

Thèse présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN CHIMIE
Mention : chimie organique

soutenue publiquement par
Mathieu PAOLI
le 25 novembre 2011

**ANALYSE PAR RMN ¹H ET RMN ¹³C D'HUILES ESSENTIELLES
ET D'EXTRAITS (*Cedrus atlantica* M. et *Taxus baccata* L.)**

Directeurs :

M. Ange BIGHELLI, Professeur, Université de Corse
M. Vincent CASTOLA, MCF-HDR, Université de Corse

Rapporteurs :

M. Pascal RICHOMME, Professeur, Université d'Angers
M. Salvador CAÑIGUERAL, Professeur, Université de Barcelone

JURY

M. Antoine-François BERNARDINI, Professeur, Université de Corse
M. Pascal RICHOMME, Professeur, Université d'Angers
M. Salvador CAÑIGUERAL, Professeur, Université de Barcelone
M. Nicolas BALDOVINI, MCF, Université de Nice
M. Ange BIGHELLI, Professeur, Université de Corse
M. Vincent CASTOLA, MCF-HDR, Université de Corse

RÉSUMÉ

Les produits naturels issus de la biomasse végétale connaissent depuis quelques années un succès grandissant dans de nombreuses industries (pharmacie, agroalimentaire, parfums et cosmétiques). L'objectif de notre étude était, d'une part de contribuer au développement des méthodes d'identification et de quantification des constituants des mélanges naturels par RMN ^{13}C et RMN ^1H , et d'autre part, de contribuer à la caractérisation chimique de végétaux poussant en Corse en vue d'une valorisation potentielle.

La première partie de nos travaux concerne la caractérisation chimique de l'huile essentielle de bois de cèdre de l'Atlas, *Cedrus atlantica* Manetti, introduit en Corse et présent dans diverses forêts. L'analyse détaillée d'un échantillon de cette huile essentielle, réalisée par combinaison de techniques chromatographiques et spectroscopiques, nous a permis d'identifier divers composés possédant le squelette himachalane ou bisabolane non encore référencés dans la bibliothèque de spectres « Terpènes » propre au laboratoire. Il s'agit de la (E)- α -atlantone, de la (Z)- α -atlantone, de l'himachalol et de l'allohimachalol. L'analyse de 48 échantillons obtenus à partir d'arbres situés dans les 5 forêts référencées par l'Office National des Forêts de Corse (Bavella, Bonifato, l'Ospedale, Pineta et Vizzavona) et dans quelques stations isolées, associée au traitement statistique des résultats (ACP, k-means et classification hiérarchique ascendante), a permis de mettre en évidence la variabilité chimique intraspécifique de cette huile essentielle. Les échantillons se répartissent en deux groupes, de compositions chimiques très rarement décrites dans la littérature, en fonction de leur teneur élevée en α -pinène (groupe I) ou en himachalol (groupe II).

Notre deuxième objectif était de contribuer au développement de la méthode d'analyse des taxanes en mélange par RMN ^{13}C , développée au laboratoire. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps, mis en œuvre deux protocoles de fractionnement d'extraits au méthanol et à l'éthanol de feuilles d'if (*Taxus baccata* L.) de Corse. Nous avons ainsi identifié 11 taxanes, dont 5 non encore référencés dans la bibliothèque de spectres « taxanes » du laboratoire (désacétyltaxine B, 5-cinnamoyltaxicine I, 2,9-désacétyltaxinine, 3,11-cyclotaxinine NN2 et 2-désacétyltaxinine J). Dans un second temps, nous avons mis au point et validé une méthode de quantification des taxanes par RMN ^{13}C en utilisant la 10-désacétylbaccatine III (10-DAB III) comme composé modèle et l'hexane-1,6-diol comme référence interne. Cette méthode pouvant être extrapolée aux composés possédant le squelette taxane, nous l'avons appliquée à la quantification de ces derniers dans les extraits au solvant de *T. baccata*.

Dans une dernière partie, nous avons mis au point et validé (justesse, linéarité et précision des mesures) un protocole expérimental de quantification par RMN ^1H sur 39 terpènes purs appartenant à différentes familles chimiques (oléfines, alcools, cétones, aldéhydes, esters, oxydes, phénylpropanoïdes, azotés) puis en mélange. Cette procédure quantitative s'est avérée fiable, rapide et complémentaire de la CPG. Elle a été appliquée à la quantification des composés majoritaires de diverses huiles essentielles et elle est susceptible d'être utilisée pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons (dosage en routine des constituants caractéristiques) et permettre ainsi de répondre aux exigences de contrôle de qualité concernant ce type de produits naturels voire des exsudats et des extraits végétaux.

Discipline : Chimie organique et analytique

Mots clés : valorisation de la biomasse, analyse des mélanges naturels, identification par RMN ^{13}C , quantification par RMN ^1H et RMN ^{13}C , huile essentielle, extrait au solvant, variabilité chimique, taxane, *Cedrus atlantica* M., *Taxus baccata* L.

SUMMARY

Natural products isolated from plants acquired, in recent years, a growing success in many industries (pharmacy, agri-food, perfume and cosmetics). The objective of our study was to contribute, on the one hand, to the development of methods involving ^{13}C and ^1H NMR for the identification and quantification of the components of natural mixtures, and on the other hand, to the chemical characterization of plants growing in Corsica for their potential valorization.

The first part of our work concerned the chemical characterization of the wood oil of *Cedrus atlantica* Manetti, introduced forty years ago and now growing wild in various Corsican forests. Detailed analysis, using the combination of chromatographic and spectroscopic techniques, of a wood oil sample allowed the identification of various compounds bearing the himachalane or bisabolane skeletons, which were still unreferenced in our home-made NMR spectral data library: (E)- α -atlantone, (Z)- α -atlantone, himachalol and allohimachalol. In addition, the analysis of 48 samples obtained from trees located in five forests referenced by the Office National des Forêts of Corsica (Bavella, Bonifato, Ospedale, Pineta and Vizzavona) as well as in a few isolated locations, associated with statistical treatment of the results (PCA, k-means and hierarchical clustering), suggested the occurrence of a chemical variability within the investigated samples. Samples are divided into two groups, whom chemical compositions were rarely described in the literature, based on their high contents in α -pinene (Group I) or himachalol (Group II).

Our second objective was to contribute to the development of an analytical method, based on ^{13}C NMR, for identification and quantification of taxanes in natural mixtures. To reach this goal, we have first implemented two protocols of fractionation of methanol and ethanol extracts of leaves of yew (*Taxus baccata* L.). Eleven taxane derivatives, including five compounds not yet referenced in our home-made NMR spectral data library (deacetyltaxine B, 5-cinnamoyltaxicine I, 2,9-deacetyltaxinine, 3,11-cyclotaxinine NN2 and 2-deacetyltaxinine J) have been identified. Then, we have developed and validated a method for quantification of taxanes by ^{13}C NMR using 10-DAB-III as model compound and hexane-1,6-diol as internal standard. The experimental procedure was applied to the quantification of the previously identified taxanes present in the extracts of *T. baccata*. This method can be extrapolated to other compounds bearing the taxane skeleton.

In the last part of this work, we developed a method that allows direct quantitative determination of terpenes in natural mixtures, using ^1H NMR. The quantitative procedure was checked and validated (accuracy, linearity and precision of measurements) with 39 commercially available terpenes of different chemical families (olefins, alcohols, ketones, aldehydes, esters, oxides, phenylpropanoids and a nitrogen-containing compound). This method is proved to be reliable, fast and complementary with GC. It may be used for the analysis of a large number of samples (routine determination of characteristic constituents) and for quality control of essential oils and solvent extracts.

Discipline: organic and analytical chemistry

Key words: valorization of biomass, natural mixture analysis, identification by ^{13}C NMR, quantification by ^1H NMR and ^{13}C NMR, essential oil, solvent extract, chemical variability, taxane, *Cedrus atlantica* M., *Taxus baccata* L.
