

LISTE DES ABREVIATIONS

%	: Pourcentage
μ l	: Microlitre
AcOEt	: Acétate d'éthyle
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
cm	: Centimètre
CPG/FID	: Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
CPG/SM	: Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
CPG/SMIE	: Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse - Impact électronique
DCM	: Dichlorométhane
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
HE	: Huile essentielle
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
I	: Nombre quantique de spin nucléaire
IE	: Impact électronique
IK	: Indice de Kovats
MeOH	: Méthanol
mg	: Milligramme
MHz	: Mégahertz
ml	: Millilitre
min	: Minute
m/z	: Rapport de la masse à la charge
nm	: Nanomètre
ppm	: Partie par million
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
t_R	: Temps de rétention
UV	: Ultra-Violet

Remerciements	iv
Liste des abréviations	v
Tables des matières	xi
Liste des figures.....	xiv
Liste des photos	xv
Liste des tableaux.....	xvi

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
PARTIE 1	
SYNTHESE DES RECHERCHES	
BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES MATIERES RESINEUSES	
I-1 Généralités sur les résines.....	2
I-1-1 Définition	2
I-1-2 Rôles des résines au sein d'une plante	2
I-1-3 Caractéristiques générales des résines	3
I-1-3-1-Propriétés physiques	3
I-1-3-2- Composition et propriétés chimiques	3
I-1-3-3-Différents modes de classification des produits résineux	4
➤ La classification taxonomique	4
➤ La classification chimique	4
➤ Classification selon les constituants de résine	4
I-2 Résines diterpéniques	5
I-2-1 Notion de diterpénoïdes	5
I-2-2-Sources des résines diterpéniques	6
I-2-3-Résines de conifères	7
➤ Copal de Congo.....	7
➤ Colophane	7
I-2-4- Ambre jaune	8

Définition	8
Composition chimique	8
Utilisations	9
Répartition géographique	9
I-3 Résines triterpéniques.....	9
I-3-1- Notion de triterpénoïdes	9
I-3-2-Sources des résines triterpéniques	11
I-3-3 L’Oliban.....	13
Définition	13
Composition chimique	13
Utilisations.....	14
Répartition géographique	14
I-3-4-La myrrhe.....	14
Définition	14
Composition chimique	15
Utilisations.....	15
Répartition géographique	15
I-3-5-Autres résines triterpéniques.....	16
Mastic	16
Dammar	16
I-4- Autres produits résineux : cas de l’ambre gris	17
Définition de l’ambre gris	17
Caractéristiques	17
Composition chimique	17
Utilisations.....	19
Répartition Géographique	19
I-5- Huiles essentielles de résines	19

I-5-1-Notion générale de huile essentielle	19
Définition.....	19
Composition chimiques	19
Notions sur les monoterpènes	20
Notions sur les sesquiterpènes	20
I-5-2- L'huile essentielle de l'Oliban.....	20
I-5-2-1 Exemple de biochimie aromatique de l'oliban	20
I-5-2-2 Exemples d'applications en parfumerie	21
I-5-3- L'huile essentielle de la myrrhe	21
I-5-3-1 Exemple de biochimie aromatique de la myrrhe	21
I-5-3-2 Exemples d'applications en parfumerie	21
I-5-4- Huile essentielle d'autres résines	22
I-6- Généralités sur les méthodes chromatographiques et spectrales utilisées	22
I-6-1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	22
I-6-2 Chromatographie sur colonne	23
I-6-3 Techniques d'analyses spectrales des produits isolés	23
I-6-3-1 Couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (CPG-SM)	23
I-6-3-2 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et méthode d'interprétation	24
I-7- Techniques d'étude des produits volatils de l'échantillon	25
II-7-1 Extraction par hydrodistillation	25
II-7-2 Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse (GC/FID) et méthode d'interprétation	25
Conclusion partielle.....	26

PARTIE 2
MATERIELS ET METHODES

II-1 Choix de l'échantillon et stratégie d'étude	27
II-1-1- Echantillons à étudier	27
Caractéristiques généraux de l'échantillon à étudier	27
II-1-2- Matériels de laboratoires utilisés	28
II-1-3- Stratégie de recherche adoptée	28
II-2- Techniques d'études préliminaires	29
II-2-1-Tests physiques.....	29
II-2-2- Mise au point de technique d'extraction et recherche de solvants chromatographiques	29
II-2-3-CCM préliminaires	30
II-2-4- Criblage des triterpènes et stéroïdes	30
II-2-5- Techniques d'extraction et d'isolement des constituants non volatils	31
Extraction dans le DCM.....	31
II-2-6 Fractionnement de l'extrait.....	31
II-2-6-1Préparation de la colonne	31
II-2-6-2Préparation du dépôt	32
II-2-6-3Elution	32
II-3- Techniques d'analyses spectrales des produits isolés pour leurs déterminations structurales	32
II-3-1 Analyse des produits résineux par couplage CPG/SM	32
II-3-2 Analyse des produits résineux par RMN	33
II-4-Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse (CPG/FID) et méthode d'interprétation	33
Conclusion partielle	34

PARTIE 3
RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1- Résultats des tests physiques	35
III-2- Résultats des extractions par solvants	35
III-2-1-Rendements d'extractions obtenues des solvants variés	35
III-2-2- Résultats de la CCM de divers extraits	36
III-2-3-Résultats de CCM de l'extrait DCM.....	37
III-2-4- Résultats du criblage des triterpènes et stéroïdes.....	38
III-2-5- Fractionnement de l'extrait	39
III-2-6- Purification des groupes de fractions : isolement des constituants.....	44
III-3- Etudes structurales des produits isolés	45
III-3-1- Identification du produit G10.....	46
❖ Analyse par CPG/SM	46
➤ Du composé majoritaire G102	50
➤ Du composé minoritaire G101	50
❖ Analyse par RMN.....	52
➤ Du composé majoritaire G102	53
➤ Du composé minoritaire G101	56
III-3-2- Identification des produits G(4+5)-1 et G6-1 : élucidation de la structure épi-ψ-taraxastanonol	66
III-3-2-1-Comparaison des profils chromatographiques de <i>G(4+5)-1 et G6-1</i>	66
III-3-2-2-Examen de l'ensemble des résultats d'analyses spectrales (CPG/SM et RMN)	70
➤ <i>Exploitation des résultats CPG/SMIE</i>	70
➤ <i>Exploitation des spectres de RMN</i>	72

III-3-3- Identification des produits G6-3 et G6-4 : élucidation des structures α -amyrenone et β -amyrenone	77
III-3-3-1 - Comparaison des profils chromatographiques de G6-3 et G6-4.....	79
III-3-3-2 - Examen du résultat CPG/SM du produit majoritaire G642	79
III-3-3-3 - Examen du résultat CPG/SM du produit minoritaire G641.....	82
➤ Exploitation des résultats <i>CPG/SMIE</i>	82
III-4- Résultats d'étude des constituants volatils	84
III-4-1-Extraction	84
III-4-2-Identification des constituants par analyse en CPG/FID	84
Conclusion partielle	88
CONCLUSION GENERALE	89
REFERENCES	
ANNEXES	
RESUME ET MOTS CLES (abstract and key words)	

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Structure de l'unité d'isoprène	3
Figure 2 : Structure du Géranyl-pyrophosphate, précurseur des diterpènes	5
Figure 3 : Exemples de structures des diterpènes rencontrés dans les résines diterpénique	5
Figure 4 : Extrait de la classification des espèces végétales. Embranchement des Gymnospermes	6
Figure 5 : Structure de l'acide congocopalolique : C ₂₁ H ₃₃ OH-OOH	7
Figure 6 : Structures de l'acide abéatique, produit majoritaire du Colophane	7
Figure 7: Exemples de l'ambre jaune	8
Figure 8 : Structures de l'acide abéatique et de l'acide pimarique	8
Figure 9 : Collier et pendentifs en ambre	9
Figure 10 : Forme linéaire du squalène	9
Figure 11: Forme replié du squalène	10
Figure 12 : Principales structures de base des triterpènes constituant les résines d'Angiospermes	10
Figure 13 : Extrait de la classification des espèces végétales. Embranchement des Angiospermes	12
Figure 14 : Exemples (a) Oliban de Somalie et (b) arbuste appartenant au genre <i>Boswellia</i>	13
Figure15: Exemples de triterpènes rencontrés dans legenre <i>Boswellia</i>	13
Figure 16 : Exemples (a) Myrrhe et (b) arbuste appartenant à la famille des Burseraceae	14
Figure 17 : Exemples de triterpènes rencontrés dans la myrrhe	15
Figure 18: Produit majoritaire de la résine mastic	16
Figure 19 : Produit majoritaire de la résine dammar (Structure dammarane).....	16
Figure 20 : (a) Ambre gris et (b) Cachalot (<i>Physeter macrocephalus</i>)	17
Figure 21: Exemple de composition de l'ambre gris	18
Figure 22 : Quelques exemples de structures de monoterpènes	20
Figure 23 : Exemples de structure de Sesquiterpènes.....	20

Figure 24 : Caryophyllène (constituant majoritaire dans HE de Capaiba)	22
Figure 25 : Constituants majoritaire dans HE de Térébenthine	22
Figure 26 : Migration du dépôt	23
Figure 27 : Récapitulation du protocole d'extraction et d'isolement du produit A12	39
Figure 28: Chromatogrammes GC des produits G10 et G11	47
Figure 29 : Spectre de masse du produit majoritaire G102, Tr = 34,50 min	48
Figure 30: Spectre de masse du produit minoritaire G101de G ₁₀ , Tr = 31,15 min.....	49
Figure 31 : Fragmentation du produit majoritaire G102 de G10, Tr = 34,50 min	51
Figure 32: S1 Spectre RMN ¹ H du G10, S1-a, S1-b, S1-c également du spectre S1	53
Figure 33: S2 Spectre RMN ¹³ C du G10	54
Figure 34 : S2-a Etalement du S2 spectre RMN ¹³ C du G10	55
Figure 35: S2-b et S2-c également du S2 spectre RMN ¹³ C du G10	56
Figure 36 : S3 Spectre RMN DEPT	57
Figure 37: S3-a également du spectre RMN DEPT	58
Figure 38 : Structure chimique de l' α -amyrine	61
Figure 39 : Structure de la β -amyrine	62
Figure 40 : Chromatogrammes GC des produits G (4+5)-1 et G6-1	67
Figure 41: Spectre de masse du constituant majoritaire (39,46 min) de G (4+5)-1	68
Figure 42 : Comparaison du spectre de masse du constituant majoritaire (39,46 min) de G (4+5)-1 avec la librairie numérique	69
Figure 43 : Fragmentation du l'epi- Ψ -taraxastananol	71
Figure 44 : Structure chimique de l'epi- Ψ -taraxastananol.....	72
Figure 45: S4 Spectre RMN ¹ H du produit G (4+5)-1, S4-a également de S4	74
Figure 46 : S5 Spectre RMN ¹³ C du produit G (4+5)-1, S5-a également de S5	75
Figure 47 : S6 Spectre RMN HMQC du produit G (4+5)-1	76

Figure 48 : Chromatogramme du produit G6-4	78
Figure 49 : Structure de l' α -amyrenone	79
Figure 50 : Fragmentation l' α -amyrenone	80
Figure 51 : Spectre de masse du produit majoritaire de G642, Tr = 32,60 min	81
Figure 52 : Structure du β -amyrenone	82
Figure 53 : Chromatogramme et spectre de masse du produit minoritaire de G641, Tr = 29,35 min ..	83
Figure 54 : Chromatogramme A de l'HE pure analysée sur CPG OV101	85
Figure 55 : Chromatogramme B du mélange HE pure et d'alcanes (C10-C20) coinjecté sur CPG OV101.....	87

LISTE DES PHOTOS

Photographie 1: Développement chromatographique d'une plaque	23
Photographie 2 : Echantillon du produit à étudier A12	27
Photographie3 : Chromatogramme en CCM de A12 et le témoin de référence révélation avec vanilline perchlorique sulfurique	36
Photographie 4: Chromatogramme en CCM de chaque extrait d'A12	37
Photographie 5 : Chromatogramme en CCM des fractions après révélation avec vanilline perchlorique sulfurique	40
Photographie 6 : Chromatogramme en CCM récapitulatives de la colonne après observation sous UV 254nm et après révélation avec vanilline perchlorique sulfurique	42
Photographie 7: Chromatogramme en CCM du groupe G1.....	44
Photographie8: Chromatogramme en CCM du groupe G (4+5).....	44
Photographie9 : Chromatogramme en CCM du groupe G6.....	45
Photographie 10 : Chromatogramme en CCM des produits G10 et G11	46
Photographie 11 : Chromatogramme en CCM des produits G (4+5)-1 et G6-1	66
Photographie 12: Chromatogramme en CCM des produits G6-3 et G6-4.....	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition de l'ambre gris	18
Tableau 2 : Les matériels de laboratoires utilisés au cours de ce travail	28
Tableau 3 : Réactifs et résultats attendus du criblage des triterpènes et stéroïdes	31
Tableau 4 : Résultats du 1 ^{er} essai d'extraction (extraction brute)	35
Tableau 5 : Résultats du 2 ^{ère} essai d'extraction (épuisement successif avec Hexane, DCM)	35
Tableau 6 : Résultats de l'extraction au DCM.....	36
Tableau 7 : Résultats du criblage des tritepènes et stéroïdes.....	38
Tableau 8 : Récapitulation de la colonne	41
Tableau 9 : Description et R _f des produits	43
Tableau 10 : Techniques spectrales utilisés.....	45
Tableau 11 : Identification des spectres RMN.....	52
Tableau 12 : Relevé du spectre de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la molécule majoritaire G102.....	53
Tableau 13 : Relevé des spectres de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃), et RMN DEPT de la molécule majoritaire G102	54
Tableau 14 : Relevé du spectre de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la molécule minoritaire G101	57
Tableau 15 : Relevé des spectres de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) et RMN DEPT de la molécule minoritaire G101	58
Tableau 16 : Relevé des spectres de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) et HMQC de la molécule majoritaire du produit G (4+5)-1	73
Tableau 17 : Evolution du volume d'huile essentielle cumulée en fonction du temps	84
Tableau 18 : Colonne B (OV101).....	87

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Madagascar étant une île exotique, possède une potentialité élevée en matière de biodiversité terrestre (faune et flore) et marine. Ces richesses sont si nombreuses et variées que l'inventaire des différentes espèces en fait un terrain de recherche privilégié, elles continuent à attirer les curiosités des scientifiques du monde entier.

Outre l'esthétique du paysage et son rôle sur le plan environnemental, cette biodiversité fournit de multiples produits de hautes valeurs ajoutées : matières premières pharmaceutiques, cosmétiques, industrielles et artisanales. Ainsi elle a un rôle majeur pour l'économie du pays.

Parmi ces richesses figurent les « résines ». Ce sont des substances organiques d'origine naturelle qui appartiennent pour la majorité au monde végétal. Elles peuvent être des résines d'arbres ou des gommes. D'autres proviennent des animaux, comme les graisses, les cires... Depuis les temps anciens, elles ont été largement utilisées pour la parfumerie et aussi dans d'autres applications [13].

Cependant, lorsque retrouvées à l'état brut, ces substances ont souvent le même aspect : des grains de matériau amorphe, du jaune très pale au rouge brun. Travaillées (transformées ou mélangées), elles sont encore peu discernables. De plus, les différents textes faisant part de leurs diversités et de leurs utilisations sont souvent sources de confusion en ce qui concerne la terminologie utilisée pour les désigner. Cette variabilité et le non spécificité des aspects, des noms, et des utilisations rendent les études de ces matériaux délicates [27]. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des analyses physico-chimiques pour mieux les identifier et les différencier.

Le CNARP dispose d'échantillons de produits résineux collectés sur les plages de la côte Ouest de Madagascar. Un des thèmes de recherche du Centre consiste à effectuer les analyses chimiques de ces échantillons afin de les identifier, les valoriser et déterminer leurs origines.

Dans le cadre de la collaboration scientifique entre le Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP) et le Laboratoire de Chimie Organique-Spectrométrie de Masse (LCO-SM), l'étude chimique d'un de ces échantillons a été proposée de commun accord par les deux Institutions, comme le sujet de notre présent Mémoire.

Les spectres des produits isolés au cours de ce travail ont été enregistrés au Laboratoire Pharmacognosie de l'Université de Rouen.

Le manuscrit comprend trois parties :

- La première présente la synthèse des données bibliographiques sur les produits résineux.
- La seconde partie décrit les matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail.
- La troisième rapporte les résultats obtenus et les discussions.

Une conclusion générale et des perspectives terminent ce manuscrit.

PARTIE 1

SYNTHESE DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES MATIERES RESINEUSES

Il existe plusieurs types de résines selon leurs origines et leurs constituants. Les résines végétales occupent une place de premier ordre parmi les matériaux organiques utilisés. Leur abondance à travers le monde et leur accessibilité facile, et surtout leurs propriétés physico-chimiques particulières (inflammabilité, insolubilité dans l'eau, adhésivité, etc.) ont fait de ces sous-produits forestiers, les matériaux polyvalents les plus fréquemment employés. Aussi bien à l'état naturel qu'après un traitement peu contraignant, leurs applications sont diverses par exemple : confection de bijoux (ambre jaune) [17], fabrication d'encens (de la myrrhe ou de l'oliban) [31]. Il reste toujours une confusion sur les noms, sur les aspects de certaines d'entre elles.

Dans cette première partie sont évoqués les différents types de résines selon les données de la littérature.

I-1 Généralités sur les résines

I-1-1 Définitions

Les résines sont des mélanges liposolubles de terpènes et/ou de composés phénoliques sécrétées par des structures spécifiques situées à l'intérieur ou en surface d'un végétal.

Les résines végétales sont souvent désignées comme des exsudats végétaux, alors que ce terme s'applique à des substances d'origine végétales et de natures diverses. En effet, les gommes, les mucilages ou les latex ont souvent été considérés dans la littérature comme étant des synonymes du terme résine. Ainsi, la nécessité de caractériser ces divers exsudats et de redéfinir clairement le terme de résine est incontournable [30] [31].

Des blocs de résine exsudée sont parfois ensevelis dans le sol au pied d'un arbre. On parle alors de façon erronée de "résines fossiles", la fossilisation se déroulant sur des temps géologiques. Il s'agit en réalité simplement de résine, au même titre que celle qui suinte à la surface de l'écorce d'un végétal. Par exsudation, la résine s'accumule à la surface de l'écorce et par l'effet de la gravitation, forme progressivement des stalactites de matière qui, à un moment donné, cassent et tombent au pied de l'arbre [39].

I-1-2 Rôles des résines au sein d'une plante :

Les résines jouent divers rôles au sein d'une plante, notamment celui d'agent cicatrisant en cas de blessure [32]. Elles protègent également la plante de la dessiccation, des radiations UV et des hautes températures, et ce principalement au niveau des jeunes feuilles et tiges [33].

I-1-3 Caractéristiques générales des résines:

I-1-3-1-Propriétés physiques

En général, ce sont des matières solides ou semi-solides amorphes qui sont insolubles dans l'eau mais souvent solubles dans l'alcool ou d'autres solvants organiques.

Elles ont une odeur peu prononcée, sont mauvaises conductrices de l'électricité et s'électrisent négativement. A la chaleur, elles se ramollissent, puis fondent plus ou moins complètement. En brûlant dans l'air, elles donnent une flamme fuligineuse et exhalent une odeur caractéristique [4].

Ces substances, plus ou moins visqueuses, obtenues par exsudation naturelle ou provoquée, tendent à durcir au contact de l'air, à des vitesses différentes selon les espèces, par évaporation de la fraction volatile et/ou par polymérisation oxydative partielle de certains composés [4].

I-1-3-2-Composition et propriétés chimiques

Elles sont constituées principalement par de molécules hydrocarbonées, sans azote mais contiennent parfois de l'oxygène. La majorité d'entre elles subissent l'oxydation atmosphérique lente, modifiant leur couleur [4].

Leurs propriétés chimiques sont basées sur les groupes fonctionnels présents dans ces substances. Les résines sont des mélanges complexes de diverses substances. Elles sont considérées comme des produits d'oxydation des terpènes.

En général, les terpénoïdes, peuvent être définis comme des produits naturels dont les structures sont constituées de plusieurs unités d'isoprène d'où leurs noms d'isoprénoïde ou en général des terpènes. En outre, ce groupe particulier de composés est parfois collectivement dénommés les terpènes. Ces derniers sont biosynthétisés par couplage d'au moins deux entités à cinq carbones dont la structure est celle de l'isoprène (figure1). Selon le nombre de ces entités les terpènes sont classés en monoterpènes à 10 carbones, Sesquiterpènes à 15 carbones, diterpènes à 20 carbones, triterpène à 30 carbones, tétra etc... [4].

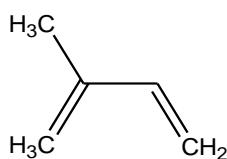


Figure 1 : Structure de l'unité d'isoprène

I-1-3-3-Différents modes de classification des produits résineux :

Les résines sont généralement classées selon trois critères, on a ainsi :

➤ *La classification taxonomique:*

Elles sont regroupées en fonction de leur origine botanique exclusivement, comme les résines de conifères (colophane, sandaraque...), des Berberidaceae (podopyllum), des Burseraceae (myrrhe, oliban...)... [4].

➤ *La classification chimique :*

Elles peuvent être classées par la présence des fonctions chimiques prédominantes :

Résines alcools : Resinotannols, Resinols

Résines Esters : Ammoniacum; Asafoetida; Benjoin; Baume du Pérou et Tolu ; Galbanum; Storax;

Résines acides: Colophane; Copaiba

Résines: Dammar; Mastic; Myrrhe; Oliban.

Il a été observé que les structures chimiques des constituants des résines sont reproduites généralement dans les végétaux de la même famille [4].

➤ *Classification selon les constituants des résines :*

Elles peuvent également être classées selon les principaux constituants présents soit de résines ou de combinaisons de résines avec d'autres substances chimiques (huile essentielle et/ou polysaccharides) [4].

Exemples: Résines; Oléorésines; Résines Oleo-gomme.

Ce travail est surtout axé sur la classification des résines selon la classification taxonomique : le terme général « résine » s'applique en réalité aux résines terpéniques. Ce type de résines est trouvé dans deux classes végétales : Gymnospermes et Angiospermes.

Elles sont formées de mono-, sesqui-, di- et triterpènes et ne contiennent pas (ou rarement) à la fois des di- et des triterpènes.

I-2- Les résines diterpéniques

I-2-1 Notion de diterpénoides

Les diterpénoides sont des substances composées de 20 atomes de carbone (C₂₀), non volatiles, obtenus à partir du géranyl-pyrophosphate (figure 2).

Ces composés sont principalement présents dans les plantes supérieures, dans les résines, ainsi que dans les champignons. Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme cyclique [6]. Des exemples de structures de diterpènes sont présentés sur la figure 3.

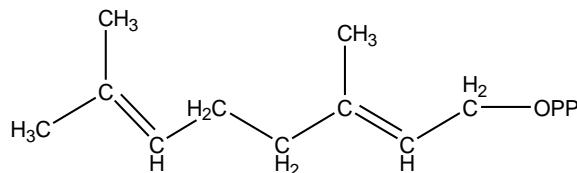
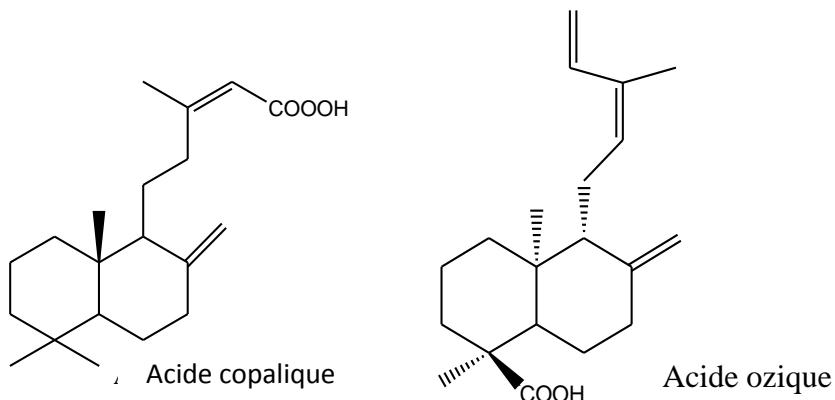
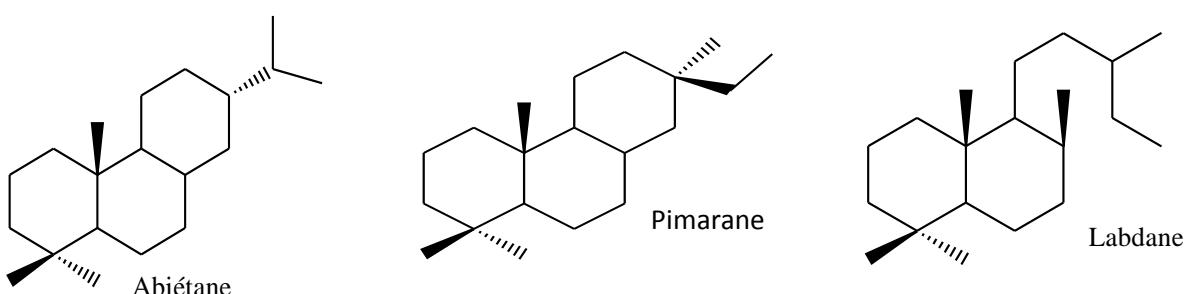


Figure 2 : Structure du Géranyl-pyrophosphate, précurseur des diterpènes



Composés majoritaires des copals africains et de Madagascar (famille des *Fabaceae*)



Principales structures de base des diterpènes constituant les résines de Conifères

Figure 3: Exemples de structures des diterpènes rencontrés dans les résines diterpéniques

I-2-2-Sources des résines diterpéniques

Les principaux producteurs de résines diterpéniques sont les arbres de l'ordre des Conifères, seuls Gymnospermes à synthétiser de la résine. La famille des Fabaceae du sous-embranchement des Angiospermes, produit également de la résine diterpénique tels : le copal de Madagascar (*Hymenaea*), ceux du Zanzibar (*Trachylobium*) et de Congo (*Copaifera*) ont été recensés.

Les résines diterpéniques des Conifères sont constituées principalement par trois types de squelettes : l'abiétane et le pimarane, ainsi que le labdane bicyclique [39].

La figure 4 montre un extrait de la classification des espèces végétales concernant l'embranchement des Gymnospermes.

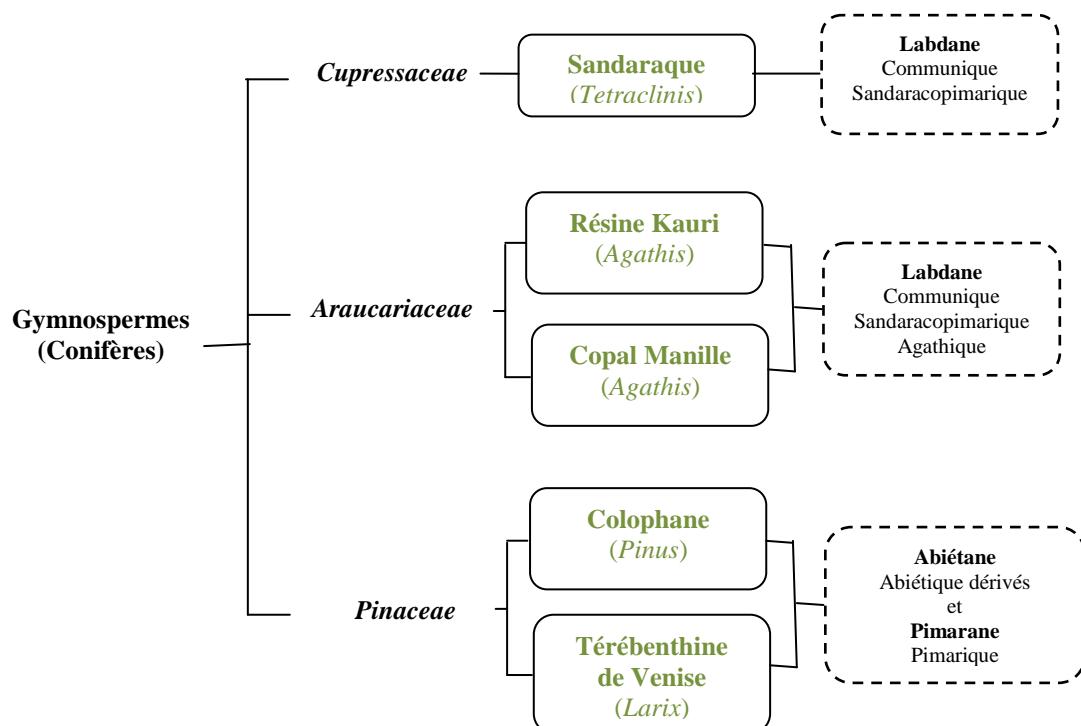


Figure 4 : Un extrait de la classification des espèces végétales.
Embranchement des Gymnospermes [14]

En vert : résines diterpéniques
Entre (...) : espèce d'arbre dont proviennent les résines diterpéniques
 Dernière colonne : squelettes types et les acides terpéniques majoritaires.

I-2-3-Résines de conifères

Deux cas sont présentés en exemples :

➤ ***Copal de Congo***

Il s'agit d'une résine naturelle provenant d'une exsudation d'arbres appelé les copaliers, de la famille des Légumineuses, dont plusieurs variétés notamment le *Copaifera Demeusil* Harms, le *Copaifera Laurentii* De Wild, et le *Copaifera Arnoldiana* De Wild [33].

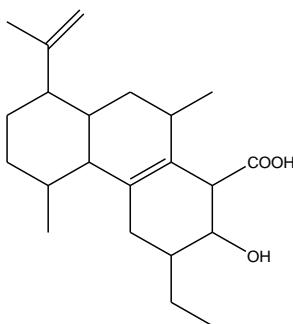


Figure 5 : Structure de l'acide congocopalolique : $C_{21}H_{33}OH-OOH$

➤ **Colophane**

La colophane (appelée aussi rosin) est une oléorésine qui provient d'une espèce végétale classée dans la famille des Pinacées (*Pinus Palustris* et *Pinus Caribaeae*). La couleur de cette résine est jaune très claire [4].

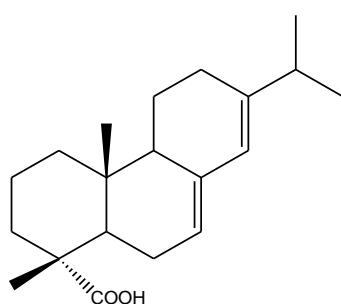


Figure 6 : Structures de l'acide abéatique, produit majoritaire du Colophane

L'ambre jaune est parmi les résines diterpéniques le plus connu.

I-2-4- Ambre jaune

Définition

L'ambre jaune ou « succin » désigne une résine fossile sécrétée par des conifères. Il se présente généralement sous forme de nodules irréguliers, relativement durs et cassants, plus ou moins translucides, parfois fluorescents et opaques. Sa couleur varie du jaune pâle au brun. Il contient des bulles d'air et quelquefois des inclusions d'insectes, de vers, ou de fleurs [22] [26] [45].



Figure 7 : Exemples de l'ambre jaune

Composition chimique

La composition chimique de l'ambre jaune n'est pas encore complètement établie. Cette lacune provient de sa résistance à se dissoudre dans les solvants courants, (éthanol, térébenthine, éther, benzène...). Ceux-ci ne l'attaquent qu'à 30% environ, et l'identification des éléments par chromatographie en phase gazeuse est donc incomplète [22] [45].

L'acide succinique est un composé important dans la structure du polymère qui représente de 3 à 8% de la masse globale de l'ambre jaune [37] [45].

Pour l'ambre de Baltique, l'acide abiétique est le composant majoritaire. Il donne par dimérisation de l'acide diabiétenique selon Rottländer [43].

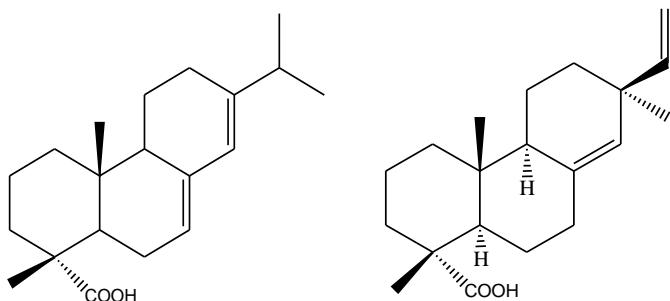


Figure 8: Structures de l'acide abiétique et de l'acide pimarique

Utilisations:

L'ambre jaune est utilisé dans la fabrication de bijoux, d'objets décoratifs, dans la médecine traditionnelle depuis des milliers d'années, mais il a aussi sa place dans la Science. Il était la première substance sur laquelle les phénomènes électrostatiques ont été observés, par le philosophe grec Thalès de Milet, 600 avant JC, l'ambre jaune a donné son nom l'électricité [7] [45].



Figure 9: Collier et pendentifs en ambre

Répartition Géographique :

L'ambre jaune est rencontré partout dans le monde. Le plus célèbre dépôt en Europe et en grande quantité est dans les côtes de la mer Baltique. On en trouve aussi en Europe orientale, sur les bords de la mer du Nord, dans les Alpes, dans le nord de l'Espagne et de la Sicile [7] [45].

I-3 Résines triterpéniques

I-3-1- Notion de triterpеноïdes

Ils sont formés à partir du squalène précurseur acyclique à 6 unités d'isoprène [52]. Ce composé peut exister sous forme linéaire (figure 10) ou repliée (figure 11).

Ils sont obtenus généralement par la biogenèse de six unités d'isoprène, le squalène (figure 10 et 11) est le précurseur acyclique (C30).

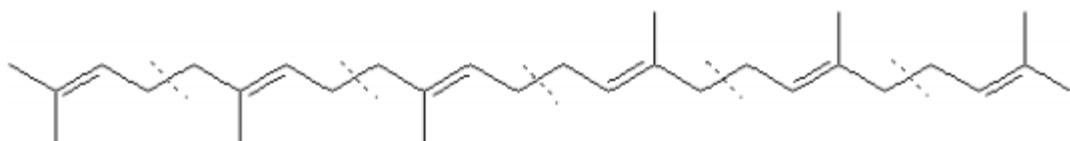


Figure 10 : Forme linéaire du squalène

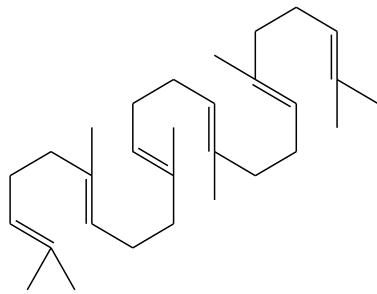


Figure 11: Forme replié du squalène

Sur la base des différents modes de fermeture du cycle, le squalène a donné naissance à une variété de structure de squelette de triterpénoïdes. On compte actuellement 4000 triterpenoides naturels isolés et identifiés, et plus de 40 types de squelettes ont été établis.

Les triperpenoides peuvent être classés en deux groupes, à savoir: les composés tétracycliques et les composés pentacycliques [10].

Des exemples de structures sont rapportés sur la figure 12.

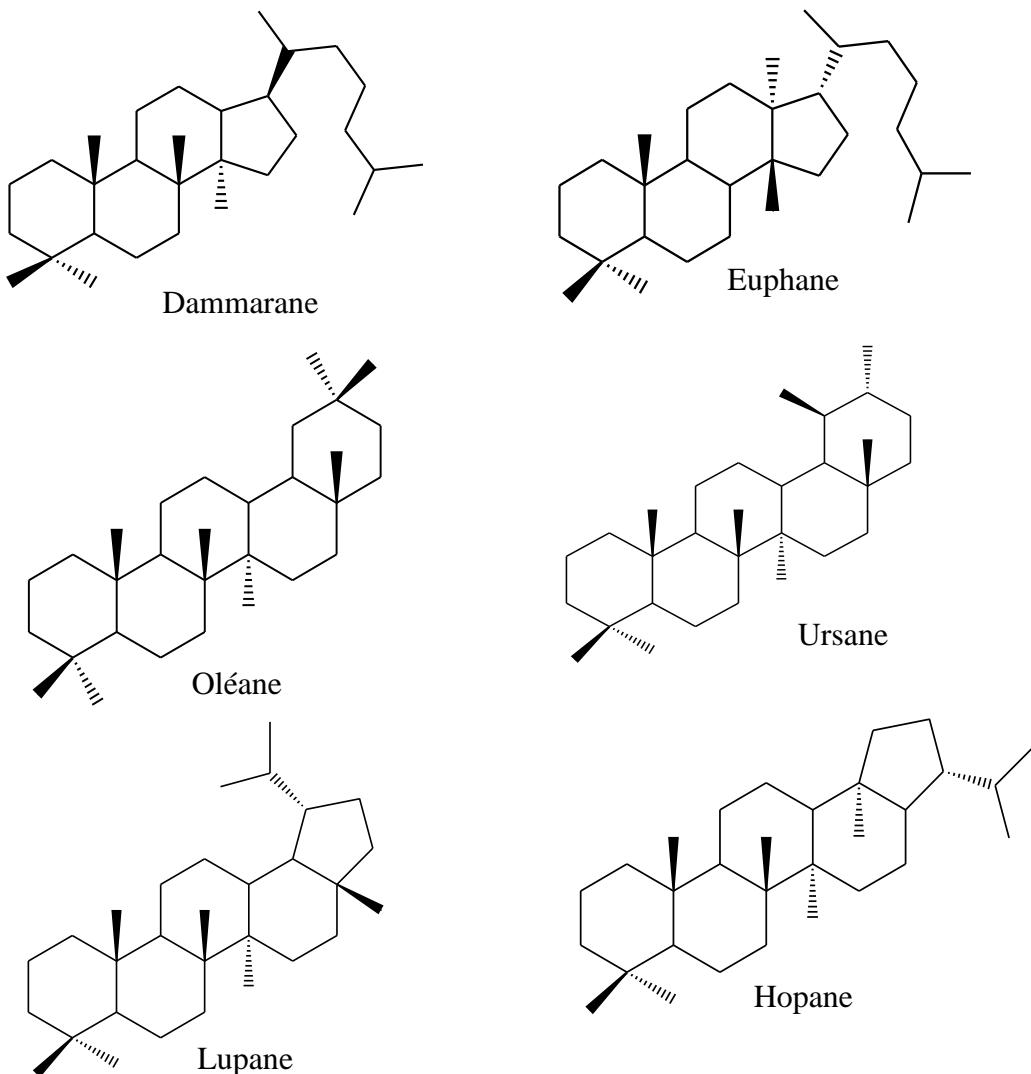


Figure 12 : Principales structures de base des triterpènes constituant les résines d'Angiospermes

I-3-2-Sources des résines triterpéniques

Les résines triterpéniques sont synthétisées par de nombreuses familles du sous embranchement des Angiospermes, notamment les familles des Anacardiaceae, des Burseraceae et des Dipterocarpaceae [39]. Certaines espèces donnent des résines diterpéniques, d'autres triterpéniques, ou des gommes composées de polysaccharides.

La figure 13 montre un extrait de la classification des espèces végétales sur l'embranchement des Angiospermes.

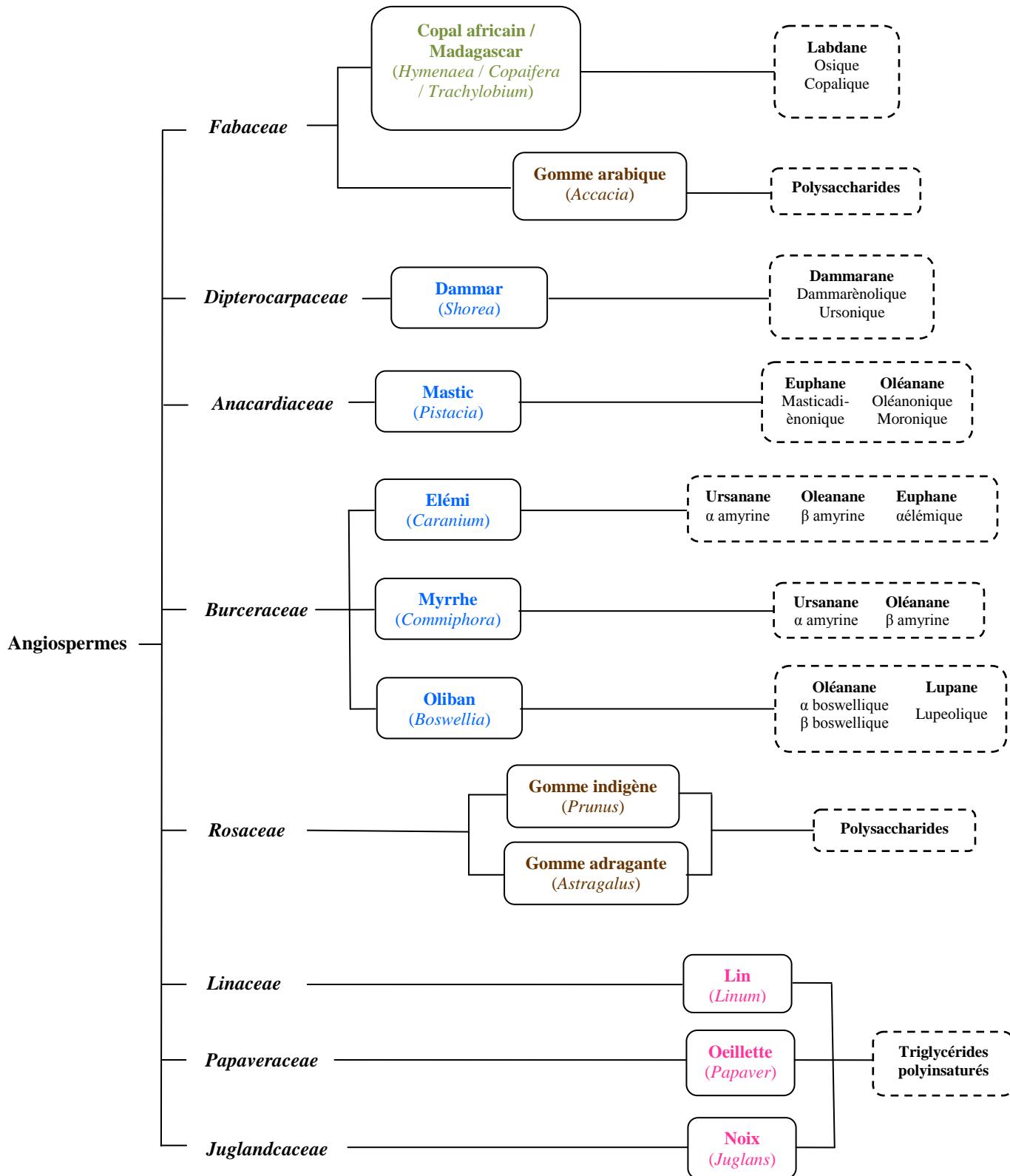


Figure 13: Extrait de la classification des espèces végétales. Embranchement des Angiospermes [13]

En vert : résine diterpéniique
En bleu : résines triterpéniques

En marron : gommes

En rose : huiles

Entre (...) : espèce d'arbre ou de plante

Dernière colonne : squelettes types et les acides terpéniques majoritaires, et pour les autres matériaux leur famille chimique.

Parmi les résines triterpéniques les plus exploitées par l'Homme, nous pouvons citer :

I-3-3 L'Oliban

Définition

C'est une résine aromatique se présentant sous la forme de suc blanchâtre produit par incision de l'écorce d'arbres et arbustes appartenant au genre *Boswellia*. Tous les arbres à encens sont de petites tailles et buissonnantes [25].



Figure 14 : Exemples (a) Oliban de Somalie et (b) arbuste appartenant au genre *Boswellia*

Composition chimique

Les triterpènes rencontrés dans le genre *Boswellia* possèdent comme composés majoritaires les acides α - et β -boswelliques et leurs dérivés acétyléniques basés sur le squelette type oléanane ainsi que l'acide lupéolique (type lupane [5] [13].

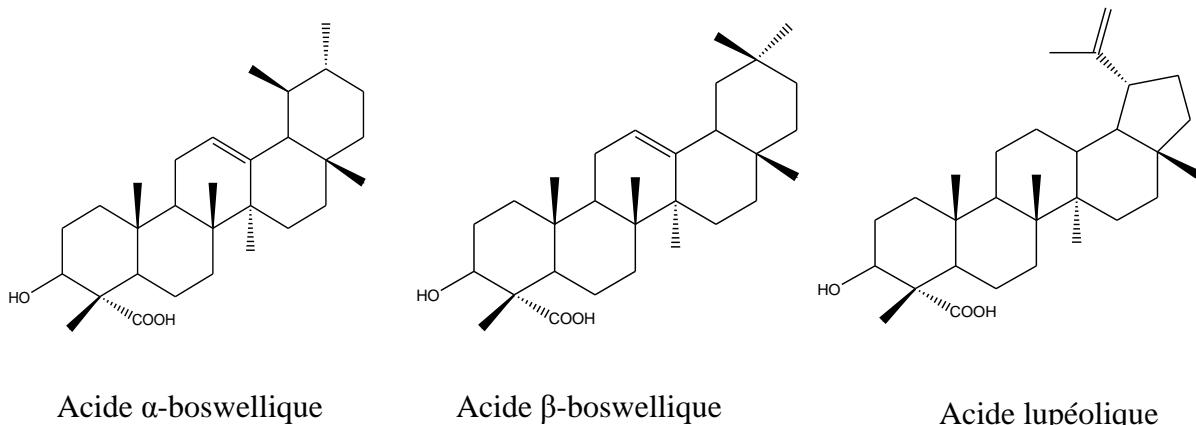


Figure 15: Exemples de triterpénés rencontrés dans le genre *Boswellia*

Utilisations :

Il faut attendre près d'une dizaine d'années pour que les arbres fournissent des résines de bonne qualité. Lorsqu'elle est brûlée, la résine de *Boswellia* dégage une épaisse fumée à l'odeur agréable. Elle est largement utilisée dans la médecine traditionnelle comme fumigatoire ainsi que comme composant de traitements des rhumatismes. Autrefois, elle servait également dans les rituels religieux et funéraires [25].

Répartition géographique :

Ce genre *Boswellia* regroupe une vingtaine d'espèces de la famille des Burseraceae, originaires d'Afrique et d'Asie. En Afrique il est distribué dans différents pays tels que la Somalie (*Boswellia sacra*), le Soudan et l'Ethiopie (*Boswellia serrat*), Madagascar (*Boswellia madagascariensis*) [2].

I-3-4-La myrrhe

Définition

Comme l'oliban, la myrrhe provient des arbres de la famille des Burseraceae dont les individus ont la particularité de sécréter des résines à la suite de blessures ou d'entailles dans l'écorce. Souvent, la myrrhe exsude naturellement de l'arbre, ce qui facilite sa récolte.

Les arbres sont souvent épineux, hauts de 2 à 4 mètres, buissonnants, à fleurs verdâtres. La myrrhe se présente en globules pouvant atteindre la grosseur d'une noisette ou même d'un œuf, revêtues d'une fine couche poussiéreuse jaunâtre [25].



(a)



(b)

Figure 16 : Exemples (a) Myrrhe et (b) arbuste appartenant à la famille des Burseraceae

Composition chimique

Elle est composée par un mélange complexe de triterpènes dont les alcools α - et β -amyrine.

Ces deux dernières résines (myrrhe et oliban) contiennent une quantité non négligeable de gomme (polysaccharides) et sont souvent chimiquement confondues [13] [51] [58].

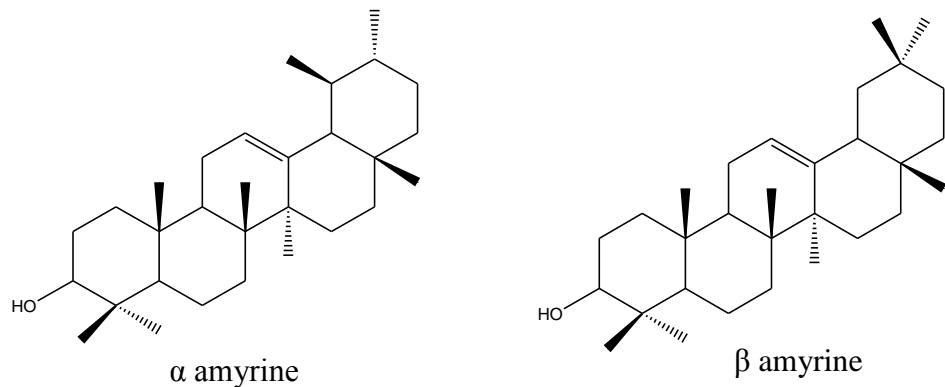


Figure 17: Exemples de triterpènes rencontrés dans la myrrhe

Utilisations

Chez les Égyptiens, elle entrait dans la composition du kyphi, parfum servant à honorer les dieux.

La myrrhe est utilisée comme composant de médicaments en raison de ses propriétés antispasmodiques et stimulantes, ainsi qu'en parfumerie, où elle entre dans la composition des parfums de type oriental (elle y accroît la sensualité des notes de rose) [46].

Répartition géographique

Les espèces les plus connues sont : *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. des côtes de Somalie, *C. abyssina* (O. Berg) Engl. d'Abyssinie, d'Erythrée, du Yémen, *C. schimperi* (O. Berg) Engl. d'Abyssinie et d'Erythrée (Ogaden), *C. opobalsamum* (L.) Engl., d'Arabie et de Somalie [25].

Il ya aussi les *Commiphora myrrha* originaires d'Inde, de Madagascar et du Sénégal [46].

I-3-5-Autres résines triterpéniques

Mastic

La résine mastic se présente sous la forme de gouttes jaune pâle dures se ramollissant par mastication. Elle est obtenue par incision de troncs d'arbres et arbustes de la famille des Anacardiaceae (encore nommée famille des Terebenthaceae). Cette famille compte environ 600 espèces réparties à travers le globe dans des régions tempérées à tropicales [4].

Cette résine est employée en pâtisserie, en confiserie, en cosmétique et dans la fabrication de liqueurs. Dès le XIème siècle, cette résine a été très recherchée dans le domaine de l'art pour la préparation de vernis et de liants [4].

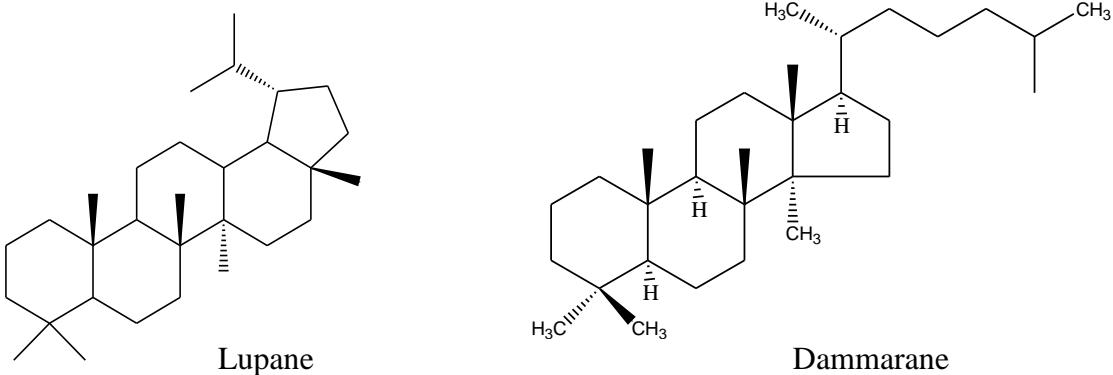


Figure 18 : Produit majoritaire de la résine mastic

Dammar

La résine dammar est principalement issue des arbres appartenant à la famille des Dipterocarpacea dont *Shorea* et *Hopea*. Elle est exsudée naturellement par les arbres, facilement retrouvée sur le sol, sous les arbres en morceaux grossiers, à côté des troncs, et même cachée sous la terre [4].

Les domaines d'utilisations de cette résine sont très variés. Traditionnellement, elle est utilisée dans l'artisanat, dans la peinture et dans la fabrication des bougies...

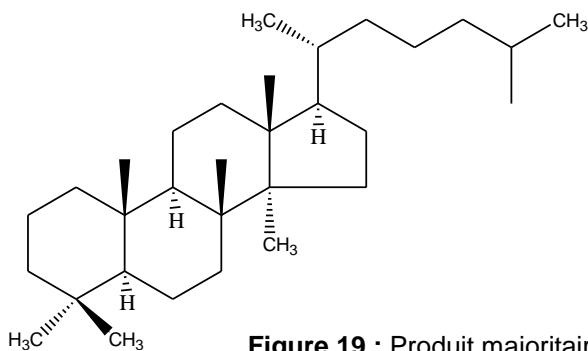


Figure 19 : Produit majoritaire de la résine dammar (Structure dammarane)

I-4- Autres produits résineux : cas de l'ambre gris

Des résines peuvent provenir des animaux comme la cire, l'ambre gris... L'ambre jaune et l'ambre gris sont deux substances qui ont des origines complètement différentes pourtant ils sont souvent récoltés sur la plage. Ce sont des produits importants, rare, difficile mais onéreux (surtout l'ambre gris). Malgré qu'ils n'ont aucune ressemblance en apparence et en compositions chimiques, on continue d'appeler les deux matières « ambre ».

Définition de l'ambre gris :

L'ambre gris est une concrétion intestinale du Cachalot (*Physeter macrocephalus*), il est appelé aussi le vomi du Cachalot. C'est une baleine à tête carrée, il a un corps foncé à la peau ridée, il possède une bosse effacée à la place de la nageoire dorsale. L'ambre gris est une substance qui permettrait à l'animal de cicatriser les plaies occasionnées, dans le tube digestif, par les becs de calamar qu'il dévore [19] [27] [47].

Caractéristiques

A l'origine, le matériau est de brun foncé à noir, mais après vieillissement, à la suite de l'action de la lumière du soleil de l'eau, de l'air et de la mer, la couleur sombre du matériau s'estompe peu à peu pour donner une couleur jaune gris ou crème pâle. En même temps, le composant principal, l'ambréine d'alcool triterpénique inodore est dégradée par oxydation [35].



Figure 20 : (a) Ambre gris et (b) Cachalot (*Physeter macrocephalus*),

Composition chimique

Des équipes de chimistes du XXe siècle, dirigés par Ruzicka à Zurich, Lederer à Paris, Stoll à Genève et Thomas à Hambourg [44], ont élucidé la composition de l'ambre gris, et réussi à synthétiser plusieurs des constituants, y compris l'ambréine ainsi que certains des composés odorants volatils, responsable de l'odeur de l'ambre gris. Des mélanges de ces produits synthétiques ont été commercialisés sous les noms de Grisambrol, Ambropur et Ambrox [35].

Toutefois, la synthèse d'ambréine et d'autres constituants semblent ne donner aucun indice sur la biosynthèse de l'ambre gris naturel. Lederer [19] a donné la composition suivante (tableau 1) pour l'ambre gris de bonne qualité.

Tableau 1 : Composition de l'ambre gris [19] [35] [49]

Biochimique	Composition en pourcentage
Fraction insoluble dans l'Ether	10-16
Pristane, C ₁₈ H ₃₈	2- 4
Ambreine C ₁₀ H ₅₂ O	25-45
epi-Coprosterol, libre et esterifié	30-40
Coprosterol	1-5
Cholesterol	0-1
Cetones (dont 50% Sont du coprostane-3-one)	6-8
Acides libres	5
Esters	5-8

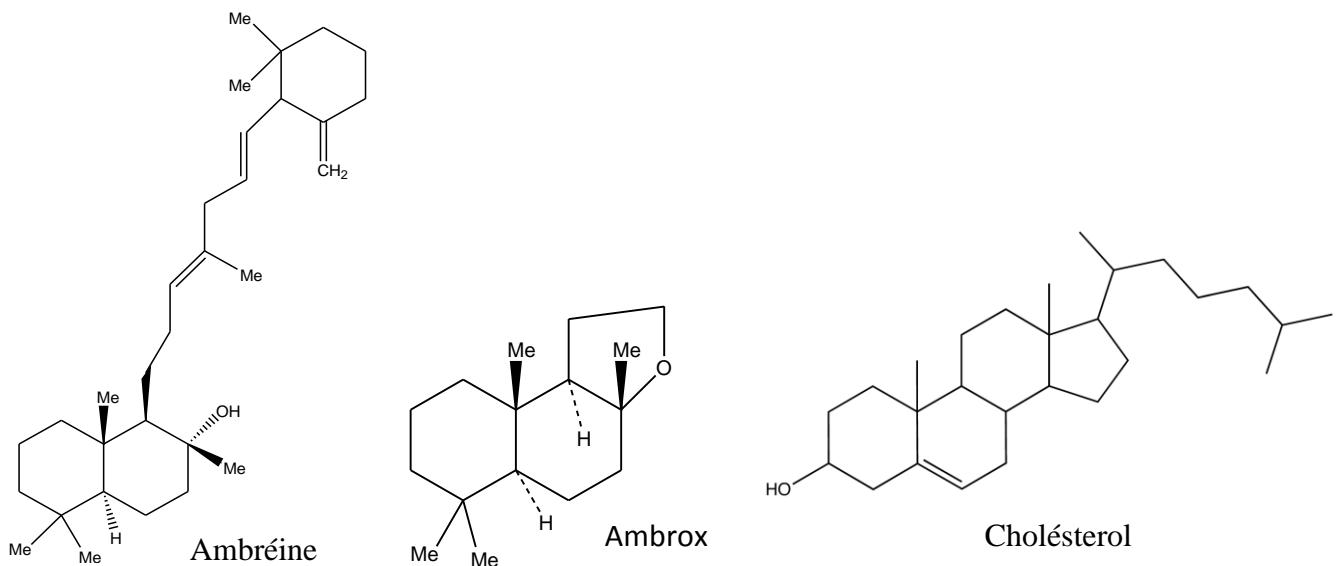


Figure 21 : Exemple de composition de l'ambre gris

Utilisations:

L'ambre gris a été l'un des matériaux les plus utilisés comme bon fixateur en parfumerie [49], en médecine pour traiter les migraines, les rhumatismes et des maladies nerveuses. Il a des vertus anti-inflammatoires et des propriétés aphrodisiaques [14].

Répartition Géographique :

On trouve l'ambre gris sur les côtes de la Nouvelle-Zélande, de l'Est de l'Inde, de l'Afrique de l'Est et du Sud, de Madagascar, du Brésil et de la Norvège, entre autres, après qu'il ait flotté plus ou moins longuement sur la mer, grâce à sa faible densité [19].

I-5-Huiles essentielles de résines:

I-5-1-Notion générale sur l'huile essentielle :

Définition

La norme AFNOR NF'T 75-006 définit l'huile essentielle comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » [1].

Il existe un grand nombre d'huiles essentielles connues dans le monde. Les huiles volatiles sont des produits odorants issus de diverses espèces végétales et animales. Elles ont tendance à s'évaporer par exposition à l'air, même à une température ambiante. Elles sont principalement les produits responsables de l'odeur ou «essence» des plantes aromatiques utilisées dans les arômes en agroalimentaire et en parfumerie.

Dans la plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), fruits (badiane) ou graines (carvi), et dans les résines (myrrhe, oliban) [8].

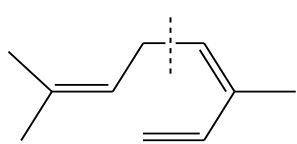
Composition chimiques

Du point de vue chimique, les huiles essentielles représentent un groupe très hétérogène. On y trouve divers composés représentant différentes fonctions (hydrocarbures, alcools, cétones, aldehydes, acides et esters). Ces composés appartiennent à une classe des produits nommée terpènes ou terpènoïdes. La majorité de ces constituants sont les monoterpènes, les sesquiterpènes et diterpènes.

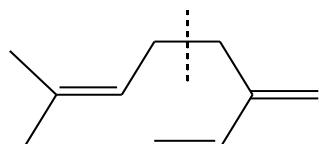
Notions sur les monoterpènes:

Ils comportent 10 atomes de carbone, et sont issus des couplages en "tête à queue" de deux unités isopréniques, et ont pour formule de base $(C_5H_x)_2$. Ils peuvent être linéaires ou cycliques : la présence d'atomes d'oxygène n'est pas exclue [48].

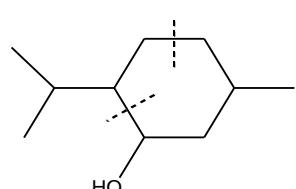
La figure 22 présente des exemples de structures.



ocimène (basilic)



Myrcène (laurier)



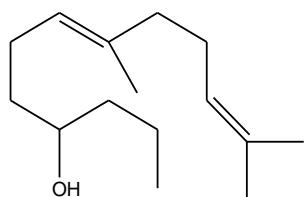
Limonène (citron)

Figure 22: Exemples de structures de monoterpènes

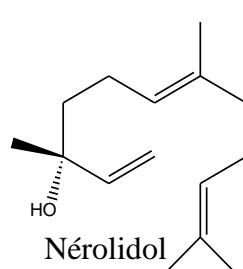
Notions sur les sesquiterpènes :

De formule moléculaire $C_{15}H_{24}$. Ce sont des composés de 15 carbones formés de 3 unités isopréniques. Comme les monoterpènes, elles peuvent être acyclique ou contenir 1 à 2 cycles. De nombreuses combinaisons sont possibles. Les dérivés des sesquiterpènes obtenus par biosynthèse ou synthèse (oxydation ou réarrangement) sont appelés sesquiterpenoïdes [6].

Des exemples sont rapportés sur la figure 23.



Farnésol



Nérolidol

Figure 23 : Exemples de structures de Sesquiterpènes

I-5-2-Huile essentielle de l'Oliban :

Par combustion de l'Oliban, on obtient une odeur agréable et forte. L'extraction alcoolique de la résine donne l'absolu. Les HE sont obtenues par distillation et les résinoïdes par extraction à l'hexane.

I-5-2-1 Exemple de biochimie aromatique de l'oliban

L'oliban de *Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr. contient 65% de résine, 30% de gomme et 4% d'huile. L'absolu contient des monoterpènes (α -pinène, limonène, β -thuyène, phellandrène, paracymène, verbénol, verbénone) et des diterpènes (oxyde d'incensole). Les acides boswelliques de la résine possèdent par ailleurs d'excellentes propriétés anti-inflammatoires [25].

I-5-2-2 Exemples d'applications en parfumerie :

« Coco » de Chanel (1984) ; « Loulou » de Cacharel (1987) ; « Shalimar » de Guerlain (1925) ; « Gems » de Van Cleef ; « Mania » de Giorgio Armani (2000) ; « Nu » d'YSL (2001) [25].

I-5-3-Huile essentielle de la myrrhe

En parfumerie, la myrrhe donne des résinoïdes brun rouge à odeur chaude, épicée, balsamique, à goût amer. Elle sert en parfumerie comme fixatif et l'huile donne une note orientale florale. L'essence de myrrhe obtenue par distillation est un des composants de base des parfums de type oriental, en association avec l'encens, l'opopanax et le santal [41].

I-5-3-1 Exemple de biochimie aromatique de la myrrhe :

La fraction d'huile volatile contient différents terpènes, sesquiterpènes, des esters, de l'élémol, du cinnamaldéhyde, Cuminaldéhyde, cumicalcohol, de l'eugénol, du herabolene, du limonène, dipentène, pinène, du m-crésol, cadinène et furanosesquiterpene numereous, du myrcène et de l' α - camphorarene; stéroïdes y compris le Z-guggulsterol, et des I, II, III guggulsterols [16] [25].

I-5-3-2 Exemples d'applications en parfumerie:

« Portos » de Balenciaga ; « Opium » d'YSL(1977) ; « La Myrrhe » des SPRS (1995) ; « Vetiver Extraordinaire » de Dominique Ropion aux éditions de Parfums Frédéric Malle (2002) [25].

I-5-4-Huile essentielle d'autres résines

D'autres résines peuvent procurer de l'huile essentielle, comme en exemples:

- La résine de Capaiba provenant du *Copaifera* (Copaiba) appartenant à la famille: Légumineuses [4].

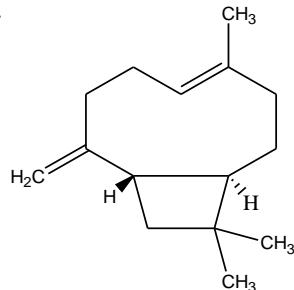


Figure 24 : Caryophyllène (constituant majoritaire dans HE de Capaiba)

- La résine de Térébenthine provenant du *Pinus Palustris* et de Miller d'autres espèces de *Pinus*, appartenant à l'ordre naturel Pinaceae [4].

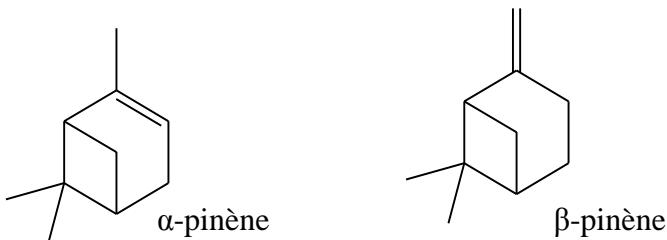


Figure 25 : Constituants majoritaire dans HE de Térébenthine

I-6-Généralités sur les méthodes chromatographiques et spectrales utilisées

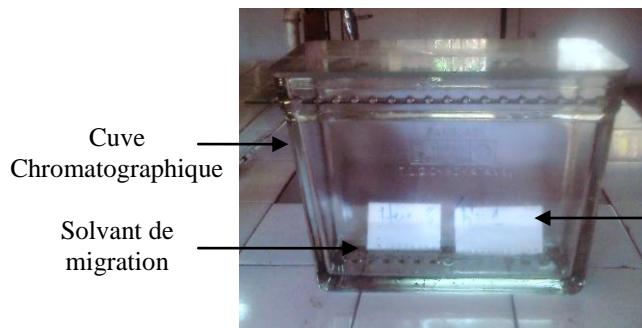
I-6-1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une méthode basée principalement sur les phénomènes d'adsorption (sur gel de silice ou sur silice greffée), elle s'apparente étroitement à la chromatographie sur colonne au niveau des phases impliquées et du mécanisme mis en œuvre pour la séparation [23].

Chaque constituant migre à une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on peut caractériser par le rapport frontal, R_f (ou rétention frontale, coefficient de migration) :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

La figure ci-dessous montre comment calculer le R_f :



Photographie 1 : Développement chromatographique d'une plaque

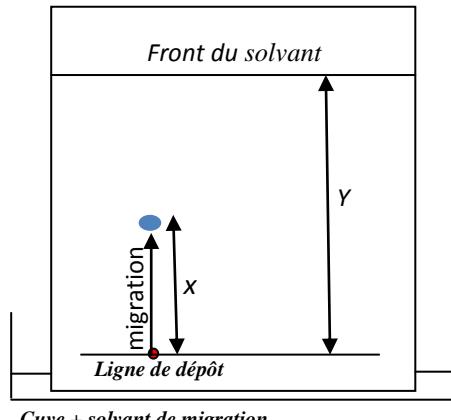


Figure 26 : Migration du dépôt

Le rapport frontal est donc égal à : $R_f = \frac{x}{y}$ ($R_f < 1$)

I-6-2 Chromatographie sur colonne :

C'est une technique chromatographique préparative pouvant se baser sur le phénomène d'adsorption, d'exclusion ou d'échange d'ion selon la phase stationnaire qui est placée dans la colonne [18].

La chromatographie sur colonne est une méthode standard de purification en chimie organique, elle sert à séparer les constituants d'un échantillon (fractionnement ou purification de produits naturels ou de produits de réaction).

I-6-3 Techniques d'analyses structurales des produits isolés

Diverses techniques spectrales (ou spectroscopiques), utilisées seule ou en combinaison avec des méthodes chromatographiques ont été mises à profit dans le présent travail.

Les analyses de l'échantillon par CPG-SM et RMN ont été réalisées au Laboratoire de Pharmacognosie à l'Université de Rouen.

I-6-3-1 Couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (CPG-SM)

➤ *Principe de la CPG*

Cette technique est utilisée pour séparer les constituants d'un mélange de gaz ou de liquide volatil (huile essentielle, résines, fractions légères des raffineries de pétrole...). Elle a plusieurs applications : vérification de la pureté d'un produit, identification d'une substance, contrôle qualité (médicament, huile essentielle, pesticides, aliments,...) et dosages diverses [24].

Appareillage: un chromatographe en phase gazeuse comprend 5 grandes parties :

- Gaz vecteur (hélium, azote, argon, hydrogène) et régulateur de débit (phase mobile)
- Chambre d'injection pour l'introduction de l'échantillon
- Four à colonne portant la colonne à la température et à la pression convenable
- Colonne : tube contenant la phase stationnaire : généralement, on utilise des colonnes capillaires (colonne très long et très mince : diamètre interne 0,05 à 0,35mm ; longueur 10 à 100m)
- Détecteur et enregistreur

➤ *Principe de la CPG-SM*

Cette technique permet de façon précise l'identification des molécules d'un mélange volatil. Le détecteur utilisé est un spectromètre de masse. Sortis de la colonne de CPG, les composés sont introduits dans une chambre d'ionisation où les molécules sont bombardées par des électrons pour donner des fragments caractéristiques. Les fragments obtenus sont enregistrés sous forme de spectres de masse [24].

Les données spectrales peuvent être comparées avec des spectres de composés connus : si les deux échantillons sont un seul et même produit, leurs spectres seront superposables.

I-6-3-2 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et méthode d'interprétation

La spectroscopie de RMN basée sur les propriétés de certains noyaux atomiques constitue un outil performant pour établir une hypothèse de structure moléculaire fiable. Seuls les noyaux de $I \neq 0$ donnent des spectres de RMN. Parmi eux figurent le proton (^1H), le carbone (^{13}C), l'azote (^{15}N) et le phosphore (^{31}P). La méthode de RMN repose sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux cités précédemment possèdent un moment magnétique nucléaire. Ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée «*spin*». La technique étudie le comportement de ces noyaux en présence d'un champ magnétique externe. Ce dernier appliqué au produit analysé entraîne un dédoublement de niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, après absorption d'une radiation électromagnétique adéquate. On obtient ainsi des signaux (FID) dont le traitement par une transformation de Fourier conduit au graphe appelé «*spectre de RMN*» [21].

Les ^1H (ou les ^{13}C) sont caractérisés sur le spectre par leurs déplacement chimique δ (exprimés en ppm ou partie par million). Cette grandeur est liée à l'environnement chimique du noyau considéré dans la molécule. Des valeurs de δ pour différents types de protons ou carbones sont rassemblées dans des tables dites de références [21].

Plusieurs types d'expériences sont utilisés en RMN. Dans le présent travail, les produits ont été analysés en RMN monodimensionnel (^1H , ^{13}C et DEPT) et en RMN bidimensionnel (HMQC).

I-7 Etude des produits volatils de l'échantillon

I-7-1 Extraction par hydrodistillation

L'obtention de l'huile essentielle par hydrodistillation, a été réalisée à l'aide d'un essencier de type Clevenger. L'échantillon finement broyé est placé dans un ballon de 2l et immergé dans 1l d'eau ; quelques grains de pierre ponce ont y été ajoutés. L'ensemble est porté à l'ébullition. On note le volume cumulé d'HE en fonction du temps.

I-7-2 Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse (CPG/FID) et méthode d'interprétation :

La Chromatographie en phase gazeuse (CPG) a été la méthode utilisée pour l'analyse de l'huile essentielle. Elle permet de déterminer sa composition qualitative et quantitative.

Dans le présent travail, l'identité des constituants majoritaires a été fixée par la méthode de calcul des Indices de Kovats. L'indice est calculé sur la base des temps de rétention obtenus à partir du chromatogramme de l'HE totale et de celui de paraffines de références [15].

En programmation de température, l'indice de Kovats est calculé suivant la formule :

$$IK = 100n + \left(100 \times \frac{T_x - T_n}{T_{n+1} - T_n} \right)$$

IK : Indice de Kovats

T_x : Temps de rétention du composé « x » étudié

T_n : Temps de rétention de la paraffine à « n » atomes de carbones, précédant immédiatement le composé étudié

T_{n+1} : Temps de rétention de la paraffine à « n+1 » atomes de carbones, suivant immédiatement le composé étudié

n : Nombre de carbone de la paraffine précédant immédiatement le composé étudié

Conclusion partielle

On note une confusion dans les compositions, aspects et noms de certaines résines d'origines animales et végétales. Des études chimiques sont alors nécessaires pour les spécifier. Généralement, elles sont constituées par des composés terpéniques.

Les terpènes sont des métabolites secondaires des végétaux, pouvant avoir des rôles importants pour l'être humain. Ces molécules sont utilisées dans le domaine thérapeutique, en parfumerie et en agroalimentaire comme condiment.

Ainsi, par référence aux données bibliographiques sur les utilisations et les valeurs des résines végétales ou animales, le présent travail a été fixé sur l'étude chimique d'une résine collectée sur la côte Ouest de Madagascar.

PARTIE 2

MATERIELS ET METHODES

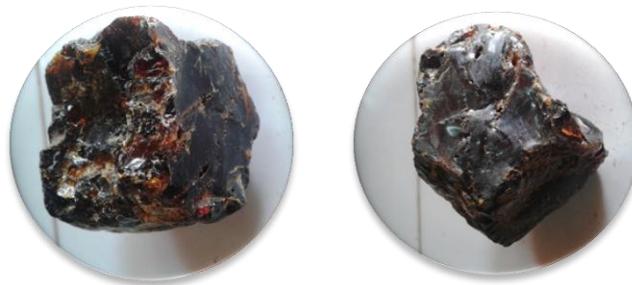
II-1 Choix de l'échantillon et stratégie d'étude

II-1-1- Echantillons à étudier

L'échantillon, codé A12 a été choisi après les résultats de son analyse par CCM qui a révélé la présence de nombreux composés séparables sur silice.

Caractéristiques généraux de l'échantillon à étudier :

La matière à étudier est un bloc de résine de couleur brun noir d'aspect goudronné avec une odeur caractéristique d'hydrocarbure.



Photographie 2: Echantillon du produit à étudier
A12

II-1-2- Matériels de laboratoires utilisés

Tableau 2 : Les matériels de laboratoires utilisés au cours de ce travail

Verreries de laboratoire	Pipettes pasteur, pipettes jaugées, tubes à essais éprouvettes graduées, cristallisoirs, flacons, erlenmeyers, entonnoirs, ballons à fond rond, colonnes, cuves chromatographiques (rectangulaire), mortier et pilon en céramique
Matériels d'analyses	Plaque CCM : plaques CCM ALUGRAM SIL G/UV ₂₅₄ ; couche : 0,20mm/gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence UV ₂₅₄ . Colonne <ul style="list-style-type: none">- Colonne de verre de longueur 60cm et de diamètre interne 3,5cm- Colonne de verre de longueur 35cm et de diamètre interne 1cm adsorbants : gel de silice (silicagel 60A 200micron)
Appareils	<ul style="list-style-type: none">- Balance de précision (Mettler AM100)- Evaporateur rotatif (BUCHI R-210 Waterbath B-180)- Lampe UV SPECTROLINE $\lambda = 254\text{nm}$- Pulvérisateur- Pistolet chauffante

II-1-3- Stratégie de recherche adoptée

Avant l'étude chimique de l'échantillon, des tests physiques ont été effectués.

L'échantillon a été divisé en 2 lots :

- L'un réservé pour l'analyse des composés non-volatiles
- Et l'autre pour celle des produits volatils

Dans le cas des produits non volatiles, deux extraits ont été préparé destinés respectivement : au criblage et à l'isolement.

II-2- Tests préliminaires

II-2-1-Tests physiques

Ces tests consistent à :

- frotter l'échantillon avec un chiffon pour voir s'il possède une force électrostatique,
- vérifier s'il est soluble dans l'eau,
- et à le brûler.

II-2-2 Mise au point de technique d'extraction et recherche de solvants chromatographiques :

Cette partie consiste à trouver le meilleur solvant permettant d'extraire le maximum des composés contenus dans l'échantillon.

Tous les essais d'extraction ont été réalisés par macération à température ambiante.

1^{er}essai d'extraction : extraction brute

0,2 g de l'échantillon sont finement broyés à l'aide d'un mortier et pilon en céramique.

La poudre obtenue est macérée avec un système de solvant DCM/Methanol (50/50 ; V/V), à température ambiante. La macération a duré 3 jours.

2^{ème}essai d'extraction : épuisement successif avec des solvants de polarité croissante : Hexane, DCM.

0,4 g de l'échantillon sont finement broyés. La poudre est macérée de l'Hexane par fractionnement de 30ml jusqu'à épuisement. Le surnageant est transvasé à chaque fois dans un autre tube. La même opération est effectuée avec du DCM.

Chaque extrait obtenu a été soumis à des CCM avec des éluant différents afin d'évaluer les résultats d'extraction selon la variation du solvant et d'en trouver le meilleur éluant qui permet de bien séparer les différents constituants

Éluants utilisés : AcOEt/Hexane (60/40, v/v)

AcOEt/Hexane (40/60, v/v)

Hexane/DCM (80/20, v/v)

II-2-3-CCM préliminaires :

Il s'agit de déposer un volume déterminé de l'extrait de l'échantillon à étudier sur une plaque de silice avec des témoins stéroïdes : cholestérol, stigmastérol et ergostérol. Le cholestérol est un produit spécifique pour l'ambre gris. [19]

- **Eluants utilisés** : Hexane/ DCM (90/10, v/v) et Hexane/ DCM (80/20, v/v)
- Hauteur de Plaque** : 8 cm
- Les dépôts sont espacés de 1 cm
- **Phase stationnaire** : silicagel (phase normale)

Système de révélation :

- Visualisation de la plaque CCM sous UV 254 nm
- Puis pulvérisation de la plaque CCM avec une solution de vanilline perchlorique sulfurique suivie directement de chauffage.

II-2-4Criblage des triterpènes et stéroïdes

Ces tests sont généralement basés sur des réactions de précipitation et/ou de coloration spécifiques à chaque classe.

0,25g de l'échantillon a été dissout directement dans 12ml de chloroforme. L'extrait est réparti dans six tubes à essais dont le premier sert de témoin et les autres sont testés selon les méthodes décrites dans le tableau 3 :

Tableau 3: Réactifs et résultats attendus du criblage des triterpènes et stéroïdes

nº du tube	Nom du test	Réactif additionné	Résultats attendus
2	Liebermann Burchard [42]	4 gouttes d'anhydride acétique et 4 gouttes d'acide sulfurique concentré	Coloration : Pourpre : présence de triterpènes Bleu vert : présence de stéroïdes
3	Salkowsky [9]	1ml d'acide sulfurique concentré (tube incliné à 45°)	Anneau de séparation rouge : présence de stérols insaturés
4	Badjet[9]	4 gouttes de solution aqueuse d'acide picrique 1% 4 gouttes de solution aqueuse de soude 20%	Coloration orange : présence de stéroïdes lactoniques
5	Kedde[9]	4gouttes d'une solution méthanolique d'acide 3,5-dinitrobenzoïque 2% 1ml d'une solution aqueuse de KOH6%	Coloration rouge : présence de stéroïdes lactoniques

II-2-5 Techniques d'extraction et d'isolement des constituants non volatils

Extraction dans le DCM

Selon les résultats des études préliminaires qui seront présentés dans la partie ci-après, l'extraction par le DCM a été retenue.

II-2-6 Fractionnement de l'extrait :

Au vu des résultats de la CCM préliminaire, la technique de chromatographie sur colonne de silice en phase normale peut être adoptée pour le fractionnement et la purification de l'extrait de l'échantillon.

II-2-6-1 Préparation de la colonne

Le choix de la taille de la colonne dépend de la masse de l'échantillon à fractionner. Ainsi, le rapport 1/40 a été exploité : longueur de la colonne = 60cm, le diamètre = 3,5 cm, la phase stationnaire est le gel de silice 60 dont la masse est de 80g.

La méthode de la colonne humide a été mise à profit. La colonne est préalablement remplie à moitié par le premier solvant d'élution. Puis on verse, en plusieurs fois, le mélange de gel de silice/solvant de départ et jusqu'à stabilisation.

II-2-6-2 Préparation du dépôt:

Environ 2,05g de poudre de l'échantillon sont solubilisées dans le DCM à température ambiante pendant 15 minutes.

5g de silice sont ajoutés dans l'extrait de dichlorométhane, l'évaporation à sec de ce mélange a conduit à un résidu qui est ensuite broyé jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine. La poudre est versée délicatement dans la colonne.

Une hauteur de solvant de 15cm environ au-dessus de l'adsorbant est nécessaire pour éviter le contact de ce dernier avec l'air.

II-2-6-3 Elution

Des gradients de solvants de polarités croissantes ont été utilisés Hexane / DCM (100 /0 à 0 /100, V/V), ensuite par le DCM/Méthanol (100/0 à 98,5/1,5, V/V), de façon à accélérer le déplacement des analytes. Les molécules sont entraînées à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité. Des fractions de 20ml ont été recueillies.

Des CCM sont effectuées sur les fractions recueillies pour comparer leurs constituants et évaluer le nombre de constituants de chaque fraction : celles ayant le même profil chromatographique ont été regroupées.

Les groupes contenant les produits majoritaires sont soumis à une deuxième chromatographie sur colonne (hauteur 35cm, diamètre 1cm). Le gel de silice employé a une masse proportionnelle à celle du groupe à purifier. L'élution est effectuée avec du solvant de système isocratique pour chacun des groupes concernés.

Les produits isolés sont ensuite analysés par les différents méthodes spectroscopiques afin d'établir leurs structures.

II-3- Techniques d'analyses spectrales des produits isolés pour leurs déterminations structurales

II-3-1-Analyse des produits résineux par couplage CPG/SM

L'appareillage est composé d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 équipé d'une colonne capillaire à silice fondue Optima 5 (diamètre interne 60 m x 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 µm), directement lié à un spectromètre de masse Hewlett-Packard 5973.

Le produit est dissout dans du dichlorométhane : un volume de 1 à 1,5 µl de solution est injecté. Le gaz vecteur est l'hélium, le débit a été régularisé en mode split à 20 ml/min. La température varie entre 60 °C et 280 °C avec une vitesse de 3 °C/min. La température finale est maintenue pendant 20 min. Les spectres de masse sont obtenus en mode impact électronique à 70 eV et par PCI utilisant comme gaz d'ionisation le méthane. L'appareil est piloté par un système informatique HPCHEM.

Les composés sont identifiés par comparaison des indices de rétention et des spectres de masse avec les données de la littérature (librairie informatique Wiley 275 et NIST 98, documents Adams et Davies)

II-3-2-Analyse des produits résineux par RMN

Un appareil Bruker Avance 400 a été utilisé pour l'enregistrement des spectres RMN ^1H , des spectres RMN ^{13}C et DEPT 1D et le traitement des spectres par les logiciels TOPSPIN-NMR, MESTRENOVA

II-4-Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse (GC/FID) et méthode d'interprétation :

Les étapes suivantes sont respectées :

- Préparation de l'échantillon, 0,2 μl de l'huile essentielle pure a été dissoute dans 100 μl d'hexane. 0,05 μl de cette solution a été injectée. On obtient le chromatogramme A de l'HE pure.
- Préparation du mélange d'alcanes de référence, 0,2 μl de chaque alcane est dissout dans 100 μl d'hexane.
- Pour la coïnjection, dans une même seringue, nous avons introduit 0,05 μl du mélange d'alcanes (C10 à C20) et 0,05 μl de la solution d'HE à 2%. Après injection, on obtient le chromatogramme B du mélange HE et d'alcanes.

Les IK des quatre composés majoritaires de l'huile essentielle ont été calculés et comparés aux valeurs données par la littérature.

L'appareillage utilisé est un chromatographe en Phase Gazeuse de type Perkin Elmer Clarus580 dont les conditions d'analyses sont :

Colonne capillaire	: OV 101
Gaz vecteur	: Hélium
Elévation de température	: 2°C/mn
Température de l'injecteur	: 230°C
Mode d'injection	: Split 1/20
Température du détecteur FID	: 250°C

Conclusion partielle

Pour déterminer la composition chimique de l'échantillon étudiée et afin de caractériser sa nature, plusieurs étapes ont été suivies et diverses techniques appliquées. Le criblage a servi à détecter les familles chimiques susceptibles d'être présent dans l'échantillon. Les analyses par CCM d'extraits dans des divers solvants ont permis d'avoir une idée sur les profils des composés à isoler et de sélectionner ainsi pour l'étude l'extrait dichlorométhanique. Un fractionnement de ce dernier, puis l'isolement et la purification des composés par chromatographie sur colonne en phase normale, sont entrepris. Ces produits purifiés ont été ensuite analysés par CPG/SM et par RMN.

L'extraction de l'huile essentielle de cet échantillon a été aussi réalisée afin de confirmer sa nature.

PARTIE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1-Résultats des tests physiques

L'échantillon est insoluble dans l'eau.

Après avoir frotté l'échantillon avec un chiffon et testé sur un corps léger (papier) on a pu constater qu'il s'agissait d'un mauvais conducteur d'électricité.

A la chaleur, l'échantillon se ramollissait, puis fondait.

En brûlant dans l'air, il donne une flamme fuligineuse et exhale une odeur « d'encens ».

D'après ces résultats et en se référant à la littérature on peut déduire que l'échantillon est une résine différente de l'ambre jaune. Toutefois, seules les analyses chimiques pouvaient confirmer cette hypothèse.

III-2-Résultats des extractions par solvants

III-2-1-Rendements d'extractions obtenues des solvants variés

Les tableaux 4 et 5, résument les résultats des essais par divers solvants et de méthodes différentes.

Tableau 4:Résultats du 1^{er} essai d'extraction (extraction brute)

Prise d'essai (g)	Solvant d'extraction	Couleur de la solution	Durée d'extraction	Masse extraite (g)	Masse de résidu (g)	Rendement d'extraction (%)
0,2	DCM/MeOH (50/50 ; V/V) 5ml	Brun Marron	3jours	0,12	0,08	60
0,08g (le résidu)	DCM10ml	Marron	24h	0,08	0	100

Tableau 5:Résultats du 2^{ère} essai d'extraction (épuisement successif par l'Hexane, le DCM)

Prise d'essai (g)	Solvant d'extraction	Couleur de la solution	Durée d'extraction	Masse extraite (g)	Masse de résidu (g)	Rendement d'extraction (%)
0,4	Hexane 10ml	Brun jaune	2jours	0,23	0,17	57,5
0,17g (le résidu)	DCM 10ml	Marron	24h	0,17	0	100

On peut déduire qu'il existe des produits insolubles dans l'hexane et dans le DCM /Methanol (50/50, v/v). Mais dans les deux cas, le résidu était complètement dissout dans le DCM. L'extraction avec le DCM a été le plus rentable. Ainsi, un essai d'extraction directe au DCM a été effectué. Il y a dissolution de l'échantillon et la masse du résidu sous forme de précipité noir est négligeable.

Les résultats obtenus sont rapportés sur le tableau 6.

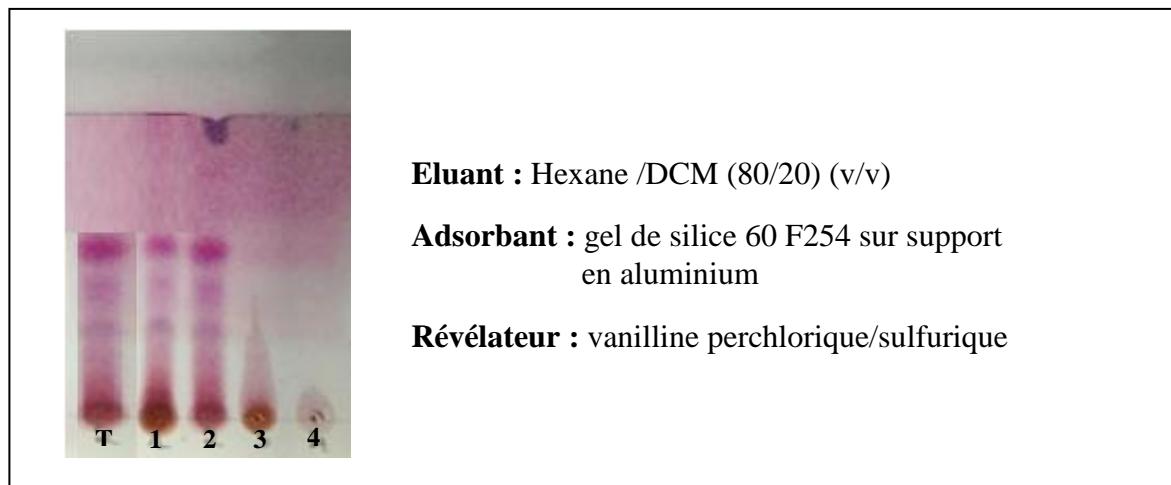
Tableau 6 : Résultats de l'extraction au DCM

Masse d'échantillon (g)	Solvant de solubilisation	Couleur de la solution	Durée d'extraction	Masse extraite (g)	Masse de résidu (g)	Rendement d'extraction (%)
2,05	DCM	Marron	15mn	2,047	0,03	99,85

Durant les essais d'extractions effectuées on a pu constater qu'un contact avec l'air atmosphérique solubilisaient rapidement les extraits : il est alors difficile de faire une filtration.

III-2-2 Résultats de la CCM de divers extraits

L'extrait d'A12 a été analysé en CCM en même temps que ceux obtenus dans le DCM/Méthanol et dans l'Hexane.



Photographie3: Chromatogramme en CCM de chaque extrait de A12

Echantillons déposés = T- Témoin A12, solubilisé dans le DCM

1- extrait DCM/Methanol ;

2- extrait hexane ;

3- résidu (après épuisement par Hexane), solubilisé dans le DCM

4- résidu (après épuisement par DCM/Methanol), solubilisé dans le DCM

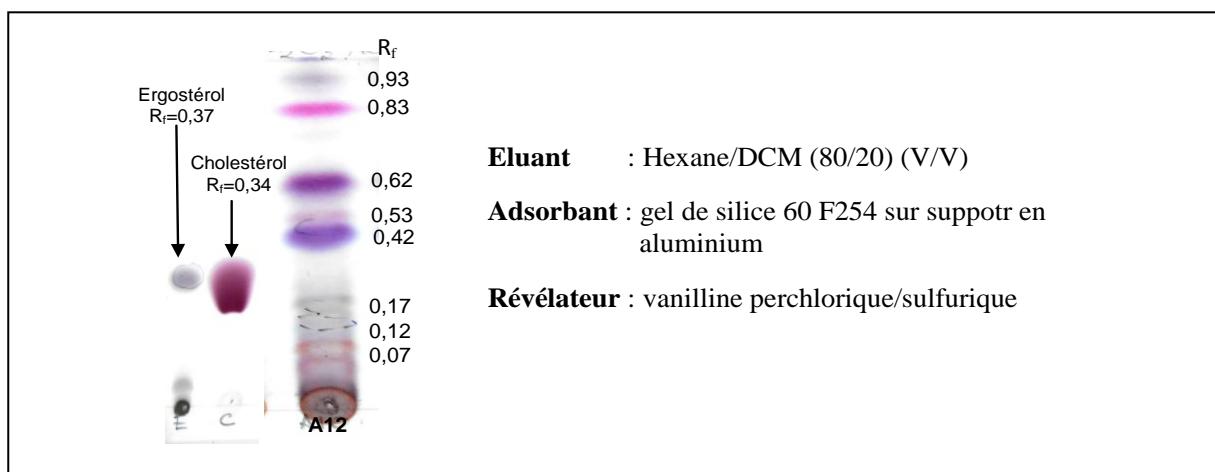
Interprétations des résultats :

L'extrait hexanique et l'extrait DCM/Methanol contiennent l'ensemble des constituants. Mais travailler avec l'extrait de dichlorométhane a été retenu, puisque l'échantillon a été totalement dissout dans le DCM.

III-2- 3-Résultats de la CCM de l'extrait DCM

Afin de vérifier si l'échantillon possédait les caractéristiques des constituants de l'ambre gris parmi lesquels figuraient les stéroïdes du cholestérol et de l'ergostérol, produits à notre disposition, étaient considérés comme témoins. Le cholestérol est spécifique de l'ambre gris.

La photographie 4 montre le chromatogramme obtenu.



Ainsi, l'échantillon présent 8 produits majoritaires : le cholestérol est absent. Ce constat permet d'envisager que l'échantillon n'est pas un ambre gris.

III-2-4-Résultats du criblage des triterpènes et stéroïdes

Pour s'assurer de l'absence des stéroïdes dans l'échantillon, un criblage de ces composés a été effectué. Dans le test correspondant, le criblage des triterpènes est fait en même temps. Le tableau 10 rapporte les résultats obtenus.

Tableau 7: Résultats du criblage des triterpènes et stéroïdes

n° du tube	Nom du test	Réactif utilisé	Résultats
2	Liebermann Burchard	Anhydride acétique et H_2SO_4	<i>Pourpre</i> : (++) présence de triterpènes <i>Bleu vert</i> : (-) absence de stéroïdes
3	Salkowsky	H_2SO_4 (tube incliné à 45°)	-
4	Badjet	Solution aqueuse d'acide picrique 1% et Solution aqueuse de soude 20%	-
5	Kedde	Solution méthanolique d'acide 3,5-dinitrobenzoïque 2% Et solution aqueuse de KOH 6%	-

Les résultats confirment l'absence des stéroïdes. Une forte présence de triterpènes est constatée.

III-2-5-Fractionnement de l'extrait

Le diagramme de la figure 27 résume le protocole d'extraction et d'isolement des composés de l'échantillon.

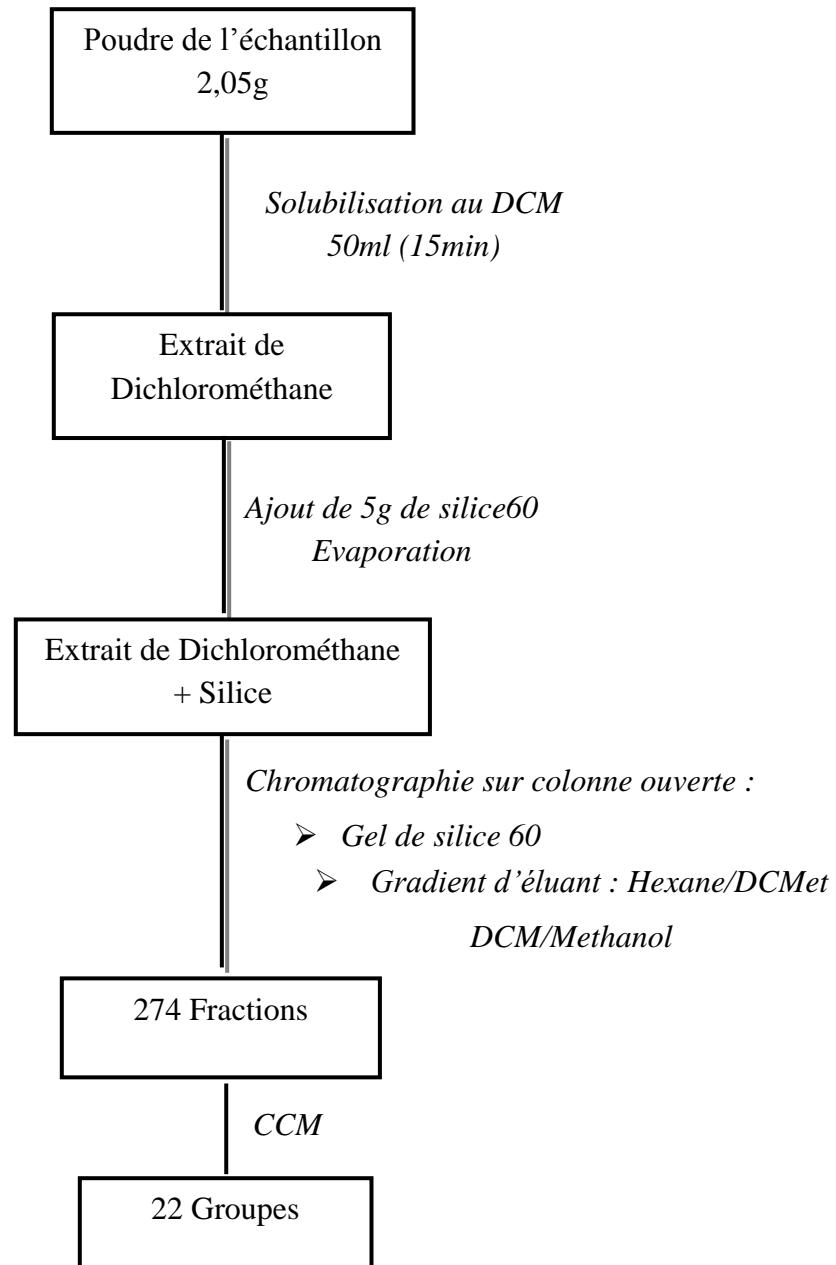
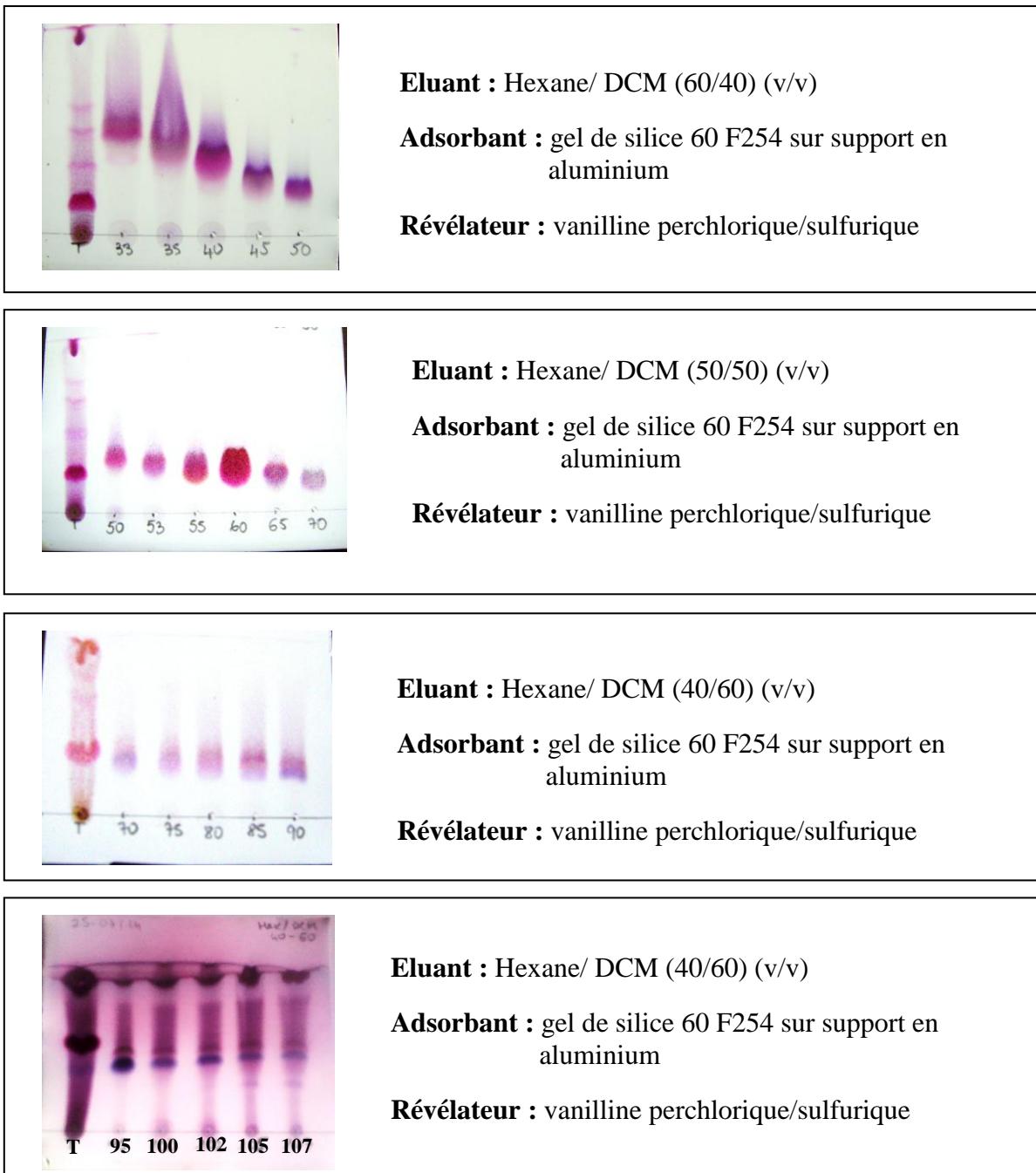


Figure 27 : Récapitulation du protocole d'extraction et d'isolement du produit A12

Les 274 fractions collectées, toutes incolores, ont été contrôlée par chromatographie sur couche mince.

Les chromatogrammes sont ensuite observées sous UV 254nm suivies puis révélées au réactif de la vanilline perchlorique/sulfurique. On chauffe à 60°C pendant 1 minute pour évaluer les profils.

Les plaques chromatographiques de ces fractions sont représentées sur la photographie 5 :



Photographie 5 : chromatogramme en CCM des fractions après révélation avec vanilline perchlorique sulfurique

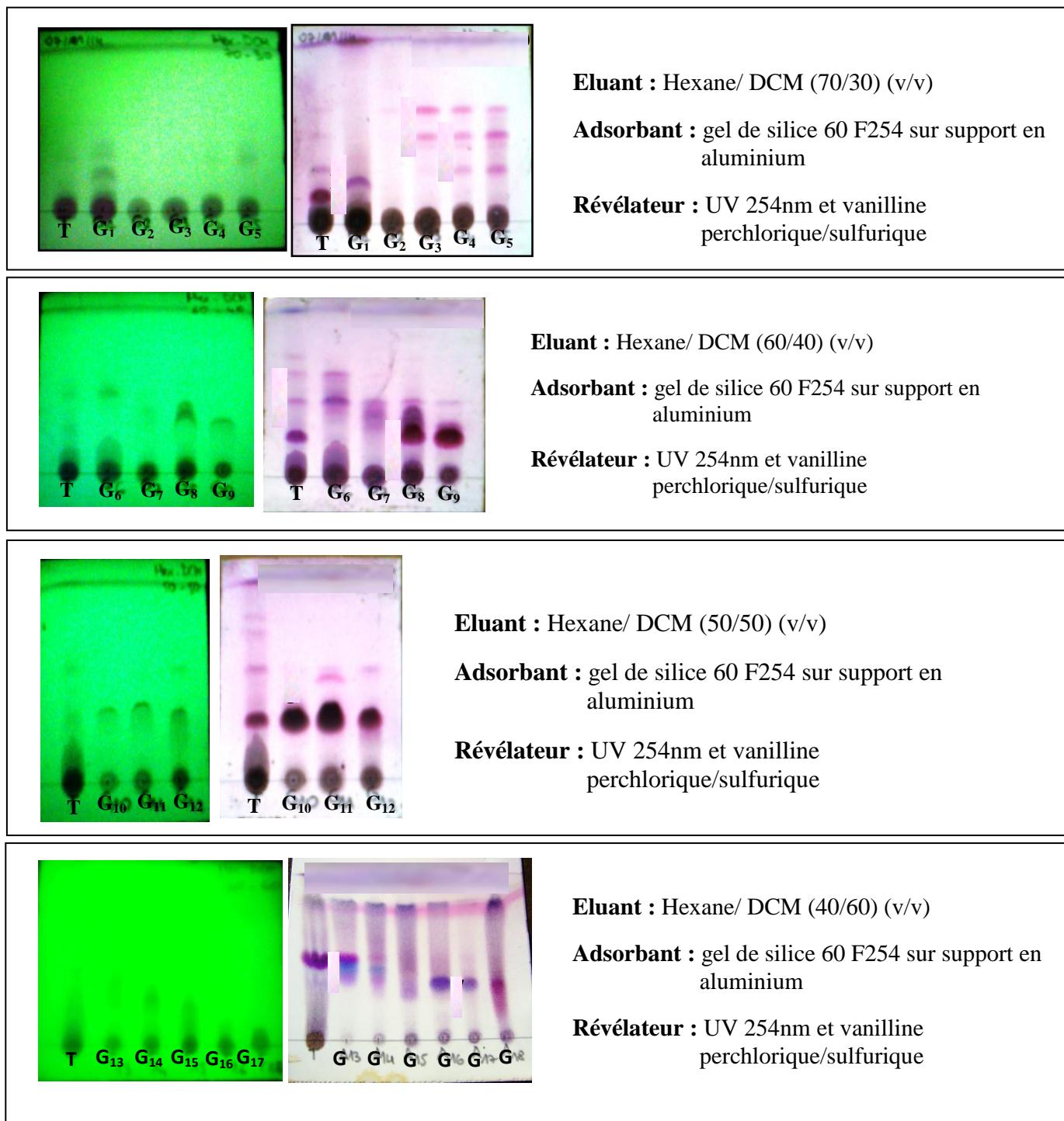
Les produits dont les taches de même R_f sont rassemblés. Les résultats sont reportés dans le tableau 10 :

Tableau 8: Récapitulation de la colonne

N° du groupe	Phase mobile	Volume utilisé (ml)	Fractions	Masse (mg)	Rendement (%)	Aspect physique
G ₁	Hexane 100%	200	1-15	106,4	5,10	Huileux incolore
G ₂	Hex-DCM 90-10	-	16-20	43,1	2,10	-
G ₃	80-20	200	21-25	19,73	0,96	-
G ₄			26-29	51	2,48	-
G ₅	70-30	500	30-33	35,1	1,71	Huileux et cristaux blanc
G ₆			34-40	107,6	5,24	-
G ₇			41-45	44,2	2,15	-
G ₈			46-50	30,9	1,50	-
G ₉			51-52	13,07	0,63	-
G ₁₀	60-40	900	53-56	71,5	3,48	Cristaux blanc
G ₁₁			57-60	190,79	9,30	Huileux brun claire
G ₁₂			61-64	81,9	3,99	-
G ₁₃			65-70	33,5	1,63	-
G ₁₄			71-85	41,79	2,03	-
G ₁₅			86-90	10,83	0,53	-
G ₁₆			91-94	8,7	0,42	-
G ₁₇	50-50	300	95-102	103,9	5,06	Huileux incolore
G ₁₈	40-60	200	103-120	61,69	3	Huileux brun foncé
G ₁₉	30-70 et 20-80	400	121-135	141,2	0,88	-
G ₂₀	10-90 et DCM100%	-	136-151	44,6	2,17	-
G ₂₁	DCM-MeOH0,1% à 1,5% puis MeOH100%	2200	152-256	74	3,6	Huileux marron
G ₂₂			257-274	602,7	29,4	-

22 groupes de produits ont été obtenus. Comme l'objectif de ce travail a été d'isoler les composés majoritaires, des CCM de vérification ont été nécessaires afin d'évaluer la pureté des produits.

Les chromatogrammes en CCM de 18 groupes sont figurés sur la photographie 6 : les 4 derniers groupes ne donnaient que des trainées.



Photographie 6 : Chromatogramme en CCM récapitulatives de la colonne après observation sous UV 254nm et après révélation avec vanilline perchlorique sulfurique

Interprétation des résultats des CCM :

A l'observation des chromatogrammes on remarque que :

- **G₁**peu polaire avait des taches de coloration violette après révélation à la vanilline perchlorique sulfurique.
- **G₃ à G₁₂**, ont donné des taches violettes, de composé moyennement polaire. Mais :
 - ✚ **G₄ à G₅**avaient des produits de même R_f et ont été rassemblés,
 - ✚ **G₆**entretenait 2 produits
 - ✚ **G₁₀et G₁₁**apparaissaient chacun en monotache, de même R_f.
- **G₁₇** présentait une tache unique de couleur violette. On peut supposer que c'est un produit pur.

Tableau 9 : Description et R_f des produits

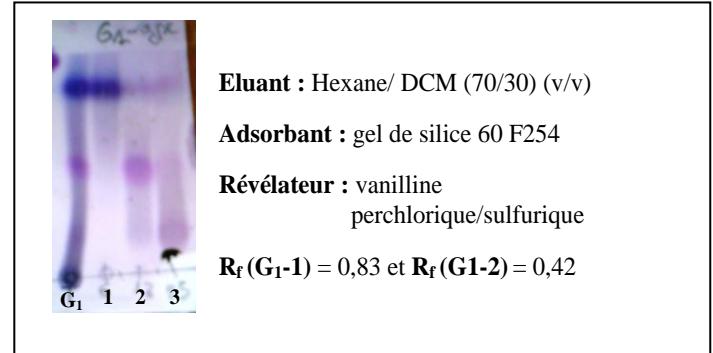
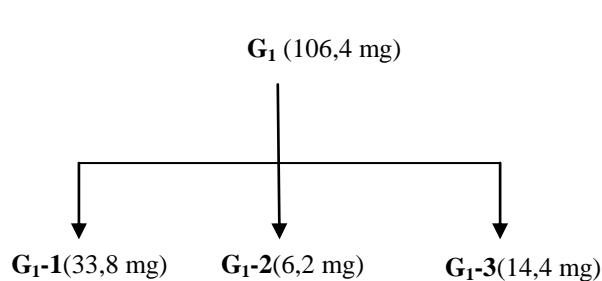
Couleur de chromatogramme	R _f	Système d'éluant	Echantillon contenant le produit
Violet	0,23	Hexane-DCM30%	G ₁
Rose	0,60		G ₃ , G ₄ , G ₅
Rose	0,34		G ₃ , G ₄ , G ₅ , G ₆ , G ₇ , G ₈ , G ₉ ,
Rose violacée	0,28		G ₄ , G ₅ , G ₆
Violet	0,29	Hexane-DCM50%	G ₈ , G ₉ , G ₁₀ , G ₁₁ , G ₁₂ , G ₁₃
Bleu	0,44	Hexane-DCM40%	G ₁₃ , G ₁₄
Violet	0,31		G ₁₆ , G ₁₇ , G ₁₈

D'après ces tests sur des plaques analytiques en gel de silice, à part les groupes **G₁₀, G₁₁ et G₁₇**, on a choisi les groupes : **G₁, G₄, G₅, et G₆**pour une investigation plus poussée.

III-2-6- Purification des groupes de fractions : isolement des constituants

➤ *Groupe G₁*

Par chromatographie sur colonne, avec de système d'éluant isocratique Hexane-DCM (80/20, V/V), on a obtenu 3 produits. Le schéma et la photographie 7 résument les résultats.

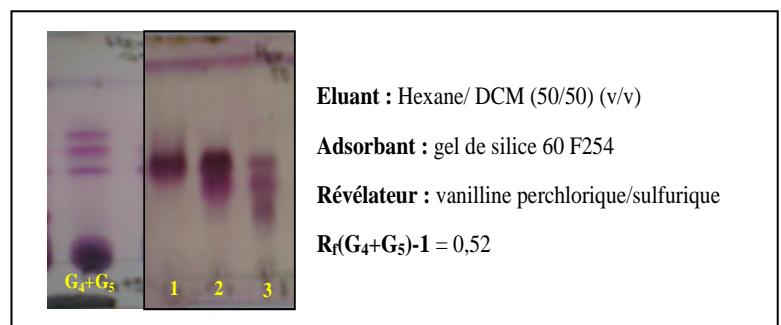
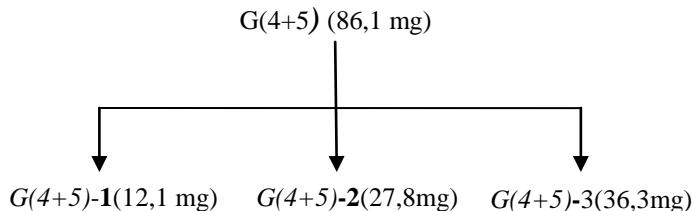


Photographie 7 : Chromatogramme en CCM du groupe G₁ et des produits après chromatographie sur colonne

➤ *Groupes G (4+5):*

Un produit et 2 mélanges de couleur violette ont été obtenus.

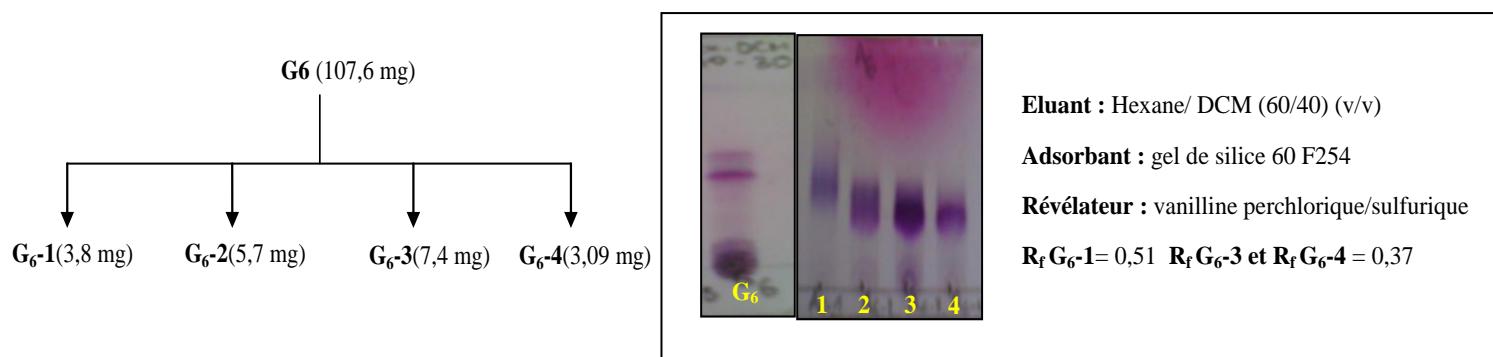
Les résultats sont résumés comme suit :



Photographie 8 : Chromatogramme en CCM du groupe G(4+5) et des produits après chromatographie sur colonne

➤ **Groupe G6**

Ayant effectué des expériences identiques à celles des groupes G₁ et G(4+5), les résultats suivants ont été obtenus.



Photographie 9 : Chromatogramme en CCM du groupe G6 et des produits après chromatographie sur colonne

III-3-Etudes structurales des produits isolés

Dans le cadre de ce travail 3 produits majoritaires ont été soumis en analyses spectrales (tableau 10). Dans ce dernier ils sont classés par ordre de teneurs décroissantes.

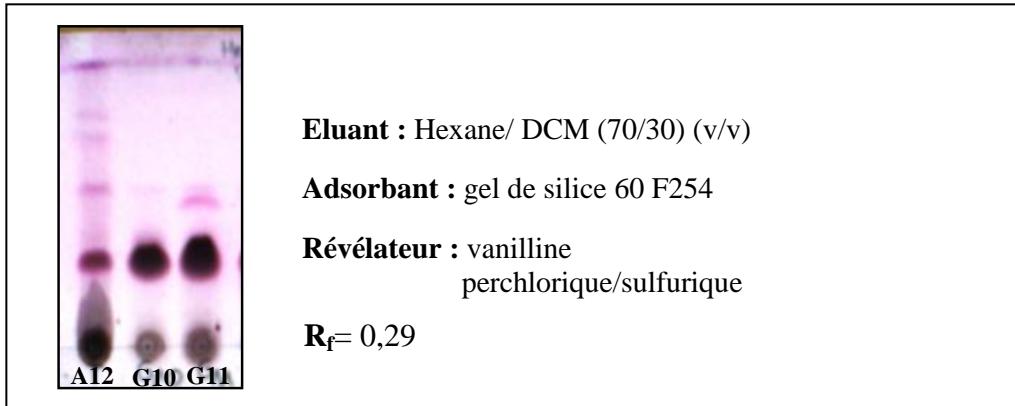
Tableau 10 : Techniques spectrales utilisés

Produits	Masse (mg)	RMN	GC/SM
G₁₀	71,5	¹ H- ¹³ C Broadband Decoupling DEPT 135	SM
G₍₄₊₅₎-1	12,1	¹ H- ¹³ C Broadband Decoupling HMQC	SM
G₆-4	3,09	-	SM

III-3-1- Identification du produit G10

❖ Analyse par CPG/SM

Si par CCM **G10** ne donnait qu'une tache unique (photographie 10), en CPG (lors de l'analyse du produit par CPG/SM), on observait deux pics de temps de rétention respectifs : $t_R = 31,15\text{min}$ (composé minoritaire codé G101) et : $t_R = 34,50\text{min}$ (composé majoritaire codé G102), (figure 28).



Photographie 10 : Chromatogramme en CCM des produits G10 et G11

Les spectres de masse en SM/IE des 2 produits (G101 et G102) sont portés sur les figures 29 et 30.

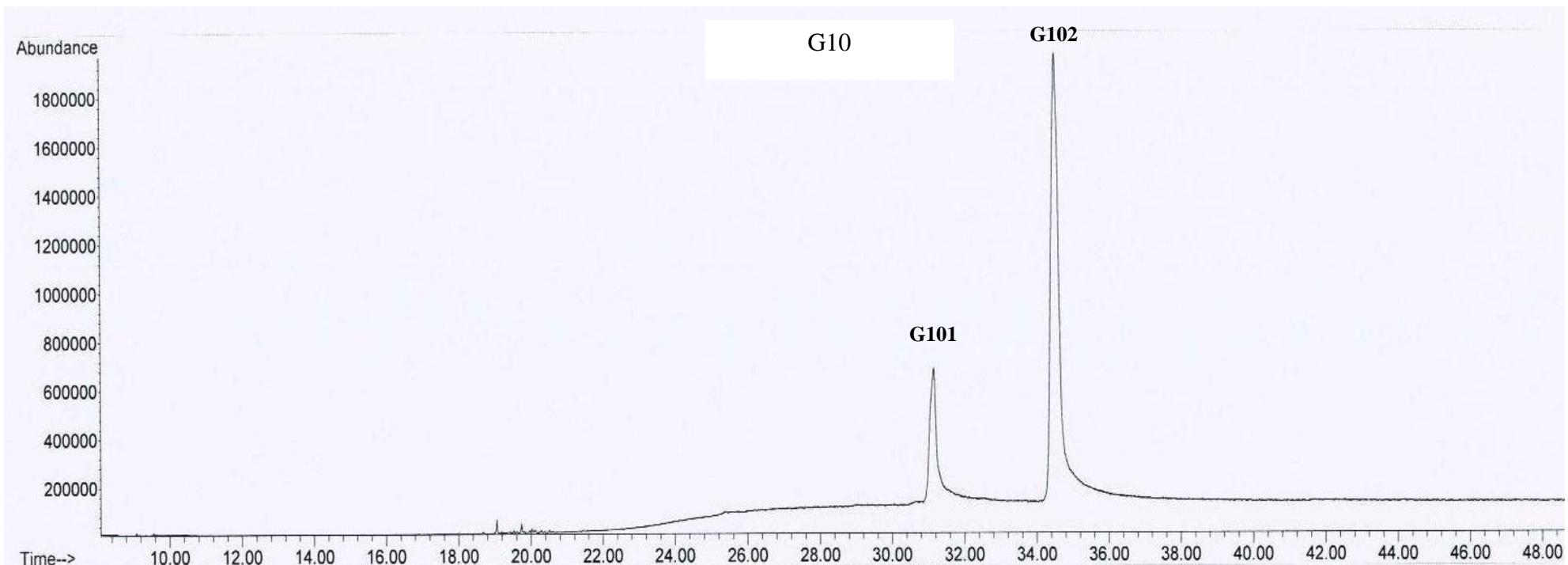


Figure 28 : Chromatogrammes GC du produit G10

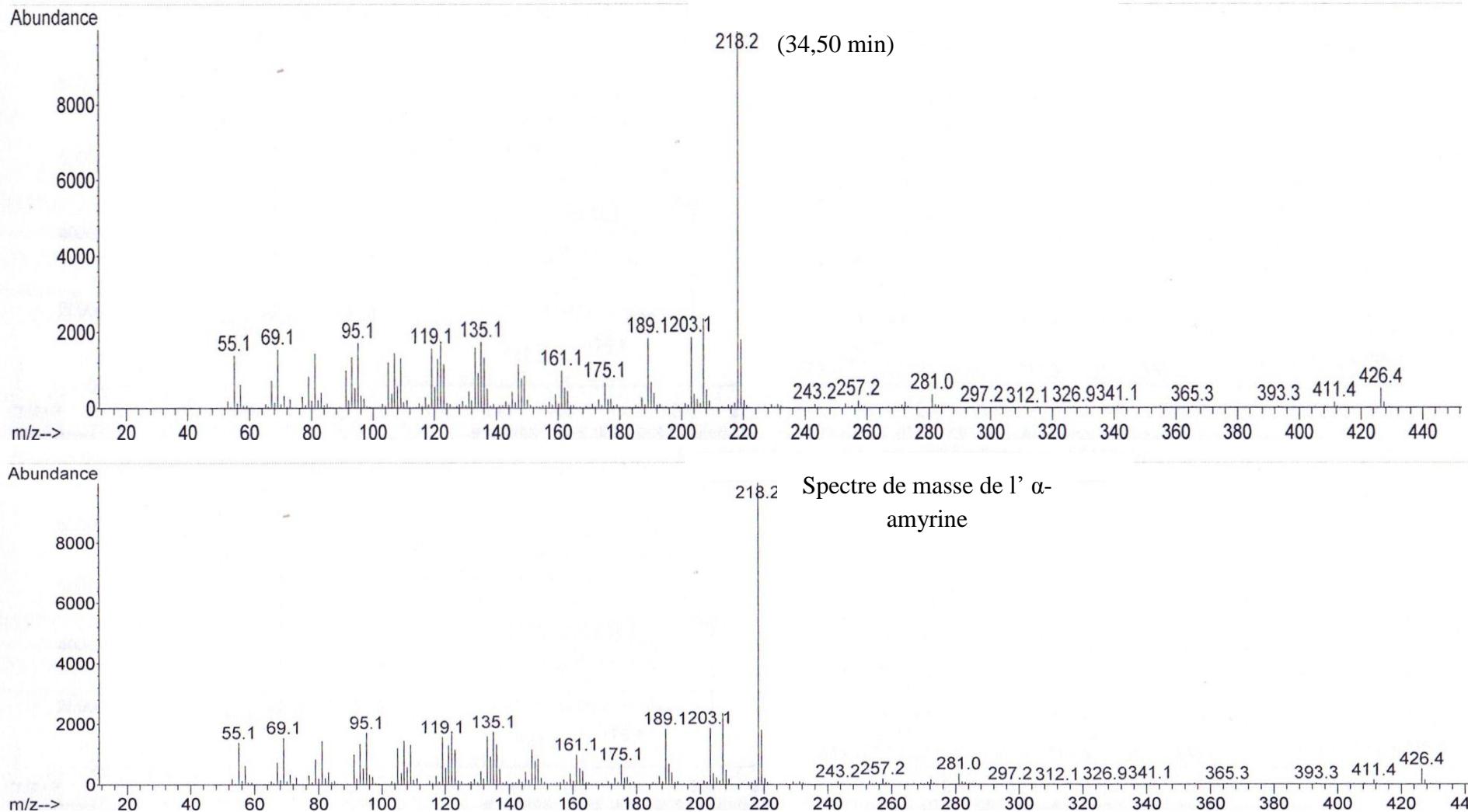


Figure 29 : Spectre de masse du produit majoritaire G102, $t_R = 34,50$ min

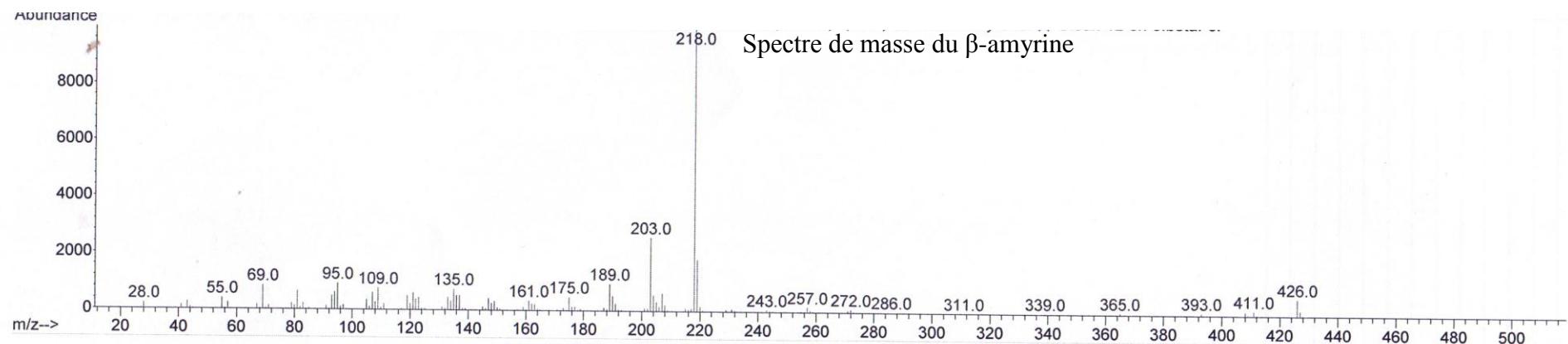
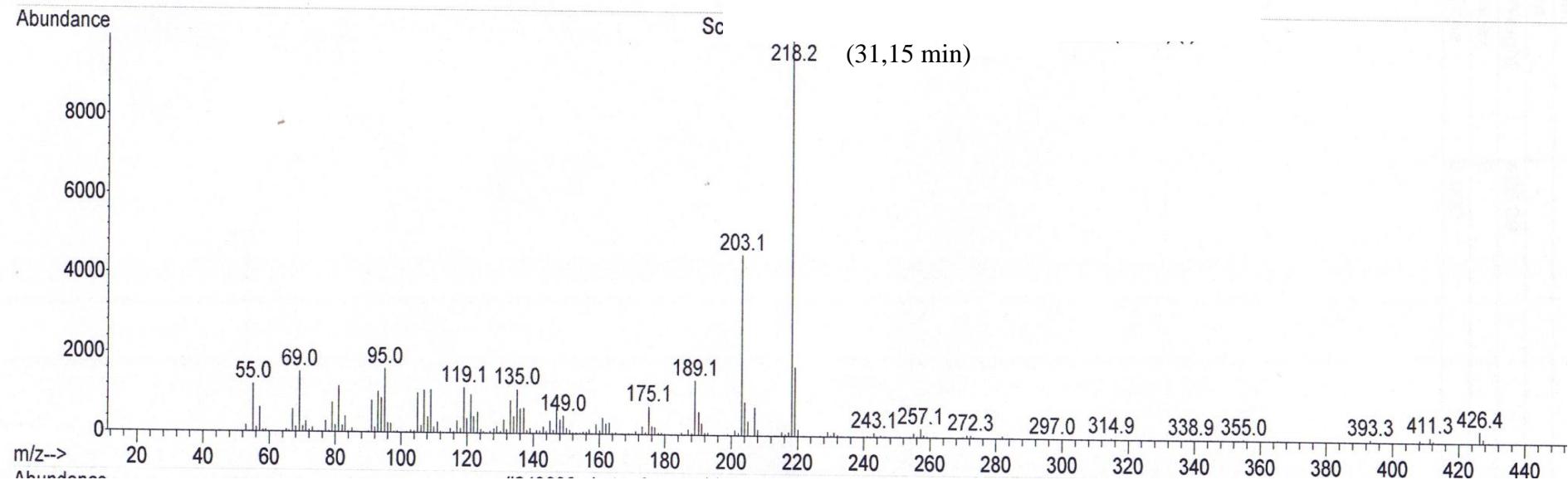


Figure 30: Spectre de masse du produit minoritaire G101 de G10, $t_R = 31,15$ min

Interprétation des spectres de masse

➤ Du composé majoritaire G102

Le spectre de masse de G102 ($t_R = 34,50\text{min}$) et le spectre du produit extrait de la librairie numérique, ayant les mêmes pics sont portés sur la figure 29.

On relève dans les 2 cas, la présence de pic moléculaire à m/z 426 (11%) correspondant à un produit de masse moléculaire 426g/mol, compatible selon la littérature à la formule brute $C_{30}H_{50}O$. En plus du pic $m/z=426$, on observe aussi des pics à 218 (pic de base, 100%) ; 203 (25%) ; 189 (25%). Les compilations NIST et WILEY, combinées à celles des articles publiés, montrent que ce produit correspondait à l' α -amyrine connu sous le nom de viminalol [11] [12] [16] [34] [38] [60].

Les propositions de fragmentation portées sur la figure 31 confirment la présence de ces aux valeurs de m/z précédentes.

En effet le pic à $m/z=218$ correspond au pic de base. Il a été obtenu selon le mécanisme de type retro Diels-Alder par lequel l'ouverture de cycle par clivages homolytiques au niveau de l'ion moléculaire génère le radical cation constituant ce pic de base et une autre molécule neutre (non détectée).

Après éjection d'un groupement radical libre méthyle, l'ion à $m/z=218$ donne naissance au fragment dont le rapport est de $m/z=203$.

Le fragment à $m/z=189$ résulte de la perte d'un groupe C_2H_5 de l'ion moléculaire, conduisant à la formation de deux nouvelles doubles liaisons éthyléniques, et à la formation d'un carbocation.

➤ Du composé minoritaire G101

Le spectre de masse du produit minoritaire G101 et le résultat de la comparaison avec la librairie numérique est présenté sur la figure 30.

On observe les pics à : 426 (M^+ , 5%); 218 (pic de base, 100%) ; 203 45% ; 189 (20%), correspondait aussi à un produit de masse moléculaire 426 g/mol, compatible à la formule brute $C_{30}H_{50}O$.

Les compilations NIST et Wiley, combinées à celle de la référence [11] [12] [34] [38] [60], montrent que ce produit minoritaire G102 correspond à la β -amyrine.

La comparaison avec les données de la littérature montre que la fragmentation de G101 est identique à celle de l' α -amyrine (figure 31) [3] [11] [12] [38] [60].

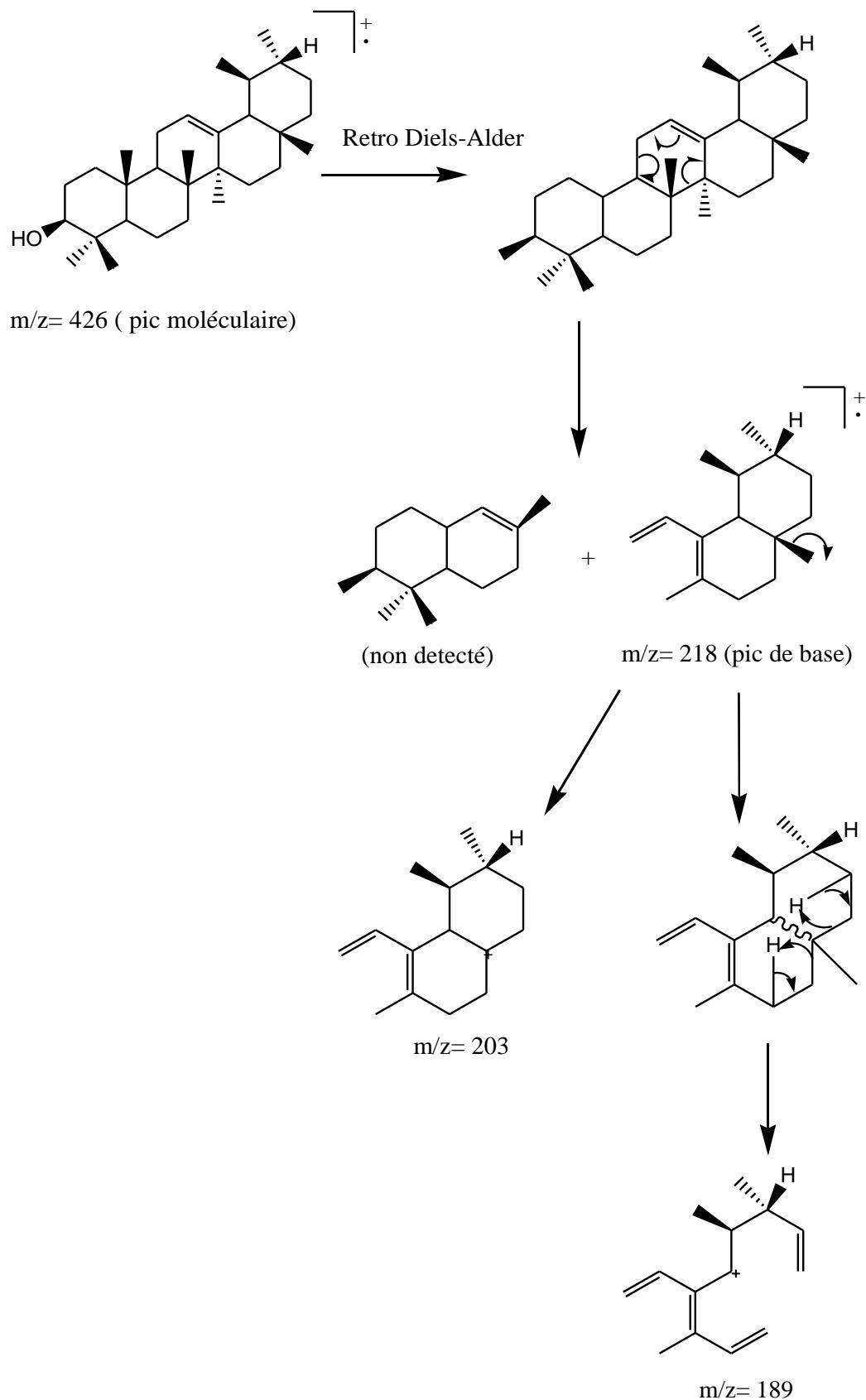


Figure 31 : Fragmentation du produit majoritaire G102 de G10, $t_R = 34,50 \text{ min}$ [11] [12] [38] [60]

❖ Analyse par RMN

Identification des spectres utilisés

A part les données de CPG/SM (chromatogrammes et spectres de masse), les spectres RMN peuvent confirmer les résultats obtenus par ces dernières. L'identification de ces spectres est présentée sur le tableau 11:

Tableau 11:Identification des spectres RMN

Spectre	Identification	Type de spectre
S1 (figure33)	<ul style="list-style-type: none"> • Domaine de δ ppm : 0 à 7,5ppm • Présence des valeurs montrant l'intégration de la surface des signaux • L'allure des signaux se présente sous forme de singulet et de multiplet <p>S1a, S1b, S1c, sont les étalements des signaux des zones des δ ppm respectifs de : 0,7-2,1ppm ; 3,16-3,35ppm ; 4,5-5,7ppm</p>	<p>Spectre RMN¹H classique 1D</p> <p>Ce spectre permet de voir les différents types de sites protoniques ainsi que l'enchaînement des sites protoniques de la molécule</p>
S2 (figure34)	<ul style="list-style-type: none"> • Domaine de δ ppm : 10 à 148ppm • Les signaux se présentent uniquement par des singulets • (ppm)= 77,03 : solvant CDCl₃ <p>S2a, S2b, S2c, sont les étalements des signaux des zones des δ ppm respectifs de : 16-60ppm ; 75,5-80ppm 116-148ppm</p>	<p>Spectre RMN ¹³C 1D “Broadband Decoupling”</p> <p>Ce spectre informe sur le nombre d'atomes de carbone à condition qu'il n'y ait pas chevauchement des signaux</p>
S3 (figure35)	<ul style="list-style-type: none"> • Domaine de δ ppm 15 à 125ppm • Il existe des pics positifs et des pics négatifs <p>S3a est l'étalement des signaux des zones des δ ppm respectifs de : 14-60ppm</p>	<p>Spectre RMN 1D « DEPT 135 »</p> <p>Ce spectre informe sur les classes de C autre que C quaternaire.</p>

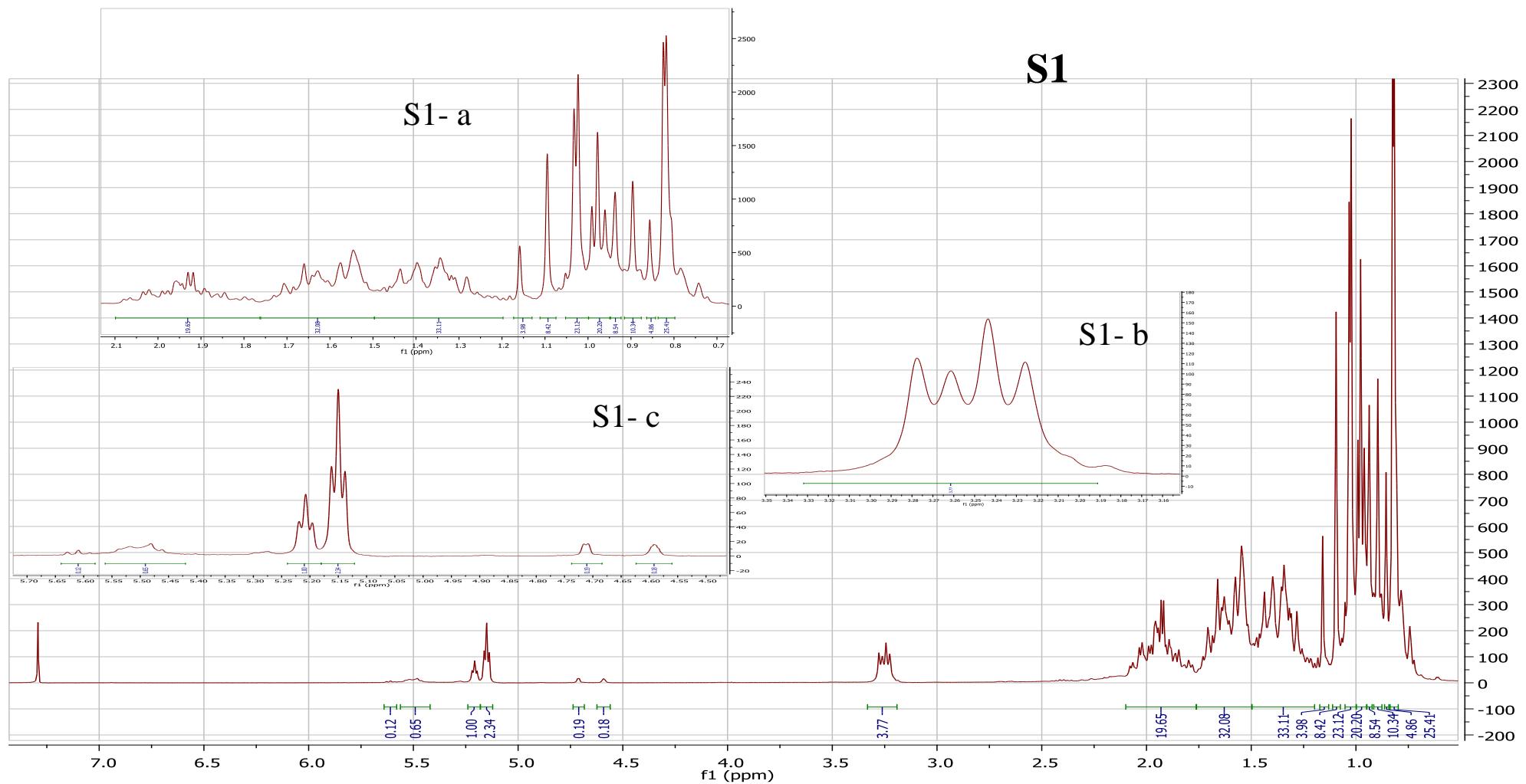


Figure 32: S1 Spectre RMN ^1H du G10, S1-a, S1-b, S1-c étalement du spectre S1

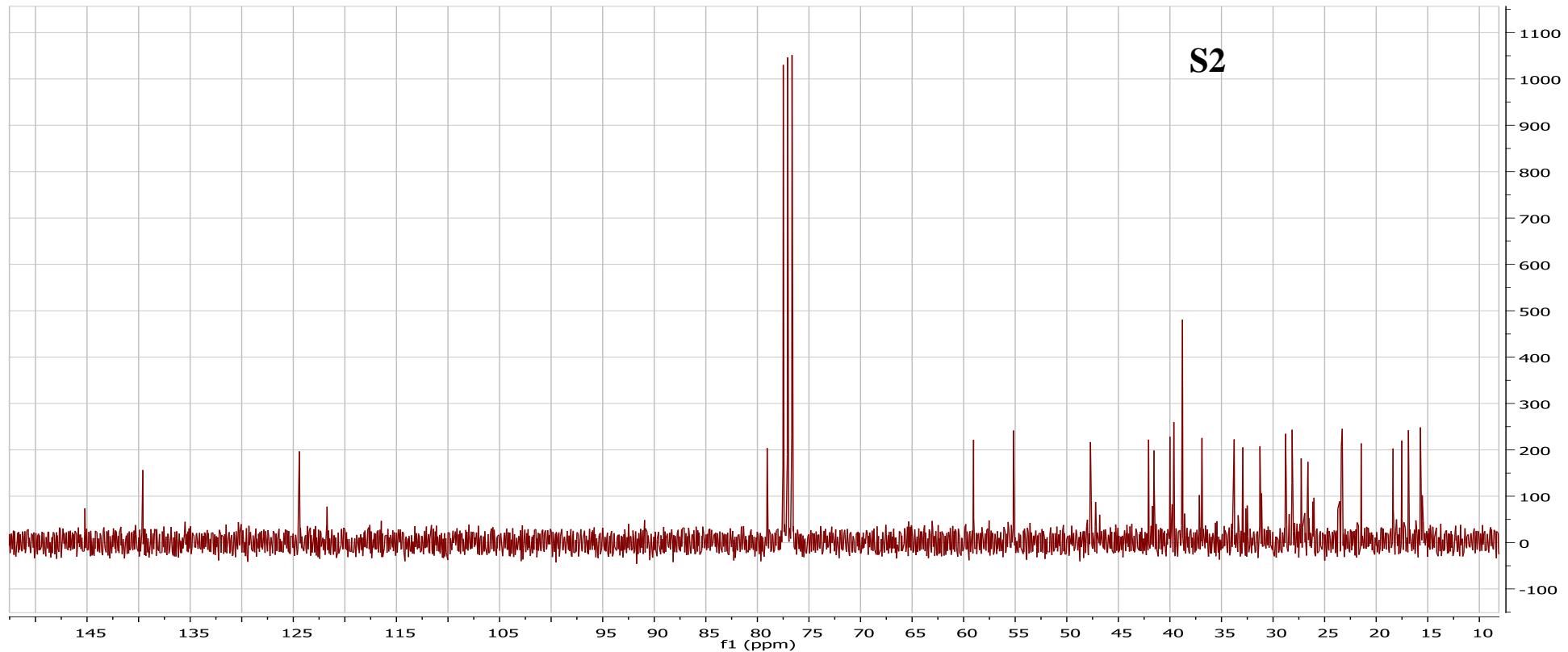


Figure 33: S2 Spectre RMN ^{13}C du G10

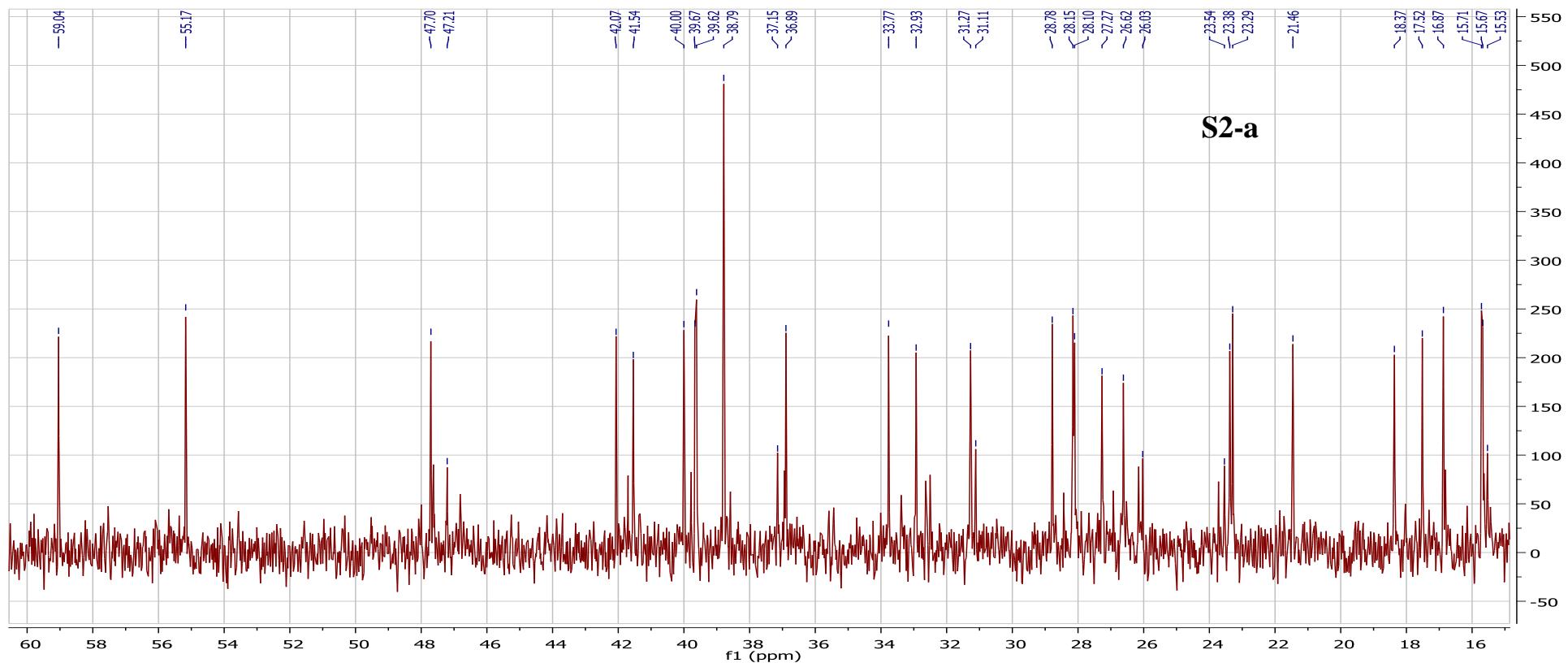
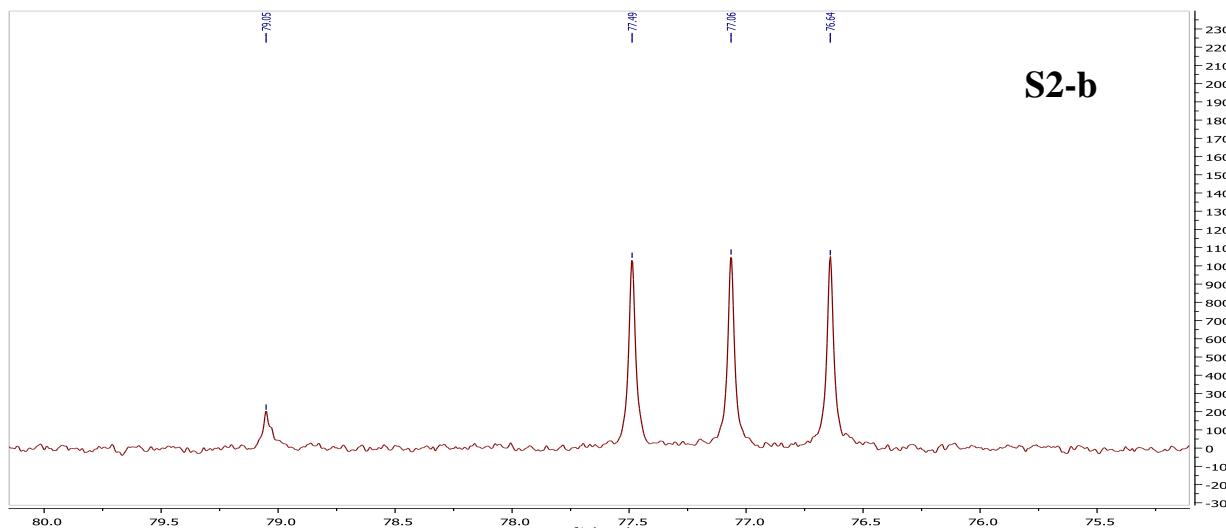
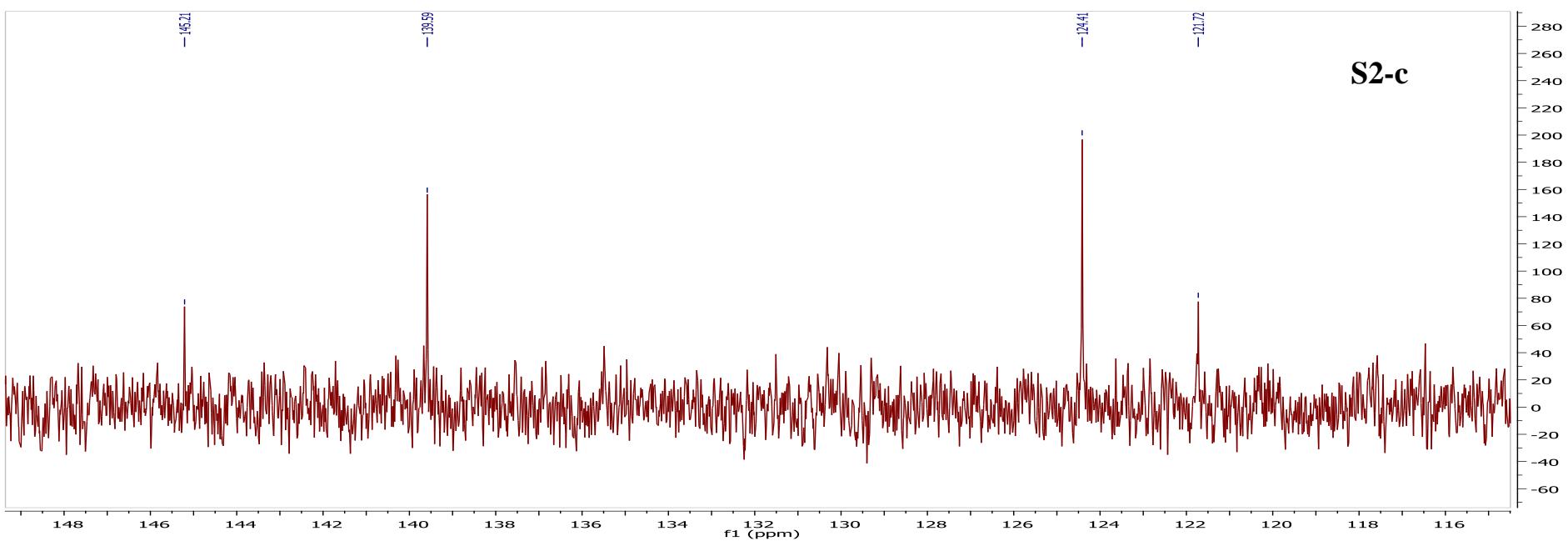


Figure 34: S2-aEtalement du S2 spectre RMN ^{13}C du G10



S2-b



S2-c

Figure 35 : S2-b et S2-c étagement du S2 spectre RMN ^{13}C du G10

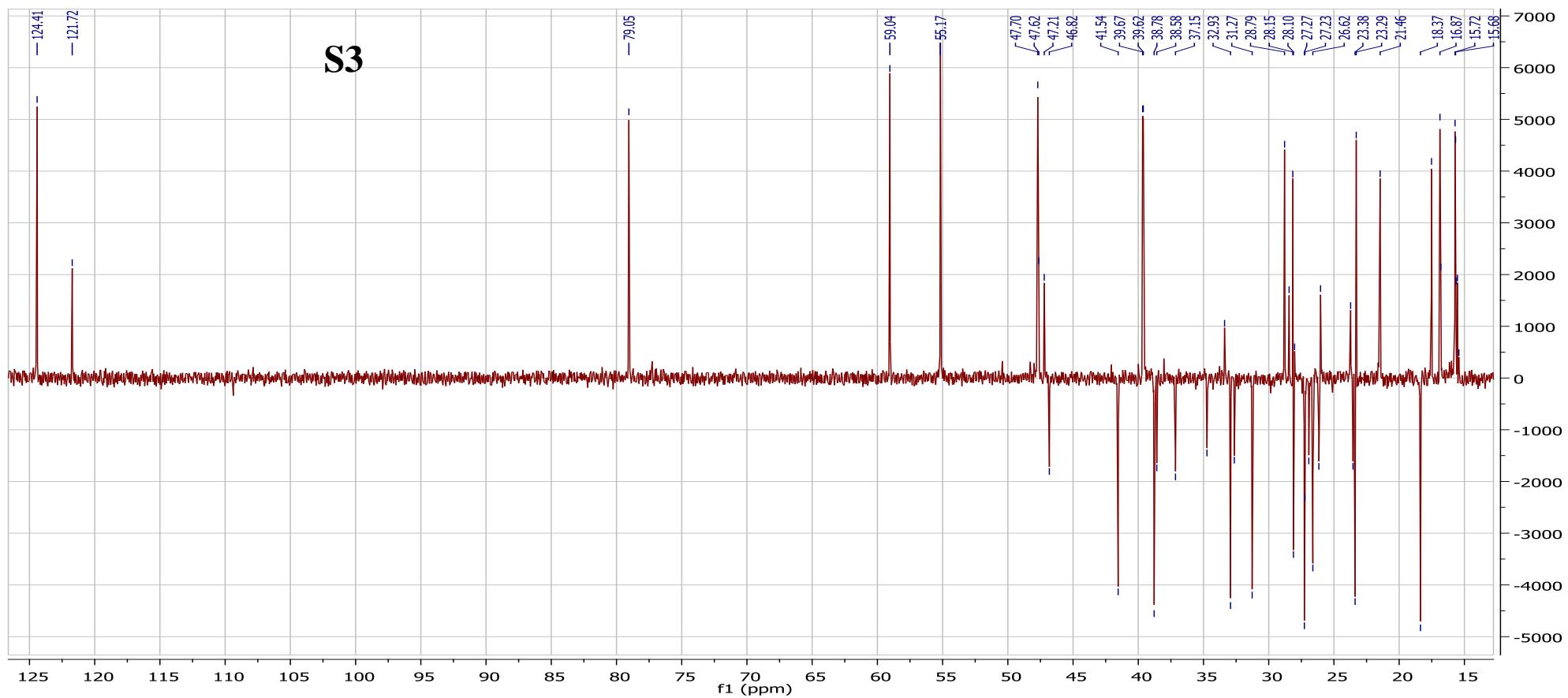


Figure 36 : S3 Spectre RMN DEPT

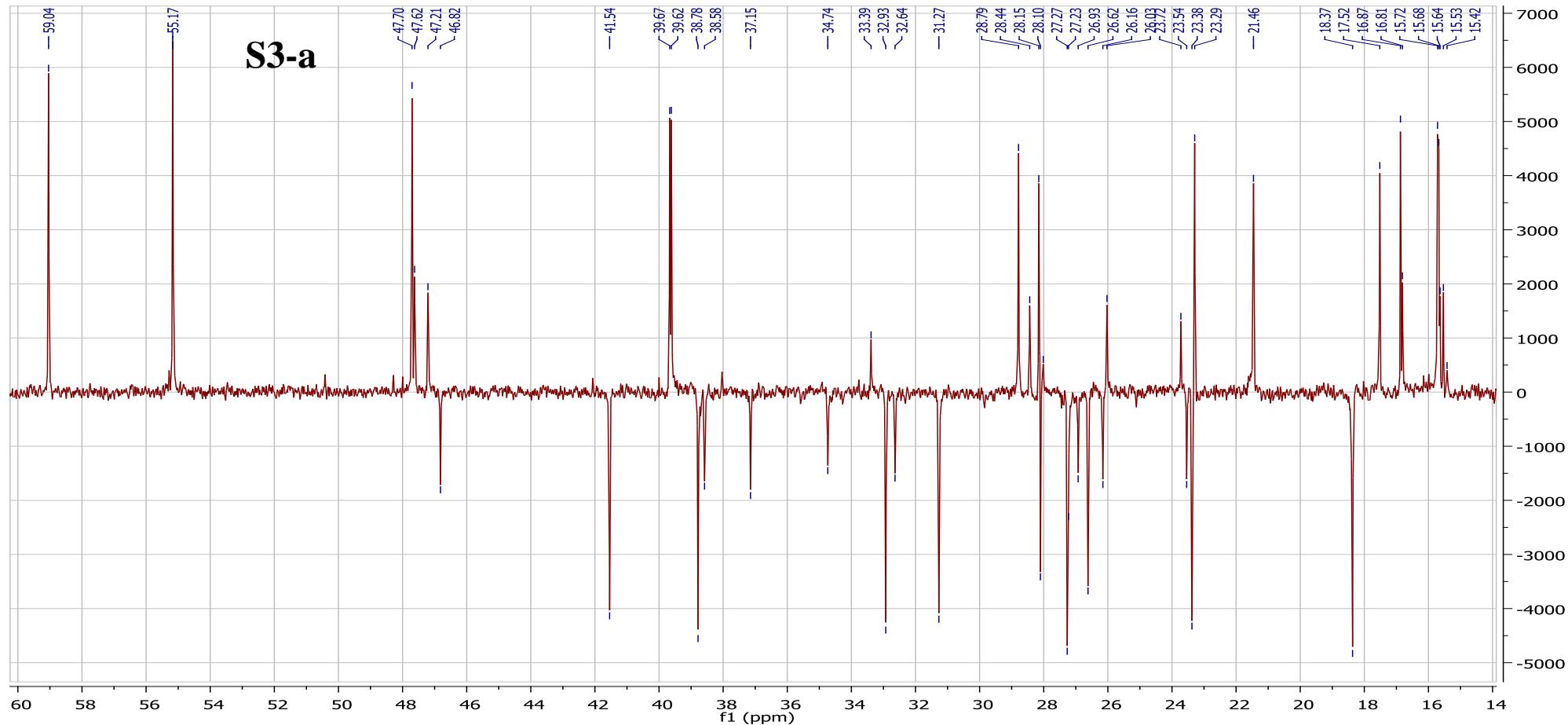


Figure 37 : S3-a étalement du spectre RMN DEPT

Interprétation des spectres RMN

➤ Composé G102

Son spectre ^{13}C -1D (figure 35) montre que G102 a 30 carbones, nombre caractéristique des composés triterpéniques. Ces composés sont abondants dans l'échantillon objet du présent travail, comme le montrent les résultats du criblage. Ainsi, une comparaison des valeurs de δ ppm des ^1H et des ^{13}C de G102 avec celles des ^1H et de ^{13}C de composés triterpéniques, le plus proche données par la littérature, peuvent permettre de poser une hypothèse de structure pour G102.

Des triterpènes répertoriés, les valeurs des δ ppm des ^1H (tableau 12) et des ^{13}C (tableau 13) de l' α -amyrine sont les plus proches de celles de G102.

Les relevés des spectres expérimentaux du produit G102 et ceux de la littérature sont présentés dans les tableaux 12 et 13.

Tableau 12 : Relevé du spectre de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de la molécule majoritaire G102

Déplacement chimique (ppm)	Multiplicité et constante de couplage	Attribution	δ (ppm) et J (Hz) de littérature [33] [36][50] [55][57][60]
5,15	t, $J = 3.6$ Hz ; 1H	H – 12	5,13 ; $J = 3,1$
3,23	d, $J = 5.3$ Hz ; 1H	H – 3	3,24 ; $J = 5,4$
2,03	td, $J = 4.3$ Hz ; 9,3 Hz ; 2H	H – 15	1,94 ; $J = 4.5$; 13,5
1,94	m ; 2H	H – 22	1,85
1,88	m ; 2H	H – 16	1,76
1,09	s ; 3H	H – 27	1,06
1,02	s ; 3H	H – 28	1,04
0,98	s ; 3H	H – 23	0,93
0,95	d ; $J = 7.0$ Hz ; 3H	H – 29	1,00 ; $J = 6,5$
0,90	s ; 3H	H – 26	0,89
0,86	s ; 3H	H – 24	0,79
0,82	s large ; 3H	H – 30	0,73
0,82	s large ; 3H	H – 25	0,72
0,80	masqué	H – 5	0,71

Tableau 13 : Relevé des spectres de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$), et RMN DEPT de la molécule majoritaire G102

Déplacement chimique (ppm)	Attribution	DEPT	δ (ppm) de littérature [33] [36][50][55][57][60]
139,6	C-13	q	139,5
124,4	C-12	CH	124,4
79,1	C-3	CH	79,4
59,0	C-18	CH	59,0
55,2	C-5	CH	55,2
47,7	C-9	CH	47,7
42,1	C-14	q	42,1
41,5	C-22	CH_2	41,5
40,0	C-8	q	40,5
39,7	C-19	CH	39,8
39,6	C-20	CH	39,6
38,8	C-1	CH_2	38,7
38,8	C-4	q	38,7
36,9	C-10	q	36,8
33,8	C-17	q	33,7
32,9	C-7	CH_2	32,8
31,3	C-21	CH_2	31,2
28,8	C-2	CH_2	28,7
28,2	C-23	CH_3	28,3
28,1	C-28	CH_3	28,1
27,3	C-15	CH_2	27,4
26,6	C-16	CH_2	26,6
23,4	C-11	CH_2	23,4
23,3	C-27	CH_3	23,2
21,5	C-30	CH_3	21,4
18,4	C-6	CH_2	18,4
17,5	C-29	CH_3	17,4
16,9	C-26	CH_3	16,8
15,7	C-24	CH_3	15,8
15,7	C-25	CH_3	15,8

On remarque que l'allure générale du spectre RMN du proton (figure34), constituée d'une masse de pics entre 0,7 ppm et 2,1 ppm est caractéristique d'un triterpénoïde, en effet les singulets intenses vers 1 ppm correspondent à des CH_3 hydrocarbonés tandis que les multiplets jusqu'à environ 2 ppm sont des signaux de CH_2 . On remarque 2 autres signaux plus déblindés, intégrant chacun pour un proton, donc correspondant à des CH .

On constate aussi la présence d'un triplet à 5,15ppm (figure34), avec une constante de couplage 3,6 Hz. Ce déplacement chimique indique qu'il s'agit probablement d'un proton éthylénique possédant deux voisins identiques, pouvant correspondre à un proton H-12 d'un squelette triterpénique de type ursane, avec une double liaison en position 12 (squelette urs-12-ène) : ce qui est confirmé par la présence du déplacement chimique du carbone C-12(figure 35) correspondant au squelette ursa-12-ène également présent à 124,41ppm.

Ainsi, la structure d' α -amyrine pour G102 est fort probable.

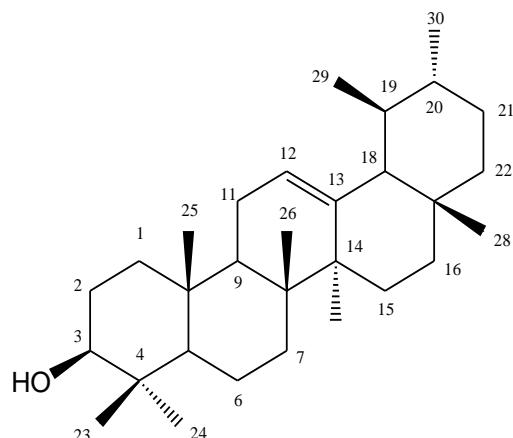


Figure 38 : Structure chimique de l' α -amyrine

➤ Composé G101

Les valeurs des δ ppm des ^{13}C du G101 sont proche de celles de l' α -amyrine (donc du G102).

On note :

- Sur le spectre ^1H , un petit déblindage de 0,06ppm pour le signal à 5,15ppm et de 0,04ppm pour celui à 3,23ppm. La littérature donne les valeurs respectives de 5,21ppm et 3,27ppm pour la β -amyrine ;
- Que pour les carbones C-13 est devenu plus déblindé (145,21ppm) et C-12 plus blindé (121,72ppm), ce qui peut expliquer l'absence de substituant en position 19 ;
- Le signal d'un C quaternaire en plus (à 31,1ppm) et d'un CH en moins.

Les déblindages des C-18 et C-19 sont accords avec le fait que le méthyle en position 29 est fixé sur le carbone C-20, ce qui laisse alors supposer la structure β -amyrine (squelette triterpénique oléanane) pour G101.

Ainsi, la structure de β -amyrine peut être posée en hypothèse, pour G101.

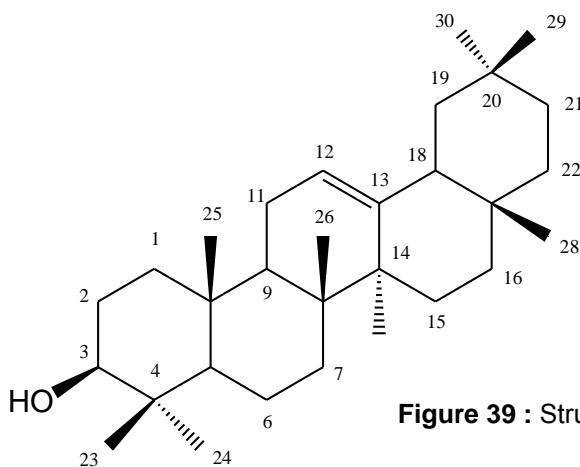


Figure 39 : Structure de la β -amyrine

Les tableaux 14 et 15 rapportent les comparaisons des δ ppm des ^1H et ^{13}C de G101 avec la β -amyrine.

Tableau 14: Relevé du spectre de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de la molécule minoritaire G101

Déplacement chimique (ppm)	Multiplicité et constante de couplage	Attribution	δ (ppm) et J (Hz) de littérature [33] [36][50] [55][57][60]
5,21	t, $J = 3,5$ Hz ; 1H	H – 12	5,18 ; $J = 3,4$
3,27	d, $J = 4,9$ Hz ; 1H	H – 3	3,26 ; $J = 4,4$
1,96 - 2,10	masqué	H – 15	1,89 ; $J = 4,0$; 14,0
1,90	m ; 2H	H – 22	1,80
1,79	m ; 2H	H – 16	1,70
1,28	s ; 3H	H – 27	1,19
1,09	s ; 3H	H – 28	1,09
0,96	s ; 3H	H – 26	0,94
0,94	s ; 3H	H – 24	0,91
0,85	masqué	H – 29	0,87
0,81	masqué	H – 30	0,80
0,78	s ; 3H	H – 23	0,77
0,74	s ; 3H	H – 25	0,73

Tableau 15: Relevé des spectres de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) et RMN DEPT de la molécule minoritaire G101

Déplacement chimique (ppm)	Attribution	DEPT	δ (ppm) de littérature [33] [36][50][55][57][60]
145,2	C-13	q	145,2
121,7	C-12	CH	121,7
77,1	C-3	CH	79,3
55,2	C-5	CH	55,2
47,6	C-18	CH	47,6
47,6	C-9	CH	47,6
47,2	C-19	CH_2	47,3
42,1	C-14	q	42,1
40,0	C-8	q	39,8
38,6	C-1	CH_2	38,7
38,6	C-4	q	38,5
37,2	C-22	CH_2	37,1
36,9	C-10	q	36,9
35,4	C-21	CH_2	34,7
34,2	C-29	CH_3	33,9
33,8	C-17	q	32,6
32,9	C-7	CH_2	32,4
31,1	C-20	q	31,0
28,2	C-28	CH_3	28,4
28,1	C-23	CH_3	28,2
28,1	C-2	CH_2	27,2
26,6	C-16	CH_2	26,3
26,0	C-15	CH_2	26,0
23,7	C-27	CH_3	24,4
23,5	C-11	CH_2	23,6
23,3	C-30	CH_3	23,7
18,0	C-6	CH_2	18,6
15,7	C-26	CH_3	16,8
15,5	C-24	CH_3	15,4
15,5	C-25	CH_3	15,4

Le chromatogramme (figure 28) montre 2 pics sortant respectivement à 31,15 min (minoritaire codé **G101**) et à 34,50 min (majoritaire codé **G102**) pouvant correspondre à deux produits.

Le spectre de RMN du proton (figure 34) montre des groupes de signaux d'allure et de déplacement chimique très proches, mais d'intégration différente : par exemple, 2 triplets entre 5,11 et 5,24 ppm, l'un intègre pour un proton et l'autre pour 0,4 ; de même pour les deux doublets entre 3,15 et 3,30 ppm. Ces premières constatations confirment les données de la GC/MS qui montrent que le produit G_{10} est constitué de deux molécules isomères, dont l'une est majoritaire par rapport à l'autre.

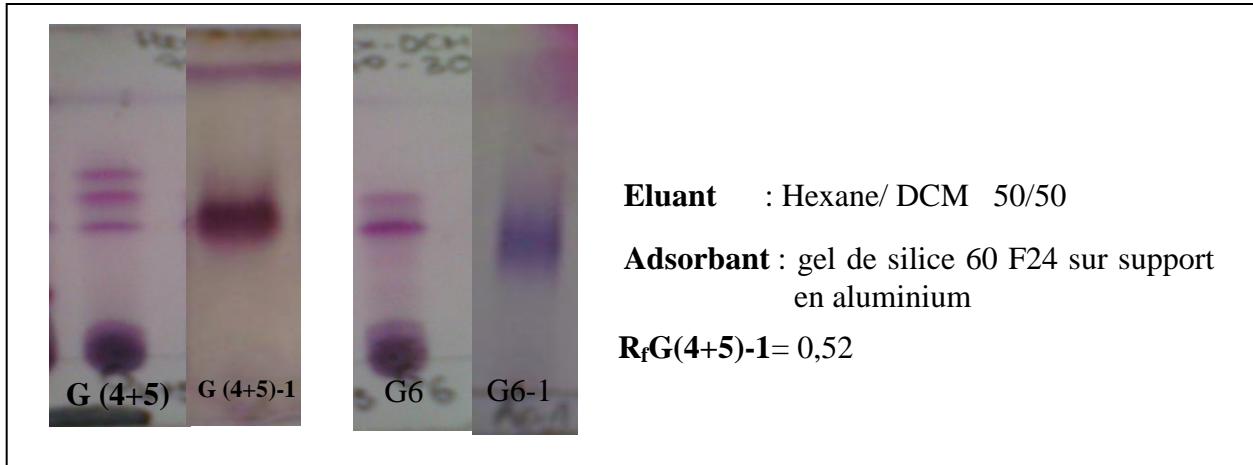
En remarque :

Des articles ont été publiés des cas d'isolement de l' α -amyrine et du β -amyrine en même temps dans une plante [33] [36] [50] [55][57][60].

II-3-2- Identification des produits G(4+5)-1: élucidation de la structure épi- ψ -taraxastananol

III-3-2-1-Comparaison des profils chromatographiques de G (4+5)-1 et G6-1

Les résultats de la comparaison des profils en CCM des 2 produits est portée sur la photographie 11.



Photographie 11 : Chromatogramme en CCM des produits G (4+5)-1 et G6-1

L'analyse en GC/MS des produits G (4+5)-1 et G6-1 montre que ces deux fractions possèdent un constituant commun majoritaire donnant : un pic à 39,4 min (figure 40) et le même spectre de masse correspondant à ce pic (figure 41).

En tenant compte des quantités de produits disponibles, 12,1 mg pour G (4+5)-1 et 3,8 mg pour G6-1, des études plus approfondies ont été poursuivies sur G (4+5)-1 afin de déterminer la structure chimique du produit majoritaire commun. Ses spectres RMN 1H et ^{13}C monodimensionnel et bidimensionnel portés sur les figures 45, 46 et 47.

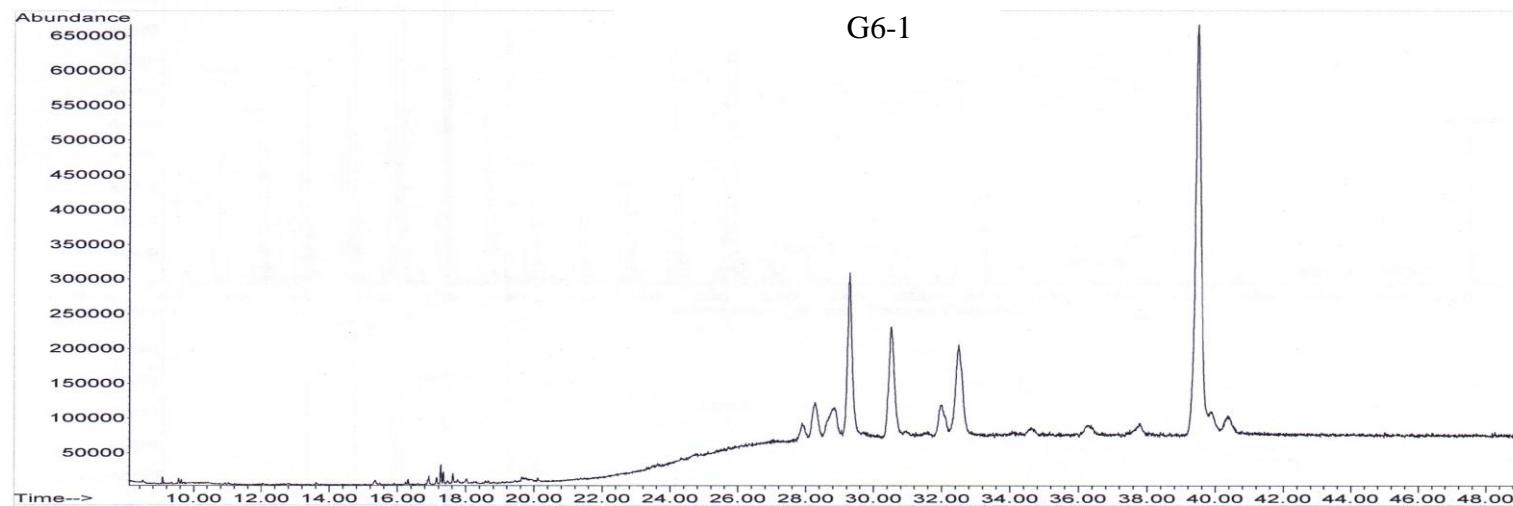
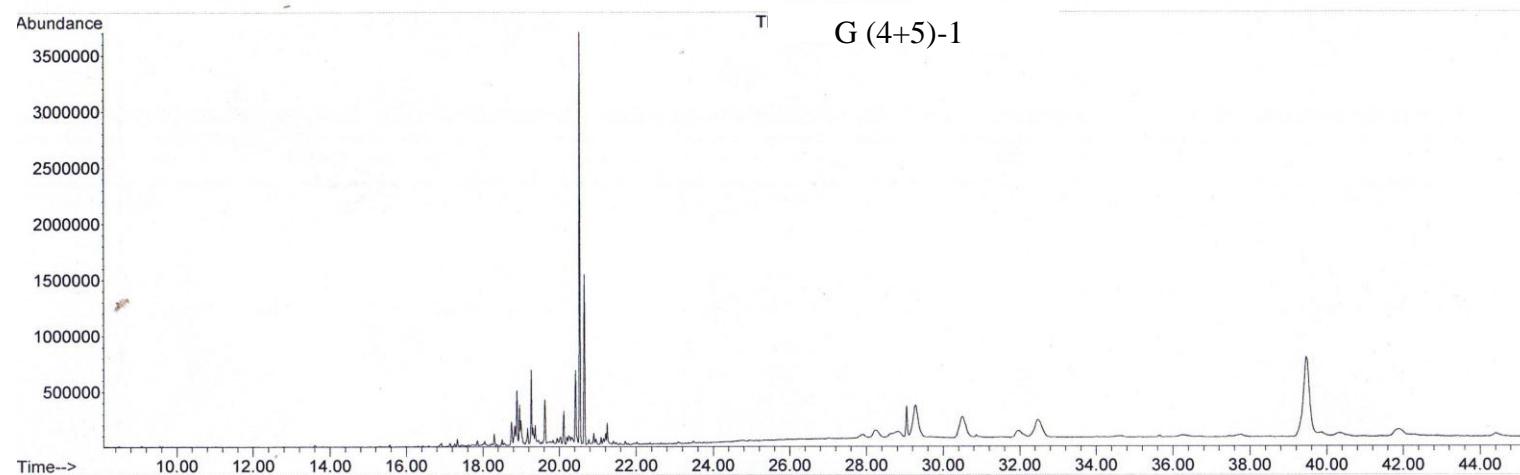


Figure 40: Chromatogrammes GC des produits G (4+5)-1 et G6-1

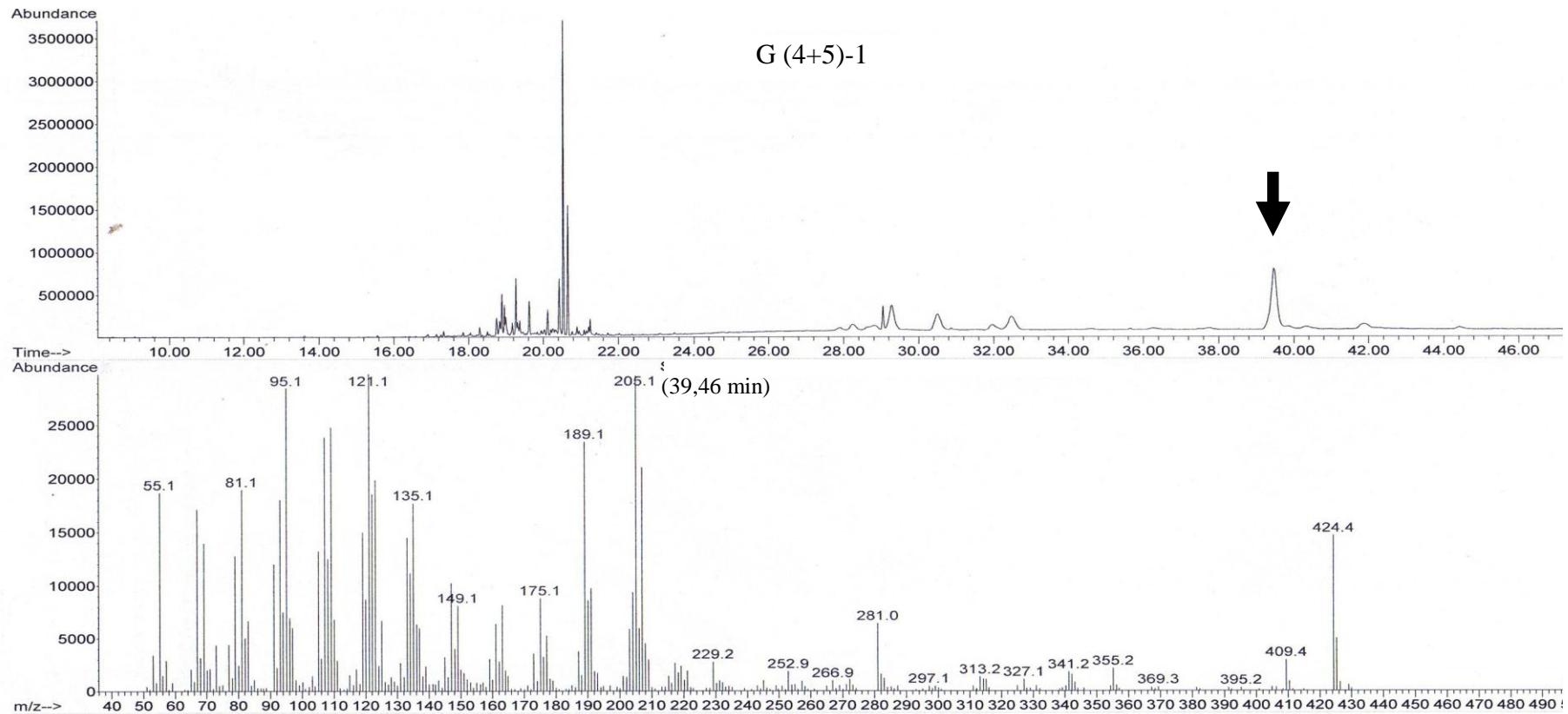


Figure 41 : Spectre de masse du constituant majoritaire (39,46 min) de G (4+5)-1

G (4+5)-1

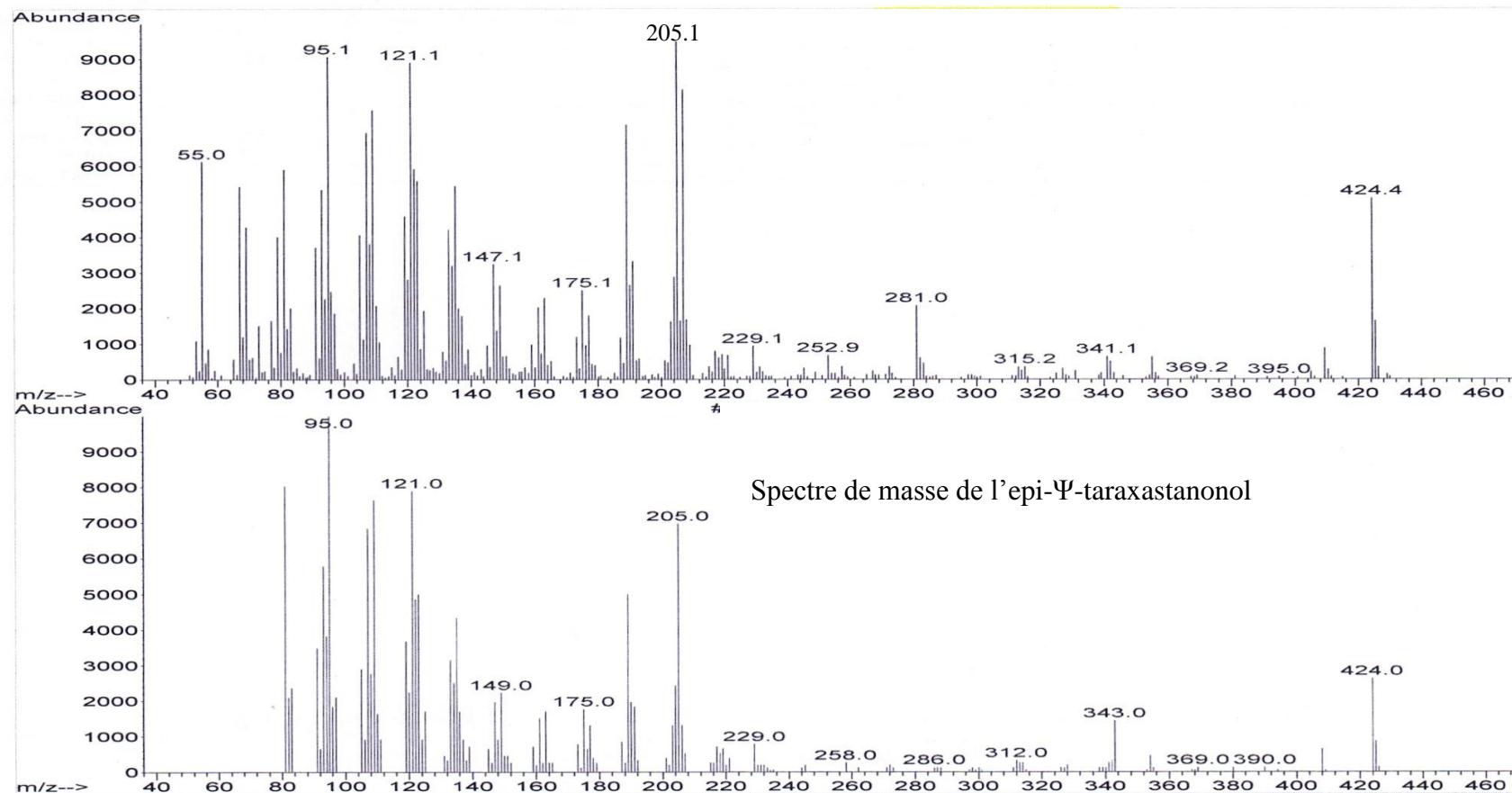


Figure 42 : Comparaison du spectre de masse du constituant majoritaire ($t_R = 39,46$ min) de G (4+5)-1 avec la librairie numérique

II-3-2-2-Examen de l'ensemble des résultats d'analyse spectrale (CPG/SM et RMN)

➤ Exploitation des résultats CPG/SMIE

Sur le spectre de masse SM/IE du G (4+5)-1 (figure 41), on relève les fragments suivants avec leurs pourcentages : 424 (12 %) ; 205 (60 %); 189 (35 %); 149 (10 %); 121(52 %) ; 109 (35 %); 95 (62 %); 81 (42 %)

La comparaison de ces données avec celles des librairies (figure 42), et des journaux [12] [28] [38] [53], permet de dire que la structure probable du G (4+5)-1 serait celle de l'epi- Ψ -taraxastananol (de masse moléculaire 442g/mol et de formule brute $C_{30}H_{50}O_2$).

Le fragment à $m/z=424$ ($C_{30}H_{48}O$) pourrait provenir de la déshydratation de l'epi- Ψ -taraxastananol.

L'ion moléculaire à $m/z=442$ correspondant à la formule brute $C_{30}H_{50}O_2$ est absent à cause de la déshydratation...

Le pic intense à $m/z=205$, serait dû à l'ouverture du cycle E.

La figure 43 montre la fragmentation de l'epi- Ψ -taraxastananol.

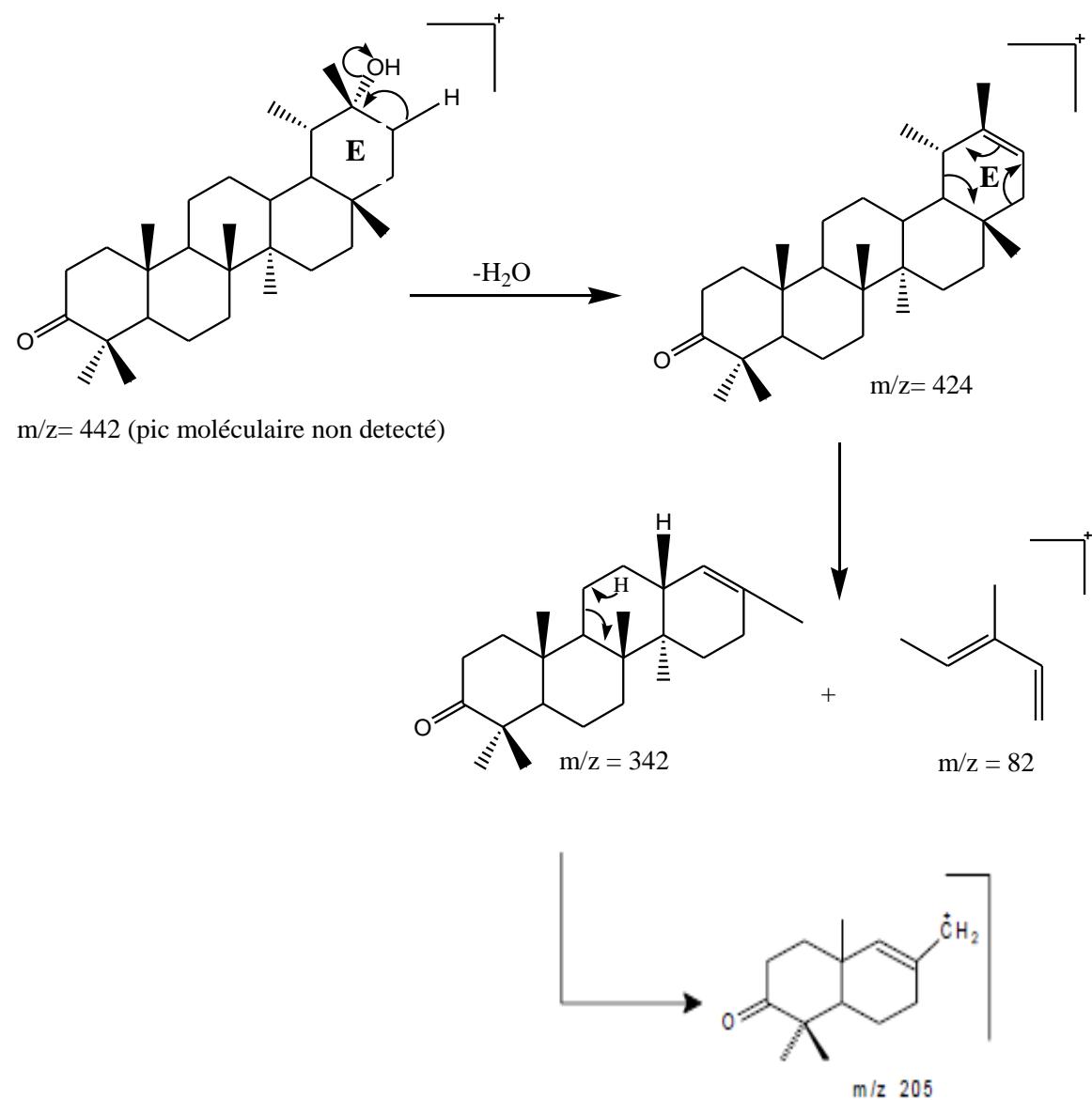


Figure 43 : Fragmentation du l'epi- Ψ -taraxastananol [28] [38]

➤ *Exploitation des spectres de RMN (1D et 2D)*

Le spectre de RMN du proton (figure 45) est constitué d'une masse de pics entre 0,5 et 2,6 ppm, caractéristiques de plusieurs CH_3 , CH_2 et CH hydrocarbonés. Le relevé de chaque signal n'est pas possible, cependant une hypothèse peut être considérée pour le type de squelette ou famille chimique : chaîne hydrocarbonée ou bien triterpénoidé.

Le spectre de RMN ^{13}C (figure 46) n'a pas été complètement sorti à cause de la faible quantité du produit. Cependant, en combinant avec le résultat de HMQC (figure 47), il a été possible de relever les signaux de quelques carbones (Tableau 16).

Plus de cinq pics correspondant à des CH_3 sont relevés entre 15 et 30 ppm et on remarque des signaux entre 36 et 50 ppm correspondant à des carbones quaternaires, ces informations permettent déjà de conclure qu'il ne s'agit pas ici d'une chaîne hydrocarbonée, mais de produit polycyclique.

En effet, on peut relever quelques déplacements chimiques de carbones quaternaires caractéristiques d'un squelette triterpénique pouvant être ursane ou oléanane : 36,4 ppm caractéristique de C-10 ; 40,9 ppm correspondant à C-8 ; 45,9 ppm attribuable à C-14 et 49,1 ppm correspondant à C-4. On remarque aussi un carbone quaternaire à 77,2 ppm, attribuable à un carbone hydroxylé.

L'ensemble de ces informations permet de conclure qu'on a un triterpène hydroxylé. En comparant avec les spectres d' α et β -amyrine exposés précédemment, les déplacements chimiques ne sont pas les mêmes, et en ce qui concerne le carbone hydroxylé, pour l'amyrine c'est un CH, tandis qu'ici c'est un quaternaire. Les signaux relevés sont comparés avec les données de la littérature sur d'autres triterpènes, et pour le produit G (4+5)-1, ces données sont compatibles avec l' $\text{l}'\text{epi-}\Psi\text{-taraxastanone}$ (figure 44) [12] [28] [38] [53].

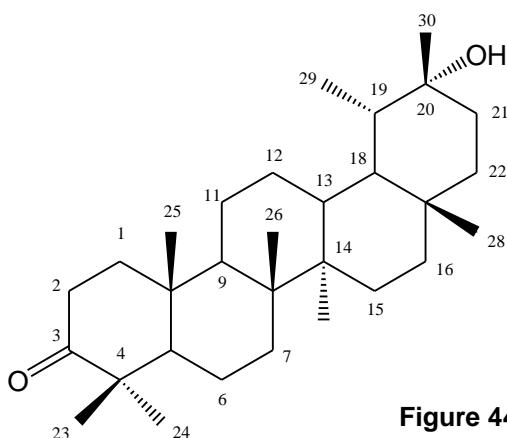


Figure 44: Structure chimique de l' $\text{epi-}\Psi\text{-taraxastanone}$

Tableau 16: Relevé des spectres de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) de la molécule majoritaire du produit G (4+5)-1

Déplacement chimique (ppm)	Attribution [53]	δ (ppm) de référence [53]
15.25	C-27	14,8
15.31	C-26	16,1
15.35	C-25	16,2
15.40	C-28	17,8
15.42	C-29	17,8
19.68	C-6	19,8
21.45	C-24	21,1
21.80	C-11	22,2
26.74	C-12	26,7
29.73	C-15 ; C-23	26,8
36.45	C-10	36,7
39.13	C-13	39,0
40.99	C-8	41,4
45.86	C-14	43,2
46.89	C-18	47,3
49.09	C-4	47,4
77.24	C-20	73,5

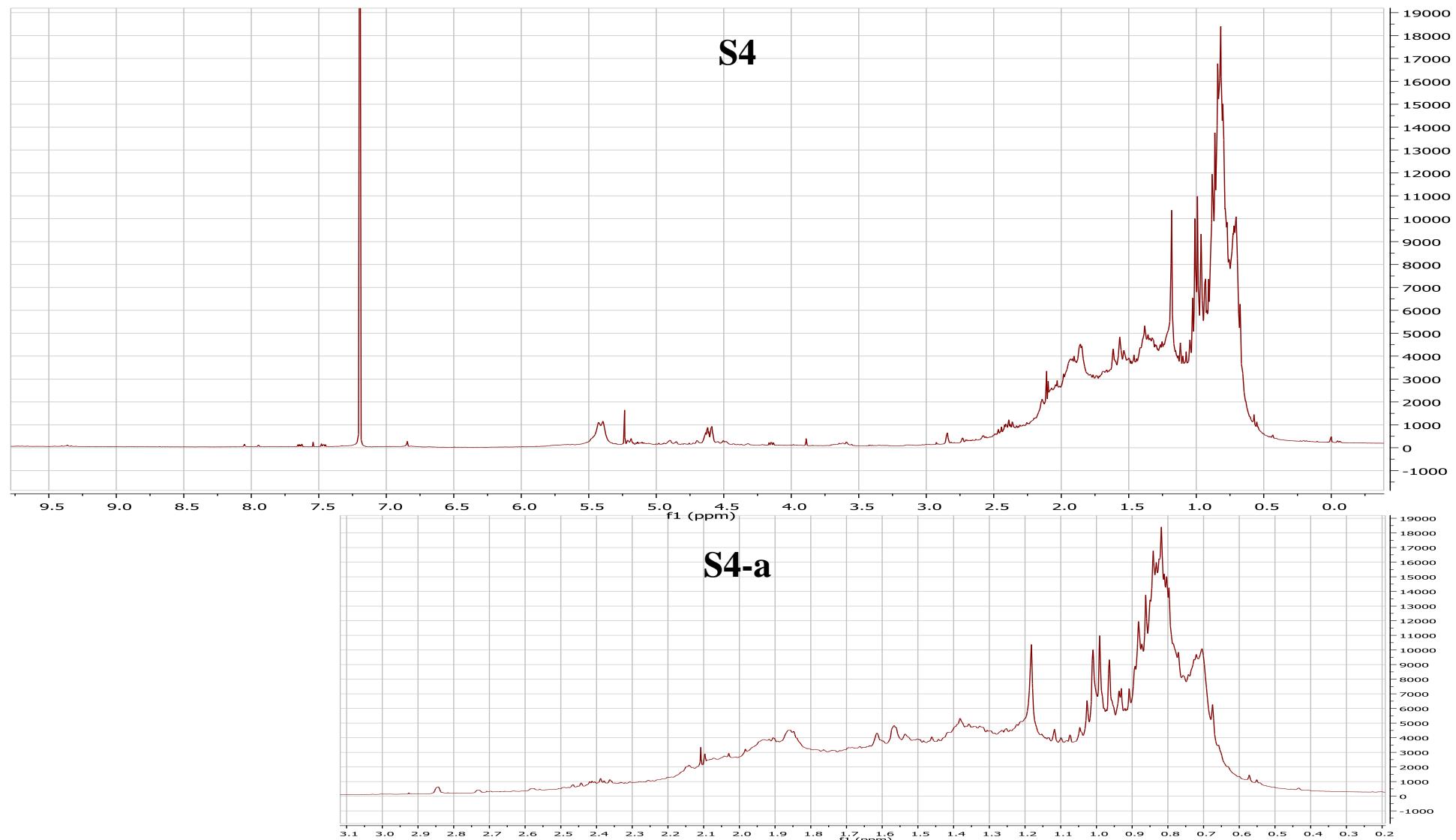
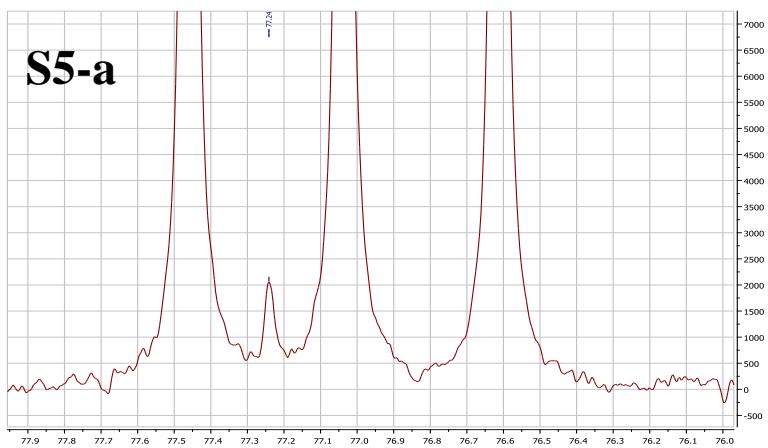
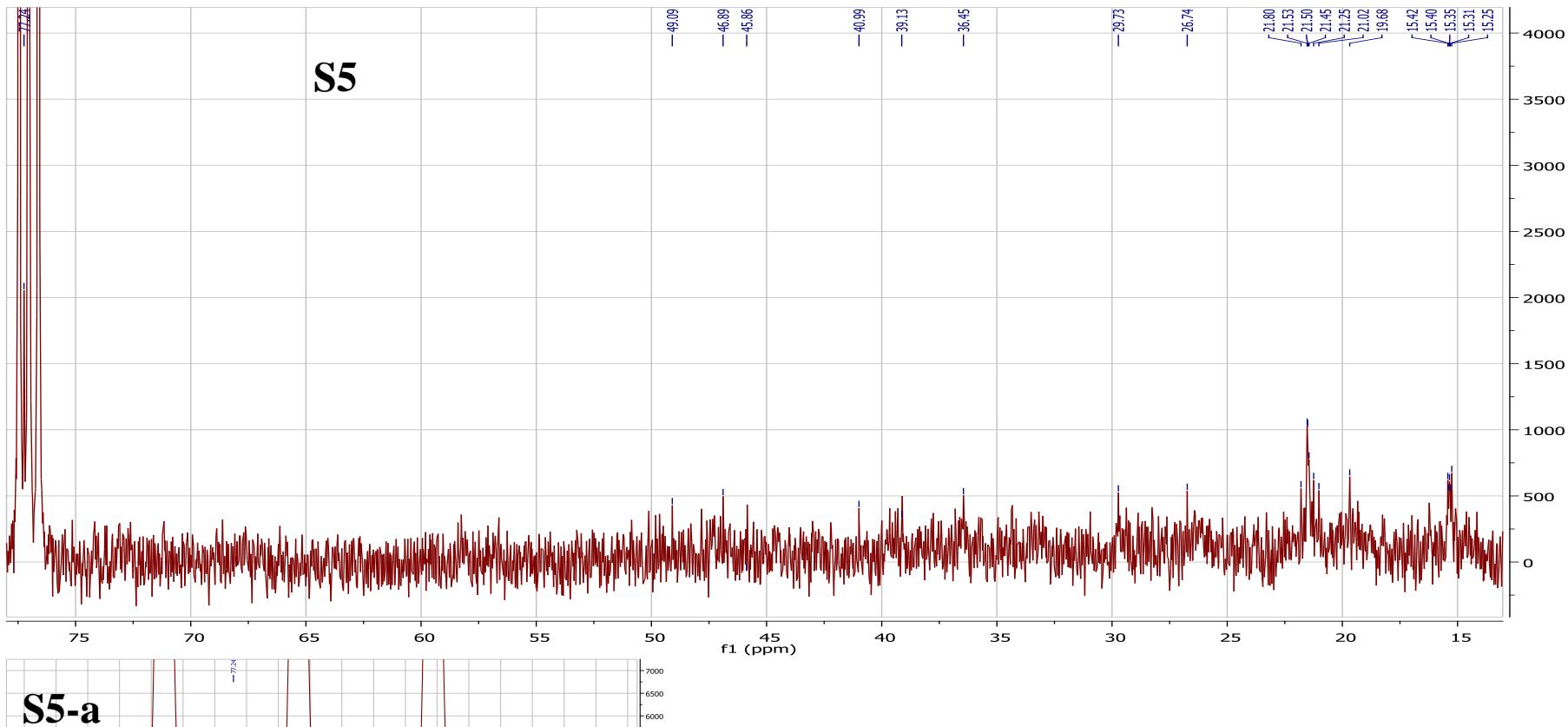


Figure 45: S4 Spectre RMN ^1H du produit G (4+5)-1,
S4-a étalement de S4



**Figure 46 : S5 Spectre RMN ^{13}C du produit G (4+5)-1,
S5-a étalement de S5**

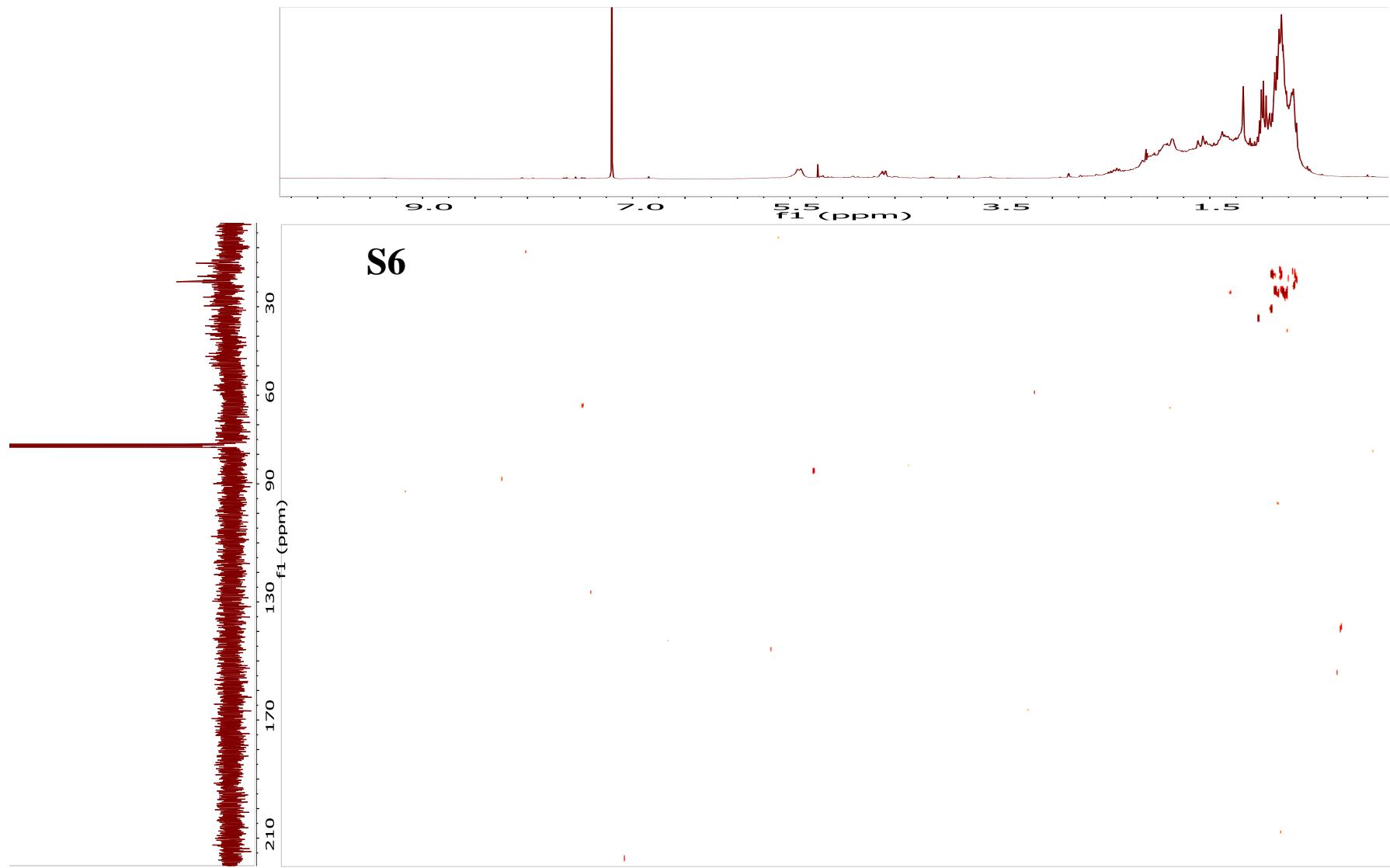


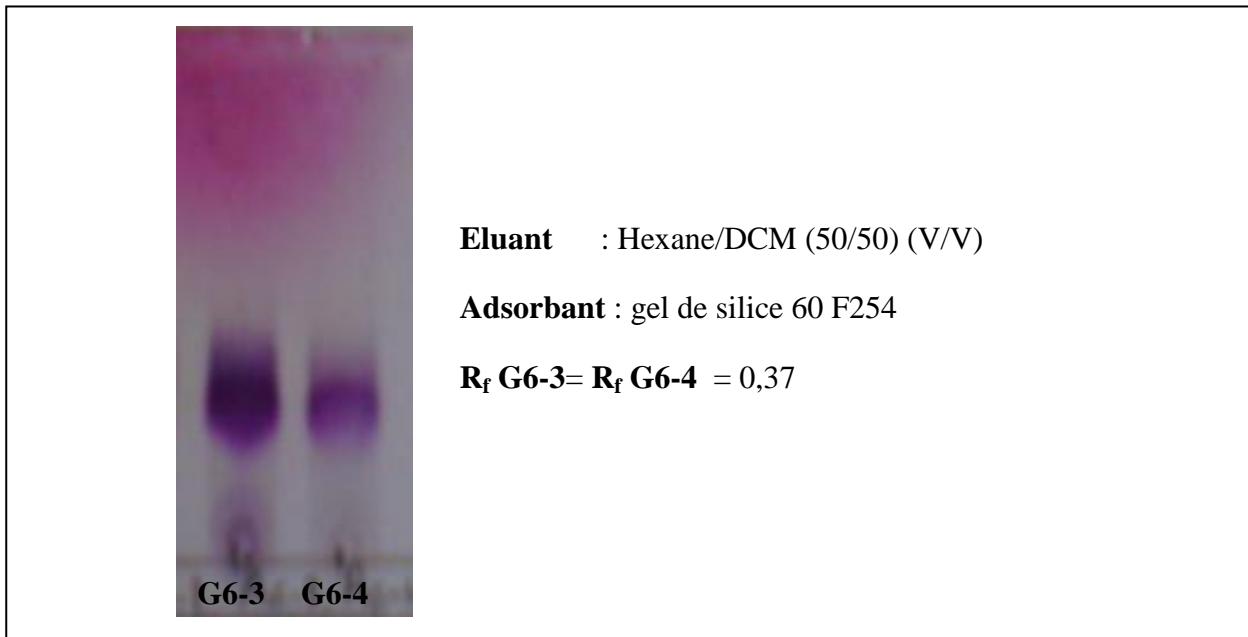
Figure 47 : S6 Spectre RMN HMQC du produit G (4+5)-1

II-3-3- Identification des produits G6-3 et G6-4 : élucidation des structures α -amyrenone et β -amyrenone

III-3-3-1 -Comparaison des profils chromatographiques de G6-3 et G6-4

La quantité plus importante de G6-4 a été le critère retenu dans le choix du produit à analyser.

Le chromatogramme en CCM et CPG de G6-4 sont portés sur la photographie 12 et figure 48. En CPG, 2 pics sont observés l'un à 29,35 min (minoritaire codé G641) et l'autre à 32,60 min (majoritaire codé G642).



Photographie 12 : Chromatogramme en CCM des produits G6-3 et G6-4

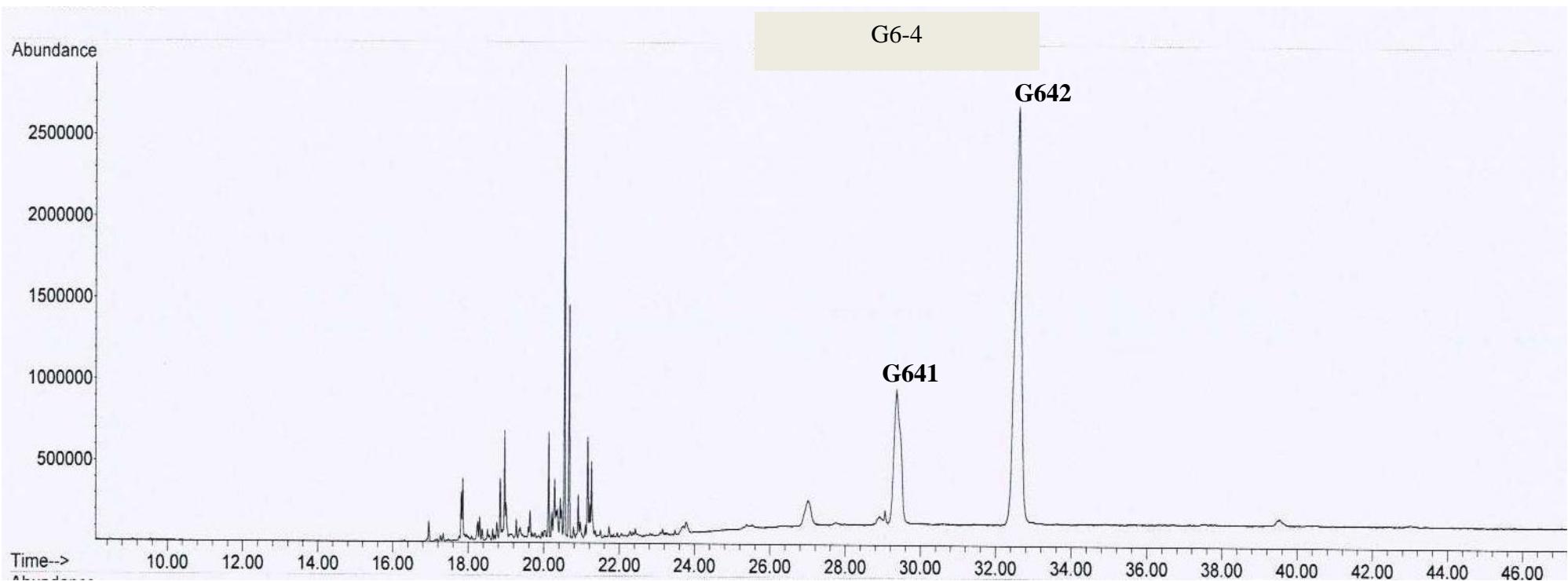


Figure 48: Chromatogramme du produit G6-4

III-3-3-2 -Examen du résultat CPG/SM du produit majoritaire G642

Le spectre de masse du produit majoritaire G642 (32,60 min) et le résultat de la comparaison avec les librairies numériques sont présentés dans la figure 51.

Le spectre de masse SM/IE du produit sortant à 32,60 min a montré les fragments suivants : 424 (M^+ , 5%) ; 409 (5%) ; 218 (pic de base, 100%) ; 203 (10%) ; 189 (10%), 55 (16%). Ces informations correspondent à un produit de masse moléculaire 424 g/mol, compatible à la formule brute $C_{30}H_{48}O$. D'après les données des librairies NIST et Wiley, combinées à celles de la littérature [12] [20][40][56][60], ce produit serait l' α -amyrenone (Urs-12-en-3-one).

Ainsi, le pic à $m/z= 218$, pic de base, proviendrait d'un mécanisme de type retro Diels-Alder par lequel l'ouverture de cycle par clivages homolytiques au niveau de l'ion moléculaire génère le radical cation constituant ce pic de base et une autre molécule neutre (non détectée).

Après éjection d'un groupement radical libre méthyle, l'ion à $m/z=218$ donne naissance au fragment dont le rapport est de $m/z=203$.

Le fragment à $m/z= 189$ résulte de la perte d'un groupe C_2H_5 de l'ion moléculaire, conduisant à la formation de deux nouvelles doubles liaisons éthyléniques, et à la formation d'un carbocation.

La fragmentation de l' α -amyrenone est présentée sur la figure 50.

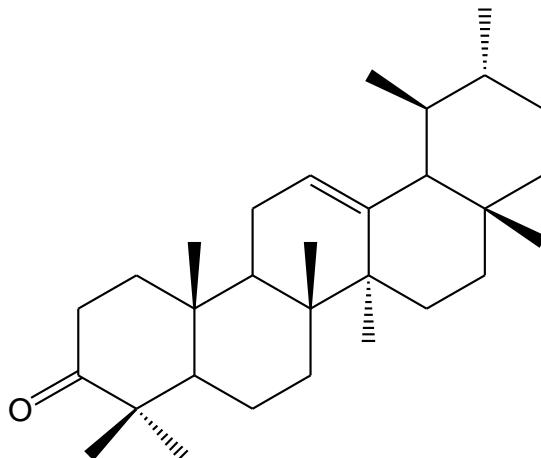


Figure 49 : Structure de l' α -amyrenone

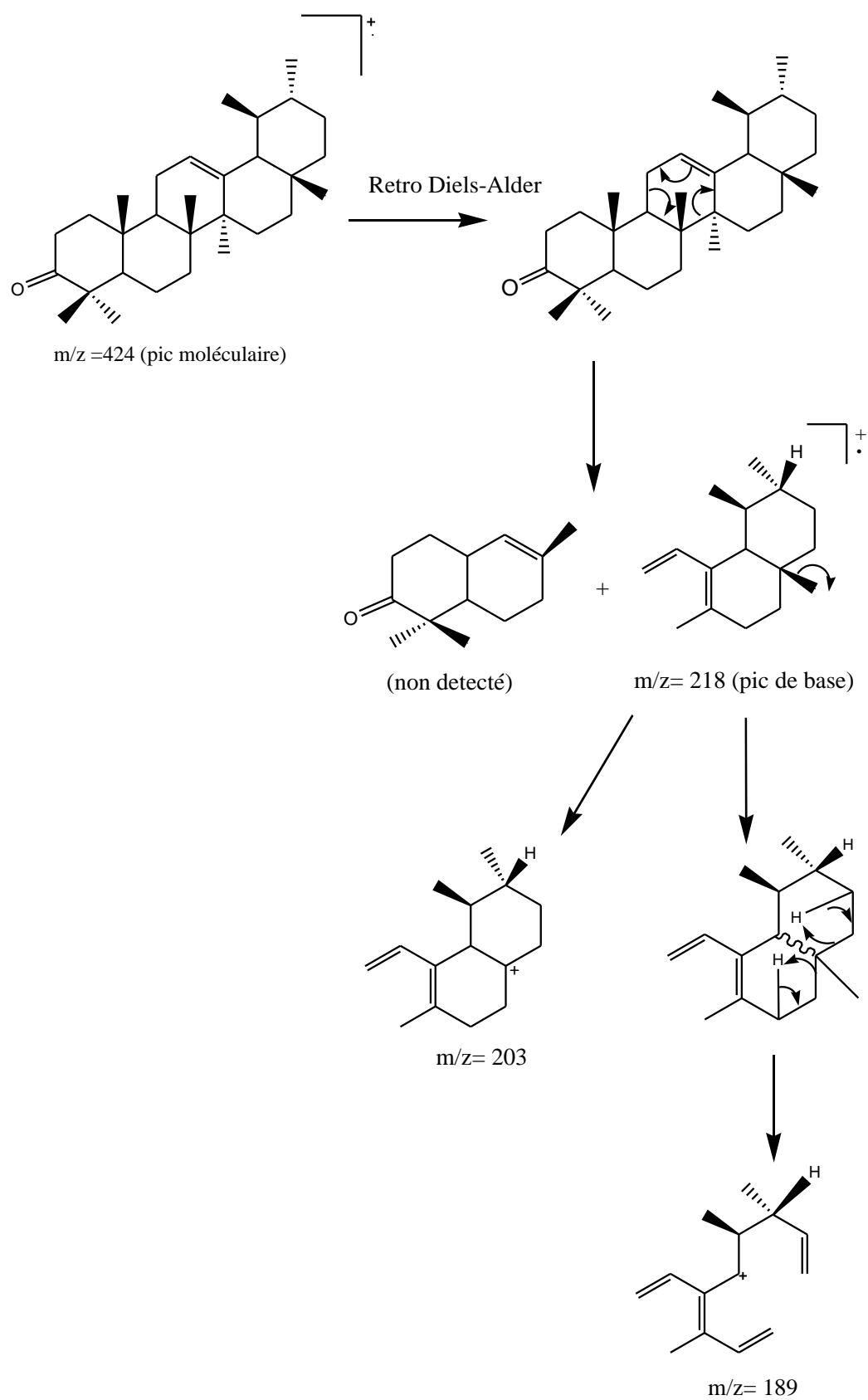


Figure 50 : Fragmentation $\text{l-}\alpha\text{-amyrenone}$ [12] [20] [40] [56] [60]

G642

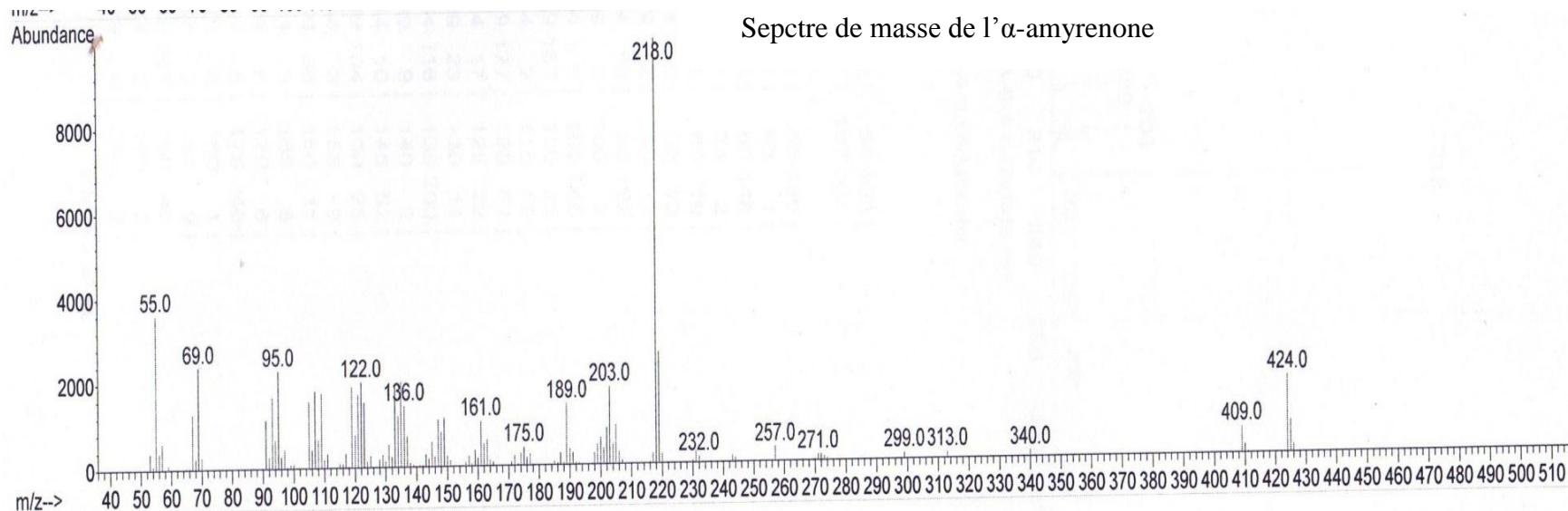
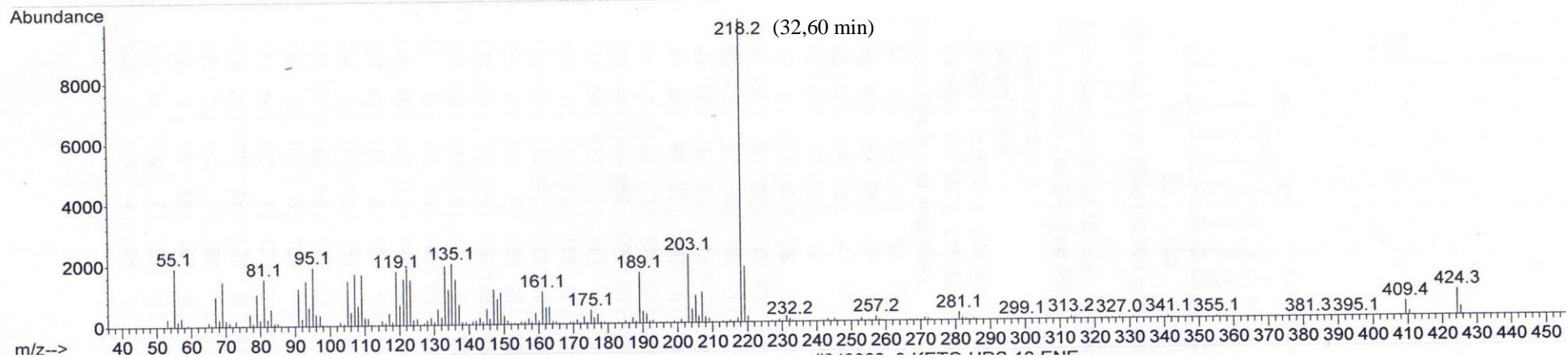


Figure 51 : Spectre de masse du produit majoritaire de G642, $t_R = 32,60$ min

III-3-3-3 - Examen du résultat CPG/SM du produit minoritaire G641

➤ **Exploitation du spectre CPG/SMIE:**

Le spectre de masse est présenté sur la figure 53.

Le spectre montre les fragments suivants : 424 (M+, 5%) ; 409 (3%) ; 218 (pic de base, 100%) ; 203 (60%) ; 189 (38%), 55 (12%).

D'après les données des librairies NIST et Wiley, combinées à celle des différentes références [12] [20] [40][56][60], le G642 correspondrait à un produit de masse moléculaire 424 g/mol, compatible à la formule brute $C_{30}H_{48}O$: le β -amyrenone (Olean-12-en-3-one).

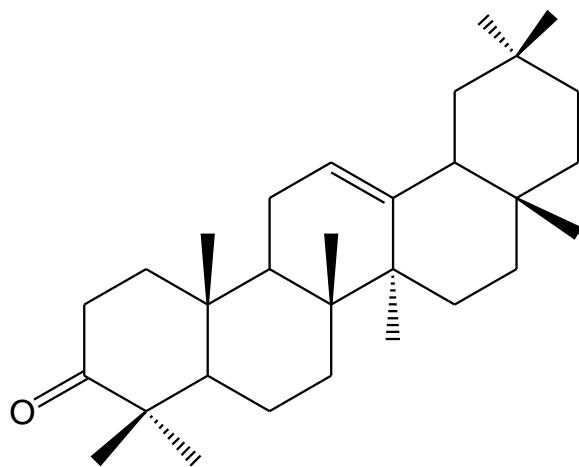


Figure 52 : Structure du β -amyrenone

On retrouve les mêmes fragments que l' α -amyrenone : cependant on remarque de nettes différences dans les pourcentages de certains pics.

G641

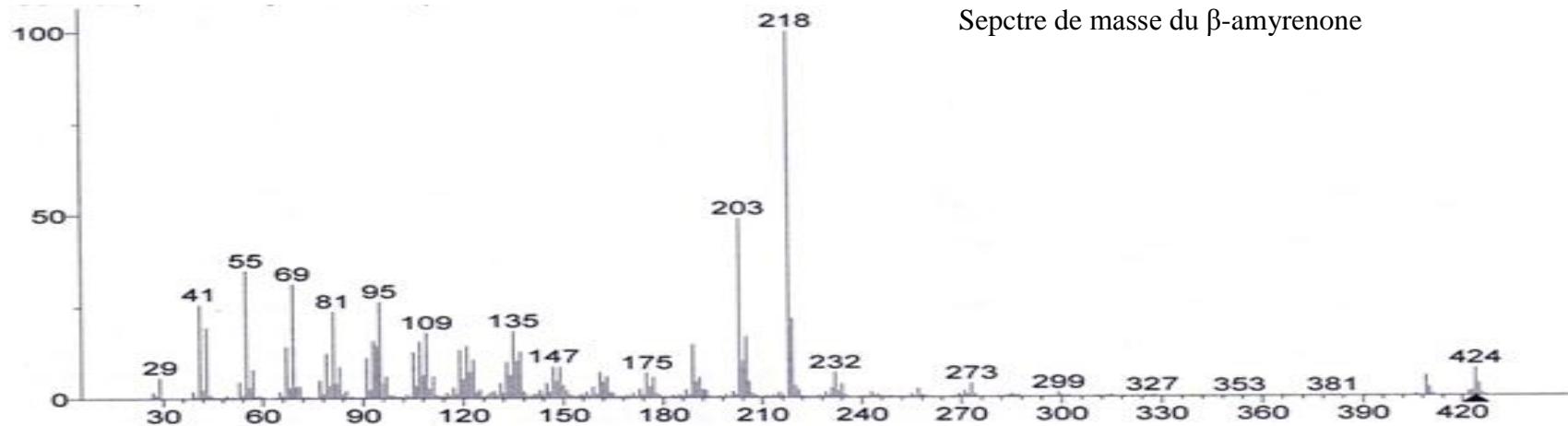
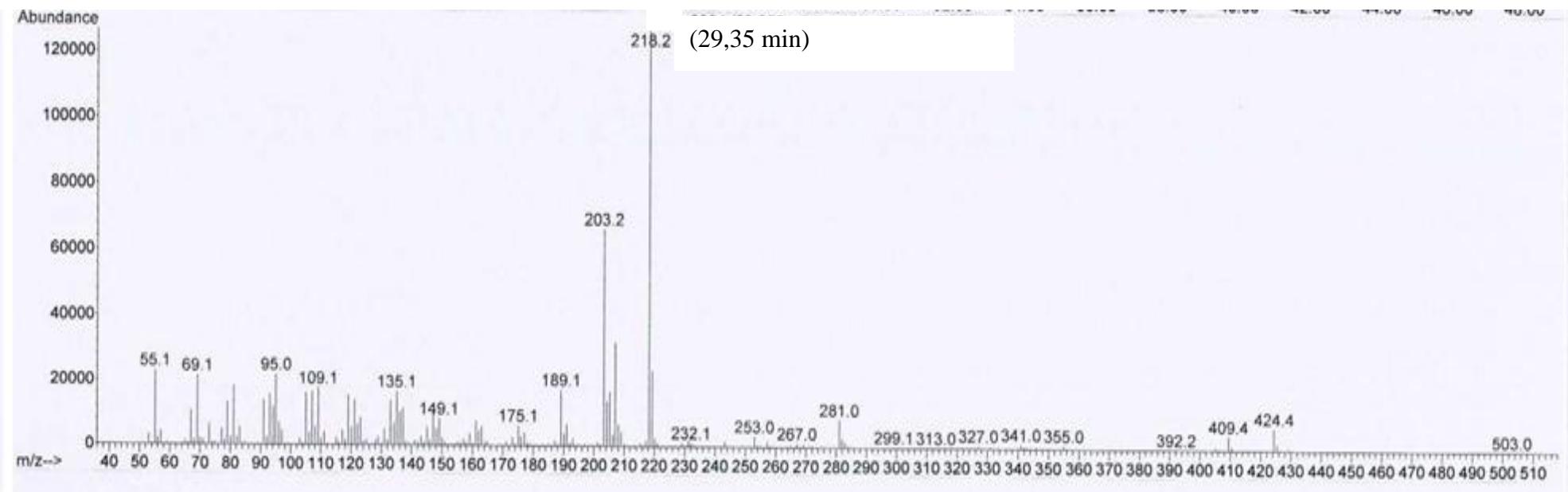


Figure 53: Spectre de masse du produit minoritaire de G641, $t_R = 29,35$ min

III-4-Résultats d'étude des constituants volatils

III-4-1-Extraction

Une étude cinétique de l'extraction par hydrodistillation de l'échantillon a été l'objet de cette partie de travail. Le premier prélèvement a été effectué au bout de 30min, la durée totale de l'expérience a été de 1h30

Les résultats obtenus sont portés sur le tableau17 :

Tableau17 : Evolution du volume d'huile essentielle cumulée en fonction du temps

Temps	0	0h30	1h	1h30	2h
Volume de l'HE cumulée (ml)	0	0,3	0,5	0,6	0,6

A partir d'une quantité de 45g de l'échantillon, un volume égal à 0,6 ml d'huile essentielle a été obtenu de 0,44g. Ce qui a donné un rendement moyen de 0,97% (masse/masse).

L'huile obtenue est un liquide limpide de couleur jaune claire moins dense que l'eau.

III-4-2-Identification des constituants par analyse en CPG/FID

Les chromatogrammes obtenus sont portés sur la :

- **figure 54:** chromatogramme A de l'HE pure analysée sur CPG OV101;
- et **figure 55** : chromatogramme B du mélange HE pure et d'alcanes (C10-C20) coinjecté sur CPG OV101.

Les constituants ont été identifiés à partir de leurs indices de Kovats.

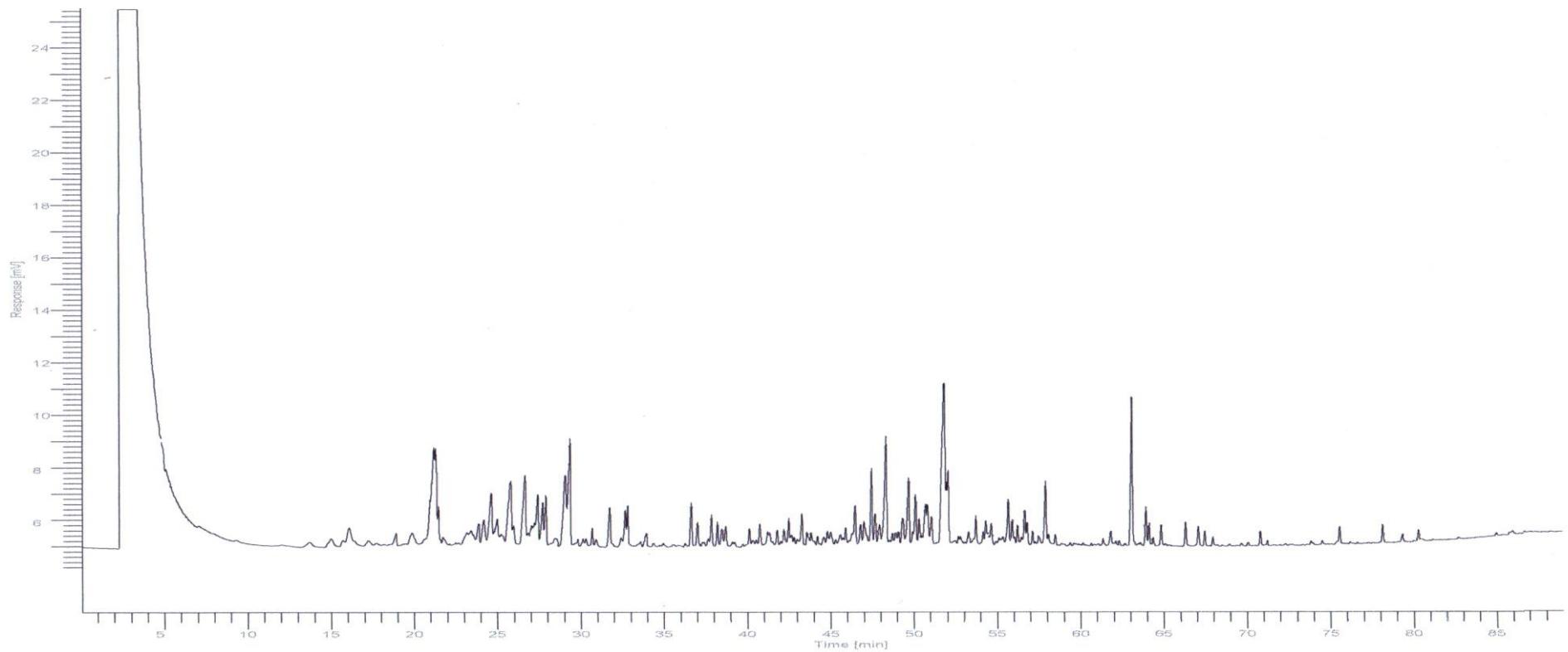


Figure 54: Chromatogramme A de l'HE pure analysée sur CPG OV101

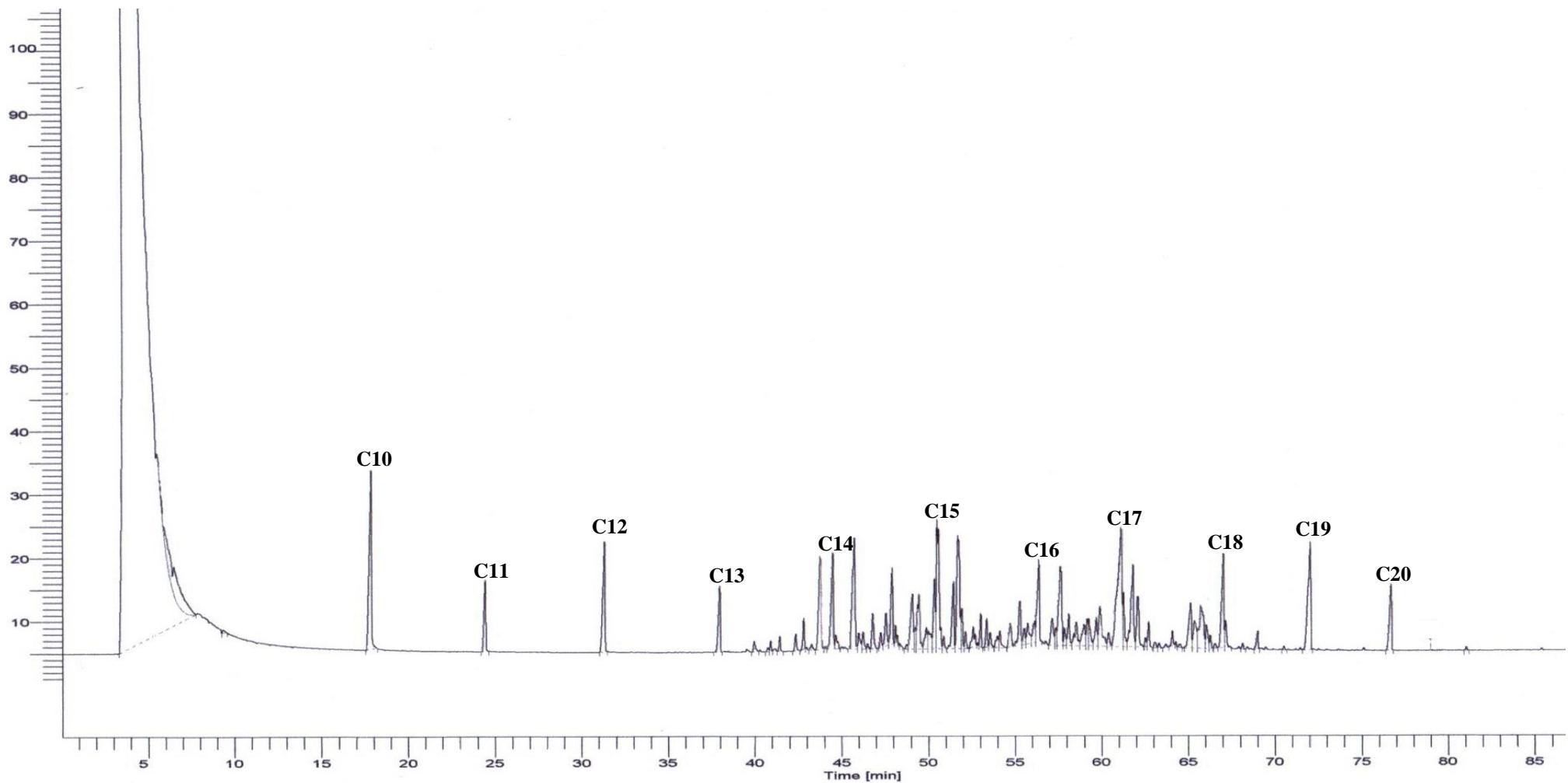


Figure 55 : Chromatogramme B du mélange HE pure et d'alcanes (C10-C20)
coinjecté sur CPG OV101.

Les résultats du calcul des IK sont rassemblés dans le tableau18 :

Tableau 18:COLONNE B (OV101)

	N° du pic	Tr du constituant	Tenneur en %	IK calculé	IK littérature [59]	Proposition de nom du constituant
1	8	40,00	0,03	1330	1330	Cinnamyl formate
2	10	40,95	0,02	1344	1344	Cyclohexyl glycidate
3	11	41,48	0,03	1353	1353	2-methyl lundecanal
4	13	42,83	0,07	1373	1373	n-butyl n-octanoate
5	14	43,32	0,02	1381	1381	acetyl cymene
6	15	43,84	0,30	1389	1389	p-cresyl isovalerate
7	18	45,81	0,47	1420	1420	Linalyl n-butyrate
8	19	46,04	0,05	1424	1424	Geranyl n-propionate
9	20	46,28	0,05	1428	1428	caryophyllene
10	22	46,84	0,10	1437	1437	Gamma-decalactone
11	23	47,30	0,04	1445	1445	Beta-copaene
12	24	47,22	0,10	1450	1450	Linalyl 2-methyl butyrate
13	27	48,40	0,01	1463	1463	Delta-decalactone
14	28	48,80	0,01	1470	1470	n-hexyl n-heptanoate
15	29	49,15	0,24	1476	1476	Gamma-muurolene
16	30	49,27	0,04	1478	1478	alloaromadendrene
17	31	49,52	0,23	1482	1482	p-cresyl isotyglate
18	33	50,04	0,09	1491	1491	Isopropyl n-methyl lanthanilate
19	36	50,92	0,03	1508	1508	Anis aldehyde propyleneglycol acetal
20	37	51,50	0,21	1515	1515	Cinnamyl n-undecanoate
21	38	51,77	0,51	1520	1520	Anisyl isobutyrate
22	40	52,18	0,05	1527	1527	n-propyl anisate
23	41	52,62	0,08	1534	1534	di-n-butyl succinate
24	42	53,06	0,07	1542	1542	Gamma-undecalactone
25	45	54,03	0,04	1558	1558	Citronellyl crotonate
26	48	55,33	0,16	1580	1580	Methyl n-dodecyl ketone
27	49	55,57	0,05	1585	1585	Alpha cedrene epoxyde
28	50	55,78	0,09	1588	1588	2-nonanoylfurane
29	54	57,40	0,05	1620	1620	Benzyl n-heptanoate
30	57	58,15	0,09	1635	1635	Phenylpropyl n-valerate
31	59	59,03	0,11	1654	1654	Cis-3-hexenyl salcylate
32	60	59,22	0,06	1658	1658	di-n-butyl adipate
33	61	59,30	0,09	1660	1660	Furfuryl disulfide
34	63	59,61	0,20	1673	1673	Trans-2-hexenyl n-nonanoate
35	71	63,09	0,02	1732	1732	n-amyl anisate
36	73	64,11	0,04	1749	1749	Bornyl benzoate

Ainsi, 36 constituants de teneur totale correspondaient à 3,59% en masse de l'huile essentielle. Le p-cresyl isovalerate(0,30%), le linalyl n-butyrate(0,47%), le linalyl n-valerate (0,54%) et l'anisyl isobutyrate (0,51%) ont été définis comme majoritaires dans l'huile, correspondant à 1,82% de ces constituants.

Conclusion partielle

Les protocoles analytiques adoptés pour l'étude de l'échantillon de produit résineux qui nous a été confié ont permis d'isoler et d'identifier ses constituants. En effet, les extractions par solvants suivis de diverses chromatographies ont conduit à l'isolement d'une dizaine de produits dont 5 structures ont été déterminées par CPG/SM et par spectroscopie de RMN: l' α -amyrine, la β -amyrine, l' α -amyrenone, le β -amyrenone et l'épi- ψ -taraxastananol. Ils appartiennent tous à la famille des triterpénoides. Ces résultats sont compatibles avec ceux du criblage chimique préliminaire. L'analyse des structures des autres produits sont en cours.

En ce qui concerne l'étude des composés volatils, l'hydrodistillation de l'échantillon a révélé la présence d'huile essentielle. L'analyse en CPG/FID de cette dernière a permis l'identification de 36 constituants dont des monoterpéniques et des sesquiterpéniques.

CONCLUSION GENERALE

Les produits résineux font partie des richesses naturelles de Madagascar. Ils sont encore peu étudiés.

La présente étude est le fruit de l'étroite collaboration entre le LCOSM et le CNARP. Le thème du travail a été axé sur les matières résineuses de la côte Ouest de Madagascar, un des axes de recherches au sein de CNARP. L'étude a été portée sur l'identification des constituants chimiques de l'échantillon par des procédés chimiques préliminaires : extractions, purification et isolement de molécules non volatiles. Puis identification structurale des produits isolés. Ces recherches ont été réalisées grâce à l'utilisation de diverses techniques d'extractions, et de méthodes chromatographiques et spectrales.

Les tests chimiques préliminaires ont montré la présence de triterpénoides. Le fractionnement et purification de l'extrait dichlorométhanique ont permis d'isoler une dizaine de produits qui ont été soumis à des analyses par CPG/SM et RMN. Jusqu'à présent, 5 structures de triterpénoides ont été identifiées celles de l' α -amyrine, la β -amyrine, l' α -amyrenone, le β -amyrenone et l'épi- ψ -taraxastananol.

En ce qui concerne l'étude des composés volatils, l'hydrodistillation de l'échantillon a montré la présence d'huile essentielle. L'analyse en CPG/FID de cette huile a permis l'identification de constituants monoterpéniques et sesquiterpéniques, en exemples le gamma-muurolène, linalyl n-butyrate, anisyl isobutyrate, citronellyl crotonate.

En tenant compte des structures chimiques identifiées qui sont des triterpènes, l'échantillon étudié correspondrait à une résine triterpénique. En se référant à la littérature les compositions de cette résine triterpénique est proche de celle de la myrrhe. En effet, l' α -amyrine et la β -amyrine sont les produits majoritaires dans la myrrhe, ces mêmes produits sont aussi majoritaires dans cet échantillon. La myrrhe est utilisée comme encens et son huile essentielle est exploitée dans la parfumerie.

A part le côté recherche sur l'évaluation de l'échantillon de résine, les expériences réalisées dans ce mémoire nous ont permis :

- d'appliquer les acquis au cours de notre formation, notamment sur la chimie analytique ;
- de nous familiariser avec les techniques d'extraction, d'isolement et d'analyse de composés dans le domaine des Produits Naturels (chromatographies, méthodes spectrales).

Les résultats obtenus sont encourageants, ainsi nous prévoyons de poursuivre les travaux sur les produits résineux.

Afin de confirmer son origine, les travaux en cours sur cet échantillon consistent aux examens des spectres des produits en cours de détermination structurale (G1-1 et G17).

Identifier d'autres produits résineux de Madagascar par analyse chimique de leurs constituants est aussi envisagé : ce qui contribue à la valorisation des différentes richesses en biodiversité.

REFERENCES

REFERENCES

- [1] Association Française de Normalisation, (1992). Recueil de normes Françaises “Huiles essentielles”, AFNOR, Paris. 798 p
- [2] ALURI JACOB S.R., PAKKURTI V.L. et KUNUKU V.R. (2012). Entomophily, Ornithophily and Anemochory in the Highly Self-incompatible *Boswellia ovalifoliolata* Bal. & Henry (*Burseraceae*), *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series.B: Biological Science* **56(1)**, pp 1-10
- [3] ANA GUTIEÄ RREZ, ISABEL M. RODRIÄGUEZ, et JOSEÄ C. DEL RIÄO, (2006). Chemical Characterization of Lignin and Lipid Fractions in Industrial Hemp Bast Fibers Used for Manufacturing High-Quality Paper Pulps, *J. Agric. Food Chem.* **54**, pp.2138-2144
- [4] ASHUTOSH HAR, (2003). Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology, *New age international limited*, pp 234-347
- [5] BABRIA FARID A., BOTROS R. MIKHAEL, GALAL T. MAATOOQ, AND MOHAMED M. A. AMER. (2003). “Immunomodulatory Triterpenoids from the Oleogum Resin of *Boswellia carterii* Birdwood”- *Z. Naturforsch.* **58c**, pp 505-516
- [6] BRAHIM HARKATI, (2011). Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille: *Scorzonera Undulata*. Mémoire de doctorat, Université de Mentouri-Constantine, pp 32-35.
- [7] BRAY PS, ANDERSON KB, (2009). Identification of carboniferous (320 million years old) class, *Ic amber. Science* **326** (5949), pp 132-134
- [8] BRIAN M. Lawrence, (1993). Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. Manuel pratique Corporation LASEVE, 142 p
- [9] BRUNETON J.J. (1993). Pharmacognosie, Phytochimie, *Plantes médicinales*. 2^{ème} Ed. Technique-Documentation Lavoisier, 1119 p
- [10] BRUNETON J.J., (1999). Phytochimie de plantes médicinales. *Pharmacognosie*. 3^{ème} Ed, pp 463-569
- [11] CATHARINA E. FINGOLO, THABATA DE S. SANTSOS, MARCELO D. M. VIANNA FILHO et MARIA AUXILIADORA C. KAPLAN, (2013). Triterpene Esters: Natural Products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae), *J. Molecules* **18**, pp 4247-4256

- [12] CAROLE MATHE, GÉRALD CULIOLI, PAUL ARCHIER, CATHY VIEILLESCAZES. (2004) Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1023**, pp 277–285
- [13] CELINE DAHER, (2012). *Analyse par spectroscopies Raman et infrarouge de matériaux naturels organiques issus d'objets du patrimoine : méthodologies et applications*. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, HAL Archives-ouverte, pp 14-15.
- [14] CHING SHEN, SHI-YIE C., YAO-HAUR K., TSONG-LONG H., MICHAEL Y. CHIANG, et ASHRAF TAHA K. (2007). Chemical Transformation and Biological Activities of Ambrein, a Major Product of Ambergris from Physeter macrocephalus(Sperm Whale), *Journal of Natural Products*, **70(2)**, pp 147-153
- [15] CONSTANTIN E. (1996). Spectrométrie de masse. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp 1-14
- [16] E. S. H. El Ashry, N. Rashed, O. M. Salama, A. Saleh, (2003). Components, therapeutic value and uses of myrrh, *Pharmazie* **58**, pp 163–168
- [17] EDWARDS H.G.M., STERN B., BURGIO L. et KITE M. (2009). Analysis of yellow "fat" deposits on Inuit boots, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **73**, pp 561-565
- [18] EGON, S. et al, 1975. Analyses chromatographiques et microscopiques des drogues, pp 13-27
- [19] E. LEDERER, F. MARX, D. MERCIER, G. PEROT. (1946). Sur les constituants de l'ambre gris II. Ambréine et Coprostanone, *Helvetica Chimica Acta*, **29 (5)**, pp 1354-1365
- [20] FABIOLA ESCALANTE-EROSA, ILKA ORTEGON-CAMPOS, VICTOR PARRA-TABLA, et LUIS M. PEÑA-RODRIGUEZ, (2004). Chemical Composition of the Epicuticular Wax of *Cnidoscolus aconitifolius*. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **48**, pp 24-25
- [21] F. ROUESSAC, A. ROUESSAC, (1994). Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes, 2nd Ed. Masson Paris – Milan – Barcelone, 303 p.
- [22] H. CAMPS-FABRER, (1986). « Ambre », *Encyclopédie berbère*, 4, *Alger – Amzwar, Aix-en-Provence*, Edisud, pp 569-576
- [23] HELMUT, D. 1969, chromatographie sur gel, pp 25-27.

- [24] H. Günther, (1995). NMR Spectroscopy – Basic principles, Concepts and Applications in Chemistry', 2nd Ed. John Wiley & sons, 405 p.
- [25] J. P. HALUK, (2005). Les arbres à parfums. The perfume trees. *Bulletin de l'Académie Lorraine des Sciences*, **44**, pp 1-4
- [26] JORGE SANTIAGO-BLAY, JOSEPH LAMBERT, (2007). Aux sources de l'ambre. *Pour la Science*, **356**, pp 70-75
- [27] JULIO BENITES, JOSE LOPEZ, JORGE G. FARIAS et MANUEL CORTES , (2006). The preparation of Oxygenated derivatives of Ambrox and Isoambrox from drimenol. *J. Chil. Chem. Soc.*, **51**(3), pp 979-981
- [28] KATHLEEN BRIDGET BROOKES, (2004). *Chemical Investigation of Isihlambezo or traditional Pregnancy-related medicines*. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy, 327 p
- [29] KEN B. ANDERSON, (2001). The nature and fate of natural resins in the geosphere
Part XI. Ruthenium tetroxide oxidation of a mature Class Ib amber Polymer. *Geochemical transaction 3, Chemistry Division*, Argonne National Laboratory, Argonne, IL, **60439**, USA, pp 10
- [30] KOTKAR PARIMAL, ANUBHA KHALE et KADU PRAMOD, (2011). Resins from herbal origin and focus on their applications. *IJPSR*, **2**(5), pp 1077-1085
- [31] LANGENHEIM J.H., (2003). Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany, *Eds., Timber Press*, pp 601-612
- [32] LAMPERT C.D., (2003). The characterisation and radiocarbon dating of archaeological resins on Southeast Asian ceramics. PHD Thesis, University of Bradford, pp 65-74
- [33] L. HENLIX, (1935). Etudes sur le copal de Congo. Mém. Inst Royal colonial Belge, pp 8-24
- [34] LILIANA HERNANDEZ V., JAVIER P. et ARTURO N. O. (2012). The Pentacyclic Triterpenes α, β -amyrins. *A Review of Sources and Biological Activitie*. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), 489 pages
- [35] LI PING CHENG, LI XU, HAI FANG MAO et GEN LI WANG, (2008). Study of structural and electronic origin of ambergris odor of some compounds. *J Mol Model* 15, pp 1-8

- [36] MANAL ABBAS, AHMAD DISI, SULEIMAN AL-KHALIL, (2009). Isolation and Identification of Anti-Ulcer Components from Anchusa Strigosa Root. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. **2** (2), pp 131-139
- [37] MATUSZEWSKA et A. JOHN, (2004). Some possibilities of Thin layer chromatographic analysis of the molecular phase of Baltic Amber and other natural resins, *Acta Chromatographica* 14, pp 83
- [38] MC. YAMILET I. GUTIERREZ GAITEN, (2011). Estudio Farmacognóstico de *Phyllanthus orbicularis* HBK, especie endémica de Cuba, Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, pp 45-67
- [39] MILLS J.S. et WHITE R., (1977). Natural resins of art and archaeology - Their sources, chemistry and identification. *Studies in Conservation*, 22, pp 12-31
- [40] M. DA PAZ LIMA, PATRICIA A. DE CAMPOS BRAGA, MARIO LOPES MACEDO, M. FATIMA DAS G. F. DA SILVA, A. GILBERTO FERREIRAB, JOÃO B. FERNANDES et PAULO C. VIEIRA. , (2004). Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic Implications. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. **15**(3), pp 385-394
- [41] MULUGETA LEMENIH et DEMEL TEKETAY, (2003). *Frankincense and Myrrh resources of Ethiopia*, II Medicinal and industrial uses. Faculty of Science, Addis Ababa University, SINET: *Ethiop. J. Sci.*, **26**(2), pp 161–172
- [42] N'GUESSAN K., KADJA B., ZIRIHI G., TRAORE D. et AKE-ASSI L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubou (Agboville, Côte-d'Ivoire); *Sciences & Nature* **6** (1), pp 1-15
- [43] NORBERT VAVRA, (1990). Chemical Characterization of Fossil Resins ("Amber") - A Critical Review of Methods, Problems and Possibilities: Determination of Mineral Species, Botanical Sources and Geographical Attribution. *125 Jahre Knappenwand - 125 years Knappenwand Proceedings of a Symposiumheld in Neukirchen am Großvenediger (Salzburg/Austria)*, pp 150
- [44] ORITANI, KYOHEI YAMASHITA et MASANAO MATSUI, (1970). Chemical Studies on Ambergris, *Agr. Biol. Chem.*, **34**(8), pp 1244-1248.
- [45] PAUL ARSIC. Ambre jaune Pierre elixir suivi de amber vif ou solution philosophique. La TILV, éditeur, pp 15-38

- [46] PAULINE BURGER, (2008). Caractérisation Moléculaires de résines végétales archéologiques et actuelles, Thése de Doctorat Université Louis Pasteur de Strasbourg, pp 40-42
- [47] PHILIP A. CHRISTENSON, BRIAN J. WILLIS, FELIX W. WEHRLI, LB AND SUZANNE WEHRLILB, (1982). Chemistry of Ambergris. 1. A Short Synthesis of alpha-Ambrinol. *J. Org. Chem.* **(47)**, pp 4786-4789
- [48] QURESHI N., PORTER. J.W. (1981) In biosynthesis of isoprenoid compound, New yourk, pp 47-94
- [49] ROBERT CLARKE, (2006). The origin of amber gris, *LAJAM* **5** (1), pp 7-21
- [50] SANTANU SAHAA, E. V. S. SUBRAHMANYAMC, CHANDRASHEKAR KODANGALAD, SHASHIDHARA C. SHAstryB, (2011). Isolation and characterization of triterpenoids and fatty acid esterof triterpenoid from leaves of *Bauhinia variegata*, *Der Pharma Chemica* **3** (4), pp 28-37
- [51] SIANI A. C., et al. (2012). Chemical Composition of South American Burseraceae Nonvolatile Oleoresins and Preliminary Solubility Assessment of their Commercial Blend. *Phytochem. Anal.*, **23**, pp 529–539
- [52] SELL C. (1990). Chemistry of amber gris. *Chemistry and Industry* (London), pp 516-520.
- [53] SILVIA ALBERO CARBONELL, FRANCISCO RADLER DE AQUINO NETO, JARI NOBREGA CARDOSO, AND ALBERTO DOS SANTOS PEREIRA, (2000). Rapid Screening of Natural Products by High-Resolution High-Temperature Gas Chromatography, *Journal of Chromatographic Science*, Vol. **38**, pp 56-93
- [54] THILIVHALI EMMANUEL TSHIKALANGE, (2007). *In vitro* anti-HIV-1 properties of ethnobotanically selected South African plants used in the treatment of sexually transmitted diseases, Doctor of Philosophiae: (Option) Medicinal Plant Science, University of Pretoria, pp 47-102
- [55] UFUK KOLAK, GÜLAÇTI TOPCU, SEHER BİRTEKSÖZ, GÜLTEN OTÜK, AYHAN ULUBELEN, (2005). Terpenoids and Steroids from the Roots of *SalviaBlepharochlaena* Turk. *J. Chem.* **29**, pp 177 – 186.

- [56] VANNA FRANCINE DE CASTRO ISHIDA, GIUSEPPINA NEGRI, ANTONIO SALATINO C, MARIA FULGÊNCIA C.L. BANDEIRA, (2011). A new type of Brazilian propolis. Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria, *Food Chemistry* **125**, pp 966–972
- [57] VENKATA SAI PRAKASH, CHATUR VEDULA et INDRA PRAKASH, (2013). Ursane and Oleane triterpenes from *Astragalus Propinquus*, *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences* 2013, Vol. **2**(4), pp 503-506
- [58] WALTER JENNINGS, TAKAYUKI SHIBAMOTO, (1980). Qualitative Analysis of Flavor and fragrance volatiles by glass capillary Gas chromatography. *Academic press*,pp 59-85
- [59] WAHLBERG INGER , KERSTIN KARLSSON et KURT R. E. (1972). Non-volatile constituents of Deertong Leaf, *Acta Chemica Scandinavica* **26** , pp 1383-1388
- [60] ZHEN-LING LIU AND XUAN TIAN, (2004) The Components of *Cacalia tangutica* *Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. **25**(7), pp 1079-1080

ANNEXES

Annexe I

1. Préparation de réactifs

Révélateur: réactif de vanilline perchlorique sulfurique

Solution A : On mélange 0,5g de vanilline dans 50mL d'éthanol

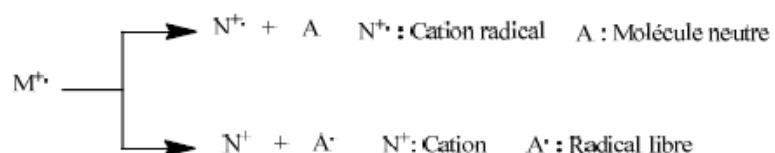
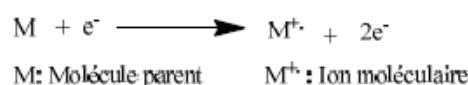
Solution B : 2mL d'acide perchlorhydrique (HClO₄, 60%) a été mélangé dans 38mL d'eau au moment de l'emploi, la solution A et la solution B sont mélangées à volumes égaux.

Solution C(Préparation H₂SO₄, 30%) : Un volume de 10,26mL H₂SO₄ concentré a été dilué avec 18mL d'eau distillé. Cette quantité a été ajustée par ajout de l'eau jusqu'à obtenir un volume finale égale à 60mL.

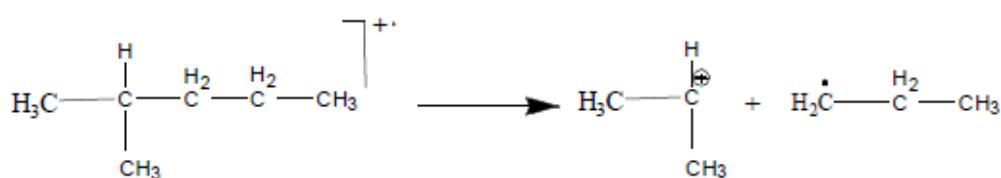
Révélation: Au moment de la révélation, la pulvérisation de la plaque s'est effectuée en deux temps. Pulvérisation par le mélange (solution A + solution B), puis par la solution C suivit dechauffage.

2. Modes de fragmentation en SM

En Impact électronique, des électrons émis par un filament rencontrent les molécules quientrent dans la source : lors de la rencontre, si l'énergie cinétique des électrons est suffisante, unélectron est arraché de la molécule M, la transformant en un ion radical M⁺. Celui-ci peut ensuite se fragmenter suivant son énergie interne. L'IE conduit ainsi à un spectre assez fourni, avec de nombreux fragments, très riche en informations structurales.

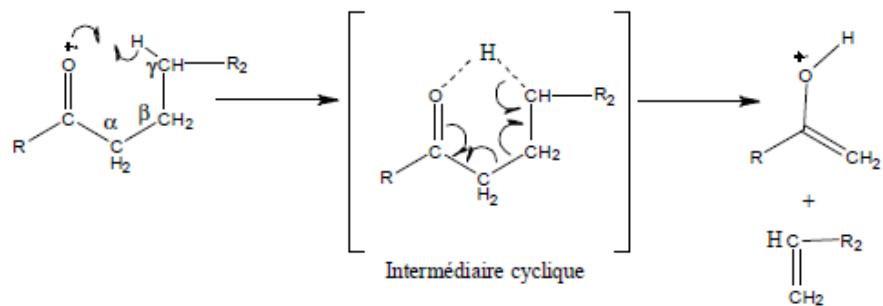


Rupture au niveau du carbone le plus substitué (le moins hydrogéné) :



Fragmentation retro DIELS-ALDER :

Elle a lieu lorsqu'une structure cyclique comporte une double liaison. Elle donne naissance à deux fragments : énique neutre et diénique. La réaction de rupture de liaison est concertée.



Annexe II

Tableaux du purification des groupes et isolement des molécules

➤ *Isolement de G₁-1, G₁-2 et G₁-3*

Masse de G₁= 106,4mg

N° du composé	Phase mobile	Volume utilisé (ml)	Fractions	Masse (mg)	Rendement (%)
G ₁ -1	Hexane-DCM 80-20	50	1-8	33,8	31,76
G ₁ -2			9-18	6,2	5,82
G ₁ -3			19-25	14,4	13,53

➤ *Isolement de G₍₄₊₅₎-1, G₍₄₊₅₎-2 et G₍₄₊₅₎-3*

Masse de G₍₄₊₅₎= 86,1mg

N° du composé	Phase mobile	Volume utilisé (ml)	Fractions	Masse (mg)	Rendement (%)
G ₍₄₊₅₎ -1	Hexane-DCM 70-30	50	1-13	12,1	14,05
G ₍₄₊₅₎ -2			14-20	27,8	32,28
G ₍₄₊₅₎ -3			21-25	36,3	42,16

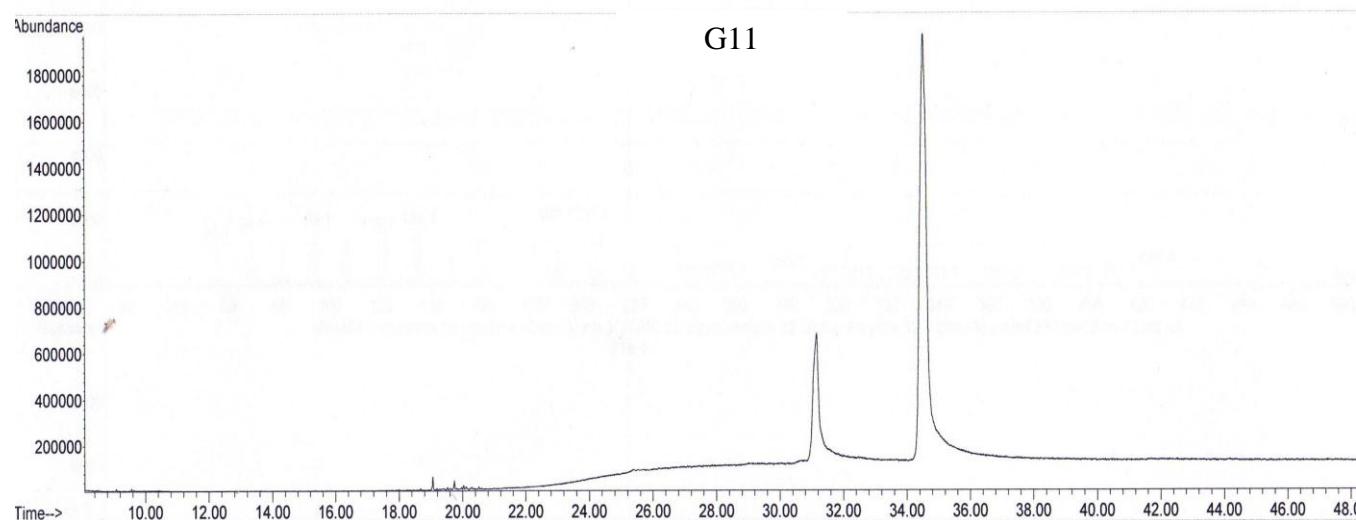
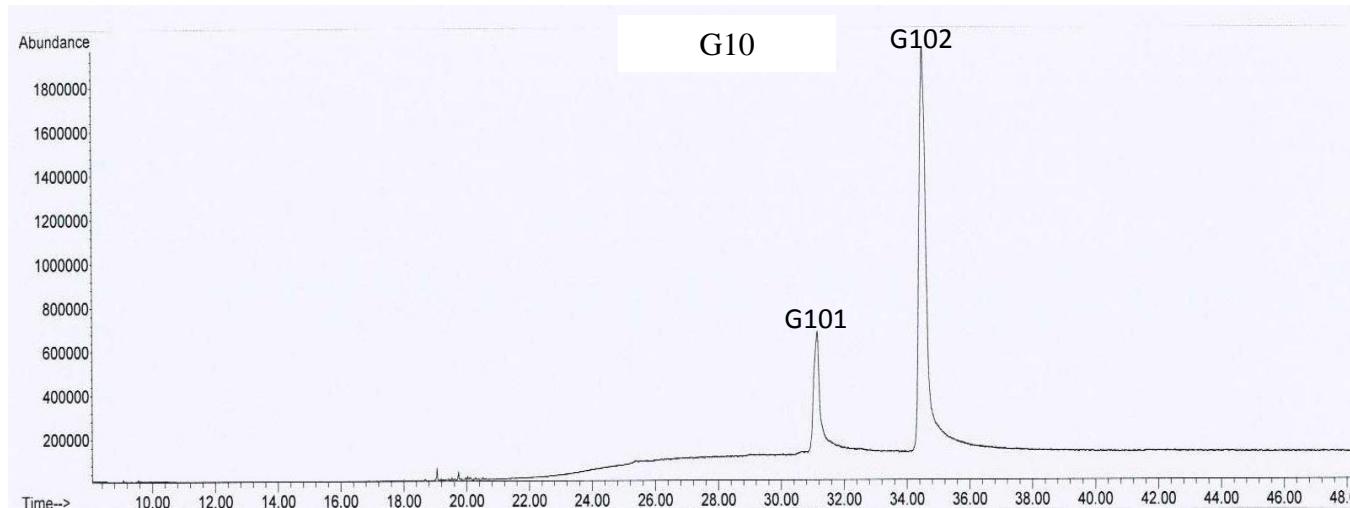
➤ *Isolement de G₆-1, G₆-2, G₆-3 et G₆-4*

Masse de G₆= 107,6mg

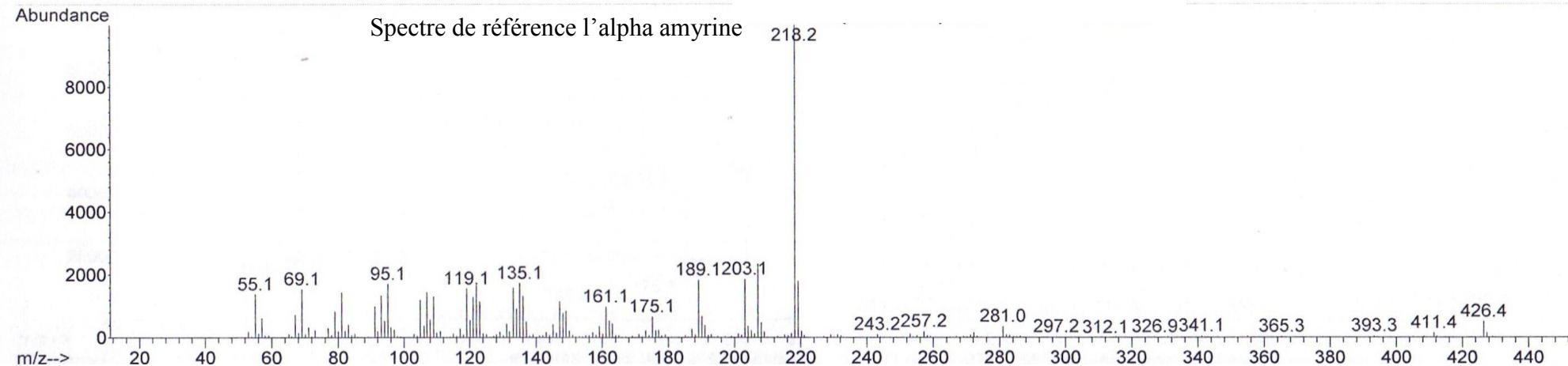
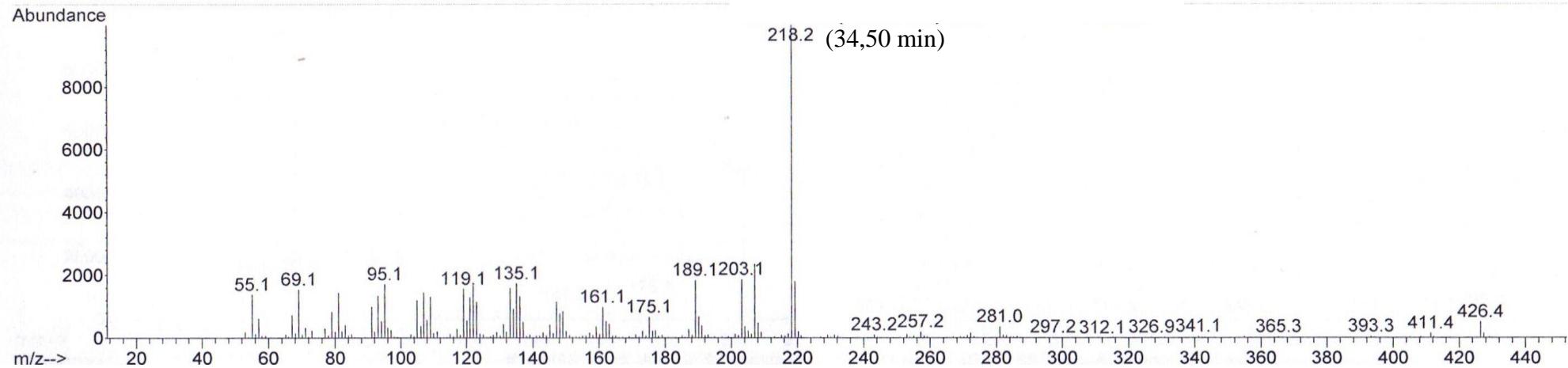
N° du composé	Phase mobile	Volume utilisé (ml)	Fractions	Masse (mg)	Rendement (%)
G ₆ -1	Hexane-DCM 70-30	50	1-7	3,8	3,53
G ₆ -2			8-14	5,7	5,29
G ₆ -3			15-18	7,4	6,87
G ₆ -4			19-25	3,09	2,87

Annexe III

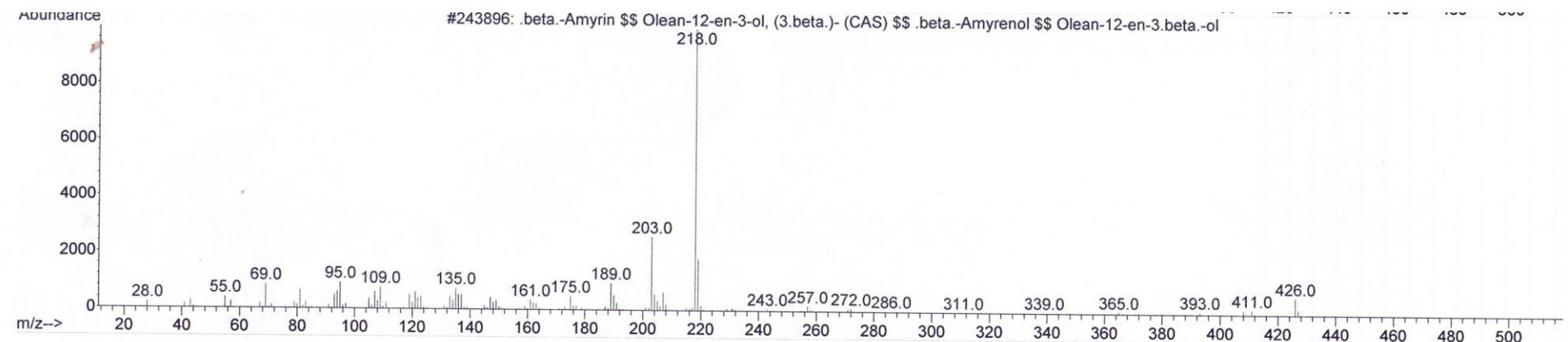
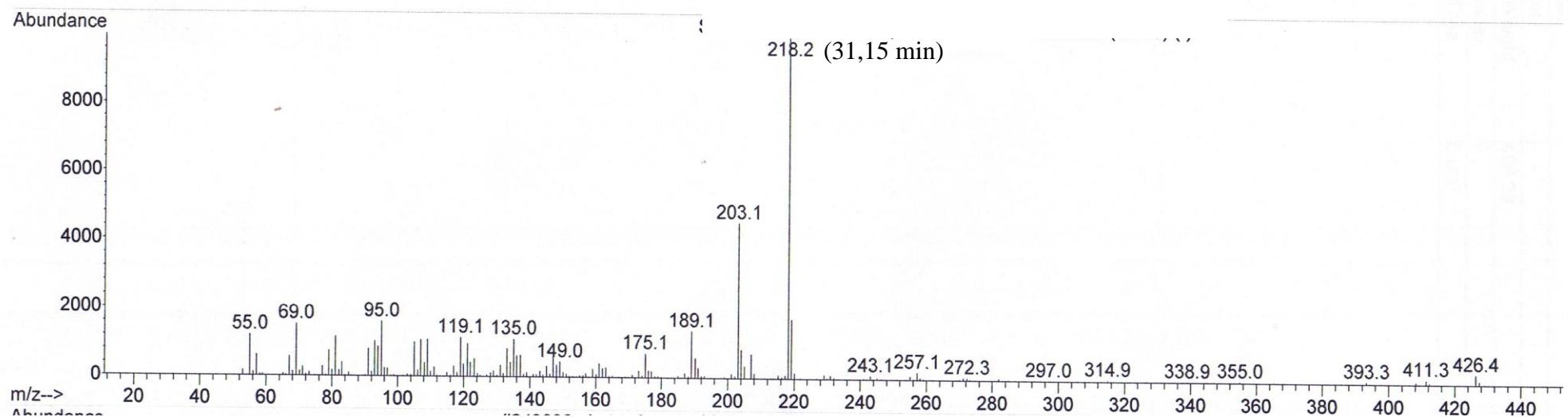
1. Chromatogramme de G10 et G11 obtenu par analyse CPG : α -amyrine et β -amyrine :



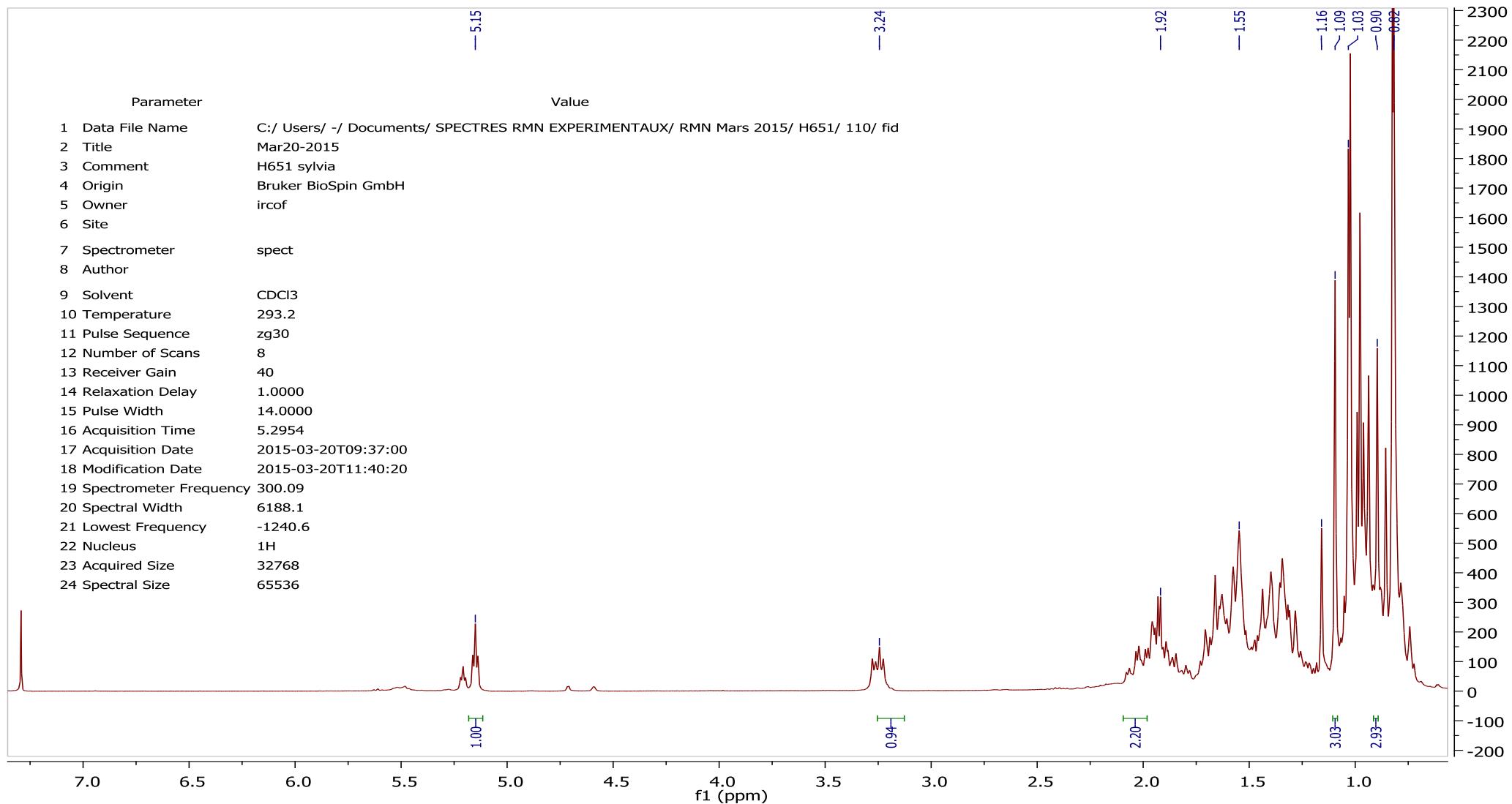
2. Spectre de masse du composé G102 (α -amyrine)



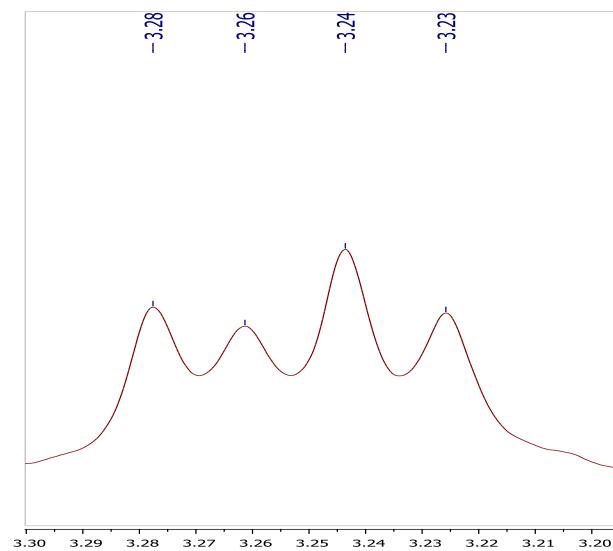
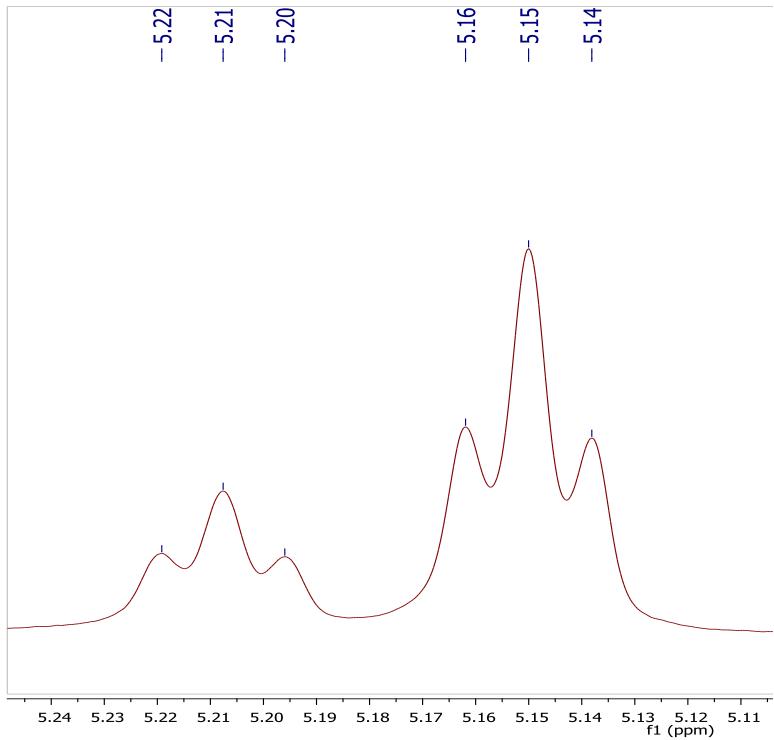
3. Spectre de masse du composé G101 (β -amyrine)



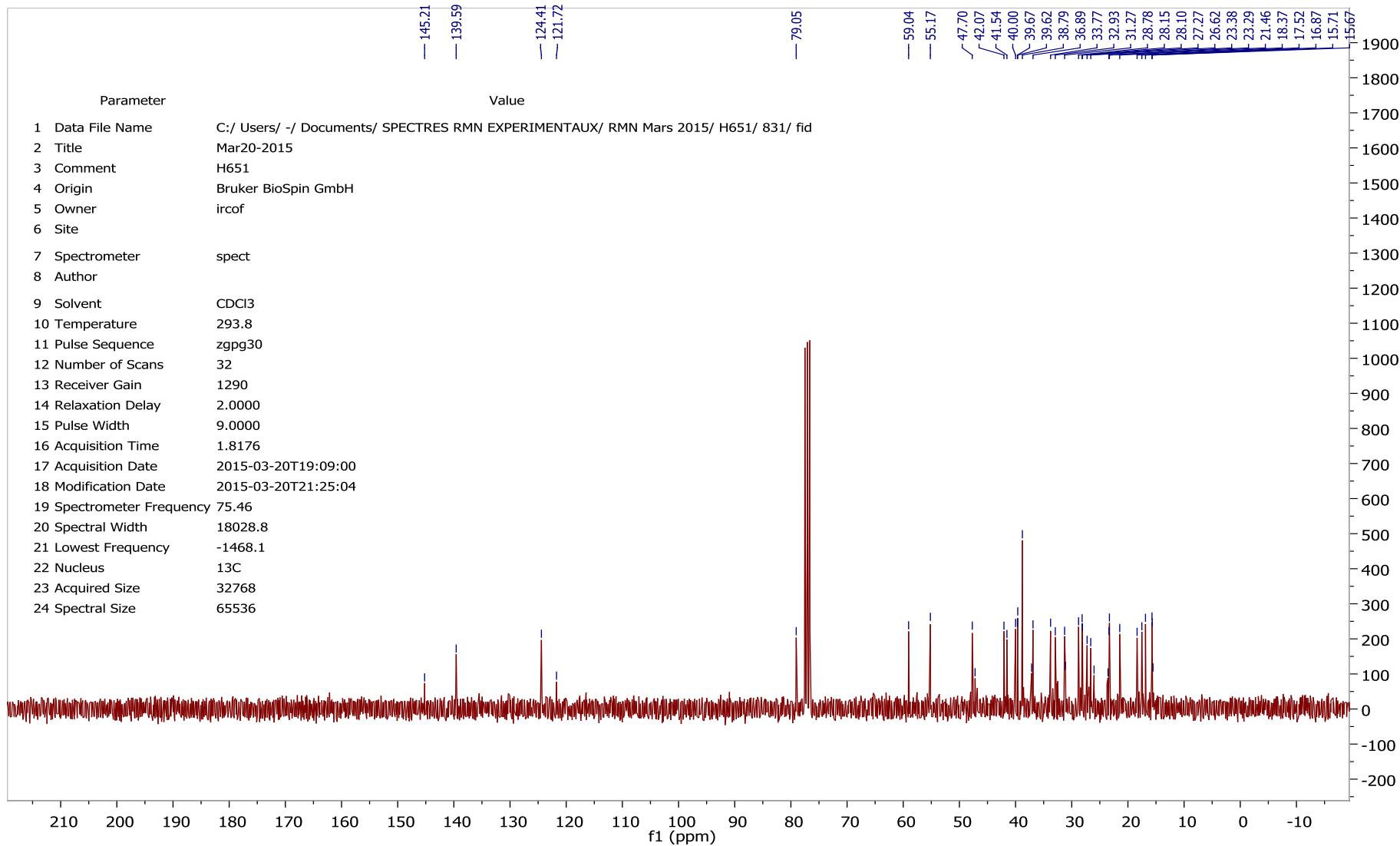
4- Spectre RMN ^1H du produit G10 (spectre S1)



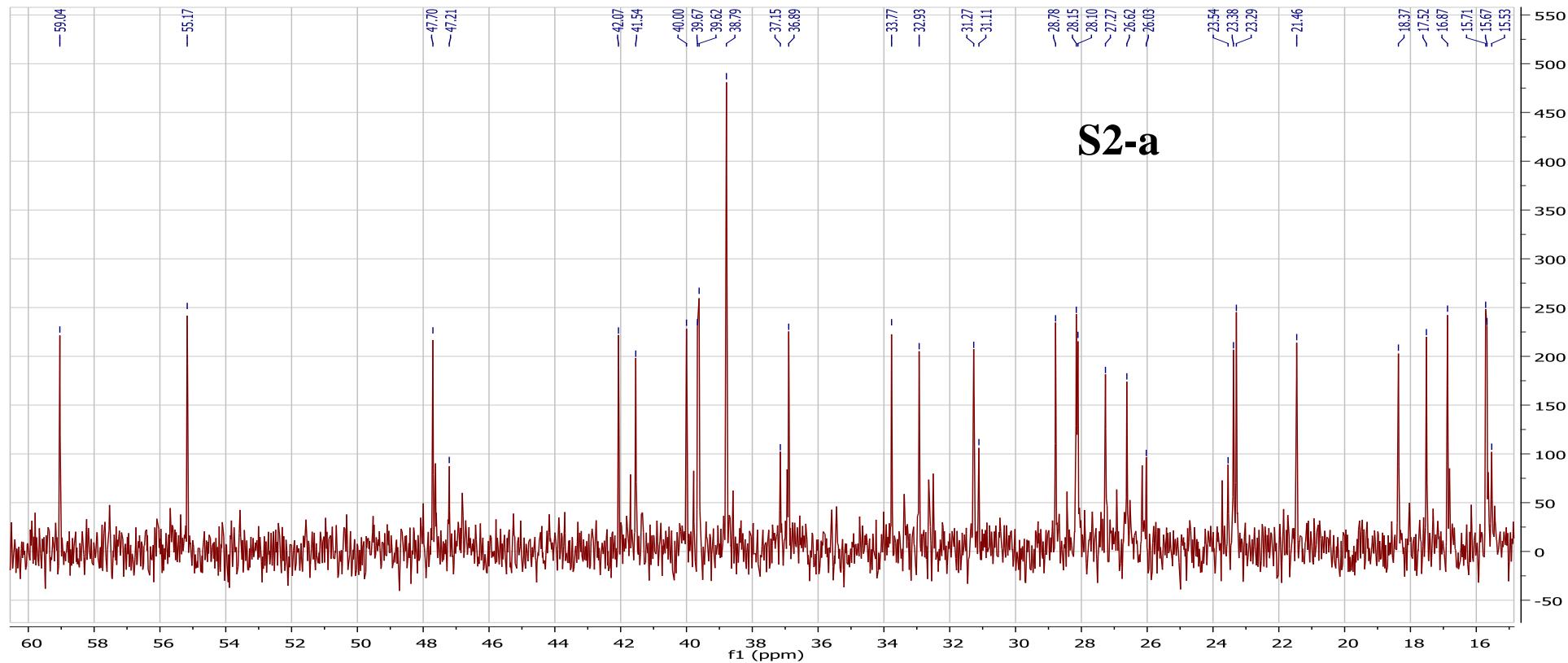
5- Etalement du Spectre RMN ^1H du produit G10 (3,05 à 3,30ppm) et (5,00 à 5,25ppm)



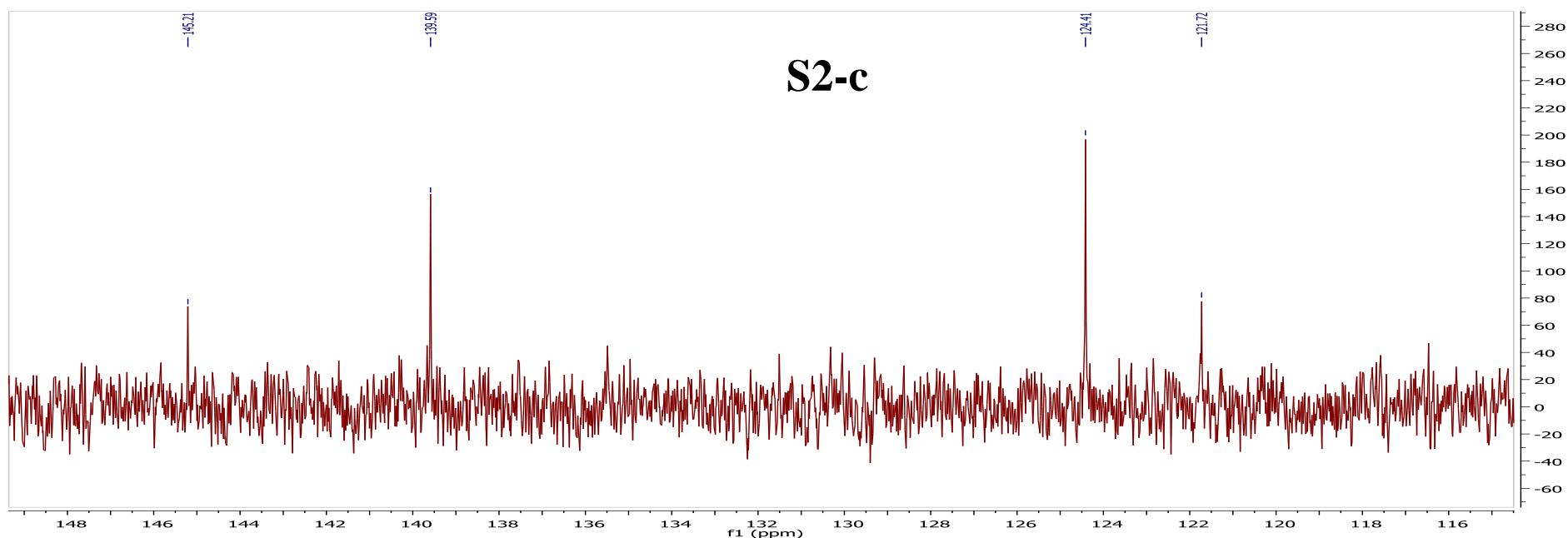
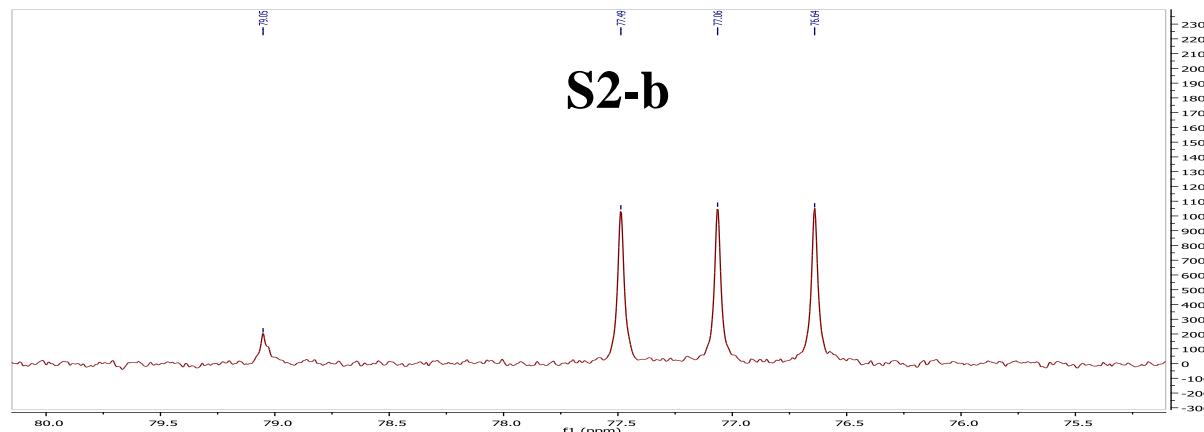
6-Spectre RMN ^{13}C du produit G10 (spectre S2)



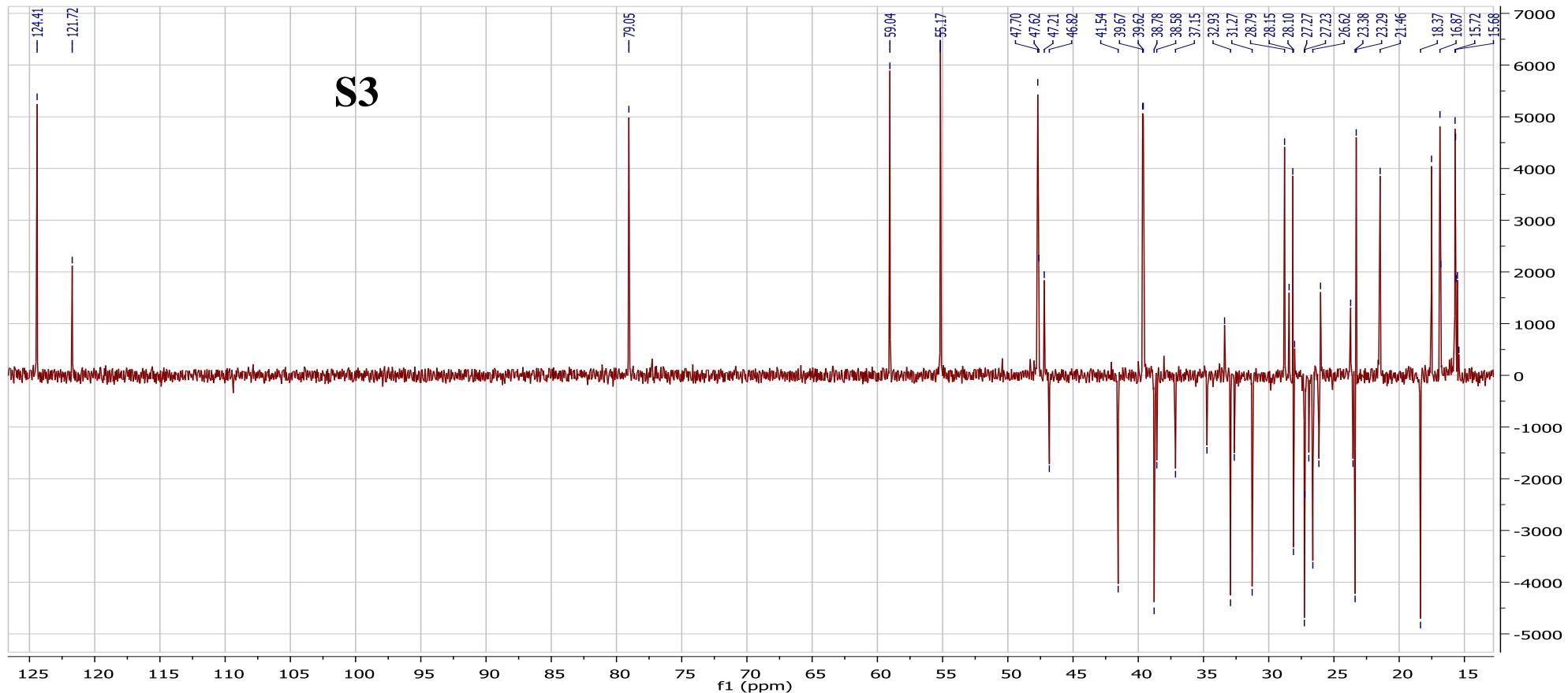
7- Etalelement du spectre RMN ^{13}C du produit G10 (16 à 60 ppm)



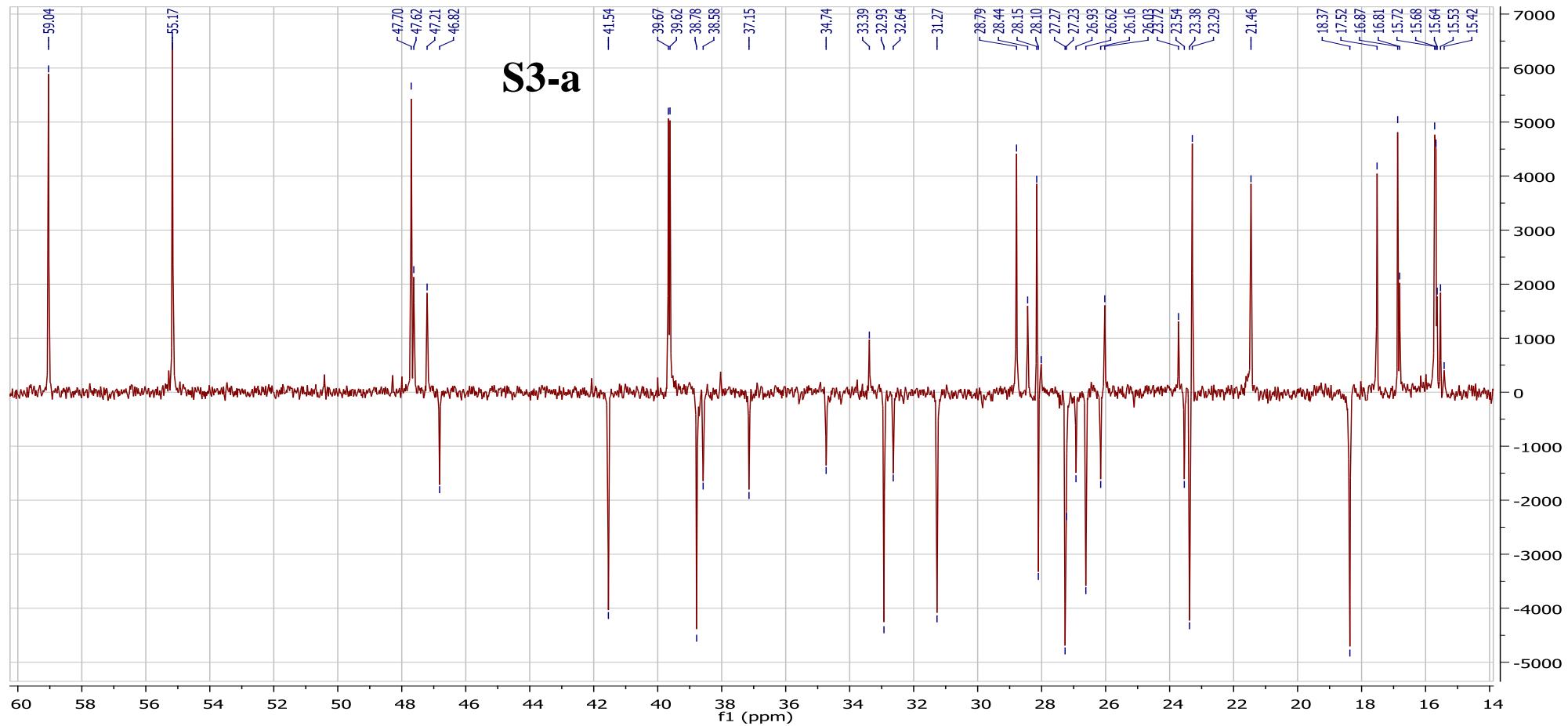
8- Etalelement du spectre RMN ^{13}C du produit G10 (78 à 146 ppm)



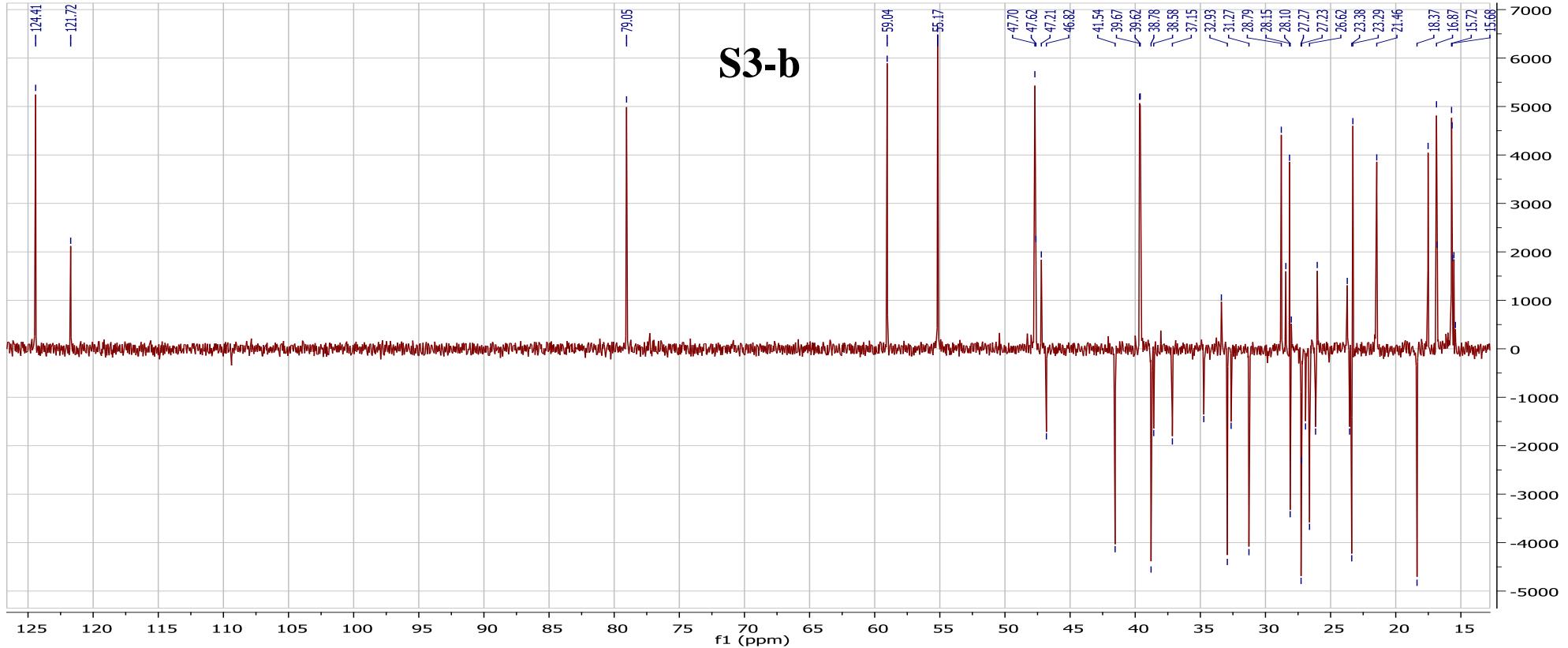
9-Spectre RMN DEPT du produit G10



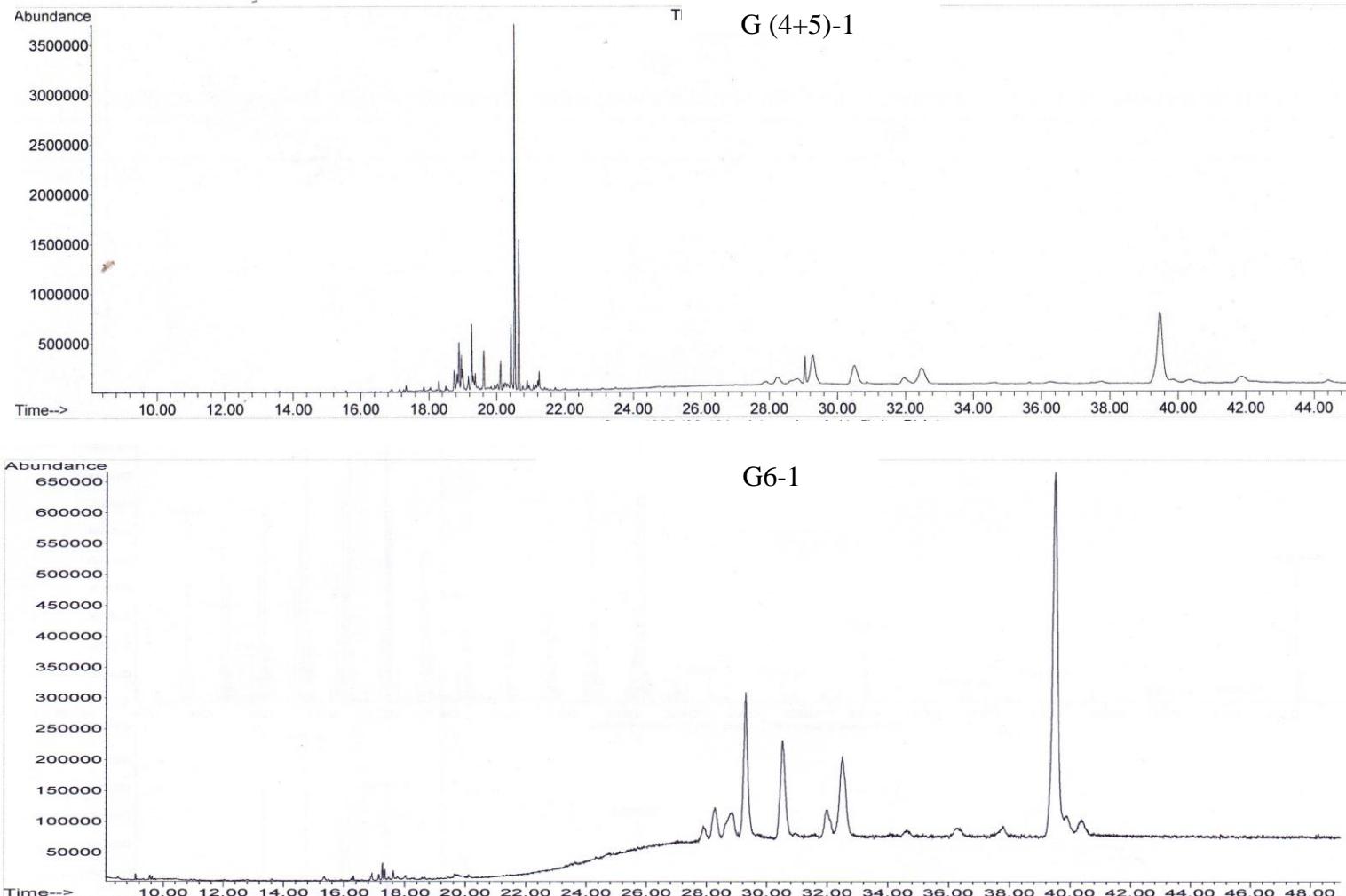
10- Etalement du spectre RMN DEPT du produit G10 (14 à 60 ppm)



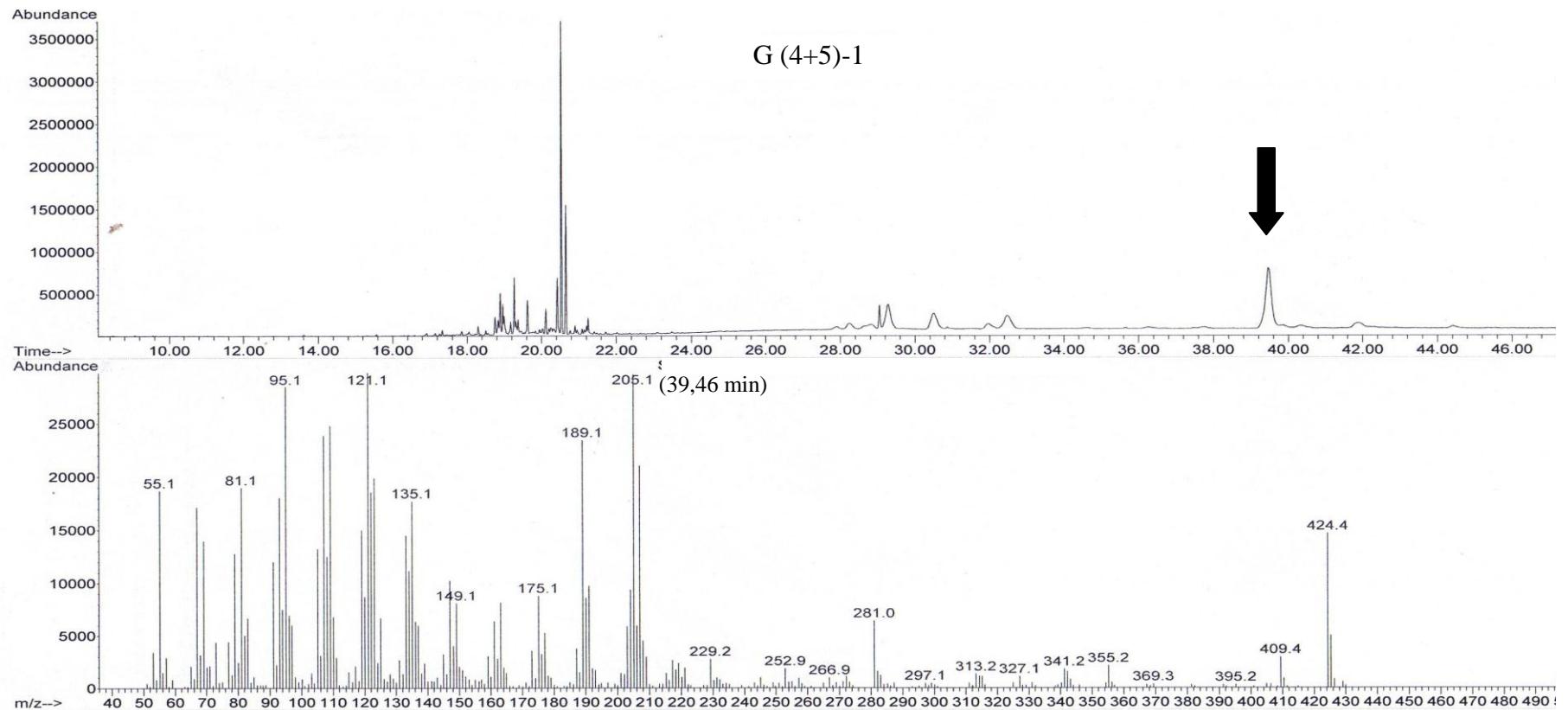
11- Etalement du spectre RMN DEPT du produit G10 (15 à 125 ppm)



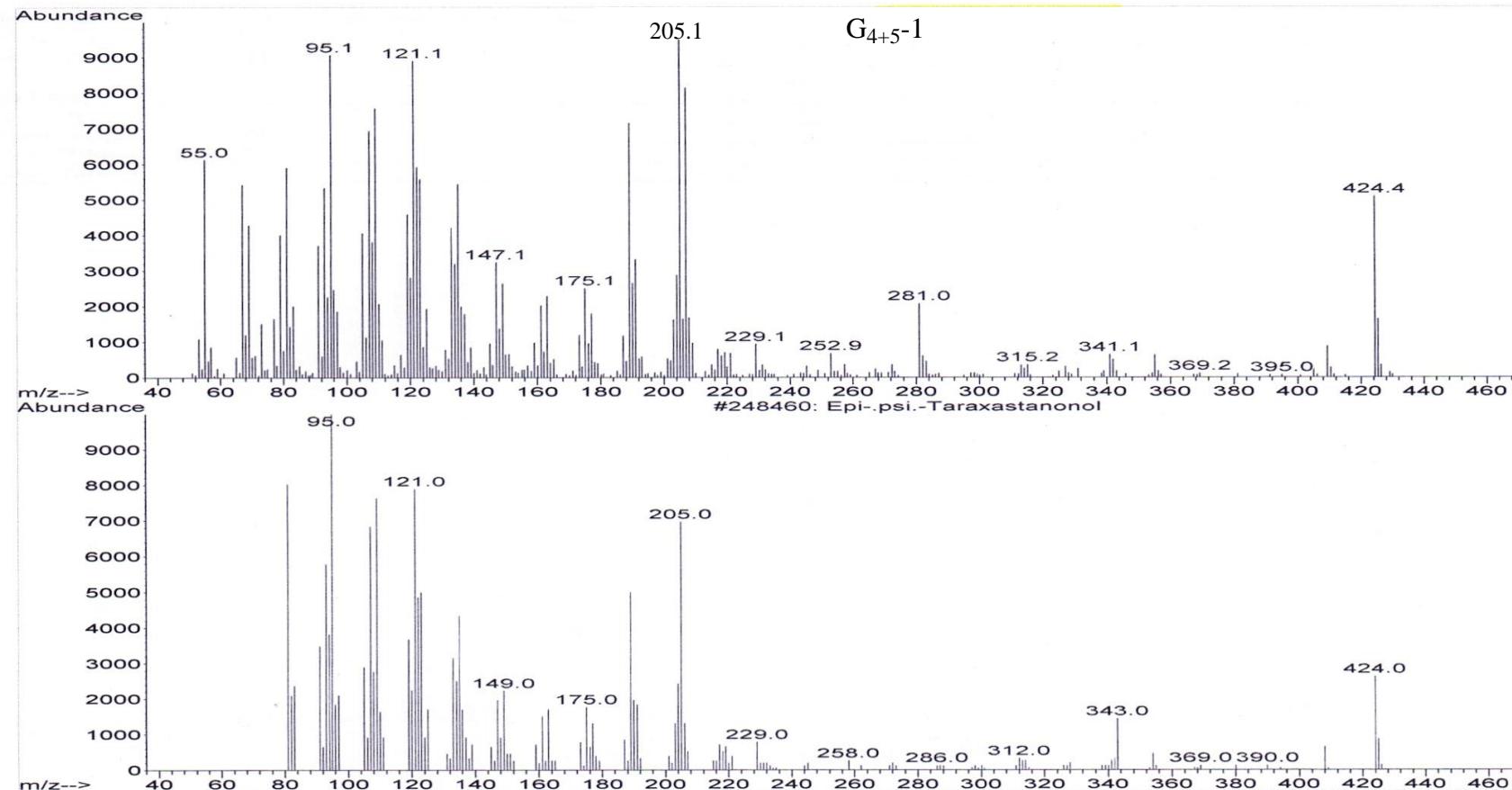
12- Chromatogramme de G(4+5)et G6-1 obtenu par analyse en CPG/SM : epi- ψ -taraxastananol



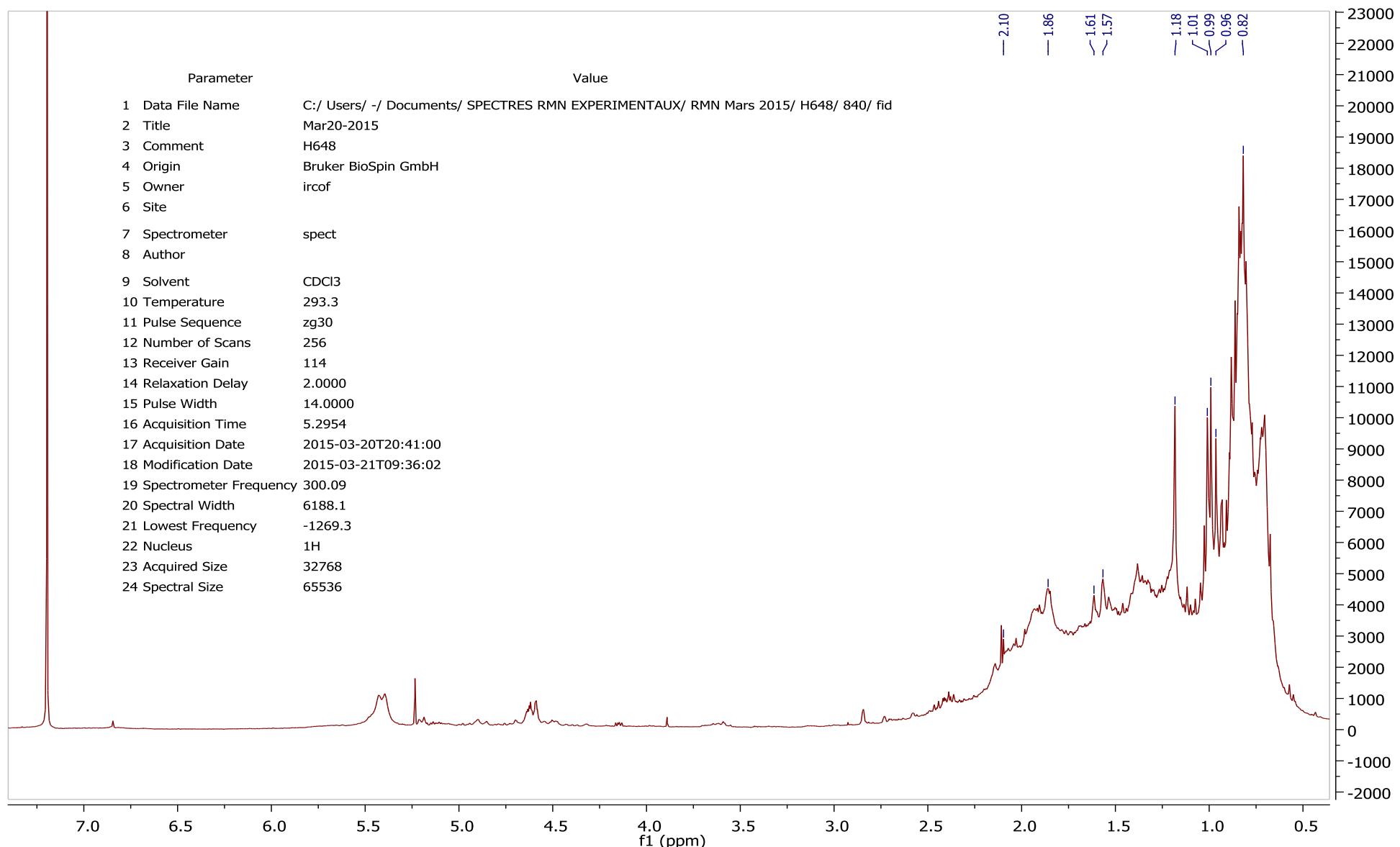
13- Spectre de masse de du produit G (4+5)-1 à 39,46 min :



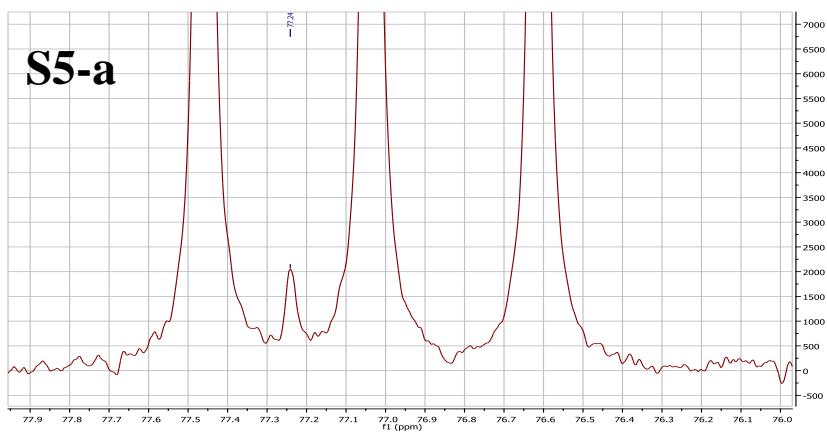
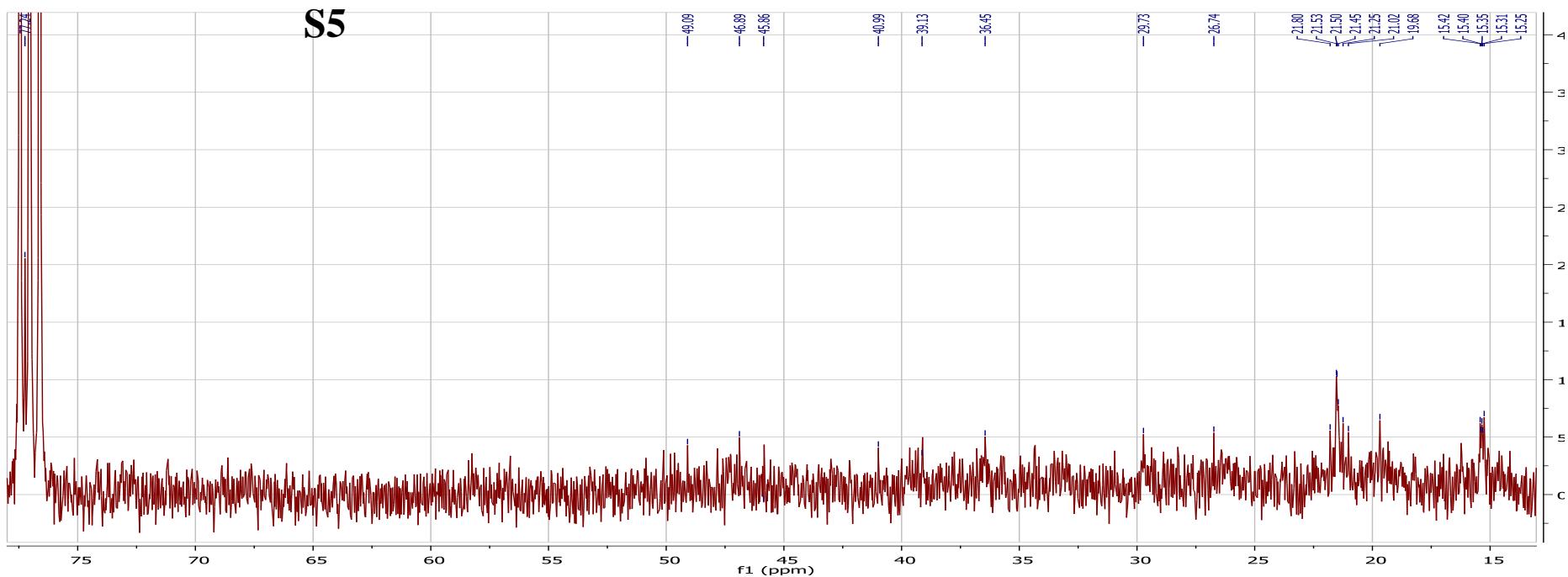
14- Spectre de masse de epi- ψ -taraxastanonol



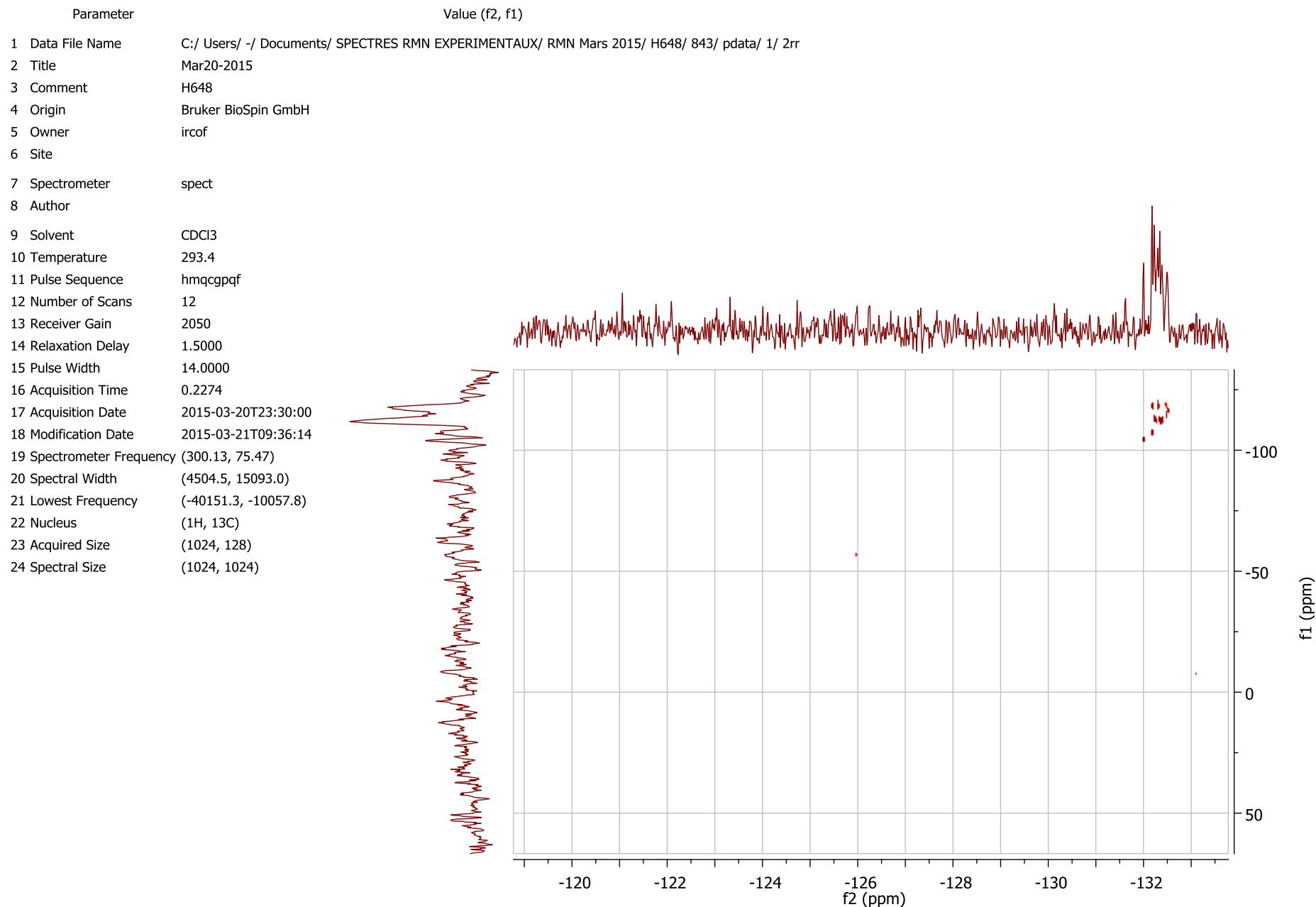
15-Spectre RMN ^1H du produit G (4+5)-1



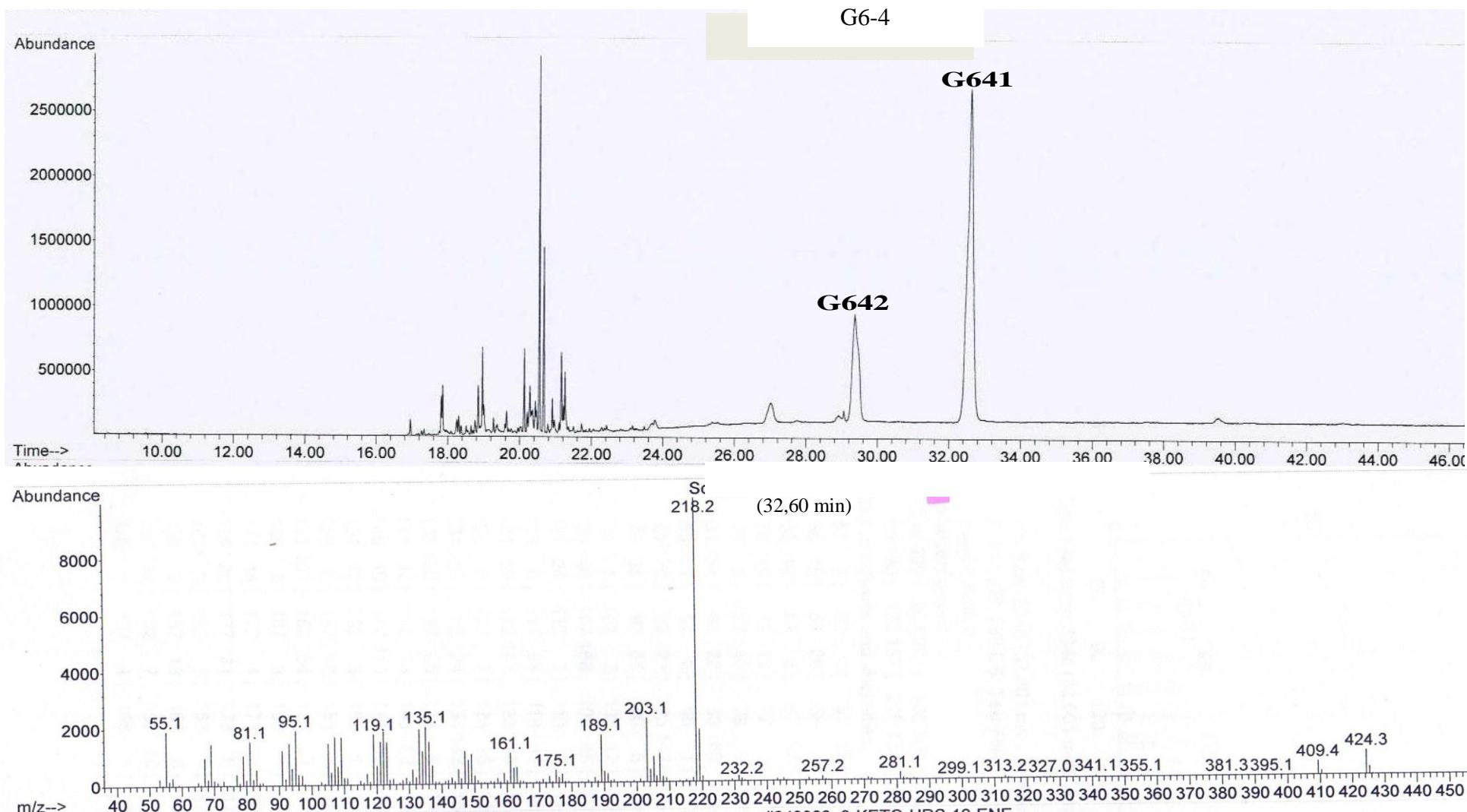
16-Spectre RMN ^{13}C du produit G (4+5)-1



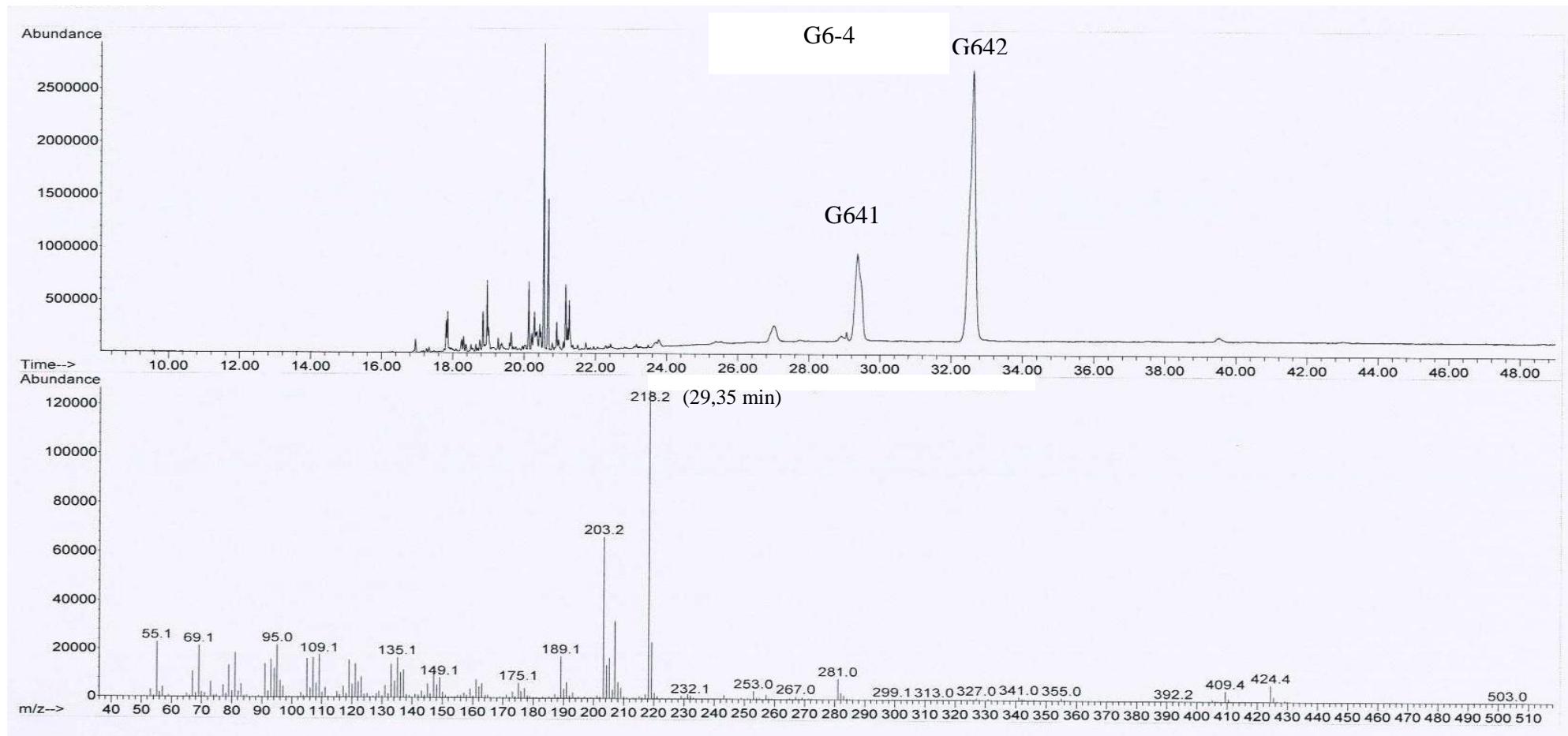
17- Spectre RMN HMQC du produit G (4+5)-1



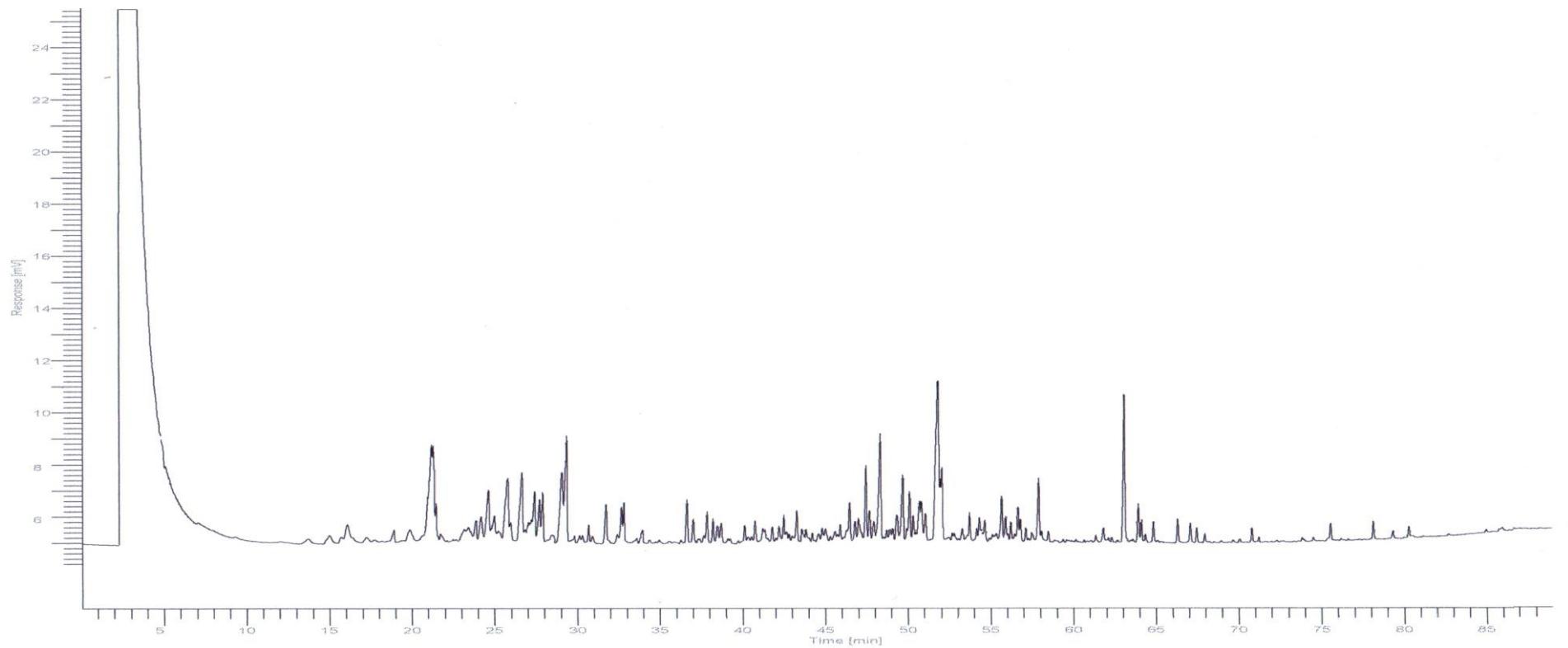
18- Chromatogramme de G6-4 et spectre de masse du produit G642(à 32,60 min) : α -amyrenone



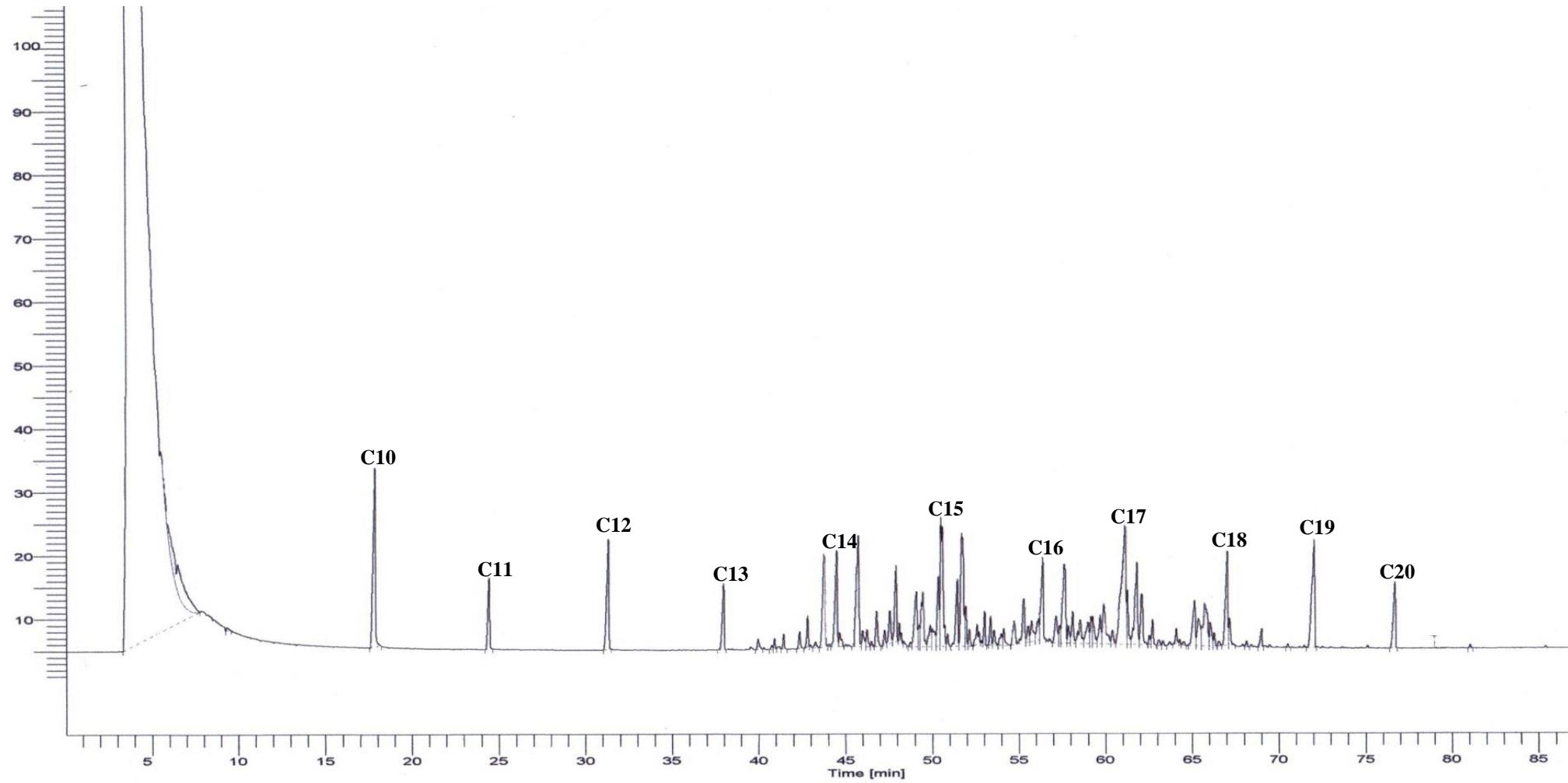
19- Chromatogramme de G4 et spectre de masse du produit G641(à 29,25 min) : β -amyrenone



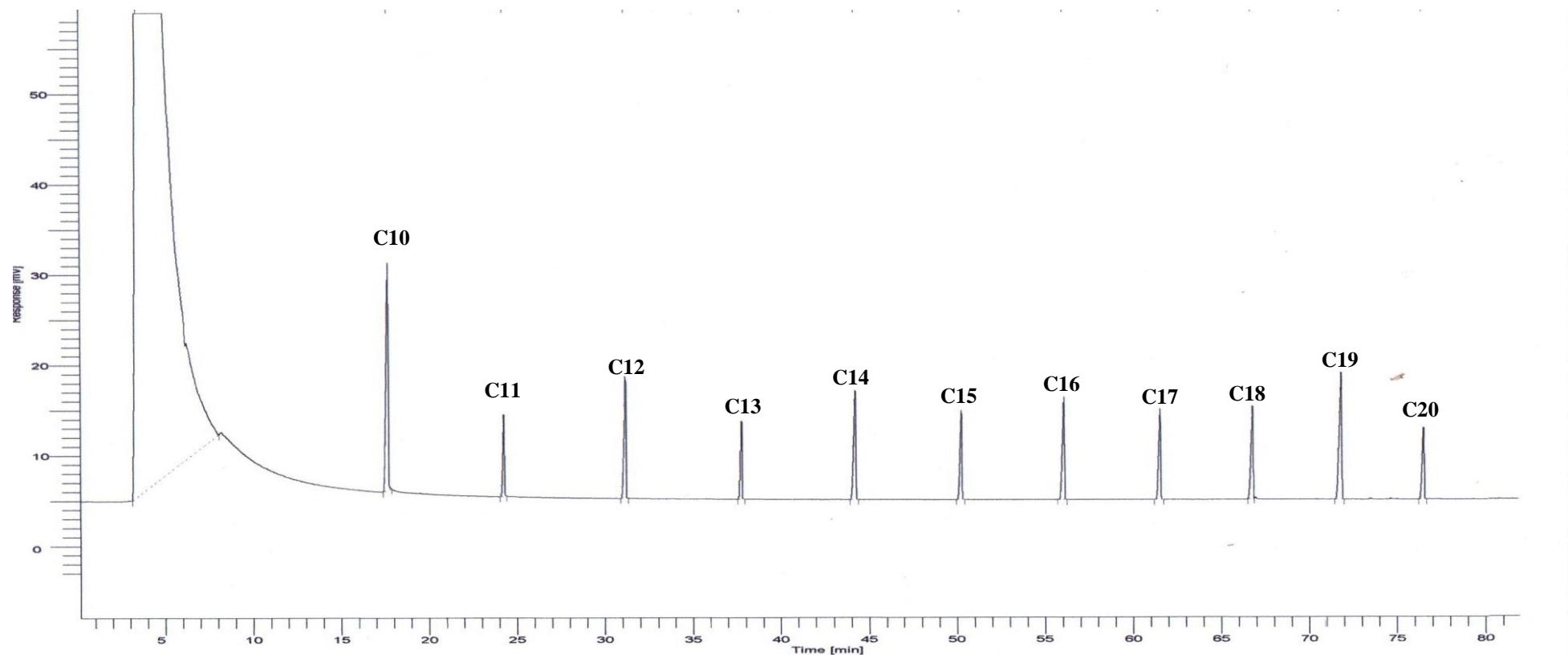
20-Chromatogramme A de l'HE pure analysée sur CPG OV101



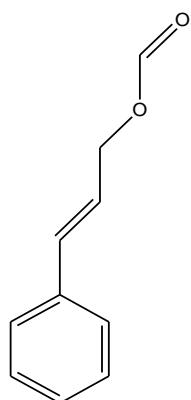
21- Chromatogramme B du mélange HE pure et d'alcanes (C10-C20) coinjecté sur CPG OV101.



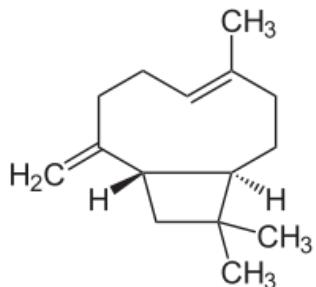
22- Chromatogramme B de l'alcane (C10-C20)



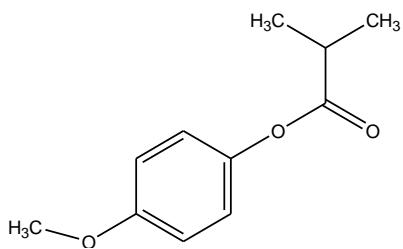
Exemples de structures des constituants de l'huile essentielle



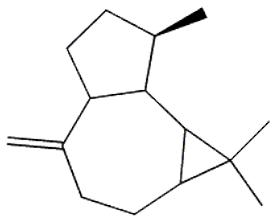
Cinnamyl formate



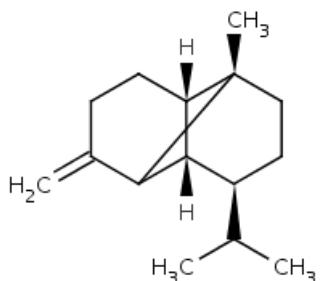
Caryophylène



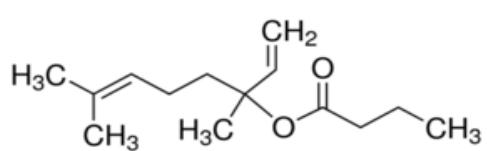
Anisyl isobutyrate



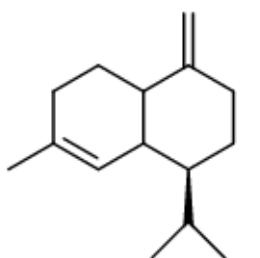
Alloaromadendrene



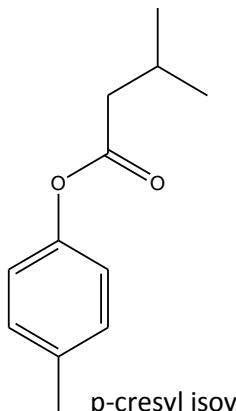
Beta-copaene



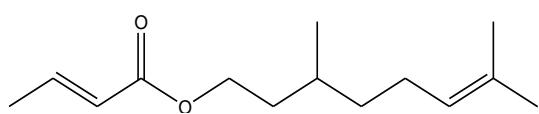
Linalyl n butirate



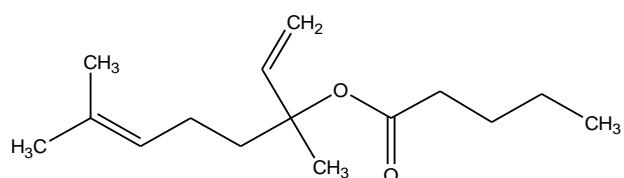
Gamma- muurolène



p-cresyl isovalerate



Citronnyl cronate



Linalyl n-valerate

Auteur : RAKOTOARIVELO Henintsoa

Adresse : Laboratoire de Chimie Organique et Spectrometrie de Masse (LCO-SM),
Ampasapito, Departement de Chimie Organique,
Faculte des Sciences-Universite d'Antananarivo BP 06

Contact : 033 17 134 82

E-mail : rhennientsou@yahoo.fr

Titre : Caractérisation d'un produit résineux collecté sur les côtes Ouest de Madagascar par analyses chimiques

Nombre de pages : 90

Nombre de figures : 55

Nombre de photos : 12

Nombre de tableaux : 18

Nombre des annexes : 3

Nombre de références : 60

RESUME

Ce travail de recherche consiste à l'isolement et à l'identification des constituants d'un produit résineux de Madagascar en utilisant diverses méthodes chromatographiques et spectrales (CCM, chromatographie sur colonne, CGP/SM, RMN).

Des structures des constituants non volatils ont été ainsi élucidées comme **α -amyrine, β -amyrine, epi- Ψ -taraxastananol, α -amyrenone et β -amyrenone.**

Les constituants volatils ont été obtenus par hydrodistillation du produit résineux avec un rendement de 0,97%, l'huile essentielle est analysée par CPG/FID. Elle est constituée de molécules monoterpéniques et sesquiterpéniques.

Ces résultats ont permis de poser l'hypothèse de la myrrhe comme identité de l'échantillon.

Mots clés : résine, triterpènes, huile essentielle, chromatographie, SM, RMN.

ABSTRACT

This research is based on the isolation and identification of the components of a resinous product from Madagascar using various chromatographic and spectral methods (TLC, column chromatography, GC / MS, NMR).

The structure of the nonvolatile compounds has been elucidated as **α -amyrin, β -amyrin, epi- Ψ -taraxastananol, α -amyrenone and β -amyrenone.**

The volatile components oil was obtained by steam distillation of the resinous product with 0.97% yield. The GC/FID analyses revealed that the essential oil is composed of monoterpane and sesquiterpene compounds.

These results lead to a hypothesis about the origin of the sample: it was myrrh.

Keywords: resin, triterpenes, essential oil, chromatography, MS, NMR.

Encadreur pédagogique : Docteur Dimby Andrianina RALAMBOMANANA

Laboratoire de Chimie Organique et Spectrométrie de Masse (LCO-SM),
Ampasapito, Département de Chimie Organique,
Faculté des Sciences-Université d'Antananarivo – BP. 06

Encadreur professionnel : Docteur Sylvia RALAMBONIRINA RASOARIVELO

Centre National d'Applications des Recherches Pharmaceutiques (CNARP),
Laboratoire de contrôle de qualité / Département de Chimie - BP. 702
Antananarivo 101 Madagascar.