

Etude des céramides et sphingomyélines des arachides (*Arachishypogaea* L.) de Manga et de Lékana en HPLC ESI-MS/MS

J.P.L. OSSOKO, Y. OKANDZA, J. ENZONGA YOCA, M.G. DZONDO, and M.D. MVOULA TSIERI

Laboratoire de Transformation et Qualité des Aliments, ENSAF : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et Foresterie, (UMNG) Brazzaville, Republic of the Congo

Copyright © 2019 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Manga peanuts are a source of Sphingomyelin and Ceramides. These molecules studied were identified by mass spectrometry. All classes of Ceramides and so of sphingomyelin are been identified although these aren't the main components of the studied seed oil.

KEYWORDS: Peanuts, Manga, Lékana, Sphingomyelin, Ceramides, HPLC-ESI-MS/MS.

RÉSUMÉ: Les arachides de Manga constituent une source de sphingomyélines et des Céramides. Ces molécules étudiées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Toutes les classes des céramides et ainsi que des sphingomyélines sont été identifiées bien que ce ne sont pas les constituants majeurs d'huile des graines étudiées.

MOTS-CLEFS: Arachides, Manga, Lékana, Sphingomyélines, Céramides, HPLC ESI-MS/MS.

1 INTRODUCTION

L'arachide (*Arachishypogaea* L., Fabaceae) est une plante légumineuse originaire d'Amérique Latine [1]. Elle est originaire du sud de la Bolivie et du nord-ouest de l'Argentine. C'est une espèce cultivée largement au Mexique, en Amérique centrale et du sud depuis l'arrivée des Conquistadors. A l'époque précolombienne, l'arachide domestiquée avait déjà évoluée en plusieurs types avant son introduction dans l'ancien monde par des explorateurs Espagnols et Portugais.

Les plus grands producteurs sont la Chine et l'Inde qui fournissent plus de 60% de la production mondiale. Actuellement l'Afrique fournit environ 25% de la production notamment le Nigeria, le Sénégal et le Soudan [1]. Le Sénégal qui fut après l'indépendance le premier exportateur mondial d'arachide [2] connait depuis quelques années une crise de la filière arachidière [3].

Au Congo, l'agriculture est pratiquée par des cellules familiales (exploitations agricoles traditionnelles). Pourtant l'arachide occupe une place non négligeable dans les habitudes alimentaires des congolais.

Pour notre étude, nous avons utilisé l'arachide de MANGA est cultivée en terre MANGA dans le département de la Cuvette au nord-est d'Owando et au sud-est de Makoua et l'arachide de LEKANA est cultivée dans les sous-préfectures de LEKANA, de DJAMBALA, NGO et MBAN dans le département des Plateaux au centre. Selon des sources orales indigènes (témoignages des habitants de 16 villages de la terre Manga), l'arachide MANGA proviendrait de LEKANA. Cette arachide a été introduite en terre Manga en 1953 par le premier enseignant de l'école primaire de MANGA, originaire de LEKANA.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODE

Le matériel végétal utilisé dans cette étude se compose de graines d'arachides MANGA (Figure 1) et de LEKANA (Figure 2) récoltée entre janvier et février dans la zone MANGA et dans les environs de la sous-préfecture de LEKANA.



Fig. 1. Les graines d'arachides de MANGA



Fig. 2. Les graines d'arachides de LEKANA

2.1 EXTRACTION DE L'HUILE

L'extraction de l'huile a été réalisée selon la méthode Soxhlet [4], qui est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés. Les huiles des arachides des différents échantillons, ont été obtenues par extraction des graines (finement broyées), au Soxhlet pendant 6 heures à la température de 70°C. Les traces d'hexane ont été éliminées au rotavapor. L'huile extraite a été tout de suite analysée.

Nous nous sommes intéressés dans notre étude à comparer les céramides et les sphingomyélines obtenus à partir des deux huiles d'arachides (*Arachis hypogaea* L.) cultivées au Congo-Brazzaville.

2.2 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR L'ANALYSE

2.2.1 PRÉPARATION DE LA PLAQUE

La plaque avant utilisation est placée dans une cuve contenant le diéthy Ether. Une heure après, on retire la plaque de la cuve, on délimite le niveau de l'élution du solvant et on la sèche à l'étuve.

Après le séchage de la plaque, on dépose tout le long de la ligne de dépôt, 200 µL de l'échantillon d'huile sur la plaque préparée. On n'attend que l'échantillon sèche sur la plaque avant de la placer dans une cuve contenant le mélange de solvants d'élution. Nous avons utilisé le mélange suivant : Hexane/ Diéthy Ether/ Acide acétique (80 : 30 : 1, V/V/V). La révélation s'est faite à l'iode.

2.2.2 SÉPARATION ET EXTRACTION DES LIPIDES

Nous avons réalisé d'autres plaques dans les mêmes conditions mais sans faire de révélation à l'iode qui modifierait les résultats attendus car il se fixe sur les doubles liaisons des acides gras insaturés et augmenterait la masse de certains ions ; ce qui rendrait impossible l'analyse des résultats. Cependant les plaques révélées nous ont permis de délimiter les différentes couches des lipides sur les plaques non révélées.

A l'aide d'une spatule on sépare les différents groupes de lipides ; On gratte les plaques afin de séparer ces groupes de lipides. On filtre ensuite chaque partie recueillie en utilisant de l'hexane. Ces fractions de lipides obtenues après filtration constituent nos échantillons à analyser en ESI/MS.

2.3 ANALYSE DES STÉROLS PAR ESI/MS⁺ ET PAR ESI/MS⁻

On étudie par infusion 10 à 20 µL de l'échantillon contenant les lipides en ESI/MS⁺ ou ESI/MS⁻. Les composés sont identifiés grâce à leurs ions moléculaires. Leurs structures sont confirmées par MS/MS.

2.3.1 ANALYSE DES CÉRAMIDES ET DES SPHINGOMYÉLINES

2.3.1.1 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Cinq (05) grammes d'arachides broyées sont mélangés avec le méthanol et l'eau ultra pure dans les proportions MeOH/Eau (2/1 : V/V). Le mélange est tourbillonné pendant 10 à 15 minutes pour extraire la fraction lipidique de l'échantillon. On laisse le mélange au repos pendant 5 minutes et on filtre le mélange. Le filtrat est séché sous azote puis on ajoute un mélange de solvant suivant composé MeOH : 2,5 mL (2% acétate), Eau : 2,1 mL et le dichlorométhane (CH₂Cl₂) : 2,5 mL. On homogénéise le mélange et on laisse au repos. La solution présente deux phases : la phase aqueuse au-dessus est éliminée et on retient la phase organique qui constituera l'échantillon à analyser.

2.3.1.2 ANALYSE DES LIPIDES

On étudie par infusion 10 à 20 µL de l'échantillon contenant les lipides en ESI/MS⁺ ou ESI/MS⁻ et en HPLC/MS.

Pour l'HPLC/MS, le solvant utilisé ici est l'acétonitrile. Le formate d'ammonium (>99%) a été fourni par Sigma Aldrich. Le liquide synthétique standard (Cer d 18 :1/18 :0, Cer d 18 :1/15 :0, PE 12 :0/12 :0, PE 16 :0/16 :0, PC 13 :0/13 :0, PC 16 :0/16 :0, SM d 18 :1/18 :0, SM d 18 :1/12 :0, PI 18 :1/18 :1, PS 12 :0/12 :0, PS 18 :0/18 :0) utilisé a été fourni par Avanti lipides polaires. Le standard synthétique PI 16 :0/17 :0 a été fourni par J. Clark (Cambridge).

Les différents standards et échantillons ont été préparés en pesant 1mg de chaque que l'on dissout dans 1ml de MeOH (pour SM et Cer), CHCl₃ (pour PE, PC) ou dans un mélange CHCl₃/MeOH/H₂O (20 :9 :1 v/v/v) (pour PI et PS) et stocké à -20°C. Les solutions de calibration sont préparées à partir des solutions précédentes dans le MeOH (Vf 50 µL) pour obtenir dix points de calibration avec des niveaux de concentrations fixés (Cer d18 :1/15:0, 320 pg/ µL ; PE 12 :0/12:0 3,6 ng/ µL ; PC 13 :0/13:0 320 pg/ µL ; SM d18 :1/12:0 320 pg / µL ; PI 16 :0/17:0 0,6 ng/ µL ; PS 12 :0/12:0 3,125 ng/ µL).

Les solutions standards et les échantillons ont été ensuite analysés à la HPLC/MS.

Les composés sont identifiés grâce à leurs ions moléculaires. Leurs structures sont confirmées par MS/MS.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des résultats de la HPLC ESI-MS/MS, nous ont permis d'identifier les différentes molécules de céramides et de sphingomyélines présentées dans le tableau ci-dessous :

Différents céramides et Sphingomyélines identifiés	Ions moléculaires (m/z) (M+H) ⁺ ; (M-H) ⁻	Arachides de «Manga»	Arachides de Lékana	
Céramides	506- (Positive)	C _{16:0} /C _{16:0}	C _{16:0} /C _{16:0}	
	518- (Positive)	C _{16:0} /C _{16:1}	C _{16:0} /C _{16:1}	
	520- (Positive)	C _{16:1} /C _{18:1}	C _{16:1} /C _{18:1}	
	544- (Positive)	C _{16:0} /C _{18:1}	C _{16:0} /C _{18:1}	
	546- (Positive)	C _{16:0} /C _{18:0}	C _{16:0} /C _{18:0}	
	576- (Positive)	C _{16:0} /C _{20:1}	C _{16:0} /C _{20:1}	
	604- (Positive)	C _{18:0} /C _{20:1}	C _{18:0} /C _{20:1}	
	630- (Positive)	C _{18:2} /C _{22:0}	C _{18:2} /C _{22:0}	
	632- (Positive)	C _{18:1} /C _{22:0}	C _{18:1} /C _{22:0}	
	658- (Positive)	C _{18:1} /C _{24:0}	C _{18:1} /C _{24:0}	
	660- (Positive)	C _{18:0} /C _{24:0}	C _{18:0} /C _{24:0}	
	Sphingomyélines	675,6 (Négative)	C _{16:1} /C _{16:0}	C _{16:1} /C _{16:0}
701,6 (Négative)		C _{16:1} /C _{18:0}	C _{16:1} /C _{18:0}	
703,6 (Négative)		C _{16:0} /C _{18:0}	C _{16:0} /C _{18:0}	
729,6 (Négative)		C _{16:1} /C _{20:1}	C _{16:1} /C _{20:1}	
731,6 (Négative)		C _{16:0} /C _{20:1}	C _{16:0} /C _{20:1}	
757,6 (Négative)		C _{18:1} /C _{20:1}	C _{18:1} /C _{20:1}	
759,6 (Négative)		C _{18:0} /C _{20:1}	C _{18:0} /C _{20:1}	
785,6 (Négative)		C _{18:2} /C _{22:0}	C _{18:2} /C _{22:0}	
787,6 (Négative)		C _{18:1} /C _{22:0}	C _{18:1} /C _{22:0}	
811,6 (Négative)		C _{18:2} /C _{24:0}	C _{18:2} /C _{24:0}	C _{18:1} /C _{24:0}
813,6 (Négative)		C _{18:0} /C _{24:0}	C _{18:0} /C _{24:0}	
815,6 (Négative)				

Les m/z identifiés ont été calculés et retrouvés par certains auteurs [5,6,7,8].

Le scanner utilisé était de type MRM. L'énergie de collision optimale utilisée pour les céramides et sphingomyélines était de 25eV.

4 CONCLUSION

Toutes les classes des céramides et ainsi que des sphingomyélines ont été identifiées. Une étude d'analyses fines sur les constituants biochimiques des huiles autres que les céramides, les sphingomyélines, seront diversifiées pour cerner le maximum de biomolécules tels que les glycolipides, les isoprénides (terpènes, xanthophylles, carotènes, vitamine A, phyloquinones ou vitamines K, tocophérols ou vitamines E,...) susceptibles d'intéresser les industries pharmaceutique et cosmétique.

REFERENCES

- [1] Kouadio A.L. 2007. Des interuniversitaires en gestion des risques naturels : Préviation de la production nationale d'arachide au Sénégal à partir du modèle agro météorologique AMS et du NDVI. ULG-Gembloux 54 p.
- [2] Freud C., Freud E.H., Richard J. è Thenevin P. 1997. L'arachide au Sénégal: un moteur en panne. Paris, Karthala 138 p.
- [3] KandiouaraNoba, AblayeNgom, MadiopGuèye, César Bassène, Maïmouna Kane, Ibou Diop, FatouNdoye, Mame Samba Mbaye, Aboubacry Kane et Amadou Tidiane Ba. L'arachide au Sénégal : état des lieux, contraintes et perspectives pour la relance de la filière. OCL 2014, 21(2) D205.
- [4] NF ISO 8262-3 2006. *Détermination de la teneur en matière grasse*. Association Française de Normalisation AFNOR, Paris France. *Journal home page: www.elsevier.com/locate/foodchem*
- [5] Calvano C.D. and Zambonin C.G. (2013). MALDI-Q-TOF-MS Ionization and Fragmentation of Phospholipids and Neutral Lipids of Dairy Interest Using Variable Doping Salts. *Adv Dairy Res*, 1: 101. *Doi: 10.4172/2329-888X.1000101.8p*
- [6] Edwards G., Aribindi K., Guerra Y., Bhattacharya S K. (2014).Sphingolipids and ceramides of mouse aqueous humor: Comparative profiles from normotensive DBA/2J mice. *Journal home page: www.elsevier.com/locate/biochi*.105: 99-109
- [7] Knittelfelder Oskar L., Weberhofer Bernd P., Eichmann Thomas O., Kohlwein Sepp D. A. (2014). Versatile ultra-high performance LC-MS method for lipid profiling. *Journal of Chromatography B*, 951-952: 119-128.
- [8] Morita Y., Sakaguchi T., Ikegami K., Goto-Inoue N., Hayasaka T., Thi Hang V., Tanaka H., Harada T., Shibasaki Y., Suzuki A., Fukumoto K., Inaba K., Murakami M., Setou M., and Konno H. (2013). Lysophosphatidycholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression. *Journal of Hepatology*, 59: 292-299.