

وزارة التعليم و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

1er

ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT : GENIE-CHIMIQUE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

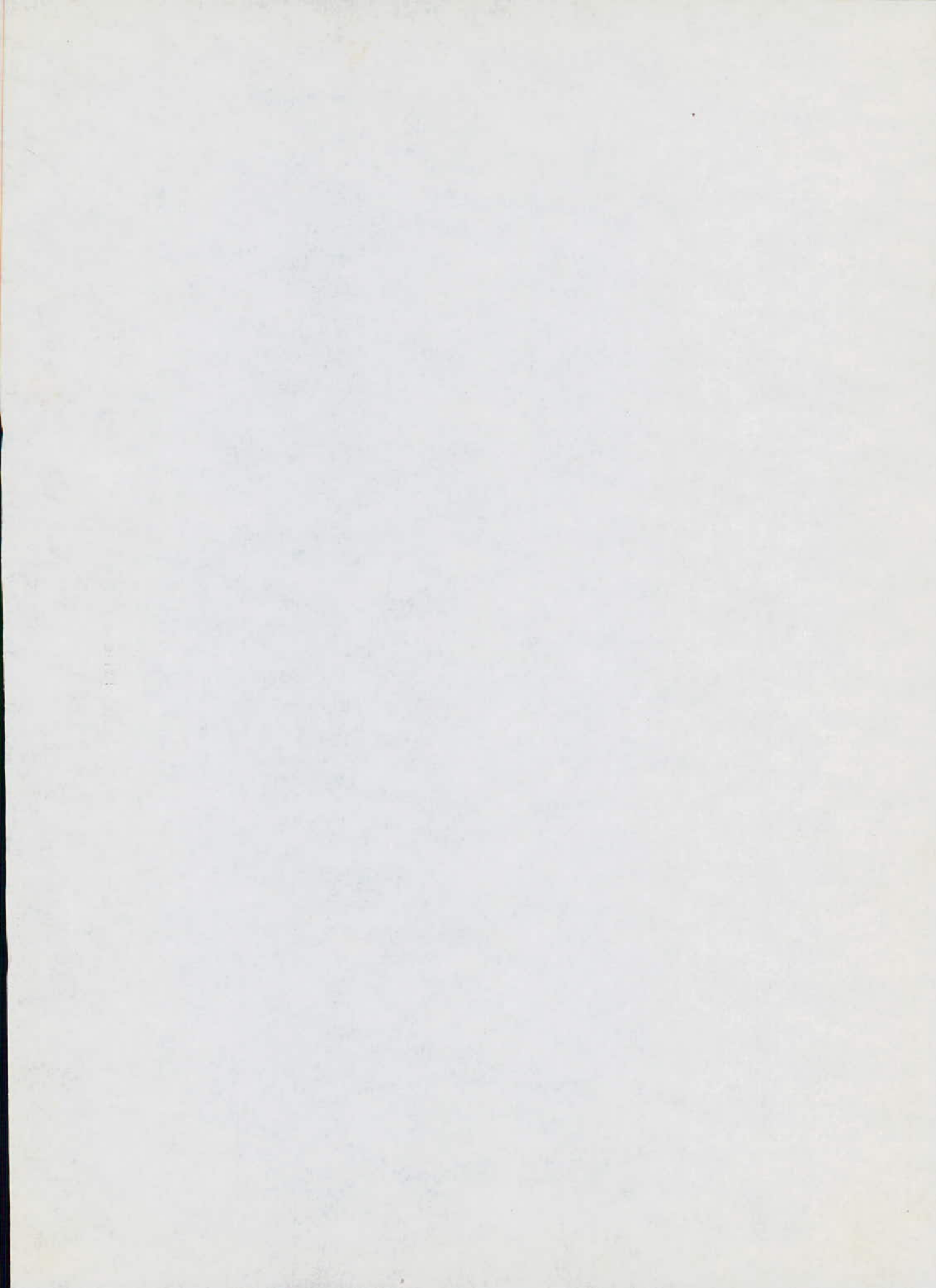
Contribution à l'Etude
Chimique de
l'Artemisia Herba Alba Asso

Proposé Par :
M^{me}. CHARCHARI S.

Etudié Par :
M^{elle}. BOUTEKEDJIRET
CHAHRAZED

Dirigé Par :
M^{me}. CHARCHARI S.

PROMOTION : JANVIER 1987



ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département : Génie chimique

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
المكتبة — BIBLIOTHEQUE
Ecole Nationale Polytechnique

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

CONTRIBUTION A L'ETUDE
CHIMIQUE
DE
L'ARTEMISIA HERBA ALBA ASSO

Proposé par :

M^{me}. CHARCHARI . S

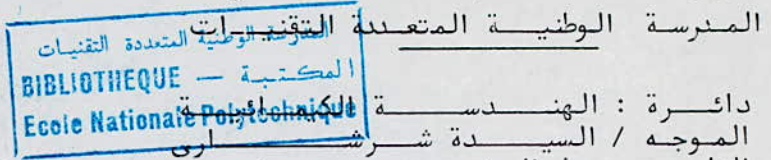
Etudié par :

M^{lle} BOUTEKEDJRET
Chahrazed

Dirigé par :

M^{me} CHARCHARI . S

Promotion janvier 1987



Département : Génie Chimique

Promoteur : Mme CHARCHARI

Elève Ingénieur: Melle BOUTEKEDJRET, C.

دائرة : الهندسة

الموجه / السيدة شرش

التلميذ المهندس

الأنسة شهرزاد بوتقجـيرت .

الموضوع / مساهمة في البحث عن التركيب الكيميائي للشيح :

الملخص / ان الهدف من هذا العمل هو عزل وتعيين المركبات الكيميائية للشيح استطعنا تشخيص مختلف الأقسام الكيميائية لهذه المادة بواسطة التجارب الفيتوكيميائية الأولية .
سمح لنا البحث في الزيت الأساسي لهذا النبات بالكروماتوغرافيا تمييز احد عشر عنصرا .
وتمكننا في بحثنا على مركبات اللاكتون السيستريبان لهذا النبات من ابر التركيب النوعي للستونين ، وعزل مركب بالتقنيات الكروماتوغرافية حاد تشخيصه .

Subject / Contribution à l'étude chimique de l'Artemisia herba alba Asso .

sumé / L'objectif de ce travail est l'isolement et l'identification des constituants chimiques de l'Artemisia herba alba Asso. Nous avons pu situer les différentes classes de composés chimiques par des tests phytochimiques préliminaires .

L'étude de l'huile essentielle de la plante par C P G a permis d'identifier 11 constituants .

Notre travail sur la composition des lactones sésquiterpéniques de la plante à abouti à la mise en évidence qualitative de la santonine et à l'isolement par des techniques chromatographiques d'un composé dont nous avons entamé l'identification.

Subject / Contribution to Chemical Study of Artemisia Herba Alba Asso .

abstract / The ^{aim} of this work is the isolation and the identification of the chemical constituents of the Artemisia Herba- Alba Asso .

We have been able to sort out the different classes of chemical constituents by preliminary phytochemical tests .

The study of the essential oil of the plant by gas chromatography has helped us to identify eleven (11) constituents .

The work on the composition of sesquiterpene lactones of the plant has allowed us to identify qualitatively the santonin and the isolation by chromatography of a constituent whose identification has been started .

- 17) E D J C A C E S -
=====

- A ma Mère et à mon Père ,
- A la mémoire de mon grand-père maternel Belkacem CHERFA ,
- A mon grand-père paternel Mohamed,
- A mes soeur et frères - Leïla - Housseem - Hatem .

En signe de reconnaissance et de profonde
affection .

Le travail a été réalisé au Département de Génie-Chimique de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger sous la direction de Madame CHARCHARI S. Maître- Assistante au Département de Génie-Chimique.

Durant toute la période impartie à la réalisation de mes travaux, Madame CHARCHARI, m'a apporté un concours apprécié non seulement au plan pédagogique, mais souvent également au plan moral lorsque des difficultés matérielles risquaient d'entraver la régularité de l'exécution de mon plan de travail. Aussi il me plaît particulièrement de lui rendre un hommage respectueux. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude .

- // es membres du Jury -

- Président / Monsieur R. BELABBES, Professeur à l'E.N.P.

- Examineurs / Monsieur RASAFINSTALAMA, Professeur à l'E.N.P.
Monsieur BENJDDJR , Maître - Assistant à l'E.N.P.
Madame F. YAGCUB , Maître - Assistante à l'E.N.P.

- Promoteur / Madame S. CHARCHARI, Maître Assistante à l' E.N.P.

- Invités / Monsieur BOUSSENADJI, Chef du Département des
Analyses fines au Service des Fraudes .
Monsieur BOUATTOU, Chef de Projet à l'E. D.J..C.

///
/// merciements /

/// exprime ma sincère reconnaissance à M. BELABBES, Professeur au Département de Génie- Chimique de l'E.N.P., pour l'honneur qu'il me fait de présider les travaux de mon jury .

Que - Monsieur R. RASAFINSTALAMA, Professeur à l'E.N.P.
- Madame F. YAGHOB, Maître- Assistante à l'E.N.P.
- Monsieur M. BENJDDIR, Maître- Assistant à l'E.N.P.

trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements pour avoir bien voulu accepté de faire partie de ce même jury .

Par ailleurs, pour mener à bien mes recherches, j'ai été souvent amenée à solliciter le concours matériel et l'utilisation des équipements scientifiques et techniques de certaines institutions de Formation ou de Recherche. Aussi je tiens à remercier bien vivement les Responsables de ces institutions, en particulier :

- Monsieur le Chef du Département de Botanique de l'I.N.A.
- Madame la Responsable de la Bibliothèque du Département de Botanique de l' I.N.A.
- Monsieur le Responsable de la Bibliothèque du Département de Technologie l'I.N.A.
- Monsieur BENZARD, Chef du Laboratoire C.D.T.R.S. au C.E.N, ainsi que Melle DEFFOUS Nabila.
- Monsieur BOUSSENADJI, Chef du Département des analyses fines du Services des Fraudes .
- Monsieur BOUATTOU, Chef de Projet à l' E.D.I.C.
- Monsieur MFLoudj , Chef de Projet à la S.N.I.C.

// e ne saurais oublier d'exprimer ma reconnaissance à l'ensemble de mes professeurs du Département de Génie- Chimique, parmi lesquels il me plaît de mentionner particulièrement ,

- Monsieur AHMED ZAID,

- Monsieur BOUMGHAR,

- Monsieur BOUAMOUD,

pour leurs conseils et leurs concours .

Je remercie enfin toutes celles et tous ceux qui m'ont aidée d'une manière ou d'une autre dans réalisation matérielle et la confection de ce document, en particulier mon Oncle Mohamed Chérif et ma Cousine Khadidja .

<u>Introduction</u>		1
<u>Chapitre I</u> : Rappel Botanique		3
1. Classification botanique de l'Artemisia herba alba Asso		4
2. La famille des composées		5
3. l'Artemisia herba alba Asso		5
<u>Chapitre II</u> : Travaux Antérieurs		8
<u>Chapitre III</u> ; Tests phytochimiques préliminaires		14
A : Recherche des flavonoides		16
2 : Recherche des tanins		16
3 : Recherche des coumarines		17
4 : Recherche des quinones libres		18
5 : Recherche des stérols et des terpenes		19
6 : Recherche des saponosides		20
7 : Recherche des alcaloides		21
8 : Recherche des lactones sesquiterpeniques		22
<u>Chapitre IV</u> : Etude chimique		25
1 : Etude de l'huile essentielle d'Artemisia herba alba Asso		27
1.1 Généralités sur les huiles essentielles.		27
1.2 : La chromatographie en phase gazeuse.		28
1.3 Partie expérimentale.		30
1.3.1. Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau		
1.3.2. Analyse de l'huile essentielle par C.P.G.		

1.4 Résultats et interprétation.	44
2 : Etude des lactones sesquiterpeniques d'Artemisia herba alba Asso	52
A - Recherche de la santonine :	52
1 Description de la santonine	52
2 Partie expérimentale	54
2.1. ; Tests qualitatifs de la santonine	
2.2. : Isolement et dosage de la santonine	
3 Résultats et discussion.	55
B - Recherche d'autres lactones sesquiterpeniques :	57
1 Méthodes de séparation et d'identification utilisées.	59
1.1. : La chromatographie d'adsorption sur colonne	
1.2. : La chromatographie sur couche mince.	
1.3. : La spectroscopie infra-rouge.	
2 Partie expérimentale.	64
2.1. : Isolement d'un lactone sesquiterpenique.	
2.2. : Identification du composé isolé.	
3 Résultats et interprétation.	68
<u>Conclusion.</u>	73
<u>Bibliographie.</u>	76

المدسة الوطنية المتعددة التقنيات
المكتبة — BIBLIOTHEQUE
Ecole Nationale Polytechnique

INTRODUCTION

L'un des objectifs de l'étude chimique des substances naturelles est la recherche de nouveaux agents thérapeutiques.

L'utilisation des plantes en médecine populaire est à l'origine de nombreuses recherches entreprises afin d'obtenir des composés plus actifs et moins toxiques.

L'étude de la composition chimique des végétaux présente aussi un intérêt pour leur classification botanique.

Il est certain que l'apparition des nouvelles méthodes physiques de séparation et d'analyse, de plus en plus précises et puissantes, rendent à l'heure actuelle l'isolement et l'identification de la structure des composés naturels plus rapide et plus efficace. Cette étape de la recherche, permettant la connaissance complète de la structure d'un composé naturelle, ouvre la voie à sa synthèse totale ou partielle et à celle d'analogues structuraux dont il peut être intéressant d'évaluer l'activité pharmacologique

L'*Artemisia herba alba* est communément utilisée en Algérie comme remède populaire. Elle est appréciée comme vermifuge, diurétique, émollient, antispasmodique. Cette large utilisation de la plante, nous a incité à entreprendre l'étude de sa composition chimique.

Chapitre : I

RAPPEL

BOTANIQUE

1 CLASSIFICATION BOTANIQUE DE L'ARTEMISIA HERBA ALBA ASSO (1)

Embranchement	Spermaphytes ou phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous Classe	Gamopétales
Ordre	Astérales
Famille	Composées
Sous famille	Radiées
Tribu	Anthemidées
Genre	<i>Artemisia</i>
Espèce	<i>Artemisia herba alba</i> ASSO

2 LA FAMILLE DES COMPOSEES (1,2)

La famille des composées, est la famille la plus vaste des phanérogames avec près de 1000 genres et 15000 espèces. Elle est considérée par beaucoup d'auteurs comme la plus évoluée.

Les composées sont surtout représentées dans les régions tempérées et froides du globe. Ce sont des plantes généralement herbacées, avec des feuilles isolées, simples, sans stipules. Leur inflorescence est tout à fait caractéristique : c'est un capitule entouré de bractées en un ou plusieurs rangs formant un involucre. Les fleurs sont groupées souvent à l'aisselle de paillettes ou d'écaillés. Le fruit est un akène, la graine n'a pas d'albumen.

Au point de vue biochimique, c'est une famille hétérogène dont les principes actifs sont très variés (3) : huiles essentielles, lactones sesquiterpéniques, flavonoïdes, coumarines, tanins, saponosides, composés acétyléniques ou polyènes, les alcaloïdes sont très rares.

3 L'ARTEMISIA HERBA ALBA ASSO

L'Artemisia herba alba Asso, est connue en Algérie sous le nom de cheih ou armoise (4). Elle est aussi appelée Seman contra de Barbarie (3).

Cette plante couvre près de six millions d'hectares dans les steppes d'Algérie (5). Elle se présente sous forme de buissons blanc laineux de 30 à 80 cm de hauteur. Les feuilles sont longues, étroites et espacées, les capitules, ovoïdes à involucre scarieux, comportent 3 à 6 fleurs jaunâtre, alors que le fruit est un akène. (Figure 1).



FIG:1

ARTEMISIA HERBA-ALBA-ASSO

Notre étude est effectuée sur la plante poussant dans la région des PORTES DE FER (BIBANS) Wilaya de Bordj Bou Arréridj. Elle a été cueillie non fleurie, à la fin du mois d'Août, séchée à l'air libre, à l'obscurité.

Un échantillon de la plante, a été identifié à l'herbarium du département de Botanique de l'Institut National d'Agronomie, comme étant celui d'*Artemisia herba alba* Asso.

Chapitre : II

TRAVAUX
ANTERIEURS

Les travaux de l'étude de la composition chimique de l'*Artemisia herba alba* Asso furent entrepris au début du siècle. Les premiers travaux concernent l'huile essentielle.

M.E. Grimal (6), a obtenu par entraînement à la vapeur d'eau de l'herbe fraîche et non fleurie de l'*Artemisia herba alba* Asso, une huile essentielle jaune verdâtre dont l'odeur est agréable. A partir de 150kg d'herbe, il a isolé 450g d'essence, soit 0,3%. Il a étudié cette essence et a obtenu les résultats suivants :
d₁₅ = 0,9456 ; N_D²⁰ = 1,47274 ; $[\alpha]_D^{20} = -15^{\circ}18'$; IA = 6,46 ;
IE = 89,23 ; correspondant à 31,23 % d'ether CH₃COOC₁₀H₁₇,
24,54 % d'alcool C₁₀H₁₈O. IE de l'essence acétylée 135,38 ce qui correspond, après soustraction de l'alcool contenu dans l'essence primitive sous forme d'ether à 12,69 % d'alcool libre. Cette essence est très soluble dans 2 à 2,5 parties d'alcool à 70° ; réfrigérée à 12°C, elle ne se solidifie pas.

La distillation sous vide donne des fractions contenant du camphène gauche ; du cineol et du camphre. Ses éléments à point d'ébullition plus élevé, traités par l'anhydride phtalique, donnent une faible proportion d'un alcool qui n'a pas été encore étudié. L'eau mère de saponification de l'essence additionnée d'acide sulfurique dépose un mélange d'acides gras dont l'analyse de ses sels d'argent, indique qu'il contient les acides caprique et caprylique.

M.M. Schimmel and Cie. (6) ont reçu d'Egypte une herbe qui porte le nom de Chieh. Cette plante s'emploie chez les arabes et les touaregs en infusion comme émoulin et diurétique. Le professeur Heckel à Marseille a examiné ce végétal et a déclaré sous réserve que cette herbe est probablement une *Artemisia herba alba*. Son opinion a été confirmée par une étude ultérieure faite par le Docteur Giessler conservateur de l'Institut Botanique de l'Université de Leipzig.

Par entraînement par la vapeur d'eau, cette plante donne 1,6% d'huile essentielle jaunâtre qui sent la thuyone et marque :
IE de l'essence acétylée = 40,7 ml est soluble dans 2,6 volumes et plus d'alcool à 70°. La faiblesse des indices d'ether et d'acetylation donne à conclure que cette essence contient très peu d'éléments saponifiables et alcooliques.

Un second lot de cette herbe n'a cédé que 0,58% d'essence sensiblement différente de la précédente. Elle est jaune brunâtre et se distingue par une odeur piquante qui était effacée dans l'essence obtenue antérieurement, par contre l'arome de thuyone ou de sange n'apparait qu'au bout de quelques temps. La principale différence réside dans la modification du sens de la déviation polarimétrique. La nouvelle essence est ~~d~~extrogyre alors que l'ancienne était levogyre, la nouvelle renferme également beaucoup plus d'éléments alcooliques. Toutes ces divergences pourraient s'expliquer par le fait que la première fois la distillation a été faite sur l'herbe fleurie alors que les fleurs du second lot n'étaient pas encore très développées.

La nouvelle essence présente les propriétés suivantes :
 $d_{15} = 0,8994$; $n_D^{20} = + 1,475$; $N_D^{20} = 1,46684$; IA = 4,6 ; IE = 35,0
IE de l'essence acétylée = 163,3 ml est soluble dans 1,8 volumes et plus d'alcool à 70° avec dépôt de paraffine.

M.H.P Jeucard et C. Satic (6) ont retiré par distillation de la plante entière ; provenant d'Algérie, une essence rouge brun dont l'odeur ressemble à celle de l'Absinthe, elle présente les propriétés suivantes :

$d_{15} = 0,9540$; IA = 6,4 ; IE = 66,5 ; IE de l'essence acétylée = 129,5.

Elle contient environ 15% de phénols parmi lesquels l'ether diméthylque du pyrogallol occupe la première place. L'essence débarassée de ses phénols distille entre 175°C et 200°C, elle

paraît contenir de la thuyone et de l'alcool thuylique.

Une autre étude (7) faite sur l'Artemisia herba Alba d'Algérie montre que l'essence contient du camphène du cinéol du camphre, du geraniol et des acides caproïque et caprylique à l'état d'esters. Le rendement en essence est de 0,3%. C'est une huile jaune verdâtre à odeur très agréable et à saveur forte. Elle présente les propriétés suivantes :

$d_{15} = 0,9456$; $N_D^{20} = 1,47274$; $[\alpha]_D^{20} = +15^{\circ} 30'$

Elle est très soluble dans l'alcool à 80°.

Plus tard, en 1961 Gildmeister et Hoffman (8), publient les résultats de leurs recherches sur la composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso.

Recemment YASHPHE J, R. SEGAL et Coll (9) ont étudié l'activité antibactériale de l'huile de la plante.

Vers les années 1970, des recherches sur d'autres constituants chimique de l'*Artemisia herba alba* furent réalisés.

La composition des lactones sesquiterpeniques du genres *Artemisia* a fait l'objet des travaux de plusieurs équipes de recherche : (10) Cet intérêt particulier, est basé sur le fait que certains composés renfermant le groupement méthylène - γ - lactone sont doués de propriétés cytotoxiques et antitumorales (11):

Ainsi S.M. Khafagy et Coll (12) publient en 1971 leurs travaux sur l'*Artemisia herba alba* d'Egypte. Ils réussissent à isoler et identifier la sentonine: un lactone sesquiterpenique dont la plante a été considérée dépourvue jusqu'alors.

La composition des lactones sesquiterpeniques d'*Artemisia herba alba* du Desert Negev en Moyen Orient est l'objet des travaux de R. Segal et Coll.

En 1976, ils rapportent l'isolement à l'état pur et l'identification de la structure de trois lactones sesquiterpeniques, appelés herbolides A, B et C (13). Les recherches plus récentes de cette équipe ont abouti à l'identification d'autres lactones sesquiterpeniques : les herbolides D, E, F et le desacetylherbolide A (14, 15).

L'étude de l'*Artemisia herba alba* de Gebel Katherina (Sinai) effectuée par M.M. Gordon et L.H. Zalkow montre la présence de : 11 β -H-tatridin D ; 3-oxo-11 β -H-tatridin D et 11 β -H-gallicin : des lactones sesquiterpeniques de structure germanolide (16 ; 17 ; 18).

Les résultats des études menées par ces équipes, conduisent à la conclusion, que l'*Artemisia herba alba* Asso contient des lactones sesquiterpeniques très variés.

Les flavonoides de l'*Artemisia herba alba* sont étudiés par A.M. Saleh et Coll (19). Ils isolent de la plante d'Egypte huit flavonoides glycosides.

Une étude des flavonoides d'*Artemisia herba alba* d'Algérie est entamée et donne des résultats assez encourageants (20).

Chapitre: III

TESTS

PHYTOCHIMIQUES

PRELIMINAIRES

Avant d'entamer une étude détaillée de la composition chimique d'une plante, il est nécessaire d'effectuer des tests phytochimiques préliminaires, afin de déterminer les différentes classes des composés s'y trouvant.

Ce sont des tests qualitatifs basés sur des réactions colorées, caractéristiques des groupements fonctionnels.

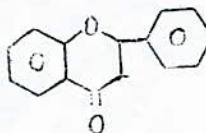
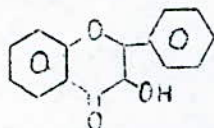
Etant donné que la composition chimique d'une même espèce végétale varie selon la région où elle se développe et selon la période de la cueillette, nous avons jugé indispensable cette recherche préliminaire.

Les données de la bibliographie (16) ont orienté notre travail sur la recherche des : flavonoïdes, quinones libres ; coumarines, tanins, saponosides, stérols, terpènes, alcaloïdes, lactones.

Les tests phytochimiques préliminaires sont effectués soit à partir d'un décocté à 5%, soit à partir d'un extrait étheré ou chloroformique. Nous avons utilisé les techniques décrites par Paris et Nothus (21).

1 Recherche des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des pigments jaunes, généralement polyphénoliques. Ils sont très répandus chez les végétaux. Ils se présentent souvent sous forme d'hétérosides ou flavonosides dont les génines sont des dérivés du flavone:
et du flavonol:



certaines flavonoïdes présentent des propriétés antiseptiques. Des recherches entreprises par Kostanetski et Perkin ont permis de trouver des méthodes de synthèse de ces produits naturels.
(22).

La recherche des flavonoïdes est faite sur le décocté, par la réaction de la cyanidine.

5ml du décocté à 5% sont additionnés de 5ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 95° - eau permutée - acide chlorhydrique concentré, à parties égales en volume) ; puis de quelques copeaux de magnésium et de quelques gouttes d'alcool isoamylique. La réaction est positive lorsqu'il y a apparition d'une coloration rose-orangé ou rose violacé dans la couche surnageante d'alcool isoamylique.

Nous avons obtenu une coloration rose orangé ; la réaction est positive.

2 Recherche des tanins :

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente, ayant la propriété de tanner la peau (c'est à dire de la rendre imputrescible). Cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000. Ils sont très répandus dans le règne végétal.

D'après la constitution chimique des différents tanins, nous pouvons distinguer deux groupes:

- Les tanins hydrolysables qui sont des polyesters de glucides et d'acides phenols. Selon la nature de ces derniers, nous distinguons les tanins galliques et ellagiques.
- Les tanins condensés dont la structure est voisine de celle des flavonoïdes. Ils sont formés de deux ou plusieurs molécules de flavanne - 3- ols (catéchols ou catéchines) ou de flavanne - 3- 4 diols (2).

La recherche des tanins est faite sur le décocté, par la réaction colorée au chlorure ferrique.

A 2ml de décocté, nous ajoutons quelques gouttes d'une solution aqueuse de chlorure ferrique à 2%. La réaction est positive s'il y a apparition d'une coloration brun-vert (tanins catéchiques) ou bleu-noir (tanins galliques).

Nous avons obtenu une coloration bleu noir, caractéristique des tanins galliques.

3 Recherches des coumarines :

Les coumarines sont des dérivés de la benzo- α -pyrone. Elles se présentent dans diverses espèces végétales.

Leur fonction physiologique dans les plantes n'est pas connue. Certaines coumarines synthétiques sont utilisées comme anticoagulants, d'autres toxiques pour les poissons sont connues sous le nom de poisons végétaux comme le bergaptène et l'imperatoïdène.

La benzo- α -pyrone ou encore la coumarine à l'odeur très agréable du foin frais, elle est utilisée en parfumerie. (23).

La recherche des coumarines est effectuée sur le décocté. Les coumarines sont extraites par l'éther éthylique et mises en évidence par leur fluorescence bleue qui est modifiée en présence d'ammoniaque.

On a obtenu une extraction de coumarines par l'éther éthylique.

10ml de décocté, sont extraits par 5ml d'éther éthylique. La phase étherée est séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporée à sec. Le résidu est dissout dans quelques gouttes de chloroforme et déposé sur du papier à chromatographie. La réaction est positive si nous observons, par examen aux U.V à 366nm, une fluorescence bleue qui vire au bleu-vert sous l'influence de vapeurs d'ammoniaque.

La réaction est positive.

4 Recherche des quinones libres :

Les quinones sont des dicétones cycliques conjuguées. Ce sont des agents d'oxydation doux. Elles sont toutes colorées.

- Les paraquinones sont généralement jaunes ou orangées.

- Les orthoquinones sont plus foncées, souvent rouges.

Les quinones constituent la catégorie la plus importante des dicétones dans la nature (24).

Les quinones libres sont mises en évidence par la réaction de Bornträger sur un extrait chloroformique de la drogue.

2g de drogue pulvérisée sont humectés par quelques gouttes d'acide chlorhydrique au 1/10, puis mis à macérer quelques heures dans 20ml de chloroforme. Après filtration, la solution chloroformique est mise en contact avec de l'ammoniaque dilué au demi. La réaction est positive lorsque, par agitation, la phase aqueuse alcaline se colore en rose plus ou moins vif.

Pour notre plante la réaction est négative ; elle ne contient donc pas de quinones libres.

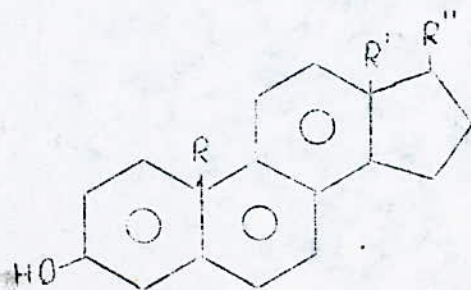
5. Recherche des stérols et des terpènes :

Les terpènes sont des hydrocarbures constitués d'unités identiques en C5 de même squelette que l'isoprène. Nous distinguons :

- * Les monoterpènes : ce sont des hydrocarbures en C10 présents dans les huiles essentielles.
- * Les sesquiterpènes : ce sont des hydrocarbures en C15 présents dans les huiles essentielles, et dans les constituants amers des végétaux.
- * Les diterpènes : ce sont des hydrocarbures en C20 ; ils constituent les résines végétales.
- * Les triterpènes : ce sont des hydrocarbures en C30 qui constituent la partie insaponifiable des plantes les saponins et les glycosides.
- * Les tétraterpènes : C40 présents dans les caroténoïdes, colorants des végétaux
- * Les polyterpènes (C5)ⁿ présents dans le caoutchouc naturel.

Etant constituants des huiles essentielles, les terpènes sont utilisés en parfumerie et dans l'industrie cosmétique. Beaucoup d'autres : glucosides, vitamines, saponins, sont utilisés en médecine. Certains sont utilisés comme détergents et résines. (23).

Les stérols sont des composés renfermant un squelette cyclopentanophenanthénique plus ou moins hydrogène. Leur formule générale est :



Beaucoup de ces composés sont des alcools. Ce sont des corps présentant les caractères de solubilité des graisses, ils sont insaponifiables. Certaines ~~phytostérols~~ sont des stimulants cardiaques. Les stérols sont très répandus dans le règne animal et végétal. (25).

La recherche des terpènes et des stérols est faite sur le résidu d'évaporation d'un extrait éthéré de la drogue. La réaction utilisée est celle de Lieberman Buchard.

1g de drogue pulvérisée est mis à macérer dans 20ml d'éther éthylique pendant 24h. Après filtration et évaporation du solvant le résidu est dissout dans d'anhydride acétique. L'addition d'1ml d'acide sulfurique concentré provoque l'apparition d'une coloration mauve virant au vert.

La réaction est positive pour notre plante, nous avons obtenu une coloration rose foncé virant au vert foncé.

6 Recherche des saponosides :

Les saponosides sont très répandus dans le règne végétal. Ce sont des glycosides ne contenant pas d'azote. Selon l'aglycone, ils sont triterpénoïdes et stéroïdes.

Tous les saponosides présentent un groupement hydroxyle lié à des D- glucose, D- galactose, D- xylose ou L-ramnose. Les saponosides ont des propriétés tensioactives, ils ont une action hémolytique assez forte : ils détruisent les globules rouges (25)

La recherche des saponosides est basée sur la propriété qu'ont les solutions aqueuses de saponosides de donner par agitation une mousse persistante. Nous opérons sur le décocté, si la recherche est positive, nous effectuons alors un indice de mousse selon la technique de la pharmacopée française.

15ml de décocté sont placés dans un tube à essai de 160mm de hauteur et de 16mm de diamètre. La lecture est effectuée après agitation pendant 10 secondes et repos pendant 10 minutes. La hauteur de mousse obtenue est mesurée en cm.

Nous avons obtenu une hauteur de mousse de 1 cm.

7 Recherche des alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés d'origine végétale, de caractères basique et de composition chimique assez complexe. Ils sont dotés d'une activité biologique intense.

Actuellement plus de 1000 alcaloïdes sont connus. Ils sont classés

Selon la structure de la partie de la molécule contenant l'azote c'est la classification chimique.

Selon leur action pharmacologique

Selon les espèces végétales les contenant.

Des recherches récentes ont montré l'efficacité des alcaloïdes comme étant des agents anticancerigènes (26).

La recherche des alcaloïdes se fait à l'aide de la réaction de Dragendorff sur les extraits obtenus en milieu acide et en milieu alcalin.

Extraction en milieu acide :

5g de drogue pulvérisée sont mis à macérer pendant 24h dans 25ml d'une solution aqueuse à 5% d'acide chlorhydrique, La phase aqueuse, après alcalinisation par l'ammoniaque concentrée, est extraite par un mélange éther éthylique - chloroforme (3 : 1 V/V). La solution organique séchée sur le sulfate de sodium anhydre, est évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu est repris par quelques ml d'acide chlorhydrique dilué au 1/10.

Extraction en milieu alcalin :

5g de drogue pulvérisée sont imbibés d'ammoniaque au demi, puis mis à macérer pendant 24 h dans un mélange éther éthylique-chloroforme (3 : 1 V/V).

L'extrait organique est traité par une solution aqueuse à 5% d'acide chlorhydrique.

Réaction de caractérisation :

Elle est faite sur les solutions acides provenant des extractions en milieu acide et en milieu alcalin.

On ajoute aux solutions acides quelques gouttes du réactif de Dragendorff. En présence d'alcaloïdes, nous observons la formation d'un précipité de couleur orange à rouge-brique.

La réaction de Dragendorff s'est avérée négative.

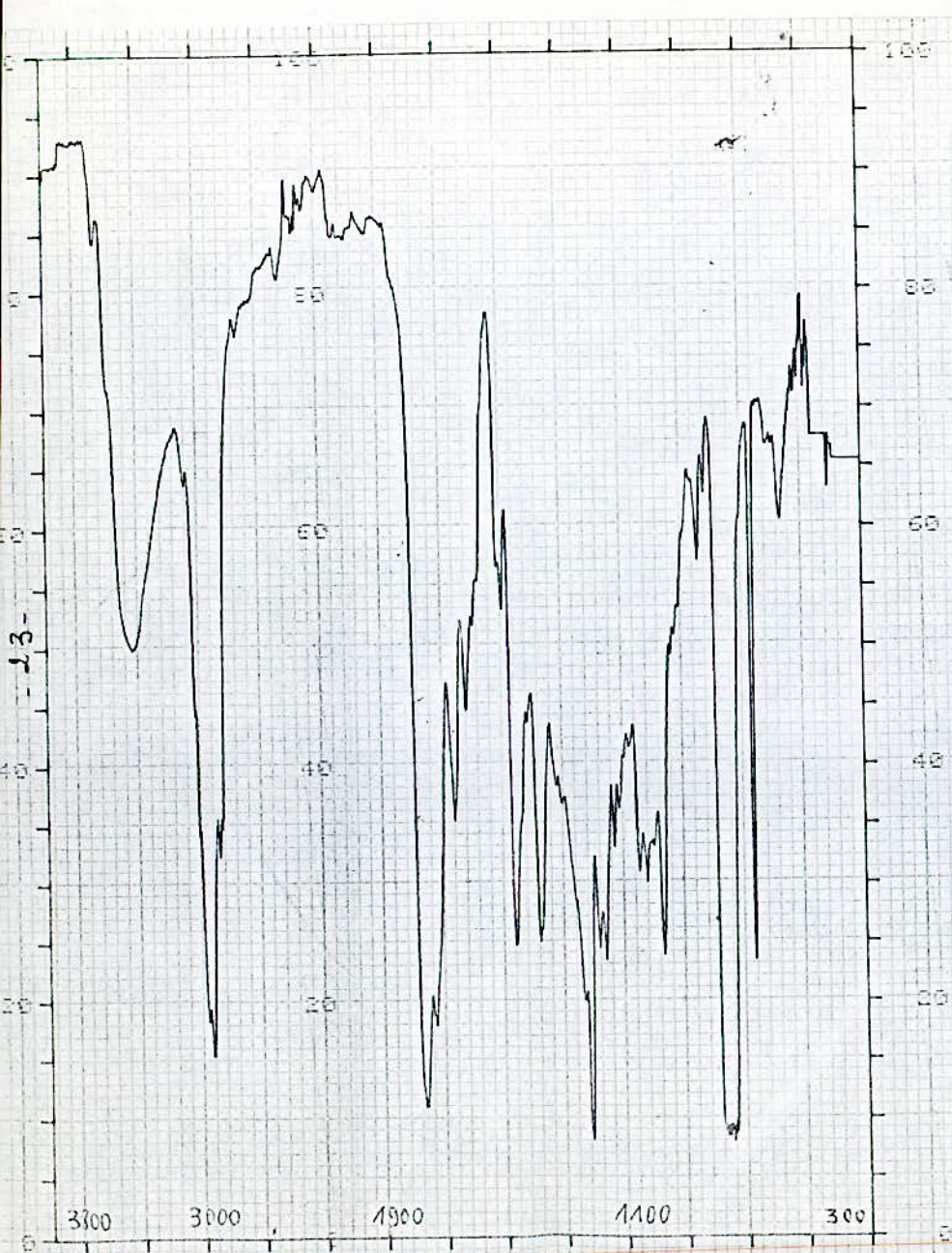
8 Recherche des lactones sesquiterpeniques :

Les lactones sesquiterpeniques renferment le groupement liés à des cycles de structure germacranolide, endemanolide, guaianolide ou cadinanolide (10°)

La recherche des lactones sesquiterpeniques est faite sur l'extrait chloroformique de la plante.

Les parties aériennes de la plante, sont grossièrement contusées et couvertes d'éther de pétrole pendant 24 heures. Le solvant est décanté et le résidu est mis en percolation dans le chloroforme pendant 72 HEURES.

L'examen du spectre infrarouge d'un échantillon d'extrait chloroformique montre une bande à 1770cm^{-1} caractéristique des lactones (Figure 2).



PERKIN-ELMER 983

DATE 9.12.1986

SAMPLE Extract, Chloroformique
 D'ARTEMISIA HERBA ALBA
 ASSO

OPERATOR

SCAN MODE 4
 NOISE FILTER 1
 RESOLUTION 3.0
 ORDINATE MODE %T
 RANGE 4000.0 - 300.0
 ABSO. SCALE 0.25

PEAK	THRESHOLD	%T
3556.0	84.23	
3437.0	49.83	
2933.0	19.30	
2874.0	32.34	
2457.0	81.04	
2356.0	85.03	
2232.0	86.90	
2008.0	94.73	
1770.0	10.99	
1731.0	17.86	
1661.0	25.25	
1621.0	44.57	
1495.0	33.00	
1452.0	24.66	
1399.0	30.04	
1214.0	7.93	
1192.0	24.37	
1153.0	23.42	
1109.0	22.93	
1048.0	36.83	
1022.0	29.91	
959.0	23.71	
844.0	55.99	
821.0	62.75	
747.0	7.63	
667.0	20.94	
600.0	60.00	
500.0	71.83	
416.0	71.11	
360.0	78.85	
404.0	71.80	
410.0	60.66	

FIG.2

Les résultats des tests phytochimiques sont résumés dans le tableau suivant :

Constituant recherché	Résultats du test	observations
Flavonoïdes	+	couleur rose-orange
Quinones libres	-	-
Coumarines	+	couleur bleu-vert observé en U.V
Tanins	+	couleur bleu-noir
Saponosides	+	moûsse 1 cm.
Stérols et Terpenes	+	couleur rose-foncé vibrant au vert-foncé
Alcaloïdes	-	-
Lactones sesqui-terpeniques.	+	Bande à 1770 cm^{-1} dans le spectre IR

Tableau 1 : Résultats des tests phytochimiques préliminaires effectués sur l'Artémisia herba alba Asso.

Chapitre : IV

ETUDE
CHIMIQUE

L'étude chimique d'une plante consiste en l'isolement des composés chimiques présents à l'état pur, suivi de leur identification par mesure de leur constantes physiques et par leur caractéristiques spectrales. Il arrive très souvent, au cours de l'étude chimique d'une plante, la découverte d'un produit naturel inconnu. Dans ce cas, il est indispensable de déterminer la structure du composé isolé et de réaliser un certain nombre de réactions chimiques confirmant la structure proposée .

Enfin la synthèse au laboratoire du produit est l'étape finale d'une telle recherche.

L'objectif de notre travail étant l'isolement et l'identification des constituants de l'Artémisia herba Alba Asso, nous avons fait appel à une variété de méthodes de séparation et d'identification. Nous avons tout d'abord isolé l'huile essentielle pour pouvoir étudier les constituants de la plante entraînables à la vapeur d'eau. Ensuite, nous nous sommes intéressés aux lactones sesquiterpéniques présents dans la plante.

1 ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE D'ARTEMISIA HERBA ALBA ASSO

1.1 Généralités sur les huiles essentielles : (2)

Les huiles essentielles appelées également essences, sont des mélanges complexes de substances odorantes et volatiles présentes dans les végétaux. Ce sont généralement des liquides à la température ordinaire. Leur caractère odorant est lié à leur volatilité. Etant très volatiles, elles peuvent être entraînées par la vapeur d'eau. Leur densité est généralement inférieure à 1, par contre leur indice de réfraction est souvent élevé. Les huiles essentielles sont dotées d'un pouvoir rotatoire, et sont généralement incolores ou jaune pâle. Peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent leur odeur. Elles sont solubles dans les alcools et pratiquement dans tous les solvants organiques. Les huiles essentielles sont très altérables et sensibles à l'oxydation, mais elles ne rancissent pas. Leur tendance à polymeriser, en donnant des produits résineux ainsi que leur altération limitent leur conservation.

La composition chimique des huiles essentielles est assez complexe. On y trouve généralement : des composés terpeniques, aromatiques, des acides organiques, des aldehydes et des cétones de faible poids moléculaire ainsi que des coumarines volatiles.

Des recherches ont permis d'affirmer que pour une même espèce végétale, il existe des variations de la composition chimique de l'huile essentielle selon le milieu et l'époque de la végétation.

Les huiles essentielles sont généralement obtenues par entraînement à la vapeur d'eau des plantes ou de certaines parties de la plante, ou alors par expression à froid. Elles peuvent être également obtenues par enfleurage ou par extraction par les solvants volatiles.

Les huiles essentielles sont utilisées en pharmacie, dans l'industrie alimentaire ainsi que dans l'industrie cosmétique.

1.2 : LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE : (27 ; 28)

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode physicochimique de séparation des substances volatiles. La séparation est basée sur les différences du coefficient de partage des produits à séparer entre un gaz constituant la phase mobile et un solide constituant la phase stationnaire.

La colonne est l'élément essentiel de tout système chromatographique. Elle contient la phase stationnaire. Généralement, nous opérons sur des colonnes thermostatées à des températures allant de l'ambiante à 350° C ; selon la volatilité de l'échantillon.

Un gaz porteur inerte traverse la colonne tout au long de l'essai. Après l'évaporation de l'échantillon et l'entraînement du mélange par le gaz porteur, les composants du mélange sont ralentis par la phase stationnaire de la colonne. Le ralentissement de chacun des constituants est fonction de son coefficient de partage K . En conséquence, entraîné par le gaz vecteur, le constituant dont le K est le plus petit quitte la colonne le premier. A la sortie de la colonne, les gaz pénètrent dans un détecteur qui donne un signal proportionnel à la concentration de la substance présente. Il est évident que les constituants d'un mélange traversent la phase stationnaire à des vitesses différentes et quittent la colonne à des intervalles de temps différents. Le temps pendant lequel le composé reste dans la phase stationnaire est appelé temps de rétention t_R , il peut être déterminé à partir de chromatogramme : l'enregistrement du processus chromatographique

Etant donné que le temps de rétention dépend du coefficient de partage, lequel est une grandeur physico-chimique propre à un

composé dans des conditions bien déterminées, t_R peut être considéré comme une caractéristique qualitative du composé. Cependant, le fait que le temps de rétention dépend de plusieurs paramètres, parfois difficilement contrôlables, sa détermination n'est pas toujours reproductible.

L'utilisation de la C.P.G. pour l'analyse qualitative est basée sur le fait que dans les mêmes conditions d'analyse, les composés ayant les mêmes temps de rétention sont identiques. Ainsi la méthode d'identification par des étalons consiste à déterminer dans les mêmes conditions les temps de rétention des composants du mélange à analyser et ceux des étalons. La comparaison de ces caractéristiques permet l'identification des composés présents dans le mélange.

Une autre application de la C P G pour l'analyse qualitative, est connue sous le nom de méthode des rajouts. Elle consiste à ajouter dans le mélange à analyser une certaine quantité d'un étalon, si ce dernier est présent dans le mélange, le pic du chromatogramme lui correspondant augmente. Si par contre il n'y est pas, il apparaît comme un constituant en plus. Les résultats obtenus par cette méthode ne sont pas très concluants, car parfois le pic correspondant à l'étalon ajouté, englobe quelques uns des pics voisins. Ceci rend l'identification incertaine.

1.3. : PARTIE EXPERIMENTALE :

1.3.1. : Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau :

Pour extraire l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* nous avons utilisé la méthode communément utilisée : l'entraînement à la vapeur d'eau.

Cette méthode consiste à mettre la plante grossièrement contusée dans un récipient, traversé par un courant de vapeur d'eau. Les constituants volatiles de la plante, peu solubles dans l'eau, sont entraînés et condensés. L'huile est séparée du distillat par décantation (29).

L'appareillage que nous avons utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle par cette méthode est représenté à la figure (3). Il est constitué d'un ballon de deux litres, à trois cols, contenant la plante. Ce ballon est d'une part relié à deux ballons chaudières lui fournissant la vapeur d'eau, et d'autre part à un réfrigérant qui sert à condenser les vapeurs d'eau contenant l'huile extraite de la plante. Le réfrigérant est relié par son extrémité à un ballon recette. Pour assurer une bonne distribution de la vapeur à travers la plante, nous avons introduit à l'extrémité des conduits de vapeur un tube persé à différents endroits.

Nous avons soumis à l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau 300g de plante pendant quatre heures et recueilli un litre de distillat. Après décantation à l'aide d'ampoules à décanter, nous avons obtenu une huile jaune-clair, d'odeur agréable. Pour récupérer complètement l'huile du distillat, nous avons procédé à un relargage avec du NaCl.

Le rendement de la distillation est de 0,48%.

Nous avons déterminé la densité et l'indice de réfraction

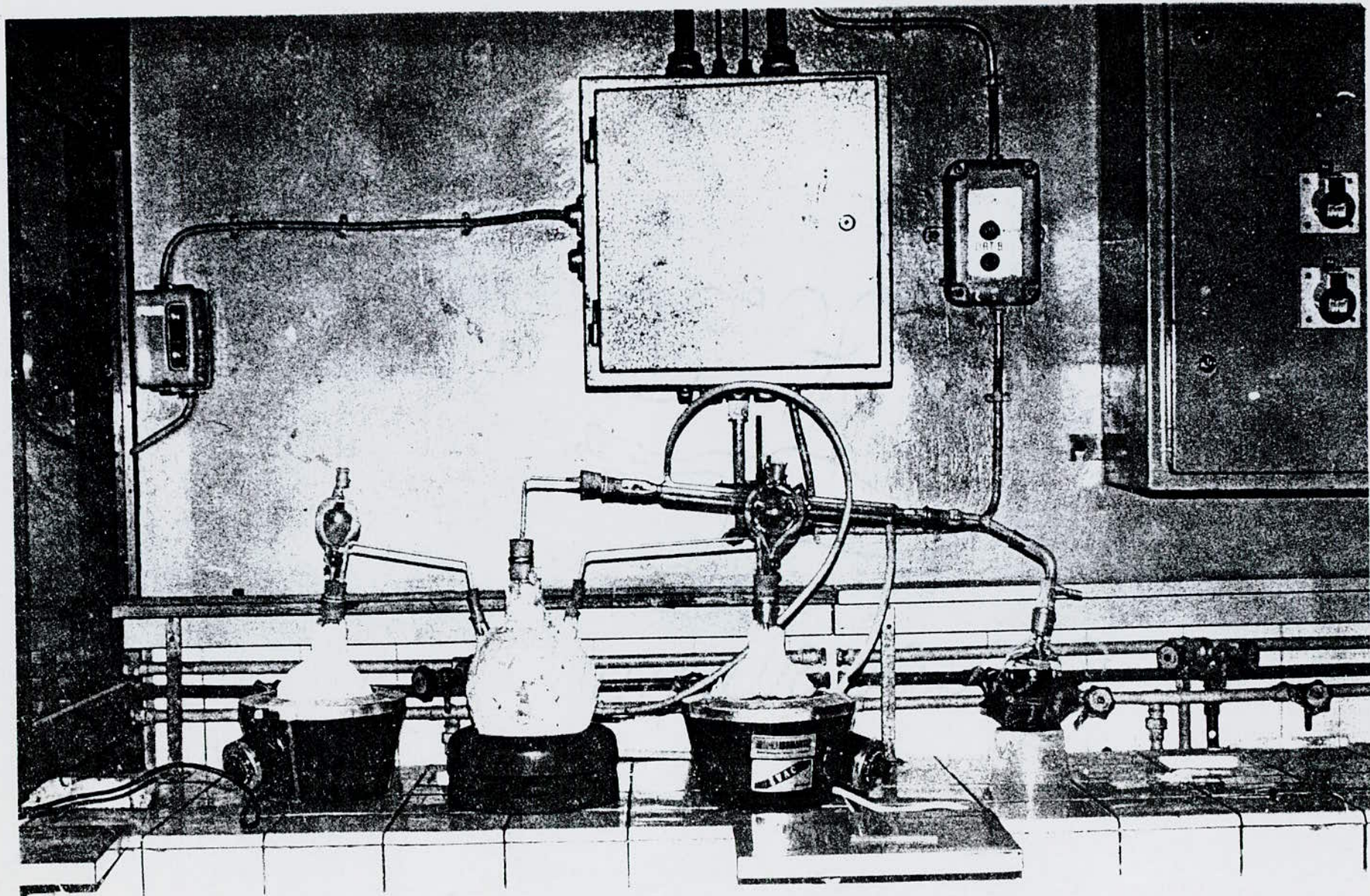


FIG.3 APPAREIL DE L'EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE PAR ENTRAINEMENT
A LA VAPEUR D'EAU

de l'huile, et nous avons constaté que les valeurs de ces constantes physiques sont très proches des valeurs de référence (6).

Constantes physiques \ Valeurs	Mesurée	référence
Densité : $d_{15^{\circ}}$	0,9415	0,9456
Indice de réfraction n_D^{20}	1,4730	1,47274

Tableau n° 2 : Constantes physiques de l'huile essentielles d'Artemisia herba alba Asso

1.3.2. : Analyse de l'huile essentielles par chromatographie en phase gazeuse :

Nous avons effectué l'analyse de l'huile essentielle avec un chromatographe PYE.UNICAM série 304 Philips à détecteur à ionisation de flamme (FID) et à intégrateur (figure.4).

Nous avons effectué un certains nombres d'essais préliminaires dans le but de trouver les conditions optimales pour une meilleure séparation des constituants de l'huile. Ceci nous a permis de fixer notre choix sur la colonne analytique en verre : dont les caractéristiques sont les suivantes :

Diamètre intérieur = 4mm

Longueur = 1,5m

Phase stationnaire = 10% PEG 20M (20000) ; lavée à l'acide, non traitée.

Support inerte = Diatomite "C"

Granulométrie = 100 - 120 mesh.

Température limite d'utilisation égale 225° C.

Les analyses effectuées à des températures de la colonne de 130°C et 150°C nous ont montré que la température de 150°C donne de meilleurs résultats. En faisant varier l'atténuation de 32 ; 64 ; 128 et 512, nous nous sommes rendus compte que l'atténuation 64

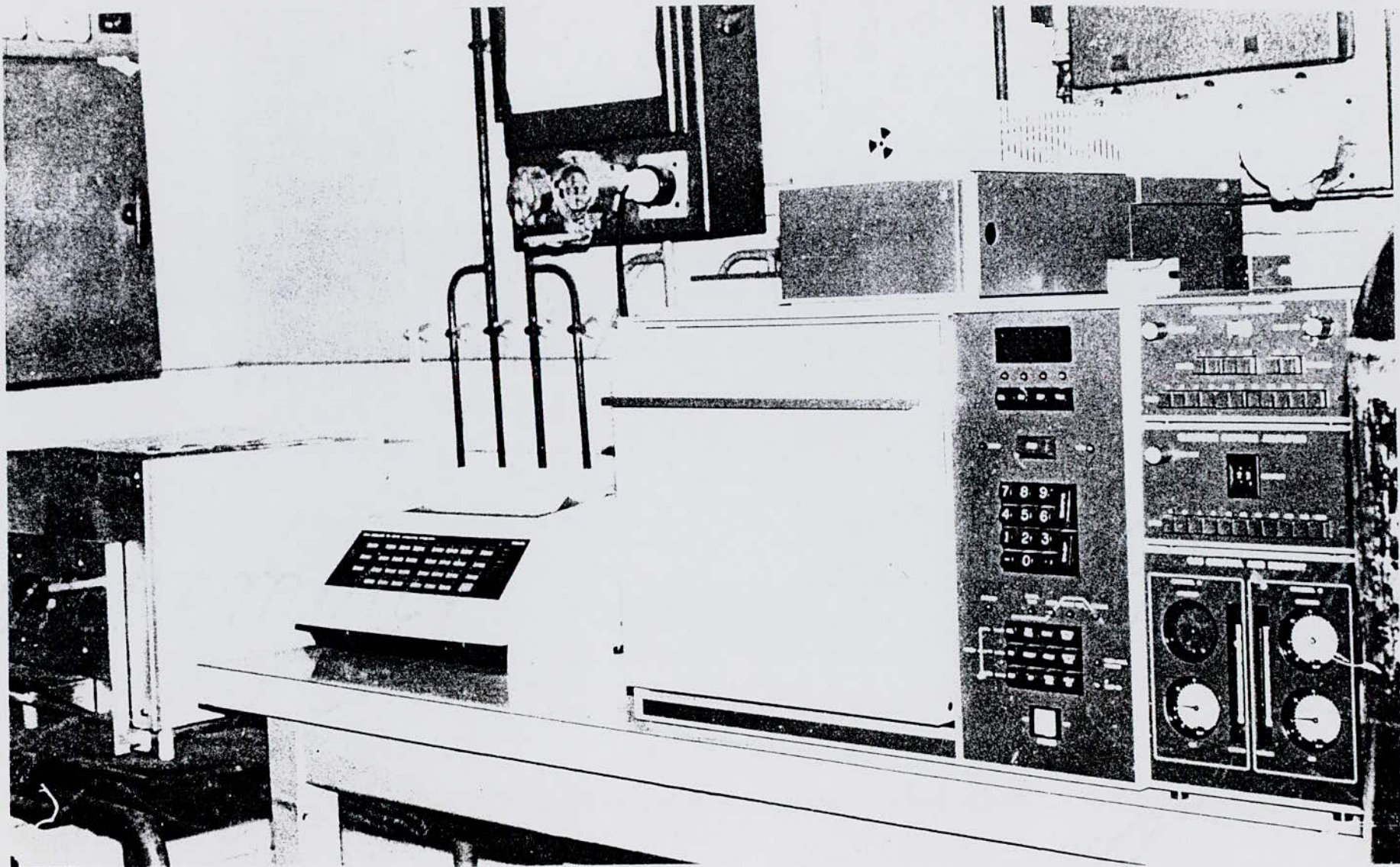


FIG: 4

CHROMATOGRAPHE

PYE_UNICAM serie 304 PHILIPS

convient le mieux. Ainsi nous avons fixé les conditions opératoires suivantes :

Débit de gaz vecteur (N₂) = 30ml/mn.

Débit d'air = 333ml/mn

Débit d'hydrogène = 33ml/mn

Température de la colonne = 150°C

Température d'injection = 170°C

Température du détecteur = 200°C

Atténuation = 64

Vitesse du papier = 0,5

Volume injecté = 0,1 µl

Le chromatogramme de l'huile essentielle représenté à la (figure 5) nous a permis de mettre en évidence 26 constituants. Pour identifier les constituants de l'huile essentielle, nous avons utilisé la méthode d'identification par des étalons. Pour cela, nous avons effectué l'analyse de l'huile et des étalons dans les mêmes conditions. Les chromatogrammes obtenus sont représentés sur les figures 6 à 16.

En comparant les temps de rétention des étalons à ceux des constituants de l'huile, nous avons réussi à en identifier quelques uns.

PT EVAL:
PT= 1474.
PT EVAL:
PT= 297.
RT= 64
CS= 1

CHROMATOGRAMME DE L'HUILE ESSENTIELLE
D'ARTEMISIA HERBA ALBA ASSO

CHANNEL A INJECT 00:03:07

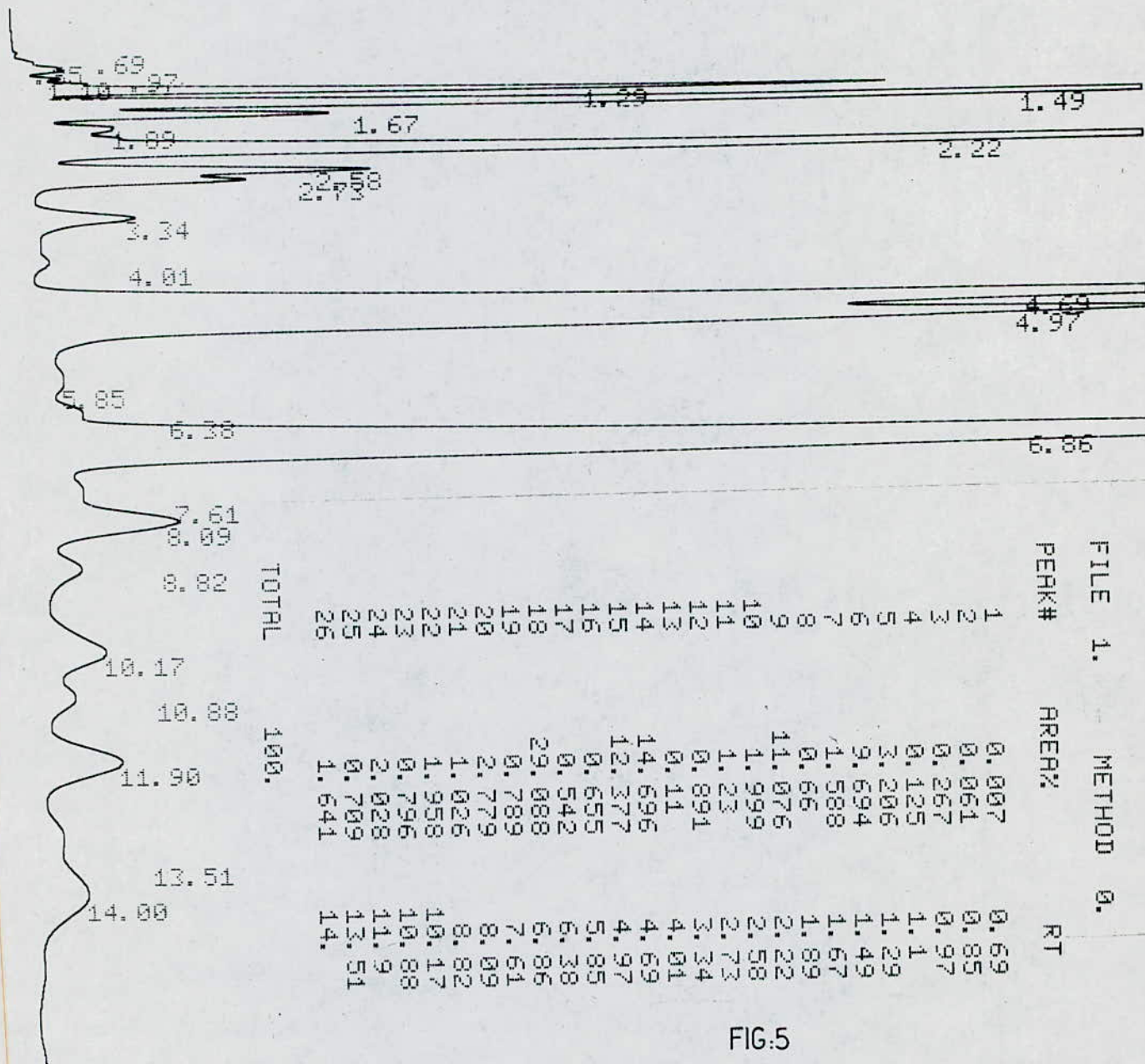
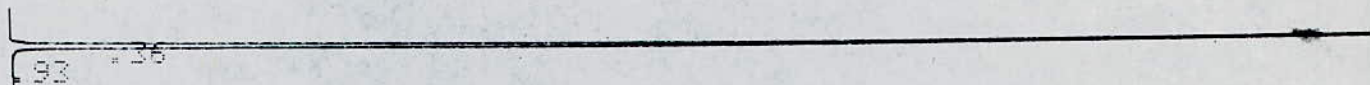


FIG.5

PT EVAL:
PT= 138.
AT= 64
CS= 0.5
RT= 1024

CHROMATOGRAMME DE L'ETHANOL

CHANNEL A INJECT 24/11/86 02:35:19



INPUT OVERRANGE AT RT= 0.96

24/11/86 02:35:19

CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 8 INDEX 8

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.038	0.36	3662	02
2	99.962	0.93	9542199	03
TOTAL	100.		9545861	

FIG. 6

PT EVAL:
PT= 412.
AT= 1024
CS= 0.5

CHROMATOGRAMME DU α-PINENE

CHANNEL A INJECT 11/11/86 14:46:50



INPUT OVERRANGE AT RT= 1.29

FIG. 7

PT EVAL:
PT= 148.
AT= 1024
CS= 0.5

CHROMATOGRAMME DU CAMPHENE

CHANNEL A INJECT 01/12/86 03:27:07



INPUT OVERRANGE AT RT= 1.56

01/12/86 03:27:07

CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 12 INDEX 12

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	2.657	0.82	495194	02
2	97.158	1.48	18107096	02
3	0.17	2.42	31613	02
4	0.015	2.66	2867	03

FIG:8

TOTAL 100. 18636770

PT EVAL:
PT= 56.
AT= 1024
CS= 0.5

CHROMATOGRAMME DU β -PINENE

CHANNEL A INJECT 17/11/86 03:32:10



INPUT OVERRANGE AT RT= 1.68

17/11/86 03:32:10

CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 6 INDEX 6

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	9.779	1.13	2518180	02
2	66.953	1.64	17240615	02
3	23.089	2.28	5945597	02
4	0.037	2.89	9588	02
5	0.141	3.4	36325	03

FIG:9

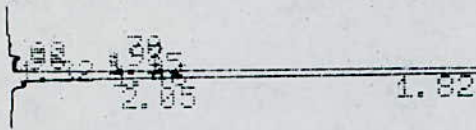
TOTAL 100. 25750305

PT EVAL:
PT= 145.
AT= 1024
CS= 0.5

-38-

CHROMATOGRAMME DU L-PHELANDRENE

CHANNEL A INJECT 01/12/86 04:06:31



INPUT OVERRANGE AT RT= 1.83

01/12/86 04:06:31

CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 15 INDEX 15

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	0.007	0.7	1102 02
2	0.006	0.82	1019 02
3	0.024	0.93	3986 02
4	0.03	0.98	4974 02
5	0.018	1.15	3043 02
6	0.537	1.32	89825 02
7	0.38	1.46	63606 02
8	98.664	1.82	16498153 08
9	0.334	2.05	55913 05

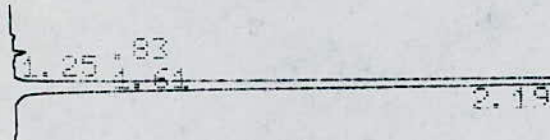
FIG: 10

TOTAL 100. 16721621

PT EVAL:
PT= 386.
AT= 1024
CS= 0.5

CHROMATOGRAMME DU CINEOL

CHANNEL A INJECT 11/11/86 14:37:18



INPUT OVERRANGE AT RT= 2.21

11/11/86 14:37:18

CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 5 INDEX 5

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	0.062	0.83	13796 01
2	0.421	1.25	94075 08
3	0.03	1.61	6685 05
4	99.487	2.19	22228266 01

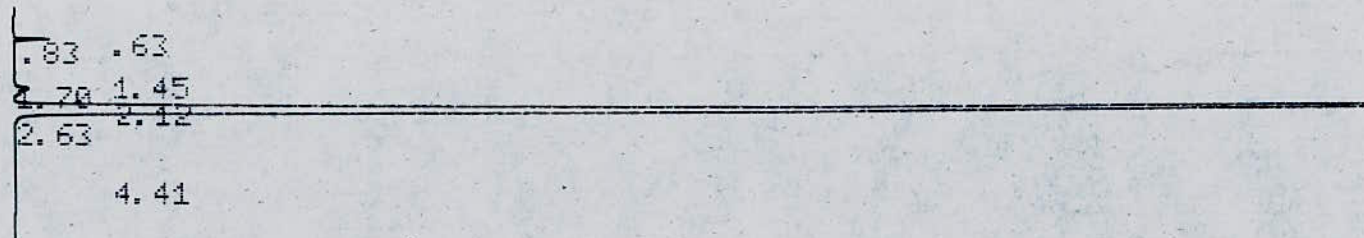
FIG: 11

TOTAL 100. 22342822

PT EVAL:
PT= 358.
RT= 1024

CHROMATOGRAMME DU P_CYMENE

CHANNEL A INJECT 01/12/86 02:35:13



INPUT OVERRANGE AT RT= 2.7

01/12/86 02:35:13 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 8 INDEX 8

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.038	0.63	7809	02
2	0.702	0.83	143581	03
3	0.068	1.45	13893	02
4	0.096	1.7	19648	02
5	1.038	2.12	212431	02
6	98.045	2.63	20065744	03
7	0.013	4.41	2652	01
TOTAL	100.		20465758	

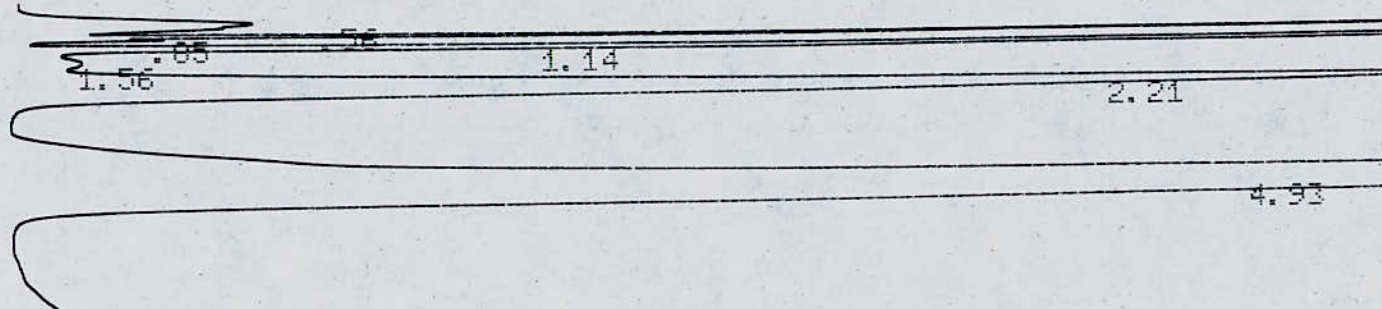
FIG 12

075

PT EVAL:
PT= 326.
AT= 64
CS= 0.5

CHROMATOGRAMME DE L'ESTER METHYLIQUE DE L'ACIDE CAPROIQUE

CHANNEL A INJECT 09/11/86 00:11:50



09/11/86 00:11:50 CH= "A" PS= 1.

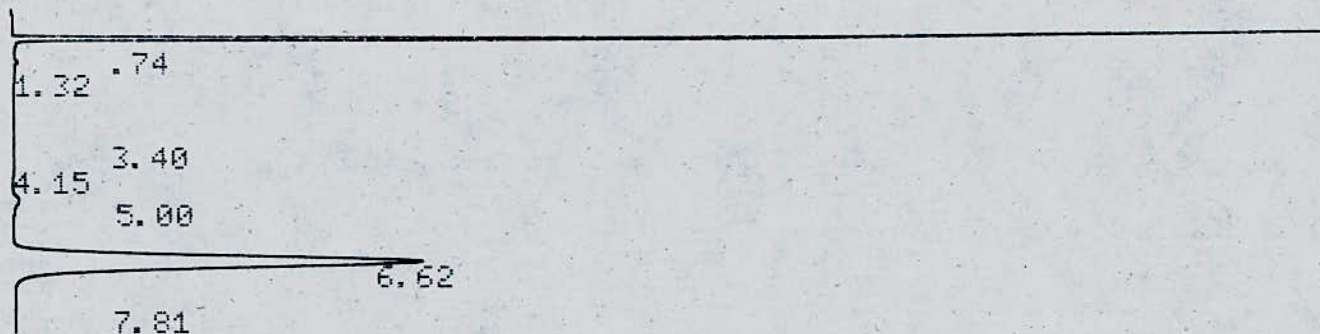
FILE	1.	METHOD	0.	RUN	2	INDEX	2
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC			
1	1.743	0.56	398533	02			
2	2.601	0.85	594594	02			
3	16.877	1.14	3858562	02			
4	0.5	1.56	114271	02			
5	14.099	2.21	3223508	03			
6	64.18	4.93	14673185	01			
TOTAL	100.		22862653				

FIG. 13

PT EVAL:
 PT= 281.
 RT= 64
 CS= 0.5
 RT= 1024
 CS= 0.5##

CHROMATOGRAMME DU CAMPHRE

CHANNEL A INJECT 11/11/6 13:35:59



11/11/6 13:35:59 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	1	INDEX	1
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC			
1	31.288	0.74	6027630	02			
2	0.476	1.32	91754	03			
3	0.025	3.4	4895	01			
4	0.096	4.15	18403	01			
5	0.809	5.	155824	01			
6	67.077	6.62	12922434	02			
7	0.229	7.81	44060	03			
TOTAL	100.		19265000				

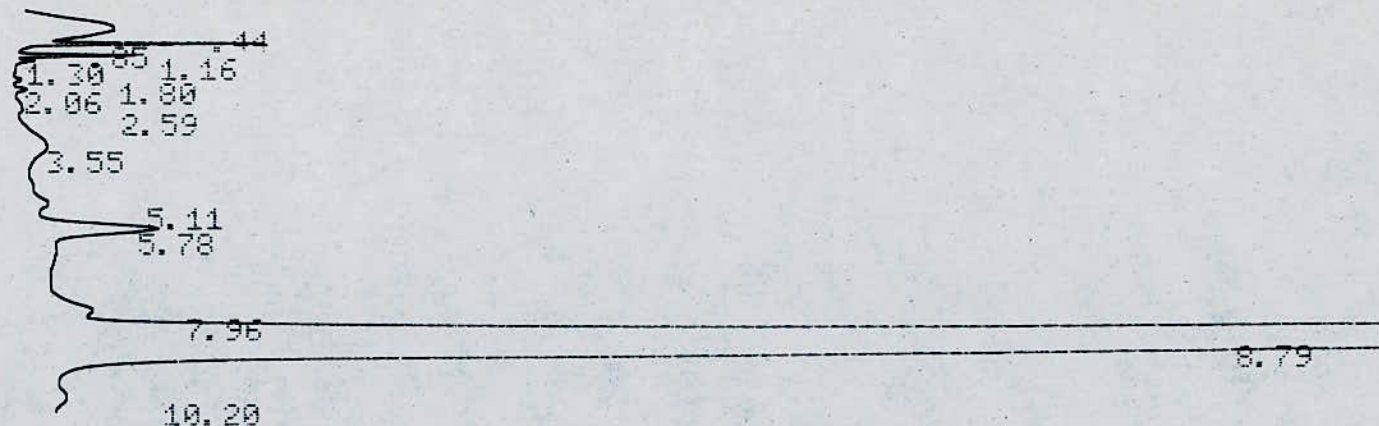
FIG. 14

PT= 201.

CHROMATOGRAMME DU γ -PHELANDRENE

RT= 64
CS= 0.5

CHANNEL A INJECT 09/10/86 00:02:12



09/10/86 00:02:12 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 1 INDEX 1

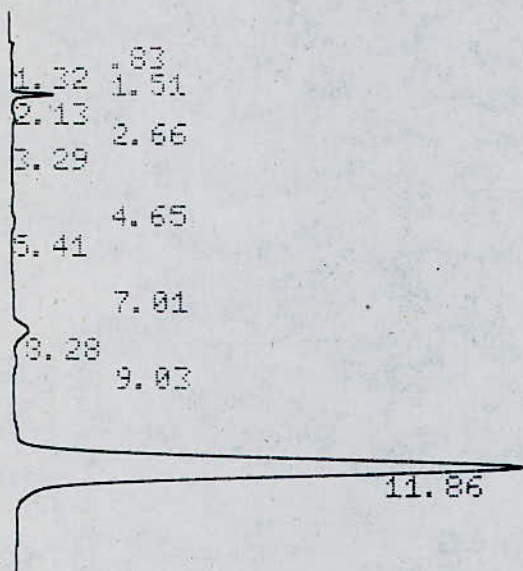
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	1.181	0.44	244549	02
2	0.362	0.85	75029	02
3	0.182	1.16	37741	02
4	0.038	1.3	7876	03
5	0.02	1.8	4072	01
6	0.036	2.06	7473	01
7	0.045	2.59	9221	02
8	0.455	3.55	94126	02
9	0.113	5.11	23305	02
10	0.854	5.78	176793	03
11	0.41	7.96	84920	02
12	96.201	8.79	19921658	08
13	0.104	10.2	21586	05
TOTAL	100.		20708349	

FIG. 15

PT EVAL:
PT= 418.
AT= 1024
CS= 0.5

CHROMATOGRAMME DU α -TERPINEOL

CHANNEL A INJECT 01/12/86 03:01:52



01/12/86 03:01:52 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 10 INDEX 10

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.066	0.83	16450	01
2	0.03	1.32	7495	01
3	0.017	1.51	4345	01
4	1.553	2.13	390037	02
5	0.168	2.66	42178	03
6	0.018	3.29	4599	01
7	0.072	4.65	18095	02
8	0.254	5.41	63707	03
9	0.201	7.01	50353	02
10	2.359	8.28	592168	02
11	0.502	9.03	126123	03
12	94.76	11.86	23792038	01

TOTAL 100. 25107588

FIG. 16

1.4. : Résultats et interprétation :

Dans le tableau suivant, nous rapportons les résultats de l'analyse de l'huile essentielle par CPG.

Numéro du pic	Temps de rétention		Nom du composé identifié.	% dans l'huile essentielle de composé identifié.
	Constituant de l'huile essentielle.	étalon		
3	0,97	0,93	alcool éthylique	0,267
5	1,29	1,25	α -pinène	3,206
6	1;49	1,48	camphène	9,694
7	1,67	1,64	β -pinène	1,588
8	1,89	1,82	α -phelandrène.	0,66
9	2,22	2,19	Cinéol	11,076
11	2,73	2,63	p - cymène	1,23
15	4,97	4,93	ester méthylique de l'acide caproïque.	12,377
18	6;86	6,62	camphre	29,008
21	8,82	8,79	γ -phelandrène	1,026
24	11,90	11,86	δ -terpinéol.	2,028

Tableau : n°3. Résultats de l'analyse de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso par CPG.

Nous remarquons que pour le pic n° 10 les temps de rétention du constituant de l'huile et de l'étalon présentent une différence de 2/10. Pour être sûr que ce pic correspond bien au camphre nous avons utilisé la méthode des rajouts. Pour cela nous avons ajouté dans l'huile essentielle quelques gouttes de camphre pur et nous avons enregistré son chromatogramme (figure 17). Nous remarquons que le pic n° 15 correspondant au camphre augmente. Cela confirme bien le résultat donné plus haut.

D'autre part, nous avons pu constaté l'absence dans l'huile essentielle des composés suivants dont les temps de rétention ne figurent pas dans le chromatogramme de l'huile : limonene (2,03) , l'ester méthylique de l'acide caprylique (3,54) ; l'aldéhyde C₁₀ (5,71) , l'ester méthylique de l'acide caprique (7,49).

Les chromatogrammes correspondants sont représentés sur les figures 10 à 21.

Dans le tableau n°3 , figurent aussi les pourcentages des constituants identifiés. Nous remarquons que l'huile essentielle d'Artemisia herba alba Asso est constituée essentiellement de : camphre ; d'ester méthylique de l'acide caproïque ; de cinéol ; de camphène et de α -pinène.

constituant de l'huile	%
Camphre	29,088
ester méthylique de l'acide caproïque.	12,377
Cinéol	11,076
camphène	9,694
α -pinène	3,206

Tableau n°4 : pourcentages des constituants majoritaires dans l'huile essentielle d'Artemisia herba alba Asso.

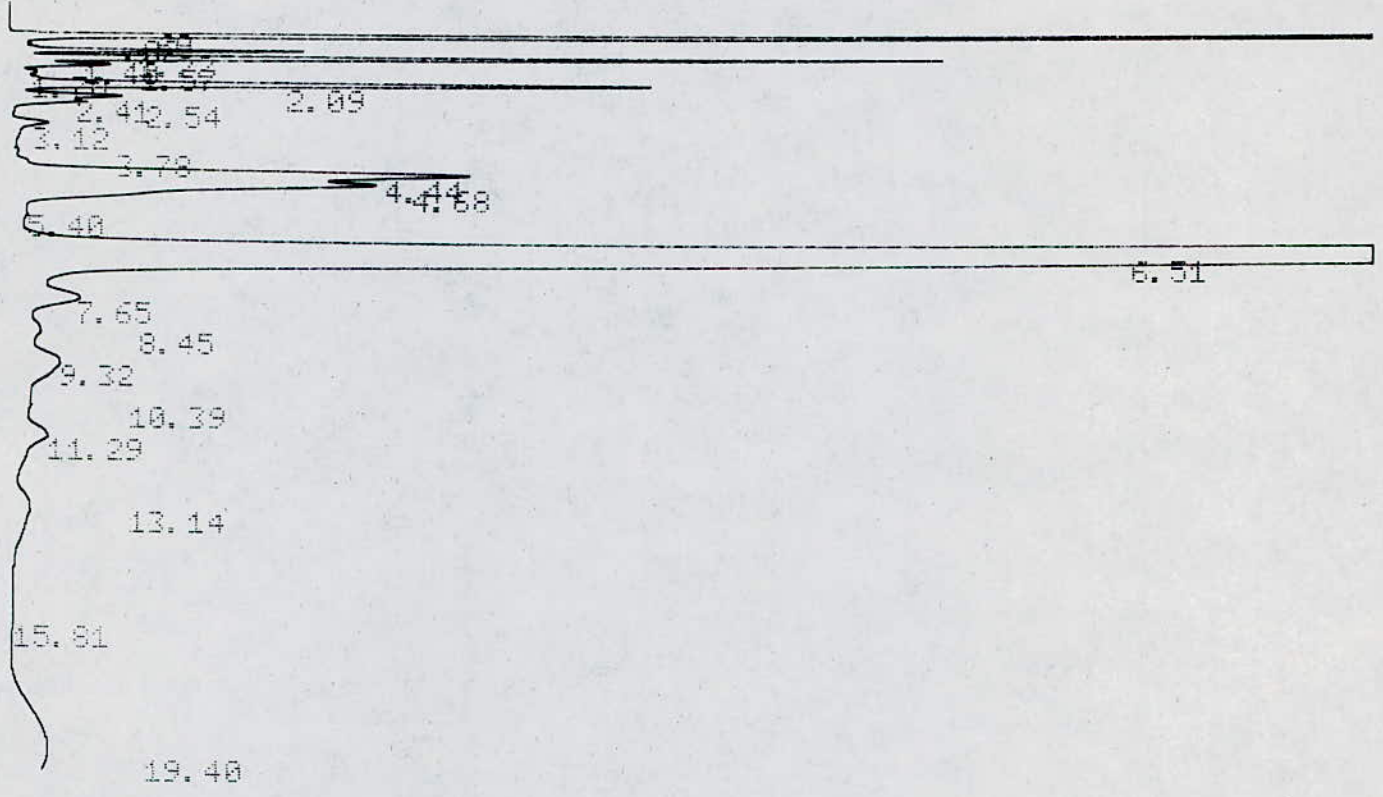
RT= 76.
 RT= 64
 OS= 0.5

CHROMATOGRAMME DE L'HUILE

- 46 -

ESSENTIELLE D'ARTEMISIA HERBA ALBA ASSO PLUS CAMPHRE

CHANNEL A INJECT 16/11/86 06:35:28



16/11/86 06:35:28

CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 17 INDEX 17

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.003	0.69	505	02
2	16.697	0.82	3055205	02
3	0.743	1.22	136004	02
4	2.188	1.4	400346	02
5	0.327	1.57	59752	02
6	0.116	1.78	21270	02
7	2.345	2.09	429181	02
8	0.466	2.41	85206	02
9	0.254	2.54	46483	02
10	0.325	3.12	59458	00
11	0.011	3.78	1999	06
12	3.344	4.44	611912	02
13	3.242	4.68	593170	02
14	0.191	5.4	34887	02
15	64.622	6.51	11824556	02
16	1.077	7.65	197077	02
17	0.528	8.45	96557	02
18	1.223	9.32	223872	02
19	0.311	10.39	56963	02
20	0.965	11.29	176501	02
21	0.709	13.14	129710	03
22	0.036	15.81	6601	01
23	0.278	19.4	50902	01

FIG:17

TOTAL 100. 18298117

PT EVAL:
 PT= 198.
 RT= 64
 CS= 0.5

CHROMATOGRAMME DU LIMONENE

CHANNEL A INJECT 09/11/86 00:52:07



09/11/86 00:52:07 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	2	INDEX	2
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC			
1	0.015	0.62	1243	01			
2	0.082	0.84	6609	01			
3	0.124	1.28	10073	02			
4	0.088	1.46	7121	02			
5	0.286	1.63	23153	02			
6	97.049	2.03	7852858	08			
7	2.169	2.54	175480	05			
8	0.187	3.61	15132	01			
TOTAL	100.		8091679				

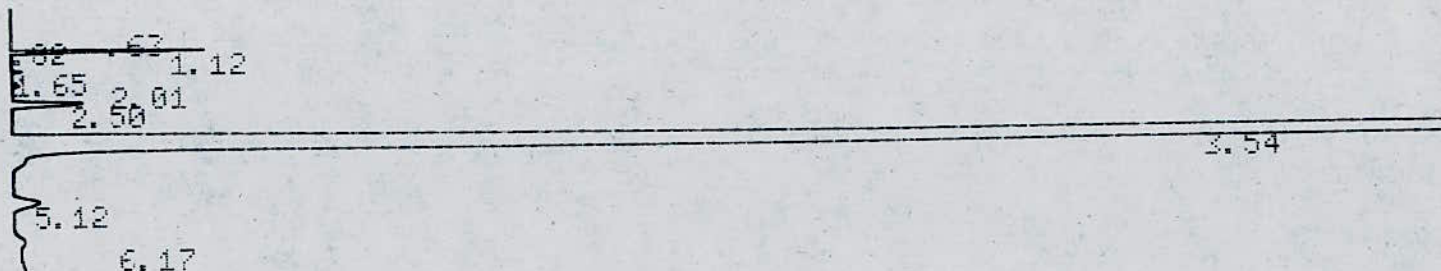
FIG: 18

-47-

PT EVAL:
 PT= 467.
 AT= 64
 CS= 0.5

CHROMATOGRAMME DE L'ESTER METHYLIQUE DE L'ACIDE CAPRYLIQUE

CHANNEL A INJECT 09/11/86 00:40:35



09/11/86 00:40:35 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 1 INDEX 1

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.015	0.63	2189	01
2	0.015	0.82	2227	01
3	0.5	1.12	71848	01
4	0.124	1.65	17757	01
5	0.066	2.01	9437	01
6	0.437	2.5	62745	01
7	98.503	3.54	14158142	01
8	0.251	5.12	36103	01
9	0.09	6.17	12920	01
TOTAL	100.		14373368	

FIG: 19

PI EVHL:
PT= 440.

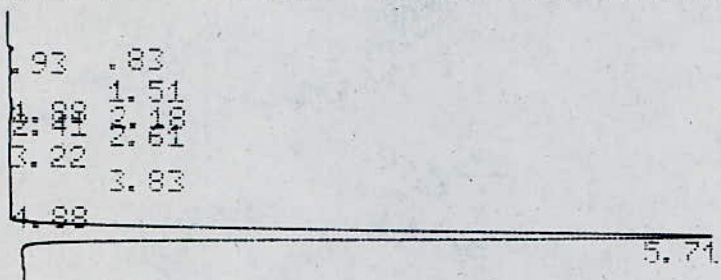
CHROMATOGRAMME DE L'ALDEHYDE C.10

RT= 124

.A FAULT 6: RT 2190
RT= <1024

.A FAULT 6: RT 2190
RT= 1024
CS= 0.5

CHANNEL A INJECT 01/12/86 03:35:22



01/12/86 03:35:22

CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 13 INDEX 13

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.018	0.83	2824	02
2	0.114	0.93	17790	03
3	0.159	1.51	24753	02
4	0.202	1.88	31506	02
5	0.196	2.18	30622	02
6	0.133	2.41	20719	02
7	0.107	2.61	16733	02
8	0.038	3.22	5966	03
9	0.02	3.83	3064	01
10	0.176	4.88	27436	01
11	98.837	5.71	15417589	03

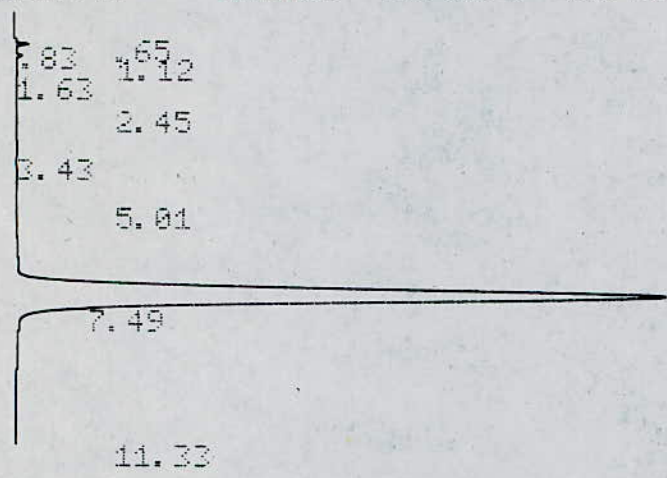
FIG. 20

TOTAL 100. 15599002

RT EVAL:
RT= 276.
AT= 1024
DS= 0.5

CHROMATOGRAMME DE L'ESTER METHYLIQUE DE L'ACIDE CAPRIQUE

CHANNEL A INJECT 11/11/6 15:40:45



11/11/6 15:40:45 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 10 INDEX 10

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.022	0.65	4991	02
2	0.281	0.83	64910	03
3	0.188	1.12	43357	01
4	0.039	1.63	9067	01
5	0.037	2.45	8555	01
6	0.292	3.43	46669	01
7	0.069	5.01	15901	01
8	99.154	7.49	22907092	01
9	0.009	11.33	2015	01
TOTAL	100.		23102557	

FIG: 21

Le pic n° 14, du chromatogramme de l'huile essentielle dont le temps de rétention est de 4,69 et le pourcentage est de 14,696% n'a pu être identifié, car il ne correspondait à aucun des étalons dont nous disposions.

Le pic n° 2 ; du même chromatogramme ; dont le temps de rétention est de 0,85 correspond à l'acétone utilisé pour le rinçage de la seringue avant chaque injection.

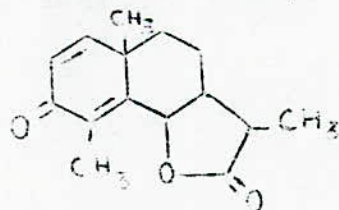
2 ETUDE DES LACTONES SESQUITERPÉNIQUES D'ARTEMISIA HERBA ALBA ASSO :

A. Recherche de la santonine :

1. : Description de la santonine: (3)

La santonine devrait être appelée santonolactone, car c'est une substance non azotée de formule brute $C_{15}H_{18}O_3$. Elle a été isolée en 1830 par Kahler, mais la détermination de sa structure a nécessité de nombreux travaux, en particulier vers 1930, ceux de Clemo et Coll. et de Ruzicka. Elle cristallise en petits prismes incolores jaunissant à la lumière, sublimes, fortement lévogyres. Elle est très peu soluble dans l'eau froide, un peu plus soluble dans l'alcool, l'éther et le benzène surtout à chaud, très soluble dans le chloroforme, insoluble dans l'éther de pétrole.

La molécule de santonine possède deux cycles hexagonaux, une fonction cétonique et un anneau lactonique.



Sa structure présente quatre carbones assymétriques, d'où 16 isomères optiques possibles. Mais deux seulement ont été rencontrés dans la nature : la santonine proprement dite et la L^e - santonine : $T_f = 171,5^\circ C$; $(\alpha)_D^{20} = -117,6^\circ$ (ethanol). La L^e santonine en diffère par son point de fusion et son pouvoir rotatoire.

La santonine est présente dans les parties aériennes de la plante, mais sa teneur varie et passe par un maximum dans les capitules au début de la floraison.

Le semen contra (les capitules d'*Artemisia Cina* Berg contenant la santonine), était connu et employé comme vermifuge par les anciens Grecs et Romains. Actuellement il est toujours utilisé en pharmacie comme vermifuge, mais depuis quelques années, la santonine s'est avérée un produit de base de la synthèse des dérivés ayant un effet cytotoxique et anticancérigène, d'où l'intérêt accru vis à vis de ce produit naturel.

La santonine n'est pas dépourvue de toxicité envers l'homme et les animaux à sang chaud : elle peut provoquer des troubles sensoriels. A dose toxique (0,50g chez l'adulte) c'est un poison convulsivant.

La santonine a été retrouvée dans plusieurs espèces d'*Artemisia*, mais en quantité variable. La systématique très complexe de ce genre a rendu difficile l'identification des plantes productrices. De plus, il semble exister des races chimiques à l'intérieur d'une même espèce, d'où des indications contradictoires.

En raison du monopole russe de la production d'*Artemisia Cina*, (l'espèce contenant le plus la santonine) des difficultés de son acclimatation hors de son pays d'origine et de la synthèse laborieuse de la santonine, des recherches ont été effectuées pour trouver d'autres sources de santonine.

Ainsi en 1971 Khafagy et Coll. (12) ont isolé la santonine des capitules fleuries d'*Artemisia herba alba* Asso d'Egypte. Ceci nous a incité à rechercher la santonine dans la plante.

2. Partie expérimentale :

2.1 : Tests qualitatifs de la santonine : (3)

Nous avons effectué tout d'abord des tests qualitatifs pour évaluer la présence de la santonine dans la plante. Ces tests sont habituellement utilisés pour la caractérisation de ce composé en vue de la sélection rapide et pour éliminer les drogues dépourvues ou pauvres en santonine.

La caractérisation qualitative de la santonine peut être effectuée par :

- a) Sa coloration rouge avec les alcalis
- b) La réaction de Qazilbash
- c) Chromatographie sur papier ou sur couche mince.
- d) Chromatographie en phase gazeuse.

Ne disposant pas d'un étalon de santonine, nous n'avons pas pu utiliser les méthodes chromatographiques. Nous nous sommes donc limités aux réactions colorées. Pour cela nous avons opéré sur les extraits alcooliques et benzenique des capitules de la plante non fleurie.

* 1g des capitules sont portés à reflux dans l'éthanol. Après filtration et addition de la soude, le filtrat se colore lentement en rouge.

* La réaction de Qazilbash consiste à traiter l'extrait benzenique par le méthylate de sodium. En présence de santonine, la couche inférieure se colore en rouge. Cette réaction est très sensible.

Les deux tests se sont avérés positifs, ceci nous a amené à tenter l'isolement et éventuellement le dosage de la santonine.

2.2. : Isolément et dosage de la santonine:(3)

L'isolement de la santonine est basé sur l'extraction de celle ci par un solvant organique. Sa purification à l'état de santoninate de baryum, soluble dans l'eau, puis la précipi-

tation de la santonine par addition d'un acide.

Pour le dosage de la santonine, nous avons utilisé la méthode préconisée par la pharmacopée française.

5 à 10g des capitules sont triturés avec de l'ammoniaque jusqu'à l'obtention d'une masse consistante que nous séchons à l'air. Cette opération a pour but de fixer les résines qui se dissoudraient dans le benzène, par lequel nous épuisons ensuite la drogue. L'extrait benzenique est évaporé et le résidu, traité au bain-marie bouillant par une solution d'hydrate de baryum. Il se forme un santoni-nate de baryum, soluble dans l'eau. Nous filtrons immédiatement et nous lavons le filtre à l'eau froide. Les filtrats réunis et refroidis à l'abri de la lumière, sont additionnés d'un excès d'acide chlorhydrique.

Nous laissons alors cristalliser la santonine dans un endroit frais. Après 24 heures, elle est recueillie sur filtre au creuset taré. Le précipité est lavé avec une petite quantité d'eau, séché deux heures à 100°C et pesé jusqu'au poids constant.

3. Résultats et discussion :

Nous avons réussi à isoler des cristaux blancs jaunissant à la lumière, bien solubles dans le chloroforme et l'éthanol. Cependant le dosage gravimétrique de la santonine, s'est avéré très délicat, en raison de la présence de résines venant souiller le produit isolé. Pour cette raison les essais que nous avons effectué n'ont pas été reproductibles.

Essai n°	Masse de la plante (g)	Masse de la santonine (g)	% de santonine
1	5,0000	0,0015	0,030
2	10,0000	0,0099	0,099
3	10,0000	0,0121	0,121

Tableau n° 5 : résultats du dosage gravimétrique de la santonine : Evidemment il serait très imprudent d'annoncer un résultat moyen des dosages effectués, étant donné le grand écart entre les essais et l'imprécision du dosage gravimétrique dans le domaine des faibles concentrations.

A notre avis, un traitement minutieux d'un échantillon de la plante dans le but d'écarter les résines, ainsi que l'utilisation de méthodes plus sensibles et plus précises, telle que la chromatographie en phase gazeuse (à condition qu'un échantillon authentique de santonine soit disponible) peuvent permettre un dosage correcte et concluant.

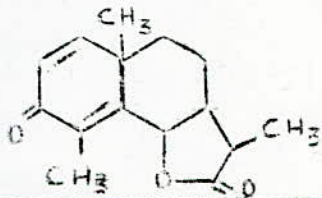
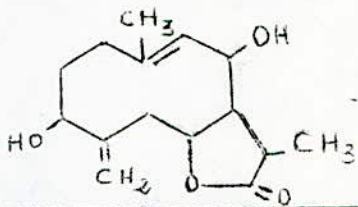
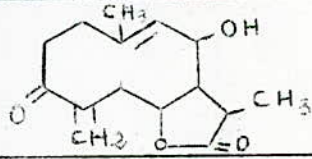
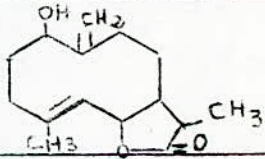
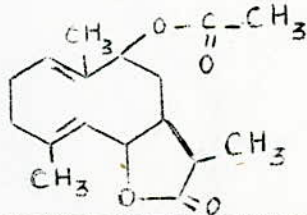
La non reproductibilité des dosages gravimétriques, nous a amené à supposer que la santonine isolée n'est pas pure. D'autre part la quantité du produit obtenu étant très faible, nous n'avons pas pu l'identifier par la mesure de ses constantes physiques : T_f ; $[\alpha]_D^{20}$, ou par ses caractéristiques spectrales

Néanmoins, la recherche de la santonine dans un échantillon de la plante au début de la floraison nous semble plus justifiée, étant donné que la quantité de ce produit atteint un maximum pendant cette période de la végétation.

B- RECHERCHE D'AUTRES LACTONES SESQUITERPENIQUES :

L'examen du spectre infra rouge de l'extrait chloroformique d'*Artemisia herba alba* Asso, montre la bande d'absorption caractéristique du groupement lactone (Figure 2).

De plus Segal et Coll, constatent que la composition des lactones sesquiterpeniques dans la plante se développant dans différentes régions du Moyent Orient est assez variée (14).

Région	Lactones sesquiterpeniques	Formule développée.
1. ELAT	-	
2. RA3 EL HIKMA	Santonine	
3. SINAI	11-β-H tatrudin D	
	3 oxo 11 β tatrudin D	
	11 α H Gallicin	
4. SEDE BOQER	herbolide A	

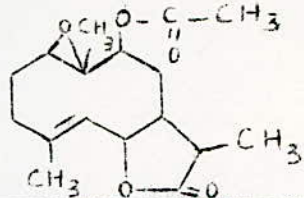
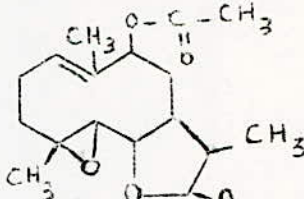
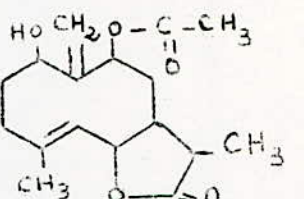
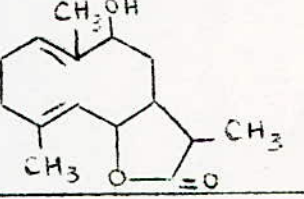
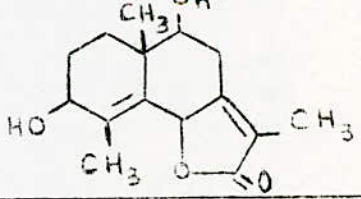
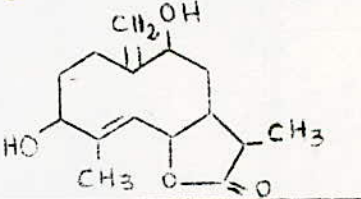
	herbolide B	
	herbolide C	
5. MIZPE RAMON	herbolide A, B, C.	
	herbolide D	
	desacetylherbolide A	
	herbolide E	
	herbolide F	

Tableau n° 6 : Composition des lactones sesquiterpeniques dans l'Artemisia herba alba Asso

Pour isoler les lactones sesquiterpeniques de l'*Artemisia herba alba* de Mizpe Ramon ; Segal et Coll ont procédé à une séparation de l'extrait chloroformique de la plante par chromatographie d'adsorption sur colonne de gel de silice. L'élution avec une solution d'isopropanol à 2% dans l'ether de pétrole, a permis d'isoler les herbolides A, B et C ; lesquels ont été purifiés et identifiés.

Nous avons tenté, en se basant sur ces travaux, d'isoler un des lactones sesquiterpeniques de la plante. Pour cela nous avons utilisé différentes méthodes de séparation et d'identification dont nous donnons un bref aperçu.

1: Méthodes de séparation et d'identification utilisées :

1.1 : La chromatographie d'adsorption sur colonne : (30, 31)

La chromatographie sur colonne est l'une des premières méthodes de séparation des constituants d'un mélange, qui fut découverte. Elle consiste à introduire le mélange à analyser au sommet d'une colonne constituée d'un tube de verre vertical, ouvert aux extrémités et rempli d'un absorbant pulvérulent appelé phase stationnaire. Un solvant, appelé éluant, est ajouté au sommet de la colonne. Il entraîne les constituants du mélange à des vitesses différentes. Ceci conduit à la formation de zones de composés purs séparées, de zones d'absorbant pur. Les composés colorés se séparent facilement, car les zones qu'ils forment dans l'absorbant sont bien visibles. Le problème est plus complexe lorsque les constituants du mélange sont incolores. Dans ce cas, il est nécessaire de recueillir des fractions de volume égal de la solution à la sortie de la colonne. Chacune des fractions est

analysée par chromatographie sur couche mince. Le solvant des fractions contenant un seul et même composé est évaporé, et le résidu est identifié par la mesure de ses constantes physiques ou par ses caractéristiques spectrales.

1.2 : La chromatographie sur couche mince : (28 , 30)

Comme toutes les autres techniques chromatographiques, la chromatographie sur couche mince est également utilisée pour séparer les constituants d'un mélange.

Le principe est le même, mais au lieu d'opérer sur colonne, on opère sur des plaques de verre recouvertes d'un adsorbant convenable. L'échantillon est déposé sur une ligne droite appelée ligne de start. Une autre droite appelée ligne de front est tracée à 10 ou 15 cm de la ligne de start. La plaque est ensuite placée dans une cuve contenant généralement un mélange de solvants, appelé éluant. Ce dernier monte par capillarité dans la couche d'adsorbant entraînant avec lui les constituants du mélange à des vitesses différentes. Cette opération est appelée développement de la plaque. Dès que le solvant atteint la ligne de front, la plaque est alors retirée de la cuve. Après séchage, la plaque est soumise à un traitement afin de rendre visibles les taches, formées par les substances non colorées, séparées lors du développement de la plaque. Ce traitement est appelé révélation. Il s'effectue par pulvérisation d'un réactif approprié sur la plaque, suivi d'un séchage à l'étuve. Souvent l'adsorbant est additionné d'un produit fluorescent, lequel permet la localisation des taches au cours de l'exposition de la plaque à la lumière ultra-violette de courte longueur d'onde 254 μm .

Les constituants du mélange sont identifiés par leur facteur de rétention $R_f = a/b$.

où : a est la distance en (cm) entre la ligne de start et le centre de la tache.

b est la distance en (cm) entre la ligne de start et la ligne du front.

Le facteur de rétention dépend de la nature des composés analysés, de l'adsorbent et des solvants ainsi que de la concentration de ces derniers. Il est indépendant de la longueur de la plaque.

Evidemment lorsque deux composés ont les mêmes R_f , ils sont identiques.

123 : La spectroscopie infra-rouge : (31)

Suite au développement de la technologie et l'apparition d'instruments de mesure perfectionnés, les méthodes spectroscopiques ont vu leur utilisation s'accroître dans le domaine de l'analyse organique. La spectroscopie infra-rouge occupe une place importante dans ce domaine. Elle s'intéresse aux liaisons interatomiques des molécules. Les atomes d'une molécule oscillent autour d'un point où les forces d'attraction entre noyaux et électrons équilibrent les forces de répulsion entre électrons et noyaux. La fréquence de ces oscillations dépend de la masse des atomes mis en jeu et de l'énergie des liaisons.

Il est possible de faire varier l'amplitude du mouvement oscillatoire en fournissant de l'énergie sous forme d'un rayonnement infra-rouge dont la fréquence correspond à celle de l'oscillation naturelle de la molécule. Celle-ci absorbe le rayonnement incident qui diminue en la traversant.

En chimie organique, on s'intéresse surtout à l'absorption du rayonnement infra-rouge se faisant dans le domaine de longueur d'onde comprise entre $2,5 \mu\text{m}$ et $15 \mu\text{m}$, ce qui correspond à un

nombre d'onde compris entre 4000 cm^{-1} et 660 cm^{-1} donnant des renseignements sur les mouvements d'étirement et de flexion des molécules. Généralement, l'intensité des bandes d'absorption dans l'I.R. s'exprime en pourcentage de rayonnement transmis ou alors en pourcentage de rayonnement absorbé.

Il arrive parfois que certaines modifications de structures survenant à d'autres endroits de la molécules, affectent très peu les mouvements d'étirement et de flexion, de sorte que la connaissance des fréquences caractéristiques des différents groupes, peut permettre de reconnaître dans le spectre d'un composé inconnu, les bandes correspondant à ces groupements.

Il faut signaler, que sous l'influence de phénomènes stériques ou électriques, il se produit un décalage des fréquences caractéristiques de certains groupes. Généralement, ces décalages sont assez faibles, mais ils peuvent parfois être beaucoup plus importants et conduire à de fausses conclusions si l'on ne s'en rend pas compte.

Dans le tableau suivant sont données les fréquences d'absorption caractéristiques de quelques groupements fonctionnels (32)

Tableau 1 : Fréquences caractéristiques de quelques groupements fonctionnels

Tableau n° 7 : Fréquences d'absorption caractéristiques de quelques groupements fonctionnels :

Groupements Fonctionnels	Longueur d'onde cm^{-1}	Mouvement oscillatoire	Intensité
- CH ₃	2970 - 2950	ν^{as}	Forte
	2885 - 2865	ν^{s}	Forte
	1465 - 1440	δ^{as}	Moyenne
	1380 - 1370	δ^{s}	Moyenne
	740	ρ	
- CH ₂	2930 - 2915	ν^{as}	Forte
	2860 - 2840	ν^{s}	Forte
	1480 - 1450	δ	Moyenne
	723 - 720	$\rho (n \geq 4)$	Moyenne
Cycloalcènes	1650 - 1550	$\nu_{\text{C}=\text{C}}$	Variable
Lactone	1730 - 1760	$\nu_{\text{C}=\text{O}}$	Forte
	1280 - 1150	$\nu_{\text{C}-\text{O}}$	
Acétate -C(=O)-CH ₃	1740 - 1730	$\nu_{\text{C}=\text{O}}$	Forte
	1060 - 1000	$\nu_{\text{C}-\text{O}}$	Forte

ν^{as} : Vibration de valence assymétrique

ν^{s} : Vibration de valence symétrique

δ : Mouvement de ciseau assymétrique, symétrique

ρ : Torsion

2 : PARTIE EXPERIMENTALE :

2.1 : Isolement d'un lactone sesquiterpenique ;

Nous avons opéré de la manière suivante :

300g de plante contusée sont trempés pendant 24 heures dans l'ether de pétrole (Teb = 40- 60). Le solvant est retiré, et la plante est mise en percolation dans le chloroforme. Après 72 heures, le chloroforme est séparé de la plante et évaporé sous vide. Le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice 60 Merck (Figure 22). Le poids de gel de silice utilisé est 20 à 30 fois celui du résidu.

L'élution par l'isopropanol à 2% dans l'ether de pétrole a fourni 21 fractions de 20 ml chacune.

Nous avons procédé ensuite à l'analyse, des fractions recueillies ; par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Celui ci est additionné d'une substance fluorescente permettant l'observation à l'U.V. des plaques développées. Après avoir tracé les lignes de start et de front, nous avons déposé sur les plaques à des intervalles réguliers une goutte de chacune des fractions.

Pour le développement des plaques nous avons essayé trois mélanges de solvants :

- * Acetate d'éthyle - méthanol (80 : 20 - V/V)
- * Acetate d'éthyle - méthanol (25 : 75 - V/V)
- * Isopropanol à 2% dans l'ether de pétrole - chloroforme (99 : 1 - V/V).

Nous avons réalisé la révélation à l'aide d'un appareil CAMAG - U.V Betrachter, permettant l'exposition des plaques à la lumière U.V de longueur d'onde 254 μ m.

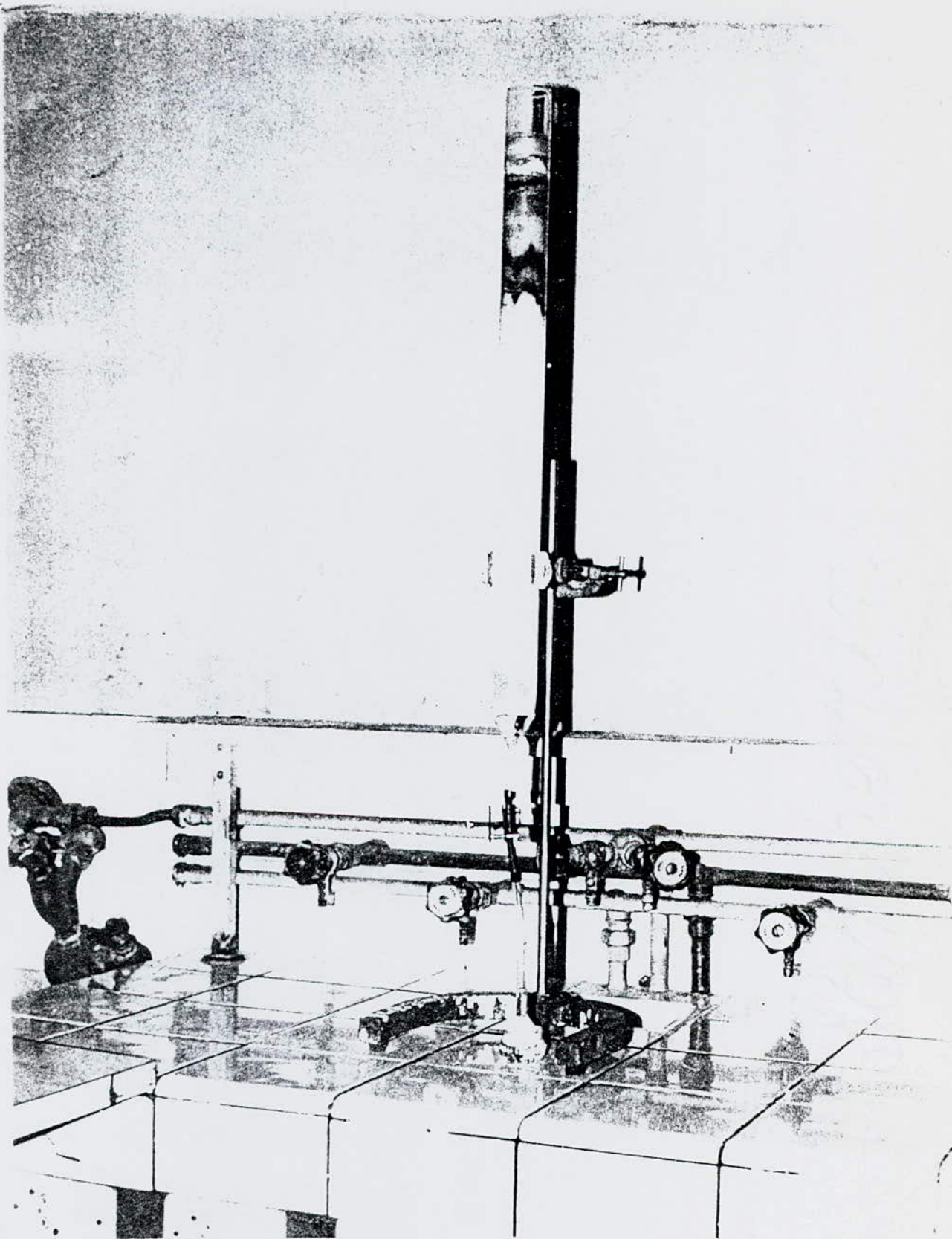


FIG: 22

COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE

Nous avons observé une seule tache pour chacune des fractions de 0 à 11 sur toutes les plaques, alors que les fractions de 12 à 20 ne présentaient pas de taches. De plus, toutes les taches étant alignées, nous avons conclu que les fractions de 0 à 11 contiennent un seul et même composé.

D'autre part, nous avons remarqué que les mélanges de solvants constitués d'acétate d'ethyle et de méthanol provoquent au cours du développement des plaques, la migration du composé jusqu'à la ligne de front (figure 23). Par contre le développement est meilleur avec l'éluant iso-propanol-ether de pétrole-chloroforme (figure 24).

L'analyse par chromatographie sur couche mince, nous a permis de localiser les fractions contenant le composé recherché.

Après évaporation sous vide du solvant de ces fractions, nous avons obtenu un résidu ayant la consistance d'un gel, de couleur jaune-pâle.

Nous avons procédé ensuite à une purification du produit brut par recristallisation dans l'ethanol et obtenu des cristaux blancs amorphes. Le rendement de la recristallisation est de 4%.

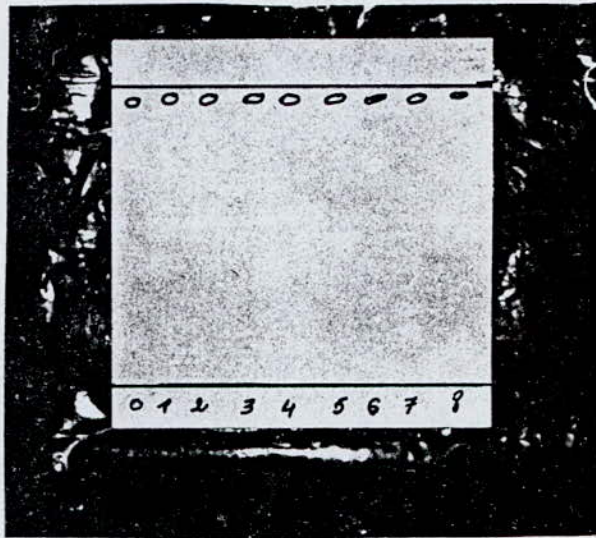


FIG: 23

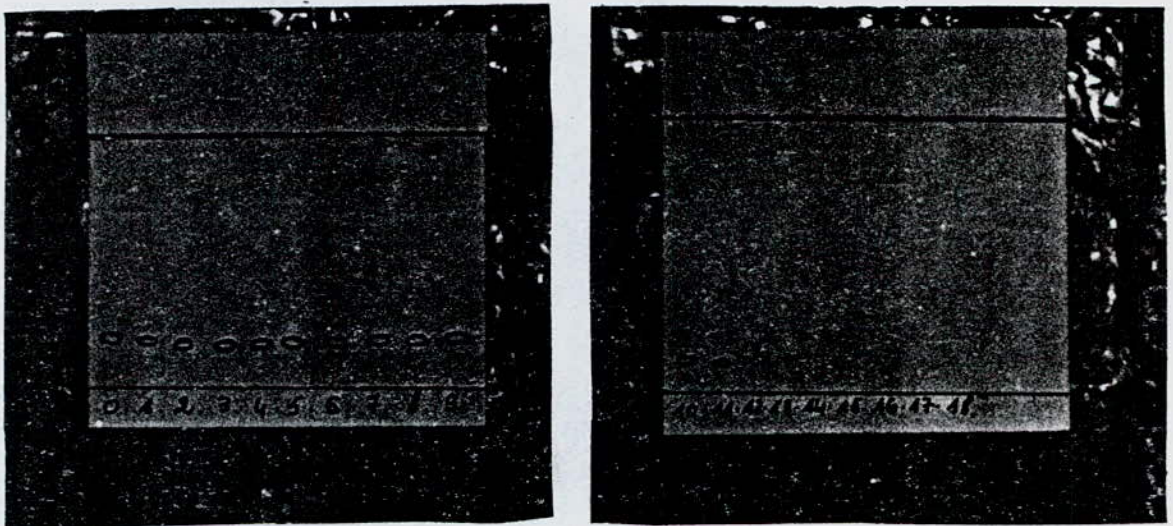


FIG: 24

2.2 : Identification du composé isolé :

Pour identifier le composé isolé, nous avons déterminé sa température de fusion, et examiné son spectre I.R.

La détermination de la température de fusion est faite en tube capillaire à l'aide d'un appareil Electrothermal Melting point Apparatus.

Le spectre IR est tracé en pastilles de KBr à l'aide d'un appareil PERKIN - ELMER 983 G.

3 : RESULTATS ET INTERPRETATION :

Nous avons effectué quatre essais de séparation de l'extrait chloroformique de la plante par chromatographie d'adsorption sur colonne. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

Masse du résidu de l'extrait chloroformique. (g)	Masse de gel de silice (g)	Masse du produit brut isolé (g)
10,000	200,000	0,406
6,500	200,000	0,632
6,666	200,000	0,644
6,666	200,000	0,649

Tableau n° 8 : Résultats du fractionnement sur colonne de l'extrait chloroformique de la plante.

Nous remarquons que le rendement de la séparation est meilleur lorsque la masse du gel de silice est de 30 fois la masse du mélange à séparer, ceci est lié au pouvoir séparateur de l'adsorbant.

L'analyse sur couche mince, nous a permis de déterminer le facteur de rétention du composé isolé : $R_f = 0,16$ dans les conditions suivantes :

* adsorbant : gel de silice 60F 254

* éluant : isopropanol à 2% dans l'éther de pétrole chloroforme (99 : 1 V/V).

La détermination de la température de fusion du composé isolé, nous a donné la valeur $54 - 55^\circ \text{C}$.

Avant d'évaporer le solvant des fractions recueillies à la sortie de la colonne chromatographique, nous avons examiné les spectres infra-rouge de chacune d'elles. Nous avons observé deux bandes d'absorption autour de 1730 cm^{-1} . Par contre dans le spectre infra-rouge du composé isolé, apparaît une seule bande d'absorption très forte à 1729 cm^{-1} (Figure 25).

Nous avons alors examiné de plus près l'absorption du composé dans cette région, en augmentant le rapport signal/bruit de fond de l'appareil. Le spectre obtenu (Figure 26) montre bien deux bandes fortes ; l'une à $1736,4 \text{ cm}^{-1}$ et l'autre à $1728,4 \text{ cm}^{-1}$.

La bande à $1736,4 \text{ cm}^{-1}$ pourrait être attribuée à la présence d'un anneau lactonique. Notre supposition est apparemment confirmée par la présence de deux autres bandes fortes : l'une à 1288 cm^{-1} caractéristique de la vibration de valence de la liaison C-O et l'autre à 1125 cm^{-1} caractéristique de la vibration asymétrique du groupement C-O-C.

Les bandes d'absorption fortes à $1728,4 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{C=O}}$) et moyenne à 1041 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$) sont probablement dues à la présence d'un groupement acétate $\text{CH}_3 - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} -$

Les bandes d'intensité moyenne à 1602 cm^{-1} et à 1581 cm^{-1} caractéristiques de la vibration $\text{C} = \text{C}$, montrent la

PERKIN-ELMER 983 G

DATE 23.12.1986

SAMPLE COMPOSE-ISOLE

OPERATOR

SCAN MODE 4

NOISE FILTER 1

RESOLUTION 3.0

ORDINATE MODE %T

ORD HIGH 60.00

ORD LOW 20.00

RANGE 4000.0-500.0

ABSC. SCALE 0.25

PEAK THRESHOLD 2.0%T

CM-1 %T

2958.0 26.04

2921.0 26.58

2851.0 28.28

2336.0 57.97

1729.0 20.66

1602.0 55.58

1581.0 55.72

1463.0 41.55

1384.0 49.76

1288.0 23.24

1125.0 33.54

1076.0 38.88

1041.0 54.93

963.0 60.58

744.0 48.61

705.0 61.71

652.0 69.68

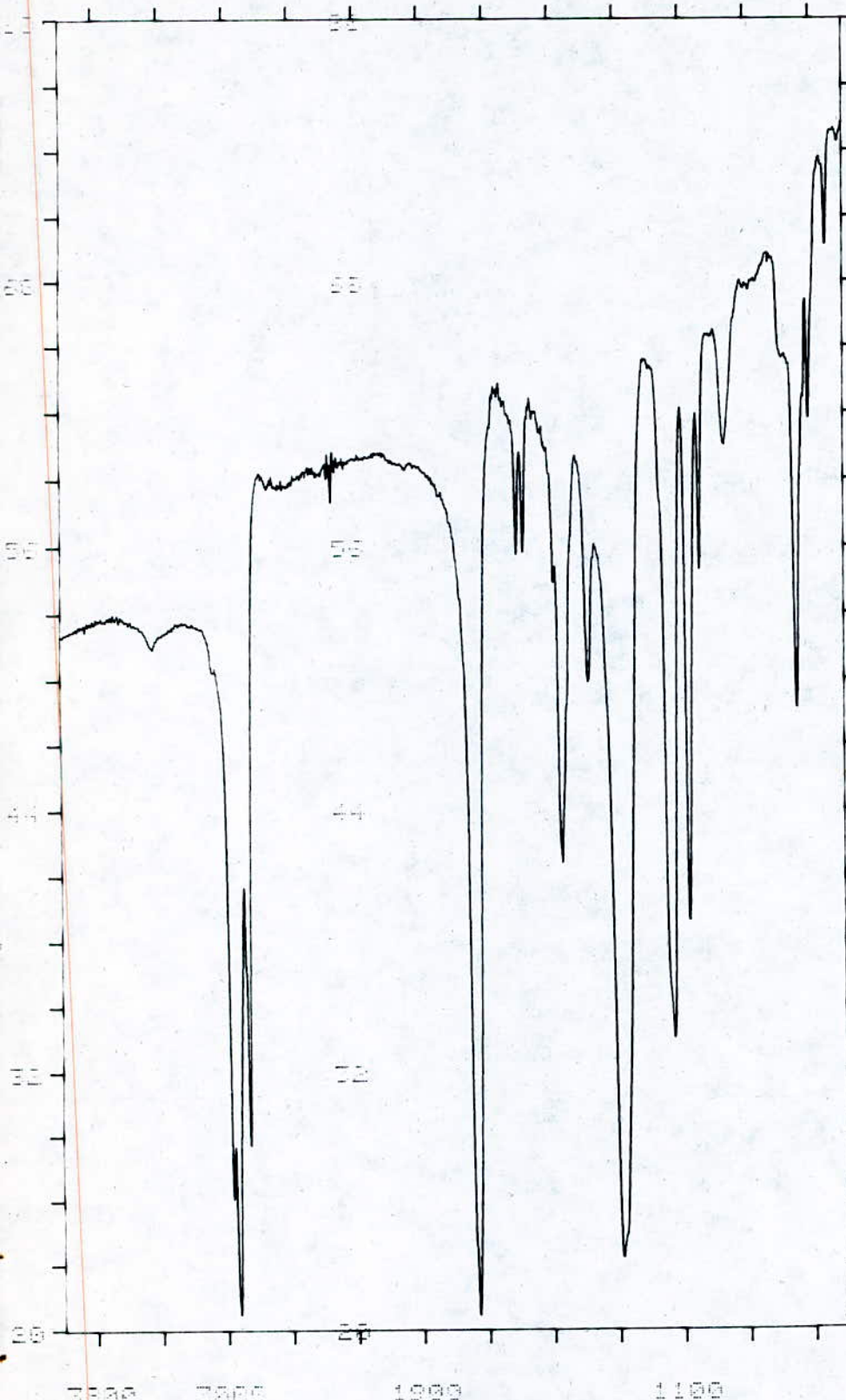


FIG:25

PERKIN-ELMER 983 G

DATE 28.12.1986

SAMPLE COMPOSE ISOLE

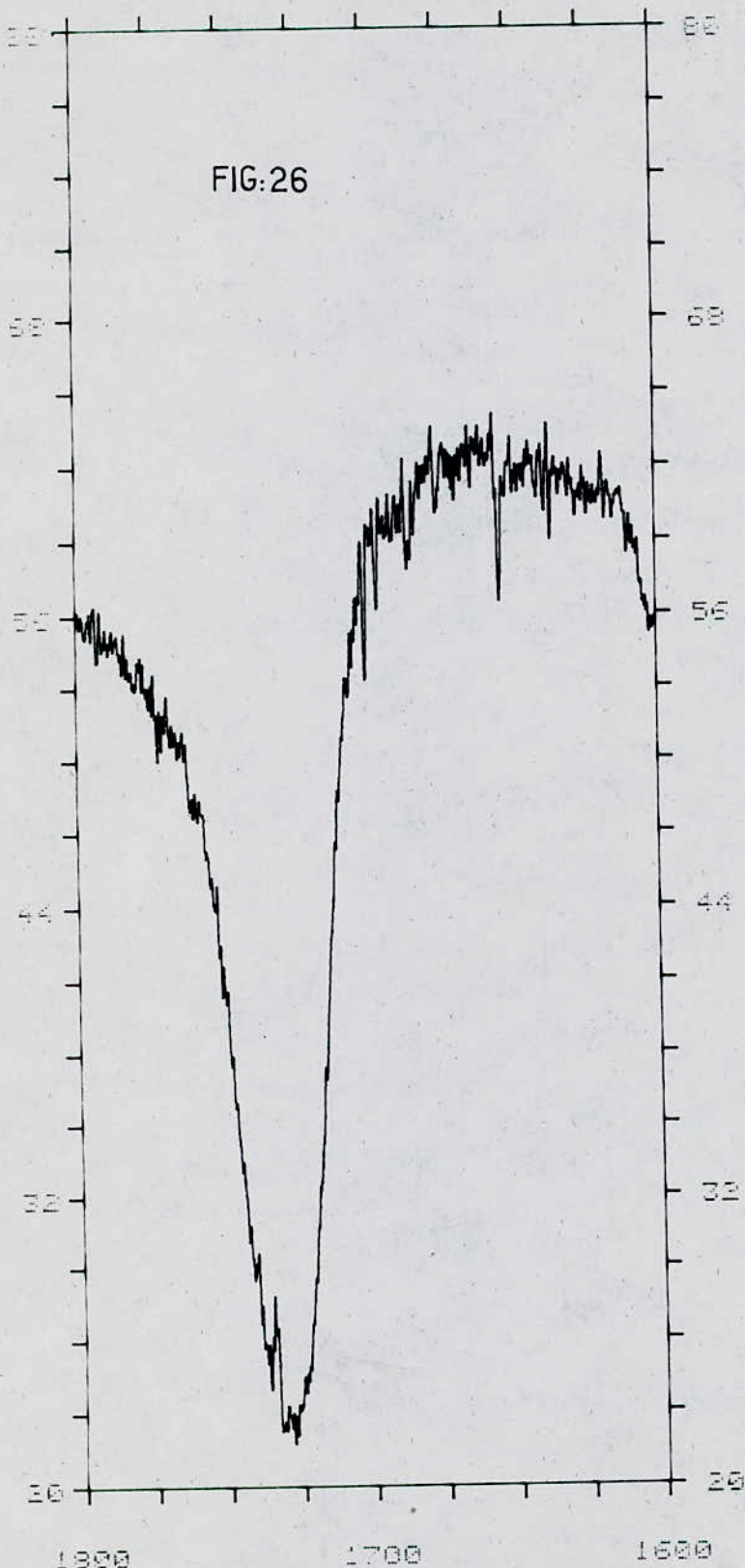
OPERATOR

REPLOTTED SPECTRUM

SCAN MODE 6
 NOISE FILTER 1
 RESOLUTION 1.9
 ORDINATE MODE %T
 ORD HIGH 80.00
 ORD LOW 20.00
 RANGE 1800.0-1600.0
 ABSCL. SCALE 2.00

PEAK THRESHOLD 2 %T
 CM-1 %T

1793.0	54.07
1772.2	49.90
1736.4	23.96
1728.4	21.77
1700.4	53.31
1696.0	56.25
1685.4	57.83
1683.0	59.24
1675.4	60.13
1663.0	60.58
1663.2	61.10
1653.6	56.46
1640.6	60.72
1637.8	60.02
1635.8	59.17
1627.2	59.99
623.2	59.99



présence des doubles liaisons, tandis que la bande à 965 cm^{-1} pourrait être la fréquence d'absorption d'un groupement éthylénique trans.

Apparemment les doubles liaisons sont conjuguées entre elles ou avec un autre groupement, car en général un système conjugué absorbe à plus basse fréquence qu'un système analogue non conjugué.

Les bandes apparaissent à 2958 cm^{-1} ; 2851 cm^{-1} ; et 1463 cm^{-1} sont celles des vibrations de valence et de flexion des liaisons C - H, tandis que les bandes à 1384 cm^{-1} (δ^s) et 744 cm^{-1} (ρ CH₃) montrent la présence du groupement méthyle : - CH₃.

Cependant toutes ces informations ne sont pas suffisantes pour décrire la structure moléculaire du composé isolé.

Nous avons essayé de comparer la T_g et le spectre infrarouge du composé isolé à ceux des lactones sesquiterpeniques isolés par Ségal et Coll.

Il s'est avéré, que la $T_g = 54^\circ\text{C}$ est aussi celle du désacetyl herbolide A, mais le spectre IR de ce composé étant complètement différent, nous avons écarté de suite l'hypothèse qu'il pourrait s'agir du même composé.

Il est évident que d'autres méthodes d'identifications du composé isolé, s'imposent : en premier lieu l'analyse élémentaire, la détermination de son poids moléculaire et de son pouvoir rotatoire, suivis des spectrométries UV, R.M.N. et de masse.

CONCLUSION

L'étude chimique de l'*Artemisia herba alba* Asso que nous nous avons entamé a permis tout d'abord de situer les différentes classes de composés présents dans la plante.

En effet les résultats des tests phytochimiques préliminaires montrent la présence des : flavonoïdes, tanins, coumarines, stérols, terpènes, saponosides et lactones sesquiterpeniques. Par contre la plante ne contient pas de quinones libres et d'alcaloïdes.

La méthode d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau, nous a permis d'avoir accès aux constituants de la plante entraînables à la vapeur d'eau. L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse, bien qu'encore très partielle a permis l'identification de 11 composés : éthanol, α -pinone, camphène, β -pinène, α -phelandrène, cinéol ; p-cymène, ester méthylique de l'acide caproïque, camphre ; γ -phelandrène ; α -terpinéol.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la composition des lactones sesquiterpeniques de la plante. Cet intérêt est basé d'une part sur une éventuelle utilisation de la plante comme source de santonine, et d'autre part sur une contribution à la classification botanique de cette variété d'*Artemisia herba alba*.

La présence de la santonine a été mise en évidence par des tests qualitatifs, mais son dosage quantitatif n'était pas concluant. Nous recommandons l'utilisation de méthodes plus sensibles et plus précises pour évaluer sa quantité dans la plante, en particulier au début de la floraison.

L'utilisation des techniques chromatographiques, telles que la chromatographie d'adsorption sur colonne et la chromatographie sur couche mince, nous a permis d'isoler un composé que nous n'avons pas pu identifier complètement. Néanmoins l'examen de son spectre IR. suggère qu'il s'agit probablement d'un lactone acétate.

Afin d'identifier ce produit à un des produits déjà isolés de la plante, ou bien de prouver qu'il s'agit d'un nouveau produit ; d'autres méthodes d'analyse s'imposent.

- B I B L I O G R A P H I E -

- 1 Em. PERROT : "Matières premières usuelles du règne végétal"
thérapeutique- hygiène- industrie.
Tome II , Masson et Cie ; 1943-1944.
- 2 M. PARIS ; M. HURABIELLE : "Abrégé de matière médicale"
pharmacognosie.
Tome I , Masson ; 1961.
- 3 PARIS R ; MOYSE H : "Matière médicale"
Tome III , p. 413 - 416 ; Masson et Cie ; 1971.
- 4 JERWAN S : "Dictionnaire des étudiants français-Arabe"
p.29 , Beyrouth 1972.
- 5 L. TRABUT : "Précis de botanique médicale"
2eme édition ; Masson et Cie Paris 1896.
- 6 GILDMEISTER et HOFFMANN : "Les huiles essentielles"
Tome III , 2eme édition par E. GILDMEISTER 1919.
- 7 M.P. OTTO : "L'industrie des parfums"
2eme édition ; Dunod , Paris 1924.
- 8 GILDMEISTER et HOFFMANN : "Les huiles essentielles"
4eme édition ; Dunod , 1961.
- 9 YASHPHE J. ; SEGAL R. ; BREUERA ; ERDREICH-NAFTALI G.
J. pharm. Sci ; 58(7) , 924- 5 ; 1979.
- 10 R.G. KELSEY ; F. SHAFIZADEH
"Sesquiterpènes lactones and systematic of the
genus Artemisia"
Phytochemistry ; vol 18 , pp 1591 - 1611 , 1979
- 11 ANDOM ; TAKASEK
Tetrahedron letters ; 33 p 2785 - 9 , 1977.
- 12 KHAFAGY S.M. ; GHARBO S.A. ; SARG T.M.
Planta Med ; 20 ; 90 , 1971.

- 13 R. SEGAL , S. SOKOLOFF , B. HARAN , D.V. ZAITSCHEK ,
D. LICHTENBERG.
"New sesquiterpene lactone from Artemisia herba
alba"
phytochemistry vol 16 pp 1237 -- 1241 , 1977.
- 14 R. SEGAL , I. FEUERSTEIN , H. DUDDECK , M. KAISER ;
A. DANIN.
"The sesquiterpene lactone from two populations
of Artemisia herba alba".
Phytochemistry vol 22 pp 129 -- 131 , 1983.
- 15 R. SEGAL , L. EDEN ; A. DANIN , M. KAISER , H. DUDDECK.
"Sesquiterpene lactone from a further population
of Artemisia herba alba".
phytochemistry vol 23 pp 2954 -- 2956 ; 1984.
- 16 ZALKOW L.H. and GORDON M.M.
J. Nat Prod , 42 ; 681 , 1979.
- 17 ZALKOW L.H. , GORDON M.M. , DICKINSON C. , GELBAURN L.T.
Planta Med , 39 , 265 , 1980.
- 18 ZALKOW L.H. ; GORDON M.M. ; VANDERVEER.
J. Nat. Prod , 44 ; 432 , 1981.
- 19 N.A.M. SALEH , SABY I. , EL NEGGOMY , MOHAMED F. ABD ALLA,
M.M. ABCU ZAID , G. DELLAMONICA , J. CHOPIN.
"Flavonoïd glycosides of Artemisia monosperma and
Artemisia herba alba"
phytochemistry vol 24 pp 201 -- 203 , 1985
- 20 BENSEGUINI, J. A. ; JAG M.
"Variabilité flavonoïque de l'Artemisia herba alba
et son incidence sur la reconnaissance des proprié-
tés pharmacodynamiques".
thèse de magister , 1986.
- 21 PARIS R.R. ; NOTHUS A
"Plantes médicinales et phytothérapie"
3 , 274 , 1969
- 22 IVANOV D. : "Chimie organique"
Nauka et Iskoustvo , sofia , 740 , 1967.
- 23 IANKOV L. et Coll. "Chimie organique"
Vol 2, Technica , sofia ; 911-912 , 1962.

- 24 HART- SCHUETZ : "Chimie organique"
5eme édition , Gaerrin 1980
- 25 GUENTCHEV M et Coll : "Petite encyclopédie chimique"
Vol 2 , Technica ; sofia 1981
- 26 GUENTCHEV M et Coll : "Petite encyclopédie chimique"
Vol 1 ; Technica , sofia 1981.
- 27 DIMOV N. : "Analyse organique"
Technica , sofia ; 80 ; 1984.
- 28 D.R. BROWNING : "Chromatographie"
Masson et Cie éditeurs 1971.
- 29 E. GUENTHER : "The essential oils"
Vol 1 ; Robert KHIEGER. Publishing company.
Malabar florida 1984.
- 30 ALAIN . BERTHILLIER : "La chromatographie et ses applications"
édition Dunod Paris 1972.
- 31 H.T. CLARKE et B. HAYNES.
"Chimie organique : analyse qualitative et
quantitative"
Vuibert Paris 1978.
- 32 BOEVA R et COLL : "Guide pratique de chimie organique"
Bourgas ; 1980.

