS 1 TO 516  
 SAMPLE: #4 CALI: FC43JA22 #2  
 CONDS.: SOLID PROBE  
 RANGE: G 1.9999 LABEL: N 0, 4.0 QUAN: A 1, 1.0 J 0 BASE: U 40, 7

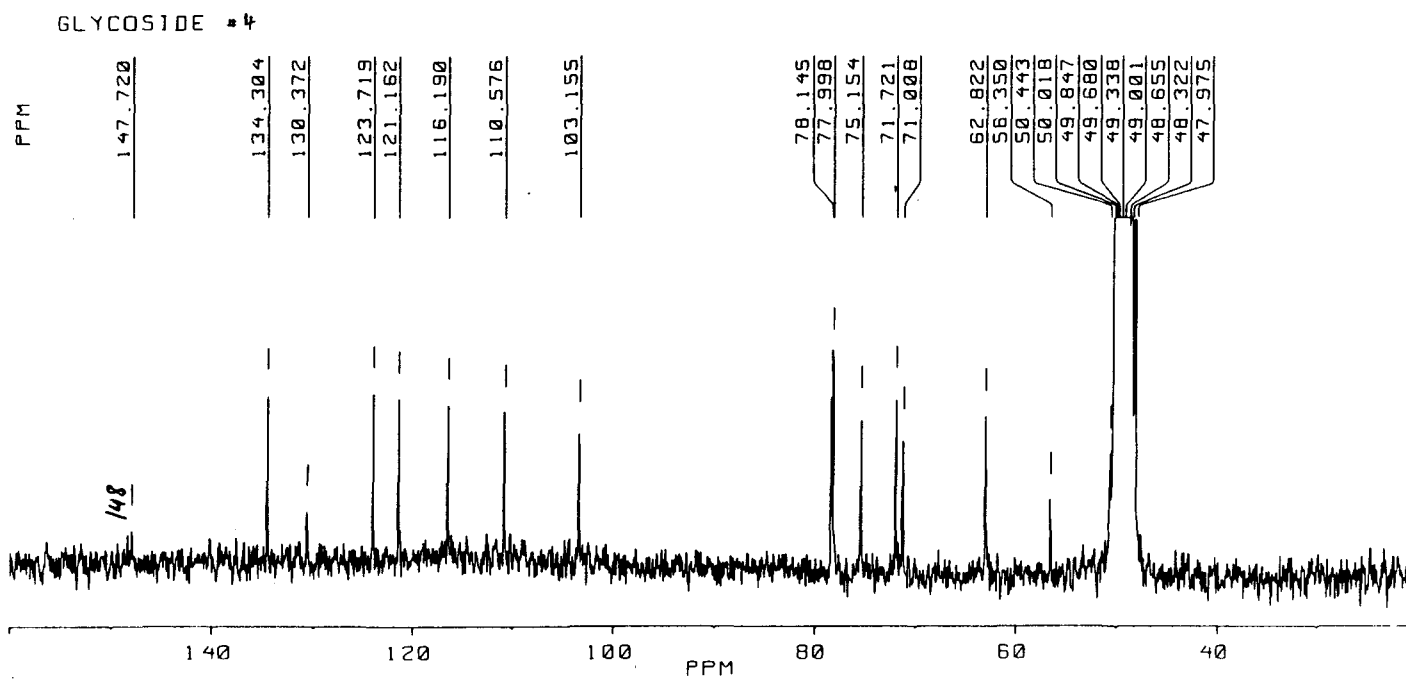


SAMPLE: #4  
 CONDS.: SOLID PROBE  
 #194 TO #203 AVERAGED - #102 TO #112 - #284 TO #292 X1.00



# Glucoside #4: Spectre de RMN <sup>1</sup>H.



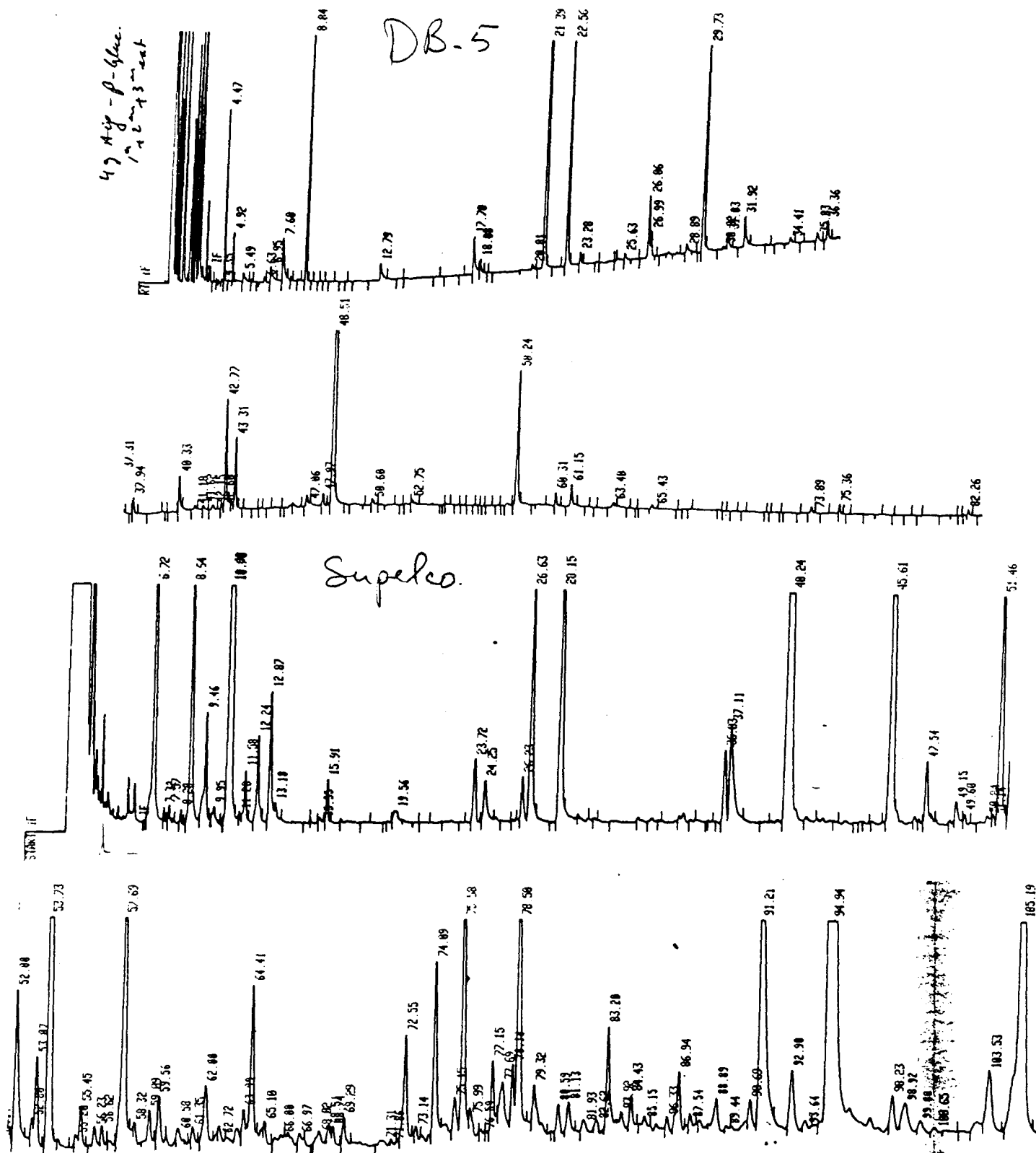
Glucoside #4: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ .

**ANNEXE II**

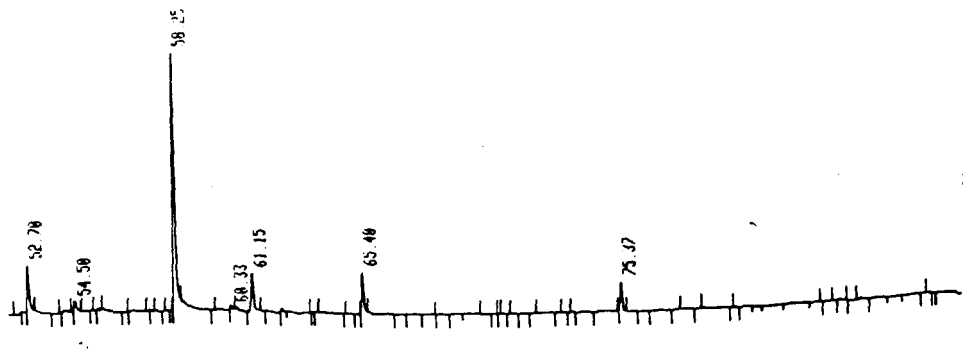
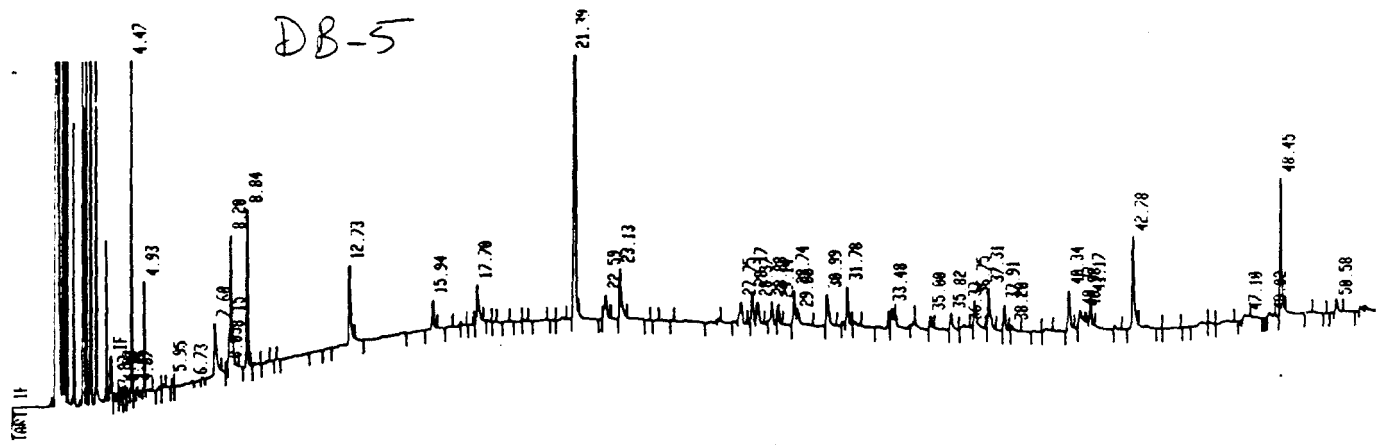
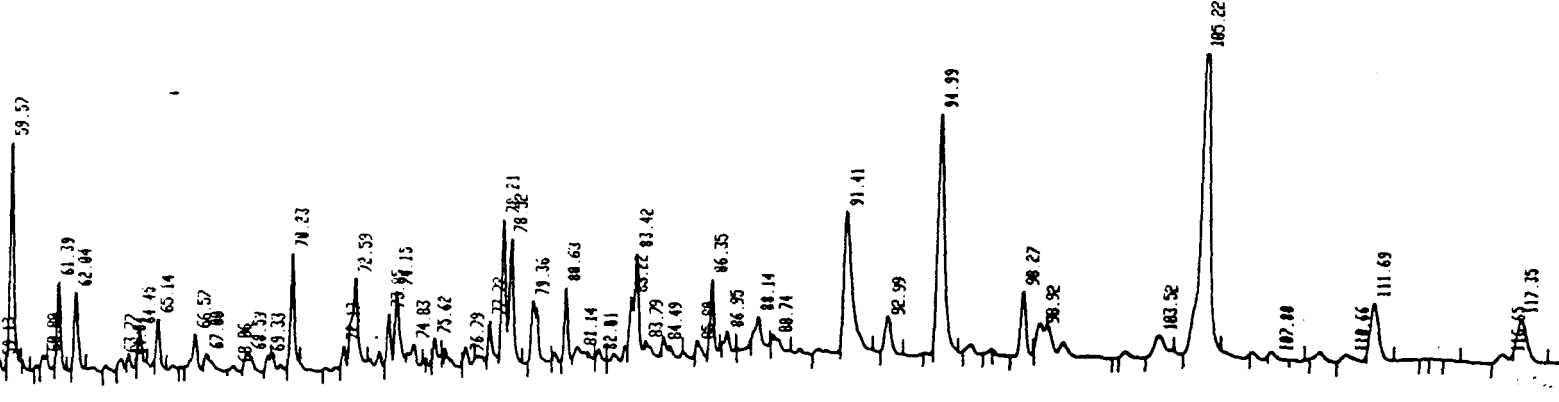
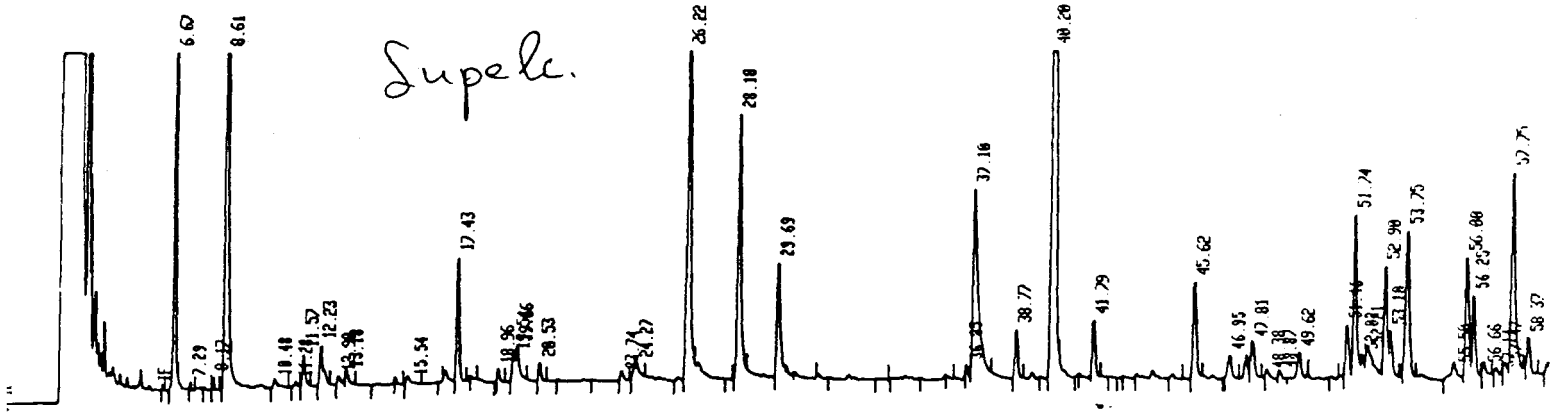
**EXEMPLES DE CHROMATOGRAMMES DE CPG.**



### Hydrolyse enzymatique avec la $\beta$ -glucosidase de l'extrait des aiguilles.



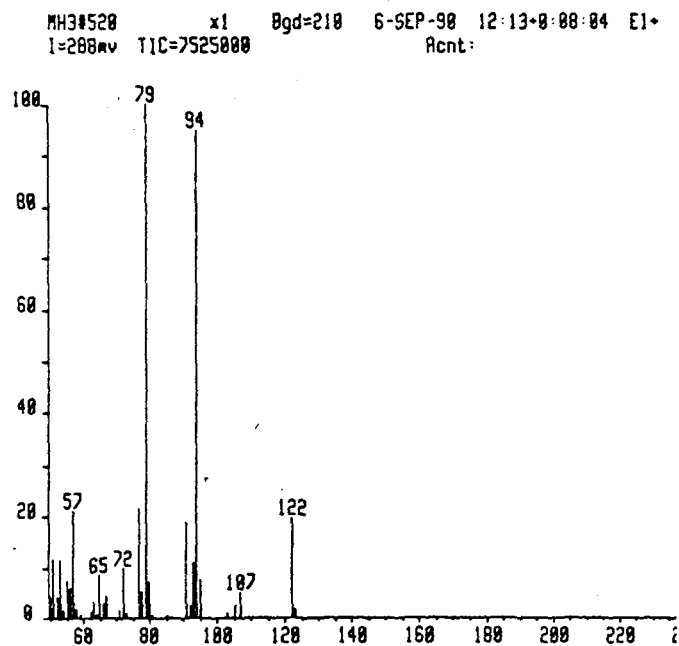
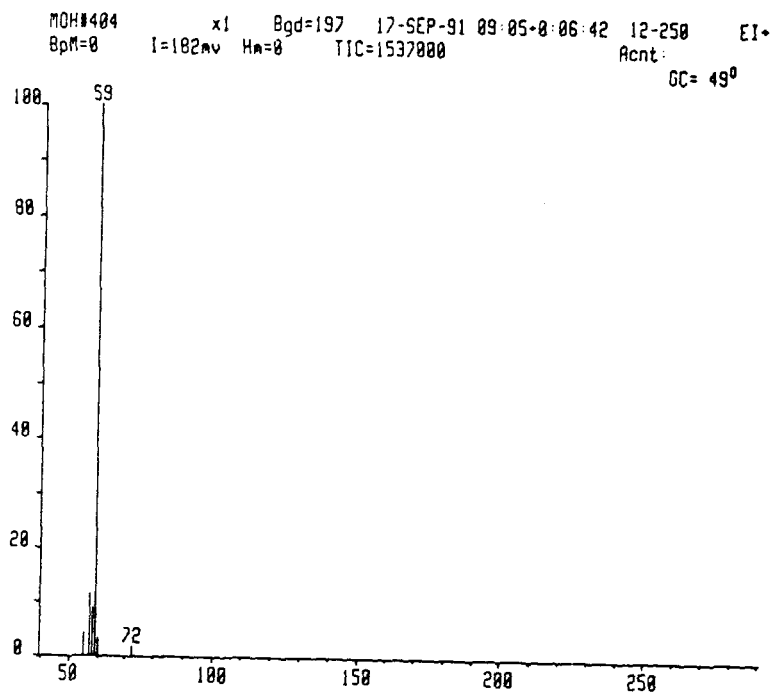
Hydrolyse enzymatique avec la  $\beta$ -glucosidase de l'extrait des ramilles.



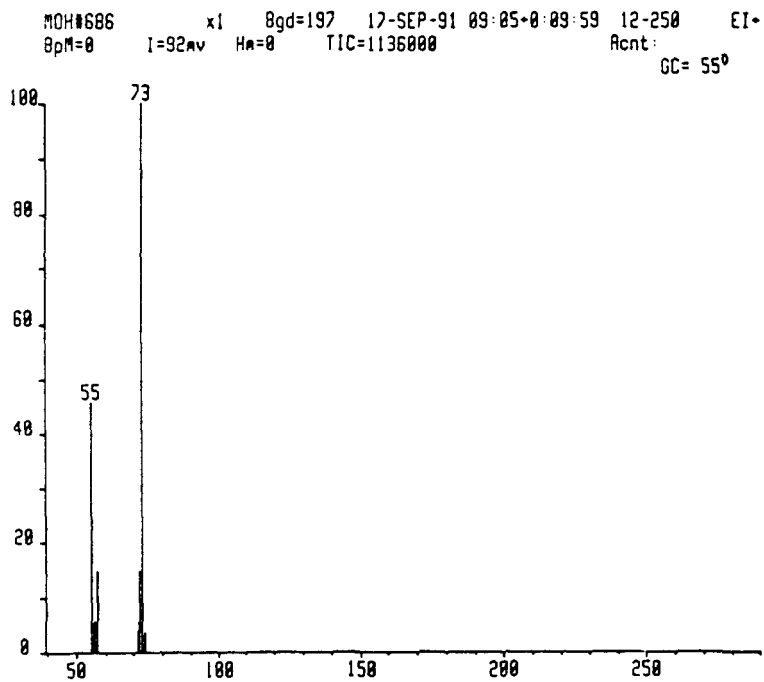


**ANNEXE III****SPECTRES DE MASSE DES AGLYCONES.**

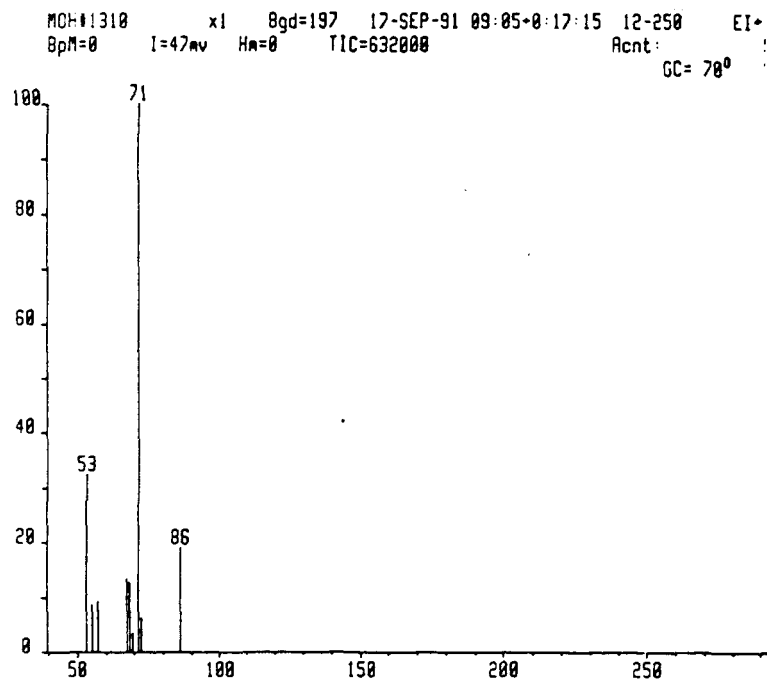
Aglycone # 1 : Santène

C<sub>9</sub>H<sub>14</sub> (122)Aglycone # 2 : 2,3-diméthylpentan-2-ol C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>O (116)

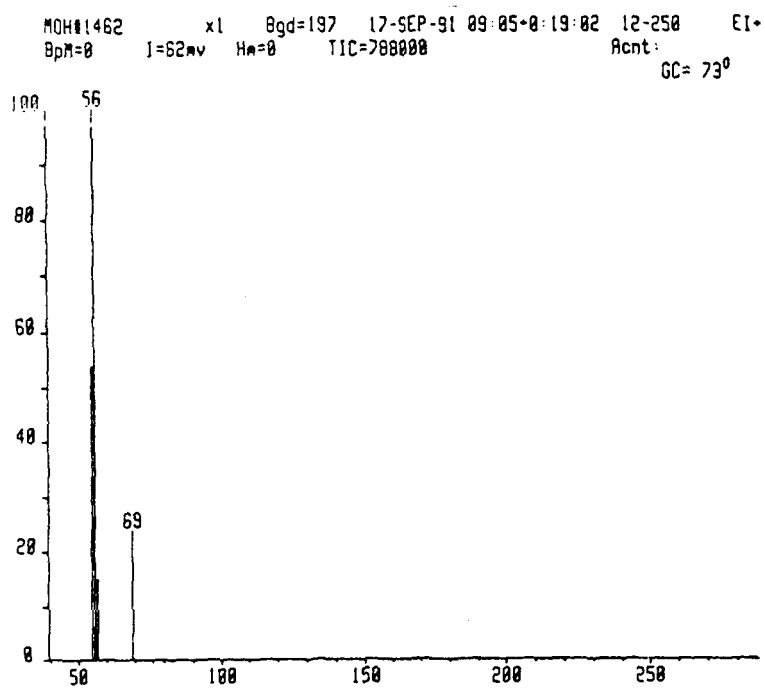
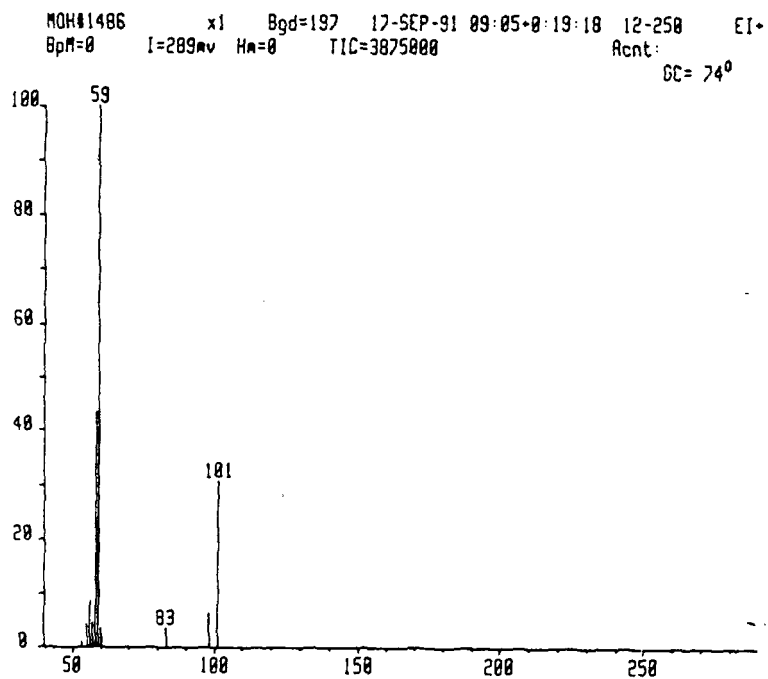
Aglycone # 3 : 2,4-diméthyl-pentan-3-ol  $C_7H_{16}O$  (116)

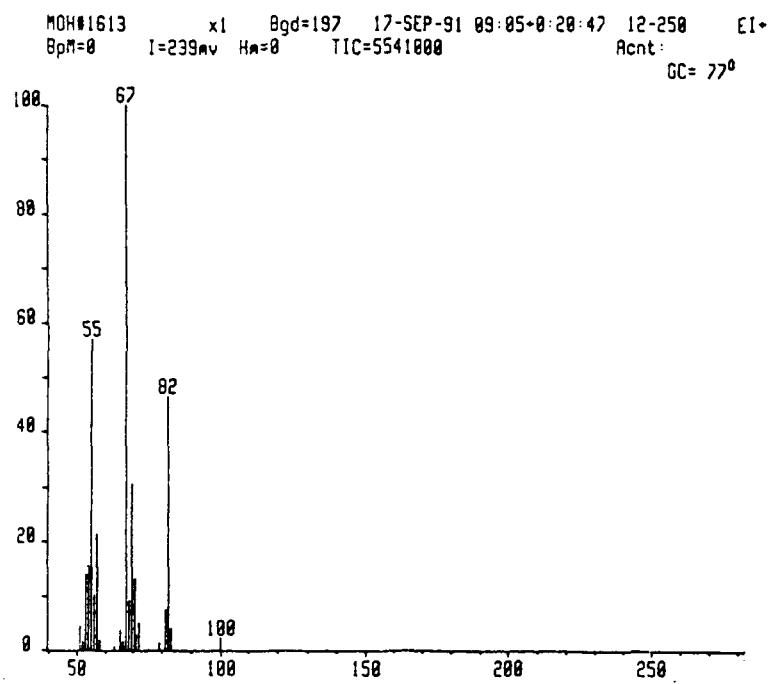
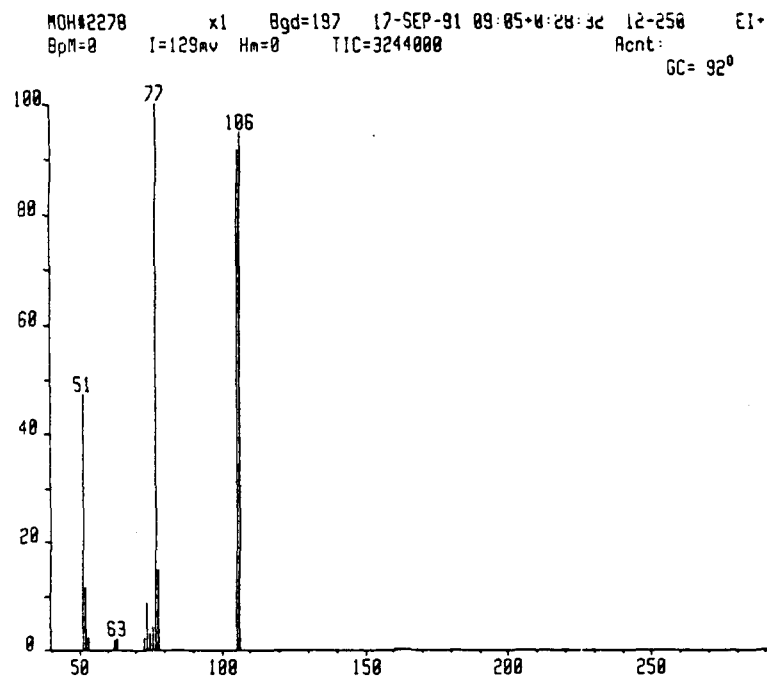


Aglycone # 4 : 2-méthylbut-2-én-1-ol  $C_5H_{10}O$  (86)



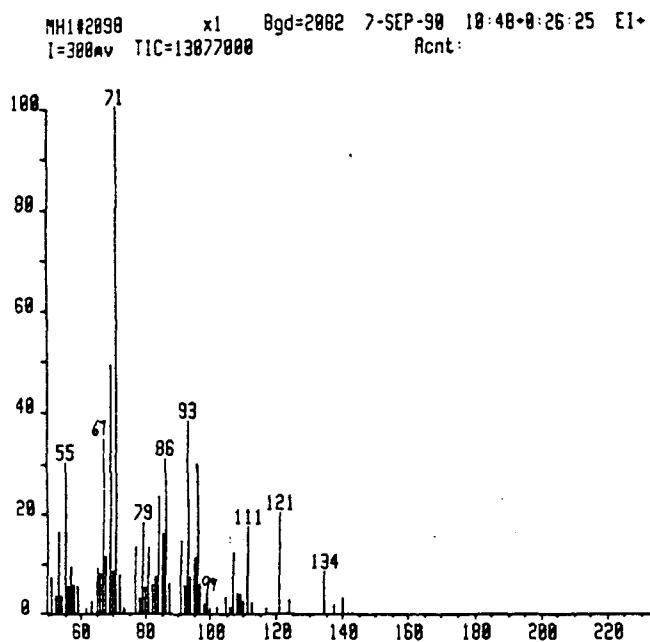
Aglycone # 5 : Hexan-1-ol

 $C_6H_{14}O$  (102)Aglycone # 6 : 2-méthylhexan-2-ol  $C_7H_{16}O$  (116)

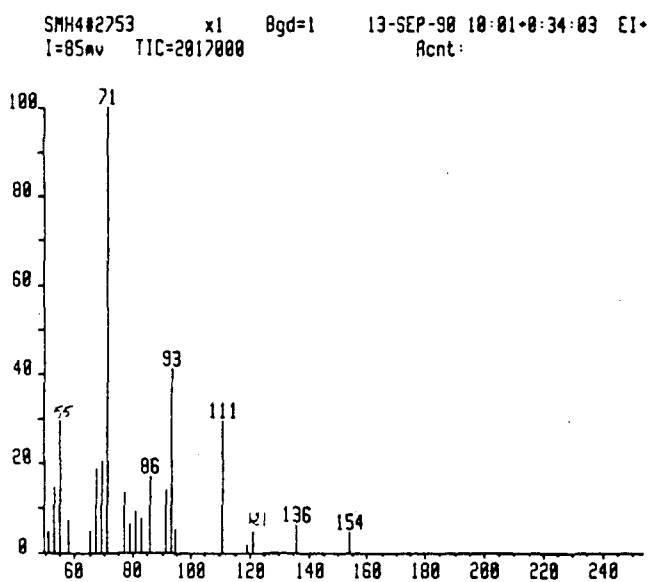
**Aglycone # 7 : Cis-hex-3-én-1-ol C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O (100)****Aglycone # 8 : Benzaldéhyde C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O (106)**



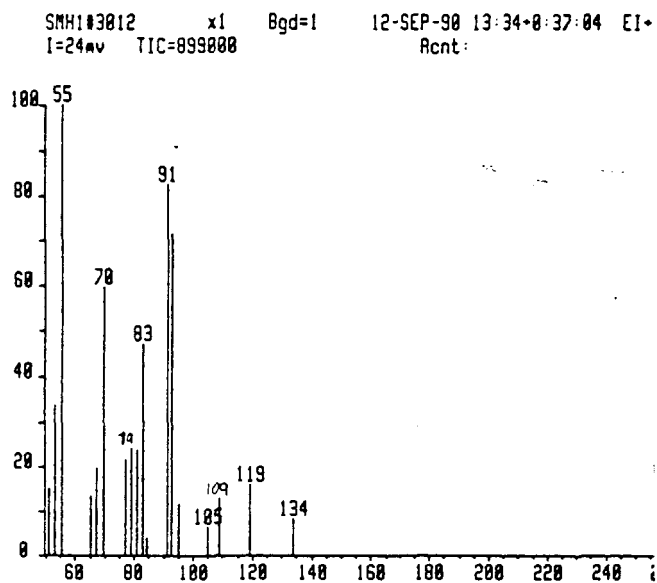
Aglycone # 9 : Linalool

 $C_{10}H_{18}O$  (154)

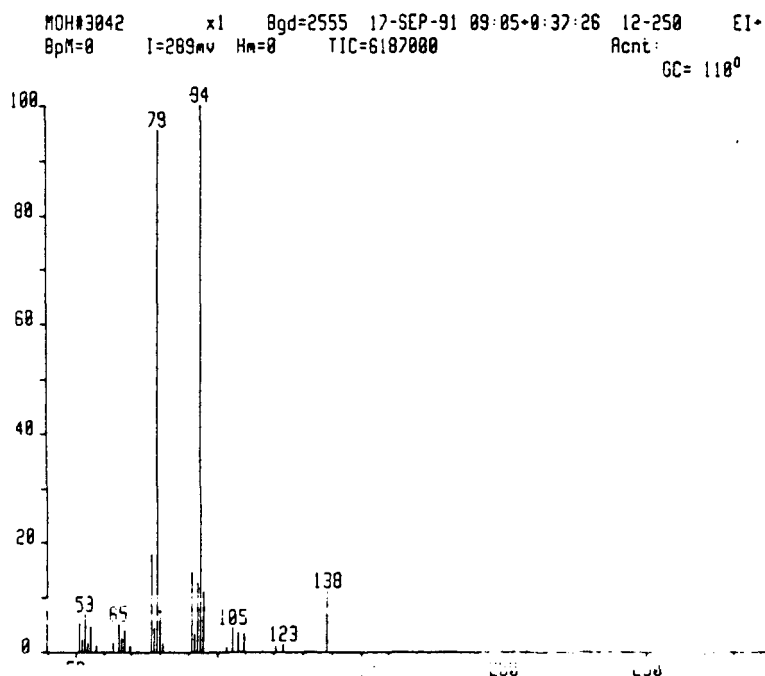
Aglycone # 10 : Terpine-4-én-1-ol

 $C_{10}H_{18}O$  (154)

Aglycone # 11 : Trans-pinocarvéol  $C_{10}H_{16}O$  (152)

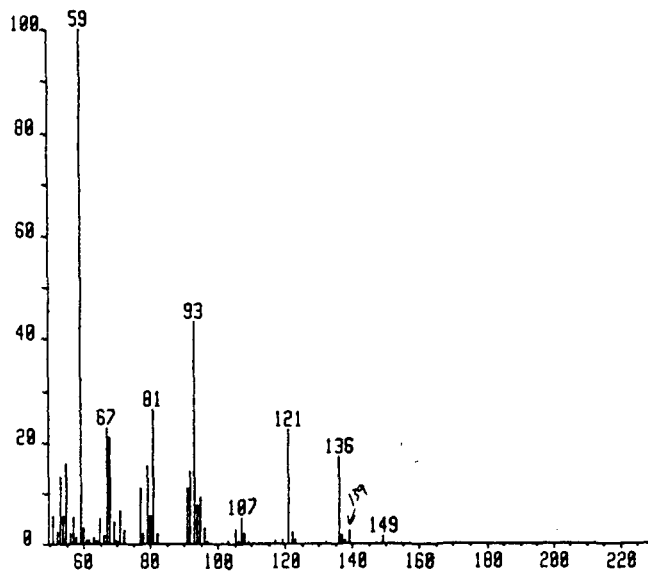


Aglycone # 12 : 3-Cyclohexène-1-acétaldéhyde,  $\alpha$ ,4-diméthyle  $C_{10}H_{16}O$  (152)



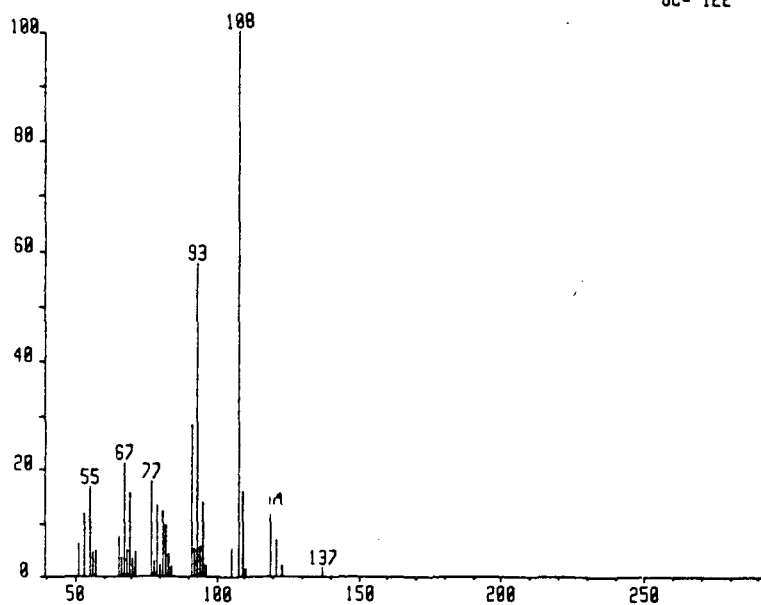
Aglycone # 13 :  $\alpha$ -Terpinéol  $C_{10}H_{18}O$  (154)

MH3#1549 x1 Bgd=1539 6-SEP-90 12:13:0:20:03 EI+  
I=377mv TIC=10649000 Acnt:

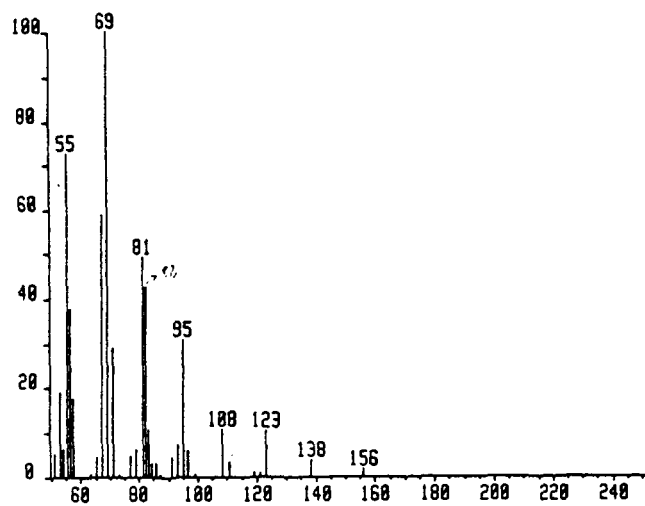


Aglycone # 15 : Campholénal  $C_{10}H_{16}O$  (152)

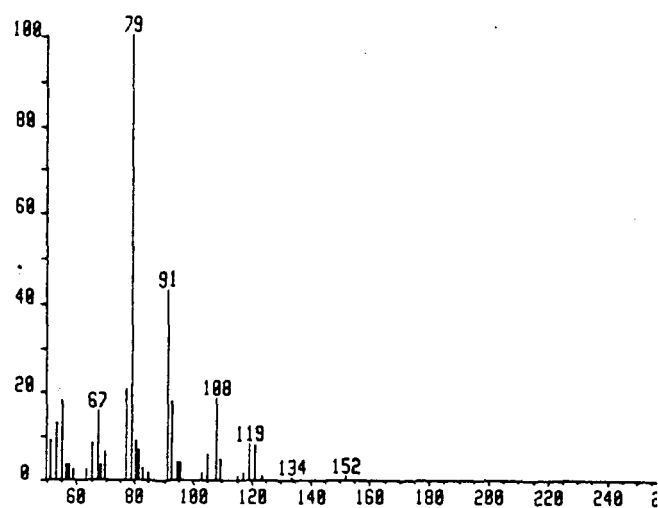
MOH#3564 x1 Bgd=3031 17-SEP-91 09:05:0:43:30 12-250 EI+  
BpM=0 I=113mv Hm=0 TIC=3134000 Acnt: S  
GC= 122° C

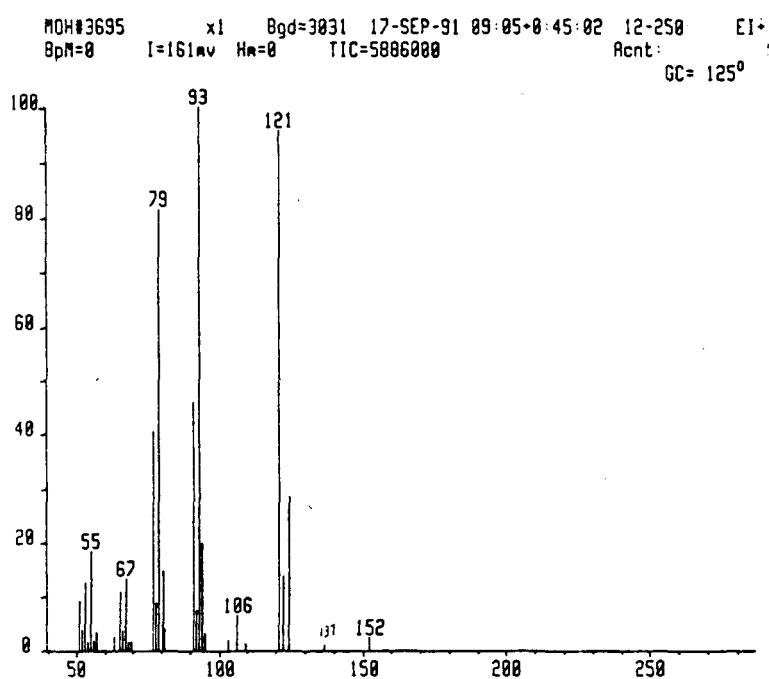
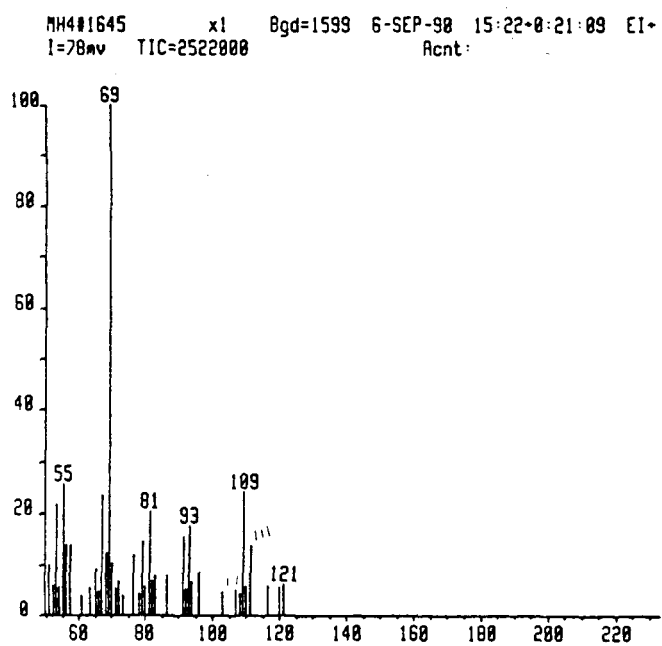


Aglycone # 16 : Citronellol

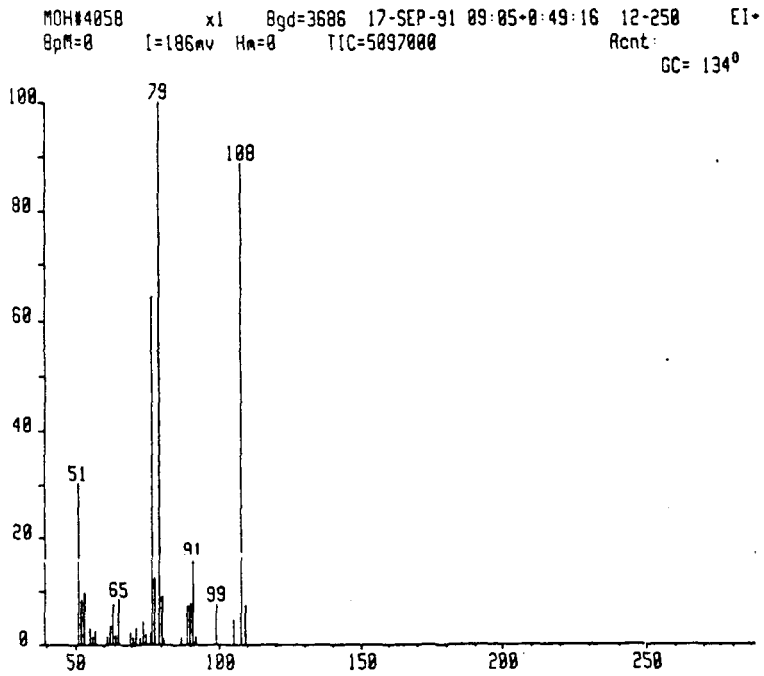
 $C_{10}H_{20}O$  (156)SMH4#3622 x1 Bgd=3611 13-SEP-90 10:01:04:11 EI-  
I=302mv TIC=10863000 Acnt:

Aglycone # 17 : Myrténol

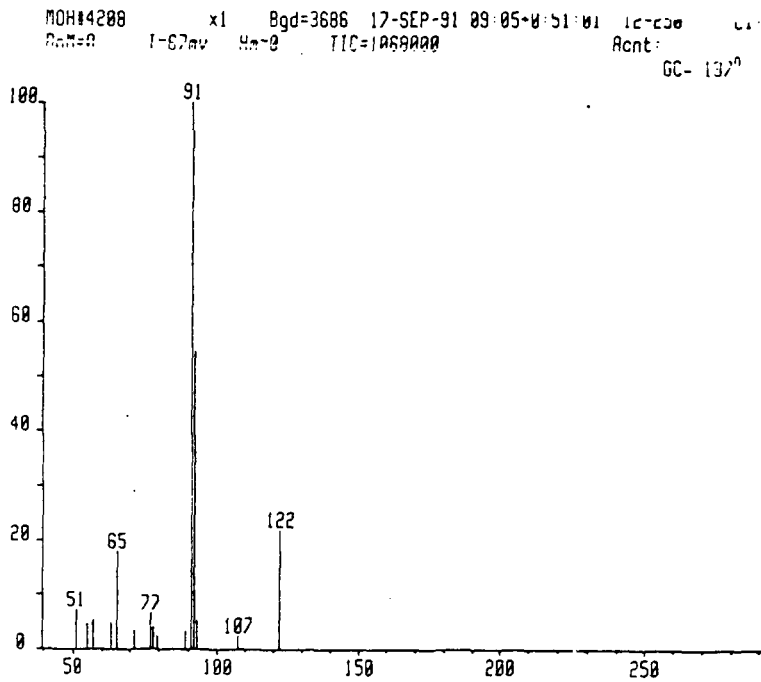
 $C_{10}H_{16}O$  (152)SMH4#3696 x1 Bgd=3611 13-SEP-90 10:01:04:02 EI-  
I=184mv TIC=417000 Acnt:

**Aglycone # 18 : Monoterpénol ? C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O (152)****Aglycone # 20 : Géraniol C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O (154)**

Aglycone # 21 : Phénylméthanol  $C_7H_8O$  (108)



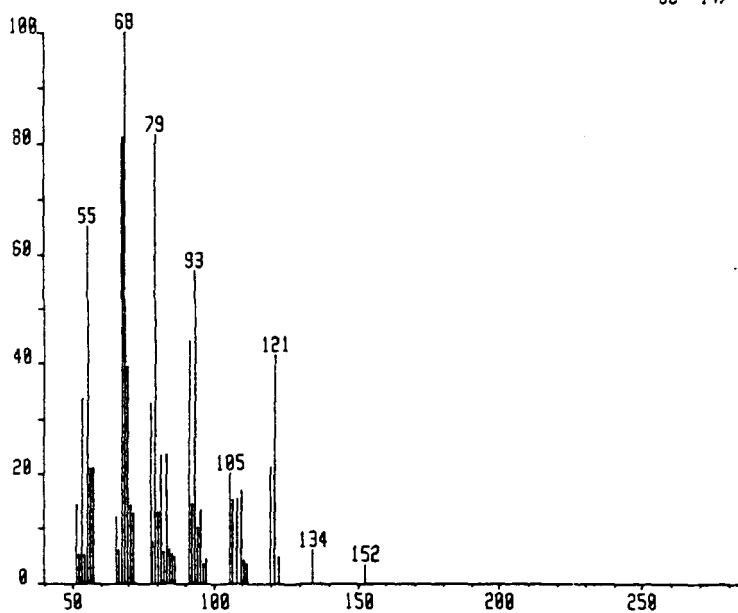
Aglycone # 22 : 2-phényléthanol  $C_8H_{10}O$  (122)



Aglycone # 23 : Alcool périllique

 $C_{10}H_{16}O$  (152)

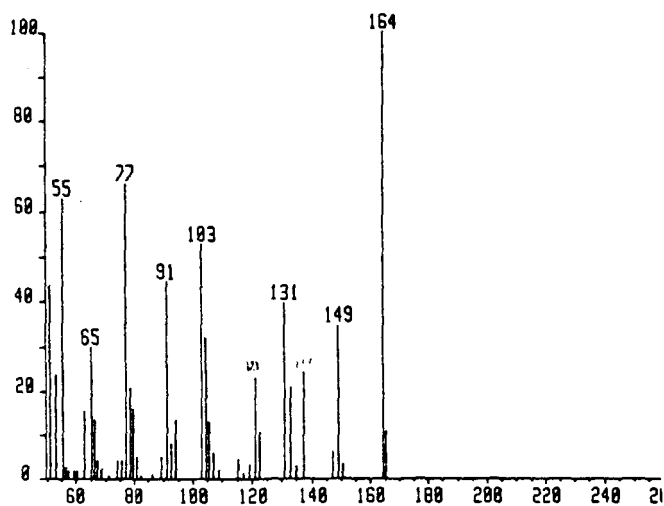
MOH#4686 x1 Bgd=3686 17-SEP-91 09:05-0:55:39 12-250 EI+  
BpM=0 I=52mV Hm=0 TIC=3199000 Acnt:  
GC= 147°

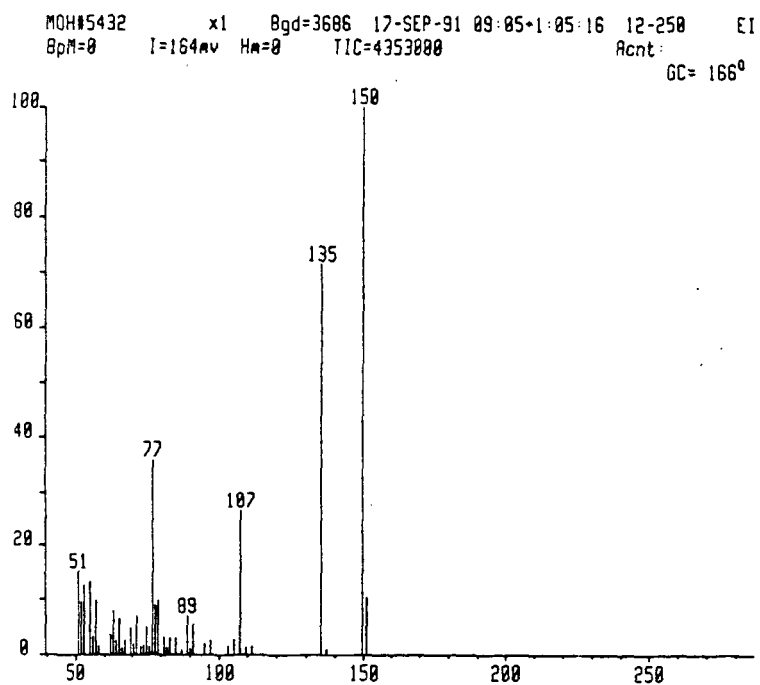
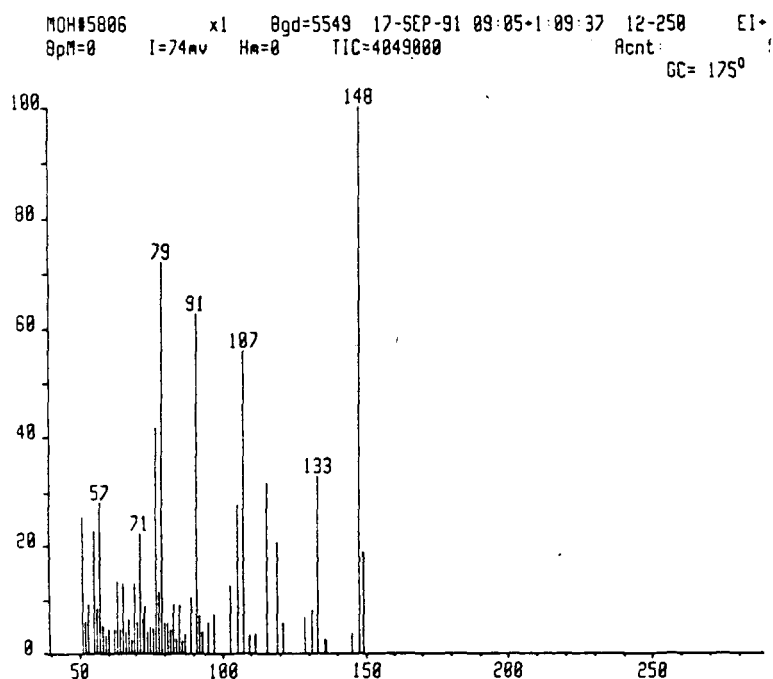


Aglycone # 24 : Eugénol

 $C_{10}H_{12}O_2$  (164)

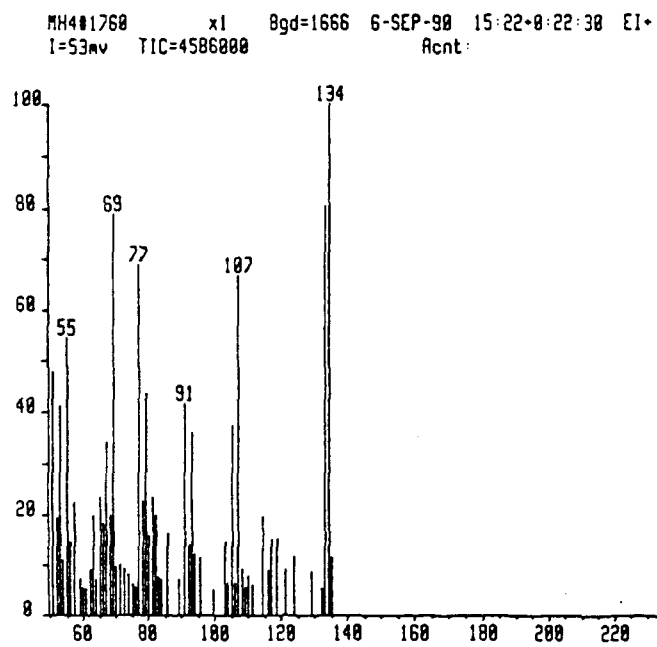
SMH1#5373 x1 Bgd=5316 12-SEP-90 13:34+1:04:34 EI+  
I=236mV TIC=12022000 Acnt:



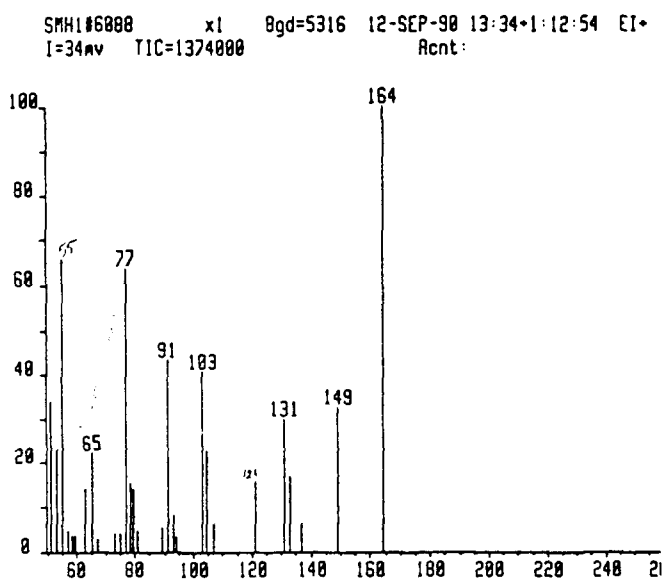
**Aglycone # 25 : 2-Hydroxy-5-méthyl-acétophénone C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> (150)****Aglycone # 26 : p-(2-Méthylallyl)-phénol C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O (148)**



Aglycone # 27 : trans-Cinnamyl alcool  $C_9H_{10}O$  (134)

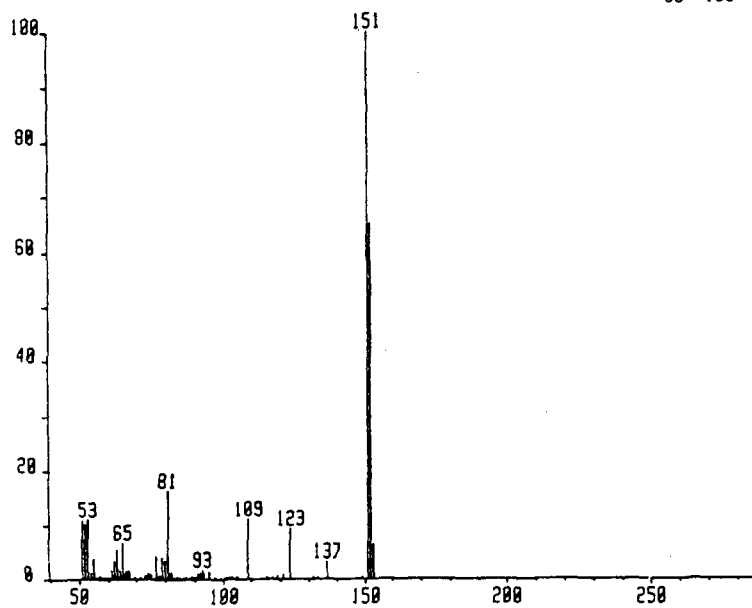


Aglycone # 28 : Iso-eugénol  $C_{10}H_{12}O_2$  (164)



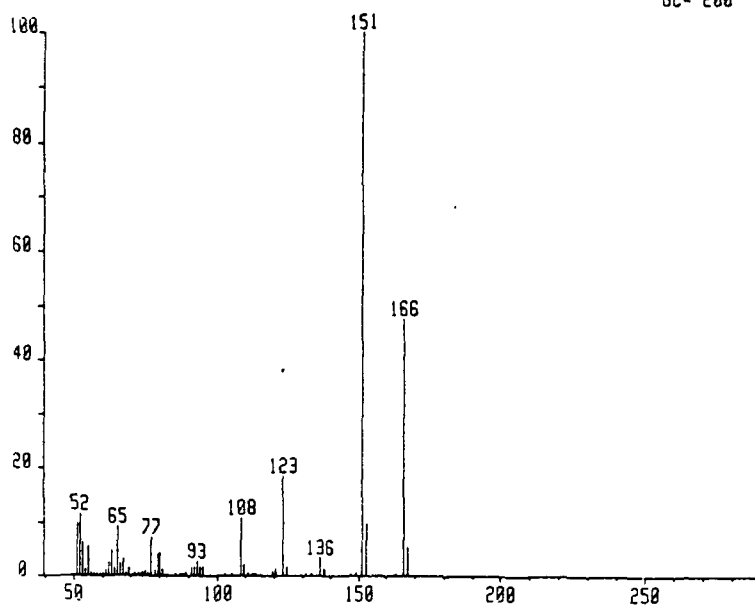
Aglycone # 29 : Vanilline  $C_8H_8O_3$  (152)

M6809#6809 x1 Bpd=6788 17-SEP-91 09:05:12 12-250 EI+  
BpM=151 I=930mv Hw=154 TIC=17829808 SU Acnt: :  
GC= 198°



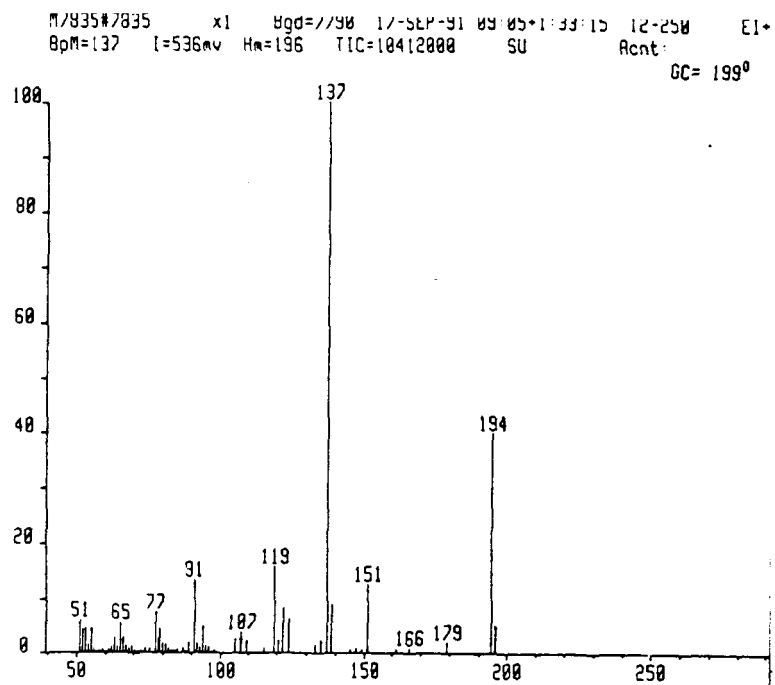
Aglycone # 30 : 4-Hydroxy-3-méthoxy-acéophénone  $C_9H_{10}O_3$  (166)

M7084#7084 x1 Bpd=7854 17-SEP-91 09:05:12 12-250 EI+  
BpM=151 I=1.4v Hw=168 TIC=27674808 SU Acnt: :  
GC= 200°



Aglycone # 31 : 4-(4-Hydroxy,3-méthoxyphényl)-2-butanone

$C_{11}H_{14}O_3$  (194)



**BIBLIOGRAPHIE**

1. Francis, M. J. O. and Allcock, C.; *Phytochem.*, Vol. 8, 1339 (1969).
2. Stahl-Biskup, E.; *Monoterpene Glycosides, State-of-the-Art, Flavour and Fragrance J.*, Vol. 2, 75-82 (1987).
3. Croteau, R.; *Catabolism Of Monoterpenes In Essential Oil Plants, Flavors and Fragrances : A World Perspective*, Ed. B. M Lawrence, B. D. Wookherjee, B. J. Willis, (1988).
4. Wills R. B. H., and F. M. Scriven; *Metabolism Of Geraniol By Apples in Relation To The Development Of Storage Breakdown*, *Phytochemistry*, Vol. 18, 785-786, (1979)
5. Ambid, C, Feron, G.; *Les Glycosides : Intérêt dans l'industrie des arômes et des parfums*, disponible à "LASEVE" de l'UQAC.
6. Dries, J. M. A. van den and Svendsen, A. Baerheim; *A Simple Method for Detection of Glycosidic Bound Monoterpenes and Other Volatile Compounds Occurring in Fresh Plant Material*, *Flav. and Frag. J.*, Vol. 4, 59-61, (1989).
7. Schulz, Gudrun and Stahl-Biskup, E.; *Essential Oils and Glycosidic Bound Volatiles from Leaves, Stem, Flowers and Roots of *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae)*, *Flav. and Frag. J.*, Vol. 6, 69-73, (1991).
8. Banthorpe, D. V. and Mann, J.; *Monoterpene Glucosides From Petals of *Tanacetum vulgare**, *Phytochem.*, Vol. 11, 2589-2591, (1971).
9. Wilson, B , Strauss, C. R. and Williams, Patrick J.; *Changes in Free and Glycosidically Bound Monoterpenes in Developing Muscat Grapes*, *J. Agric. Food Chem.* Vol. 32, 919-924, (1984).

10. Wilson, B., Strauss, C. R., and Williams, P. J.; The Distribution of Free and Glycosidically-Bound Monoterpenes Among Skin, Juice, and Pulp Fractions of Some White Grape Varieties, *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 37, No. 2, 107-111, (1986).
11. Williams, Patrick J. and All; Novel Monoterpenes Disaccharide Glycosides of *Vitis vinifera* Grapes and Wines, *Phytochemistry*, Vol. 21, No. 8, 2013-2020, (1982).
12. Williams, Patrick J. and All; Studies on the Hydrolysis of *Vitis vinifera* Monoterpene Precursor Compound and Model Monoterpenes  $\beta$ -D-Glucosides Rationalizing the Monoterpenes Composition of Grapes, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 30, 1219-1223, (1982).
13. Svendsen, A. Baerheim and Merckx, I. J. M.; A Simple Method for Screening of Fresh Plant Material for Glycosidic Bound Volatile Compounds, *Planta Medica*, Vol. 55, 38-40, (1989).
14. Merckx, Ysbrand M. and Svendsen, A. Baerheim; Glycosidic Bound Volatile Compounds in Some Coniferae, *J. Ess. Oil Res.*, Vol. 2, 71-72, (1990).
15. Williams, P. J. et al.;  $\beta$ -Glucosides of Aroma Components From Petals of *Rosa* Species : Assay, Occurrence, and Biosynthetic Implications, *J. Plant Physiol.* Vol. 134, 567-572, (1989).
16. Fabre, J. et Ambid, C.; *Jasminum grandiflorum* , Application à l'obtention de bio-essence, disponible à " LASÈVE " de l'UQAC.
17. Miyakado, M. et al.; (-)-cis-Chrysanthenol O- $\beta$ -D-Glucoopyranoside: A New Monoterpene Glucoside From *Dicoria canescens* , *Phytchem.*, Vol. 13, 2881-2882, (1974).

18. Shimizu, Sumio; A New Monoterpene Glycoside 1-Menthyl 6'-O-acetyl- $\beta$ -D-Glucoside In *Mentha arvensis* var *piperascens* Mal, J. Ess. Oil Res., Vol. 2, 21-24, (1990).
19. Hase, Tsunao; Iwagawa, Tetsuo and Munesada, Kiyotaka; A Bitter Monoterpene Glucoside From *Viburnum phlebotrichum*, Phytochem., Vol. 21, No. 6, 1435-1437, (1982).
20. Takido, Michio; Fukuhara, Kiyohiro; Yamanouchi, Sakae and Takahashi, Shuhichi; Phlebortrichin, A Phenolic Compound From The Fresh Leaves Of *Viburnum phlebotrichum*, Phytochemistry, Vol. 22, No. 1, 223-225, (1983).
21. Konoshima, Takao and Sawada, Tokunosuke; Studies on the Constituents of Leguminous Plants. VI. The Structure Elucidations of Monoterpene Glycosides from Fruits of *Gymnocladus chinensis* Baillon, Chem. Pharm. Bull., Vol. 32, No. 2, 2617-2621, (1984).
22. Huiying, Lang; Shouzheng, Li; McCabe, Terrence and Clardy, Jon; A New Monoterpene Glycoside of *Paeonia lactiflora*, Planta Medica, 501-504, (1984).
23. Shimomura, Hiroko; Sashida, Yutaka; Oohara, Motomu and Tenma, Hiroko; Phenolic Glucosides from *Parabenzoin praecox*, Phytochem., Vol. 27, No. 2, 644-646, (1988).
24. Søren Rosendal Jensen; Bent Juhl Nielsen and Viggo Norn, Phenolic Glucosides In *Viburnum henryi*, Phytochem., Vol. 18, 904-906, (1979).
25. Leong, G.; Archavlis, A. and Derbesy, M.; Research on the Glucoside Fraction of *Vanilla bean*, J. Ess. Oil Res., Vol. 1, 33-41, (1989).

26. Andersson, Polf and Ludgren, Lennart N.; Monoaryl and Cyclohexenone Glycosides From Needles of *Pinus sylvestris*, *Phytochem.*, Vol. 27, No. 2, 559-562, (1988).
27. Frère Marie-Victorin; *Flore Laurentienne*, 2ed; Les presses de l'Université de Montréal; (1964).
28. Hosie, R. C.; *Arbres Indigènes du Canada*; Édité par les Éditions Fides conjointement avec Environnement Canada et le Centre d'édition du gouvernement du Canada, Approvisionnements et Services Canada; (1980).
29. Cauboue, Madeleine et Malenfant, Denis; *Le reboisement au Québec, Exigences écologiques des épinettes (PICEA), des pins (PINUS) et des mélèzes (LARIX) plantés au Québec*; publications du Québec; 1984.
30. Beaulieu, Jean; Corriveau, Armand et Daoust, Gaétan; *Stabilité phénotypique et délimitation de zones d'amélioration de l'épinette noire au Québec*; Rapport d'information LAU-X-85, (1989).
31. Chavanne, M.; Jullien, A.; Beudoin, G.J.; Flamand, E.; *Chimie organique expérimentale*, MODULO ÉDITEUR, (1986).
32. P. Sandra, C. Bicchi, *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*, Dr. AlfredHuethig Verlag Heidelberg, Basel, New York, (1987)
33. Miller, James M.; *Chromatography: concepts and contrasts*, Wiley Interscience Publication, (1988).
34. Huber, J. F. K. and Hulsman, Y. A. R. J. *Anal. Chem, Act*, Vol. 38, 405, (1967).
35. Touchstone, J. C. and Dobbins, M. F.; *Pratice of Thin Layer Chromatography*, 2d., Wiley-Interscience Publication, New York, (1983).



36. Hamilton, R. J.; Sewell, P. A.; Introduction To High Performance Liquid Chromatography, 2d. Chapman and hall, London, New York, (1982).
37. De Grave, Jean; Berthou, François et PROST, Michel; méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse, Masson, (1986).
38. Ordre des chimistes du Québec, notes de cours pour chromatographie liquide à haute performance (HPLC), 3<sup>ème</sup> Edition, (1988).
39. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2 d, A Wiley-Interscience Publication, (1979).
40. Adams, Robert P.; Identification Of Essential Oil by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press, Inc., (1989).
41. Jennings, Walter; Shibamoto, Takayuki; Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography, Academic Press, (1980).
42. Swigar, A.A.and Silverstein, R.M.; Monoterpenes, Infrared, Mass, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR Spectra, and Kovats Indices, Aldrich, (1981).
43. Karasek, F.W.; Clement, R. E.; Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry principles and techniques, Elsevier, (1988).
44. Memory, J. D. and Wilson, Nancy K.; NMR Of Aromatic compounds, A Wiley-Interscience Publication, New York, (1982).
45. Silverstein, Robert M.; Spectrometric Identification Of Organic Compounds, Fourth Edi, John Wiley & Sons, (1981).
46. Stereochemistry: Fundamentals and methods / Edi. by Henri B. Kagan. Vol. 1.

Determination of configuration by spectrometric methods, with contributions by A. Gaudemer, (1977).

47. Belleau, Francine; Analyse de l'huile essentielle du *Ledum Groenlandicum* RETZIUS, Mémoire présenté à l'UQAC, (1990).
48. Günther, H.; NMR Spectroscopy, Ed. John & Sons, (1980).
49. Weeb, G. A.; Annual reports on NMR Spectroscopy, V. 13, 1982, Academic Press.
50. J. C. Holmes et F. A. Morrel, Appl. Spec., 1957, II, 1986.
51. David F. Ewing; <sup>13</sup>C Substituent Effects in Monosubstitued Benzenes; Organic Magnetic resonance, Vol. 12, No. 9, 499-524, (1979).
52. Roger A. Dommissie, Lucia van Hoof and Arnold J. Vlietinck; Structural Analysis of Phenolic Glucosides from Salicaceae by NMR Spectroscopy; Phytochem., Vol. 25, No. 5, 1201-1204, (1986).
53. I. J. M. Merks and A. Baerheim Svendsen; Occurence and Possible Role of Glycosidic Bound Eugenol and 2-Methoxy-4-Vinylphenol in the Lignin Biosynthesis of Some Lamiaceae; Planta Medica, Vol. 55, 88-89, (1989).
54. Jean-Marie Hachey, Guy-J. Collin and Sandra Simard; Influence Of Sample Preparation On The Composition Of The Essential Oil Of The Needles And Twigs Of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P.; Journal Of Wood Chemistry And Technology, Vol. 1, No. 1, 53-60, (1989).