



**HAL**  
open science

**Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM(IE et IC) et RMN du carbone-13 de Cistus albidus et de deux Asteraceae endémiques de Corse : Eupatorium cannabinum subsp. corsicum et Doronicum corsicum.**

Julien Paolini

► **To cite this version:**

Julien Paolini. Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM(IE et IC) et RMN du carbone-13 de Cistus albidus et de deux Asteraceae endémiques de Corse : Eupatorium cannabinum subsp. corsicum et Doronicum corsicum.. Chimie. Université de Corse, 2005. Français. NNT: . tel-00441322

**HAL Id: tel-00441322**

**<https://theses.hal.science/tel-00441322>**

Submitted on 15 Dec 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE CORSE PASCAL PAOLI  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**

**THESE**

pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CORSE**  
*Discipline : Chimie Organique et Analytique*

Présentée et soutenue publiquement  
par

**Julien PAOLINI**

le 12-12-2005

**CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES  
PAR CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN DU CARBONE-13  
DE *CISTUS ALBIDUS* ET DE DEUX ASTERACEAE ENDEMIQUES  
DE CORSE : *EUPATORIUM CANNABINUM* SUBSP. *CORSICUM*  
ET *DORONICUM CORSICUM***

*Directeur* : Pr. Antoine-François BERNARDINI  
*Codirecteur* : Pr. Jean COSTA

**JURY**

Mme L. LIZZANI-CUVELIER	Professeur, Université de Nice (Rapporteur)
Mme C. MENUT	Professeur, ENS Chimie Montpellier (Rapporteur)
M. J.C. VALLEE	Directeur des opérations économiques, ADEC
M. J. CASANOVA	Professeur, Université de Corse
M. J. COSTA	Professeur, Université de Corse
M. A.F. BERNARDINI	Professeur, Université de Corse

*A mes parents*

*A mes frères, Manu et Nels*

*A mon amie, Lili*

# AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Chimie des Produits Naturels » de l'Université de Corse, associée au CNRS (UMR 6134), sous la direction de Monsieur le Professeur Antoine-François BERNARDINI et de Monsieur le Professeur Jean COSTA.

Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer à Monsieur le Professeur Antoine-François BERNARDINI ma respectueuse gratitude. J'ai été très sensible à sa grande disponibilité et à la totale confiance qu'il m'a accordée. Sa grande expérience, ses précieux conseils et ses encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse. J'ai trouvé en lui un directeur ouvert qui m'a guidé dans mon travail tout au long de ces années. Je le remercie de s'être soucié de mon devenir.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Jean COSTA, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour son dévouement exemplaire et son encadrement sans faille que pour ses recommandations et avis judicieux durant nos séances de travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Madame le Professeur Louise LIZZANI-CUVELIER (Université de Nice-Sophia Antipolis) et Madame le Professeur Chantal MENUT (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier), en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je suis très heureux de bénéficier de leurs observations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Que Monsieur Jean-Charles VALLEE (Directeur des opérations économiques, ADEC) trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'il a bien voulu apporter à ce travail en acceptant de participer à cette Commission d'Examen.

Je veux exprimer, ici, ma respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur Joseph CASANOVA pour avoir bien voulu participer à ce jury et aussi pour l'accueil qui m'a toujours été réservé au laboratoire « Chimie et Biomasse » qu'il dirige. Je le remercie de m'avoir fait profiter de son expérience et de sa rigueur scientifique.

Je remercie vivement Mademoiselle Pascale BRADESI, Maître de conférences (Université de Corse) et Monsieur Ange BIGHELLI, Professeur (Université de Corse) pour leur collaboration et pour m'avoir initié à la RMN du carbone-13.

Enfin, qu'il me soit permis de dire ma reconnaissance et mon amitié à la « fine équipe » :

- Pierre TOMI, Maître de conférences (Université de Corse) pour ses grandes qualités scientifiques et humaines et pour avoir guidé mes premiers pas dans la Recherche.

- Alain MUSELLI, Maître de conférences (Université de Corse) pour ses conseils éclairés, ses encouragements et sa bonne humeur.

- et je le gardais pour la bonne bouche, Jean-Marie DESJOBERT, Assistant Ingénieur et virtuose de la chromatographie, pour sa disponibilité de tous les instants, pour son aide technique si précieuse, son esprit positif et l'ambiance qu'il sait faire régner au laboratoire.

Merci à ma famille et à mes amis.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>PREMIERE PARTIE</b>	
<b>LES METHODES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES</b> .....	4
<b>I- IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'UN MELANGE</b> .....	7
<b>A- L'analyse structurale</b> .....	7
<b>B- Les différentes techniques d'analyse d'un mélange complexe</b> .....	8
1- La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) .....	8
2- Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM) .....	9
2-1- CPG/SM en mode « Impact Electronique » (CPG/SM-IE) .....	10
2-2- CPG/SM en mode « Ionisation Chimique » (CPG/SM-IC) .....	12
2-2-1- Ionisation Chimique Positive (ICP) .....	13
2-2-2- Ionisation Chimique Négative (ICN) .....	17
2-2-3- Applications à l'analyse des huiles essentielles .....	18
3- Les autres techniques de couplage .....	26
4- La Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN- <sup>13</sup> C) .....	29
<b>II- SEPARATION DES CONSTITUANTS PREALABLEMENT A LEUR IDENTIFICATION</b> .....	33
<b>III- PROBLEMATIQUE DE LA RECHERCHE</b> .....	34
<b>A- Analyse du contexte</b> .....	34
<b>B- Méthodologie d'analyse</b> .....	35

## **DEUXIEME PARTIE**

ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CISTUS ALBIDUS</i> .....	40
---	----

I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE GENRE <i>CISTUS</i> .....	41
---	----

1- Etude botanique.....	41
-------------------------	----

2- Etude chimique.....	45
------------------------	----

II- ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CISTUS ALBIDUS</i> .....	63
---	----

1- Analyse de l'huile essentielle avant fractionnement.....	64
---	----

2- Fractionnement de l'huile essentielle.....	66
---	----

3- Etude des fractions hydrocarbonées.....	68
--	----

4- Etude des fractions oxygénées.....	72
---------------------------------------	----

III- BILAN DE L'ETUDE SUR <i>CISTUS ALBIDUS</i> .....	89
---	----

## **TROISIEME PARTIE**

ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE DEUX ASTERACEAE ENDEMIQUES DE CORSE : <i>EUPATORIUM CANNABINUM</i> SUBSP. <i>CORSICUM</i> ET <i>DORONICUM CORSICUM</i> .....	96
--	----

### **CHAPITRE I**

ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D' <i>EUPATORIUM CANNABINUM</i> SUBSP. <i>CORSICUM</i> .....	97
--	----

I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	97
-------------------------------	----

1- Présentation de la plante.....	97
-----------------------------------	----

2- Les huiles essentielles.....	99
---------------------------------	----

3- Les extraits.....	101
----------------------	-----

II- ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES D' <i>EUPATORIUM CANNABINUM</i> SUBSP. <i>CORSICUM</i> .....	110
<b>A- Etude de l'huile essentielle de parties aériennes d'<i>Eupatorium cannabinum</i> subsp. <i>corsicum</i>.....</b>	<b>110</b>
1- Analyse de l'huile essentielle avant fractionnement.....	110
2- Fractionnement de l'huile essentielle.....	112
3- Etude des fractions hydrocarbonées.....	114
4- Etude des fractions oxygénées.....	120
5- Etude des composés absents des bibliothèques propres au laboratoire.....	126
5-1- Identification des composés par CPG/Ir et CPG/SM-IE.....	131
5-2- Contribution de la CPG/SM en mode « Ionisation Chimique » à l'identification.....	147
5-3- Contribution de la RMN du carbone-13 à l'identification.....	178
<b>B- Etude de l'huile essentielle de racines d'<i>Eupatorium cannabinum</i> subsp. <i>corsicum</i>.....</b>	<b>182</b>
1- Analyse de l'huile essentielle avant fractionnement.....	182
2- Fractionnement de l'huile essentielle.....	183
3- Etude des fractions hydrocarbonées.....	185
4- Etude des fractions oxygénées.....	185
5- Etude des composés absents des bibliothèques.....	193
III- BILAN DE L'ETUDE SUR <i>EUPATORIUM CANNABINUM</i> .....	205
IV- COMPARAISON DES HUILES ESSENTIELLES D' <i>EUPATORIUM CANNABINUM</i> DE CORSE, DE SARDAIGNE ET DE TOSCANE.....	220



<b>CHAPITRE 2</b>	
ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>DORONICUM CORSICUM</i> .....	224
<b>I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	224
1- Le genre <i>Doronicum</i> .....	224
2- Les esters dérivés du thymol identifiés dans les Asteraceae.....	231
<b>II- ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>DORONICUM CORSICUM</i></b> .....	234
1- Analyse de l'huile essentielle avant fractionnement.....	234
2- Fractionnement de l'huile essentielle.....	236
3- Etude des fractions hydrocarbonées.....	237
4- Etude des fractions oxygénées.....	242
5- Etude des composés absents des bibliothèques.....	247
<b>III- BILAN DE L'ETUDE SUR <i>DORONICUM CORSICUM</i></b> .....	272
<b>CHAPITRE 3</b>	
BILAN DE L'ETUDE SUR DEUX ASTERACEAE ENDEMIQUES DE CORSE : <i>EUPATORIUM CANNABINUM</i> SUBSP. <i>CORSICUM</i> ET <i>DORONICUM CORSICUM</i> .....	280
<b>CONCLUSION</b> .....	284
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	288
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	293
<b>ANNEXES</b> .....	319

# INTRODUCTION

La Corse est riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes ou encore pouvant être utilisées comme source d'isolats pour les hémisynthèses. Ces plantes aromatiques sont, donc, à l'origine de produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines...) qui se présentent presque toujours comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation. Les techniques d'analyse à la disposition de l'expérimentateur d'aujourd'hui permettent, dans la grande majorité des cas, de réaliser ce travail en routine. Cependant, l'identification de certains constituants est parfois délicate et l'utilisation de plusieurs méthodes d'analyse complémentaires s'avère non seulement utile mais nécessaire. Les huiles essentielles, préparées par hydrodistillation du matériel végétal, en sont une bonne illustration.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines de composés, principalement terpéniques. Les terpènes, molécules construites à partir d'entités isopréniques, constituent une famille très diversifiée, tant au niveau structural qu'au niveau fonctionnel. Dans les huiles essentielles, on rencontre généralement des mono et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone) et plus rarement des diterpènes (20 atomes de carbone) ainsi que des composés linéaires non terpéniques et des phénylpropanoïdes.

L'objectif de ce travail de thèse est double :

- objectif méthodologique, par l'enrichissement des bibliothèques de référence du laboratoire et par l'évaluation et l'intégration de la CPG/SM en mode « Ionisation Chimique » dans la méthodologie d'analyse du laboratoire,

- objectif finalisé, par la caractérisation de trois plantes de la région méditerranéenne : *Cistus albidus*, *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*, à travers l'étude de la composition chimique de leurs huiles essentielles, en adaptant la méthodologie d'analyse en fonction des résultats recherchés.

Ainsi, dans une première partie, nous décrivons les principales techniques d'analyse conventionnelles actuellement utilisées pour les huiles essentielles ; nous mettons en évidence les avantages et les limites de chacune. La mise en oeuvre du couplage CPG/SM en mode ionisation chimique (IC) constitue l'une des originalités de notre étude en regard de la méthodologie habituelle adoptée au laboratoire. Pour cette raison, nous nous étendons plus particulièrement sur ce mode d'ionisation. Nous présentons également la problématique et la méthodologie de recherche de l'équipe « Chimie des Produits Naturels » dans ce domaine.

La deuxième partie commence par une revue bibliographique du point de vue botanique et chimique sur les espèces du genre *Cistus*. Ensuite, nous présentons l'analyse d'une huile essentielle de *Cistus albidus* par CPG/Ir, CPG/SM et RMN du carbone-13, avant et après fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte. Nous détaillons chacune des étapes de ce processus et nous décrivons, également, l'identification de nombreux sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés présents dans l'huile essentielle.

La troisième partie, consacrée à l'étude des huiles essentielles de deux plantes endémiques de Corse de la famille des Asteraceae, se décompose en deux chapitres :

- dans le premier chapitre, nous décrivons, tout d'abord, les études réalisées sur les huiles essentielles et les extraits obtenues à partir d'*Eupatorium cannabinum*. Puis, nous analysons, avant et après fractionnement, les huiles essentielles préparées séparément à partir des parties aériennes et des racines d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* de Corse. Enfin, nous comparons les compositions chimiques de nos échantillons insulaires avec celles d'échantillons en provenance de Toscane et de Sardaigne ;

- dans le second chapitre, nous présentons, d'abord, une étude bibliographique sur le genre *Doronicum* et sur les esters dérivés du thymol dans les Asteraceae. Puis, nous analysons, avant et après fractionnement, l'huile essentielle de *Doronicum corsicum* dont la composition chimique n'a encore fait, à notre connaissance, l'objet d'aucune étude.

Dans les deux chapitres, nous détaillons la mise en œuvre du couplage CPG/SM selon les modes « impact électronique » (IE) et « ionisation chimique » (IC). Nous explicitons les raisonnements qui nous ont conduits, avec ou sans l'aide de la RMN du carbone-13, à identifier des composés proposés par les bibliothèques commerciales, la littérature ou absents de toutes bibliothèques. Pour cela, nous avons été amenés :

- à effectuer des hémisynthèses,
- à étudier les fragmentations en CPG/SM-(IE et IC),
- à procéder à des reconstitutions de spectres de RMN du carbone-13 et à des analyses structurales.

Pour terminer cette troisième partie, nous dressons le bilan de l'étude sur ces deux Asteraceae.

Enfin, la partie expérimentale reprend la préparation des huiles essentielles, les conditions expérimentales des diverses analyses et des hémisynthèses. En annexe sont donnés un certain nombre de spectres de masse intéressants mais qu'il eut été inopportun d'insérer dans le texte même du présent mémoire.

# **PREMIERE PARTIE**

## **LES METHODES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES**

Une parfaite connaissance de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire aux industriels pour en contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation. En effet, ces huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques (1).

L'analyse des huiles essentielles comporte généralement plusieurs séquences :

- la première séquence consiste à analyser les huiles essentielles, tout d'abord, par Chromatographie en Phase gazeuse (CPG) ; cette technique chromatographique permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir), puis à les analyser par le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM) ou, quelques fois, la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention Ir et des données spectrales (spectres de masse ou infrarouge) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'huiles essentielles.

- une deuxième séquence est mise en œuvre lorsque l'huile essentielle est complexe ou qu'elle contient des composés pouvant coéluer ou encore lorsque l'analyse est réalisée dans une optique de recherche. Un fractionnement de l'huile essentielle est alors effectué, le plus souvent par chromatographie liquide sur colonne ouverte de silice ou d'alumine. Les fractions obtenues sont ensuite analysées de la façon décrite

dans la première séquence. Cette étape est à privilégier lorsque l'on veut étudier les différentes familles de composés (esters, alcools, cétones...).

- enfin, une troisième séquence peut être mise en œuvre lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'huile essentielle sont inconnus des bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits dans la littérature. Il est alors nécessaire de les purifier par distillation fractionnée ou par des techniques chromatographiques préparatives telles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie liquide sur Colonne ouverte (CC), la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ou encore la Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative (CGP). L'objectif est d'aboutir à leur identification structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-<sup>1</sup>H) et du carbone-13 (RMN-<sup>13</sup>C), SM, IRTF, etc.

- une nouvelle voie d'analyse est le recours à la RMN du carbone-13, décrite par Formacek et Kubeczka (2, 3) et développée par Casanova et coll. (4-6). Elle permet d'identifier les constituants d'un mélange complexe sans individualisation et sans séparation préalable. Cependant, si l'huile essentielle est jugée trop complexe, si les abondances des constituants sont trop faibles, il faudra dans cette voie, aussi, procéder au fractionnement du mélange pour faciliter l'identification des constituants.

Aujourd'hui, la généralisation des méthodes de couplage en ligne évoquées ci-dessus permet d'obtenir rapidement de bons résultats. A condition, toutefois, que l'on sache, comme le préconise Joulain (1), se prémunir contre des interprétations hasardeuses résultant d'une utilisation superficielle de ces techniques.

## I- IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'UN MELANGE

De manière schématique, deux démarches analytiques se distinguent en fonction de l'objectif recherché. La première est l'analyse structurale qui consiste à élucider la structure d'une molécule qui n'a encore jamais été décrite dans la littérature. La seconde est d'identifier et de quantifier un produit déjà connu et dont les caractéristiques spectrales sont répertoriées.

### A- L'analyse structurale

L'analyse structurale nécessite la purification préalable du composé par des distillations fractionnées ou par différentes techniques chromatographiques (CCM, CC, CLHP, CGP) permettant d'obtenir une quantité suffisante de produit pur afin de réaliser une étude spectroscopique complète par Spectrométrie de masse (SM), Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), Ultra-Violet (UV) et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C, RMN bidimensionnelle) (7, 8). A partir de la combinaison de ces méthodes complémentaires, il est possible d'établir avec une certitude suffisante la structure de la molécule du constituant inconnu. Parmi toutes ces techniques spectroscopiques, la RMN est la technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques ; elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules (9).

La RMN bidimensionnelle avec l'enregistrement de spectres à deux dimensions (10-13) c'est-à-dire des spectres de corrélation proton-proton (COSY et NOESY) et proton-carbone (XHCORR, HMQC et HMBC), permet de mettre en évidence des interactions (directes ou indirectes) entre les noyaux et fournit des renseignements très précis sur la structure moléculaire. Enfin, les spectres de corrélation carbone-carbone (INADEQUATE) permettent de construire pas à pas le squelette carboné de la molécule (14). Cependant, leur enregistrement nécessite une quantité de produit importante, ce qui limite l'utilisation de cette technique.



## **B- Les différentes techniques d'analyse d'un mélange complexe**

### 1- La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (15). C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles.

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (16) ou en programmation de température (indices de rétention) (17). Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes.

Les indices de rétention polaire ( $I_r p$ ) et apolaire ( $I_r a$ ) sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans des bibliothèques de référence élaborées au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales (18-21) ou répertoriés dans la littérature.

Cependant, une reproductibilité parfaite des indices de rétention est difficile à obtenir et ne peut être observée que sur des chromatogrammes réalisés sur une période courte avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques. Les variations les plus importantes sont observées lorsqu'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire avec ceux de la littérature, particulièrement pour ce qui concerne la colonne polaire (22). Dans le domaine des huiles essentielles, il a été montré que 230 sesquiterpènes de même masse moléculaire présentent des indices de rétention compris

dans un intervalle de seulement 300 unités (1). Il s'ensuit une grande incertitude dans l'identification des constituants.

De plus, les nombreux cas de coélution montrent que la comparaison des indices de rétention et même la méthode des surcharges ne suffisent pas à identifier formellement un composé. Le développement des phases stationnaires chirales (colonne de cyclodextrines) et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans la séparation et l'identification des composés dans les huiles essentielles (23, 24). Ainsi, la CPG bidimensionnelle (CPG/CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant coéluer avec des composés plus abondants. L'échantillon est injecté dans une pré-colonne, puis les composés qui coéluent sont transférés dans une deuxième colonne pour être séparés. L'efficacité de cette méthode est illustrée par Marriott et coll. (23) qui ont appliqué la CPG bidimensionnelle à l'étude d'une huile essentielle de vétiver (*Vetiveria zizanioides*).

L'utilisation de colonnes chirales en CPG bidimensionnelle permet l'analyse énantiomérique des constituants d'un mélange complexe. Dans de nombreux cas, la détermination de la distribution énantiomérique est utilisée pour la détection d'adultérations dans les arômes (25, 26). Enfin, la GPG/CPG chirale a été utilisée par König et coll. (27) pour identifier le (-)- $\delta$ -amorphène dans une huile essentielle de vétiver.

Les techniques de couplage de la CPG avec des techniques spectroscopiques (SM, IRTF) ont permis une approche beaucoup plus précise de l'identification.

## 2- Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

Les premiers appareils de routine CPG/SM à colonnes capillaires datent de 1975. Depuis, cette méthode de couplage n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des

produits pétroliers (carburants, matières synthétiques), des produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine), etc. (28). Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (29, 30).

Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus fréquents pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le piège à ions ou « ion trap ». Tous deux utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge  $m/z$  (31, 32). Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres cylindriques. Un cation pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. Dans les appareils à quadripôle, les potentiels sont réglés de manière telle que seuls les ions d'une fourchette de masses déterminées traversent les barres. Par la suite, le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Les détecteurs les plus courants sont les chalelrons (multiplicateurs d'électrons) et les photomultiplicateurs ; ils convertissent les impacts ioniques en signaux. L'ordinateur enregistre les signaux visualisés sous forme de pics d'intensités variables, rangés sur une échelle de masses. Le multiplicateur de photons permet la détection des ions positifs et dans certains cas des ions négatifs.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). Dans ce dernier cas, on distingue l'ionisation chimique positive (ICP) et l'ionisation chimique négative (ICN).

### 2-1- CPG/SM en mode « Impact Electronique » (CPG/SM-IE)

En mode impact électronique, le bombardement de substances par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70 eV provoque leur ionisation et leur fragmentation. Les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse

caractéristique du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées commerciales [NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (33) et Wiley Registry of Mass Spectral Data (34) contenant plusieurs milliers de spectres, König-Joulain (19) contenant plus de 1200 composés essentiellement terpéniques et Adams (21) utilisant un analyseur « ion trap »]. Une bibliothèque « Laboratoire » qui nous est propre a été construite ; elle contient plus de 600 composés rencontrés dans les huiles essentielles, dont une grande majorité de terpènes. En général, la concordance entre les spectres d'un même composé obtenu à partir d'une huile essentielle et présent dans les bibliothèques est bien meilleure avec des références de la bibliothèque « laboratoire » car ils sont enregistrés dans des conditions expérimentales identiques. Les spectres de masse expérimentaux sont aussi, en tant que de besoin, comparés à des spectres contenus dans des bibliothèques non informatisées (18, 35, 36).

Les systèmes actuels de CPG/SM sont très performants pour la séparation, la détection et l'identification des molécules. Néanmoins, en mode IE, il existe des difficultés qui sont dues :

- à la similitude des spectres de masse. C'est le cas de molécules proches d'un point de vue structural comme les quatre isomères du menthol ou du farnésol (37, 38) ou les acétates d'isobornyle et de bornyle qui ne diffèrent que par la configuration du carbone asymétrique portant le groupement fonctionnel (3). Cette similitude des spectres de masse est également observée pour certaines molécules possédant des squelettes différents telles les (Z,Z) et (E,Z)- $\alpha$ -farnésène (sesquiterpènes linéaires avec 4 insaturations) et le *cis*- $\alpha$ -bergamotène (sesquiterpène bicyclique diénique) (39) ou encore le 1-endo-bourbonanol (sesquiterpène tricyclique) et le 1,6-germacradièn-5-ol (sesquiterpène monocyclique) (40),

- à la faible intensité voire l'absence du pic moléculaire sur le spectre de masse,
- à la co-élution des composés ou à la mauvaise résolution de certains pics chromatographiques.

## 2-2- CPG/SM en mode « Ionisation Chimique » (CPG/SM-IC)

Par définition, l'ionisation chimique c'est des réactions ions-molécules entre des molécules de l'échantillon en phase gazeuse et les ions d'un plasma obtenus à partir d'un gaz réactif.

Cette technique, de mise en œuvre aisée avec un appareil équipé d'une source à ionisation chimique (en série sur la plupart des appareils récents), a trouvé de nombreuses applications chimiques et biochimiques dans les domaines de l'environnement et du médical.

La littérature concernant la spectrométrie de masse en ionisation chimique est très importante. En effet, plus de 1100 articles utilisant le mot-clé « ionisation chimique » ont été publiés. Notre étude porte essentiellement sur la littérature relative à l'étude des composés terpéniques par ionisation chimique.

L'ionisation chimique résulte des travaux de Field et Munson sur le comportement du méthane et de l'isobutane en spectrométrie de masse sous une pression voisine de 1 Torr dans la source (41). Le spectre de masse enregistré dans ces conditions était invariablement contaminé par des pics correspondant à des masses élevées dus aux impuretés présentes dans le gaz. Ils portèrent leur attention non plus sur le gaz méthane ou isobutane, mais sur ces impuretés, ils en déduisirent les principes d'une nouvelle méthode générale d'analyse en spectrométrie de masse. Bien qu'elle permette l'étude de certaines substances minérales, c'est en chimie organique que les applications ont été les plus nombreuses.

Après un démarrage timide, le développement ultérieur fut spectaculaire et on ne compte pas moins d'une dizaine de revues générales importantes qui font le point sur le millier de publications concernant l'IC (42-52). Parmi les nombreux livres sur le sujet il faut citer celui de Harrisson (53) présentant les principaux travaux ayant utilisé l'IC et celui de Longevialle (29) résumant les principes fondamentaux de l'IC.

## 2-1-1- Ionisation Chimique Positive (ICP)

### ***a- Principe :***

La technique d'ICP (41) consiste, dans un premier temps, par impact électronique, à ioniser le gaz réactif X. Le gaz réactif ionisé  $X^+$  réagit ensuite avec les molécules de gaz réactif au moyen de collisions ions-molécules produisant le gaz réactif « plasma » :  $XH^+$ .

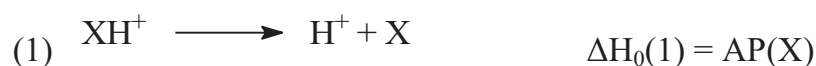
Les ions  $XH^+$  ainsi formés, d'énergie moindre que les électrons qui leur ont donné naissance, réagissent avec la substance M étudiée (réactions ions-molécules) provoquant une fragmentation douce des molécules (53, 54).

L'échantillon à analyser est introduit dans la source d'ions en même temps que le gaz réactif ionisé présent en large excès.

La réaction plasma ( $XH^+$ ) – molécule (M) est un échange protonique :



Le concept fondamental est analogue à celui des réactions acido-basiques au sens de Brønsted-Lowry.



Par définition, l'affinité protonique (AP) du gaz réactif X est l'enthalpie standard mise en jeu par la réaction (1).

L'exothermicité correspond à l'enthalpie standard de la réaction (3) plasma-molécule. La condition d'exothermicité est  $\Delta H_0(3) < 0$ , d'où  $AP(X) < AP(M)$ . Plus l'effet exothermique est important et plus on dispose d'énergie pour fragmenter  $[M+H]^+$ . Cette différence entre les affinités protoniques de X et de M régit la fragmentation observée en ICP. Ainsi, la diminution de l'affinité protonique du gaz

réactif entraîne une augmentation du caractère exothermique de la réaction. Cette énergie cédée au cation  $[M+H]^+$  est responsable de la fragmentation de la molécule.

Harrison (53) rapporte un certain nombre d'affinités protoniques (AP) : celles des principaux gaz utilisés varient d'une centaine de kcal/mol pour le méthane à plus de 200 kcal/mol pour l'isobutane et l'ammoniac.

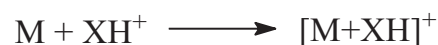
***b- Principaux types de réactions en ICP (29, 48, 49, 53, 54) :***

▪ Le transfert de proton :

En ionisation positive, la réaction la plus commune est la formation de l'ion  $[M+H]^+$  par transfert de proton (réaction 3). Le degré de fragmentation peut être contrôlé par le choix du gaz réactif, la stabilité de l'ion quasi-moléculaire  $[M+H]^+$  est plus importante que la stabilité de l'ion radicalaire  $M^+$  formé par impact électronique.

▪ Les réactions d'association ou formation d'adduits :

Des réactions d'association se produisent entre les ions du plasma et la molécule à analyser entraînant la formation d'adduits  $[M+XH]^+$ .



▪ La perte d'un hydrure ou abstraction d'un hydrure :

La molécule analysée cède un ion hydrure au gaz réactif «plasma» induisant la formation de l'ion  $[M-H]^+$ .

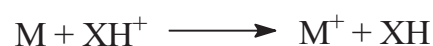


▪ L'échange de charge peut se faire de 2 façons :

- Attachement de l'électron :



- Transfert d'électron :

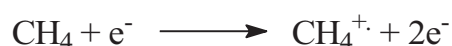


Ces réactions peuvent être utilisées pour obtenir des informations sur la masse moléculaire, les ions caractéristiques de la masse moléculaire sont appelés ions « quasi-moléculaires » ou « pseudo-moléculaires » indépendamment de leur nature exacte :  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^+$ . Observons successivement les réactions obtenues avec les principaux gaz ionisants.

### *c- Principaux gaz utilisés en ICP*

- Le méthane (31, 29, 48, 49, 54) :

Le méthane est introduit dans la source d'ionisation ; la réaction primaire est son ionisation selon le mode de l'impact électronique :



Cet ion peut se fragmenter de deux manière :



Mais il réagira principalement avec une autre molécule de méthane pour donner :



L'ion  $\text{CH}_5^+$  est une entité stable découverte par Tal'roze et Lyubimova en 1952 (55).

D'autres réactions ions-molécules de méthane se produisent dans le plasma, par exemple :



L'ion  $\text{C}_3\text{H}_5^+$  se forme par l'enchaînement réactionnel :



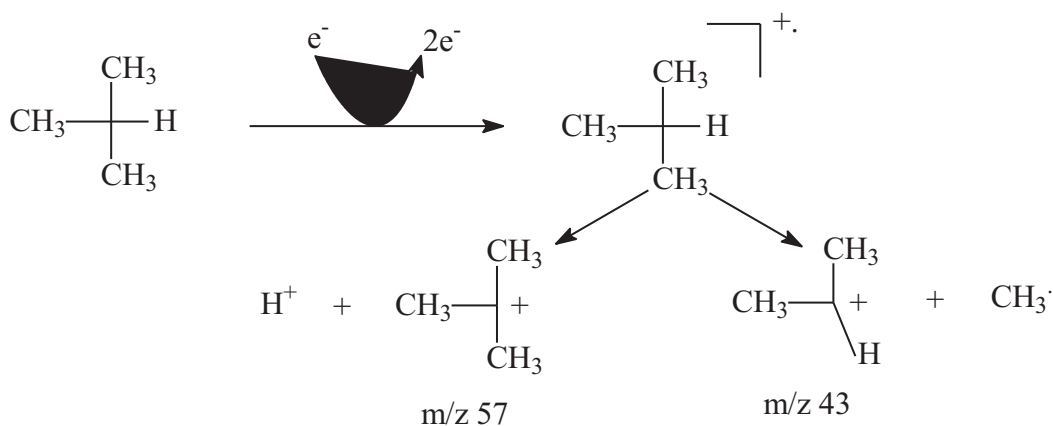


Le plasma issu du méthane contient à la fois, en quantité abondante, des cations à nombre pair d'électrons et à nombre impair d'hydrogènes tels  $\text{CH}_5^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_5^+$  et, en quantité moins abondante, des ions radicalaires à nombre impair d'électrons et à nombre pair d'hydrogènes tels  $\text{CH}_2^+$  ou  $\text{CH}_4^+$ . Les abondances relatives de ces ions sont fonction de la pression dans la source.

La réaction de transfert de proton entraînant la formation de l'ion quasi-moléculaire  $[\text{M}+\text{H}]^+$  est l'hypothèse la plus probable. Dans le cas où la molécule M ne présente pas d'insaturation, elle ne peut pas accepter de proton. L'observation de l'ion quasi-moléculaire  $[\text{M}-\text{H}]^+$  est cependant possible, par perte d'hydrure. En outre, avec les molécules polaires on observera la formation d'adduits  $[\text{M}+\text{C}_2\text{H}_5]^+$  et  $[\text{M}+\text{C}_3\text{H}_5]^+$ . Ainsi, en ICP- $\text{CH}_4$ , la série d'ions à  $(\text{M}+1)^+$ ,  $(\text{M}+29)^+$ ,  $(\text{M}+41)^+$  aide à la détermination de la masse moléculaire de la substance analysée.

▪ L'isobutane (31, 48, 53) :

Lors de l'impact électronique, l'isobutane perd un électron ; il se forme le radical cation correspondant qui se fragmentera principalement par perte d'un atome d'hydrogène pour former le cation *tertio*-butyle, et accessoirement par perte d'un radical méthyle pour donner le cation *iso*-propyle.



On observe aussi dans le spectre un ion de masse 39 u, correspondant au cation  $\text{C}_3\text{H}_3^+$ . Ici encore, les ions du plasma réagiront principalement par transfert de proton sur la molécule de l'échantillon. Cependant, avec les molécules polaires, on observera

la formation d'adduit notamment avec les ions *tertio*-butyle  $(M+57)^+$  et avec  $C_3H_3^+$   $(M+39)^+$ .

En raison de la stabilité du cation *tertio*-butyle, le plasma à isobutane est très peu efficace pour ioniser les hydrocarbures. Cette caractéristique permet de l'utiliser sélectivement pour ioniser d'autres substances en mélange avec des hydrocarbures saturés.

▪ L'ammoniac (31, 48, 53) :

Le radical cation  $NH_3^+$  formé par impact électronique réagit avec une molécule d'ammoniac pour former l'ion ammonium et le radical  $NH_2\cdot$  :



Dans le plasma, on observe un ion de masse 35 u provenant de l'association d'un ion ammonium et d'une molécule d'ammoniac :



Avec ce gaz réactif, le mode d'ionisation dépend de la nature de l'échantillon. Les molécules basiques s'ionisent par transfert de proton. Les molécules polaires (et celles susceptibles de former des liaisons hydrogène) peu ou pas basiques, forment un adduit et, dans certains cas, on observe simultanément les ions  $[M+H]^+$  et  $[M+NH_4]^+$ . D'autres substances, les hydrocarbures saturés par exemple, ne seront pas efficacement ionisées. On voit tout le parti qui peut être tiré de la comparaison des spectres pris avec divers gaz ionisants, telle la détection sélective, dans des hydrocarbures saturés, d'autres molécules susceptibles d'être ionisées.

2-2-2- Ionisation Chimique Négative (ICN) (52, 56, 57)

L'obtention d'ions négatifs est liée à deux processus distincts : interaction électrons-molécules et interaction ions-molécules. L'ionisation chimique a lieu, dans le premier cas, par capture électronique et dans le second cas, par des ions réactants (57, 58). Dans ce dernier processus, le gaz réactant, placé dans la source à une pression

de l'ordre de 1 Torr, est ionisé par des électrons d'énergie de 70 eV. Les ions ainsi générés (57) réagissent avec les substances à analyser et produisent des ions négatifs. Ce processus est en tous points analogue à celui de l'ICP.

Parmi les gaz réactifs, nous pouvons citer, notamment, les ions hydroxyles  $\text{OH}^-$ . Ils sont formés à partir d'un mélange gazeux constitué à 75% de méthane et à 25% de protoxide d'azote  $\text{N}_2\text{O}$  selon les réactions suivantes :



Ce plasma présente un intérêt particulier par la présence simultanée d'électrons, et d'ions  $\text{OH}^-$  réagissant avec les substances acides selon le schéma habituel des réactions acide-base.

### 2-2-3- Applications à l'analyse des huiles essentielles

Eu égard au grand nombre de fois qu'il est nécessaire d'utiliser des vocables tel « couplage en ligne chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique positive avec le méthane comme gaz réactant », il est commode, pour la lecture, de le remplacer par le sigle ICP- $\text{CH}_4$ . qui symbolisera donc, selon le contexte, le mode ou l'ensemble de la technique analytique. De même, nous utiliserons des formules telle  $[\text{M}+\text{H}]^+$  qui représentera aussi bien l'ion que le pic correspondant sur le spectre.

#### ***a- Etude des composés hydrocarbonés :***

Des alcanes et des alcènes ont été étudiés par Field et coll. (58, 59) en ICP- $\text{CH}_4$ . Les spectres des alcanes sont caractérisés par les ions  $[\text{M}-\text{H}]^+$  abondants (25 à 45%) et une série d'ions alkyles  $[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}]^+$  issus de leur fragmentation.

Les spectres des alcènes mono-insaturés se différencient des précédents principalement par deux types d'ions quasi-moléculaires  $[\text{M}+\text{H}]^+$  et  $[\text{M}-\text{H}]^+$  et par

deux séries d'ions alkyles et alkényles  $[C_nH_{2n-1}]^+$  issus de leurs fragmentations respectives (59). L'ICP-CH<sub>4</sub> ne permet pas de préciser la position de la double liaison.

Des alcynes, des alcadiènes et des cycloalcènes ont également été étudiés en ICP-CH<sub>4</sub> par Field (59) ; leurs spectres présentent également les deux types d'ions quasi-moléculaires  $[M+H]^+$  et  $[M-H]^+$  et deux séries d'ions  $[C_nH_{2n-1}]^+$  et  $[C_nH_{2n-3}]^+$  correspondantes. Les ions  $[M-H]^+$  sont particulièrement abondants pour les cycloalcènes alors que pour les alcynes et les alcadiènes les séries d'ions alkyles et alkényles prédominent.

Les cycloalcanes ont été étudiés en ICP-CH<sub>4</sub> par Field et Munson (60). Leurs spectres se singularisent, dans beaucoup de cas, par des ions  $[M+H]^+$  peu abondants (entre 2 et 5%) et des ions  $[M-H]^+$  abondants (entre 25 et 75%).

Budzikiewicz et Busker (61) ont décrit les spectres ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> de différents octadécènes. Ils sont caractérisés par les ions  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^+$  et les séries d'ions alkyles et alkényles correspondantes. Ils diffèrent de ceux obtenus en ICP-CH<sub>4</sub> par la présence d'adduits  $[M+C_4H_9]^+$ . Ceux-ci peuvent permettre de distinguer les isomères Z et E au moyen du rapport  $[M+C_4H_9]^+ / [M-H]^+$  ; généralement ce rapport est égal à 2 pour l'isomérisation Z et il prend une valeur inférieure à 1 pour l'isomérisation E.

Les spectres ICP-CH<sub>4</sub> (62) et ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> (63, 64) des mono et sesquiterpènes hydrocarbonés sont notablement différents de ceux obtenus par IE. En ICP, les spectres présentent peu de pics et on note la présence des ions quasi-moléculaire  $[M-H]^+$  et  $[M+H]^+$  abondants. Les ions obtenus en ICP-CH<sub>4</sub> par les réactions d'association  $(M+29)^+$  et  $(M+41)^+$  sont respectivement à m/z 165 et m/z 177 pour les monoterpènes étudiés et à m/z 233 et m/z 245 pour les sesquiterpènes.

Hadjieva et coll. (62) ont étudié, en ICP-CH<sub>4</sub>, les monoterpènes de l'huile essentielle de *Rosa damascena*. En IE, le pic de base de ces composés est à m/z 93 ; ce pic est absent des spectres ICP-CH<sub>4</sub> sur lesquels le pic de base est à m/z 81. Pour la plupart des monoterpènes de masse 136, les ions à m/z 121 issus de la perte d'un méthyle sont plus abondants sur les spectres ICP-CH<sub>4</sub> que sur les spectres IE. Ces

auteurs ont constaté que les masses et les abondances des fragments des spectres ICP-CH<sub>4</sub> correspondent à celles relevées en IE. Ils ont ainsi mis en évidence des corrélations entre les spectres IE et ICP-CH<sub>4</sub> de différents sesquiterpènes.

Schultze et coll. (39) ont étudié, en ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> et ICP-NH<sub>3</sub>, 44 sesquiterpènes hydrocarbonés C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> de masse molaire 204, trois sesquiterpènes de masse moléculaire 202 (cuparène, *ar*-curcumène, *ar*-himachalène) et le farnésane de masse moléculaire 212.

Les spectres ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> des sesquiterpènes contiennent les pics quasi-moléculaires [M+H]<sup>+</sup>, [M-H]<sup>+</sup> et l'ion radicalaire M<sup>+</sup>. L'ion [M+H]<sup>+</sup> est le pic de base de tous les composés renfermant une ou plusieurs doubles liaisons. Pour les composés saturés, la réaction d'abstraction d'un hydrure est favorisée par rapport au transfert de proton ; ainsi, l'ion [M-H]<sup>+</sup> correspond au pic de base des spectres du longicyclène et du farnésane. L'importance des fragmentations donne des informations sur la structure des composés. En effet, les fragmentations sont nombreuses pour les composés linéaires tels les farnésènes. Des fragmentations importantes sont aussi observées pour des composés à grand cycle. Au contraire, les composés polycycliques et ceux contenant de petits cycles ne se fragmentent que très peu ou pas du tout. Dans certains cas, les spectres permettent de distinguer les stéréoisomères. Par exemple, les spectres IE du (Z)-β-, du (E)-β-, du (E,Z)-α- et du (Z,Z)-α-farnésène sont identiques. L'utilisation de l'ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> permet de différencier les deux premiers des deux derniers par l'intensité de différents fragments, particulièrement par les pics à m/z 81 qui sont plus intenses pour les isomères β. Les spectres IE du (E,Z)-α- et du (Z,Z)-α-farnésène sont identiques à celui du *cis*-α-bergamotène ; là encore l'utilisation de l'ICP permet de différencier ces composés par l'intensité des ions à m/z 81. Les spectres ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> des sesquiterpènes étudiés présentent également des pics correspondant aux adduits [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>. L'intensité des adduits [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> à m/z 261 permet de distinguer certains isomères ; par exemple, pour l'α-bulnésène l'ion à m/z 261 a une intensité de 13% alors que pour le β-bulnésène elle est de 1%. Des différences dans l'intensité de ces ions à m/z 261 sont aussi observées pour les couples α-/γ-muuroène, α-/β-cédrène et α-/β-cadinène.

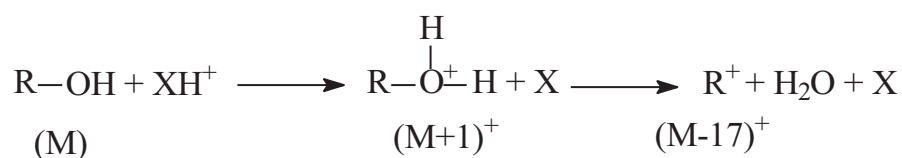
Les spectres ICP-NH<sub>3</sub> des sesquiterpènes étudiés sont plus simples que ceux obtenus en ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>. Ils contiennent en général trois ions caractéristiques : [M+H]<sup>+</sup> à m/z=205 et les adduits [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> à m/z=222 et [M+NH<sub>4</sub>.NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> à m/z=239. Les ions [M+H]<sup>+</sup> ou [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> correspondent souvent aux pics de base des spectres ICP-NH<sub>3</sub>. Le nombre de fragmentations est significativement réduit par rapport à l'ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> et la différenciation des spectres est plus aisée. Par exemple, le (E)-β- et le (Z)-β-farnésène ont des spectres identiques en ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> alors qu'en ICP-NH<sub>3</sub>, les ions formés ont des abondances différentes pour les deux stéréoisomères. Il en est de même pour le (E,Z)-α- et le (Z,Z)-α-farnésène. D'autres composés donnent des variations dans l'abondance des ions en fonction de la position de la double liaison ; c'est le cas des isomères β-/γ-/δ-élémane et de l'α et β-guaiène, par exemple.

Certains composés ne s'ionisent pas en ICP-NH<sub>3</sub> (ar-curcumène, ar-himachalène, cuparène), ceci peut contribuer à résoudre des problèmes de co-élution. L'ionisation chimique permet également de mettre en évidence un composé qui co-élue avec un alcane. En effet, les alcanes ne seront pas ionisés en ICP-NH<sub>3</sub> (64) contrairement à la plupart des autres familles de composés.

#### ***b- Etude des composés oxygénés :***

Les spectres ICP-CH<sub>4</sub> de plusieurs alcools saturés, oléfiniques et cycliques ont été décrits par Saris et coll. (65). Plusieurs alcools saturés ont également été étudiés en ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> par Field (66). Winkler et coll. ont rapporté l'étude de différents types d'alcools en ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> (67) et en ICP-NH<sub>3</sub> (68) et Munson et coll. (69) ont étudié l'ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> des alcools insaturés. Enfin, les spectres de masse en ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> de nombreux alcools terpéniques ont été décrits par Bruins (70) et par Lange et coll. (71). Certains travaux ont montré que pour les molécules diéniques conjuguées (alcools, aldéhydes, hydrocarbures, esters) les abondances relatives de certains ions sont caractéristiques de la position du système π (72, 73).

En ICP-CH<sub>4</sub> et en ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>, les alcools saturés protonés sont instables, la réaction de transfert de proton est suivie d'une fragmentation. Le pic de base correspond à l'ion [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> formé par la perte d'une molécule d'eau à partir de la molécule protonée :

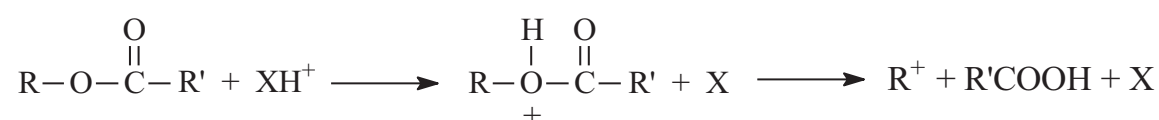


Les fragmentations en ICP-CH<sub>4</sub> et ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> des alcools saturés se caractérisent par la perte d'un hydrure pour former les ions [M-H]<sup>+</sup>. Cette abstraction n'est possible que si l'alcool est primaire ou secondaire. Ces ions [M-H]<sup>+</sup> peuvent perdre H<sub>2</sub>O pour former des ions alkényles [ROH-H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. Ainsi les pics correspondant aux séries d'ions alkyles et alkényles sont observés sur les spectres. Les spectres ICP-NH<sub>3</sub> des alcools saturés se caractérisent en général par la formation d'ions adduits et d'ions [RNH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> par déplacement du groupe hydroxyle.

Les ions [M+H]<sup>+</sup> des alcools cycliques, allyliques et benzyliques sont instables ; ils se fragmentent par perte d'une molécule d'eau.

Les cétones linéaires donnent des ions [M+H]<sup>+</sup> en ICP-CH<sub>4</sub> qui correspondent au pic de base des spectres ; ces ions subissent de faibles fragmentations. Au contraire, les aldéhydes linéaires donnent des ions [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> très abondants issus de la fragmentation de la molécule protonée (74).

L'ICP-CH<sub>4</sub> et ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> des esters linéaires fournissent des ions [M+H]<sup>+</sup> ainsi que des adduits [M+C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup> et [M+C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>. La fragmentation majeure des ions [M+H]<sup>+</sup> est l'élimination d'une molécule d'acide carboxylique :



Cette fragmentation est empêchée par la présence d'un deuxième groupe fonctionnel dans la molécule (75) et ceci peut permettre de différencier des stéréoisomères (76).

Les spectres ICP-CH<sub>4</sub> des alcools terpéniques (bornéol, terpinéol, linalol et citronellol) contiennent les pics correspondant aux ions [M-H]<sup>+</sup> (4-14%) et aux ions [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (100%) sauf pour le citronellol qui admet un pic de base à m/z=137 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

Les ions [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> sont également présents sur les spectres des aldéhydes terpéniques, ils sont dus à la protonation de l'atome d'oxygène entraînant une rapide décomposition par perte d'une molécule d'eau. L'importance de cette fragmentation dépend de la géométrie de la molécule (62).

Les adduits [M+C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup> et [M+C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup> ne sont pas observés en ICP-CH<sub>4</sub> des alcools terpéniques (62). Ainsi, les cétones peuvent être distinguées des alcools homologues par la formation des ions [M+H]<sup>+</sup>, [M+C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup> et [M+C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup> en quantité abondante (62).

Dans le cas, des alcools terpéniques aromatiques (ie : le carvacrol) la réaction de transfert de proton est favorisée par rapport à la perte d'un hydrure (71).

A la différence des esters aliphatiques, l'ICP-CH<sub>4</sub> et l'ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> des esters terpéniques se caractérisent, en général, par des ions [M+H]<sup>+</sup> de faible abondance (71, 77) sur le spectre sauf pour l'acétate de citronellyle où la double liaison de la chaîne hydrocarbonée semble interagir avec le groupe carboxylate protoné et de ce fait stabiliser les ions [M+H]<sup>+</sup>. Ainsi, les spectres des esters terpéniques donnent peu d'informations sur la masse moléculaire, des confusions sont alors possibles dans la détermination du groupe fonctionnel. Par exemple, les spectres de l'acétate d'isobornyle et de l'isobornéol présentent un pic de base à m/z=137 correspondant aux ions [M+H-CH<sub>3</sub>COOH]<sup>+</sup> pour l'ester et aux ions [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> pour l'alcool.

Diverses études (71, 78) ont montré que l'isobutane n'est pas le meilleur gaz pour étudier ces composés en raison de la faible intensité des ions [M+H]<sup>+</sup> et de l'observation d'ions abondants de même masse : [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> pour les alcools et [M+H-RCOOH]<sup>+</sup> pour les esters. Ces fragments ont, également, la même masse que les ions [M+H]<sup>+</sup> observés sur les spectres de leurs homologues hydrocarbonés.



Knight et coll. (79) et Lange et coll. (71, 77) ont étudié les spectres ICP-NH<sub>3</sub> des alcools et des esters terpéniques. Par réaction d'association, ces composés conduisent aux adduits [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> et [M+NH<sub>4</sub>.NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> d'abondance élevée qui permettent la détermination de la masse molaire. Les spectres des alcools présentent des pics intenses correspondant aux ions [M+NH<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> et [M+NH<sub>4</sub>.NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. Ces réactions de substitution de l'hydroxyle par les ions du plasma sont décrites comme des fragmentations majeures de nombreux alcools. Par exemple, le pic de base du spectre du linalol correspond à l'ion [M+NH<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. Le déplacement de H<sub>2</sub>O par réaction avec l'ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup> étant aussi observé avec les cétones, les ions [M+NH<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ne sont donc pas spécifiques des alcools. Abondants pour les esters, ces ions peuvent permettre de déterminer la masse de la partie carboxylique. Des exceptions existent, ces ions ne sont pas observés par exemple avec le citronellol, l'acétate de citronellyle et l'acétate de menthyle.

Les pics quasi-moléculaires [M+H]<sup>+</sup> peuvent être observés sur les spectres des alcools lorsqu'il y a interaction entre le groupe hydroxyle protoné et un autre groupe fonctionnel. Ces pics [M+H]<sup>+</sup> peuvent être utilisés pour différencier des stéréoisomères ; en effet ils sont plus intenses sur les spectres ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> du *cis*-1,3-cyclohexanediol et du *cis*-1,4-cyclohexanediol que sur ceux des isomères *trans* correspondants (80).

Hadjieva et coll. (62), par ICP-CH<sub>4</sub>, ont différencié les isomères *cis* et *trans* de l'oxyde de linalol par l'intensité des pics [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (*cis* : 55%, *trans* : 30%). Fraisse et coll. (81) ont montré que l'utilisation de l'ICP-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> permet d'observer pour ces deux isomères, une différence d'intensité plus forte (*cis* : 71%, *trans* : 34%). Ces résultats peuvent s'expliquer, après élimination de la molécule d'eau, par une stabilisation plus importante de la charge pour l'isomère *cis*. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que les deux isomères de l'oxyde de linalol ont des spectres identiques en IE.

Pour les alcools insaturés, le système  $\pi$  stabilise la molécule protonée. Ainsi, les pics quasi-moléculaires  $[M+H]^+$  sont pics de base pour les spectres de l'hex-3-ènol, de l'hex-4-ènol et de l'hex-5-ènol (82). Ce mécanisme de stabilisation a été observé pour de nombreux alcools terpéniques en ICP- $C_4H_{10}$  (71, 77, 83). Ceci peut permettre de distinguer des stéréoisomères ; ainsi, les pics  $[M+H]^+$  sont plus intenses sur le spectre du *syn*-7-hydroxynorborn-2-ène que sur celui de l'isomère *anti* (84). Toujours en ICP- $C_4H_{10}$ , Lange et Schulze (83) ont différencié les quatre stéréoisomères de l'isopulegol par les intensités des pics  $[M+H]^+$  à  $m/z$  155 et  $[M+H-H_2O]^+$  à  $m/z$  137.

Enfin, Badjah Hadj Ahmed et coll. (85) ont différencié plusieurs isomères de dérivés pinaniques ( $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, *cis*- $\delta$ -pinène, pinocamphone et isopinocamphone, nopinone et isonopinone) en utilisant l'azote comme gaz réactif.

Le mode de l'ionisation chimique négative (ICN) a été utilisé pour l'analyse des huiles essentielles de *Valeriana officinalis* (86) et de *Cannabis sativa* (87). Bruins et coll. (70, 86, 87) préconisent cette méthode bien adaptée à la détermination de la masse moléculaire des alcools et des esters terpéniques contenus dans les huiles essentielles. Les ions hydroxyles  $OH^-$  permettent la formation de l'ion  $[M-H]^-$  suffisamment stable pour être observé avec une abondance relativement élevée. En général, cet ion correspond au pic de base dans le cas des alcools, plus rarement dans le cas des esters pour lesquels l'ion carboxylate  $[RCOO]^-$  est caractéristique. L'utilisation de l'ICN, appliquée à l'étude de l'huile essentielle d'*Allium porrum* L. (88) a permis d'obtenir des résultats intéressants notamment quant à la détermination des principales familles de composés chimiques présents. Enfin, Bicchi et coll. (89) ont utilisé l'ICN avec les ions  $OH^-$  pour étudier différents esters linéaires présents dans l'huile essentielle d'*Anthemis nobilis*.

En 1987, Bruins (90) a récapitulé les différents résultats obtenus par utilisation de l'IC appliquée à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles.

De nombreuses études ont mis en évidence l'influence des paramètres expérimentaux, notamment la température et la pression dans la source d'ionisation, sur les résultats d'une analyse en IC (71, 77, 83, 90). Il convient, donc, d'être prudent, en particulier dans la comparaison de spectres enregistrés dans des conditions expérimentales différentes. Zupanc et coll. (91) ont développé une méthode d'analyse combinant les spectres de masse obtenus en IE et en ICP et ont ainsi créé une bibliothèque de référence contenant les spectres combinés de plusieurs terpènes. La combinaison des deux modes d'ionisation permet, dans certains cas, d'obtenir des informations complémentaires intéressantes (92, 93) mais nécessite de réaliser plusieurs analyses pour un même échantillon. Enfin, Vernin et coll. ont mis en évidence les apports de l'IC à l'étude des huiles essentielles (94) et ont développé un logiciel de traitement des données (95, 96) facilitant l'identification des composés à partir de leurs spectres de masse (IE et IC) et des valeurs de leurs indices de rétention (apolaire et polaire).

### 3- Les autres techniques de couplage

Les nombreuses difficultés rencontrées lors de l'analyse de mélanges complexes selon les différentes techniques et méthodes connues ont conduit, récemment, à la mise au point de la spectrométrie de masse multidimensionnelle à double analyseur (SM/SM) (92) ou à triple analyseur (97). Cette technique, souvent couplée à la CPG, a connu un développement rapide ces dernières années. Le principe consiste à sélectionner un ion issu de la première fragmentation afin de le fragmenter de nouveau. Les fragments de l'ion secondaire constituent, alors le deuxième spectre de masse qui diffère selon l'origine de l'ion primaire. Souvent, le premier spectromètre de masse du couplage fonctionne en mode ionisation chimique et les suivants en mode impact électronique. Cazaussus et coll. (98) ont appliqué cette méthode à l'étude des fragmentations de la khusimone constituant de l'huile essentielle de vétiver bourbon. Decouzon et coll. (99) ont montré que ce couplage permettait de différencier les quatre isomères du dihydrocarvéol à partir des fragments caractéristiques induits par la

stéréochimie de la molécule (position axiale ou équatoriale des groupements hydroxyle et méthyle) alors que cela n'est pas possible en ICN simple.

Le couplage de la CPG avec un spectromètre infrarouge par transformée de Fourier (CPG/IRFT) est une technique particulièrement intéressante lorsqu'il s'agit d'analyser des composés fonctionnalisés en permettant d'identifier des molécules dont les spectres de masse ne sont pas suffisamment différenciés. A titre d'exemple, les quatre isomères du farnésol, ceux du menthol (38), les acétates de bornyle et d'isobornyle (3), les esters linéaires portant les groupements méthacrylate/crotonate et angélate/tiglate (89) ou encore le nérol et le géraniol (100) sont distingués sur la base de leur spectre infrarouge. L'IRFT a aussi montré son efficacité dans l'identification de composés susceptibles de subir des transpositions sous l'effet de l'impact électronique. C'est le cas du germacrène B et du bicyclogermacrène qui subissent une réaction sigmatropique [3,3] (réarrangement de Cope) conduisant au  $\gamma$ -élémane et au bicycloélémane (3, 101). Le développement d'appareils permettant d'atteindre des seuils de sensibilité comparables à ceux de la CPG/SM (67, 68) font du couplage CPG/IRFT une technique de plus en plus intéressante dans l'analyse des arômes.

Les couplages CPG/IRFT et CPG/SM sont donc deux techniques complémentaires adaptées à l'analyse des huiles essentielles. Il est aussi possible de coupler à la fois la CPG à un spectromètre de masse et à un détecteur infrarouge (CPG/IRFT/SM). Ainsi, on associe les potentialités offertes par les deux techniques (102). Ce double couplage a permis à Hedges et coll. (103) de rapidement identifier à côté du 1,8-cinéole majoritaire, plusieurs autres constituants présents à de faibles concentrations dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus australiana*.

Comme nous l'avons dit précédemment pour le germacrène B et le bicyclogermacrène, en CPG/SM, certaines molécules peuvent subir des transpositions sous l'effet de la température (réarrangement de Cope) et d'autres peuvent présenter des retards d'élution du fait d'une trop grande polarité ou d'une masse moléculaire trop importante. Le couplage CLHP/SM a permis de surmonter ces difficultés en

raison de la possibilité de travailler à température ambiante, d'une part, et d'utiliser des colonnes spécifiques à greffons « standards » ou « inverses », d'autre part (104). De plus, les améliorations apportées au niveau des interfaces d'ionisation à pression atmosphérique (API) permettent d'atteindre des sensibilités plus importantes (105). Cette technique a notamment été utilisée par Cremin et coll. (106) pour identifier plusieurs esters aromatiques d'alcools sesquiterpéniques présents dans un basidiomycète pathogène. De même, Carini et coll. (107) ont utilisé le couplage CLHP/SM en mode ionisation chimique positive et négative pour reconnaître des antioxydants polyphénoliques dans des extraits d'*Helichrysum stoechas*. Enfin, Morin et coll. (108) ont identifié de nombreux composés dans une huile essentielle de verveine en la fractionnant préalablement par CLHP semi-préparative, puis en analysant les fractions obtenues par CPG/SM.

Le développement des techniques chromatographiques multidimensionnelles tels le couplage d'une chromatographie en phase liquide (CPL) avec une CPG (CPL-CPG) ou encore le couplage CPG-CPG, a permis de réaliser des progrès notables dans le domaine de la séparation des mélanges complexes (109, 110). Ainsi, les performances du couplage CPG/IRFT-SM ont été améliorées par l'utilisation de la CPG multidimensionnelle (CPGMD) à trois colonnes : une pré-colonne de polarité intermédiaire, une colonne polaire et une colonne apolaire (CPGMD/IRFT-SM) ; cela confère au système, en plus d'une double détection, une séparation optimale. D'autre part, le couplage en ligne CPL-CPG associe la sélectivité de la chromatographie en phase liquide avec la grande efficacité des colonnes capillaires (104). Cette méthode est particulièrement bien adaptée à l'analyse des huiles essentielles du genre *Citrus* (111) pour lesquelles les constituants ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux de standards. Des études récentes portant sur ces huiles essentielles ont aussi été réalisées à l'aide d'un couplage CLHP-CPG/SM qui a permis une identification encore plus performante (112, 113).

Il convient de signaler enfin, l'existence d'un couplage direct entre la CLHP et la RMN du proton. Deux méthodes peuvent être utilisées : la première, dite par « flux

non continu », consiste à arrêter l'élution quand un constituant est détecté dans la sonde du spectromètre. La seconde est dite par « flux continu » ; l'acquisition des données est faite à l'aide d'une sonde où le liquide est en écoulement constant. La présence de solvants protonés dans les échantillons à analyser est un handicap pour ce type de couplage. Cette difficulté est contournée par la mise en œuvre de techniques d'irradiation sélectives ou par l'utilisation de solvants deutérés. Actuellement, la puissance des aimants permet d'enregistrer un spectre avec une quantité de substance pure de l'ordre du nanogramme (114). Cette association est principalement utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour l'étude de mélanges simples, par exemple pour l'identification de métabolites divers dans les urines (114), la détection d'impuretés dans certains produits pharmaceutiques (115) et l'analyse de dérivés de la vitamine A (116). Elle est également utilisée dans l'industrie agroalimentaire, dans l'analyse de polymères et des carburants (114). En outre, Spring et coll. (117) ont utilisé ce couplage pour élucider la structure de trois lactones sesquiterpéniques présentes dans un extrait de feuilles de *Zaluzania grayana*.

D'une manière générale, l'utilisation de tels couplages, bien que donnant d'excellents résultats quand ils sont utilisés à bon escient, doit faire l'objet de la plus grande vigilance si l'on veut éviter les erreurs, liées essentiellement à une informatisation poussée ou à un excès de confiance. Joulain (1) a parfaitement décrit les avantages et les inconvénients des techniques les plus utilisées et a dénoncé les abus résultant d'une utilisation trop mécanique de certaines d'entre-elles. Il dresse un large éventail des erreurs fréquemment commises et énonce les recommandations à observer permettant de ne donner que des résultats fiables.

#### 4- La Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN-<sup>13</sup>C)

Une alternative aux méthodes d'analyse décrites précédemment est la RMN du carbone-13 des mélanges, sans séparation préalable des constituants. Cette technique, initié par Formáček et Kubeczka (2, 3), développée par Casanova et coll. (4-6) offre des potentialités fortement intéressantes.

Le principe consiste à attribuer les raies de résonance de chacun des carbones de chaque composé à partir du spectre unique du mélange et de les comparer à des produits de référence répertoriés dans des bibliothèques (5, 6). Contrairement aux techniques chromatographiques, les constituants ne font pas l'objet d'une individualisation en RMN. Différents aspects sont à considérer, à savoir l'observation et l'individualisation des différentes raies de résonance dans le spectre du mélange et l'attribution de chacune de ces raies de résonance à un produit donné permettant son identification. L'individualisation de tous les signaux dans le spectre du mélange dépend de plusieurs paramètres :

- la complexité du mélange mais également le nombre de carbones constitutifs de chacun des constituants ;
- les différences entre les concentrations relatives des divers constituants ;
- les similitudes observées au niveau de tout ou partie des squelettes carbonés de molécules provoquant une augmentation du nombre de superpositions des carbones possédant des environnements magnétiques moyens identiques.

En regard de la technique de Formáček et Kubeckzka, l'originalité de la méthode développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » réside dans l'informatisation de la recherche qui est réalisée par un logiciel permettant de comparer le déplacement chimique de chaque carbone dans n'importe quel spectre expérimental avec ceux des atomes de carbone de composés purs répertoriés dans la bibliothèque de spectres élaborée au laboratoire de l'équipe à partir d'échantillons authentiques et/ou dans la bibliothèque construite à partir des données décrites dans la littérature. Ainsi, l'informatisation de la recherche permet, en un laps de temps très court, l'édition de toutes les informations nécessaires à la caractérisation des constituants d'un mélange complexe (attribution des raies de résonance, variation des déplacements chimiques, superpositions).

La certitude de l'identification des composés du mélange est rendue possible par la prise en compte des paramètres suivants :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- le nombre de superpositions des signaux pouvant se produire quand les différents effets stériques et électroniques font que deux carbones appartenant à deux molécules différentes ont le même déplacement chimique, ou quand des constituants du mélange ont une partie de leur squelette très proche ;
- les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence ( $\Delta\delta$ ) ;
- l'intensité des raies de résonance observées qui permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à un composé donné.

L'apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse d'un mélange complexe est intéressant en ce sens qu'elle permet, dès lors que leur teneur est supérieure à 0,5% et qu'ils sont présents dans les bibliothèques de référence, d'identifier rapidement et sans ambiguïté, certains composés dont l'analyse par les techniques conventionnelles est problématique. D'une manière générale :

- tous les carbones sont observés à l'exception des carbones quaternaires de ceux des composés minoritaires ;
- les variations des déplacements chimiques sont inférieures ou égales à 0,05 ppm pour la grande majorité des carbones ;
- le nombre de superpositions est limité et n'empêche aucunement l'identification d'un composé par l'observation d'au moins 50% des carbones qui lui appartiennent en propre.

La RMN du carbone-13 des mélanges est efficace particulièrement pour la différenciation et l'identification de molécules structurellement très proches (ie : stéréoisomères) comme le montrent les travaux réalisés sur les isomères du menthol, du dihydrocarvéol et sur leurs acétates (118, 119) ou ceux portant sur les cédrènes et les funébrènes qui ne diffèrent que par la jonction des cycles (95, 120). De même, les énantiomères du camphre et de la fenchone ont été différenciés dans l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* (121). L' $\alpha$ -bisabolol et l'*épi*- $\alpha$ -bisabolol, deux alcools



sesquiterpéniques, ont des spectres de masse identiques et des indices de rétention très proches ; seuls leurs spectres de RMN du carbone-13, très différents, permettent leur identification même si l'un seulement des isomères est présent dans l'huile essentielle (122).

L'utilisation de cette technique est également intéressante pour l'identification des composés qui coéluent en CPG. Par exemple, l'étude par CPG/SM de l'huile essentielle de *Piper betle* du Viêt-Nam pouvait conduire à l'identification du  $\delta$ -cadinol avec une teneur de l'ordre de 20%. L'analyse par RMN du carbone-13 a montré qu'en réalité il s'agissait de  $\tau$ -muurolol et de  $\tau$ -cadinol (123) à une teneur d'environ 10% chacun et qui coéluaient sur la colonne de CPG utilisée.

Enfin, la RMN du carbone-13 a été utilisée comme un outil dans l'identification de molécules thermosensibles ; l'identification de deux sesquiterpènes furaniques dans l'huile essentielle de *Smyrnia olusatrum* (124) a été rendue possible par cette technique. En effet, le furanodiène se réarrange en furanoélémane ; cette transposition de Cope qui se produit en grande partie dans l'injecteur du chromatographe rend impossible leur différenciation par les méthodes chromatographiques. La RMN a permis également l'analyse d'autres molécules thermolabiles tels les gingérols dans les extraits au CO<sub>2</sub> supercritique de gingembre (125). Enfin, elle a été récemment utilisée pour quantifier l'ascaridole et l'isoascaridole dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* de Madagascar (126).

L'utilisation conjointe de la RMN du carbone-13, des indices de rétention et du couplage CPG/SM a montré son efficacité pour l'analyse d'un grand nombre d'huiles essentielles de plantes aromatiques de Corse [*Rosmarinus officinalis* (127), *Thymus herba barona* (128), *Myrtus communis* (129), *Crithmum maritimum* (130), *Calamintha nepeta* (131), *Peucedanum paniculatum* (132), *Juniperus communis* ssp. *alpina* (133), *Dittrichia viscosa* subsp. *viscosa* (134), *Ferula communis* (135), *Santolina corsica* (135) et encore *Stachys glutinosa* (136), *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (137) et *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (138, 139, 140)], du Viêt-Nam (130), de Madagascar (141), de Côte d'Ivoire (142) mais également pour mettre en évidence la

variabilité chimique de plusieurs plantes (128, 131) notamment pour un grand nombre de *Citrus* (143).

Dans le cas où la recherche du logiciel dans les bibliothèques s'avère infructueuse, il est possible de procéder à la reconstitution du spectre de la molécule sur la base de parties de spectres correspondant à des parties de molécules présentes dans ces bibliothèques et constitutives du composé recherché. Si les molécules de référence sont issues de la littérature, il vaut veiller à contrôler les conditions d'enregistrement des spectres et les déplacements chimiques des carbones.

## II- SÉPARATION DES CONSTITUANTS PRÉALABLEMENT A LEUR IDENTIFICATION

Souvent, l'identification d'un grand nombre de constituants d'une huile essentielle nécessite un fractionnement préalable de cette huile essentielle par distillation fractionnée et/ou par une ou plusieurs techniques chromatographiques (CC, CCM, CLHP, CGP). Chaque fraction, constituant un mélange moins complexe, est soumise à l'analyse.

Un grand nombre d'huiles essentielles, plus ou moins complexes, ont été étudiées selon cette voie depuis une quinzaine d'années. On peut citer, par exemple, les travaux de Brown et Hagedorn (144) sur le fractionnement de l'huile essentielle de *Croton elutaria* par une série de CC et de CGP. Les composés isolés ont ensuite été caractérisés par différentes techniques spectroscopiques : IR, SM, RMN du proton et du carbone-13. Ce travail a permis d'identifier 143 composés dont 12 nouvelles molécules.

Bicchi et coll. (145) ont utilisé cette procédure pour l'analyse approfondie de l'huile essentielle d'*Artemisia roxburghiana*. Le fractionnement poussé de l'huile essentielle (80g), mené par distillation fractionnée sous vide, CC et CCM préparatives, a permis l'identification de 108 constituants, principalement par comparaison des

indices de rétention en CPG et des spectres de masse en CPG/SM. En outre, le recours à la RMN du proton et du carbone-13 a permis l'identification de 23 composés dont de nombreux sesquiterpènes.

Il convient également d'évoquer les excellents travaux de Weyerstahl et coll. (146-149), qui réalisent des fractionnements très poussés de l'huile essentielle, par distillation fractionnée et chromatographies répétées (CC, CCM). Les composés isolés ont été identifiés sur la base des résultats obtenus en SM, RMN du proton et du carbone-13. Ainsi, ce n'est pas moins de 150, 160 et 170 composés qui ont été identifiés respectivement dans les huiles essentielles de *Pulicaria gnaphalodes* (147), d'*Artemisia sieberi* (148) et du Vétiver d'Haïti (149). Ces mêmes auteurs ont analysé de façon analogue les huiles essentielles de *Cangerana glaberrima* du Brésil (150), de *Tanacetum fruticosum* d'Inde (151), d'*Aglaia odorata* du Viêt-Nam (152) et de *Zanthoxylum alatum* d'Inde (153).

### III- PROBLÉMATIQUE DE LA RECHERCHE

#### **A- Analyse du contexte**

Ce travail est réalisé dans le cadre d'un projet de recherche structurant de l'Université de Corse sur la biodiversité insulaire et la valorisation des ressources naturelles ; il porte, notamment, sur la production et la caractérisation des huiles essentielles qui en sont extraites.

Notre domaine de recherche concerne la valorisation des plantes à parfums, aromatiques et médicinales poussant à l'état spontané ou cultivé en Corse ou encore pouvant y être introduites dans un objectif de développement durable. Nos études visent aussi bien les espèces végétales faisant déjà l'objet d'une exploitation que celles, non encore exploitées, susceptibles d'intéresser les producteurs et les industriels. La détermination de la composition chimique des huiles essentielles

permet de les caractériser, de mettre en évidence une éventuelle spécificité locale et d'en évaluer la qualité.

Ce travail s'inscrit :

- à l'échelon régional, dans le cadre de politique menée par la Collectivité Territoriale de Corse (CTC), notamment, l'Agence de Développement Economique de la Corse (ADEC) à travers l'appel régional à proposition. En outre, la problématique est développée en collaboration avec des producteurs insulaires.

- à l'échelon national, dans le cadre d'une labellisation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi que du CNRS.

- enfin, à l'échelon international, dans le cadre des financements de la Communauté européenne à travers les PIC Interreg Italie France « Iles » Sardaigne-Corse-Toscane, mais aussi dans un cadre commun au Ministère des Affaires Etrangères et à la CTC, via leur programme de coopération décentralisée.

## **B- Méthodologie d'analyse**

L'identification des constituants d'une huile essentielle est une opération délicate nécessitant l'utilisation, l'adaptation et le perfectionnement des techniques d'analyse, ainsi que la mise en œuvre d'une méthodologie d'analyse rigoureuse.

La méthodologie d'analyse du laboratoire est basée sur l'utilisation conjointe de la CPG/Ir et de la CPG/SM-IE (figure 1). Ces deux techniques d'analyse sont particulièrement bien adaptées à l'analyse des huiles essentielles et constituent les techniques de référence au niveau du marché. Comme toutes techniques analytiques, elles présentent des limites justifiant le recours à des méthodes d'analyse complémentaires et en premier lieu, lorsque cela est possible, la RMN du carbone-13 des mélanges (figure 2).

La technique de l'IC apparaît également comme complémentaire de celle de l'IE. Selon la littérature et ainsi que nos propres travaux l'établissent, cette complémentarité peut être mise à profit pour obtenir une information plus fiable sur plusieurs points :

- la détermination de la masse moléculaire à partir de l'observation des ions quasi-moléculaires et adduits ;
- l'identification des groupes fonctionnels, présents dans la molécule, basée sur les fragmentations caractéristiques des différentes familles de composés ;
- la stéréochimie des composés à partir des intensités relatives de certains pics caractéristiques.

En mode IC, l'ionisation et les fragmentations d'un composé dépendent de manière importante des conditions analytiques : gaz réactif, pression et température de la source. L'expérimentateur peut donc les faire judicieusement varier en fonction des informations recherchées.

Une huile essentielle, fractionnée ou non, est analysée simultanément par CPG/Ir et CPG/SM. Le calcul des indices de rétention, polaires et apolaires, et la quantification des composés s'effectuent par CPG/Ir. L'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants qui sont ensuite comparés à ceux répertoriés dans des bibliothèques, l'une élaborée au laboratoire et les autres, commerciales, en éditions traditionnelles ou informatisées [König-Joulain (18, 19), Wiley (33), Adams (21), Nist (34)]. Chaque proposition du logiciel de comparaison des spectres de masse est assortie d'une note de concordance qui reflète la validité de la structure proposée. Si la note de concordance est correcte, on compare les indices de rétention du constituant proposé à ceux présents dans la bibliothèque élaborée au laboratoire, ou dans des bibliothèques commerciales [Joulain (18, 19), Jennings (20), Adams (21)], ou répertoriés dans la littérature. Toutefois, on ne se limite pas simplement à la note de concordance ; on procède systématiquement à l'examen du spectre de masse du composé recherché afin d'en tirer les principales informations : masse de l'ion moléculaire, fragmentations caractéristiques ou encore mise en évidence de coélutions. A ce stade, trois approches différentes (**a**, **b**, **c**) sont envisagées (figures 1 et 2) :

(a), le spectre de masse du constituant et ses indices de rétention correspondent à ceux d'un composé présent dans les bibliothèques afférentes élaborées au laboratoire. L'identification du constituant est réalisée sans ambiguïté. Sa structure peut éventuellement être confirmée par RMN du carbone-13, notamment si un autre composé présent dans les bibliothèques possède des caractéristiques voisines.

(b), les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne correspondent à ceux d'aucun composé des bibliothèques propres mais correspondent à celles d'un composé présent dans les bibliothèques commerciales (ou dans la littérature). Dans ce cas nous vérifions, par l'étude des fragmentations principales, si le spectre de masse du produit proposé est bien en accord avec la structure de ce dernier. Cette approche mécanistique peut être complétée, lorsque cela s'avère possible, soit par une étape d'hémisynthèse suivie de l'exploitation de l'analyse du composé synthétisé, soit par le recours à la RMN du carbone 13.

(c), les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne correspondent à ceux d'aucun composé d'aucune bibliothèque. Dans ce cas, deux solutions sont envisageables :

- soit le composé est présent dans les bibliothèques RMN du carbone-13 (auquel cas il est identifié sans ambiguïté),

- soit le composé est absent des bibliothèques RMN du carbone-13, auquel cas nous n'avons d'autre ressource que le schéma classique de purification du constituant dans l'optique d'une étude structurale.

Figure 1 : identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM

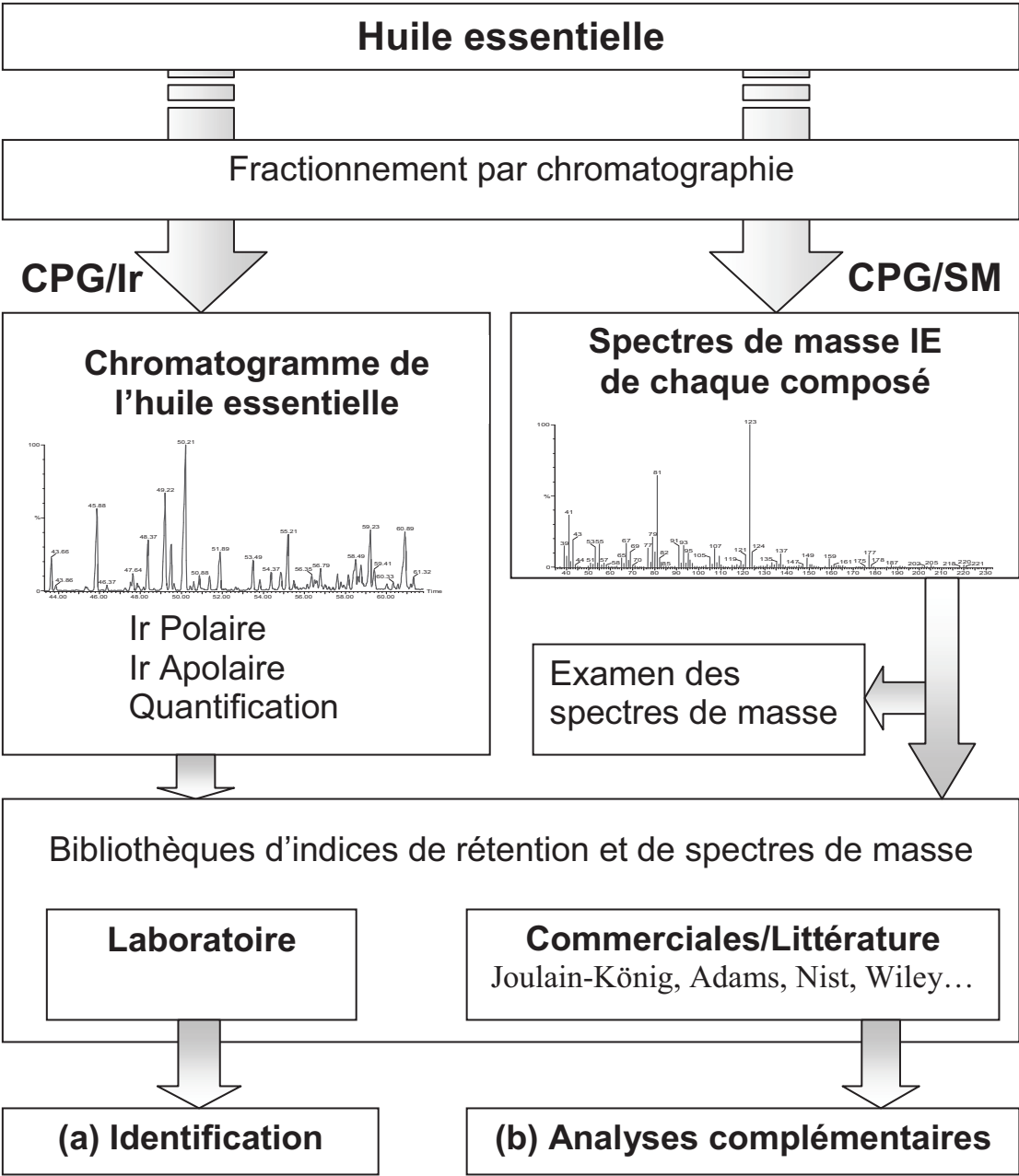
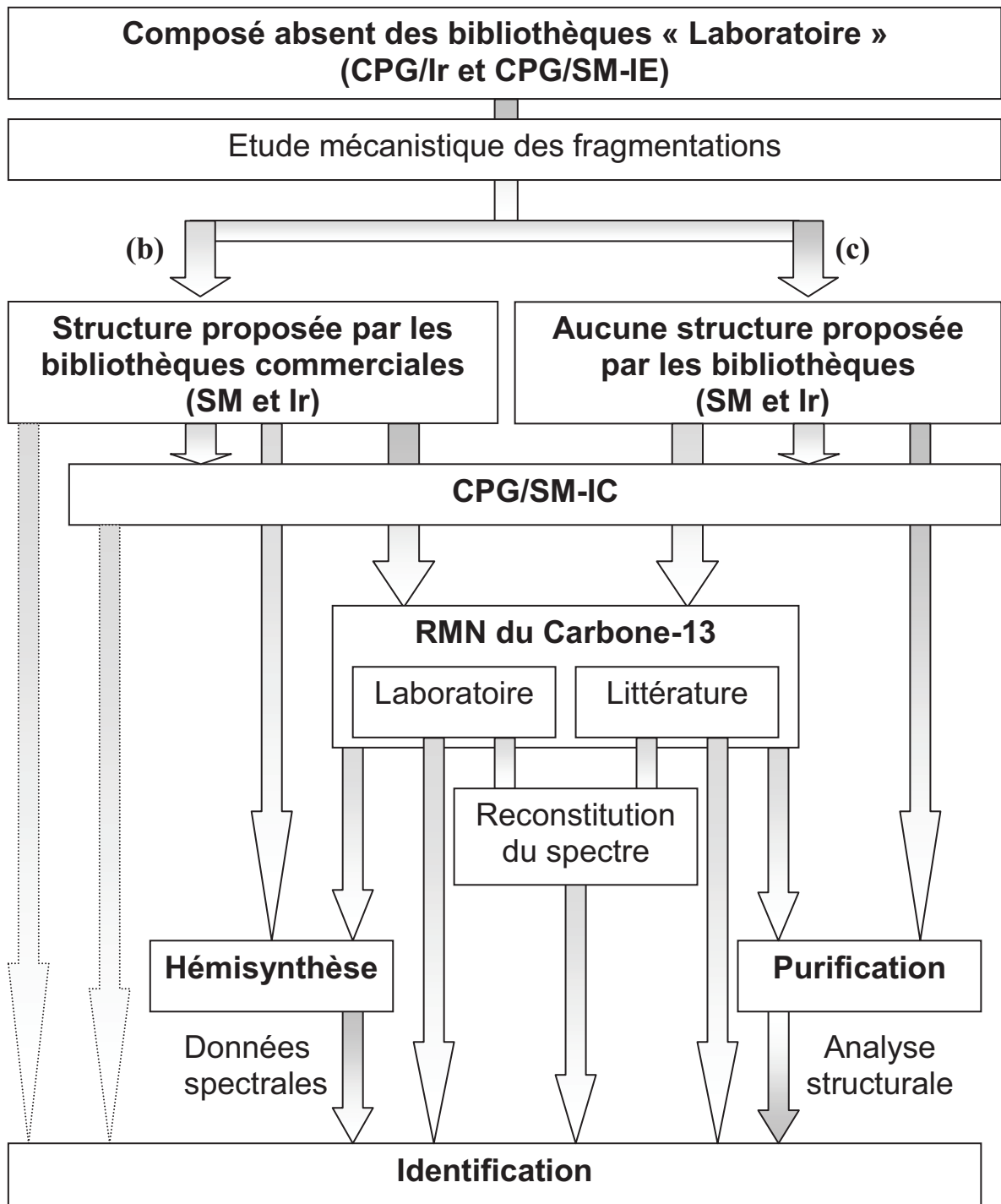


Figure 2 : méthodes d'analyses complémentaires des constituants d'une huile essentielle





## **DEUXIEME PARTIE**

### ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CISTUS ALBIDUS*

## I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE GENRE *CISTUS*

### 1- Etude botanique

La famille des Cistacées comprend cinq genres déterminés à partir de l'étude des fruits et des stigmates : *Cistus*, *Helianthemum*, *Fumana*, *Halimum* et *Tuberaria*, les deux premiers étant les plus répandus (154).

Les Cistacées sont des plantes herbacées ou ligneuses comprenant près de cent espèces réparties sur le pourtour du bassin méditerranéen et dans certaines de ses îles (Sardaigne, Sicile et Corse) (155).

Les espèces du genre *Cistus* possèdent des feuilles simples, opposées, sans stipule, ovales, oblongues ou lancéolées. Elles sont généralement recouvertes de poils étoilés qui créent des espaces isolants empêchant la transpiration et permettant une adaptation à une relative sécheresse (156).

La floraison abondante des espèces du genre *Cistus* (157, 158) se produit au printemps. Les fleurs hermaphrodites sont solitaires ou réunies en inflorescences et le calice persistant est composé de trois à cinq sépales. Les pétales, qui forment une corolle éphémère, sont extrêmement délicats et toujours au nombre de 5. Leurs couleurs vont du blanc au jaune, à l'orange et au rose. Les pétales sont étroitement enroulés dans le bouton en sens inverse de celui dans lequel sont enroulés les sépales. Les étamines sont nombreuses et toujours libres, l'ovaire est supère et le fruit est une capsule de 2 à 10 loges et valves, à plusieurs graines tétraèdres ou subtrigones, renfermant une plantule enroulée ou spiralée (156).

Les cistes sont des espèces pionnières des environnements dégradés en raison de perturbations humaines ; par exemple, les champs abandonnés sont entièrement envahis par les cistes (159). La Cistaie s'installe souvent après les incendies et joue un

rôle important dans la dynamique de succession car ce sont les premiers arbustes à émerger après le feu, permettant ainsi la germination des autres plantes (160).

Les espèces du genre *Cistus* sont présentes dans les terrains chauds, ensoleillés, protégés des intempéries (161). Le genre *Cistus* comprend une trentaine d'espèces habitant la région méditerranéenne d'Europe, d'Asie, et d'Afrique. Les espèces les plus répandues dans cette région sont *Cistus ladaniferus* (Ciste à gomme), *Cistus monspeliensis* (Ciste de Montpellier), *Cistus salviifolius* (Ciste à feuille de Sauge), *Cistus laurifolius* (Ciste à feuille de Laurier), *Cistus creticus* (Ciste de Crète) et *Cistus albidus* (Ciste cotonneux). D'autres espèces sont présentes en moindre abondance : *Cistus populifolius* (Ciste à feuille de peuplier), *Cistus crispus* (Ciste crépu), *Cistus hirsutus*, *Cistus bourgeanus*, *Cistus pouzolzii*, *Cistus heterophyllus*, *Cistus parviflorus*, *Cistus varius*, *Cistus albanicus*, *Cistus palhinhae*, *Cistus clusii* et *Cistus libanotis* (163).

Il existe une corrélation étroite entre les espèces de cistes et la nature du sol. Ainsi, *Cistus albidus* est réputé calcicole alors que *Cistus monspeliensis* et *Cistus salviifolius* sont plutôt calcifuges (162).

A la suite, nous donnons les principales caractéristiques botaniques des espèces les plus répandues :

- *Cistus ladaniferus* (155, 156) est très répandu dans la région méditerranéenne à basse altitude (Portugal, Espagne, Italie septentrionale, Algérie, Maroc). Il est peu présent en France (Massif de l'Estérel) ; en Corse, quelques essais de culture sont actuellement réalisés par des producteurs locaux d'huiles essentielles. C'est un arbrisseau très odorant et très visqueux qui peut atteindre deux mètres de hauteur. Les feuilles sont vert sombre, glabres, presque sans poils sur la face supérieure alors qu'elles apparaissent tomenteuses et blanchâtres sur la face inférieure. Les fleurs mesurent de 6 à 8 centimètres de large et sont blanches, souvent jaunes ou tachées de pourpre vers l'onglet. Les trois sépales sont presque égaux et couverts de nombreux

tubercules portant de nombreux poils. Enfin, la période de floraison s'étale d'avril à juin.

- *Cistus monspeliensis* (155, 158) est une espèce commune en France, en Afrique du Nord, à Chypre et sur les Iles Canaries à relativement basse altitude (<1000 mètres). Elle affectionne particulièrement les terrains riches en éléments meubles et colonise les terrains parcourus par les incendies. Sa présence apparaît beaucoup plus liée à la nature physique qu'à la nature chimique du milieu. *Cistus monspeliensis* est très abondant en Corse, notamment à basse et moyenne altitude (étage mésoméditerranéen). C'est un arbrisseau d'environ un mètre, très odorant, verdâtre, possédant des rameaux, des pédoncules et des calices velus et visqueux. Les feuilles sont sessiles, lancéolées-linéaires, rugueuses-réticulées, trinervées, beaucoup plus longues que larges et à bords enroulés. Les fleurs de couleur blanche, disposées en grappe unilatérale sur un pédoncule dressé, mesurent de 2 à 3 centimètres. Les sépales, au nombre de cinq, sont en forme de cœur et la floraison va de mai à juin.

- *Cistus salviifolius* (156, 158) est présent dans toute la région méditerranéenne, dans les bois clairs, sur les côteaux, sur le sable maritime et sur les sols siliceux. En France, il s'étend des Pyrénées Atlantiques jusqu'à l'Ile de Noirmoutier et en Corse. C'est un sous-arbrisseau non visqueux mesurant de 30 à 80 cm avec des rameaux verts, diffus et couverts de poils étoilés. Les feuilles opposées, ovales-oblongues, velues sont courtement pétiolées, tomenteuses et les fleurs qui apparaissent en mai et juin sont longuement pédonculées, solitaires ou par 2-4. Elles sont formées de pétales blancs tachés de jaune à l'onglet et la corolle mesure entre 4 et 5 cm. Le fruit est une capsule anguleuse à 5 loges.

- *Cistus creticus* (Syn. *Cistus incanus* ou *Cistus villosus*) (156, 158), abondant sur le pourtour du bassin méditerranéen oriental et à l'Ouest jusqu'en Corse, en Sardaigne, en Italie du Sud et en Afrique du Nord, est absent de France continentale. C'est un arbrisseau mesurant environ un mètre ; ses feuilles simples, opposées, vertes sont brièvement pétiolées et un peu ondulées sur les bords. La floraison a lieu à la fin

du printemps et ses pétales roses sont chiffonnés. C'est une espèce polymorphe dans laquelle on distingue plusieurs variétés, parfois élevées au rang de sous-espèces : la variété *eriocephalus* ou *incanus* (Corse et Italie) chez laquelle les jeunes rameaux, les pédoncules floraux et les sépales sont recouverts de longs poils blancs soyeux, la variété *corsicus* (Iles de l'Ouest du bassin méditerranéen) à poils étoilés, courts et enfin, la variété *creticus* (bassin méditerranéen oriental) qui n'existe pas en France et que l'on rencontre surtout dans l'Est du bassin méditerranéen.

- *Cistus laurifolius* (155, 156) est une espèce répandue dans l'ensemble de la région méditerranéenne, excepté dans la partie orientale, qui semble absente de Corse. Cet arbrisseau mesure jusqu'à 1,50 m de hauteur, il est très odorant, verdâtre, avec des rameaux velus et glutineux. Ces feuilles sont pétiolées, vertes et glabres au dessus, blanches et soyeuses en dessous. L'inflorescence est un corymbe, de 3 à 12 fleurs blanches avec onglet jaune qui apparaissent en juin. Le fruit est une capsule à 5 loges et les graines sont tuberculeuses.

- *Cistus albidus* (156, 164), plus couramment appelé Ciste blanc ou Ciste cotonneux, peu odorant, se trouve sous forme d'arbrisseau de 40 cm à 1 m de hauteur. Les feuilles d'un beau gris duveteux sont sessiles, demi embrassantes, oblongues elliptiques, opposées et très velues sur les 2 faces. Les fleurs de 4 à 6 cm de long, d'un rose lumineux sont pédonculées et en ombelle au sommet des rameaux. Les sépales, au nombre de 5, sont largement ovales, acuminés et velus. Les pétales, 2 à 3 fois plus longs que le calice, ont un aspect fripé. Le fruit quant à lui, se présente sous forme de capsule ovoïde à 5 loges, velu, plus court que le calice. *Cistus albidus* dont la période de floraison va de mai à juin, pousse dans les garrigues et sur les côteaux surtout calcaires (155). On le trouve sur tout le pourtour méditerranéen: Sardaigne, Italie, Baléares, Espagne, Portugal et Algérie. En Corse, cette espèce a été observée pour la dernière fois dans les années 30 et n'a plus jamais été signalée (158).

## 2- Etude chimique

Le genre *Cistus* a fait l'objet de nombreuses études chimiques ; nous reprenons, à la suite, les principaux travaux réalisés sur les extraits et les huiles essentielles obtenues à partir des principales espèces de Cistes.

### - *Cistus ladaniferus*

D'après les travaux bibliographiques de Lawrence (165-167), il semble que les premières études sur le Ciste ladanifer débutent en 1912 et se poursuivent jusqu'aux années cinquante. Ces études portent principalement sur les propriétés physicochimiques de différents échantillons de végétal récoltés dans le Sud de la France. D'autres études menées par Sabetay (168) et Trabaud (169, 170) ont permis d'identifier divers composés dans les essences, les concrètes, les absolues et les huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* de Provence. Il s'agit, par exemple, de la 2,2,6-triméthylcyclohexanone, du benzaldéhyde, de l'acétophénone, de l'eugénol, du 1,8-cinéole, de l' $\alpha$ - et du  $\beta$ -pinène et d'un alcool sesquiterpénique, le lédol.

*Cistus ladaniferus* sécrète du labdanum qui est une sorte de gomme-résine produite par des glandes oléifères présentes sur les feuilles, les rameaux et les sommités fleuries de la plante. Cette résine extraite par immersion du ciste dans de l'eau chaude carbonatée est un produit noirâtre, possédant une odeur ambrée et une saveur balsamique amère. Le labdanum était autrefois utilisé comme médicament stimulant, astringent, hémostatique et répulsif (171). Aujourd'hui, le labdanum est utilisé en parfumerie pour ses propriétés odorantes et comme stabilisant dans les parfums.

Plusieurs équipes de chercheurs ont étudié la gomme résine de *Cistus ladaniferus* ; elles en ont extrait une fraction acide, une fraction neutre et une fraction phénolique.

Les premiers travaux ont été effectués par Cocker et coll. (172-174) qui ont isolé deux diterpènes dans la fraction acide : l'acide labdanolique **1.1** et l'acide 6-oxo-cativique **1.2** (figure 3).

Au début des années soixante, Tabacih-Wlotzka et coll. (175-177) ont étudié la fraction neutre et ont identifié le  $\Delta(13-14)$ -isodihydroabiétate de méthyle **1.3**, le déhydroabiétate de méthyle **1.4**, le labdane-8 $\alpha$ ,15-diol **1.5**, le labdane-8 $\alpha$ ,15,19 $\alpha$ -triol **1.6** (figure 3).

De Pascual Teresa et coll. (178-185) ont identifié dans la fraction neutre de la gomme labdanum de *Cistus ladaniferus* d'Espagne, deux alcools sesquiterpéniques (lédol et viridiflorol) et trois alcools diterpéniques (178) : le 15-nor-8 $\alpha$ -labdanol **1.7**, le ladénol **1.8** (ou labd-8(17)-èn-15-ol) et l'oxo-cativol **1.9** (ou 15-hydroxylabd-7-èn-6-one) (figure 3). Dans la fraction phénolique, ils ont isolé et identifié des flavonoïdes (179) dont le plus abondant est un dérivé diméthylé du kampférol **1.10** (ou 3,5,7,4-tétrahydroflavone): le jaranol **1.11** (3,7-diméthylkampférol). Le méthyl-jaranol **1.12** (3,7,4'-triméthylkampférol), la 7,4'-diméthylapigénine **1.13** et la genkwanine **1.14** (7-méthoxy-5,4'-dihydrohyflavone ou 7-méthylapigénine) sont les autres composés flavonoïques identifiés (179) (figure 4). Ils ont également mis en évidence la présence de diverses lactones (180-182) telles l'ambréinolide **1.15**, la 8-épi-12-norambréinolide **1.16**, la 12-norambréinolide **1.17**, l' $\alpha$  et la  $\beta$ -levanténolide **1.18** et **1.19**, trois  $\delta$ -lactones à chaîne latérale normale (C16, C18 et C20) **1.20a-c** et deux  $\gamma$ -lactones diterpéniques isomères à squelette labdane **1.21** (figure 5). De plus, ces auteurs ont identifié l'acide ladénique **1.22** (183), l'acide cativique, l'acide labd-8-èn-15-oïque **1.23** et l'acide dihydrocinnamique, une série d'acides gras (C16 à C28) et d'acides  $\beta$ -hydroxylés (C18 à C30) (184). Enfin en 1982, ces mêmes auteurs (185) identifient, dans la fraction acide, deux nouveaux acides diterpéniques : l'acide 7-oxo-labd-8-èn-15-oïque **1.24** et l'acide labda-6,8(17)-dièn-15-oïque **1.25** (figure 5).

Enfin, en 1994, Bats et coll. (186) ont comparé les compositions chimiques de divers extraits de *Cistus ladanifer* de Provence : concrète, gomme séchée, gomme pyrolysée, concrète. Ils ont ainsi mis en évidence des différences de composition en fonction des procédés d'extraction utilisés.

Les premières études détaillées concernant des huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* ont été réalisées par Gülz et coll. (187, 188). Ces auteurs mettent en évidence la complexité de ces huiles essentielles ; environ 300 composés peuvent être repérés sur le chromatogramme et aucun d'entre eux ne prédomine vraiment (189). Les constituants majoritaires sont l' $\alpha$ -pinène, le camphène et l'acétate de bornyle puis les *cis* et *trans* hex-2-èn-1-ol (dont la présence est probablement due à une synthèse enzymatique causée par un broyage effectué en amont de la distillation). Par la suite, cette même équipe a identifié, dans cette huile essentielle, la *cis*-ociménone, la tagétone, la pinocarvone et quatre esters de l'acide phénylpropanoïque (189, 190). La présence de ces derniers a été confirmée par Vernin (191) qui décrit en 1993 leurs spectres de masse et leurs indices de rétention.

En 1982, Rijke et coll. (192) ont isolé et identifié des composés à quatre ou cinq atomes de carbone dans des huiles essentielles commerciales. En 1986, Peyron et coll. (193) ont comparé les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* provenant de l'Esterel et d'Espagne. En 1987, Simon-Fuentes et coll. (194) ont identifié 85 composés dans l'huile essentielle d'Espagne par CPG/SM. La plupart de ces composés sont présents à l'état de trace et les constituants majoritaires sont l' $\alpha$ -pinène (35%), le camphène (10,3%), la 2,2,6-triméthylcyclohexanone (5,7%), le para-cymène (4%) et l'acétate de bornyle (3,7%). Enfin, en 1988, Gaudin et Guénet (195) ont établi des corrélations entre la qualité des huiles essentielles commerciales et le procédé de préparation (hydrodistillation à pression normale, sous pression, hydrodiffusion).

Weyerstahl et coll. (196) ont étudié une huile essentielle commerciale obtenue à partir du labdanum de *Cistus ladaniferus* par CPG, CPG/SM et par RMN du carbone-13 et du proton. Ils ont ainsi répertorié plus de 300 composés et en ont identifié 186 (154 dans la partie neutre et 32 dans la partie acide) représentant 95% de



l'huile totale. Cette huile essentielle est principalement constituée de trois familles de composés : les aromadendranes (23%), les cadinanes (9%) et les labdanes (7%). Parmi les constituants majoritaires, ils identifient le ledène (9,3%), le viridiflorol (4,3%) et le cubébane-11-ol (4,1%). Suite à cette étude, ces auteurs ont également décrit de nombreux nouveaux composés naturels tel que le cis-para-menth-4(8)-èn-2-ol, le cubéb-11-ène, le 1,2-déhydroglobulol, le 3,4-déhydroglobulol, le muurola-4,10(14)-dien-1-ol et le 8-15-nor-labdène.

Les huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* cultivé en Corse ont fait l'objet d'études par CPG et RMN du carbone-13 au sein de nos laboratoires (197, 198). Ces travaux ont permis d'identifier plus de 40 composés représentant environ 80% de la composition chimique globale. Les composés majoritaires sont l' $\alpha$ -pinène (39%), le viridiflorol (11,8%), le lédol (3,3%) et l'acétate de bornyle (3,1%). Parmi les autres constituants identifiés, nous pouvons signaler, par exemple, la présence d'une cétone monoterpénique, l'isopinocampone et d'un diterpène oxygéné, le labdan-8 $\alpha$ -ol-15-acetoxy. L'analyse de vingt et un échantillons d'huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* a permis de mettre en évidence des variations parfois importantes concernant la composition chimique de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* notamment au niveau des teneurs en  $\alpha$ -pinène, viridiflorol, lédol et trans-pinocarvéol.

Enfin, en 2003, Robles et coll. (199) ont comparé deux variétés de *Cistus ladaniferus*, à savoir la variété *maculatus* et la variété *albiflorus*. On retrouve les mêmes constituants majoritaires dans les deux variétés : l' $\alpha$ -pinène, le viridiflorol, la 2,2,6-triméthylcyclohexanone, la verbénone, le terpinèn-4-ol et le *trans*-pinocarvéol. Néanmoins, ces auteurs ont constaté que les populations de la variété *maculatus* possèdent des concentrations supérieures en  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène,  $\gamma$ -terpinène et verbénone que celles de la variété *albiflorus*. Les huiles essentielles obtenues à partir de la variété *albiflorus* présentent quant à elle des concentrations inférieures en benzaldhède, para-cymène-8-ol, lédol et viridiflorol que de *Cistus ladaniferus* var. *maculatus*. D'après ces auteurs, ces différences ne peuvent être attribuées aux conditions environnementales car ces deux variétés poussent sur les mêmes sites.

Figure 3 : diterpènes à squelette labdane identifiés dans *Cistus ladaniferus*

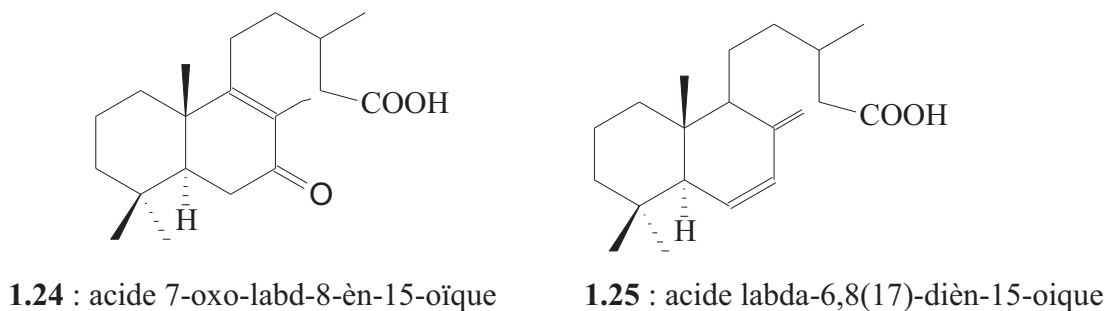
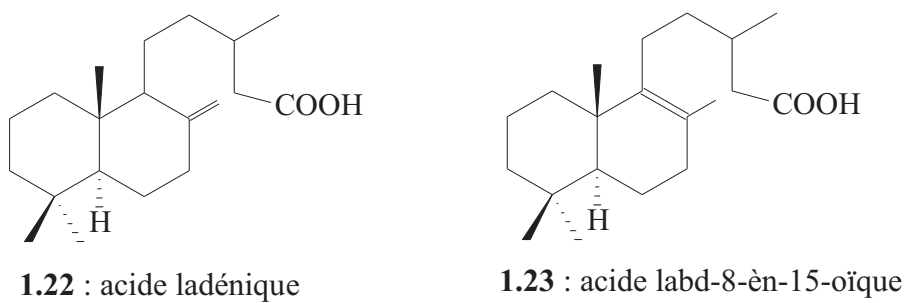
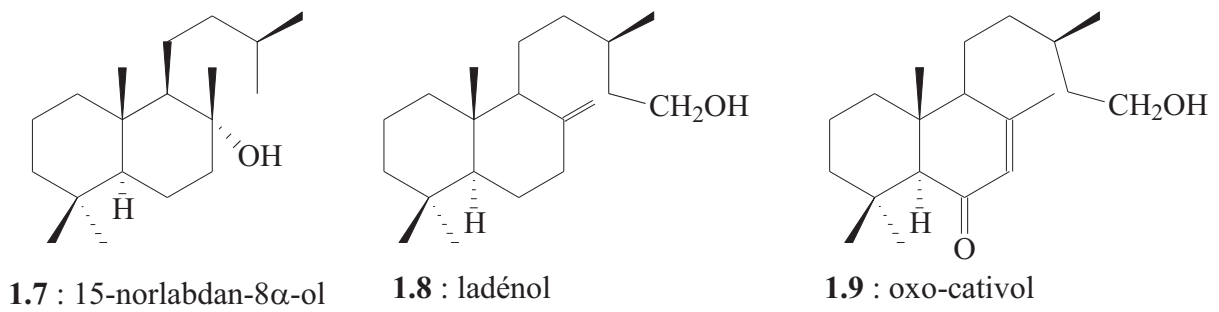
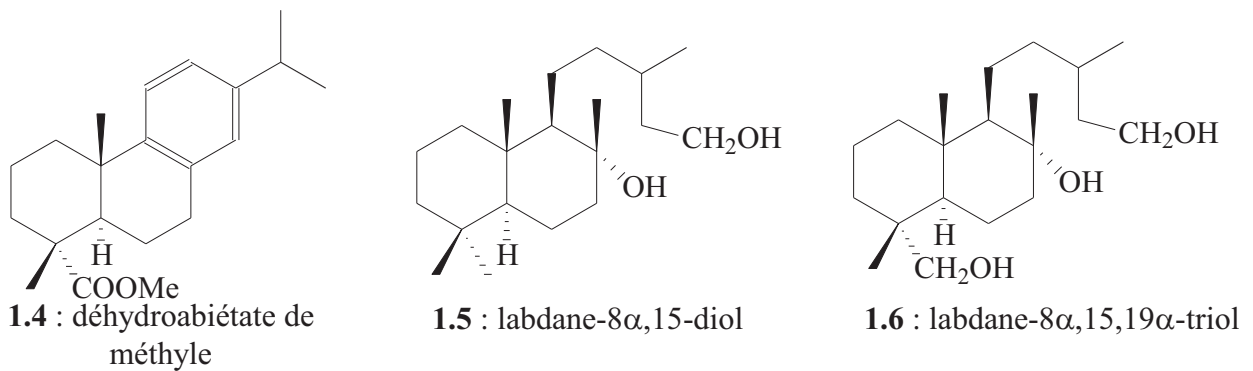
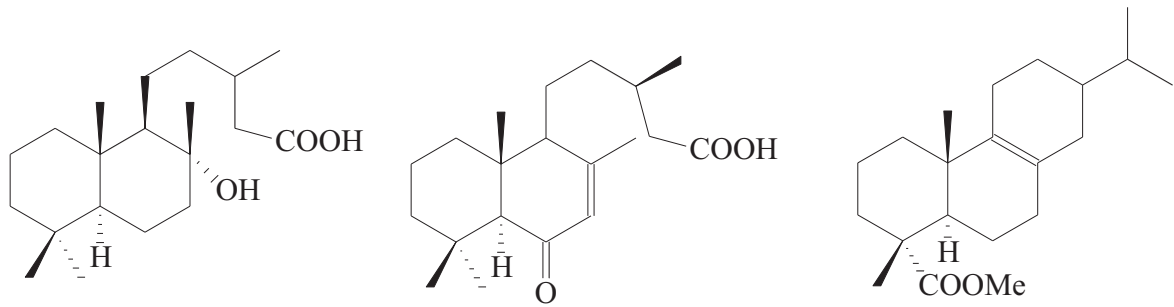
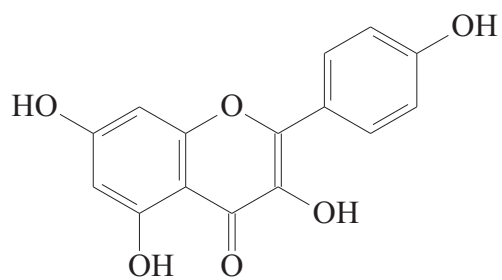
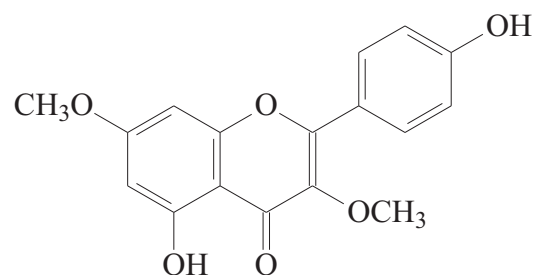


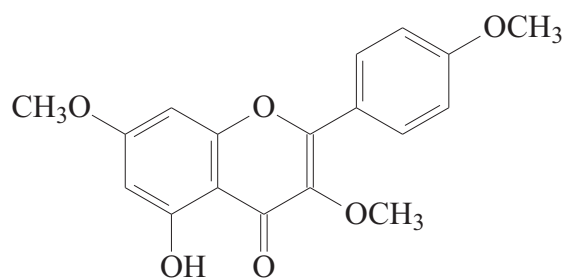
Figure 4 : flavonoïdes identifiés dans *Cistus ladaniferus*



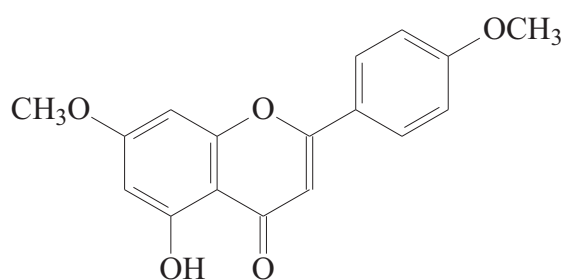
**1.10** : kampférol



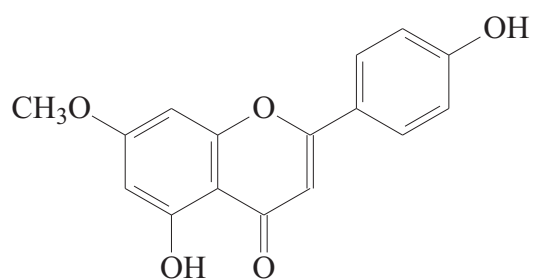
**1.11** : jaranol



**1.12** : méthyljaranol

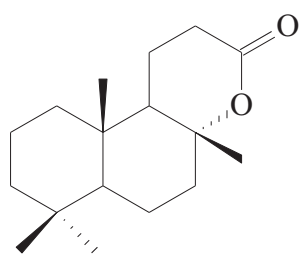


**1.13** : 7,4'-diméthylapigénine

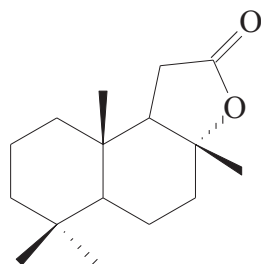


**1.14** : genkwanine

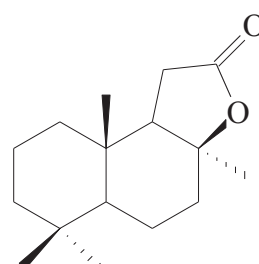
Figure 5 : lactones identifiées dans *Cistus ladaniferus*



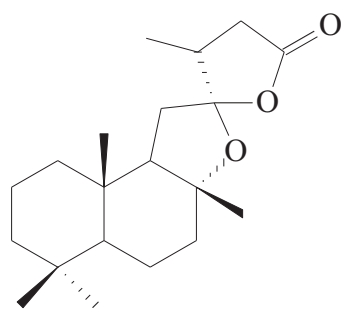
1.15 : ambréinolide



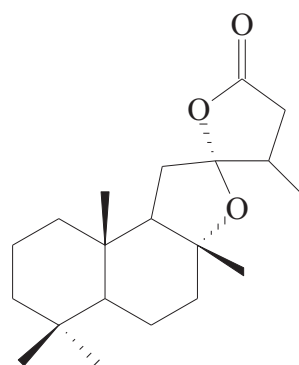
1.16 : 8-épi-12-norambréinolide



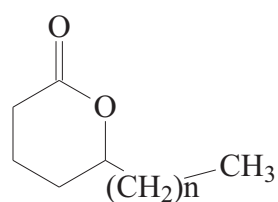
1.17 : 12-norambréinolide



1.18 : α-levanténolide



1.19 : β-levanténolide

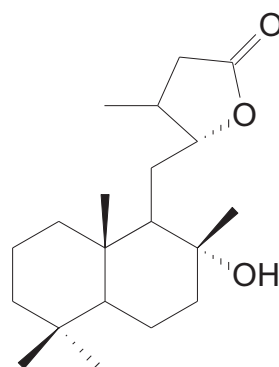


1.20 : δ-lactones

a : n=16

b : n=18

c : n=20



1.21 : γ-lactone diterpénique

- *Cistus monspeliensis*

L'étude d'une concrète obtenue à l'éther de pétrole de *Cistus monspeliensis* d'Italie a permis à Berti et coll. (200, 201) d'identifier deux nouveaux diterpènes à squelette clérodane (figure 6) : le cistodiol **1.26** et l'acide cistodioïque **1.27** ainsi que trois autres constituants le méthyljaranol **1.12**, le 7,4'-diméthylapigénine **1.13** et le labdane-8 $\alpha$ ,15-diol **1.5** (déjà identifiés dans *Cistus ladaniferus*). Par la suite, à partir du même extrait, ils ont identifié le docosan-1-ol, l'oxyde de 13-épi-manoyle et un alcool triterpénique le  $\beta$ -sitostérol (202).

Dans une étude plus générale réalisée sur le genre *Cistus*, Tabacih-Wlotzka et Bard (177) ont étudié des fractions neutre et acide d'une concrète de *Cistus monspeliensis* de France obtenue à l'éther de pétrole. Celle-ci est constituée principalement de composés à squelette cistane ; la fraction acide contient deux hydroxyacides : l'acide 18-hydroxyciste-3(4)-èn-15-oïque (45%) **1.28** et l'acide 15-hydroxyciste-3(4)-èn-18-oïque (8%) **1.29** tandis que la fraction neutre contient le ciste-3(4)-ène-15,18-diol (17%) **1.30** et l'acide 18-acétoxyciste-3(4)-èn-15-oïque (27%) **1.31**. Les composés à squelette labdane sont représentés dans la fraction acide par l'acide labdanolique **1.1** et dans la fraction neutre par le labdane-8 $\alpha$ ,15-diol (15%) **1.5** et le 15-acétoxy- labdan-8 $\alpha$ -ol (5%) **1.32**.

Gulz et coll. (203) sont les auteurs des premiers travaux réalisés sur l'huile essentielle de *Cistus monspeliensis*. Dans la fraction hydrocarbonée, ils ont mis en évidence la présence de plusieurs composés diterpéniques (dont l'un, non identifié, présent à une teneur de 41,8%) ainsi que de nombreux alcanes normaux : l'heptacosane (9,4%), le nonacosane (8,6%) et le tricosane (3,6%).

Les travaux effectués dans notre laboratoire sur l'huile essentielle de *Cistus monspelliensis* (197, 204) poussant à l'état spontané en Corse ont permis de reconnaître les composés majoritaires : l' $\alpha$ -pinène (19%), le viridiflorol (11,5%), l'oxyde de sclaréol (6,8%) et le lédol (3,8%). Au total, ce sont 43 constituants

représentant 79,4% de la composition chimique totale qui ont été identifiés. L'étude par RMN du carbone-13 a permis d'identifier sans ambiguïté huit diterpènes, par exemple ; l' $\alpha$ -kaurène, l'oxyde de manoyle et son épimère, le labdan-8 $\alpha$ ,15-diol, le sclaréol, l'oxyde de sclareol et l'ambrox. Un diterpène hydrocarboné, non décrit dans la littérature, le 9-géranyle-para-cymène a également mis en évidence par comparaison des déplacements chimiques des carbones avec ceux d'autres molécules.

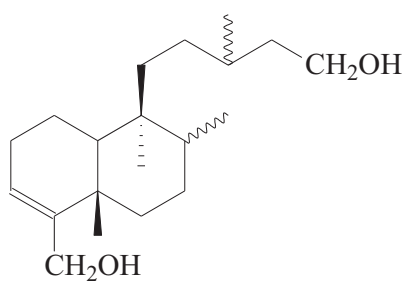
Plus récemment, Robles et coll. (205) ont effectué une étude comparative des huiles essentielles préparées à partir de *Cistus monspeliensis* poussant en Provence sur sols calcaires et siliceux. Les analyses ont été réalisées par CPG et CPG/SM. La principale différence ayant été mise en évidence est la présence d' $\alpha$ -cadinol et d' $\alpha$ -bisabolol en proportion plus importante dans les huiles essentielles de plantes poussant sur des sols calcaires. Outre ces deux composés, les auteurs ont identifié l'oxyde de 13-*épi*-manoyle, le tricosane et l' $\alpha$ -ionone.

Enfin en 2001, Angelopoulou et coll. (206) ont étudié par CPG et CPG/SM les huiles essentielles et les extraits à l'hexane de fruits et de feuilles de *Cistus monspeliensis* de Grèce.

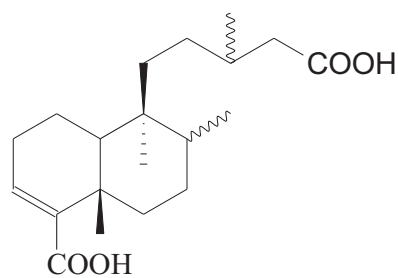
Les composés majoritaires des huiles essentielles de feuilles sont : l'oxyde de manoyle **1.33** (5,4%), l'oxyde de 13-*épi*-manoyle **1.34** (39,7%), et le kaur-16-ène (18,5%), et dans les huiles essentielles de fruits : les deux oxydes de manoyle **1.33** et **1.34** (20,3%) et l'heptacosane (28,7%) (figure 7).

Les composés présents dans les extraits à l'hexane sont principalement des diterpènes à squelette clérodane. Le constituant majoritaire n'a pas été identifié, il est présent dans les extraits de feuilles et de fruits respectivement à des teneurs de 78,6% et 52,8%. Le produit majoritaire en second est, dans les extraits de feuilles, un autre composé non identifié (18,4%) tandis que dans les extraits de fruits, c'est l'acide 18-acétoxykolavan-3-*en*-oïque. De plus, ces auteurs ont recherché l'activité cytotoxique du mélange oxyde de manoyle **1.33** / oxyde de 13-*épi*-manoyle **1.34** ; ils ont mis en évidence une légère activité inhibitrice de ces deux isomères sur la croissance de différentes lignées cellulaires.

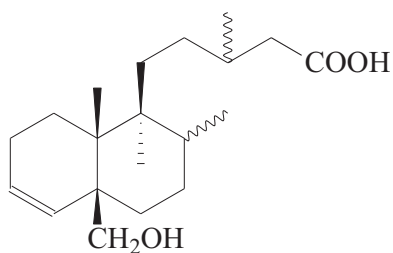
Figure 6 : composés identifiés dans *Cistus monspelliensis*



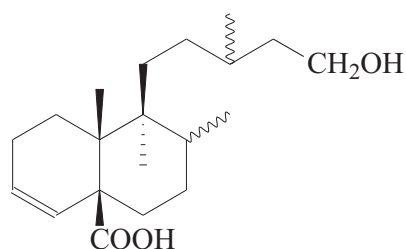
**1.26** : cistodiol



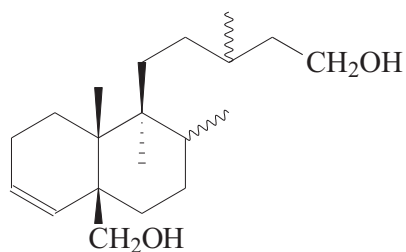
**1.27** : acide cistodioïque



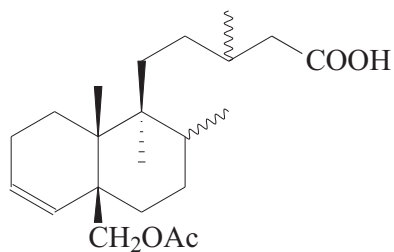
**1.28** : acide  
18-hydroxyciste-3(4)-èn-15-oïque



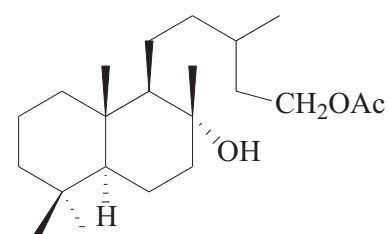
**1.29** : acide  
15-hydroxyciste-3(4)-èn-18-oïque



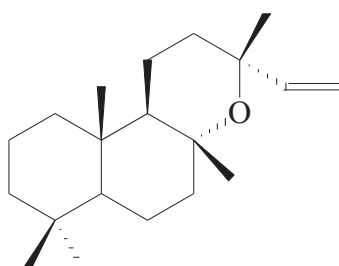
**1.30** : ciste-3(4)-èn-15,18-diol



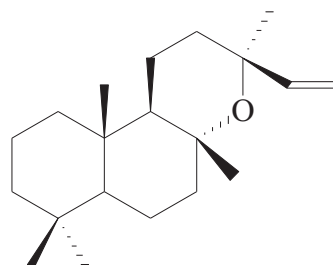
**1.31** : acide  
18-acétoxciste-3(4)-èn-15-oïque



**1.32** : 15-acétoxcylabdan-8α-ol



**1.33** : oxyde de manoyle



**1.34** : oxyde de 13-épi-manoyle

- *Cistus creticus*

Les huiles essentielles et les extraits obtenus à partir de *Cistus creticus* de Grèce et de son labdanum ont été principalement étudiés par Demetzos et coll. (207-212) qui ont identifié plusieurs constituants par CPG et CPG/SM.

En 1994, dans les huiles essentielles obtenues à partir de la résine labdanum, Demetzos et coll. (207) ont identifié 52 composés représentant 97,4% de la composition chimique totale. Les composés majoritaires sont l'oxyde de manoyle (12,1%), l'oxyde de 13-*épi*-manoyle (19,8%) et l' $\alpha$ -pinène (10,3%). Il ont également mis en évidence la présence d'un sesquiterpène à squelette drimane, le drima-7,9(11)-diène (16,1%) **1.35** (figure 7). Plus récemment (208), ils y ont mis en évidence la présence de trois diterpènes à squelette labdane : le sclaréol **1.36**, le *ent*-3- $\beta$ -hydroxy oxyde de 13-*épi*-manoyle **1.37** et le *ent*-3- $\beta$ -acétoxy oxyde de 13-*épi*-manoyle **1.38** (figure 7). Ils ont également étudié l'activité antimicrobienne de différentes fractions de cette même huile essentielle obtenues par chromatographie sur colonne ouverte et celle de produits purifiés (**1.33**, **1.34**, **1.35-1.38**).

En 1995 (209), dans les huiles essentielles préparées à partir du végétal, ils ont identifié 49 composés représentant 76,6% de la composition chimique totale dont deux composés majoritaires: l'oxyde de manoyle **1.33** (19,6%) et l'oxyde 13-*épi*-manoyle **1.34** (13,4%). Ils ont également mis en évidence une activité antimicrobienne sur des bactéries gram positive.

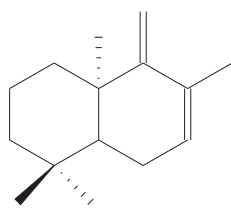
Les huiles essentielles préparées à partir de *Cistus creticus* sous-espèce *creticus* sont dominées par des diterpènes à squelette labdane (oxyde de manoyle **1.33** et oxyde de 13-*épi*-manoyle **1.34**) alors que celles obtenues à partir la sous-espèce *eriocephalus* sont dominées par des sesquiterpènes hydrocarbonés ( $\delta$ -cadinène,  $\alpha$ -cadinène et  $\alpha$ -copaène) et par des sesquiterpènes oxygénés (bulnesol, viridiflorol et lédol) (210).



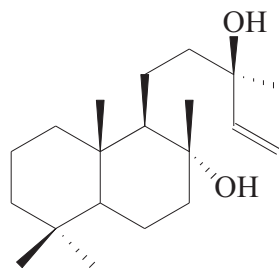
En 1999 (211), ces mêmes auteurs ont poursuivi cette étude en analysant les diterpènes à squelette labdane contenus dans les huiles essentielles et les extraits à l'hexane des fruits, des feuilles et du labdanum de ces deux sous-espèces et ils ont étudié l'activité antimicrobienne de ces différents mélanges. Ils ont ainsi identifié et quantifié neuf labdanes : le *ent*-3- $\beta$ -hydroxy oxyde de 13-*épi*-manoyle **1.37**, le *ent*-3- $\beta$ -acétoxy oxyde de 13-*épi*-manoyle **1.38**, l'*ent*-oxyde de manoyle **1.39**, l'*ent*-oxyde de 13-*épi*-manoyle **1.40**, l'*ent*-oxyde de 8-*épi*-manoyle **1.41**, le labd-13(E)-ène-8 $\alpha$ -15-diol **1.42**, le labda-7,13(E)-dièn-15-ol **1.43**, 15-acétoxy labd-13(E)-èn-8 $\alpha$ -ol **1.44** et l'acétate de labda-7,13(E)-dièn-15-yle **1.45** (figure 7).

Enfin en 2002 (212), toujours par GPG et CPG/SM, ils ont étudié les compositions chimiques des huiles essentielles de 35 populations de *Cistus creticus* de Crète. 142 composés ont ainsi été identifiés représentant entre 56,8 et 89,8% de la composition chimique des échantillons. Les huiles essentielles sont caractérisées par la présence de diterpènes en proportion importante, principalement des composés à squelette labdane. Les proportions en oxyde de manoyle **1.33** (présent dans les 35 populations) varient de 0,9% à 20,4%, celles en oxyde de 13-*épi*-manoyle **1.34** (35 populations) de 2,5% à 36,8%, celles en 3- $\beta$ -acétoxy oxyde de manoyle (23 populations) de 0,4% à 12,8% et celles en labda-7,13-dien-15-ol (20 populations) de 0,6% à 5,1%. Ils ont mis en évidence l'existence de deux chimiotypes se différenciant par l'abondance en diterpènes à squelette labdane.

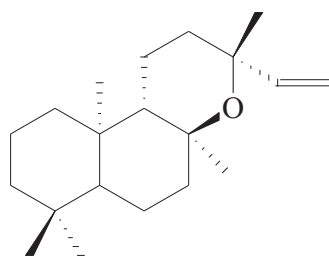
Figure 7 : composés identifiés dans *Cistus creticus*



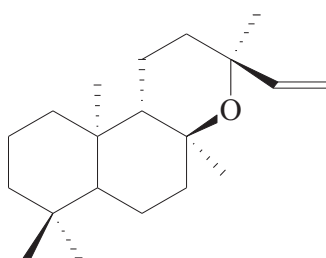
1.35 : drima-7,9(11)-diène



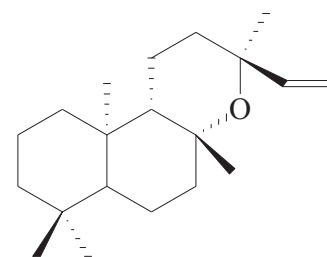
1.36 : sclaréol



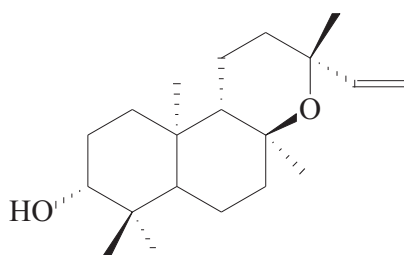
1.37 : *ent*-oxyde de 13-épi-manoyle



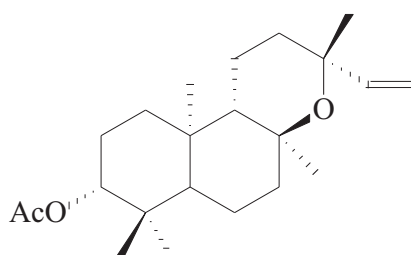
1.38 : *ent*-oxyde de manoyle



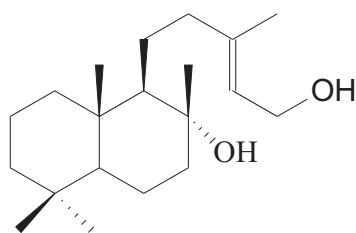
1.39 : *ent*-oxyde de 8-épi-manoyle



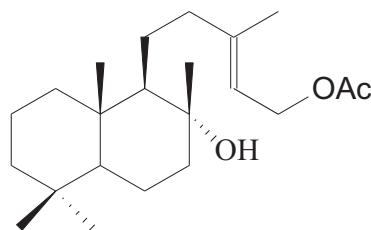
1.40 : *ent*-3- $\beta$ -hydroxy oxyde de 13-épi-manoyle



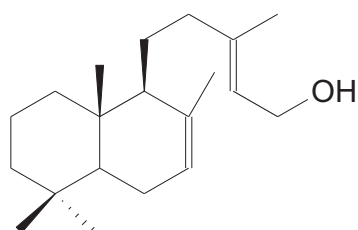
1.41 : *ent*-3- $\beta$ -acétoxy oxyde de 13-épi-manoyle



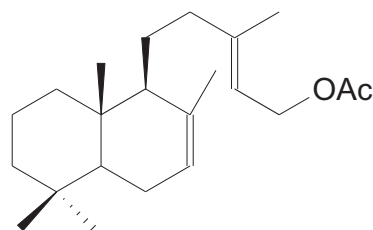
1.42 : labd-13(E)-ène-8 $\alpha$ -15-diol



1.43 : 15-acétoxy labd-13(E)-èn-8 $\alpha$ -ol



1.44 : labda-7,13(E)-dièn-15-ol

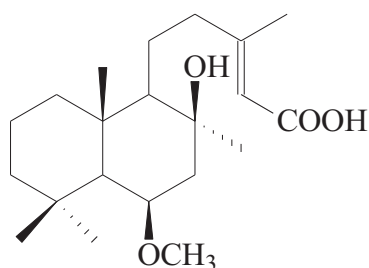


1.45 : acétate de labda-7,13(E)-dièn-15-yle

- *Cistus laurifolius*

Les études effectuées sur les extraits au solvant de *Cistus laurifolius* ont permis d'identifier un acide diterpénique de la famille des labdanes comme composé majoritaire : l'acide acétyl-laurifolique **1.46** (213) (figure 8) et des flavonoides (214) tels le 5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavone, le jaranol **1.11** et la genkwanine **1.14** (composés qui ont été également identifiés dans *Cistus ladaniferus*).

Figure 8 : structure de l'acide acétyl-laurifolique identifié dans *Cistus laurifolius*



**1.46** : acide acétyl-laurifolique

A notre connaissance, une seule étude récente a été menée sur l'huile essentielle de *Cistus laurifolius* de Turquie (215) et un seul composé majoritaire le bornéol (6,1%) a pu être identifié.

- Autres espèces du genre *Cistus*

D'autres études sur les huiles essentielles de diverses espèces du genre *Cistus* ont été menées par différents auteurs. En 1984, Gülz et coll. (203) ont étudié les terpènes hydrocarbonés présents dans les huiles essentielles de *Cistus palhinae* et ont comparé les résultats obtenus avec ceux de trois autres espèces du genre *Cistus* (*C. ladaniferus*, *C. laurifolius*, *C. monspeliensis*).

Demetzos et coll. (216) ont étudié, en 1989, la composition chimique de l'huile essentielle de *Cistus parviflorus* de Grèce et ont comparé son activité antimicrobienne avec celle de *Cistus monspeliensis*. Ils ont mis en évidence la présence de 55 composés représentant environ 90% de l'huile essentielle, 48 composés ont été identifiés par CPG et CPG/SM dont 37,8% de labdanes diterpéniques et 37,2% de composés sesquiterpéniques (hydrocarbonés et alcools). Enfin, en 1989, ces mêmes auteurs (217) ont réalisé une étude comparative entre les huiles essentielles de *Cistus creticus* et celles de cinq autres espèces de Ciste (*C. ladaniferus*, *C. laurifolius*, *C. palhinae*, *C. monspeliensis* et *C. laurifolius*).

Parmi les travaux les plus récents, on peut citer ceux menés en CPG et en CPG/SM par Demetzos et coll. sur les huiles essentielles de *Cistus salviifolius* (218) et *Cistus parviflorus* (219). Ces auteurs ont effectué une étude comparative des compositions chimiques des huiles essentielles obtenues à partir de plusieurs populations de ces deux espèces de Ciste.

Dans les huiles essentielles de *Cistus salviifolius* de Crète (218), ils ont identifié 167 composés représentant entre 96 et 100% de la composition chimique totale. Elles sont dominées par les sesquiterpènes oxygénés et les principaux constituants sont le camphre, le viridiflorol, le longibornéol, le phyllocladène, l'abiétatriène et le *cis*-ferruginol. Ils ont également différencié trois chimiotypes et étudié l'activité antimicrobienne des différentes huiles essentielles sur des bactéries gram positive et négative.

Dans l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Cistus parviflorus* de Crète (219), les auteurs ont évoqué l'existence de deux chimiotypes après l'analyse de neuf échantillons et l'identification de 114 composés représentant entre 85 et 96% de la composition chimique totale. Les sesquiterpènes et diterpènes oxygénés sont les groupes de composés les plus abondantes ; les composés majoritaires sont le carvacrol (0-23%), l'oxyde de caryophyllène (2-11%), l' $\alpha$ -*épi*-cadinol (2-7%), l'abiétatriène (0,2-4,2%), le 4-*épi*-déhydroabiétole (0-4,8%), le déhydroabiétole (0-10%), le *cis*-ferruginol (0,4-4,6%), le 13-*épi*-oxyde de manoyle **1.34** (0,6-5,9%) et l'oxyde de manoyle **1.33** (0,9-5%).

- *Cistus albidus*

En ce qui concerne *Cistus albidus*, espèce servant de substrat au présent travail de thèse, très peu d'études chimiques ont été réalisées sur son huile essentielle. A notre connaissance, la première étude sur *Cistus albidus* d'Espagne a été réalisée par De Pascual Teresa et coll. en 1978 (220). Ils ont analysé un extrait à l'hexane et y ont trouvé :

- une fraction acide (15%), constituée par des acides gras et par l'acide labdanolique **1.1** ;

- une fraction phénolique (0,6%), constituée de flavonoïdes dont la plupart ont également été identifiés dans les autres espèces de cistes : jaranol **11**, 3-méthylkampférol, genkwanine **1.14** et naringénine (5,7,4'-trihydroxyflavanone) ;

- une fraction neutre (une cire, 84%) constituée de composés triterpéniques non identifiés (présents en faible quantité), d'acides gras et d'alcools tels le  $\beta$ -sitostérol, le dammarénodiol II **1.47**, le diptérocarpol **1.48**, l'ocotillol II **1.49**, le fouquierol **1.50** ou encore l'isofouquierol **1.51** (figure 9).

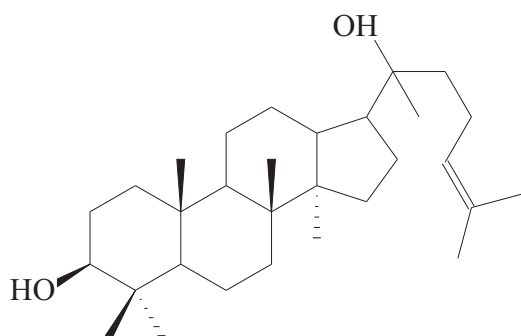
En 1998 et 2000, Llusia et Peñuelas (221-223) ont constaté que *Cistus albidus* émettait un pourcentage important de composés organiques volatils dont les deux plus abondants sont le (E)- $\beta$ -caryophyllène et le limonène suivis du 2- $\delta$ -carène et du  $\beta$ -pinène. Ils ont également constaté que les taux d'émission étaient beaucoup plus importants en automne qu'au printemps.

En 1998, Robles et coll. (224, 225) ont conduit une étude comparative des huiles essentielles de *Cistus albidus* en fonction du lieu de pousse (sol calcaire ou sol siliceux) et il semblerait que la nature du sol soit, au niveau qualitatif, sans influence sur la composition chimique. En effet, ces auteurs identifient quatorze constituants par CPG et CPG/SM et dans les deux cas, les composés majoritaires sont : l' $\alpha$ -zingibérène, le  $\delta$ -cadinène et l' $\alpha$ -curcumène. Toutefois, les plantes poussant sur sols calcaires sont plus riches en allo-aromadendrène et (E)- $\beta$ -caryophyllène et plus pauvres en  $\alpha$ -zingibérène que les plantes poussant sur des sols siliceux.

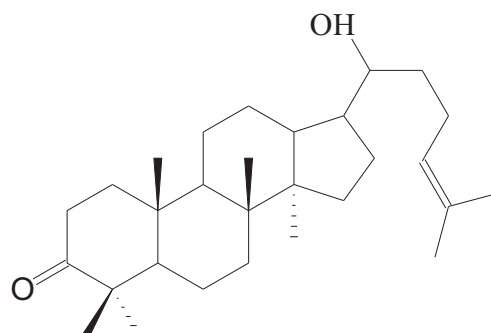
En 1999, ces mêmes chercheurs (226) ont mesuré les potentialités allélopathiques (toxicité envers les autres plantes) de *Cistus albidus* sur *Lactuca sativa* et les potentialités autotoxiques. Ils ont conclu que l'huile essentielle possède une influence faible sur la germination mais, même en faible quantité, elle augmente de façon significative la proportion de plantules non viables et inhibe la croissance des plantules normales.

En 2005, Palá-Paúl et coll. (227) ont étudié les variations saisonnières de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles (récoltées en hiver et au printemps) et de fleurs (récoltées au printemps) de *Cistus albidus* d'Espagne. Par CPG/Ir et CPG/SM, ils identifient 38 constituants représentant respectivement entre 62 et 66% des compositions chimiques de ces huiles essentielles. Les auteurs n'ont pas noté de variation saisonnière significative ; aussi bien en hiver qu'au printemps, les constituants majoritaires des huiles essentielles de feuilles sont l' $\alpha$ -zingibérène, l'aromadendrène, l' $\alpha$ -curcumène et le guaiol alors que ceux de l'huile essentielle de fleurs sont l' $\alpha$ -cadinol, l' $\alpha$ -zingibérène et le  $\delta$ -cadinène. Pour expliquer la présence importante d' $\alpha$ -cadinol dans les huiles de fleurs, ces auteurs supposent que l' $\alpha$ -cadinol facilite la pollinisation et qu'il est impliqué dans les mécanismes allélopathiques.

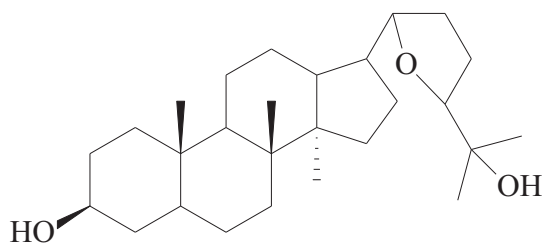
Figure 9 : composés identifiés dans *Cistus albidus*



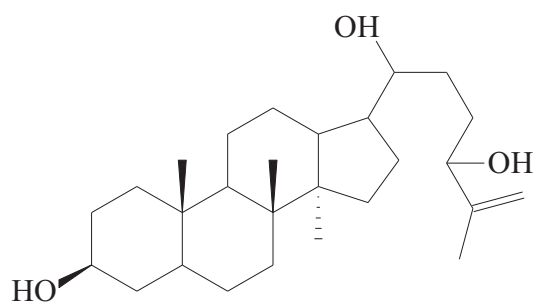
1.47 : dammarénodiol II



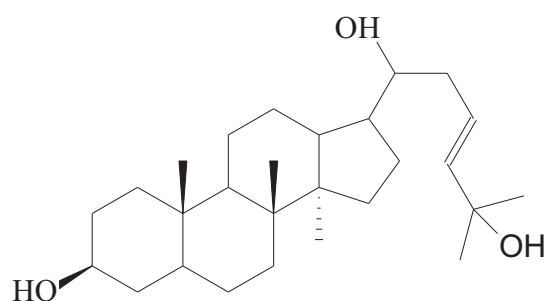
1.48 : diptérocarpol



1.49 : ocotillol II



1.50 : fouquierol



1.51 : isofouquierol

## II- ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CISTUS ALBIDUS*

L'huile essentielle de *Cistus albidus* nous a été fournie par le professeur Jacques Kaloustian, du laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie de Marseille (Université de la Méditerranée) dans le cadre d'une collaboration visant à conjuguer les apports de l'analyse thermique et de la chimie analytique pour l'étude de la dégradation thermique des végétaux.

En préalable à une étude, menée par d'autres membres de notre équipe, sur la dégradation thermique du végétal, il nous a paru intéressant d'étudier la composition chimique de son huile essentielle pour la raison que celle-ci est à ce jour très peu décrite et que notre laboratoire a déjà étudié des huiles essentielles de divers Cistes. Les cistes sont des plantes particulièrement intéressantes car, comme nous l'avons vu précédemment, leurs huiles essentielles sont souvent complexes et possèdent une richesse importante en composés sesquiterpéniques. Enfin, nous pouvons ainsi connaître les principaux composés volatils que le végétal est susceptible de dégager en cas d'échauffement, et qui sont plus aisément quantifiables lors de l'analyse de l'huile essentielle.

Le matériel végétal a été récolté au mois de janvier 2003 en Provence, l'huile essentielle a été préparée par hydrodistillation, durant 5 heures, des parties aériennes du végétal à l'aide d'un appareil de type Clevenger et le rendement moyen calculé en fonction de la masse de végétal frais est de 0,07%.

Pour l'analyse de l'huile essentielle de *Cistus albidus* et de ses fractions, nous avons mis en oeuvre les méthodes chromatographiques conventionnelles (CPG/Ir et CPG/SM) ; pour certaines fractions nous avons eu recours, en parallèle, à la RMN du carbone-13 des mélanges.



## 1- Analyse de l'huile essentielle avant fractionnement

L'analyse de l'huile essentielle des parties aériennes de *Cistus albidus* par CPG/Ir et CPG/SM-IE nous a permis d'identifier 12 constituants représentant 53,5% de la composition chimique : 8 composés hydrocarbonés et 4 composés oxygénés (tableau 1). Cette première analyse met en évidence une composition plus riche en composés sesquiterpéniques hydrocarbonés (38,8%) qu'en composés oxygénés (14,7%).

Les composés hydrocarbonés majoritaires sont l' $\alpha$ -zingibérène (12,8%), l' $\alpha$ -curcumène (7,7%) et le (E)- $\beta$ -caryophyllène (5,9%) tandis que l'allo-aromadendrène, le germacrène D et le  $\delta$ -cadinène sont présents avec des teneurs d'environ 3%.

Parmi les composés oxygénés, l' $\alpha$ -cadinol est le composé principal avec une teneur de 5,4% ; on trouve également l' $\alpha$ -bisabolol (4,1%), l'oxyde de caryophyllène (3,8%) et la shyobunone (cétone sesquiterpénique peu commune, présente avec une abondance de 1,4%).

L'huile essentielle de *Cistus albidus* est complexe ; plus d'une centaine de constituants sont repérés sur le chromatogramme, ils sont présents en faible proportion où à l'état de trace et nombre d'entre eux coéluent (figure 10). Face à cette complexité, nous avons poursuivi l'étude de l'huile essentielle par un fractionnement sur colonne de silice afin d'obtenir des mélanges plus simples à analyser et un taux d'identification plus important.

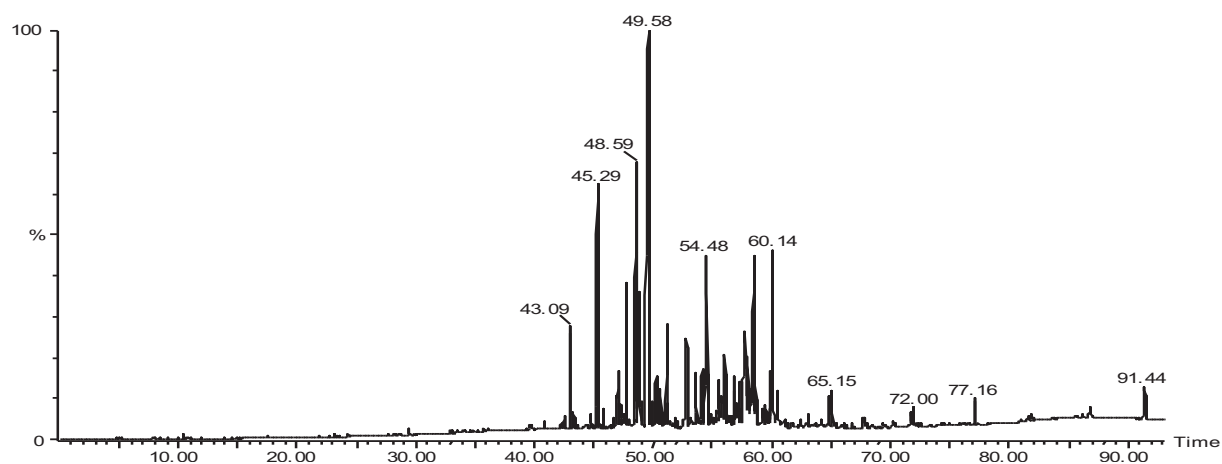
Tableau 1 : composition chimique de l'huile essentielle de *Cistus albidus*

Composés	Ir <i>a</i>	Ir <i>p</i>	%
$\beta$ -bourbonène	1388	1519	1,9
(E)- $\beta$ -caryophyllène	1419	1593	5,9
<i>allo</i> -aromadendrène	1451	1631	3,4
$\alpha$ -curcumène	1467	1763	7,7
germacrène-D	1477	1701	3,1
$\alpha$ -zingibérène	1488	1714	12,8
shyobunone	1503	1890	1,4
$\gamma$ -cadinène	1507	1748	0,6
$\delta$ -cadinène	1516	1748	3,4
oxyde de caryophyllène	1575	1960	3,8
$\alpha$ -cadinol	1643	2218	5,4
$\alpha$ -bisabolol	1665	2199	4,1
<b>Total</b>			<b>53,5</b>

**Ir** : indices de rétention sur colonne apolaire (*a*) et sur colonne polaire (*p*)

**%** : abondance relative des composés mesurée sur colonne apolaire

Figure 10 : chromatogramme de l'huile essentielle de *Cistus albidus* obtenu sur colonne apolaire



## 2- Fractionnement de l'huile essentielle

- *Chromatographie sur colonne ouverte de silice de forte granulométrie :*

4,5 g de l'huile essentielle de *Cistus albidus* ont été soumis à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte de silice de forte granulométrie (chromatographie flash : SiO<sub>2</sub>, ICN 200-500 µm, 60A) (figure 11).

Par élution au pentane on obtient une fraction F1 contenant les composés hydrocarbonés (1993mg).

En utilisant comme éluant un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité 95/5, 90/10 et 0/100 on obtient respectivement 3 fractions contenant les composés oxygénés F2 (604mg), F3 (977mg) et F4 (901mg).

Ces quatre fractions ont été étudiées par CPG/Ir et CPG/SM. Les résultats sont présentés dans les paragraphes 3 et 4.

- *Chromatographie sur colonne ouverte de silice de faible granulométrie :*

Les 4 fractions précédentes ont été chromatographiées sur colonne de silice de faible granulométrie (chromatographie fine : SiO<sub>2</sub>, ICN 63-200 µm, 60A).

Nous avons recueilli 11 fractions pour les composés hydrocarbonés (F1.1 à F1.11) et 27 fractions pour les composés oxygénés (F2.1 à F2.6, F3.1 à F3.11, F4.1 à F4.10).

L'ensemble des fractions a été étudié par CPG/Ir et CPG/SM et certaines d'entre elles, choisies en fonction de leur profil chromatographique, ont également été analysées par RMN du carbone-13. Les résultats sont présentés dans les paragraphes 3 et 4.

Figure 11 : fractionnement de l'huile essentielle de *Cistus albidus*

**Huile essentielle (4,5 g)**

**Flash** : ICN (200-500 µm), 60 A

PE/ Et <sub>2</sub> O : 100/0	PE/ Et <sub>2</sub> O : 95/5	PE/ Et <sub>2</sub> O : 90/10	PE/ Et <sub>2</sub> O : 0/100
<b>F1</b> (1993 mg)  <b>Fine</b> : ICN (63-200 µm), 60 A, AgNO <sub>3</sub> , PE/ Et <sub>2</sub> O : 100/0  <b>F1.1</b> (233 mg) <b>F1.2</b> (208 mg) <b>F1.3</b> (284 mg) <b>F1.4</b> (265 mg) <b>F1.5</b> (209 mg) <b>F1.6</b> (139 mg) <b>F1.7</b> (128 mg) <b>F1.8</b> (180 mg) <b>F1.9</b> (133 mg) <b>F1.10</b> (161 mg) <b>F1.11</b> (41mg)	<b>F2</b> (604 mg)  <b>Fine</b> : ICN (63-200 µm), 60 A PE/ Et <sub>2</sub> O : 99/1 ; 95/5  <b>F2.1</b> (155 mg) <b>F2.2</b> (88 mg) <b>F2.3</b> (104 mg) <b>F2.4</b> (77 mg) <b>F2.5</b> (95 mg) <b>F2.6</b> (66 mg)	<b>F3</b> (977 mg)  <b>Fine</b> : ICN(63-200 µm), 60 A PE/ Et <sub>2</sub> O : 94/6 ; 90/10  <b>F3.1</b> (83 mg) <b>F3.2</b> (81 mg) <b>F3.3</b> (89 mg) <b>F3.4</b> (88 mg) <b>F3.5</b> (99 mg) <b>F3.6</b> (92 mg) <b>F3.7</b> (94 mg) <b>F3.8</b> (107 mg) <b>F3.9</b> (75 mg) <b>F3.10</b> (101 mg) <b>F3.11</b> (34 mg)	<b>F4</b> (901 mg)  <b>Fine</b> : Si gel 63-200 µm, 60 A PE/ Et <sub>2</sub> O : 89/11 ; 100/0  <b>F4.1</b> (56 mg) <b>F4.2</b> (107 mg) <b>F4.3</b> (102 mg) <b>F4.4</b> (104 mg) <b>F4.5</b> (81 mg) <b>F4.6</b> (100 mg) <b>F4.7</b> (85 mg) <b>F4.8</b> (88 mg) <b>F4.9</b> (52 mg) <b>F4.10</b> (93 mg)

### 3- Etude des fractions hydrocarbonées

1,993 g de la fraction F1 ont été fractionnés sur colonne de silice imprégnée de nitrate d'argent (20%). L'élution au pentane a permis de recueillir 11 nouvelles fractions (F1.1 à F1.11) qui ont été analysées par CPG/Ir et CPG/SM, certaines d'entre elles ont été analysées par RMN du carbone-13. Les composés identifiés dans les différentes fractions hydrocarbonées de l'huile essentielle de *Cistus albidus* sont présentés dans le tableau 2.

➤ Par rapport à l'analyse de l'huile essentielle avant fractionnement, 25 composés supplémentaires ont été identifiés. Au total, ce sont, donc, 33 composés représentant 97% de la composition chimique globale de la fraction hydrocarbonée qui ont été identifiés. Sur ces 33 constituants hydrocarbonés :

- 27 composés (calligraphiés en police usuelle) ont été identifiés par comparaison des indices de rétention et des spectres de masse expérimentaux avec ceux d'échantillons authentiques contenus dans nos bibliothèques propres. L'utilisation de la RMN du carbone-13 des mélanges a permis de confirmer l'identification de 19 de ces composés (calligraphiés en police usuelle et en gras).

- Les structures des 6 composés restants, absents des bibliothèques du laboratoire, ont été proposées par les bibliothèques commerciales d'indices de rétention et de spectres de masse (calligraphiés en italique). Il s'agit du 1,5-di-*épi*-bourbonène, du *cis*- $\alpha$ -bergamotène, de l'isogermacrène D, du muurolo-4,11-diène, de l' $\alpha$ -cadinène et de l' $\alpha$ -corocalène. Parmi ces composés, l'identification de l'isogermacrène D et du *cis*- $\alpha$ -bergamotène a été confirmée en utilisant la RMN du carbone-13 des mélanges par comparaison des raies de résonance des carbones de chaque molécule avec celles présentes dans la bibliothèque König-Joulain (18) (calligraphiés en italique et en gras). Les données spectrales et la structure de ces deux composés sont rapportées à la figure 12.

Tableau 2 : composés identifiés dans les fractions hydrocarbonées de type F1 de l'huile essentielle de *Cistus albidus*

<i>Masse (mg)</i>	<b>1993</b>	<b>233</b>	<b>208</b>	<b>284</b>	<b>265</b>	<b>209</b>	<b>139</b>	<b>128</b>	<b>180</b>	<b>133</b>	<b>161</b>	<b>41</b>		
<b>Composés</b>	<b>Ir a</b>	<b>Ir p</b>	<b>F1</b>	<b>F1.1*</b>	<b>F1.2*</b>	<b>F1.3*</b>	<b>F1.4*</b>	<b>F1.5*</b>	<b>F1.6</b>	<b>F1.7*</b>	<b>F1.8</b>	<b>F1.9</b>	<b>F1.10</b>	<b>F1.11*</b>
$\alpha$ -cubébène	1350	1460	0,3	1,6	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -copaène	1377	1496	0,5	3,4	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -élémane	1387	1579	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5
$\beta$ -bourbonène	1388	1519	4,1	24,0	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>1,5-di-épi-bourbonène</i> ( $\alpha$ ou $\beta$ )	1391	1512	0,5	2,3	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -gurjunène	1411	1525	0,6	4,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cis-<math>\alpha</math>-bergamotène</i>	1411	1564	0,4	-	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -yanglène	1418	1568	0,1	3,2	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)- $\beta$ -caryophyllène	1419	1593	13,1	-	7,9	41,9	20,1	12,3	9,3	5,6	3,2	1,3	-	-
$\beta$ -copaène	1426	1585	0,8	4,6	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aromadendrène	1436	1599	1,0	-	-	-	0,2	0,7	0,8	0,5	-	-	-	-
<i>isogermacrène D</i>	1442	1665	0,4	-	1,9	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
allo-aromadendrène	1451	1631	7,2	23,0	31,7	3,0	2,3	2,1	2,0	1,9	-	-	-	-
$\alpha$ -humulène	1451	1661	1,5	-	-	-	-	-	-	7,7	4,4	1,9	1,8	0,5
<i>muurola-4,11-diène</i>	1457	1645	0,5	-	2,2	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -curcumène	1467	1763	16,7	-	-	3,0	7,2	18,6	27,3	30,0	77,5	86,7	66,8	60,3
germacrène D	1477	1701	6,4	-	-	-	5,0	11,6	9,9	6,5	1,6	-	-	-
$\alpha$ -zingibérène	1488	1714	27,1	-	-	6,5	38,9	19,8	9,3	8,0	3,9	3,4	2,5	1,5
$\alpha$ -muurolène	1494	1716	1,2	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-
bicyclogermacrène	1494	1724	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5
$\gamma$ -cadinène	1507	1748	1,6	-	1,8	5,5	2,3	1,5	1,3	1,1	-	-	-	-
calamenène (cis et/ou trans)	1511	1818	0,1	-	-	-	-	-	1,6	1,0	-	-	-	-
$\delta$ -cadinène	1516	1748	6,9	-	13,5	15,3	7,9	4,7	1,9	1,2	-	-	-	-

Composés	Ir	a	Ir	p	F1	F1.1*	F1.2*	F1.3*	F1.4*	F1.5*	F1.6	F1.7*	F1.8	F1.9	F1.10	F1.11*
<b>β-sesquiphellandréne</b>	1516	1761	0,3	-	-	-	-	-	3,3	2,9	1,8	-	-	-	-	-
cadina-1,4-diène	1527	1769	0,2	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>α-cadinène</i>	1531	1779	0,4	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>α-calacorène</b>	1539	1894	0,3	-	-	-	-	-	-	-	1,2	3,4	-	-	-	-
β-calacorène	1548	1996	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
<i>α-corocalène</i>	1605	2037	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3
cadalène	1658	2191	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7
<b>géranyle para-cymène</b>	1898	2219	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4	6,2
<b>géranyle α-terpinène</b>	1902	2142	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5
<b>tricosane</b>	2300	2300	1,3	6,9	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>			<b>97,0</b>	<b>73,4</b>	<b>74,0</b>	<b>81,7</b>	<b>87,2</b>	<b>74,2</b>	<b>66,4</b>	<b>67,5</b>	<b>90,6</b>	<b>93,3</b>	<b>74,5</b>	<b>81,0</b>		

Les composés écrits en police usuelle sont présents dans nos bibliothèques propres d'Ir et de SM

Les composés en *italique* ont été identifiés par comparaison avec les bibliothèques commerciales et/ou la littérature

Les composés en **gras** ont été identifiés, également, par RMN du carbone-13 des mélanges

**Ir** : Indices de rétention calculés sur colonne apolaire (**a**) et sur colonne polaire (**p**)

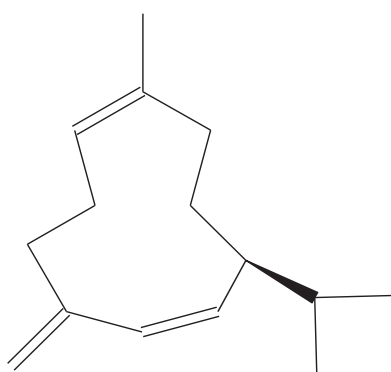
Les abondances sont données sur colonne apolaire (sauf lors de coélution : pourcentages donnés sur colonne polaire).

\* Fractions étudiées par RMN du carbone-13 des mélanges

Pour ces deux composés :

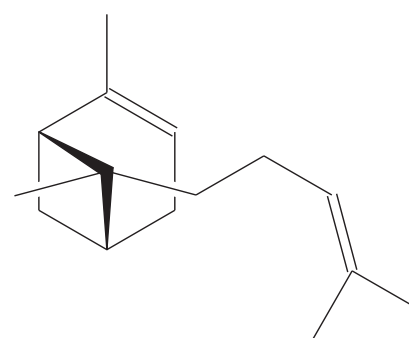
- tous les signaux des carbones décrits dans la littérature (18) ont été repérés ; 12 signaux sur 15 pour l'isogermacrène D et 15 sur 15 pour le *cis*- $\alpha$ -bergamotène.
- le nombre de superpositions de signaux, compris entre 2 et 6, ne gêne en rien la confirmation des composés, chacun d'entre eux étant identifié au minimum à partir de 50% des carbones lui appartenant en propre ;
- les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) observées entre les valeurs du mélange et celles des spectres de référence sont inférieures ou égales à 0,09 ppm pour tous les carbones observés.

Figure 12 : déplacements chimiques de l'isogermacrène D et du *cis*- $\alpha$ -bergamotène, mesurés dans la fraction F1.2 et décrits dans la littérature



isogermacrène D

$\delta$ (18)	$\delta$ F1.2 (ppm)
131,40	131,36
125,39	125,39
112,92	112,94
36,63	36,69
32,29	32,30
28,76	28,75
28,15	28,21
25,78	25,73
22,17	22,13
20,74	20,74
20,61	20,61
14,13	14,12



*cis*- $\alpha$ -bergamotène

$\delta$ (18)	$\delta$ F1.2 (ppm)
143,7	143,68
130,7	130,61
125,4	125,39
116,6	116,59
46,1	46,26
40,5	40,52
40,4	40,42
33,9	33,92
31,6	31,61
29,7	29,73
25,7	25,73
23,1 x 2	23,15 x 2
22,9	22,88
17,5	17,45



#### 4- Etude des fractions oxygénées

##### a- Etude de la fraction F2

604 mg de la fraction F2 ont été chromatographiés sur colonne de silice de fine granulométrie en utilisant un gradient pentane/oxyde de diéthyle (99/1-95/5) ; nous avons recueilli 6 fractions (F2.1 à F2.6).

➤ L'analyse de la fraction F2 et des 6 fractions résultantes par CPG/Ir, CPG/SM et RMN du carbone-13 a permis d'identifier, au total, 22 composés repris dans le tableau 3 :

- 13 composés ont été identifiés à partir de nos bibliothèques propres d'indices de rétention et de spectres de masse ; 5 d'entre eux ont été également identifiés par RMN du carbone-13 sur la base des données contenues dans les bibliothèques du laboratoire « Chimie et Biomasse ». Parmi ces 13 composés, nous relevons la présence de trois cétones sesquiterpéniques possédant un squelette élémene : la shyobunone, l'iso-shyobunone et la 6-épi-shyobunone.
- les structures des 9 autres constituants ont été proposées par la bibliothèque commerciale König-Joulain (19). La structure de la salvial-4(14)-èn-1-one a été confirmée par RMN du carbone-13 sur la base des données de la littérature. Ce composé avait été décrit, en 1983, dans une huile essentielle de *Salvia sclarea* par Maurer et Hauser (228). La structure de ce composé et la comparaison des déplacements chimiques mesurés dans la fraction F2.4 avec ceux décrits dans la littérature sont repris à la figure 13. Les signaux de tous les carbones ont été repérés, à l'exception du carbone quaternaire du groupement carbonyle. Par ailleurs, le nombre de superpositions reste limité et ce produit est donc confirmé par l'observation d'au moins 50% des carbones qui lui appartiennent en propre. Les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) des carbones du produit par rapport aux valeurs de référence sont relativement faibles, comprises entre 0,01 et 0,06 ppm dans la majorité des cas.

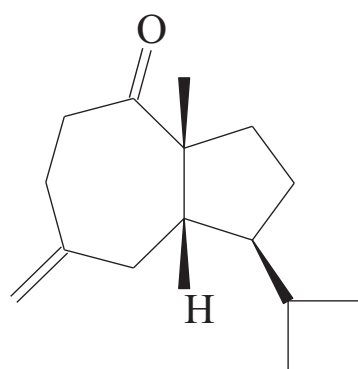
Tableau 3 : composés identifiés dans les fractions oxygénées de type F2 de l'huile essentielle de *Cistus albidus*

<i>Masse (mg)</i>	<b>604</b>	<b>155</b>	<b>88</b>	<b>104</b>	<b>77</b>	<b>95</b>	<b>66</b>
<b>Composés</b>	<b>F2</b>	<b>F2.1*</b>	<b>F2.2*</b>	<b>F2.3*</b>	<b>F2.4*</b>	<b>F2.5*</b>	<b>F2.6</b>
	<b>Ir a</b>	<b>Ir p</b>					
nonanal	1081	1395	0,2	0,2	0,5	-	-
<i>safranal</i>	1180	1705	0,2	-	0,4	-	-
décanal	1187	1496	0,1	0,1	0,2	-	-
<i>β-cyclocitral</i>	1197	1704	0,1	-	0,4	-	-
undécanal	1283	1604	0,1	0,2	0,3	-	-
acétate de néryle	1342	1727	0,2	-	0,7	-	-
dodécanal	1384	1706	0,2	0,1	0,2	-	-
<i>déhydrosesquicinéole</i>	1461	1813	0,1	0,1	0,6	-	-
<b>6-épi-shyobunone</b>	1482	1846	2,8	1,6	9,5	1,3	-
<b>shyobunone</b>	1503	1890	6,2	22,4	1,8	0,3	-
iso-shyobunone	1521	1880	0,8	-	0,2	1,4	0,2
<i>oxyde de -β- caryophyllène</i>	1543	1845	0,6	-	3,2	2,1	-
<b>oxyde de caryophyllène</b>	1575	1960	9,8	-	-	0,5	57,0
<b>salvial-4(14)-èn-1-one</b>	1584	1995	1,4	-	0,2	0,5	0,5
époxyde d'humulène II	1594	2011	0,5	-	-	-	4,7
<i>β-oplopénone</i>	1594	2051	0,7	-	-	2,5	-
<i>[1, 9]-oxyde de bisabola-2,10-diène</i>	1596	1988	0,5	-	1,2	3,5	-
<i>époxyde d'allo-aromadendrène</i>	1622	2095	0,4	-	-	0,2	1,8
<b>cubénol</b>	1631	2023	1,4	-	-	0,6	0,4
<i>ar-curcumèn-15-al</i>	1691	2229	0,3	-	0,4	1,2	-
tétradécanal	1696	2020	0,6	1,4	1,8	0,3	-
<b>oxyde de 13-épi-manoyle</b>	2018	2372	3,8	12,9	2,3	0,1	-
<b>Total</b>	<b>31,0</b>	<b>39,0</b>	<b>22,4</b>	<b>13,1</b>	<b>18,8</b>	<b>12,0</b>	<b>64,6</b>

Légende : cf. tableau 2

Dans certaines fractions, il reste dans encore un certain nombre de composés oxygénés non identifiés, qui semble être pour la plupart des cétones sesquiterpéniques présentes à des teneurs variant de 10 à 40% et dont la structure n'a pu être déterminée avec précision.

Figure 13 : déplacements chimiques de la salvial-4(14)-èn-1-one, mesurés dans la fraction F2.4 et décrits dans la littérature (228)



salvial-4(14)-èn-1-one

$\delta$ (228)	$\delta$ F2.4 (ppm)	
215,7	-	s
148,5	148,53	s
111,9	111,88	t
59,3	59,26	s
54,8	54,79	d
52,1	52,12	d
42,7	42,71	t
39,3	39,27	t
34,8	34,86	t
33,6	33,49	t
32,8	32,79	d
27,2	27,14	t
25,4	25,35	q
22,1	22,16	q
19,7	19,68	q

## b- Etude de la fraction F3

Le fractionnement sur colonne ouverte de silice de fine granulométrie de la fraction F3 (977 mg) avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (94/6-90/10) a permis de recueillir onze fractions (F3.1 à F3.11). F3 et les onze fractions résultantes ont été analysées par CPG et CPG/SM ; 6 d'entre elles ont également été analysées par RMN du carbone-13 des mélanges.

➤ Au total, 21 composés ont été identifiés (tableau 4) :

14 composés par comparaison des indices de rétention et des spectres de masse expérimentaux avec ceux contenus dans nos bibliothèques « laboratoire » (Ir et SM) ; 8 d'entre eux ont été également identifiés par RMN du carbone-13 sur la base des données contenues dans les bibliothèques du laboratoire « Chimie et Biomasse ». Par exemple, l'*épi- $\alpha$* -bisabolol a été aisément identifié par RMN du carbone-13 des mélanges dans différentes fractions. Ce composé n'est pas repéré en CPG en raison de coélutions sur colonne polaire et apolaire avec l' $\alpha$ -bisabolol et de ce que les spectres de masse des deux isomères sont superposables (122).

• 7 composés ont été identifiés à partir des bibliothèques commerciales (19, 21) ; 3 d'entre eux ont été identifiés également par RMN du carbone-13 sur la base des déplacements chimiques donnés dans la littérature et explicités à la figure 14. Il s'agit :

- du germacrène D-4-ol (Adams) (21) ou  $\beta$ -germacrénol (König-Joulain Ir a : 1571) (19) ou 4- $\beta$ -hydroxygermacra-1(10),5-diène (229) ou encore germacra-1,6-dièn-5-ol (230) . Sa présence a été confirmée par RMN du carbone-13 en comparant ses déplacements chimiques dans la fraction F3-2 avec ceux reportés par Nordin et coll. en 1999 (230).

- du 1,10-di-*épi*-cubénol (Adams) (21). Ce composé a un spectre de masse superposable à ceux de ses deux stéréoisomères, le 1-*épi*-cubénol et le cubénol

également présents dans les fractions et identifiés sur la base des bibliothèques du laboratoire. Il s'en différencie, toutefois, par ses indices de rétention. Son identification a été rendue possible grâce à son indice de rétention apolaire et la concordance des déplacements chimiques des carbones avec ceux répertoriés en 1998 par Weyerstahl et coll. (231) lors d'une étude de l'huile essentielle de racines d'*Hedychium gardnerianum*.

- du kunséol ou 6- $\beta$ -hydrogermacra-1(10),4-diène ; son identification est confirmée par les travaux de Cornwell et coll. (232) qui décrivent son spectre de masse et ses déplacements chimiques dans l'étude des extraits obtenus à partir de plantes de la famille des Myrtaceae.

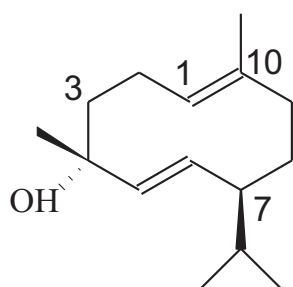
**Ainsi, ces trois constituants ont été confirmés par l'observation de tous les signaux des carbones, à l'exception de trois carbones quaternaires (un pour le 1,10-di-*épi*-cubénol et deux pour le kunséol). De surcroît, les variations de déplacements chimiques observées ( $\Delta\delta$  ppm) entre les valeurs de la fraction, dans laquelle le composé est le plus important, et celles des spectres de la littérature sont presque toujours inférieures ou égales à 0,09 ppm.**

Tableau 4 : composés identifiés dans les fractions oxygénées de type F3 de l'huile essentielle de *Cistus albidus*

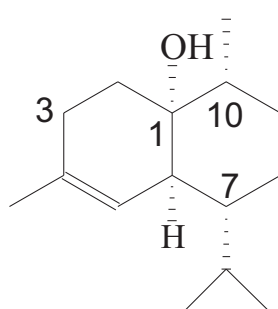
<i>Masse (mg)</i>	977	83	81	89	88	99	92	94	107	75	101	34		
<b>Composés</b>	<b>Ir a</b>	<b>Ir p</b>	<b>F3</b>	<b>F3.1</b>	<b>F3.2*</b>	<b>F3.3*</b>	<b>F3.4</b>	<b>F3.5*</b>	<b>F3.6*</b>	<b>F3.7</b>	<b>F3.8*</b>	<b>F3.9*</b>	<b>F3.10</b>	<b>F3.11</b>
terpinèn-4-ol	1161	1610	0,1	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-
<b>eugénol</b>	1332	2136	0,7	-	1,3	3,2	0,6	-	-	-	-	-	-	-
cubébol	1491	1879	0,7	-	-	-	-	-	-	0,9	1,9	1,5	0,3	0,3
4-épi-cubébol	1511	1930	0,7	-	-	-	-	-	-	0,2	1,1	2,7	3,1	3,1
<b>spathuléol</b>	1563	2103	8,2	-	-	-	-	0,3	3,2	6,6	9,3	9,9	2,9	2,9
<b>germacrène D-4-ol</b>	1573	2035	5,4	2,9	17,1	11,3	0,2	-	-	-	-	-	-	-
viridiflorol	1580	2054	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	1,2
<b>lédol</b>	1588	1997	3,5	-	-	-	-	0,7	1,4	4,3	4,4	2,7	0,9	-
époxyde d'humulène II	1594	2011	1,2	4,1	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>zingibérénol</b>	1603	2100	6,7	-	-	-	-	-	-	9,7	14,3	15,4	9,6	-
<i>guaia-6,10(14)-dièn-4β-ol</i>	1605	2132	0,7	0,2	1,1	4,2	3,1	0,3	-	-	-	-	-	-
<b>1,10-di-épi-cubénol</b>	1610	2054	0,7	0,5	2,9	1,8	0,1	-	-	-	-	-	-	-
<b>1-épi-cubénol</b>	1615	2053	1,6	1,1	1,7	7,6	4,4	0,4	-	-	-	-	-	-
<b>τ-cadinol</b>	1633	2157	5,6	-	-	0,2	5,6	12,3	13,7	11,3	5,8	2,3	1,1	0,2
<b>τ-muurolol</b>	1633	2173	7,4	-	-	-	-	-	-	10,8	18,8	22,0	23,2	2,7
<b>α-bisabolol</b>	1665	2199	24,0	-	-	-	30,7	50,1	41,2	25,5	10,6	6,5	2,1	0,9
<b>épi-α-bisabolol</b>	1667	2202												
<b>kunséol</b>	1687	2253	0,9	-	-	-	-	-	0,8	1,5	5,0	3,4	1,0	0,2
<i>curcuphénol</i>	1694	2194	0,2	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>xanthorhizol</b>	1728	2674	1,5	1,4	8,0	4,0	0,2	-	-	-	-	-	-	-
géranyle linalol	2031	2559	0,2	-	0,1	1,0	3,0	1,0	0,2	-	-	-	-	-
<b>Total</b>			<b>70,4</b>	<b>10,7</b>	<b>33,9</b>	<b>33,3</b>	<b>48,3</b>	<b>64,8</b>	<b>57,6</b>	<b>66,3</b>	<b>66,6</b>	<b>64,6</b>	<b>52,9</b>	<b>11,5</b>

Légende : cf. tableau 2

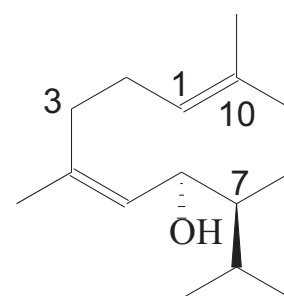
Figure 14 : déplacements chimiques du germacrène D 4-ol, du 1,10-di-*épi*-cubénol et du kunséaol mesurés dans les fractions F3.2 et F3.8 et décrits dans la littérature



germacrène D 4-ol



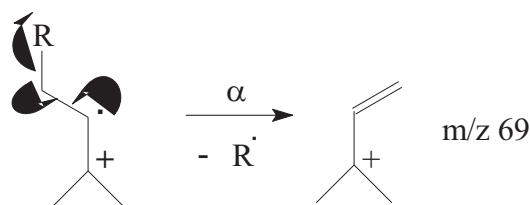
1,10-di-*épi*-cubénol



kunséaol

C	germacrène D 4-ol			1,10-di- <i>épi</i> -cubénol			kunséaol		
	$\delta$ (230)	$\delta$ F3.2 (ppm)		$\delta$ (231)	$\delta$ F3.2 (ppm)		$\delta$ (232)	$\delta$ F3.8 (ppm)	
1	128,88	128,87	d	72,20	-	s	128,7	128,70	d
2	23,67	23,68	t	27,80	27,80	t	30,3	30,36	t
3	39,62	39,61	t	31,30	31,38	t	37,2	37,12	t
4	73,12	73,12	s	133,6	133,64	s	133,3	-	s
5	140,09	140,05	d	123,3	123,56	d	133,5	133,51	d
6	125,73	125,72	d	41,7	41,80	d	68,8	68,81	d
7	52,83	52,82	d	49,0	49,09	d	52,2	52,19	d
8	25,95	25,96	t	19,0	19,11	t	24,3	24,40	t
9	41,28	41,27	t	28,5	28,53	t	41,3	41,39	t
10	132,58	132,55	s	37,1	37,14	d	138,9	-	s
11	32,99	32,99	d	27,7	27,70	d	32,1	32,13	d
12	20,60	20,62	q	23,4	23,43	q	22,1	22,10	q
13	18,96	18,97	q	13,9	13,98	q	21,3	21,42	q
14	16,70	16,72	q	16,6	16,72	q	21,0	21,10	q
15	30,69	30,73	q	21,8	21,82	q	16,5	16,47	q

De plus, le zingibérénol a été proposé par la banque König-Joulain (19), son spectre de masse présente un ion moléculaire à  $m/z$  222 ( $C_{15}H_{26}O$ ) et un pic de base à  $m/z$  69 en accord avec la présence du motif isopentenyle, selon le mécanisme de fragmentation suivant (32) :



D'autres ions abondants sont observés sur le spectre de masse, par exemple, les pics à  $m/z$  119 et à  $m/z$  93 ayant des intensités respectives d'environ 50% et 45%. Nous signalons également la présence d'un ion  $(M-H_2O)^+$  à  $m/z$  204 (10%) correspondant à la perte d'une molécule d'eau après réarrangement d'hydrogène.

Bien que présent avec une teneur de l'ordre de 15% dans les fractions F3.8 et F3.9, la structure du zingibérénol n'a pu être confirmée par RMN du carbone-13 des mélanges car les valeurs des déplacements chimiques de ses atomes de carbone ne sont pas décrites dans la littérature. Sur le spectre de RMN du carbone-13 de ces fractions, parmi les signaux non attribués, 15 raies de résonance présentant des intensités en accord avec un composé de cette importance restaient non attribuées.

Nous pouvons notamment observer la présence de 4 signaux appartenant à des carbones éthyléniques résonnant entre 133,81 et 124,73 ppm et 1 signal caractéristique d'un carbone portant un groupe hydroxyle à 68,81 ppm.

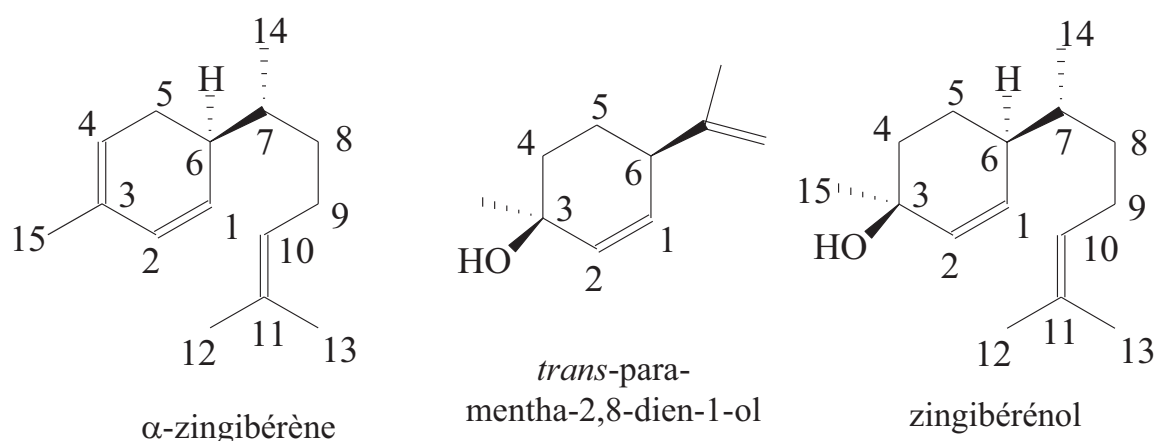
Une séquence « spin-echo » a également été réalisée pour déterminer le nombre d'hydrogènes portés par chaque atome de carbone.

La confirmation de ce composé a été réalisée par une reconstitution du spectre de RMN du carbone-13 à partir des valeurs de déplacements chimiques de deux molécules de référence présentes dans la bibliothèque du laboratoire « Chimie et Biomasse » : l' $\alpha$ -zingibérène et le trans-para-mentha-2,8-dien-1-ol (figure 15). Dans le cas de ce composé, nous avons donc repéré les valeurs des 15 carbones et le faible nombre de superpositions ne gêne en rien son identification. Les variations des déplacements chimiques observées sont inférieures ou égales à 0,6 ppm pour les signaux correspondant à la partie linéaire de la molécule, en revanche, pour la partie



cyclique les variations sont plus importantes ; elles sont comprises entre 0,2 et 1,41 ppm et même supérieures à 2 ppm pour le carbone de jonction (carbone situé entre les deux molécules de référence). Ce dernier présente souvent des variations importantes lorsqu'on effectue des reconstitutions de spectres.

Figure 15 : identification du zingibérénol par comparaison des déplacements chimiques, mesurés dans les fractions F3.8 et F3.9, avec ceux de l' $\alpha$ -zingibérène et du *trans*-*para*-mentha-2,8-dien-1-ol

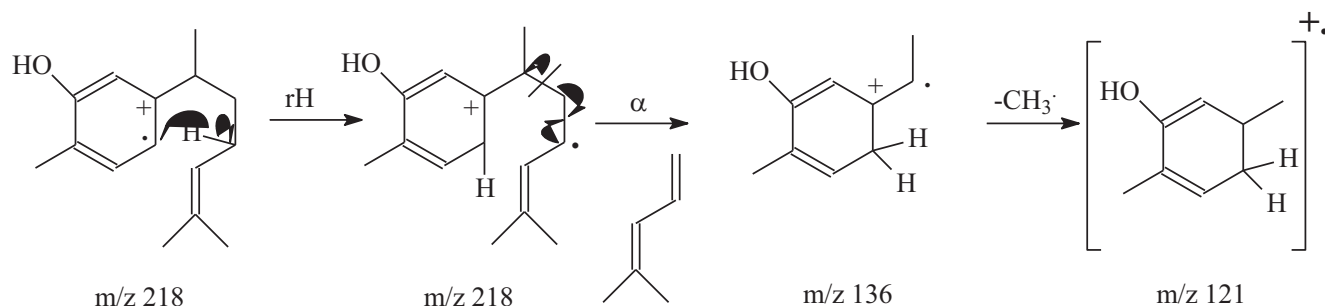


C	$\alpha$ -zingibérène	F3.8 et F3.9 (ppm)			$\Delta\delta$
		<i>trans</i> - <i>para</i> -mentha-2,8-dien-1-ol	zingibérénol		
1	127,93	131,90	133,12 *	CH	1,22
2		133,98	133,81 *	CH	0,97
3		67,40	68,81	C	1,41
4		36,66	37,45	CH <sub>2</sub>	0,21
5	24,55	24,83	23,63	CH <sub>2</sub>	1,20
6	39,13	43,40	41,15	CH	2,25
7	36,11		36,27	CH	0,16
8	34,32		33,69	CH <sub>2</sub>	0,63
9	26,01		26,07	CH <sub>2</sub>	0,06
10	124,89		124,73	CH	0,16
11	131,10		131,32	C	0,22
12	25,71		25,73	CH <sub>3</sub>	0,02
13	17,66		17,68	CH <sub>3</sub>	0,02
14	16,59		16,47	CH <sub>3</sub>	0,12
15	21,09	29,47	29,68	CH <sub>3</sub>	0,21

$\Delta\delta$  : variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence

\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C1 et C2

En outre, pour ce qui concerne le xanthorrhizol proposé par la banque König-Joulain (19), son spectre de masse présente un ion moléculaire à  $m/z$  218, un pic de base à  $m/z$  136 et un pic abondant à  $m/z$  121. Les ions à  $m/z$  136 ( $M-C_6H_{10}$ )<sup>+</sup> proviennent d'un mécanisme de réarrangement d'hydrogène (rH) suivi d'un clivage  $\alpha$ , la perte d'un méthyle à partir de ces ions conduit aux ions à  $m/z$  121 (32) :



Sur le spectre de RMN du carbone-13 de la fraction 3.2, nous observons une série de raies de résonance non attribuées (correspondant à un produit d'une teneur de l'ordre de 10%) qui semble appartenir au xanthorrhizol. Par exemple, nous observons :

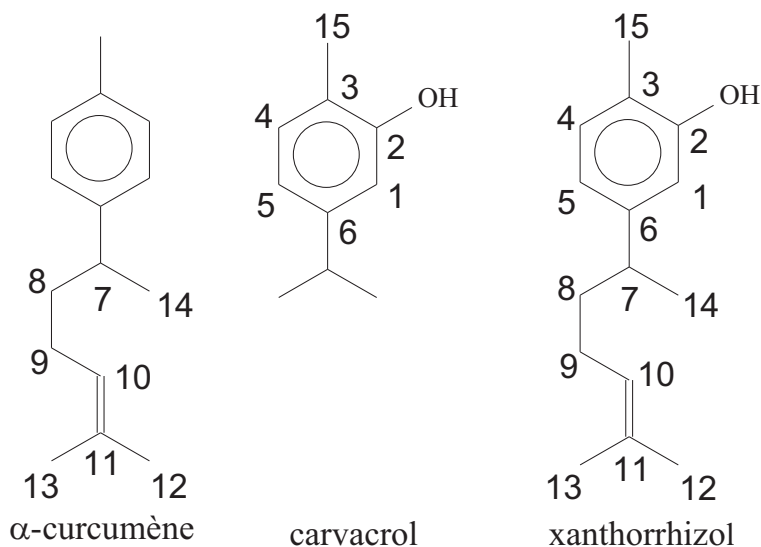
- 6 signaux entre 154,13 et 113,50 ppm, pouvant correspondre aux carbones d'un groupement phénolique bisubstitué par une fonction hydroxyle et un méthyle ;
- et deux signaux résonnant à 131,31 ppm et 124,56 ppm appartenant à deux carbones éthyléniques.

Les valeurs des déplacements chimiques du xanthorrhizol n'étant pas, à notre connaissance, rapportées dans la littérature, nous avons effectué une reconstitution de sa structure et de son spectre de RMN du carbone-13 à partir de deux molécules de référence présentes dans la bibliothèque du laboratoire « Chimie et Biomasse » : l' $\alpha$ -curcumène et le carvacrol (figure 16).

Tous les carbones ont été observés, le nombre de superpositions des signaux est très limité et les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) observées entre les valeurs du mélange et celles des spectres de référence sont inférieures à 1 ppm, à l'exception du C6 qui est le carbone de jonction entre les deux molécules de référence.

Une séquence « spin-echo » réalisée sur la fraction a permis de déterminer le nombre d'hydrogènes portés par chaque atome de carbone.

Figure 16 : identification du xanthorrhizol par comparaison des déplacements chimiques, mesurés dans la fraction F3.2, avec ceux de l' $\alpha$ -curcumène et du carvacrol



C	$\delta$ $\alpha$ -curcumène	$\delta$ carvacrol	xanthorrhizol		$\Delta\delta$
			$\delta$ F3.2 (ppm)		
1	-	113,10	113,50	CH	0,40
2	-	153,60	154,13	C	0,53
3	-	120,97	121,15	C	0,18
4	-	130,85	130,67	CH	0,18
5	-	119,81	118,94	CH	0,87
6	-	148,44	146,91	C	1,53
7	39,07	-	39,05	CH	0,02
8	38,52	-	38,42	CH <sub>2</sub>	0,10
9	26,23	-	26,17	CH <sub>2</sub>	0,06
10	124,64	-	124,56	CH	0,12
11	131,28	-	131,31	C	0,03
12	25,63	-	25,63	CH <sub>3</sub>	-
13	17,66	-	17,69	CH <sub>3</sub>	0,03
14	22,47	-	22,42	CH <sub>3</sub>	0,05
15	-	15,30	15,49	CH <sub>3</sub>	0,19

$\Delta\delta$  : variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence

### c- Etude de la fraction F4

La fraction F4 (901 mg) a également été chromatographiée sur colonne de silice de fine granulométrie en utilisant comme éluant un mélange de polarité croissante d'oxyde de diéthyle dans le pentane de 11% / 89% à 100% / 0%. La fraction F4 et les dix fractions résultantes (F4.4 à F4.10) ont été analysées par CPG et CPG/SM ; certaines d'entre elles ont été analysées également par RMN du carbone-13 des mélanges. Les composés identifiés dans les fractions oxygénées de type F4 de l'huile essentielle sont présentés dans le tableau 5.

➤ 18 composés ont été identifiés :

- 15 composés, sur la base du contenu de nos bibliothèques propres. La présence de huit d'entre eux a été également confirmée par la RMN du carbone-13 des mélanges.

- en ce qui concerne les 3 autres composés :

- le (E)-nuciférol a été identifié par comparaison de son spectre de masse et de ses indices de rétention expérimentaux avec ceux contenus dans la banque König-Joulain (19).

- les deux sesquiterpènes à squelette caryophyllane: le caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5- $\beta$ -ol (caryophylladiénol II) et le caryophylla-3,8(15)-dièn-5- $\beta$ -ol (caryophyllénol II) ont été identifiés par comparaison avec les résultats des analyses CPG et CPG/SM de Weyerstahl et coll. (233) qui ont mis en évidence ces composés dans l'huile essentielle d'*Achillea eriophora*. La présence du caryophylla-3,8(15)-dièn-5- $\beta$ -ol a été également confirmée par l'étude de la fraction F4.2 en RMN du carbone-13. Les déplacements chimiques observés dans cette fraction ont été comparés à ceux décrits par Fraga et coll. (234) qui ont isolé ce composé à partir d'un extrait à l'éthanol de *Laurus azorica* (figure 17). Ces deux sesquiterpènes ont été également partiellement décrits en 1968 par Schulte-Elte et Ohloff (235) et en 1983 par Groweiss et Kashman (236).

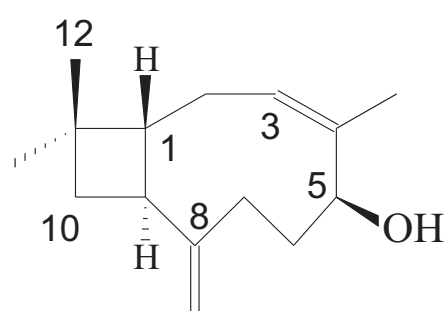
Tableau 5: composés identifiés dans les fractions oxygénées de type F4 de l'huile essentielle de *Cistus albidus*

<i>Masse (mg)</i>	<b>901</b>	<b>56</b>	<b>107</b>	<b>102</b>	<b>104</b>	<b>81</b>	<b>100</b>	<b>85</b>	<b>88</b>	<b>52</b>	<b>93</b>		
<b>Composés</b>	<b>Ir a</b>	<b>Ir p</b>	<b>F4</b>	<b>F4.1</b>	<b>F4.2*</b>	<b>F4.3*</b>	<b>F4.4*</b>	<b>F4.5</b>	<b>F4.6*</b>	<b>F4.7*</b>	<b>F4.8*</b>	<b>F4.9*</b>	<b>F4.10*</b>
(Z)-hex-3-èn-1-ol	818	1377	0,9	-	-	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	-	-
(Z)-hex-2-èn-1-ol	827	1405	0,2	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-
hexanol	834	1357	0,5	-	-	-	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	-	-
$\alpha$ -terpinéol	1172	1692	0,8	0,1	0,5	0,9	1,0	1,1	0,9	0,5	0,1	-	-
cubébol	1491	1879	0,3	0,5	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
4-épi-cubébol	1511	1930	0,4	2,3	1,3	0,5	0,2	0,1	-	-	-	-	-
<i>ar-turméról isomère</i>	1560	2184	6,3	1,0	8,9	10,4	9,2	6,7	4,8	2,0	0,5	-	-
spathuléol	1563	2103	0,4	2,5	0,7	0,2	-	-	-	-	-	-	-
<i>caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5-<math>\beta</math>-ol</i>	1624	2267	1,0	2,7	3,2	2,1	1,0	-	-	-	-	-	-
<b>caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5-<math>\alpha</math>-ol</b>	1627	2272	4,1	5,1	8,1	6,8	5,6	3,0	1,3	0,4	-	-	-
<b><math>\tau</math>-cadinol</b>	1633	2157	4,3	1,6	2,6	4,3	5,3	6,0	6,0	5,0	2,8	0,8	-
<b><math>\tau</math>-muurolol</b>	1633	2173	0,9	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math>-cadinol</b>	1643	2218	29,1	-	10,4	20,6	30,9	37,8	42,4	41,4	29,5	7,7	1,1
<i>caryophylla-3,8(15)-dièn-5-<math>\beta</math>-ol</i>	1661	2350	2,5	6,4	7,4	5,2	2,9	1,4	0,6	0,1	-	-	-
<b><math>\alpha</math>-bisabolol</b>	1665	2199	0,6	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>eudesma-4(15),7-dièn-1-<math>\beta</math>-ol</b>	1675	2333	2,2	1,3	3,0	3,6	3,6	3,2	2,4	-	-	-	-
<i>(E)-nuciférol</i>	1726	2352	0,7	-	-	0,6	0,9	1,0	0,9	0,5	-	-	-
<b>iso-calamendiol</b>	1730	2472	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	9,3
<b>acide palmitique</b>	1944	2504	2,1	-	-	1,5	0,4	1,1	0,8	0,4	0,3	0,4	-
<b>Total</b>	<b>58,7</b>	<b>30,3</b>	<b>46,3</b>	<b>56,8</b>	<b>61,4</b>	<b>61,8</b>	<b>60,7</b>	<b>50,8</b>	<b>33,5</b>	<b>10,5</b>	<b>10,4</b>		

Légende : cf. Tableau 2

L'identification par RMN du carbone-13 s'est déroulée en tenant compte des paramètres habituels, à savoir le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus, le contrôle des variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$  ppm) de chacun des carbones d'un composé et enfin le nombre de superpositions.

Figure 17 : déplacements chimiques du caryophylla-3, 8(15)-dièn-5- $\beta$ -ol (caryophyllénol II), mesurés dans la fraction F4.2 et décrits dans la littérature (234)



caryophylla-3, 8(15)-dièn-5- $\beta$ -ol  
(caryophyllénol II)

C	$\delta$ (234)	$\delta$ F4.2 (ppm)	
1	39,6	39,66	d
2	28,5	28,46	t
3	126,0	125,90	d
4	137,6	137,55	s
5	69,7	69,63	d
6	34,2	34,22	t
7	32,5	32,51	t
8	154,9	154,92	s
9	42,5	42,53	d
10	50,2	50,29	t
11	33,1	33,13	s
12	22,7	22,70	q
13	29,5	29,47	q
14	15,6	15,60	q
15	109,7	109,69	t

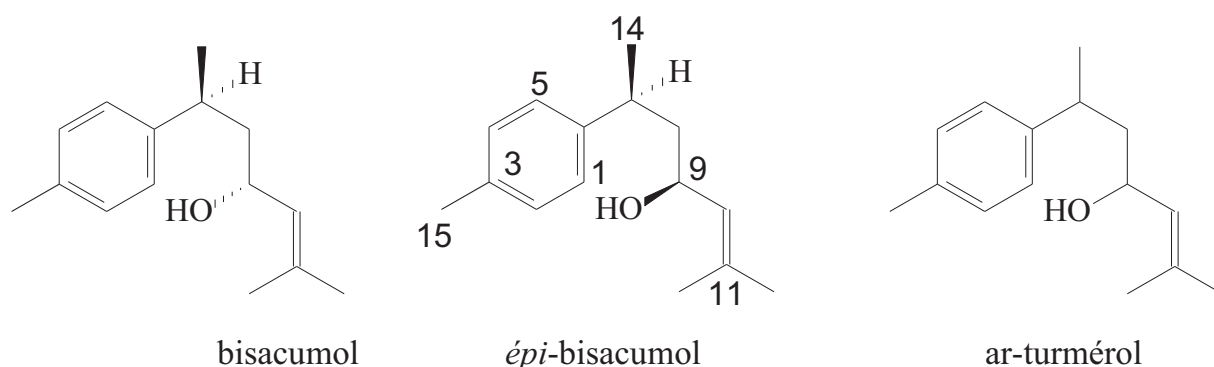
Le composé caractérisé par des indices de rétention à Ir a 1560 et Ir p 2184 est présent, sur les chromatogrammes des fractions F4.2 à F4.4, avec des abondances de l'ordre de 10%. La banque Adams (21) propose de l'identifier comme étant l'ar-turmérol. Or, ce composé (figure 18), possède 2 carbones asymétriques (C7 et C9) et admet, donc, quatre stéréoisomères :

- deux stéréoisomères pour lesquels le C7 prend la configuration absolue R (méthyle C14 en arrière) et qui, à notre connaissance, ne sont pas décrits dans la littérature ;
- deux stéréoisomères pour lesquels le C7 prend la configuration absolue S (méthyle C14 en avant) et qui ont été synthétisés par Li et coll. (237) et dénommés bisacumol et *épi*-bisacumol.

Les spectres de masse (IE) du bisacumol et de l'*épi*-bisacumol présents dans la bibliothèque König-Joulain (19) ne correspondent à aucun de ceux observés dans les fractions F4.2 à F4.4. Il est de même, pour les indices de rétention apolaires.

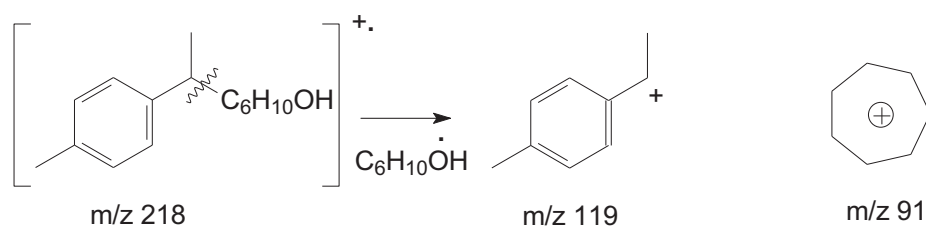
Une comparaison des déplacements chimiques des carbones de ces deux isomères et des carbones du constituant de l'huile essentielle montre une coïncidence pour les carbones du cycle aromatique C1 à C6 et des méthyles C12, C13 et C15. En revanche, pour les cinq autres carbones C8 à C11 et C14 situés à proximité du groupe hydroxyle en C9, leurs déplacements chimiques ne sont pas retrouvés dans le mélange (figure 18). La RMN du carbone-13 ne permettant pas de distinguer deux formes énantiomériques, nous sommes amenés à conclure que le constituant ne peut être l'un des quatre stéréoisomères de l'*ar*-turméról.

Figure 18 : comparaison de déplacements chimiques mesurés dans la fraction F4.3 avec ceux des bisacumols décrits dans la littérature (237)



C	$\delta$ bisacumol (237)	$\delta$ <i>épi</i> -bisacumol (237)	$\delta$ F4.3 (ppm)		$\Delta\delta$
6	143,90	144,03	144,98	C	0,95
3	135,11	135,16	135,33	C	0,17
11	133,89	133,08	?	C	-
2 et 4	128,91	128,92	128,94	CH	0,02
10	128,55	128,07	?	CH	-
1 et 5	126,79	126,72	126,88	CH	0,14
9	66,66	66,69	?	CH	-
8	45,83	45,92	?	CH <sub>2</sub>	-
7	35,71	35,93	36,35 ?	CH	0,42
12	25,51	25,65	25,72	CH <sub>3</sub>	0,07
14	22,90	22,79	?	CH <sub>3</sub>	-
15	20,61	20,62	20,75	CH <sub>3</sub>	0,13
13	17,89	18,10	17,36	CH <sub>3</sub>	0,53

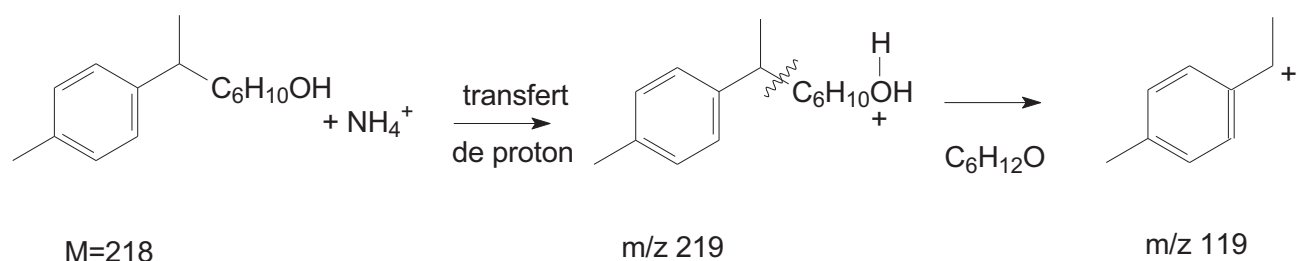
Sur le spectre de masse (IE) du composé individualisé en CPG, la détermination de la masse moléculaire n'est pas évidente en raison des très faibles intensités des pics dans la région spectrale concernée (figure 19). Nous pouvons envisager qu'il s'agisse de l'ion à  $m/z$  218 observé en très faible abondance (2%) sur le spectre de masse. Le spectre de ce constituant présente un pic de base à  $m/z$  119 ( $C_9H_{11}^+$ ) et un ion abondant  $C_7H_7^+$  à  $m/z$  91 correspondant à l'ion tropyllium (caractéristique des composés à cycle aromatique) :



Le couplage CPG/SM en ionisation chimique positive et négative avec l'ammoniac comme gaz réactif a permis de déterminer la masse moléculaire ( $M=218$ ) par l'observation des ions adduits  $[M+NH_4]^+$  à  $m/z$  236 et quasi-moléculaires  $[M+H]^+$  à  $m/z$  219,  $[M-H]^-$  à  $m/z$  217 (figure 19).

De l'examen des spectres en IC, d'autres informations structurales ont pu être tirées par l'observation de fragmentations caractéristiques reprises au tableau 6 et dans la figure 19 ;

- en ICP : perte d'un groupement  $C_6H_{12}O$  après réaction d'association (pic à  $m/z$  136) et transfert de proton (pic à  $m/z$  119). La masse de ce groupement correspond à celle d'une partie de la chaîne linéaire portant le groupe hydroxyle. Par exemple, pour la réaction de transfert de proton :



- en ICN : la perte d'une molécule d'eau après abstraction d'un hydrure (correspondant au signal à  $m/z$  199) est une fragmentation caractéristique des alcools.



A partir de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons raisonnablement suggérer qu'il s'agit d'un isomère de l'ar-turmérol sans pouvoir préciser la structure exacte du composé recherché notamment la position du carbone portant le groupement hydroxyle (probablement le C8 en accord avec une fragmentation en  $\alpha,\beta$  du groupe hydroxyle et perte du groupement  $C_6H_{12}O$ ). Nous désignerons ce composé par la dénomination « ar-turmérol isomère » dans les tableaux 5 et 7.

Figure 19 : spectres de masse -IE, -ICP-NH<sub>3</sub> et -ICN-NH<sub>3</sub> du composé présentant des indices de retention à 1560 (Ir *a*) et 2184 (Ir *p*)

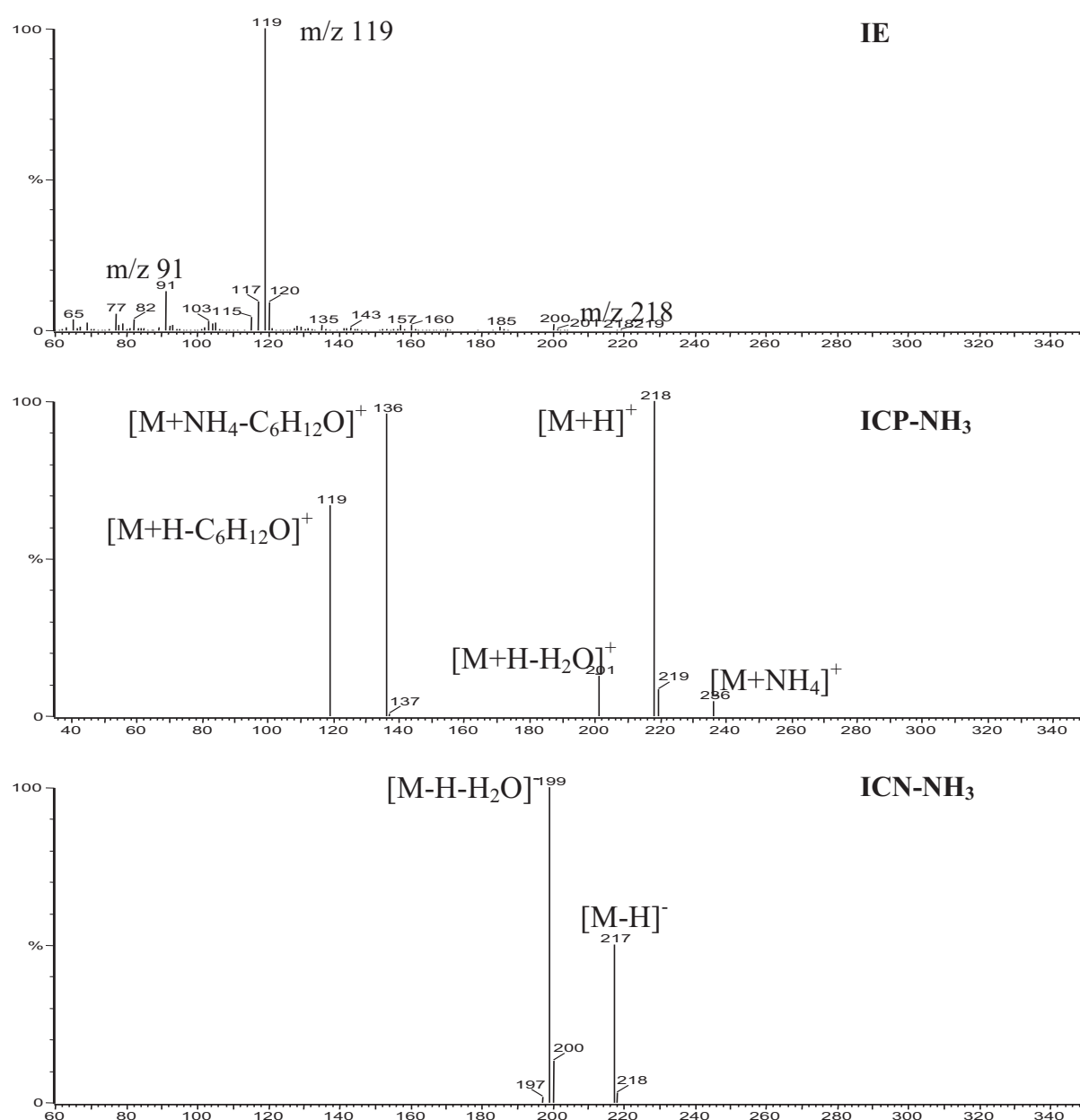


Tableau 6 : principaux pics observés sur les spectres de masse du composé à Ir  $\alpha$  1560 et Ir  $p$  2184 obtenus par CPG/SM- IE, ICP-NH<sub>3</sub> et ICN-NH<sub>3</sub>

IE					
M <sup>+</sup> 218 (2%)		ions abondants 119 (100%), 117 (9%), 91 (12%)			

ICP-NH <sub>3</sub>					
[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 236 (6%)	[M+H] <sup>+</sup> 219 (11%)	M <sup>+</sup> 218 (100%)	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 201 (16%)	[M+NH <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O] <sup>+</sup> 136 (94%)	[M+H-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O] <sup>+</sup> 119 (69%)

ICN-NH <sub>3</sub>	
[M-H] <sup>-</sup> 217 (52%)	[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> 199 (100%)

### III- BILAN DE L'ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CISTUS ALBIDUS*

Nous avons identifié 87 constituants représentant 80,4% en masse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Cistus albidus*. Nous relevons, en outre, la présence d'un isomère de l'ar-turmerol présent à une teneur de 1,4% dans l'huile essentielle (tableau 7).

Dans celle-ci, on note une proportion importante de composés sesquiterpéniques (78,8% en masse des composés identifiés dans l'huile essentielle) et une faible abondance en monoterpènes (0,4%) : 6 monoterpènes oxygénés, 28 sesquiterpènes hydrocarbonés, 40 sesquiterpènes oxygénés, 2 diterpènes hydrocarbonés, 2 diterpènes oxygénés et 10 composés aliphatiques. Les constituants majoritaires sont l' $\alpha$ -zingibérène (12,8%), l' $\alpha$ -curcumène (7,7%), le (E)- $\beta$ -caryophyllène (5,9%), l' $\alpha$ -cadinol (5,4%) et l' $\alpha$ -bisabolol (4,1%).

La majeure partie des constituants (62 composés) a été identifiée par comparaison des données spectrales (SM et/ou RMN-<sup>13</sup>C) et des indices de rétention des constituants avec ceux des composés de référence contenus dans nos bibliothèques « laboratoire ».

26 composés ont été identifiés par comparaison de leurs caractéristiques avec celles de composés des bibliothèques commerciales et/ou de la littérature. Il s'agit du safranal, du  $\beta$ -cyclocitral, du 1,5-di-*épi*-bourbonène, de l'isogermacrène D, du *cis*- $\alpha$ -bergamotène, du muurola-4,11-diène, de l' $\alpha$ -cadinène, de l' $\alpha$ -corocalène, du déhydrosesquicinéole, de l'oxyde de  $\beta$ -caryophyllène, de l'ar-turméról isomère, du germacrène D-4-ol, de la salvial-4(14)-èn-1-one, du  $\beta$ -oplopénone, du [1,9]-oxyde de bisabola-2,10-diène, du zingibérénol, du guaia-6,10(14)-dièn-4- $\beta$ -ol, du 1-10-di-*épi*-cubénol, de l'époxide d'allo-aromadendrène, du caryophylladiénol I, du caryophyllénol II, du kunséaol, de l'ar-curcumène-15-al, du curcuphénol, du (E)-nuciférol et du xanthorrhizol.

Parmi ceux-ci, l'identification de sept composés a été confirmée par comparaison des déplacements chimiques expérimentaux avec ceux reportés dans la littérature : l'isogermacrène D, le *cis*- $\alpha$ -bergamotène, le germacrène D-4-ol, la salvial-4(14)-èn-1-one, le 1,10-di-*épi*-cubénol, le caryophyllénol II et le kunséaol. En ce qui concerne le xanthorrhizol et le zingibérénol, la confirmation de leur identification est basée sur une reconstitution de spectre de RMN du carbone-13 en utilisant des molécules de référence contenues dans la bibliothèque « laboratoire ». Enfin, nous avons suggéré la présence d'un isomère de l'ar-turméról par utilisation de données complémentaires obtenues par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13. Nous notons que Palá-Paúl et coll. (227) ont identifié un composé comme étant l'ar-turmerol par CPG/Ir et CPG/SM dans les huiles essentielles de feuilles de *Cistus albidus* d'Espagne avec une teneur de 1,5% et un Ir a à 1548. Sur la base de nos analyses, notamment par RMN du carbone-13, nous avons été amenés à nous questionner sur l'effectivité de sa présence.

Nos résultats sont en cohérence avec ceux que l'on peut trouver dans la littérature reportant des travaux analogues. Les composés majoritaires sont identiques à ceux obtenus dans les huiles essentielles de plantes récoltées en France (224, 225) et en Espagne (227) (excepté pour le guaïol qui n'est pas présent dans l'échantillon étudié).

L'huile essentielle de *Cistus albidus* se caractérise par la présence en proportion importante de sesquiterpènes à squelette bisabolane :  $\alpha$ -zingibérène (12,8%),  $\alpha$ -curcumène (7,7%), zingibérénol (2,1%), ar-turméról isomère (1,4%), xanthorrhizol (0,3%), (E)-nuciferol (0,1%) et curcuphénol (0,1%). Ce type de composés est habituellement présent dans les plantes de la famille des Zingiberaceae (genre *Zinger* et *Curcuma*) et n'avait encore jamais été signalé dans d'autres espèces de Cistes. D'autres composés n'ont jamais été identifiés dans le genre *Cistus*, par exemple, les cétones sesquiterpéniques à squelette élémmane : 6-épi-shyobunone (0,5%), shyobunone (1,4%), *iso*-shyobunone (0,3%) ou le diol sesquiterpénique à squelette bicyclo[4.4.0]décane *iso*-calamendiol (0,2%). Ces quatre composés ont été récemment identifiés par Gonny et coll. dans l'huile essentielle de *Daucus carota* (238). Contrairement aux huiles essentielles d'autres espèces du genre *Cistus* présentant une quantité importante de diterpènes à squelette labdane, ceux-ci sont peu représentés dans l'huile essentielle de *Cistus albidus* ; nous avons observé uniquement l'oxyde de 13-épi-manoylé avec une teneur de 0,5%.

L'ensemble de ces résultats montre que la composition chimique de l'huile essentielle de *Cistus albidus* est très différente de celles des autres espèces de Cistes rapportées dans la littérature.

Tableau 7 : composition chimique de l'huile essentielle de *Cistus albidus*

Composés	Ir a	Ir p	%	Identification
(Z)-hex-3-èn-1-ol	818	1377	0,2	Ir, IE
(Z)-hex-2-èn-1-ol	827	1405	tr	Ir, IE
hexanol	834	1357	0,1	Ir, IE
nonanal	1081	1395	0,1	Ir, IE
terpinèn-4-ol	1161	1610	tr	Ir, IE
$\alpha$ -terpinéol	1172	1692	0,2	Ir, IE
<i>safranal</i>	1180	1705	tr	Ir, IE
décanal	1182	1498	tr	Ir, IE
$\beta$ -cyclocitral	1197	1704	tr	Ir, IE
undécanal	1283	1604	tr	Ir, IE
eugénol	1332	2136	0,2	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
acétate de néryle	1342	1725	tr	Ir, IE
$\alpha$ -cubébène	1350	1460	0,1	Ir, IE
$\alpha$ -copaène	1377	1496	0,2	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
dodécanal	1384	1706	tr	Ir, IE
$\beta$ -élémente	1387	1579	0,2	Ir, IE
$\beta$ -bourbonène	1388	1519	1,9	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
<i>1,5-di-épi-bourbonène (<math>\alpha</math> ou <math>\beta</math>)</i>	1391	1512	0,2	Ir, IE
$\alpha$ -gurjunène	1411	1525	0,3	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
<i>cis-<math>\alpha</math>-bergamotène</i>	1411	1564	0,2	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
$\beta$ -yanglène	1418	1568	tr	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
(E)- $\beta$ -caryophyllène	1419	1593	5,9	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
$\beta$ -copaène	1426	1585	0,3	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
aromadendrène	1436	1599	0,5	Ir, IE
<i>isogermacrène D</i>	1442	1665	0,2	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
allo-aromadendrène	1451	1631	3,4	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
$\alpha$ -humulène	1451	1661	0,7	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
<i>muurola-4,11-diène</i>	1457	1645	0,3	Ir, IE
<i>déhydrosesquicinéole</i>	1461	1823	tr	Ir, IE
$\alpha$ -curcumène	1467	1763	7,7	Ir, IR, RMN- <sup>13</sup> C
germacrène D	1477	1701	3,1	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C

<b>Composés</b>	<b>RI a</b>	<b>RI p</b>	<b>%</b>	<b>Identification</b>
6-épi-shyobunone	1482	1846	0,5	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
α-zingiberène	1488	1714	12,8	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
cubébol	1491	1879	0,1	Ir, IE
α-muuroène	1494	1716	0,6	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
bicyclogermacrène	1494	1724	0,3	Ir, IE
shyobunone	1503	1890	1,4	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
γ-cadinène	1507	1748	0,9	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
calaménène	1511	1818	tr	Ir, IE
4-épi-cubébol	1511	1930	0,1	IR, IR
δ-cadinène	1516	1748	3,4	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
β-sesquiphellandrène	1516	1761	0,1	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
iso-shyobunone	1521	1880	0,3	Ir, IE
cadina-1,4-diène	1527	1769	0,1	Ir, IE
α-cadinène	1531	1779	0,3	Ir, IE
α-calacorène	1539	1894	0,1	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
oxyde de -β-caryophyllène	1543	1845	0,2	Ir, IE
β-calacorène	1548	1996	tr	Ir, IE
ar-turmérol isomère	1560	2184	1,4	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C, IC
spathuléol	1563	2103	1,3	Ir, IR, RMN- <sup>13</sup> C
germacrène D-4-ol (ou β-germacréol)				
(4-β-hydroxygermacra-1(10),5-diène)	1573	2035	0,3	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
oxyde de caryophyllène	1575	1960	3,8	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
viridiflorol	1580	2054	0,2	Ir, IE
salvial-4(14)-èn-1-one	1584	1995	0,3	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
lédol	1588	1997	0,2	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
époxyde d'humulène II	1594	2011	0,4	Ir, IE
β-oplopénone	1594	2051	0,3	Ir, IE
[1,9]-oxyde de bisabola-2,10-diène	1596	1988	0,3	Ir, IE
zingibérénol	1603	2100	2,1	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
α-corocalène	1605	2037	0,2	Ir, IE
guaia-6,10(14)-dièn-4-β-ol	1605	2132	0,3	Ir, IE
1,10-di-épi-cubéol	1610	2054	0,4	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C

<b>Composés</b>	<b>RI a</b>	<b>RI p</b>	<b>%</b>	<b>Identification</b>
1-épi-cubénol	1615	2033	0,6	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
époxyde d'allo-aromadendrène	1622	2095	0,2	Ir, IE
<i>caryophylladiénol II</i> ( <i>caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5-β-ol</i> )	1624	2267	0,7	Ir, IE
caryophylladiénol I ( <i>caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5-α-ol</i> )	1627	2272	0,9	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
cubénol	1631	2023	0,7	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
τ-cadinol	1633	2157	1,7	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
τ-muurolol	1633	2173	1,6	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
α-cadinol	1643	2218	5,4	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
cadalène	1658	2191	0,3	Ir, IE
<i>caryophyllénol II</i> ( <i>caryophylla-3,8(15)-dièn-5-β-ol</i> )	1661	2350	0,5	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
α-bisabolol	1665	2199	4,1	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
épi-α-bisabolol	1667	2202	2,2	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
eudesma-4(15),7-dièn-1-β-ol	1681	2333	0,6	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
<i>kunséaol</i> ( <i>6-β-hydroxygermacra-1(10),4-diène</i> )	1687	2253	0,6	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
<i>ar-curcumèn-15-al</i>	1691	2229	0,2	Ir, IE
<i>curcuphénol</i>	1694	2194	0,1	Ir, IE
tétradécanal	1696	2020	0,1	Ir, IE
( <i>E</i> )- <i>nuciférol</i>	1726	2352	0,1	Ir, IE
<i>xanthorrhizol</i>	1728	2674	0,3	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
iso-calamendiol	1730	2462	0,2	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
géranyle para-cymène	1898	2219	0,4	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
géranyle α-terpinène	1902	2142	0,3	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
acide palmitique	1944	2504	0,2	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
oxyde de 13-épi-manoyle	2018	2372	0,5	Ir, IE, RMN- <sup>13</sup> C
géranyle linalol	2031	2559	0,1	Ir, IE
tricosane	2300	2300	0,6	Ir, IR, RMN- <sup>13</sup> C
<b>Total</b>			<b>81,8</b>	

---

Tableau 7 (suite)

---

Monoterpènes hydrocarbonés	-
Monoterpènes oxygénés	0,4
Sesquiterpènes hydrocarbonés	44,1
Sesquiterpènes oxygénés	34,7
Diterpènes hydrocarbonés	0,7
Diterpènes oxygénés	0,6
Autres	1,3

---

Ir : Indice de rétention sur colonne apolaire (*a*) et polaire (*p*)

Les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf lors de coélution (colonne polaire)

Les composés en *italique* ont été identifiés par les bibliothèques commerciales et/ou la littérature

IC : spectres de masse en ionisation chimique

RMN-<sup>13</sup>C : composés identifiés par RMN du carbone-13

---



## TROISIEME PARTIE

ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE DEUX  
ASTERACEAE ENDEMIQUES DE CORSE :

*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et

*Doronicum corsicum*

# CHAPITRE I

## Etude de la composition chimique des huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum*

### I- ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

#### 1- Présentation de la plante

*Eupatorium cannabinum* (L.) ou Eupatoire chanvrine appartient à la famille des Asteraceae, tribu des Eupatorieae. Le genre *Eupatorium* comprend 45 espèces réparties en Amérique du Nord et en Asie de l'Est. L'espèce *Eupatorium cannabinum* a étendu sa distribution en Europe et en Inde. Les espèces du genre *Eupatorium* sont des plantes pérennes à feuilles opposées, divisées ou simples et à fleurs blanches, roses ou pourpres.

Il existe en Corse, au sein du genre *Eupatorium*, deux espèces différentes décrites par Gamisans et Jeanmonod (239) :

- *Eupatorium adenophorum* est une plante mesurant de 80 à 200 cm de haut, à feuilles toutes indivisibles et à fleurs blanches qui apparaissent entre avril et juin. Cette espèce se trouve à basse altitude entre 10 et 100 mètres dans les rocailles, les vallons frais et les bords de ruisseaux. C'est une plante originaire du Mexique qui a été introduite en Corse et signalée dans deux stations en 1953 par Litardière au vallon de Lupino et en 1961 par Conrad sur les bords du canal de la Gravona.
- *Eupatorium cannabinum* L. subsp. *corsicum* (Loisel.) (figure 20) est une espèce paléotempérée. Elle est commune en Europe, en Afrique du Nord, en Asie mineure et en Inde, tandis que la sous-espèce *corsicum* semble limitée à la Corse, la Sardaigne, l'Italie méridionale et les Cévennes. L'espèce répandue sur l'île entière, est très fréquente dans les ripisylves et les lieux marécageux de relative basse altitude entre 0

et 1100 mètres. Les tiges mesurent entre 30 et 90 cm et les feuilles sont pétiolées, indivises ou trifides à tripartites. Les fleurs roses apparaissent entre juin et septembre.

Les plantes de Corse se caractérisent par une variabilité importante de la forme et de la découpe des feuilles entre les individus d'une même population. Les différences entre les populations de Corse et celles du continent se marquent dans la valeur de la variabilité morphologique. En effet, selon Gamisans et coll. (239), « Aucun caractère réellement significatif ne peut être mis en évidence : seules la taille globalement plus petite et la présence fréquente d'individus à feuilles indivises, généralement plus petites et plus largement ovales-lancéolées, dénotent une différence avec les populations du continent » (figure 20). Ces auteurs estiment qu'il existe un seul taxon en Corse et que celui-ci mérite le rang sous spécifique.

Figure 20 : représentation schématique d'*Eupatorium cannabinum* L.



*Eupatorium cannabinum*  
(Populations continentales)



*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum*  
(Populations corses)

En médecine traditionnelle européenne, l'espèce *Eupatorium cannabinum* était utilisée pour ses propriétés laxatives, diurétiques et cholérétiques (240). En Toscane, les infusions des plantes de cette espèce étaient utilisées dans les traitements des maladies de peau tels le psoriasis, l'eczéma ou les furoncles (241). Les activités fongitoxique et cytotoxique des huiles essentielles de parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* ont été étudiées par différents auteurs (242-244).

## 2- Les huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* a fait l'objet de quelques études concernant principalement les parties aériennes et, très peu, les racines. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la sous-espèce *corsicum*.

La toute première étude sur la composition chimique de l'huile essentielle de parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* (subsp. et origine non précisées) remonte à 1983 ; Hendriks et coll. (245) ont identifié 33 composés par CPG/SM-IE. Les constituants majoritaires sont le germacrène D, l' $\alpha$ -terpinène, l'acétate de néryle, le para-cymène et l'oxyde de thymyle et de méthyle. Ces auteurs ont étudié les huiles essentielles de feuilles, de tiges et de fleurs mais n'ont mis en évidence aucune différence significative entre les huiles essentielles de ces trois organes.

En 1985, après fractionnement de l'huile essentielle de parties aériennes, Hendriks et coll. (246) mettent en évidence environ 70 composés par CPG/Ir et CPG/SM-IE. Le fractionnement a été réalisé sur colonne de silice en éluant avec du pentane puis avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante ; Il a été ainsi obtenu une fraction hydrocarbonée et plusieurs fractions oxygénées. Ces auteurs ont identifié 19 composés terpéniques dans la fraction hydrocarbonée dont 4 composés majoritaires de l'huile essentielle : le  $\beta$ -pinène, l' $\alpha$ -terpinène, le para-cymène et le germacrène D. L'étude par CPG/SM-IE révélant la présence de nombreux esters essentiellement monoterpéniques dans l'une des fractions oxygénées,

les auteurs ont analysé cette fraction par CPG/SM en ionisation chimique négative (CPG/SM-ICN). Ils proposent les structures pour 44 constituants mais se sont heurtés à de nombreuses difficultés quant à la différenciation des différents isomères. Dans les autres fractions oxygénées, ils ont mis en évidence la présence d'oxyde de thymyle et de méthyle et celle d'alcools monoterpéniques : linalol, *trans*-hydrate de sabinène, lavandulol,  $\alpha$ -terpinéol, nérol, géraniol et thymol. Ces études ne donnent, cependant, aucune indication sur l'abondance relative de ces composés dans l'huile essentielle.

En 1993, Perineau et coll. (247) identifient par CPG/Ir et CPG/SM-IE, dans l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum* (subsp. et origine non précisées), 14 constituants représentant environ 52% de la composition chimique totale dont 3 composés abondants : la cypérone (16,9%), le (E,E)- $\alpha$ -farnésène (12,3%) et le spathuléol (6,1%).

En 1999, Singh et Pankey (248) étudient l'huile essentielle de feuilles d'*Eupatorium cannabinum* d'Inde du Nord (subsp. non précisée) et mettent en évidence 14 constituants représentant environ 99% de l'huile essentielle ; les composés majoritaires sont l'oxyde de caryophyllène (28,5%), le calarène (14,2%), le  $\beta$ -sélinène (10,2%), le myrcène (6,2%), le limonène (5,8 %) et le (E)- $\beta$ -caryophyllène (5,0%).

En 2001, Senatore et coll. (249) étudient la composition chimique et l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* L. subsp. *cannabinum* du Sud de l'Italie (Naples). Ils identifient par CPG/Ir et CPG/SM-IE 55 composés représentant 94,1% de la composition chimique totale de l'huile essentielle ; les composés majoritaires sont le germacrène D (33,5%), l' $\alpha$ -farnésène (12,9%), le  $\delta$ -2-carène (6,5%), le para-cymène (4,5%), le (E)- $\beta$ -caryophyllène (4,5%), l' $\alpha$ -phellandrène (3,6%), le bicyclogermacrène (3%), l'élémol (2,8%) et l' $\alpha$ -cadinol (2,7%). Les autres composés ont des teneurs inférieures à 2%. Les auteurs ont mis en évidence une activité antibactérienne notamment sur les bactéries Gram +.

Enfin, en 2003, Flamini et coll. (250) comparent les compositions chimiques des huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* de Toscane (Italie Centrale) (subsp. non précisée) préparées à partir des feuilles, d'une part, et à partir des fleurs et des fruits, d'autre part. Ainsi, 66 composés (78,9% de la composition chimique globale) ont été identifiés dans l'huile essentielle de feuilles et 70 composés (86,1% de la composition chimique globale) dans celle de fleurs/fruits. Les composés majoritaires de ces huiles essentielles sont le germacrène D (feuilles : 29,2%, fleurs/fruits : 20,3%) le bicyclogermacrène (feuilles : 4,6%, fleurs/fruits : 12,3%), l'oxyde de thymyle et de méthyle (feuilles : 7,8%, fleurs/fruits : 12,2%) et le spathulénol (feuilles : 7,3%, fleurs/fruits : 10,8 %).

En ce qui concerne les huiles essentielles de racines d'*Eupatorium cannabinum*, à notre connaissance très peu d'études ont été réalisées. Le seul résultat remarquable est, selon nous, l'identification de l'euparin (figure 25 : **2.1**) par Hendriks et coll. (245).

### 3- Les extraits

Dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum*, différentes études (245, 251, 252, 253) ont mis en évidence la présence de lactones sesquiterpéniques, de benzofuranes, d'alcaloïdes de la pyrrolizidine et de flavonoïdes.

L'eupatolide (figure 21 : **2.2**) et l'eucannabinolide (figure 22 : **2.3**) ont été isolées par Droždž et coll. (254, 255) dans les extraits des parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum*. En fait une lactone sesquiterpénique a été isolée, pour la première fois dans *Eupatorium cannabinum*, en 1951 par Gizycki (256) et a été appelée eupatoriopicrin (figure 21 : **2.4**) ; sa structure a été élucidée par Dolejš et Herout en 1962 (257).

Diverses études sur les extraits des parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum*, ont permis d'identifier plusieurs lactones sesquiterpéniques regroupées, à la suite, selon leurs familles (dans les figures 21 à 23 le nombre en gras est le numéro attribué au composé dont la structure est présentée dans la figure indiquée pour la famille) :

- famille des germacranolides (figure 21) : outre l'eupatolide **2.2** et l'eupatoriopicrin **2.4**, le 20-deoxyeupatoriopicrin **2.5** (258, 259), les composés **2.6** (258) et **2.7** (258), l'eupatoriopicrin 19-*O*-acétate **2.8** (260), l'eupatoriopicrin 19-*O*-linoléate **2.9** (261), le 3- $\beta$ -hydroxyeupatoriopicrin **2.10** (262), l'hiyodorilactone E **2.11** (258), le 8- $\beta$ -acétoxy-2 $\alpha$ -hydroxycostunolide **2.12** (261), le sachalinin **2.13** (263). Enfin, Rucker et al. (264) ont identifié en 1997, le 3- $\beta$ -peroxyeucannabinolide **2.14** et l'eupatoformosanin **2.15**.

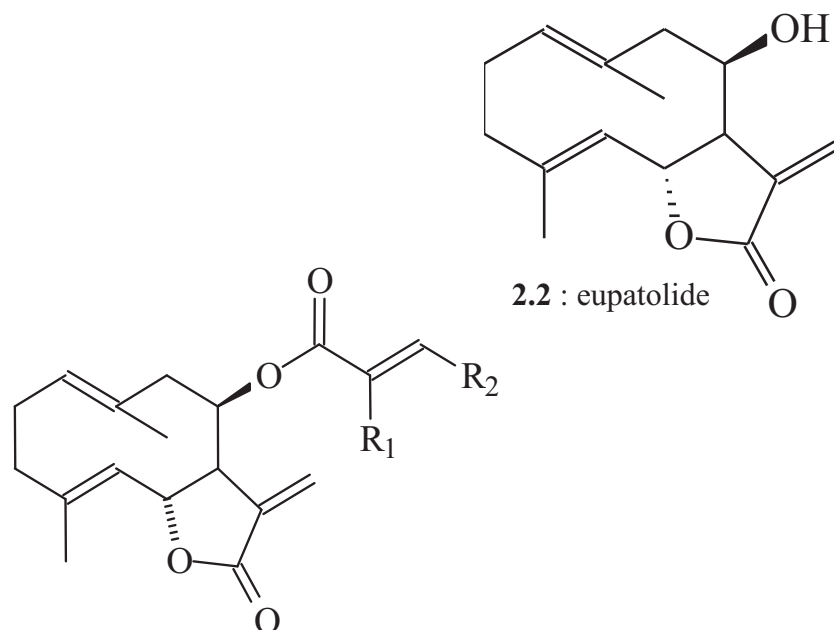
- famille des heliangolides (figure 22) : outre l'eucannabinolide **2.3** (255), l'eupasimplicin B **2.16** (258), le chromolaénide **2.17** (258, 265), et le composé **2.18** (258, 260).

- famille des guaianolides (figure 23) : l'eupachifolin C **2.19** (258) et le 2-acétyl-8 $\beta$ -[4,5-dihydrotigloyloxy]-préepatundin **2.20** (261).

En 1987, Zdero et Bohlmann (261) mettent également en évidence par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-<sup>1</sup>H) et CPG/SM ; un diterpène à squelette clérodane : le cannaclérodanolide **2.21** (figure 24), la lutéine, le 4-hydroxy- $\beta$ -ionone, l'acide (E)-hex-1-énoïque, le germacrène D, l'acétate de néryle et l'isobutyrate de néryle.

Diverses études ont mis en évidence les activités cytotoxique et anti-tumorale de ces lactones sesquiterpéniques (252, 266-271).

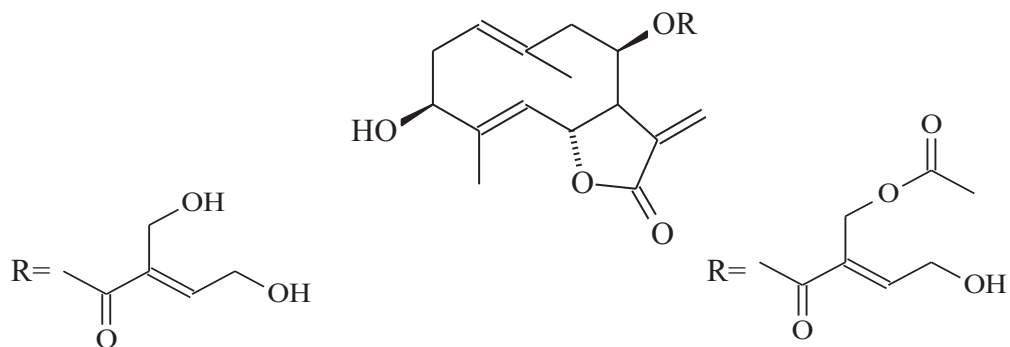
Figure 21 : lactones sesquiterpéniques de la famille des germacranolides identifiées dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum*.



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Composés
CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	2.4 : eupatoriopicrin
CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	2.5 : 20-deoxyeupatoriopicrin
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2.6
CH <sub>3</sub>		2.7
OH		2.8 : eupatoriopicrin 19- <i>O</i> -acétate
OH		2.9 : eupatoriopicrin 19- <i>O</i> -linoléate

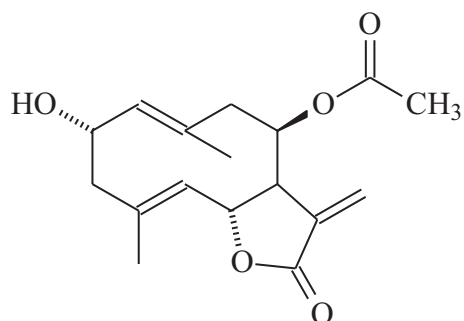


Figure 21 (suite) : lactones sesquiterpéniques de la famille des germacranolides identifiées dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum*.

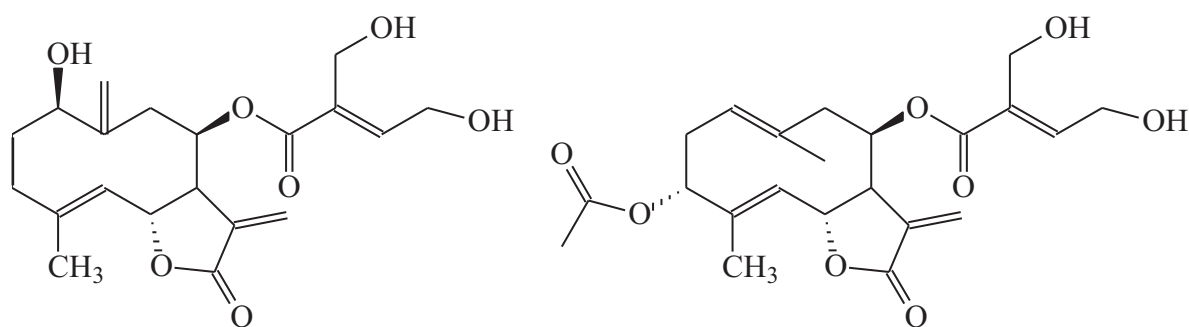


**2.10** : 3-β-hydroxyeupatoriopicrin

**2.11** : hiyodorilactone E

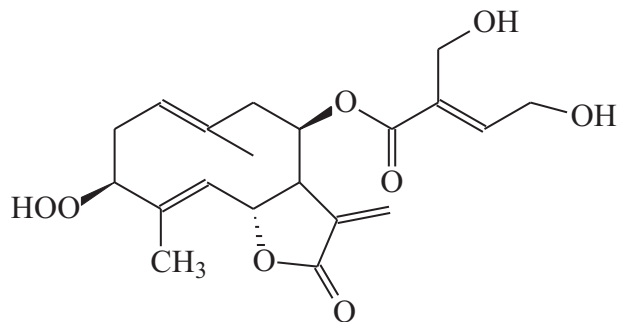


**2.12** : 8-β-acétoxy-2α-hydroxycostunolide



**2.13** : sachalinin

**2.14** : eupatoformosanin



**2.15** : 3-β-peroxyeucannabinolide

Figure 22 : lactones sesquiterpéniques de la famille des heliangolides identifiées dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum*.

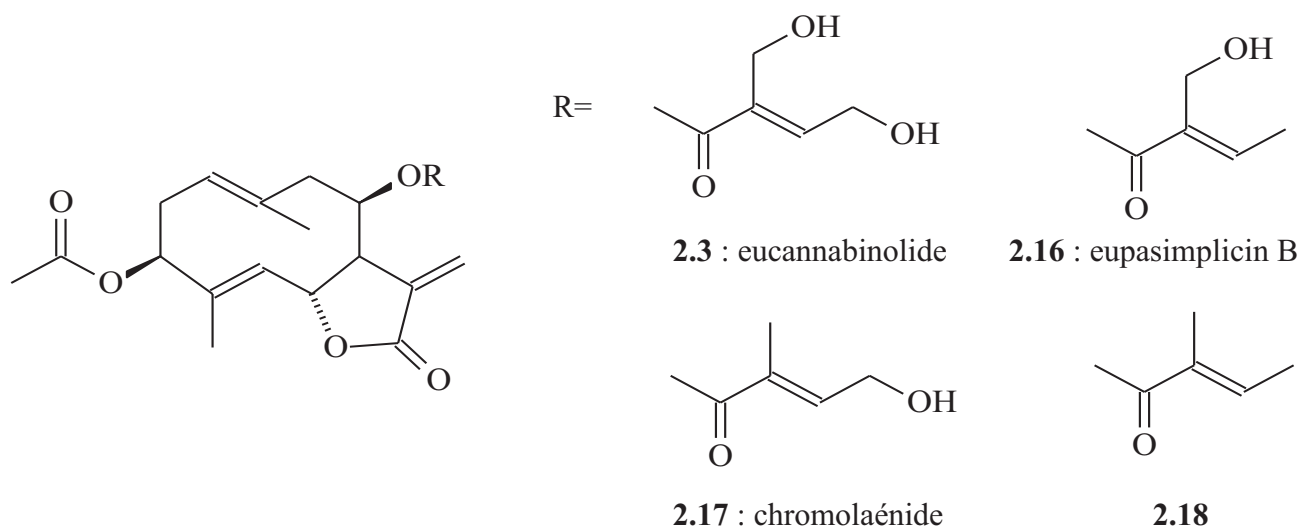


Figure 23 : lactones sesquiterpéniques de la famille des guainolides identifiées dans *Eupatorium cannabinum*.

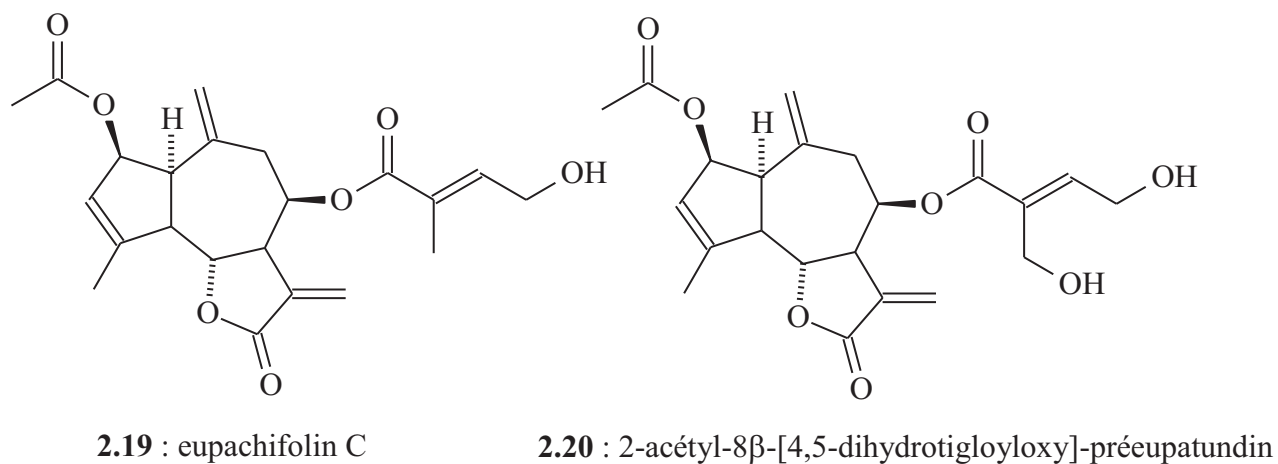
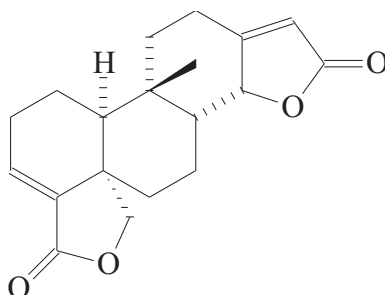


Figure 24 : diterpène à squelette clérodane identifié dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum*.



**2.21** : cannaclérodanolide

Les dérivés du benzofurane identifiés dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum* sont repris dans la figure 24. Il s'agit de l'euparin **2.1**, de la 6-hydroxytrémétone **2.22**, et de 4 esters dérivés de celle-ci **2.23-2.26**. Quatre benzofuranes ont été identifiés dans les extraits de racines d'*Eupatorium cannabinum* par différents auteurs (figure 25) (261, 272-274) : un isomère de l'euparin **2.27** et trois esters dérivés de ce composé **2.28-2.30**. Enfin, l'étude d'un extrait des racines d'*Eupatorium cannabinum* révèle la présence de sitostérol, d'acétate de néryle, d'isobutyrate de néryle ainsi que celle d'un composé terpénique inhabituel : l'acétate de 10-acétoxynéryle **2.31** (figure 26) (261).

Les travaux de Pedersen (275) et de Pagani (276) mettent en évidence la présence de deux alcaloïdes dérivés de la pyrrolizidine (figure 27) dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum* : l'échinatine **2.32** et la supinine **2.33**.

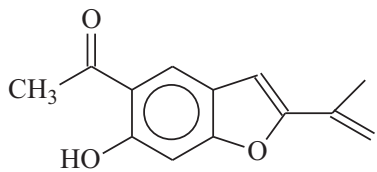
Par la suite, en 1984, Luethy et coll. (277) signalent la présence d'amabiline, en 1987, Hendriks et coll. (278) font état de celle de nombreux alcaloïdes dérivés de la pyrrolizidine dans les extraits de parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* : échinatine **2.32**, supinine **2.33**,  $\beta$ -acétate d'échinatine,  $\beta$ -isovalérate d'échinatine,  $\beta$ -angélate ou  $\beta$ -tiglate d'échinatine. Ces auteurs ont également étudié les extraits de racines et ils ont identifié, en plus des composés précédents, la trachélanthamine, le  $\beta$ -

isobutyrate de supinine, le  $\beta$ -angélate ou  $\beta$ -tiglate de supinine, le  $\beta$ -angélate ou  $\beta$ -tiglate de trachélanthamine.

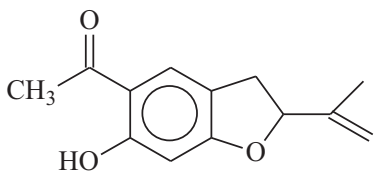
Deux triterpènes ont été isolés dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum* : le taraxastérol (ou  $\alpha$ -lactucérol) (274) et l'acétate de dammaradiényle **2.34** (figure 28) (276).

Enfin, en 1989, Elema et coll. (279) ont étudié les flavonoïdes contenus dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum*.

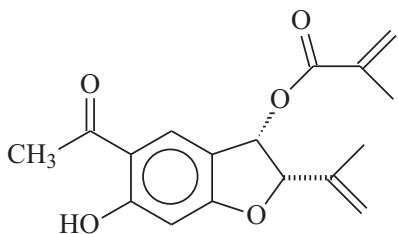
Figure 25 : dérivés du benzofurane identifiés dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum*.



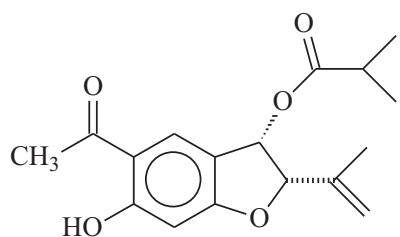
**2.1** : euparin



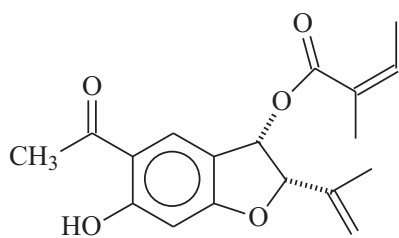
**2.22** : 6-hydroxytrémétone



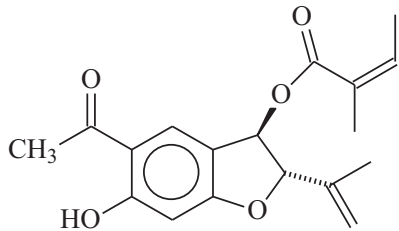
**2.23** : 3β-méthacrylate de 6-hydroxytrémétone



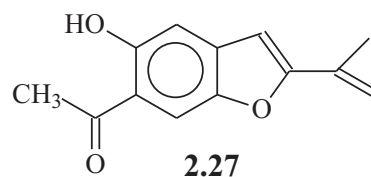
**2.24** : 3β-isobutyrate de 6-hydroxytrémétone



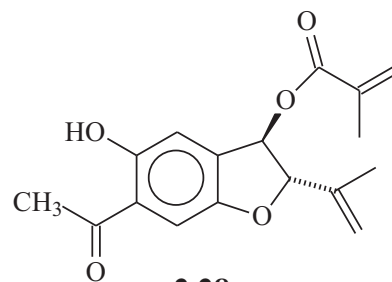
**2.25** : 3β-angélate de 6-hydroxytrémétone



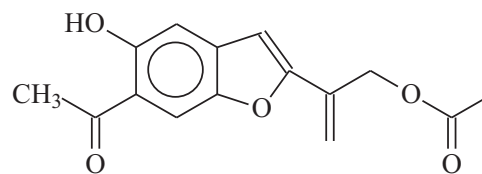
**2.26** : 3α-angélate de 6-hydroxytrémétone



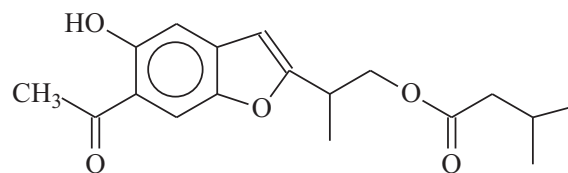
**2.27**



**2.28**

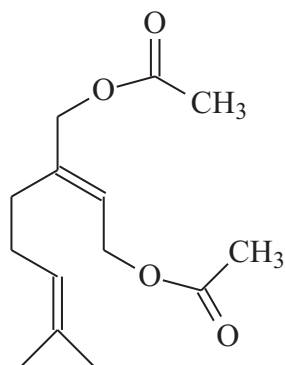


**2.29**



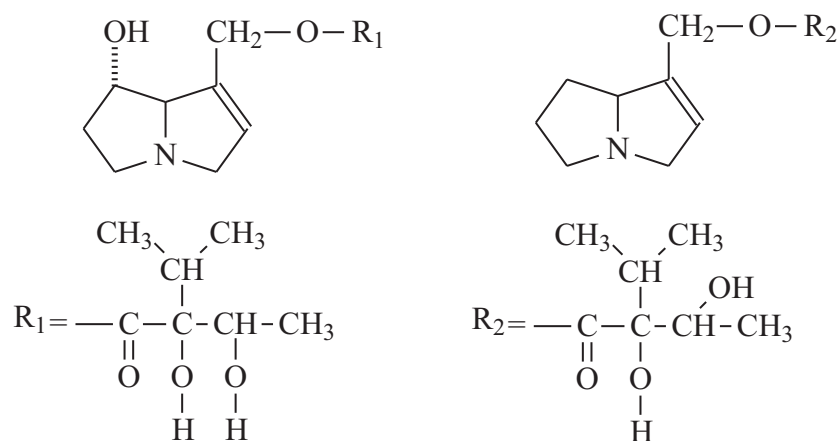
**2.30**

Figure 26 : diester terpénique identifié dans les extraits  
d'*Eupatorium cannabinum*



**2.31** : acétate de 10-acétoxyneryle

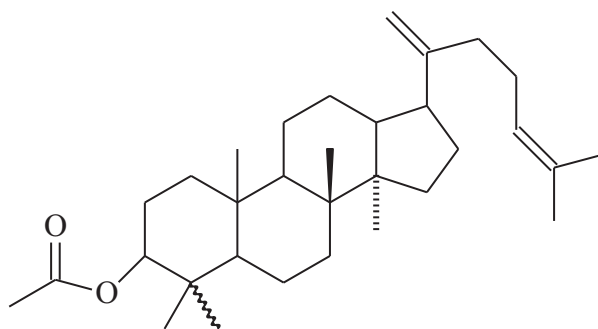
Figure 27 : alcaloïdes dérivés de la pyrrolizidine identifiés dans les extraits  
d'*Eupatorium cannabinum*.



**2.32** : échinatine

**2.33** : supinine

Figure 28 : triterpène identifié dans les extraits d'*Eupatorium cannabinum*.



**2.34** : acétate de dammaradiényle

## II- ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES D'*EUPATORIUM CANNABINUM* SUBSP. *CORSICUM*

Ce chapitre porte sur l'étude de la composition chimique des huiles essentielles préparées, par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger, à partir des parties aériennes, d'une part, et des racines, d'autre part, d'*Eupatorium cannabinum* L. subsp. *corsicum* de Corse. Le matériel végétal a été récolté en Haute-Corse, de Juin à Septembre 2003, sur les bords des rivières et des cours d'eau à proximité de Barchetta, Francardo, Caporalino et Corte, à des altitudes comprises entre 200 et 500 mètres. Il a été hydrodistillé pendant cinq heures et le rendement moyen, calculé en fonction de la masse de végétal frais, est compris entre 0,05% et 0,07% pour les parties aériennes et entre 0,09% et 0,12% pour les racines.

### **A- Etude de l'huile essentielle de parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum***

#### 1- Analyse de l'huile essentielle avant fractionnement

L'analyse de l'huile essentielle de parties aériennes par CPG/Ir et CPG/SM-IE a permis d'identifier 24 constituants se répartissant en 17 composés hydrocarbonés et 7 composés oxygénés, le tout représentant, environ 76% de la composition chimique de l'huile essentielle (tableau 8). Les composés majoritaires sont le germacrène D (28,5%) suivi de l' $\alpha$ -phellandrène (19,0%) et du para-cymène (5,2%). Les autres composés ont une teneur inférieure à 4 %.

Tableau 8 : composition chimique de l'huile essentielle de parties aériennes  
d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum*

Composés	Ir <i>a</i>	Ir <i>p</i>	%
α-pinène	930	1024	0,2
camphène	943	1066	1,6
β-pinène	970	1111	0,3
myrcène	981	1166	0,8
δ-2-carène	996	1140	3,9
α-phellandrène	996	1169	19,0
para-cymène	1012	1271	5,2
limonène	1022	1205	0,7
(Z)-β-ocimène	1026	1238	0,2
(E)-β-ocimène	1037	1254	1,5
linalol	1082	1547	0,2
α-terpinéol	1172	1692	0,2
oxyde de thymyle et de méthyle	1215	1586	2,1
acétate de bornyle	1269	1579	0,6
acétate de lavandulyle	1271	1606	0,4
acétate de néryle	1342	1725	2,3
(E)-β-caryophyllène	1419	1593	3,1
α-humulène	1451	1661	1,0
germacrène D	1477	1701	28,5
bicyclogermacrène	1494	1724	1,7
β-bisabolène	1500	1718	0,4
γ-cadinène	1507	1748	0,2
δ-cadinène	1516	1748	0,6
α-cadinol	1643	2218	1,0
<b>Total</b>			<b>75,7</b>

**Ir** : indices de rétention sur colonne apolaire (**a**) et sur colonne polaire (**p**)

**%** : abondance relative des composés mesurée sur colonne apolaire

(sauf lors de coélution : pourcentages donnés sur colonne polaire)



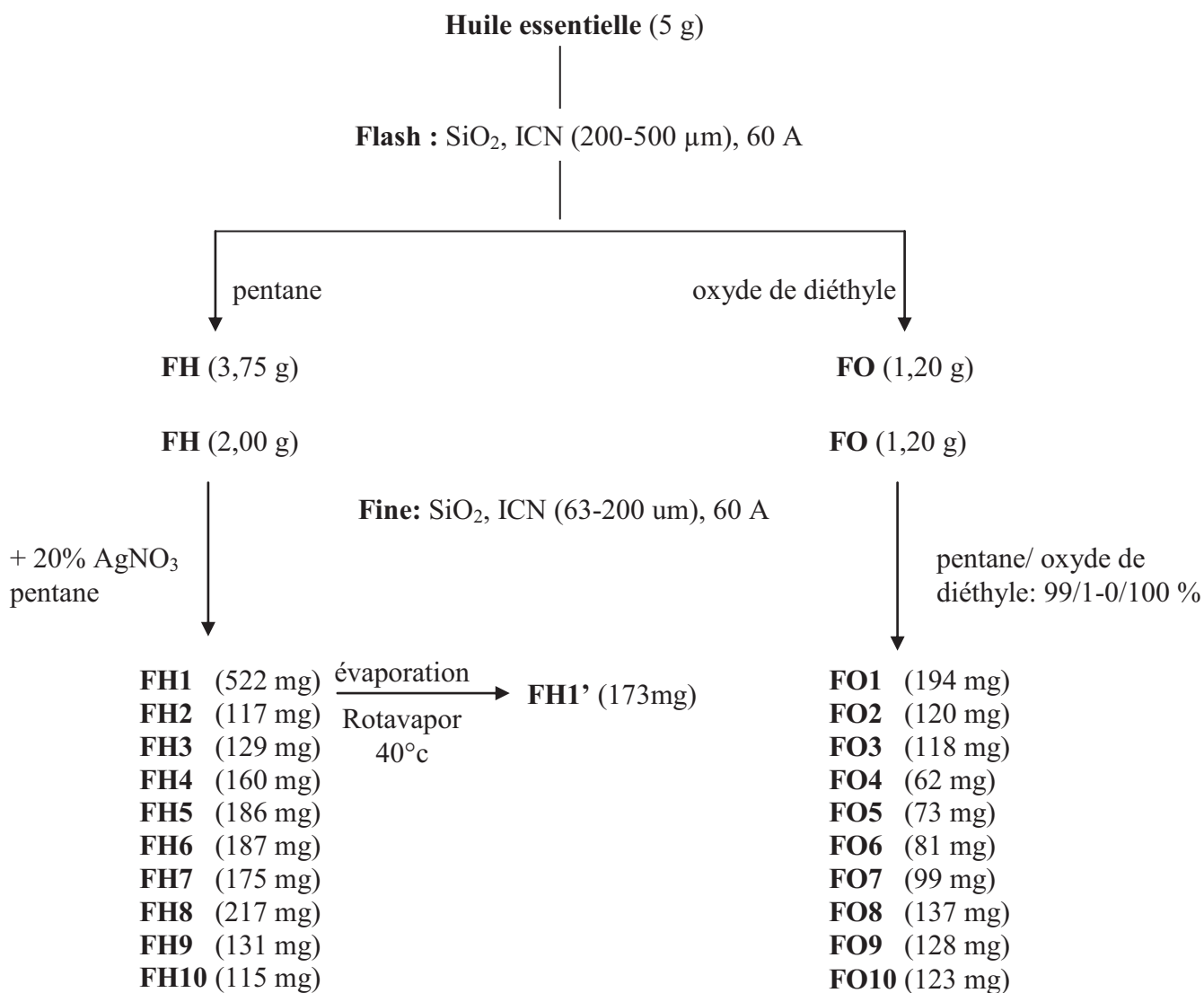
## 2- Fractionnement de l'huile essentielle

5 g d'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* ont été soumis à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte de silice de forte granulométrie (chromatographie flash : SiO<sub>2</sub>, ICN 200-500 µm, 60 Å). Par élution au pentane on obtient une fraction FH contenant les composés hydrocarbonés (3,75 g) ; une élution à l'oxyde de diéthyle conduit, ensuite, à une fraction FO contenant les composés oxygénés (1,2 g). Ces deux fractions font l'objet de la séquence classique d'analyse par CPG/Ir et CPG/SM et sont soumises, à leur tour, à un fractionnement sur colonne de silice de granulométrie plus fine (chromatographie fine: SiO<sub>2</sub>, ICN 63-200 µm, 60 Å). On recueille 10 fractions hydrocarbonées (FH1 à FH10) par élution au pentane et autant de fractions oxygénées (FO1 à FO10) en utilisant un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante. Le fractionnement et les conditions opératoires sont représentés schématiquement sur la figure 29.

Chacune des 20 fractions est soumise à la séquence analytique par CPG/Ir et CPG/SM.

Dans les fractions hydrocarbonées FH et FH1, sur la base des propositions de la bibliothèque commerciale König-Joulain (18, 19), on relève la présence de sesquiterpènes tricycliques (tableau 9). Pour concentrer ces composés, dans l'optique de confirmer leurs identifications, nous avons évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif, les monoterpènes tels le β-pinène, l'α-phellandrène et le δ-2-carène présents dans la fraction FH1 ; nous obtenons ainsi une fraction expurgée notée FH1' (figure 29), soumise, elle aussi, à la même séquence analytique.

Figure 29 : fractionnement de l'huile essentielle de parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum*



### 3- Etude des fractions hydrocarbonées

#### *Analyse en CPG/Ir et en GPG/SM-IE*

Les composés hydrocarbonés et leurs abondances relatives dans chaque fraction sont repris dans le tableau 9. Par rapport à l'analyse de l'huile essentielle brute, ce sont 40 composés supplémentaires qui ont été identifiés soit par comparaison avec les caractéristiques d'échantillons authentiques contenus dans nos bibliothèques propres (28 composés écrits en police usuelle), soit par comparaison avec les données de la bibliothèque commerciale König-Joulain (18, 19) (12 composés écrits en italique). Parmi ces derniers, 5 composés (écrits en italique gras et notés **H1** à **H5**) ont, également, été identifiés comme tels par la RMN du carbone-13 appliquée au mélange ; les structures et les données spectrales de ces composés sont rapportées à la suite (figure 30).

Ces 57 composés, au total, identifiés avec certitude, représentent 97,2% de la composition chimique de la fraction hydrocarbonée.

#### *Etude par RMN du carbone-13*

L'étude de la fraction FH1' par RMN du carbone-13 a permis de conforter les identifications proposées par les bibliothèques commerciales pour les 5 composés (**H1** à **H5**). Sur les spectres de RMN du carbone-13 nous avons procédé à la comparaison des différentes raies de résonance des atomes de carbone de chaque molécule avec celles répertoriées dans la bibliothèque König-Joulain (18) (figure 30).

Il s'agit donc bien de composés terpéniques tricycliques ; 4 d'entre eux possèdent un squelette silphiperfolane : le 7- $\alpha$ -[H]-silphiperfol-5-ène (**H1**), le 7- $\beta$ -[H]-silphiperfol-5-ène (**H2**), le silphin-1-ène (**H3**) et le silphiperfol-6-ène (**H4**) ; le cinquième composé est le modhephène (**H5**). La figure 30 donne les structures de ces composés et, dans sa seconde partie, explicite les déplacements chimiques des atomes de carbone. A notre connaissance, ces composés n'ont encore jamais été signalés dans des huiles essentielles du genre *Eupatorium*.

Tableau 9 : composés identifiés dans les fractions hydrocarbonées de l'huile essentielle de parties aériennes

<i>Fractions</i>	<b>FH</b>											
	<b>2000</b>	<b>FH1</b>	<b>FH1'</b>	<b>FH2</b>	<b>FH3</b>	<b>FH4</b>	<b>FH5</b>	<b>FH6</b>	<b>FH7</b>	<b>FH8</b>	<b>FH9</b>	<b>FH10</b>
<i>masse des fractions (mg)</i>												
<b>Composés</b>	<b>Ir</b>	<b>a</b>	<b>Ir</b>	<b>p</b>								
$\alpha$ -pinène	930	1024	0,3	0,4	0,1	0,2	0,1	-	-	-	-	-
camphène	943	1066	2,2	2,6	2,1	5,9	2,3	0,5	0,1	-	-	-
$\beta$ -pinène	970	1111	0,4	0,5	0,3	1,8	0,7	0,2	-	-	-	-
$\beta$ -myrcène	981	1166	1,1	-	-	-	1,2	2	1,6	0,8	0,6	-
$\delta$ -2-carène	996	1140	4,7	9,1	8,3	24,7	11,7	2,5	0,6	0,1	-	-
$\alpha$ -phellandrène	996	1169	23,3	65,8	0,7	1,4	0,4	0,2	0,2	0,1	-	-
para-cymène	1012	1271	6,4	-	-	8,4	11,7	19,9	32,0	39,5	26,7	19,7
$\beta$ -phellandrène	1020	1215	0,1	-	-	0,3	0,3	0,1	-	-	-	5,5
limonène	1022	1205	0,9	-	-	-	2,7	3,8	2,5	1,3	0,4	-
$\beta$ -(Z)-ocimène	1026	1238	0,3	-	-	-	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	-
$\beta$ -(E)-ocimène	1037	1254	1,9	-	-	-	0,1	0,3	0,6	0,6	1,6	0,8
undécane	1100	1100	tr	tr	0,1	-	-	-	-	-	-	-
(E)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène	1105	1309	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
tridécano	1300	1300	tr	tr	0,2	-	-	-	-	-	-	-
<b>7-<math>\alpha</math>-[H]-silphiperfol-5-ène (H1)</b>	1326	1429	0,4	1,1	5,9	1,5	0,3	0,1	-	-	-	-
bicycloélémente	1334	1481	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
présilphiperfol-7-ène	1335	1414	0,3	0,5	2,3	0,3	0,1	-	-	-	-	-
<b>7-<math>\beta</math>-[H]-silphiperfol-5-ène (H2)</b>	1348	1454	0,8	2,5	9,8	2,5	0,5	0,1	-	-	-	-
<b>silphin-1-ène (H3)</b>	1348	1474	2,1	6,7	29,3	9,2	2,1	0,6	-	-	-	-
$\alpha$ -cubébène	1350	1460	0,1	-	-	0,5	0,5	0,2	-	-	-	-
cyclosativène	1377	1473	tr	tr	1,2	0,3	-	-	-	-	-	-

<i>Fractions</i>	FH	FH1	FH1'	FH2	FH3	FH4	FH5	FH6	FH7	FH8	FH9	FH10
$\alpha$ -copaène	0,3	0,4	0,6	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>silphiperfol-6-ène (H4)</i>	0,8	0,8	10,9	8,2	1,7	0,4	-	-	-	-	-	-
<i>péthylbrène</i>	tr	0,1	0,5	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>modhephène (H5)</i>	1,1	3,4	12,6	7,5	1,7	0,5	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -cubébène	0,5	-	-	-	2,2	1,7	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -éléménène	0,9	-	-	-	-	1,2	1,6	1,9	1,4	1,5	1,4	1,9
$\beta$ -bourbonène	tr	-	-	0,3	0,1	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -isocomène	0,3	0,5	2,6	1,4	0,5	0,1	-	-	-	-	-	-
sativène	tr	0,2	0,5	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -isocomène	0,3	0,6	2,3	2,2	0,7	0,1	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -ylangène	tr	0,2	0,6	1,2	0,4	-	-	-	-	-	-	-
(E)- $\beta$ -caryophyllène	3,9	-	-	-	8,1	19,8	15,9	10,3	4,9	1,1	0,4	-
$\beta$ -copaène	0,1	0,3	0,8	1,4	0,6	-	-	-	-	-	-	-
trans- $\alpha$ -bergamotène	tr	-	-	0,8	1,3	0,6	-	-	-	-	-	-
aromadendrène	0,1	-	-	0,8	0,6	0,2	-	-	-	-	-	-
allo-aromadendrène	0,3	-	-	1,8	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -humulène	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	28,1
$\gamma$ -muurolène	0,3	-	-	-	4,5	4,2	3,2	1,8	-	-	-	-
germacrène D	36,4	-	-	-	-	4,4	16,6	25,7	55,9	69,1	70,9	9,9
trans- $\beta$ -bergamotène	tr	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-
lédène	0,3	-	-	-	1,5	0,8	0,4	0,2	-	-	-	-
$\alpha$ -muurolène	tr	-	-	-	4,6	3,5	2,2	1,1	-	-	-	-
bicyclogermacrène	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,9
(E,E)- $\alpha$ -farnésène	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	18,0
$\beta$ -bisabolène	0,5	-	-	-	-	-	0,6	1,6	1,7	3,2	9,8	18,5

<i>Fractions</i>	FH	FH1	FH1'	FH2	FH3	FH4	FH5	FH6	FH7	FH8	FH9	FH10
$\gamma$ -cadinène	1507 1748	-	-	-	1,1	2,1	1,5	1,1	0,6	0,5	0,6	-
calamenène	1511 1818	tr	-	-	0,8	0,7	0,7	0,7	0,4	0,6	0,8	-
$\delta$ -cadinène	1516 1748	0,8	-	-	5,9	6,8	5,5	3,5	2,2	0,8	1,4	-
$\alpha$ -cadinène	1531 1779	tr	-	-	0,3	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-	-
$\alpha$ -calacorène	1539 1894	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
$\beta$ -calacorène	1548 1932	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
<i>germacrène B</i>	1554 1816	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,9
tricosane	2300 2300	0,1	0,3	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
tetracosane	2400 2400	tr	tr	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
pentacosane	2500 2500	tr	0,2	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-
heptacosane	2700 2700	tr	0,2	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>		<b>97,2</b>	<b>98,4</b>	<b>94,0</b>	<b>82,9</b>	<b>71,6</b>	<b>79,4</b>	<b>86,4</b>	<b>90,9</b>	<b>97,4</b>	<b>95,1</b>	<b>89,8</b>

Les composés écrits en police usuelle sont présents dans nos bibliothèques propres d'Ir et de SM

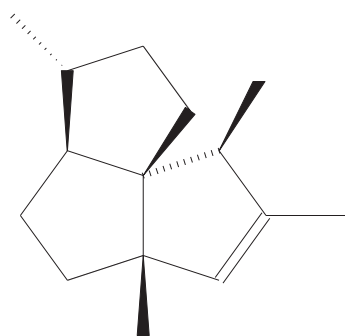
Les composés en *italique* ont été identifiés par comparaison avec les bibliothèques commerciales (18, 19)

Les composés en *italique* et en **gras** ont été identifiés, également, par RMN du carbone-13

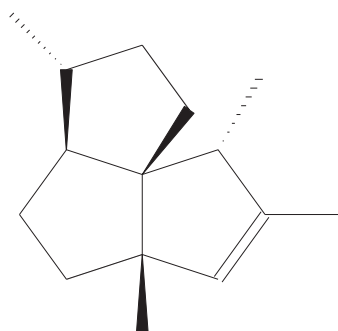
**Ir** : Indices de rétention calculés sur colonne apolaire (**a**) et sur colonne polaire (**p**)

Les abondances sont données sur colonne apolaire (sauf lors de coélution : pourcentages donnés sur colonne polaire)

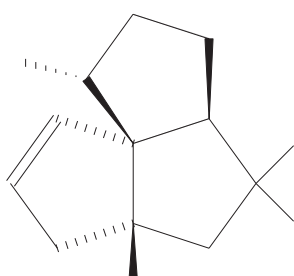
Figure 30 : structures des sesquiterpènes tricycliques **H1** à **H5**



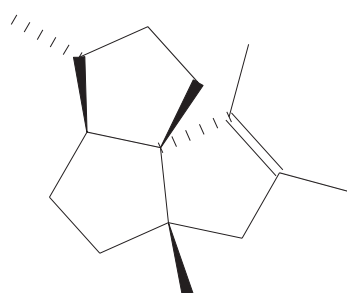
**H1** : 7- $\alpha$ -[H]-sipherfol-5-ène



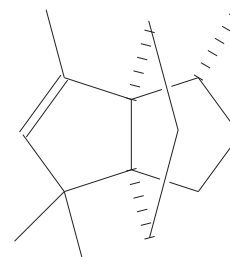
**H2** : 7- $\beta$ -[H]-sipherfol-5-ène



**H3** : silphin-1-ène



**H4** : sipherfol-6-ène



**H5** : modhephène

Ici encore, pour chacun des composés identifiés, les signaux de tous les carbones ont été repérés et attribués à partir du spectre unique du mélange. Par ailleurs, le nombre de superpositions reste limité. Les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) des carbones de ces composés par rapport à celles des produits de référence sont relativement faibles, inférieures à 0,1 ppm dans la majorité des cas.

Figure 30 (suite): déplacements chimiques des sesquiterpènes tricycliques **H1** à **H5** mesurés dans la fraction FH1' et décrits dans la littérature (18)

<b>H1</b>		<b>H2</b>		<b>H3</b>		<b>H4</b>		<b>H5</b>	
$\delta$ (18)	$\delta$ FH1' (ppm)	$\delta$ (18)	$\delta$ FH1' (ppm)	$\delta$ (18)	$\delta$ FH1' (ppm)	$\delta$ (18)	$\delta$ FH1' (ppm)	$\delta$ (18)	$\delta$ FH1' (ppm)
142,5	142,50	140,9	140,87	138,5	138,38	136,0	136,00	140,9	140,83
	s		s		d		s		s
133,0	133,07	133,4	133,42	125,4	125,36	127,3	127,33	135,4	135,46
	d		d		d		s		d
65,2	65,24	65,2	65,24	72,6	72,36	71,9	71,74	73,1	73,08
	d		s		s		s		s
64,2	64,20	56,5	56,49	64,0	63,71	59,1	58,96	66,1	66,04
	s		s		d		d		s
57,6	57,61	52,4	52,41	58,7	58,29	52,4	52,23	45,9	45,84
	s		d		t		t		s
55,0	55,03	51,1	51,08	51,4	51,95	49,7	49,56	43,9	43,93
	d		d		t		s		d
43,0	43,01	42,5	42,57	49,4	49,21	41,4	41,29	38,7	38,76
	d		d		s		d		t
37,7	37,69	37,6	37,61	39,4	39,36	40,2	40,09	35,8	35,80
	t		t		s		t		t
35,8	35,87	36,0	36,08	38,7	38,58	36,7	36,61	34,3	34,34
	t		t		d		t		t
29,9	29,85	34,8	34,84	37,6	37,43	30,0	29,91	29,9	29,85
	t		t		t		t		t
29,1	29,16	30,1	30,11	31,1	30,93	29,1	28,98	29,3	29,36
	t		t		q		t		q
23,3	23,30	20,5	20,51	27,7	27,68	24,8	24,71	27,2	27,16
	q		q		t		q		t
20,1	20,09	19,7	19,75	27,4	27,41	19,7	19,58	26,3	26,30
	q		q		q		q		q
17,3	17,34	14,6	14,60	26,7	26,65	14,3	14,15	15,6	15,61
	q		q		q		q		q
15,4	15,49	14,4	14,40	16,4	16,43	11,0	10,84	13,75	13,78
	q		q		q		q		q



#### 4- Etude des fractions oxygénées

Les composés oxygénés et leurs abondances relatives dans chaque fraction sont repris dans le tableau 10. Par rapport à l'analyse de l'huile essentielle, ce sont 65 composés supplémentaires qui ont été identifiés soit par comparaison avec les caractéristiques d'échantillons authentiques contenus dans nos bibliothèques propres (52 composés écrits en police usuelle), soit par comparaison avec les données de la bibliothèque commerciale König-Joulain (19, 21) (13 composés écrits en italique). Parmi ces derniers, le présilphiperfolane-9 $\alpha$ -ol (noté **O1**) et le copabornéol (noté **O2**), présents dans les fractions avec des abondances relatives respectives de 8,4% (FO9) et de 16,2% (FO7) ont également été identifiés comme tels par la RMN du carbone-13 appliquée aux mélanges ; les structures et les déplacements chimiques de ces composés sont rapportées dans la figure 31.

Ces 72 composés représentent 56,1% de la composition chimique de la fraction oxygénée.

A cela, il convient d'ajouter 18 composés représentant 24,5% de la composition chimique de la fraction oxygénée (composés notés **A1** à **A4**, **B1** à **B4**, **C1** à **C3**, **D1** à **D4** et **E1** à **E3** dans le tableau 10). A ce niveau de l'étude, les propositions des banques commerciales ne nous permettent pas de retenir les structures proposées avec une certitude suffisante. Les fractions FO1 et FO2 contenant ces composés ont fait l'objet d'une étude particulière détaillée à la suite ; les composés précités ont ainsi pu être identifiés.

Ainsi, compte tenu de ces 18 composés, le tableau 19, comporte 90 composés représentant 80,6% de la fraction oxygénée.

Tableau 10 : composés identifiés dans les fractions oxygénés de l'huile essentielle de parties aériennes

<i>Fractions</i>	FO	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9	FO10
<i>masse des fractions (mg)</i>	1200	194	120	118	62	73	81	99	137	128	123
<i>Composés</i>	<i>Ir a</i>	<i>Ir p</i>									
(Z)-hex-3-èn-1-ol	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-
(Z)-hex-2-èn-1-ol	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-
hexanol	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-
phénylacétaldehyde	0,1	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
nonanal	0,1	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
linalol	0,9	-	-	-	-	7,2	0,3	-	-	-	-
<i>cis-para-menth-2-èn-1-ol</i>	0,3	-	-	-	-	-	1,1	-	1,6	-	-
<i>trans-para-menth-2-èn-1-ol</i>	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,5	1,8	-
oxyde de nérol	0,1	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
lavandulol	0,1	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-
bornéol	0,2	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-
terpinène-4-ol	tr	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
$\alpha$ -terpinéol	1,1	-	-	-	-	-	-	-	7,1	3,6	-
cis-pipéritol	0,1	-	-	-	-	-	0,8	0,4	-	-	-
décanal	tr	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-pipéritol	0,2	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
<i>8,9-déhydrothymol</i>	0,2	-	-	0,4	0,7	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -cyclocitral	tr	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-
nérol	0,3	-	-	-	-	-	-	-	3,1	-	-
pulégone	tr	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-
oxyde de thymyle et de méthyle	9,6	24,9	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>carvotanacétone</i>	0,1	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-

<i>Fractions</i>	FO	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9	FO10
oxyde de carvacryle et de méthyle	1224	1594	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
acétate de linalyle	1237	1555	tr	0,2	-	-	-	-	-	-	-
thymol	1267	2157	0,1	-	-	1,7	-	-	-	-	-
acétate de bornyle	1269	1579	2,7	13,0	12,4	0,3	-	-	-	-	-
acétate de lavandulyle	1271	1606	1,7	3,6	6,7	3,3	-	-	-	-	-
carvacrol	1275	2183	0,1	-	-	-	1,0	-	-	-	-
(E,E)-2,4-décadiénal	1288	1798	0,1	-	-	0,5	-	-	-	-	-
acétate de $\alpha$ -terpinyle	1330	1688	tr	0,2	-	-	-	-	-	-	-
acétate de néryle	1342	1725	12,9	23,0	71,2	23,4	-	-	-	-	-
acétate de géranyle	1358	1752	0,2	-	0,1	1,3	-	-	-	-	-
(E)- $\beta$ -damascénone	1362	1810	0,4	-	-	0,7	-	-	-	-	-
(E)- $\beta$ -damascone	1391	1805	tr	-	-	-	0,3	-	-	-	-
<b>C1</b>	1402	1641	3,5	16,7	3,7	-	-	-	-	-	-
<b>E1</b>	1410	1677	tr	0,1	-	-	-	-	-	-	-
géranyle acétone	1426	1846	0,1	-	-	-	0,4	-	-	-	-
propionate de néryle	1428	1784	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B1</b>	1454	1922	1,0	5,9	-	-	-	-	-	-	-
<b>A1</b>	1458	1889	3,3	8,0	5,5	-	-	-	-	-	-
2-méthylbutyrate de 2-phényléthyle	1460	1950	tr	-	0,3	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -ionone	1462	1923	0,2	-	-	-	0,5	0,4	-	-	-
isovalérate de 2-phényléthyle	1463	1964	tr	-	0,1	-	-	-	-	-	-
<b>D1</b>	1469	1780	3,8	10,7	2,7	-	-	-	-	-	-
tridécane-2-one	1481	1806	tr	-	-	0,3	-	-	-	-	-
cubébol	1485	1880	0,6	-	-	-	-	3,8	1,1	-	-
<b>E2</b>	1490	1759	1,2	2,9	0,3	-	-	-	-	-	-

<i>Fractions</i>	FO	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9	FO10
<b>C2</b>	1494	1729	3,0	8,5	1,4	-	-	-	-	-	-
<b>E3</b>	1494	1761	0,3	0,5	0,3	-	-	-	-	-	-
<b>C3</b>	1501	1753	1,9	3,6	1,2	-	-	-	-	-	-
4-épi-cubébol	1504	1928	0,6	-	-	-	-	1,2	3,5	-	-
<b>présilhiperfolane-9<math>\alpha</math>-ol (O1)</b>	1515	1992	1,3	-	-	-	-	-	-	8,4	8,1
élémol	1531	2052	0,1	-	-	-	-	-	1,4	-	-
(E)-nérolidol	1544	2013	0,3	-	-	-	5,6	-	-	-	-
<b>B2</b>	1548	1996	0,7	1,2	1,3	-	-	-	-	-	-
<b>B3</b>	1548	2006	0,8	1,7	1,7	-	-	-	-	-	-
<b>A2</b>	1551	1964	1,1	3,9	1,3	-	-	-	-	-	-
<b>A3</b>	1551	1975	1,4	3,7	1,9	-	-	-	-	-	-
<b>D2</b>	1554	1857	0,8	2,5	0,6	-	-	-	-	-	-
<i>1,5-époxyvalial-4-(14)-ène</i>	1554	1959	0,1	-	-	0,6	-	-	-	-	-
<i>maaliol</i>	1559	1973	0,1	-	-	-	-	1,1	-	-	-
<b>D3</b>	1560	1877	0,3	0,7	0,2	-	-	-	-	-	-
palustrol	1562	1914	0,3	-	-	-	1,8	-	-	-	-
spathulénol	1563	2103	1,7	-	-	-	-	14,0	2,4	-	-
gleénol	1572	2008	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -germacrénol	1573	2019	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
oxyde de caryophyllène	1575	1960	0,5	-	-	-	7,0	-	-	-	-
globulol	1576	2051	0,7	-	-	-	-	-	-	6,2	-
viridiflorol	1580	2054	1,0	-	-	-	-	7,5	1,7	-	-
lédol	1588	1997	0,1	-	-	-	-	1,2	-	-	-
apiol dill	1589	2327	0,1	-	-	1,4	-	-	-	-	-
<b>copabornéol (O2)</b>	1592	2159	1,2	-	-	-	2,3	16,2	-	-	-
époxyde d'humulène II	1594	2011	0,2	-	-	-	-	-	-	1,7	-

<i>Fractions</i>	FO	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9	FO10
<i>eudesm-4(15)-ène-6-ol</i>	1,8	-	-	-	-	23,2	-	-	-	-	-
1,10-épi-cubénol	0,1	-	-	-	1,4	0,5	-	-	-	-	-
1-épi-cubénol	0,8	-	-	-	-	-	15,0	-	-	-	-
$\gamma$ -eudesmol	0,1	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-
<i>iso-spathuléol</i>	0,2	-	-	-	-	-	-	-	2,2	-	-
$\tau$ -cadinol	1,4	-	-	-	-	-	5,6	7,9	2,8	-	-
$\tau$ -muurolol	1,5	-	-	-	-	-	-	17,9	3,8	-	-
<b>B4</b>	0,3	-	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-
cubénol	0,4	-	-	-	11,8	-	-	-	-	-	-
<b>A4</b>	1,0	0,2	7,8	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -cadinol	4,4	-	-	-	-	-	-	-	13,2	43,2	3,7
<b>D4</b>	0,1	0,7	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>valéranone</i>	0,5	-	-	-	4,0	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -bisabolol	1,3	-	-	-	-	-	4,2	3,3	-	-	-
pentadécane-2-one	0,2	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-
<i>mitsulfide</i>	0,1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-phytol	0,7	-	-	-	-	-	-	-	10,8	-	-
<b>Total</b>	<b>80,6</b>	<b>92,4</b>	<b>82,3</b>	<b>91,2</b>	<b>51,3</b>	<b>40,5</b>	<b>42,5</b>	<b>77,4</b>	<b>57,3</b>	<b>68,2</b>	<b>11,8</b>

Les composés écrits en police usuelle ont été identifiés sont présents dans nos bibliothèques propres d'Ir et de SM

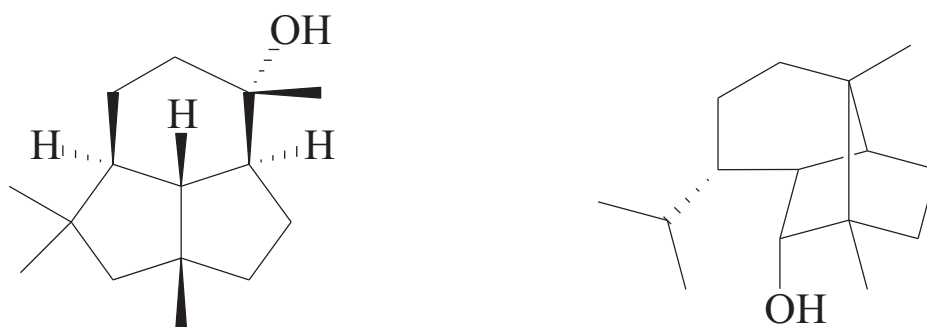
Les composés en *italique* ont été identifiés par comparaison avec les bibliothèques commerciales (19, 21)

Les composés en *italique* et en **gras** ont été identifiés, également, par RMN du carbone-13

**Ir** : Indices de rétention calculés sur colonne apolaire (**a**) et sur colonne polaire (**p**)

Les abondances sont données sur colonne apolaire (sauf lors de coélution : pourcentages donnés sur colonne polaire)

Figure 31 : structures et déplacements chimiques du présilphiperfolane-9 $\alpha$ -ol (**O1**) et du copabornéol (**O2**) mesurés dans les fractions FO9 et FO7 et décrits dans la bibliothèque « laboratoire » (lab)



<b>O1 : présilphiperfolane-9<math>\alpha</math>-ol</b>			<b>O2 : copabornéol</b>	
$\delta$ (lab)	$\delta$ FO9 (ppm)		$\delta$ (lab)	$\delta$ FO7 (ppm)
76,14	76,13	s	86,23	86,07
63,87	63,82	d	52,05	51,96
62,21	62,15	d	50,04	50,02
60,89	60,86	d	49,07	49,05
58,75	58,71	t	49,01	48,97
46,63	46,62	s	41,48	41,48
45,44	45,39	t	31,90	31,92
45,35	45,33	t	28,86	28,88
42,16	42,14	s	26,06	26,09
30,94	30,94	q	24,97	24,97
29,71	29,72	t	23,65	23,65
28,81	28,82	q	20,82	20,82
27,01	27,00	t	20,47	20,49
22,09	22,10	q	19,72	19,73
21,77	21,73	q	13,40	13,42

Les intensités relativement importantes (respectivement voisines de 2 et de 7 pour **O1** et **O2**) des valeurs des déplacements chimiques permettent de repérer les 15 carbones de chaque constituant. De plus, chaque composé est identifié par au minimum 80% des carbones lui appartenant en propre. Enfin, les variations des déplacements chimiques observées entre les valeurs du mélange et celles des spectres de référence sont inférieures ou égales 0,09 ppm (excepté pour le carbone de **O2** portant la fonction hydroxyle).

## 5- Etude des composés absents des bibliothèques propres au laboratoire

Nous nous sommes particulièrement attachés à l'identification des 18 composés présents dans les fractions FO1 et FO2 avec une abondance relative intéressante et dont les caractéristiques ne correspondent à aucune des références de nos bibliothèques « laboratoire ». Seize d'entre eux sont repérés sur le chromatogramme reconstitué de la première fraction (figure 32) et les 2 autres (**A4** et **B4**) sur le chromatogramme reconstitué de la seconde (figure 33).

Pour deux de ces composés, aucune structure n'est proposée par les bibliothèques ni par la littérature. Pour les seize autres : les structures de 4 composés sont évoquées dans la littérature seulement, les structures de 5 composés sont proposées par les bibliothèques commerciales seulement et pour les 7 composés restants des propositions souvent différentes sont faites par la littérature et par les bibliothèques commerciales. En bref, ces seize autres composés n'ont pu être identifiés avec certitude de la manière dont nous avons procédé jusqu'à présent. Selon les bibliothèques il s'agit d'esters monoterpéniques. Dans une large mesure, les propositions sont confortées par les travaux de Hendriks et coll. (246) qui ont relevé la présence d'esters dérivés du nérol, du thymol et du bornéol dans une huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*. Les premières propositions de structures pour ces composés sont reprises dans le tableau 11.

Les études des chromatogrammes et des spectres de masse explicitées à la suite, les propositions des banques commerciales et de la littérature nous conduisent à répartir les 18 composés en 5 groupes désignés par les lettres de **A** à **E** :

- Groupe **A** : quatre esters dérivés du thymol (**A1-A4**). **A1**, **A2** et **A3** se caractérisent par une forte abondance en ions à  $m/z$  150 et à  $m/z$  135 tandis que **A4** se distingue par une forte abondance en ions à  $m/z$  83 et à  $m/z$  55. Les ions moléculaires sont respectivement observés à  $m/z$  220 (**A1**), à  $m/z$  234 (**A2** et **A3**) et à  $m/z$  232 (**A4**).

- Groupe **B** : quatre esters dérivés du 8,9-déhydrothymol (**B1-B4**). **B1**, **B2** et **B3** se caractérisent par une forte abondance en ions à  $m/z$  148 et à  $m/z$  133 tandis qu'à l'instar de **A4**, **B4** se distingue par une forte abondance en ions à  $m/z$  83 et à  $m/z$  55. Les ions moléculaires sont respectivement observés à  $m/z$  218 (**B1**), à  $m/z$  232 (**B2** et **B3**) et à  $m/z$  230 (**B4**).
- Groupe **C** : trois esters dérivés du bornéol ou de l'isobornéol (**C1-C3**). Les ions moléculaires sont respectivement observés à  $m/z$  224 (**C1**) et à  $m/z$  238 (**C2** et **C3**) et les pics de base à  $m/z$  43 (**C1**) et à  $m/z$  57 (**C2** et **C3**).
- Groupe **D** : quatre esters dérivés du nérol ou du géraniol (**D1-D4**).
- Groupe **E** : trois esters dérivés du lavandulol.

Les pics moléculaires des composés des groupes **D** et **E** sont trop faibles (de l'ordre de 0,1%) voire absents, et ne peuvent être exploités. Pour tous les composés, les pics de base sont à  $m/z$  41, excepté pour le composé **E1** qui présente un pic de base à  $m/z$  43).

Afin d'élucider la structure de ces composés par comparaison de leurs indices de rétention et de leurs données spectrales avec ceux d'échantillons authentiques, nous avons synthétisé une grande partie des esters proposés (marqués d'un astérisque dans le tableau 11) et un certain nombre de leurs isomères.

Enfin, nous avons soumis les fractions FO1 et FO2 à une analyse par CPG/SM-IC (ionisation chimique) en utilisant le méthane et l'ammoniac comme gaz ionisants. En outre, la mise en oeuvre de cette technique nous permettra d'évaluer son apport à l'étude de ce type de composés.



Figure 32 : chromatogramme reconstitué (agrandissement) de la fraction FO1  
(colonne polaire)

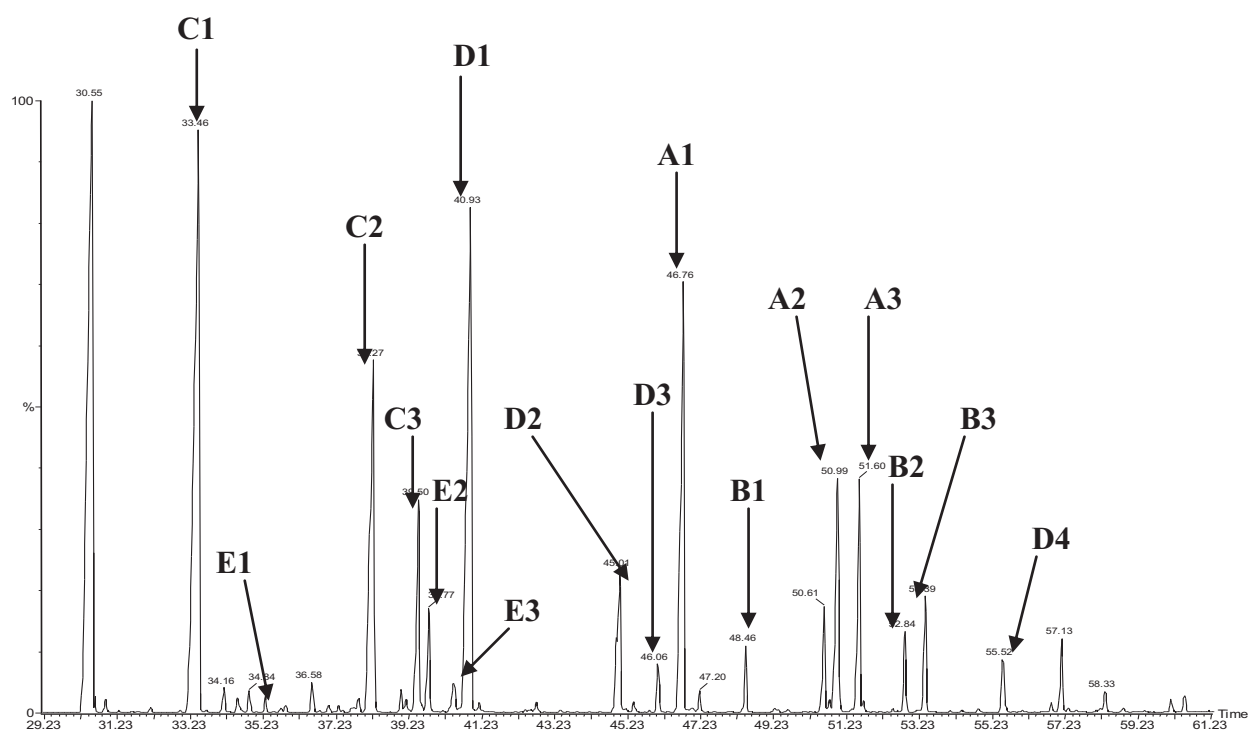


Figure 33 : chromatogramme reconstitué (agrandissement) de la fraction FO2  
(colonne polaire)

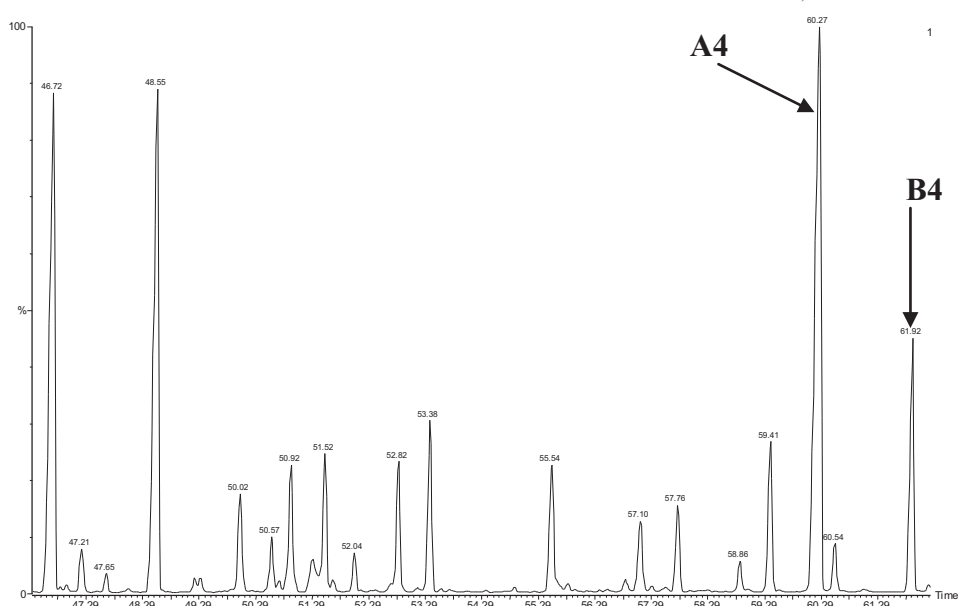


Tableau 11 : propositions des bibliothèques commerciales et de la littérature sur la base des résultats obtenus par CPG/Ir et CPG/SM-IE

<b>Composés</b>	<b>Ir a</b>	<b>Ir p</b>	<b>M<sup>+</sup></b>	<b>Principaux ions (m/z)</b>	<b>Proposition de structure</b>	<b>Bibliothèques/littérature</b>	<b>Ir a'</b>	<b>M</b>
<b>A1</b>	1458	1889	220	150, <b>135</b> , 43	isobutyrate de thymyle *	König-Joulain (19)	1462	220
					butyrate de thymyle *	Hendriks et coll. (246)	1463	220
<b>A2</b>	1551	1964	234	150, 135, <b>57</b>	isovalérate de thymyle *	Hendriks et coll. (19)	1553	243
<b>A3</b>	1551	1975	234	150, <b>135</b> , 57	tiglate de thymyle	Hendriks et coll. (246)	1637	232
<b>A4</b>	1634	2169	232	<b>83</b> , 55	isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle	König-Joulain (19)	1458	218
<b>B1</b>	1454	1922	218	<b>148</b> , 133, 43	butyrate d'a phényle (?)	Hendriks et coll. (246)	1454	218
<b>B2</b>	1548	1996	232	148, 133, <b>57</b>	isovalérate d'a phényle (?)	Hendriks et coll. (19)	1550	232
<b>B3</b>	1548	2006	232	<b>148</b> , 133, 57	tiglate d'a phényle (?)	Hendriks et coll. (19)	1632	230
<b>B4</b>	1627	2205	230	<b>83</b> , 55	isobutyrate d'isobornyle *	König-Joulain (246)	1424	224
<b>C1</b>	1402	1641	224	136, 121, 95, 93, 71, <b>43</b> , 41	isovalérate d'isobornyle *	König-Joulain (19)	1516	238
<b>C2</b>	1494	1729	238	136, 121, 95, 93, 71, <b>57</b> , 41	2-méthylbutyrate d'isobornyle *	Adams (21)	238	238
<b>C3</b>	1501	1753	238	136, 121, 95, 93, 71, <b>57</b> , 41	isovalérate de bornyle *	Hendriks et coll. (246)	1506	238
<b>D1</b>	1469	1780	-	136, 121, 93, 69, 43, <b>41</b>	isobutyrate de néryle *	König-Joulain (19)	1468	224
					(iso?)butyrate de néryle *	Hendriks et coll. (246)	1470	224
<b>D2</b>	1554	1857	-	136, 121, 93, 69, 57, <b>41</b>	2-méthylbutyrate de géranyle *	König-Joulain (19)	1591	238
					isovalérate de néryle *	Hendriks et coll. (246)	1555	238
<b>D3</b>	1560	1877	-	136, 121, 93, 69, 57, <b>41</b>	isovalérate de géranyle *	Wiley (34)	238	238
					isovalérate de géranyle *	Hendriks et coll. (246)	1562	238
<b>D4</b>	1652	2054	-	136, 121, 93, 83, 69, 55, <b>41</b>	tiglate de géranyle	Adams (21), Wiley (34)	236	236
					tiglate de néryle	Hendriks et coll. (246)	1654	236

<b>E1</b>	1410	1677	-	136, 121, 93, 69, <b>43</b> , 41	isobutyrate de lavandulyle *	Adams (21)	224
<b>E2</b>	1490	1759	-	136, 121, 93, 69, 57, <b>41</b>	2-méthylbutyrate de lavandulyle *	Adams (21)	238
<b>E3</b>	1494	1771	-	136, 121, 93, 69, 57, <b>41</b>	isovalérate de lavandulyle *	Adams (21)	238

**Ir** : indices de rétention calculé sur colonne apolaire (**a**) et sur colonne polaire (**p**)

**M<sup>+</sup>** : ions moléculaires observés (abondance relative > à 0,1%)

En **gras** : Pic de base des spectres de masse

\* : composés synthétisés

**Ir a'** : indices de rétention apolaire de la littérature (246) ou de la bibliothèque König-Joulain (19)

**M** : masse moléculaire des composés proposés par la littérature (246) ou la bibliothèque König-Joulain (19)

## 5-1- Identification des composés par CPG/Ir et CPG/SM-IE

### ***a- Etude des composés A1, A2 et A3***

#### ▪ Etude du composé A1 :

S'agissant du composé **A1**, la bibliothèque commerciale König-Joulain (19) propose la structure de l'isobutyrate de thymyle alors que Hendriks et coll. (246) font état dans l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum* de la présence de butyrate de thymyle, isomère du précédent.

Sur le spectre de masse du composé **A1**, obtenu à partir du pic correspondant sur le chromatogramme reconstitué, l'ion moléculaire ( $m/z$  220) est facilement repéré. Le pic à  $m/z$  135 est le pic de base. Enfin, les ions à  $m/z$  43 et à  $m/z$  150 ont des abondances relatives importantes (respectivement de 90% et de 58%). Il est à rappeler que les pics à  $m/z$  150 et à  $m/z$  135 sont caractéristiques du fragment thymyle selon qu'il y ait perte ou non d'un groupement méthyle.

Nous avons réalisé l'hémisynthèse des deux butyrates isomères et nous les avons soumis à la même séquence analytique que la fraction FO1 contenant **A1**.

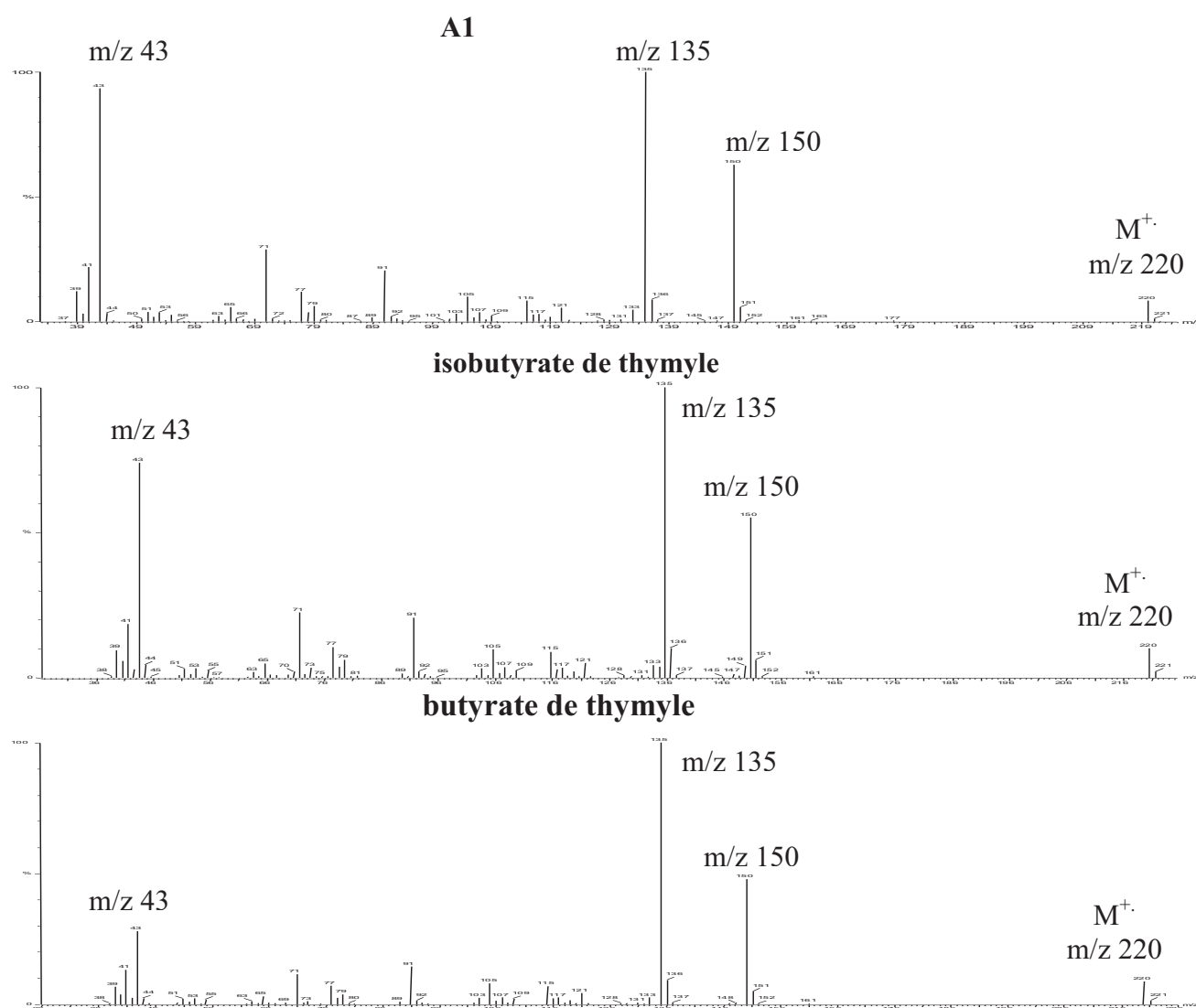
Le tableau 12 récapitule les indices de rétention de **A1** et des deux esters de thymyle synthétisés ainsi que les abondances relatives des ions caractéristiques. Tant au niveau des indices de rétention apolaire et polaire qu'au niveau des spectres de masse donnés à la figure 34, les données de **A1** sont assimilables à celles de l'isobutyrate de thymyle et se différencient nettement de celles du butyrate de thymyle.

En conclusion et conformément à la proposition de la bibliothèque commerciale König-Joulain (19), nous identifions le composé **A1** comme étant l'isobutyrate de thymyle.

Tableau 12 : comparaison des indices de rétention et des principaux ions du composé **A1** avec ceux des composés synthétisés

Composés	m/z			Indices de rétention	
	43	135	150	Ir a	Ir p
<b>A1</b>	90%	100%	58%	1458	1889
isobutyrate de thymyle	74%	100%	53%	1462	1892
butyrate de thymyle	27%	100%	47%	1509	1970

Figure 34 : spectres de masse obtenus par CPG/SM-IE de **A1**, de l'isobutyrate de thymyle et du butyrate de thymyle



▪ Etude des composés **A2** et **A3** :

Pour les composés **A2** et **A3**, les différentes bibliothèques commerciales ne proposent aucune structure avec une probabilité acceptable pour une masse molaire de 234 et un indice de rétention apolaire de 1553. Hendriks et coll. (246) évoquent la présence de l'isovalérate de thymyle dans une huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*.

Nous repérons un ion moléculaire à  $m/z$  234 à partir du chromatogramme reconstitué de la fraction FO1 analysée sur colonne apolaire et deux ions moléculaires à  $m/z$  234 par une analyse conduite sur colonne polaire. **A2** et **A3** coéluent donc sur colonne apolaire alors qu'ils sont individualisés sur colonne polaire. Les principaux fragments issus des composés **A2** et **A3** sont reportés dans le tableau 13.

Les spectres de masse de **A2** et **A3** semblables entre eux, diffèrent de celui de **A1** notamment par le pic à  $m/z$  57, en remplacement de celui à  $m/z$  43 ; ce qui signifie la présence d'un groupe méthylénique supplémentaire par rapport au fragment alcoyle de **A1**.

Nous avons réalisé l'hémisynthèse du valérate de thymyle et de ses deux isomères l'isovalérate et le 2-méthylbutyrate. Afin d'accéder aux spectres de masse et aux indices de rétention des différents isomères, nous les avons soumis à la même séquence analytique que la fraction FO1 contenant **A2** et **A3**. Le tableau 13 récapitule les indices de rétention de **A2**, **A3** et des esters synthétisés ainsi que les abondances relatives des ions caractéristiques. Les spectres de masse des composés synthétisés et ceux des composés **A1**, **A2** et **A3** sont présentés dans l'annexe 1.

Un raisonnement analogue à celui appliqué précédemment pour **A1** nous conduit à identifier **A2** comme étant le 2-méthylbutyrate de thymyle et **A3** comme étant l'isovalérate de thymyle.

Tableau 13 : comparaison des indices de rétention et des principaux ions des composés **A2** et **A3** avec ceux des composés synthétisés

Composés	m/z			Indices de rétention	
	57	135	150	Ir <i>a</i>	Ir <i>p</i>
<b>A2</b>	100%	86%	65%	1551	1964
<b>A3</b>	33%	100%	66%	1551	1975
2-méthylbutyrate de thymyle	100%	75%	58%	1555	1967
isovalérate de thymyle	35%	100%	63%	1555	1980
valérate de thymyle	37%	100%	71%	1602	2061

Les ions alcoyles caractéristiques  $C_3H_7^+$  à m/z 43 et  $C_4H_9^+$  à m/z 57 sont issus :

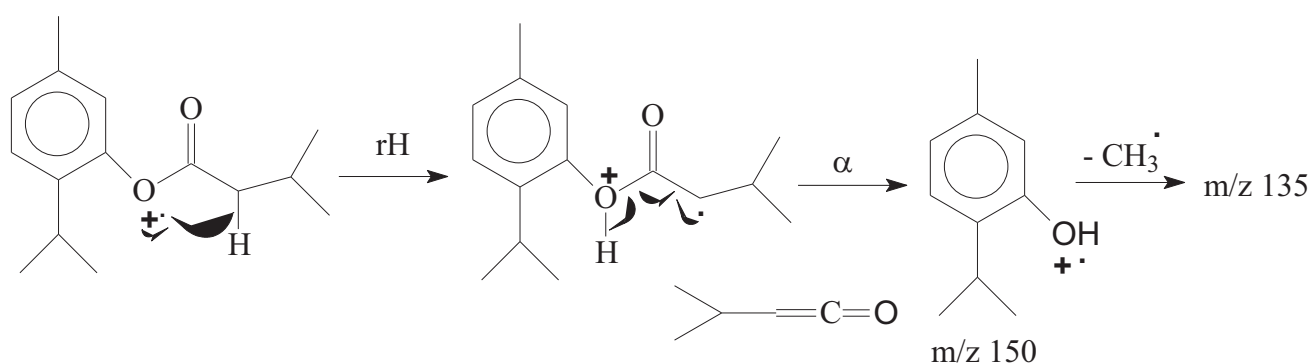
- soit d'un clivage par induction (i) touchant la partie acyle de l'ester qui se réalise avec une migration de la charge portée par l'hétéroatome vers le carbone voisin.

- soit d'un clivage par induction (i) à partir des ions acylium  $RCO^+$  résultant de la fragmentation en  $\alpha$  du carbonyle du côté alkoxy (figure 35).

Ces mécanismes de fragmentations sont décrits dans la littérature relative aux fragmentations des esters en CPG/SM-IE (8, 32, 280).

Les ions à m/z 150 et à m/z 135 caractéristiques de la masse de la partie aryle sont issus d'un mécanisme de réarrangement d'hydrogène (rH) à 4 centres suivi d'un clivage  $\alpha$  entraînant la perte du groupement  $R=C=O$  (formation de l'ion à m/z 150). L'ion à m/z 150 se fragmente à son tour par perte d'un groupement méthyle conduisant à la formation de l'ion à m/z 135 (figure 35).

A titre d'exemple, pour l'isovalérate de thymyle (**A3**), nous pouvons proposer le mécanisme de fragmentation suivant (32) :



### ***b- Etude des composés B1, B2 et B3***

Comme précédemment, sur le chromatogramme reconstitué de la fraction oxygénée FO1 analysée sur colonne apolaire, nous repérons des spectres de masse possédant deux ions moléculaires, l'ion à  $m/z$  218 et l'autre à  $m/z$  232, tandis que sur colonne polaire nous repérons trois ions moléculaires : l'un à  $m/z$  218 ; les deux autres à  $m/z$  232. De la même façon, nous sommes en présence de 2 composés coéluant sur colonne apolaire alors qu'ils sont individualisés sur colonne polaire.

La bibliothèque König-Joulain (19) propose la structure de l'isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle pour le composé **B1** de masse molaire 218 et ne fait aucune proposition pour les composés **B2** et **B3** de masse molaire 232.

Hendriks et coll. (246) font état de la présence, dans une huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*, de composés qu'ils dénomment : butyrate d' $\alpha$ -phényle (?) de masse molaire 218 et isovalérate d' $\alpha$ -phényle (?) de masse molaire 232.

Les indices de rétention et les principaux pics des spectres de masse sont repris dans le tableau 14. Les spectres de masse des composés **B1**, **B2** et **B3** sont donnés dans l'annexe 2.

Tableau 14 : Indices de rétention et principaux ions des composés **B1**, **B2** et **B3**

Composés	m/z				Indices de rétention	
	43	57	133	148	Ir <i>a</i>	Ir <i>p</i>
<b>B1</b>	96%		31%	100%	1454	1922
<b>B2</b>		100%	25%	96%	1548	1996
<b>B3</b>		37%	26%	100%	1548	2006

La comparaison des spectres de masse des composés **A1**, **A2**, **A3** et **B1**, **B2**, **B3** met en évidence (figure 35) :

- une différence de masse molaire de deux unités aussi bien entre la masse molaire de **A1** (M=220) et celle de **B1** (M=218) qu'entre la masse molaire de **A2-A3**



(M=232) et celle de **B2-B3** (M=230). Cette même différence se retrouve entre les masses des ions m/z 150 et m/z 135 (composés du groupe **A**) et celles respectivement des ions m/z 148 et m/z 133 (composés du groupe **B**). De cela nous déduisons l'existence d'une double liaison supplémentaire sur la partie aryloxy de la molécule d'ester.

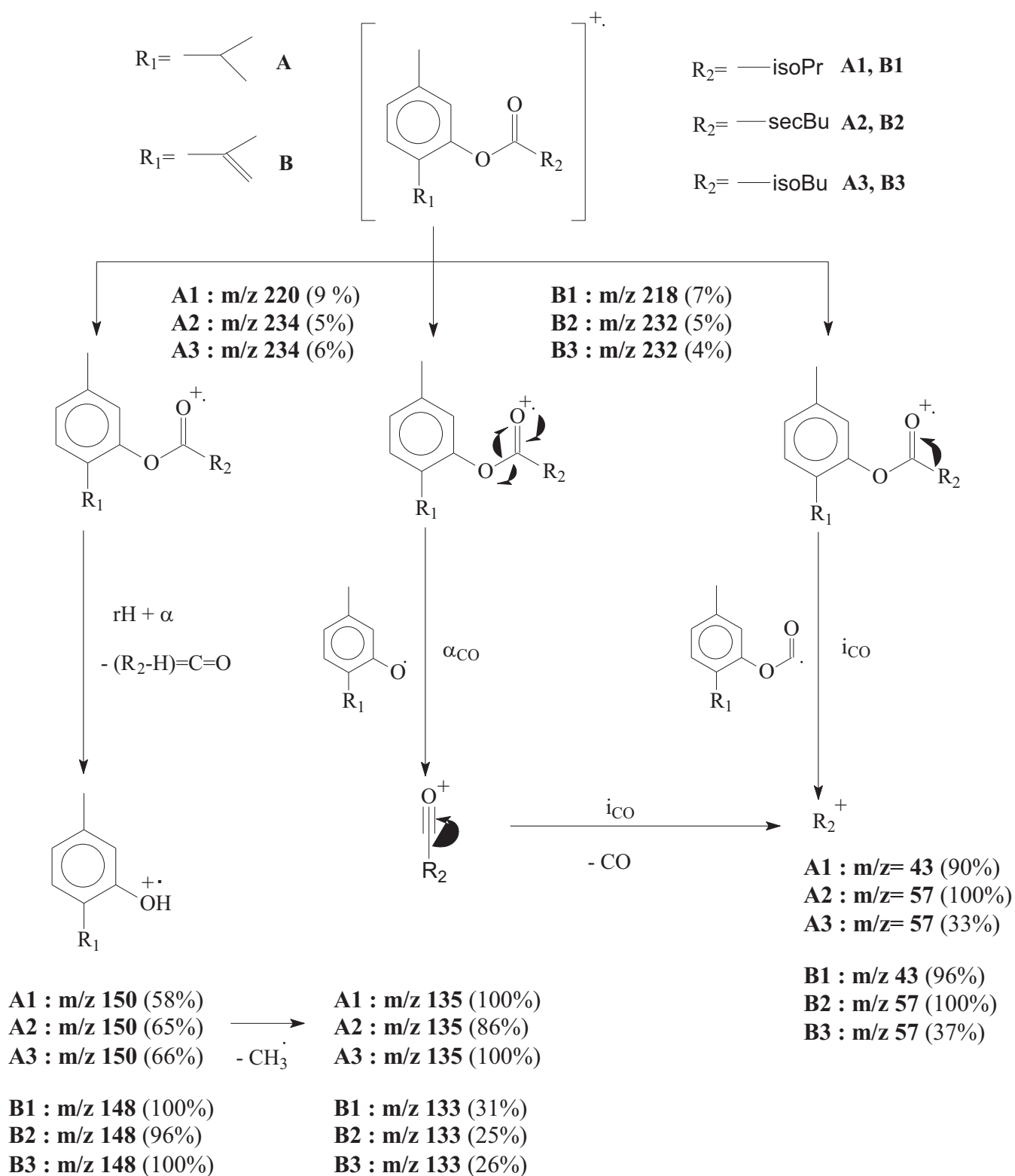
- une différence de masse de 14 unités entre les masses moléculaires du composé **B1** (M=218) et celles des composés **B2** et **B3** (M=232) suggérant la présence d'un groupement méthylénique CH<sub>2</sub> supplémentaire dans les molécules de **B2** et **B3**. Cette différence se retrouve entre les masses des carbocations alcoyles de **B1** (m/z 43) et ceux de **B2** et **B3** (m/z 57) indiquant que le groupement CH<sub>2</sub> se situe dans la partie acyle de l'ester.

- une plus grande stabilité des pics à m/z 148 (composés du groupe **B**) en regard des pics à m/z 150 (composés du groupe **A**), en effet, le rapport des intensités des pics m/z 133 / m/z 148 est d'environ 0,3 alors que celui des intensités des pics m/z 135 / m/z 150 varie entre 1,1 et 1,5. Ces observations laissent supposer que l'ion à m/z 148 est plus stable que l'ion à m/z 150 du fait de la présence d'une double liaison supplémentaire conjuguée au cycle aromatique.

- des similitudes entre les spectres des composés **A2-B2** et **A3-B3** ; l'ion alcoyle à m/z 57 est le pic de base des composés **A2** et **B2** alors que ses intensités sont de respectivement 33% et 37% pour **A3** et **B3**. Ceci est dû au fait que le cation *sec*-butyle formé pour les composés **A2** et **B2** est plus stable que le cation *iso*-butyle formé pour les composés **A3** et **B3** .

Ces fortes analogies entre les données spectrales des composés du groupe **A** et ceux du groupe **B** conduisent à identifier les composés **B1**, **B2** et **B3** comme étant respectivement l'isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle en accord avec la bibliothèque König-Joulain (19), le 2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle et l'isovalérate de 8,9-déhydrothymyle. Toutefois, afin de conforter leur identification, ces composés seront soumis à des analyses complémentaires (cf. paragraphe 5-2)

Figure 35 : principales fragmentations en CPG/SM-IE de A1-A3 et B1-B3



### ***c- Etude des composés A4 et B4***

Nous repérons un ion moléculaire  $m/z$  232 (composé **A4**) et un ion moléculaire  $m/z$  230 (composé **B4**) à partir du chromatogramme reconstitué de la fraction FO2 analysée sur colonne apolaire et sur colonne polaire. Pour ces composés, les différentes bibliothèques commerciales ne proposent aucune structure acceptable.

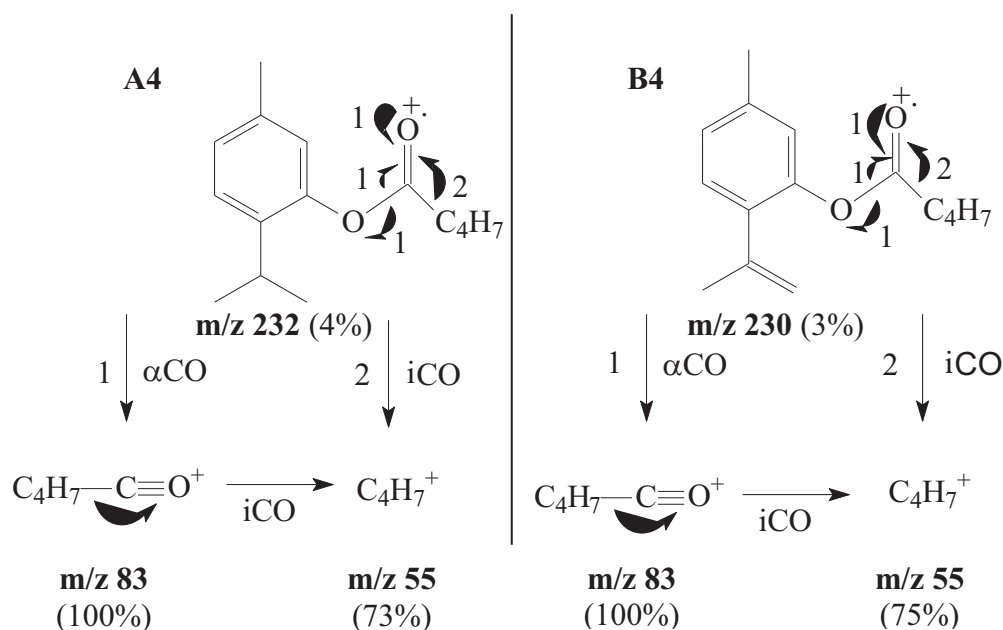
Hendriks et coll. (246) ont cependant rapporté la présence de tiglate de thymyle de masse molaire 232 et d'un tiglate d' « a-phényle » (?) de masse molaire 230 dans l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*.

Sur la base des travaux d'Hendriks précités et de l'examen des spectres présentés ci-après, nous sommes conduits à faire l'hypothèse d'un ester de thymyle pour **A4** et d'un ester de 8,9-déhydrothymyle pour **B4**. Les spectres de masse (donnés en annexe 3) présentent deux pics intenses, l'un à  $m/z$  83 (correspondant à l'ion  $C_4H_7CO^+$  et, dans les deux cas, constituant le pic de base), l'autre à  $m/z$  55 relatif à l'ion  $C_4H_7^+$ . Ces ions acylium et alcoyle résultent des fragmentations de part et d'autre du □groupement carbonyle de la fonction ester. Ces ions sont en accord avec la présence d'un groupement tiglate (ou isomère) dans les composés **A4** et **B4** (figure 36 et annexe 3).

L'absence des ions caractéristiques aryloxy et aryle à  $m/z$  150 et  $m/z$  135 pour le composé **A4** (caractéristiques du groupement thymyle) et à  $m/z$  148 et  $m/z$  133 pour le composé **B4** (caractéristiques du groupement 8,9-déhydrothymyle) s'explique probablement par un blocage du mécanisme de réarrangement d'hydrogène (rH) du fait de la conjugaison entre le carboxyle et la double liaison du groupement alkényle. En effet, pour qu'il y ait réarrangement d'hydrogène (rH) l'ion moléculaire doit passer par un état intermédiaire à 4 centres ; la présence d'une double liaison conjuguée empêche cet état.

A ce stade de l'étude, nous ne disposons d'aucun élément pour préciser l'isomérisie de la partie acyle (tiglate ou angélate). Sur la base de nos résultats, en accord avec ceux de la littérature (241), nous pouvons néanmoins raisonnablement suggérer les structures du tiglate de thymyle et du tiglate de 8,9-déhydrothymyle respectivement pour les composés **A4** et **B4**. Ces composés feront l'objet d'analyses complémentaires afin de préciser leur structure (cf. paragraphe 5-2).

Figure 36 : principales fragmentations en CPG/SM-IE de **A4** et **B4**



#### *d- Etude des composés C1, C2 et C3*

A partir du chromatogramme reconstitué de la fraction oxygénée FO1 analysée sur colonnes apolaire et polaire, nous repérons un ion moléculaire à  $m/z$  224 (composé **C1**) et deux ions moléculaires à  $m/z$  238 (composés **C2** et **C3**).

Pour le composé **C1**, la bibliothèque König-Joulain (19) propose la structure de l'isobutyrate d'isobornyle. Pour les composés **C2** et **C3**, les banques König-Joulain (19) et Wiley (34) proposent la structure de l'isovalérate d'isobornyle tandis que la banque Adams (21) propose celle du 2-méthylbutyrate d'isobornyle (tableau 11). Hendriks et coll (246) font état de la présence d'isovalérate de bornyle dans une huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*.

Nous avons réalisé l'hémisynthèse des butyrate et valérate de bornyle et d'isobornyle ainsi que de tous leurs isomères (isobutyrate, isovalérate, 2-méthylbutyrate). Soit un total de 10 composés. A fin de comparaison, le tableau 15 reprend les principaux fragments des composés **C1**, **C2**, **C3** et des composés synthétisés. Les spectres de masse des composés **C1** à **C3** sont donnés à l'annexe 4.

Tableau 15 : Indices de rétention et principaux ions des composés **C1**, **C2** et **C3** et des composés synthétisés

Composés	m/z									Indices	
	41	43	57	71	85	93	95	121	136	Ir <i>a</i>	Ir <i>p</i>
isobut. de bornyle	50	100	5	69	-	49	72	38	41	1404	1647
butyrate de bornyle	44	68	4	100	-	60	91	43	48	1454	1730
isobut. d'isoborn.	65	100	3	45	-	57	41	36	31	1422	1683
butyrate d'isoborn.	55	75	4	100	-	62	83	41	39	1485	1747
<b>C1</b>	51	100	5	56	-	37	50	23	29	<b>1402</b>	<b>1641</b>
<b>C2</b>	43	11	100	1	35	26	29	15	23	<b>1494</b>	<b>1729</b>
<b>C3</b>	76	35	100	2	76	49	58	29	41	<b>1501</b>	<b>1753</b>
2-métbut. de bornyle	40	14	100	1	36	37	44	19	28	1498	1735
isoval. de bornyle	78	37	100	3	94	59	78	44	57	1503	1760
valérate de bornyle	77	26	94	3	92	70	100	57	66	1547	1831
2-métbut. d'isoborn.	50	12	100	2	24	14	18	8	11	1518	1735
isoval. d'isoborn.	76	42	85	2	79	100	69	69	65	1513	1775
valérate d'isoborn.	68	24	76	3	71	100	82	79	70	1460	1845

isobut. = isobutyrate, isoval. = isovalérate, 2-métbut. = 2-méthylbutyrate

isoborn. = isobornyle

Les fragmentations conduisant aux principaux signaux des spectres sont schématisées à la figure 37.

Les signaux intenses à m/z 71 pour **C1** et à m/z 85 pour **C2** et **C3** correspondent aux ions acylium issus d'une fragmentation  $\alpha$ CO (figure 37 et annexe 4).

Les pics de base correspondent aux ions alcoyles  $C_3H_7^+$  (m/z 43) pour le composé **C1** et  $C_4H_9^+$  (m/z 57) pour les composés **C2** et **C3**. Ces ions sont issus d'un clivage par induction touchant la partie acyle de l'ester avec une migration de la

charge portée par l'hétéroatome vers le carbone voisin. Cependant ce clivage est également possible à partir des ions acylium  $\text{RCO}^+$ .

L'ion 2,3-diméthylcyclopentényle  $\text{C}_7\text{H}_{11}^+$  ( $m/z$  95) se forme par perte d'un groupement méthyle à partir de l'ion radicalaire 1,1,2-triméthylcyclopentanyle ( $m/z$  110). Il s'agit de la décomposition de l'ion moléculaire par rupture du squelette bicyclo [2.2.1]décane suivie d'une élimination de  $\text{CH}_2=\text{CH-O-COR}$  (281).

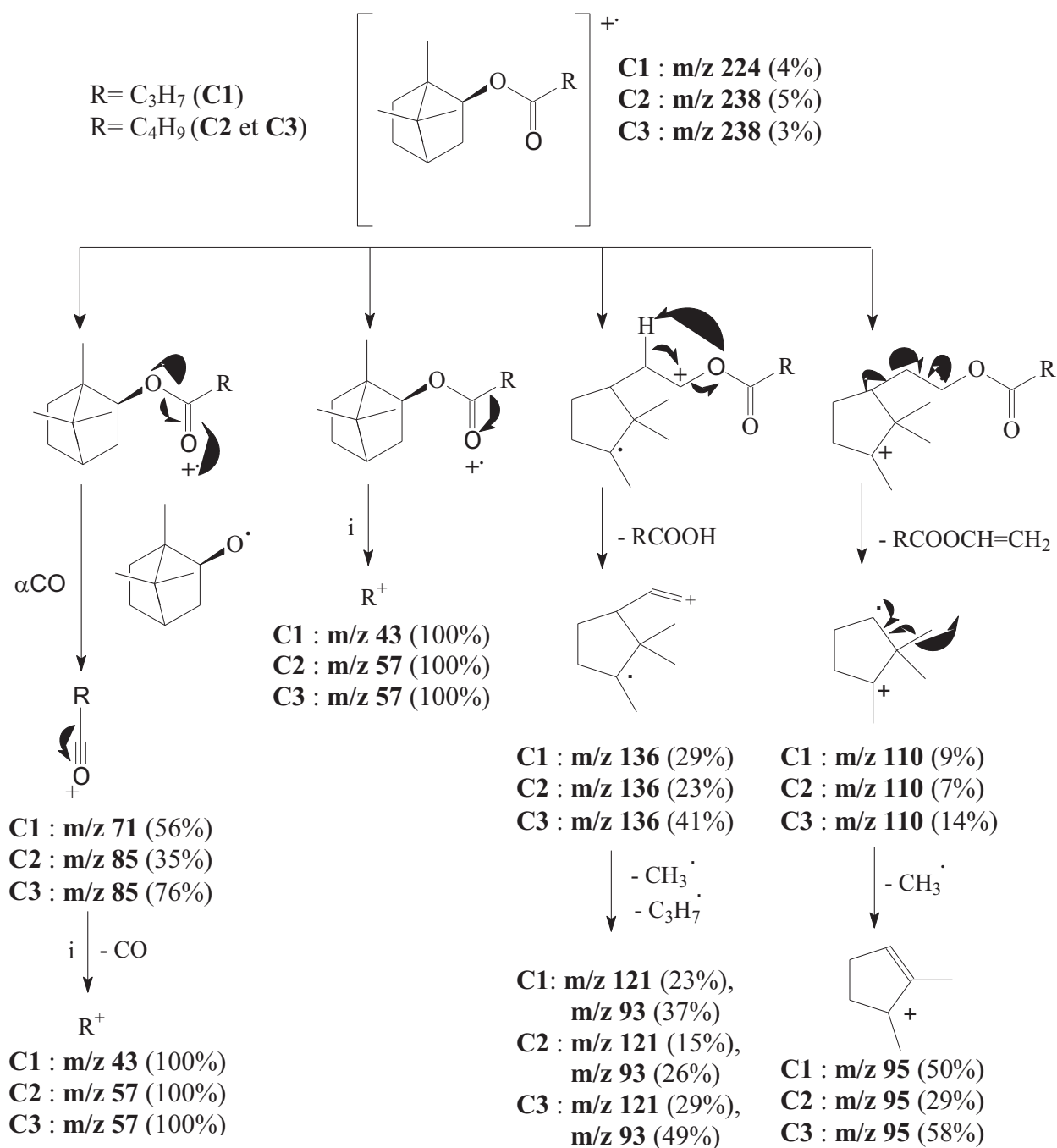
L'ion correspondant au pic  $m/z$  136 est issu d'une fragmentation (clivage par induction) entraînant l'élimination d'une molécule neutre acide intervenant à la suite d'une migration d'hydrogène ; l'intermédiaire formé va subir un clivage par induction avec migration de la charge ( $rH + i$ ).

Enfin, les ions à  $m/z$  93 et à  $m/z$  121 proviennent de l'ion  $[\text{M-RCOOH}]^+$  à  $m/z$  136 par perte respectivement d'un fragment de masse 43 ( $\text{C}_3\text{H}_7$ ) et d'un fragment de masse 15 ( $\text{CH}_3$ ) (282). L'élimination du groupement neutre carboxyle est bien indiquée par l'intensité des ions à  $m/z$  136 et à  $m/z$  121 (figure 37 et annexe 4).

Les spectres de masse observés pour les composés **C1**, **C2** et **C3** sont semblables à ceux observés pour les composés de même masse molaire synthétisés. Sur la base des spectres de masse, il ne nous est pas possible de conclure quant à la nature exacte de l'isomère : butyrate ou isobutyrate de bornyle ou d'isobornyle, pour **C1**, valérate, isovalérate, 2-méthylbutyrate de bornyle ou d'isobornyle pour **C2** et **C3**.

Le tableau 15 reprend également les indices de rétention polaires et apolaires des composés **C1**, **C2**, **C3** et de tous les composés isomères synthétisés. De la comparaison sur la base de ces éléments, nous pouvons raisonnablement identifier les composés **C1**, **C2** et **C3** comme étant respectivement l'isobutyrate de bornyle, le 2-méthylbutyrate de bornyle et l'isovalérate de bornyle.

Figure 37 : principales fragmentations en CPG/SM-IE de C1, C2 et C3



### *e- Etude des composés D1, D2, D3, D4 et E1, E2, E3*

Les bibliothèques commerciales et la littérature proposent des esters dérivant du nérol, ou du géraniol pour les composés **D1** à **D4** et des esters dérivant du lavandulol pour les composés **E1** à **E3** (tableau 11). La seule utilisation de ces bibliothèques ne permet pas de déterminer sans ambiguïté la structure de ces composés. En effet, l'identification de ces molécules en impact électronique est rendue difficile par les trop nombreuses et trop fortes similitudes dans les spectres de masse (annexes 5 et 6). Par exemple :

- m/z 41 (**D1**: 100%, **D2** : 100%, **D3** : 100%, **D4** : 100%, **E1**: 92%, **E2** : 100%, **E3** : 100%) ;
- m/z 69 (**D1**: 95%, **D2** : 84%, **D3** : 88%, **D4** : 90%, **E1**: 95%, **E2** : 91%, **E3** : 93%) ;
- m/z 93 (**D1**: 68%, **D2** : 65%, **D3** : 74%, **D4** : 87%, **E1**: 83%, **E2** : 96%, **E3** : 89%) ;
- m/z 121 (**D1**: 27%, **D2** : 22%, **D3** : 25%, **D4** : 30%, **E1**: 27%, **E2** : 33%, **E3** : 29%).

De plus, les ions moléculaires de ces composés sont présents en très faible abondance (environ 0,1%) voire absents.

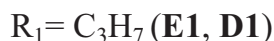
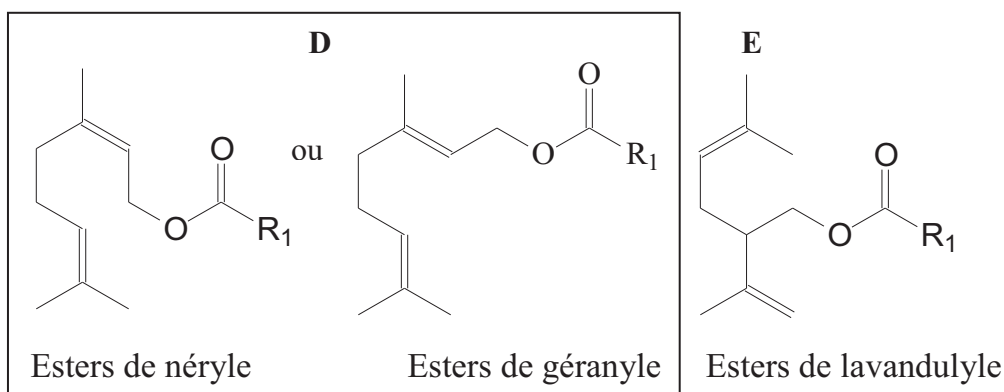
Les informations que nous pouvons obtenir de ces spectres se limitent :

- au niveau des signaux à m/z 43 ( $C_3H_7^+$ ) pour les composés **D1**, **E1** ; à m/z 57 ( $C_4H_9^+$ ) pour les composés **D2**, **D3**, **E2**, **E3** ; et à m/z 55 ( $C_4H_7^+$ ) pour **D4**. Ces ions alcoyles proviennent, notamment, des ions acylium afférents (figure 38) ;

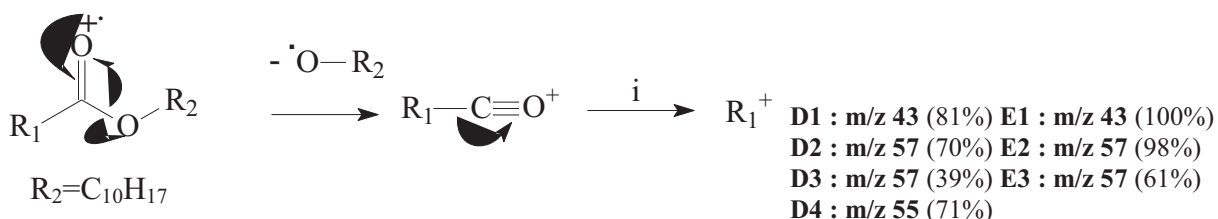
- aux mécanismes de fragmentation entraînant la formation des ions à m/z 69 qui sont en accord avec les structures d'esters dérivant du géraniol, et/ou du nérol et/ou du lavandulol (figure 38) (280).



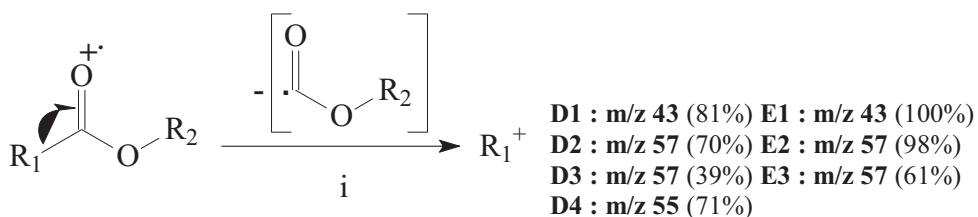
Figure 38 : principales fragmentations en CPG-SM-IE de **D1-D4** et **E1-E3**



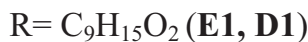
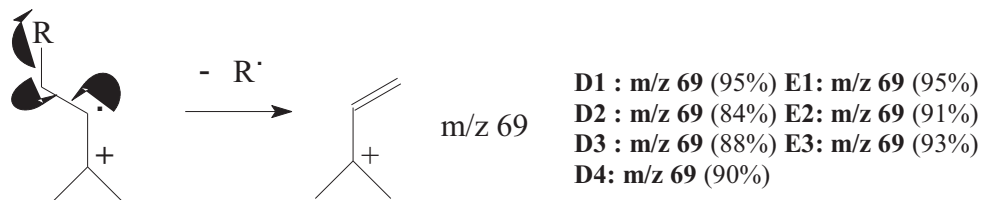
- Mécanismes de fragmentations  $\alpha$ CO du côté alkoxy :



- Clivage par induction touchant la partie acyle de l'ester :



- Mécanismes d'obtention de l'ion à m/z 69 :



Nous avons synthétisé 15 esters terpéniques susceptibles de correspondre aux composés à identifier. Il s'agit d'esters de masse moléculaire 224 (butyrate et isobutyrate) et 238 (isovalérate, 2-méthylbutyrate et valérate) dérivés du nérol, du géraniol et du lavandulol. Les indices de rétention de ces 15 composés calculés sur colonnes apolaire et polaire sont consignés dans le tableau 16.

L'étude de la concordance des indices de rétention des composés à identifier avec ceux des composés synthétisés nous conduit aux identifications suivantes :

<b>D1</b> : isobutyrate de néryle	<b>E1</b> : isobutyrate de lavandulyle
<b>D2</b> : 2-méthylbutyrate de néryle	<b>E2</b> : 2-méthylbutyrate de lavandulyle
<b>D3</b> : isovalérate de néryle	<b>E3</b> : isovalérate de lavandulyle

En ce qui concerne le composé **D4**, ses indices de rétention ne correspondent à aucun de ceux des composés synthétisés. Les bibliothèques commerciales Adams (21) et Wiley (34) proposent la structure du tiglate de géranyle tandis que Hendriks et coll. (246) font état de la présence de tiglate de néryle dans l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*.

Le spectre de masse de **D4** présente deux pics intenses à  $m/z$  83 ( $C_4H_7CO^+$ ) et à  $m/z$  55 ( $C_4H_7^+$ ), correspondant aux ions acylium et alcoyle. Ces ions caractérisent la masse de la partie acyle (figure 38). En accord avec les données de la littérature (241), nous faisons l'hypothèse de la présence du tiglate de néryle de masse molaire 236 dans l'huile essentielle de parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* L. de Corse (subsp. *corsicum*). La structure du composé **D4** doit être précisée par des analyses complémentaires (cf. paragraphe 5-2).

Tableau 16 : attribution de structure aux composés **D1-D4** et **E1-E3** en fonction des indices de rétention

<b>Composés synthétisés</b>	<b>Ir</b>	<b>a</b>	<b>Ir</b>	<b>p</b>	<b>E1</b>	<b>D1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>
isobutyrate de lavandulyle	1407	1680	1410/1677								
butyrate de lavandulyle	1447	1749									
isobutyrate de néryle	1473	1785	1469/1780								
2-méthylbutyrate de lavandulyle	1491	1761	1490/1759								
isobutyrate de géranyle	1494	1785									
isovalérate de lavandulyle	1493	1762	1494/1761								
butyrate de néryle	1518	1863									
butyrate de géranyle	1539	1897									
valérate de lavandulyle	1541	1843									
2-méthylbutyrate de néryle	1557	1863	1554/1857								
isovalérate de néryle	1564	1882							1560/1877		
2-méthylbutyrate de géranyle	1585	1901									
isovalérate de géranyle	1587	1920									
valérate de néryle	1611	1960									
valérate de géranyle	1632	1994									1652/2054

## 5-2- Contribution de la CPG/SM en mode « Ionisation Chimique » à l'identification

Sur les 18 composés, repérés dans les fractions oxygénées de l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum* de Corse, 12 composés ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et de leurs indices de rétention avec les caractéristiques d'échantillons synthétisés, il s'agit de 3 esters de thymyle (**A1-A3**), de 3 esters de bornyle (**C1-C3**), de 3 esters de néryle (**D1-D3**) et de 3 esters de lavandulyle (**E1-E3**). Pour les 6 autres, sans certitude suffisante, nous avons suggéré le tiglate de thymyle (**A4**), le tiglate de néryle (**D4**), et 4 esters de 8,9-déhydrothymyle (**B1-B4**) respectivement l'isobutyrate, le 2-méthylbutyrate, l'isovalérate et le tiglate de 8,9-déhydrothymyle.

Nous avons étudié ces 18 composés par CPG/SM en ionisation chimique positive (ICP) et négative (ICN) en utilisant le méthane (ICP-CH<sub>4</sub>) et l'ammoniac (ICP-NH<sub>3</sub> et ICN-NH<sub>3</sub>) comme gaz réactifs. L'objectif est d'établir les mécanismes de fragmentations de ces esters monoterpéniques en IC afin de conforter l'identification des 12 premiers composés, d'étayer celle des 6 derniers et, ce faisant, d'évaluer la contribution de l'IC à l'identification des constituants d'une huile essentielle.

### ***a- Etude des composés A1, A2 et A3***

#### ▪ En ICP-CH<sub>4</sub>

Nous observons sur les spectres de masse de l'isobutyrate de thymyle (**A1**) plusieurs ions abondants (figure 39) : l'ion à m/z 179 représente le pic de base du spectre, les ions à m/z 151 et m/z 71 ont respectivement des teneurs de 96% et de 40%. Nous observons, aussi, des ions caractéristiques de la masse molaire du composé : l'ion à m/z 249 ([M+C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 4%) provient d'une réaction d'association entre les ions du plasma et l'isobutyrate de thymyle (**A1**) et l'ion à m/z 221 ([M+H]<sup>+</sup>, 35%), d'une réaction de transfert de proton. Les principales fragmentations observées en ICP-CH<sub>4</sub> correspondent à des mécanismes de réarrangement d'hydrogène à 6 centres (figure 40)

qui ont été décrits par Field en 1972 (44). Ainsi, nous observons des ions issus de la perte du groupement  $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{C}=\text{O}$ , après réaction d'association, à  $m/z$  179 (100%) et, après réaction de transfert de proton, à  $m/z$  151 (96%). L'ion à  $m/z$  179 provient également de la perte d'un groupement isopropylène  $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}_2$  après réaction de transfert de proton. Nous observons, enfin, un ion acylium  $[(\text{CH}_3)_2\text{CHCO}]^+$  à  $m/z$  71 (40%) issu d'un clivage par induction avec migration de la charge.

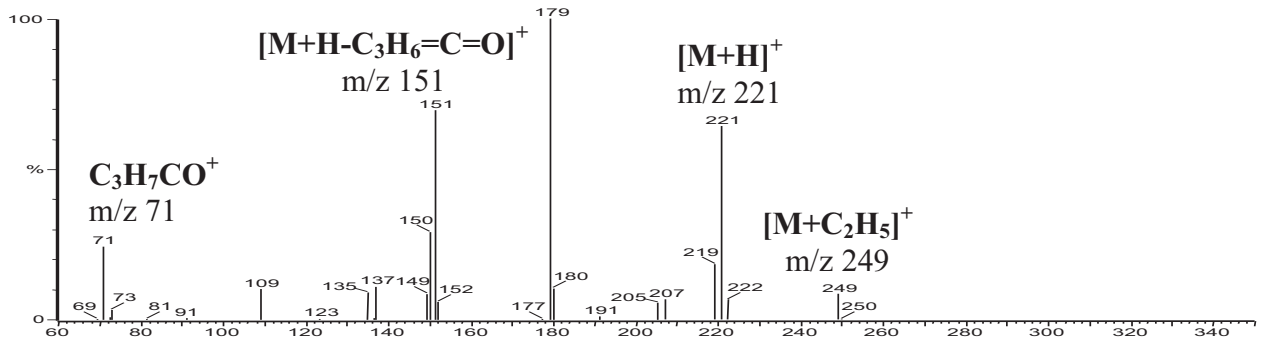
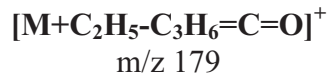
Les réactions d'ionisation et les mécanismes de fragmentation du 2-méthylbutyrate de thymyle (**A2**) et de l'isovalérate de thymyle (**A3**) en ICP- $\text{CH}_4$  sont identiques à ceux observés pour l'isobutyrate de thymyle (**A1**) (figures 39 et 41).

Nous observons, pour ces deux composés, quatre ions abondants à  $m/z$  193, 179, 151 et 85 :

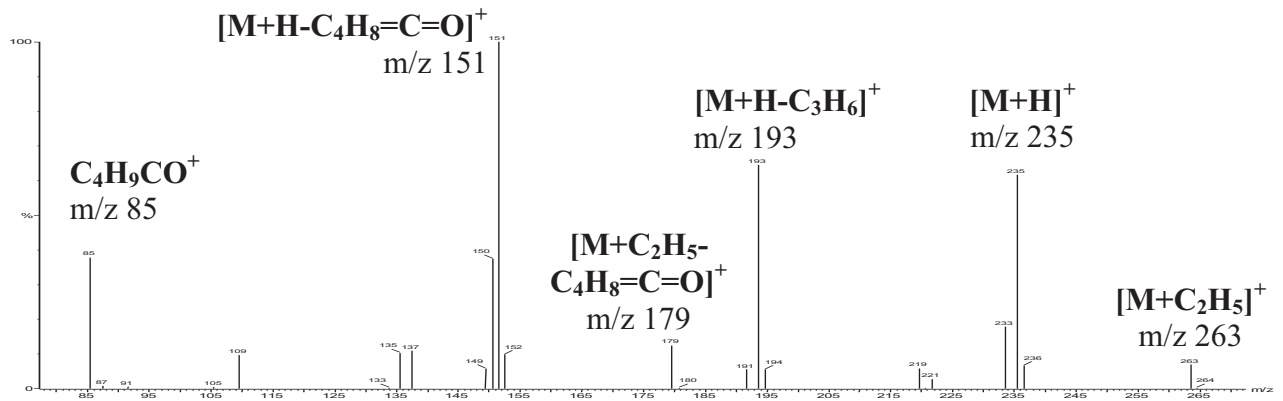
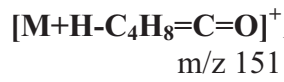
- l'ion à  $m/z$  193 est issu de la perte du groupement isopropylène après réaction de transfert de proton ;
- l'ion à  $m/z$  179, observé a une intensité plus faible que pour l'isobutyrate de thymyle (**A1**), est issu de la perte d'un groupement  $\text{C}_4\text{H}_8=\text{C}=\text{O}$  après réaction d'association ;
- l'ion à  $m/z$  151, pic de base pour ces 2 composés, provient de la perte d'un groupement  $\text{C}_4\text{H}_8=\text{C}=\text{O}$  après réaction de transfert de proton ;
- enfin, l'ion à  $m/z$  85 (caractéristique de la masse de la partie acyle) remplace celui observé à  $m/z$  71 sur le spectre de l'isobutyrate de thymyle (**A1**).

Figure 39 : spectres de masse en ICP-CH<sub>4</sub> de A1, A2 et A3

A1 : isobutyrate de thymyle (M=220)



A2 : 2-méthylbutyrate de thymyle (M=234)



A3 : isovalérate de thymyle (M=234)

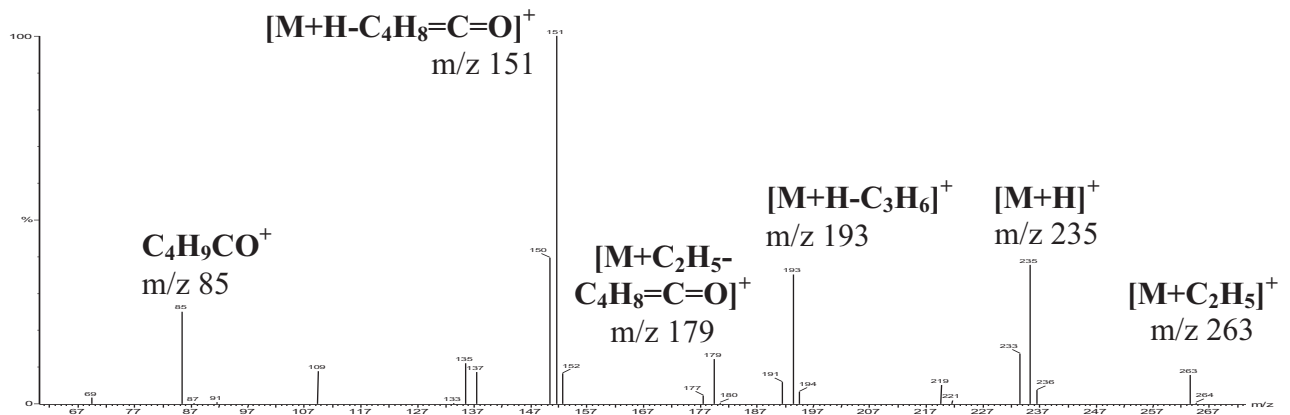
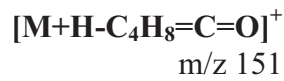


Figure 40 : principales fragmentations en ICP-CH<sub>4</sub> de A1

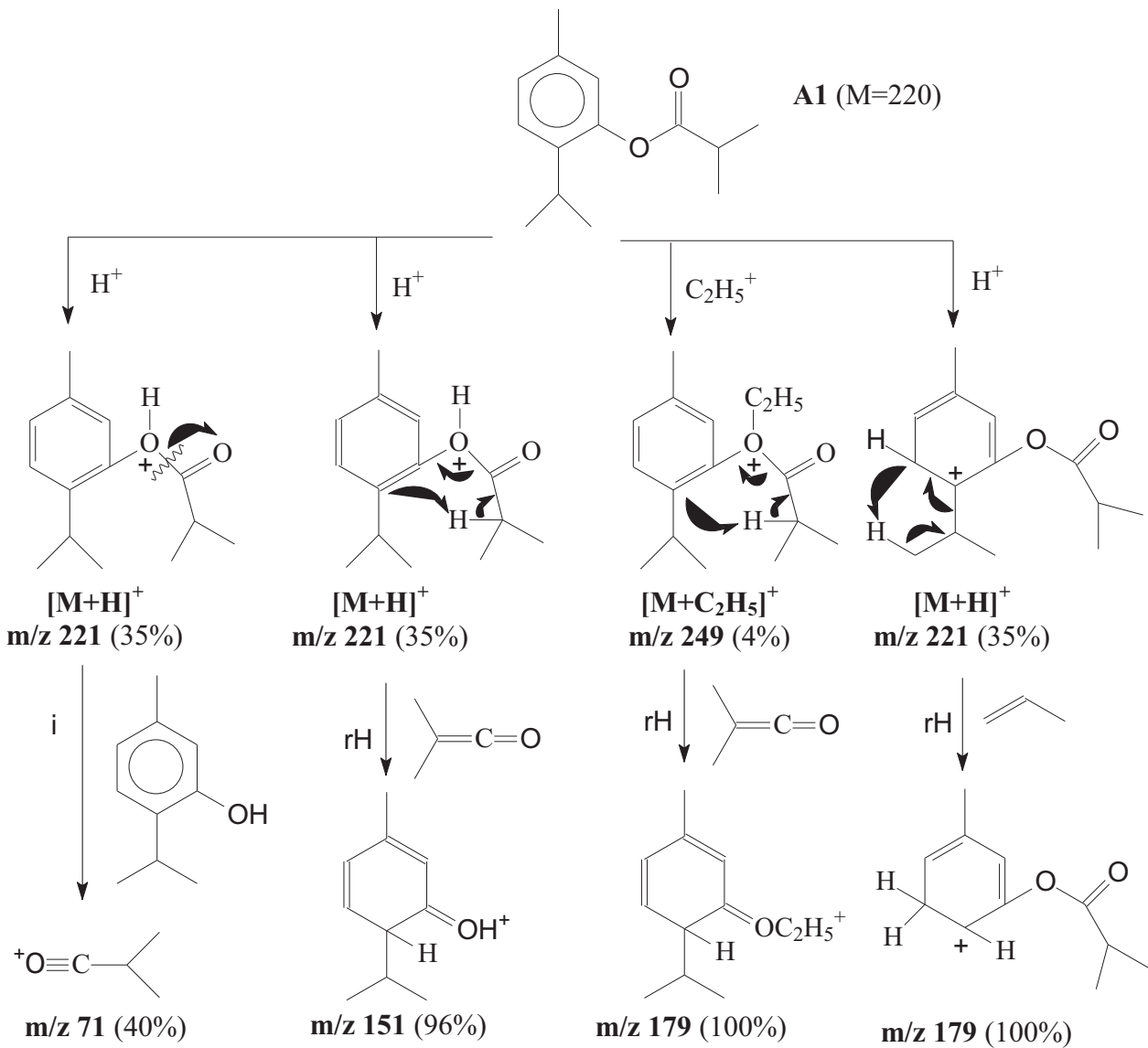
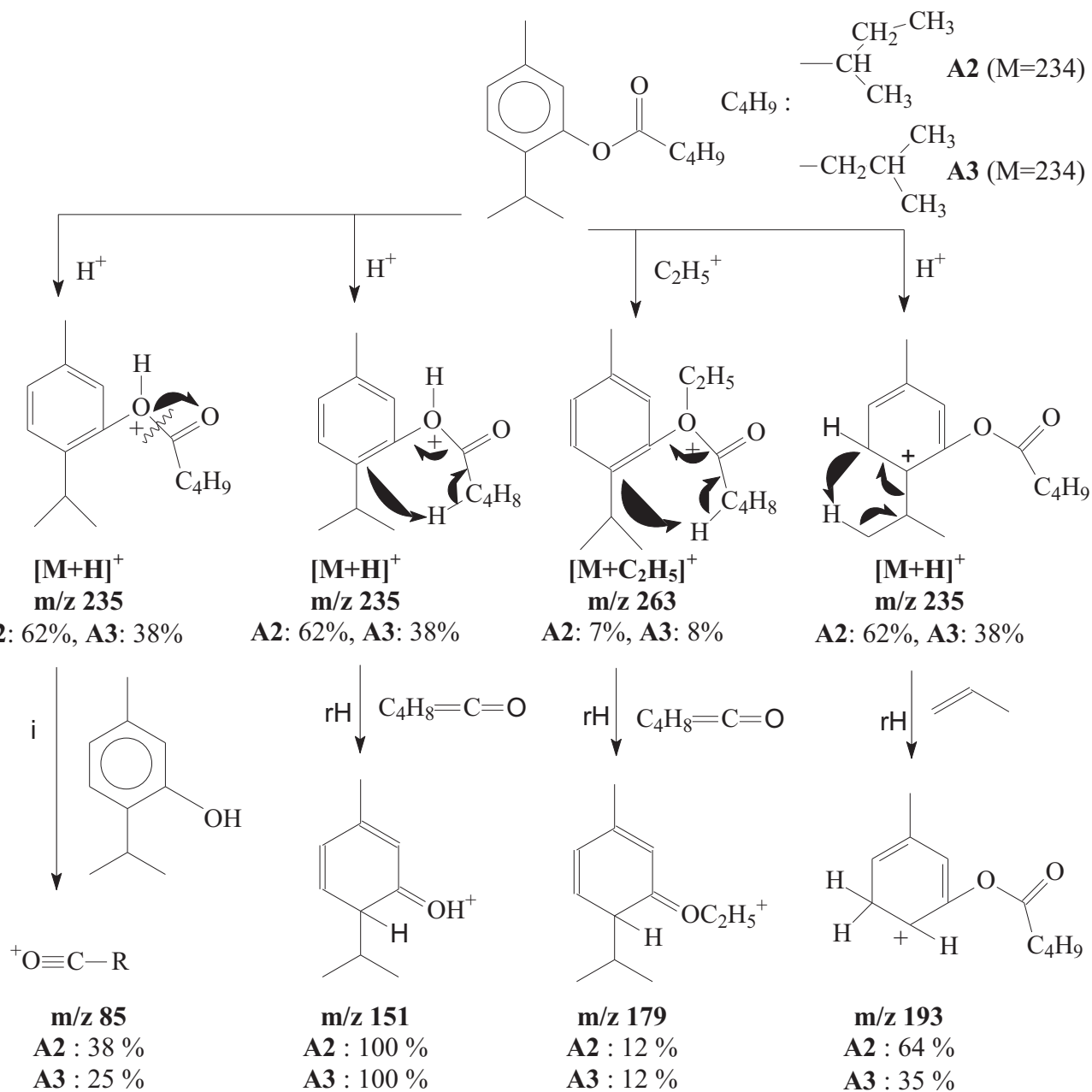


Figure 41 : principales fragmentations en ICP-CH<sub>4</sub> de A2 et A3





- En IC-NH<sub>3</sub>

L'ICP-NH<sub>3</sub> conduit à l'obtention de spectres plus simples avec un nombre de fragments moins important qu'en ICP-CH<sub>4</sub>. Pour les spectres de l'isobutyrate de thymyle (**A1**) (figure 42), nous retrouvons en ICP-NH<sub>3</sub>, l'ion quasi moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à m/z 221 (4%) provenant d'une réaction de transfert de proton entre le gaz réactif ionisé et le composé **A1**. Le pic de base correspond à l'ion adduit [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> à m/z 238 produit par une réaction d'association entre le composé **A1** et les ions réactifs NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

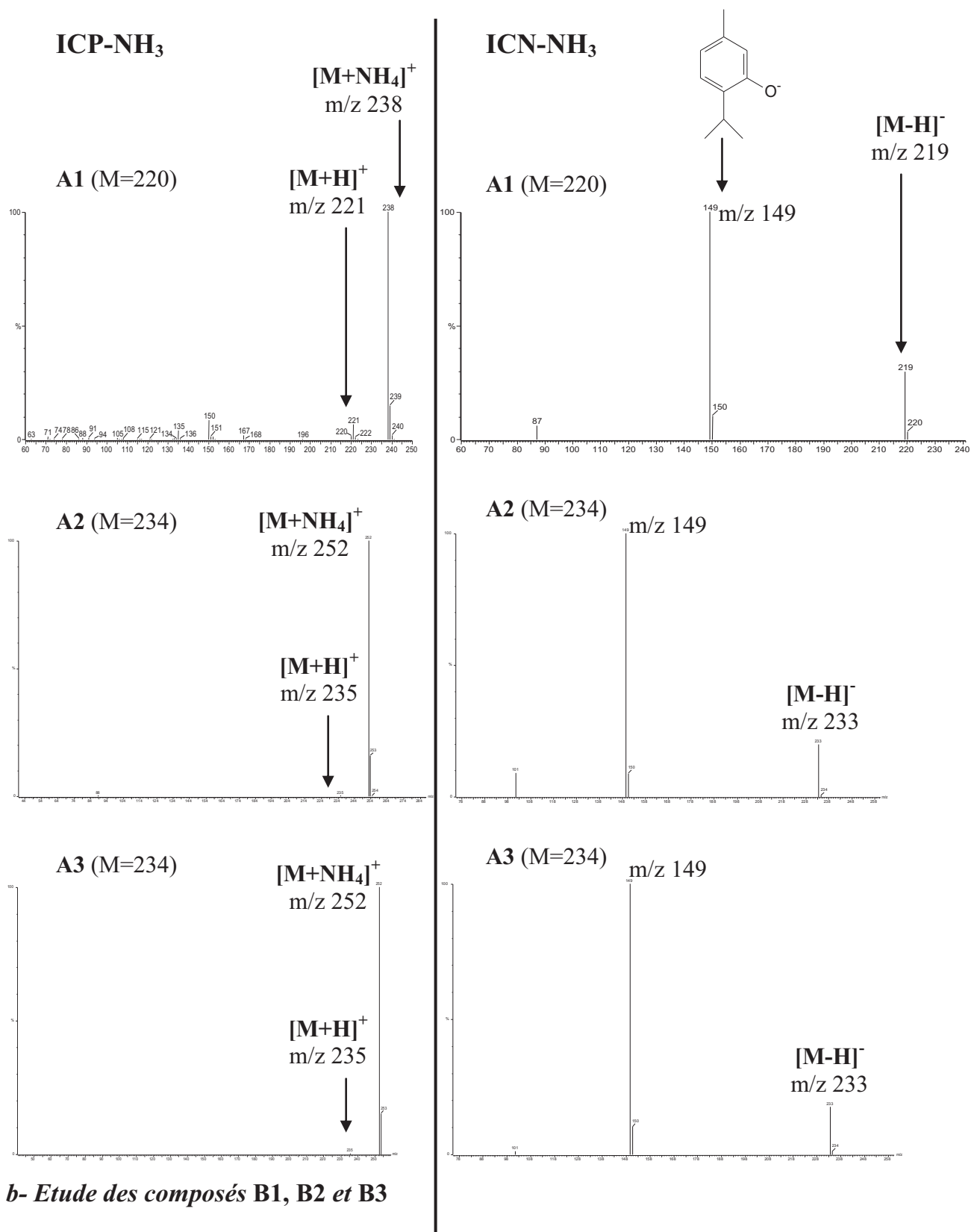
L'ICN-NH<sub>3</sub> met en évidence l'ion quasi moléculaire [M-H]<sup>-</sup> à m/z 219 (21%) résultant d'une réaction d'abstraction d'un hydrure entre le composé **A1** et les ions réactifs ; le pic de base du spectre à m/z 149 correspond à un anion phénolate [M-partie alkoxy]<sup>-</sup>.

Pour le 2-méthylbutyrate de thymyle (**A2**) et l'isovalérate de thymyle (**A3**), nous observons des spectres de masse identiques en IC-NH<sub>3</sub> (figure 42). En effet, l'ICP conduit à la formation d'un ion adduit abondant [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> à m/z 252 (100%) et d'un ion quasi moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à m/z 235 de faible intensité (1%-2%). L'ICN entraîne la formation d'un ion quasi moléculaire [M-H]<sup>-</sup> à m/z 233 (environ 20%) par réaction d'abstraction d'un hydrure et d'un pic de base à m/z 149 correspondant à l'ion phénolate déjà observé pour l'isobutyrate de thymyle (**A1**) (figure 42).

L'IC-NH<sub>3</sub> permet donc d'établir sans ambiguïté la masse moléculaire des composés (**A1-A3**) et en déduire la masse de la partie alkoxy par l'observation d'un pic de base à m/z 149 en ICN (figure 42).

Par rapport à l'ionisation chimique au méthane, l'utilisation de l'ammoniac n'apporte pas de renseignements supplémentaires quand à l'étude de la structure de ces composés.

Figure 42 : spectres de masse en IC-NH<sub>3</sub> de A1, A2 et A3



A partir de l'étude par CPG/SM-IE et CPG/Ir, nous avons proposé la structure de l'isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle pour le composé **B1**, du 2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle pour **B2** et de l'isovalérate de 8,9-déhydrothymyle pour **B3**.

▪ En ICP-CH<sub>4</sub>

Nous observons pour le composé **B1**, la formation de quatre ions abondants : l'ion  $[M+H]^+$  à  $m/z$  219 (42%) provenant d'une réaction de transfert de proton, l'ion à  $m/z$  177 (14%) issu de la perte d'un groupement  $C_3H_6=C=O$  après réaction d'association, l'ion à  $m/z$  149 (100%) issu de la perte d'un groupement  $C_3H_6=C=O$  après réaction de transfert de proton et l'ion à  $m/z$  71 (39%) correspondant à la formation de l'ion acylium  $C_3H_7CO^+$ . Pour les composés **B2** et **B3** de masse molaire 232, les mécanismes de fragmentation sont identiques entre eux et analogues à ceux exposés ci-dessus ; nous retrouvons l'ion quasi-moléculaire (ici à  $m/z$  233) les mêmes ions à  $m/z$  177 et 149 (perte du groupe  $C_4H_8=C=O$  après réaction d'association ou transfert de proton) et à  $m/z$  85, la formation de l'ion acylium correspondant  $C_4H_9CO^+$  (figures 43, 44 et 45).

Les mécanismes de fragmentation des esters de 8,9-déhydrothymyle (**B1-B3**) sont également identiques à ceux observés pour les esters de thymyle (**A1-A3**) à l'exception, toutefois, de la perte du groupement isopropylène situé sur le cycle benzénique en raison de l'extension de la conjugaison.

Ce mode d'ionisation permet donc de confirmer la masse molaire de **B1** ( $M=218$ ), **B2** ( $M=232$ ) et **B3** ( $M=232$ ) par l'observation des ions quasi-moléculaires  $(M+H)^+$ . L'utilisation du méthane comme gaz réactant permet également d'obtenir des informations sur la structure de ces composés : sur la masse de la partie alkoxy par l'observation des ions à  $m/z$  149 et 177 et sur la masse de la partie acyle par l'observation des carbocations acyles à  $m/z$  71 ou  $m/z$  85. Ces résultats sont en accord avec les propositions de structure faites précédemment : isobutyrate de 8,9-

déhydrothymyle pour le composé **B1**, 2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle pour **B2** et isovalérate de 8,9-déhydrothymyle pour **B3** (figures 43, 44 et 45).

Figure 43 : spectres de masse en ICP-CH<sub>4</sub> de **B1**, **B2** et **B3**

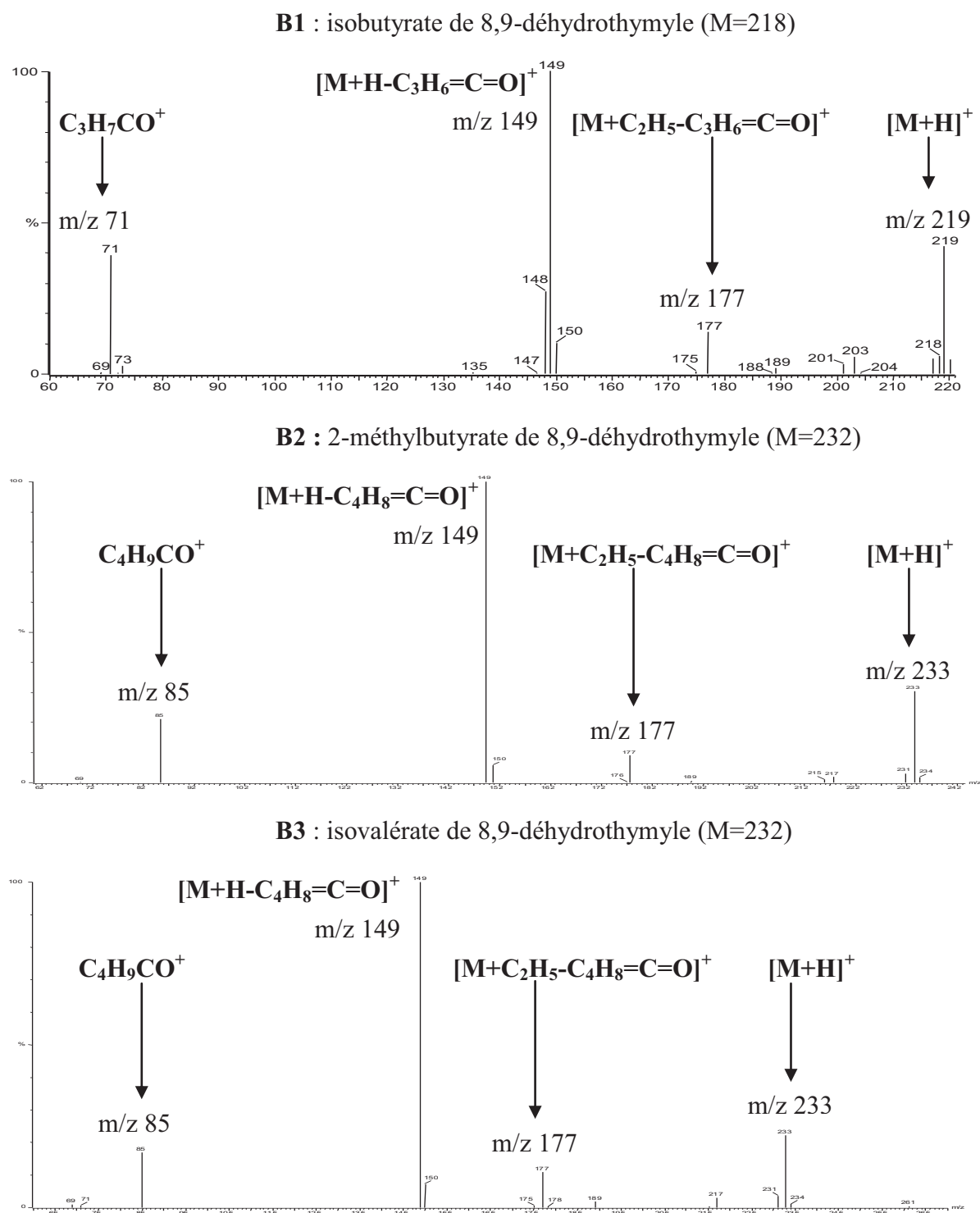


Figure 44 : principales fragmentations en ICP-CH<sub>4</sub> de **B1**

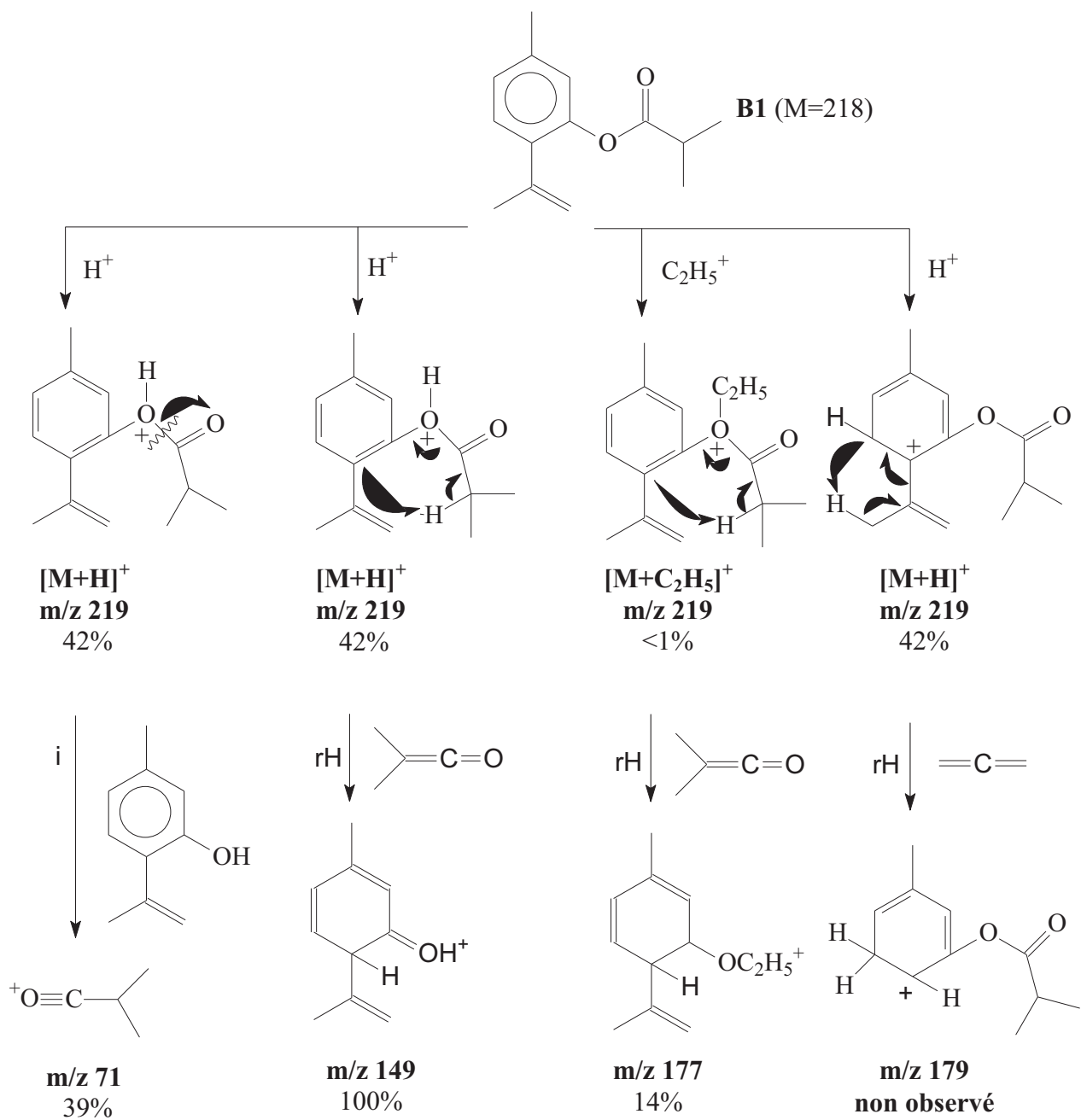
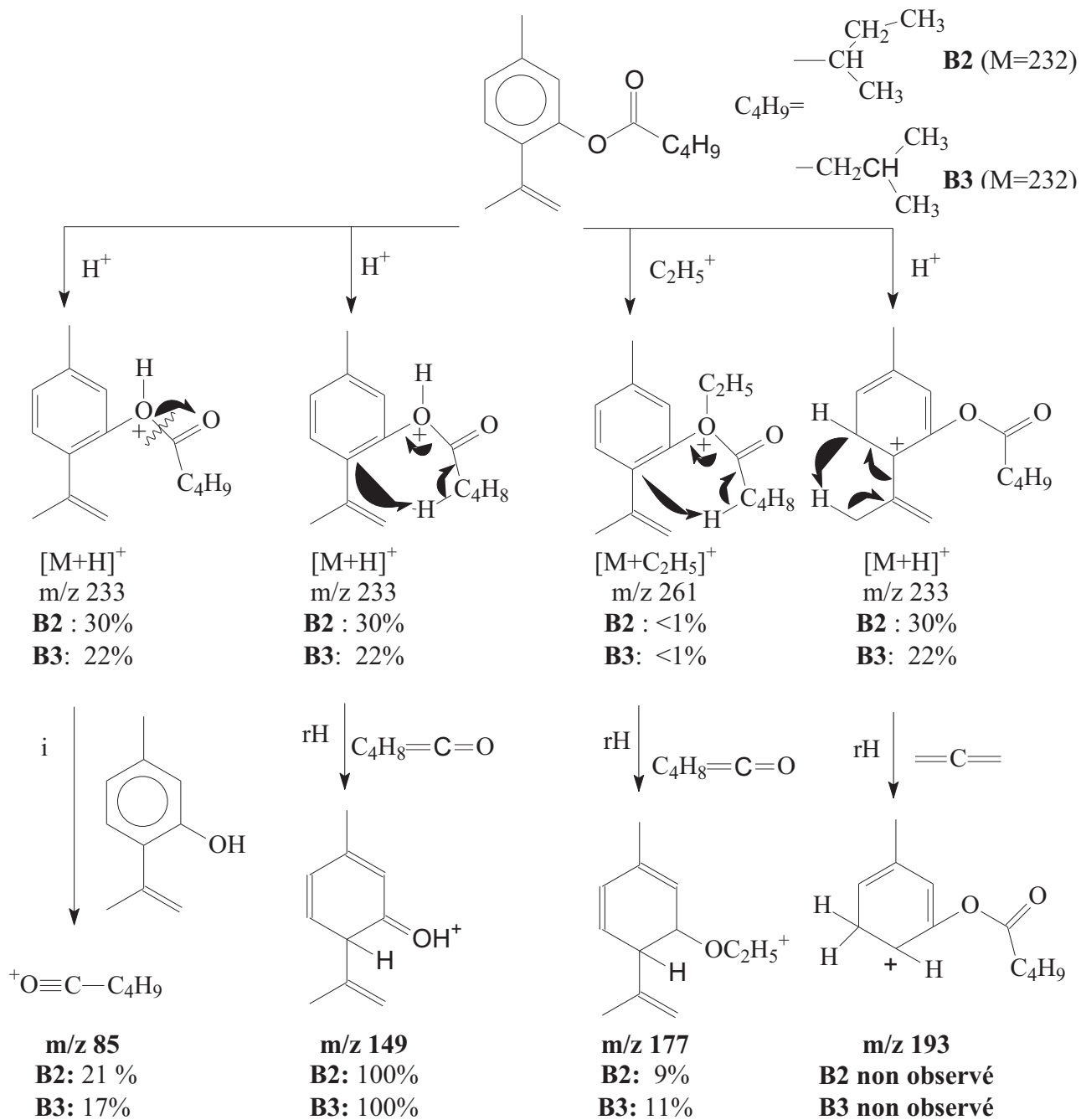


Figure 45 : principales fragmentations en ICP-CH<sub>4</sub> de **B2** et **B3**



- En IC-NH<sub>3</sub>

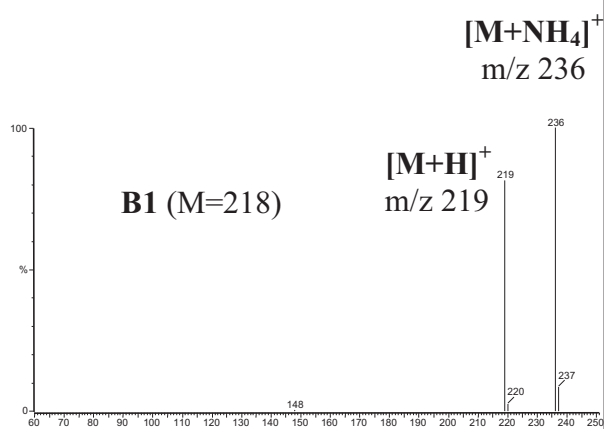
Pour l'isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle (**B1**) de masse molaire 218, nous retrouvons sur le spectre en ICP-NH<sub>3</sub> l'ion adduit [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> à m/z 236 (100%) et l'ion quasi-moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à m/z 219 (76%) et sur le spectre ICN-NH<sub>3</sub>, l'ion quasi-moléculaire [M-H]<sup>-</sup> à m/z 217 (56%) et l'ion phénolate à m/z 147 (100%) (figure 46).

De la même façon, pour les composés **B2** et **B3** de masse molaire 232, le mode « ionisation chimique » avec l'ammoniac permet d'obtenir les ions quasi moléculaires: [M+H]<sup>+</sup> à m/z 233 et [M-H]<sup>-</sup> à m/z 231, l'ion adduit [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> à m/z 250 (pic de base) et l'ion phénolate à m/z 147 (figure 46).

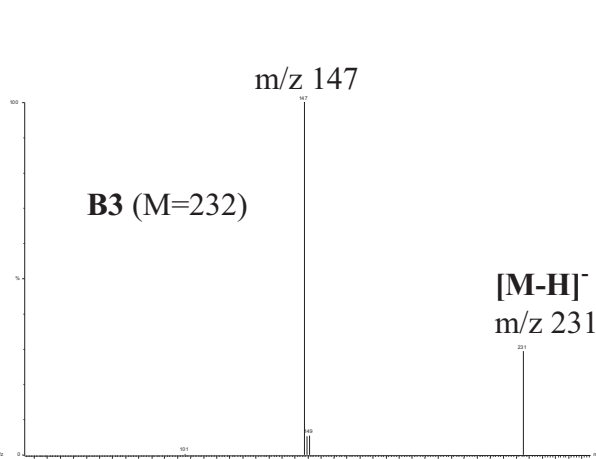
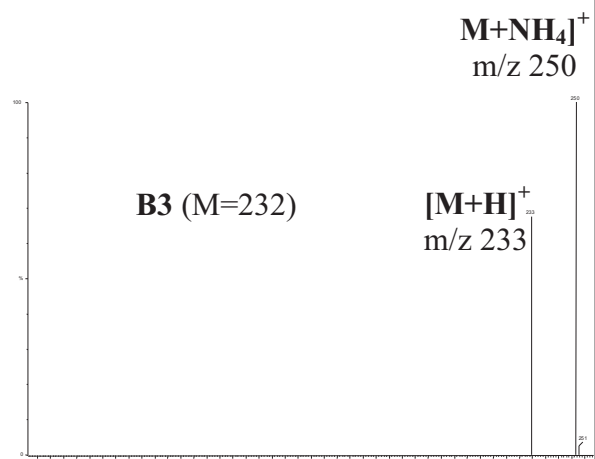
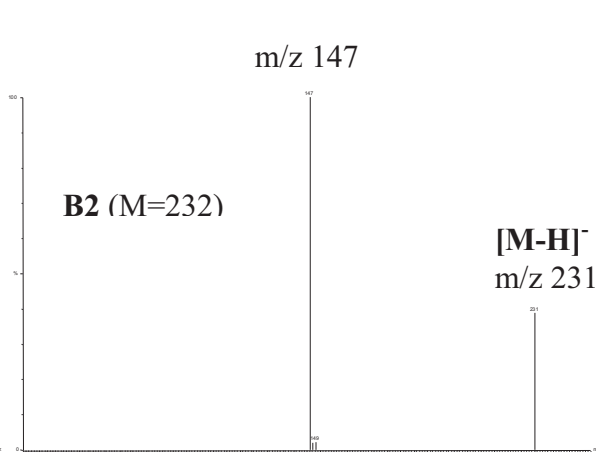
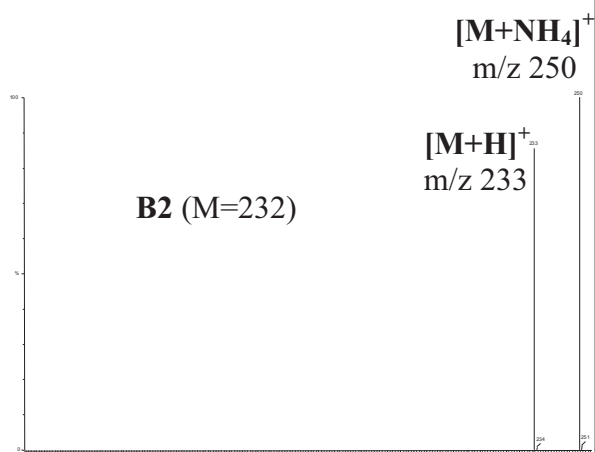
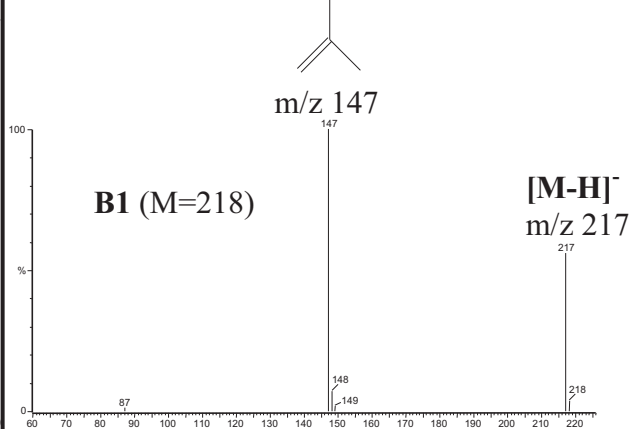
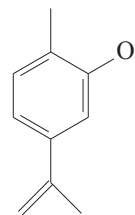
Comme précédemment, l'IC permet de confirmer qu'il s'agit bien d'esters de 8,9-déhydrothymyle dont le groupe alkyle est C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour **B1** et C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> pour **B2** et **B3**.

Figure 46 : spectres de masse en IC-NH<sub>3</sub> de **B1**, **B2** et **B3**.

ICP-NH<sub>3</sub>



ICN-NH<sub>3</sub>





### *c- Etude des composés A4 et B4*

D'après les travaux réalisés précédemment en CPG/Ir et en CPG/SM-IE, pour les composés **A4** et **B4** nous proposons, les structures du tiglate de thymyle pour **A4** de masse molaire 232 et du tiglate de 8,9-déhydrothymyle pour **B4** de masse molaire 230.

- En ICP-CH<sub>4</sub>

Le spectre du composé **A4** contient trois pics intenses à m/z 233 (59%), à m/z 191 (49%) et à m/z 83 (100%). De façon analogue, le spectre du composé **B4** contient les pics m/z 231 (14%) et m/z 83 (100%). On n'observe pas de pic à m/z 189 (homologue de celui à m/z 191 dans **A4**) car il correspondrait à une rupture de la conjugaison (figures 47, 48 et 49).

Le recours à l'ionisation chimique permet d'observer les ions caractéristiques quasi moléculaires  $[M+H]^+$  et les carbocations acyles  $RCO^+$  pour les deux composés et de préciser s'il s'agit d'un ester de thymyle ou de 8,9-déhydrothymyle selon la présence ou l'absence du pic à m/z 191 (relatif au cation  $[M+H-C_3H_6]^+$  pour les esters de thymyle).

Il est à noter, également, que le spectre du composé **A4** diffère des spectres des composés **A1**, **A2** et **A3** par la faible abondance du fragment à m/z 151 (6%) (pic de base de **A1**, **A2** et **A3**) probablement du fait de la présence, sur la partie alkyle, d'une double liaison conjuguée avec le groupe carboxylate qui bloque le réarrangement d'hydrogène. De la même manière, le spectre du composé **B4** présente un ion à m/z 149 (5%) de faible intensité comparée à celle observée sur les spectres des composés **B1**, **B2** et **B3**. Cette même raison doit être invoquée pour expliquer l'absence des ions à m/z 179 sur le spectre du composé **A4** et à m/z 177 sur le spectre du composé **B4** correspondant à la perte du fragment  $C_4H_6=C=O$  après réaction d'association (figure 47).

Ces différents résultats sont en accord avec les structures « supposées » tiglate de thymyle pour le composé **A4** et tiglate de 8,9-déhydrothymyle pour le composé **B4**, sans pouvoir exclure, cependant, l'isomère angélate.

Figure 47 : spectres de masse obtenus en ICP-CH<sub>4</sub> de **A4** et **B4**

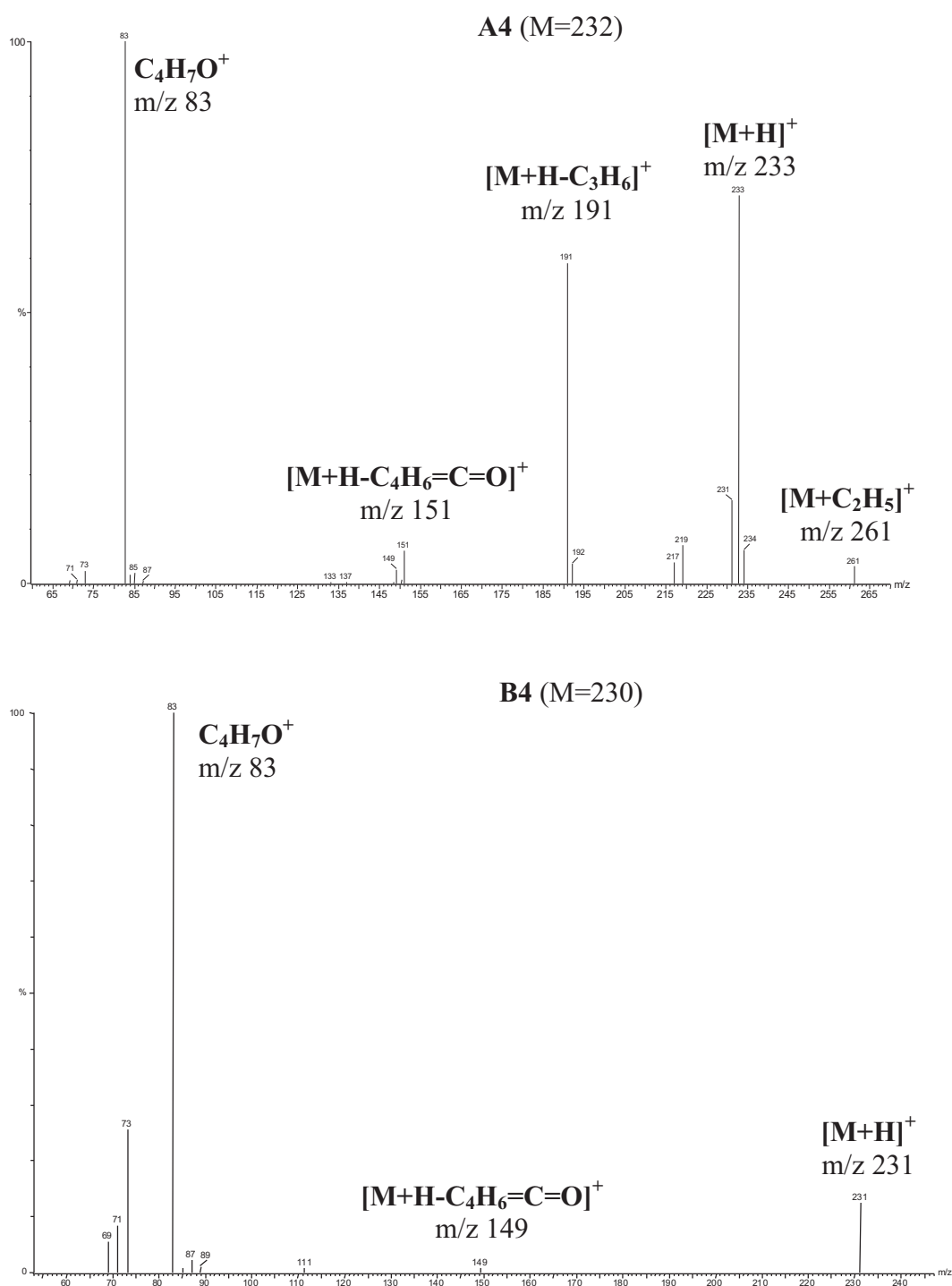


Figure 48 : principales fragmentations en ICP-CH<sub>4</sub> de A4

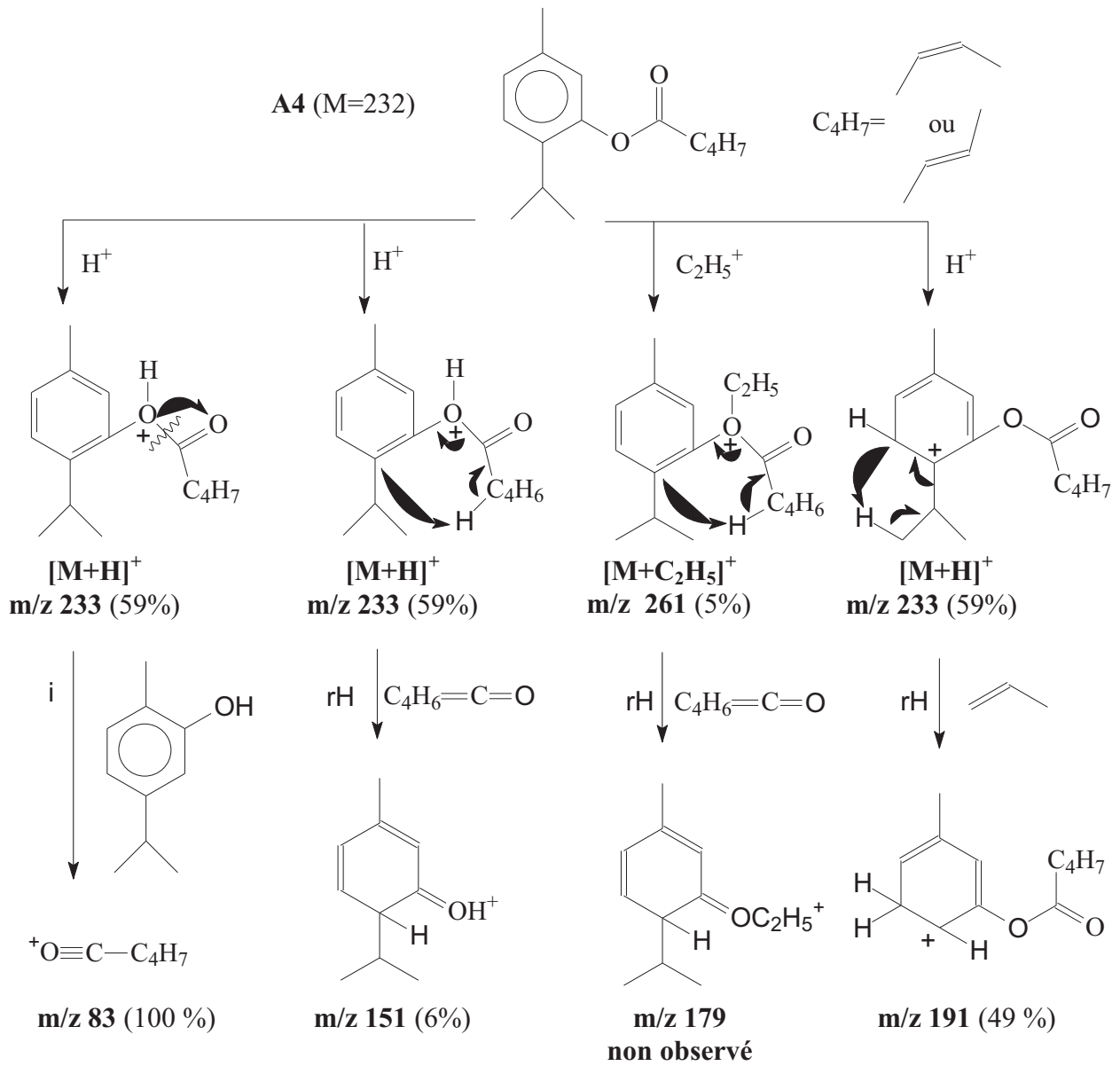
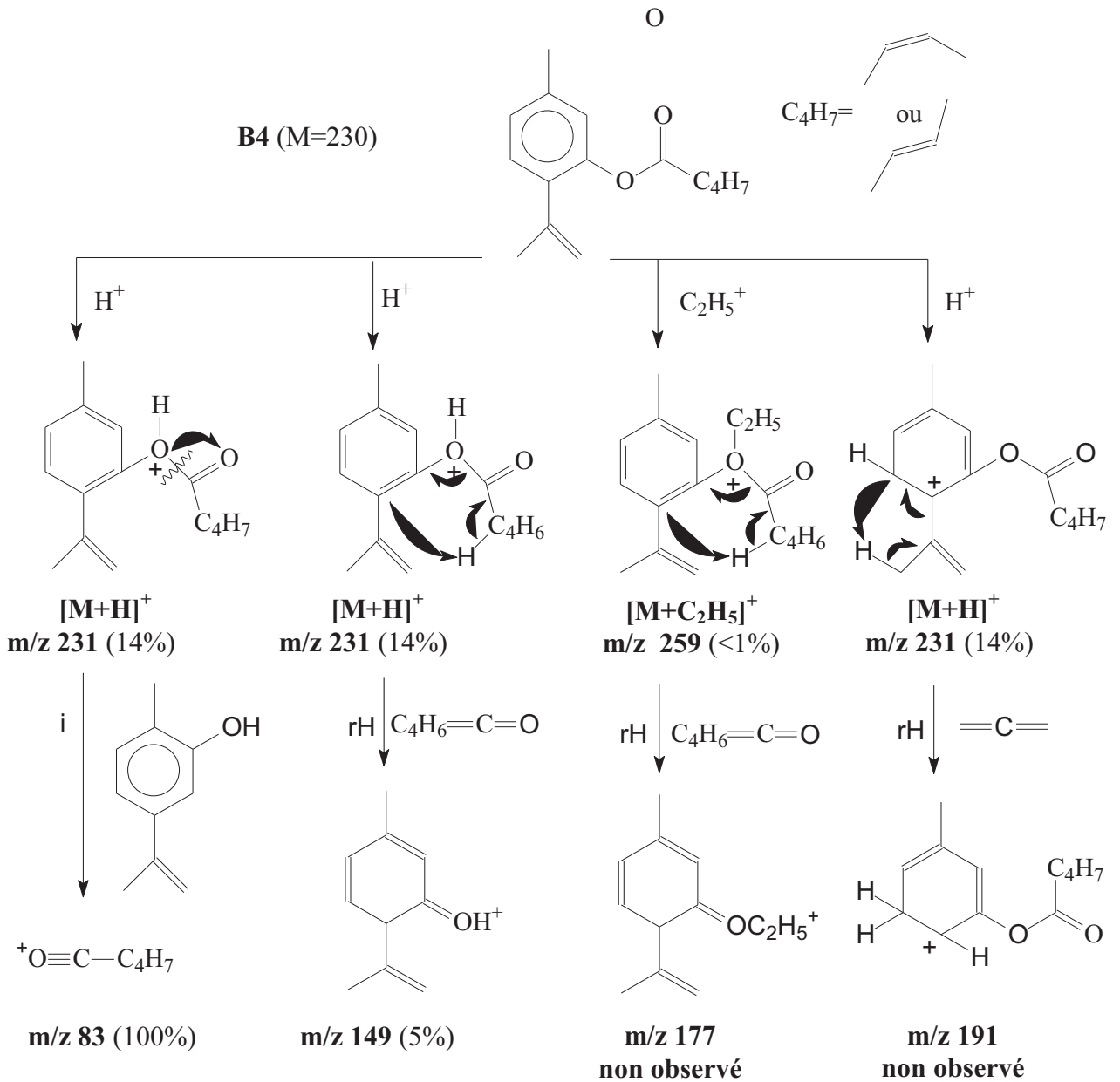


Figure 49 : principales fragmentations en ICP-CH<sub>4</sub> de **B4**

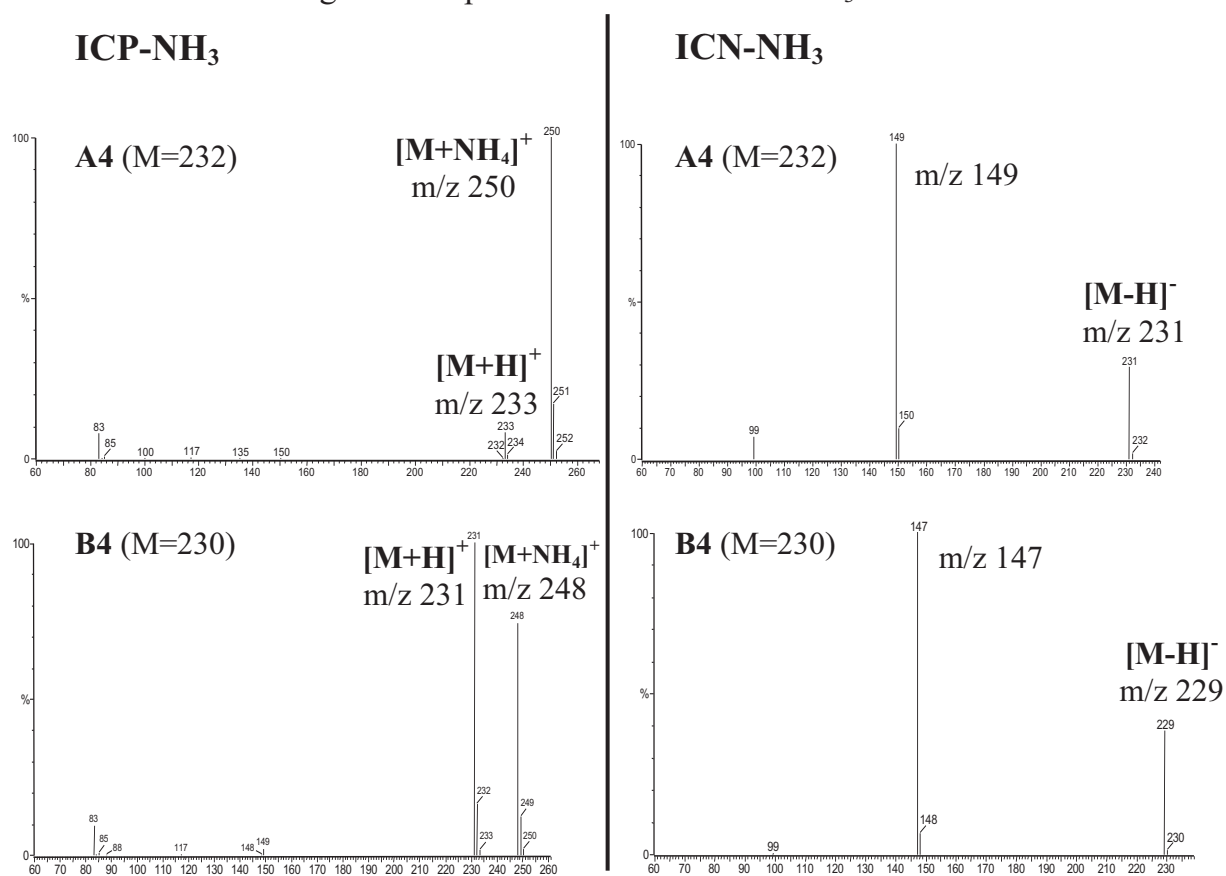


- En IC-NH<sub>3</sub>

L'étude des composés **A4** et **B4** nous a permis d'observer : - en ICP, pour le composé **A4** un pic de base  $[M+NH_4]^+$  à m/z 250 et un ion  $[M+H]^+$  à m/z 233 (8%) et pour le composé **B4** un pic de base  $[M+H]^+$  à m/z 231 et un ion  $[M+NH_4]^+$  à m/z 248 (76%) (Figure 50). - en ICN, les pics de base respectivement à m/z 149 pour **A4** et à m/z 147 pour **B4** ainsi que les ions quasi-moléculaires  $[M-H]^-$  respectivement à m/z 231 (29%) et à m/z 229 (38%).

L'utilisation de l'ammoniac permet donc de confirmer la masse moléculaire par l'observation des ions quasi-moléculaires  $[M-H]^+$ ,  $[M+H]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ . L'ensemble de ces résultats confirment la présence d'un ester de thymyle pour le composé **A4** et d'un ester de 8,9-déhydrothymyle pour **B4**, en effet, nous observons en ICN-NH<sub>3</sub> les ions caractéristiques de la partie « phénolate » à m/z 149 pour le composé **A4** et à m/z 147 pour le composé **B4**. Afin de préciser la nature de l'isomère : tiglate ou angélate nous avons réalisé une étude par RMN du carbone-13 (cf. paragraphe 5-3).

Figure 50 : spectres de masse en IC-NH<sub>3</sub> de **A4** et **B4**

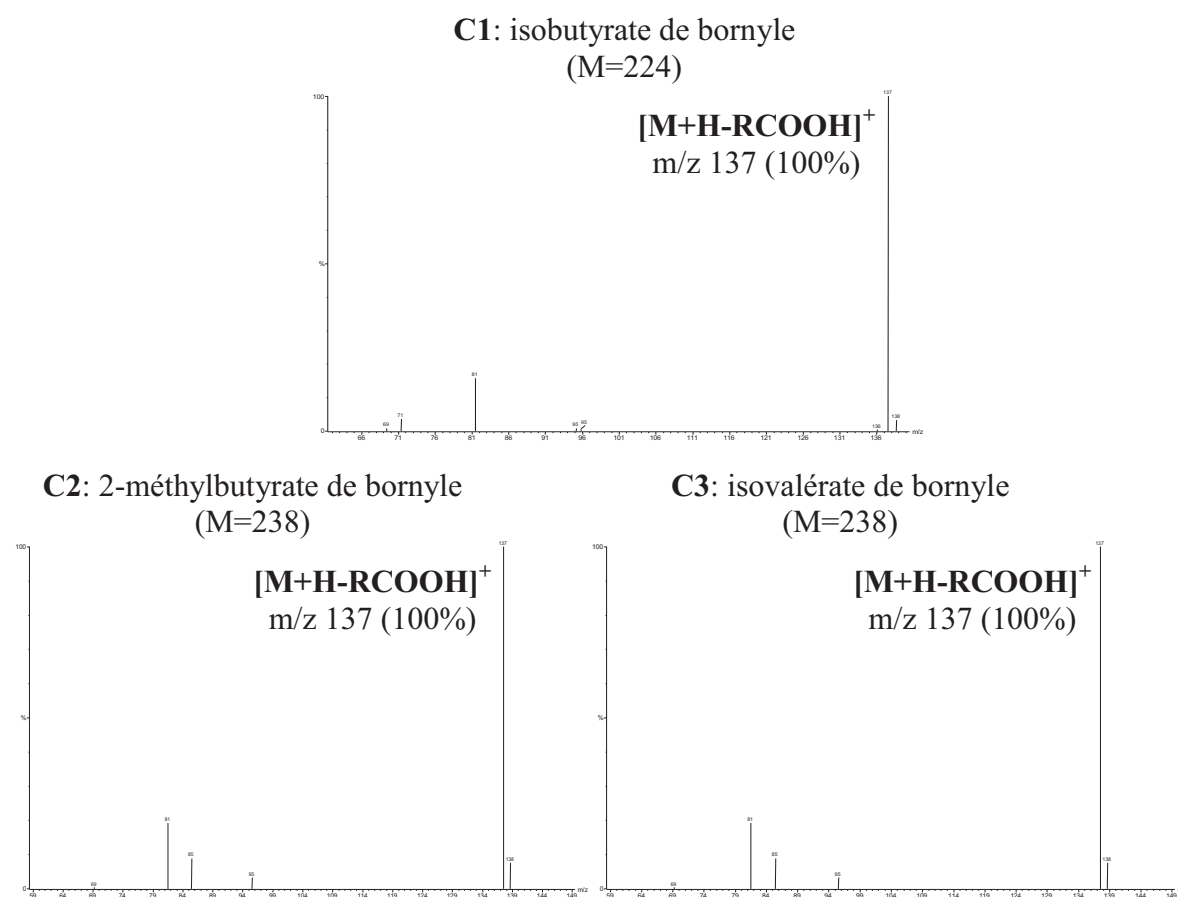


### *d- Etude des composés C1, C2 et C3*

- En ICP-CH<sub>4</sub>

Les spectres de masse de l'isobutyrate de bornyle (**C1**), du 2-méthylbutyrate de bornyle (**C2**) et de l'isovalérate de bornyle (**C3**) donnent très peu de renseignements sur la structure de ces composés. En effet, pour ces trois composés, nous observons un seul ion abondant  $[M+H-RCOOH]^+$  à  $m/z$  137 (100%) issu de la perte d'une molécule d'acide après réaction de transfert de proton. Les ions  $[M+H]^+$  et  $[M+C_2H_5]^+$  n'ont pu être observés induisant des spectres de masse quasiment identiques pour ces trois composés (Figure 51).

Figure 51 : spectres de masse obtenus en ICP-CH<sub>4</sub> de **C1**, **C2** et **C3**



▪ En IC-NH<sub>3</sub>

L'utilisation de l'ICP-NH<sub>3</sub> conduit à l'observation :

- d'ions adduits [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> abondants à m/z 242 (78%) pour l'isobutyrate de bornyle (**C1**) et à m/z 256 (resp. 66%, 62%) pour le 2-méthylbutyrate de bornyle (**C2**) et l'isovalérate de bornyle (**C3**) ;
- d'ions quasi-moléculaires [M+H]<sup>+</sup> de faible intensité (< 3%) ou absents ;
- un pic de base [M+H-RCOOH]<sup>+</sup> à m/z 137 ;
- un ion [M+NH<sub>4</sub>-RCOOH]<sup>+</sup> à m/z 154 (29-37%).

Ces deux derniers ions proviennent de l'élimination d'une molécule acide après réaction de transfert de proton (m/z 137) et réaction d'association (m/z 154) (figure 52).

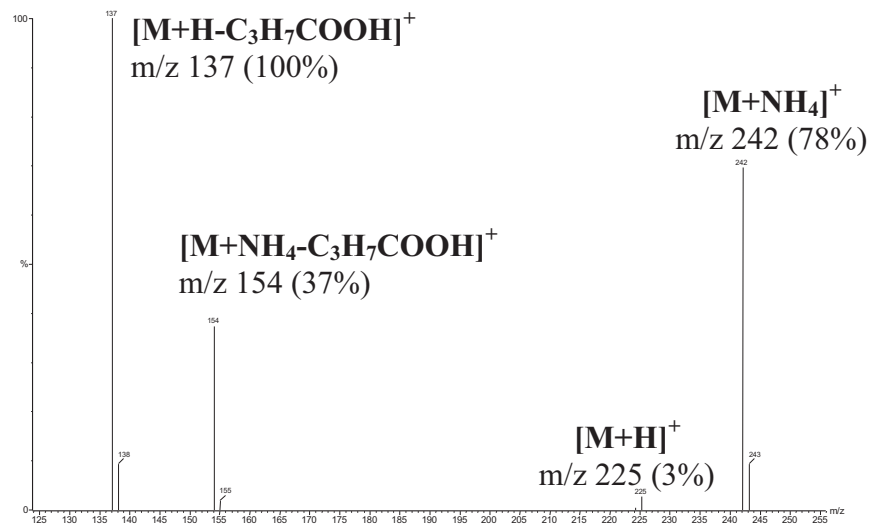
L'ICN-NH<sub>3</sub> conduit quant à elle à l'observation de deux types d'ions :

- des ions quasi-moléculaires [M-H]<sup>-</sup> qui sont le pic de base pour les composés **C2** et **C3** ;
- des ions carboxylates à m/z 87 pour le composé **C1** ([C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>COO]<sup>-</sup> : 45%) et à m/z 101 pour les composés **C2** et **C3** ([C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>COO]<sup>-</sup> : respectivement 47% et 17%) (figure 53).

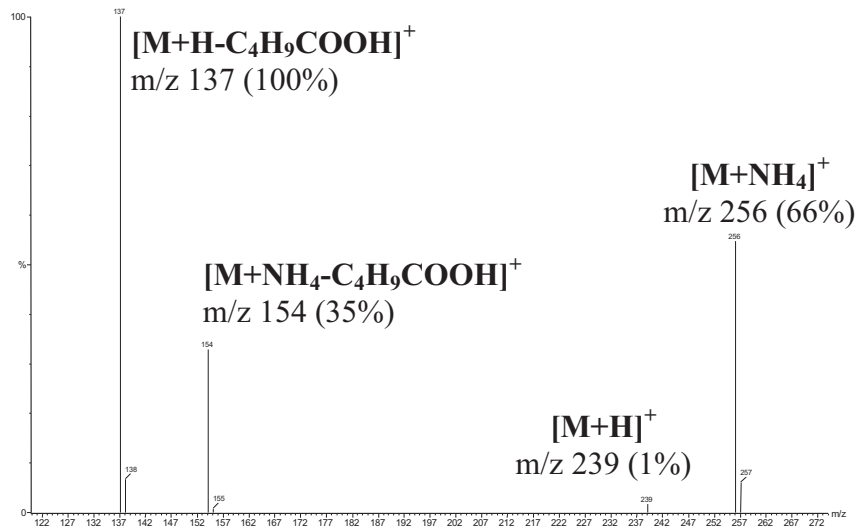
L'ammoniac est mieux adapté que le méthane à l'analyse des esters de bornyle. En effet, en ionisation chimique négative nous observons des ions caractéristiques de la masse moléculaire et des ions caractéristiques de la masse du groupe fonctionnel.

Figure 52 : spectres de masse en ICP-NH<sub>3</sub> de C1, C2 et C3

C1: isobutyrate de bornyle  
(M=224)



C2: 2-méthylbutyrate de bornyle  
(M=238)



C3: isovalérate de bornyle  
(M=238)

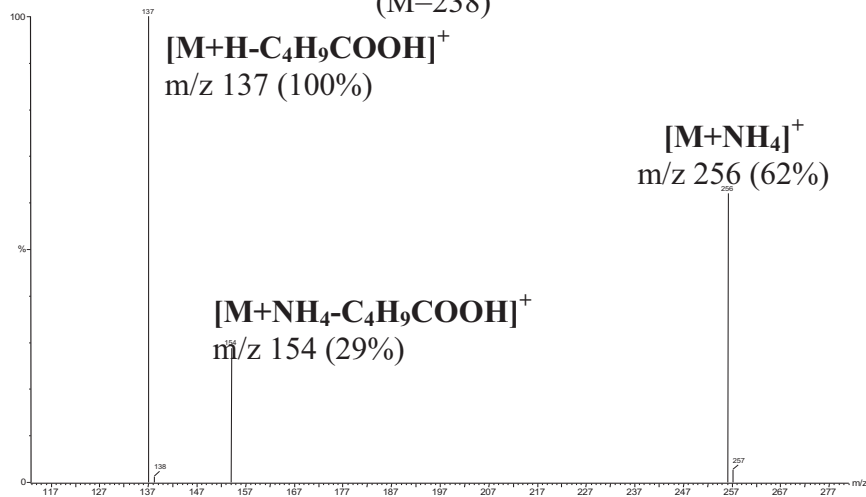
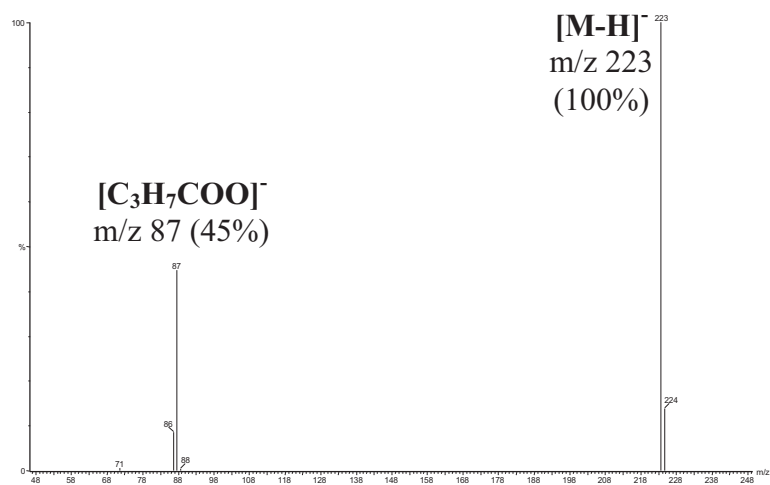


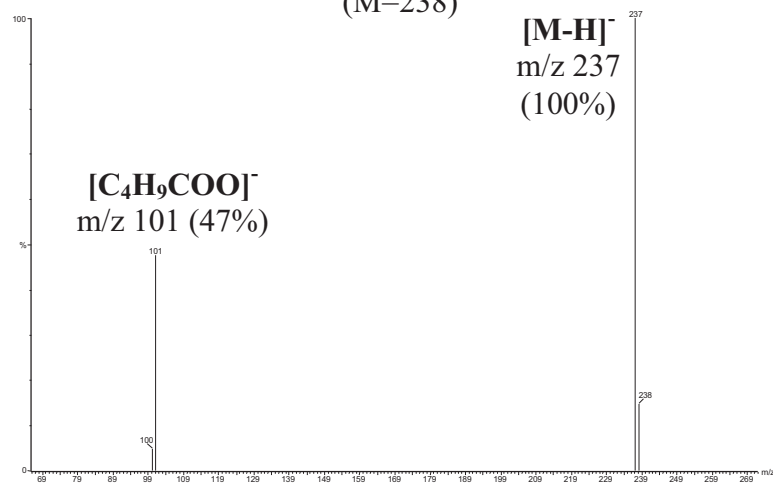


Figure 53 : spectres de masse en ICN-NH<sub>3</sub> de **C1**, **C2** et **C3**

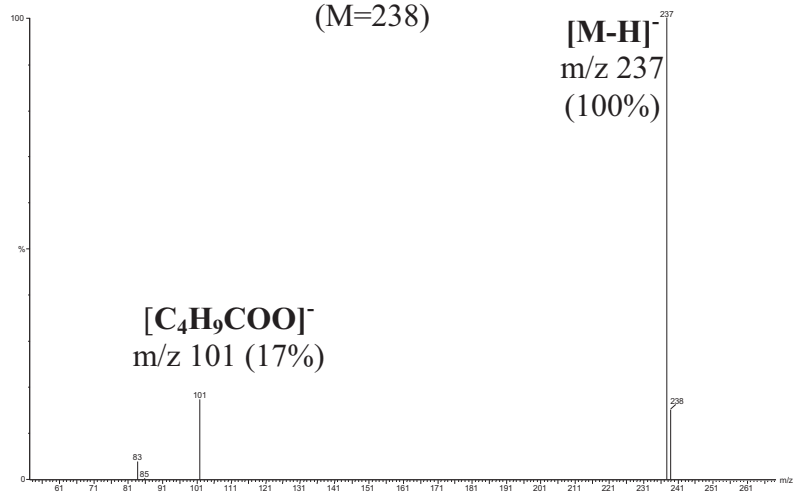
**C1**: isobutyrate de bornyle  
(M=224)



**C2**: 2-méthylbutyrate de bornyle  
(M=238)



**C3**: isovalérate de bornyle  
(M=238)

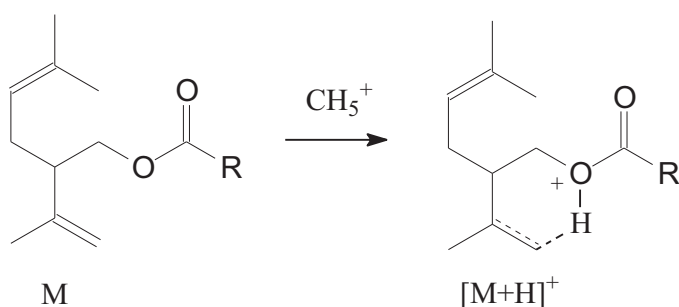


## e- Etude des composés D1, D2, D3, D4 et E1, E2, E3

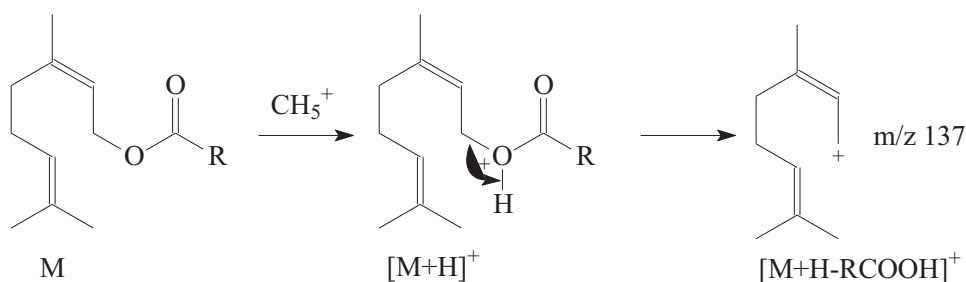
### ▪ En ICP-CH<sub>4</sub>

Les spectres de masse obtenus pour les quatre esters de néryle (**D1-D4**) sont identiques (figure 54) ; chacun d'eux présente trois ions abondants à  $m/z$  137 ( $[M+H-C_4H_9COOH]^+$  : 51-73%), à  $m/z$  81 ( $[C_6H_9]^+$  : 100%) et à  $m/z$  69 ( $[C_5H_9]^+$  : 13-22%).

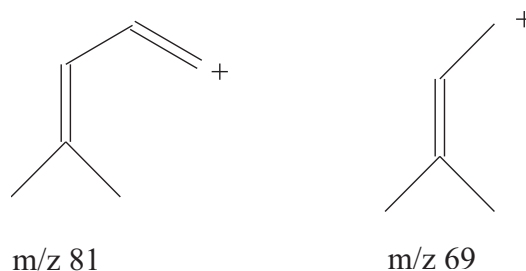
Pour les trois esters de lavandulyle (**E1-E3**), les spectres de masse obtenus sont également identiques (figure 55). Nous observons les mêmes signaux que pour les esters de néryle : à  $m/z$  137 (100%), à  $m/z$  81 (28-33%) et à  $m/z$  69 (48-54%). On observe aussi l'ion  $[M+H]^+$  caractéristique de la masse moléculaire : à  $m/z$  225 pour le composé **E1** (10%) et à  $m/z$  239 pour les composés **E2** (9%) et **E3** (8%). La structure des esters de lavandulyle semble stabiliser la molécule protonée (comme schématisé ci-dessous) bien mieux que la structure des esters de néryle. Ces mécanismes de stabilisation ont été décrits en 1985 par Jalonen et Taskinen (84).



Les esters linéaires étudiés se caractérisent principalement en ICP-CH<sub>4</sub> par la formation d'ions abondants  $[M+H-RCOOH]^+$  à  $m/z$  137. Cette fragmentation correspond à la perte de la partie acide à partir de la molécule protonée  $[M+H]^+$ . A titre d'exemple, avec les esters de néryle, la perte d'une molécule acide se fait selon le mécanisme suivant (71, 77) :



Les fragments à  $m/z$  81 et  $m/z$  69 observés sur les spectres de masse des esters de néryle et de lavandulyle correspondent respectivement à des ions  $C_6H_9^+$  et  $C_5H_9^+$  provenant de la fragmentation de la chaîne carbonée :



Le méthane ne semble donc pas être le meilleur gaz pour déterminer la masse molaire et celle du groupe fonctionnel des esters linéaires terpéniques.

- En IC-NH<sub>3</sub>

Sur les spectres des composés **D1-D4** (figure 55) et **E1-E3** (Figure 56), on note la présence d'ions adduits  $[M+NH_4]^+$  en abondance significative à  $m/z$  242 pour les isobutyrate (**D1**, **E1**), à  $m/z$  256 ( $M+18$ )<sup>+</sup> pour les 2-méthylbutyrate (**E2**, **D2**) et les isovalérate (**E3**, **D3**) et à  $m/z$  254 pour **D4**. Ces ions sont beaucoup plus intenses pour les esters de lavandulyle (**E1-E3**) que pour ceux de néryle (**D1-D4**).

Nous remarquons également la présence d'ions  $[M+NH_4-RCOOH]^+$  à  $m/z$  154 avec une intensité bien plus importante pour les esters de néryle (**D1-D4**) que pour ceux de lavandulyle (**E1-E3**).

Le pic de base des spectres des esters de néryle (**D1-D4**) est l'ion  $[M+H-RCOOH]^+$  à  $m/z$  137 alors que pour les esters de lavandulyle (**E1-E3**) le pic à  $m/z$  137 présente une intensité faible ; pour ces derniers composés, les pics de base sont les ions quasi-moléculaires alors même que ces ions sont absents des spectres des esters de néryle (**D1-D4**) (figures 56 et 57).

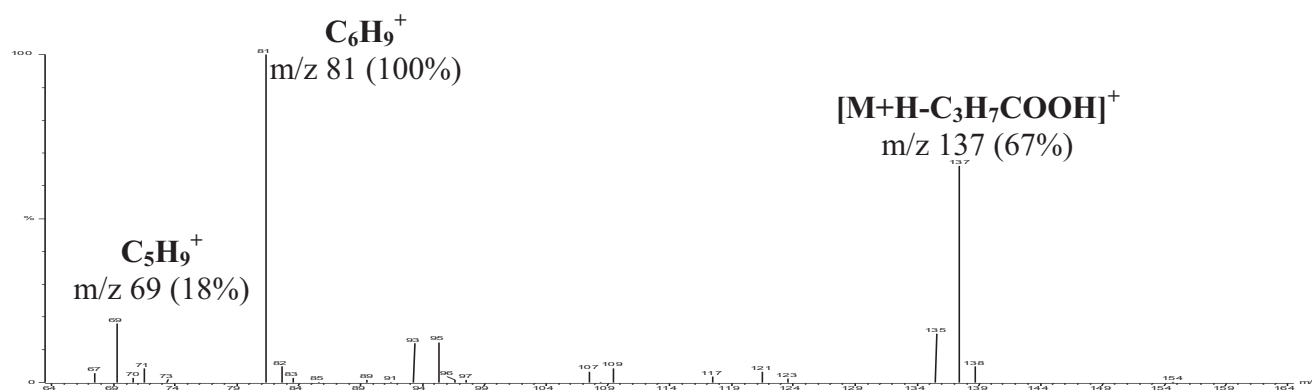
L'ICP-NH<sub>3</sub> permet de déterminer le groupe fonctionnel de ces composés, par l'observation des ions [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> et [M+NH<sub>4</sub>-RCOOH]<sup>+</sup> pour les esters de néryle (**D1-D4**). La différence de masse entre les ions [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> et [M+NH<sub>4</sub>-RCOOH]<sup>+</sup> permet de déterminer la masse de la partie acide. Pour les esters de lavandulyle (**E1-E3**), il est préférable d'utiliser la différence de masse entre les ions [M+H]<sup>+</sup> et [M+H-RCOOH]<sup>+</sup> pour déterminer la masse de la partie ester car l'ion [M+NH<sub>4</sub>-RCOOH]<sup>+</sup> à m/z 154 est présent en très faible abondance. La masse moléculaire de ces esters de lavandulyle (**E1-E3**) est déterminée aisément par la présence des ions [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> et [M+H]<sup>+</sup> abondants.

L'ICN-NH<sub>3</sub> permet de déterminer, sans ambiguïté, les masses moléculaires et les masses des groupements fonctionnels. En effet, les ions quasi-moléculaires [M-H]<sup>-</sup> et les ions carboxylates sont abondants pour tous les composés étudiés. Les pics de base correspondent aux ions carboxylates pour les esters de néryle (**D1-D4**) alors que pour les esters de lavandulyle (**E1-E3**) les pics de base correspondent aux ions [M-H]<sup>-</sup> (figure 58 et 59).

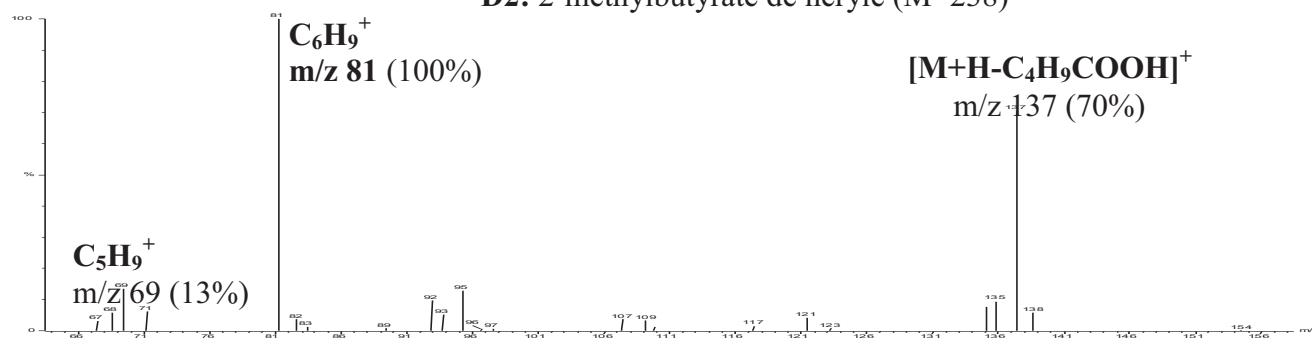
L'utilisation de l'ammoniac comme gaz réactant permet donc de résoudre les problèmes rencontrés en ICP-CH<sub>4</sub> et en IE notamment pour déterminer la masse molaire et différencier les esters de néryle (**D1-D4**) des esters de lavandulyle (**E1-E3**). En effet, la structure des esters de lavandulyle permet de stabiliser les ions [M+H]<sup>+</sup> et [M-H]<sup>-</sup> en IC-NH<sub>3</sub> qui sont les pics de base des spectres de masse obtenus.

Figure 54 : spectres de masse en ICP-CH<sub>4</sub> de **D1**, **D2**, **D3** et **D4**.

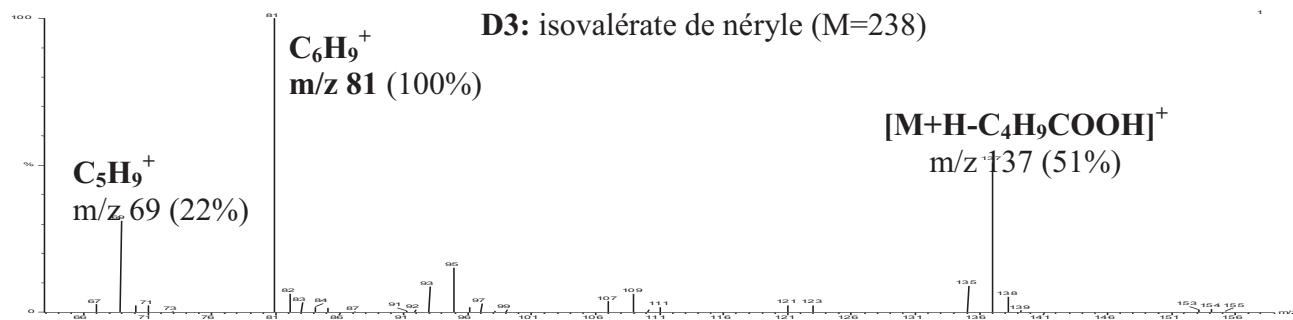
**D1: isobutyrate de néryle (M=224)**



**D2: 2-méthylbutyrate de néryle (M=238)**



**D3: isovalérate de néryle (M=238)**



**D4: tiglate de néryle (M=236)**

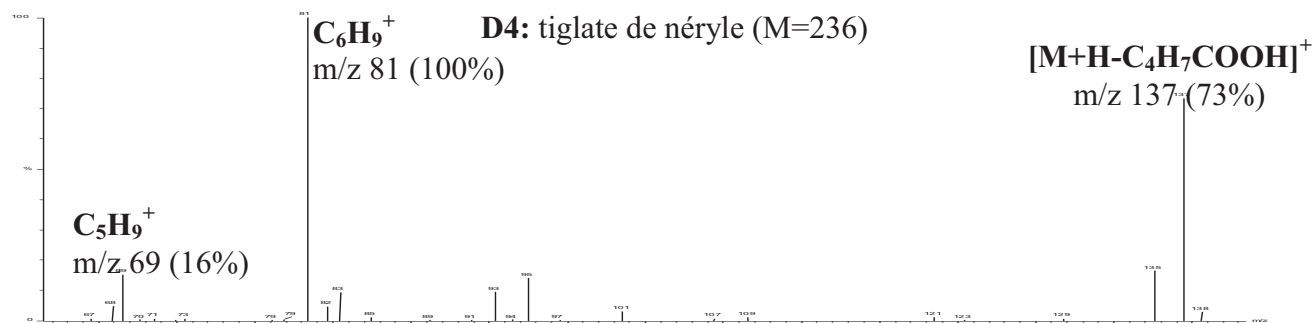
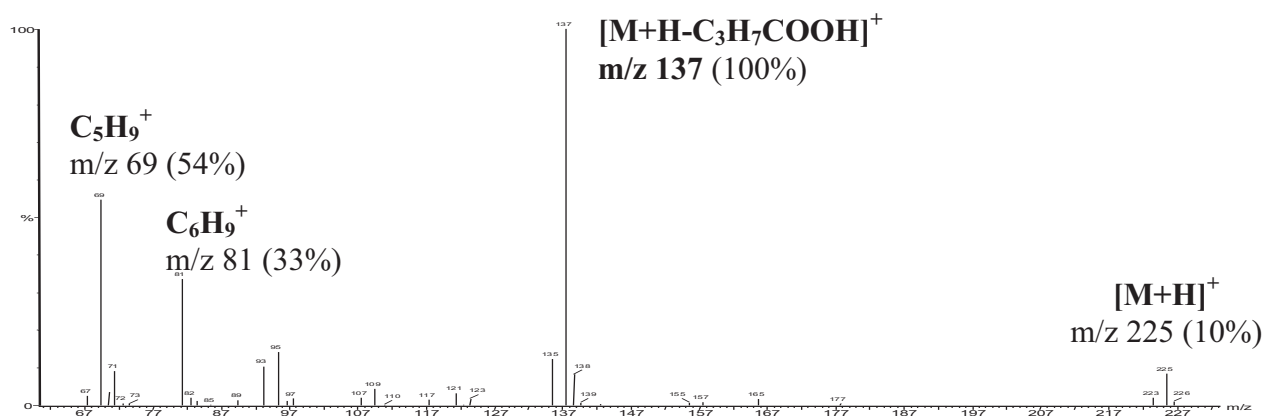
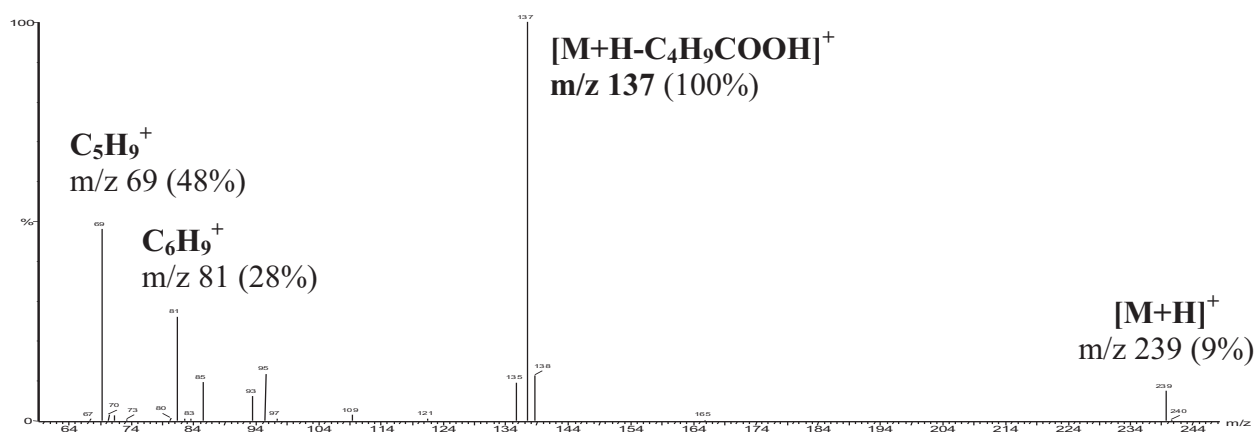


Figure 55 : spectres de masse en ICP-CH<sub>4</sub> de **E1**, **E2** et **E3**

**E1**: isobutyrate de lavandulyle (M=224)



**E2** : 2-méthylbutyrate de lavandulyle (M=238)



**E3**: isovalérate de lavandulyle (M=238)

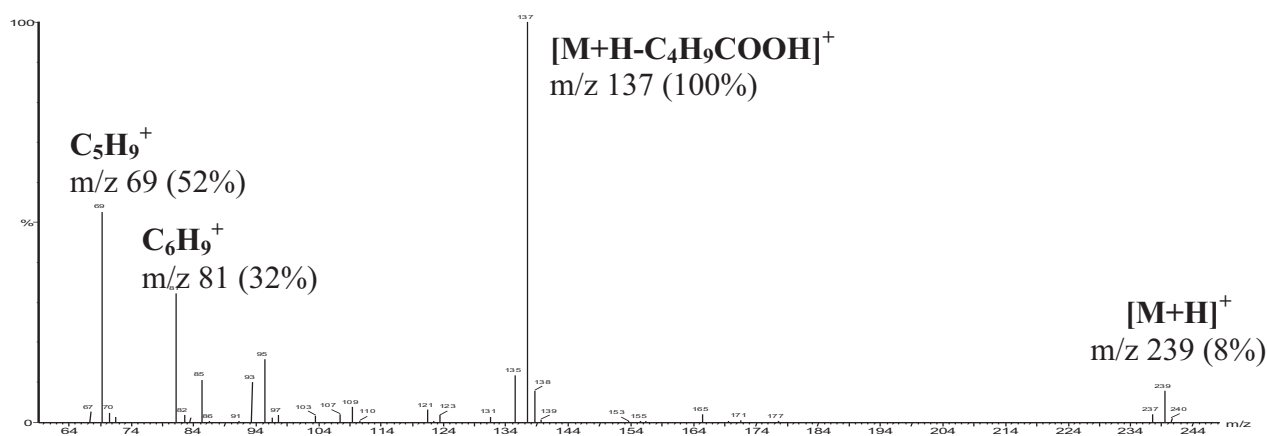
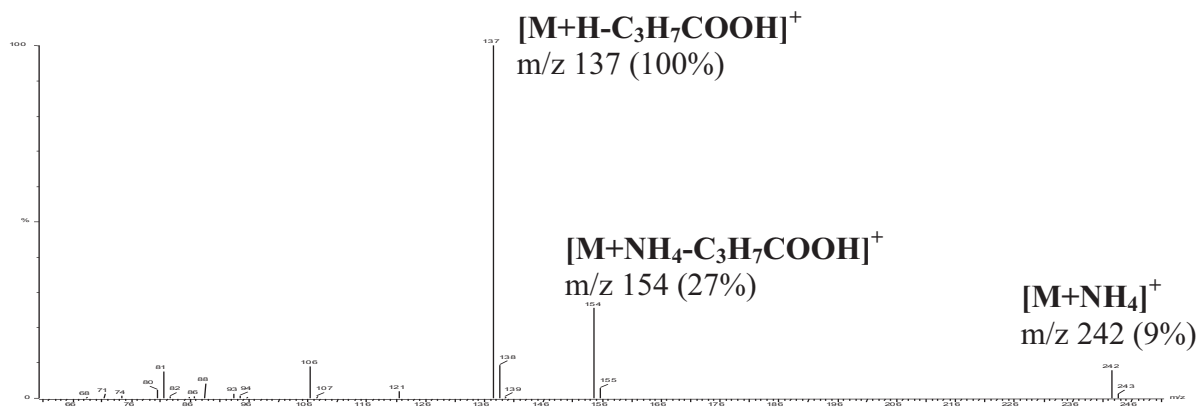
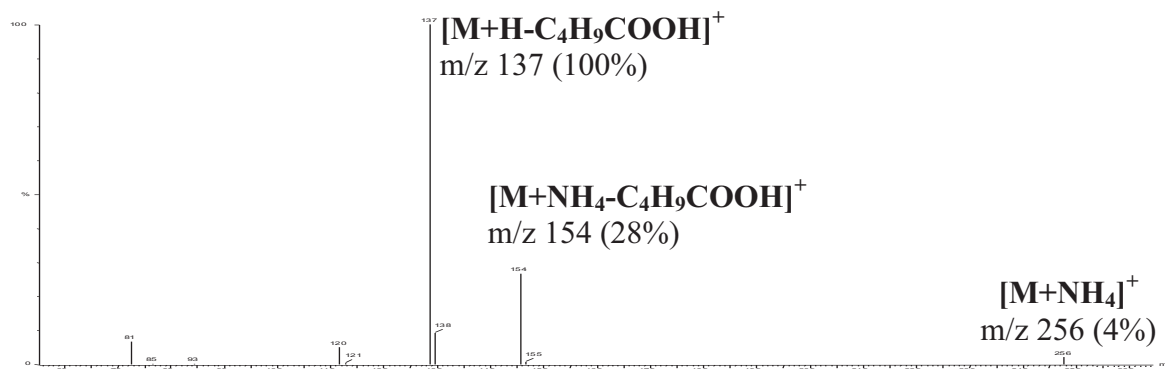


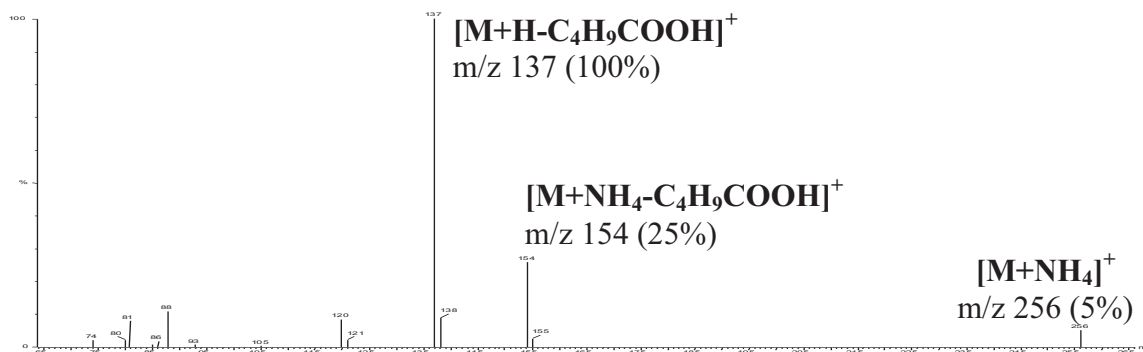
Figure 56 : spectres de masse en ICP-NH<sub>3</sub> de **D1**, **D2**, **D3** et **D4**  
**D1**: isobutyrate de néryle (M=224)



**D2** : 2-méthylbutyrate de néryle (M=238)



**D3**: isovalérate de néryle (M=238)



**D4**: tiglate de néryle (M=236)

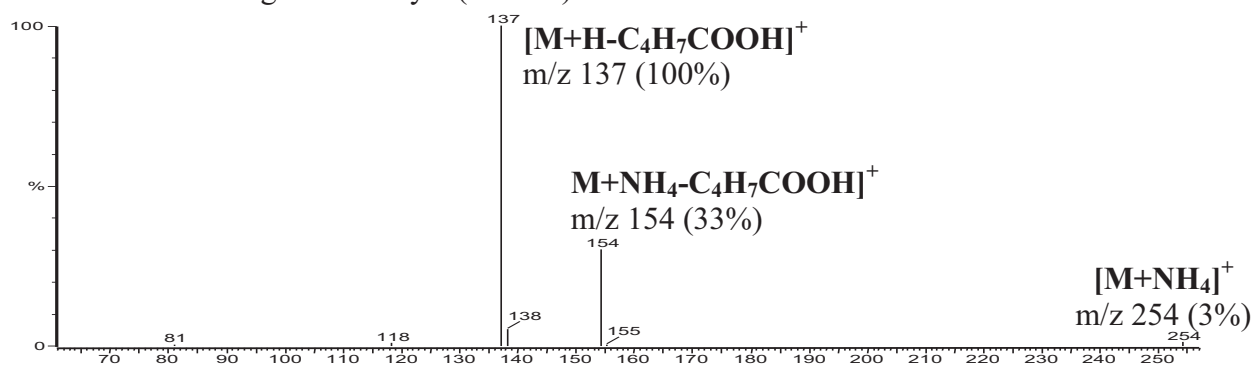


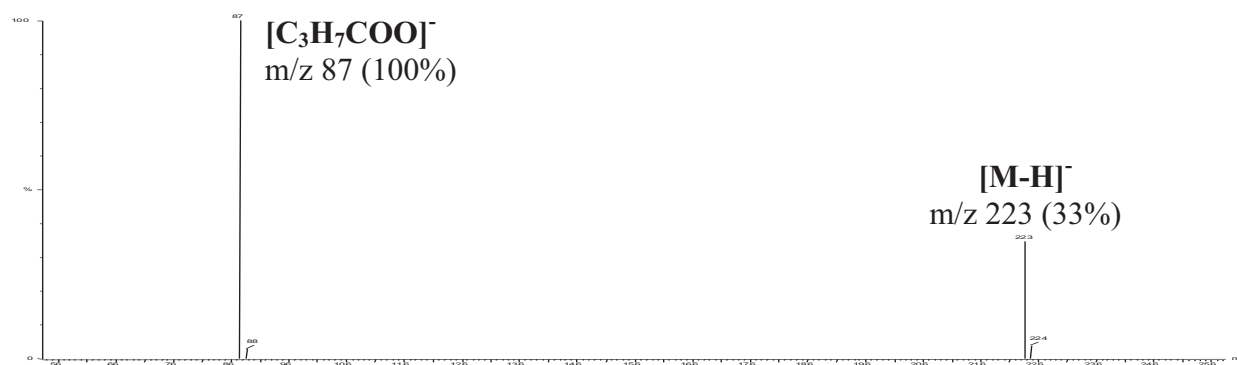
Figure 57 : spectres de masse en ICP-NH<sub>3</sub> de **E1**, **E2** et **E3**



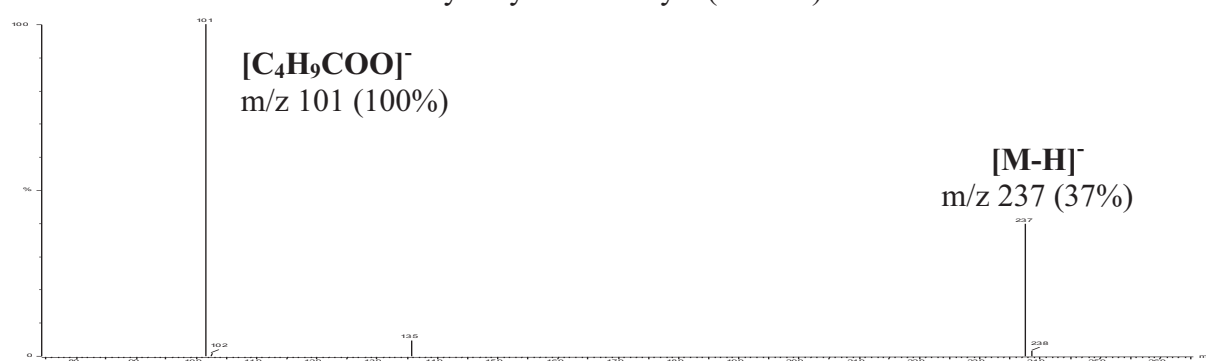


Figure 58 : spectres de masse en ICN-NH<sub>3</sub> de **D1**, **D2**, **D3** et **D4**

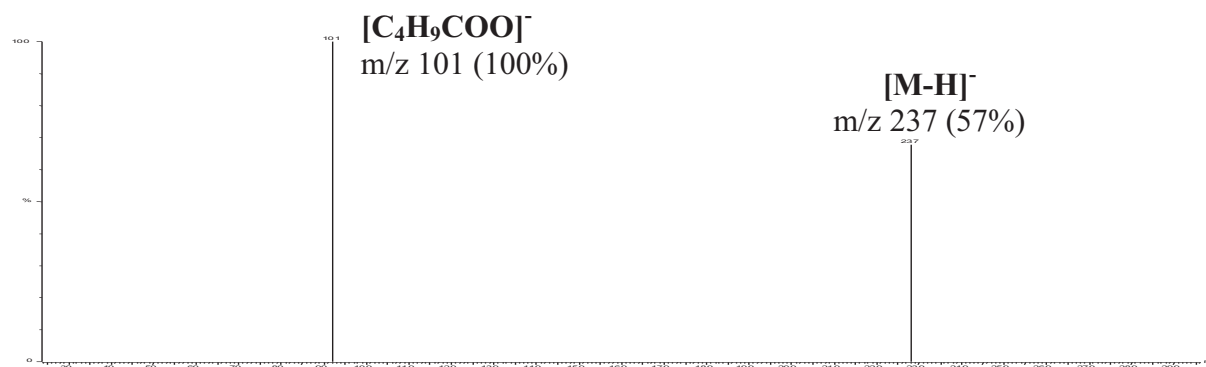
**D1**: isobutyrate de néryle (M=224)



**D2** : 2-méthylbutyrate de néryle (M=238)



**D3**: isovalérate de néryle (M=238)



**D4**: tiglate de néryle (M=236)

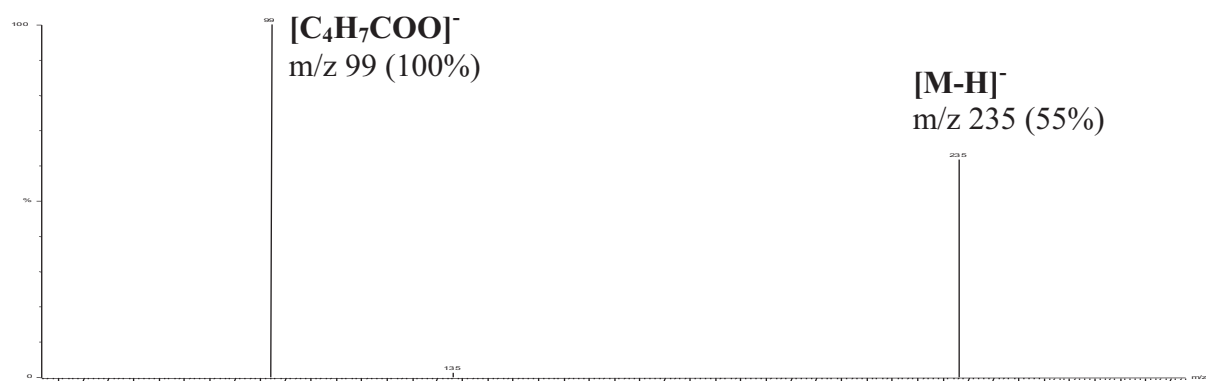
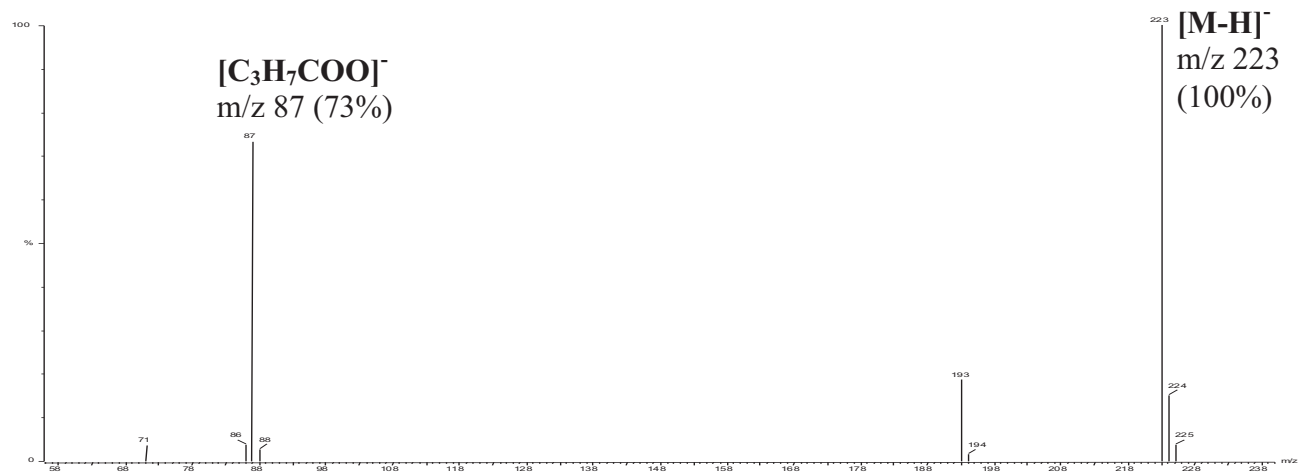


Figure 59 : spectres de masse en ICN-NH<sub>3</sub> de **E1**, **E2** et **E3**

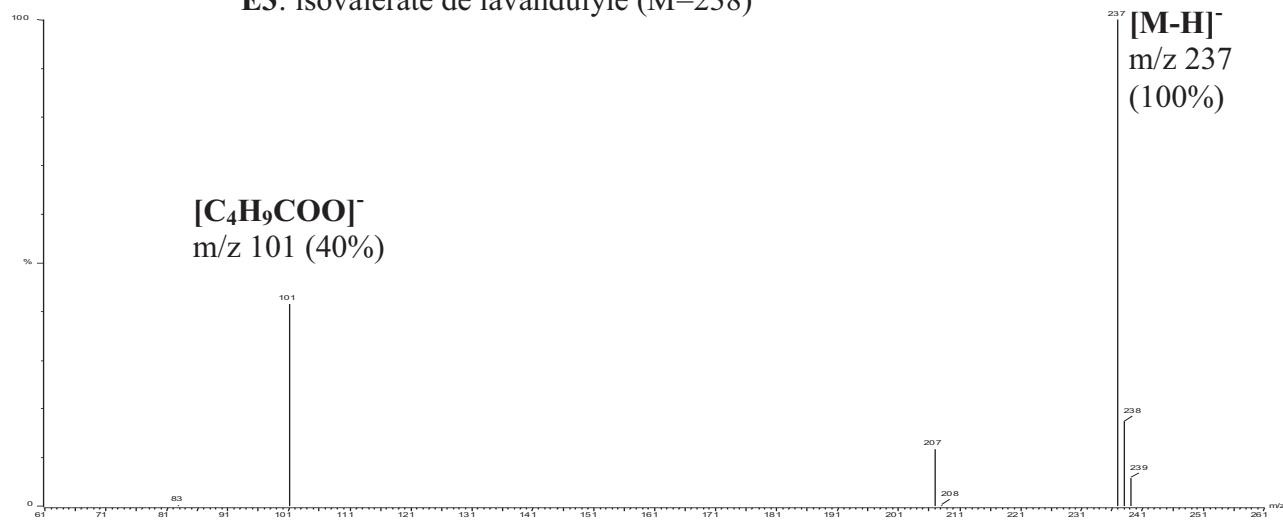
**E1**: isobutyrate de lavandulyle (M=224)



**E2**: 2-méthylbutyrate de lavandulyle (M=238)



**E3**: isovalérate de lavandulyle (M=238)



### 5-3- Contribution de la RMN du carbone-13 à l'identification

Les 12 esters synthétisés (**A1-A3**, **C1-C3**, **D1-D3**, **E1-E3**), reconnus dans les fractions FO1 et FO2 sur la base des indices de rétention et des spectres de masse, ont été caractérisés en RMN du proton et RMN du carbone-13.

D'une façon générale, la confirmation par RMN du carbone-13 de la présence d'un composé dans un mélange est rendue malaisée voire impossible si son abondance est trop faible (non observation des déplacements chimiques) ou si les valeurs des déplacements chimiques de ses carbones sont très proches de celles d'autres carbones (nombre de superpositions trop important). Pour ces raisons, nous avons pu confirmer la présence de seulement quatre des 12 esters monoterpéniques identifiés sur la base des méthodes conventionnelles (CPG/SM et CPG/Ir) appliquées aux composés synthétisés et aux fractions de l'huile essentielle. Il s'agit de l'isobutyrate de thymyle **A1** (FO1 : 8,0%), de l'isobutyrate de bornyle **C1** (FO1 : 16,7%), du 2-méthylbutyrate de bornyle **C2** (FO1 : 8,5%) et de l'isobutyrate de néryle **D1** (FO1 : 10,7%). Les structures et les déplacements chimiques de ces esters monoterpéniques (**A1**, **C1**, **C2** et **D1**) sont présentés à la figure 60.

La structure du tiglate de néryle proposée pour le composé **D4** n'a pu être confirmée en RMN du carbone-13, en raison sa trop faible abondance dans les fractions.

La structure de l'ester de thymyle **A4** pour laquelle nous n'avons pas pu préciser la nature de l'isomère (tiglate ou angélate de thymyle) a pu être établie par RMN du carbone-13. Les déplacements chimiques des carbones méthyliques du groupement tiglate (14,61 ppm et 12,23 ppm) dans la fraction FO2 ont été comparés à ceux des carbones analogues dans l'acide tiglique (14,56 ppm et 11,63 ppm) et dans le tiglate d'éthyle (14,27 ppm et 12,01 ppm). De surcroît, les déplacements chimiques des carbones méthyliques dans l'acide angélique (15,93 ppm et 20,22 ppm) n'ont pas été repérés dans la fraction. Enfin, la reconstitution du spectre du composé **A4** a été

effectuée par comparaison des déplacements chimiques mesurés dans la fraction FO2 (**A4** : 7.8%) avec ceux de l'isobutyrate de thymyle **A1**, d'une part, et du tiglate d'éthyle, d'autre part. Ces comparaisons permettent de préciser la structure du tiglate de thymyle pour le composé **A4** (figure 61).

Ainsi, par comparaison avec l'isobutyrate de thymyle, nous observons les signaux caractéristiques du cycle benzénique entre 148,38 ppm (carbone portant le groupement ester) et 122,93 ppm, un méthyne à 27,22 ppm, trois méthyles à 23,01 ppm (intensité double) et à 20,92 ppm. Les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) sont inférieures ou égales à 0,17 ppm (excepté pour le carbone portant le groupement ester).

Enfin, par comparaison avec les valeurs des déplacements chimiques du tiglate d'éthyle, nous observons les signaux caractéristiques du groupement tiglate :

- un carbonyle (166,68 ppm), associé à un carbone quaternaire (128,92 ppm) et à un méthyne éthylénique (138,96) ; - deux méthyles à 14,61 et à 12,23 ppm. Dans ce cas, nous constatons que les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) ne sont jamais supérieures à 0,31 ppm excepté pour le carbone du groupement carbonyle (0,58 ppm) et pour le méthyne éthylénique (2,16 ppm) du groupement tiglate.

Figure 60 : structures des esters monoterpéniques (**A1**, **C1**, **C2**, **D1**) synthétisés et identifiés par RMN du carbone-13 dans la fraction FO1

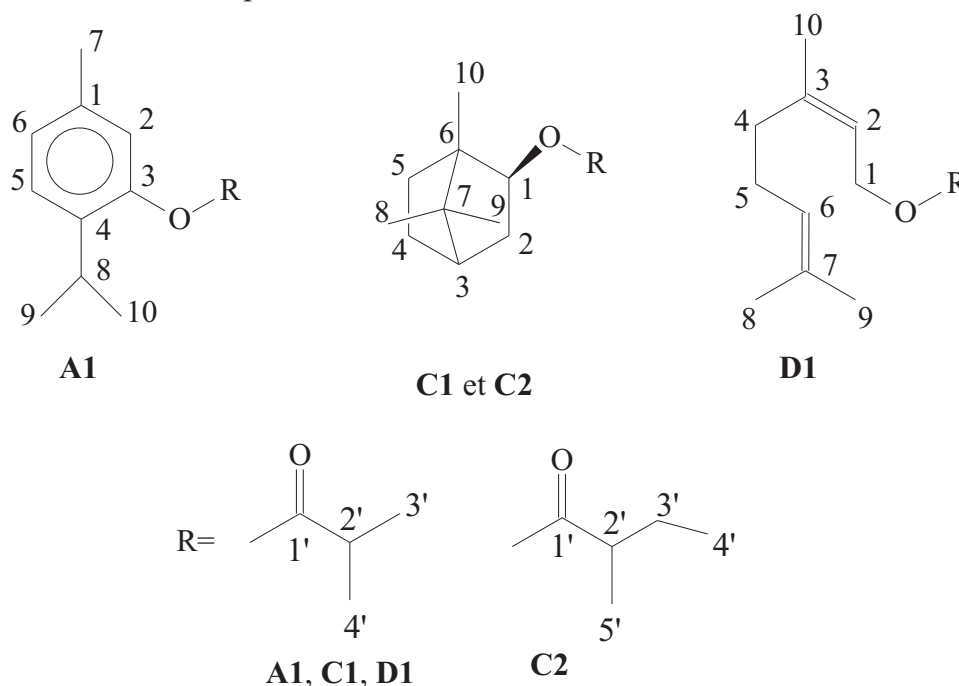


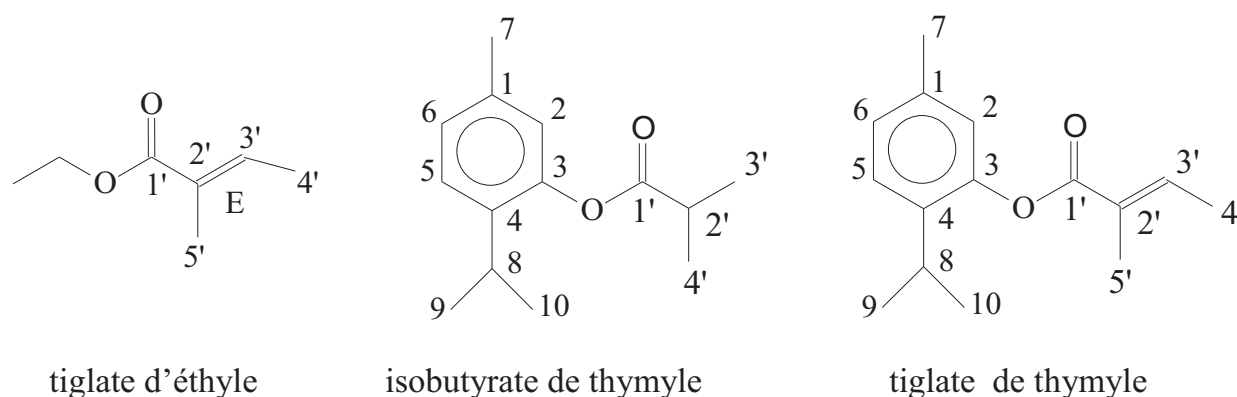
Figure 60 (suite) : déplacements chimiques des esters monoterpéniques (**A1**, **C1**, **C2**, **D1**) mesurés dans la fraction FO1

C	isobutyrate de thymyle		isobutyrate de bornyle		2-méthylbutyrate de bornyle		isobutyrate de néryle	
	<b>A1</b> $\delta$ (FO1)	s	<b>C1</b> $\delta$ (FO1)	d	<b>C2</b> $\delta$ (FO1)	d	<b>D1</b> $\delta$ (FO1)	t
1	137,08 *	s	79,27	d	79,38	d	60,98	t
2	122,79	d	36,81	t	36,96	t	119,43	d
3	148,12	s	44,86	d	44,92	d	142,29	s
4	136,56 *	s	28,00	t	28,08	t	32,20	t
5	126,33 **	d	27,09	t	27,15	t	26,71	t
6	127,03 **	d	48,74	s	48,78	s	123,64	d
7	20,88	q	47,74	s	47,82	s	132,11	s
8	27,05	d	19,62	q	19,71	q	17,66	q
9	23,03	q	18,78	q	18,87	q	27,70	q
10	23,03	q	13,42	q	13,51	q	23,53	q
1'	175,77	s	177,26	s	176,98	s	177,19	s
2'	34,35	d	34,21	d	41,42	d	34,03	d
3'	19,10	q	18,94	q	26,87	t	19,04	q
4'	19,10	q	18,94	q	11,66	q	19,04	q
5'					16,76	q		q

\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C1 et C4

\*\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C5 et C6

Figure 61 : identification de **A4** par comparaison de déplacements chimiques, mesurés dans la fraction FO2, avec ceux du tiglate d'éthyle et de l'isobutyrate de thymyle **A1**



C	$\delta$ tiglate d'éthyle	$\delta$ isobutyrate de thymyle	tiglate de thymyle <b>A4</b> $\delta$ FO2 (ppm)		$\Delta\delta$
1		137,08 *	136,95 *	C	0,13
2		122,79	122,93*	CH	0,14
3		148,12	148,38	C	0,26
4		136,56 *	136,43 *	C	0,13
5		126,33 **	126,28 **	CH	0,05
6		127,03 **	126,93 **	CH	0,10
7		20,88	20,92	CH <sub>3</sub>	0,04
8		27,05	27,22	CH	0,17
9		23,03	23,01	CH <sub>3</sub>	0,02
10		23,03	23,01	CH <sub>3</sub>	0,02
1'	168,10		166,68	C	0,58
2'	128,96		128,92	C	0,04
3'	136,80		138,96	CH	2,16
4'	14,27		14,61	CH <sub>3</sub>	0,34
5'	12,01		12,23	CH <sub>3</sub>	0,21

\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C1 et C4

\*\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C5 et C6

$\Delta\delta$  : variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence

**B- Etude de l'huile essentielle de racines d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum***

1- Analyse de l'huile essentielle avant fractionnement

L'analyse de l'huile essentielle de racines par CPG/Ir et CPG/SM-IE a permis d'identifier 16 constituants se répartissant en 8 composés hydrocarbonés et 8 composés oxygénés, le tout représentant 78%, environ, de la composition chimique globale (tableau 17). L'huile essentielle est caractérisée par la prédominance de composés monoterpéniques. Les produits majoritaires sont l'isobutyrate de néryle (17,6%), l'oxyde de thymyle et de méthyle (15,1%), le  $\delta$ -2-carène (14,5%), l'acétate de néryle (7,5%) et le  $\beta$ -pinène (5,7%). Les autres composés ont une teneur inférieure à 3% (tableau 17).

Tableau 17 : composition chimique de l'huile essentielle de racines

<b>Composés</b>	<b>Ir <i>a</i></b>	<b>Ir <i>p</i></b>	<b>%</b>
$\alpha$ -pinène	930	1024	1,6
camphène	943	1066	0,9
$\beta$ -pinène	970	1111	5,7
$\delta$ -2-carène	996	1140	14,5
$\alpha$ -phellandrène	996	1169	2,5
para-cymène	1012	1271	3,0
limonène	1022	1205	0,9
$\alpha$ -terpinéol	1172	1692	1,0
oxyde de thymyle et de méthyle	1215	1586	15,1
acétate de bornyle	1269	1579	1,1
acétate de néryle	1342	1725	7,5
isobutyrate de thymyle ( <b>A1</b> )	1458	1889	1,3
isobutyrate de néryle ( <b>D1</b> )	1469	1780	17,6
bicyclogermacrène	1494	1724	1,2
$\tau$ -cadinol	1625	2152	2,8
$\alpha$ -cadinol	1643	2218	1,5
<b>TOTAL</b>			<b>78,2</b>

**Ir** : indices de rétention sur colonne apolaire (***a***) et sur colonne polaire (***p***)  
**%** : abondance relative des composés mesurée sur colonne apolaire (***a***)  
sauf lors de coélution colonne polaire (***p***)

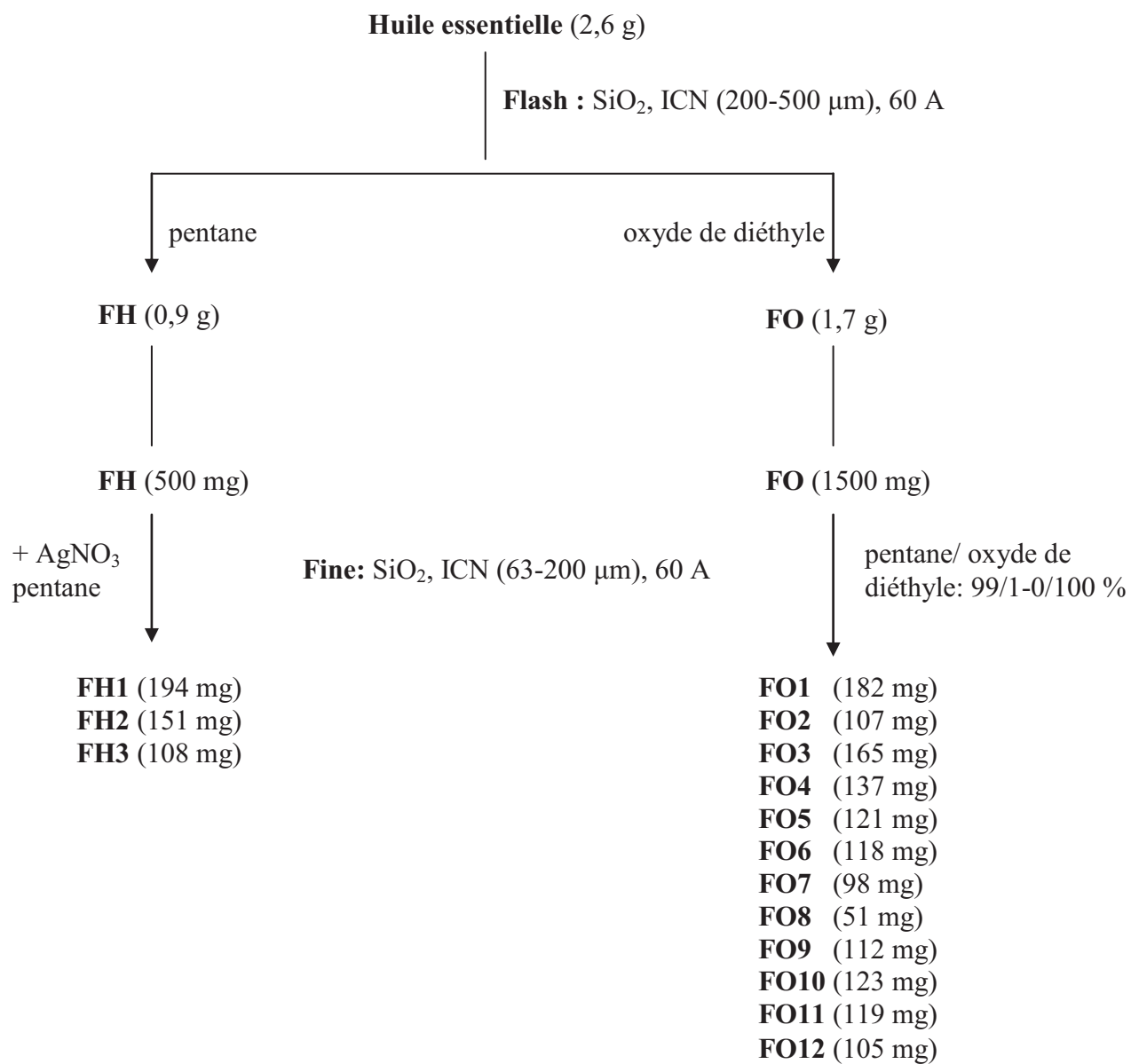
## 2- Fractionnement de l'huile essentielle

Comme pour l'huile essentielle de parties aériennes, celle de racines (2,6 g) a été soumise à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte de silice de forte granulométrie (chromatographie flash : SiO<sub>2</sub>, ICN 200-500 μm, 60 A). Par élution au pentane on obtient une fraction FH contenant les composés hydrocarbonés (0,9 g) ; une élution à l'oxyde de diéthyle conduit, ensuite, à une fraction FO contenant les composés oxygénés (1,7 g).

Ces deux fractions font l'objet de la séquence classique d'analyse par CPG/Ir et par CPG/SM et sont soumises, à leur tour, à un fractionnement sur colonne de silice de granulométrie plus fine (Fine: SiO<sub>2</sub>, ICN (63-200 um), 60 A). On collecte 3 fractions hydrocarbonées (FH1 à FH3) et 12 fractions oxygénées (FO1 à FO12). Le fractionnement est représenté schématiquement à la figure 62. Chacune des 15 fractions est soumise à la même séquence analytique que ci-dessus.



Figure 62 : fractionnement de l'huile essentielle de racines  
d' *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum*



### 3- Etude des fractions hydrocarbonées

#### *Analyse en CPG/Ir et en GPG/SM-IE*

Les composés hydrocarbonés et leurs abondances relatives dans chaque fraction sont repris dans le tableau 18. Par rapport à l'analyse de l'huile essentielle, ce sont 44 composés supplémentaires qui ont été identifiés avec une certitude suffisante soit par comparaison avec les caractéristiques d'échantillons authentiques contenus dans nos bibliothèques propres (34 composés écrits en police usuelle), soit par comparaison avec les données des bibliothèques commerciales de type König-Joulain (18, 19) (10 composés écrits en italique).

Parmi les composés identifiés à partir des bibliothèques propres au laboratoire figurent, notamment, les composés à squelette silphiperfolane (**H1** à **H4**) et le modhephène (**H5**) qui y ont été intégrés à la suite de l'étude de l'huile essentielle de parties aériennes.

Au total, ces 52 composés représentent 96,3 % en masse de la composition chimique globale de la fraction hydrocarbonée.

### 4- Etude des fractions oxygénées

#### *Analyse en CPG/Ir et en GPG/SM-IE*

Les composés oxygénés et leurs abondances relatives dans chaque fraction sont repris dans le tableau 19. Par rapport à l'analyse de l'huile essentielle, ce sont 38 composés supplémentaires qui ont été identifiés avec une certitude suffisante soit par comparaison avec les caractéristiques d'échantillons authentiques contenus dans nos bibliothèques propres (30 composés écrits en police usuelle), soit par comparaison avec les données de bibliothèques commerciales de type König-Joulain (19) (7

composés écrits en italique). L'identification du 2,5-diméthoxycymène (écrit en italique et en gras) est détaillée dans le chapitre 2 (paragraphe 5).

Parmi les composés identifiés, nous relevons la présence de 6 esters monoterpéniques (**A1**, **A2**, **B1**, **B2**, **C1**, **C2**, **D1**, **D2**) dont l'étude a déjà été détaillée dans l'analyse des huiles essentielles de parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* de Corse (cf. A- paragraphe 5).

Au total, ces 46 composés représentent 81,5% en masse de la composition chimique globale de la fraction oxygénée.

Les composés oxygénés restant non identifiés dans les fractions oxygénés sont notés **A5**, **B5**, **D5**, **A6**, **B6**, **D6** (fractions FO3 à FO5) et **D7**, **D8**, **F1** (fractions FO8 à FO11). Leur désignation tient compte, par anticipation, des résultats de l'analyse par CPG/SM-IC à laquelle nous les avons soumis.

Au total, nous reportons la présence de 55 composés représentant 91,8 % de la fraction oxygénée (tableau 19).

### ***Etude par RMN du carbone-13***

Le composé **B1** pour lequel la banque commerciale König-Joulain (19) propose la structure de l'isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle a été l'objet d'une étude par CPG/SM-(IE et IC) lors de l'analyse de l'huile essentielle des parties aériennes où il avait une faible abondance. Il est présent dans la fraction FO6 avec une teneur de 8,1% permettant une étude par RMN du carbone-13. L'identification a pu ainsi être confirmée également par cette méthode sur la base du spectre de l'isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle reconstitué à partir de ceux de l'isobutyrate de thymyle et du paracyménène (figure 63).

Tableau 18 : composés identifiés dans les fractions hydrocarbonées de l'huile essentielle de racines d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum*.

<i>Fractions</i>			<b>FH</b>	<b>FH1</b>	<b>FH2</b>	<b>FH3</b>
<i>Masse des fractions (mg)</i>			<b>500</b>	<b>164</b>	<b>151</b>	<b>108</b>
<b>Composés</b>	<b>Ir a</b>	<b>Ir p</b>				
$\alpha$ -pinène	930	1024	2,4	3,2	-	-
camphène	943	1066	1,5	2,1	-	-
$\beta$ -pinène	970	1111	12,3	18,1	-	-
myrcène	981	1166	0,5	0,9	0,3	-
$\delta$ -2-carène	996	1140	27,4	43,7	0,3	-
$\alpha$ -phellandrène	996	1169	6,9	10,3	0,1	-
para-cymène	1012	1271	10,4	-	15,0	-
limonène	1022	1205	3,1	-	4,1	-
terpinolène	1079	1281	0,7	-	1,0	-
undécane	1100	1100	tr	0,5	-	-
7- $\alpha$ -[H]-silphiperfol-5-ène ( <b>H1</b> )	1326	1429	0,3	0,7	0,1	-
<i>bicycloélémente</i>	1334	1481	0,1	-	0,1	-
<i>présilphiperfol-7-ène</i>	1335	1414	0,1	0,2	-	-
7- $\beta$ -[H]-silphiperfol-5-ène ( <b>H2</b> )	1348	1454	0,9	3,1	0,4	-
silphin-1-ène ( <b>H3</b> )	1348	1474	0,9	3,9	0,7	-
$\alpha$ -cubébène	1350	1460	tr	-	0,1	-
<i>silphiperfola-5,7(14)-diène</i>	1353	1523	tr	-	0,2	0,1
isolédène	1373	1467	0,1	-	0,3	0,4
silphiperfol-6-ène ( <b>H4</b> )	1377	1496	0,4	1,5	0,5	-
modhéphène ( <b>H5</b> )	1382	1522	1,1	3,7	0,8	-
$\beta$ -élémente	1387	1579	0,4	-	0,5	4,8
$\beta$ -bourbonène	1388	1519	tr	0,1	0,2	-
$\alpha$ -isocomène	1388	1533	0,1	0,5	0,1	-
$\beta$ -isocomène	1406	1571	0,1	0,6	0,2	-
$\alpha$ -barbatène	1410	1565	0,7	2,3	0,6	-
(E)- $\beta$ -caryophyllène	1419	1593	1,9	-	10,2	-
<i>isobarbatène</i>	1424	1579	0,4	1,3	0,2	-
trans- $\alpha$ -bergamotène	1430	1580	0,7	-	4,1	-
aromadendrène	1436	1599	0,3	0,3	3,1	3,6
$\beta$ -barbatène	1441	1633	0,1	0,3	-	-
$\alpha$ -himachalène	1447	1632	tr	-	0,8	-
allo-aromadendrène	1451	1631	0,5	0,4	2,7	-
$\alpha$ -humulène	1451	1661	0,5	-	-	8,1
(E)- $\beta$ -farnésène	1452	1665	0,5	-	-	6,6
$\alpha$ -curcumène	1467	1763	0,3	-	-	1,9
$\gamma$ -muurolène	1471	1681	0,1	-	1,2	-

<i>Fractions</i>			<b>FH</b>	<b>FH1</b>	<b>FH2</b>	<b>FH3</b>
germacrène D	1477	1701	3,4	-	-	11,0
trans- $\beta$ -bergamotène	1479	1678	1,6	-	12,4	2,1
$\gamma$ -humulène	1479	1708	3,8	-	12,2	16,0
lédène	1492	1686	0,4	-	5,9	1,7
$\alpha$ -muurolène	1494	1716	0,1	-	1,8	-
bicyclogermacrène	1494	1724	6,6	-	-	7,7
cuparène	1496	1804	0,1	-	1,6	1,0
$\beta$ -bisabolène	1500	1718	1,1	-	-	16,0
$\gamma$ -cadinène	1507	1748	1,1	-	5,6	0,8
calaménène	1511	1818	0,3	-	-	0,8
$\delta$ -cadinène	1516	1748	1,3	-	5,8	1,6
sesquiphéllandrène B	1516	1761	0,3	-	-	3,3
<i>(E)-<math>\alpha</math>-bisabolène</i>	1534	1769	0,4	-	-	2,5
$\alpha$ -calacorène	1539	1894	tr	-	-	1,5
$\beta$ -calacorène	1548	1932	tr	-	-	0,6
<i>germacrène B</i>	1554	1816	0,1	-	-	1,3
<b>Total</b>			<b>96,3</b>	<b>97,7</b>	<b>93,2</b>	<b>93,4</b>

Les composés écrits en police usuelle sont présents dans nos bibliothèques propres d'Ir et de SM

Les composés en *italique* ont été identifiés par comparaison avec les bibliothèques commerciales (18, 19)

**Ir** : Indices de rétention calculés sur colonne apolaire (**a**) et sur colonne polaire (**p**)

Les abondances sont données sur colonne apolaire (sauf lors de coélution : pourcentages donnés sur colonne polaire)

Tableau 19 : composés identifiés dans les fractions oxygénés d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum*

<i>Fractions</i>	FO	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9	FO10	FO11	FO12	
<i>Masse des fractions (mg)</i>	1500	182	107	165	137	121	118	98	51	112	123	119	105	
<i>Composés</i>	Ir	a	Ir	p										
linalol	0,6	1082	1547	-	-	-	-	-	-	-	5,8	-	-	
trans-para-mentha-2,8-dièn-1-ol	tr	1103	1622	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	
<i>cis-para-menth-2-èn-1-ol</i>	tr	1106	1561	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	
<i>cis-para-mentha-2,8-dièn-1-ol</i>	tr	1116	1663	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	
<i>trans-para-menth-2-èn-1-ol</i>	tr	1123	1625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	
camphre	0,1	1125	1510	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	
verbénol (cis ou trans)	tr	1128	1678	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	
oxyde de néryle	0,1	1137	1469	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	
terpinèn-4-ol	tr	1161	1610	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	
$\alpha$ -terpinéol	1,8	1172	1610	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24,1	
<i>8, 9-déhydrothymol</i>	0,1	1193	1961	-	-	-	-	0,3	1,1	-	-	-	-	
nérol	0,5	1208	1793	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,7	
néral	tr	1214	1637	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	
oxyde de thymyle et de méthyle	13,9	1215	1586	95,7	92,9	24,7	6,1	0,4	-	-	-	-	-	
oxyde de carvacryle et de méthyle	0,1	1224	1594	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
géraniol	tr	1235	1835	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	
géralial	0,1	1245	1723	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	
thymol	0,1	1267	2157	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	
acétate de bornyle	1,9	1269	1579	-	-	-	-	11,1	6,9	-	-	-	-	
carvacrol	tr	1275	2183	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	
<i>acétate de trans-pinocarvyle</i>	0,2	1281	1641	-	-	-	-	1,9	0,3	-	-	-	-	
acétate de néryle	12,5	1342	1725	-	-	-	-	54,4	85,4	9,8	0,1	-	-	

<i>Fractions</i>	FO	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9	FO10	FO11	FO12
acétate de géranyle	1358	1752	0,1	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-
<b>2,5-diméthoxycymène</b>	1399	1852	2,6	1,5	5,6	8,9	-	-	-	-	-	-	-
isobutyrate de bornyle (C1)	1402	1641	0,7	-	1,4	1,5	2,0	-	-	-	-	-	-
propionate de néryle	1428	1784	1,1	-	-	1,4	2,9	5,0	-	-	-	-	-
<b>isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle (B1)</b>	1454	1922	1,1	-	-	0,3	2,6	8,1	0,3	0,2	-	-	-
isobutyrate de thymyle (A1)	1458	1889	2,3	-	3,0	3,7	6,1	5,5	0,3	0,2	-	-	-
isobutyrate de néryle (D1)	1469	1780	29,4	3,8	57,4	67,6	78,2	7,7	0,5	3,2	-	-	-
<b>B5</b>	1479	2116	0,1	-	0,1	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-
<b>A5</b>	1481	1957	0,1	-	0,3	0,3	0,4	-	-	-	-	-	-
2-méthylbutyrate de bornyle (C2)	1494	1729	0,2	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
<b>D5</b>	1501	1857	1,1	-	2,2	2,7	1,7	-	-	-	-	-	-
présilphiperfolane-9 $\alpha$ -ol (O1)	1515	1992	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0
2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle (B2)	1548	1996	0,3	-	0,2	0,4	0,7	-	-	-	-	-	-
2-méthylbutyrate de thymyle (A2)	1551	1964	0,6	-	0,7	0,8	1,3	-	-	-	-	-	-
2-méthylbutyrate de néryle (D2)	1554	1857	1,0	-	0,3	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-
spathuléol	1563	2103	1,0	-	-	-	-	-	-	-	14,8	0,3	-
oxyde de caryophyllène	1575	1960	0,3	-	-	-	-	-	4,5	-	-	-	-
globulol	1576	2051	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7
<b>B6</b>	1580	2117	0,2	-	0,2	0,2	0,4	-	-	-	-	-	-
<b>A6</b>	1582	2074	0,5	-	0,6	0,7	0,7	-	-	-	-	-	-
époxyde d'humulène II	1594	2011	0,1	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-
<b>D6</b>	1604	1970	0,7	-	0,4	0,7	0,2	-	-	-	-	-	-
<i>eudesm-4(15)-èn-6-ol</i>	1610	2025	0,6	-	-	-	-	-	7,6	-	-	-	-
$\tau$ -cadinol	1625	2152	4,9	-	-	-	-	-	-	47,5	14,8	0,9	-
cubénol	1631	2023	tr	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-
<i><math>\beta</math>-himachalol</i>	1637	2193	tr	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-

<i>Fractions</i>	FO	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9	FO10	FO11	FO12
$\alpha$ -cadinol	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39,7
$\beta$ -acorénol	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-
<b>D7</b>	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24,2	-
$\alpha$ -bisabolol	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-
épi- $\alpha$ -bisabolol	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-
<b>D8</b>	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	25,0	19,7	-	-
<b>F1</b>	2,6	-	-	-	-	-	-	-	18,4	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>91,8</b>	<b>95,7</b>	<b>98,3</b>	<b>97,3</b>	<b>95,8</b>	<b>92,1</b>	<b>93,7</b>	<b>94,9</b>	<b>48,4</b>	<b>29,3</b>	<b>76,6</b>	<b>53,8</b>	<b>81,8</b>

Les composés écrits normalement ont été identifiés sont présents dans nos bibliothèques propres d'Ir et de SM

Les composés en *italique* ont été identifiés par comparaison avec les bibliothèques commerciales (19, 21)

L'identification des composés en *italique* et en **gras** est détaillée dans le paragraphe 5

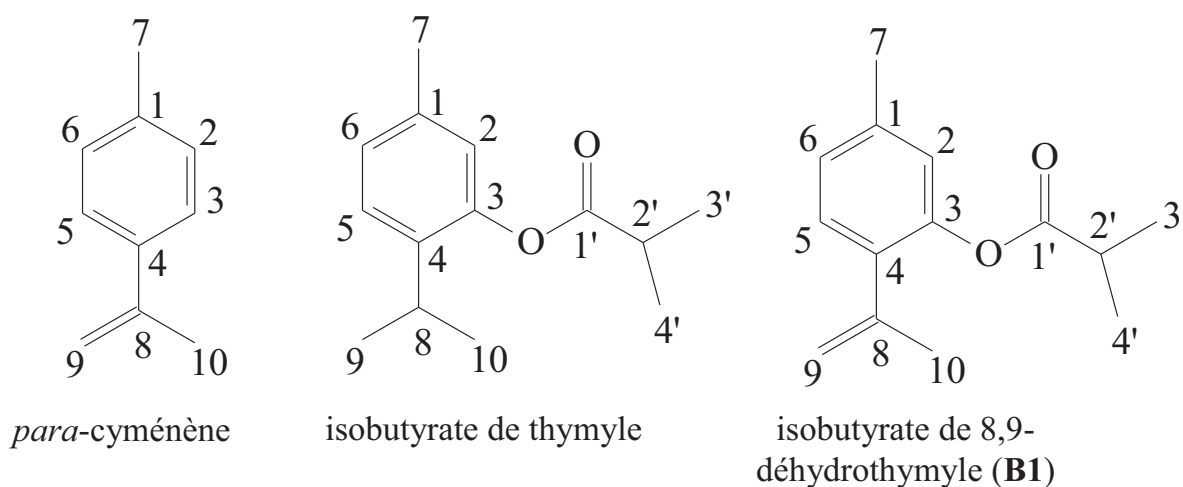
Les composés en **gras** ont été identifiés, également, par RMN du carbone-13

**Ir** : Indices de rétention calculés sur colonne apolaire (**a**) et sur colonne polaire (**p**)

Les abondances sont données sur colonne apolaire (sauf lors de coélution : pourcentages donnés sur colonne polaire)



Figure 63 : comparaison de déplacements chimiques mesurés dans la fraction FO6 avec ceux de l'isobutyrate de thymyle (**A1**) et du para-cyménène



C	$\delta$ <i>para</i> -cyménène	$\delta$ isobutyrate de thymyle	<b>B1</b> $\delta$ (FO6) ppm		$\Delta\delta$
1		137,08 *	138,08 *	C	1,00
2		122,79	123,04	CH	0,25
3		148,12	147,38	C	0,74
4	138,40	136,56 *	133,55 *	C	3,01
5		126,33 **	126,58 **	CH	0,25
6		127,03 **	128,86 **	CH	1,83
7		20,88	20,90	CH <sub>3</sub>	0,02
8	143,09		141,36	C	1,73
9	111,54		115,53	CH <sub>2</sub>	3,99
10	21,83		23,55	CH <sub>3</sub>	1,72
1'		175,77	175,45	C	0,32
2'		34,35	34,15	CH	0,20
3'		19,10	18,87	CH <sub>3</sub>	0,23
4'		19,10	18,87	CH <sub>3</sub>	0,23

\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C1 et C4

\*\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C5 et C6

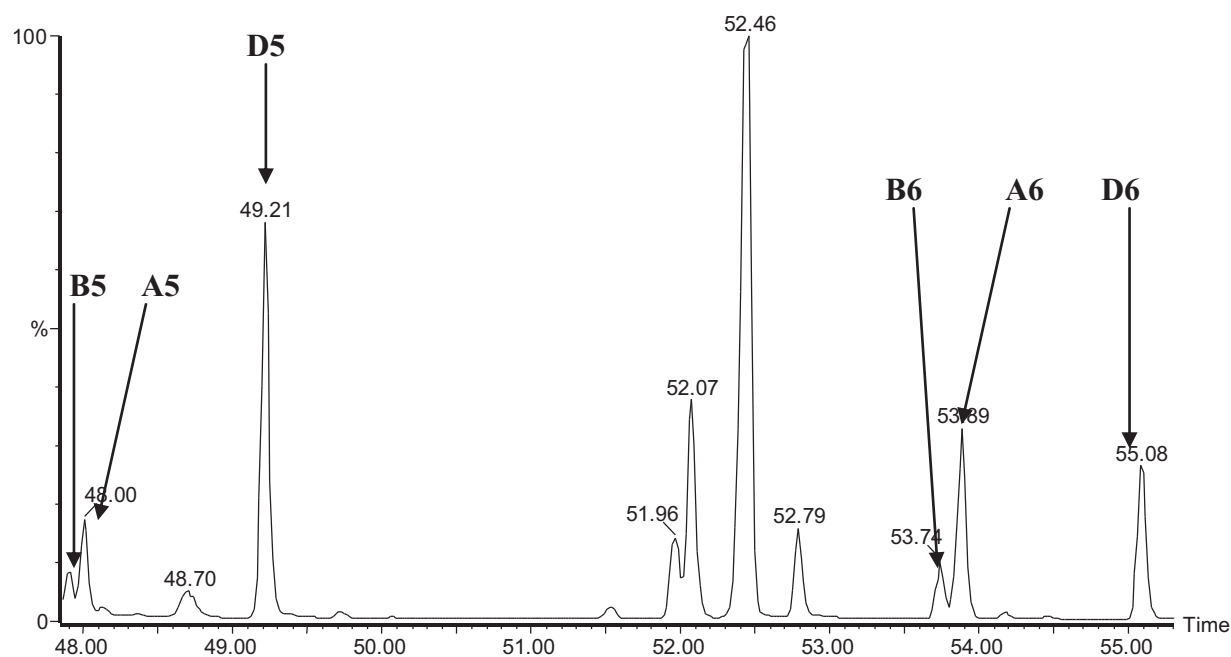
$\Delta\delta$  : variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence

Nous observons 14 signaux et le nombre de superpositions ne gêne en rien la confirmation du composé car environ 70% des carbones lui appartiennent en propre. Les variations des valeurs des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) sont inférieures ou égales à 1 ppm pour environ 70% des carbones.

## 5- Etude des composés absents des bibliothèques

A titre d'exemple, la figure 64 donne le chromatogramme reconstitué de la fraction FO4 où apparaissent les composés **A5**, **A6**, **B5**, **B6**, **D5**, **D6**.

Figure 64 : agrandissement du chromatogramme reconstitué de la fraction FO4 (colonne apolaire)



### *a- Etude des composés A5, B5, A6 et B6*

#### ▪ Par CPG/Ir et CPG/SM-IE

Pour les composés **A5**, **B5**, **A6** et **B6**, les différentes bibliothèques commerciales ne font aucune proposition de structure.

Les spectres de masse (IE) des composés **A5** et **B5** sont quasiment identiques. On observe les pics moléculaires respectivement à  $m/z$  218 et à  $m/z$  216 ainsi que deux pics de forte intensité : celui correspondant à l'ion acylium  $C_2H_5CO^+$  à  $m/z$  69 et celui du carbocation alkyle  $C_3H_5^+$  à  $m/z$  41 (annexe 7).

Les spectres de masse (IE) des composés **A6** et **B6** sont également quasiment identiques entre eux et analogues aux précédents ; les pics moléculaires sont respectivement à m/z 232 et à m/z 230, le pic de l'ion acylium  $C_3H_7CO^+$  à m/z 83 et celui du carbocation alkyle  $C_4H_7^+$  à m/z 55. Les spectres de masse de **A6** et **B6** sont à rapprocher de ceux du tiglate de thymyle (**A4**) et du tiglate de 8,9-déhydrothymyle (**B4**) identifiés précédemment dans l'huile essentielle des parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* de Corse. Cependant les indices de rétention sont notablement différents : environ 50 unités sur colonne apolaire et de 100 unités sur colonne polaire. Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur la structure de ces composés et de confirmer leur masse moléculaire, nous avons entrepris une étude en ionisation chimique.

- Par CPG/SM-IC

- *Etude des composés A5 et A6*

Les spectres de masse de **A5** et **A6** en ICP-CH<sub>4</sub> sont donnés à l'annexe 8.

Les principales fragmentations de ces deux composés (figure 65) nous permettent de confirmer :

- les masses molaires de 218 (**A5**) et de 232(**A6**) par l'observation des ions quasi-moléculaires  $[M+H]^+$  respectivement à m/z 219 et m/z 233 ;
- les masses des parties acyles par l'observation des ions acylium  $C_3H_5CO^+$  à m/z 69 (**A5**) et  $C_4H_7CO^+$  à m/z 83 (**A6**) ;
- la présence d'un groupement isopropyle sur le cycle benzénique par l'observation des ions  $[M+H-C_3H_6]^+$  à m/z 177 (**A5**) et à m/z 191 (**A6**), issus de la perte du groupement isopropyle à partir de la molécule protonée;
- une insaturation en  $\alpha,\beta$  du groupement fonctionnel empêchant le réarrangement d'hydrogène. Comme nous l'avons déjà relevé dans le cas du tiglate de thymyle (**A4**) nous n'observons pas d'ions à m/z 151 et à m/z 179.

Les spectres de masse en IC-NH<sub>3</sub> sont donnés à l'annexe 9, de leur examen nous déduisons :

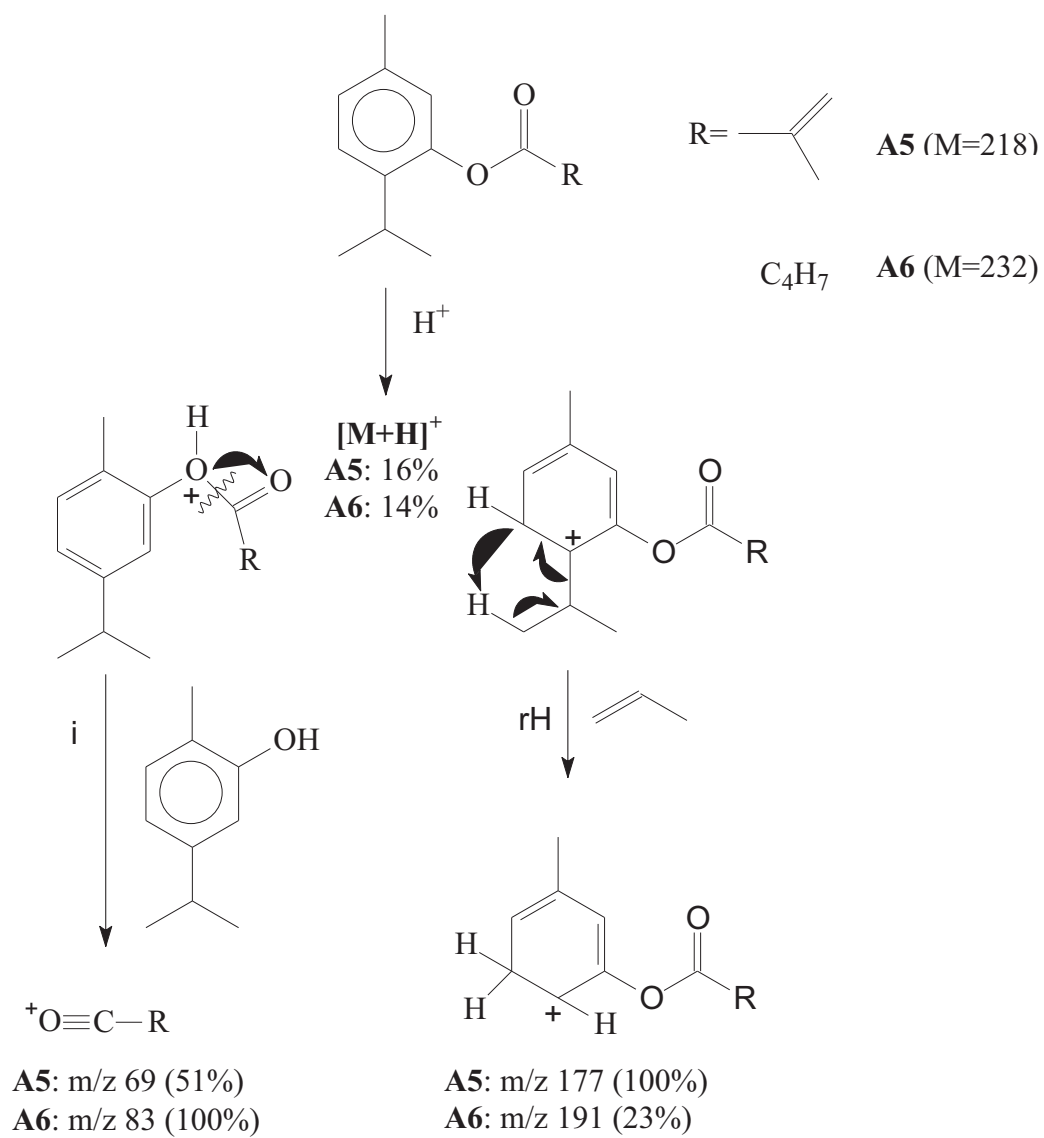
- les masses molaires des composés **A5** (M=218) et **A6** (M=232) par l'observation des ions quasi-moléculaires [M-H]<sup>-</sup> en ICN et des ions adduits [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> en ICP ;

- la structure de la partie aryle de l'ester par l'observation du pic à m/z 149 (100%) en ICN-NH<sub>3</sub> caractéristique de l'ion thymyle.

Pour le composé **A5**, ces informations nous conduisent à proposer la structure du méthacrylate de thymyle. En outre, nous avons réalisé l'hémisynthèse de celui-ci. Le produit synthétisé a été reconnu par RMN du proton et RMN du carbone-13 et étudié par CPG et CPG/SM. La concordance des données spectrales et des indices de rétention de l'échantillon authentique (Ir *a* 1485/ Ir *p* 1953) avec ceux du composé **A5** (Ir *a* 1481/ Ir *p* 1957) confirme notre identification.

Pour le composé **A6**, les données de l'étude par CPG/SM et la discordance de ses indices de rétention avec ceux du tiglate de thymyle, nous conduisent à proposer la structure de l'angélate de thymyle.

Figure 65 : principales fragmentations en ICP-CH<sub>4</sub> de A5 et A6



- Etude des composés **B5** et **B6**

De l'examen des spectres de masse obtenus en ICP-CH<sub>4</sub> (annexe 10), nous en déduisons :

- les masses molaires des composés **B5** (216) et **B6** (230) par l'observation des ions caractéristiques [M+H]<sup>+</sup> à m/z 217 (38%) et à m/z 231 (14%) ;

- la formule brute des groupes acyles par l'observation des pics des ions C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>CO<sup>+</sup> à m/z 69 pour **B5** et C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>CO<sup>+</sup> à m/z 83 pour **B6**. Il est à noter que ces deux pics sont les pics de base des spectres afférents ;

- la présence d'une double liaison en α,β dans le groupement acyle, du fait de l'absence d'un pic intense à m/z 151 (migration d'un hydrogène et perte d'un fragment R=C=O) ;

- la présence d'un groupe isopropylène sur le cycle benzénique, du fait de l'absence de pics à m/z 177 pour **B5** et à m/z 191 pour **B6** ([M+H-C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>]<sup>+</sup>).

Dès à présent, nous pouvons conclure, dans les deux cas, à des structures d'esters de type 8,9-déhydrothymyle. Nous proposons, d'attribuer à **B5** la structure du méthacrylate de 8,9-déhydrothymyle. Par ailleurs, les indices de rétention du composé **B6**, différent notablement de ceux du composé **B4** identifié comme étant le tiglate de 8,9-déhydrothymyle. Nous proposons, d'identifier **B6** comme étant l'angélate de 8,9-déhydrothymyle.

L'analyse par IC-NH<sub>3</sub> conforte ces propositions :

- aussi bien en ICP, par l'observation des ions [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> et [M+H]<sup>+</sup> ;

- qu'en ICN, par l'observation des ions quasi-moléculaires [M-H]<sup>-</sup> et de pics de base à m/z 147 correspondant à l'ion phénolate dérivé du 8,9-déhydrothymol.

## ***b- Etude des composés D5 et D6***

### ▪ Par CPG/Ir et CPG/SM-IE

Pour les composés **D5** et **D6**, les banques commerciales proposent des structures acycliques monoterpéniques. Les spectres de masse des composés **D5** et **D6** obtenus en impact électronique présentent de nombreuses similitudes (annexe 11). Ces spectres sont à rapprocher de ceux des esters de néryle (groupe **D**). En effet, pour ces constituants, nous avons observé des ions de fortes abondances à  $m/z$  41, à  $m/z$  69, à  $m/z$  93 et à  $m/z$  121 et pas d'ions moléculaires (comme dans le cas des esters de lavandulyle).

En outre, pour le composé **D6**, nous observons également des pics intenses caractéristiques de la partie acyle à  $m/z$  83 et à  $m/z$  55 comme dans le cas du tiglate de néryle (**D4**). La principale discordance réside dans les indices de rétention ; nous notons une différence de l'ordre de 50 unités sur colonne apolaire et de 80 unités sur colonne polaire.

Afin de déterminer la masse moléculaire et obtenir d'autres renseignements sur la structure de ces composés nous avons poursuivi l'étude en ionisation chimique.

### ▪ Par CPG/SM-IC

L'étude des composés **D5** et **D6** en ICP aussi bien avec l'ammoniac qu'avec le méthane ne donne que peu de renseignements sur leur structure. En effet, nous observons :

- en ICP-CH<sub>4</sub>, un ion abondant  $[M+H-RCOOH]^+$  à  $m/z$  137 ( 70%) ;
- en ICP-NH<sub>3</sub>, un ion  $[M+H-RCOOH]^+$  à  $m/z$  137 (100%) et un ion  $[M+NH_4-RCOOH]^+$  à  $m/z$  154 (25-30%) ainsi qu'un ion adduit  $[M+NH_4]^+$  de faible intensité à  $m/z$  240 (6%) pour **D5** et à  $m/z$  254 (2%) pour **D6**. Nous en déduisons néanmoins les masses moléculaires des deux composés, respectivement 222 et 236.

En ICN-NH<sub>3</sub>, nous observons pour le composé **D5** un ion quasi moléculaire [M-H]<sup>-</sup> à m/z 221 (25%) et un ion carboxylate C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>COO<sup>-</sup> à m/z 85 (100%) (annexe 12). Ces résultats nous suggèrent un ester linéaire monoterpénique : le méthacrylate de néryle. La présence d'un ester de lavandulyle peut être écartée dans la mesure où, comme nous avons vu précédemment, les spectres en IC-NH<sub>3</sub> sont différents pour les deux types d'esters (cf. A- paragraphe 5-2).

Nous avons procédé à la synthèse du méthacrylate de néryle que nous avons reconnu par RMN du proton et RMN du carbone-13. La concordance des données spectrales et des indices de rétention de l'échantillon authentique (Ir *a* 1503/ Ir *p* 1863) avec ceux du composé **D5** (Ir *a* 1501/ Ir *p* 1857) confirme notre identification.

Pour le composé **D6**, nous notons en ICN-NH<sub>3</sub> la présence d'un ion quasi moléculaire [M-H]<sup>-</sup> à m/z 235 (17%) et d'un ion carboxylate C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>COO<sup>-</sup> à m/z 99 (100%) (annexe 12). Les résultats obtenus en CPG/SM-IE et IC pour le composé **D6** sont identiques à ceux obtenus pour le tiglate de néryle (**D4**) identifié dans l'huile essentielle des parties aériennes. Cependant, la discordance de ses indices de rétention avec ceux du tiglate de thymyle (50 unités sur colonne apolaire et 80 sur colonne polaire) nous conduit à proposer la structure de l'angélate de néryle.

### *c- Etude des composés D7, D8*

- Par CPG/SM-IE

Les composés **D7** et **D8** présentent des spectres de masse identiques et la masse moléculaire n'a pu être déterminée du fait de l'absence des pics moléculaires (annexe 13). Après fractionnement, le composé **D7** est présent dans la fraction FO11 à une teneur de 24,2% et le composé **D8** l'est dans les fractions FO9 et FO10 respectivement à 25,0% et à 19,7%.



▪ Par CPG/SM-IC

L'ICP-CH<sub>4</sub> ne donne que peu d'informations sur la structure des deux composés **D7** et **D8** ; un seul signal abondant est observé à m/z 137.

L'IC-NH<sub>3</sub> est plus adaptée ;

- en ICP, nous observons un pic de base à m/z 272 pour le composé **D7** et à m/z 300 pour le composé **D8** et, dans les deux cas, des ions abondants à m/z 195 (8%) et m/z 135 (29%-38%). Ces pics de base correspondent aux ions adduits [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. Nous en déduisons les masses moléculaires de **D7** (254) et de **D8** (282) (annexe 14) ;

- en ICN, ces masses moléculaires sont confirmées par les ions quasi-moléculaires [M-H]<sup>-</sup> à m/z 253 (20%) pour **D7** et à m/z 281 (2%) pour **D8**. Les principaux pics observés sont m/z 195 (100%), m/z 179 pour **D7** et m/z 195, m/z 87 (100%) pour **D8**.

L'utilisation de l'IC-NH<sub>3</sub> nous permet, donc, de déterminer leur masse moléculaire mais également de différencier ces deux composés qui présentaient des spectres de masse identiques en IE et en ICP-CH<sub>4</sub>.

La masse moléculaire du composé **D7** déterminée en ionisation chimique correspond à celle de l'acétate de 10-acétoxyneryle (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>) (M=254) identifié par Zdero et Bohlmann (261) dans un extrait de racines d'*Eupatorium cannabinum*.

Pour le composé **D8**, la présence sur le spectre ICN-NH<sub>3</sub> d'un ion carboxylate C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>COO<sup>-</sup> à m/z 87 (100%) laisse supposer un groupement fonctionnel isobutyrate. Nous pouvons proposer la structure de l'isobutyrate de 10-acétoxyneryle pour le composé **D8** en accord avec une masse molaire de 282 (C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>). Afin de confirmer ces résultats nous avons étudié les fractions contenant les composés **D7** et **D8** par RMN du carbone-13.

▪ Par RMN du carbone-13

Nous avons poursuivi l'étude des composés **D7** et **D8** par RMN du carbone-13, en comparant respectivement les déplacements mesurés dans les fractions FO9 à FO11 avec ceux de l'acétate de néryle, d'une part, et de l'isobutyrate de néryle, d'autre part. Cette reconstitution nous permet de confirmer la structure de l'acétate de 10-acétoxyneryle pour le composé **D7** et celle de l'isobutyrate de 10-acétoxyneryle pour le composé **D8** (figure 66).

Sur les spectres de ces mélanges, plusieurs séries de raies de résonance, restaient non attribuées. Les spectres des fractions FO11 et FO9 présentaient respectivement 14 et 16 raies de résonance de forte intensité non attribuées.

La comparaison des déplacements chimiques de la fraction FO11 avec ceux de l'acétate de néryle et la réalisation d'une séquence « spin echo », nous ont permis d'observer les signaux caractéristiques :

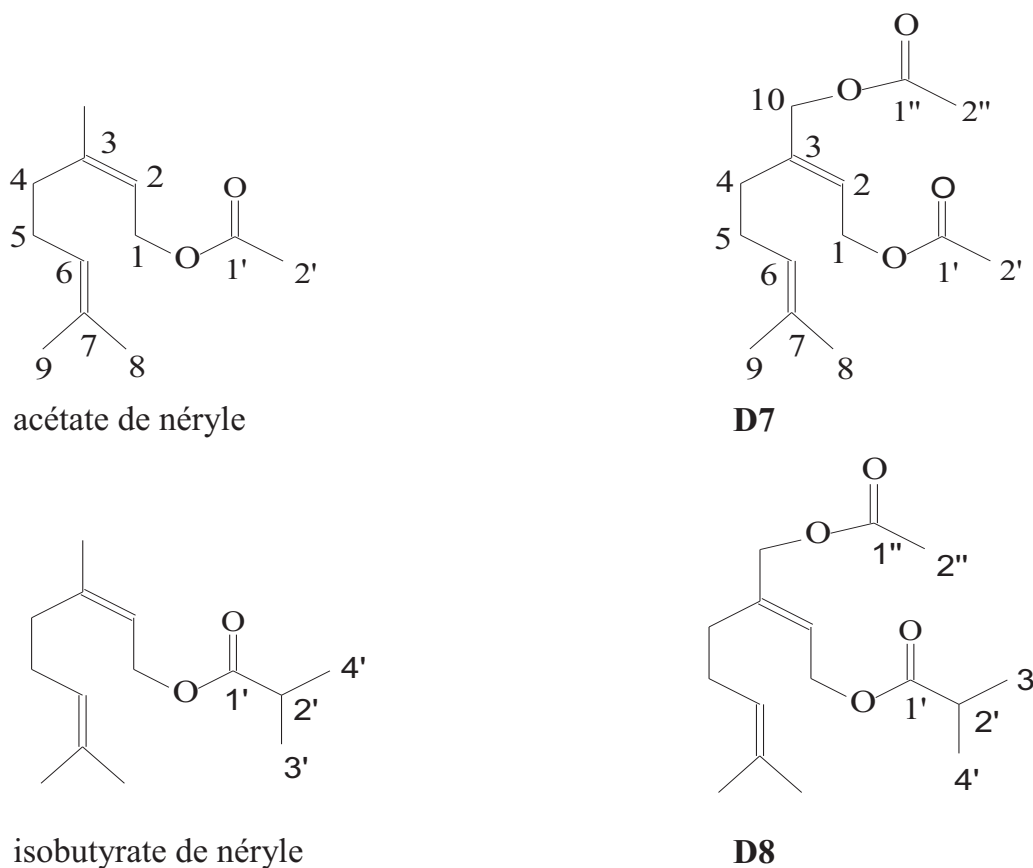
- des deux fonctions acétate par la présence de deux carbonyles (170,97 et 170,73 ppm) associés à deux méthylènes (60,54 ppm et 67,12 ppm) et à deux méthyles (18,97 ppm et 20,95 ppm).

- du groupement isopentenyle par l'observation des signaux à 28,66 ppm, 123,09 ppm, 132,73 ppm, 25,69 ppm et 17,66 ppm.

Nous observons également un carbone quaternaire à 153,36 ppm et un méthyne éthylénique à 122,36 ppm. Nous constatons que ces carbones subissent un effet déblindant par la présence d'une deuxième fonction ester sur la molécule.

Dans le spectre de la fraction FO9 contenant le composé **D8**, nous observons 12 raies de résonances proches de celles l'acétate de 10-acétoxyneryle (**D7**) avec des variations des valeurs des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) inférieures ou égales à 0,07 ppm pour 9 d'entre elles et des variations plus importantes pour les 3 autres situées entre les deux groupements esters (0,16 ppm, 0,36 ppm et 3,50 ppm). Les 4 déplacements chimiques restants non attribués sont caractéristiques d'un groupement isobutyrate : un carbonyle à 177,01 ppm associé à un méthyne à 34,13 ppm et à un pic d'intensité double à 18,99 ppm (deux méthyles équivalents).

Figure 66 : identification de **D7** et **D8** par comparaison des déplacements chimiques, mesurés dans les fractions FO9 et FO11, avec ceux de l'acétate de néryle et de l'isobutyrate de néryle



C	$\delta$ acétate de néryle	$\delta$ isobutyrate de néryle	<b>D7</b> $\delta$ (FO11)	<b>D8</b> $\delta$ (FO9)	
1	61,11	60,98	60,54	60,38	CH <sub>2</sub>
2	119,3	119,43	122,36	122,72	CH
3	142,52	142,29	153,36	156,86	C
4	26,69	26,71	26,94	26,97	CH <sub>2</sub>
5	32,21	32,2	28,66	28,66	CH <sub>2</sub>
6	123,65	123,64	123,09	123,14	CH
7	132,11	132,11	132,73	132,66	C
8	25,67	25,79	25,69	25,68	CH <sub>3</sub>
9	17,67	17,66	17,66	17,66	CH <sub>3</sub>
10			67,12	67,18	CH <sub>2</sub>
1'	171,03	177,19	170,97	177,01	C
2'	21	34,03	18,87	33,96	CH <sub>3</sub> ou CH
3'		19,04		18,99	CH <sub>3</sub>
4'		19,04		18,99	CH <sub>3</sub>
1''			170,73	170,67	C
2''			20,95	20,92	CH <sub>3</sub>

#### ***d- Etude du composé F1***

Le composé **F1** admet un ion moléculaire abondant à  $m/z$  216 (56%) et un pic de base à  $m/z$  201 (perte d'un méthyle) (annexe 13).

La masse molaire du composé **F1** a été facilement confirmée en IC-NH<sub>3</sub> par l'observation de pic de base à  $m/z$  215 [M-H]<sup>-</sup> en ICN et à  $m/z$  217 [M+H]<sup>+</sup> en ICP (annexe 15). Cette masse moléculaire est en accord avec celle de l'euparine (formule brute C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>) identifié par différents auteurs dans les huiles essentielles et les extraits d'*Eupatorium cannabinum* (cf. I- étude bibliographique).

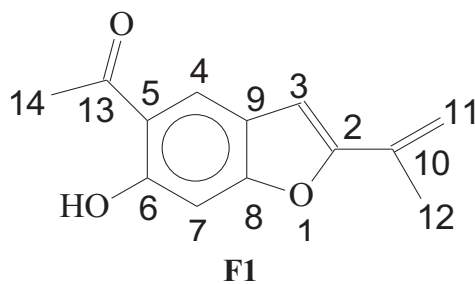
Sur le spectre de RMN du carbone 13 de la fraction FO8, nous observons 13 raies de résonance non attribuées avec des intensités moyennes de 4,5 correspondant bien à un composé présent à 18% dans la fraction.

Parmi ces 13 raies, nous repérons un signal appartenant à un groupement carbonyle à 204,38 ppm et une série de 8 signaux résonnant entre 160,24 et 103,39 ppm caractéristiques d'un benzofurane.

Le composé **F1** a été identifié comme étant l'euparine par comparaison des déplacements chimiques mesurés dans la fraction FO8 avec ceux décrits dans la littérature (272) (figure 67). Nous constatons que les auteurs (272) ont enregistré le spectre de l'euparin dans le DMSO, probablement en raison d'une mauvaise solubilité du composé dans le CDCl<sub>3</sub>. Nous pouvons citer parmi les déplacements chimiques caractéristiques : le carbone portant le groupement hydroxyle à 158,56 ppm, les deux méthynes à 103,39 et 98,47 ppm et le méthyle à 18,69 ppm.

Ainsi, tous les carbones de l'euparine sont observés (sans superposition avec d'autres signaux) et les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) sont inférieures ou égales à 0,06 ppm.

Figure 67 : structures et déplacements chimiques de l'euparine (F1), mesurés dans la fraction FO8, et décrits dans la littérature (272)



C	$\delta$ euparin (272) (DMSO)	F1 $\delta$ FO8 (DMSO)	
2	156,75	156,69	s
3	103,35	103,39	d
4	124,79	124,84	d
5	132,03	131,98	s
6	158,59	158,56	s
7	98,48	98,47	d
8	160,27	160,24	s
9	121,3	121,28	s
10	117,15	117,09	s
11	113,12	113,12	t
12	18,69	18,69	q
13	204,33	204,38	s
14	27,23	27,28	q

### III- BILAN DE L'ETUDE SUR *EUPATORIUM CANNABINUM*

Les constituants majoritaires des huiles essentielles de parties aériennes sont : le germacrène D (28,5 %), l' $\alpha$ -phellandrène (19,0 %) et le para-cymène (5,2 %) ; ceux des huiles essentielles de racines sont : l'isobutyrate de néryle (17,6%), l'oxyde de thymyle et de méthyle (15,1%), le  $\delta$ -2-carène (14,5%), l'acétate de néryle (7,5%) et le  $\beta$ -pinène (5,7%).

L'analyse détaillée de l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* après fractionnement sur colonne ouverte de silice et par combinaison des techniques chromatographiques, de la spectrométrie de masse (IE et IC) et de la RMN du carbone-13, a conduit à l'identification de 147 composés dans l'huile essentielle des parties aériennes et de 107 composés dans celles des racines représentant respectivement 93,6% et 96,1% de la composition chimique globale. Cela représente un total de 181 constituants différents repris dans le tableau 20.

Une grande majorité de constituants (soient 121) ont été identifiés sur la base des bibliothèques d'indices de rétention et de spectres de masse propres au laboratoire.

14 esters monoterpéniques ont été reconnus à partir des composés synthétisés.

Les bibliothèques commerciales ont proposé avec une certitude suffisante les structures de 33 autres constituants. Sept d'entre elles ont été confirmées par RMN du carbone-13. Il s'agit des cinq sesquiterpènes tricycliques (7- $\alpha$ -[H]-silphiperfol-5-ène **H1**, 7- $\beta$ -[H]-silphiperfol-5-ène **H2**, silphin-1-ène **H3**, silphiperfol-6-ène **H4**, modhephène **H5**) et des deux alcools sesquiterpéniques (présilphiperfolane-9 $\alpha$ -ol **O1**, copabornéol **O2**).

Enfin, les structures de 12 constituants ont été identifiées par la mise en œuvre du couplage CPG/SM en mode ionisation chimique.

Tableau 20 : composition chimique des huiles essentielles de parties aériennes et de racines d'*Eupatorium cannabinum* de Corse (subsp. *corsicum*)

Composés	Ir a	Ir p	P.A	R	Identification
(Z)-hex-3-èn 1-ol	818	1377	0,2	-	Ir, IE
(Z)-hex-2-èn-1-ol	827	1405	0,1	-	Ir, IE
hexanol	834	1357	0,1	-	Ir, IE
$\alpha$ -pinène	930	1024	0,2	1,6	Ir, IE
camphène	943	1066	1,6	0,9	Ir, IE
$\beta$ -pinène	970	1111	0,3	5,7	Ir, IE
$\beta$ -myrcène	981	1166	0,8	0,2	Ir, IE
$\delta$ -2-carène	996	1140	3,9	14,5	Ir, IE
$\alpha$ -phellandrène	996	1169	19,0	2,5	Ir, IE
phénylacétaldehyde	1011	1624	tr	-	Ir, IE
para-cymène	1012	1271	5,2	3,0	Ir, IE
$\beta$ -phellandrène	1020	1215	0,1	-	Ir, IE
limonène	1022	1205	0,7	0,9	Ir, IE
(Z)- $\beta$ -ocimène	1026	1238	0,2	-	Ir, IE
(E)- $\beta$ -ocimène	1037	1254	1,5	-	Ir, IE
terpinolène	1079	1281	-	0,2	Ir, IE
nonanal	1081	1395	tr	-	Ir, IE
linalol	1082	1547	0,2	0,3	Ir, IE
undécane	1100	1100	tr	0,1	Ir, IE
(E)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène	1105	1309	tr	-	Ir, IE
trans-para-mentha-2,8-dièn-1-ol	1103	1622	-	tr	Ir, IE
cis-para-menth-2-èn-1-ol	1106	1561	0,1	tr	Ir, IE
cis-para-mentha-2,8-dièn-1-ol	1116	1663	-	tr	Ir, IE
trans-para-menth-2-èn-1-ol	1123	1625	0,1	tr	Ir, IE
camphre	1125	1510	-	0,1	Ir, IE
verbénol (cis ou trans)	1128	1678	-	tr	Ir, IE
oxyde de nérol	1137	1469	tr	0,1	Ir, IE
lavandulol	1148	1671	tr	-	Ir, IE
bornéol	1149	1692	tr	-	Ir, IE
terpinén-4-ol	1161	1610	tr	tr	Ir, IE
$\alpha$ -terpinéol	1172	1692	0,2	1,0	Ir, IE
cis-pipéritol	1179	1742	tr	-	Ir, IE
décanal	1182	1498	tr	-	Ir, IE
trans-pipéritol	1189	1738	0,1	-	Ir, IE
8,9-déhydrothymol	1193	1961	0,1	tr	Ir, IE
$\beta$ -cyclocitral	1197	1704	tr	-	Ir, IE
nérol	1208	1793	0,1	0,2	Ir, IE
pulégone	1214	1637	tr	-	Ir, IE

Composés	Ir a	Ir p	P.A	R	Identification
néral	1214	1673	-	tr	Ir, IE
oxyde de thymyle et de méthyle	1215	1586	2,1	15,1	Ir, IE
<i>carvotanacétone</i>	1221	1669	tr	-	Ir, IE
oxyde de carvacryle et de méthyle	1224	1594	tr	0,1	Ir, IE
géraniol	1235	1835	-	tr	Ir, IE
géranial	1245	1723	-	0,1	Ir, IE
acétate de linalyle	1237	1555	tr	-	Ir, IE
thymol	1267	2157	tr	tr	Ir, IE
acétate de bornyle	1269	1579	0,6	1,1	Ir, IE
acétate de lavandulyle	1271	1606	0,4	-	Ir, IE
carvacrol	1275	2183	tr	tr	Ir, IE
<i>acétate de trans-pinocarvyle</i>	1281	1641	-	0,1	Ir, IE
(E,E)-2,4-décadiénal	1288	1798	tr	-	Ir, IE
tridécane	1300	1300	tr	-	Ir, IE
7- $\alpha$ -[H]-silphiperfol-5-ène (H1)	1326	1429	0,3	0,1	Ir, IE, <sup>13</sup> C
acétate de $\alpha$ -terpinyle	1330	1688	tr	-	Ir, IE
<i>bicycloélémente</i>	1334	1481	0,1	tr	Ir, IE
<i>présilphiperfol-7-ène</i>	1335	1414	0,2	tr	Ir, IE
acétate de néryle	1342	1725	2,3	7,5	Ir, IE
7- $\beta$ -[H]-silphiperfol-5-ène (H2)	1348	1454	0,6	0,2	Ir, IE, <sup>13</sup> C
silphin-1-ène (H3)	1348	1474	1,6	0,3	Ir, IE, <sup>13</sup> C
$\alpha$ -cubebène	1350	1460	0,1	tr	Ir, IE
<i>silphiperfola-5,7(14)-diène</i>	1353	1523	-	tr	Ir, IE
acétate de géranyle	1358	1752	tr	tr	Ir, IE
(E)- $\beta$ -damascénone	1362	1810	tr	-	Ir, IE
isolede	1373	1467	-	tr	Ir, IE
cyclosativène	1377	1473	tr	-	Ir, IE
$\alpha$ -copaène	1377	1496	0,2	-	Ir, IE
silphiperfol-6-ène (H4)	1377	1496	0,6	0,1	Ir, IE, <sup>13</sup> C
<i>péthyrène</i>	1377	1512	tr	-	Ir, IE
modhephène (H5)	1382	1522	0,8	0,2	Ir, IE, <sup>13</sup> C
$\beta$ -cubébène	1387	1537	0,4	-	Ir, IE
$\beta$ -élémente	1387	1579	0,7	0,2	Ir, IE
$\beta$ -bourbonène	1388	1519	tr	tr	Ir, IE
$\alpha$ -isocoméne	1388	1533	0,2	tr	Ir, IE
sativène	1390	1525	tr	-	Ir, IE
(E)- $\beta$ -damascone	1391	1805	tr	-	Ir, IE
2,5-diméthoxycymène	1399	1852	-	1,5	Ir, IE
isobutyrate de bornyle (C1)	1402	1641	1,2	0,4	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C, Syn
$\beta$ -isocoméne	1406	1571	0,2	tr	Ir, IE
$\alpha$ -barbatène	1410	1565	-	0,1	Ir, IE



<b>Composés</b>	<b>Ir a</b>	<b>Ir p</b>	<b>P.A</b>	<b>R</b>	<b>Identification</b>
isobutyrate de lavandulyle ( <b>E1</b> )	1410	1677	tr	-	Ir, IE, IC, Syn
$\beta$ -ylangène	1418	1568	tr	-	Ir, IE
(E)- $\beta$ -caryophyllène	1419	1593	3,1	0,3	Ir, IE
<i>iso-barbatène</i>	1424	1579	-	0,1	Ir, IE
$\beta$ -copaène	1426	1585	0,1	-	Ir, IE
géranyle acétone	1426	1846	tr	-	Ir, IE
propionate de néryle	1428	1784	tr	0,6	Ir, IE
trans- $\alpha$ -bergamotène	1430	1580	tr	0,1	Ir, IE
aromadendrène	1436	1599	0,1	0,1	Ir, IE
<i><math>\beta</math>-barbatène</i>	1441	1633	-	tr	Ir, IE
$\alpha$ -himachalène	1447	1632	-	tr	Ir, IE
allo-aromadendrène	1451	1631	0,2	tr	Ir, IE
$\alpha$ -humulène	1451	1661	1,0	tr	Ir, IE
(E)- $\beta$ -farnésène	1452	1665	-	tr	Ir, IE
isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle ( <b>B1</b> )	1454	1922	0,2	0,7	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C
isobutyrate de thymyle ( <b>A1</b> )	1458	1889	0,7	1,3	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C, Syn
2-méthylbutyrate de 2-phényléthyle	1460	1950	tr	-	Ir, IE
$\beta$ -ionone	1462	1923	tr	-	Ir, IE
isovalérate de 2-phényléthyle	1463	1964	tr	-	Ir, IE
$\alpha$ -curcumène	1467	1763	-	tr	Ir, IE
isobutyrate de néryle ( <b>D1</b> )	1469	1780	0,3	17,6	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C, Syn
$\gamma$ -muurolène	1471	1681	0,2	tr	Ir, IE
germacrène D	1477	1701	28,5	0,6	Ir, IE
trans- $\beta$ -bergamotène	1479	1678	tr	tr	Ir, IE
$\gamma$ -humulène	1479	1708	-	1,0	Ir, IE
méthacrylate de 8,9-déhydrothymyle ( <b>B5</b> )	1479	2116	-	tr	Ir, IE, IC
tridécan-2-one	1481	1806	tr	-	Ir, IE
méthacrylate de thymyle ( <b>A5</b> )	1481	1957	-	0,1	Ir, IE, IC, Syn
cubébol	1485	1880	0,1	-	Ir, IE
2-méthylbutyrate de lavandulyle ( <b>E2</b> )	1490	1759	0,3	-	Ir, IE, IC, Syn
lédène	1492	1686	0,2	tr	Ir, IE
$\alpha$ -muurolène	1494	1716	tr	tr	Ir, IE
bicyclogermacrène	1494	1724	1,7	1,2	Ir, IE
2-méthylbutyrate de bornyle ( <b>C2</b> )	1494	1729	1,2	0,1	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C, Syn
isovalérate de lavandulyle ( <b>E3</b> )	1494	1761	0,1	-	Ir, IE, IC, Syn
(E,E)- $\alpha$ -farnésène	1496	1744	0,9	-	Ir, IE
cuparène	1496	1804	-	tr	Ir, IE
$\beta$ -bisabolène	1500	1718	0,4	0,2	Ir, IE
isovalérate de bornyle ( <b>C3</b> )	1501	1753	0,2	-	Ir, IE, IC, Syn
méthacrylate de néryle ( <b>D5</b> )	1501	1857	-	0,6	Ir, IE, IC, Syn
4-épi-cubébol	1504	1928	0,2	-	Ir, IE

Composés	Ir a	Ir p	P.A	R	Identification
$\gamma$ -cadinène	1507	1748	0,2	0,2	Ir, IE
calaménène	1511	1818	tr	tr	Ir, IE
présilphiperfolane-9 $\alpha$ -ol ( <b>O1</b> )	1515	1992	tr	0,1	Ir, IE, <sup>13</sup> C
$\delta$ -cadinène	1516	1748	0,6	0,4	Ir, IE
$\beta$ -sesquiphellandrène	1516	1761	-	tr	Ir, IE
$\alpha$ -cadinène	1531	1779	tr	-	Ir, IE
élémol	1531	2052	tr	-	Ir, IE
( <i>E</i> )- $\alpha$ -bisabolène	1534	1769	-	0,1	Ir, IE
$\alpha$ -calacorène	1539	1894	tr	tr	Ir, IE
( <i>E</i> )-nérolidol	1544	2013	0,1	-	Ir, IE
2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle ( <b>B2</b> )	1548	1996	0,2	0,4	Ir, IE, IC
$\beta$ -calacorène	1548	1932	tr	tr	Ir, IE
isovalérate de 8,9-déhydrothymyle ( <b>B3</b> )	1548	2006	0,2	-	Ir, IE, IC
2-méthyle butyrate de thymyle ( <b>A2</b> )	1551	1964	0,2	0,6	Ir, IE, IC, Syn
isovalérate de thymyle ( <b>A3</b> )	1551	1975	0,3	-	Ir, IE, IC, Syn
germacrène <i>B</i>	1554	1816	0,1	tr	Ir, IE
2-méthylbutyrate de néryle ( <b>D2</b> )	1554	1857	0,2	0,5	Ir, IE, IC, Syn
1,5-époxyalvial-4-(14)-ène	1554	1959	tr	-	Ir, IE
maaliol	1559	1973	tr	-	Ir, IE
isovalérate de néryle ( <b>D3</b> )	1560	1877	0,1	-	Ir, IE, IC, Syn
palustrol	1562	1914	tr	-	Ir, IE
spathuléol	1563	2103	0,3	0,3	Ir, IE
gleénol	1572	2008	tr	-	Ir, IE
$\beta$ -germacréol	1573	2019	tr	-	Ir, IE
oxyde de caryophyllène	1575	1960	0,2	0,1	Ir, IE
globulol	1576	2051	0,1	0,1	Ir, IE
viridiflorol	1580	2054	0,1	-	Ir, IE
angélate de 8,9-déhydrothymyle ( <b>B6</b> )	1580	2117	-	0,1	Ir, IE, IC
angélate de thymyle ( <b>A6</b> )	1582	2074	-	0,4	Ir, IE, IC
lédol	1588	1997	tr	-	Ir, IE
apiol dill	1589	2327	tr	-	Ir, IE
copabornéol ( <b>O2</b> )	1592	2159	0,3	-	Ir, IE, <sup>13</sup> C
époxyde d'humulène II	1594	2011	tr	tr	Ir, IE
angélate de néryle ( <b>D6</b> )	1604	1970	-	0,5	Ir, IE, IC
eudesm-4(15)-èn-6-ol	1610	2025	0,3	0,3	Ir, IE
1,10-épi-cubénol	1610	2054	tr	-	Ir, IE
1-épi-cubénol	1615	2033	0,2	-	Ir, IE
$\gamma$ -eudesmol	1616	2149	tr	-	Ir, IE
iso-spathuléol	1619	2206	tr	-	Ir, IE
$\tau$ -cadinol	1625	2152	0,3	2,8	Ir, IE
$\tau$ -muurolol	1625	2170	0,3	-	Ir, IE

Composés	Ir <i>a</i>	Ir <i>p</i>	P.A	R	Identification
tiglate de 8,9-déhydrothymyle ( <b>B4</b> )	1627	2205	tr	-	Ir, IE, IC
cubénol	1631	2023	0,1	tr	Ir, IE
tiglate de thymyle ( <b>A4</b> )	1634	2169	0,6	-	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C
<i>β</i> -himachalol	1637	2193	-	tr	Ir, IE
α-cadinol	1643	2218	1,0	1,5	Ir, IE
tiglate de néryle ( <b>D4</b> )	1652	2054	tr	-	Ir, IE, IC
valéranone	1658	2087	0,1	-	Ir, IE
<i>β</i> -acorénol	1658	2149	-	tr	Ir, IE
acétate de 10-acétoxynéryle ( <b>D7</b> )	1660	2325	-	1,0	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C
α-bisabolol	1665	2199	0,2	tr	Ir, IE
épi-α-bisabolol	1667	2202	-	tr	Ir, IE
pentadécan-2-one	1682	2010	tr	-	Ir, IE
mitsulfide	1724	2128	tr	-	Ir, IE
isobutyrate de 10-acétoxynéryle ( <b>D8</b> )	1783	2347	-	1,9	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C
euparine ( <b>F1</b> )	1858	2797	-	1,8	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C
(E)-phytol	2099	2604	0,1	-	Ir, IE
tricosane	2300	2300	0,1	-	Ir, IE
tétracosane	2400	2400	tr	-	Ir, IE
pentacosane	2500	2500	tr	-	Ir, IE
heptacosane	2700	2700	tr	-	Ir, IE
<b>Total</b>			<b>93,6</b>	<b>96,1</b>	

Monoterpènes hydrocarbonés	33,5	29,5
Monoterpènes oxygénés	12,6	54,0
Sesquiterpènes hydrocarbonés	43,3	5,5
Sesquiterpènes oxygénés	3,6	5,2
Benzofuranes	-	1,8
Autres	0,6	0,1

Ir : Indice de rétention sur colonne apolaire (*a*) et polaire (*p*)

P.A : huile essentielle de parties aériennes

R : huile essentielle de racines

Les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf lors de coélution (colonne polaire)

Les composés en *italique* ont été identifiés par les bibliothèques commerciales

tr : teneur inférieure à 0,05%

IE : spectre de masse en impact électronique.

IC : spectre de masse en ionisation chimique.

<sup>13</sup>C : déplacements chimiques en RMN du carbone-13

Syn : Synthèse des composés

La comparaison des compositions chimiques des huiles essentielles de parties aériennes et de racines d'*Eupatorium cannabinum* L. de Corse (subsp. *corsicum*) révèle la présence de composés identiques mais en proportions très différentes selon la partie du végétal. Par exemple, les deux composés majoritaires des huiles de parties aériennes, le germacrène D et l' $\alpha$ -phellandrène sont présents en faible voire très faible quantité dans les huiles essentielles des racines ; une exception pour le  $\delta$ -2-carène qui présente une teneur bien plus forte dans les racines. Inversement, l'isobutyrate de néryle majoritaire dans les huiles essentielles de racines (28,5%) a une très faible teneur (0,3%) dans celles de parties aériennes.

Dans l'huile essentielle des parties aériennes nous identifions 57 composés hydrocarbonés et 90 composés oxygénés qui représentent respectivement 76,9% et 16,7% de la composition chimique. Ces huiles essentielles se caractérisent par une teneur abondante en composés hydrocarbonés : parmi ceux-ci, 39 sesquiterpènes représentant 43,3% de la composition chimique de l'huile essentielle et 12 monoterpènes représentant 33,5%. Les composés oxygénés se subdivisent en sesquiterpènes (3,6%) et en monoterpènes (12,6%).

Dans les huiles essentielles de racines, nous identifions 52 composés hydrocarbonés et 55 composés oxygénés représentant respectivement 61% et 35,1% de la composition chimique. Parmi les composés hydrocarbonés, nous mettons en évidence 9 monoterpènes et 42 sesquiterpènes représentant respectivement 29,5% et 5,5%. Les huiles essentielles de racines sont dominées par les monoterpènes oxygénés qui représentent 54,0% de la composition chimique totale alors que les sesquiterpènes oxygénés ne représentent que 5,2%.

Les huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* se caractérisent par la présence d'un grand nombre d'esters monoterpéniques représentant environ 9% de l'huile essentielle de parties aériennes et environ 33% de celle de racines. L'identification de certains de ces composés a nécessité l'utilisation de la

CPG/SM en ionisation chimique positive (ICP) et négative (ICN) en complément de la CPG/Ir et de la CPG/SM-IE. En effet, nous reportons la présence de 24 esters monoterpéniques dérivés du thymol (**A1-A6**), du 8,9-déhydrothymol (**B1-B6**), du bornéol (**C1-C3**), du nérol (**D1-D6**) et du lavandulol (**E1-E3**), dont certains ont été synthétisés et étudiés par RMN du carbone-13. Enfin, nous avons identifié trois composés dans les racines, absents des différentes bibliothèques : il s'agit de l'acétate de 10-acétoxyneryle (**D8**), de l'isobutyrate de 10-acétoxyneryle (**D9**) et de l'euparine (**F1**). Nous notons que ces trois composés ne sont pas présents dans l'huile essentielle de parties aériennes. Nous remarquons également que les groupements méthacrylate et angélate sont présents uniquement dans l'huile essentielle des racines alors que les groupements isovalérate et tiglate ont été reportés seulement dans l'huile essentielle des parties aériennes.

L'étude des esters monoterpéniques d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* a permis de mettre en évidence les fragmentations privilégiées de ces composés en CPG/SM-IE (tableau 21) et -IC avec différents gaz ionisants (tableaux 22 à 24).

- Par CPG/SM-IE (tableau 21)

Nous avons constaté que les esters de thymyle (**A**) et de 8,9-déhydrothymyle (**B**) présentent :

- des ions moléculaires ayant des abondances comprises entre 3 et 9% ;
- des ions caractéristiques de la partie phénolique à m/z 150 pour les esters de thymyle (**A1-A3**) et à m/z 148 pour les esters de 8,9-déhydrothymyle (**B1-B3**) ;
- la perte d'un groupement méthyle à partir de ces ions (respectivement à m/z 135 et m/z 133).

A l'inverse, la détermination de la masse moléculaire et la différenciation des esters linéaires (néryle **D** et lavandulyle **E**) sont difficiles en impact électronique. En effet, ces spectres de masse présentent de petites différences dans l'intensité des pics homologues et les ions moléculaires sont absents (**D**) ou présents en très faible abondance (**E**).

Pour l'ensemble de ces esters, les fragmentations conduisent aux ions alkyles ( $R^+$ ) caractéristiques de la partie acide à  $m/z$  43 (**A1, B1, C1, D1, E1**), à  $m/z$  57 (**A2, A3, B2, B3, C2, C3, D2, D3, E2, E3**), à  $m/z$  41 (**A5, B5, D5**), à  $m/z$  55 (**A4, A6, B4, B6, D4, D6**) et aux ions acylium ( $RC=O^+$ ) à  $m/z$  69 (**A5, B5, D5**) et à  $m/z$  83 (**A4, A6, B4, B6, D4, D6**).

Tableau 21 : principaux ions obtenus en CPG/SM-IE pour les esters (**A à E**) et les bi-esters (**D7 et D8**)

N° (M)	Composés	$M^+$ (intensité)	ions abondants (m/z)
<b>A1</b> (220)	isobutyrate de thymyle	220 (9%)	150, 135 (100%), 43
<b>A2</b> (234)	2-méthylbutyrate de thymyle	234 (5%)	150, 135, 57 (100%)
<b>A3</b> (234)	isovalérate de thymyle	234 (6%)	150, 135 (100%), 57
<b>A4</b> (232)	tiglate de thymyle	232 (4%)	83 (100%), 55
<b>A5</b> (218)	méthacrylate de thymyle	218 (3%)	69 (100%), 41
<b>A6</b> (232)	angélate de thymyle	232 (4%)	83 (100%), 55
<b>B1</b> (218)	isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle	218 (7%)	148 (100%), 133, 43
<b>B2</b> (232)	2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle	232 (5%)	148, 133, 57 (100%)
<b>B3</b> (232)	isovalérate de 8,9-déhydrothymyle	232 (4%)	148 (100%), 133, 57
<b>B4</b> (230)	tiglate de 8,9-déhydrothymyle	230 (3%)	83 (100%), 55
<b>B5</b> (216)	méthacrylate de 8,9-déhydrothymyle	216 (4%)	69 (100%), 41
<b>B6</b> (230)	angélate de 8,9-déhydrothymyle	230 (3%)	83 (100%), 55
<b>C1</b> (224)	isobutyrate de bornyle	224 (4%)	95, 93, 71, 43 (100%), 41
<b>C2</b> (238)	2-méthylbutyrate de bornyle	239 (5%)	95, 93, 71, 57 (100%), 41
<b>C3</b> (238)	isovalérate de bornyle	238 (3%)	95, 93, 71, 57 (100%), 41
<b>D1</b> (224)	isobutyrate de néryle	-	93, 69, 43, 41 (100%)
<b>D2</b> (238)	2-méthylbutyrate de néryle	-	93, 69, 57, 41 (100%)
<b>D3</b> (238)	isovalérate de néryle	-	93, 69, 57, 41 (100%)
<b>D4</b> (236)	tiglate de néryle	-	93, 83, 69, 55, 41 (100%)
<b>D5</b> (222)	méthacrylate de néryle	-	93, 69 (100%), 41
<b>D6</b> (236)	angélate de néryle	-	93, 83, 69 (100%), 55, 41
<b>D7</b> (254)	acétate de 10-acétoxynéryle	-	134, 119, 69, 43 (100%)
<b>D8</b> (282)	isovalérate de 10-acétoxynéryle	-	134, 119, 69, 43 (100%)
<b>E1</b> (224)	isobutyrate de lavandulyle	224 (<1%)	93, 69, 43 (100%), 41
<b>E2</b> (238)	2-méthylbutyrate de lavandulyle	238 (<1%)	93, 69, 57, 41 (100%)
<b>E3</b> (238)	isovalérate de lavandulyle	238 (<1%)	93, 69, 57, 41 (100%)

$M^+$  = ion moléculaire

- Par CPG/SM-IC (tableau 22 à 24)

- *Les esters de thymyle (A) et de 8,9-déhydrothymyle (B)*

Nous observons en ICP-CH<sub>4</sub> (tableau 22) :

- les ions quasi-moléculaires [M+H]<sup>+</sup> ;
- les ions acylium RC=O<sup>+</sup> ;
- les ions [M+H-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup> issus de la perte du groupement C<sub>3</sub>H<sub>6</sub> sont observés seulement pour les esters de thymyle (**A**). En effet, cette fragmentation ne peut se faire pour les esters de 8,9-déhydrothymyle (**B**), du fait de la présence de la double liaison conjuguée au cycle aromatique qui stabilise le système ;

- les ions [M+C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>C=O]<sup>+</sup> et [M+H-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>C=O]<sup>+</sup> résultant respectivement de la perte d'un groupement C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>C=O après réaction d'association et transfert de proton sont présents pour les esters possédant un groupement alkyle saturé (**A1** à **A3** et **B1** à **B3**). A l'inverse, ces fragmentations ne sont pas observées pour les esters possédant une double liaison dans le groupement alkyle (**A4** à **A6** et **B4** à **B6**). L'absence de ces ions sur les spectres de ces esters s'explique par la présence d'une double liaison en α,β du carbonyle empêchant la migration d'un hydrogène et la perte du groupement C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>C=O.

En ICP-NH<sub>3</sub> (tableau 23), les spectres de masse de ces esters aromatiques (**A** et **B**) présentent des ions quasi-moléculaires [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> et [M+H]<sup>+</sup> avec des proportions importantes.

Enfin, en ICN-NH<sub>3</sub> (tableau 24), les spectres de masse de ces composés présentent des ions [M-H]<sup>-</sup> abondants (issus des réactions d'abstraction d'un hydrure) et des anions phénolates caractéristiques à m/z 149 pour les esters de thymyle (**A**) et à m/z 147 pour les esters de 8,9-déhydrothymyle (**B**).

- Les esters de bornyle (**C**)

Les spectres de masse en ICP-CH<sub>4</sub> (tableau 22) présentent un seul ion [M+H-RCOOH]<sup>+</sup> résultant de la perte d'une molécule d'acide à partir de la molécule protonée.

Les spectres de masse ICP-NH<sub>3</sub> de ces esters (tableau 23) se caractérisent par :

- les ions adduits [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> ;
- la présence d'ions d'intensité importante à m/z 154 [M+NH<sub>4</sub>-RCOOH]<sup>+</sup> et à m/z 137 [M+H-RCOOH]<sup>+</sup> résultant de la perte d'une molécule acide respectivement après réaction d'association et transfert de proton.

Enfin, les spectres de masse ICN-NH<sub>3</sub> (tableau 24) de ces esters présentent des anions carboxylates RCOO<sup>-</sup>.

- Les esters de néryle (**D1 à D6**) et de lavandulyle (**E**)

En IC, les esters linéaires se caractérisent par la présence en abondance :

- d'ions [M+H-RCOOH]<sup>+</sup> à m/z 137 (tableaux 22 et 23) ;
- d'ions adduits [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (tableau 23) ;
- et d'ions carboxylates RCOO<sup>-</sup> (tableau 24).

Nous constatons également que les spectres de masse des esters linéaires sont différenciés, sans ambiguïté, en IC-NH<sub>3</sub> par :

- les ions quasi-moléculaires [M+H]<sup>+</sup> qui sont les pics de base des esters de lavandulyle **E** alors qu'ils sont absents pour les esters de néryle **D**. En effet, les structures des esters de lavandulyle semblent stabiliser les molécules protonées par des interactions entre une double liaison et le groupement carboxylate (tableau 23) ;

- les ions [M-H]<sup>-</sup> qui sont les pics de base des esters de lavandulyle **E** alors que les ions carboxylate RCOO<sup>-</sup> constituent les pics de base des spectres des esters de néryle **D** (tableau 24).



Tableau 22 : fragmentations observées en ICP-CH<sub>4</sub> pour les esters A à E

N° (M)	[M+H] <sup>+</sup>						[M+H]			[M+H]		Autres
	[M+H] <sup>+</sup>	[M+C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	[M+H] -C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> <sup>+</sup>	[M+C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -C <sub>n</sub> H <sub>2n</sub> CO] <sup>+</sup>	[M+H] -C <sub>n</sub> H <sub>2n</sub> CO] <sup>+</sup>	[RCO] <sup>+</sup>	[M+H] -RCOOH] <sup>+</sup>					
<b>A1</b> (220)	221 (35%)	249 (4%)	179 (100%)	179 (100%) <sup>n=3</sup>	151 (96%) <sup>n=3</sup>	71 (40%)	-	-	-	-		
<b>A2</b> (234)	235 (62%)	263 (7%)	193 (64%)	179 (12%) <sup>n=4</sup>	151 (100%) <sup>n=4</sup>	85 (38%)	-	-	-	-		
<b>A3</b> (234)	235 (38%)	263 (8%)	193 (35%)	179 (12%) <sup>n=4</sup>	151 (100%) <sup>n=4</sup>	85 (25%)	-	-	-	-		
<b>A4</b> (232)	233 (59%)	261 (5%)	191 (49%)	-	-	83 (100%)	-	-	-	-		
<b>A5</b> (218)	219 (16%)	-	177 (100%)	-	-	69 (51%)	-	-	-	-		
<b>A6</b> (232)	233 (14%)	-	191 (23%)	-	-	83 (100%)	-	-	-	-		
<b>B1</b> (218)	219 (42%)	-	-	177 (14%) <sup>n=3</sup>	149 (100%) <sup>n=3</sup>	71 (39%)	-	-	-	-		
<b>B2</b> (232)	233 (30%)	-	-	177 (9%) <sup>n=4</sup>	149 (100%) <sup>n=4</sup>	85 (21%)	-	-	-	-		
<b>B3</b> (232)	233 (22%)	-	-	177 (11%) <sup>n=4</sup>	149 (100%) <sup>n=4</sup>	85 (17%)	-	-	-	-		
<b>B4</b> (230)	231 (14%)	-	-	-	-	83 (100%)	-	-	-	-		
<b>B5</b> (216)	217 (38%)	-	-	-	-	69 (100%)	-	-	-	-		
<b>B6</b> (230)	231 (14%)	-	-	-	-	83 (100%)	-	-	-	-		
<b>C1</b> (224)	-	-	-	-	-	-	137 (100%)	-	-	-		
<b>C2</b> (238)	-	-	-	-	-	-	137 (100%)	-	-	-		
<b>C3</b> (238)	-	-	-	-	-	-	137 (100%)	-	-	-		
<b>D1</b> (224)	-	-	-	-	-	-	137 (67%)	81 (100%)	81 (100%)	81 (100%)		
<b>D2</b> (238)	-	-	-	-	-	-	137 (70%)	81 (100%)	81 (100%)	81 (100%)		
<b>D3</b> (238)	-	-	-	-	-	-	137 (51%)	81 (100%)	81 (100%)	81 (100%)		
<b>D4</b> (236)	-	-	-	-	-	-	137 (73%)	81 (100%)	81 (100%)	81 (100%)		
<b>D5</b> (222)	-	-	-	-	-	-	137 (65%)	81 (100%)	81 (100%)	81 (100%)		
<b>D6</b> (236)	-	-	-	-	-	-	137 (70%)	81 (100%)	81 (100%)	81 (100%)		
<b>E1</b> (224)	225 (10%)	-	-	-	-	-	137 (100%)	81 (33%)	81 (33%)	81 (33%)		
<b>E2</b> (238)	239 (9%)	-	-	-	-	-	137 (100%)	81 (28%)	81 (28%)	81 (28%)		
<b>E3</b> (238)	239 (8%)	-	-	-	-	-	137 (100%)	81 (32%)	81 (32%)	81 (32%)		

R= cf. tableau 23 et 24

Tableau 23 : fragmentations observées en ICP-NH<sub>3</sub> pour les esters A à E

N° (M)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> -RCOOH] <sup>+</sup>	[M+H-RCOOH] <sup>+</sup>
<b>A1</b> (220)	238 (100%)	221 (4%)	-	-
<b>A2</b> (234)	252 (100%)	235 (2%)	-	-
<b>A3</b> (234)	252 (100%)	235 (1%)	-	-
<b>A4</b> (232)	250 (100%)	233 (8%)	-	-
<b>A5</b> (218)	236 (100%)	219 (7%)	-	-
<b>A6</b> (232)	250 (100%)	233 (5%)	-	-
<b>B1</b> (218)	236 (100%)	219 (76%)	-	-
<b>B2</b> (232)	250 (100%)	233 (81%)	-	-
<b>B3</b> (232)	250 (100%)	233 (68%)	-	-
<b>B4</b> (230)	248 (76%)	231 (100%)	-	-
<b>B5</b> (216)	234 (78%)	217 (100%)	-	-
<b>B6</b> (230)	248 (67%)	231 (100%)	-	-
<b>C1</b> (224)	242 (78%)	225 (3%)	154 (37%)	137 (100%)
<b>C2</b> (238)	256 (66%)	239 (1%)	154 (35%)	137 (100%)
<b>C3</b> (238)	256 (62%)	-	154 (29%)	137 (100%)
<b>D1</b> (224)	242 (9%)	-	154 (27%)	137 (100%)
<b>D2</b> (238)	256 (4%)	-	154 (28%)	137 (100%)
<b>D3</b> (238)	256 (5%)	-	154 (25%)	137 (100%)
<b>D4</b> (236)	254 (3%)	-	154 (33%)	137 (100%)
<b>D5</b> (222)	240 (6%)	-	154 (30%)	137 (100%)
<b>D6</b> (236)	254 (2%)	-	154 (25%)	137 (100%)
<b>E1</b> (224)	242 (47%)	225 (100%)	-	137 (29%)
<b>E2</b> (238)	256 (53%)	239 (100%)	-	137 (15%)
<b>E3</b> (238)	256 (52%)	239 (100%)	-	137 (13%)

**A1, B1, C1, D1, E1** : R= C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>

**A2, A3, B2, B3, D2, D3, E2, E3** : R= C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>

**A4, B4, D4** : R= C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>

**A5, B5, D5** : R= C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>

**A6, B6, D6** : R= C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>

Tableau 24 : fragmentations observées en ICN-NH<sub>3</sub> pour les esters A à E

N° (M)	[M-H] <sup>-</sup>	[M-RCO] <sup>-</sup>	[RCOO] <sup>-</sup>
<b>A1</b> (220)	219 (21%)	149 (100%)	-
<b>A2</b> (234)	233 (24%)	149 (100%)	-
<b>A3</b> (234)	233 (19%)	149 (100%)	-
<b>A4</b> (232)	231 (29%)	149 (100%)	-
<b>A5</b> (218)	217 (48%)	149 (100%)	-
<b>A6</b> (232)	231 (27%)	149 (100%)	-
<b>B1</b> (218)	217 (56%)	147 (100%)	-
<b>B2</b> (232)	231 (48%)	147 (100%)	-
<b>B3</b> (232)	231 (29%)	147 (100%)	-
<b>B4</b> (230)	229 (38%)	147 (100%)	-
<b>B5</b> (216)	215 (41%)	147 (100%)	-
<b>B6</b> (230)	229 (37%)	147 (100%)	-
<b>C1</b> (224)	223 (100%)	-	87 (45%)
<b>C2</b> (238)	237 (100%)	-	101 (47%)
<b>C3</b> (238)	237 (100%)	-	101 (17%)
<b>D1</b> (224)	223 (33%)	-	87 (100%)
<b>D2</b> (238)	237 (37%)	-	101 (100%)
<b>D3</b> (238)	237 (57%)	-	101 (100%)
<b>D4</b> (236)	235 (55%)	-	99 (100%)
<b>D5</b> (222)	221 (35%)	-	85 (100%)
<b>D6</b> (236)	235 (27%)	-	99 (100%)
<b>E1</b> (224)	223 (100%)	-	87 (73%)
<b>E2</b> (238)	237 (100%)	-	101 (41%)
<b>E3</b> (238)	237 (100%)	-	101 (40%)

**A1, B1, C1, D1, E1** : R= C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>

**A2, A3, B2, B3, D2, D3, E2, E3** : R= C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>

**A4, B4, D4** : R= C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>

**A5, B5, D5** : R= C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>

**A6, B6, D6** : R= C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>

- Les bi-esters de néryle **D7** et **D8**

Nous identifions également dans l'huile essentielle de racines deux bi-esters de néryle **D7** et **D8** (figure 66) ;

- par CPG/SM-IE, les masses moléculaires ne peuvent pas être déterminées et les spectres de masse sont superposables (tableau 21) ;

- en ICP-CH<sub>4</sub>, les problèmes rencontrés en impact électronique ne sont pas résolues, en effet, les spectres présentent uniquement des ions à m/z 135 [M+H-R<sub>1</sub>COOH-R<sub>2</sub>COOH]<sup>+</sup> résultant d'une perte des molécules acides à partir des ions quasi-moléculaires [M+H]<sup>+</sup> ;

- en ICP-NH<sub>3</sub>, les masses moléculaires ont été déterminées par l'observation des ions [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (pic de base) qui sont stabilisés par la présence de deux groupes fonctionnels sur les molécules (75) (ie : ces ions adduits sont présents en faible abondance sur les spectres ICP-NH<sub>3</sub> des esters de néryle). La perte de molécules acides permet de déterminer les masses des groupements ester. Elle est observée après réaction d'association à m/z 212 [M+NH<sub>4</sub>-R<sub>1</sub>COOH]<sup>+</sup> et après réaction de transfert de proton à m/z 195 [M+H-R<sub>1</sub>COOH]<sup>+</sup> et à m/z 135 [M+H-R<sub>1</sub>COOH-R<sub>2</sub>COOH]<sup>+</sup> (tableau 25) ;

- en ICN-NH<sub>3</sub>, les masses moléculaires sont confirmées par l'observation des ions quasi-moléculaires [M-H]<sup>-</sup> et celles des groupements carboxylates sont déterminées par l'observation des anions R<sub>1</sub>COO<sup>-</sup> et des ions à m/z 195 issus de la perte de R<sub>1</sub>COO (tableau 25).

Tableau 25 : fragmentations observées en IC-NH<sub>3</sub> pour les bi-esters **D7** et **D8**

N° (M)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> -R <sub>1</sub> COOH] <sup>+</sup>	[M+H-R <sub>1</sub> COOH] <sup>+</sup>	[M+H-R <sub>1</sub> COOH-R <sub>2</sub> COOH] <sup>+</sup>
<b>D7</b> (254)	272 (100%)	212 (3%)	195 (8%)	135 (29%)
<b>D8</b> (282)	300 (100%)	212 (2%)	195 (8%)	135 (38%)

N° (M)	[M-H] <sup>-</sup>	[R <sub>1</sub> COO] <sup>-</sup>	[M-R <sub>1</sub> COO] <sup>-</sup>
<b>D7</b> (254)	253 (20%)	-	195 (100%)
<b>D8</b> (282)	281 (2%)	87 (100%)	195 (5%)

**D7** : R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>  
**D8** : R<sub>1</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>

## VI- COMPARAISON DES HUILES ESSENTIELLES D'*EUPATORIUM CANNABINUM* DE CORSE, DE SARDAIGNE ET DE TOSCANE

Nous avons comparé les compositions chimiques de différents échantillons d'huiles essentielles de parties aériennes, d'une part, et des racines, d'autre part, d'*Eupatorium cannabinum* de Corse, de Sardaigne et de Toscane. Le tableau 26 reprend les principaux composés des huiles essentielles des trois régions tandis que les figures 68 et 69 permettent la comparaison des composés majoritaires de ces échantillons.

Pour les parties aériennes, les huiles essentielles de Corse se caractérisent par une teneur plus forte en  $\alpha$ -phellandrène et des teneurs très faibles en oxyde de méthyle et de thymyle, en bicyclogermacrène, en  $\beta$ -bisabolène et en spathulénol. Les huiles essentielles de Sardaigne se différencient par une plus forte abondance en  $\beta$ -bisabolène et une teneur plus faible en germacrène D. En 2003, Flamini et coll. (245) ont comparé les compositions chimiques des huiles essentielles de Toscane obtenues séparément à partir des feuilles et à partir des fleurs et des fruits d'*Eupatorium cannabinum*. L'originalité des huiles essentielles de Toscane réside dans la plus forte abondance en spathulénol, la faible teneur en  $\alpha$ -phellandrène et en para-cymène et dans l'absence de  $\beta$ -bisabolène et d'isobutyrate de néryle.

Pour les racines, les huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* de Corse se caractérisent par une plus forte abondance en isobutyrate de néryle et la quasi absence de spathulénol. Les huiles essentielles de Sardaigne se distinguent des autres par une proportion plus importante en  $\alpha$  et  $\tau$ -cadinol et une abondance plus faible en  $\delta$ -2-carène. Enfin, les huiles essentielles de Toscane se singularisent par une abondance particulièrement forte en  $\delta$ -2-carène et à moindre degré de  $\beta$ -pinène et par l'absence d' $\alpha$  et de  $\tau$ -cadinol, de para-cymène, de germacrène D et de  $\beta$ -bisabolène.

En conclusion, si les compositions chimiques des échantillons analysés provenant de Corse et de Sardaigne se distingue seulement au niveau quantitatif, la différenciation avec ceux de Toscane est plus fondamentale.

Tableau 26 : composés majoritaires des huiles essentielles de parties aériennes et de racines d'*Eupatorium cannabinum* de Corse, de Sardaigne et de Toscane.

Composés	Parties Aériennes Toscane (245) (feuilles / fleurs-fruits)			Racines		
	Corse	Sardaigne	Toscane (245) (feuilles / fleurs-fruits)	Corse	Sardaigne	Toscane
$\beta$ -pinène	0,3	1,6	0,4 / 0,4	<b>5,7</b>	2,7	<b>11,2</b>
$\delta$ -2-carène	<b>3,9</b>	<b>6,9</b>	- / <b>4,4</b>	<b>14,5</b>	<b>6,7</b>	<b>32,5</b>
$\alpha$ -phellandrène	<b>19,0</b>	<b>3,3</b>	0,7 / 0,5	2,5	0,5	-
para-cymène	<b>5,2</b>	<b>6,9</b>	1,0 / 0,9	3,0	2,9	0,7
oxyde de thymyle et de méthyle	2,1	<b>14,2</b>	<b>7,8 / 12,2</b>	<b>15,1</b>	<b>12,2</b>	<b>11,7</b>
acétate de bornyle	0,6	1,1	1,1 / 2,6	1,1	2,4	1,1
acétate de néryle	2,3	2,9	0,9 / 1,1	<b>7,5</b>	<b>13,5</b>	<b>14,7</b>
isobutyrate de néryle	0,3	2,6	-	<b>17,6</b>	<b>8,2</b>	<b>8,9</b>
germacrène D	<b>28,5</b>	<b>12,2</b>	<b>29,2 / 20,3</b>	0,6	0,4	-
bicyclogermacrène	1,7	<b>4,1</b>	<b>4,6 / 12,3</b>	1,2	1,9	2,0
$\beta$ -bisabolène	0,4	<b>4,2</b>	-	0,2	1,2	-
spathuléol	0,3	<b>3,9</b>	<b>7,3 / 10,8</b>	0,3	<b>3,5</b>	<b>6,1</b>
$\tau$ -cadinol	0,3	1,9	0,3 / 0,2	2,8	<b>9,6</b>	-
$\alpha$ -cadinol	1,0	1,5	1,4 / 1,1	1,5	<b>5,5</b>	-
euparin	-	1,4	-	1,8	2,8	-

En **gras** : teneurs supérieures à 3,0%

Figure 68 : comparaison des composés majoritaires des huiles essentielles de parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* de Corse, de Sardaigne et de Toscane

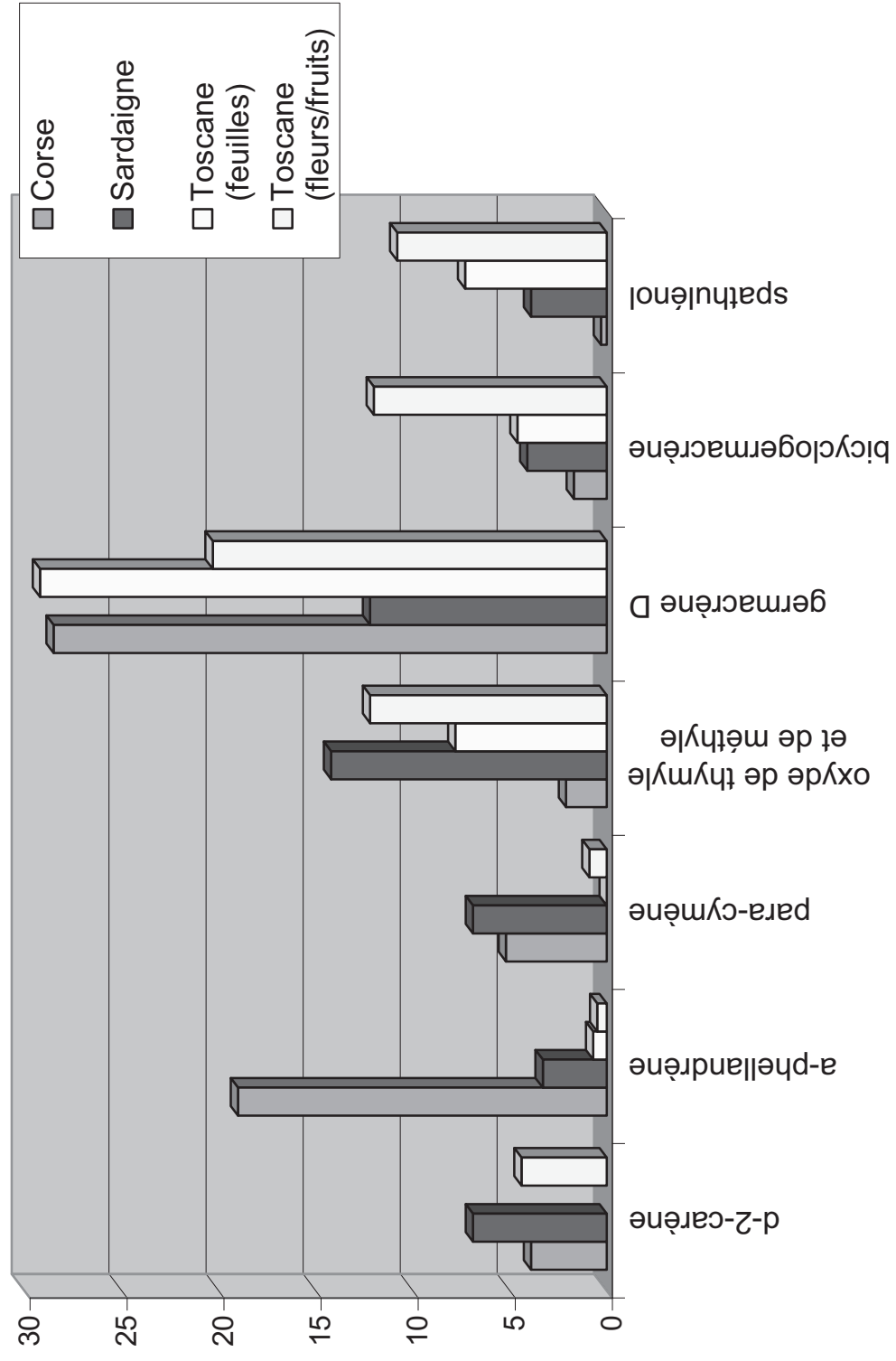
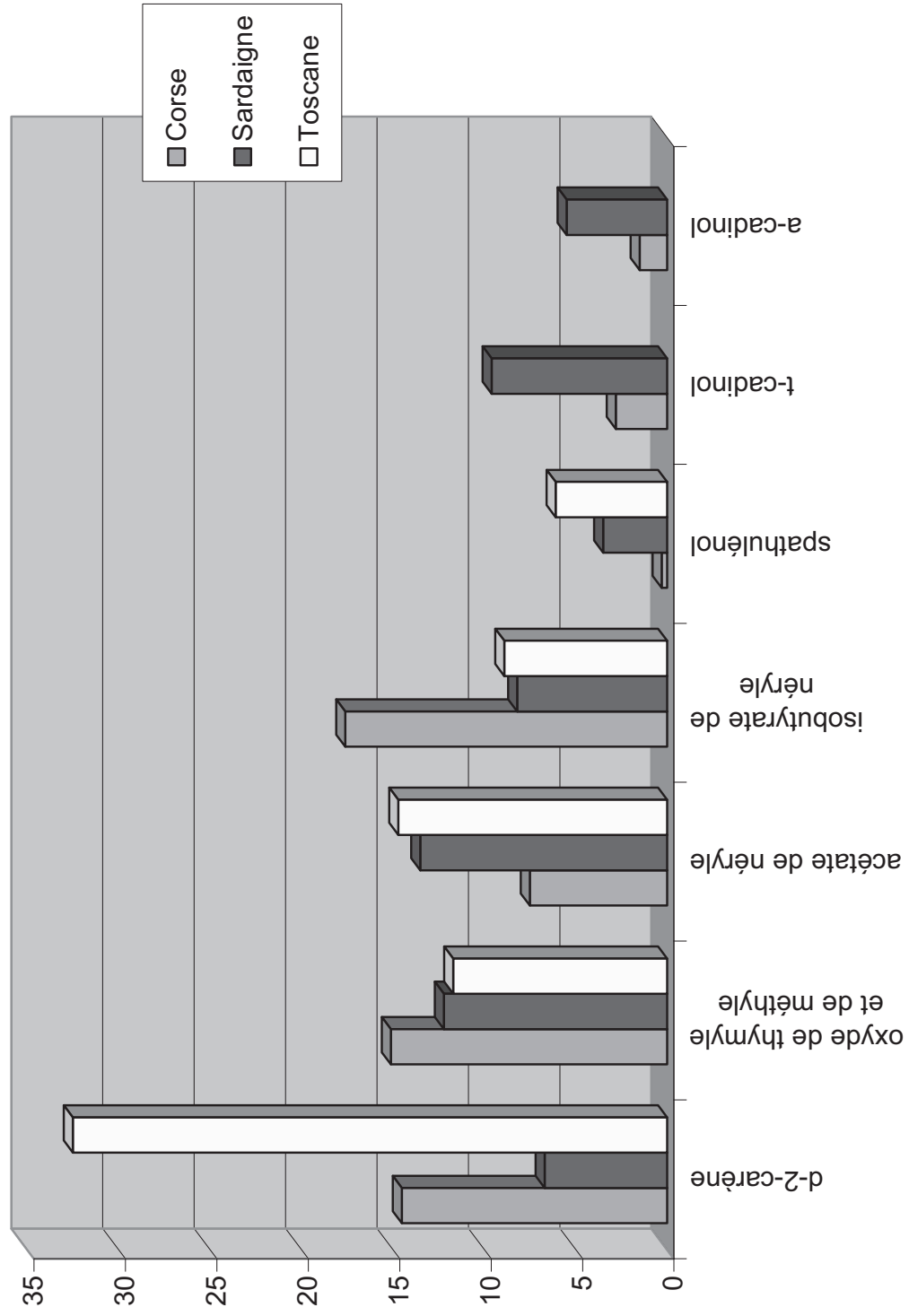


Figure 69 : Comparaison des composés majoritaires des huiles essentielles de racines d'*Eupatorium cannabinum* de Corse, de Sardaigne et de Toscane





## CHAPITRE 2

### Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Doronicum corsicum*

#### I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

##### 1- Le genre *Doronicum*

Le genre *Doronicum*, appartient à la famille des Asteraceae, tribu des Senecioneae ; il comprend 26 espèces et 4 sous-espèces localisées en Asie, en Europe et en Afrique du Nord. Les doronics sont situés dans les régions montagneuses (Alpes, Caucase, Himalaya) et possèdent des capitules radiés, des fleurs jaunes et des feuilles caulinaires alternes (283).

Il existe, en Corse, deux espèces différentes de *Doronicum* décrites par Jeanmonod et coll. (283) :

- *Doronicum grandiflorum* (figure 70) est une espèce orophyle du sud-ouest européen (Pyrénées, Alpes) mesurant entre 10 et 40 cm de hauteur. Elle est présente dans les étages subalpin et alpin à des altitudes comprises entre 1800 et 2700 m. En Corse, elle est particulièrement répandue dans les éboulis aux ubacs des grands massifs (Cintu, Rotondu, Renosu). Les fleurs apparaissent aux mois de juillet et d'août et le capitule de 3 à 5-6,5 cm de diamètre est solitaire (exceptionnellement un deuxième plus petit peut être présent). Les feuilles basales à limbe ovale mesurent entre 3-4 et 10-15 cm de long et les feuilles caulinaires inférieures sont plus ou moins longuement pétiolées. Chez les populations corses, l'indument des feuilles est marqué par la relative abondance des poils glanduleux courts et la présence de poils glanduleux longs plus rares (c'est l'inverse chez les populations alpines et pyrénéennes).

- *Doronicum corsicum* (figure 70), est une plante endémique de Corse mesurant entre 10 et 120 cm et possédant un capitule d'un diamètre variant de 2 à 5 cm. L'inflorescence est en corymbe terminal comprenant entre 2 et 8 capitules (plus

rarement un capitule solitaire) porté par des pédoncules pubescents-glanduleux. Les feuilles basales sont obovales à oblancéolées, souvent plus réduites que les feuilles caulinares qui sont ovales-lancéolées à lancéolées. Ce doronic corse, dont la floraison se concentre sur les mois de juillet et d'août, est présent sur les bords rocheux ou rocaillieux des torrents entre 800 et 1900 mètres, particulièrement au niveau des cascades. On le trouve depuis les massifs du Cintu et du San Petrone au Nord, jusqu'à la Montagne de Cagna, au Sud (284).

Figure 70 : représentation schématique de *Doronicum corsicum* et *Doronicum grandiflorum*



*Doronicum corsicum*

*Doronicum grandiflorum*

Une analyse phylogénétique de 2001 sur les espèces du genre *Doronicum* (285), basée sur l'étude des caractères morphologiques, sur l'ADN ribosomale et sur un gène codant pour les chloroplastes a montré que sur le plan génétique, *Doronicum corsicum* est l'espèce la plus éloignée des autres espèces de *Doronicum*.

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur les huiles essentielles du genre *Doronicum*. La tribu des Senecioaceae (286) et en particulier les espèces du genre *Arnica* se caractérisent par la présence de composés dérivés du thymol tel l'oxyde de thymyle et de méthyle.

Reynaud et Reynaud (287-290) ont étudié les flavonoïdes de 4 espèces de *Doronicum* (*D. grandiflorum*, *D. orientale*, *D. pardalianches* et *D. corsicum*) qui semblent se caractériser par leur richesse en flavones méthoxylées en 8, comparées à d'autres Asteraceae où la méthoxylation se rencontre plus souvent en position 6.

Pour *Doronicum grandiflorum*, à côté de flavonoïdes courants (lutéoline, quercétine, kaempférol, etc...), ces auteurs ont isolé et identifié des flavones méthoxylées en 8 et un hétéroside particulièrement rare : le (6''-acétyl) isoquercitrine. Dans *Doronicum corsicum* ils ont également identifié deux diosides flavoniques : le rhamnoglucosyl-3-quercétine (rutine) et le rhamnoglucosyl-3-kaempférol dont la présence constitue un critère d'évolution par rapport à celle de monosides seuls. Cette observation a permis aux auteurs de considérer que sur le plan flavonique *Doronicum orientale*, *Doronicum pardalianches* et *Doronicum corsicum* sont plus évolués que *Doronicum grandiflorum*.

En 1976, Aleiva et coll. ont mené une étude sur les alcaloïdes de la pyrrolizidine de *Doronicum macrophyllum* (291) ; ils ont ainsi isolé le doronine, un alcaloïde de la pyrrolizidine C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>ClNO<sub>8</sub>.

Par RMN du proton, infra-rouge et spectrométrie de masse, Bohlmann et coll. ont étudié les extraits à l'éther de pétrole de quatre espèces du genre *Doronicum* (292-295) : *Doronicum austriacum*, *Doronicum macrophyllum*, *Doronicum pardalianches*, *Doronicum hungaricum*.

Ils y ont identifié :

- un composé hydrocarboné polyinsaturé, le pentaynène (figure 71 : **3.1**) ;
- cinq sesquiterpènes hydrocarbonés (le  $\gamma$ -humulène, le germacrène D, le bicyclogermacrène, le (E,E)- $\alpha$ -farnesène et le (Z,E)- $\alpha$ -farnesène) ;
- trois esters monoterpéniques dérivés du nérol (l'isobutyrate de néryle, le 2-méthylbutyrate de néryle et l'isovalérate de néryle) ;
- un alcool sesquiterpénique tricyclique peu commun, le pardalianchol (figure 72 : **3.2**) ;
- deux acétates triterpéniques (figure 73 : **3.3** et **3.4**) ;
- un acide diterpénique, l'acide déhydro-ent-kaurénique (figure 74 : **3.5**) ;
- onze benzofuranes (figure 75 : **3.6** à **3.16**) ;
- treize composés dérivés du thymol (figure 76 : **3.17** à **3.29**) ;
- deux composés phénoliques (figure 77 : **3.30** et **3.31**).

Les structures de ces composés (**3.1** à **3.33**) identifiés dans les extraits obtenus à partir des espèces précitées sont représentées dans les figures 71 à 77.

Figure 71 : structure du pentaynène (3.1)



Figure 72 : structure du pardalianchol (3.2)

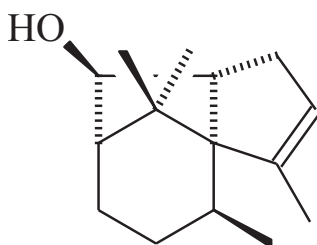


Figure 73 : structure de deux triterpènes (3.3, 3.4) identifiés dans *Doronicum macrophyllum*

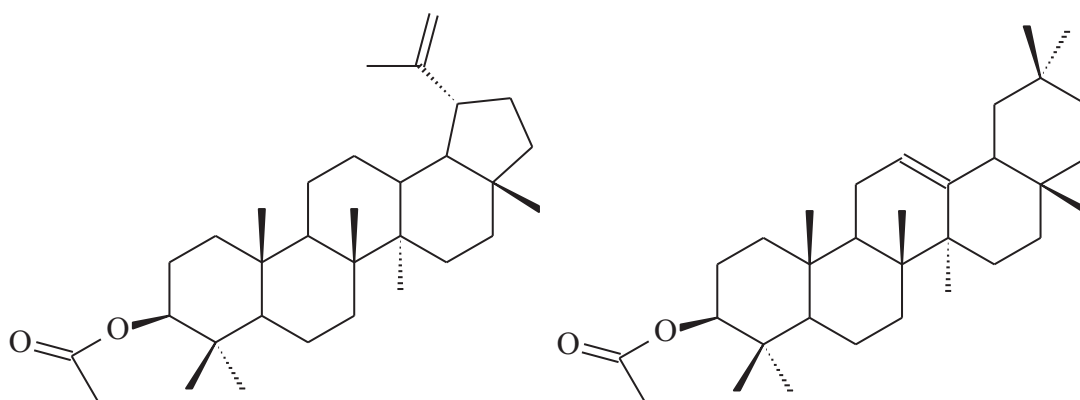


Figure 74 : structure de l'acide déhydro-ent-kaurénique (3.5)

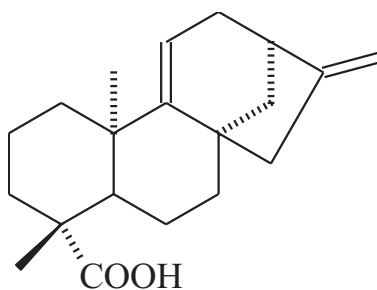
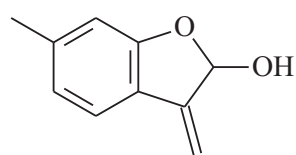
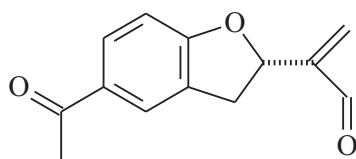


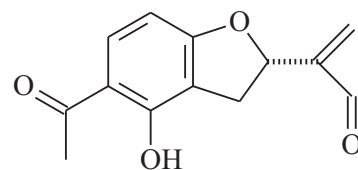
Figure 75 : benzofuranes identifiés dans le genre *Doronicum*



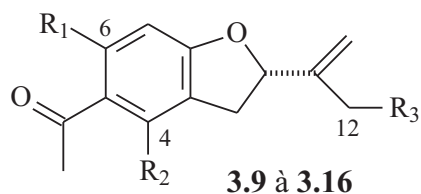
**3.6**



**3.7**



**3.8**



**3.9 à 3.16**

R<sub>1</sub> = H

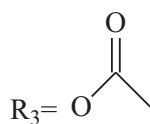
R<sub>2</sub> = OH

R<sub>3</sub> = OH

**3.9** : 4,12-dihydroxytrémétone

R<sub>1</sub> = H

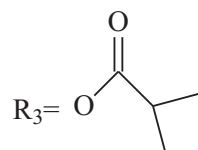
R<sub>2</sub> = OH



**3.10** : 12-acétoxy 4-hydroxytrémétone

R<sub>1</sub> = H

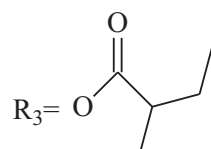
R<sub>2</sub> = OH



**3.11** : 12-isobutyroxy 4-hydroxytrémétone

R<sub>1</sub> = H

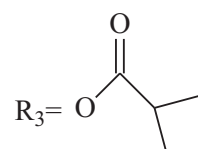
R<sub>2</sub> = OH



**3.12** : 12-[2-méthylbutyroxy]  
4-hydroxytrémétone

R<sub>1</sub> = H

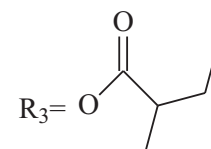
R<sub>2</sub> = H



**3.13** : 12-isobutyroxytrémétone

R<sub>1</sub> = H

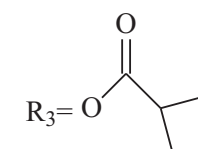
R<sub>2</sub> = H



**3.14** : 12-[2-méthylbutyroxy] trémétone

R<sub>1</sub> = OH

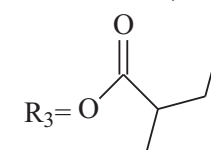
R<sub>2</sub> = H



**3.15** : 12-isobutyroxy 6-hydroxytrémétone

R<sub>1</sub> = OH

R<sub>2</sub> = H



**3.16** : 12-[2-méthylbutyroxy]  
6-hydroxytrémétone

Figure 76 : composés dérivés du thymol identifiés dans le genre *Doronicum*

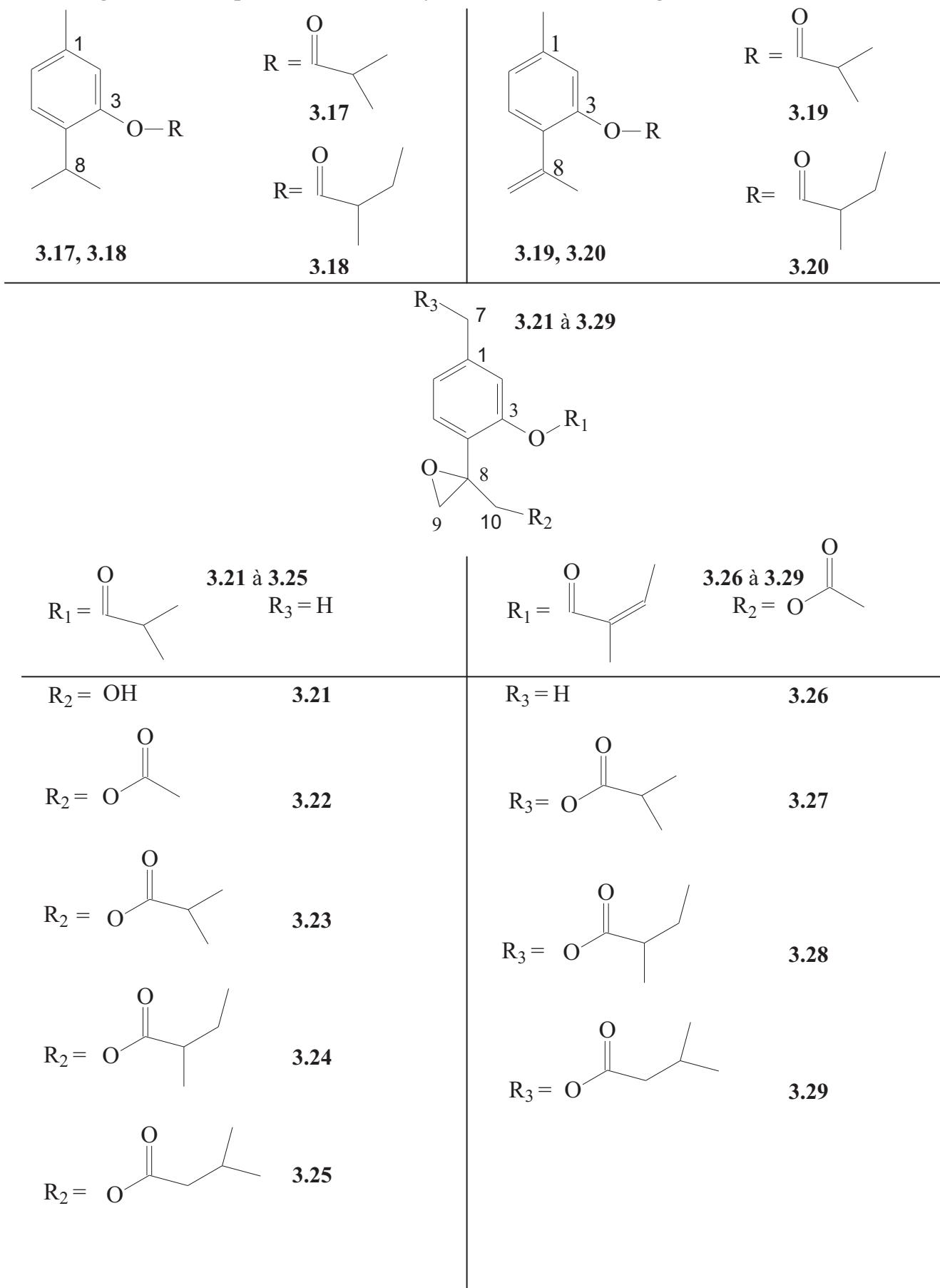
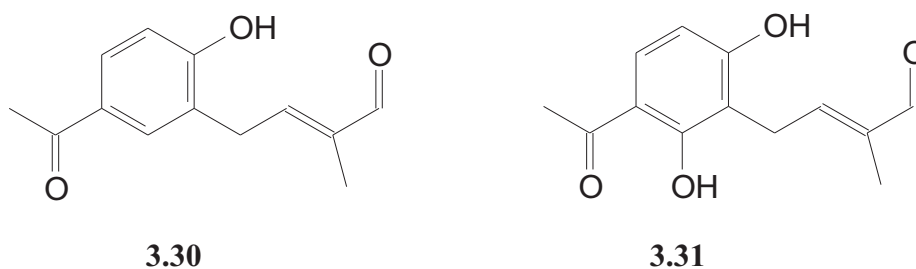


Figure 76 (suite) : esters dérivés du thymol identifiés dans le genre *Doronicum*

- 3.17 : isobutyrate de thymyle (A1)
- 3.18 : 2-méthylbutyrate de thymyle (A2)
- 3.19 : isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle (B1)
- 3.20 : 2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle (B2)
- 3.21 : isobutyrate de 10-hydroxy 8,9-époxythymyle
- 3.22 : isobutyrate de 10-acétoxy 8,9-époxythymyle
- 3.23 : isobutyrate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle
- 3.24 : isobutyrate de 10-[2-méthylbutyroxy] 8,9-époxythymyle
- 3.25 : isobutyrate de 10-isovaléroxy 8,9-époxythymyle
- 3.26 : angélate de 10-acétoxy 8,9-époxythymyle
- 3.27 : angélate de 7-isobutyroxy 10-acétoxy 8,9-époxythymyle
- 3.28 : angélate de 7-[2-méthylbutyroxy] 10-acétoxy 8,9-époxythymyle
- 3.29 : angélate de 7-isovaléroxy 10-acétoxy 8,9-époxythymyle

Figure 77 : composés phénoliques identifiés dans le genre *Doronicum*



## 2- Les esters dérivés du thymol dans les Asteraceae

Les quelques travaux sur la composition chimique des espèces du genre *Doronicum* (292-295) ont donc mis en évidence la présence de composés dérivés du thymol (3.17 à 3.29). Afin de compléter notre étude bibliographique nous nous sommes intéressés à ce type de molécules et particulièrement aux esters, aux bi-esters de thymyle (3.32 à 3.40) et de 8,9-déhydrothymyle (3.41 à 3.45) ainsi qu'aux esters, aux bi-esters de 8,9-époxythymyle (3.46 à 3.67). Le tableau 27 reprend ces composés en faisant apparaître les fonctions esters concernées. Tous ces composés ont été signalés dans des extraits aux solvants de différentes Asteraceae appartenant notamment aux tribus des Senecioneae (*Doronicum*, *Arnica*), des Eupatorieae (*Eupatorium*, *Ageratina*, *Sclerolepis*, *Kaunia*), des Inuleae (*Inula*, *Stoebe*) et des Helenieae (*Schkuhria*, *Eriophyllum*).



En 1971, Shtacher and Kashman (296) ont isolé deux esters dérivés de thymyle dans un extrait de racines d'*Inula viscosa*. Il s'agit du 7-isobutyrate de 3-méthoxycymène **3.36** et du 7-isovalérate de 3-méthoxycymène **3.37** qui ont été caractérisés par RMN du proton et par spectrométrie de masse.

En 1972, dans un extrait d'*Arnica amplexicaulis* (297), Bohlmann et Zdero identifient l'isobutyrate de thymyle **3.17**, l'isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle **3.19** et l'isobutyrate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle **3.23** par spectrométrie de masse et RMN du proton. Par la suite, d'autres dérivés du thymol ont été isolés et caractérisés par Bohlmann et coll. dans des études sur des espèces du genre *Athrixia* (298), *Ageratina* et *Sclerolepis* (299, 300, 301), *Inula* (302, 303), *Stoebe* (304), *Schkuhria* (305), *Marshallia* (306), *Eryophyllum* (307), *Kaunia* (308) et *Mikania* (309).

Les travaux de Willuhn et coll. (310, 311) sur les extraits au dichlorométhane d'*Arnica sachalinensis* ont permis d'identifier différents composés dérivés du thymol par spectrométrie de masse, RMN du proton et RMN du carbone-13. Ces auteurs ont également montré que l'isobutyrate de 10-acétoxy 8,9-époxythymyle **3.22** était un allergène de contact (312).

En 1993, dans un extrait d'*Eupatorium stoechadosmum*, Trang et coll. (313) ont isolé l'angélate de 10-acétoxy 8,9-époxythymyle **3.67** qu'ils ont caractérisé par infra rouge, spectrométrie de masse, RMN du proton et du carbone-13.

Enfin, plus récemment, dans un extrait au méthanol d'*Eupatorium fortunei*, Tori et coll. (314) ont identifié, plusieurs dérivés du thymol (**3.34**, **3.43**, **3.44**) à l'aide de différentes techniques analytiques : IR, SM-(IE et IC), RMN du proton et du carbone-13.

Tableau 27 : structures de composés dérivés du thymol identifiés dans les Asteraceae

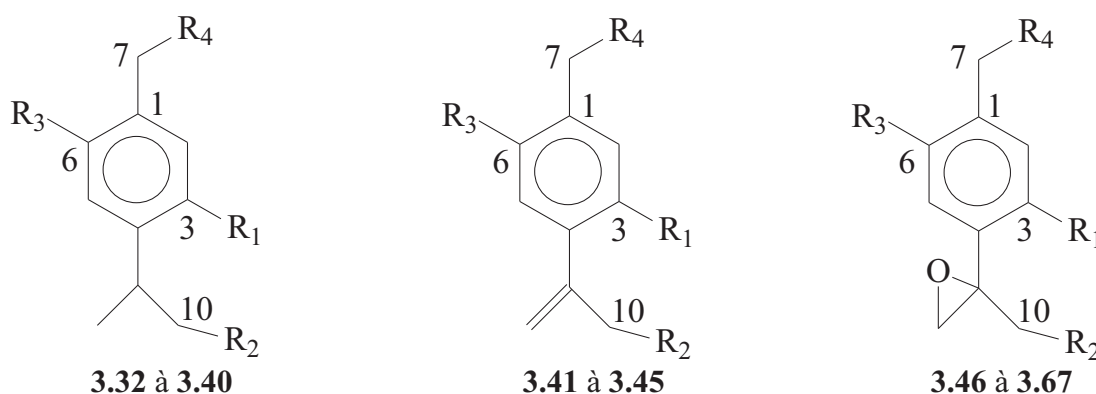


Tableau 27 (suite) : structures de composés dérivés du thymol identifiés dans les  
Asteraceae

N° composé	R <sub>1</sub> =	R <sub>2</sub> =	R <sub>3</sub> =	R <sub>4</sub> =	N° référence
3.32	isobutyrate	acétate	méthoxy	H	308
3.33	isobutyrate	isobutyrate	méthoxy	H	308
3.34	tiglate	acétate	H	H	314
3.35	méthoxy	H	H	acétate	308
3.36	méthoxy	H	H	isobutyrate	296, 302
3.37	méthoxy	H	H	isovalérate	296
3.38	méthoxy	acétate	H	isobutyrate	303
3.39	méthoxy	H	méthoxy	H	300, 301, 307, 308
3.40	méthoxy	H	méthoxy	isobutyrate	300
3.41	isobutyrate	acétate	H	H	311
3.42	isobutyrate	isobutyrate	H	H	306
3.43	tiglate	H	H	H	314
3.44	tiglate	acétate	H	H	314
3.45	méthoxy	H	méthoxy	H	308
3.46	isobutyrate	H	H	H	299, 301, 304, 305
3.47	isobutyrate	acétate	H	H	297, 299-301, 309-311
3.48	isobutyrate	tiglate	H	H	299
3.49	isobutyrate	acétate*	H	isobutyrate*	311
3.50	isobutyrate	acétate*	H	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> COO*	311
3.51	isobutyrate	H	H	acétate	299, 301, 304
3.52	isobutyrate	H	H	isobutyrate	299, 301, 306
3.53	isobutyrate	isobutyrate	H	isobutyrate	302
3.54	isobutyrate	H	H	isovalérate	306
3.55	isobutyrate	H	méthoxy	H	305, 306
3.56	isobutyrate	acétate	méthoxy	H	300
3.57	isobutyrate	isobutyrate	méthoxy	H	303
3.58	2-méthylbutyrate	H	H	H	304
3.59	2-méthylbutyrate	acétate	H	H	304
3.60	isovalérate	acétate	H	H	304
3.61	tiglate	acétate	H	H	298
3.62	tiglate	isobutyrate	H	H	298
3.63	tiglate	tiglate	H	H	298
3.64	tiglate	isobutyrate	H	acétate	298
3.65	tiglate	tiglate	H	acétate	298
3.66	tiglate	isobutyrate	H	isobutyrate	298
3.67	angélate	acétate	H	H	313

R<sub>2</sub> et R<sub>4</sub> interchangeables

## II- ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *DORONICUM CORSICUM*

### 1- Analyse de l'huile essentielle avant fractionnement

Nous avons étudié les huiles essentielles préparées à partir de parties aériennes de *Doronicum corsicum* par hydrodistillation durant cinq heures dans un appareil de type Clevenger. Le matériel végétal a été récolté en Haute-Corse, de Juillet à Août 2003, dans différentes stations : Vizzavona, Col de Vergio, Col de Sorba ; le rendement moyen, calculé en fonction de la masse de végétal frais, est de 0,07%.

L'analyse par CPG/Ir et CPG/SM-IE de l'huile essentielle a permis d'identifier 26 composés (tableau 28), sur la base des références de nos bibliothèques « laboratoire » compte tenu des identifications faites précédemment dans l'étude de l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*, représentant environ 58% de la composition chimique. Nous avons identifié 12 composés hydrocarbonés et 14 composés oxygénés représentant respectivement 31,8% et 24,8% de la composition chimique totale. Les composés majoritaires sont le modhephène (11,6%), le (E)- $\beta$ -caryophyllène (9,8%), l'angélate de thymyle **A6** (8,7%), l'oxyde de thymyle et de méthyle (4,6%) et le 7- $\beta$ -[H]-silphiperfol-5-ène (3,4%) (tableau 28). A ce stade de notre étude, un composé ayant à une teneur de 9,9% reste non identifié, nous le désignerons par **G2** (Ir a 2130 ; Ir p 2808) dans la suite du chapitre. Les autres composés ont une teneur inférieure à 3%. Parmi les 26 composés identifiés, nous notons la présence de constituants préalablement identifiés dans les huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* tels les sesquiterpènes tricycliques, les esters de thymyle, de 8,9-déhydrothymyle et de néryle.

L'huile essentielle a été fractionnée sur colonne ouverte de silice en vue de l'identification d'un plus grand nombre de composés et, pour certains constituants déjà identifiés, d'obtenir des concentrations suffisantes pour permettre une analyse par RMN du carbone-13.

Tableau 28 : composition chimique de l'huile essentielle de *Doronicum corsicum*

<b>Composés</b>	<b>Ir <i>a</i></b>	<b>Ir <i>p</i></b>	<b>%</b>
$\alpha$ -pinène	930	1024	0,1
$\alpha$ -phellandrène	996	1169	0,1
para-cymène	1012	1271	0,2
oxyde de thymyle et de méthyle	1215	1586	4,6
oxyde de carvacryle et de méthyle	1224	1594	0,3
7- $\alpha$ -[H]-silphiperfol-5-ène	1326	1429	0,5
7- $\beta$ -[H]-silphiperfol-5-ène	1348	1454	3,4
silphin-1-ène	1348	1474	0,8
modhephène	1382	1522	11,6
( <i>E</i> )- $\beta$ -caryophyllène	1419	1593	9,8
$\alpha$ -humulène	1451	1661	2,4
isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle	1454	1922	0,4
isobutyrate de thymyle	1458	1889	1,7
isobutyrate de néryle	1469	1780	0,8
germacrène D	1477	1701	2,1
bicyclogermacrène	1494	1724	1,1
$\delta$ -cadinène	1516	1748	0,6
2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle	1548	1996	0,9
isovalérate de 8,9-déhydrothymyle	1548	2006	0,4
2-méthylbutyrate de thymyle	1551	1964	2,5
isovalérate de thymyle	1551	1975	0,4
2-méthylbutyrate de néryle	1554	1857	1,0
isovalérate de néryle	1560	1877	0,6
angélate de 8,9-déhydrothymyle	1580	2117	1,9
angélate de thymyle ( <b>A6</b> )	1582	2074	8,7
$\beta$ -bisabolol	1653	2133	0,9
<b>Total</b>			<b>57,8</b>

**Ir** : Indices de rétention sur colonne apolaire (*a*) et polaire (*p*)

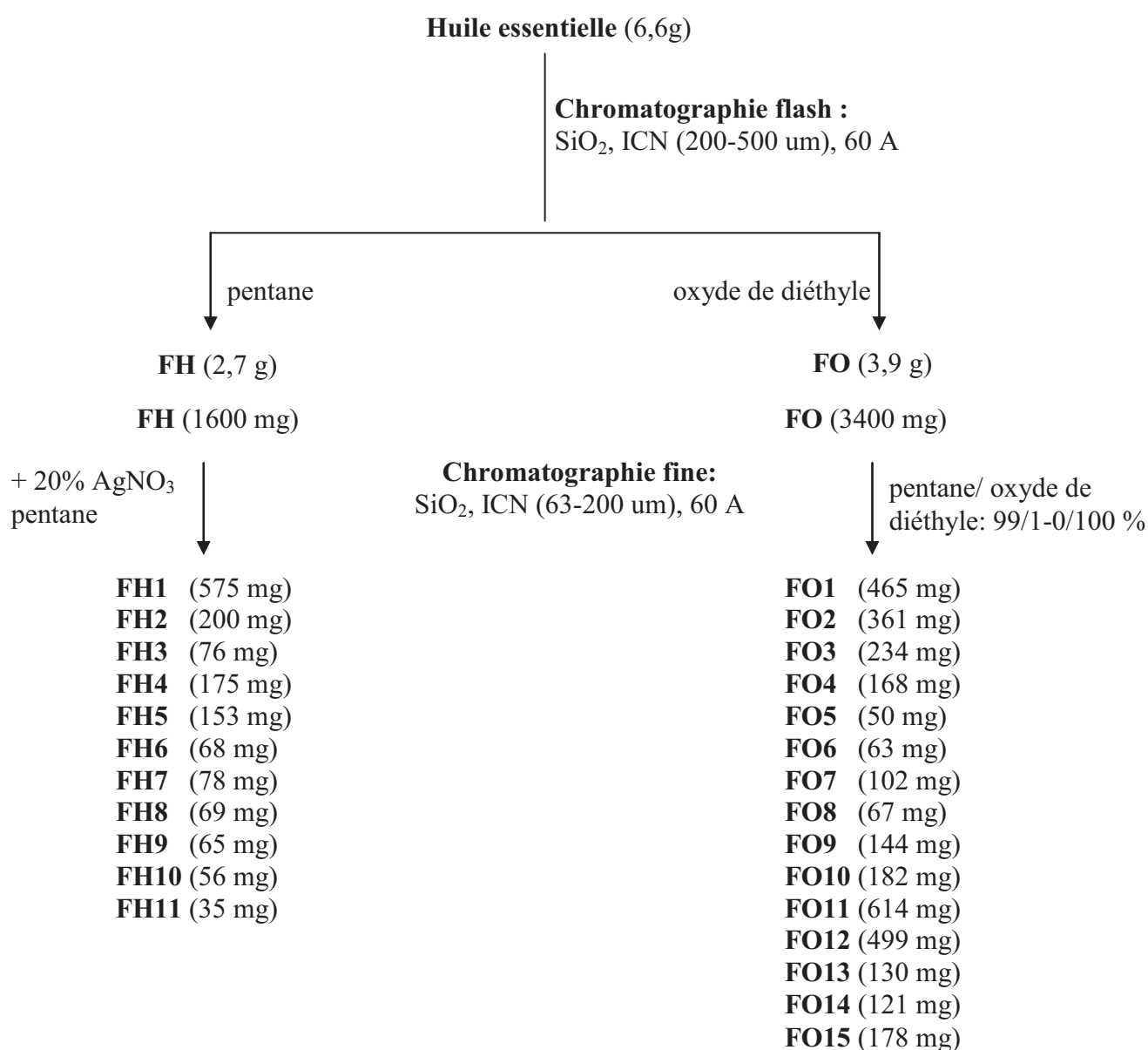
Les abondances sont données sur colonne polaire

(sauf lors de coélution : pourcentages donnés sur colonne apolaire)

## 2- Fractionnement de l'huile essentielle

L'huile essentielle (6,6 g) a été fractionnée par chromatographie sur colonne ouverte de silice de forte granulométrie (SiO<sub>2</sub>, ICN 200-500 µm, 60 A). La fraction FH contenant les hydrocarbures (2,7 g) est obtenue par élution au pentane et la fraction FO contenant les composés oxygénés (3,9 g), par élution à l'oxyde de diéthyle. Ces deux fractions ont été analysées par CPG/Ir et par CPG/SM avant d'être fractionnées à leur tour sur colonne de silice de granulométrie plus fine (figure 78). On collecte ainsi 11 fractions hydrocarbonées (FH1 à FH11) et 15 fractions oxygénés (FO1 à FO15).

Figure 78: fractionnement de l'huile essentielle de *Doronicum corsicum*



### 3- Etude des fractions hydrocarbonées

L'étude des fractions de type FH par CPG/Ir et CPG/SM a permis de reconnaître 45 composés en plus des 12 constituants déjà identifiés. Ces 57 composés, repris au tableau 29 représentent environ 97% de la composition chimique globale de la fraction FH. Ils se répartissent en 44 sesquiterpènes (96% de FH) et en 13 monoterpènes (0,8% de FH).

10 composés, absents des bibliothèques du laboratoire (Ir et SM), ont été identifiés par les bibliothèques commerciales d'indices de rétention et de spectres de masse : le (E)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène, le bicycloélémente, le silphiperfol-5,7(14)-diène, le péthybrène, l' $\alpha$ -isocomène (**H6**) , le  $\beta$ -isocomène (**H7**), le (E)- $\gamma$ -bisabolène, le (E)- $\alpha$ -bisabolène (**H8**), le sesquisabinène A (**H9**) et le sesquisabinène B.

Les quatre composés notés **H6** à **H9** sont présents à des teneurs supérieures à 5 % dans l'une ou l'autre des fractions hydrocarbonées. Nous avons pu ainsi confirmer l'identification de ces composés par RMN du carbone-13 en comparant les déplacements chimiques mesurés dans les fractions concernées avec ceux de la bibliothèque du laboratoire « Chimie et Biomasse » ou de la littérature (18) (figure 79). Deux de ces quatre composés, l' $\alpha$ -isocomène et le  $\beta$ -isocomène, avaient été identifiés dans les huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* sur la base des propositions des bibliothèques commerciales (Ir et SM) mais les faibles abondances de ces deux composés n'avaient pas permis une analyse par RMN du carbone-13. La présente étude de l' $\alpha$ -isocomène et du  $\beta$ -isocomène par RMN du carbone-13 dans l'huile essentielle de *Doronicum corsicum* constitue une confirmation des identifications qui avaient été faites dans *Eupatorium cannabinum*.

Pour chacun des composés identifiés par RMN du carbone-13, tous les carbones, y compris les carbones quaternaires, ont été repérés. De plus, le nombre de superpositions reste limité, chacun des constituants est donc confirmé par l'observation d'au moins 50% des carbones qui lui appartiennent en propre malgré l'existence de similitudes structurales. De plus, les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) des carbones par rapport aux valeurs de référence sont faibles.

Tableau 29 : composés identifiés dans les fractions hydrocarbonées de l'huile essentielle de *Doronicum corsicum*

Fractions	FH											FH11		
	1600	575	FH1	FH2	FH3	FH4	FH5	FH6	FH7	FH8	FH9		FH10	56
Masse des fractions (mg)														
Composés	Ir a	Ir p												
$\alpha$ -pinène	930	1024	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -myrcène	981	1166	tr	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -phellandrène	996	1140	0,1	-	0,7	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -terpinène	1010	1185	tr	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
para-cymène	1012	1271	0,5	-	-	-	-	0,6	2,4	0,3	-	-	-	-
$\beta$ -phellandrène	1020	1215	tr	-	0,3	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
limonène	1022	1205	0,1	-	0,1	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-
(E)- $\beta$ -ocimène	1037	1254	tr	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
(E)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène	1105	1309	tr	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
7- $\alpha$ -[H]-silphiperfol-5-ène	1326	1429	1,2	2,9	0,7	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
bicycloélémente	1334	1481	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,6	-
7- $\beta$ -[H]-silphiperfol-5-ène	1348	1454	8,8	20,5	8,2	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-
silphin-1-ène	1348	1474	2,0	4,7	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -cubébène	1350	1460	0,1	-	0,1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
silphiperfol-5,7 (14)-diène	1353	1523	0,1	-	-	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -copaène	1377	1496	0,1	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
péthyrène	1377	1512	tr	0,6	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
modhephène	1382	1522	30,4	57,6	63,5	16,6	0,2	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3	-	-
$\alpha$ -isocomène (H6)	1388	1533	2,8	5,5	4,4	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -isocomène (H7)	1406	1571	2,6	1,8	12,0	7,3	-	-	-	-	-	-	-	-
cis- $\alpha$ -bergamotène	1411	1567	0,3	-	-	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-

Fractions	FH	FH1	FH2	FH3	FH4	FH5	FH6	FH7	FH8	FH9	FH10	FH11
(E)- $\beta$ -caryophyllène	26,1	-	-	20,3	86,7	93,6	91,0	22,5	2,4	0,8	0,4	1,1
$\beta$ -copaène	0,1	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans- $\alpha$ -bergamotène	0,3	-	-	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>sesquisabinène A (H8)</b>	0,5	-	-	-	-	-	-	2,2	5,8	-	-	-
aromadendrène	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9
<i>sesquisabinène B</i>	0,3	-	-	-	-	-	-	-	2,8	-	-	-
allo-aromadendrène	0,5	-	0,3	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -humulène	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	44,3	66,3	47,7
(E)- $\beta$ -farnésène	1,1	-	-	-	-	-	-	-	4,9	10,3	2,6	-
$\alpha$ -curcumène	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,4	2,8
$\gamma$ -gurjunène	0,3	-	0,5	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-
$\gamma$ -muurolène	0,3	-	-	2,2	0,7	0,2	0,3	-	-	-	-	-
$\gamma$ -curcumène	0,1	-	-	-	-	-	-	-	2,9	2,3	0,1	-
trans- $\beta$ -bergamotène	0,1	-	-	-	0,7	0,7	0,7	-	-	-	-	-
germacrène D	5,4	-	-	-	-	-	0,7	61,9	40,3	5,4	0,4	0,5
(Z,E)- $\alpha$ -farnésène	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	1,6
$\beta$ -sélinène	tr	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
lédène	0,1	-	-	2,9	0,2	0,1	0,3	-	-	-	-	-
$\alpha$ -muurolène	0,1	-	-	2,2	1,1	0,2	0,3	-	-	-	-	-
bicyclogermacrène	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9	23,2
(E,E)- $\alpha$ -farnésène	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	7,2	16,6	15,9
$\beta$ -bisabolène	0,5	-	-	-	-	-	-	3,2	8,9	1,8	-	-
$\beta$ -curcumène	0,3	-	-	-	-	-	-	1,5	3,1	0,4	-	-
$\gamma$ -cadinène	0,2	-	-	-	0,9	0,8	0,8	-	-	-	-	-
(Z)- $\gamma$ -bisabolène	0,8	-	-	-	-	-	-	-	3,9	3,2	-	-
calaménène	tr	-	-	-	-	-	-	0,1	0,2	-	-	-



Fractions	FH	FH1	FH2	FH3	FH4	FH5	FH6	FH7	FH8	FH9	FH10	FH11		
δ-cadinène	1516	1748	1,3	-	-	5,3	6,6	3,2	2,2	2,2	1,6	-	-	-
<i>(E)</i> -γ-bisabolène (H9)	1523	1727	0,3	-	-	-	-	-	-	3,8	1,8	2,2	-	
cadina-1,4-diène	1525	1769	tr	-	0,4	0,2	-	-	-	-	-	-	-	
α-cadinène	1531	1779	tr	-	-	-	0,2	0,3	0,3	-	-	-	-	
<i>(E)</i> -α-bisabolène (H10)	1534	1759	1,2	-	-	-	-	-	-	12,7	11,3	-	-	
α-calacorène	1539	1894	tr	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	-	-	
α-kaurène	2046	2353	tr	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	
tricosane	2300	2300	tr	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
tétracosane	2400	2400	tr	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
pentacosane	2500	2500	tr	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>	<b>96,9</b>	<b>95,5</b>	<b>91,9</b>	<b>89,2</b>	<b>97,8</b>	<b>99,6</b>	<b>97,7</b>	<b>96,3</b>	<b>76,0</b>	<b>89,8</b>	<b>98,3</b>	<b>44,0</b>		

Les composés écrits en police usuelle sont présents dans nos bibliothèques propres d'Ir et de SM

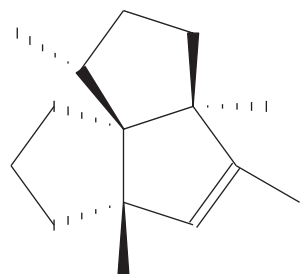
Les composés en *italique* ont été identifiés par comparaison avec les bibliothèques commerciales

Les composés en *italique* et en **gras** ont été identifiés, également, par RMN du carbone-13

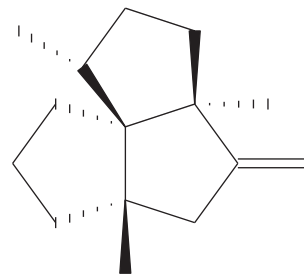
**Ir** : Indices de rétention calculés sur colonne apolaire (**a**) et sur colonne polaire (**p**)

Les abondances sont données sur colonne apolaire (sauf lors de coélution : pourcentages donnés sur colonne polaire)

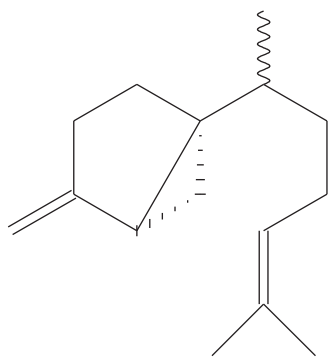
Figure 79 : structures et déplacements chimiques de l' $\alpha$ -isocomène (**H6**), du  $\beta$ -isocomène (**H7**), du sesquisabinène A (**H8**) et du (E)- $\alpha$ -bisabolène (**H9**) mesurés dans les fractions FH1, FH2 et FH8 et contenus dans la bibliothèque «laboratoire» (lab) ou décrits dans la littérature (18)



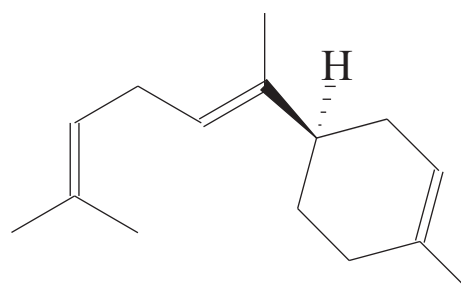
**H6** :  $\alpha$ -isocomène



**H7** :  $\beta$ -isocomène



**H8** : sesquisabinène A



**H9** : (E)- $\alpha$ -bisabolène

<b>H6</b>			<b>H7</b>			<b>H8</b>			<b>H9</b>		
$\delta$ (18)	$\delta$ (FH1)		$\delta$ (18)	$\delta$ (FH2)		$\delta$ (lab)	$\delta$ (FH8)		$\delta$ (lab)	$\delta$ (FH8)	
142,8	142,77	s	162,8	162,15	s	154,14	154,15	s	139,27	139,27	s
132,8	132,71	d	100,9	100,73	t	131,13	131,14	s	133,65	133,65	s
63,9	63,78	s	66,9	66,66	s	124,98	124,98	d	131,23	131,23	s
60,0	59,88	s	55,1	55,02	s	101,92	101,82	t	123,56	123,54	d
56,7	56,70	s	49,6	49,49	s	37,85	37,86	d	121,79	121,77	d
42,7	42,64	t	48,1	48,02	t	36,60	36,64	s	120,95	120,94	d
40,0	39,92	d	42,8	42,81	t	34,63	34,63	t	42,85	42,84	d
37,0	37,26	t	41,7	41,69	t	31,17	31,18	d	30,83	30,81	t
33,7	33,66	t	40,5	40,46	d	28,76	28,77	t	30,80	30,80	t
32,0	31,96	t	37,7	34,57	t	26,58	26,59	t	28,01	27,99	t
24,1	24,05	q	30,2	30,30	t	26,05	26,05	t	26,98	26,97	t
23,7	23,73	t	24,2	24,21	q	25,72	25,72	q	27,70	27,72	q
23,2	23,18	q	24,0	24,03	t	18,01	18,01	q	23,50	23,51	q
17,3	17,29	q	23,6	23,43	q	17,65	17,68	q	17,72	17,72	q
13,0	13,01	q	18,0	18,00	q	16,14	16,15	t	14,15	14,15	q

#### 4- Etude des fractions oxygénées

L'analyse par CPG/Ir et CPG/SM-IE des fractions de type FO a permis d'identifier 71 constituants, repris au tableau 30, incluant les 14 composés oxygénés préalablement identifiés dans l'huile essentielle.

Parmi ceux ci :

- 63 composés ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et de leurs indices de rétention avec ceux contenus dans les bibliothèques du laboratoire. Nous constatons la présence, dans ces fractions, de nombreux composés précédemment identifiés dans les huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum*.
- 8 composés ont été identifiés à partir des données des bibliothèques commerciales : le 8,9-déhydrothymol, l'oxyde de  $\beta$ -caryophyllène, le 1,5-époxyvalial-4,14-ène, le trans-artéannuic alcool, la  $\beta$ -oplopénone, l'eudesm-4(15)-èn-6-ol, le caryophylla-4(14)-8(15)-dièn-5 $\beta$ -ol et l'isobutyrate de 6-méthoxythymyle.

Outre ces 71 composés, les fractions oxygénées contiennent :

- un composé **O3** pour lequel les bibliothèques commerciales proposent la structure du 2,5-diméthoxycymène qui s'avérera être erronée.
- le composé **A6** identifié comme étant l'angélate de thymyle suite à l'étude d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* mais qui faute d'une teneur suffisante, n'avait pu être confirmée par RMN du carbone-13.
- 4 composés notés **A7**, **A8**, **G1** et **G2** pour lesquels aucune structure acceptable n'est proposée par les bibliothèques commerciales.

Les analyses de ces 6 composés sont détaillées dans le paragraphe 5.

Tableau 30 : composés identifiés dans les fractions oxygénées de l'huile essentielle de *Doronicum corsicum*

Fractions	FO FO1FO2FO3FO4FO5FO6FO7FO8FO9FO10FO11FO12FO13FO14FO15																
	3400	465	361	234	168	50	63	102	67	144	182	614	499	130	121	178	
Masse des fractions (mg)																	
Composés	Ir	a	Ir	p													
<i>acétate de cis-hex-3-èneyle</i>	987	1321	0,1	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nonalal	1081	1395	0,2	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
oxyde de nérol	1137	1469	0,1	-	-	-	0,9	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-2-nonènal	1137	1535	tr	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -terpinéol	1172	1692	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
décanal	1182	1498	tr	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>8,9-déhydrothymol</i>	1193	1961	0,2	-	-	-	-	0,4	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -cyclocitral	1197	1704	tr	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
oxyde de thymyle et de méthyle	1215	1586	7,1	23,9	9,8	10,4	12,6	0,9	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-
oxyde de carvacryle et de méthyle	1224	1594	0,5	1,7	0,8	0,9	1,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-2-décènal	1238	1640	tr	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-
acétate de linalyle	1237	1555	tr	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
thymol	1267	2157	0,2	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-
acétate de bornyle	1269	1579	tr	-	-	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
décan-2-one	1274	1599	tr	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
undécanal	1286	1583	tr	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E,E)-2,4-décadiènal	1288	1798	tr	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
acétate de $\alpha$ -terpinyle	1330	1688	tr	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-2-undécènal	1341	1749	tr	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
acétate de néryle	1342	1724	0,2	-	-	-	1,3	6,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)- $\beta$ -damascènone	1362	1810	0,2	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-

Fractions		FO	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9	FO10	FO11	FO12	FO13	FO14	FO15
dodécanal	1388 1705	tr	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2,5-diméthoxycymène (O3)</b>	1399 1852	3,7	9,5	5,7	8,1	9,5	3,2	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
géranyle acétone	1426 1846	0,1	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
propionate de néryle	1428 1784	0,1	-	0,2	0,3	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle	1454 1922	0,6	0,3	1,4	2,2	2,3	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
isobutyrate de thymyle	1458 1889	3,3	2,5	8,7	7,3	7,0	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -ionone	1462 1923	tr	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
isovalérate de 2-phényléthyle	1463 1964	tr	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
isobutyrate de néryle	1469 1780	1,4	2,9	3,4	3,1	2,8	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tridécane-2-one	1481 1808	tr	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
cubébol	1485 1880	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	0,2	-
tridécanal	1490 1813	tr	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-épi-cubébol	1504 1928	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	0,9	-
<i>oxyde de <math>\beta</math>-caryophyllène</i>	1543 1845	tr	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle	1548 1966	1,5	0,9	3,4	3,1	3,1	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
isovalérate de 8,9-déhydrothymyle	1548 2006	0,6	0,3	1,0	0,9	0,9	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-méthylbutyrate de thymyle	1551 1964	4,2	6,8	12,6	9,9	9,1	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
isovalérate de thymyle	1551 1975	0,8	1,1	1,9	1,4	1,3	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
acide dodécanoïque	1556 2474	3,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43,4
2-méthylbutyrate de néryle	1554 1857	1,7	4,0	3,0	3,7	3,4	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>1,5-époxyvalial-4(14)-ène</i>	1554 1959	tr	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
isovalérate de néryle	1560 1877	1,1	2,5	2,3	2,4	2,2	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
palustrol	1562 1914	0,4	-	-	-	-	-	-	0,7	0,9	-	-	-	-	-	-	-
spatulénol	1563 2103	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-

Fractiions	FO	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	FO7	FO8	FO9	FO10	FO11	FO12	FO13	FO14	FO15
gleénol	1572	2008	0,2	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -germacrénol	1573	2019	0,4	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-
oxyde de caryophyllène	1575	1940	0,7	-	-	-	-	-	-	12,2	-	-	-	-	-	-
globulol	1576	2051	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	2,7	-
<i>trans-artéannuic alcool</i>	1582	1999	0,5	-	-	3,8	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
angélate de 8,9-déhydrothymyle	1580	2117	3,1	3,0	10,1	5,0	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>angélate de thymyle (A6)</b>	1582	2074	14,5	31,7	25,0	30,0	27,8	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-
lédol	1588	1997	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,8	1,5	-
tétradécanal	1592	1919	tr	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -oplopénone	1594	2051	0,1	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-
époxyde d'humulène II	1594	2011	0,2	-	-	-	-	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-
<i>eudesm-4(15)-èn-6-ol</i>	1610	2025	0,1	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-
<i>caryphylla-4(14),8(15)-dièn-5-<math>\beta</math>-ol</i>	1624	2267	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,1	3,7	-
<i>caryphylla-4(14),8(15)-dièn-5-<math>\alpha</math>-ol</i>	1627	2272	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,0	13,4	-
$\tau$ -cadinol	1625	2152	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	-	-
$\tau$ -muurolol	1625	2170	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9	-	-
cubénol	1631	2023	0,2	-	-	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -cadinol	1643	2218	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,1	7,1
$\beta$ -bisabolol	1653	2133	1,5	-	-	-	-	-	-	26,6	6,7	-	-	-	-	-
<i>isobutyrate de 6-méthoxythymyle</i>	1658	1998	0,7	-	-	-	1,3	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>eudesm-4(15),7-dièn-1<math>\beta</math>-ol</i>	1670	2203	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,3
<b>A7</b>	1689	2257	2,6	-	-	-	-	41,4	59,4	-	-	-	-	-	-	-
pentadécanal	1693	2286	0,1	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
acide tétradécanoïque	1748	2681	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23,5

<b>Fractions</b>	<b>FO</b>	<b>FO1</b>	<b>FO2</b>	<b>FO3</b>	<b>FO4</b>	<b>FO5</b>	<b>FO6</b>	<b>FO7</b>	<b>FO8</b>	<b>FO9</b>	<b>FO10</b>	<b>FO11</b>	<b>FO12</b>	<b>FO13</b>	<b>FO14</b>	<b>FO15</b>		
<b>A8</b>	1774 2332	1,8	-	-	-	-	21,2	39,5	4,0	-	-	-	-	-	-	-		
acétate de (Z,E)-farnésyle	1792 2225	tr	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
hexadécanal	1795 2109	tr	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
acide hexadécanoïque	1952 2884	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1		
oxyde de manoyle	1992 2335	0,1	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<b>G1</b>	1999 2647	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	9,1	5,0	-	-		
<b>G2</b>	2130 2808	16,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55,3	57,4	13,1	1,4	1,0		
<b>Total</b>			<b>83,7</b>	<b>91,1</b>	<b>89,3</b>	<b>88,9</b>	<b>88,6</b>	<b>57,4</b>	<b>31,7</b>	<b>83,6</b>	<b>76,7</b>	<b>18,6</b>	<b>26,6</b>	<b>65,8</b>	<b>66,5</b>	<b>58,0</b>	<b>67,4</b>	<b>77,1</b>

Les composés écrits en style usuel sont présents dans nos bibliothèques propres d'Ir et de SM

Les composés en *italique* ont été identifiés par comparaison avec les bibliothèques commerciales

Les composés en **gras** ont, également, été identifiés en RMN du carbone-13

**Ir** : Indices de rétention calculés sur colonne apolaire (**a**) et sur colonne polaire (**p**)

Les abondances sont données sur colonne polaire (sauf lors de coélution : pourcentages donnés sur colonne apolaire)

## 5- Etude des composés absents des bibliothèques

### *a- Etude du composé O3*

Pour le composé **O3**, la bibliothèque commerciale König-Joullain (19) (Ir et SM) proposait le 2,6-diméthoxycymène. Le spectre de masse IE présente un ion moléculaire à  $m/z$  194 (50% environ) en accord avec la formule brute  $C_{12}H_{18}O_2$  et un pic de base à  $m/z$  179 correspondant à la perte d'un méthyle.

En RMN du carbone-13, les déplacements chimiques mesurés dans la fraction FO1 (**O3** : 9,5%) ne sont pas en accord avec cette structure. La symétrie dans la molécule du 2,6-diméthoxycymène induit huit déplacements chimiques dont quatre d'intensité double, ce que nous n'observons pas (figure 80). Par ailleurs, des études sur les plantes de la famille des Asteraceae (300, 301, 307, 308) font état du 2,5-diméthoxycymène. Afin de confirmer cette structure nous avons réalisé un fractionnement poussé de FO1 qui a conduit à un mélange où **O3** est présent à une teneur de 60%. Les déplacements chimiques mesurés dans ce mélange (figure 80) nous permettent d'identifier **O3** comme étant le 2,5-diméthoxycymène.

Dans cette fraction, nous observons 12 raies de résonance d'intensité importante. Ainsi, tous les signaux correspondants au 2,5-diméthoxycymène sont repérés :

- 2 signaux correspondant aux deux méthyles des groupements méthoxy à 56,31 et 56,17 ppm,
- six signaux correspondant à un benzène tétrasubstitué avec 4 carbones quaternaires et deux méthynes éthyléniques à 114,17 et 109,23 ppm,
- un signal d'intensité double appartenant à deux méthyles à 22,90 ppm d'un groupement isopropyle,
- enfin, deux carbones quaternaires à 135,09 et 124,19 ppm et un méthyle à 16,03 ppm.

A notre connaissance, le spectre de RMN du carbone-13 de ce composé n'est pas décrit dans la littérature.



Figure 80 : structure et déplacements chimiques du 2,5-diméthoxycymène (**O3**)

$\delta$ <b>O3</b> (ppm)	
151,81	C
150,48	C
135,09	C
124,19	C
114,17	CH
109,23	CH
56,31	CH <sub>3</sub>
56,17	CH <sub>3</sub>
26,77	CH
22,90 *2	CH <sub>3</sub>
16,03	CH <sub>3</sub>

### ***b- Etude du composé A6***

Dans les fractions FO1 à FO4, le composé **A6** est présent à des teneurs allant de 25% à 31,7%. Ce composé a été précédemment identifié dans l'huile essentielle de racines d'*Eupatorium cannabinum* comme étant l'angélate de thymyle sur la base d'études par CPG/Ir, CPG/SM-IE et CPG/SM-IC, mais sa faible abondance dans les fractions ne nous a pas permis de conforter cette identification par RMN du carbone-13.

Afin de caractériser le composé **A6** par RMN du carbone-13, nous avons procédé à une reconstitution de la molécule « supposée » à partir de deux molécules de référence : l'isobutyrate de thymyle et l'acide angélique (315), puis nous avons comparé les déplacements chimiques mesurés dans les fractions FO1-FO4 avec ceux des molécules de référence. Les résultats sont regroupés dans la figure 81 et supposent la structure de l'angélate de thymyle pour le composé **A6**. Ce composé n'étant pas décrit dans la littérature, nous avons effectué un fractionnement poussé (plusieurs chromatographies successives) de la fraction FO1 et nous avons abouti à un mélange où ce composé est présent à une teneur de 72%. A ce stade, la purification du

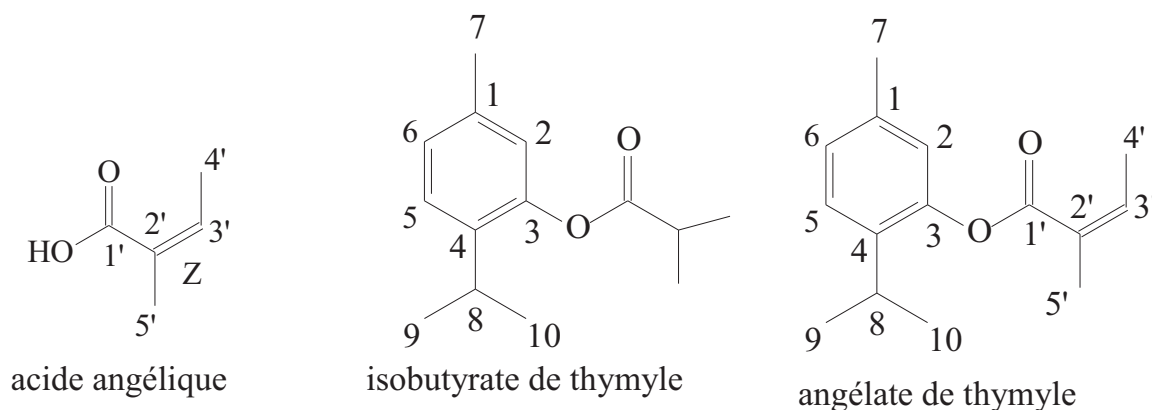
composé **A6** par chromatographie sur colonne de silice s'avère délicate, nous avons donc décidé de mener l'analyse structurale sur cette fraction.

Le spectre de RMN du carbone-13 présente l'aspect caractéristique du mélange d'un produit majoritaire en présence d'autres constituants minoritaires. Ainsi, nous observons 10 raies de résonance d'intensité moyenne voisine de 5,5 qui dominent un ensemble de pics moins intenses et cinq signaux d'intensité 1,5 appartenant vraisemblablement aux carbones quaternaires du composé majoritaire. Les séquences « spin echo » et DEPT nous renseignent sur le nombre d'hydrogène portés par chaque atome de carbones.

Parmi ces quinze signaux, nous repérons, dans la zone de résonance des carbones aliphatiques (10-70 ppm), 6 signaux de forte intensité (3 méthyles et 3 méthynes). On distingue également dans la région des champs faibles (120-180 ppm), 4 signaux intenses correspondant aux méthynes éthyléniques et 5 carbones quaternaires (4 appartenant à des carbones éthyléniques et le troisième à un carbonyle).

Le spectre de RMN du proton de la même fraction est caractérisé par la présence de huit figures dominantes : à 7,20 ppm, 7,02 ppm, à 6,85 ppm, à 6,25 ppm, à 2,99 ppm, à 2,32 ppm, à 2,08 ppm et à 1,20 ppm.

Figure 81 : identification de **A6** par comparaison des déplacements chimiques, mesurés dans les fractions FO1 à FO4, avec ceux de l'isobutyrate de thymyle et de l'acide angélique



C	acide angélique		angélate de thymyle	
	$\delta$ (315)	$\delta$ isobutyrate de thymyle	<b>A6</b> $\delta$ (FO1 à FO4)	
1		137,08 *	137,04 *	C 0,04
2		122,79	122,90	CH 0,11
3		148,12	147,94	C 0,18
4		136,56 *	136,50 *	C 0,06
5		126,33 **	126,34 **	CH 0,01
6		127,03 **	126,92 **	CH 0,11
7		20,88	20,85	CH <sub>3</sub> 0,03
8		27,05	27,21	CH 0,16
9		23,03	23,01	CH <sub>3</sub> 0,02
10		23,03	23,01	CH <sub>3</sub> 0,02
1'	173,96	175,77	166,42	C -
2'	127,33		127,30	C 0,03
3'	140,87		140,36	CH 0,51
4'	15,93		15,92	CH <sub>3</sub> 0,01
5'	20,22		20,72	CH <sub>3</sub> 0,50

\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C1 et C4

\*\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C5 et C6

$\Delta\delta$  : variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence

Le spectre de RMN 2D XHCORR permet d'établir une corrélation scalaire proton-carbone dont les résultats sont regroupés dans le tableau 31. Dans la matrice de corrélation, nous pouvons noter :

- pour la partie alkyle , une corrélation entre les protons à 2,08 ppm (intégration, 6H) et le méthyle à 15,92 ppm et une autre entre le proton à 6,25 ppm (1H) et le méthyne éthylénique à 140,36 ppm.

- pour la partie aryle, des corrélations entre les protons caractéristiques du cycle benzénique à 6,85 ppm (1H), 7,02 ppm (dd, 1H) et 7,20 ppm (1H) et les méthynes éthyléniques à 122,90, 126,92 et 126,34 ppm. Des corrélations confirmant la présence du groupement isopropyle par les protons à 1,2 ppm (6H) couplés au signal d'intensité double à 23,01 ppm (deux méthyles) et par le proton à 2,99 ppm (1H) couplé au méthyne à 27,21 ppm. Enfin, nous observons une dernière corrélation entre le proton à 2,32 ppm (1H) et le méthyle éthylénique à 20,85 ppm.

Tableau 31 : corrélations proton-carbones obtenues avec le spectre RMN 2D XHCORR

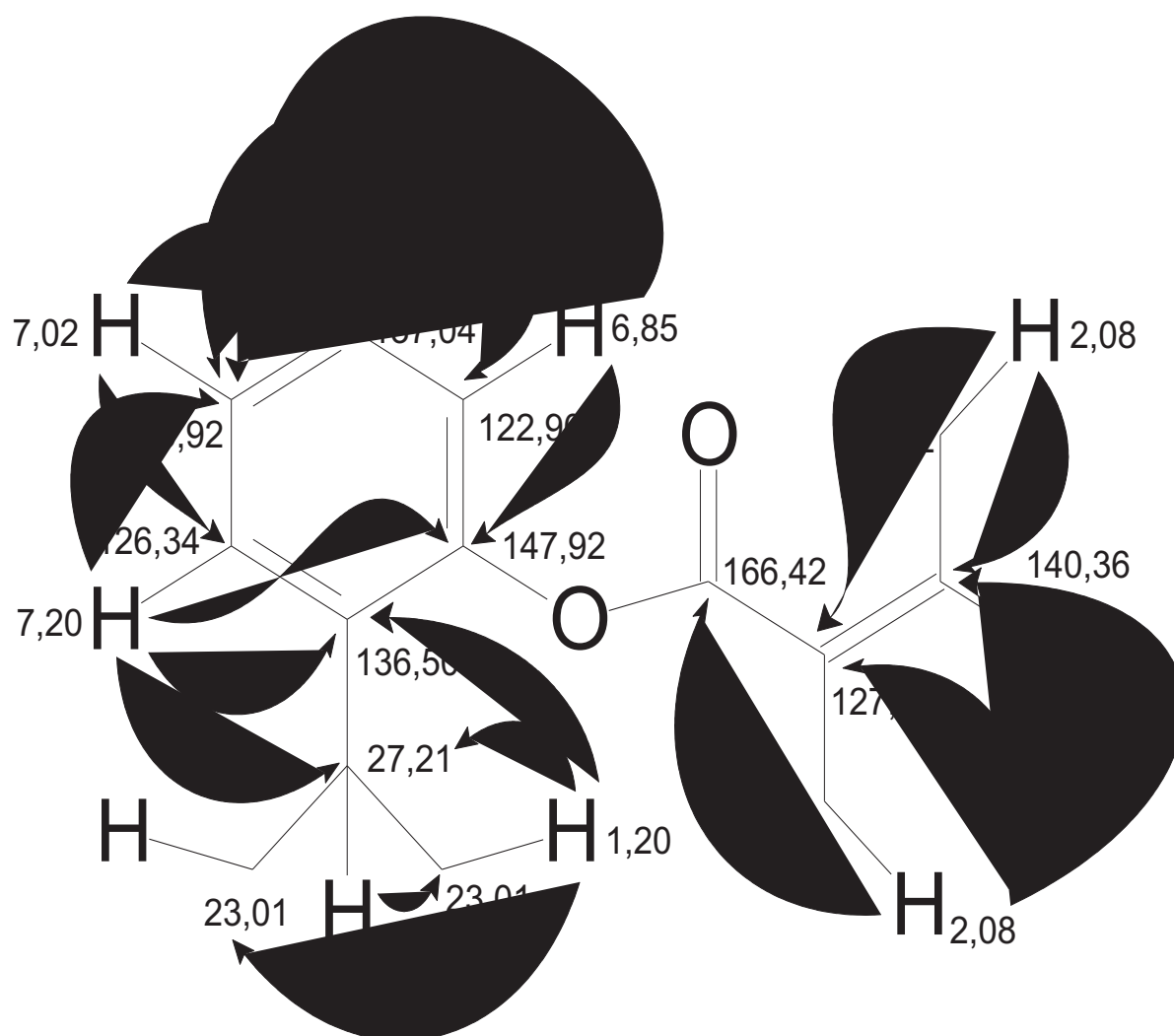
C	X <sub>C</sub>	δ (ppm) du <sup>13</sup> C	δ (ppm) du <sup>1</sup> H
1	C	137,04	-
2	CH	122,90	6,85 (H <sub>2</sub> )
3	C	147,94	-
4	C	136,50	-
5	CH	126,34	7,20 (H <sub>5</sub> )
6	CH	126,92	7,02 (H <sub>6</sub> )
7	CH <sub>3</sub>	20,85	2,32 (H <sub>7</sub> )
8	CH	27,21	2,99 (H <sub>8</sub> )
9	CH <sub>3</sub>	23,01	1,20 (H <sub>9</sub> , H <sub>10</sub> )
10	CH <sub>3</sub>	23,01	
1'	C	166,42	-
2'	C	127,30	-
3'	CH	140,36	6,25 (H <sub>3'</sub> )
4'	CH <sub>3</sub>	15,92	2,08 (H <sub>4'</sub> , H <sub>5'</sub> )
5'	CH <sub>3</sub>	20,72	

X<sub>C</sub> : multiplicité des carbones

Nous avons également procédé à des expériences de RMN 2D HMBC permettant d'établir des corrélations proton-carbone à longues distances ; les résultats obtenus sont présentés à la figure 82.

Les résultats de ces études en RMN 2D (tableau 31 et figure 82) permettent notamment d'attribuer les déplacements chimiques pouvant être intervertis (figure 81) et confirment la structure de l'angélate de thymyle pour le composé **A6**.

Figure 82 : analyse structurale de **A6** (angélate de thymyle) par RMN 2D HMBC



### ***c- Etude des composés A7, A8, G1 et G2***

Les composés notés **A7, A8, G1, G2** sont présents à de fortes teneurs dans les fractions FO5 à FO12 ; l'attribution de cette notation a été établie en tenant compte, par anticipation, des identifications réalisées par la suite.

Les bibliothèques commerciales (Ir et SM) ne proposent aucune structure acceptable. En effet, les propositions faites ne correspondent pas aux spectres de masse obtenus pour ces composés. Toutefois, la bibliothèque König-Joulain (19) propose les structures de composés dérivés de l'eugénol : le tiglate d'époxypseudoisoeugényle et le tiglate de pseudoisoeugényle. Bien que ne prenant pas en considération ces structures, en raison des mauvaises notes de concordance, nous retenons que ces propositions vont dans le sens de structures d'esters à cycle aromatique.

A ce stade de notre étude, nous faisons l'hypothèse que ces quatre composés sont des dérivés du thymol, du 8,9-déhydrothymol ou du 8,9-époxythymol dans la mesure où Bohlmann et coll. ont décrit ce type de composés dans les extraits de différentes espèces du genre *Doronicum*. Les structures des composés identifiés dans ces études sont présentées dans la figure 76 (I- Etude bibliographique).

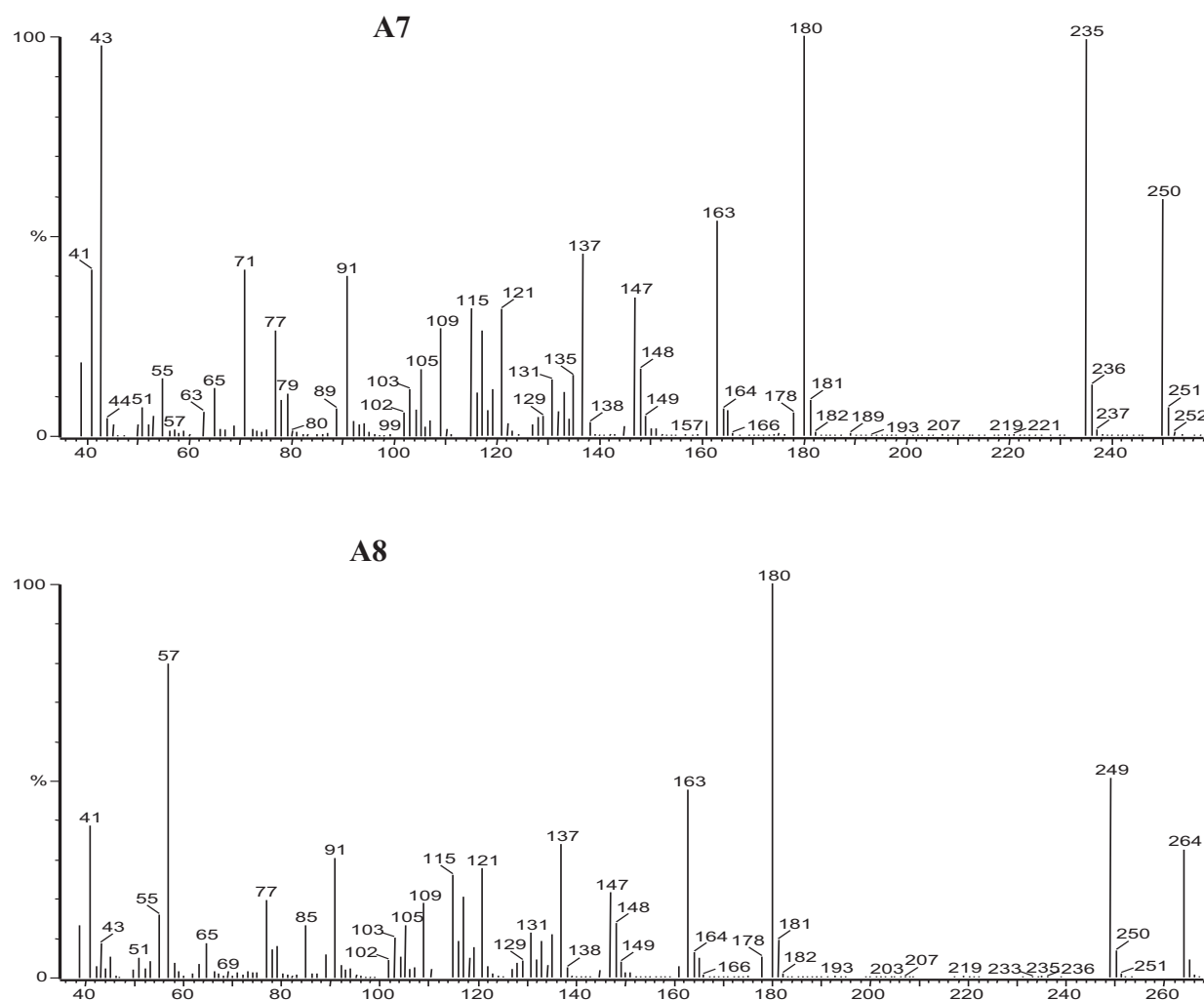
#### ***Etude des composés A7 et A8***

- **Par CPG/SM-IE (figure 83)**

Les spectres de masse obtenus pour les composés **A7** et **A8** sont caractérisés par des pics intenses à  $m/z$  180 (100%) et à  $m/z$  163, 147, 137, 121, 115, 109, 91, 77, 41... cependant ils diffèrent par les pics moléculaires à  $m/z$  250 (**A7**) et à  $m/z$  264 (**A8**) ainsi que par la présence d'ions à  $m/z$  235 (**A7**) et à  $m/z$  249 (**A8**) issus de la perte d'un groupement méthyle à partir des ions moléculaires, et aussi par la présence sur le

spectre de masse de **A7** de pics à  $m/z$  71 et à  $m/z$  43 et, sur spectre de **A8**, de pics à  $m/z$  85 et à  $m/z$  57. Nous relevons une différence de 14 unités entre les masses moléculaires de **A7** et de **A8** que nous retrouvons pour les couples d'ions 249-235, 85-71 et 57-43, ceci suppose des mécanismes de fragmentations similaires et des structures proches se différenciant, au moins, par un groupement méthylénique.

Figure 83 : spectres de masse en IE des composés **A7** et **A8**



- Par CPG/SM-IC (figures 84, 85, 86)

L'IC-NH<sub>3</sub> permet de confirmer les masses moléculaires des composés **A7** (250) et **A8** (264) nous observons :

- en ICP-NH<sub>3</sub> des ions [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> abondants à m/z 268 pour **A7** et à m/z 282 pour **A8**,
- en ICN-NH<sub>3</sub> des ions [M-H]<sup>-</sup>, pics de base des spectres à m/z 249 pour **A7** et à m/z 263 pour **A8**.

En ICN-NH<sub>3</sub>, nous observons, également, les ions carboxylates RCOO<sup>-</sup> à m/z 87 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>COO<sup>-</sup>) pour **A7** et à m/z 101 (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>COO<sup>-</sup>) pour **A8**.

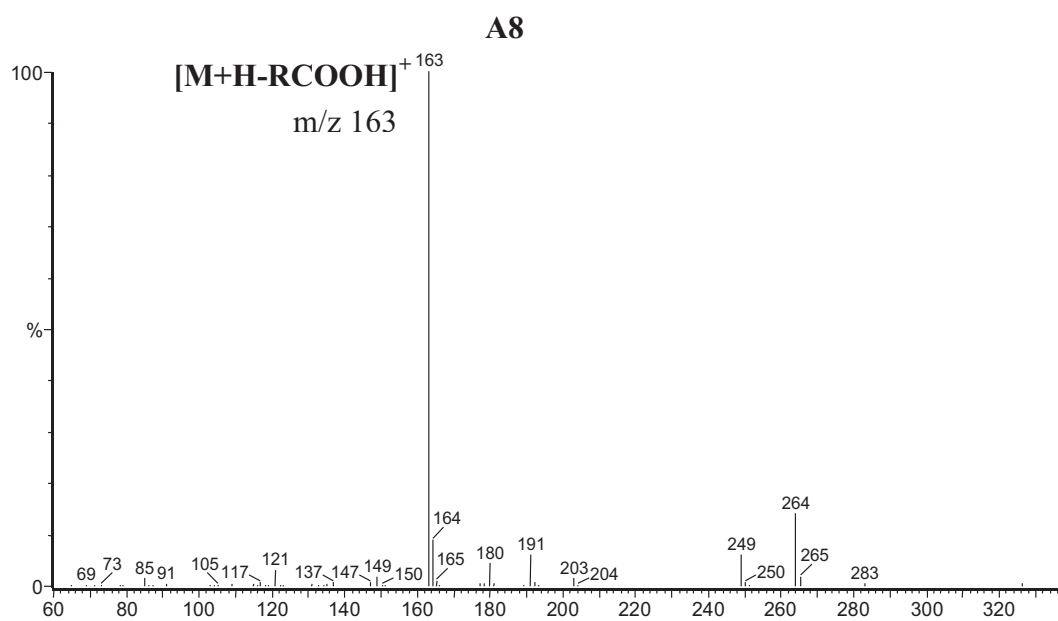
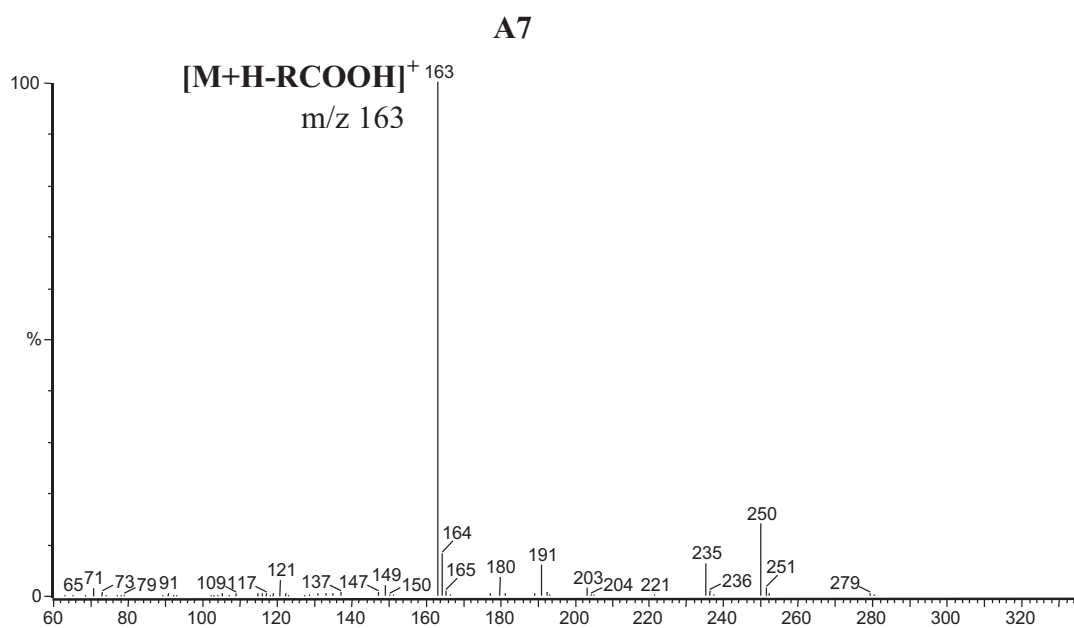
En ICP-CH<sub>4</sub> et en ICP-NH<sub>3</sub>, l'observation des ions C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>O<sup>+</sup> à m/z 163 suggère une structure de type méthoxycymène sur la base de la perte d'une molécule acide (RCOOH) à partir de la molécule protonée.

Enfin, les spectres de masse en ICP-NH<sub>3</sub> présentent un pic de base à m/z 180 correspondant probablement à un ion issu de la perte d'une molécule d'acide (RCOOH) à partir des ions d'adduits [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

Ces résultats suggèrent, pour ces deux composés **A7** et **A8** une structure d'esters dérivés du méthoxycymène de masse molaire de 250 (**A7**) avec un groupement carboxylate de masse 87 (butyrate ou isobutyrate) et de masse molaire de 264 (**A8**) avec un groupement carboxylate de masse 101 (2-méthylbutyrate, isovalérate ou valérate). La position des groupes fonctionnels sur le cycle benzénique a pu être précisée par une étude en RMN du carbone-13.

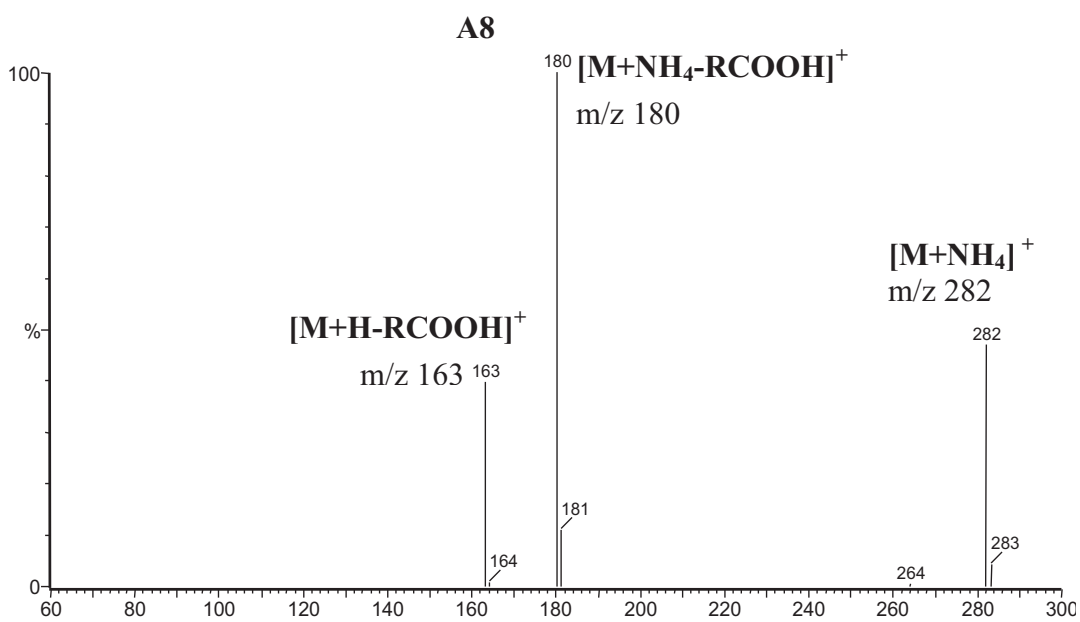
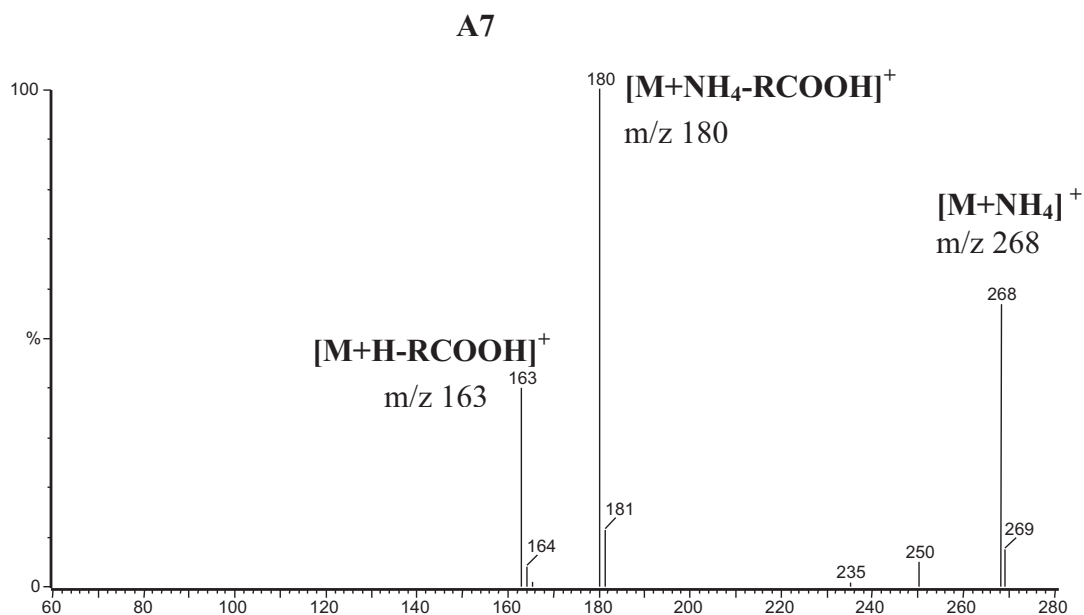


Figure 84 : spectres de masse en ICP-CH<sub>4</sub> des composés A7 et A8



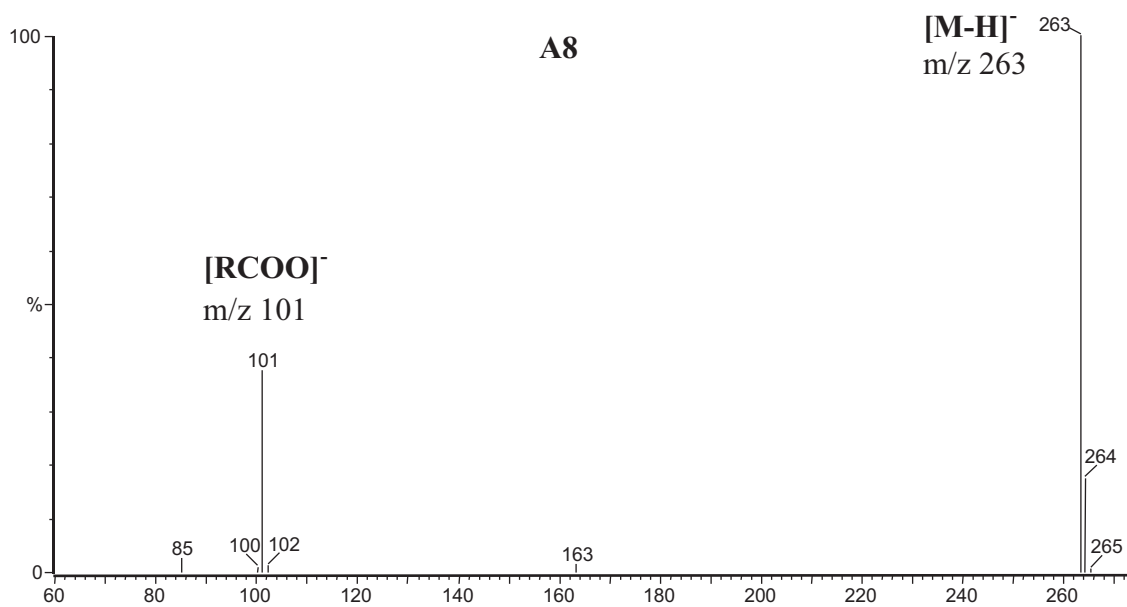
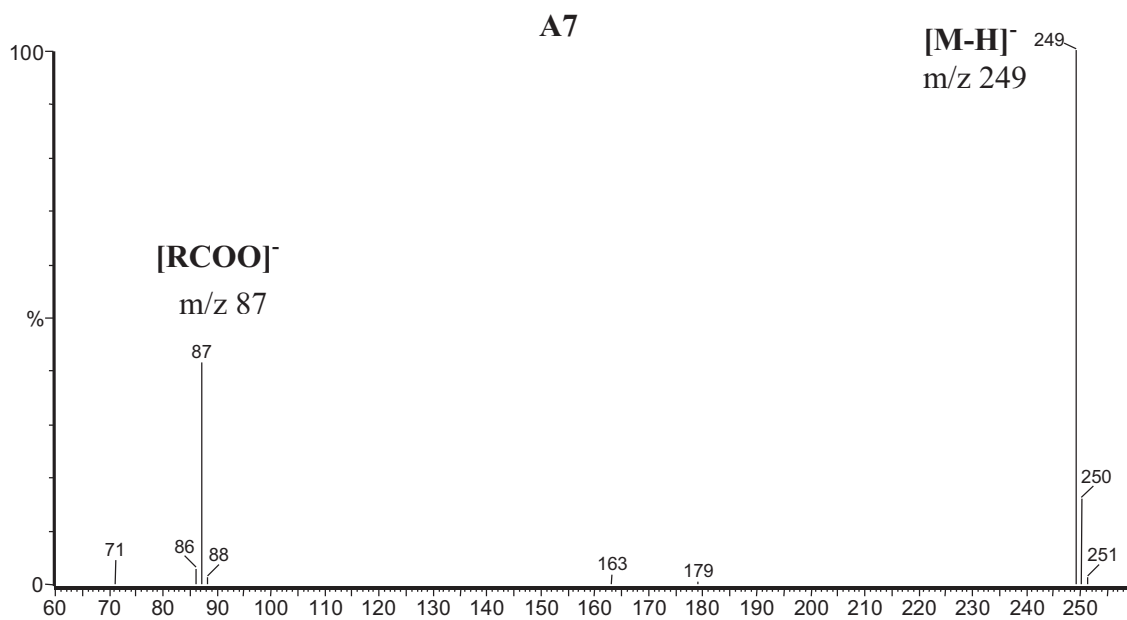
**R=C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour A7 et R=C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> pour A8**

Figure 85 : spectres de masse en ICP-NH<sub>3</sub> des composés A7 et A8



$R=C_3H_7$  pour A7 et  $R=C_4H_9$  pour A8

Figure 86 : spectres de masse en ICN-NH<sub>3</sub> des composés A7 et A8



**R=C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>** pour A7 et **R=C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>** pour A8

▪ Par RMN du carbone-13

Les structures des composés **A7** et **A8** ont été précisées par RMN du carbone-13 en comparant les déplacements chimiques mesurés dans les fractions avec ceux de molécules de référence, en l'occurrence l'oxyde de thymyle et de méthyle et l'isobutyrate de thymyle pour le composé **A7**, l'oxyde de thymyle et de méthyle et le 2-méthylbutyrate de thymyle pour le composé **A8**. Nous avons pu, ainsi, attribuer la structure du 7-isobutyrate de 3-méthoxycuminyle (296) au composé **A7** et celle du 2-méthylbutyrate de 3-méthoxycuminyle au composé **A8**. Les résultats sont récapitulés dans la figure 87 et le tableau 32. A notre connaissance, les valeurs des déplacements chimiques de ces deux composés ne sont pas décrites dans la littérature.

A partir du spectre de la fraction FO8 (contenant environ 60% du composé **A7**) nous repérons 15 signaux d'intensité voisine de 6, sauf pour les carbones quaternaires (environ 2). Les autres signaux appartiennent à des composés minoritaires ; ils ont des intensités relativement faibles (environ 0,3) et ne gênent donc, en rien, l'observation des carbones quaternaires du 7-isobutyrate de 3-méthoxycuminyle (**A7**).

Ces 15 signaux sont caractéristiques :

- du groupement isobutyrate, par un carbonyle à 177,02 ppm associé au méthyne à 34,08 ppm et par un pic à 19,05 ppm de forte intensité (environ 11) qui est le signal de résonance des deux méthyles équivalents.

- du groupement méthoxy, par un méthyle à 55,37 ppm.

- du cycle benzénique, par trois carbones quaternaires à 137,03 ppm, 134,71 ppm et 120,26 ppm et par trois méthynes éthyléniques à 156,87 ppm (portant le méthoxy), 126,14 ppm et 110,08 ppm.

- du groupement isopropyle, par un méthyne à 26,64 ppm et par un signal à 22,67 ppm d'intensité double correspondant aux deux méthyles équivalents.

Enfin, l'absence d'un méthyle aux environs de 21 ppm et la présence d'un méthylène à 66,20 ppm confirment la présence du groupement isobutyrate sur le C7.

Dans le spectre de la fraction FO7, après avoir repéré les signaux correspondants au 7-isobutyrate de 3-méthoxycymène, 16 valeurs de déplacements chimiques d'intensité importante sont restées non attribuées. Cette série de valeurs correspond au 2-méthylbutyrate de 3-méthoxycuminyne (**A8**) présent à une teneur d'environ 40% dans cette fraction.

Nous constatons que les valeurs des déplacements chimiques du composé **A8** sont très proches de celles du 7-isobutyrate de 3-méthoxycuminyne (**A7**). En effet, les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) entre ces deux molécules sont inférieures ou égales à 0,04 ppm excepté pour le méthylène portant la fonction ester (0,08 ppm) et pour les déplacements chimiques caractéristiques du groupement 2-méthylbutyrate, à savoir : le carbonyle à 176,64 ppm, le méthyne à 41,14 ppm, le méthylène à 26,64 ppm et les deux méthyles à 16,66 et 11,67 ppm.

Figure 87 : structure des composés **A7**, **A8** et des molécules de référence

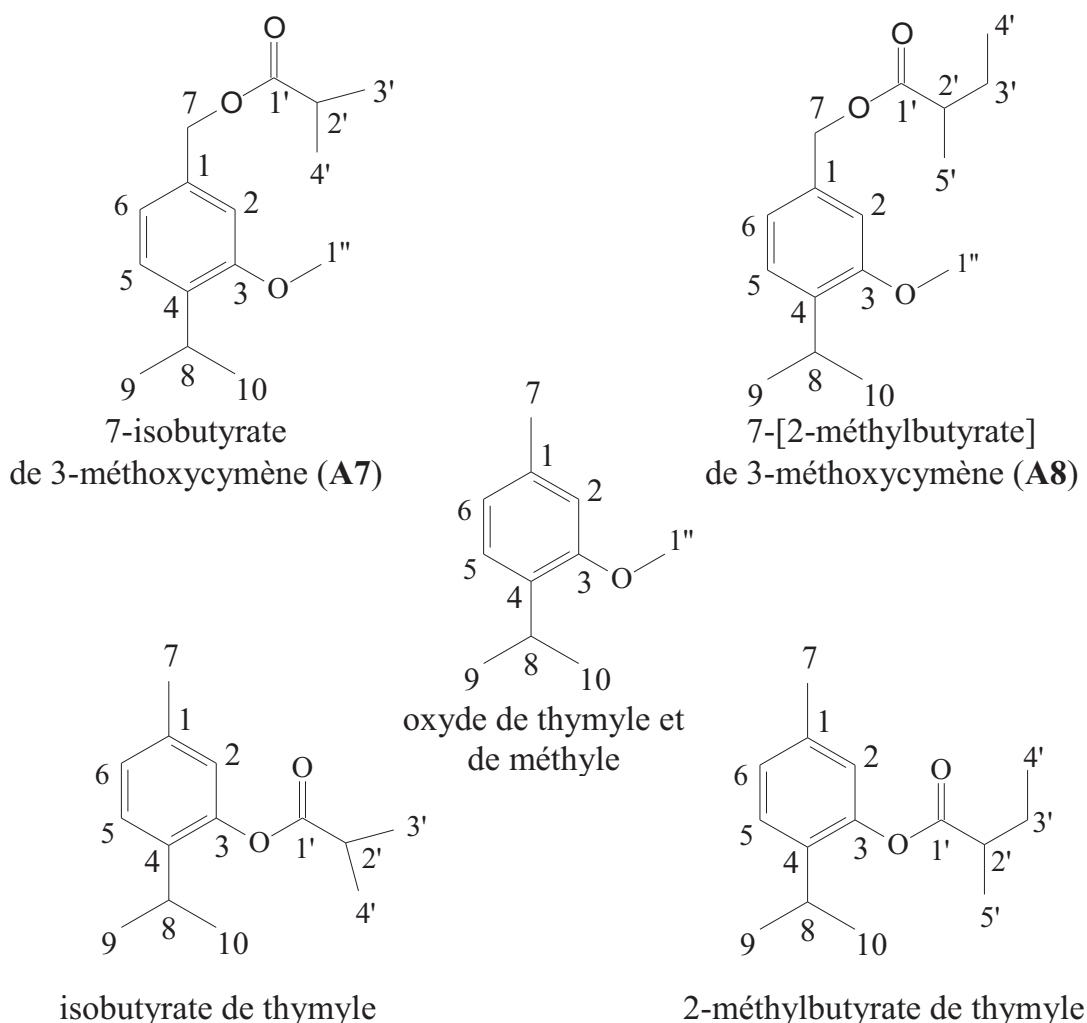


Tableau 32 : identification de **A7** et **A8** par comparaison des déplacements chimiques, mesurés dans les fractions FO6 à FO8, avec ceux des molécules de référence

C	oxyde de thymyle	isobutyrate de thymyle	2-méthylbutyrate de thymyle	<b>A7</b> $\delta$ (FO7,FO8)	<b>A8</b> $\delta$ (FO6,FO7)	
1	136,29	137,08	137,11	137,03	137,02	C
2	111,39			110,08	110,12	CH
3	156,68			156,87	156,87	CH
4	134,04			134,71	134,73	C
5	125,82			126,14	126,13	CH
6	121,11			120,26	120,30	C
7	-	-	-	66,20	66,12	CH <sub>2</sub>
8	26,45	27,05	27,00	26,64	26,64	CH
9	22,81	23,03	23,08	22,67	22,67	CH <sub>3</sub>
10	22,81	23,03	23,08	22,67	22,67	CH <sub>3</sub>
1'		175,77	175,35	177,02	176,64	C
2'		34,35	41,44	34,08	41,13	CH
3'		19,10	26,83	19,05	26,85	CH <sub>3</sub> ou CH <sub>2</sub>
4'		19,10	11,80	19,05	11,67	CH <sub>3</sub>
5'			16,80		16,66	CH <sub>3</sub>
1''	55,27			55,35	55,34	CH <sub>3</sub>

### *Etude des composés G1 et G2*

- Par CPG/SM-IE (figure 88)

Les spectres de masse en IE des composés **G1** et **G2** se ressemblent par la présence d'ions à m/z 162 et à m/z 145 mais diffèrent au niveau des pics de base à m/z 43 pour **G1** et à m/z 83 pour **G2** et d'ions intenses à m/z 71 pour **G1** et à m/z 55 pour **G2**. Les masses moléculaires ne peuvent être déterminées et nous avons étudié ces composés en ionisation chimique.

▪ Par CPG/SM-IC (figures 89, 90 et 91)

Par l'observation des ions quasi moléculaires  $[M+H]^+$  en ICP-NH<sub>3</sub> et en ICP-CH<sub>4</sub>, nous déterminons les masses moléculaires des composés **G1** (320) et **G2** (332).

En ICP, nous observons les ions RCO<sup>+</sup> caractéristiques de la partie ester :

- à m/z 71 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>CO<sup>+</sup>) pour le composé **G1**,
- à m/z 83 (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>CO<sup>+</sup>) et à m/z 71 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>CO<sup>+</sup>) pour le composé **G2**.

On note également la présence d'ions  $[M+NH_4-C_3H_7COOH]^+$  à m/z 250 pour **G1** et à m/z 262 pour **G2** provenant de la perte du groupement C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>COOH après réaction d'association.

Enfin, les spectres ICP de ces deux composés présentent des pics abondants à m/z 162 et à m/z 145, issus de la perte de deux molécules acides après réaction d'association  $[M+NH_4-R_1COOH-R_2COOH]^+$  et transfert de proton  $[M+H-R_1COOH-R_2COOH]^+$ .

En ICN-NH<sub>3</sub>, nous observons des ions carboxylates : - à m/z 87 [C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>COO]<sup>-</sup> pour **G1**, - à m/z 99 [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>COO]<sup>-</sup> et m/z 87 [C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>COO]<sup>-</sup> pour **G2**. Nous notons la présence d'ions  $[M-H-C_3H_7COO]^-$  à m/z 232 pour **G1** et à m/z 244 pour **G2** issus de la perte de groupement carboxylate après abstraction d'un hydrure.

Ces résultats suggèrent pour les composés **G1** et **G2** des structures de bi-esters du 8,9-époxythymyle ayant pour le composé **G1** : une masse molaire de 320 et deux groupements carboxylate de masse 87 (butyrate ou isobutyrate), et, pour le composé **G2** : une masse molaire de 332, un groupement carboxylate de masse 87 (butyrate ou isobutyrate) et un autre de masse 99 (angélate ou tiglate). La position des groupes fonctionnels sur le cycle benzénique a pu être précisée par une étude structurale en RMN du carbone-13 de ces composés.

Figure 88 : spectres de masse en IE de **G1** et **G2**

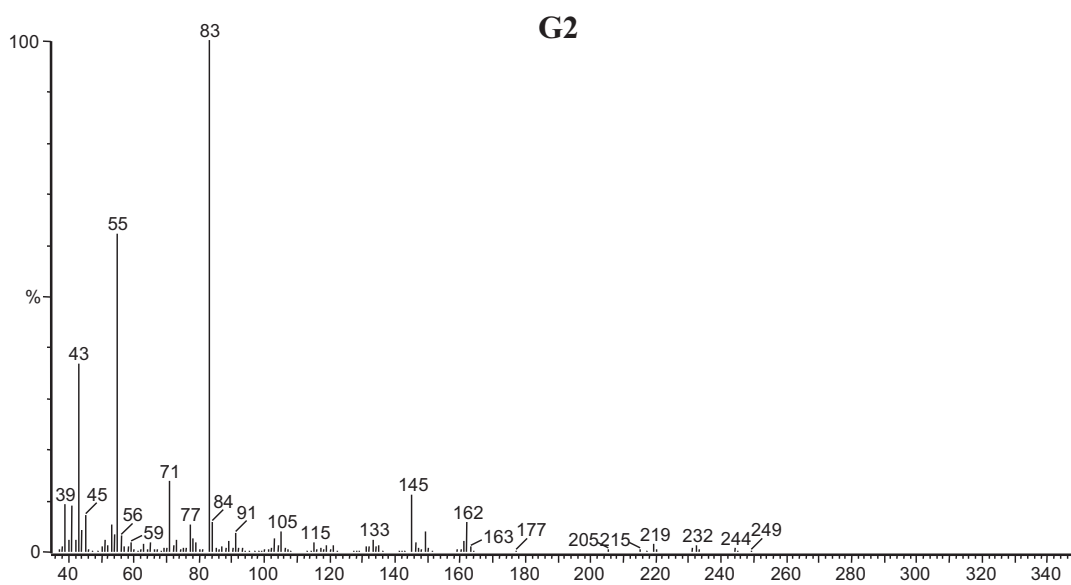
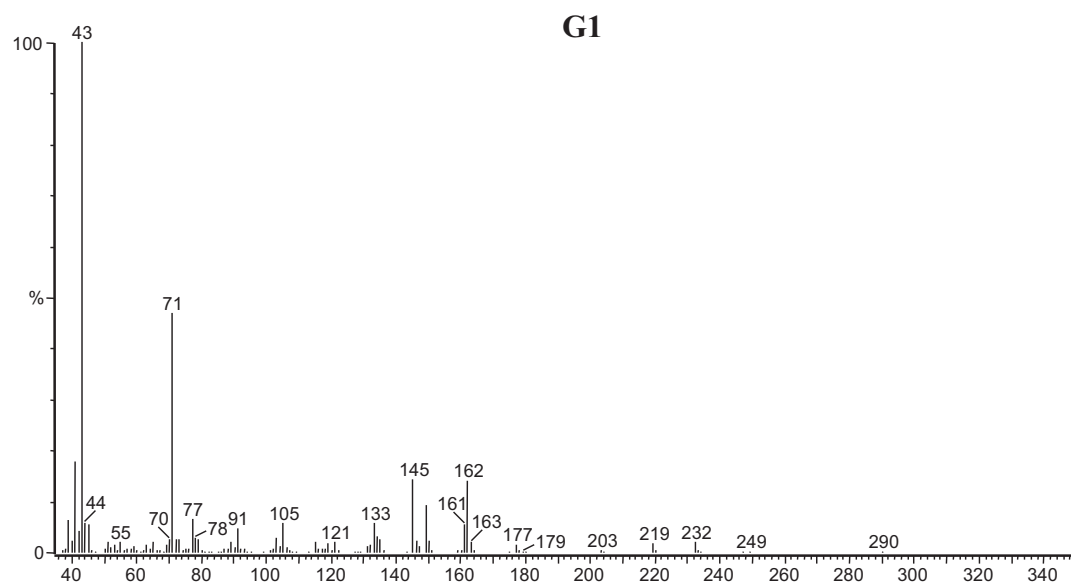
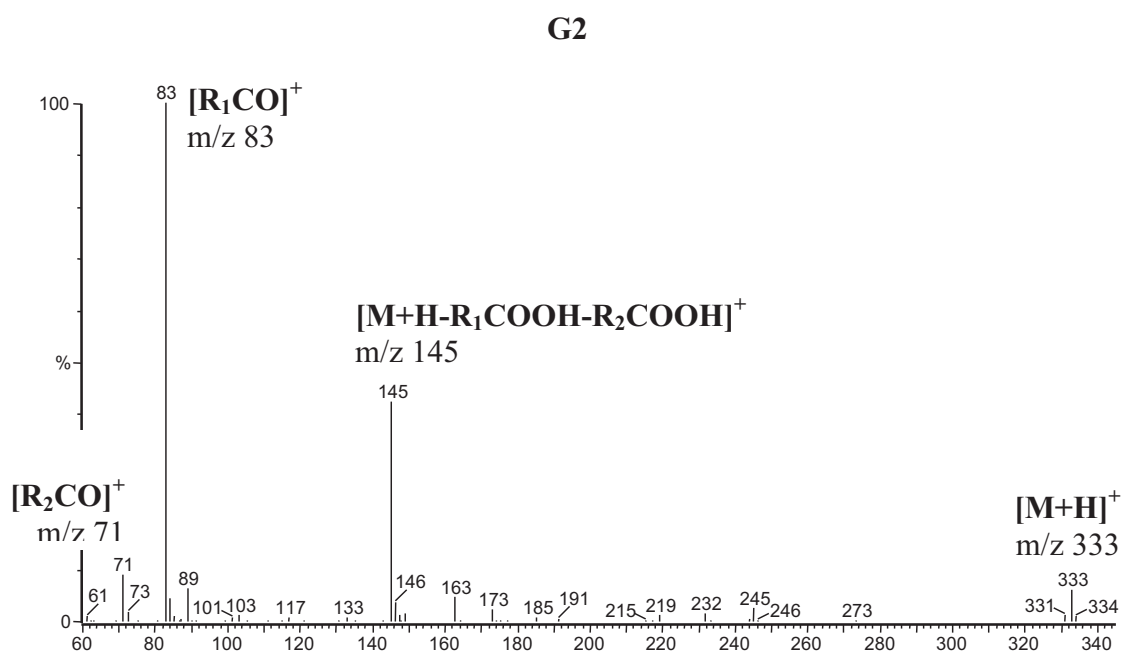
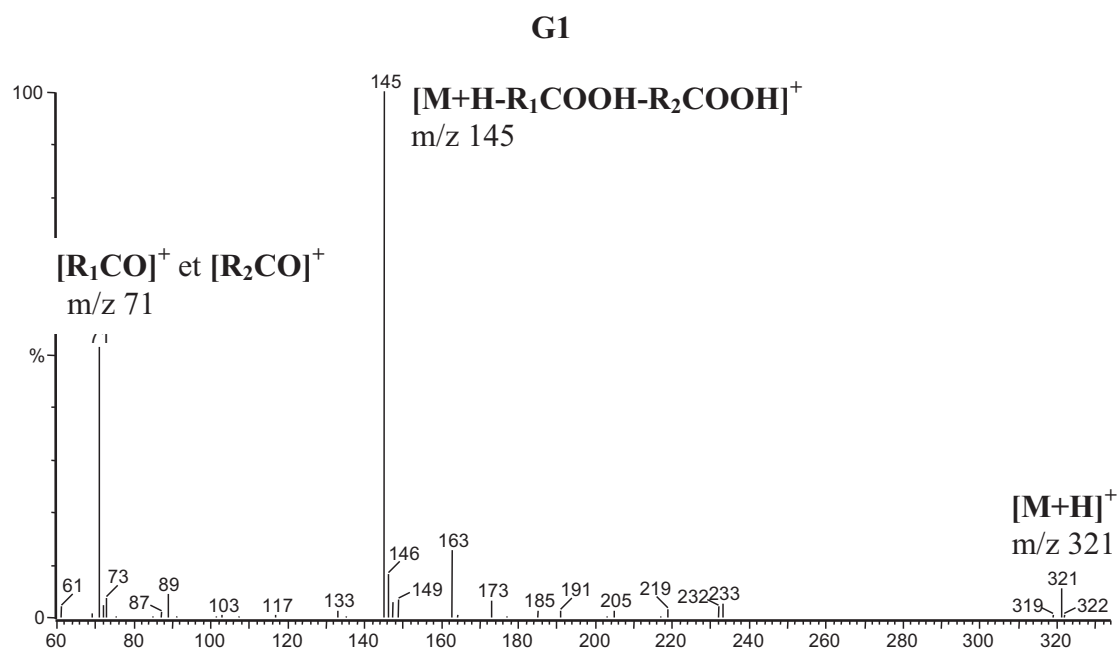




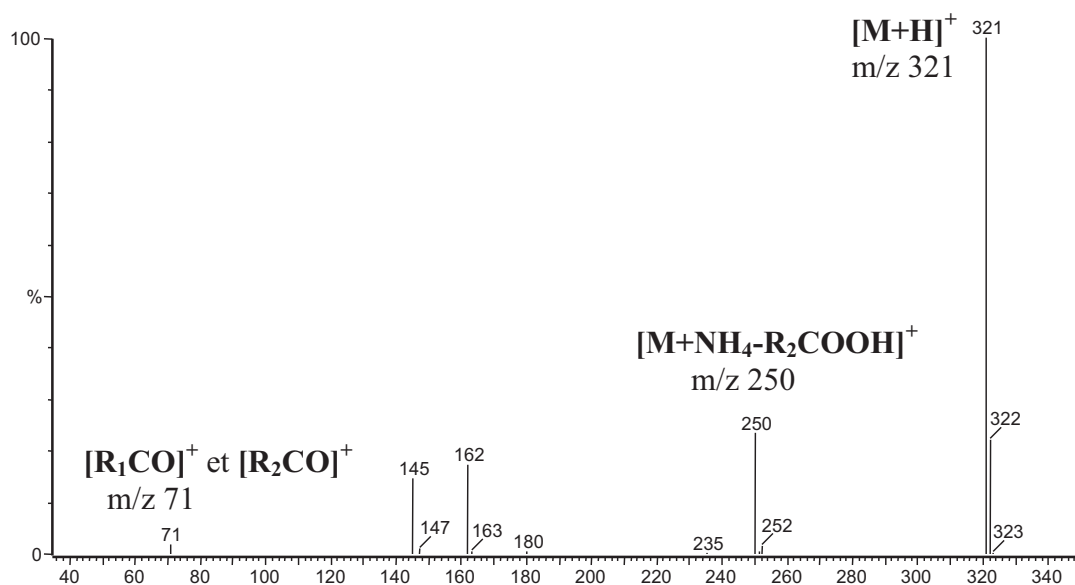
Figure 89 : spectres de masse en ICP-CH<sub>4</sub> des composés **G1** et **G2**



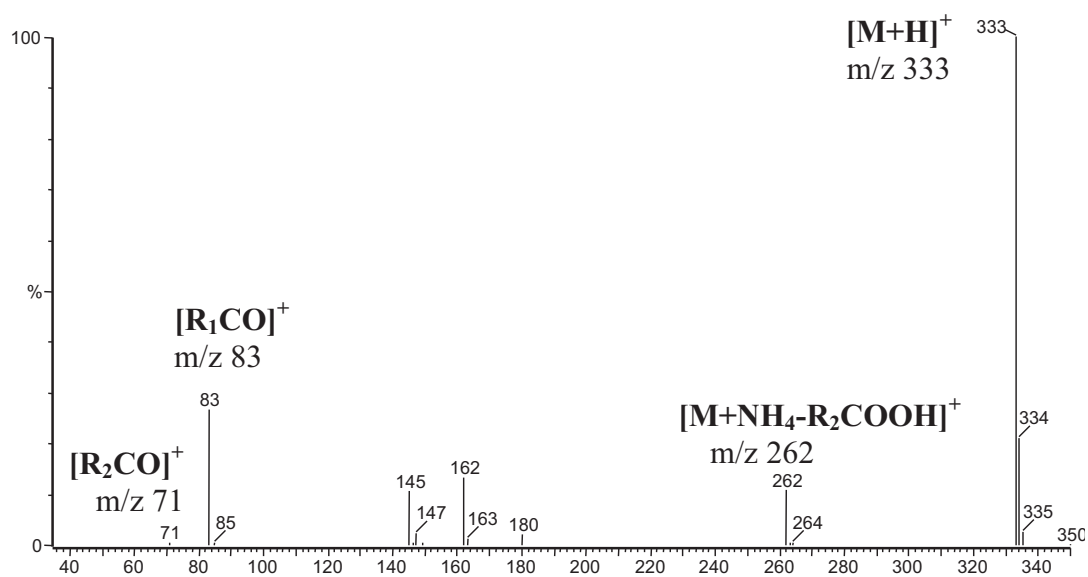
$R_1 = C_3H_7$  pour **G1** et  $C_4H_7$  pour **G2**  
 $R_2 = C_3H_7$  pour **G1** et **G2**

Figure 90 : spectres de masse en ICP-NH<sub>3</sub> des composés **G1** et **G2**

**G1**



**G2**

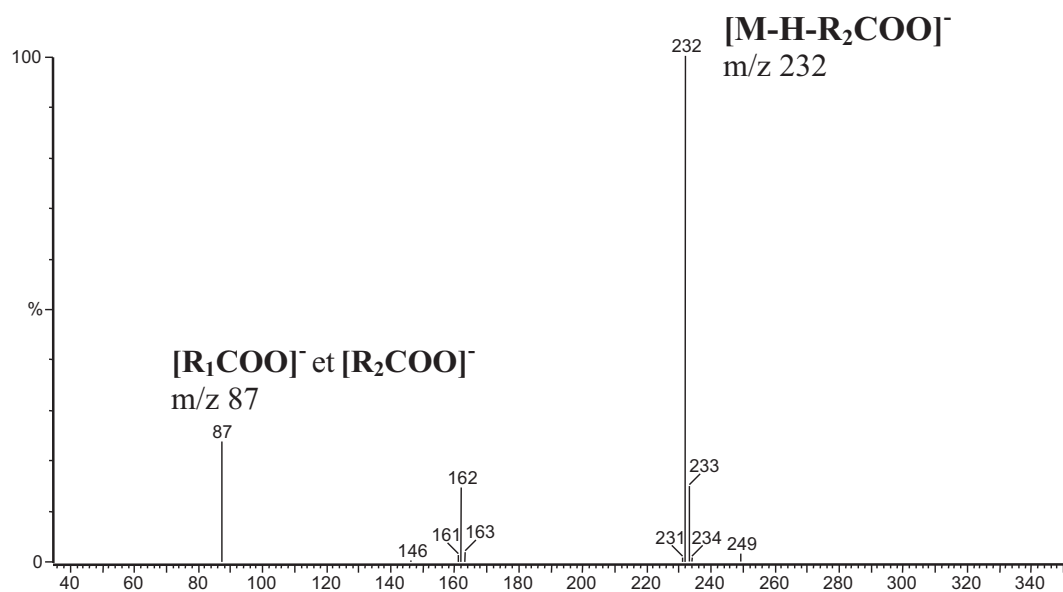


$R_1 = C_3H_7$  pour **G1** et  $C_4H_7$  pour **G2**

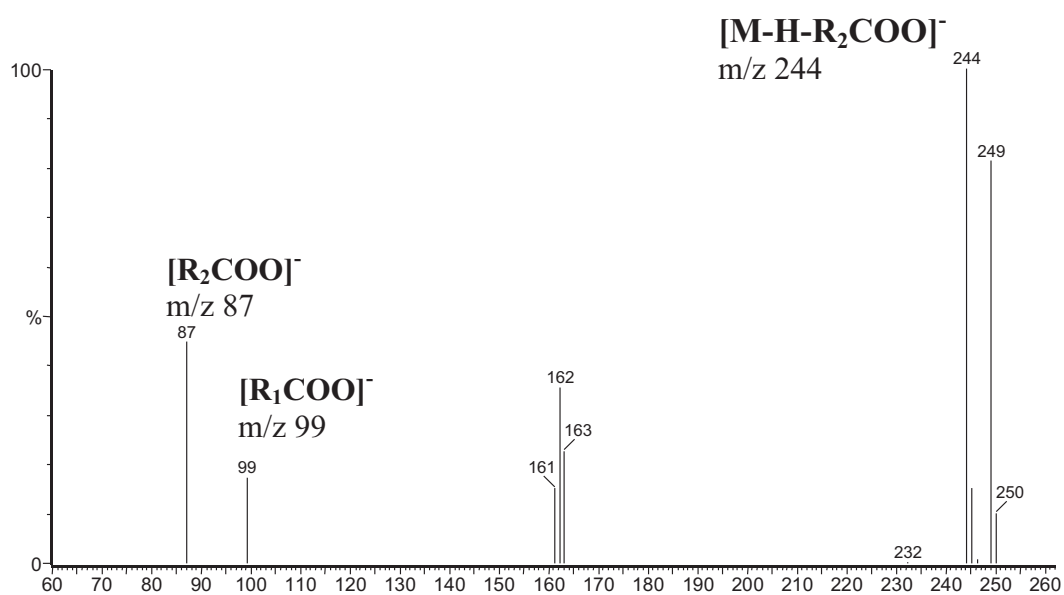
$R_2 = C_3H_7$  pour **G1** et **G2**

Figure 91 : spectres de masse en ICP-NH<sub>3</sub> des composés **G1** et **G2**

**G1**



**G2**



$R_1 = C_3H_7$  pour **G1** et  $C_4H_7$  pour **G2**

$R_2 = C_3H_7$  pour **G1** et **G2**

▪ Par RMN du carbone-13

Les structures des composés **G1** et **G2** ont été établies par RMN du carbone-13 à l'aide de données de la littérature, sur la base d'une reconstitution des spectres à partir de ceux de l'acétate de 10-isobutyroxy-8,9-époxythymyle qui a été décrit en 1986 par Willuhn et coll. (310) dans un extrait d'*Arnica sachalinensis*, de ceux de l'isobutyrate de thymyle et de l'angélate de thymyle (figure 92 et tableau 33). Nous identifions, donc, les composés **G1** et **G2** comme étant respectivement l'isobutyrate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle et l'angélate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle.

En ce qui concerne l'isobutyrate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle (**G1**), à notre connaissance, seules les données en RMN du proton sont décrites dans la littérature (297).

L'angélate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle (**G2**) n'étant pas décrit dans la littérature, nous avons effectué un fractionnement poussé des fractions FO11 et FO12 et nous avons abouti à un mélange où ce composé est présent à une teneur de 75%. La purification de ce composé s'avérant délicate, nous avons entrepris de mener l'analyse structurale sur cette fraction.

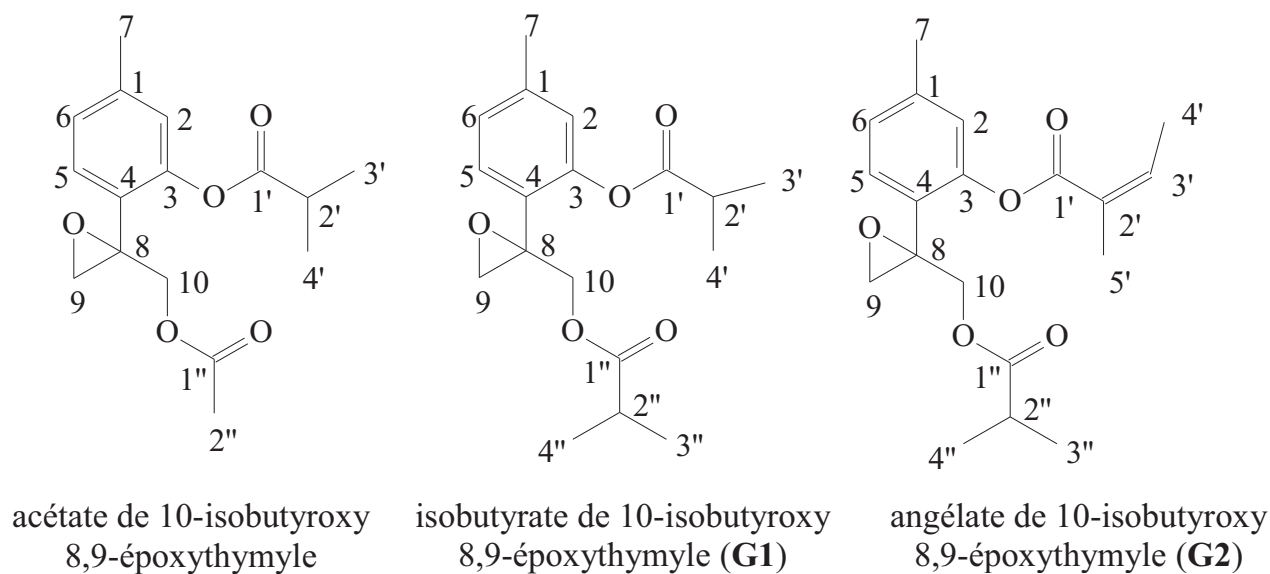
Le spectre de RMN du carbone-13 de cette fraction présente 19 raies de résonances intenses :

- 12 signaux d'intensité moyenne importante (voisine de 6,5) qui dominent les signaux appartenant aux composés minoritaires.
- 7 signaux que l'on peut considérer, en fonction de leur intensité (environ 2), comme les carbones quaternaires du composé **G2**.

Les séquences « spin echo » et DEPT nous renseignent sur le nombre d'atomes d'hydrogènes portés par chaque atome de carbone.

Ainsi, nous repérons parmi ces 19 signaux: 5 méthyles, 2 méthylènes, 5 méthynes (dont 4 éthyléniques) et 7 carbones quaternaires. Parmi ceux-ci, nous pouvons notamment signaler les deux carbonyles à 176,39 et 165,71 ppm, le carbone quaternaire à 148,46 ppm portant le groupement angélate et le méthylène à 65,24 ppm portant le groupement isobutyrate.

Figure 92 : structure des composés **G1** et **G2** et de l'acétate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle



Les analyses par RMN 2D XHCORR (tableau 34) nous permettent de confirmer :

- le groupement angélate, par une corrélation entre les protons à 2,08 ppm (6H) et le méthyle à 15,97 ppm et une autre entre le proton à 6,35 ppm (1H) et le méthyne éthylénique à 141,53 ppm.

- le groupement isobutyrate, par des corrélations entre les protons au environ de 1,09 ppm (6H) et le signal d'intensité double à 18,86 ppm (deux méthyles) et entre le proton à 2,50 ppm (1H) couplé au méthyne à 33,86 ppm.

- la partie aryle, par les corrélations entre les protons caractéristiques du cycle benzénique à 6,95 ppm (1H), 7,06 ppm (1H) et 7,37 ppm (1H) et les méthynes éthyléniques à 123,16, 126,67 et 129,01 ppm. Enfin, nous observons une dernière corrélation entre le proton à 2,36 ppm (1H) et le méthyle à 21,16 ppm.

Le signal caractéristique d'un carbonyle, à 176,39 ppm, est associé au méthylène à 65,24 ppm (corrélé aux protons centrés à 4,41 ppm). Enfin, l'époxyde se caractérise par le carbone quaternaire à 56,97 ppm et le carbone méthylénique à 50,80 ppm (corrélé aux protons centrés à 2,92 ppm).

Tableau 33: identification de **G1** et **G2** par comparaison des déplacements chimiques, mesurés dans les fractions FO11 et FO12, avec ceux de l'acétate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle (310) et des molécules de références

C	acétate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle $\delta$ (310)	$\delta$ isobutyrate de thymyle	$\delta$ angélate de thymyle	$\delta$ <b>G1</b> (FO12)	$\delta$ <b>G2</b> (FO11-FO12)	
1	139,72			139,92	139,93	C
2	122,84			122,98	123,16	CH
3	148,50			148,61	148,46	C
4	125,84			126,74	126,12 *	C
5	128,75			128,95	129,01	CH
6	126,58			126,08	126,67	CH
7	20,91			21,14	21,16 **	CH <sub>3</sub>
8	56,50			56,94	56,97	C
9	50,74			50,72	50,80	CH <sub>2</sub>
10	65,20			64,88	65,24	CH <sub>2</sub>
1'	175,15		166,42	175,34	165,71	C
2'	34,02		127,30	34,22 *	126,79 *	CH ou C
3'	18,80		140,36	18,92 **	141,53	CH <sub>3</sub> ou CH
4'	18,80		15,92	18,92 **	15,97	CH <sub>3</sub>
5'			20,72		20,66 **	CH <sub>3</sub>
1''		175,77		175,34	176,39	C
2''		34,35		33,86 *	33,86	CH
3''		19,10		18,86 **	18,86	CH <sub>3</sub>
4''		19,10		18,86 **	18,86	CH <sub>3</sub>

**G1** ; \* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C2' et C2''

\*\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C3'-C4' et C3''-C4''

**G2** ; \* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C4 et C2'

\*\* : déplacements chimiques pouvant être intervertis entre C7 et C5'

Nous avons également procédé à des expériences de RMN 2D HMBC permettant d'établir des corrélations proton-carbone à longues distances ; les résultats obtenus sont présentés à la figure 93.

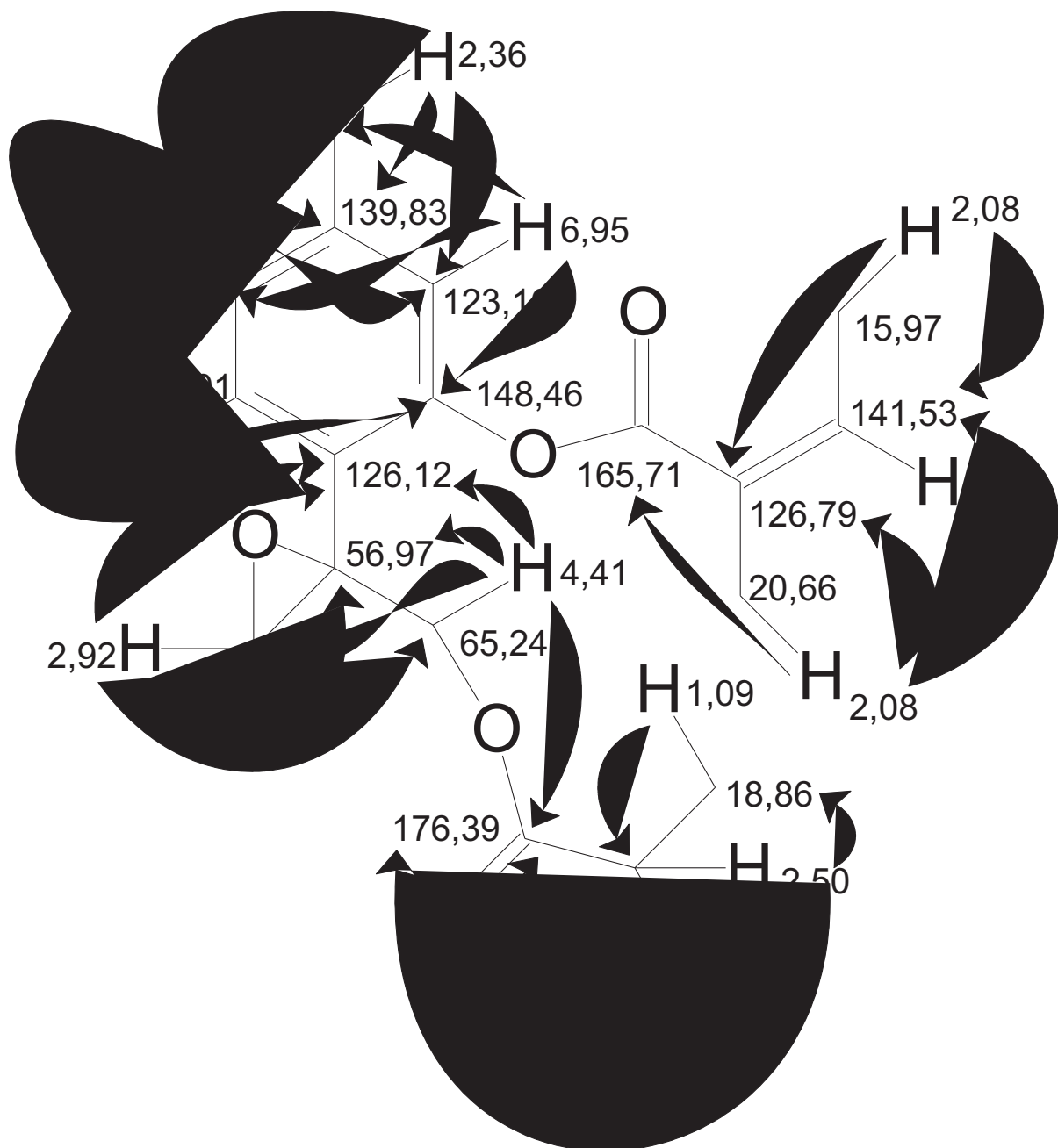
Les résultats de ces études en RMN 2D (tableau 34 et figure 93) permettent notamment d'attribuer les déplacements chimiques pouvant être intervertis (figure 92) et confirment la structure de l'angélate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle (**G2**) pour le composé **G2**.

Tableau 34 : corrélations proton-carbones obtenues avec le spectre RMN 2D XHCORR

C	X <sub>C</sub>	δ (ppm) du <sup>13</sup> C	δ (ppm) du <sup>1</sup> H
1	C	139,93	-
2	CH	123,16	6,95 (H <sub>2</sub> )
3	C	148,46	-
4	C	126,12	-
5	CH	129,01	7,37 (H <sub>5</sub> )
6	CH	126,67	7,06 (H <sub>6</sub> )
7	CH <sub>3</sub>	21,16	2,36 (H <sub>7</sub> )
8	C	56,97	-
9	CH <sub>2</sub>	50,80	3,03-2,81 (H <sub>9</sub> )
10	CH <sub>2</sub>	65,24	4,68-4,15 (H <sub>10</sub> )
1'	C	165,71	-
2'	C	126,79	-
3'	CH	141,53	6,30 (H <sub>3'</sub> )
4'	CH <sub>3</sub>	15,97	2,08 (H <sub>4'</sub> , H <sub>5'</sub> )
5'	CH <sub>3</sub>	20,66	-
1''	C	176,39	-
2''	CH	33,86	2,50 (H <sub>2''</sub> )
3''	CH <sub>3</sub>	18,86	1,09 (H <sub>3''</sub> , H <sub>4''</sub> )
4''	CH <sub>3</sub>	18,86	-

X<sub>C</sub> : multiplicité des carbones

Figure 93 : analyse structurale de l'angélate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle (G2)  
 par RMN 2D HMBC





### III- BILAN DE L'ETUDE SUR *DORONICUM CORSICUM*

Après fractionnement sur colonne ouverte de silice et analyse de chacune des fractions par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et parfois RMN du carbone-13, l'étude de l'huile essentielle de *Doronicum corsicum* a conduit à identifier 133 composés représentant 84,5% de la composition chimique totale (tableau 35) dont quatre composés majoritaires : le modhephène (11,6%), l'angélate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle (**G2**) (9,9%), le (E)- $\beta$ -caryophyllène (9,8%) et l'angélate de thymyle (**A6**) (8,7%).

On dénombre 57 hydrocarbures (environ 39% de la composition chimique), essentiellement sesquiterpéniques (38,1% de la composition chimique totale) et 76 composés oxygénés (environ 46%), principalement monoterpéniques (40,9%). Nous relevons, également, la forte teneur en sesquiterpènes hydrocarbonés tricycliques (23% de l'huile essentielle).

Une grande majorité de constituants, 108, ont été identifiés sur la base des bibliothèques d'indices de rétention et de spectres de masse propres au laboratoire.

Les bibliothèques commerciales ont proposé les structures de 19 autres constituants. Quatre d'entre elles ont été confirmées par RMN du carbone-13 ; il s'agit de l' $\alpha$ -isocomène **H6**, du  $\beta$ -isocomène **H7**, du sesquisabinène A **H8** et du (E)- $\gamma$ -bisabolène **H9**).

Enfin, les structures de 6 constituants ont été identifiées par la mise en œuvre du couplage CPG/SM en mode ionisation chimique et de la RMN du carbone-13. Il s'agit du 2,5-diméthoxycymène (**O3**), de l'angélate de thymyle (**A6**), du 7-isobutyrate de 3-méthoxycuminyle (**A7**), du 2-méthylbutyrate de 3-méthoxycuminyle (**A8**), de l'isobutyrate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle (**G1**) et de l'angélate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle (**G2**). Deux de ces composés (**A6** et **G2**) majoritaires dans l'huile essentielle, n'étaient pas décrits dans la littérature ; nous avons donc réalisé leur analyse structurale.

L'ensemble des résultats obtenus par CPG-SM-(IE et IC) pour les composés **A7**, **A8**, **G1** et **G2** est reporté dans les tableaux 36 à 39.

L'utilisation de l'impact électronique (tableau 36) sur ces composés a montré ses limites ; en effet les spectres de certains composés ne présentaient pas d'ions moléculaires.

L'ionisation chimique a permis de surmonter certaines difficultés (tableaux 37 à 39) :

- la masse moléculaire a été déterminée par l'observation des ions quasi-moléculaires  $[M-H]^-$  et/ou  $[M+H]^+$  et/ou des adduits  $[M+NH_4]^+$  ;
- la masse de la partie ester a été également déterminée par l'observation des ions  $RCO^+$  en ICP et  $RCOO^-$  en ICN ;
- les structures des molécules ont été suggérées par l'observation des ions issus, par exemple, des réactions de perte de molécules d'acides après transfert de proton, réactions d'association ou abstraction d'un hydrure ou bien de la perte d'un groupement  $C_3H_6$  après transfert de proton.

Tableau 35 : composition chimique des huiles essentielles de parties aériennes  
de *Doronicum corsicum*

Composés	Ir a	Ir p	HT	Identification
$\alpha$ -pinène	930	1024	0,1	Ir, IE
$\beta$ -myrcène	981	1166	tr	Ir, IE
acétate de <i>cis</i> -hex-3-èneyle	987	1321	0,1	Ir, IE
$\alpha$ -phellandrène	996	1140	0,1	Ir, IE
$\alpha$ -terpinène	1010	1185	tr	Ir, IE
para-cymène	1012	1271	0,2	Ir, IE
$\beta$ -phellandrène	1020	1215	tr	Ir, IE
limonène	1022	1205	tr	Ir, IE
(E)- $\beta$ -ocimène	1037	1254	tr	Ir, IE
nonéal	1081	1395	0,1	Ir, IE
(E)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène	1105	1309	tr	Ir, IE
oxyde de nérol	1137	1469	tr	Ir, IE
(E)-2-nonanal	1137	1525	tr	Ir, IE
$\alpha$ -terpinéol	1172	1692	tr	Ir, IE
décanal	1182	1498	tr	Ir, IE
8,9-déhydrothymol	1193	1961	tr	Ir, IE
$\beta$ -cyclocitral	1197	1611	tr	Ir, IE
oxyde de thymyle et de méthyle	1215	1586	4,6	Ir, IE
oxyde de carvacryle et de méthyle	1224	1594	0,3	Ir, IE
(E)-2-décénal	1238	1640	tr	Ir, IE
acétate de linalyle	1237	1555	tr	Ir, IE
thymol	1267	2157	tr	Ir, IE
acétate de bornyle	1269	1579	0,1	Ir, IE
décan-2-one	1274	1599	tr	Ir, IE
undécanal	1286	1593	tr	Ir, IE
(E,E)-2,4-décadiénal	1288	1798	tr	Ir, IE
7- $\alpha$ -[H]-silphiperfol-5-ène	1326	1429	0,5	Ir, IE
acétate de $\alpha$ -terpinyle	1330	1688	tr	Ir, IE
bicycloelemène	1334	1471	tr	Ir, IE
(E)-2-undécénal	1341	1739	tr	Ir, IE
acétate de néryle	1342	1724	0,1	Ir, IE
7- $\beta$ -[H]-silphiperfol-5-ène	1348	1454	3,4	Ir, IE
silphin-1-ène	1348	1474	0,8	Ir, IE
$\alpha$ -cubébène	1350	1460	tr	Ir, IE
silphiperfola-5,7(14)-diène	1353	1523	tr	Ir, IE
(E)- $\beta$ -damascénone	1362	1810	0,2	Ir, IE

<b>Composés</b>	<b>Ir a</b>	<b>Ir p</b>	<b>HT</b>	<b>Identification</b>
$\alpha$ -copaène	1377	1496	0,3	Ir, IE
<i>péthybrène</i>	1377	1512	0,3	Ir, IE
modhephène	1382	1522	11,6	Ir, IE
$\alpha$ -isocomène ( <b>H6</b> )	1388	1533	1,2	Ir, IE, <sup>13</sup> C
dodécanal	1388	1715	tr	Ir, IE
2,5-diméthoxycymène ( <b>O3</b> )	1399	1852	2,7	Ir, IE, <sup>13</sup> C
$\beta$ -isocomène ( <b>H7</b> )	1406	1571	1,2	Ir, IE, <sup>13</sup> C
cis- $\alpha$ -bergamotène	1411	1557	0,1	Ir, IE
(E)- $\beta$ -caryophyllène	1419	1593	9,8	Ir, IE
$\beta$ -copaène	1426	1585	tr	Ir, IE
géranyle acétone	1426	1846	tr	Ir, IE
propionate de néryle	1428	1784	tr	Ir, IE
trans- $\alpha$ -bergamotène	1430	1580	0,2	Ir, IE
sesquisabinène A ( <b>H8</b> )	1435	1629	0,1	Ir, IE, <sup>13</sup> C
aromadendrène	1436	1589	0,1	Ir, IE
<i>sesquisabinène B</i>	1447	1656	0,2	Ir, IE
allo-aromadendrène	1451	1631	tr	Ir, IE
$\alpha$ -humulène	1451	1661	2,4	Ir, IE
(E)- $\beta$ -farnésène	1452	1665	0,1	Ir, IE
isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle	1454	1922	0,4	Ir, IE
isobutyrate de thymyle	1458	1889	1,7	Ir, IE
$\beta$ -ionone	1462	1923	tr	Ir, IE
isovalérate de 2-phényléthyle	1463	1954	tr	Ir, IE
$\alpha$ -curcumène	1467	1763	tr	Ir, IE
$\gamma$ -gurjunène	1469	1647	tr	Ir, IE
isobutyrate de néryle	1469	1780	0,8	Ir, IE
$\gamma$ -muurolène	1471	1681	tr	Ir, IE
$\gamma$ -curcumène	1474	1689	tr	Ir, IE
trans- $\beta$ -bergamotène	1479	1678	tr	Ir, IE
germacrène D	1479	1700	2,1	Ir, IE
tridécan-2-one	1481	1808	tr	Ir, IE
(Z,E)- $\alpha$ -farnésène	1482	1725	0,1	Ir, IE
$\beta$ -sélinène	1483	1708	tr	Ir, IE
cubébol	1485	1880	tr	Ir, IE
tridécanal	1490	1803	tr	Ir, IE
lédène	1492	1686	tr	Ir, IE
$\alpha$ -muurolène	1494	1716	tr	Ir, IE
bicyclogermacrène	1494	1724	1,1	Ir, IE
(E,E)- $\alpha$ -farnésène	1496	1746	0,6	Ir, IE

<b>Composés</b>	<b>Ir a</b>	<b>Ir p</b>	<b>HT</b>	<b>Identification</b>
β-bisabolène	1500	1718	0,2	Ir, IE
4-épi-cubébol	1504	1928	tr	Ir, IE
β-curcumène	1507	1734	tr	Ir, IE
γ-cadinène	1507	1748	0,5	Ir, IE
(Z)-γ-bisabolène	1509	1751	tr	Ir, IE
calaménène	1511	1808	tr	Ir, IE
δ-cadinène	1516	1748	0,6	Ir, IE
(E)-γ-bisabolène	1523	1727	0,1	Ir, IE
cadina-1,4-diène	1525	1769	tr	Ir, IE
α-cadinène	1531	1779	tr	Ir, IE
(E)-α-bisabolène ( <b>H9</b> )	1534	1769	0,5	Ir, IE, <sup>13</sup> C
α-calacorène	1539	1894	0,1	Ir, IE
oxyde de β-caryophyllène	1543	1911	tr	Ir, IE
2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle	1548	1996	0,9	Ir, IE
isovalérate de 8,9-déhydrothymyle	1548	2006	0,4	Ir, IE
2-méthylbutyrate de thymyle	1551	1964	2,5	Ir, IE
isovalérate de thymyle	1551	1975	0,4	Ir, IE
acide dodécanoïque	1556	2474	tr	Ir, IE
2-méthylbutyrate de néryle	1554	1857	1,0	Ir, IE
1,5-époxy-salvia-4(14)-ène	1554	1884	tr	Ir, IE
isovalérate de néryle	1560	1877	0,6	Ir, IE
palustrol	1562	1914	tr	Ir, IE
spathuléol	1563	2103	0,2	Ir, IE
gleénol	1572	2008	0,2	Ir, IE
β-germacréol	1573	2019	0,2	Ir, IE
oxyde de caryophyllène	1575	1940	0,3	Ir, IE
globulol	1576	2051	0,2	Ir, IE
angélate de 8,9-déhydrothymyle	1580	2117	1,9	Ir, IE
trans-arténnuic alcool	1582	1999	tr	Ir, IE
angélate de thymyle ( <b>A6</b> )	1582	2074	8,7	Ir, IE, <sup>13</sup> C
lédol	1588	1997	tr	Ir, IE
tetradécanal	1592	1919	tr	Ir, IE
époxyde d'humulène II	1594	2011	0,1	Ir, IE
β-oplopénone	1594	2051	tr	Ir, IE
eudesm-4(15)-èn-6-ol	1610	2025	tr	Ir, IE
caryphylla-4(14),8(15)-dièn-5-β-ol	1624	2267	0,2	Ir, IE
caryphylla-4(14),8(15)-dièn-5-α-ol	1627	2272	0,4	Ir, IE
τ-cadinol	1625	2152	0,2	Ir, IE
τ-muurolol	1625	2170	0,2	Ir, IE

<b>Composés</b>	<b>Ir <i>a</i></b>	<b>Ir <i>p</i></b>	<b>HT</b>	<b>Identification</b>
cubénol	1631	2023	0,1	Ir, IE
$\alpha$ -cadinol	1643	2218	0,8	Ir, IE
$\beta$ -bisabolol	1653	2123	0,9	Ir, IE
<i>isobutyrate de 6-méthoxythymyle</i>	1658	1998	0,2	Ir, IE
eudesm-4(15),7-dièn-1 $\beta$ -ol	1670	2203	0,2	Ir, IE
isobutyrate de 3-méthoxycuminyle ( <b>A7</b> )	1689	2257	1,5	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C
pentadécane	1693	2016	tr	Ir, IE
acide tétradécanoïque	1748	2681	0,7	Ir, IE
2-méthylbutyrate de 3-méthoxycuminyle ( <b>A8</b> )	1774	2332	1,1	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C
acétate de (Z,E)-farnésyle	1792	2225	tr	Ir, IE
hexadécane	1795	2119	tr	Ir, IE
acide hexadécanoïque	1942	2884	tr	Ir, IE
oxyde de manoyl	1992	2335	tr	Ir, IE
$\alpha$ -kaurène	2046	2363	tr	Ir, IE
isobutyrate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle ( <b>G1</b> )	1999	2647	1,1	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C
angélate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle ( <b>G2</b> )	2130	2808	9,9	Ir, IE, IC, <sup>13</sup> C
tricosane	2300	2300	tr	Ir, IE
tétracosane	2400	2400	tr	Ir, IE
pentacosane	2500	2500	tr	Ir, IE
<b>Total</b>			<b>84,5</b>	

Monoterpènes hydrocarbonés

0,5

Monoterpènes oxygénés

40,9

Sesquiterpènes hydrocarbonés

38,1

Sesquiterpènes oxygénés

4,1

Autres

0,9

Les composés en *italique* ont été identifiés par les bibliothèques commerciales

**Ir** : Indice de rétention sur colonne apolaire (**a**) et polaire (**p**)

Les pourcentages sont donnés sur colonne polaire sauf lors de coélution (colonne apolaire)

tr : teneur inférieure à 0,05%

IE : spectre de masse en impact électronique

IC : spectre de masse en ionisation chimique

<sup>13</sup>C : déplacements chimiques en RMN du carbone-13

Tableau 36 : principaux ions obtenus en CPG/SM-IE pour les composés **A7**, **A8**, **G1** et **G2**

N° (M)	Composés	M <sup>+</sup> . (intensité)	ions abondants (m/z)
<b>A7</b> (250)	isobutyrate de 3-méthoxycuminyne	250 (41%)	235, 180, 163, 43 (100%)
<b>A8</b> (264)	2-méthylbutyrate de 3-méthoxycuminyne	264 (33%)	249, 180 (100%), 163, 57
<b>G1</b> (320)	isobutyrate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle	320 (-)	162, 145, 71 (100%), 43
<b>G2</b> (332)	angélate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle	332 (-)	162, 145, 83 (100%), 71, 55, 43

Tableau 37 : fragmentations observées en ICP-CH<sub>4</sub> pour les composés identifiés **A7**, **A8**, **G1** et **G2**

N° (M)	[M+H] <sup>+</sup>	[R <sub>1</sub> CO] <sup>+</sup>	[R <sub>2</sub> CO] <sup>+</sup>	[M+H -RCOOH] <sup>+</sup>	[M+H-R <sub>1</sub> COOH -R <sub>2</sub> COOH] <sup>+</sup>
<b>A7</b> (250)	251 (1%)	-	-	163 (100%)	-
<b>A8</b> (264)	265 (1%)	-	-	163 (100%)	-
<b>G1</b> (320)	321 (5%)	71 (51%)	71 (51%)	-	145 (100%)
<b>G2</b> (332)	333 (6%)	83 (100%)	71 (9%)	-	145 (42%)

R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour **A8** et C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> pour **A9**

R<sub>1</sub> = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour **G1** et C<sub>4</sub>H<sub>7</sub> pour **G2**, R<sub>2</sub> = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour **G1** et **G2**

Tableau 38 : fragmentations observées en ICP-NH<sub>3</sub> pour les composés **A7**, **A8**, **G1** et **G2**

N° (M)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> -RCOOH] <sup>+</sup>	[M+H-RCOOH] <sup>+</sup>	[R <sub>1</sub> CO] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> -R <sub>2</sub> COOH] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> -R <sub>1</sub> COOH -R <sub>2</sub> COOH] <sup>+</sup>	[M+H]
<b>A7</b> (250)	268 (57%)		180 (100%)	163 (40%)	-	-	-	-
<b>A8</b> (264)	282 (46%)		180 (100%)	163 (40%)	-	-	-	-
<b>G1</b> (320)	-	321 (100%)	-	-	71 (2%)	250 (13%)	162 (15%)	145 (15%)
<b>G2</b> (332)	-	333 (100%)	-	-	83 (25%)	262 (8%)	162 (10%)	145 (12%)

R= C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour **A8** et C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> pour **A9**

R<sub>1</sub> = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour **G1** et C<sub>4</sub>H<sub>7</sub> pour **G2**, R<sub>2</sub> = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour **G1** et **G2**

Tableau 39 : fragmentations observées en ICN-NH<sub>3</sub> pour les composés **A7**, **A8**, **G1** et **G2**

N° (M)	[M-H] <sup>-</sup>	[RCOO] <sup>-</sup>	[M-H-R <sub>2</sub> COO] <sup>-</sup>	[R <sub>1</sub> COO] <sup>-</sup>	[R <sub>2</sub> COO] <sup>-</sup>
<b>A7</b> (250)	249 (100%)	87 (41%)	-	-	-
<b>A8</b> (264)	263 (100%)	101 (38%)	-	-	-
<b>G1</b> (320)	-	-	232 (100%)	87 (23%)	87 (23%)
<b>G2</b> (332)	-	-	244 (100%)	99 (17%)	87 (45%)

R= C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour **A8** et C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> pour **A9**

R<sub>1</sub> = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour **G1** et C<sub>4</sub>H<sub>7</sub> pour **G2**, R<sub>2</sub> = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> pour **G1** et **G2**



## CHAPITRE 3

Bilan de l'étude sur deux Asteraceae endémiques de Corse :

*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*

L'étude de ces deux Asteraceae endémiques de Corse a permis l'identification, dans les huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum*, de 147 composés dans celles de parties aériennes et de 107 composés dans celles de racines représentant respectivement 93,6% et 96,1% de la composition chimique. Dans l'huile essentielle de *Doronicum corsicum*, 133 composés ont été identifiés représentant 84,5% de l'huile totale. Ces huiles essentielles présentent de nombreuses similitudes au niveau qualitatif, notamment par la présence de sesquiterpènes tricycliques et d'esters monoterpéniques, mais elles sont nettement différentes d'un point de vue quantitatif. A titre d'exemple, le modhephène, l'angélate de thymyle et l'angélate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle sont les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Doronicum corsicum* alors que les deux premiers sont présents à une faible teneur dans les huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et que le troisième en est absent. Diverses méthodes ont été utilisées pour identifier ces nombreux constituants. Nous distinguons 5 types de configurations dans le processus de l'identification :

### [1] Bibliothèques propres

Suite aux analyses en CPG/Ir et CPG/SM-IE, 157 composés ont été identifiés à l'aide des bibliothèques propres au laboratoire.

### [2] Bibliothèques commerciales et/ou littérature

Faisant toujours suite aux seules analyses en CPG/Ir et CPG/SM-IE, 38 autres composés ont pu être identifié, sans ambiguïté, à l'aide des bibliothèques commerciales (et/ou la littérature). L'identification de onze de ces composés, présents à des teneurs supérieures à 5% dans les fractions, a été confirmée par analyse en RMN

du carbone-13. Il s'agit de 9 sesquiterpènes hydrocarbonés à squelette silphiperfolane (**H1** à **H4**), modhephane (**H5**), isocomane (**H6** et **H7**), sesquisabinane (**H8**) et bisabolane (**H9**) et de 2 alcools sesquiterpéniques (**O1** et **O2**).

### [3] Synthèses

Un certain nombre de composés proposés par les bibliothèques commerciales et/ou par la littérature n'avaient pas, à notre sens, une fiabilité suffisante. Parfois même, les propositions des banques commerciales étaient différentes de celles de la littérature. Cela était notamment le cas pour une série d'esters monoterpéniques. Les difficultés d'identification provenaient principalement de la faible abondance, voire l'absence, des ions moléculaires, de la similitude des spectres de masse et/ou de la proximité des indices de rétention.

Pour contourner ces difficultés, nous avons effectué la synthèse de 32 esters correspondant aux composés proposés et à leurs isomères. Il s'agit de 6 esters de thymyle, 5 esters de bornyle, 5 esters d'isobornyle, 6 esters de néryle, 5 esters de géranyle et de 5 esters de lavandulyle. Les groupements carboxylates sont de type méthacrylate (pour les esters de néryle et de thymyle seulement), isobutyrate, butyrate, 2-méthylbutyrate, isovalérate et valérate. Ces composés ainsi synthétisés ont formellement été étudiés et reconnus par CPG/Ir, CPG/SM-IE, RMN du proton et RMN du carbone-13.

14 constituants (**A1** à **A3**, **A5**, **C1** à **C3**, **D1** à **D3**, **D5**, **E1** à **E3**) ont été identifiés par comparaison des indices de rétention et des spectres de masse (IE) des composés synthétisés avec ceux des composés présumés dans les huiles essentielles. L'identification de 4 de ces composés (**A1**, **C1**, **C2**, **D1**) présents à des teneurs suffisamment élevées dans les fractions, a été confirmée en RMN du carbone-13 par comparaison des déplacements chimiques mesurés dans les fractions avec ceux des composés synthétisés.

Ces 14 esters monoterpéniques ont fait l'objet d'une étude par CPG/SM-IC en utilisant le méthane (ICP) et l'ammoniac (ICP et ICN) comme gaz réactifs ; les mécanismes de fragmentations privilégiées ont pu être mis en évidence.

#### [4] Couplage CPG/SM-IC

17 composés dont les spectres de masse sont inconnus de nos bibliothèques propres et des bibliothèques commerciales, n'ont pu être synthétisés. Leur identification est basée sur l'exploitation des spectres de masse en IE et en IC compte tenu des enseignements tirés de l'étude précédente relative aux fragmentations des esters monoterpéniques. Il s'agit de 2 esters de thymyle (**A4** et **A6**), de 5 esters de 8,9-déhydrothymyle (**B2** à **B6**), de 2 esters de 8,9-époxythymyle (**G1** et **G2**), de 2 esters de 3-méthoxycuminyle (**A7** et **A8**), de 2 esters de néryle (**D4** et **D6**), de 2 bi-esters de néryle (**D7** et **D8**), d'un benzofurane (**F1**) et du 2,5-diméthoxycymène (**O3**).

#### [5] RMN du carbone-13

Parmi les composés identifiés ci-dessus, 10 structures ont été précisées par RMN du carbone-13. Il s'agit, des composés monoterpéniques (**A4**, **A6**, **A7**, **A8**, **G1**, **G2**, **D7**, **D8** et **O3**) et d'un dérivé du benzofurane (**F1**). A ces composés, il convient d'ajouter l'isobutyrate de 8,9-déhydrothymol (**B1**), proposé par les bibliothèques commerciales.

Nous avons procédé par comparaison des déplacements chimiques des carbones du constituant mesurés dans le mélange soit avec ceux des composés authentiques lorsqu'ils étaient décrits dans la littérature, soit avec un spectre reconstitué à partir de molécules de références et/ou de la littérature.

Enfin, nous avons réalisé l'analyse structurale de **A6** (angélate de thymyle) et de **G2** (angélate de 10-isobutyroxy 8,9-époxythymyle) qui n'étaient pas décrits dans la littérature.

Ce faisant, nous avons pu enrichir nos bibliothèques propres de 56 références se décomposant en :

- 43 composés (9 sesquiterpènes hydrocarbonés, 31 monoterpènes oxygénés, 2 sesquiterpènes oxygénés et un benzofurane) effectivement présents dans les huiles

essentielles étudiées. Ces composés sont d'autant plus intéressants qu'un grand nombre d'entre eux sont absents des bibliothèques commerciales.

- 18 esters monoterpéniques que nous avons synthétisés en vue des identifications mais qui se sont avérés ne pas être présents dans ces huiles essentielles.

Cette étude nous a permis de montrer la contribution déterminante du couplage CPG/SM en mode IC, venant en complément au même couplage en mode IE. Pour l'analyse des mélanges complexes, la CPG/SM-IC permet la détermination de la masse moléculaire, ce que le mode IE ne permet pas toujours, et permet, souvent, la différenciation de composés ayant des spectres de masse similaires en impact électronique. Nous avons également montré que l'ionisation chimique (positive et négative) avec différents gaz réactants est une méthode efficace pour obtenir des informations structurales sur des composés absents des différentes bibliothèques.

# CONCLUSION

La flore corse est riche en plantes aromatiques et médicinales et bon nombre d'entre elles sont des espèces endémiques pouvant être valorisées en tant que source de produits à forte valeur ajoutée. Les huiles essentielles, obtenues par hydrodistillation de matériel végétal, trouvent des emplois dans divers secteurs (parfumerie, cosmétique, aromathérapie...) et peuvent constituer la base d'un développement économique durable pour l'île.

Les huiles essentielles se présentent généralement sous forme de mélanges complexes dont il est nécessaire de connaître avec précision la composition avant toute étape de valorisation. La caractérisation d'une huile essentielle est une opération indispensable lorsque l'on souhaite la contrôler, la commercialiser, ou mettre en évidence son éventuelle spécificité.

L'objectif de notre travail était de participer au développement de cette méthodologie d'analyse en utilisant la complémentarité des diverses techniques, de contribuer à l'enrichissement de nos bibliothèques propres de références et, enfin, de procéder à l'évaluation et l'intégration du mode « ionisation chimique » dans la méthodologie d'analyse.

Pour la détermination de la composition chimique des huiles essentielles nous avons respecté un processus impliquant différentes techniques d'analyse :

- avant tout fractionnement, nous avons procédé à l'analyse par CPG/Ir et CPG/SM-IE de l'huile essentielle,
- l'huile essentielle est ensuite fractionnée sur colonne ouverte facilitant ainsi la quantification et l'identification des composés minoritaires,
- pour conforter ou pour aider à certaines identifications, nous avons mis en œuvre le couplage CPG/SM selon le mode « ionisation chimique » (ICP et ICN) en utilisant  $\text{NH}_3$  et  $\text{CH}_4$  comme gaz réactants,

- enfin, dans certains cas, nous avons également eu recours à la RMN du carbone-13 afin de préciser ou de confirmer certaines identifications ou d'identifier des constituants absents des bibliothèques d'indices de rétention et de spectres de masse.

Dans la **première partie** de ce mémoire, nous avons passé en revue les principales techniques conventionnelles utilisées pour l'analyse des huiles essentielles. Il est connu que l'utilisation conjointe des indices de rétention et du couplage en ligne CPG/SM est une méthode particulièrement bien adaptée à ce type d'études. Nous avons plus particulièrement détaillé le couplage CPG/SM-IC afin de positionner cette méthode par rapport aux autres techniques.

Dans la **seconde partie**, nous avons caractérisé l'huile essentielle de *Cistus albidus* de Provence. Nous avons réalisé une étude détaillée de la composition chimique de cette huile essentielle par fractionnement sur colonne ouverte et combinaison des différentes techniques analytiques énumérées ci-dessus ; nous avons ainsi identifié 87 constituants représentant plus de 80% de la composition chimique. Les identifications ont été proposées, la plupart du temps, par nos bibliothèques (Ir, SM) et/ou par celles de RMN du laboratoire « Chimie et Biomasse ». Dans un certain nombre de cas, nous avons eu recours aux propositions des bibliothèques commerciales ou aux données de la littérature. L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude a montré que l'huile essentielle de *Cistus albidus* est originale dans le genre *Cistus* ; elle se distingue par une forte abondance en sesquiterpènes à squelette bisabolane et par des faibles teneurs en monoterpènes et en diterpènes à squelette labdane.

Dans la **troisième partie**, nous avons préparé et étudié les huiles essentielles de deux Asteraceae endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*.

Dans le premier chapitre, nous avons caractérisé les huiles essentielles de parties aériennes et de racines d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* de Corse par l'identification de respectivement 147 constituants (94%) et 107 constituants

(96%) . Bien qu'elles présentent de nombreux composés identiques, les résultats des analyses ont montré que ces huiles essentielles différaient dans leurs compositions chimiques au niveau qualitatif et plus particulièrement au niveau quantitatif. Dans les huiles essentielles des parties aériennes, on relève une prédominance des composés hydrocarbonés monoterpéniques (33%) et sesquiterpéniques (43%) ; le germacrène D et l' $\alpha$ -phellandrène sont les deux produits majoritaires. L'huile essentielle de racines est constituée principalement par des composés oxygénés monoterpéniques (54%) ; l'isobutyrate de néryle et l'oxyde de méthyle et de thymyle sont les deux composés principaux.

Les huiles essentielles d'*Eupatorium cannabinum* contiennent environ 9% d'esters monoterpéniques pour les parties aériennes et 33 % pour les racines. Nous en avons identifié une trentaine ; la famille la mieux représentée est celle des esters de néryle, puis celle de bornyle suivies de celles de thymyle, de 8,9-déhydrothymyle et enfin de lavandulyle. L'étude de ces composés par CPG/SM-IE nous a permis de mieux appréhender les mécanismes de réaction et de fragmentation se produisant dans les esters monoterpéniques.

Nous avons identifié des composés qualifiés dans la littérature d' « inhabituels ». En l'occurrence, deux bi-esters de néryle, un dérivé du benzofurane, quatre sesquiterpènes tricycliques à squelette silphiperfolane et un à squelette modhephane. Il est à relever que ces composés n'avaient encore jamais été signalés dans les huiles essentielles du genre *Eupatorium*.

Dans le second chapitre, nous avons caractérisé l'huile essentielle de *Doronicum corsicum* par l'identification de 133 constituants représentant environ 85% de la composition chimique. Les groupes prédominants sont les monoterpènes oxygénés (41%) et les sesquiterpènes hydrocarbonés (38%). Parmi les composés oxygénés, nous constatons la présence de beaucoup d'esters monoterpéniques tels les esters de thymyle, de 8,9-déhydrothymyle et de néryle. Cette huile essentielle présente une composition chimique originale par la présence parmi les composés majoritaires

du modhephène, de l'angélate de thymyle et de l'angélate de 10-isobutyroxy-8,9-époxythymyle. Ces deux derniers n'étant pas décrits dans la littérature, ont fait l'objet d'une analyse structurale. Enfin, nous avons également signalé la présence de deux esters de 3-méthoxycymène et d'un bi-ester de 8,9-époxythymyle.

Dans ces études, la grande majorité des constituants a été identifiée à l'aide de nos banques propres d'indices de rétention et de spectres de masse (IE).

Nous avons réalisé les hémisynthèses d'une trentaine d'esters monoterpéniques suggérés par les bibliothèques commerciales ou par la littérature, ainsi, 14 d'entre eux ont pu être identifiés dans ces huiles essentielles.

Une quarantaine de constituants a été identifiée sur la base des propositions des bibliothèques commerciales. De plus, l'identification d'une vingtaine de constituants a été rendue possible par la mise en œuvre du mode « ionisation chimique ». Dans les deux cas, pour les composés dont l'abondance était suffisante, l'analyse par RMN du carbone-13 a permis de confirmer voire de préciser la structure des molécules.

Dans la majorité des cas, c'est grâce à l'utilisation conjointe de l'ensemble des techniques d'analyse que nous aboutissons à une identification fiable par la production d'un faisceau d'indices concordants. En considérant ses atouts et ses limites, il ressort, *in fine*, que l'ionisation chimique est un outil relativement bien adapté à l'analyse des mélanges complexes fournissant, dans bien des cas, des informations structurales ou permettant de différencier des stéréoisomères, à condition, toutefois, de fixer et de contrôler les conditions expérimentales.

Au total, ce travail de thèse a permis d'enrichir de manière conséquente nos bibliothèques de référence puisqu'une soixantaine de composés y ont été intégrés.



# PARTIE EXPERIMENTALE

## CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SILICE

Pour séparer les composés hydrocarbonés des composés oxygénés contenus dans les huiles essentielles, nous avons utilisé comme adsorbant une silice ICN 200-500  $\mu\text{m}$ , 60A. La séparation des composés hydrocarbonés ou oxygénés a été réalisée en utilisant une silice de faible granulométrie, ICN 63-200  $\mu\text{m}$ . Pour obtenir une meilleure séparation des composés hydrocarbonés, nous avons imprégné la colonne par du nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ , 20%).

## CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem GC, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composés, d'un injecteur diviseur et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ) respectivement polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane).

Le gaz vecteur est l'hélium (1ml/min) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/mm, puis en un palier de 45 mm à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2  $\mu\text{l}$ .

Pour chacun des composés, les indices de rétention polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane.

## COUPLAGE CPG/SPECTROMETRIE DE MASSE

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass.

Le gaz vecteur est l'hélium (1ml/min) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/mm, puis en un palier de 35 mm à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2  $\mu\text{l}$ . La détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source est de 150°C.

### ***En mode impact électronique :***

Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da. La température de la source est de 150°C.

### ***En mode ionisation chimique :***

Les gaz réactifs utilisés sont ; - en ionisation chimique positive : le méthane ( $\text{CH}_4$ ) et l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ), - en ionisation chimique négative : l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Ils sont ionisés par un faisceau électronique de 70 eV. La température de la source est de 150°C et la pression de 0,2 mbar. Les spectres de masse obtenus par ionisation chimique ont été acquis sur la gamme de masse 60-350 Da.

## RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur deux appareils Bruker différents, dans le chloroforme deutéré et les déplacements chimiques sont donnés en ppm (d) par rapport au TMS pris comme référence interne.

*Bruker AC 200 « Aspect 3000 » équipé d'une sonde de 5 ou 10 mm, opérant à 200,132 MHz pour le proton et à 53,323 MHz pour le carbone-13.*

### RMN du proton

Les spectres de RMN du proton ont été enregistrés avec les paramètres suivants : sonde de 5 mm : durée de l'impulsion = 2,0  $\mu$ s (angle d'impulsion 25°), temps d'acquisition = 2,3 s correspondant à une acquisition de 16 K avec une largeur spectrale (SW) de 3500 Hz (17,5 ppm), temps de répétition entre deux expériences = 3,3s.

### RMN du carbone-13

Les spectres du carbone-13 ont été enregistrés avec les paramètres suivants : Sonde de 10 mm ou (5mm) ; durée de l'impulsion 5 ms ou (2,8 ms) (angle d'impulsion 45°), temps d'acquisition = 1,3 s correspondant à une acquisition de 32 K avec une largeur spectrale (SW) de 12 500 Hz (250 ppm), résolution digitale de 0,763 Hz/pt, temps de répétition entre deux expériences = 3,3 s. Pour l'enregistrement des spectres des huiles essentielles, 200 mg ou (70mg) d'huile essentielle sont dissout dans 2 ml ou (5ml) de CDCl<sub>3</sub>. Le nombre d'accumulations est compris entre 2000 et 10 000 pour chaque enregistrement. Découplage pulsé (« Composite Phase Decoupling »). Les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle (LB = 1,0 Hz).

### Expérience d'écho de spin

Les paramètres du programme JMODXH ont été utilisés pour les expériences d'écho de spin (sonde de 5 mm) ; durée de l'impulsion 5,6 ms (angle d'impulsion 90°), temps de répétition entre deux expériences = 5,3 s, temps pour  $[1/J(C,H)]$  calculé pour  $J(C,H) = 125 \text{ Hz} : 8,0 \text{ ms}$ .

***Bruker BioSpin AG équipé d'une sonde de 5, opérant à 400,132 MHz pour le proton et à 100,623 MHz pour le carbone-13.***

### RMN du proton

Les spectres de RMN du proton ont été enregistrés avec les paramètres suivants ; sonde de 5 mm : angle d'impulsion 30°, temps d'acquisition = 2,56 s correspondant à une acquisition de 32 000 avec une largeur spectrale (SW) de 7000 Hz (17,5 ppm).

### RMN du carbone-13

Les spectres du carbone-13 ont été enregistrés avec les paramètres suivants : Sonde de 10 mm ou (5mm) ; angle d'impulsion 45°, temps d'acquisition = 2,73 s correspondant à une acquisition de 64 K avec une largeur spectrale (SW) de 25 000 Hz (250 ppm), résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Pour l'enregistrement des spectres des huiles essentielles, 70 mg d'huile essentielle sont dissout dans 5ml de  $\text{CDCl}_3$ . Le nombre d'accumulations est compris entre 2000 et 5 000 pour chaque enregistrement. Découplage pulsé (« Composite Phase Decoupling »). Les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle (LB = 1,0 Hz). Les expériences de RMN deux dimensions, COSY, NEOSY, HSQC, HMBC, sont réalisées en utilisant les différents programmes Bruker Avance 400.

## HEMISYNTHESES

### *Préparation des esters :*

Dans un ballon tricol surmonté d'un réfrigérant et muni d'une ampoule à brome et d'un système d'agitation magnétique, l'alcool (500 mg, 3,3 mmoles, 1 équivalent) et la triéthylamine (350 mg, 3,5 mmoles, 1 équivalent) sont dilués dans 20 ml de dichlorométhane anhydre. Le mélange est refroidi dans un bain de glace ; une solution de chlorure d'acide (400 mg, 3,3 mmoles, 1 équivalent) dans 15 ml de dichlorométhane est placée dans l'ampoule à brome et est ajoutée goutte à goutte au contenu du ballon. A la fin de l'addition, le bain de glace est retiré et le mélange est chauffé à reflux pendant trois heures. On verse alors le contenu du ballon dans une ampoule à décanter contenant 200 ml d'eau et après agitation, la phase organique est lavée deux fois à l'eau pure, séchée sur sulfate de magnésium anhydre et évaporée.

Avant son étude spectrale, le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice ICN 63-200  $\mu\text{m}$ .

Ce protocole a été utilisé pour effectuer les hémisynthèses de 32 esters monoterpéniques :

- isobutyrate de thymyle, butyrate de thymyle, 2-méthylbutyrate de thymyle, isovalérate de thymyle et valérate de thymyle, méthacrylate de thymyle ;
- isobutyrate de bornyle, butyrate de bornyle, 2-méthylbutyrate de bornyle, isovalérate de bornyle et valérate de bornyle ;
- isobutyrate d'isobornyle, butyrate d'isobornyle, 2-méthylbutyrate d'isobornyle, isovalérate d'isobornyle et valérate d'isobornyle ;
- isobutyrate de néryle, butyrate de néryle, 2-méthylbutyrate de néryle, isovalérate de néryle, valérate de néryle et méthacrylate de néryle ;
- isobutyrate de géranyle, butyrate de géranyle, 2-méthylbutyrate de géranyle, isovalérate de géranyle et valérate de géranyle ;
- isobutyrate de lavandulyle, butyrate de lavandulyle, 2-méthylbutyrate de lavandulyle, isovalérate de lavandulyle et valérate de lavandulyle.

Certaines de ces synthèses ont été effectuées dans le cadre de stage de Maîtrise : Stéphanie Cozzani (2000), Marielle Navari (2001), Anthony Ottavi (2002).

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) Joulain D., Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture : use and abuse, *Perfumer & Flavorist*, 1994, **19**, 5-17.
- (2) Formáček V., Kubeczka K.H., Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy, Ed. John Wiley & Sons, Chichester, 1982.
- (3) Kubeczka K.H., Schultze W., Formáček V., Herres W., New developments in essential oils analysis by Fourier-Transform spectroscopy, *10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours, Washington, 16-20 Nov., 1986*, Proceedings, Ed. Elsevier Science, 1988, 931-950.
- (4) Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J., Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson. Anal.*, 1995, **1**, 25-34.
- (5) Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J., L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13 – Partie 1., *Can. J. Appl. Spectrosc.*, 1996, **41**(1), 15-24.
- (6) Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J., L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13 – Partie 2., *Can. J. Appl. Spectrosc.*, 1996, **41**(2), 41-50.
- (7) Silverstein R.M., Bassler G.C., Morill T.C., Spectroscopic identification of organic compounds, 5<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons, New York, 1991.
- (8) Cooper J.W., Spectroscopic techniques for chemistry research, John Wiley & Sons, New York, 1980.
- (9) Günther H., La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie, Masson, Paris, 1994.
- (10) Atta-Ur-Rahman, Azra Pervin, The nuts and bolts of modern two-dimensional NMR spectroscopy. A suggested protocol for structure elucidation, *J. Chem. Soc. Pakistan*, 1991, **13**, 127-152.
- (11) Freeman R., Molecular structure by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Mol. Struct.*, 1998, **173**, 17-30.
- (12) Ernst R., Two-dimensional NMR spectroscopy : a powerful tool for the investigation of molecular structure and dynamics, *Chimia*, 1987, **41**, 323-340.

- (13) Derome A.E., Modern NMR techniques for chemistry research, Pergamon Press, Oxford, 1987.
- (14) Breitmaier E., Voelter W., Carbon-13 NMR spectroscopy, high-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry, 3<sup>ème</sup> édition, Verlag Chemie International, New York, 1990.
- (15) Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, 1995.
- (16) Kováts E., Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, in *Advances in Chromatography*, Chap. 7, 1965, 229-247.
- (17) Van Den Dool H., Kratz P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatogr.*, 1963, **11**, 463-471.
- (18) Joulain D., König W.A., The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Ed. E.B.-Verlag, Hambourg, 1998.
- (19) König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D., Terpenoids and related constituents of essential oils, University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany, 2001.
- (20) Jennings W., Shibamoto T., Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography, Ed. Jovanovitch H.B., Academic Press, New-York, 1980.
- (21) Adams R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 1995.
- (22) Grundschober F., The identification of individual components in flavouring and flavoured foods, *Z. Lebensm. Unters. Forsh.*, 1991, **192**, 530-534.
- (23) Marriott P., Shellie R., Fergus J., Ong R., Morrison P., High resolution essential oil analysis by using comprehensive gas chromatographic methodology, *Flavour Fragr. J.*, 2000, **15**, 225-239.
- (24) Marriott P., Shellie R., Cornwell C., Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, *J. Chromatogr. A*, 2001, **936**, 1-22.
- (25) Casabianca H., Graff J.B., Jame P., Perruchietti C., Application of hyphenated techniques to the chromatographic authentication of flavors in food products and perfumes, *J. High Resol. Chromatogr.*, 1995, **18**, 279-286.

- (26) Casabianca H., Graff J.B., Faugier V., Fleig F., Grenier C., Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate. A powerful tool for authenticity control of essential oils, *J. High Resol. Chromatogr.*, 1998, **21**, 107-112.
- (27) König W.A., Bülow N., Saritas Y., Identification of sesquiterpene hydrocarbons by gas phase analytical methods, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 367-378.
- (28) McLafferty F.W., Michnowicz J.A., State-of-the-art GC-MS, *Chemtech.*, 1992, 182-189.
- (29) Longevialle P., Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris, 1981.
- (30) Constantin E., Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 1996, 1-14.
- (31) De Hoffmann E., Charette J., Stroobant V., Spectrométrie de Masse, 2<sup>e</sup> édition, Librairie Dunod, Paris, 1999.
- (32) McLafferty F.W., Tureček F., Interpretation of mass spectra, Fourth edition, University Science Books, Sausalito, California, 1993.
- (33) National Institute of Standards and Technology, PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, The Perkin Elmer Corporation, 1999.
- (34) Mc Lafferty F.W., Stauffer D.B., Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6<sup>th</sup> ed. Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co., Newfield, 1994.
- (35) Adams R.P., Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy, Academic Press, Inc., San Diego, 1989.
- (36) Mc Lafferty F.W., Stauffer D.B., The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 1-7, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, 1989.
- (37) Masada Y., Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry, Ed. John Wiley & Sons, New-York, 1976.
- (38) Coleman II W.M., Gordon B.M., Lawrence B.M., Examinations of the matrix isolation fourier transform infrared spectra of organic compounds: part XII, *Applied Spectroscopy*, 1989, **43**(2), 298-304.
- (39) Schultze W., Lange G., Schmaus G., Isobutane and ammonia chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons, *Flavour Fragr. J.*, 1992, **7**, 55-64.



- (40) Joulain D., Laurent R., Two closely related sesquiterpenols : 1-endo-bourbonanol and 1,6-germacradien-5-ol, *J. Essent. Oil Res.*, 1989, **1**, 197-200.
- (41) Munson B., Field F.H., Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 2621-2630.
- (42) Field F.H., Chemical ionization mass spectrometry, *Acc. Chem. Res.*, 1968, **1**, 42-49.
- (43) Munson B., Chemical ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 1971, **43**(13), 28A-43A.
- (44) Field F.H., Chemical ionization, dans MTP international review of science : physical chemistry series One, vol. 5 : mass spectrometry, Ed. A. Maccoll, Butterworths, Londres et University Park Press, Baltimore, 1972, 133-181.
- (45) Field F.H., Chemical ionization, dans ion molecule reactions, vol. 1, Ed. J. L. Franklin, Butterworths, Londres, 1972, 261.
- (46) Arsenault G.P., Chemical ionization mass spectrometry, dans biomedical applications of mass spectrometry, Ed. G.R. Waller, Wiley Interscience, New-York, 1972, chap. 31, 817-832.
- (47) Milne G.W.A., Lacey M., Modern ionization techniques in mass spectrometry, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1974, 45-104.
- (48) Munson B., Chemical ionization mass spectrometry : ten years later, *Anal. Chem.*, 1977, **49**, 772A-778A.
- (49) Richter W.J., Schwarz H., Chemical ionization : a mass spectrometry analytical procedure of rapidly increasing importance, *Angew. Chem. Int.*, Ed. Engl., 1978, **17**, 424-439.
- (50) Mather R.E., Todd J.F.J., Chemical ionization mass spectrometry : a survey of instrument technology, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Phys.*, 1979, **30**, 1-37.
- (51) Jennings K.R., Chemical ionization mass spectrometry, dans gas phase ion chemistry, vol. 2, Ed. Bowers M.T., Academic Press, N.Y., 1979, 123-150.
- (52) Dougherty R.C., Negative chemical ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 1981, **53**, 625A-636A.
- (53) Harrison A.G., Chemical ionization mass spectrometry., 2<sup>nd</sup> Ed CRC Press, Boca Raton, Florida., 1992.

- (54) Arpino P.J., L'ionisation chimique une façon de modéliser les réactions de chimie organique dans un spectromètre de masse, *L'actualité chimique*, 1982, **4**, 19-28.
- (55) Tal'roze V.L., Lyubimova A.K., Secondary processes in a mass spectrometer ion source, *Dokl. Akad. Nauk., SSSR*, 1952, **86**, 909.
- (56) Smitf A.L.C., Field F.H., Negative chemical ionization, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 6471.
- (57) Budzikiewick H., Negative chemical ionization mass spectrometry, *Angew. Chem. Int., Ed. Engl.*, 1981, **20**, 624.
- (58) Field F.H., Munson B., Becker D.A., Chemical ionization mass spectrometry, *Adv. Chem. Ser.*, 1966, **58**, 167-192.
- (59) Field F.H., Chemical ionization mass spectrometry. VIII. Alkènes and alkynes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 5649-5656.
- (60) Munson M.S.B., Field F.H., Chemical ionization mass spectrometry. V. Cycloparaffins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **89**, 4272.
- (61) Budzikiewicz H., Busker E., Studies in chemical ionization mass spectrometry. III. CI-spectra of olefins, *Tetrahedron.*, 1980, **36**, 255-266.
- (62) Hadjieva P., Sandra P., Stoinova-Ivanova B., Verzele M., Open tubular gas chromatography-mass spectral « electron impact and chemical ionization » - analysis of bulgarian rose oil (*Rosa damascena* mill.), *Riv. Ital. EPPOS.*, 1980, **62**, 367-372.
- (63) Vernin G, Metzger J., Etude des huiles essentielles par GC-SM-Banque SPECMA : Essences de Géranium, *Parfums, Cosmétiques, Arômes.*, 1983, **52**, 51-61.
- (64) Brevard H., Spectrométrie de masse et modes d'ionisations appliqués à l'étude de l'huile essentielle de *Ruscus acuelatus*, Thèse de l'Université de Nice., 1985.
- (65) Sarris J., Etievant P.X., Le Querre J.L., Adda J., The chemical ionization mass spectra of alcohols, *Progress in Flavour Research 1984.*, Ed. Elsevier, Amsterdam, 1985.
- (66) Field F.H., Chemical ionization mass spectrometry. XII. Alcohols., *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 2672-2676.
- (67) Winkler F.J., Gulaçar F.O., Mermoud F., Bushs A., Temperature dependence of the isobutane cemical ionization of open-chain and cyclic alcohols; structural,

stereochemical and molecular-size effects. A reevaluation of the chemical ionization of alcohols, *Helv. Chim. Acta*, 1983, **66**, 929-941.

- (68) Winkler F.J., Gulaçar F.O., Mermoud F., Bushs A., Ammoniac chemical ionization mass spectrometry of alcohols; structural, stereochemical, molecular-size and temperature effects, *Helv. Chim. Acta*, 1984, **67**, 488-501.
- (69) Munson B., Feng T.M., Ward H.D., Murray Jr.R.K., Isobutane chemical ionization mass spectra of unsaturated alcohols, *Org. Mass. Spectrom.*, 1987, **22**, 606-609.
- (70) Bruins A.P., Negative ion chemical ionization mass spectrometry in the determination of components in essential oils, *Anal. Chem.*, 1979, **51**, 967-972.
- (71) Lange G, Schulze W., Applications of isobutane and ammoniac chemical ionization for the analysis of volatile terpene alcohols and esters, *Flavour Fragr. J.*, 1987, **2**, 63-73.
- (72) Doolittle R.E., Tumlinson J.H., Proveaux A., Determination of double bond position and conjugated dienes by chemical ionization mass spectrometry with isobutene, *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 1625-1630.
- (73) Einhorn J., Virelizier H., Gemal A.L., Tabet J.C., Direct determination of double bond position and conjugated dienes by  $t.C_4H_9^+$  - Chemical ionization mass spectrometry, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**(11), 1145-1148.
- (74) Weiss M., Crombie R.A., Harrison A.G., Structure and fragmentation of  $[C_6H_{13}O]^+$  ions formed by chemical ionization, *Org. Mass. Spectrom.*, 1987, **22**, 216-223.
- (75) Weinkam R.J., Gal J., Effects of bifunctional interactions in the chemical ionization mass spectrometry of carboxylic acids and methyl esters, *Org. Mass. Spectrom.*, 1976, **11**, 188.
- (76) Harrison A.G., Kallury R.K.M.R., Stereochemical applications of mass spectrometry. II-Chemical ionization mass spectra of isomeric dicarboxylic acids and derivatives, *Org. Mass. Spectrom.*, 1980, **15**, 277-283.
- (77) Lange G., Schulze W., Studies on terpenoid and non terpenoid esters using chemical ionization mass spectrometry in GC/MS coupling, *Bioflavour '87*, Ed. Walter de Gruyter, Berlin, 1988.
- (78) Gunther W., Ph.D. Thesis, Hambourg, 1983.

- (79) Knight D.W., Knight M.E., Rossiter., Jones E., Games D.E., Mass spectral methods in structural studies of naturally-occurring volatiles, *Adv. Mass. Spectrom.*, 1980, **8**, 1116-1126.
- (80) Winkler J., McLafferty F.W., Stereochemical effects in the chemical ionization of cyclic diols, *Tetrahedron*, 1974, **30**, 2971-2976.
- (81) Fraisse D., Scharff C., Vernin G., Metzger J., SPECMA bank applications to the study of *Geranium* essentials oils of various origin, *9<sup>th</sup> Inter Congress Essential Oils, Singapore, Essential Oils, Technical Paper*, 1983, **3**, 100-120.
- (82) Munson B., Chemical ionization mass spectrometry: analytical applications of ion-molecule reactions, *Interactions Between Ions and Molecules.*, Ed Plenum Press, New York, 1975.
- (83) Lange G., Schulze W., Differentiation of isopulegol isomers by chemical ionization mass spectrometry, *Bioflavour '87*, Ed. Walter de Gruyer, Berlin, 1988.
- (84) Jalonen J., Taskinen J., Organic chemistry of gaz-phase ions. Part 1. Effect of the protonation site in norborneols, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1985, **2**, 1833-1838.
- (85) Badjah Hadj Ahmed A.Y., Meklati B.Y., Fraisse D., Mass spectrometry with positive chemical ionization of some  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene derivatives, *Flavour Fragr. J.*, 1998, **3**, 13-18.
- (86) Hendriks H., Bruins A.P., Study of three type of essential oil of *Valeriana officinalis* L. s.l by combined gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, 1980, **190**, 321-330.
- (87) Hendriks H., Bruins A.P., A Tentative identification of components in the essential oil of *Cannabis sativa* L. by a combination of gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry and retention indices, *Biochemical Mass Spectrometry*, 1983, **10**(6), 377-381.
- (88) George G., Applications de l'ICN à l'analyse des mélanges aromatiques, Thèse de doctorat de l'Université de Nice, 1984.
- (89) Bicchi C., Frattini C., Raverdino V., Considerations and remarks on the analysis of *Anthemis nobiblis* L. essential oil by capillary gas chromatography and "hyphenated" techniques, *J. Chromatogr.*, 1987, **411**, 237-249.
- (90) Bruins A.P., Gas Chromatography-Mass Spectrometry of essential oils. Part II. Positive ion and negative ion chemical ionization techniques, *Capillary Gaz Chromatography in Essential Oils Analysis*, Ed. Bicchi C, Sandra P, Heidelberg, Huethig Verlag, 1987, 329-356.

- (91) Zupanc M., Prošek M., Dušan M., Combined CI and EI mass spectra in the analysis of essential oils, *J. High Resol. Chromatogr.*, 1992, **15**, 510-513.
- (92) Cambon A., La spectrométrie de masse multidimensionnelle et ses applications à l'analyse des mélanges complexes, *Science, Technique, Technologie*, 1989, **11**, 4-10.
- (93) Rangunathan N., Krock K.A., Klawun C., Sasaki T.A., Wilkis C.L.L., Multispectral detection for gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1995, **703**, 335-382.
- (94) Vernin G., Lageot C., Couplage CG/SM pour l'analyse des arômes et des huiles essentielles, *Analisis*, 1992, **20**(7), 34-39.
- (95) Vernin G., Petitjean M., Poite J.C., Metzger J., Fraisse D., Suon K.-N., Mass spectra and Kováts indices databank of volatile aroma compounds, Chap. VII in *Computer Aids to Chemistry*, Vernin G. and Chanon M. ed., Horwood E., Pub., Chichester, 1986, 294-333.
- (96) Vernin G., Metzger J., Suon K.-N., Fraisse D., Ghiglione C., Hamoud A., Párkányi C., GC-MS-SPECMA bank analysis of essential oils and aromas. GC-MS (EI-PCI) data bank analysis of sesquiterpenic compounds in Juniper needle oil - Applications of the mass fragmentometry SIM technique, *Lebensm. -Wiss. U. - Technol.*, 1990, **23**, 25-33.
- (97) Yost R.A., Enke C.G., Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation, *Anal. Chem.*, 1979, **51**, 1251-1264.
- (98) Cazaussus A., Pes R., Sellier N., Tabet J.C, GC-MS and GC-MS-MS analysis of a complex essential oil, *Chromatographia*, 1988, **25**(10), 865-869.
- (99) Decouzon M., Gérialdi S., Rouillard M., Sturla J.M., A new look at the spectrometric properties of dihydrocarveol stereoisomers, *Flavour Fragr. J.*, 1990, **5**, 147-152.
- (100) Coleman III W.M., Gordon B.M., Gas chromatography-matrix isolation-Fourier transform-infrared spectrometry of natural products, *J. Chromatogr. Sci.*, 1991, **29**(9), 371-376.
- (101) Le Quéré J-L., Le couplage CPG/IRFT dans l'analyse des arômes, *Analisis*, 1992, **20**(7), 46-49.
- (102) Tomlinson M.J., Sasaki T.A., Wilkins C.L., Applications of multidimensional-gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-fourier transform infrared-mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 1996, **16**, 1-14.

- (103) Hedges L.M., Wilkins C.L., Component analysis of *Eucalyptus* oil by gas chromatography-fourier transform-infrared spectrometry-mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.*, 1991, **29**, 345-350.
- (104) Careri M., Mangia A., Multidimensional detection methods for separations and their application in food analysis, *Trends Anal. Chem.*, 1996, **15**(10), 538-550.
- (105) Hirabayashi A., Sakairi M., Takada Y., Koizumi H., Recent progress in atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.*, 1997, **16**(1), 45-52.
- (106) Cremin P., Donnelly D.M.X., Wolfender J.L., Hostettmann K., Liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric analysis of sesquiterpenes of *Armillaria* (*Eumycota* : *Basidiomycotina*) species, *J. Chromatogr. A*, 1995, **710**, 273-285.
- (107) Carini M., Aldini G., Furlanetto S., Stefani R., Maffei Facino R., LC coupled to ion trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxydants from *Helichrysum stoechas*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, **24**, 517-526.
- (108) Morin P., Caude M., Richard H., Rosset R., Semipreparative separation of terpenoids from essential oils by high-performance liquid chromatography and their subsequent identification by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, 1986, **363**, 57-69.
- (109) Philips J.B., Xu J., Comprehensive multi-dimensional gas chromatography, *J. Chromatogr.*, 1995, **703**, 327-334.
- (110) Modeste F., Caude M., Couplage en ligne de la chromatographie en phase liquide avec la chromatographie en phase gazeuse. Principes, développements et applications, *Analisis*, 1994, **22**, 89-107.
- (111) Munari F., Dugo P., Cotroneo A., Automated on-line HPLC-HRGC with gradient of elution and multiple GC transfert applied to the characterization of *Citrus* essential oils, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1990, **13**, 56-61.
- (112) Mondello L., Dugo G., Dugo P., Bartle K.D., On line HPLC-HRGC in the analytical chemistry of *Citrus* essential oils, *Perfumer & Flavorist*, 1996, **21**, 25-49.
- (113) Mondello L., Dugo P., Bartle K.D., Automated HPLC-HRGC : A powerful method fir essential oil analysis. Part V. Identification of terpene hydrocarbons of bergamot, lemon, mandarin, sweet orange, bitter orange, grapefruit, clementine and mexican lime oils by coupled HPLC-HRGC-MS (ITD), *Flavour Fragr. J.*, 1995, **10**, 33-42.

- (114) Korhammer S.A., Bernreuther A., Hyphenation of high-performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic techniques (SFC, GPC, GC, CE) with nuclear magnetic resonance (NMR) : A review, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, **354**, 131-135.
- (115) Sidelmann U. G., Lenz E.M., Spraul M., Hofmann M., Troke J., Sanderson P.N., Lindon J.C., Wilson I.D., Nicholson J.K., 750 MHz HPLC-NMR spectroscopy studies on the separation and characterization of the positional isomers of the glucuronides of 6,11-dihydro-11-oxodiben[b,e]oxepin-2-acetic acid, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 106-110.
- (116) Albert K., Schlotterbeck G., Tseng L.-H., Braumann U., Application of on-line capillary high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry coupling for the analysis of vitamin A derivatives, *J. Chromatogr. A*, 1996, **750**, 303-309.
- (117) Spring O., Buschmann H., Vogler B., Schilling E.E., Spraul M., Hofmann M., Sesquiterpene lactone chemistry of *Zaluzania grayana* from on-line LC-NMR measurement, *Phytochemistry*, 1995, **39**, 609-612.
- (118) Bradesi P., Apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse des mélanges naturels dans le domaine de l'agroalimentaire : huiles essentielles et autres productions végétales, Thèse de doctorat de l'Université de Corse, 1995.
- (119) Bradesi P., Tomi F., Casanova J., Identification of dihydrocarveol stereoisomers and their acetates using carbon-13 NMR spectroscopy, *Spectroscopy Letters*, 1994, **27**, 921-933.
- (120) Tomi F., Bighelli A., Casanova J., Carbon-13 chemical shift assignment of  $\beta$ -cedrene and some derivatives, *Spectroscopy Letters*, 1993, **26**, 1661-1671.
- (121) Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J.,  $^{13}\text{C}$ -NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*, *Flavour Fragr. J.*, 1998, **13**, 154-158.
- (122) Tomi F., Casanova J., Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles, *Annales Fals. Expertise Chim.*, 2000, **93**, 313-330.
- (123) Thanh L., Dũng N.X., Bighelli A., Casanova J., Leclercq P.A., Combination of capillary GC, GC/MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR for the characterization of the rhizome oil of *Piper betle* L. (Piperaceae) from Vietnam, *Spectroscopy*, 1996/1997, **13**, 131-136.
- (124) Baldovini N., Tomi F., Casanova J., Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by  $^{13}\text{C}$ -NMR, *Phytochem. Anal.*, 2001, **12**, 58-63.

- (125) Mazzone V., Analyse de mélanges naturels par RMN du carbone-13 : extraits lipidiques, miels et huiles essentielles, Thèse de doctorat, Université de Corse, France, 1998.
- (126) Cavalli J.F., Combined analysis of the essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy : quantitative determination of Ascaridole, a heat-sensitive compound, *Phytochem. Anal.*, 2004, **15**, 275-279.
- (127) Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R., Casanova J., Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica, *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 205-209.
- (128) Corticchiato M., Tomi F., Bernardini A.F., Casanova J., Composition and intraspecific variability of essential oil from *Thymus herba barona* Lois, *Biochem. Syst. Ecol.*, 1998, **26**, 915-932.
- (129) Bradesi P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A.F., Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica (France), *J. Essent. Oil Res.*, 1997, **9**, 283-288.
- (130) Muselli A., Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse d'huiles essentielles de Corse et du Viêt-Nam, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, 1999.
- (131) Baldovini N., Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J., Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France), *Flavour Fragr. J.*, 2000, **15**, 50-54.
- (132) Vellutini M., Baldovini N., de Rocca Serra, Tomi F., Casanova J.,  $\beta$ -Cyclolavandulyl and  $\beta$ -isocyclolavandulyl esters from *Peucedanum paniculatum* L. an endemic species to Corsica, *Phytochemistry*, 2005, **66**, 1956-1962.
- (133) Gonny M., Cavaleiro C., Salgueiro L., Casanova J., Analysis of *Juniperus communis* subsp. *alpina* needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR, 2006, **21**, 99-106.
- (134) Blanc M.C., la RMN du carbone-13, outil d'analyse : différenciation énantiomérique des terpènes, caractérisation des huiles essentielles de *Dittrichia graveolens* et *Dittrichia viscosa* subsp. *viscosa*, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, 2003.
- (135) Ferrari B., la RMN du carbone-13, outil d'analyse des mélanges naturels : caractérisation d'huiles végétales, d'huiles essentielles et d'extraits aux solvants, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, 2003.



- (136) Mariotti J.P., Costa J., Bianchini A., Bernardini A.F., Casanova J., Composition of essential oil of *Stachys glutinosa* from Corsica (France), *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 205-209.
- (137) Cozzani S., Muselli A., Desjobert J.M., Bernardini A.F., Tomi F., Casanova J., Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) from Corsica, *Flavour Fragr. J.*, 2005, **20**, 436-441.
- (138) Bianchini A., Contribution à la valorisation d'une plante aromatique de Corse, *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don subsp. *italicum* : composition chimique de l'huile essentielle composition inorganique du végétal et des sols, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, 2001.
- (139) Bianchini A., Tomi P., Costa J., Bernardini A.F., Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. Don Fil subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France), *Flavour Fragr. J.*, 2001, **16**, 30-34.
- (140) Bianchini A., Tomi P., Costa J., Bernardini A.F., Morelli I., Flamini G., Cioni P.L., Usaï M., Marchetti M., A comparative study of volatile constituents of two *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. Don Fil subspecies growing in Corsica (France), Tuscany and Sardinia (Italy), *Flavour Fragr. J.*, 2003, **18**, 487-491.
- (141) Cavalli J.F., Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, 2002.
- (142) Boti J.B., Contribution à la caractérisation de plantes aromatiques de Côte d'Ivoire et de Corse apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse d'huiles essentielles et d'un extrait, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, 2004.
- (143) Lota M.L., Les huiles essentielles d'agrumes : caractérisation par RMN du carbone-13, CPG-IK et CPG/SM, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, 1999.
- (144) Hagedorn M.L., Brown S.M., The constituents Cascarilla oil (*Croton eluteria* Bennett), *Flavour Fragr. J.*, 1991, **6**, 193-204.
- (145) Bicchi C., Rubiolo P., Marshall H., Weyerstahl P., Laurent R., Constituents of *Artemisia roxburghiana* Besser Essential Oil, *Flavour Fragr. J.*, 1998, **13**, 40-46.
- (146) Weyerstahl P., Marschall H., Schroder M., Wahlburg H-C., Kaul V.K., The sesquiterpene fraction of the essential oil of *Artemisia laciniata* Willd., *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 315-325.

- (147) Weyerstahl P., Marschall H., Wahlburg H-C., Christiansen C., Rustaiyan A., Mirdjalili F., Constituents of essential oil of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. from Iran, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 121-130.
- (148) Weyerstahl P., Schneider S., Marschall H., Rustaiyan A., The essential oil of *Artemisia sieberi* Bess., *Flavour Fragr. J.*, 1993, **8**, 139-145.
- (149) Weyerstahl P., Marschall H., Eckhardt A., Christiansen C., Constituents of commercial Brazilian lantana oil, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 15-28.
- (150) Weyerstahl P., Schneider S., Marschall H., Constituents of the brazilian *Cangerana* oil, *Flavour Fragr. J.*, 1996, **11**, 81-84.
- (151) Weyerstahl P., Marschall H., Thefeld K., Rustaiyan A., Constituents of the essential oil *Tanacetum* (syn *Chrysanthemum*) *fruticulosum* Ledeb. from Iran, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 112-120.
- (152) Weyerstahl P., Marschall H., Son P.T., Giang P.M., Constituents of the flower essential oil of *Aglaia odorata* Lour. from Vietnam, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 219-224.
- (153) Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Son P.T., Giang P.M., Kaul V.K., Constituents of the flower essential oil from the fruits of *Zanthoxylum rhesoides* Drak from Vietnam and from aerial parts of *Zanthoxylum alatum* Roxb. From India, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 225-229.
- (154) Flora europea, 1968, Vol. 2, Cambridge University Press.
- (155) Bonnier G., Flore complète de France, Suisse et Belgique, Tome II, 1912-1932.
- (156) Coste H. (Abbé), Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse, et des contrées limitrophes, Librairie Scientifique et Technique Albert Blanchard, Tome I, 1937.
- (157) Fournier P., Les quatre flores de France, Ed. Lechevalier-Paris, 1977, **1**, 432, 438-440.
- (158) Gamisans J., Monod D.J., Catalogue des plantes vasculaires de la Corse, Ed. des Conservatoires Botaniques, Genève, 1993.
- (159) Bran-Blanquet J., Bolos O., Aperçu des groupements végétaux des montagnes Tarragonaises, *Collectanea botanica*, 1950, **II**(3), 302-342.
- (160) Luis-Calabuig E., Tarregar R., Alonso I., Seedling regeneration of two *Cistus* species after experimental disturbances, *Int. J. Wildland Fire*, 1996, **6**(1), 13-19.

- (161) Berthier A., La gomme de labdanum en Espagne, *Revista italiana*, 1976, **6**, 315-317.
- (162) Coulouma A., Contribution à l'étude chimique des Cistes, *Bull. Soc. Royale de Bot. de Belgique*, 1933, LXVII (1), 86-94.
- (163) Roustand T., Contribution à l'étude botanique et phytochimique du genre *Cistus*, Thèse de doctorat, Université de Pharmacie de Montpellier, 1984.
- (164) Gaussen H., Leroy J.F., Ozenda P., Précis de botanique, Ed. Masson, Paris, 1982, **2**, 296.
- (165) Lawrence B.M., Progress in essentials oils, *Perfumer & Flavorist*, 1984, **9** (Feb/Mar), 49-60.
- (166) Lawrence B.M., Progress in essentials oils, *Perfumer & Flavorist*, 1986, **11** (Aug/Sept), 73-80.
- (167) Lawrence B.M., Progress in essentials oils, *Perfumer & Flavorist*, 1990, **15** (Mar/Apr), 78-79.
- (168) Sabetay S., Constantes analytiques des essences, concrètes et absolues de ciste-labdanum de l'Estérel, *Industrie de la parfumerie*, 1950.
- (169) Trabaud L., The Ciste-labdanum of Provence, *Soap, Perfumer & Cosmetics*, 1950, **23**, 372-376.
- (170) Trabaud L., The Ciste-labdanum oil, *Soap, Perfumer & Cosmetics*, 1951, **24**, 449-452.
- (171) Fournier P., Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Tome I. Ed. Paul Lechatelier. 1947.
- (172) Cocker J.D., Halsall T.G., Bowers A., The chemistry of Gum Labdanum. Part I. Some Acidic Constituents, *J. Chem. Soc.*, 1956, 4259-4262.
- (173) Cocker J.D., Halsall T.G., The chemistry of Gum Labdanum. Part II. The structure of labdanolic acid, *J. Chem. Soc.*, 1956, 4262-4271.
- (174) Cocker J.D., Halsall T.G., The chemistry of Gum Labdanum. Part III. A proof of the  $\beta$ -configuration of the C9 side-chain of labdanolic acid, *J. Chem. Soc.*, 1957, 4401-4403.
- (175) Tabacik-Wlotzka C., Mousseron M., Chafai A., Etude des constituants neutres du *Cistus ladaniferus*, *Bull. Soc. Chim. F.*, 1963, 2299-2306.

- (176) Tabacik-Wlotzka C., Identification du déhydro-acbiétate de méthyle dans la fraction neutre de la concrète de Ciste, *Bull. Soc. Chim. F.*, 1964, 618-619.
- (177) Tabacik-Wlotzka C., Bard M., Etude chimio-taxonomique dans le genre *Cistus*, *Phytochemistry*, 1971, **10**, 3093-3109.
- (178) De Pascual Teresa J., Urones J.G., Gonzales Mateos F., Terpenoides monohidroxilados de la gommorresina de *Cistus ladaniferus* L., *An. Quim.*, 1977, **73**, 1024-1028.
- (179) De Pascual Teresa J., Portela Marcos C., Sanchez Bellido C.I., Estudio de la gomorresina del *C. ladaniferus* (L.), II. 3,7-dimethyl-kampferol o « jaranol », *An. Quim.*, 1967, **64**, 623-632.
- (180) De Pascual Teresa J., Urones J.G., Basabe P., Aubanell F.H., Componentes minoritarios de *Cistus ladaniferus* L. : Lactonas, *An. Quim.*, 1979, **75**, 335-340.
- (181) De Pascual Teresa J., Urones J.G., Montana Pedrero A., Basabe P., Functionalization at C-12 in labdanic diterpenes : synthesis of the natural diterpenic lactones isolated from *Cistus ladaniferus* L., *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 5717-5720.
- (182) Urones J., Basabe P., Marcos I.S., Diez Martin D., Sexmero M.J., Peral M.H., Broughton H.B., Chemistry of the labdanediol from *Cistus ladaniferus* L. synthesis of 12-nor-ambreionide and  $\alpha$  and  $\beta$ -levantenolides, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 10389-10398.
- (183) De Pascual Teresa J., Vara A., Urones J., San Feliciano A., Estudio de la gomorresina del *Cistus ladaniferus* (L), IV. Acido ladénico (labd-8(20)-en-15-oico), *An. Quim.*, 1972, **68**, 727-732.
- (184) De Pascual Teresa J., Bermejo Jimenez B., Urones J., San Feliciano A., Estudio de la gomorresina del *Cistus ladaniferus* (L), *Anales de Fisica y Quimica.*, 1966, **62 B**, 569-582.
- (185) De Pascual Teresa J., Bellido I.S., Basade P., Marcos I.S., Ruano L.F., Urones J., Labdane diterpenoids from *Cistus ladaniferus*, *Phytochemistry*, 1982, **21**, 899-901.
- (186) Bats J.P., Caisso E., Arnaudo J.F, Lavoine S., Coutière D., L'extraction du ciste labdanifer : gomme labdanum ou bioconcrète de ciste, 12<sup>èmes</sup> Journées Internationales des Huiles Essentielles, Digne-les-Bains, 2-4 septembre 1993, *Actes : Rivista Italiana EPPOS*, 1994, N° spécial, 602-613.
- (187) Königs R., Gülz P.G., The monoterpenes in the essential leaf oil of *Cistus ladaniferus* L., *Z. Pflanzenphysiol.*, 1974, **72**, 237-238.

- (188) Gülz P.G., Über die Zusammensetzung der atherischen Öle von *Cistus ladaniferus* L., *Parfumerie und Kosmetik*, 1975, **56**, 344-346.
- (189) Proksch P., Gülz P.G., Further oxygenated compounds in the essential oils of *Cistus ladaniferus* L. (Cistaceae), *Z. Naturforsch.*, 1980, **35c**, 529-532.
- (190) Proksch P., Gülz P.G., Budzikiewicz H., Phenylpropanoic acid esters in the essential oil of *Cistus ladaniferus* L. (Cistaceae), *Z. Naturforsch.*, 1980, **35c**, 201-203.
- (191) Vernin G., Mass spectra and Kovats indices of some phenylpropanoic acid esters found in the essential oil of *Cistus ladaniferus* L., *J. Essent. Oil Res.*, 1993, **5**, 563-569.
- (192) De Rijke D., ter Heide R., Boelens H., New compounds with small rings in essential oils, *Perfumer and Flavorist*, 1982, **7**, 31-37.
- (193) Peyron L., Alessandri S., Alessandri A., Huile essentielle de feuillage de *Cistus ladaniferus* L. cultivé en Corse, *Parfums, cosmétiques, Arômes*, 1986, **67**, 59-67.
- (194) Simon-Fuentes A., Sendra J.M., Cunat P., Neutral volatiles of *Cistus ladaniferus* essential oil, *An. Quim.*, 1987, **83**, 201-204.
- (195) Gaudin G., Guenet A., Contribution à la connaissance de l'huile essentielle de Ciste, *7èmes Journées Internationales des Huiles Essentielles, Digne-les-Bains, Rivista Italiana EPPOS*, 1-3 septembre 1988, *Actes*, 155-167.
- (196) Weyerstahl P., Marshall H., Weirauch M., Thefeld K., Surburg H., Constituents of commercial labdanum oil, *Flavour Fragr. J.*, 1998, **13**, 295-318.
- (197) Mariotti J.P., Analyse d'huiles essentielle par chromatographie et RMN du carbone-13 : *Cistus ladaniferus*, *Cistus monspeliensis* et *Stachys glutinosa*. Université de Corse, 1994.
- (198) Mariotti J.P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A.F., Chemical composition of the essential oils of *Cistus ladaniferus* L. cultivated in Corsica (France), *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**: 147-151.
- (199) Robles C., Bousquet-Mélou A., Garzino S., Bonin G., Comparison of essential oil composition of two varieties of *Cistus ladanifer*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2003, **31**, 339-343.
- (200) Berti G., Livi O., Segnini D., Cavero I., Determination of constitution and synthesis of a new flavone from *Cistus monspeliensis* L., *Tetrahedron*, 1967, **23**, 2295-2300.

- (201) Berti G., Livi O., Segnini D., Cistodiol and Cistodioic acid, diterpenoids with a cis-fused clerodane skeleton, *Tetrahedron Letters*, 1970, 1401-1404.
- (202) Cavero I., Livi O., Segnini D., Estrazione, frazionamento ed esame dei costituenti del *Cistus monspeliensis* L., *Annali di Chimica*, 1971, 469-482.
- (203) Gülz P.G., Kobold U., Michaelis K., Vostrowxky O., The composition of terpene hydrocarbons in the essential oil from leaves of four *Cistus* species, *Z. Naturforsch.*, 1984, **39c**, 699-704.
- (204) Mariotti J.P., Tomi F., Bernardini A.F., Costa J., Casanova J., *12èmes journée internationales Huiles essentielles*, Digne-les-Bains, 3-4 septembre 1993, *Actes : Rivista Italiana EPPOS*, 1994, N° spécial, 614-620.
- (205) Robles C., Garzino S., Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves, *Phytochemistry*, **53**, 2000, 71-75.
- (206) Angelopoulou D., Demetzos C., Dimas C., Perdetzoglou D., Loukis A., Essential oils and hexane extracts from leaves and fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic activity of ent-13-epi-manoyl oxide and its isomers, *Planta Med.*, 2001, **67**, 168-171.
- (207) Demetzos C., Mitaku S., Loukis A., Harvala C., A new drimane sesquiterpene, isomers of manoyl oxide and other volatile constituents from the resin "ladano" of *Cistus incanus* subsp. *creticus* (L.) Heywood, *J. Essent. Oil Res.*, 1994, **6**, 37-41.
- (208) Demetzos C., Stahl B., Anastassaki T., Gazouli M, Tzouvelekis L.S., Rallis M., Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin ladano, of its essential oil and of the isolated compounds, *Planta Med.*, 1999, **65**, 76-78.
- (209) Demetzos C., Loukis A., Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* L., *J. Essent. Oil Res.*, 1995, **7**, 407-410.
- (210) Demetzos C., Katerinopoulos H., Kouvaralis A., Stratigakis N., Loukis A., Ekonomakis C., Spiliotis V., Tsaknis J., Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*, *Planta Med.*, 1997, **63**, 477-479.
- (211) Anastassaki T., Demetzos C., Perdetzoglou D., Gazouli M, Loukis A., Harvala C., Analysis of labdane-type diterpenes from *Cistus creticus* (subsp. *creticus* and subsp. *eriocephalus*), by GC and GC-MS, *Panta Med.*, 1999, **65**, 735-739.
- (212) Demetzos C., Anastassaki T., Perdetzoglou D., A chemometric interpopulation of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in Crete (Greece), *Z. Naturforsch.*, 2002, **57c**, 89-94.

- (213) De Pascual Teresa J., Urones J.G., Bermejo F., Componentes de *C. laurifolius* L., I. Acido acetil-laurifolico, *An. Quim.*, 1978, **74**, 1540.
- (214) De Pascual Teresa J., Urones J.G., Basabe P., Llanos A., Sanchez I., Flavonoides de Cistaceae, *An. Quim.*, 1979, **75**, 168-171.
- (215) Ögütveren M., Tetik S.S., Composition of the essential oil of *Cistus laurifolius* L. from Turkey, *J. Essent. Oil Res.*, 2004, **16**, 24-25.
- (216) Demetzos C., Chinou J.B., Charvala C.E., Homatidou V.I., The essential oil of *Cistus parviflorus* and its antimicrobial activity in comparison with *C. monspeliensis*, *Filoterapia*, 1989, **5**, 439-442.
- (217) Demetzos C., Homatidou V.I., Loukis A., Philianos S.M., The essential oil of *Cistus creticus* : comparison with five other species of the genus *Cistus*, *Planta Med.*, 1989, **55**, 633-634.
- (218) Angelopoulou D., Demetzos C., Perdetzoglou D., An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus* L. growing in Crete (Greece), *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 405-415.
- (219) Demetzos C., Angelopoulou D., Perdetzoglou D., A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece), *Biochem. Syst. Ecol.*, 2002, **30**, 651-665.
- (220) De Pascual Teresa J., Urones J.G., Basabe P., Pinto del Rey J.A., Componentes de *Cistus albidus* L., *An. Quim.*, 1978, **74**, 345-350.
- (221) Llusia J., Peñuelas J., Changes in terpene content and emission in potted Mediterranean woody plants under severe drought, *Can. J. Bot.*, 1998, **76**, 1366-1373.
- (222) Llusia J., Peñuelas J., Seasonal patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions, *Amer. J. Bot.*, 2000, **87**, 133-140.
- (223) Peñuelas J., Llusia J., Seasonal patterns of non-terpenoid C6-C10 VOC emission from seven Mediterranean woody species, *Chemosphere*, 2001, **45**, 237-244.
- (224) Robles C., Garzino S., Essential oil composition of *Cistus albidus* leaves, *Phytochemistry*, 1998, **48**(8), 1341-1345.
- (225) Robles C., Fonctionnement des cistaies à *Cistus albidus* L. et *Cistus monspeliensis* L ; en Provence calcaire et silicieuse à travers la mesure des

réactions écophysiologicals, Thèse de Biologie des Populations et Ecologie, Université de Provence-Aix-Marseille I, 1998.

- (226) Robles C., Bonin G., Garzino S., Potentialités autotoxiques et allélopathiques de *Cistus albidus* L., *Life Sci.*, 1999, **322**, 977-685.
- (227) Palá-Paúl J., Velasco-Negueruela A., Pérez-Alonso J., Seasonal variation in chemical composition of *Cistus albidus* L. from Spain, *J. Essent. Oil Res.*, 2005, **17**, 19-22.
- (228) Maurer B., Hauser A., New sesquiterpenoids from Clary Sage Oil (*Salvia sclarea* L.), *Helv. Chim. Acta*, 1983, **66**(7), 2223-2235.
- (229) Nagahama S., Masato T., Hiroshi K., Masashi S., Sesquiterpene alcohols from *Cryptomeria japonica* and *C. fortunei* leaf oil, *Phytochemistry*, 1993, **33**(4), 879-882.
- (230) Nordin O., Hedenström E., Högberg H.E., Stereochemistry of 1,6-Germacradien-5-ol, a constituent of the needles of scots pine (*Pinus sylvestris*) and of the defense secretion from larvae of the pine sawfly *Neodiprion sertifer*, *Acta Chem. Scand.*, 1999; **53**: 124-132.
- (231) Weyerstahl P., Marschall H., Thefeld K., Subba G.C., Constituents of the essential oil from the rhizomes of *Hedychium gardnerianum* Roscoe, *Flavour Fragr. J.*, 1998, **13**, 377-388.
- (232) Cornwell C.P., Reddy N., Leach D.N., Wyllie G., Germacradienols in the essential oils of the Myrtaceae, *Flavour Fragr. J.*, 2001, **16**, 263-273.
- (233) Weyerstahl P., Marschall H., Seelmann I., Rustaiytan A., Constituents of the essential oil of *Achillea eriophora* DC., *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 71-78.
- (234) Fraga B.M., Cabrera I., Reina M., Terrero D., Two new sesquiterpenes from *Laurus azorica*, *Z. Naturforsch.*, 2001, **56c**, 503-505.
- (235) Schulte-Elte K.H., Ohloff G., Über en-synthesen mit singulett-sauerstoff die farbstoff-sensibilisierende photooxygenierung von (-)-caryophyllen und (-)-isocaryophyllen und die stereochemie der dargestellten caryophylladienol, *Helv. Chim. Acta*, 1968, **51**(3), 494-505.
- (236) Groweiss A., Kashman Y., Eight new xenia diterpenoids from three soft corals of the red sea, *Tetrahedron*, 1983, **39**(20), 3385-3396.
- (237) Li A., Guoren Y., Yang L., Xinfu P., Teng-Kuci Y., Total asymmetric synthesis of (7S,9R)-(+)-bisacumol, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, **14**, 75-78.



- (238) Gonny M., Bradesi P., Casanova J., Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy, *Flavour Fragr. J.*, 2004, **19**, 424-433.
- (239) Gamisans J., Jeanmonod D., Asteraceae-I-Complements au prodrome de la flore corse, Editions des conservatoires et jardins botaniques, 1998, Ville de Genève.
- (240) Lexa A., Fleurentin J., Younos C., Mortier F., Study of antihepatotoxicity of *Eupatorium cannabinum* in mice. An adequate method of screening in vivo antihepatotoxic natural principles, *Phytother. Res.*, 1990, **4**, 148-151.
- (241) Mazza F., Itinerari alla scoperta dell'erbe officinali del Monte Amiata, Scampa Duemila Ed., Abbadia San Salvador, Siena, 2000.
- (242) Dwivedi S.K., Kishore N., Fungitoxicity of some essential oils against *Macrophomina phaseolina*, *Indian Perfum.*, 1990, **34**, 20-21.
- (243) Yadav P., Dubey N.K., Screening of some essential oils against ringworm fungi, *Indian J. Pharm. Sci.*, 1994, **56**, 227-230.
- (244) Dubey N.K., Kishore N., Tiwari T.N., Young L.S., Cytotoxic activity of the essential oils of *Trachyspermum ammi* and *Eupatorium cannabinum*, *Indians Drugs*, 1997, **34**, 471-472.
- (245) Hendriks H., Malingré TH.M., Elema E.T., Pyrrolizidine alkaloids, flavonoids and volatile compounds in the genus *Eupatorium*, *Pharm. Weekbl. Sci.*, 1983, **5**, 281-286.
- (246) Hendriks H., Bos R., Bruins A.P., Analysis of the essential oil of *Eupatorium cannabinum* by combined GC-MS using electron impact and negative ion chemical ionization, *Planta Med.*, 1985, **6**, 541-542.
- (247) Perineau F., Bourrel C., Gaset A., Characterization of fungistatic and bacteriostatic activities of four essential oils rich in lactones (Elecampane, Catnip, *Eupatorium cannabinum*, Tansy), *Rivista Ital. EPPOS.*, Spec Num, 1993, **4**, 694-703.
- (248) Singh G., Pandey S.K., GC-MS analysis of *Eupatorium cannabinum* oil from North India, *J. Aromat. Plant Sci.*, 1999, **21**, 8-10.
- (249) Senatore F., De Fusco R., Napolitano F., *Eupatorium cannabinum* L. ssp. *cannabinum* (Asteraceae) Essential oil : Chemical Composition and Antibacterial Activity, *J. Essent. Oil Res.*, 2001, **13**, 463-466.

- (250) Flamini G., Cioni P.L., Morelli L., Analysis of the essential oil of the leaves and flowers/fruits of *Eupatorium cannabinum* L. from South Tuscany (Central Italy), *J. Essent. Oil Res.*, 2003, **15**, 127-129.
- (251) Dominguez X.A., The biology and chemistry of the Compositae, Academic Press, London-New York-San Francisco (Heywood V.H., Harborne J.B, Turner B.L., Eds.), 1977, Vol. II, 487-502.
- (252) Woerdenbag H.J., *Eupatorium cannabinum* L. A review emphasizing the sesquiterpene lactones and their biological activity, *Pharm. Weekbl. Sci.*, 1986, **8**, 245-251.
- (253) Herz W., Chemistry of the Eupatoriinae, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 1115-1137.
- (254) Droždž B., Bialek-Grygiel G., Composition of lactone fraction of leaves and inflorescence of *Eupatorium cannabinum*, *Diss. Pharm. Pharmacol.*, 1971, **23**, 537-540.
- (255) Droždž B., Grabarczyk H., Samek Z., Holub M., Herout V., Šorm F., Sesquiterpene lactones from *Eupatorium cannabinum* L. Revision of structure of Eupatoriopicrin, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 1972, **37**, 1546-1554.
- (256) Gizycky V. F., *Eupatorium cannabinum* L., Wasserdost und Verwandte (III), *Pharmazie*, 1951, **6**, 686-688.
- (257) Dolejš L., Herout V., On terpenes. CXLV. Constitution of eupatoriopicrin, a germacranolide from *Eupatorium cannabinum* L., *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 1962, **27**, 2654-2661.
- (258) Bos R., Hendriks H., Bruins A.P., Schripsema J., Kloosterman J., Sipma G., The presence of some sesquiterpene lactones in *Eupatorium cannabinum* L., *Farm. Tijdschr. Belg.*, 1984, **61**, 398.
- (259) Bohlmann F., Schmeda-Hirschmann G., Jakupovic J., Heliangolides and germacrolides from *Disynaphia multicrenulata*, *Phytochemistry*, 1984, **23**, 1435.
- (260) Jakupovic J., Pathak V.P., Bohlmann F., Gage D., Dillon M.O., Sesquiterpene lactones from *Helogyne hutchisonii*, *Phytochemistry*, 1986, **25**, 2563.
- (261) Zdero C., Bohlmann F., Eupatoriopicrin 19-*O*-linolenate and other constituents from *Eupatorium cannabinum*, *Planta Med.*, 1987, **53**, 169-172.
- (262) Jakupovic J., Sun F., Bohlmann F., King R.M., Further sesquiterpene lactones from *Eupatorium altissimum*, *Planta Med.*, 1987, **53**, 97-98.

- (263) Ito K., Sakakibara Y., Haruna M., Lee K.H., Four new germacranolides from *Eupatorium lindleyanum* DC., *Chem. Lett.*, 1979, 1469.
- (264) Rücker G., Schenkel E. P., Manns D., Mayer R., Hausen B.M, Heiden K., Allergic sesquiterpene lactones from *Eupatorium cannabinum* L. and *Kaunia Rufescens* (Lund ex de Candolle), *Natural toxins*, 1997, **5**, 223-227.
- (265) Bohlmann F., Fiedler L., Notiz uber ein neues germacranolid aus *Chromolaena glaberrima* (DC) K. et R., *Chem. Ber.*, 1978, **11**, 408.
- (266) Hladoń B., Drożdż B., Grabarczyk H., Bobkiewicz T., Obszewski J., Sesquiterpene lactones. Part XIII. Cytotoxic activity of eupatolide and eupatoriopicrin on human and animal malignant cells in tissue culture *in vitro*, *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1975, **27**, 429-438.
- (267) Hladoń B., Drożdż B., Holub M., Bobkiewicz T., Sesquiterpene lactones. Part XVI. *In vitro* studies on cytotoxic properties of sesquiterpene lactones in tissues cultures of human and animal malignant cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (Warsz), 1975, **23**, 845-855.
- (268) Hladoń B., Chodera A., Sesquiterpene lactones. Part XVII. Cytostatic and pharmacological activity. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (Warsz), 1975, **23**, 857-865.
- (269) Slee P.H.Thj., Van Oosterom A.T, De Bruijn E.A., Predictive testing in cancer chemotherapy; I. *In vivo*. *Pharm. Weekbl. Sci.*, 1985, **7**, 93-99.
- (270) Woerdenbag H.J, Meijer C., Mulder N.H., De Vries E.G.E, Hendriks H., Malingré Th. M., Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of some sesquiterpene lactones on a human lung carcinoma cell line using the Fast Green dye exclusion assay. *Planta Med.*, 1986, **24**, 112-114.
- (271) Woerdenbag H.J, Lemstra W., Malingré Th. M., Konings A.W.T., Phytopharmacological investigation of the cytostatic effect of eupatoriopicrin on the Lewis Lung tumor. Federation of medical scientific societies, proceeding of the the 27<sup>th</sup> Dutch federation meeting, Groningen: Federation of medical scientific societies, 1986, 452.
- (272) Siebertz R., Proksch P., Wray V., Witte L., Accumulation and biosynthesis of benzofurans in root cultures of *Eupatorium cannabinum*, *Phytochemistry*, 1989, **28**, 789-793.
- (273) Gryzbowska J., Jerzmanowska Z., *Studies on Eupatorium* III. Chemical analysis of roots and stems with leaves. *Rozniki Chem.*, 1954a, **28**, 213-231. *Chemical Abstract*, 48, 12379.

- (274) Gryzbowska J., Jerzmanowska Z., Witkowski H., *Studies on Eupatorium* II. Isolation of triterpene taraxasterol ( $\alpha$ -lactuceryl), *Rozniki Chem.*, 1954b, **28**, 197-212. *Chemical Abstract*, **48**, 12378.
- (275) Pedersen J., Echitanine and supinine: pyrrolizidine alkaloids from *Eupatorium cannabinum*, *Phytochemistry*, 1975, **14**, 2086-2087.
- (276) Pagani F., Constituents of *Eupatorium cannabinum* L. var. *syriacum* (Jacq.) (Compositae). Note III. Isolation of dammaradienyl acetate and pyrrolizidine alkaloids. *Boll. Chim. Farm.*, 1991, **129**, 281-282 ; *Chemical Abstracts*, **115**, 228434y.
- (277) Luethy J., Brauchli J., Zweifel V., Schmid P., Schlatter Ch., *Pharm. Acta Helv.*, 1984, **59**, 242-246.
- (278) Hendriks H., Balraadjsing W., Huizing H.J., Bruins A.P., Investigations into the presence of pyrrolizidine alkaloids in *Eupatorium cannabinum* by means of positive and negative ion chemical ionization GC-MS, *Planta Med.*, 1987, **53**, 456-461.
- (279) Elema E.T., Schripsema J., Malingré T.M., Flavones and flavonol glycosides from *Eupatorium cannabinum* L., *Pharm. Weeblad Sci. Ed.*, 1989, **11**, 161 ; *Chemical Abstract*, **112**, 131991c.
- (280) Waller G.R., Biochemical applications of mass spectrometry, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., 1972, New York.
- (281) Daniel A., Pavia A.A., Spectrométrie de masse en série du bornane I : bornanes monosubstitués, *Org. Mass. Spectrom.*, 1971, **5**, 1237-1259.
- (282) Robbiani R., Seibl J., Elimination reactions in the gaz phase-I : elimination of water and acetic acid in epimeric borneols and bornylacetate, *Org. Mass Spectrom.*, 1973, **7**, 1153-1164.
- (283) Gamisans J., Jeanmonod D., Asteraceae-II-Complements au prodrome de la flore corse, Editions des conservatoires et jardins botaniques, 2004, Ville de Genève.
- (284) Marzocchi J.F., Gamisans J., La flore endémique de la Corse, Edisud, 1996, Aix-en-Provence.
- (285) Fernandez I.A., Aguilar J.F., Panero J.L., Feliner G.N., A phylogenetic analysis of *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae) based on morphological, nuclear ribosomal (ITS), and chloroplast (trnL-F) evidence, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2001, **20**, 41-64.

- (286) David J. R., The biology and chemistry of the Compositae, Academic Press, London-New York-San Francisco (Heywood V.H., Harborne J.B, Turner B.L., Eds.), 1977, Vol. II, 831-850.
- (287) Réyraud J., Raynaud J., Voirin B., Sur la présence de deux flavones méthoxylés rares chez *Doronicum grandiflorum* Lam. (Composées), *Pharmazie*, 1983, **38**, 628.
- (288) Réyraud J., Raynaud J., Sur la présence d'Onopordine chez *Doronicum grandiflorum* Lam. (Composées), *Pharmazie*, 1984, **39**, 126.
- (289) Réyraud J., Etude botanique, chimique et chimiosystématique du genre *Doronicum* (Compositae) et plus particulièrement de l'espèce *Doronicum grandiflorum*, Doctorat d'état de Pharmacie, 1984, Lyon.
- (290) Réyraud J., Raynaud J., Les flavonoïdes de *Doronicum grandiflorum*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 1986, **14**, 191-193.
- (291) Aleiva S., Abdullaev U., Telezhenetskaya M., Yumusov S., *Doronicum macrophyllum*, *Khim. Prir. Soedin.*, 1976, 194.
- (292) Bohlmann F., Zdero C., Neue benzofuranederivate aus *Doronicum austriacum* Jacq., *Tetrahedron letters*, 1970, **41**, 3575-3576.
- (293) Bohlmann F., Grenz M., Neue tremeton-derivate aus *Doronicum macrophyllum*, *Phytochemistry*, 1979, **18**, 179-181.
- (294) Bohlmann F., Abraham W-R., Ein neuer sesquiterpenalkohol und andere inhaltsstoffe aus *Doronicum pardalianches*, *Phytochemistry*, 1979, **18**, 668-671.
- (295) Bohlmann F., Dhar A.T., Ahmed M., Thymol derivatives from *Doronicum hungaricum*, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 1850-1851.
- (296) Shtacher G., Kashman Y., Chemical investigation of volatile constituents of *Inula viscosa*, *Tetrahedron*, 1971, **27**, 1343-1349.
- (297) Bohlmann F., Zdero C., Neue thymol-derivate aus *Arnica amplexicaulis*, *Tetrahedron letters*, 1972, **28**, 2827-2828.
- (298) Bohlmann F., Zdero C., Neue norkauren- und thymol-derivate aus *Athrixia*-arten, *Phytochemistry*, 1977, **16**, 1243-1245.
- (299) Bohlmann F., Mahanta P.K., Suwita Al., Suwita An., Natu A., Zdero C., Dorner W., Ehlers D., Grenz M., Neue sesquiterpenlactone und andere inhaltsstoff aus vertretern der Eupatorium-gruppe, *Phytochemistry*, 1977, **16**, 1973-1981.

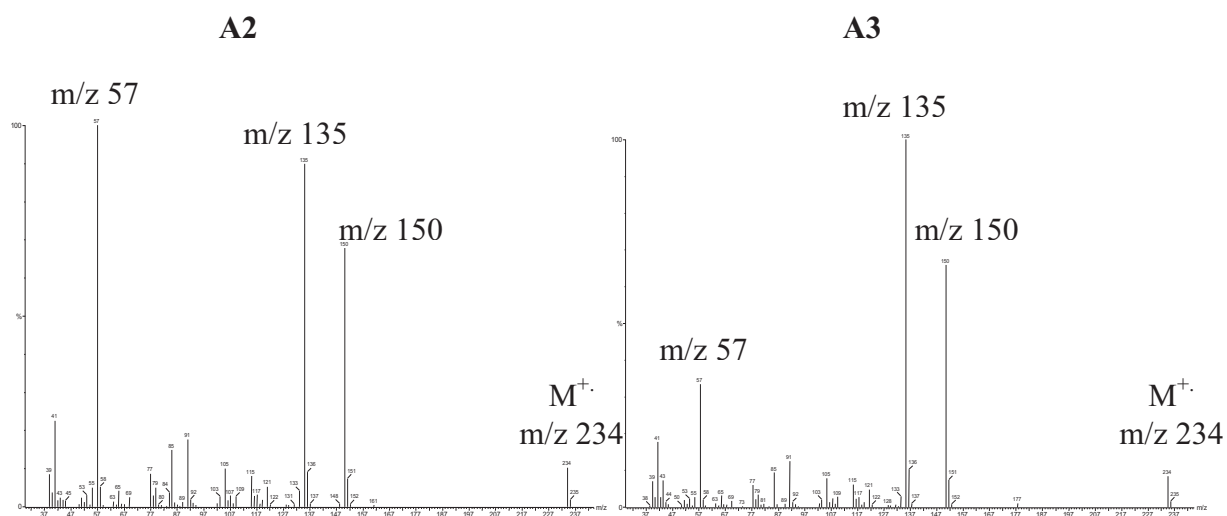
- (300) Bohlmann F., Jakupovic J., Lonitz M., Naturally occurring terpene derivatives. 76. Constituents of the *Eupatorium* group, *Chem. Ber.*, 1977, **110**, 301-314.
- (301) Bohlmann F., Zitzkowsky P., Suwita A., Fiedler L., Naturally occurring terpene derivatives. Part 161. Cis-colavenic acid and further constituents from species of tribe Eupatorieae, *Phytochemistry*, 1978, **17**, 2101-2105.
- (302) Bohlmann F., Zdero C., Neue sesquiterpenlactone und thymol-derivate aus *Inula*-arten, *Phytochemistry*, 1977, **16**, 1243-1245.
- (303) Bohlmann F., Mahanta P.K., Jakupovic J., Rastogi C., Natu A., New sesquiterpene lactones from *Inula* species, 1978, *Phytochemistry*, **17**, 1165-1172.
- (304) Bohlmann F., Suwita A., Naturally occurring terpene derivatives. Part 158. New phloroglucinol derivatives from *Leontonyx* species and further compounds from representatives of the tribe Inulaea, *Phytochemistry*, 1978, **17**, 1929-1934.
- (305) Bohlmann F., Jakupovic J., Robinson H., King R.M., Neue diterpene aus *Schkuhria*-arten, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 881-884.
- (306) Bohlmann F., Jakupovic J., King R.M., Robinson H., Chromones, and flavans from *Marshallia obovata*, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 881-884.
- (307) Bohlmann F., Zdero C., Jakupovic J., Robinson H., King R.M., Eriolanolides, eudesmanolides and a rearranged sesquiterpene from *Eriophyllum* species, *Phytochemistry*, 1981, **20**, 2239-2244.
- (308) Bohlmann F., Kramp W., Rajinder K, Gupta K, King R.M., Robinson H., Four guaianolides and other constituents from three *Kaunia* species, *Phytochemistry*, 1981, **20**, 2375-2378.
- (309) Bohlmann F., Adler A., Jakupovic J., King R.M., Robinson H., Naturally occurring terpene derivatives. Part 412. A dimeric germacranolide and other sesquiterpene lactones from *Mikania* species, *Phytochemistry*, 1982, **21**, 1349-1355.
- (310) Willuhn G., Junior I., Wendisch D., Desmethoxy-encecalin und thymolderivate aus *Arnica sachalinensis*, *Planta Med.*, 1986, **52**, 349-351.
- (311) Passreiter C.M, Matthiesen U., Willuhn G., 10-acetoxy-9-chloro-8,9-dehydrothymol and further thymol derivatives from *Arnica sachalinensis*, *Phytochemistry*, 1998, **49**, 777-781.
- (312) Passreiter C.M, Florack M., Willuhn G., Goerz G., Allergische Kontaktdermatitis auf Asteraceae, *Dermatosen*, 1988, **36**, 79-82.

- (313) Trang N.T.D., Wanner M.J., Koomen G-J., Dung N.X., New acetophenone and thymol derivatives from *Eupatorium stoechadosmum*, *Planta Med.*, 1993, **59**, 480-481.
- (314) Tori M., Ohara Y., Nakashima K., Sono M., Thymol derivatives from *Eupatorium fortunei*, *J. Nat. Prod.*, 2001, **64**, 1048-1051.
- (315) Joseph-Nathan P., Wesener J.R., Günther H., A two-dimensional NMR study of angelic and tiglic acid, *Org. Magn. Reson.*, 1984, **22**(3), 190-191.

# **ANNEXES**

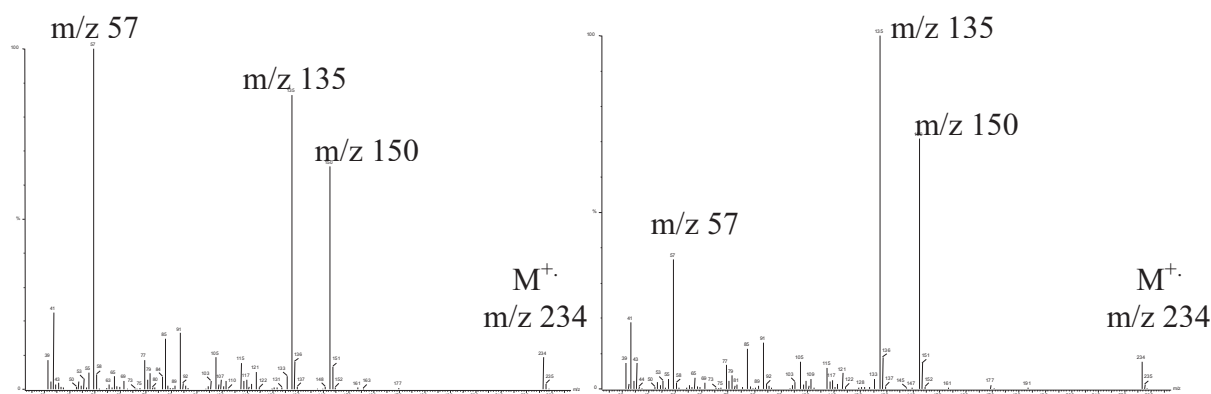


Annexe 1 : spectres de masse en CPG/SM-IE de **A2**, de **A3**,  
 du 2-méthylbutyrate de thymyle, de l'isovalérate de thymyle et du valérate de thymyle

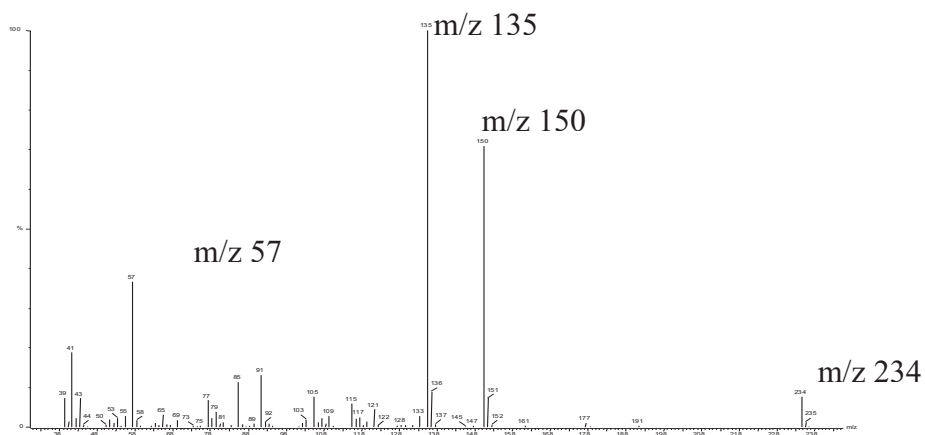


**2-méthylbutyrate de thymyle**

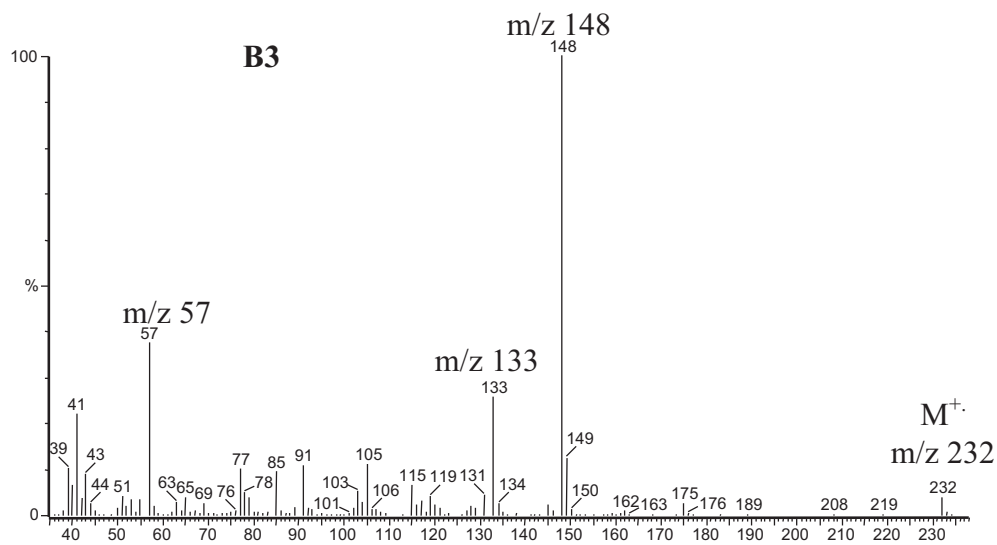
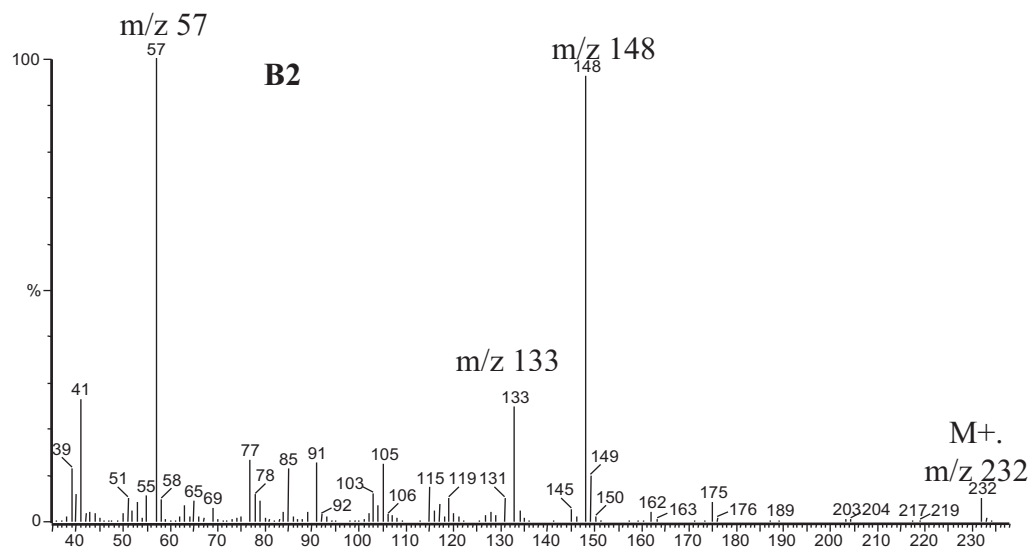
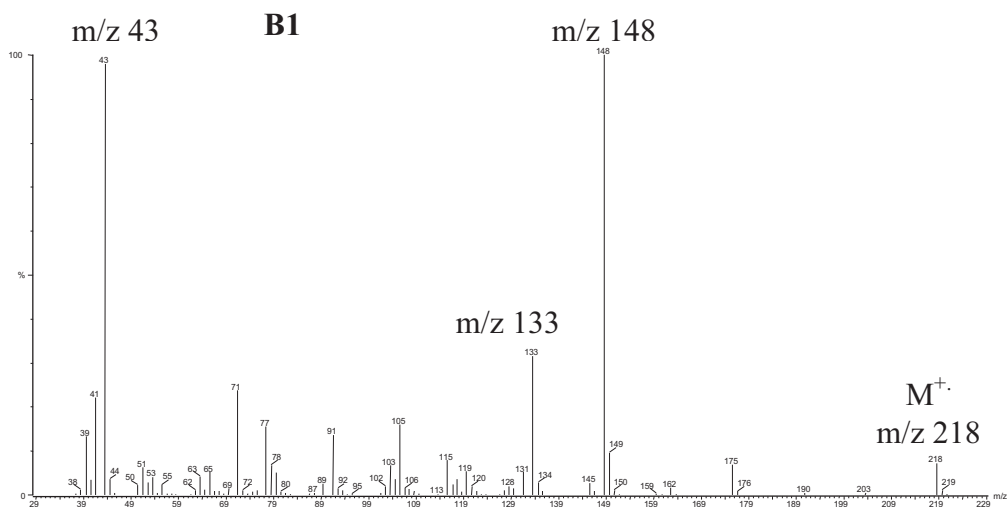
**isovalérate de thymyle**



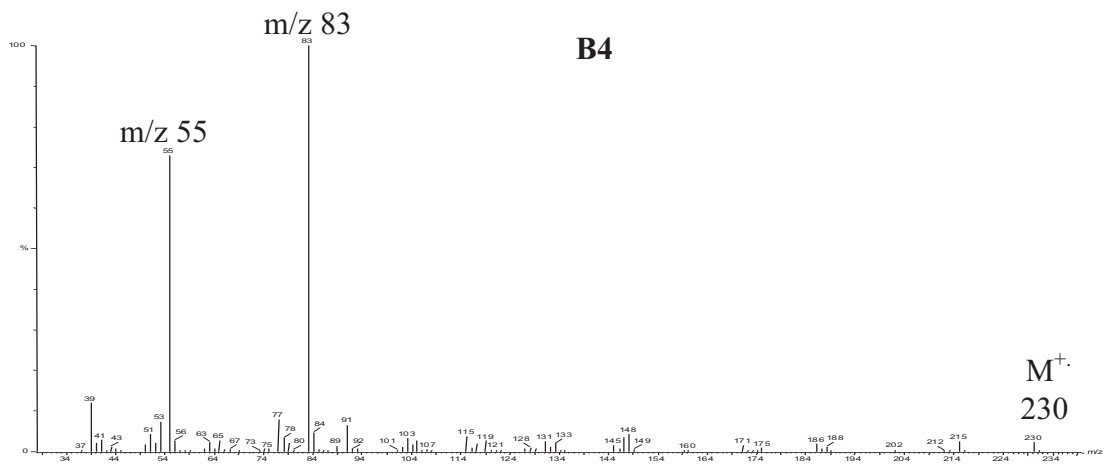
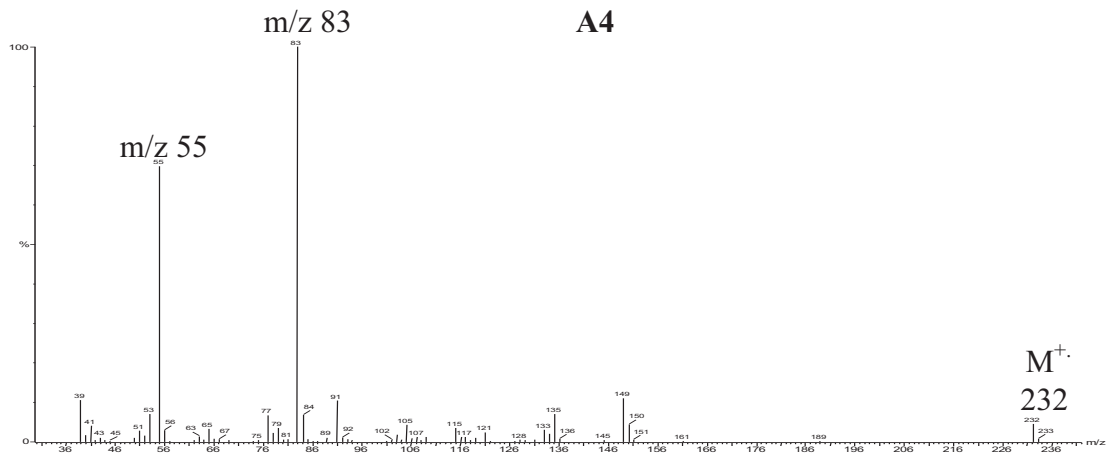
**valérate de thymyle**



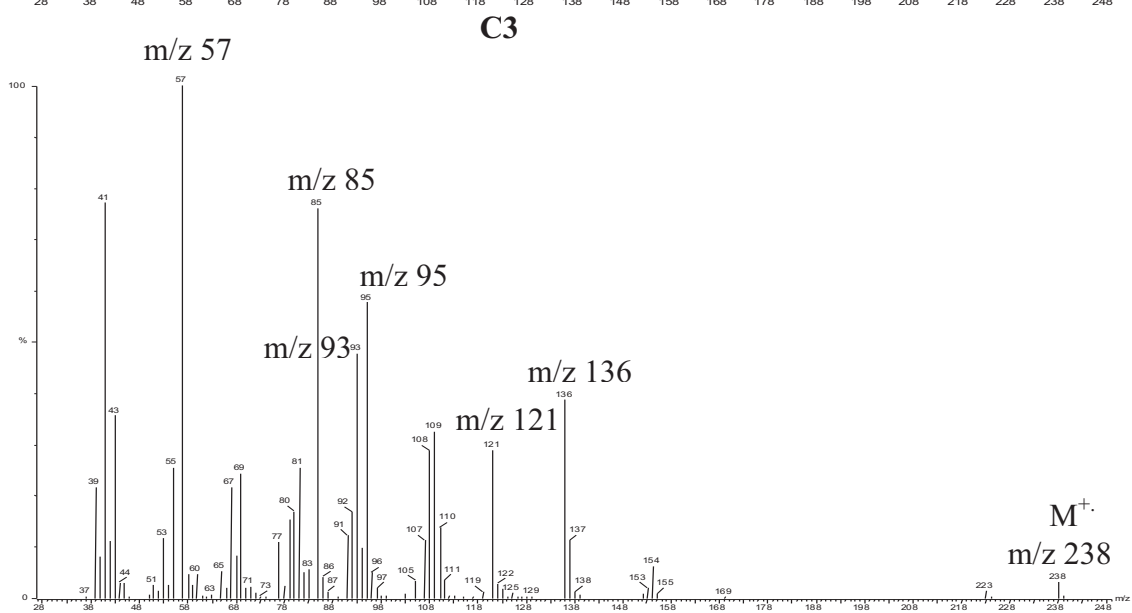
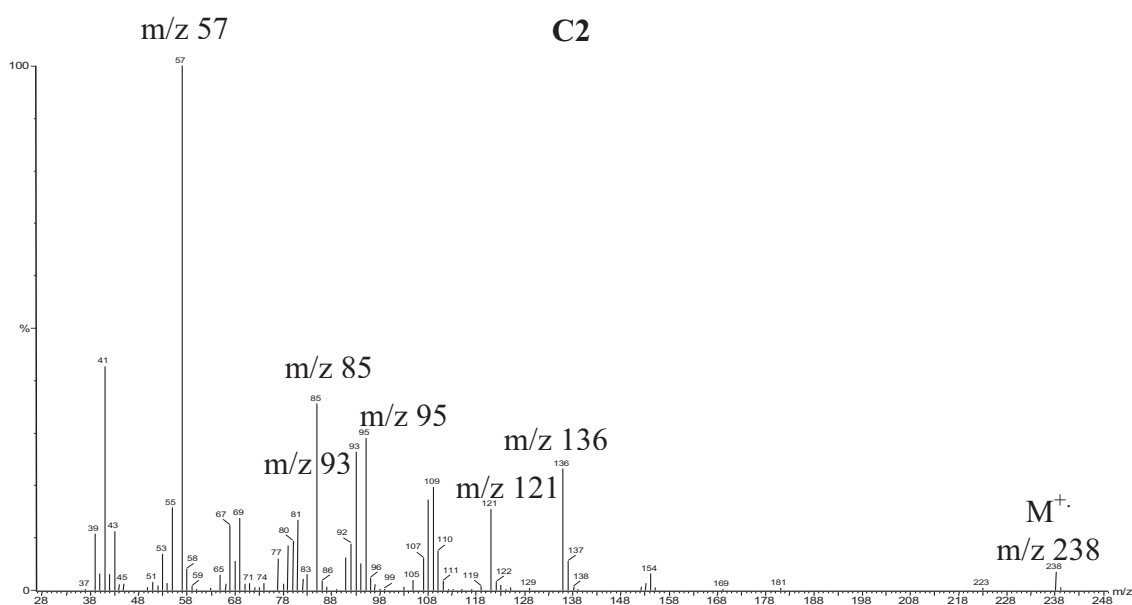
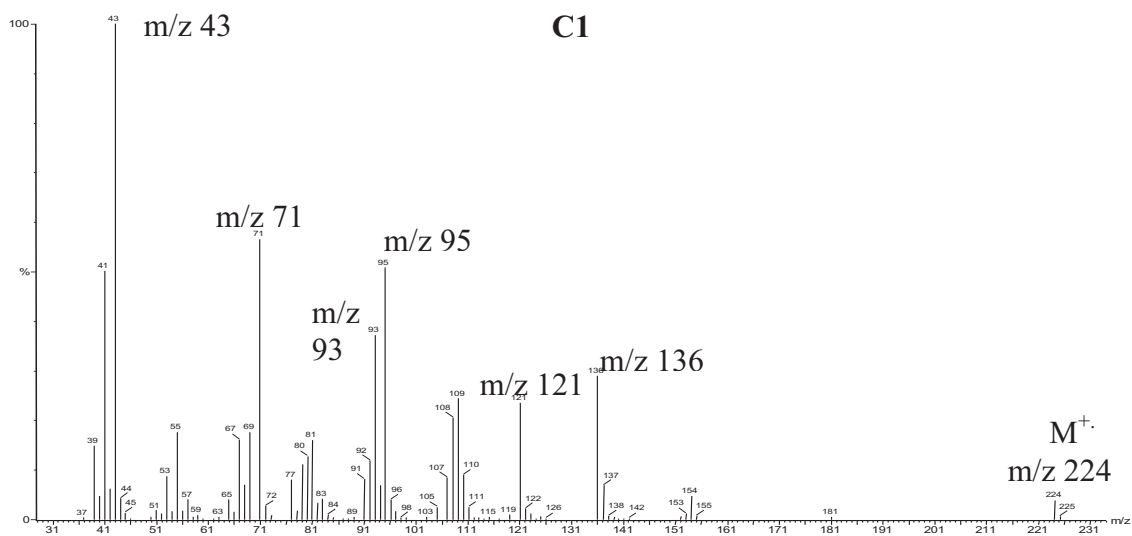
Annexe 2 : spectres de masse en CPG/SM-IE de **B1**, **B2** et **B3**



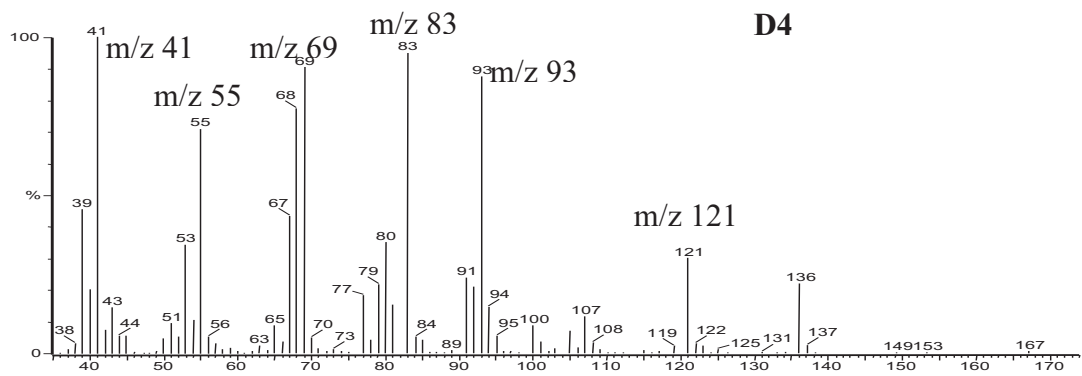
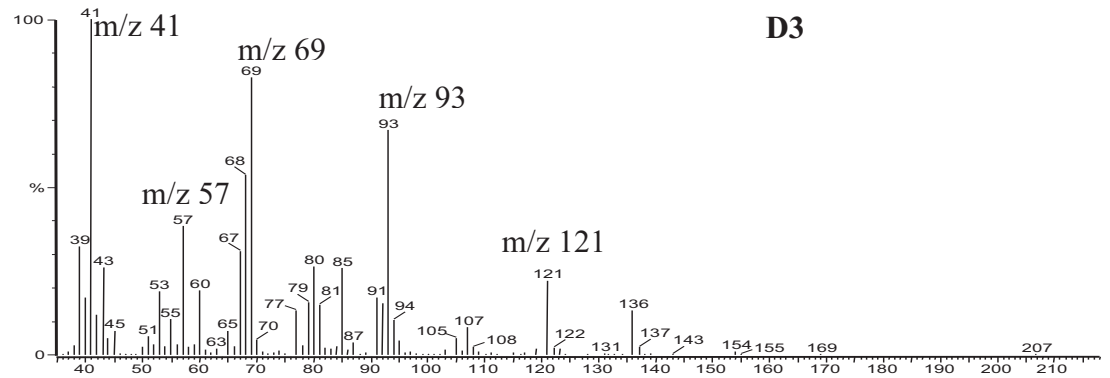
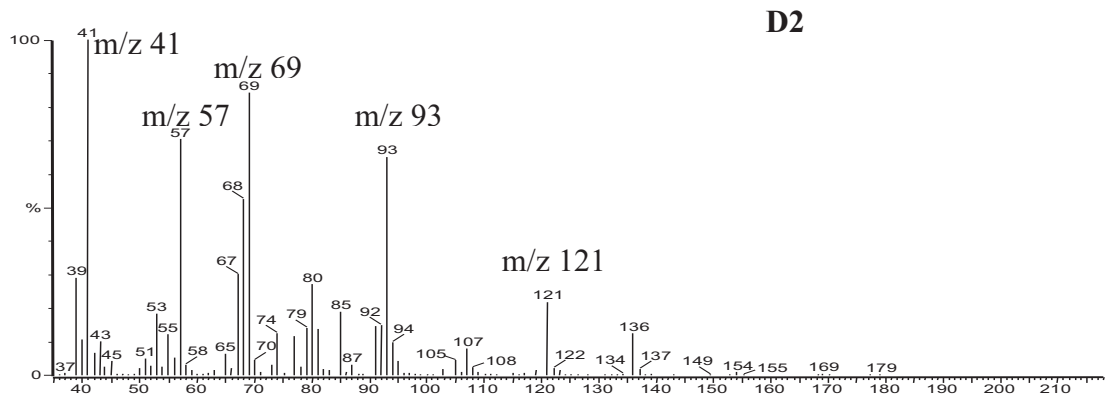
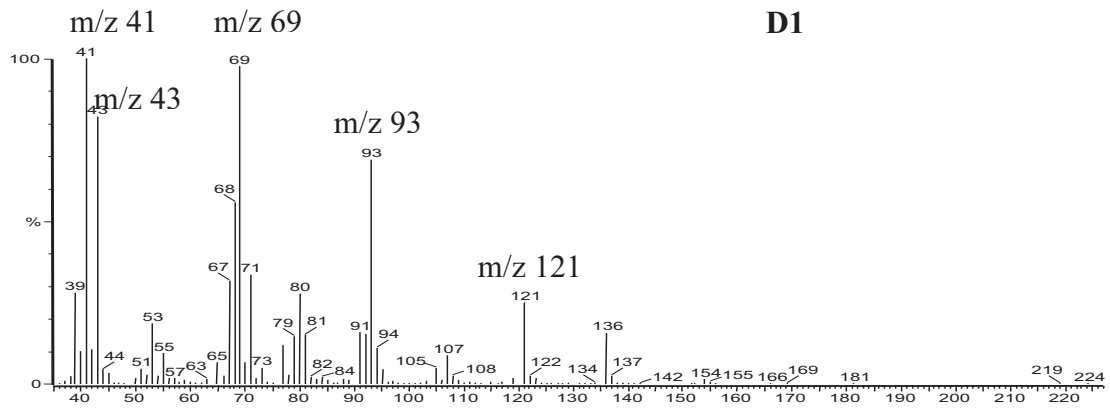
Annexe 3 : spectres de masse en CPG/SM-IE de **A4** et **B4**



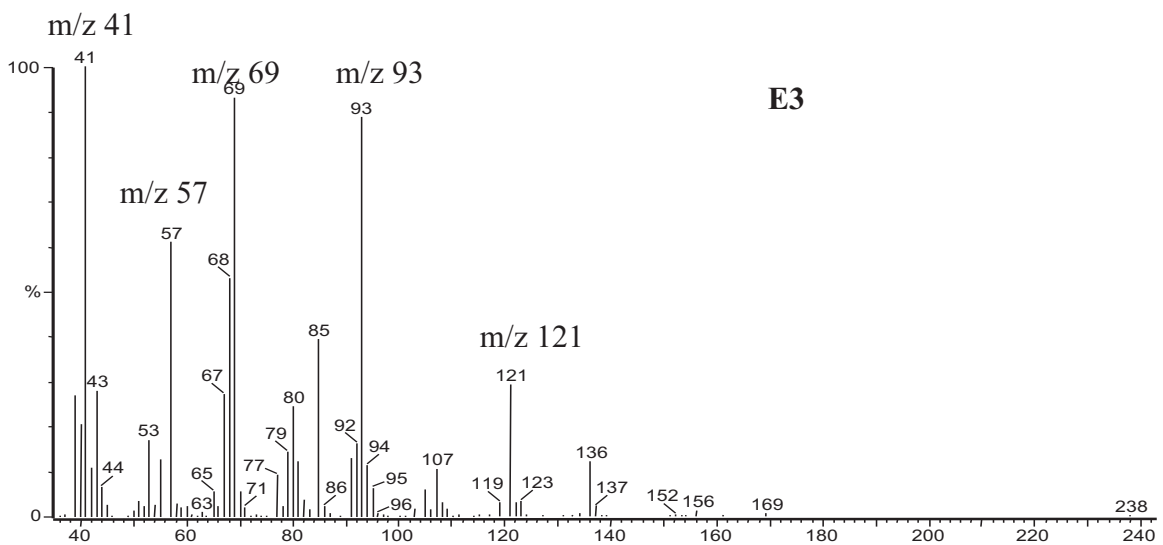
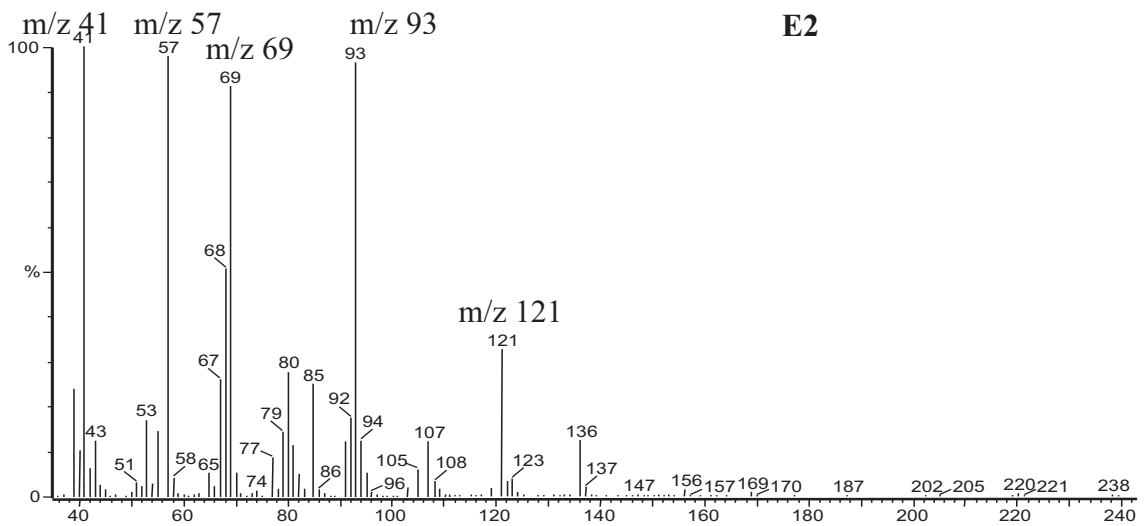
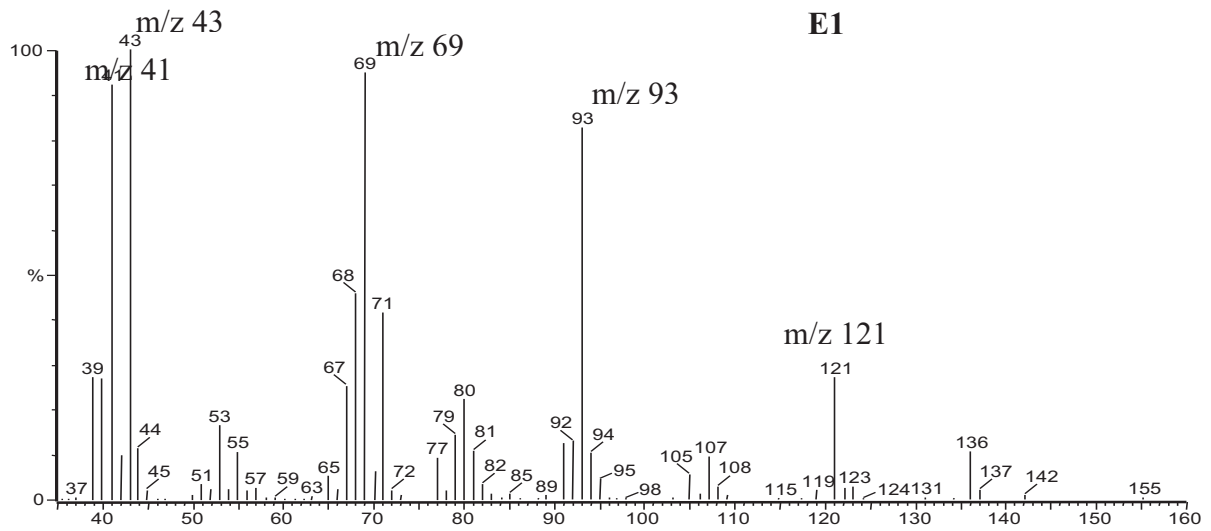
Annexe 4 : spectres de masse en CPG/SM-IE de C1, C2 et C3.



Annexe 5 : spectres de masse en CPG/SM-IE de **D1-D4**

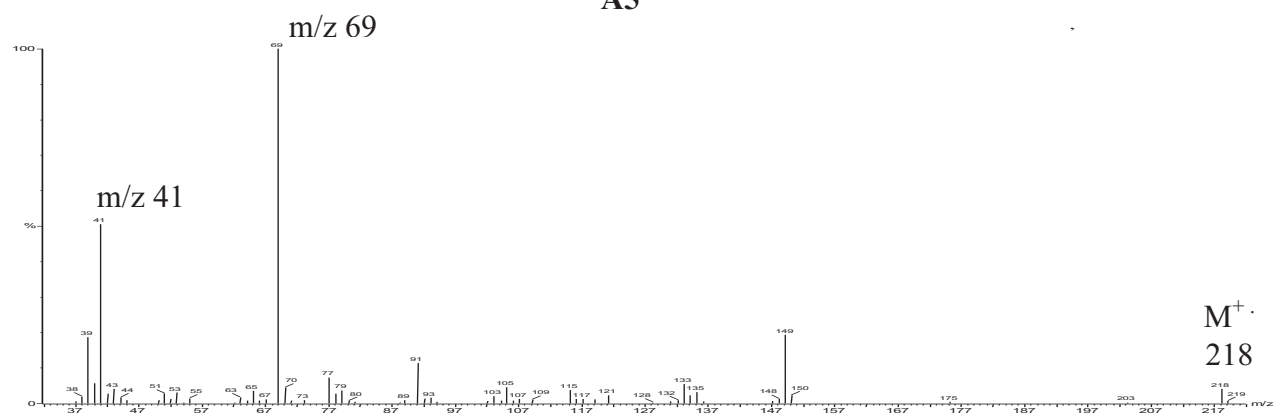


Annexe 6 : spectres de masse en CPG/SM-IE de E1-E3

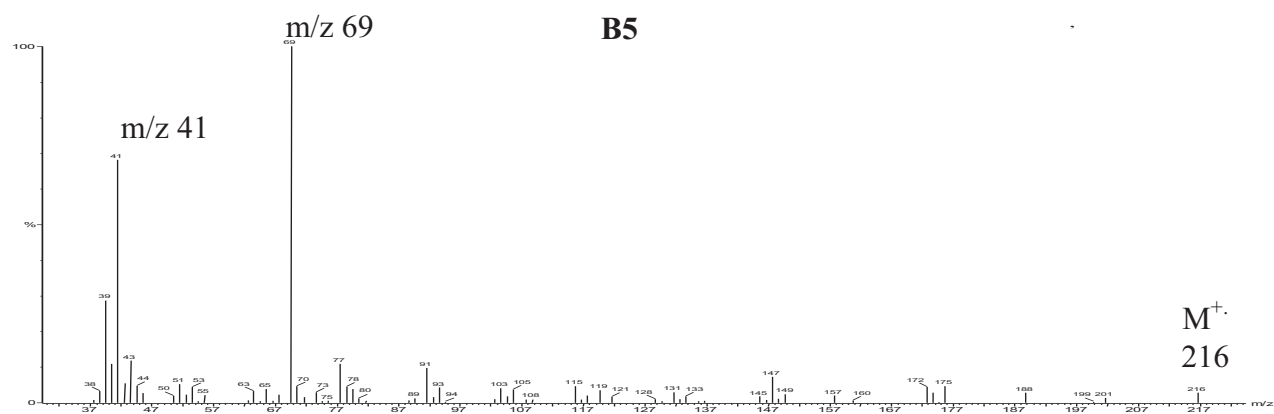


Annexe 7 : spectres de masse en CPG/SM-IE de A5, B5, A6 et B6

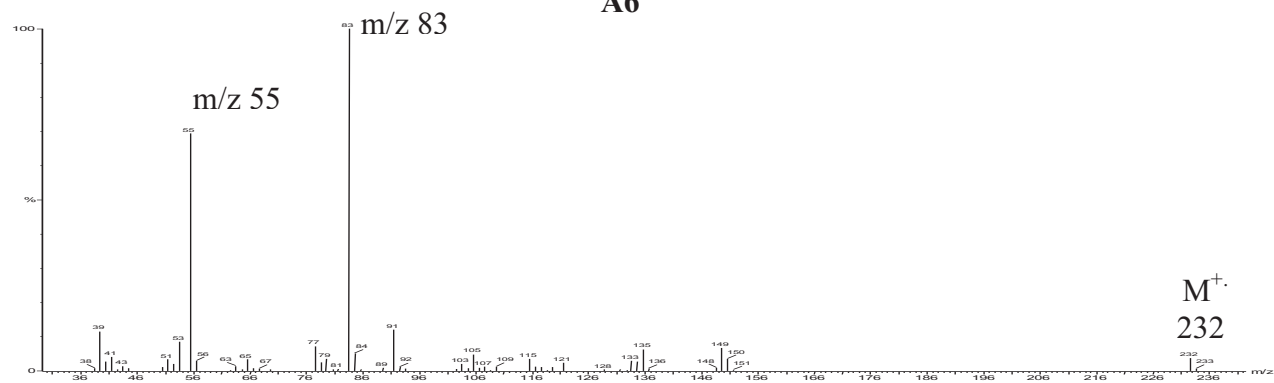
A5



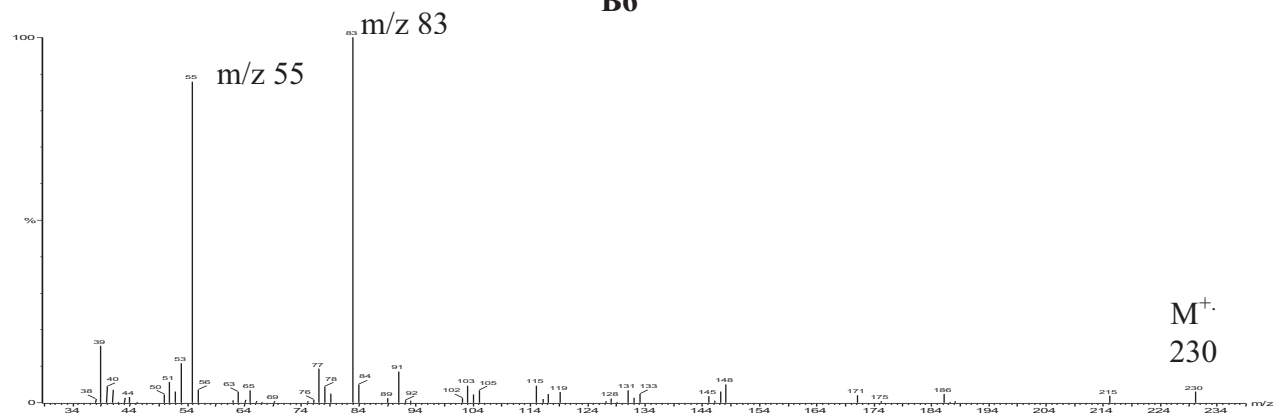
B5



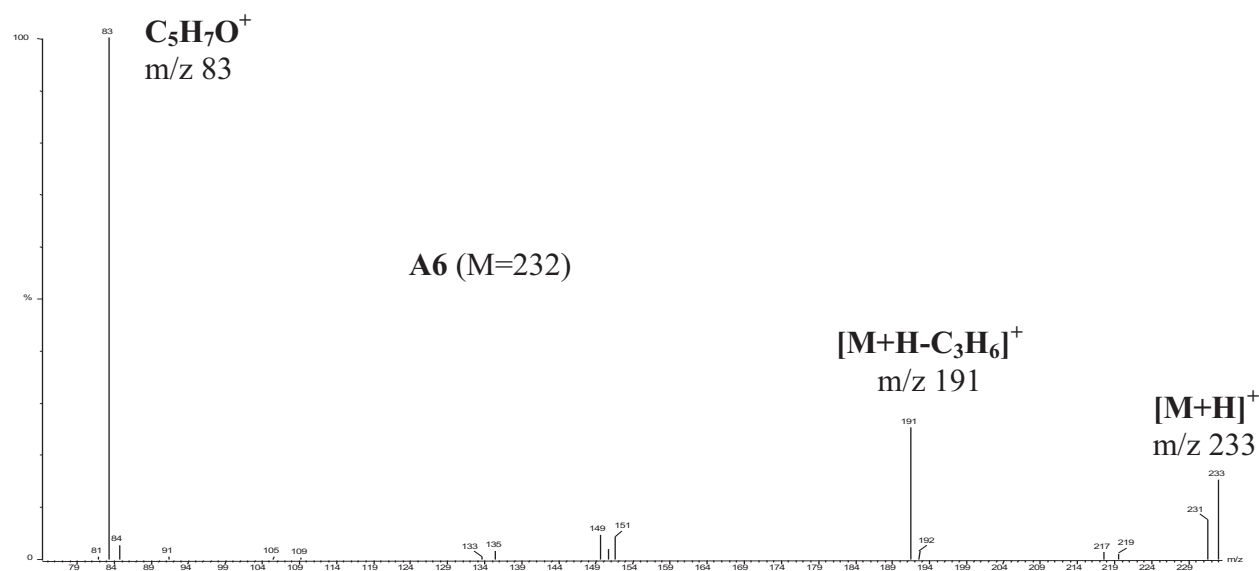
A6



B6



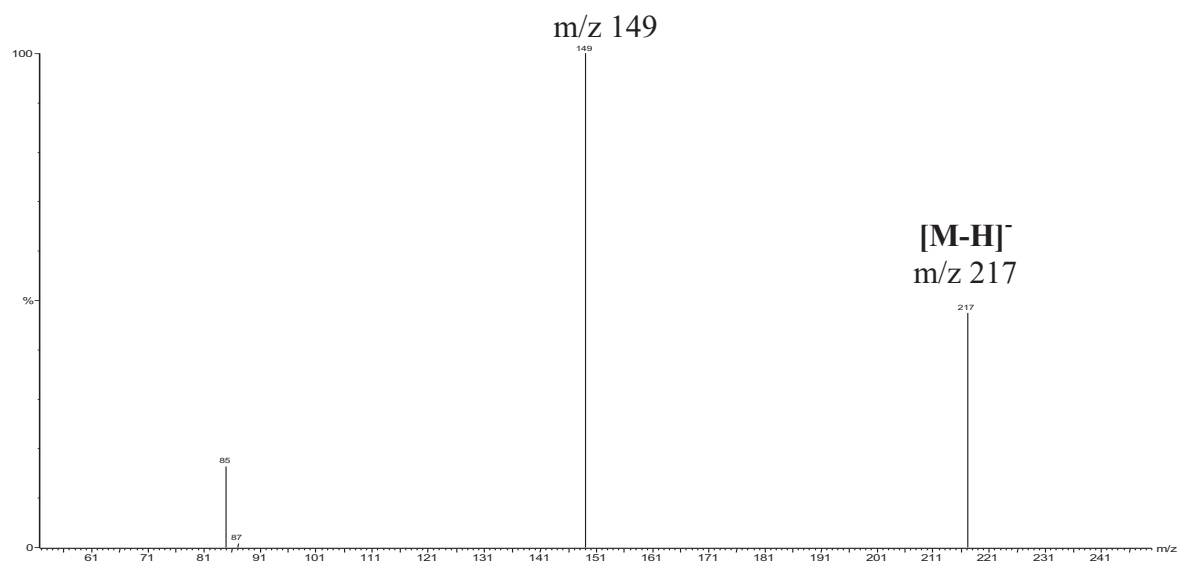
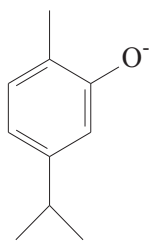
Annexe 8 : spectres de masse en ICP-CH<sub>4</sub> de A5 et A6



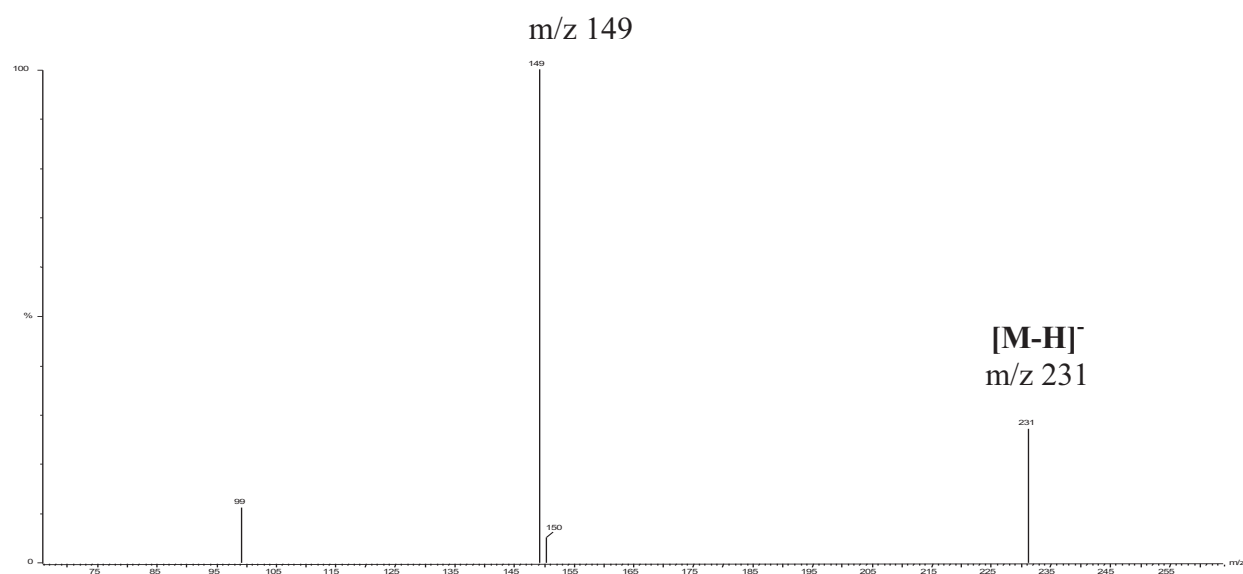
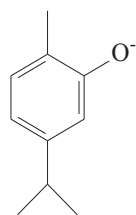


Annexe 9 : spectres de masse en ICN-NH<sub>3</sub> de A5 et A6

A5 (M=218)

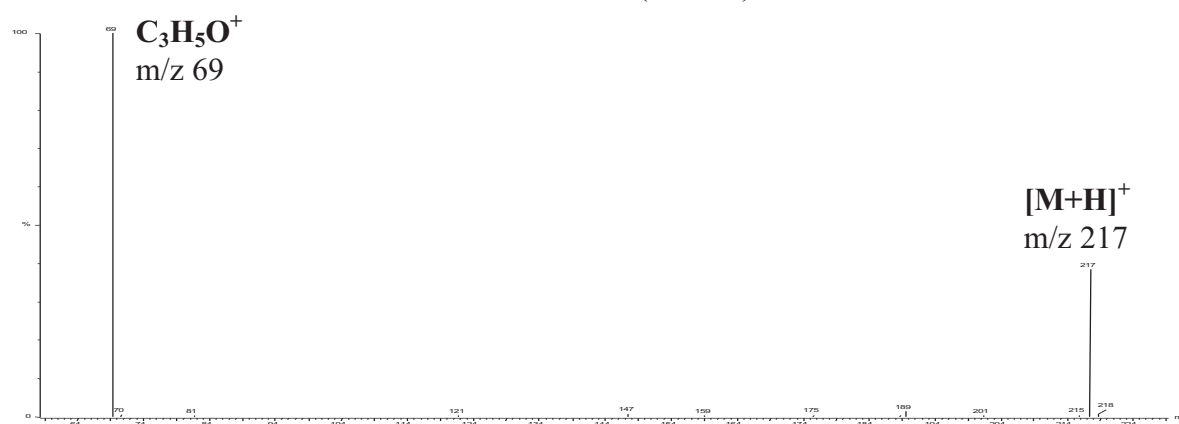


A6 (M=232)

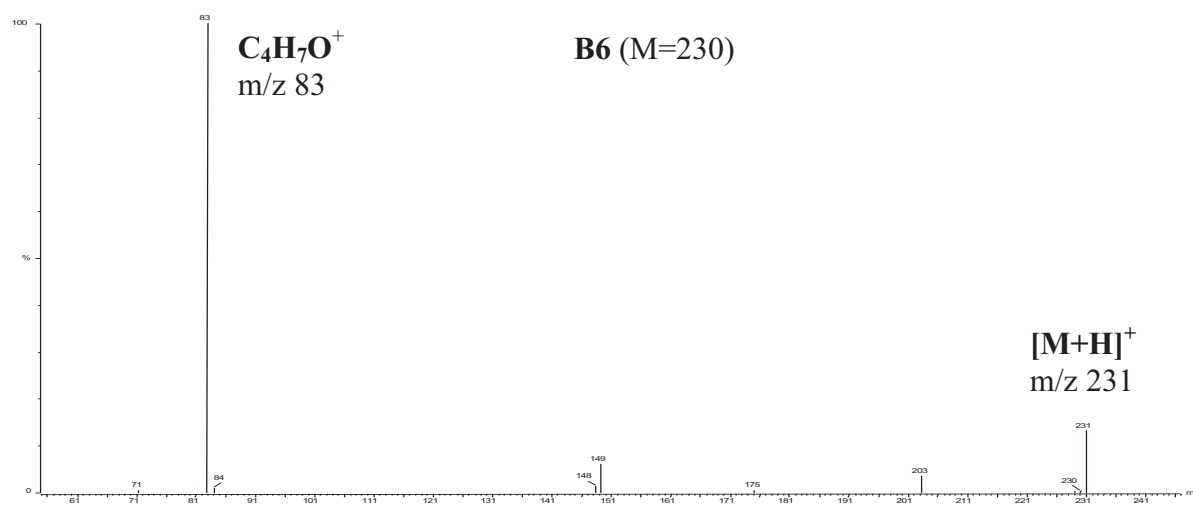


Annexe 10 : spectres de masse en ICP-CH<sub>4</sub> de **B5** et **B6**

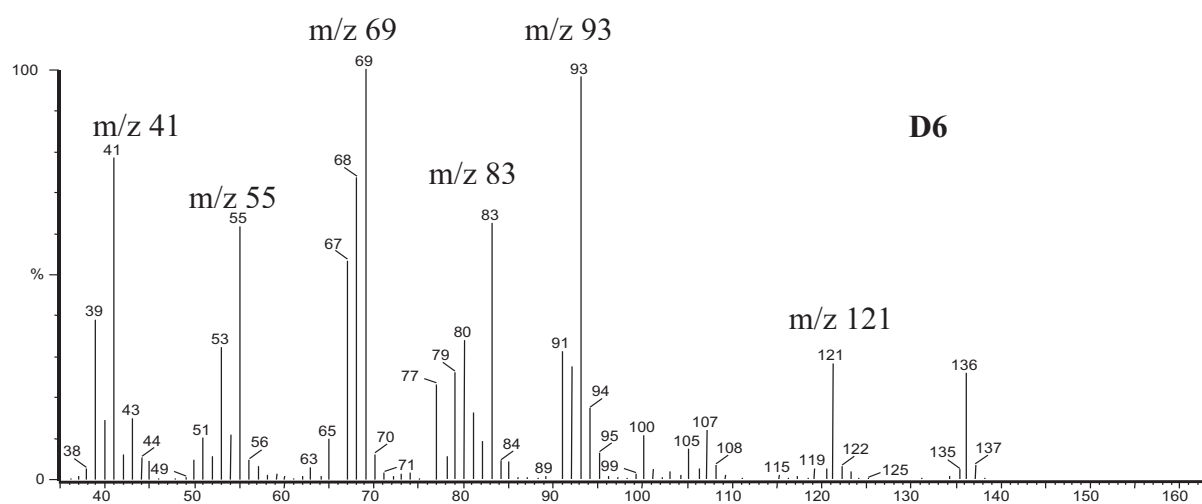
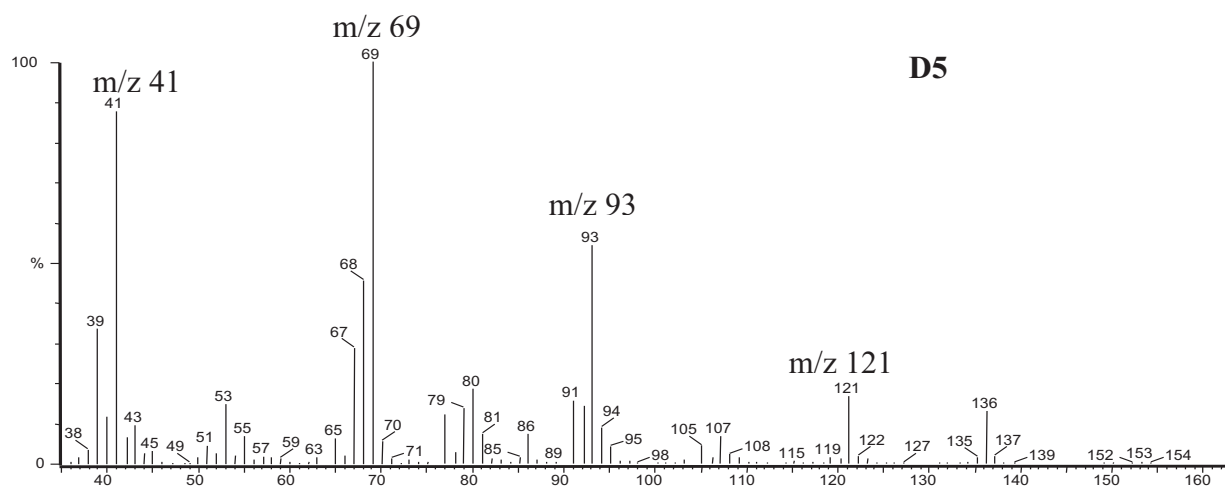
**B5** (M=216)



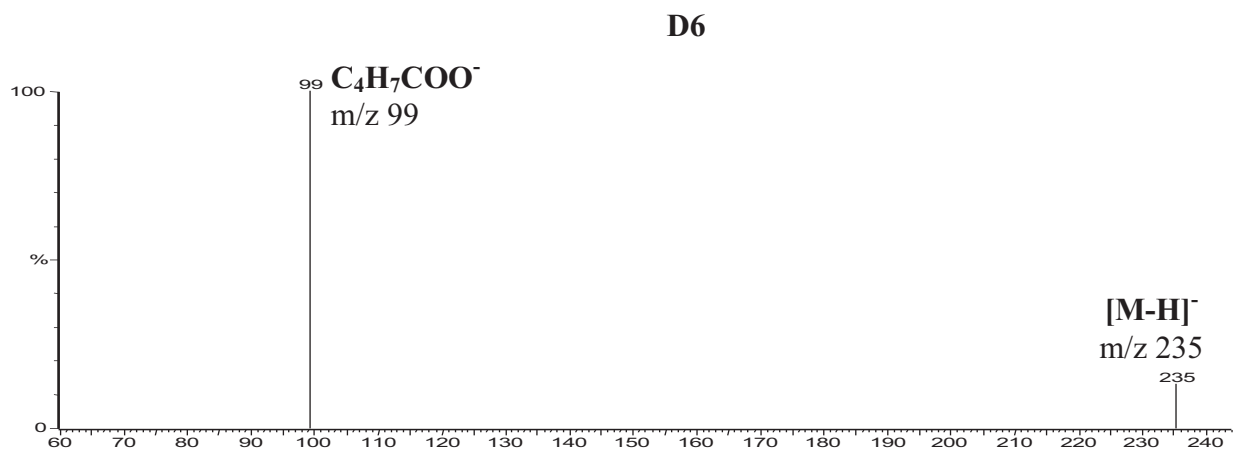
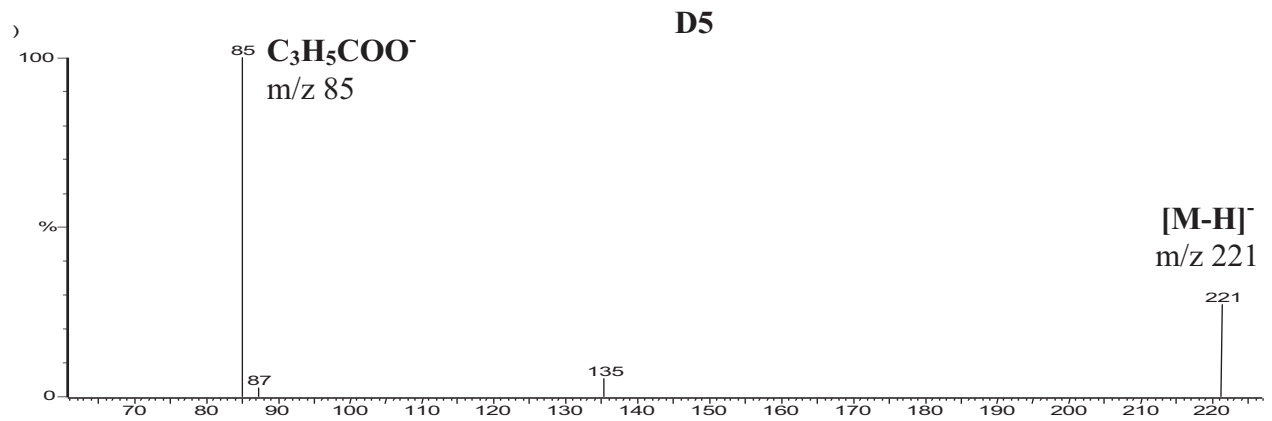
**B6** (M=230)



Annexe 11 : spectres de masse en CPG/SM-IE de D5 et D6

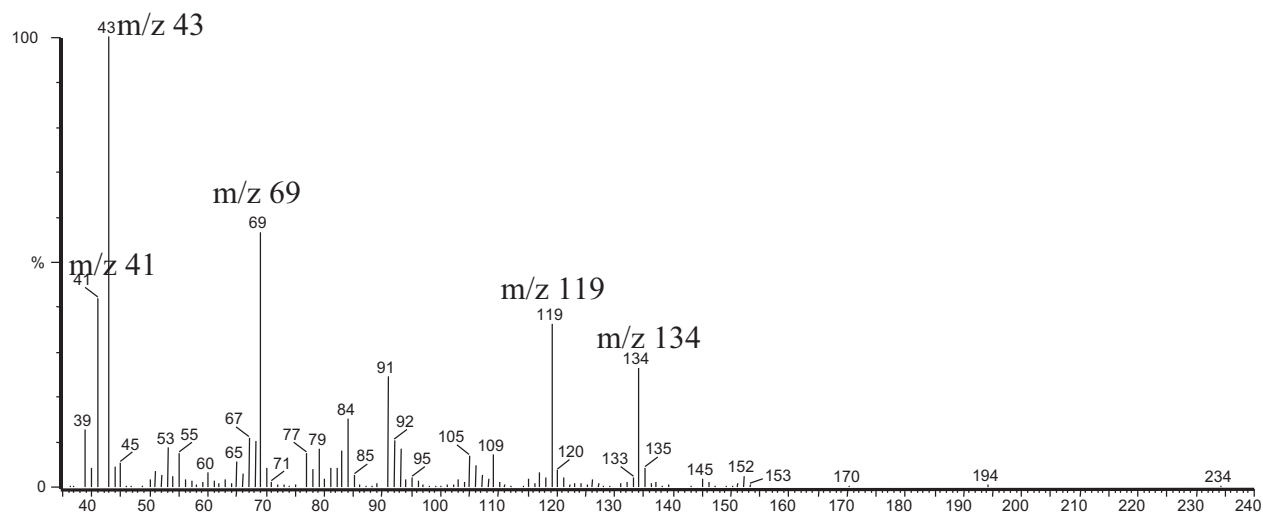


Annexe 12 : spectres de masse ICN-NH<sub>3</sub> de **D5** et **D6**

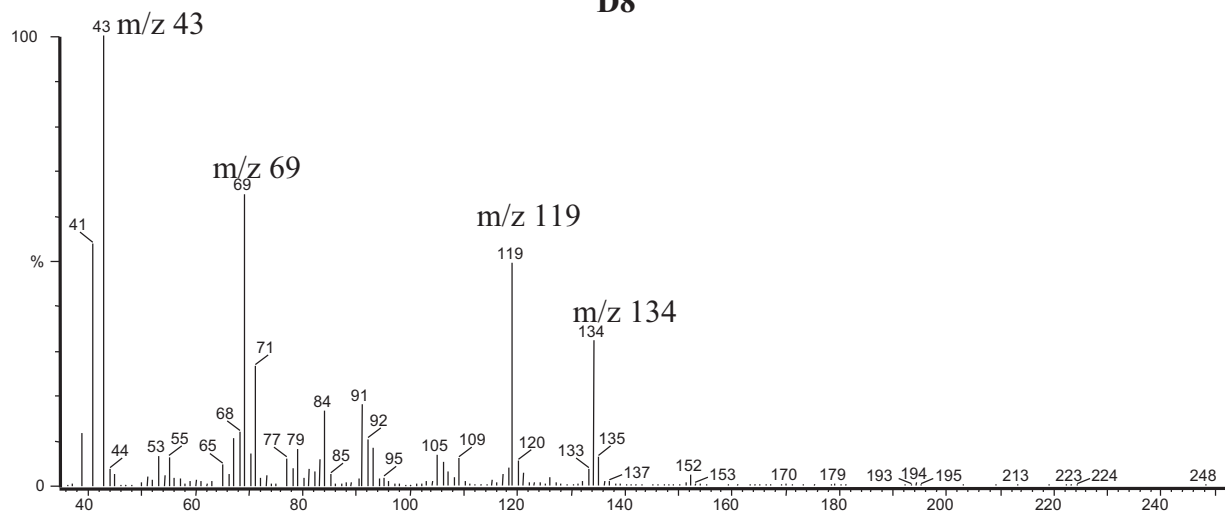


Annexe 13 : spectres de masse en CPG/SM-IE de **D7**, **D8** et **F1**

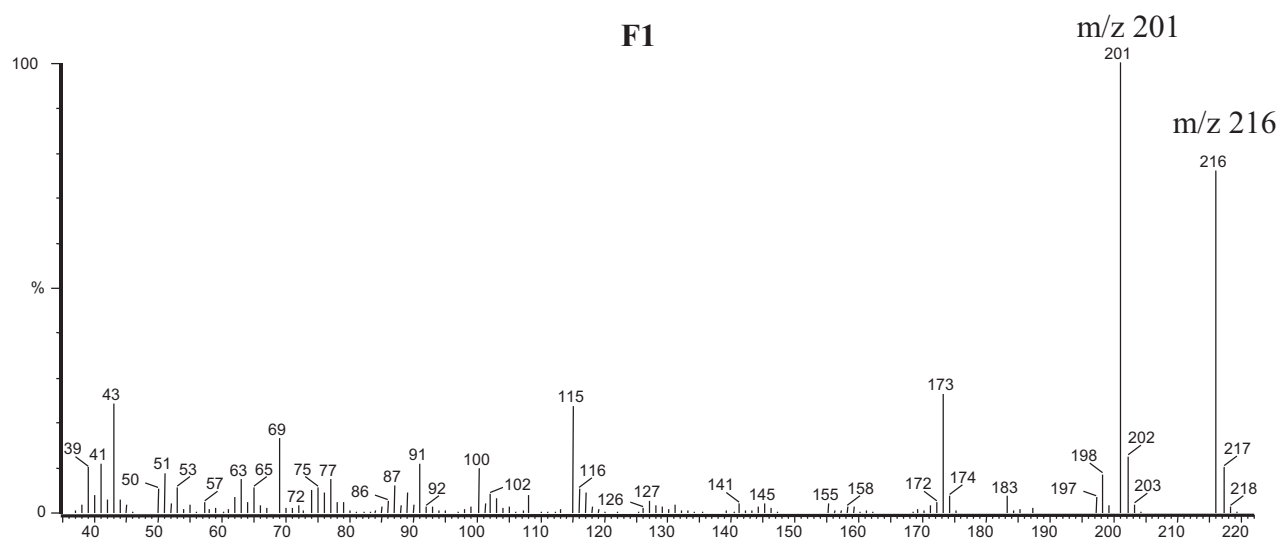
**D7**



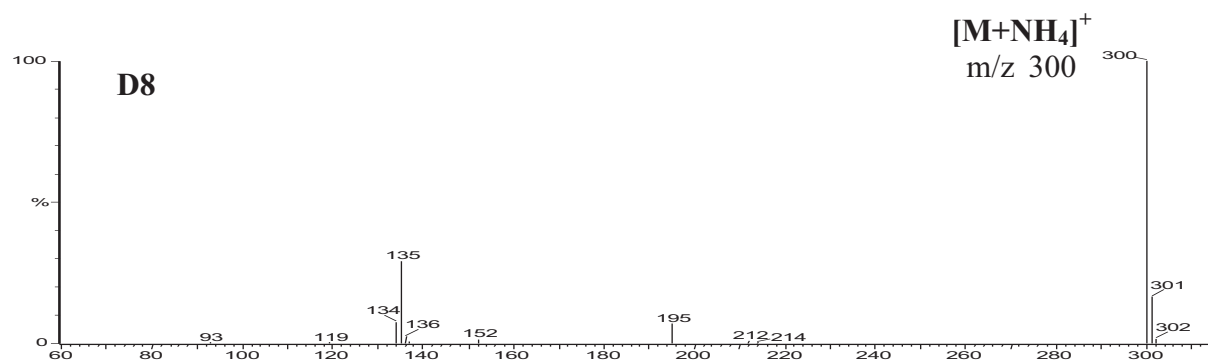
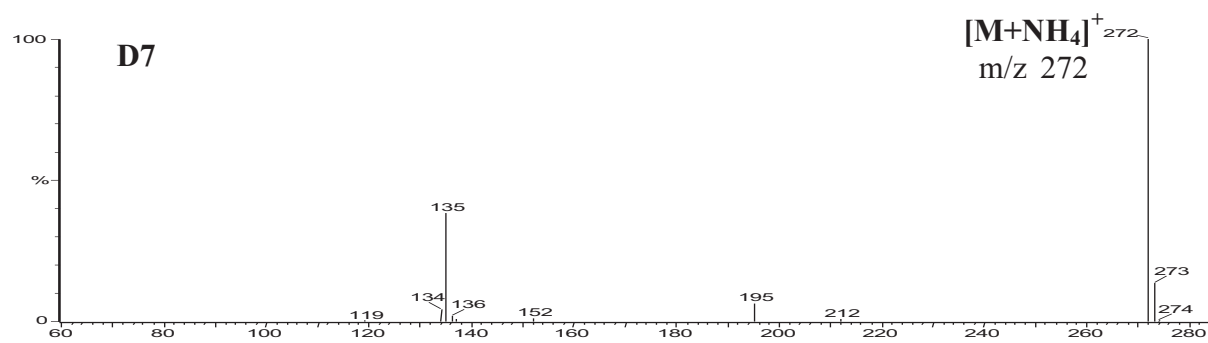
**D8**



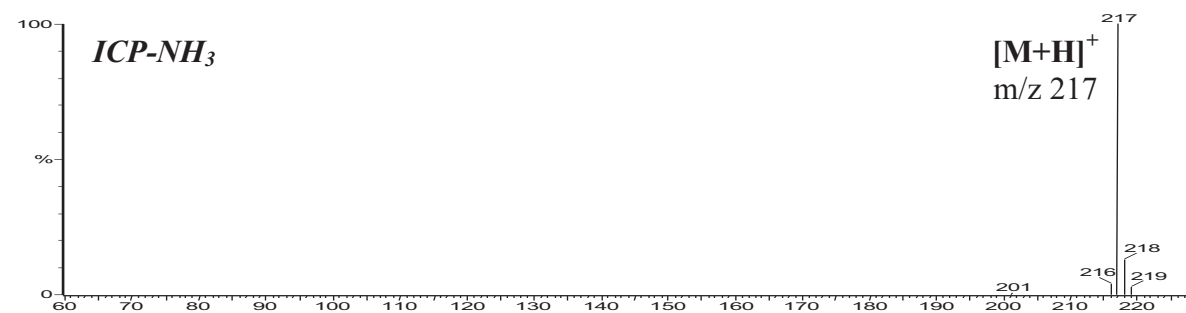
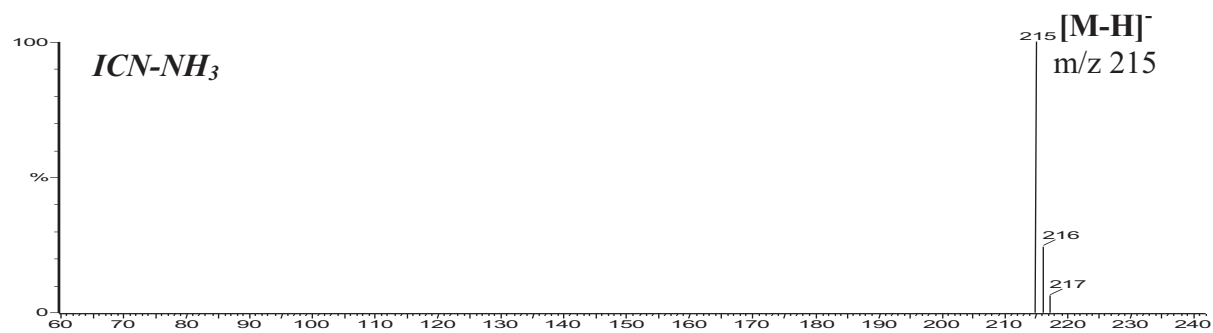
**F1**



Annexe 14 : spectres de masse en ICP-NH<sub>3</sub> de **D7** et **D8**



Annexe 15 : spectres de masse de l'euparin (**F1**) en IC-NH<sub>3</sub>



# RESUME

La flore de Corse est riche en plantes aromatiques et médicinales, pouvant être à l'origine de produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines...) qui se présentent presque toujours comme des mélanges complexes dont il convient de déterminer la composition chimique avant leur éventuelle valorisation. La méthodologie adoptée au laboratoire pour l'identification des constituants est basée sur la complémentarité de diverses techniques : CC, CPG/Ir, CPG/SM-IE et RMN du carbone-13.

L'objectif de notre travail est double :

- objectif méthodologique, par la contribution à l'enrichissement de nos bibliothèques de référence et par l'évaluation et l'intégration de la CPG/SM en mode « Ionisation Chimique » dans la méthodologie d'analyse du laboratoire,
- objectif finalisé, par la caractérisation de trois plantes de la région méditerranéenne : *Cistus albidus*, *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*, à travers l'étude de la composition chimique de leurs huiles essentielles, en adaptant la méthodologie d'analyse en fonction des résultats recherchés.

L'huile essentielle de *Cistus albidus* de Provence s'est avérée différente de celles des autres espèces de Cistes par une proportion importante de sesquiterpènes à squelette bisabolane et par une faible abondance des monoterpènes et des diterpènes à squelette labdane.

L'étude de deux plantes endémiques de Corse de la famille des Asteraceae, a permis de mettre en évidence :

- pour l'huile essentielle de parties aériennes d'*Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum*, une prédominance des composés hydrocarbonés mono et sesquiterpéniques alors que, dans l'huile essentielle de racines, les composés oxygénés monoterpéniques dominent.
- pour l'huile essentielle de *Doronicum corsicum*, une composition chimique originale par la présence, parmi les constituants majoritaires, de composés « inhabituels » dérivés du thymol non décrits dans la littérature.

Ces huiles essentielles se caractérisent par la présence de nombreux esters et bi-esters monoterpéniques de thymyle, -de 8,9-déhydrothymyle, - de 8,9-époxythymyle, -de bornyle, - de néryle, -de lavandulyle dont nous avons, pour certains, réalisé l'hémisynthèse, et par celle de sesquiterpènes tricycliques. L'étude de ces esters en CPG/SM-IC nous a permis de mettre en évidence les mécanismes de réactions et de fragmentations se produisant en ICP et ICN avec différents gaz réactants (CH<sub>4</sub> et NH<sub>3</sub>).

Enfin, par l'utilisation combinée de la CPG/SM-(IE et IC) et de la RMN du carbone-13 nous avons pu identifier, dans ces huiles essentielles, de nombreux composés absents des différentes bibliothèques de référence.

---

## DISCIPLINE :

**Chimie Organique et Analytique**

---

## MOTS CLES

CPG/SM, Impact Electronique, Ionisation Chimique, RMN du carbone-13, Plantes Aromatiques, *Cistus albidus*, *Eupatorium cannabinum*, *Doronicum corsicum*, Huiles Essentielles, Terpènes, Esters Monoterpéniques, Sesquiterpènes Tricycliques.

---