

IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DE L'ESSENCE DES AIGUILLES DE *PINUS PINASTER*

G. PAULY, M. GLEIZES et C. BERNARD-DAGAN

Laboratoire de Biologie végétale, Université de Bordeaux I, 33405 Talence, France

(Reçu le 16 novembre 1972. Accepté le 1 janvier 1973)

Key Word Index—*Pinus pinaster*; Coniferae; essential oils of leaves; terpenes.

Abstract—The chromatographic analysis of the volatile leaf oil of *Pinus pinaster* Ait. showed 42% of mono-terpene hydrocarbons (α -pinene, camphene, β -pinene, myrcene, 3-carene, limonene, *cis*-ocimene, terpinolene, *para*-cymene), 35% of sesquiterpene hydrocarbons (cubebene, copaene, caryophyllene, humulene, germacrene D, α - and γ -muurolenes, δ - and γ -cadinenes) and 23% of oxygenated compounds including esters (linalyl, bornyl, geranyl, neryl and farnesyl acetates), alcohols (*cis*-hexenol, linalol, α -fenchol, *trans*-pinocarveol, terpinen-4-ol, α -terpineol, dihydrocarveol, guaïol, junenol and α -cadinol), one aldehyde (hexenal) and one ketone (piperitone). Three non terpenoid phenylethyl esters were also identified: phenylethyl isovalerate, methyl-2 butyrate and 3-3 dimethylacrylate. Some alcohols and mainly α -terpineol and linalol seemed to be formed during the steam distillation process, they were absent when the leaf oil was obtained by maceration of small portions of leaves in the usual solvents of terpenes.

Résumé—L'essence des aiguilles de *Pinus pinaster* Ait. obtenue par entraînement à la vapeur d'eau contient 42% de carbures monoterpéniques (α -pinène, camphène, β -pinène, myrcène, 3-carène, limonène, *cis*-ocimène, terpinolène, *para*-cymène), 35% de carbures sesquiterpéniques (cubébène, copaène, caryophyllène, humulène, germacrène D, α - et γ -muurolènes, δ - et γ -cadinènes) et 23% de composés oxygénés comprenant des esters (acétates de linalyle, bornyle, géranyle, néryle et farnésyle), des alcools (*cis*-hexenol, linalol, α -fenchol, *trans*-pinocarvéol, terpinène-4-ol, α -terpinéol, dihydrocarvéol, guaïol, junénol et α -cadinol), un aldéhyde (hexenal) et une cétone (pipéritone). Des esters non terpéniques ont aussi été mis en évidence: l'isovalérate, le méthyl-2 butyrate et le 3-3 diméthylacrylate de phénétyle. Le procédé d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau favorise la formation d'alcools, en particulier l' α -terpinéol et le linalol qui sont absents dans les essences obtenues par macération de fragments d'aiguilles dans les solvants habituels des terpènes.

INTRODUCTION

L'AIRE de répartition du Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) s'étend sur la région méditerranéenne occidentale et la zone atlantique du sud-ouest européen. Une étude¹ des monoterpènes des tissus extérieurs au bois de pousses âgées d'un an, effectuée sur des Pins maritimes d'origines géographiques différentes, avait montré que le 3-carène était un excellent critère chimiotaxinomique et permettait de distinguer les diverses provenances de cette espèce. Un travail plus récent² sur une série de croisements contrôlés de Pins d'origine landaise (sud-ouest de la France) a mis en évidence le contrôle génétique du 3-carène par un seul couple d'allèles qui détermine la présence (à des taux compris entre 20 et 50%) ou l'absence de ce carbure monoterpénique. Toutefois, dans le Pin maritime des Landes, d'autres composés sesquiterpéniques ou oxygénés apparaissent aussi en plus ou moins grande abondance selon les individus. Avant de rechercher les corrélations entre ces différents composés et les

¹ BERNARD-DAGAN, C., FILLON, C., PAULY, G., BARADAT, PH. et ILLY, G. (1971) *Ann. Sci. For.* **28** (3), 223-258.

² BARADAT, PH., BERNARD-DAGAN, C., FILLON, C., MARPEAU, A. et PAULY, G. (1973) *Ann. Sci. For.* **30**, sous-presse.

mécanismes biogénétiques de leur élaboration, il est donc apparu nécessaire de procéder à une étude approfondie des divers constituants de l'essence de ces Pins. Dans cet article, sont exposés les résultats de cette étude effectuée sur des Pins d'origine landaise.

RESULTATS ET DISCUSSION

La composition centésimale d'une essence obtenue par entraînement à la vapeur d'eau est indiquée dans le Tableau 1. L'essence totale contient environ 77 % de carbures mono- et sesqui-terpéniques et 23 % de composés oxygénés. Les monoterpènes constituent 42 % de l'essence totale. Ils sont principalement représentés par l' α - et le β -pinène. On trouve aussi, en quantités moindres, du 3-carène, du myrcène, du limonène, du *cis*-ocimène et du terpinolène. Du camphène, et du *para*-cymène ont été décelés à l'état de traces. Parmi les sesquiterpènes identifiés, le caryophyllène est le composé majoritaire. Le germacrène D, signalé pour la première fois chez les Conifères par Yoshihara *et al.*³ est présent au taux de 11,50 % chez *Pinus pinaster*. On rencontre aussi du cubebène, du copaène, de l'humulène, de l' α - et du γ -muurolène, du δ - et du γ -cadinène.

TABLEAU 1. COMPOSITION CENTÉSIMALE DE L'ESSENCE DES FEUILLES DE *Pinus pinaster*

No.*	Composés	%	No.	Composés	%
1	Hexenal	0,05	28	Non identifié	0,08
2	<i>cis</i> -Hexenol	0,45	29	Acétate de néryle	0,08
3	α -Pinène	10,16	30	α -Cubebène	0,35
4	Camphène	0,22	31	Acétate de géranyle	0,25
5	β -Pinène	16,01	32	Copaène	0,71
6	Myrcène	6,07	33	Méthyl-eugénol	0,55
7	3-Carène	3,47	34	Non identifié	0,10
8	<i>para</i> -Cymène	Traces	35	Caryophyllène	12,59
9	Limonène	4,64	36	Humulène	1,77
10	<i>cis</i> -Ocimène	0,50	37	Isovalérate de phénéthyle	1,87
11	Pinol	0,05	38	Méthyl-2 butyrate de phénéthyle	6,09
12	Non identifié	0,05	39	Germacrène D	11,50
13	Terpinolène	0,85	40	γ -Muurolène	1,18
14	Linalol	1,54	41	α -Muurolène	1,21
15	α -Fenchol	0,55	42	γ -Cadinène	1,25
16	<i>trans</i> -Pinocarvéol	Traces	43	δ -Cadinène	5,00
17	Non identifié	0,11	44	Non identifié	0,15
18	Non identifié	0,16	45	Nérolidol	0,05
19	Terpinène-4-ol	0,16	46	3-3 Diméthylacrylate de phénéthyle	0,10
20	α -Terpinéol	5,80	47	Non identifié	0,33
21	Dihydrocarvéol	Traces	48	Guaiol	0,16
22	Non identifié	0,22	49	Junénol	0,22
23	Acétate de linalyle	0,16	50	(Isomères du cadinol)	1,00
24	Géraniol	0,20	51	α -Cadinol	0,93
25	Pipéritone	0,35	52	Non identifié	0,10
26	Acétate de bornyle	0,10	53	Non identifié	0,10
27	Non identifié	0,08	54	Acétate de farnésyle	0,25
				Composés identifiés	97,43 %
				Composés non identifiés	2,49 %

* Les numéros correspondent à l'ordre de sortie des composés sur colonne de SE 30. Les composés présentant le même temps de rétention sur SE 30 ont été évalués après séparation sur une colonne polaire (DEGS 15 % sur Chromosorb W 80/100, 360 \times 0,31 cm de diamètre externe).

³ YOSHIHARA, K., OHTA, Y., SAKAI, T. et HIROSE, Y. (1969) *Tetrahedron Letters* 2263-2264.

Les composés oxygénés déterminés dans cette essence d'aiguilles sont de nature très diverse. Plusieurs alcools ont été identifiés; le linalol (1,54 %) et l' α -terpinéol (5,80 %) sont les plus abondants; l' α -fenchol, le terpinène-4-ol, le géraniol et trois alcools sesquiterpéniques cycliques (junénol, guaïol, α -cadinol) présentent des pourcentages compris entre 0,10 et 0,90 %. Les feuilles de Pin maritime élaborent de nombreux acétates: acétates de linalyle, bornyle, néryle, géranyle et farnésyle. Elles sont pauvres en aldéhydes et cétones, seuls l'hexenal et la pipéritone ont été déterminés avec certitude. Elles comportent aussi du méthyl-eugénol, composé méthyloxy fréquemment rencontré chez les Conifères et un époxyde, le pinol.

Plus intéressante semble être la présence d'esters de phénéthyle tels que le méthyl-2 butyrate et l'isovalérate de phénéthyle que nous avons déjà signalée chez le Pin maritime⁴ et dont les teneurs sont respectivement de l'ordre de 2 et 6 %. Un autre ester de phénéthyle a été mis en évidence: le 3-3 diméthylacrylate de phénéthyle que Cheng et von Rudloff⁵ ont aussi trouvé chez *Chamaecyparis nootkatensis* (D. Don) Spach. La présence, à l'état de traces, du *cis*-2-3 diméthylacrylate de phénéthyle, isomère du précédent, est hautement probable chez le Pin maritime. Elle a pu être déduite d'après l'étude de son spectre de masse et comparaison de ce spectre avec celui du produit synthétisé. Toutefois, un autre composé oxygéné, non identifié, dont le temps de rétention sur les colonnes est identique à celui du *cis*-2-3 diméthylacrylate de phénéthyle a rendu difficile l'interprétation du spectre par le chevauchement des différents pics de fragmentation de ces deux produits.

Il faut cependant souligner que ces résultats concernent une essence obtenue par distillation par la vapeur d'eau. Dans le même temps, une expérience comparative était effectuée avec des aiguilles de la même provenance géographique. Des fragments de ces aiguilles étaient mis à macérer dans plusieurs solvants tels que le pentane, l'éther éthylique et l'hexane. Cette expérience a permis de constater que les extraits provenant de ces macérations avaient une composition en constituants oxygénés différente de celle qui est présentée par l'essence de distillation. En particulier les deux alcools les plus abondants dans l'essence de distillation, l' α -terpinéol et le linalol, n'apparaissent pas sur les chromatogrammes de l'essence extraite par macération. Il semblerait donc que la distillation par la vapeur d'eau bouillante provoquerait une hydrolyse de constituants thermolabiles avec formation secondaire d'alcools. En outre, le milieu aqueux chaud d'entraînement par la vapeur présente rapidement un pH acide (voisin de 3) qui peut aussi provoquer des modifications des constituants alcooliques. Toutes ces transformations pourraient être du même type que celles qui ont été décrites précédemment.⁶⁻⁹ Il est donc vraisemblable que la plupart des alcools (linalol, α -terpinéol, géraniol . . .) apparaissent au cours de la distillation à partir de précurseurs présents dans les tissus et respectés par la macération.

PARTIE EXPERIMENTALE

Appareils. La partie analytique de ce travail a été effectuée avec un chromatographe Barber-Coleman série 5000 muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Trois sortes de colonnes furent utilisées: SE 30 à 6 % sur Varaport 80/100 (270 cm de longueur et 0,31 cm de diamètre externe), DEGS à 15 % sur Chromosorb W 80/100 (360 \times 0,31 cm) et PEG à 5 % sur Varaport 80/100 (360 \times 0,31 cm). Après fractionnement sur silice, les divers constituants ont été isolés au moyen d'un chromatographe Varian 1400 spécialement

⁴ BERNARD-DAGAN, C., BOURGEOIS, G. et GLEIZES, M. (1970) *Compt. Rend.* **271**, 712-713.

⁵ CHENG, Y. S. et VON RUDLOFF, E. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2517-2527.

⁶ VON RUDLOFF, E. (1961) *Can. J. Chem.* **39**, 1-12.

⁷ RITTERSDORF, W. (1965) *Angew. Chem.* **77** (9), 432.

⁸ CRAMER, F. et RITTERSDORF, W. (1967) *Tetrahedron* **23**, 3015-3022.

⁹ STEVENS, K. L., JURD, L. et MANNERS, G. (1972) *Tetrahedron* **28**, 1939-1944.

équipé pour la chromatographie en phase gazeuse 'préparative' avec une colonne SE 30 à 10% sur DMCS (350 × 0,63 cm) et une colonne DEGS à 15% sur Chromosorb W 80/100 (360 × 0,63 cm). En sortie de colonne, les constituants étaient recueillis dans des tubes de verre refroidis dans de la carboglace. Un spectrophotomètre IR Perkin Elmer 457 a permis la réalisation des spectres sur cellules de KBr. Les spectres RMN ont été obtenus avec un spectromètre Varian HA 100 en utilisant le tétraméthylsilane en solution dans du CCl₄ comme étalon interne. Il est aussi apparu nécessaire de connaître les spectres de masse de quelques constituants. Ils ont été enregistrés sur un spectromètre de masse AEI MS 12.

Matériel végétal. 100 g d'essence ont été recueillis par entraînement à la vapeur d'eau après broyage de feuilles formées au printemps de 1970 et prélevées en novembre de la même année sur des arbres âgés de 50 à 70 ans poussant sur le territoire de la commune de Biganos en Gironde. Une cinquantaine d'aiguilles de la même provenance ont aussi été découpées en fragments mis à macérer dans divers solvants (pentane, hexane, éther éthylique) pendant 2 hr. Les solvants étaient ensuite chassés par évaporation sous un courant d'azote.

Fractionnement et séparation des constituants. L'essence obtenue par distillation a été séparée en différentes fractions sur une colonne de silice contenant 1000 g d'acide silicique (Merck 70-325 mesh). Cette colonne avait une hauteur de 200 cm et un diamètre de 5 cm. L'élution de l'essence sur cette colonne par des solvants et des mélanges de solvants de polarité croissante (pentane, mélanges de pentane et d'éther sulfurique, éther sulfurique, méthanol) a permis d'obtenir 88 fractions dans lesquelles les constituants se trouvaient groupés d'après leur nature chimique. Les carbures mono- et sesqui-terpéniques ont été isolés par élution de l'essence totale avec du pentane et un mélange de pentane et d'éther dans les proportions 19:1, ce système de solvants permettant l'entraînement total des carbures. Les composés oxygénés (esters, aldéhydes, cétones, alcools) ont été élués par des systèmes de solvants comprenant des proportions croissantes d'Et₂O dans du pentane, puis par Et₂O, enfin par MeOH. Les constituants présents dans ces différentes fractions ont été isolés par chromatographie en phase gazeuse 'préparative' et leur identification a pu être menée à bien par spectrométrie IR, RMN et éventuellement par SM.

Les esters non terpéniques (3-3 diméthylacrylate et *cis*-2-3 diméthylacrylate de phénéthyle) ont été synthétisés et la concordance entre leurs spectres et les spectres des esters isolés par micropiégeage a confirmé leur identification.

Remerciements—Nous exprimons notre gratitude à MM. Teisseire et Rouillier du Centre de Recherche Roure-Bertrand fils et Justin Dupont à Grasse pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de ce travail. Les spectres de masse et RMN ont été enregistrés par M. Bourgeois du laboratoire de Chimie Appliquée et de l'Institut de Pin et M. Gabriel du Centre de Recherche Paul Pascal que nous tenons à remercier bien vivement. Nous n'aurions garde d'oublier le Laboratoire de Recherches de la Cellulose du Pin à Facture où nous avons pu préparer le matériel végétal.