



Préparation des échantillons pour l'analyse en LC-MS

Grégory Genta-Jouve

Spectrométrie de masse appliquée aux Substances Naturelles

Sommaire

- Introduction
 - Homogénéisation
 - Les différents types d'extraction
 - Influences des paramètres
- Applications
 - Plantes
 - Organismes marins (éponges, cnidaires, etc...)
 - Champignons
 - Micro-organismes

Introduction

L'extraction est une étape fondamentale de l'analyse d'un échantillon. Elle doit être menée avec précision avec les bons paramètres pour permettre d'observer la réalité de l'échantillon.

Il est important de noter qu'une extraction exhaustive est impossible et que l'observable correspond donc à une fraction plus ou moins grande de l'objet étudié.

Pour quelles raisons une extraction parfaite (exhaustive) n'est pas possible?

- Différences de solubilité des métabolites (acides aminés vs acides gras)
- Accessibilité du solvant aux compartiments cellulaires

Le développement d'un protocole d'extraction va donc avoir pour but de répondre à ces deux problèmes!

Introduction

L'homogénéisation de l'échantillon:

Pour permettre au solvant de solubiliser un maximum de métabolites, une étape d'homogénéisation va être nécessaire.

Les techniques sont principalement mécaniques:

- Le couple mortier/pilon
- la cryofracture
- les tubes de lyse avec billes

Mais elles peuvent aussi faire appel à une étape de chauffage (résine).

Le but de cette étape est d'augmenter la surface interfaciale ainsi que d'obtenir un échantillon homogène.

Introduction

L'étape suivant l'homogénéisation est l'extraction à proprement parler. Elle va permettre de solubiliser les métabolites dans un solvant ou mélange de solvants pour permettre la séparation d'avec les résidus tissulaires (membranes, parois, protéines, etc...).

Différents types d'extraction sont utilisés en chimie des substances naturelles:

- Soxhlets
- Sonication
- Micro-ondes
- Solvants accélérés
- Fluides supercritiques
- SBSE
- Distillation
- Macération
- Décoction
- Infusion

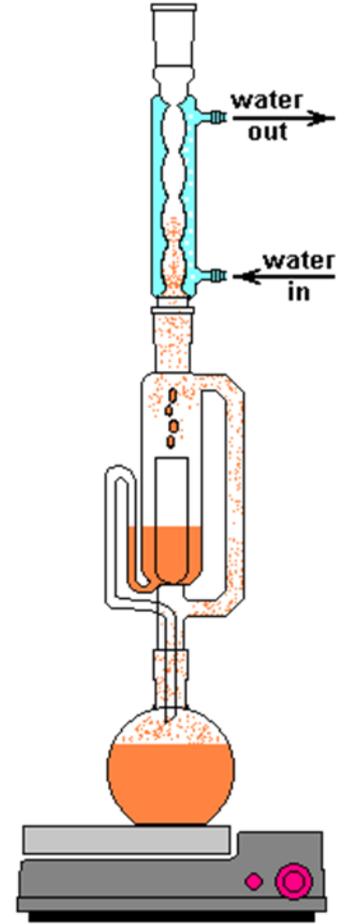
Introduction

Extraction par soxhlet:

C'est une des techniques les plus anciennes permettant l'extraction des métabolites. Cette technique est utilisée pour les molécules peu ou pas volatiles et stables à la température.

Cette technique permet d'extraire une quantité importante de matière mais possède quelques inconvénients:

- temps d'extraction longs
- utilisation d'une quantité de solvant importante
- électricité (refroidissement + chauffage)
- peu adaptée pour les petites quantités

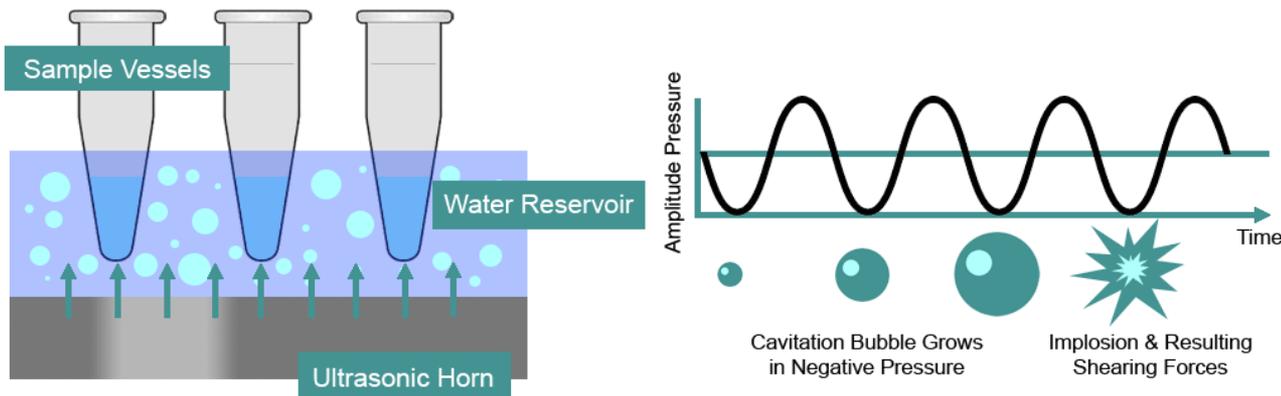


Introduction

Extraction par ultrasons (sonication):

Les ondes ultrasons ont une fréquence allant de 16 KHz à 1GHz et sont inaudibles par les humains.

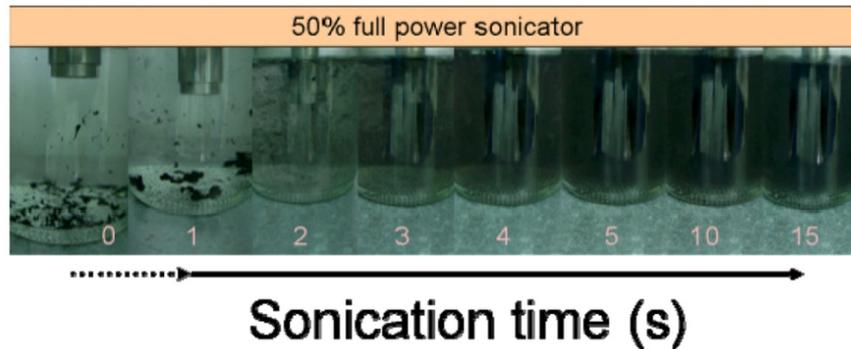
Les vibrations dues aux ultrasons sont la source d'énergie permettant le re-largage des métabolites dans les matrices complexes. Le phénomène principal durant la sonication est la création de cavités (plus particulièrement la création et l'effondrement de ces cavités), la friction et l'accroissement des débits de diffusion.



Introduction

Extraction par ultrasons (sonication):

Le temps est un paramètre important comme présenté ci-dessous.



Le temps moyen utilisé en chimie des substances naturelles est compris entre 5 et 30 minutes, mais peut être plus long > 70 min.

Les rendements obtenus sont comparables à une extraction par soxhlet d'une douzaine d'heures (à la même température).

Introduction

Extraction par ASE

Ce type d'extraction utilise le même principe que les techniques précédentes, mais à une pression plus importante (ca. 100-140 atm).

Il permet d'utiliser le solvant au delà de sa température d'ébullition. Sous ces conditions, le solvant a des propriétés qui favorisent le processus d'extraction:

- Viscosité faible
- Coefficient de diffusion élevé
- Force de solvatation élevée



Introduction

Extraction par micro-ondes

Le micro-onde agit sur certaines molécules, telles que l'eau (ou autres molécules dipolaires), qui absorbent l'onde, et convertissent son énergie en chaleur.

Ainsi dans un organisme, les micro-ondes sont absorbées par les parties les plus riches en eau, puis converties en chaleur.

Il en résulte une soudaine augmentation de la température à l'intérieur du matériel, jusqu'à ce que la pression interne dépasse la capacité d'expansion des parois cellulaires.

Les métabolites sont ainsi extraits.



Introduction

Extraction par fluides supercritiques

Les fluides supercritiques pénètrent les échantillons presque aussi facilement que les gaz. Ceci est dû à leur coefficient de diffusion élevé ainsi qu'à leur viscosité réduite.

Leur solubilité est cependant proche de celle des liquides.

Le CO₂ reste le gaz le plus utilisé de par ses paramètres critiques, mais il reste néanmoins un solvant non polaire.

En mélange avec des solvants organiques plus polaires, il permet d'extraire des métabolites de polarité moyenne.

L'avantage principal est la réduction du volume de solvant utilisé ainsi que du temps d'extraction.



Introduction

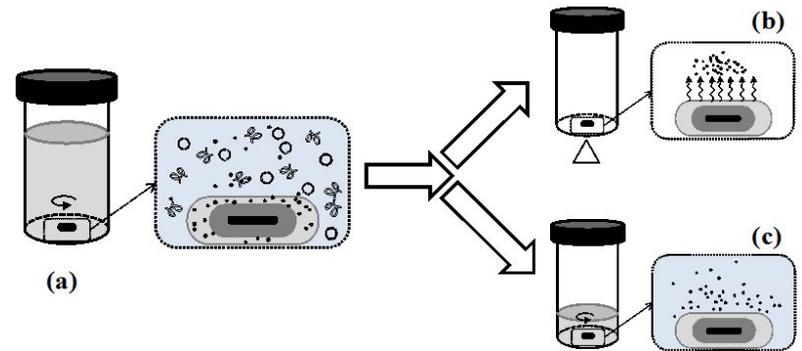
SBSE

La « stir bar sorbtive extraction » est une technique d'extraction analytique qui permet de capter les molécules dans un milieu (rivière, milieu de culture, mer, etc...).

En fonction de leur coefficient de partage octanol/eau, les molécules sont adsorbées sur la couche de PDMS.

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte:

- Les concentrations en métabolites
- Le coefficients de partage
- Les durées d'exposition



Introduction

Comparaison des différentes méthodes

Toutes les techniques d'extraction présentées ont des avantages et des inconvénients.

Comparison of various liquid–solid extraction techniques used in the analysis of plant metabolites [45]

Extraction	Soxhlet	USE	ASE	MAE	SFE
Cost	Low	Low	High	Medium	High
Extraction time	6–48 h	<30 min	<30 min	<30 min	<60 min
Solvent use [mL]	200–600	<50	<100	<40	<10

Designation: USE – ultrasonic extraction; ASE – accelerated solvent extraction; MAE – microwave-assisted extraction; SFE – supercritical fluid extraction.

Il manque un élément essentiel: le spectre d'extraction. Mais celui-ci ne dépend pas seulement de la technique utilisée. En effet le spectre est fortement corrélé avec le/les solvants utilisés.

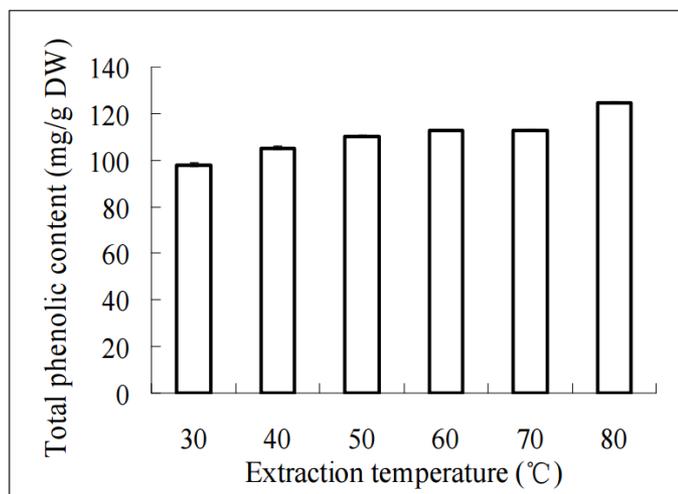
Introduction

Différents paramètres peuvent influencer l'extraction:

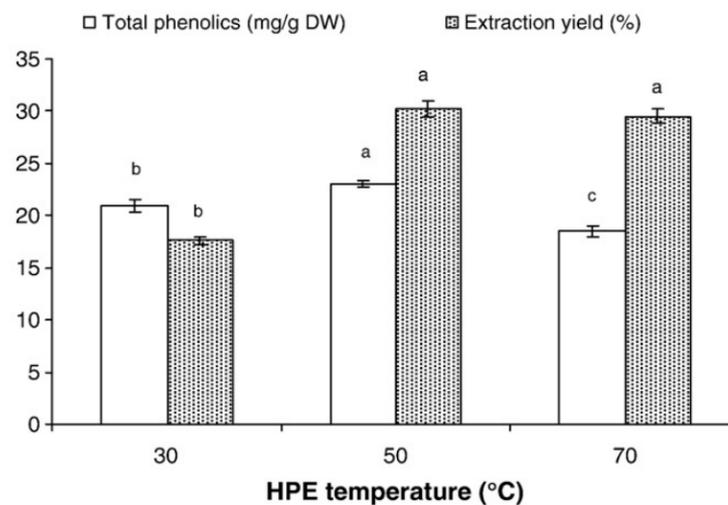
- Température
- Pression
- Durée
- Le pH
- Le type de solvant
- Le nombre de solvant

Introduction

Influence de la température



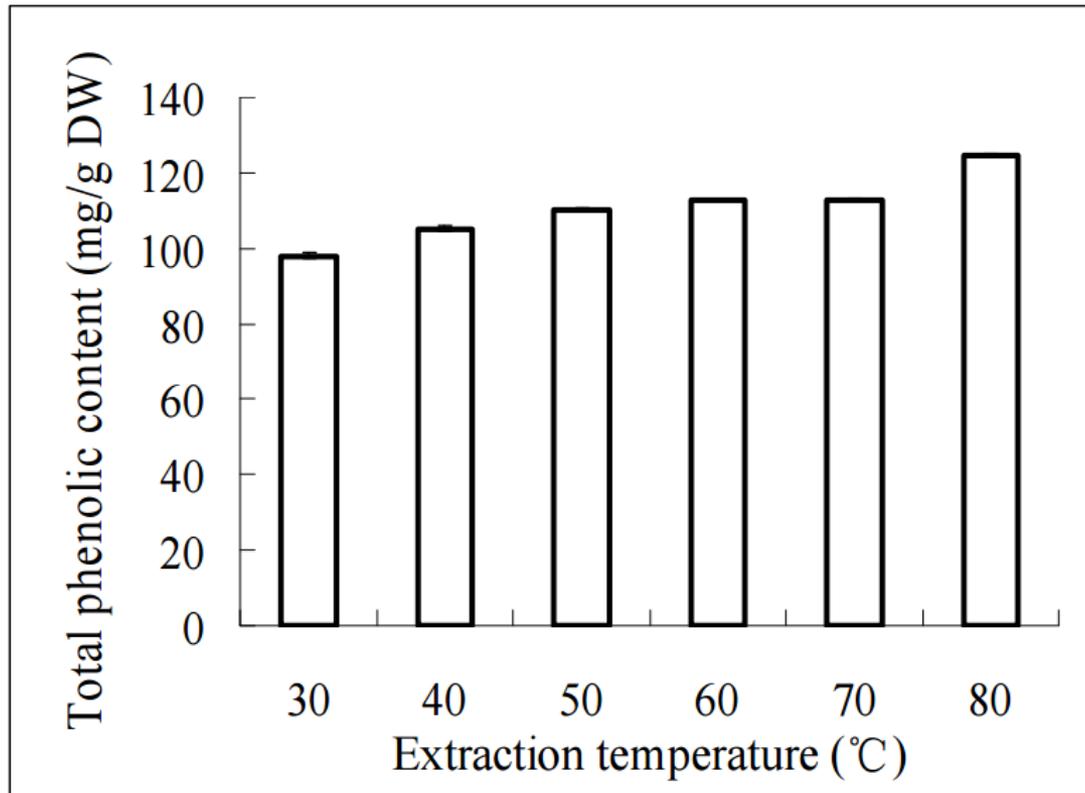
Péricarpe de litchi



Péricarpe de longane

Introduction

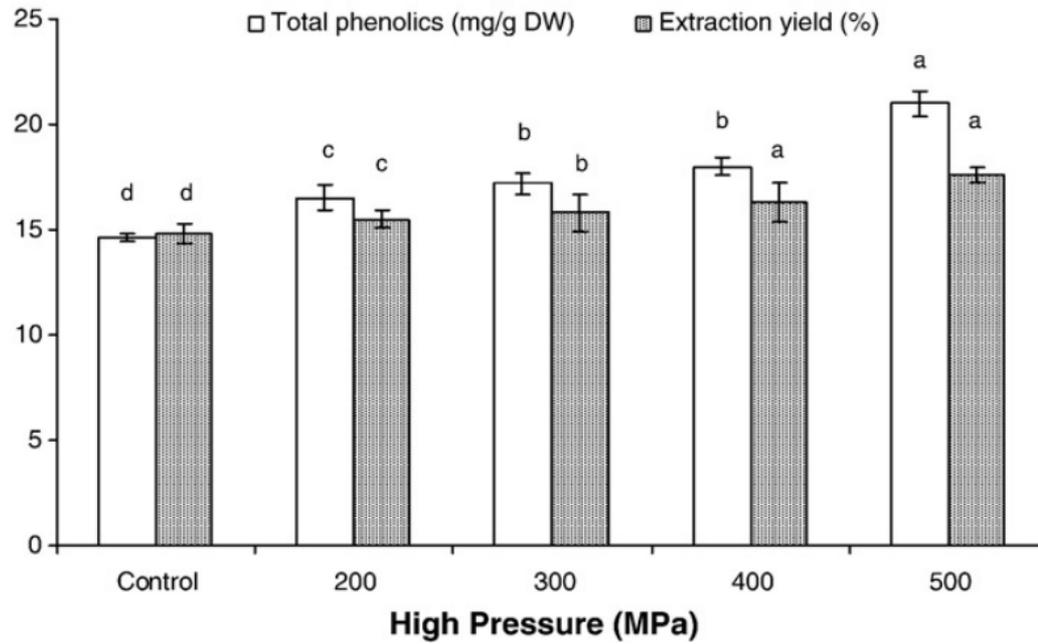
Influence du pH: exemple du litchi



Variation du rendement d'extraction en fonction du pH.

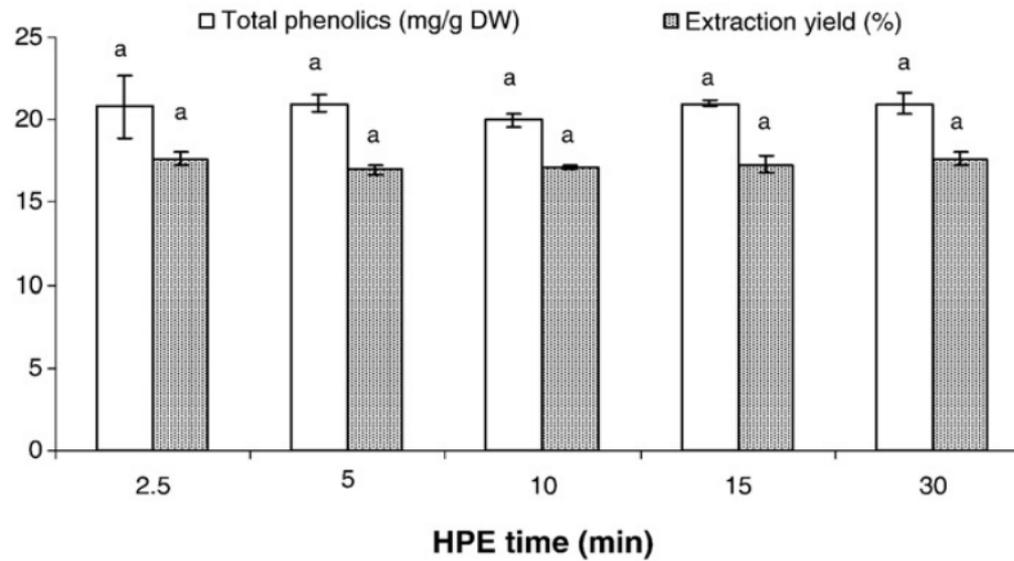
Introduction

Influence de la pression



Introduction

Influence du temps



Introduction

Influence du solvant

Le solvant joue un rôle primordial dans le processus d'extraction étant donné que la solubilité est le paramètre le plus important.

Le changement du solvant a un impact direct sur la composition en métabolites de l'extrait obtenu.

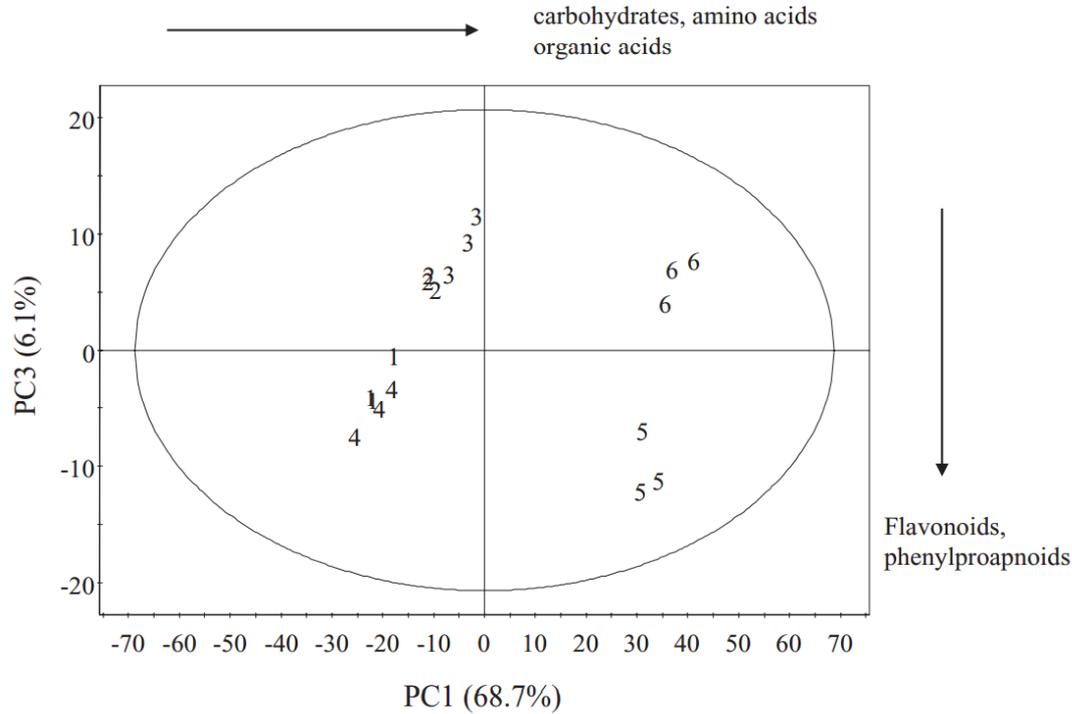


Figure 5. Principal component analysis score plot of *Arabidopsis* extracted with different polar solvents. **1**, Acetone; **2**, Acetone–MeOH (1 : 1); **3**, MeOH; **4**, AcCN; **5**, MeOH–water (1 : 1); **6**, Water. Adapted from Verpoorte *et al.* (2007) with kind permission from Springer.

Introduction

Extraction

Il n'existe pas de solvant miracle et le solvant dépend surtout de la matrice étudiée.

Un procédé a cependant été mis au point pour permettre d'obtenir des extraits de bonne qualité en utilisant un volume de solvant réduit.

Les tubes de lyse permettent d'extraire différents tissus avec un bon rendement en utilisant un volume de solvant réduit. Le spectre de solvants utilisables est assez large (compatibilité avec les vials) et la température dépend de la durée d'agitation.

Les extraits sont comparables à ceux obtenus par soxhlet ou sonication avec une durée d'extraction < 5 min



Application

Extraction de plantes

Aucun type d'extraction ne permet d'obtenir tous les métabolites d'une plante.

Type de métabolites:

- Phénols et flavonoïdes
- Terpènes
- Coumarines
- Stérols
- Alcaloïdes



Afin d'obtenir un extrait représentatif, différents (mélange de) solvants on été proposés:

- Acétate d'éthyle
- Ethanol
- Methanol/dichloromethane (7:3 v/v)

De plus l'utilisation du precellys (tubes de lyse) est de plus en plus observée.

Application

Extraction d'organismes marins

Type de métabolites:

- Terpènes
- Stérols
- Alcaloïdes
- Saponines
- Polycétides



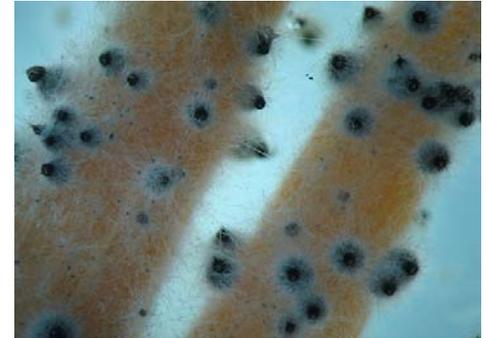
Plusieurs protocoles ont été proposés mais il semble que l'extraction par le mélange méthanol/dichlorométhane (1:1 v/v) conduise à des extraits de bonne qualité. Bien que les ultrasons soient encore majoritaires, l'utilisation des tubes de lyse est de plus en plus fréquente.

Application

Extraction de champignons

Type de métabolites:

- Terpènes
- Stéroïdes
- Alcaloïdes
- Saponines
- Polycétides



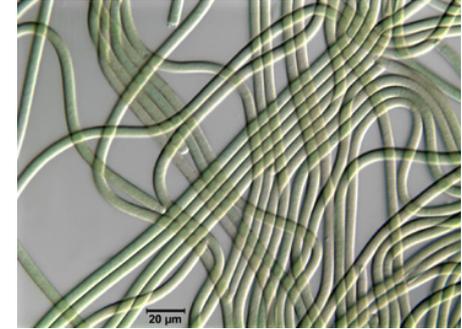
Pas de grandes différences observées entre ASE et sonication.
En terme de solvants, le mélange dichloromethane/acétate d'éthyle/méthanol (2:3:1) semble le plus adapté.

Application

Extraction de micro organismes: ex. micro algues

Type de métabolites:

- Terpènes
- Stérols
- Alcaloïdes
- Saponines
- Polycétides



- Plusieurs protocoles ont été proposés mais il semble que l'extraction par le mélange méthanol/dichlorométhane (1:1 v/v) conduise à des extraits de bonne qualité.

Conclusion

Il n'existe pas de solution parfaite pour l'extraction des métabolites.
Le type de solvants ainsi que les mélanges sont à déterminer en fonction de la matrice étudiée.

