UNIVERSITÉ DU BURUNDI
GRENIER DU SAVOIR DU BURUNDI
Dépôt institutionnel officiel
https://repository.ub.edu.bi

# Les huiles volatiles naturelles de Rubia Cordifolia,L. plectranthus defoliatus,H.

**BUKURU, Jacques; Directeur: Dr.-Léonard HARI . . Coodirecteur: Dr. I-L DE POOTER**

**1991-11**

UB, FACULTEDES SCIENCES

https://repository.ub.edu.bi/handle/123456789/835

Document téléchargé depuis le **Grenier du Savoir du Burundi** — https://repository.ub.edu.bi

UNIVERSITE DU BURUNDI
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

# LES HUILES VOLATILES NATURELLES DE RUBIA CORDIFOLIA, L. ET DE PLECTRANTHUS DEFOLIATUS, H.

par

Jacques BUKURU

Directeur : Dr.Léonard HARI

Co-directeur: Dr. H. DE POOTER

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en Sciences Chimiques

BUJUMBURA, Novembre 1991

A ma persévérante mère,

A mes frères et soeurs,

A tous les membres du C.B.U.,

Je dédie ce mémoire.

## AVANT-PROPOS.

Au terme du présent travail, grand est notre désir d'exprimer notre profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à sa réalisation.

Nous voudrions adresser nos sincères remerciements au Dr Léonard HARI, initiateur et directeur de ce travail, pour ses précieux conseils et suggestions, et pour sa louable disponibilité à notre égard.

Nous remercions profondément le Dr H. De POOTER pour en avoir assuré la co-direction. Nous lui témoignons notre franche reconnaissance pour son soutien technique et pour les très utiles conseils qu'il nous a prodigués.

A tous les professeurs du Département de Chimie, nous adressons nos vifs remerciements pour la formation qu'ils nous ont donnée.

Nous voudrions exprimer notre profonde gratitude à notre soeur Emilienne Joy INABASHENGEZI pour son soutien moral et matériel sans précédent.

Nous ne pourrons jamais oublier Mme NTABAHUNGU Xavière qui a mis à notre disposition son " computer" et qui nous a assuré un concours technique. Du fond de notre coeur, nous lui disons : Merci !

Jacques BUKURU,

Bujumbura, Novembre 1991.

## TABLE DES MATIERES


Page

Abréviations et Signes utilisés ..... 1
Résumé ..... 2
I. Introduction Générale ..... 3
I.1. Raisons du choix du sujet ..... 4
I.2. Classification et écogéographie des plantes..... étudiées ..... 5
I.2.1 Rubia cordifolia,L. ..... 5
I.2.2. Plectranthus defoliatus, H. ..... 5
I.3. Théorie sur les huiles volatiles ..... 6
I.3.1. Définition ..... 6
I.3.2. Propriétés physiques ..... 8
I.3.3. Composition chimique ..... 8
I.3.4. Biosynthèse des terpènes ..... 10
I.3.5. Les différentes formes de monoterpènes..... 13
I.4. Intérêts économiques et pharmaceutiques des ..... huiles volatiles ..... 15
II. Partie Expérimentale ..... 16
II.1. Préparation préliminaire du matériel végétal..... 16
II.2. Extraction et analyse des huiles essentielles .... 16
II.2.1. Méthodes d'extraction ..... 16
a. Entraînement à la vapeur ..... 16
b. Expression ..... 19
c. Hydrodistillation ..... 19
d. Enfleurage ..... 19
e. Extraction directe par un solvant ..... 19
II.2.2. Extraction proprement dite ..... 20
a. Mode opératoire ..... 20
b. Résultats obtenus ..... 21
II.2.3. Méthodes d'analyse ..... 21

II.2.4. Les analyses ..... 22
a. Analyses par GC ..... 22
b. Analyses par GC-MS ..... 23
II.3. Résultats des analyses ..... 23
II.4. Discussion des résultats ..... 34
II.5 Recherche des alcaloïdes de Rubia cordifolia,L.... 43
II.5.1. Résultats du screening phytochimique ..... 43
a. Extrait éthéré ..... 44
b. Extrait alcoolique ..... 45
c. Extrait aqueux ..... 46
II.5.2. Extraction et isolation des alcaloïdes .... 46
a. Méthode d'extraction ..... 46
b. Isolation ..... 47
c. Quelques caractéristiques .....
des produits isolés..... 48
d. Hypothèse ..... 49
III. Conclusion Générale et Recommandations ..... 50
IV. Annexes ..... 52
Annexe 1: Méthode d'analyse GC-MS ..... 52
A. Notions de Chromatographie en Phase gazeuse..... 52
A.1. Définition et principes ..... 52
A.2. Schéma de fonctionnement d'un .....
chromatographe ..... 53
A.3. Quelques grandeurs mesurées en GC ..... 54
B. Notions sur la spectrométrie de masse ..... 56
B.1. Principe de base ..... 56
B.2. Schéma d'un spectromètre de masse ..... 57
C. Interface de couplage GC-MS ..... 58
Annexe 2: Composition des huiles essentielles de .....
quelques Lamiacées (ou Labicées) médicinales.. 59
Bibliographie..... 61

---

## ABREVIATIONS ET SIGNES UTILISES.

CC : Chromatographie sur Colonne

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

C.R.P.M.T. : Centre de Recherche et de Promotion de la Médecine Traditionnelle

CRUPHAMET : Centre de Recherche Universitaire en Pharmacopée et Médecine Traditionnelle

FID : Flamme Ionization Detector

FSOT : Fused silica Open Tubular.

GC : Gas Chromatography

MS : Mass Spectrometry

P.C. : Personal Computer

P.M. : Poids Moléculaire

TIC : Total ion-current

[...] : Les chiffres entre crochets correspondent aux références bibliographiques consultées.

## RESUME

Ce travail de recherche porte sur l'extraction et l'identification des huiles volatiles de deux plantes locales:

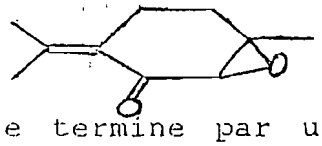
Rubia cordifolia, L. et

Plectranthus defoliatus, H.

Dans une introduction générale, nous énumérons d'abord les raisons qui nous ont poussé à choisir un tel sujet, nous donnons ensuite une brève description des plantes étudiées, suivie d'un aperçu théorique sur les huiles volatiles et nous soulignons enfin l'importance économique et pharmaceutique de ces substances.

La partie expérimentale débute par un bref exposé des méthodes d'extraction, suivi des résultats obtenus. Viennent ensuite les méthodes d'analyse que nous avons, pour simplifier, détaillées dans l'Annexe 1.

Les résultats des analyses nous ont montré que contrairement à Rubia cordifolia, L., Plectranthus defoliatus, H. est très riche en huile essentielle. Le composant principal de cette huile est l'oxyde de pipériténone (64,8%):



Cette partie se termine par une recherche d'autres principes actifs dans la plante Rubia cordifolia, L., cela pour élucider son usage très répandu en médecine traditionnelle. Nous avons mis en évidence une présence notable d'alcaloïdes.

Nous avons donné dans l'Annexe 1, quelques notions sur les méthodes d'analyse que nous avons exploitées (GC et MS), tandis que l'Annexe 2 a été consacré à la composition chimique des huiles essentielles de quelques Lamiacées déjà étudiées par d'autres chercheurs.

# I. INTRODUCTION GENERALE

L'étude des écosystèmes biologiques nous apprend, de façon indéniable, que les plantes constituent un élément indispensable de la plupart des chaînes trophiques.

Mais, depuis fort longtemps, l'usage de certaines plantes pour guérir bon nombre de maladies a prouvé que l'importance des végétaux pour le monde animal, et pour l'homme en particulier, est non seulement alimentaire, mais aussi thérapeutique. Aussi a-t-on vu que la médecine traditionnelle, dans tous les pays du monde, exploite des plantes à effets physiologiques particuliers pour guérir de nombreux maux. Ces propriétés sont dues à la présence de divers principes actifs. On a ainsi mis en évidence des plantes anti-venimeuses, des plantes vermifuges, anti-diarrhéiques, anti-mucostiques, stimulantes de l'appétit, etc...[5,19,20,21,23,26,29].

Mais, étant donné que la médecine traditionnelle ne tient souvent compte ni de la toxicité éventuelle de certains principes actifs, ni des effets néfastes ou déficients d'une posologie imprécise, la recherche scientifique s'évertue actuellement à mener une étude détaillée des plantes médicinales en vue de la rationalisation et de l'optimalisation de leur utilisation.

Les principes actifs qui ont le plus souvent retenu l'attention des chercheurs sont les anthraquinones, les tannins, les alcaloïdes, les iridoïdes, les phénoliques, les flavonoïdes.

Cependant, un domaine non moins important suscite aujourd'hui, chez bien de gens, un intérêt particulier pour les plantes médicinales: C'est celui des huiles volatiles. Ce domaine fut pendant longtemps négligé. C'est grâce au développement des industries des parfums, des cosmétiques et de l'industrie alimentaire dont elles constituent la matière première, qu'il y a eu regain d'intérêt pour les huiles volatiles.

Au Burundi, un chemin long reste encore à parcourir dans l'étude des huiles volatiles.

Mais la richesse de notre flore en plantes odorantes constitue un atout pour une investigation poussée dans ce domaine.

## I. 1. Raisons du choix du sujet.

L'étude des huiles volatiles, dans notre pays, est encore à son début. Peu (presque pas) de travaux y relatifs ont déjà été effectués. Ceux qui intéresseraient notre région ont été effectués l'un en 1944 sur les Labiées (ou Lamiacées) médicinales [12], l'autre en 1958 sur l'Eucalyptus dives " type" originaire du Kivu.[17]

C'est dans le but de contribuer à l'étude des huiles volatiles naturelles de notre pays que nous avons voulu rechercher, extraire et analyser les huiles volatiles de deux plantes locales: Rubia Cordifolia, L. (ssp. conotricha, nom vernaculaire: UMUKAKA) et Plectranthus defoliatus, H. (nom vernaculaire: UMUKUYANGOMA).

Les deux plantes, quant à elles, nous semblaient intéressantes d'une part pour leur odeur ( bien que moins particulière et moins intense pour la première) et, d'autre part,pour leur usage répandu en médecine traditionnelle.

Par ailleurs, dans la recherche systématique sur la composition de Rubia cordifolia, L. ( réalisée au CRUPHAMET), des substances non polaires non encore identifiées se sont révélées être des substances huileuses. En outre, cette plante est souvent utilisée pour les mêmes soins que Pentas longiflora dont la fraction non polaire (CRUPHAMET) avait montré des substances à caractère huileux .

Toutes ces raisons nous ont poussé à étudier la composition en huiles volatiles de Rubia cordifolia,L. tandis que pour Plectranthus defoliatus, H., cette étude a été conditionnée par son odeur attrayante. C'est certainement à cause de cette odeur agréable que les feuilles de cette plante sont utilisées par certains ménages burundais pour le conditionnement des ustensiles notamment ceux utilisés pour la conservation des produits laitiers.

Caractéristiques odoriférantes et usages thérapeutiques.

| Plante | Propriétés odoriférantes | Usages thérapeutiques |
|---|---|---|
| Rubia Cordifolia, L. | * plante fraîche :<br>- odeur légèrement agréable<br>- dominance de l'odeur des herbes fraîchement coupées<br>* Plante sèche :<br>- odeur plus intense<br>- odeur de chocolat | *$_1$ Contre l'odeur malsaine du corps (surtout des aisselles)<br>*$_{1,2}$ Pour les femmes enceintes et les femmes allaitantes.<br>*$_1$ Contre le point de côté<br>*$_1$ Contre certaines maladies de la peau.<br>*$_2$ Contre l'indigestion<br>*$_2$ contre le Kwashiorkor |
| Plectranthus defoliatus, H. | Odeur agréable et intense | Utilisée, à cause de son odeur, pour oindre les ustensiles utilisés pour la conservation du lait. |

*$_1$ : Informations livrées par les guérisseurs traditionnels.

*$_{1,2}$ : Informations livrées par les guérisseurs traditionnels et par le C.R.P.M.T.

*$_2$ : Informations livrées par le C.R.P.M.T.

## I. 2. Classification et écogéographie des plantes étudiées.

### I.2.1. Rubia Cordifolia, L.

Rubia Cordifolia, L. est une dicotylédone faisant partie de l'ordre des Rubiales et de la famille des Rubiacées.

C'est une plante essentiellement tropicale , elle se trouve sous forme de liane et elle pousse sur des terrains post-culturaux ou rudéraux et dans les savanes.

### I.2.2. Plectranthus defoliantus, H.

Cette plante est une dicotylédone appartenant à l'ordre des Lamiales et à la famille des Lamiacées.

C'est un sous-arbuste poussant dans la savane ou sur des terrains post-culturaux ou rudéraux à climat méditerranéen [1,3,11].

I. 3. Théorie sur les huiles volatiles. [ 4,24,25,28]

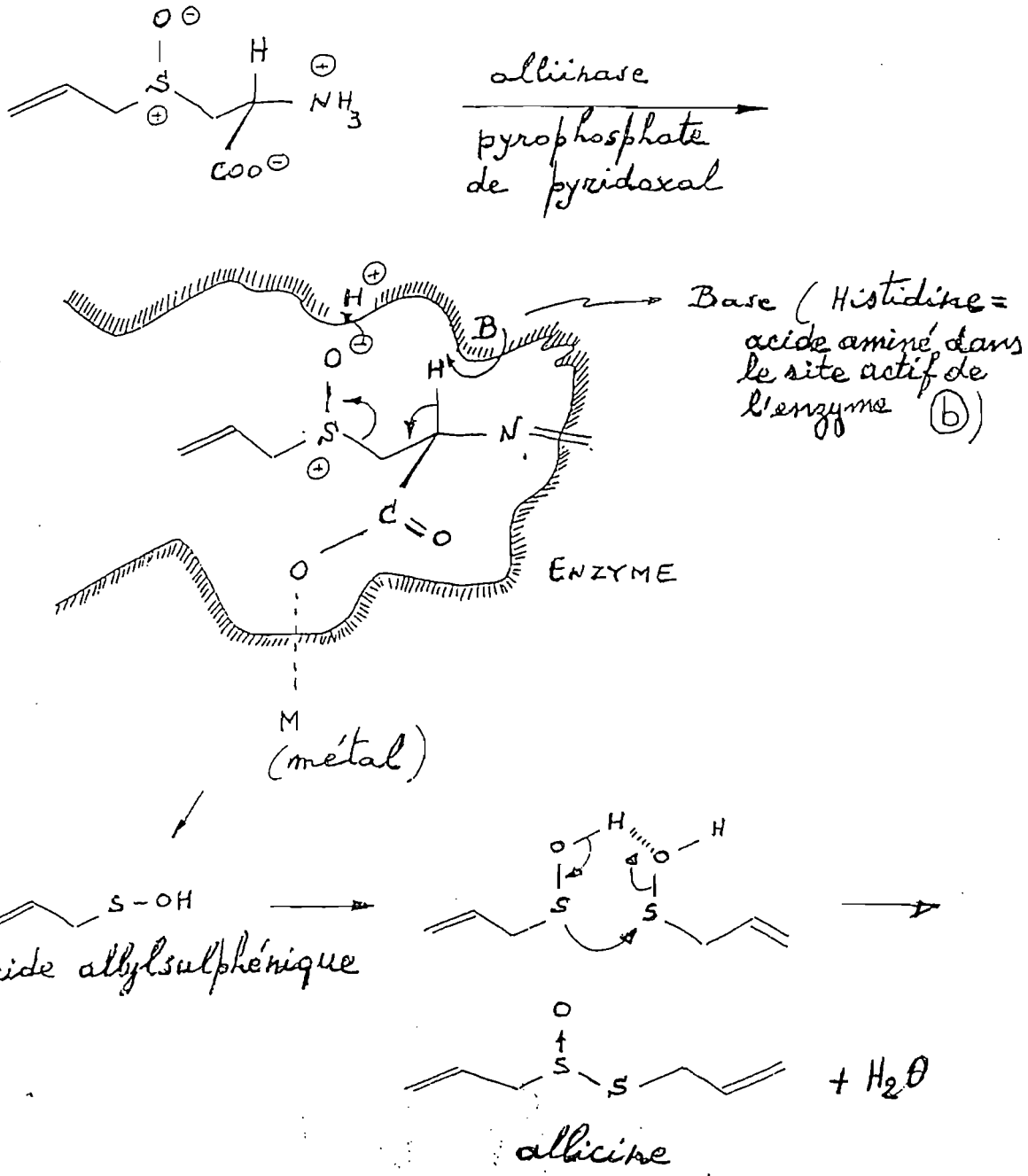
I.3.1. Définition.

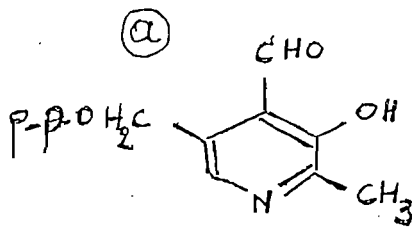
Les huiles volatiles sont des mélanges odorants de composition généralement assez complexe. Elles sont, pour la plupart, d'origine végétale, mais on peut les trouver dans les sécrétions glandulaires de certains animaux.

Elles sont plus ou moins modifiées au cours de la préparation. Ces huiles volatiles portent le nom général d'huiles essentielles ou simplement essences. Leur volatilité les oppose aux huiles fixes qui sont des lipides.

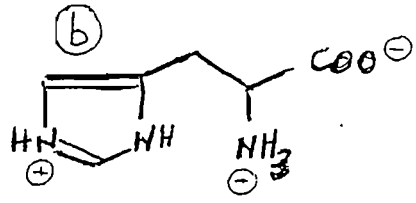
Sous le nom d'essence, on désigne aussi quelquefois des produits odorants non préformés chez le végétal, mais provenant de l'hydrolyse enzymatique d'hétérosides (par exemple l'essence d'amandes amères). Dans la racine de Valériane fraîche, il n'existe que des traces d'huile essentielle. L'augmentation de celle-ci par dédoublement d'esters fait apparaître l'odeur désagréable. Chez l'ail, l'essence dérive, non d'un hétéroside, mais d'un amino-acide soufré, l'alliine , seul présent dans la plante fraîche, celui-ci est décomposé sous l'influence d'une enzyme, l'alliinase, en un sulfoxyde, l'allicine, donnant naissance au disulfure d'allyle. Cette substance est un antibiotique capable de tuer le batonnet de diphtérie et la bactérie de choléra.

Sous l'action d'un enzyme (l'alliinase) ayant comme coenzyme le pyrophosphate de pyridoxal (a) , l'alliine est transformée en allicine :




le pyrophosphate de pyridoxal




l'histidine (acide aminé)

## I. 3.2. Propriétés physiques.

Les huiles essentielles sont généralement liquides à la température ordinaire, d'odeur aromatique, rarement colorées quand elles sont fraîches ( les essences à azulènes: camomille et surtout de Matricaire, sont bleues).

Leur densité est le plus souvent inférieure à celle de l'eau à l'exception des essences de canelle, de Girofle et de Sassafras.

Elles ont un indice de réfraction élevé et, le plus souvent, sont douées de pouvoir rotatoire.

A cause de leur volatilité et de leur solubilité réduite dans l'eau, elles sont entraînables à la vapeur d'eau.

Très peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leur odeur.

Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, la plupart des solvants organiques et dans les huiles fixes.

## I. 3.3. Composition chimique.

Ces mélanges peuvent contenir des substances chimiques à fonctions diverses: des alcools, des éthers, des aldéhydes, des cétones, des esters, de lactones etc...

Les constituants principaux des huiles volatiles sont des hydrocarbures terpéniques( aliphatiques, mono et bicycliques, parfois sesquiterpéniques) et leurs dérivés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones). On rencontre aussi dans les huiles essentielles des composés acycliques: acides organiques à faible PM ( formique, acétique, valérique), alcools, aldéhydes, cétones (méthyl- nonylcétone) et surtout des dérivés aromatiques: aldéhydes ( anisique, cuminique, cinnamique), phénols et leurs éthers (thymol, eugénol, anéthole); on trouve enfin des coumarines (bergaptène, ombelliférone).

Les substances organiques communes à beaucoup d'huiles essentielles sont les terpènes. L'unité monomérique dont semblent dérivés tous les terpènes est l'isoprène ( qui est aussi le monomère du caoutchouc naturel):

$$CH_2 = \underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{C}} - CH = CH_2$$

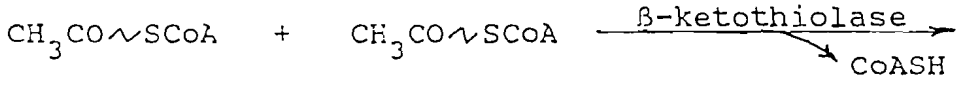
Les unités monomériques se polymérisent pour former de différentes structures géométriques à différentes odeurs. Des « terpènes oxygénés » se forment lorsque l'oxygène est introduit dans la molécule, qu'elle soit cyclique ou aliphatique.

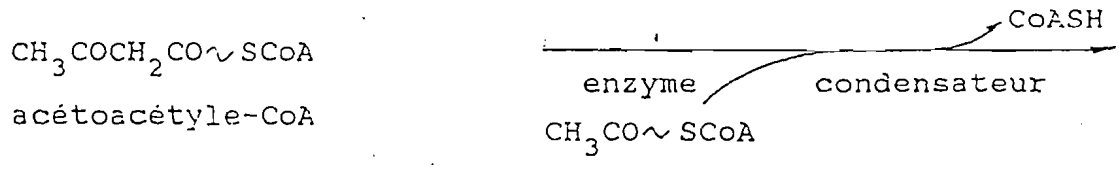
Selon le nombre d'unités isopréniques engagées, on fait,pour les terpènes, la classification suivante:

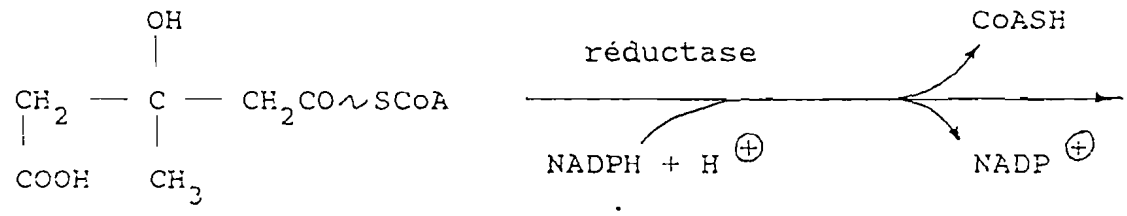
| Nombre d'unités isopréniques | Classe | Formule brute |
|---|---|---|
| 2 | Monoterpènes | $C_{10}H_{16}$ |
| 3 | Sesquiterpènes | $C_{15}H_{24}$ |
| 4 | Diterpènes | $C_{20}H_{32}$ |
| 6 | Triterpènes | $C_{30}H_{48}$ |

## I.3.4. Biosynthèse des terpènes.

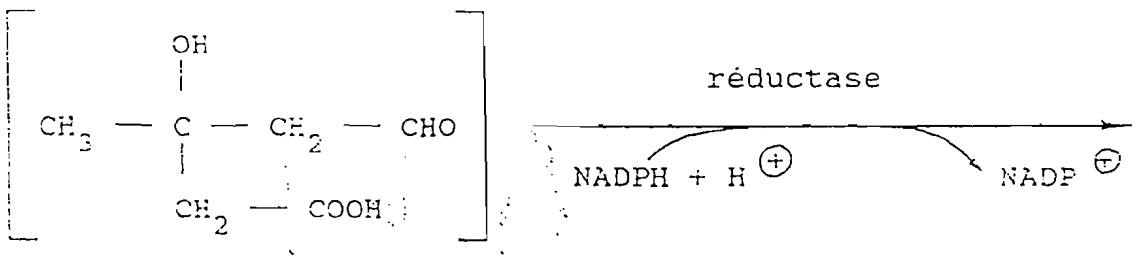
Tandis que l'isoprène n'existe pas dans la nature, et n'est produit que par la décomposition thermique de p.e. le caoutchouc naturel, l'unité de l'isoprène biologiquement actif duquel tous les terpènes semblent être déduits, est le pyrophosphate d'isopentényle (PPI), lui-même produit de 3 unités d'acétylCoA.

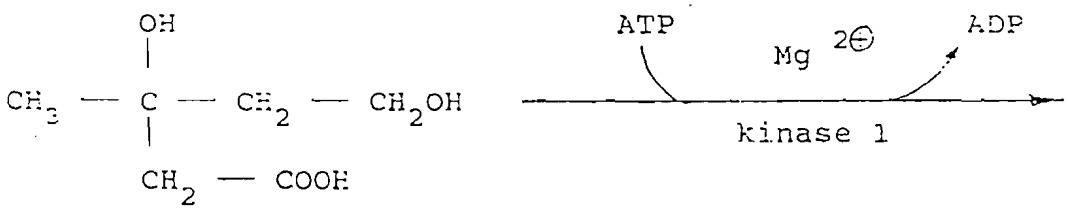


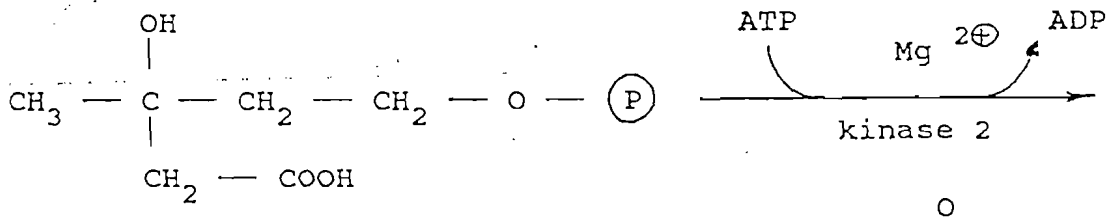




ß-hydroxy-ß-méthylglutaryle-CoA

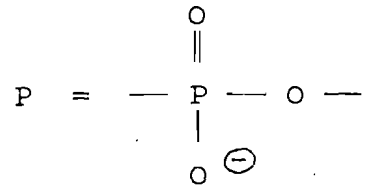


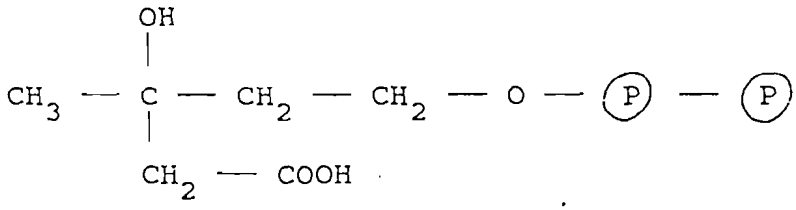




acide mévalonique

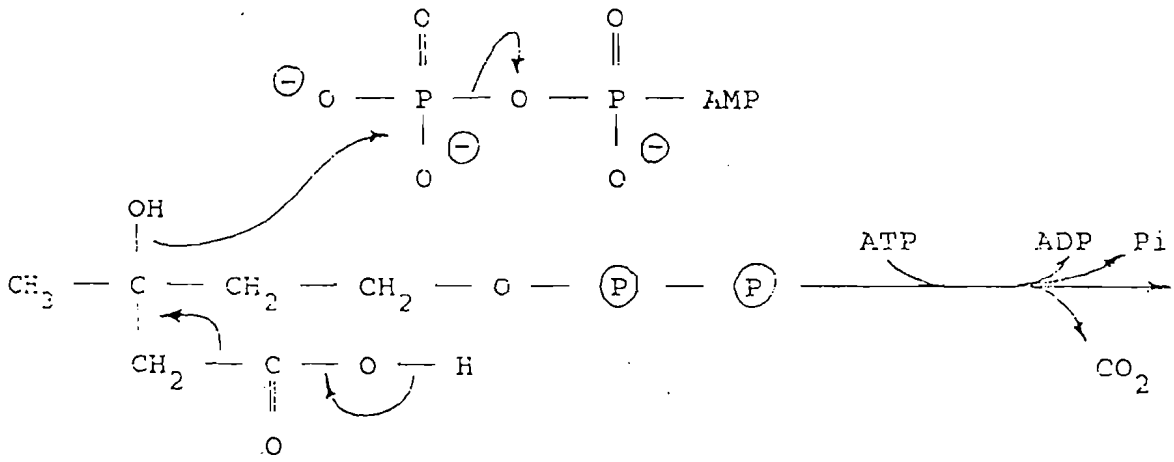


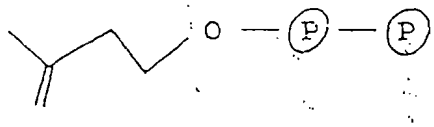

5-phosphate de mévalonyle




pyrophosphate de mévalpnyle

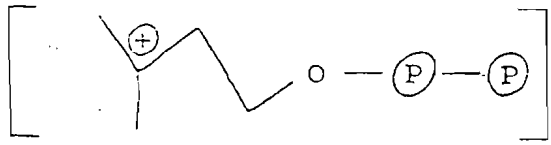


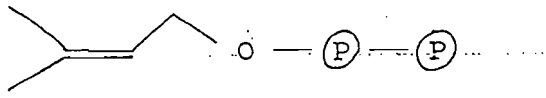

isomérase

(+ H⊕)

pyrophosphate d'isopentényle
(IPP)

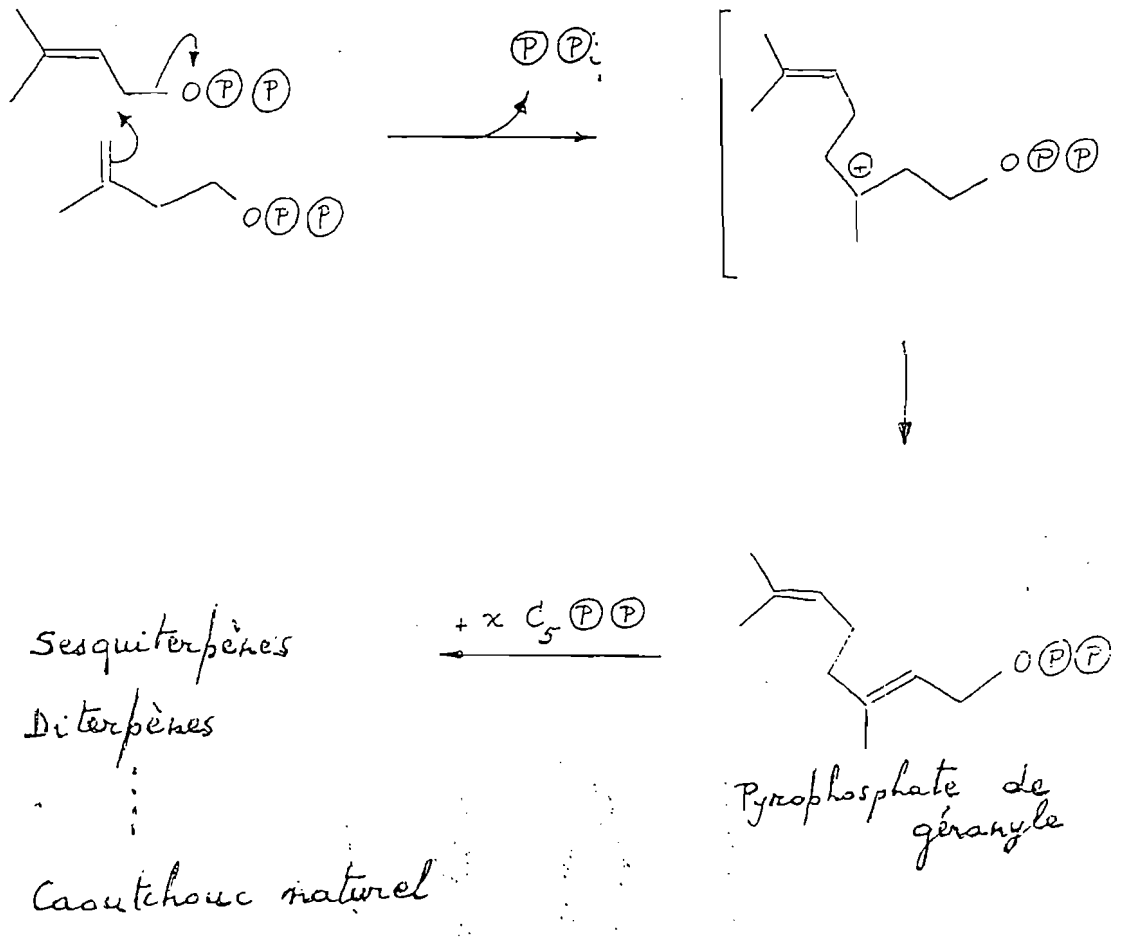



- H⊕



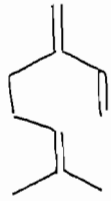
pyrophosphate de diméthylallyle
(DAPP)

En couplant les unités IPP + DAPP on obtient le pyrophosphate de géranyle. Celui-ci sert de produit de base pour la formation des autres terpènes. Par addition consécutive d'unités DAPP se forment les sesquiterpènes, les diterpènes, etc. jusqu'au caoutchouc naturel, qui est un polymère.

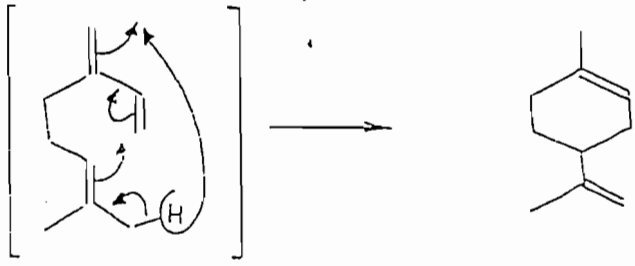


## I.3.5. Les différentes formes de monoterpènes.

a. acycliques p.e. le myrcène (très répandu p.e. les pins; odeur de la térébenthine)

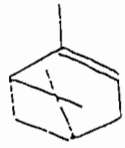


b. monocycliques p.e. le limonène (pelure d'orange, le citron); odeur d'orange.




c. plusieurs formes bicycliques

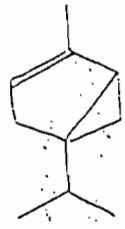
p.e. α-pinène



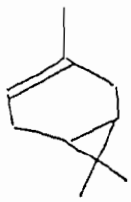
le pin
odeur résineuse

α-thujène

le pin (en de faibles concentrations)

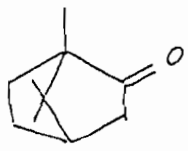


car-3-ène



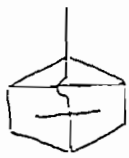
les pins du Portugal
odeur résineuse

le camphre




odeur intense

d. tricycliques
p.e. le tricyclène



## I.4. Intérêts économiques et pharmaceutiques des huiles volatiles.

Bon nombre de dérivés oxygénés des monoterpènes et des sesquiterpènes ont une odeur intense, et, sous forme d'huiles essentielles, ont une importance économique comme matière première dans la parfumerie , la cosmétologie ou comme additifs dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie pharmaceutique.

En dehors de leur saveur utile pour l'alimentation et la liquoristerie, ces épices ont souvent, à faible dose, un effet stimulant favorable sur l'appétit et la digestion.

Leurs fréquentes propriétés bactéricides sont exploitées pour l'hygiène alimentaire dans les pays chauds.

L'emploi des drogues à essence en thérapeutique est lié à leurs propriétés pharmacodynamiques.

Parmi les plantes à essences se trouvent des

- antiseptiques agissant sur les voies respiratoires et les voies urinaires
- eupeptiques et carminatifs
- stimulants du système nerveux central (Anis, Badiane)
- stomachiques (Menthe, Mélisse, Verveine),
- antispasmodiques (Camomille)
- cholérétiques (Romarin, sauge)
- vermifuges
- révulsifs, rubéfiants (essence à térébenthine)
- antiseptiques cicatrisants
- stimulants du cuir chevelu (Romarin)
- antiinflammatoires (à cause des azulènes).

## II. PARTIE EXPERIMENTALE.

### II. 1. Préparation préliminaire du matériel végétal.

Après la récolte, les plantes ont été séchées à l'air ambiant du laboratoire à une température variant de 24°C à 28°C.

Cependant, après avoir constaté que pour la plante Rubia cordifolia, L., le matériel séché dégageait une odeur plus intense et légèrement différente par rapport à la plante fraîche, nous avons consacré un échantillon frais à une analyse à part.

Après environ 15 jours de séchage, les plantes sont réduites en poudre dans un mortier.

### II.2. Extraction et analyse des huiles essentielles.

#### II. 2.1. Méthodes d'extraction. [4,9,24,25,28]

Parmi les méthodes les plus couramment exploitées pour extraire les huiles volatiles du matériel végétal brut citons spécialement:

a. Entraînement à la vapeur.

Dans cette méthode, le matériel végétal est traversé par un courant rapide de vapeur d'eau surchauffée (105°C).

L'huile volatile est entraînée et il se forme une phase vapeur mixte (eau + huile) qui se condense dans un réfrigérateur et qui se rassemble dans un récepteur (Fig.1).

Ce distillat est ensuite extrait de façon continue par un solvant de densité plus grande (pas nécessairement) que l'eau, par exemple le $CH_2Cl_2$ avec un point d'ébullition de 37°C (Fig.2).

On peut aussi faire une simple extraction (non continue) liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter, mais là on doit s'attendre à des pertes plus ou moins importantes (tant quantitatives que qualitatives) en huiles essentielles.

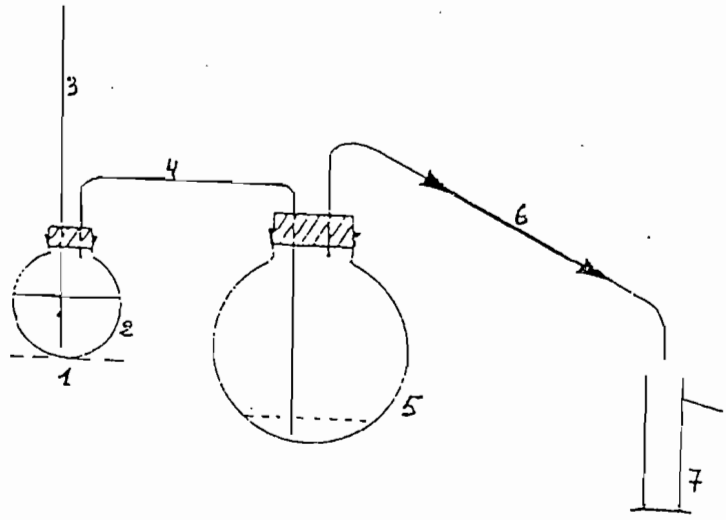



FIG.1.Montage pour l'entraînement à la vapeur.

1.Système de chauffage
2.Ballon contenant de l'eau
3.Tube en verre
4.Tube en verre (ou un tuyau en plastic) pour la conduction de la vapeur d'eau
5.Ballon contenant le matériel végétal
6.Réfrigérant
7.Récepteur

solvant de densité plus grande que l'eau p.e. $CH_2Cl_2$ avec un point d'ébullition de 37°C.

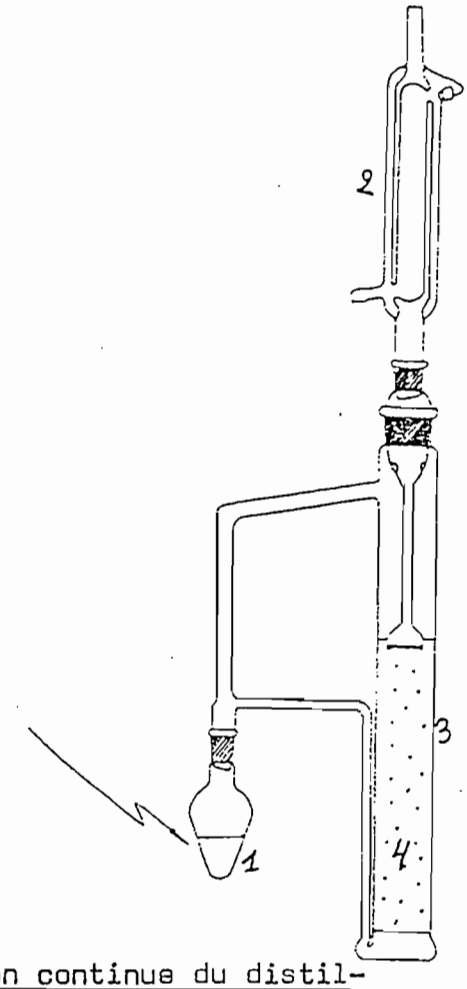



FIG.2. Système d'extraction continue du distillat ( huile essentielle + eau )

1. Ballon contenant le solvant
2. Système de condensation
3. Flacon spécial contenant le distillat (huile essentielle + eau )
4. Distillat : huile essentielle + eau

b. L'expression.

La méthode consiste à exercer une pression sur le matériel végétal. Elle est utile pour extraire les huiles volatiles contenues dans les glandes sous-épidermiques des écorces des oranges et des citrons.

c. Hydrodistillation.

L'eau et le matériel végétal sont mis dans un même ballon, le tout est porté à ébullition et la vapeur mixte est condensée et recueillie.

La méthode est surtout utilisable pour les huiles stables dans un milieu légèrement acide.

d. Enfleurage.

Dans cette méthode, un corps gras (axonge) se sature d'essences lorsqu'il est mis en contact avec le matériel végétal. Le corps gras est ensuite épuisé par l'alcool absolu et ce solvant est évaporé sous-vide.

e. Extraction directe par un solvant.

Le matériel végétal est extrait par un solvant volatil (alcool, benzène ou autre solvant) à chaud. L'évaporation du solvant donne un résidu (= " concret " ).

Le " concret " est traité à l'alcool, le mélange est ensuite refroidi à -5°--10° C.

Le précipité ( les cires et les graisses à chaîne longue) est éliminé par filtration ou par décantation, le surnageant est concentré sous-vide.

On obtient une huile liquide ou semi-liquide (= " absolu "), soluble dans l'alcool et saturée en substances naturelles.

Méthode exploitée:

Dans notre travail, nous avons exploité la première méthode à savoir l'entraînement à la vapeur qui est généralement la plus utilisée. Cette méthode présente en effet plusieurs avantages:

- Elle est efficace pour séparer toutes les substances peu solubles dans l'eau et qui ont une tension de vapeur notable vers 100° C

- Les huiles sont vaporisées à une température inférieure à leur température d'ébullition normale

- La méthode est équivalente à une distillation sous-vide alors qu'elle se fait à une pression normale (il est même possible de faire une sublimation)

- La composition de la vapeur est constante et est indépendante de la composition quantitative de l'huile.

La composition du distillat dépend uniquement de la pression partielle des substances ( non miscibles à l'eau) volatiles:

Loi de Dalton:

$P = dP_1 + dP_2 + dP_3 .....$

où P = pression atmosphérique (pression totale)

dP = pressions partielles des composants volatils de l'huile + pression partielle de l'eau

II.2.2. Extraction proprement dite.

Pour la raison énoncée au paragraphe II.1. , l'extraction a porté, pour Rubia cordifolia,L. sur un échantillon frais et sur un échantillon séché.

Nous avons, pour simplifier, adopté la notation suivante:

RCORD1.D : Echantillon frais de Rubia cordifolia, L.

RCORD2.D : Echantillon séché de Rubia cardifolia, L.

PDEFOL1.D: Echantillon (séché) de Plectranthus defoliatus, H.

a. Mode opératoire.

Dans un ballon de 3L, une masse donnée (précisée ci-après) du matériel végétal est traitée à la vapeur d'eau légèrement surchauffée (105° C) pendant 2 heures.

Le distillat est condensé et recueilli dans un ballon d'un litre refroidi dans la glace (voir Fig.1). Ce distillat est ensuite extrait continuellement pendant 2 heures avec le dichlorométhane (voir Fig.2)

Après séchage sur du sulfate de magnésium pendant la nuit, le solvant est éliminé par distillation sous-vide (température du

bain: 30°C). La fraction volatile obtenue est conservée sous azote à -18°C.

b. Résultats obtenus.

| Echantillon | Masse de l'échantillon (g) | Masse de la fraction volatile obtenue (g) | Rendement (%) |
|---|---|---|---|
| RCORD1.D | 96 | $2x10^{-3}$ | 0,002 |
| RCORD2.D | 320 | $11x10^{-3}$ | 0,003 |
| PDEFOL1.D | 460 | 3,68 | 0,8 |

L'analyse de ces résultats montre que, contrairement à la plante Plectranthus defoliatus, H., Rubia cordifolia, L. a un contenu en volatils très faible. L'évaporation du solvant ($CH_2Cl_2$) ne laisse qu'une couche extrêmement mince de substance attachée à la face intérieure du récipient ( un ballon conique de 50ml).Par contre, nous avons obtenu pour Plectranthus defoliatus, H. une fraction non négligeable d'huile volatile ( jaune pâle, très fluide).

Dans le but de comparer l'extraction continue (Fig.2) au $CH_2Cl_2$ et l'extraction non continue (ampoule à décanter), nous avons préparé une huile volatile (PDEFOL2.D) par extraction du distillat suivant ce dernier procédé (non continu: dans une ampoule à décanter). Nous avons destiné cette huile (PDEFOL2.D ) à une analyse à part.

D'autre part, la fraction résiduelle de RCORD1.D est presque inodore tandis que celle de RCORD2.D a une odeur de chocolat de source inconnue.

II. 2.3. Méthodes d'analyse. [6,7,14]

Les huiles essentielles étant composées de substances volatiles, elles sont analysées par chromatographie en phase gazeuse (GC) sur des colonnes capillaires (diamètre-intérieur de 0,5—0,2 mm; longueur 25—50m) FSOT (" fused silica open tubular " ≈ colonnes tubulaires ouvertes, en silice en fusion). ( Fonctionnement d'un chromatographe: voir Fig.3, ANNEXE 1).

Mais cette analyse peut s'avérer compliquée lorsque l'essence a une composition complexe. Dans ce cas on essaye d'obtenir d'abord les spectres de masse des composants, et de déterminer les structures par comparaison des spectres de masse avec des spectres de masse de référence.

Simultanément on détermine les indices de Kovàts qui sont presque des constantes physiques caractéristiques des substances volatiles. On parle de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Fig:5, Annexe 1).

L'identification des substances se fait exclusivement par analyse spectrométrique.(Fig. 4, Annexe 1).

Les détails de cès méthodes d'analyse sont donnés dans l'Annexe 1.

II. 2.4. Les analyses.

Les analyses ont porté sur les 4 échantillons;RCORD1.D, RCORD2.D, PDEFOL1.D et PDEFOL2.D.

a. Analyses par GC

Appareillage et mode opératoire:

Les analyses ont été faites à l'aide d'un chromatogaz VARIAN 3700, pourvu d'une colonne capillaire en quartz (longueur:30m, diamètre : 0,54 mm) avec comme phase stationnaire le poly-diméthylesiloxane (épaisseur de la couche: 1,5$\mu$m), et d'un détecteur FID ( surface des pics = concentration).

La température a été maintenue à 220° C pour l'injecteur et le détecteur, tandis que pour le four, elle était programmée de 30°- 220°C à un taux d'accroissement de 3°/min, puis isotherme à 220° C pendant 15 min.

Le débit du gaz-vecteur (He) était de 3,5ml/min.

Opération:

Un échantillon de 0,5$\mu$l d'une solution de 1$\mu$l d'huile dans 250$\mu$l de $CH_2Cl_2$ est injecté avec une série homologue d'hydrocarbures $C_6$-$C_{20}$ (référence).

b. Analyses par GC-MS.

Appareillage et Mode opératoire:

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatogaz HP5980 pourvu d'une colonne capillaire en quartz (longueur:30m, diamètre: 0,32mm) avec comme phase stationnaire le poly-diméthylphénylsiloxane 5% (épaisseur de la couche: 0,2 $\mu$m), et d'un détecteur sélectif de masse HP5970A ( un spectomètre de masse quadrupole).

Nous avons également maintenu la température à 220°C pour l'injecteur et le détecteur tandis qu'elle était programmée de 30°-220°C à un taux d'accroissement de 3°C/min, puis isotherme à 220°C pendant 10min, pour le four.

Le débit du gaz vecteur ( He) était de 1ml/min et l'énergie de la source était de 70eV.

Opération:

1$\mu$l d'une solution de 1$\mu$l d'huile volatile dans 100$\mu$l de $CH_2Cl_2$ est injectée.

II. 3. Résultats des analyses.

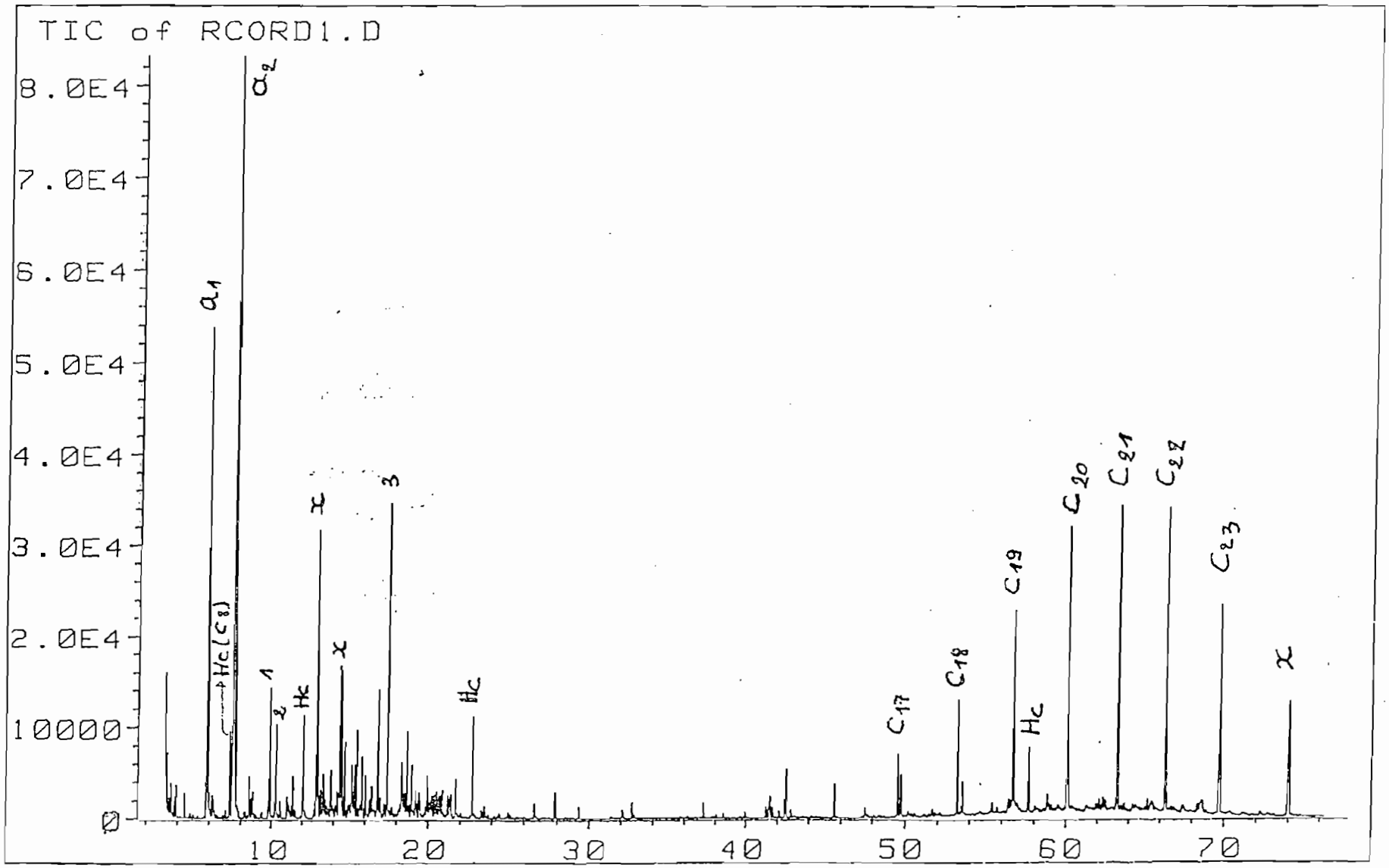
Dans ce paragraphe, nous donnons, pour les 4 échantillons, les chromatogrammes réalisés en GC couplée à la MS (GC-MS) ainsi que l'identification des pics.

Cette identification a été faite par comparaison des indices de Kovàts et des spectres de masse avec les données de substances de référence.

La composition centésimale a été faite par intégration des pics à l'aide d'un PC, chargé de programme NELSON:

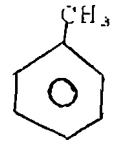
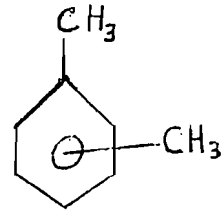
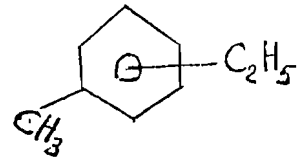
Pour calculer cette composition centésimale, on présume que la réponse du détecteur est la même pour les différentes substances constituant l'huile.

Ainsi, la concentration relative d'une substance dans l'huile est déterminée par comparaison de la surface du pic correspondant, avec la surface totale de tous les pics ( supposition non tout à fait correcte car la réponse du détecteur n'est pas une constante mais dépend de la structure du composé sous étude. La méthode est cependant fiable pour le cas des huiles volatiles).

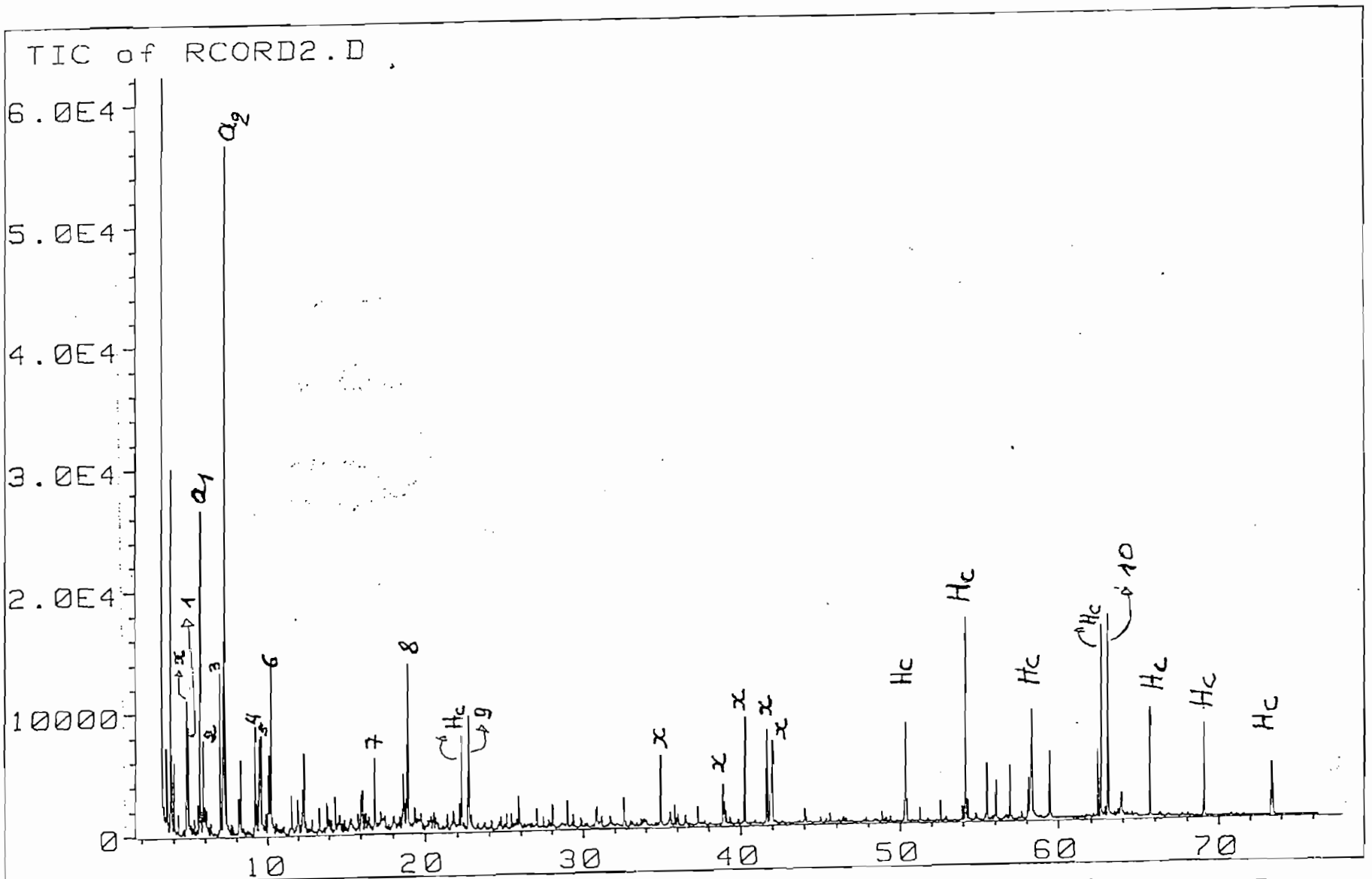



Chromatogramme de la fraction volatile de Rubia cordifolia, L. frais obtenu par GC-MS

Composition de la fraction volatile de RCORD1.D.

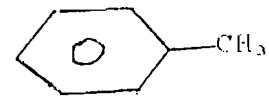
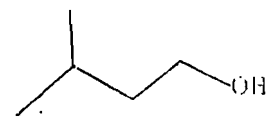
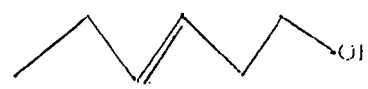
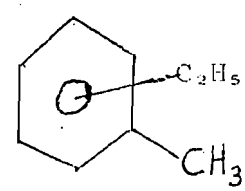
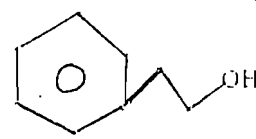
| Pic | Composé | Formule | Remarques. |
|---|---|---|---|
| $a_1$ | Toluène |  | Contaminant du solvant |
| $a_2$ | Tétrachloroéthylène | $Cl_2C=CCl_2$ | Contaminant du solvant |
| Hc ($C_8, C_{17}, ..$) | Hydrocarbure | -------- | Le nombre de carbones a été déterminé |
| Hc | Hydrocarbure | -------- | Le nombre de carbones n'a pas été déterminé |
| 1<br>2 | Xylène |  | La position peut être o,,m. ou p. pour le 2è groupe. |
| 3 | Ethyletoluène |  | La position du substituant n'a pas été déterminée |
| x | ---------- | ------ | Non identifié |

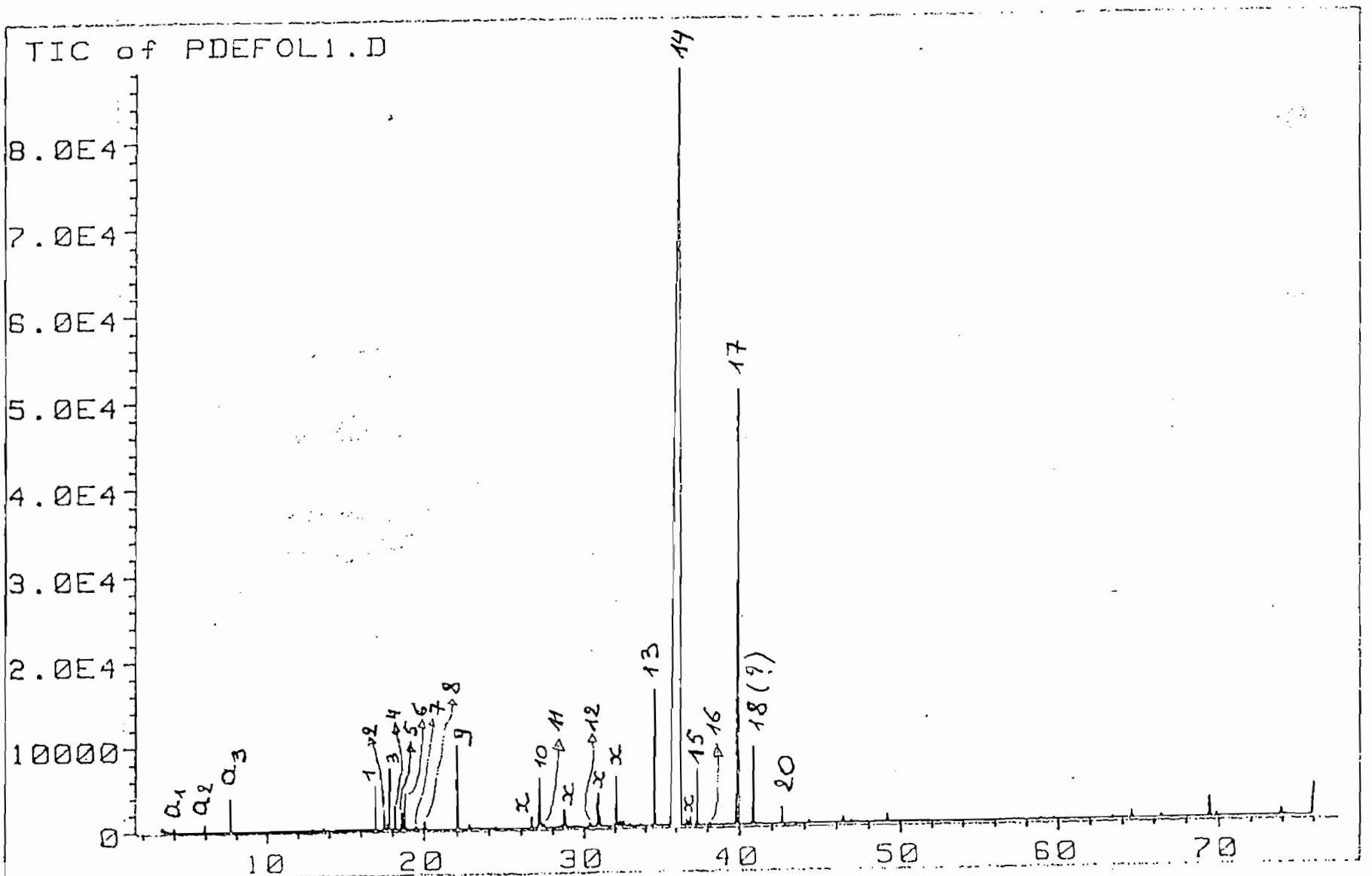
U.B




Chromatogramme de la fraction volatile de Rubia Cordifolia L. séché obtenu par GC-MS

Composition de la fraction volatile de RCORD2.D.

| Pic | composé | Formule | Remarques |
|---|---|---|---|
| $a_1$ | Toluène |  | Contaminant du solvant |
| $a_2$ | Tétrachloroéthylène | $Cl_2C=CCl_2$ | Contaminant du solvant |
| Hc | Hydrocarbure | --------- | Le nombre de carbones n'a pas été déterminé |
| 1 | Méthyl-3 butanol-1 |  | |
| 2 | Pentanol-1 |  | |
| 3 | Hexanal |  | |
| 4 | Alcool | -------- | Non identifié |
| 5 | Hexène-3-ol-1 |  | |
| 6 | Hexanol-1 |  | |
| 7<br>8 | Ethyletoluène |  | La position du groupe $-C_2H_5$ n'a pas été déterminée |
| 9 | β-phényléthanol |  | |
| 10 | Diterpène | $C_{20}H_{32}$ | |
| x | ---------- | --------- | Non identifié |

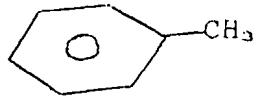
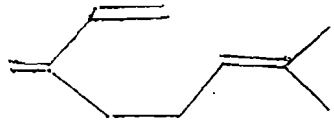
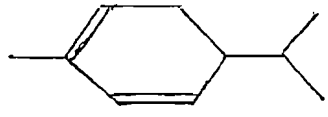
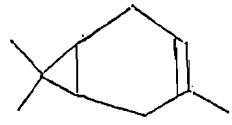
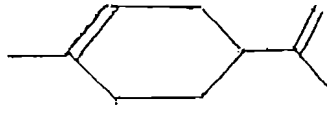


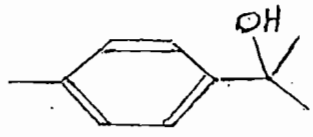
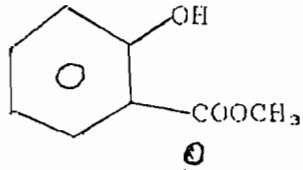
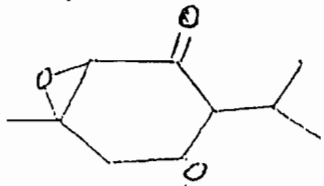
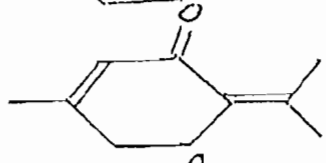
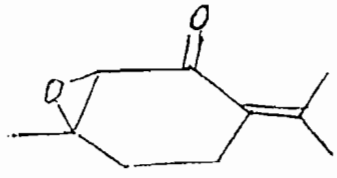
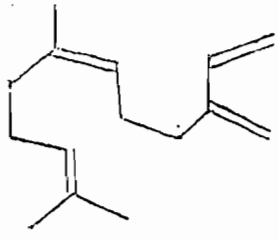

Chromatogramme de l'huile essentielle de

Plectranthus defoliatus, H. obtenu par GC-MS

[Extraction continue du distillat]

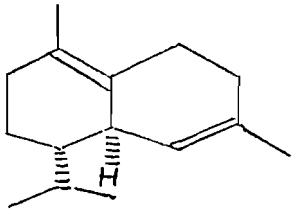
## Composition de l'huile volatile de PUEFOLI.D.

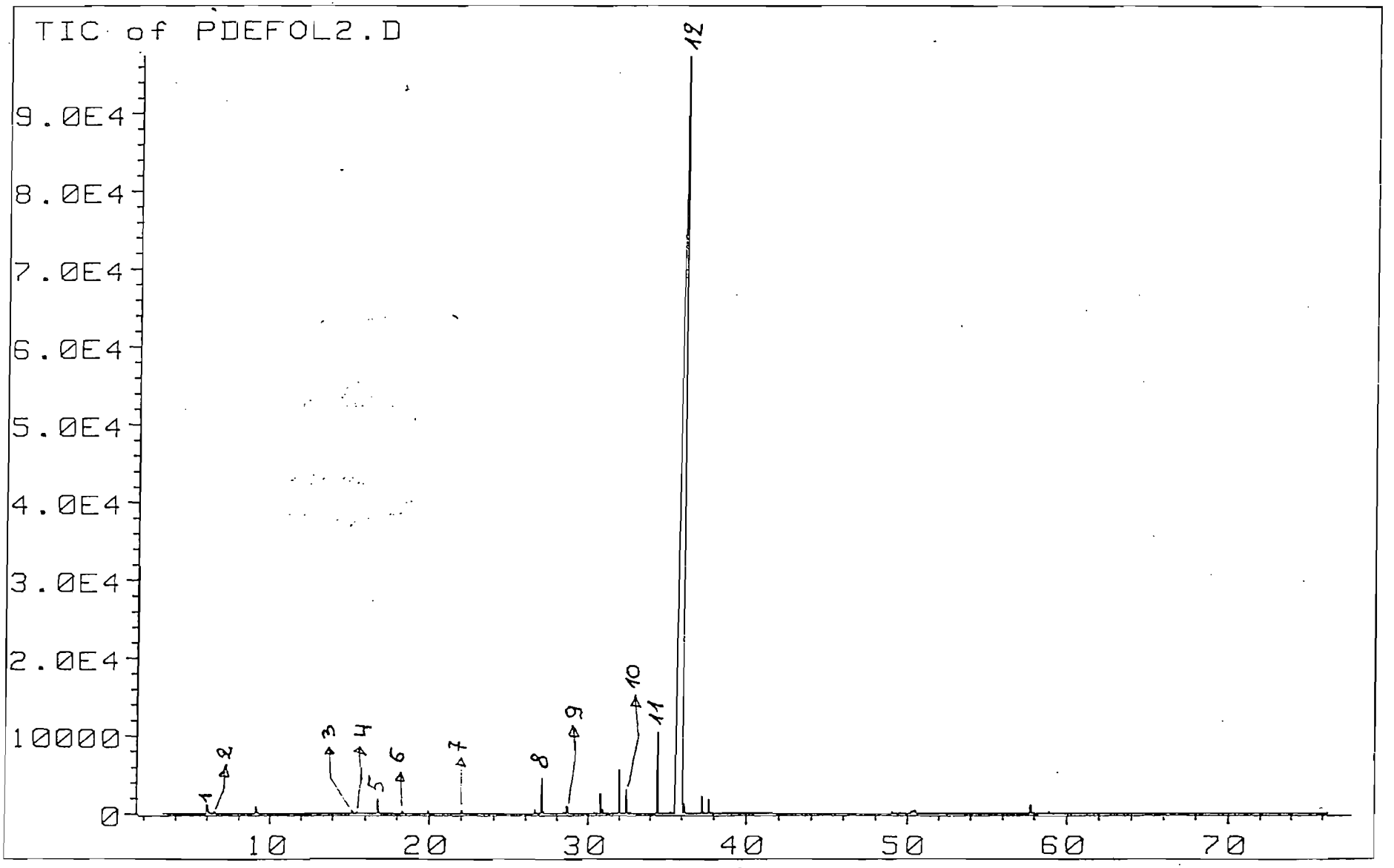
| Pic | Composé | Formule | Indice de Kovats | Concentration (%) | Remarques |
|---|---|---|---|---|---|
| $a_1$ | Trichloro-éthylène | $Cl_2C=CHCl$ | 700 | 0,6 | Contaminant du solvant |
| $a_2$ | Toluène |  | 755 | 1,7 | Contaminant du solvant |
| $a_3$ | Tétrachloro-éthylène | $Cl_2C=CCl_2$ | 800 | 1,8 | Contaminant du solvant |
| 1 | Myrcène |  | 983 | 0,9 | |
| 2 | α-Phellandrène |  | 1000 | 0,7 | |
| 3 | Car-3-ène |  | 1007 | 1,0 | |
| 4 | α-Terpinene |  | 1011 | 0,5 | |
| 5 | p.Cymène |  | 1014 | 0,3 | |
| 6 | Limonène |  | 1024 | 0,6 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 7 | Cis-β-Ocimène |  | 1028 | trace (<0,1) |
| 8 | Trans-β-Ocimène |  | 1039 | 0,2 |
| 9 | Terpinolène |  | 1082 | 1,3 |
| 10 | p.Cymèn-8-ol |  | 1166 | 1.3 |
| 11 | Salicylate de méthyle |  | 1169 | trace(<0,1) |
| 12 | Oxyde de pipéritone |  | 1286 | 0,4 |
| 13 | Pipériténone |  | 1318 | 2,3 |
| 14 | Oxyde de pipériténone |  | 1341 | 64,8 |
| 15 | ---------- | ---------- | 1382 | 1,1 |
| 16 | --------- | ---------- | 1392 | 0,2 |
| 17 | Cis-β-Farnesène |  | 1449 | 6,2 |

Non identifié

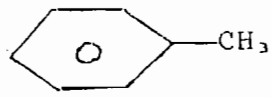
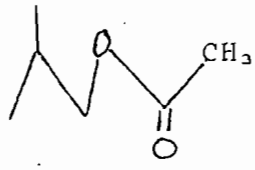
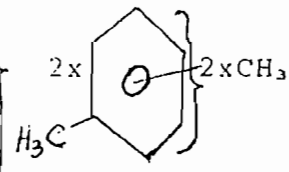
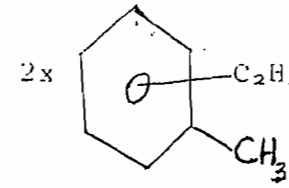
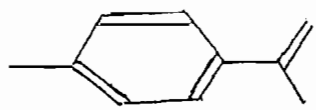
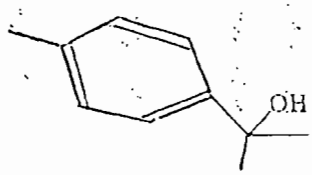
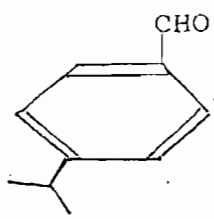
Non identifié

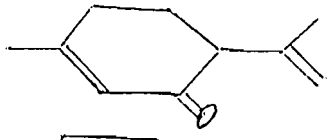
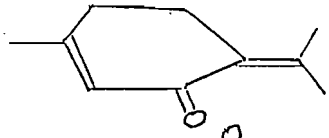
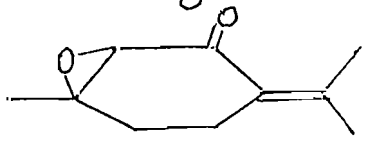
| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 18 | ? | Inconnu | --------- | 1483 | 1,0 |
| 19 | ? | Inconnu | --------- | 1500 | 1,3 |
| 20 | | δ-Cadinène |  | 1520 | 0,2 |
| ⋉ | | --------- | --------- | ----- | ----- Non identifié |




Chromatogramme de l'huile essentielle de Plectranthus defoliatus, H. obtenu par GC-MS
[Extraction non continue du distillat]

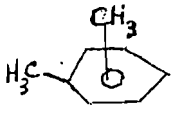
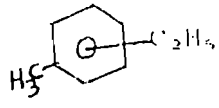
Composition de l'huile volatile de PDEFOL2.D.

| Pic | Composé | Formule | Indice de Kovats | Concentration (%) | Remarques |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Toluène |  | 753 | 0,9 | |
| 2 | Acétate d'isobutyle |  | 758 | 0,1 | |
| 3 | Un triméthyl-benzène |  | 941 | trace (<0,1) | La position des deux groupes-$CH_3$ est indéterminée. |
| 4 | Un triméthyl-benzène | | 949 | 0,1 | |
| 5. | Un éthyltoluène |  | 981 | 0,4 | La position du groupe $-C_2H_5$ est indéterminée |
| 6. | Un éthyltoluène | | 1009 | 0,2 | |
| 7. | p. Cymène (ou $\alpha$, p.diméthylstyrène) |  | 1073 | trace (<0,1) | |
| 8. | p. Cymèn -8-ol |  | 1163 | 1,2 | |
| 9. | Aldéhyde cuminique |  | 1233 | 0,4 | |

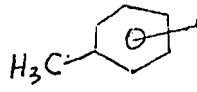
| | | | |
|---|---|---|---|
| 10. | Isopipériténone  | 1274 | 0,9 |
| **11.** | Pipériténone  | **1316** | 2,9 |
| 12. | Oxyde de pipériténone  | 1342 | 88,1 |

II.4. Discussion des résultats.

Les analyses précédentes nous ont renseigné sur la composition des fractions volatiles des 4 échantillons (RCORD1.D, RCORD2.D, PDEFOL1.D et PDEFOL2.D).

Mis à part le xylène  et le composé 

(la position du substituant est indéterminée), Rubia cordifolia,L. frais (RCORD1.D) ne semble contenir autre chose que des hydrocarbures.

Rubia cordifolia,L. séché (RCORD2.D) contient, en plus des hydrocarbures, des alcools ( et aussi quelques aldéhydes) qui semblent libérés pendant le séchage. (La plante contient aussi des diterpènes et encore une fois de l'éthyletoluène : ).

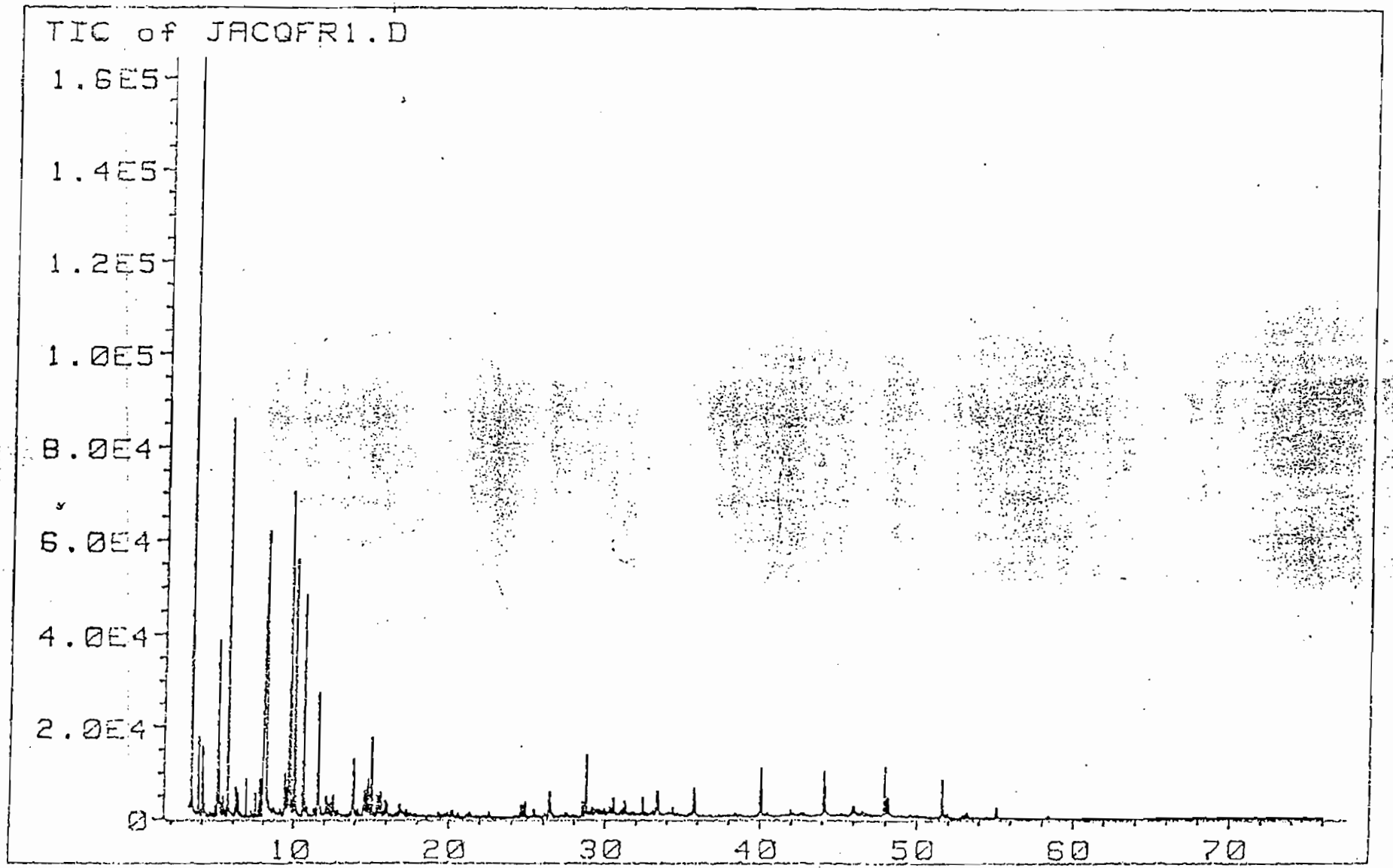
Par ailleurs, le contenu en volatils est très faible pour cette plante:

- le rendement de la distillation à la vapeur est de 0,002% (2mg de substances volatiles pour 96g de matériel végétal) et de 0,003 % (11mg de substances volatiles pour 320g de matériel) respectivement pour RCORD1.D et RECORD2.D.

Compte tenu de ces analyses, Rubia cordifolia, L. ne semble pas contenir d'huiles essentielles.

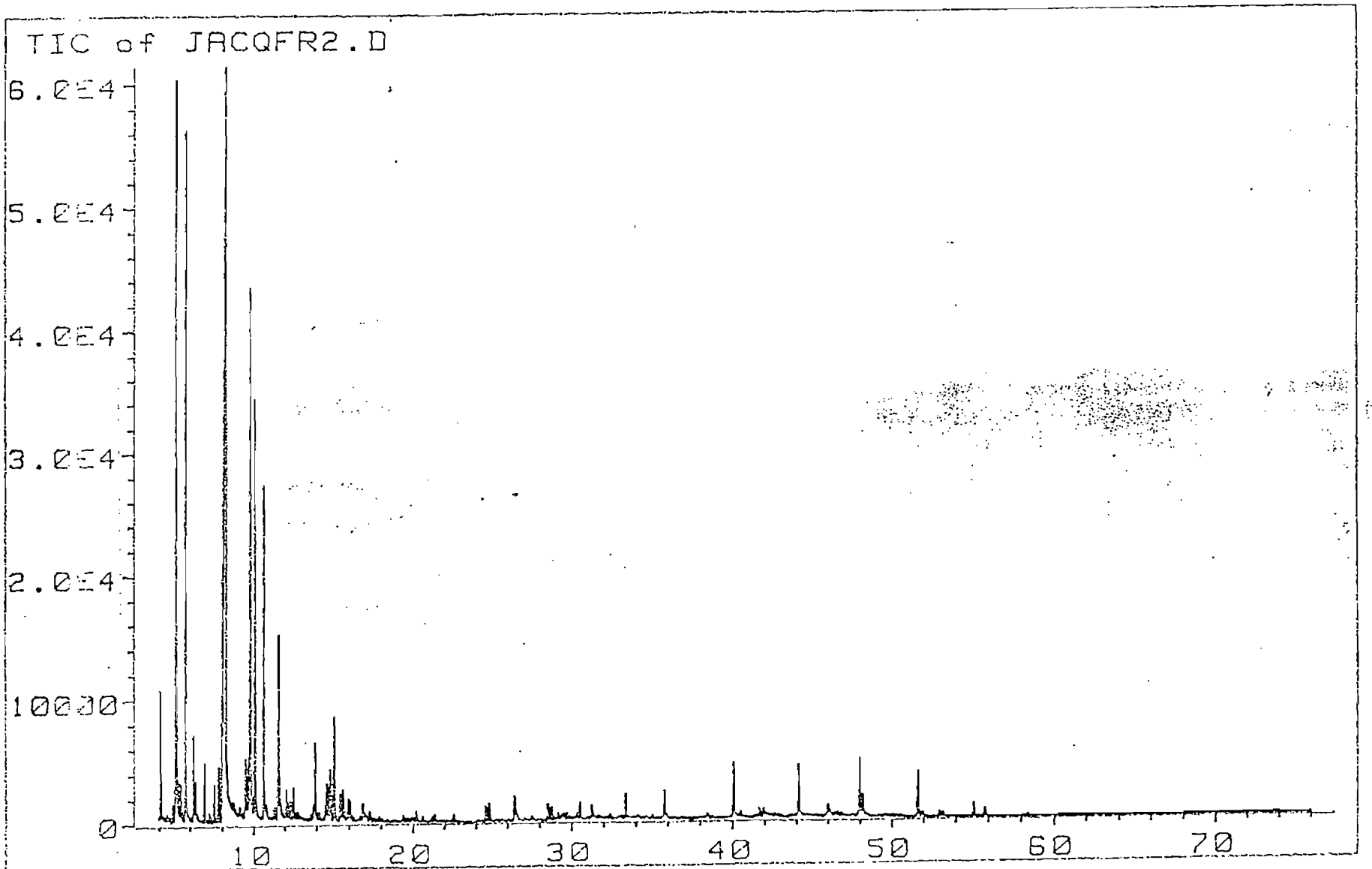
Nous avons poussé loin nos investigations en faisant des analyses (toujours par GC-MS) de 6 fractions obtenues par chromatographie sur colonne (adsorbant: silicagel 0,060-0,200mm, diamètre des pores 4nm, système éluant: Benzine de pétrole-acétone (9:4) ) d'un extrait de substrat à l'éther diéthylique ( très pur stabilisé avec 7 ppm de BHT-Merck).

Mais, encore une fois, toutes les 6 fractions ne contenaient principalement que des hydrocarbures ( voir les chromatogrammes ci-après), et étaient de composition presque constante. Nous n'avons pas identifier ces hydrocarbures parce qu'on ne peut faire cela que par comparaison directe avec des substances de référence. Comme ces produits n'appartiennent pas aux grandes classes de substances actives (alcaloïdes, anthraquinones, flavonoïdes, etc...), nous avons considéré que leur identification n'apporterait rien de fondamental.

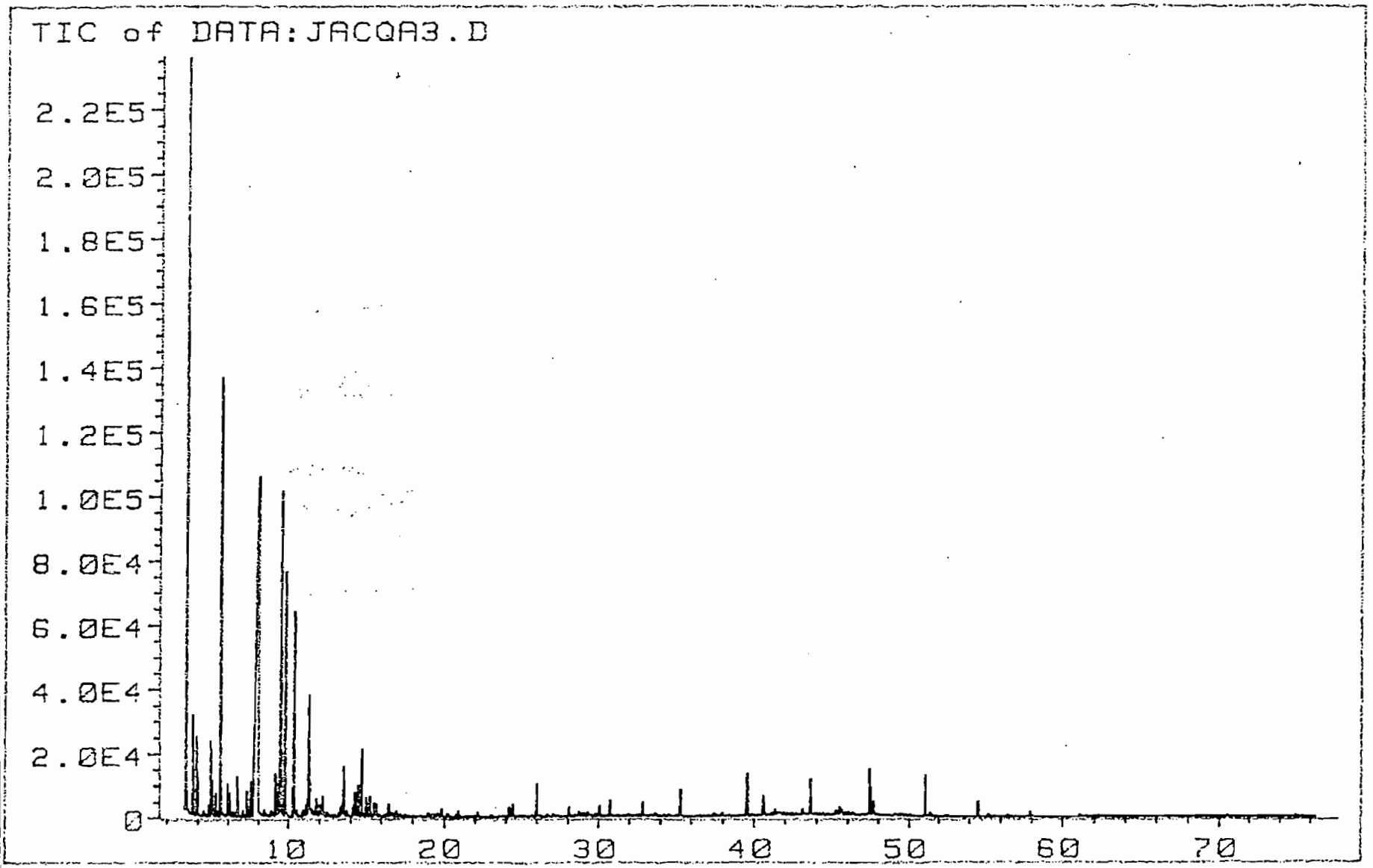




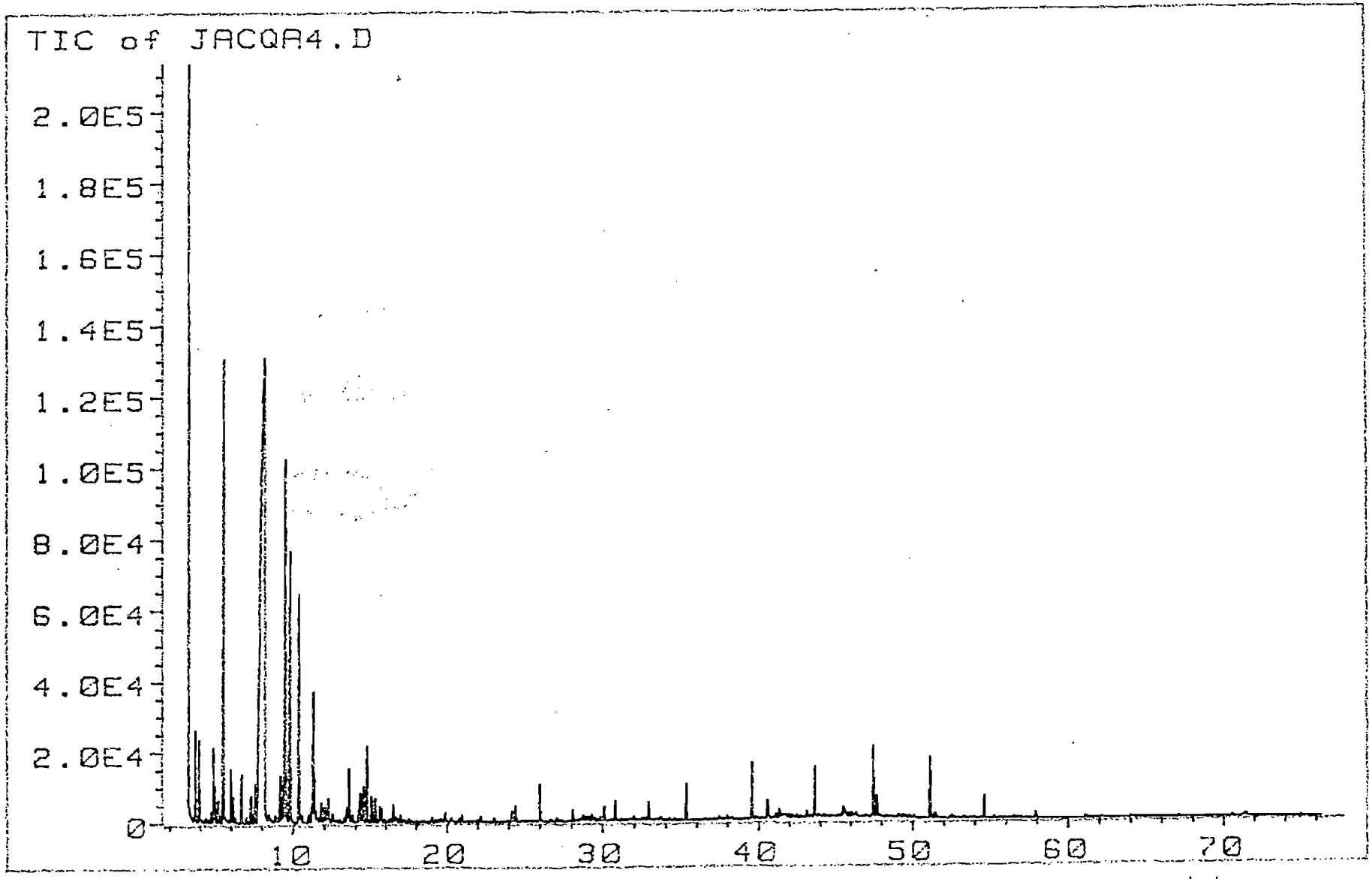

Chromatogramme (GC-MS) de la 1ère fraction (Jaune) obtenue par CC de l'extrait éthéré de Rubia C.



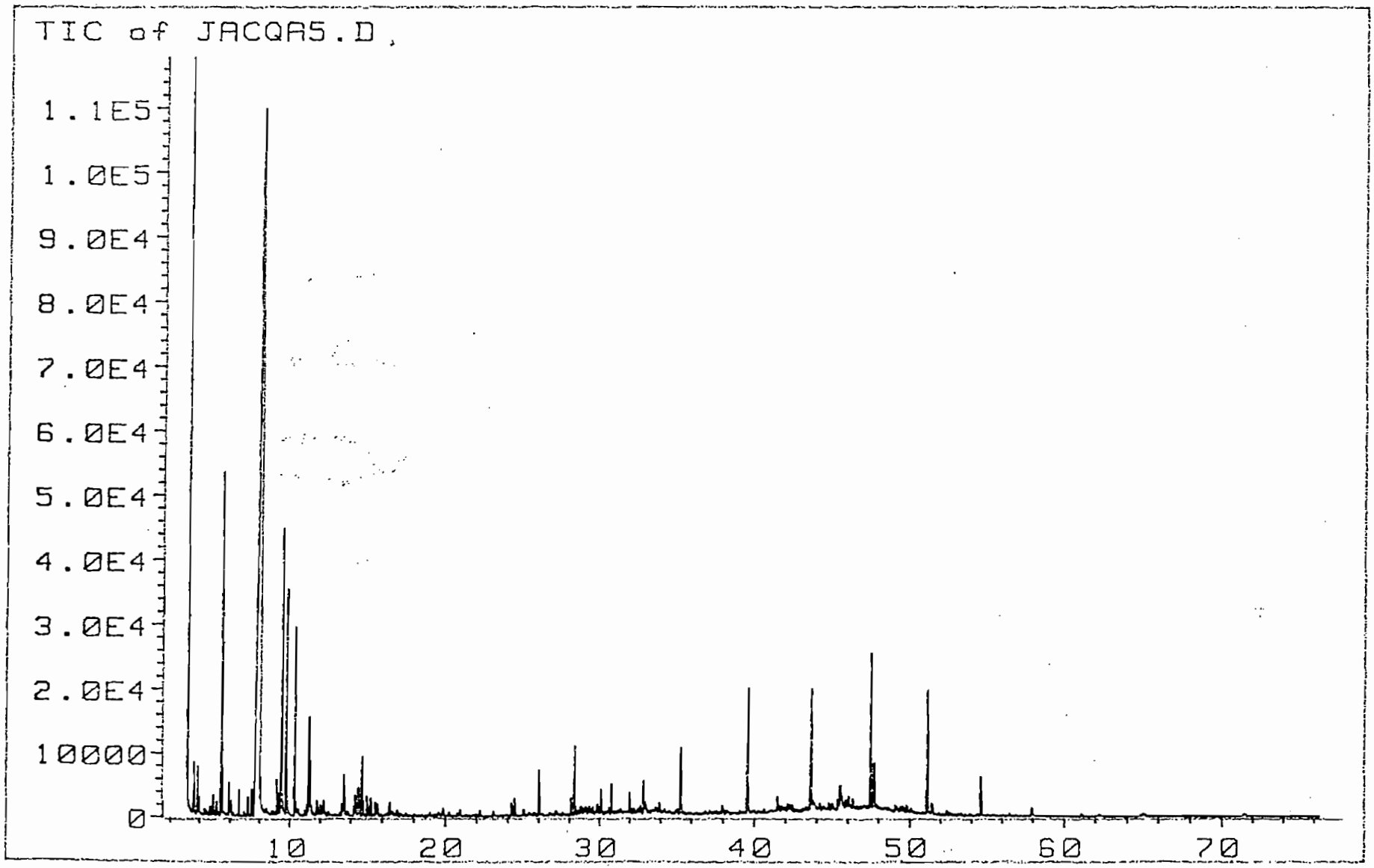

Chromatogramme (GC-MS) de la 2ème fraction (Brune) obtenue par CC de l'extrait éthéré de Rubia C.



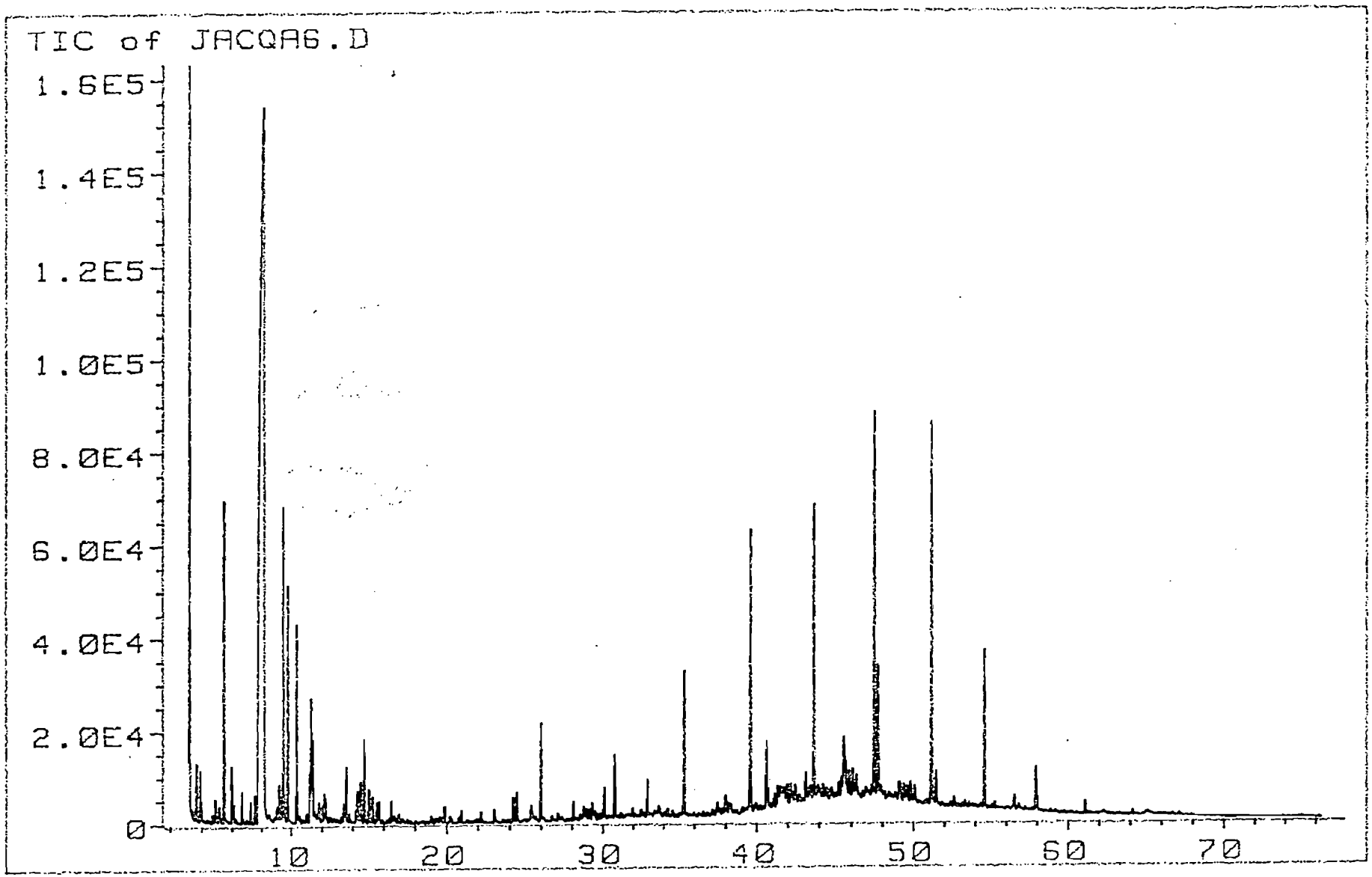

Chromatogramme (GC-MS) de la 3è fraction (vert-jaunâtre) obtenue par CC de l'extrait éthéré de Rubia C.




Chromatogramme (GC-MS) de la 4è fraction (verte) obtenue par CC de l'extrait éthéré de *Rubia c.*




Chromatogramme (GC-MS) de la 5è fraction (Jaune) obtenue par CC de l'extrait éthéré de Rubia c.




Chromatogramme (GC-MS) de la 6ème fraction (Vert jaunâtre) obtenue par CC de l'extrait éthéré de Rubia c.

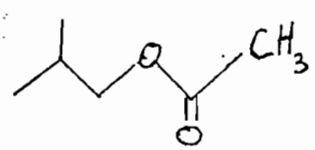
Par contre, Plectranthus defoliatus,H. (PDEFOL1.D.) contient une fraction volatile non négligéable ( quantitativement). La distillation à la vapeur donne un rendement de 0,8% (3,68g d'huile pour 460g de matériel).

L'analyse de cette fraction volatile a montré la présence d'un nombre assez important de substances. Parmi ces composants on note la présence, par ordre décroissant d'importance (%),

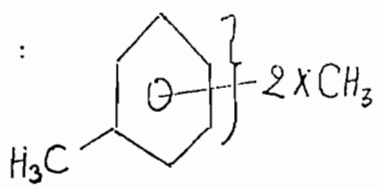
| | |
|---|---|
| d'oxyde de pipériténone | (64,8%) |
| de cis-β- Farnesène | ( 6,2%) |
| de pipériténone | ( 2,3%) |
| de p.cymèn-8-ol | ( 1,3%) |
| de terpinolène | ( 1,3%) |
| de car-3-ène | ( 1,0%) |
| de myrcène | ( 0,9%) |
| de α-phellandrène | ( 0,7%) |
| de limonène | ( 0,6%) |
| de α-terpinène | ( 0,5%) |
| d'oxyde de pipéritone | ( 0,4%) |
| de p.cymène | ( 0,3%) |
| de δ-cadinène | ( 0,2%) |
| de trans-β-ocimène | ( 0,2%) |

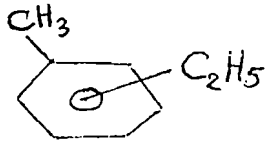
Par extraction non continue (dans une ampoule à décanter) au $CH_2Cl_2$, nous avons obtenu une huile (= PDEFOL2.D) qui correspond (constatation après analyse) assez bien avec PDEFOL1.D, sauf que beaucoup de monoterpènes manquent ( bien entendu dans les circonstances de l'analyse: il se peut qu'ils soient présents sous forme de traces). Dans PDEFOL2.D, il ya aussi:

de l'acétate d'isobutyle:




deux triméthylbenzène différents :



deux éthyltoluène différents: 


La présence d'huiles volatiles dans la plante Plectranthus defoliatus,H. justifie son odeur intense et agréable,et son utilisation dans le conditionnement des ustensiles destinés à la conservation de certains produits alimentaires dans les ménages burundais .

Pour la plante Rubia cordifolia, L., nous avons pensé que ses diverses propriétés thérapeutiques (voir p.5) ne peuvent s'expliquer que par une présence probable de divers autres principes actifs. En effet, le screening phytochimique montre que la plante contient d'autres principes actifs dont peuvent dépendre ces propriétés thérapeutiques.

Nous avons mis en évidence, par screening phytochimique, un grand nombre de principes actifs dont les alcaloïdes qui sont présents dans les 3 extraits ( éthéré, alcoolique et aqueux) et que nous avons voulu extraire et identifier.

## II.5. Recherche des alcaloïdes de Rubia cordifolia,L.

Nous avons utilisé la méthode préconisée par IOAN CIULEI (" I. Methodology for analysis of vegetable drugs") [2].

Le matériel végétal est d'abord épuisé par extraction à l'éther , puis à l'alcool et enfin à l'eau.

Les principes actifs sont identifiés dans les 3 extraits.

### II.5.1. Résultats du screening phytochimique.

Pour la notation des résultats, nous avons utilisé le barème suivant:

- \- : test négatif
- \+ : test peu positif
- ++ : test positif
- +++: test très positif

a. Extrait éthéré.

| Composés détectés | Réactions analytiques | Résultats |
|---|---|---|
| Alcaloïdes basiques | Mayer<br>Dragendorff | + + +<br>+ + + |
| Anthracenosides aglycones | Bornträger | --------- |
| Acides gras à haut PM | Opalescence en solution aqueuse acidifiée | + + + |
| Graisses | Saponification | + + + |
| Stérols et terpènes | Liebermann-Buchard | + + |
| Flavones aglycones | Shibata | + + |
| Caroténoïdes | Carr-Price | + + |

b. Extrait alcoolique.

| composés détectés | Réactions analytiques | Résultats |
|---|---|---|
| Tannins | Action de la gélatine salée | + + + |
| Composés réducteurs (oses) | Fehling | + |
| Sels d'alcaloïdes | Mayer | + + + |
| Alcaloïdes | Mayer | + + + |
| Bases quaternaires et amines oxydés | Mayer | ----- |
| Anthracénosides | Bornträger | + |
| Stéroïdes glycosidiques | Liebermann-Buchard | + + + |
| Flavonoïdes:<br>- Flavonols<br>- Flavones | Shibata | ------<br>+ + + |
| Anthocyanidines | Variation de couleur en fonction du PH | ------ |

c. Extrait aqueux.

| composés détectés | Réactions analytiques | Résultats |
|---|---|---|
| Polyuronides (pectines, mucilages, gommes) | Bleu de méthylène (ou le bleu de toluidine) | ---- |
| Saponosides | Pouvoir moussant | ----- |
| Composés réducteurs (oses) | Fehling | ----- |
| Tannins | Styassny | + + |
| Sels d'alcaloïdes | Mayer | + |
| Anthracénosides | Bornträger | ---- |
| Stéroïdes glycosidiques | Liebermann-Buchard | ---- |
| Flavonoïdes:<br>- Flavonols<br>- Flavones | Shibata | + + +<br>+ + + |
| Anthocyanidines | Variation de couleur en fonction du PH | ------ |

## II.5.2. Extraction et isolation des alcaloïdes.

a. Méthode d'extraction.

Le matériel végétal (200g) est d'abord dégraissé par extraction répétée (3 fois) par de la benzine de pétrole (ou autre solvant apolaire). L'importante présence de graisses nous a poussé à ne pas isoler les alcaloïdes de l'extrait éthéré (bien qu'ils y soient présents: alcaloïdes basiques).

Le même matériel est alors épuisé par extraction au MeOH ( ou à l'EtOH). L'extrait alcoolique est concentré sous-vide (température $\leq$ 40°C). Le résidu est solubilisé dans un peu d'acide acétique 10% puis traité goutte à goutte à l'$NH_4OH$ concentré.

Il s'est formé plus au moins immédiatement un précipité (Pr1) que nous avons isolé par centrifugation, lavé à l'$NH_4OH$ 10%, et dissous dans quelques gouttes de $CHCl_3$ (on peut utiliser aussi l'alcool).

Mais le surnageant rougeâtre, après l'avoir laissé reposer, a montré un précipité rougeâtre (Pr2) qui se dépose lentement. Nous avons laissé le processus s'écouler jusqu'à ce que le test des alcaloïdes dans le surnageant soit négatif.

b. Isolation.

Nous avons d'abord constaté que le précipité Pr1 n'est pas totalement soluble dans le $CHCl_3$. Celui-ci n'a dissous qu'une fraction "blanc jaunâtre" que nous avons analysée par CCM et ensuite par CC.

La CCM de cette fraction dans les systèmes

MeOH,

MeOH-Acétone (14:10)

MeOH-Acétone-$H_2O$(14:7:3)

n'a montré qu'une tache unique. Nous avons considéré que cette fraction est constituée par un produit pur (P1). Le " rate of flow" ($R_F$) dans le meilleur des systèmes précédents, MeOH-Acétone (14:10), est de 0,98.

Par contre la CCM du précipité Pr2 (aussi insoluble dans le $CHCl_3$ et dissous préalablement dans le MeOH), dans le système ( le meilleur choisi) MeOH-$H_2O$-$NH_4OH$(11:11:3), a donné 2 taches dont les $R_F$ sont 0,97 (P2) et 0,79 (P3).

Nous avons isolé seulement les produits P1 et P2 qui avaient une fluorescence bleue à l'$UV_{360nm}$, P3 n'ayant pas montré cette fluorescence. Remarque:

- CCM: plaque: Kieselgel 60 $F_{254}$
  Epaisseur de la couche: 0,25 mm ( MERCK)
- CC: Phase stationnaire: Kieselgel 0,032-0,063mm
  (RIEDEL-DEHAËN)

c. Quelques caractéristiques des produits isolés.

Solubilité:

| Produit isolé | Solvants organiques | | | | | | | | Solvants minéraux | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Solvants apolaires | | | | Solvants polaires | | | | | | |
| | Benzine de pétrole | $CHCl_3$ | Toluène | Cyclohexane | Acétate d'éthyle | Acétone | MeOH | $H_2O$ | HCl 37 % | $H_2SO_4$ 97 % | $CH_3COOH$ 96 % |
| P1 | + + | + + + | + + + | + + | + | + | - | - | +? | +? | +? |
| P2 | - | - | - | - | - | - | + + + | + + + | +++ | +++ | ++ |

Barème utilisé: - : Insoluble
+? : Indistinctement soluble
+ : Faiblement soluble
++ : Soluble
+++ : Très soluble

Autres propriétés:

Produit P1
- A l'UV: fluorescence bleue
- Substance gluante
- blanchâtre

Produit P2
- A l'UV: fluorescence bleue
- Amorphe et très hygroscopique
- Noir (tendant au rouge)
- gomme

d. Hypothèse.

Si l'on s'en tient aux propriétés observées pour les deux produits isolés, ceux-ci pourraient faire partie des rares alcaloïdes huileux (P1) ou amorphes (P2).

## III. CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS

Nous avons voulu, dans notre travail, rechercher la nature des substances huileuses obtenues par CC de la fraction non polaire de la plante Rubia cordifolia, L. et les huiles essentielles de Plectranthus defoliatus, H.

Nous avons constaté que la fraction volatile de Rubia cordifolia,L. ne contenait pas d'huiles essentielles mais plutôt des hydrocarbures et un diterpène.

Par contre, Plectranthus defoliatus, H. est une plante très riche en huiles essentielles et ceci est presque une caractéristique des plantes de la famille des Lamiacées ( voir ANNEXE2, p.59).

L'utilisation répandue de Rubia cordifolia, L. en médecine traditionnelle et la présence presque exclusive des hydrocarbures dans sa fraction volatile nous ont poussé à nous tournerdu côté des substances beaucoup plus reconnues pour leur activité pharmacologique, à savoir les alcaloïdes qui ont été révélés par le screening phytochimique.

La pureté et les propriétés biologiques, pharmacologiques, etc... des 2 fractions isolées restent à démontrer et dépassent le cadre de notre travail.

Au point de vue huiles essentielles, Rubia cordifolia, L. ne révèle pas d'importance économique particulière, mais cette plante est intéressante comme source d'autres principes actifs comme le montre le screening phytochimique.

Par contre, la plante Plectranthus defoliatus,H. pourrait être économiquement intéressante comme source d'huiles essentielles.

Recommandations :

Le screening phytochimique de Rubia cordifolia, L. ayant révélé la présence, en plus des alcaloïdes, des quinones, des flavonoïdes, des tannins,des stéroïdes et des terpènes, des études ultérieures au présent travail méritent d'être faites.

Quant à Plectranthus defoliatus, H., nous recommandons une étude exhaustive de sa composition en huiles essentielles en fonction des saisons de récolte et de l'altitude.

# IV. ANNEXES

## ANNEXE 1: Méthode d'analyse GC-MS.

### A. Notions de chromatographie en Phase gazeuse. [4,6]

#### A.1. Définition et principes.

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode d'analyse immédiate, dans laquelle les constituants du mélange à séparer se partagent différemment entre deux phases, en une suite d'équilibres de dissolution ou d'adsorption constamment déplacés:
l'une des deux phases est immobile, elle a une très grande surface spécifique; l'autre phase, mobile, percole à travers la phase fixe. La phase fixe est un solide ou un liquide et la phase mobile est un gaz (gaz vecteur).

Le fractionnement du mélange gazeux ou volatilisable est basé sur la différence d'affinité du gaz ou vapeur pour la phase fixe.

## A.2. Schéma de fonctionnement d' un chromatographe.

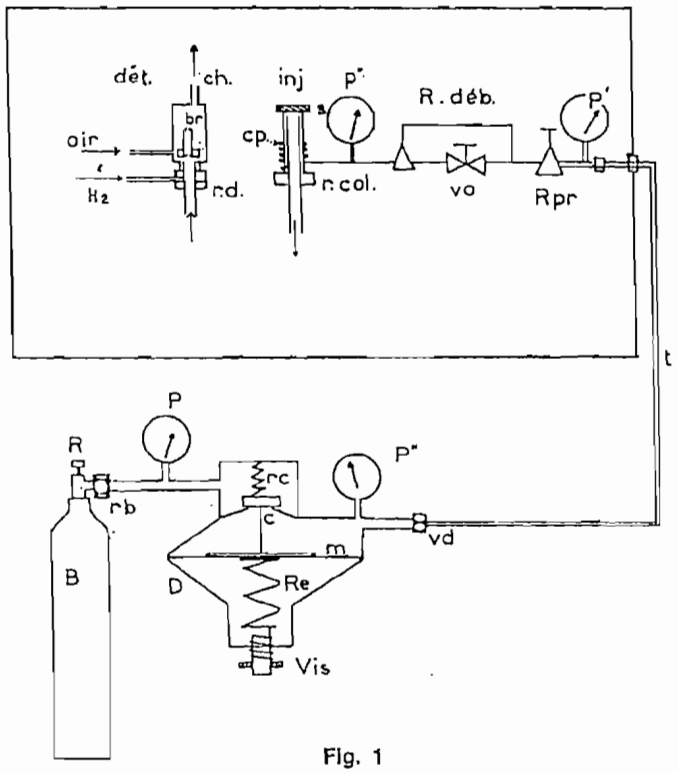



Fig. 1

La Fig. 3 présente le schéma de distribution d'un gaz, ici le gaz vecteur, dans un chromatographe.

B : la bouteille de gaz possède un robinet R et un raccord r.b.
R : doit être ouvert d'un tour complet au moins.
rb : est du type B pour l'air comprimé industriel, C pour l'azote, etc. (voir texte).
D : le détendeur a une seule détente ; il possède :
P : indicateur de pression dans la bouteille (0 à 196 bars).
Vis : vis de règlage de la détente par l'intermédiaire de
Re : ressort de détente à force réglable.
m : la membrane repousse le clapet c.
c : le clapet reçoit par ailleurs une poussée du ressort rc.
— Lorsqu'une limaille se coince dans le clapet, la pression de sortie « p » augmente jusqu'à la destruction du contrôleur de pression de sortie « P'' ». Il faut alors démonter le détendeur ou l'envoyer à l'usine.

— Si la membrane m est percée, une grosse fuite apparaît à la vis de réglage de la pression.
vd : est le raccord, type « Swagelok ou Gyrolok » en 1/8 de pouce en général.
t : le tube en cuivre 1/8 de pouce relie le détendeur au chromatographe.
P' : indique la pression d'entrée du gaz dans le chromatographe.
R. pr : est un régulateur de pression qui permet d'envoyer au régulateur de débit R. déb. une pression suffisante.
v.a. : la vanne alguille permet d'ajuster le débit selon le besoin de la colonne ou du détecteur ($H_2$ et air).
P''' : indique la pression du gaz à l'entrée de la colonne.
Ce contrôleur de pression peut être remplacé par un indicateur de débit à bille, appelé rotamètre.
cp : le gaz vecteur arrive par un capillaire de préchauffage avant d'être injecté dans la chambre d'injection (inj.).
S : le septum ou pastille d'injection ferme la chambre d'injection et permet d'introduire l'échantillon à l'aide de la seringue. Ce septum doit être changé fréquemment (60 à 100 injections).
r.col : permet de connecter l'entrée de la colonne à l'injecteur.
r.d. : connecte la sortie de colonne au détecteur.
$H_2$ : l'hydrogène arrive à ce niveau pour être mélangé au gaz vecteur.
Air : l'air arrive à la base du brûleur « br » pour alimenter en oxygène la flamme.
Ch. : les gaz s'échappent alors par la cheminée d'échappement.
— Si le détecteur est étanche, on peut mesurer les différents débits à ce niveau et recueillir éventuellement les effluents radioactifs brûlés ($CO_2$ et $H_2O$).

## A 3. Quelques grandeurs mesurées en GC.

- Temps de rétention brut d'un composé, tc: C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et la réponse du détecteur (indiquant la concentration maximale du composé dans le gaz vecteur sortant de la colonne).

- Temps de rétention du gaz vecteur (He ou $H_2$), tm: C'est le temps de rétention d'un composé non retenu.

On définit le temps de rétention corrigé, tr, comme le temps passé en phase fixe par un composé retenu:

tr = tc - tm ( dépend des conditions expérimentales)

- Largeur du pic d'un composé

= largeur à la base ( segment défini par les tangentes au point d'inflexion et la ligne de base)

= Largeur à mi-hauteur.

- Aire du Pic = hauteur x largeur.

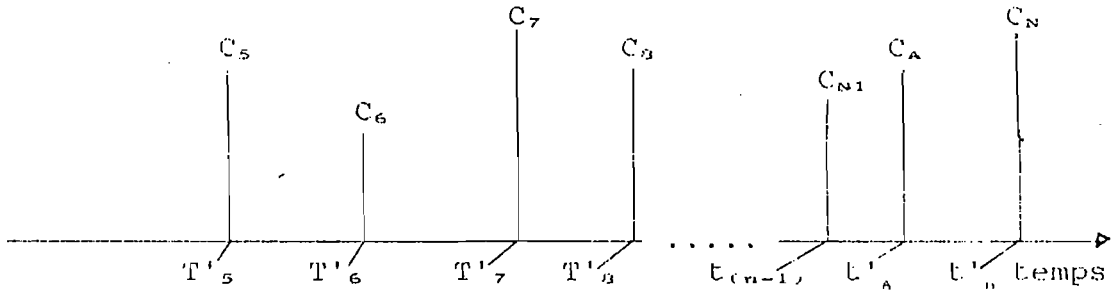
Actuellement on préfère faire une intégration électronique du signal obtenu. (Hauteur=Proportionnelle à la quantité de soluté injectée)

- Indice de Kováts:

L'indice de Kováts est un chiffre qui exprime le temps de rétention d'une substance lors d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse. Il ne dépend que de la phase stationnaire, et est indépendant des circonstances chromatographiques employées (température, débit du gaz vecteur, taux d'accroissement de la température dans une analyse à température programmée).

L'indice de Kováts est déterminé en référant le temps de rétention d'une substance aux temps de rétention de produits de référence. En général, pour ces derniers, on utilise une série d'homologues d'hydrocarbures.

Il est possible de faire l'analyse à température constante (isothermique) ou à température programmée. Les indices de Kováts sont déduits des relations suivantes ( si la figure suivante représente un chromatogramme d'une huile):




A: la substance inconnue.

A température constante:

$$I_K = 100\ (N-n) + 100n\ \frac{\log t'_A - \log t'_{(N-n)}}{\log t'_N - \log t'_{(N-n)}}$$

où $t'_A$ = temps de rétention corrigé de l'inconnu A

$t'_{(N-n)}$ = temps de rétention corrigé de la paraffine $C_{(N-n)}$ précédant l'inconnu A sur le chromatogramme.

$t'_N$ = temps de rétention corrigé de la paraffine $C_N$, qui succède l'inconnu A sur le chromatogramme.

n = nombre entier

A température programmée:

$$I_K = 100(N-n) + 100n\ \frac{t'_A - t'_{(N-n)}}{t'_N - t'_{(N-n)}}$$

où $t'_A - t'_{(N-n)}$ = distance (en mm) entre le pic de l'inconnu A et celui de l'hydrocarbure précédant A.

$t'_N - t'_{(N-n)}$ = la distance (en mm) entre le pic de l'inconnu A et celui de l'hydrocarbure qui le précède.

Dans ce travail, nous avons fait des analyses à température programmée.

## B. Notions sur la spectrométrie de masse. [14]

### B.1. Principe de base.

Lorsqu'une molécule entre en collision avec un électron ionisant, elle subit une ionisation positive ou négative ( perte ou gain d'électron) et, en plus, se fragmente en plusieurs morceaux (ions) dans des proportions (intensités) différentes: C'est ce qu'on appelle spectre de masse. Si ce courant d'ions traverse un champ électrique, puis un champ magnétique, les différents ions se séparent suivant leur rapport m/e (masse/charge). Un système de détection est connecté à tout le circuit.

Un spectre de masse est une caractéristique de la molécule fragmentée, il donne (souvent, mais pas toujours!) sa masse et celles des fragments qui en résultent.

A des molécules différentes [identiques] correspondront des fragments différents [identiques].

Il existe ainsi des catalogues (références) de spectre de masse qui sont utilisés pour identifier les constituants d'un mélange de composition inconnue.

B.2. Schéma d'un spectromètre de masse.

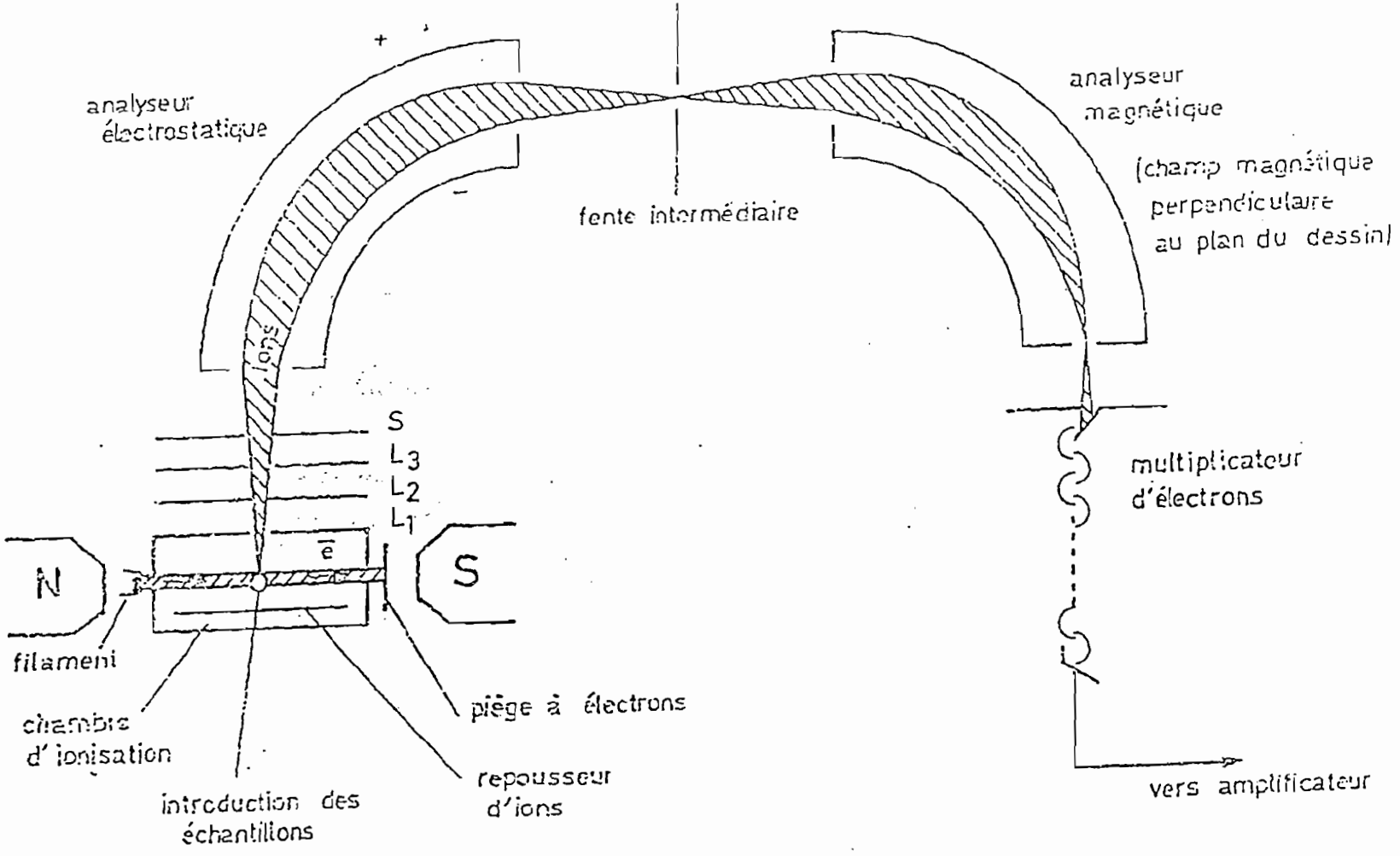



Fig.4 SPECTROMÈTRE DE MASSE A.E.I. DU TYPE MS9

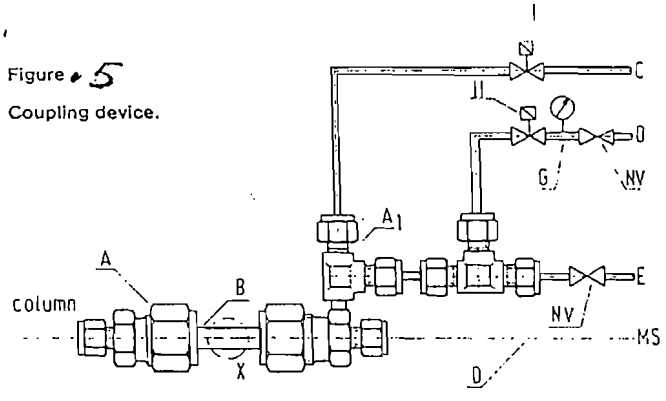
## C. Interface de couplage GC-MS [7].

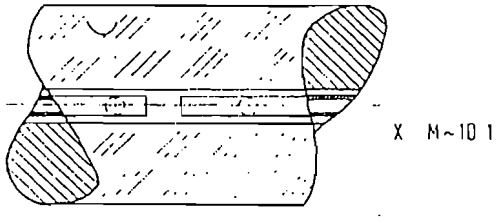
### The Interface

The interface consists of a flexible fused silica capillary and the coupling shown schematically in Figure 5. For this device only commercial Swagelock tube fittings have been used (A, $A_1$). Part B consists of a thick-walled glass capillary tube. The device is connected to the prevacuum pump of the GC/MS system by a metal capillary (C). The metal capillaries D and E serve as supply lines for helium. It is possible by means of the electrical valves I and II to operate automatically in the open or direct coupling modes.

Helium can be continuously supplied through capillary E. Q is the flexible transfer capillary (length about 15 in., ID 0.05 in.).

Figure 5
Coupling device.



ANNEXE 2: Composition des huiles essentielles de quelques Lamiacées (ou Labiées) médicinales.

a. Ocimum viride, Willd. [12]

Composants: Thymol (environ 65%), carvacrol, limonène, dipentène et terpinéol.

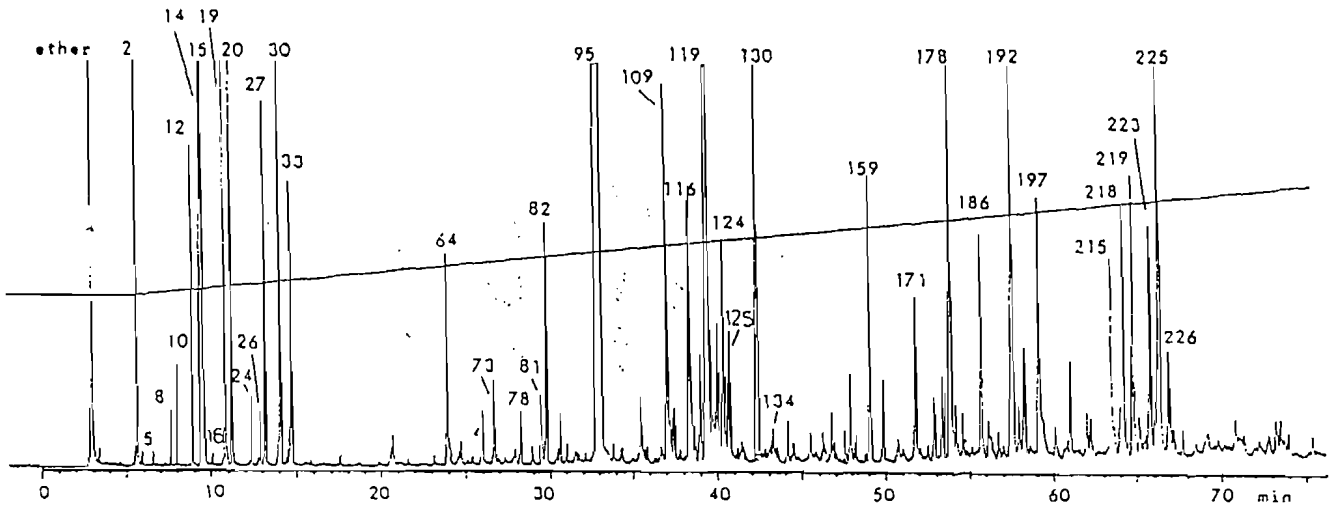
b. Ocimum canum, Sims. [12]:

Composants: Cinamate de méthyle (87% , suivant les pays de culture, le composant principal peut être le dextro-camphre), citral, citronellal, du myrcène (ou de l'ocimène?)

c. Ocimum basilicum, L. [12]:

Composants: Méthyl chavicol, linalool, cinéol, camphre, ocimène, eugénol, etc...

d. Plectranthus rugosus. [31]




GLC of the essential oil of *Plectranthus rugosus* on FFAP fused silica capillary column (temperature program: 5 min 65° C, 2° C/min to 205° C).

Constituents of *Plectranthus rugosus* essential oil

| Peak-No. | Compound | [%] | Identification |
|---|---|---|---|
| *2* | α-Pinene | 3.1 | GLC, MS [a] |
| *5* | Camphene | 0.03 | GLC [a] |
| *8* | β-Pinene | 0.1 | GLC [a] |
| *10* | Sabinene | 0.2 | GLC, MS [a] |
| *12* | 3-Carene | 0.7 | GLC, MS [a] |
| *14* | Myrcene | 2.1 | GLC, MS [a] |
| *15* | α-Phellandrene | 4.6 | GLC, MS [a] |
| *16* | α-Terpinene | 0.04 | GLC [a] |
| *19* | Limonene | 2.4 | GLC, MS [a] |
| *20* | β-Phellandrene | 2.3 | GLC, MS |
| *24* | *cis*-β-Ocimene | 0.2 | GLC, MS [a] |
| *26* | γ-Terpinene | 0.2 | GLC, MS [a] |
| *27* | *trans*-β-Ocimene | 1.0 | GLC, MS [a] |
| *30* | p-Cymene | 2.1 | GLC, MS [a] |
| *33* | Terpinolene | 1.0 | GLC, MS |
| *64a* | Thujone | 0.7 | MS |
| *64b* | 1-Nonene-3-ol | | MS, NMR |
| *73* | α-Copaene | 0.4 | GLC [b], MS [a] |
| *78* | [β-Bourbonene] [c] | 0.3 | GLC [b], MS |
| *81* | β-Cubebene | 0.4 | GLC, MS [a] |
| *82* | Linalool | 0.9 | GLC, MS [a] |
| *95a* | Caryophyllene | 22.0 | GLC, MS, NMR [a] |
| *95b* | Terpinene-4-ol | 0.7 | GLC, MS [a] |
| *109* | Humulene | 1.6 | GLC, MS [a] |
| *116* | [γ-Muurolene] [c] | 1.4 | GLC [b], MS |
| *119* | Germacrene D | 7.5 | GLC, MS [a] |
| *123* [d] | Piperitone epoxide | 0.8 | GLC, MS, NMR [a] |
| *124* [d] | [α-Muurolene] [c] | 1.0 | GLC [b], MS |
| *125* | Bicyclogermacrene | 0.8 | MS [a] |
| *130a* | δ-Cadinene | 2.8 | GLC [b], MS, NMR |
| *130b* | γ-Cadinene | 1.1 | MS, NMR |
| *134* | α-Curcumene | 0.2 | GLC, MS [a] |
| *159* | $C_{15}H_{26}O$ | 1.1 | MS |
| *171* | $C_{15}H_{26}O$ | 0.7 | MS |
| *178* | Caryophyllene oxide | 3.1 | GLC, MS, NMR [a] |
| *186* | [$C_{14}H_{20}O_2$, aromatic ester] [c] | 1.2 | MS, NMR |
| *192* | $C_{15}H_{26}O$ | 2.9 | MS |
| *197* | $C_{15}H_{26}O$, sesquiterpene alcohol | 1.4 | MS |
| *215a* | T-Cadinol | 1.2 | MS, NMR |
| *215b* | $C_{10}H_{14}O$, aromatic alcohol | | MS |
| *218* | $C_{15}H_{26}O$, sesquiterpene alcohol | 1.7 | MS |
| *219* | Torreyol | 1.3 | MS, $^1H$, $^{13}C$ NMR |
| *223* | $C_{15}H_{26}O$ | 1.0 | MS |
| *225* | α-Cadinol | 3.1 | MS, $^1H$, $^{13}C$ NMR |
| *226* | $C_{15}H_{26}O$, sesquiterpene alcohol | 0.6 | MS |

[a] Comparison with an authentic sample, [b] Self-consistent Kovats' Index, see below, [c] Tentative identification, [d] Peak assignment ambiguous.

## BIBLIOGRAPHIE.


1. M. J. BIGENDAKO: Recherche ethnopharmacognosique sur les plantes utilisées en médecine traditionnelle au Burundi occidental, Thèse de doctorat , ULB, Bruxelles, 1989-1990.
2. I. CIULEI: Practical manuals on the industrial utilisation of medicinal and aromatic plants: I. Methodology for analysis of vegetable drugs. IPC Romania, Bucharest, 1982.
3. P. CORSIN: Flore Universelle, Volume 5, Edition Rencontre, Lausanne, 1971.
4. Dr H.De POOTER: La chimie des substances Naturelles. Université du Burundi, Bujumbura, Avril 1991.
5. G. FUMBA: Plantes médicinales antivénimeuses du Burundi, Presse de l'avenir, Belgique, 1983.
6. G. GUICHON et C. POMMIER,: La chromatographie en phase gazeuse. Gauthier-Villars Editeur, Paris 6è, 1971.
7. Dr A. HUTHIG VERLAG: Recent advances in capillary gas chromatography, vol.2, Edited by W. Bertsch and al, New York, 1982.
8. H. INOUYE et al,: Phytochemistry, Vol. 27, No 8(1988), pp.2591-2598.
9. J. KATIHABWA: Chimie générale I, Partim: Eléments de chimie organique descriptive. Université du Burundi, Bujumbura, Mai 1989, p.8-12.
10. G. LAVOUE et al: Les nouvelles dimensions de la chromatographie en phase gazeuse. Labo-France Editeur, 7, rue Godot-de-Mauroy- 75009 Paris, 1982.
11. George H.M. LAWRENCE: Taxonomy of vascular plants. Macmillan company, New York, 1951.
12. LE JEUNE, J.B.H.: Contribution à l'étude des Labiées médicinales de notre colonie. Dans Servir, Vol.5., pp. 224-234, (1944).

13. J. LEVISALLES et M. JOZEFOWICZ: Chimie organique: 3. composés organiques complexes. Flammarion Sciences, Paris, 1974, p. 180-190.

14. P. LONGEVIALLE: Principe de la spectrométrie de masse des substances organiques. Masson, Paris, 1981.

15. B. MANIRAKIZA: Essai d'isolation des substances actives de la fraction polaire des racines de Pentas longiflora. Mémoire de Licence, Université du Burundi, Bujumbura, 1990.

16. Frère MARIE-VICTORIN, E.C.: Flore Laurentienne. Deuxième édition entièrement revue et mis à jour par Ernest Rouleau. Les Presses de l'Université de Montréal, Septembre 1964.

17. MINISTERE DES COLONIES, BELGIQUE: Recherche sur une huile essentielle d'Eucalyptus dives, "type" originaire du Kivu. Ministère des colonies, Bruxelles, 1958.

18. A. MUSUKU: Essai d'extraction et d'étude des alcaloïdes du Fagara-Chalybea (Igugu). Mémoire de Licence. Université du Burundi, Bujumbura, 1986.

19. L. MVUKIYE: Inventaire phytochimique des plantes médicinales du Burundi. Mémoire de licence. Université du Burundi, Bujumbura, 1980.

20. F. NDABAHAGAMYE: Contribution à l'étude phytochimique des plantes médicinales du Burundi: Mémoire de Licence. Université du Burundi, Bujumbura, 1986.

21. P. NTKOMBAYE: Approche ethnobotanique des plantes médicinales du Burundi: Inventaire et étude de quelques Rubiacées médicinales. Mémoire de Licence, Université du Burundi; Bujumbura, 1983-84.

22. D. NIYONGABO: Essai d'identification de substances actives de la pharmacopée traditionnelle Burundaise: cas du Pentas longiflora. Mémoire de Licence. Université du Burundi, Bujumbura, 1987.

23. E. NTAKARUTIMANA: Contribution à l'étude des plantes médicinales par Screening phytochimique. Mémoire de Licence. Université du Burundi, Bujumbura, 1986.

24. ORDRE DU GOUVERNEMENT FRANÇAIS: Pharmacopée française, 8ème Edition. Editée sous la direction de la commission permanente de la pharmacopée par l'ordre National des pharmaciens, Paris 7è, 1965.

25. R.R.PARIS et Mme H. MOYSE: Matière médicale, Tome I, 2è édition révisée. Masson, Paris, 1976.

26. M. RAMADHANI: contribution à l'étude phytochimique des plantes médicinales du Burundi. Mémoire de Licence. Université du Burundi, Bujumbura, 1985.

27. K. RANDERATH: Chromatographie sur couche mince. Traduit de l'allemand par NGUYÊN-DĂNG-TÂM. 2è édition revue et augmentée, Gauthier-Villars Editeur, Paris-6è, 1971.

28. M. C. SBROLLINI: Olfactory Delights. In Journal of chemical Education Society, vol.64, No 9 ( september 1987), pp. 799-801.

29. L. THURZOVA et al.: Les plantes-santés qui poussent autour de nous. Elsevier Séquoia, Bruxelles, 1978.

30. G. VERNIN: La chromatographie en couche mince: techniques et applications en chimie organique. DUNOD, Paris, 1970.

31. P. WEYERSTAHL et al.: Volatile constituents of Plectranthus rugosus Leaf oil. In Journal of Medicinal Plant Research, Vol. 48,(1983), pp.99-102.

==========§§§§==========§§§§==========