

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

HEBBACHE Zahida Yasmina

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des substances naturelles

**Détermination de la coumarine dans la cannelle de Ceylan
(*C. Zeylanicum*) et la cannelle de Chine (*C. Cassia*) par
spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier**

Soutenu le 14 septembre 2011, devant le jury composé de :

Mr	M. EL HATTAB	MCA à l'Université de Blida	Président
Mme	Z. CHEMAT	MCA à l'Université de Blida	Examineur
Mme	N. BOUCHENAFI	MCA à l'Université de Blida	Examineur
Mme	Y. DAGHBOUCHE	Pr à l'Université de Blida	Promoteur

RESUME

Le présent travail porte sur le contrôle de qualité des extraits de deux espèces de cannelle *Cinnamomum Zeylanicum* et *Cinnamomum Cassia*, par spectrométrie IRTF (spectrométrie à transformée de Fourier) et ce, par le contrôle de leur teneur en coumarine.

La propriété de la lactone liée à son ouverture et sa solubilité en milieu alcalin et sa fermeture en milieu acide a été exploitée pour isoler la coumarine des extraits de cannelles. L'utilisation d'un mélange iso-octane/dichlorométhane dans une proportion (95 : 5 v/v) a fourni un pourcentage de récupération de la coumarine de l'ordre 100%.

La teneur de la coumarine dans l'extrait de cannelle de Chine, préalablement traité, a été évaluée, à 5% en utilisant les bandes d'absorbance à 1731, 1180, 1120, 930, 829 cm^{-1} corrigées avec une ligne de base adéquate.

Dans le cas de l'extrait de cannelle de Ceylan, présentant une teneur de coumarine plus faible, de l'ordre de 1%, seulement les bandes spécifiques à 829, 930 et 1180 cm^{-1} ont été adéquates pour la détermination.

La possibilité de la détermination directe de la teneur de coumarine dans les extraits de cannelle a été vérifiée en exploitant la sélectivité et la spécificité des bandes du composé qui appartiennent à la zone des «empreintes digitales». Effectivement les bandes à 829 et 930 cm^{-1} ont fourni des teneurs du même ordre que celle trouvées après traitement des extraits.

Mots clés : Extrait de cannelle, coumarine, préconcentration, spectrométrie IRTF.

المخلص

هذا العمل مخصص لمراقبة جودة المستخلصات لنوعين من القرفة، القرفة الكاسية و القرفة الزيلانيكومية بواسطة (المطيافية ما تحت الحمراء بتحول فوريي)، و هذا من خلال التحكم في مضمونها الكومارين. الخاصية اللاكتونية ذات الصلة بانفتاحه وذوبانه في وسط أساسي والاعلاقه في وسط حمضي لعزل الكومارين من مستخلصات القرفة. استخدام مزيج من الأيزو أوكتين / ثنائي كلورو ميثان في نسب 5 : 95 أعطى نسبة 100 % من الكومارين.

ويقدر مردود الكومارين في مستخلصات القرفة الصينية و هذا بعد إخضاعه لمعالجة أولية، قيم بنسبة 5 %، باستعمال الموجات الامتصاصية في 1180 ، 1731 ، 1120 ، 930 ، 829 سم مصحح بقاعدة مناسبة. في حالة : مستخلص القرفة الزيلانيكومية، وجود مردود منخفض من الكومارين بنسبة 1 % ، في موجات محددة فقط 930 ، 829 و 1180 سم .

تم فحص إمكانية تحديد المباشر للمحتوى الكومارين في مستخلصات القرفة في الموجات من خلال استغلال الانتقائية وخصوصية الموجات اللذين ينتمون إلى منطقة "بصمات". وقد وفرت فعلا في الموجات 829 و 930 سم نفس المردود في المستخلصات المعالجة.

الكلمات الرئيسية : مستخلص القرفة، الكومارين، تركيز، المطيافية ما تحت الحمراء بتحول فوريي.

ABSTRACT

This work focuses on the quality control of the extracts of two cinnamon species *Cinnamomum Zeylanicum* and *Cinnamomum Cassia*, using FTIR Spectroscopy (Fourier transform infrared spectroscopy) and this by controlling their coumarin content. The lactone property related to its openness and its solubility under alkaline and its closure in an acid environment was exploited to isolate coumarin from the cinnamon extracts. The use of an iso-octane/dichloromethane mixture in a 95:5 (v/v) proportion, has provided a 100% percentage of coumarin recovery. The coumarin content in the Chinese cinnamon extract, treated beforehand, has been evaluated at 5% by using the absorbance bands at 1731, 1180, 1120, 930, 829 cm^{-1} adjusted with a proper base line. In the case of the Ceylan cinnamon extract, which is presenting a lower content of coumarin, about 1%, only the bands specific to 829, 930 and 1180 cm^{-1} were adequate for the determination. The possibility of the direct determination of the coumarin content in the cinnamon extracts has been verified by exploiting the selectivity and specificity of the compound bands which belong to the "digital fingerprints" zone. Indeed the bands with 829 and 930 cm^{-1} provided contents of the same order as the ones found after the extracts treatment.

Key words : cinnamon Extract, coumarin, preconcentration, FTIR Spectroscopy.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame Y. Daghbouche .Je tiens à la remercier d'avoir guidé mes premiers pas de recherches, pour ses conseils fructueux, sa disponibilité et pour sa patience. Qu'elle découvre ici ma considération et mes sincères remerciements.

Je remercie également Madame N. El Hattab et Monsieur M. El Hattab pour leur aide et leur disponibilité.

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également Monsieur Boulahouache et Monsieur Ait Yahia pour leur assistance morale et matérielle pour la réalisation de ce travail.

Enfin j'exprime mes remerciements à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

DEDICACES

A ma grand-mère, qu'ALLAH protège. En témoignage de ma profonde affection, qu'elle sache que ce travail est en partie le fruit de son soutien ; je lui suis très reconnaissante.

A mes parents et mes sœurs adorées Assia et Chaima.

A mes tantes, oncles, cousines et cousins pour leur soutien moral et matériel et pour leurs encouragements tout au long de ces années.

A tous mes Amis (es).

TABLE DES MATIERES

RESUME	I
REMERCIEMENTS	III
DEDICACES	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES	2
LISTE DES TABLEAUX	4
INTRODUCTION GENERALE	5
Chapitre I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	9
I.1 Les plantes médicinales	10
I.2 Les épices	10
I.3 Les métabolites secondaires	11
I.4 Les produits phénoliques	12
I.4.1 Structures et catégories des composés phénoliques	14
I.4.1.1 Les acides phénoliques	15
I.5 Les coumarines	16
I.5.1 Structure chimique et classification des coumarines	16
I.5.2 Propriétés physico-chimique des coumarines	17
I.5.3 La coumarine	17
I.5.4 Usage de la coumarine	18
I.5.4.1 Usage en médecine	18
I.5.4.2 Usage alimentaire	19
I.5.4.3 Autres usages	20
I.6 Travaux antérieurs réalisés sur la coumarine	20

I.7	Espèce étudiée : la cannelle	22
I.7.1	Historique	22
I.7.2	Description des espèces appartenant au genre <i>Cinnamomum</i>	22
I.7.3	Différence entre la cannelle de Chine et de Ceylan	23
I.7.4	Cannelle de Ceylan	24
I.7.4.1	Description de la cannelle de Ceylan	24
I.7.4.2	Composition chimique de la cannelle de Ceylan	26
I.7.5	Cannelle de Chine	27
I.7.5.1	Description de la cannelle de Chine	27
I.7.5.2	Composition chimique de la cannelle de Chine	27
I.7.6	Propriétés pharmacologiques et emplois de la cannelle	27
I.7.7	Travaux antérieurs réalisés	29
I.8	Spectrométrie infrarouge	30
Chapitre II	Détermination de la coumarine dans la cannelle de Ceylan (<i>C. Zeylanicum</i>) et la cannelle de Chine (<i>C. Cassia</i>) par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier	32
II.1	Introduction	33
II.2	Etude systématique de la cannelle de Ceylan (<i>Cinnamomum Zeylanicum</i>) et de la cannelle de Chine (<i>Cinnamomum Cassia</i>)	34
II.3	Partie expérimentale	36
II.3.1	Appareillage et réactifs	36
II.3.2	Procédure générale	38
II.3.2.1	Préparation de l'extrait	38
II.3.2.2	Caractéristiques organoleptique des deux extraits	39

II.3.2.3	Test d'identification de la coumarine dans les deux extraits de cannelles	40
II.3.2.4	Procédé d'isolement et de préconcentration de la coumarine des extraits de cannelle	41
II.4	Résultat et discussion	44
II.4.1	Détermination de la coumarine dans les extraits de cannelles après préconcentration	44
II.4.1.1	Spectre IRTF de la coumarine	44
II.4.1.2	Caractéristiques analytiques de la coumarine obtenues directement dans CH ₂ Cl ₂	45
II.4.1.3	Comparaison des caractéristiques analytiques obtenues pour la détermination de la coumarine dissoute dans CH ₂ Cl ₂ et obtenues après préconcentration	47
II.4.1.4	Détermination de la teneur de la coumarine dans les extraits de cannelles après préconcentration	51
II.4.2	Dosage de la coumarine dans les extraits de cannelles sans traitement préalable	56
II.4.2.1	Dosage de la coumarine dans les extraits de cannelle de Chine	57
II.4.2.2	Dosage de la coumarine dans les extraits de cannelle de Ceylan	58
	CONCLUSION GENERALE	61
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	65

LISTE DES ABREVIATIONS

A	absorbance
CG/MS	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CCM	chromatographie sur couche mince
CH ₂ Cl ₂	dichlorométhane
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
EPS	extraction en phase liquide
ELL	extraction liquide liquide
IR	spectroscopie infrarouge
IRTF	spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier
C	concentration
UMA	unité de masse atomique
UV	Ultra-Violet

LISTE DES FIGURES

Figure I.1	Structures chimiques de quelques hydroxybenzoïques	15
Figure I.2	Structures chimiques de quelques hydroxycinnamiques	15
Figure I.3	Structures chimiques de quelques coumarines	16
Figure I.4	Cannelle de Ceylan	24
Figure I.5	Cannelle de Chine	24
Figure II.1	A : <i>Cinnamomum Cassia</i> B : <i>Cinnamomum Zeylanicum</i>	35
Figure II.2	Montage de flux utilisé pour la détermination de la coumarine dans les extraits de cannelles	37
Figure II.3	Protocole général de préparation de l'extrait	39
Figure II.4	A : Extrait de cannelle de Chine B : Extrait de cannelle de Ceylan	40
Figure II.5	Test d'identification de la coumarine dans les deux extraits de cannelles (Chine A), (Ceylan B)	41
Figure II.6	Protocole général de l'isolement et de préconcentration de la coumarine	43
Figure II.7	Spectre IRTF de la coumarine 10 mg.ml ⁻¹ préparée directement dans CH ₂ Cl ₂ sans aucun traitement préalable	45
Figure II.8	Spectres d'absorbance de la coumarine préparée directement dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre 0.75-10 mg.ml ⁻¹	47
Figure II.9	Spectres d'absorbance de la coumarine après traitement et préconcentration pour un domaine de concentration compris entre 1.05-13.49 mg.ml ⁻¹	51

Figure II.10	Spectres infrarouge de 20 mg.ml ⁻¹ d'extrait de la cannelle de Chine traitées (en rouge) et de la coumarine pure 0.75mg.ml ⁻¹ (en noir)	53
Figure II.11	Spectres infrarouge de l'extrait de la cannelle de Chine traitée 152.9 mg.ml ⁻¹ (en rouge) et spectre de la coumarine pure 7.5mg.ml ⁻¹ (en noir)	53
Figure II.12	Spectres infrarouge de l'extrait de cannelle de Ceylan préconcentré et dilué dans 2.5 ml de CH ₂ Cl ₂ : 20 mg.ml ⁻¹ (en rouge) et 150 mg.ml ⁻¹ (en violet), et de la coumarine pure 0.75 mg.ml ⁻¹ (en noir)	54
Figure II.13	Spectres infrarouge de cannelle de Chine 10.22 mg.ml ⁻¹ (en rouge) et de la coumarine 0.75 mg.ml ⁻¹ préparés directement dans le CH ₂ Cl ₂ sans aucun traitement (en noir)	57
Figure II.14	Spectres infrarouge de cannelle de Ceylan 20 mg.ml ⁻¹ (en rouge) et de la coumarine 0.75 mg.ml ⁻¹ (en noir) préparés directement dans le CH ₂ Cl ₂ sans aucun traitement	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1	Classes des phénols	14
Tableau I.2	Composition chimique approximative de l'huile essentielle de l'écorce de cannelle de Ceylan	26
Tableau II.1	Systématique de la cannelle de Ceylan et de Chine	36
Tableau II.2	Caractéristiques organoleptiques de l'extrait de cannelle de Chine et de Ceylan	39
Tableau II.3	Caractéristiques analytiques de la coumarine préparée directement dans $\text{CH}_2 \text{Cl}_2$ /amylène	46
Tableau II.4	Taux de coumarine récupérée après traitement de préconcentration	49
Tableau II.5	Caractéristiques analytiques de la coumarine après préconcentration	50
Tableau II.6	Teneur en coumarine dans l'extrait de cannelle de Chine après traitement d'isolement et de préconcentration	52
Tableau II.7	Teneur en coumarine dans l'extrait de cannelle de Ceylan après traitement d'isolement et de préconcentration	55
Tableau II.8	Teneur en coumarine dans l'extrait de cannelle de Chine	58
Tableau II.9	Teneur en coumarine déterminée directement dans la cannelle de Ceylan	59

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes et notamment les épices par leurs vertus à la fois culinaires, hygiéniques et médicinales ont été réhabilitées à la lumière des connaissances scientifiques apportées par la biochimie et la phyto-pharmacognosie (étude des composants des plantes utiles en médecine). En Algérie, une grande marge de la population a recours aux plantes aromatiques et médicinales pour se faire soigner. Ces remèdes traditionnels sont transmis de génération en génération.

L'approvisionnement en plantes médicinales et aromatiques se fait essentiellement auprès des marchands d'épices "apothicaire". Dans la majorité des cas, ces produits sont vendus moulus et sans emballage spécifique. Leur provenance, car il faut signaler que les épices sont des produits exotiques dans leur majorité, et leur composition sont méconnues du consommateur.

Les épices ne posent aucun problème de toxicité lorsqu'elles sont utilisées en l'état dans les préparations culinaires, leur puissance aromatique limitant naturellement leur dose d'emploi bien en deçà des risques de toxicité. Par contre, il n'en est pas de même des huiles essentielles et des oléorésines, extraits très concentrés, qui peuvent être consommés de façon abusive et où certains composés peuvent présenter des risques de toxicité.

Quant à la qualité thérapeutique et nutritive des extraits utilisés de nombreux critères entrent en jeu à savoir :

- L'origine géographique de la plante.
- Le mode et la saison de culture et récolte de la plante.
- Le stade de développement végétatif de l'espèce ou la partie de la plante que l'on distille.
- Les conditions d'extraction et de stockage.

Ces critères sont d'une importance fondamentale sur la qualité des extraits et c'est ce qui explique les différences dans la composition chimique d'une référence à l'autre.

De nombreux chimistes et biochimistes consacrent une partie considérable de leur temps au laboratoire à recueillir des informations quantitatives sur les espèces qu'ils étudient en fonction de la variation d'un critère de qualité. La chimie analytique constitue donc un outil important pour le travail d'investigation de ces chercheurs.

La méthode d'analyse des extraits la plus fiable et la plus complète est la chromatographie en phase gazeuse. Cette analyse donne une véritable carte d'identité de l'extrait et permet de définir son profil caractéristique et sa spécificité biochimique.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) joue un rôle essentiel dans l'élucidation de la composition chimique des extraits ainsi que dans le contrôle quantitative des composants majoritaires suivis des composants minoritaires spécifiques permettant ainsi de mettre en évidence tout problème qualitatif dû à une mauvaise fabrication ou un mauvais stockage ou encore déceler toutes les fraudes possibles.

Il demeure évident que la mise au point de nouvelles méthodes d'analyse appropriées, rapide et extrêmement spécifiques, pour le dosage d'un grand nombre de substances, est indispensable et toujours nécessaire pour les chercheurs travaillant sur l'optimisation des différents paramètres cités ci-dessus.

On s'est rendu compte, lors de notre recherche bibliographique, que la spectrométrie IRTF a été utilisée seulement comme outil d'analyse qualitative de la coumarine. Devant la prolifération récente de règlements alimentaires,

l'objectif de ce mémoire, est de contribuer au développement des applications analytiques quantitatives de la spectrométrie IRTF et d'offrir un outil d'analyse fiable complémentaire pour le contrôle de qualité des extraits de cannelle par le contrôle de leur teneur en coumarine.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à la cannelle car d'une part c'est une épice à la large consommation en Algérie (cuisine, pâtisserie, tisane) et d'autre part les auteurs notent que la consommation de doses importantes de cannelle ou d'extraits de cannelle peut se révéler toxique. En effet, la cannelle contient de la coumarine, une substance susceptible, chez les personnes sensibles, de causer des dommages au foie et une inflammation. Les quantités de coumarine sont toutefois faibles dans la cannelle de Ceylan contrairement à la Cassia (ou cannelle de Chine) qui en contient beaucoup plus.

Notre travail est réparti en deux parties :

La première partie a été consacrée à une synthèse bibliographique (épices, métabolites secondaires, espèces étudiées, coumarine, travaux antérieurs réalisés dans ce domaine ainsi que les principes théoriques de la spectrométrie infrarouge).

Une deuxième partie qui englobe la partie expérimentale dans laquelle seront décrits le matériel utilisé ainsi que le protocole d'isolement et de préconcentration de la coumarine des extraits de cannelles. Nous y exposerons l'ensemble des résultats obtenus suivis de leur discussion.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1 Les plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante dont un des organes, par exemple la feuille ou l'écorce possède des vertus curatives. Dès son apparition, l'homme s'oriente rapidement vers le monde végétal, omniprésent autour de lui et qui lui offre déjà une source de nourriture, pour tenter de calmer ses maux. Par un apprentissage fait sans doute d'échecs et de réussites il a expérimenté des remèdes tirés du monde végétal. Certains de ces remèdes sont devenus classiques.

Les progrès de la biochimie et de l'analyse organique, ainsi que ceux de la physiologie végétale, ont permis de commencer un tri scientifique pour confirmer ou infirmer les actions curatives attribuées à certaines plantes [1].

I.2 Les épices

Le mot "épice" (du latin "species" qui signifie "substance"), apparu à la fin du XIIème siècle, désigne une substance aromatique d'origine végétale. Les épices sont originaires pour la plupart des régions tropicales d'Asie (Inde, Indonésie, Asie du sud-est) et d'Amérique (Mexique, Pérou, Antilles). Elles ne constituent pas une famille botanique en tant que telle et proviennent de différentes parties de plantes : le gingembre et le curcuma sont des rhizomes, la cannelle est une écorce, le clou de girofle est un bourgeon, le safran est une fleur, le poivre et la coriandre sont des fruits, la noix de muscade et la moutarde sont des graines. La popularité des épices a été et reste très liée à leurs propriétés organoleptiques [2].

La notion de flaveur des épices recouvre l'ensemble des perceptions olfacto-gustatives (odeurs, arômes et saveurs). Ces perceptions résultent de stimuli générés par une multitude de composés organiques. Certains de ces composés sont volatils et constituent ce que l'on appelle en général l'huile essentielle. Les autres non-volatils sont plus particulièrement responsables de la saveur et de la couleur [2].

La consommation d'épices n'est nullement mauvaise pour la santé, puisqu'au contraire un certain nombre de ces substances ont des effets bénéfiques sur l'organisme. En revanche, et c'est valable pour la plupart des aliments, un excès peut avoir des conséquences désagréables sur le système digestif (brûlures d'estomac). Quant aux surdoses elles peuvent entraîner des conséquences graves voir la mort. Ainsi en est-il de la muscade hallucinogène, du safran qui provoque des crises d'hilarité, de la fève tonka à partir de laquelle on fabrique la mort-aux-rats [3].

I.3 Les métabolites secondaires

Tous les êtres vivants ont un *métabolisme primaire* qui fournit les molécules de base : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides aminés, carbohydrates. Les métabolites primaires sont produits en quantité élevée par les plantes et sont " à faible prix de revient ". Il existe aussi un *métabolisme secondaire*, chez les plantes [1, 4].

Le terme de métabolites secondaires recouvre un vaste ensemble de molécules synthétisées par les végétaux. Ces substances ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante. Elles exercent cependant une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement [1, 4].

La nature de ces métabolites est très variable d'une espèce à l'autre. Leur accumulation varie aussi fortement entre les différents tissus et organes d'une même plante. Les métabolites secondaires sont impliqués dans les relations entre les plantes et leur environnement. Emis sous forme de composés organiques volatils ou exsudés par différents organes, ces composés jouent un rôle essentiel dans la communication de la plante avec son environnement. Les composés endogènes ont un rôle attractif (pigments) ou répulsif (anti-appétant) et toxiques vis-à-vis des herbivores et de la faune auxiliaire et participent à la défense des plantes contre les organismes pathogènes. Ils protègent également les tissus végétaux des rayonnements UVs et peuvent s'accumuler en fortes teneurs en

réponse aux stress abiotiques. Beaucoup de ces métabolites possèdent des propriétés médicinales et nutritionnelles de grand intérêt. Certains présentent des caractéristiques antioxydantes importantes pour la qualité des produits végétaux [1, 4].

Les métabolites secondaires à structure chimique souvent complexe, sont très dispersés et très différents selon les espèces. C'est seulement à partir de la deuxième moitié du 20^e siècle qu'il y a eu explosion des recherches en ce domaine grâce à l'évolution du matériel d'analyse à savoir :

- a) Les chromatographies (papier, couche mince, phase gazeuse, liquide haute pression,....).
- b) La résonance magnétique nucléaire.
- c) La spectrographie de masse.
- d) La spectrophotométrie.

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes selon leur appartenance chimique :

Les terpènes, les composés phénoliques, les stéroïdes et les alcaloïdes, Chacune de ces classes renfermant une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques [1, 4].

1.4 Les produits phénoliques

L'appellation « phénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules non azotées, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) libre, ou engagé dans une autre fonction éther, ester,... [5].

Les représentants les plus nombreux (plus de 5 000 molécules isolées) et les plus connus en sont les « flavonoïdes ». Sous cette qualification un peu abusive

se cachent en fait trois familles de molécules de structures voisines : les flavonoïdes *stricto sensu*, les anthocyanes et les proanthocyanidines [5]. Néanmoins, de nombreuses autres structures existent, telles que les acides phénoliques (dérivés de l'acide cinnamique), les tanins, les hydrolysables coumarines, les lignanes, les quinones et autres phloroglucinols [6].

La définition purement chimique est insuffisante pour caractériser les composés phénoliques végétaux. Elle inclurait des métabolites secondaires possédant ces caractéristiques chimiques alors qu'ils appartiennent à d'autres classes de composés c'est le cas des alcaloïdes (Boldine, Morphine,..) et des terpènes (Thymol, gossypol, carnosol, ..). Ces structures possèdent tous un noyau benzénique et un hydroxyle. Il s'avère donc nécessaire de faire intervenir un critère biosynthétique pour mieux cerner les limites du groupe [7].

Les composés phénoliques des végétaux sont les composés issus de deux grandes voies d'aromagenèse qui sont la voie du métabolisme de l'acide shikimique et la voie du métabolisme des polyacétates [6, 7]. Certains sont issus d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate entraînant ainsi la formation de composés mixtes. Cette voie intermédiaire est notamment à l'origine de tous les flavonoïdes [6].

Les phénols intéressent particulièrement deux domaines, la phytothérapie puisque l'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose en tout ou partie sur la présence de composés phénoliques dans ces plantes et l'hygiène alimentaire. En effet de plus en plus d'études indiquent que les phénols pourraient diminuer le risque d'apparition d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) [8].

La présence des phénols dans quasiment toutes les parties du végétal, confère une protection considérable à la plante. Elle assure la survie de cette dernière

dans les différentes conditions environnementales (climat, sols, sécheresse, rayon UV...). Ces métabolites sont doués de plusieurs rôles au sein de la plante, la lutte contre les agents pathogènes, l'astringence, le goût, la couleur de la plante, l'attraction, la pollinisation, et la contribution à la croissance de la plante [9-11].

I.4.1 Structures et catégories des composés phénoliques

Les composés phénoliques comprennent un noyau aromatique, qui possède un ou plus de substituants hydroxylés [12]. Ce dernier conduit les composés phénoliques simples à se polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés [13].

La plupart des composés phénoliques sont présents conjugués avec un mono ou polysaccharides, liés à un ou plusieurs groupes phénoliques, ça peut être aussi des dérivations fonctionnelles comme des esters et des méthyles esters [13]. Ces composés peuvent être groupés dans plusieurs classes, comme le montre le tableau I.1.

Tableau I.1 : Classes des phénols [13]

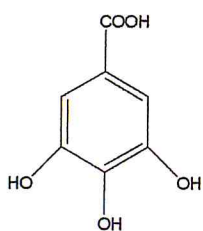
Classes	Structures
Phénols simples, benzoquinones	C_6
Acide Hydroxybenzoïque	C_6-C_1
Acétophénones, acide phénylacétique	C_6-C_2
Acide hydroxycinnamique, phénylpropanoïdes (coumarines, isocoumarines, chromones, chromènes)	C_6-C_3
Napthoquinones	C_6-C_4
Xanthones	$C_6-C_1-C_6$
Stilbènes, anthraquinones	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoïdes, isoflavonoïdes	$C_6-C_3-C_6$
Lignanes, neolignanes	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoïdes	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Lignines	$(C_6-C_3)_n$
Tanins condensés (proanthocyanidines ou flavolanes)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

I.4.1.1 Les acides phénoliques

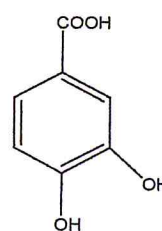
Les acides phénoliques se composent de deux sous groupes :

a) Les hydroxybenzoïques

On retrouve dans cette classe plusieurs molécules et les plus fréquentes sont : L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide protocatechuique et le p-hydroxybenzoïque. Ces composants ont une structure de (C₆-C₁) en commun (figure I.1) [7].



Acide gallique

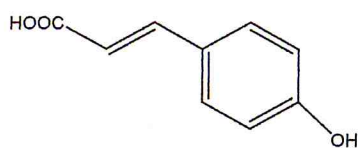


Acide protocatechuique

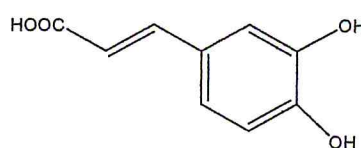
Figure I.1 : Structures chimiques de quelques hydroxybenzoïques [7, 13].

b) Les hydroxycinnamiques

Ce sont des composés aromatiques avec une chaîne latérale de trois carbones C₆-C₃, comme les acides p-coumariques et l'acide caféique [7] (figure I.2).



Acide p-coumarique



acide caféique

Figure I.2 : Structures chimiques de quelques hydroxycinnamiques [7, 13].

Les autres dérivées phénylpropaniques, comme les coumarines, sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique ou l'acide p-coumarique [7].

I.5 Les coumarines

I.5.1 Structure chimique et classification des coumarines

En dehors de quelque cas, dont la coumarine (1) elle même, toute les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombelliférone (2) est le précurseur de 6,7-dihydroxycoumarine (3) et 6, 7, 8-trihydroxycoumarine (4). Les hydroxyles de ces coumarines simples peuvent être méthylés ou, cela n'est pas rare, l'un d'eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique [7], la figure I.3 montre les structures chimiques de quelques coumarines.

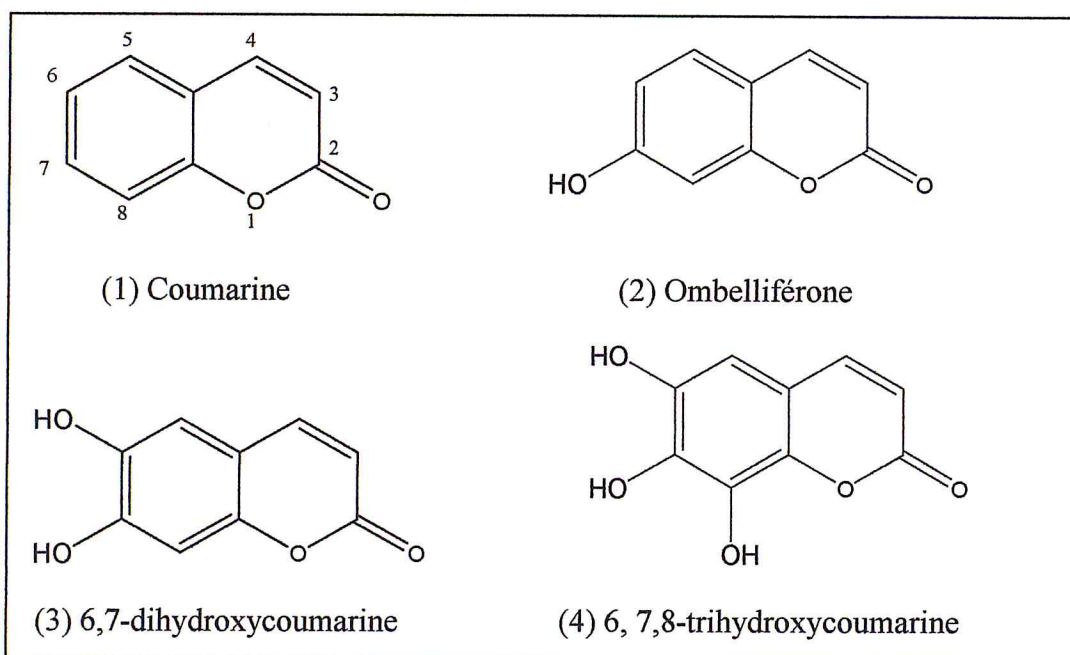


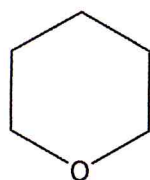
Figure I.3 : Structures chimiques de quelques coumarines [7].

En général les coumarines sont classées en quatre catégories comme suit [14] :

- Les coumarines simples : dont l'élément structural subit soit une hydroxylation, une alcoxylation ou une alkylation
- Les furano-coumarines : les éléments de cette famille consistent en un hétérocycle pentagonal qui est le furane (5) attaché au noyau coumarinique.
- Les pyrano-coumarines : les composés de ce groupe sont analogues à ceux du groupe précédent (les furano-coumarine), à part que les substances de cette

catégorie consiste en un hétérocycle hexagonal qui est le pyrane (6) attaché au noyau coumarinique.

- Des coumarines substituées dans le noyau de pyrane :



(5) Furane



(6) Pyrane

I.5.2 Propriétés physico-chimique des coumarines

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools, et dans les solvants organiques, tels que les dioxydes d'éthyles ou les solvants chlorés, avec lesquels on peut les extraire. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau [7].

Les coumarines ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants, profondément modifié en milieu alcalin (KOH, NaOCH₃). Examinées en lumière UV, les CCM de drogues à coumarines présentent des taches dont la coloration, exaltée en présence d'ammoniac, varie du bleu au jaune et au pourpre [7].

Dans ce travail, notre ambition se limitera à l'étude d'un phénol simple appartenant au groupe des hydroxycinnamiques et connu par le nom de coumarine.

I.5.3 La coumarine

La coumarine a été isolée par Vogel en 1820 par extraction à partir de fèves de tonka (*Dipteryx odorata*) d'où le nom de camarou, nom vernaculaire de la fève de tonka [7]. Elle a ensuite été identifiée dans un grand nombre de plantes appartenant à de nombreuses familles différentes. Ses occurrences sont mieux connus dans le mélilot (*Melilotus officinalis alba*), aspérule odorante (*Asperula*

odorata), la feuille de la vanille (*Trilisa odoratissima*), gousses de vanille (*Vanilla planifolia*), la casse (*Cinnamomum cassia*), lavande (*Lavandula officinalis*) et le baume du Pérou (*Myroxylon pereirae*) [15, 16, 17, 18]. La coumarine est un produit naturel qui présente des différences entre espèces marquées à la fois dans le métabolisme et la toxicité [19].

Chimiquement la coumarine est une substance naturelle organique aromatique connue dans la nomenclature internationale comme 2H-1-benzopyrane-2-one qui peut être considérée en première approximation, comme une lactone de l'acide 2-hydroxy-Z-cinnamique (figure I.2).

Le même terme de coumarine désigne aussi la classe des composés phénoliques dérivés de cette dernière molécule, la 2H-1-benzopyrane-2-one. Ces composés possèdent des hydroxyles phénoliques qui peuvent être méthylés ou engagés dans des liaisons hétérosides. Plus d'un millier de coumarines naturelles ont été décrites. Elles sont très largement distribuées dans le règne végétal [20]. La majorité des coumarines utilisées commercialement sont synthétisées à partir de salicylaldéhyde [21], mais la coumarine isolée dans les fèves tonka reste de qualité supérieure [19].

I.5.4 Usage de la coumarine

I.5.4.1 Usage en médecine

Les coumarines manifestent diverses activités biologiques, qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrone [22-25]

En médecine, la coumarine est utilisée dans le traitement adjuvant du lymphoedème postmastectomie, en complément des méthodes de contention. Son action antioedématisque résulte de l'augmentation du drainage lymphatique et de la stimulation de l'activité protéolytique des macrophages [26]. Comme conséquence de son usage médical, de nombreuses personnes qui ont été exposées à des doses thérapeutiques de coumarine allant de 100 à 7000 mg par jour pendant des périodes allant de deux semaines à plus de deux ans, on été

atteintes d'hépatite ce qui a conduit au retrait du marché de la spécialité correspondante [27].

Cependant, la coumarine reste utilisée en phytothérapie, mais à des doses beaucoup plus faibles, comme dans les spécialités contenant du mélilot.

L'action commune des coumarines, de différentes origines, est celle contre les différents types de troubles gastriques [28], antivirale [29], antimicrobienne [30]. A la différence de ses dérivés (comme la coumadine), la coumarine elle-même n'a pas d'activité anticoagulante. Le 4-hydroxy-3-[1-(4-nitrophényl)-3-oxobutyl] coumarine, appelé usuellement acénocoumarol, est antagoniste de la vitamine K et inhibiteur de la synthèse des facteurs de la coagulation vitamino-K-dépendants. Ses propriétés anticoagulantes sont utilisées dans la thérapie des maladies thromboemboliques [31].

Dans ce contexte, il a été prouvé que la fermentation humide de foin qui renferme de la coumarine (en raison de la présence de mélilot) génère des dérivés anticoagulants, qui entraînent des hémorragies chez les herbivores qui en consomment [31].

I.5.4.2 Usage alimentaire

Le codex alimentarius a recommandé en 1985 (réaffirmé en 2006) de ne pas ajouter la coumarine telle quelle aux aliments et aux boissons. Elle peut être présente dans les aliments et les boissons seulement sous la forme de préparations aromatisantes naturelles (par exemple l'extrait de fève tonka) et pas plus de 2 mg/kg dans les denrées alimentaires et les boissons et de 10 mg/kg dans les caramels spéciaux [32]. En 2004 puis en juillet 2008, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (efsa) a recommandé une dose journalière acceptable (DJA) de 0,1 mg de coumarine/kg de poids corporel. Un calcul simple permet de s'apercevoir que la DJA est très largement dépassée par une cuillère à café de cannelle de Chine (teneur en coumarine importante). D'où l'importance de bien

distinguer cette cannelle de la cannelle de Ceylan (teneur en coumarine très faible) [32].

I.5.4.3 Autres usages

L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie. Actuellement, elle entre dans la composition de 90% des parfums (dans 60% avec une teneur supérieure à 1%). Elle s'associe bien à la vanilline dont elle atténue le côté alimentaire. Elle est aussi utilisée dans les produits cosmétiques (déodorants, eaux de toilette, crèmes, shampoings, savons de toilette, dentifrice, etc.).

On trouve aussi de la coumarine dans les cigarettes indiennes, les bidî, et les cigarettes aux clous de girofle indonésiennes, les kreteks [33].

Pour neutraliser ou masquer les mauvaises odeurs, la coumarine est aussi ajoutée aux peintures, insecticides, encres, aux aérosols, au caoutchouc ou aux matières plastiques [34].

I.6 Travaux antérieurs réalisés sur la coumarine

Différentes techniques d'analyses instrumentales ont été utilisées pour identifier la coumarine :

a) Fluorescence sous la lumière UV

Les coumarines sont caractérisées par une fluorescence à l'UV à 366 nm [35-38, 9]. Cette fluorescence est en général :

- Bleue pour les coumarines hydroxylées en 7 (Ombélliférone).
- Pourpre pour les coumarines prénylées.
- Jaune pour les furanocoumarines [35].

b) Spectroscopie infrarouge IR

Cette technique qui fournit des informations sur les groupements fonctionnels d'une molécule a été exploitée pour l'identification de la coumarine en utilisant

la bande d'absorption caractéristique à la vibration d'allongement de la liaison C=O. Pour la lactone conjuguée la bande apparaît pratiquement dans la région (1740-1770 cm^{-1}) [39, 40].

c) Spectroscopie ultraviolet UV

Les coumarines ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants, profondément modifié en milieu alcalin : KOH, NaOH, NaOCH₃ et en présence d'AlCl₃. Ce dernier forme un complexe avec les hydroxyles portés par des carbones adjacents, ce qui induit un déplacement bathochrome [7].

Pour la coumarine, les absorptions maximales sont présentées dans deux bandes en 276 nm et 311 nm. La présence des substituants alkylés induit par des modifications des valeurs de la bande en 311 nm vers 325 nm [41, 42]. Selon la position de OH, le déplacement est plus ou moins fort [7].

d) Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN

L'allure des spectres RMN ¹H des coumarines est caractéristique. Les protons oléfiniques H-3 et H-4 apparaissent respectivement sous forme de deux doublets à : δ (ppm) [7,50 – 7,90], [6,10 – 6,40] pour les coumarines simples et les furanocoumarines [43-46].

e) La spectrométrie de masse des coumarines

Les composés cycliques fortement insaturés tels que la « coumarine », et mêmes les ions qui se sont formés par fragmentation au niveau d'un groupement carbonyle, ont la propriété de pouvoir perdre un groupement CO (28 uma). S'il y a plusieurs groupements CO dans une molécule, ils peuvent être éliminés les uns après les autres [40, 39, 47].

La technique utilisée pour la quantification de la coumarine était la CLHP surtout pour l'évaluation de sécurité de la coumarine dans les aliments. En effet

certains aliments comme des biscuits étoilés fabriqués à partir de la cannelle de Chine contenaient une quantité remarquable de coumarine au dessus du niveau de codex [32]. Cette technique a été utilisée aussi pour l'analyse quantitative de la coumarine dans l'extrait de *Mikamia Glomereta Spreng* [48], ces travaux ont confirmé que la CLHP est une méthode efficace pour le contrôle de qualité des matrices contenant la coumarine.

I.7 Espèce étudiée : la cannelle

Dans ce travail, le dosage de la coumarine par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier va être réalisé sur deux espèces de cannelle, la cannelle de Ceylan et la cannelle de Chine qui appartiennent au genre *Cinnamomum*.

I.7.1 Historique

La cannelle (nom arabe : Kerfa) est la doyenne des épices. On en faisait déjà mention dans les papyrus égyptiens : Elle entrait dans la composition de parfums qui étaient utilisés pour l'embaumement des morts. Les propriétés de la cannelle sont mises à profit par la médecine chinoise 2700 ans avant Jésus-Christ. Dès 950 ans avant Jésus-Christ et pendant des siècles, les Arabes furent les maîtres incontestés du commerce, dangereux sans doute mais lucratif, de la cannelle. Ils gardaient d'ailleurs soigneusement secrètes les provenances de cette denrée tellement appréciée [49].

D'un point de vue étymologique, le nom générique du Cannelier vient du grec « kinnamômou » ou « kinnamomon » qui désigne cette Lauracée aromatique, « Kinein » signifiant enroulé. Le nom de Cannelle, quant à lui, vient du latin « canna » qui signifie roseau, tuyau, en référence à la forme des bâtonnets que l'on utilise dans le commerce [50].

I.7.2 Description des espèces appartenant au genre *Cinnamomum*

En dehors de son origine historique et culturelle, la Cannelle a aussi une origine et une situation géographique bien spécifiques. La Cannelle appartient à

la famille des lauracées. Le genre *Cinnamomum* comprend environ 250 espèces dont plusieurs d'entre elles sont aromatiques et des arômes qui sont largement distribués en Chine, en Inde et en Australie [49].

Le *Cinnamomum Verum* (syn. *C. Zeylanicum*) est originaire du Sri Lanka où il est cultivé sur une grande échelle, et exporté (connu dans le commerce comme la cannelle de Ceylan ou cannelle de Sri Lanka ou cannelle vraie) [51].

Cassia ou la cannelle de cassia provient de différentes sources, les plus connues étant celle des Chinois (*C. Cassia*, syn. *C. Aromaticum*) nommée aussi cannelle de Chine, et celle des indonésiens Cassia (*C. Burmannii*) [51]. La cassia de l'Inde provient de *C. Tamala* et quelques autres espèces apparentées (*C. Impressinervium*, *C. Bejolghota*), qui sont indigènes à la région nord-orientale de l'Inde. Ces espèces ont été utilisées dans les médecines traditionnelles de l'Inde et la Chine [51].

I.7.3 Différence entre la cannelle de Chine et de Ceylan

Dans de nombreux cas, très peu de distinctions sont faites entre l'écorce de *Cinnamomum Verum* (syn. *Cinnamomum Zeylanicum*, cannelle vraie) et *Cinnamomum Cassia* (cannelle de Chine). L'écorce de *Cinnamomum Verum* fournit une meilleure qualité de l'huile essentielle. Cassia a été utilisée en Chine bien avant l'introduction de la cannelle de Ceylan, mais elle est maintenant considérée comme un substitut de qualité inférieure [51]. La distinction faite par les écrivains chinois, hébraïques, grecs et latins de l'Antiquité entre ces deux sortes de cannelle a été toujours admise sur le plan commercial et reconnu sur le plan scientifique [52].

Le commerce fournit plusieurs espèces de cannelle, la cannelle de Ceylan *C. Zeylanicum*, qui est en écorces très minces, roulées comme du papier et renfermées les unes dans les autres, d'une couleur citrine blonde, d'une saveur aromatique un peu piquante et la cannelle de chine *C. Cassia*, plus épaisse que la

précédente, moins roulée, d'une couleur plus foncée, d'une saveur plus piquante et moins agréable [53].

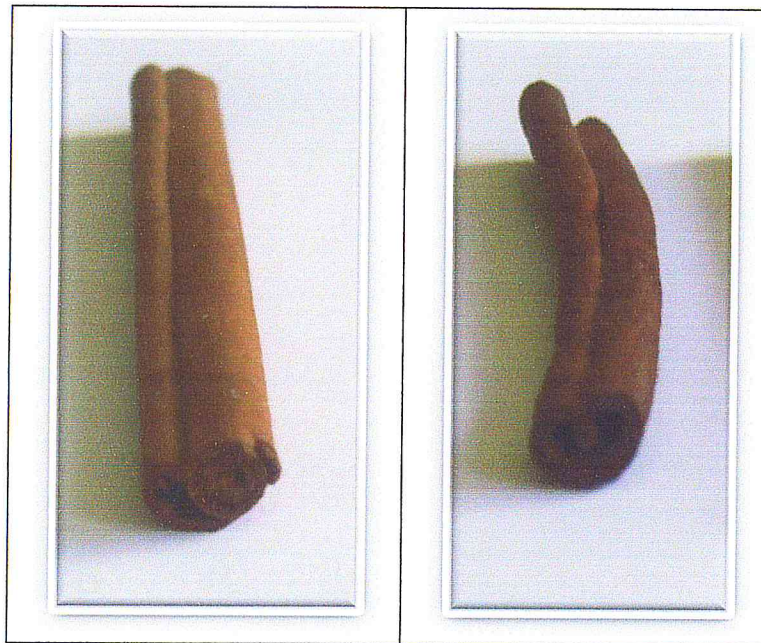


Figure I.4 : cannelle de Ceylan

Figure I.5 : cannelle de Chine

La cannelle de Chine et la cannelle de Ceylan se distinguent aussi par leur mode de préparation. Les bandes d'écorce sont mises à fermenter sous des nattes pendant toute une nuit. En ce qui concerne la cannelle de Chine, on se contente de retirer le liège de l'écorce tandis que pour la cannelle de Ceylan on effectue, le lendemain, une opération complémentaire qui consiste à gratter toute la couche extérieure de l'écorce pour n'utiliser que la couche intérieure. Cette opération a pour résultat de provoquer l'enroulement de l'écorce par les deux côtés tandis que l'écorce plus épaisse de la cannelle de Chine ne s'enroule que d'un seul côté [52] (figure I.4 et figure I.5).

I.7.4 Cannelle de Ceylan

I.7.4.1 Description de la cannelle de Ceylan

Le cannelier est originaire de l'île de Ceylan (aujourd'hui le Sri Lanka). Il s'agit d'un arbre de la famille des lauracées de 15 à 20 m de haut, avec de

longues branches [54-57]. Les feuilles sont opposées, d'un vert brillant, à l'aspect cireux, elliptiques avec la base arrondie et le sommet pointu. Les jeunes feuilles sont de couleur rouge. Elles sont pourvues de trois nervures longitudinales bien visibles depuis la base jusqu'à la pointe, de couleur plus claire. L'inflorescence est axillaire ou terminale, sous forme de panicules constituées de petites fleurs jaunes. Le fruit est une drupe ovoïde de couleur noirâtre. L'écorce des jeunes tiges est brun clair et douce au toucher, celle des tiges matures est brun foncé et rugueuse. C'est l'écorce des jeunes pousses qui est récoltée, séchée et ensuite vendue [54-57].

De grandes variations physiques existent au sein de l'espèce. Le type de sol et le climat ont un effet sur la croissance et le type d'écorce [55, 56, 58]. En effet, au Sri Lanka, on reconnaît cinq types d'écorces sur la base de critères morphologiques. Ces différences visuelles ne sont pas corrélées à la qualité de l'écorce en termes d'épices ni au rendement ou à la composition chimique de l'huile [54-56].

Le cannelier de Ceylan a été introduit à Madagascar et aux Comores au cours du 19^{ème} siècle. Cet arbre pousse dans les régions chaudes et humides, depuis les régions côtières 15 jusqu'à 200 m d'altitude. Originellement cultivé en plantations, le cannelier est depuis devenu un arbre sauvage, via la propagation par les oiseaux [58].

Le cannelier croît dans les régions tropicales humides. Il produit son écorce la plus fine sous des températures moyennes de 27 à 30°C mais pousse très bien dans des environnements très variés. Il nécessite des précipitations annuelles de l'ordre de 2000 à 2500 mm sans saison sèche trop prononcée. Il croît depuis le niveau de la mer jusqu'à 1500 m. Il s'adapte très bien à des environnements forestiers mais pousse aussi s'il est isolé. Il croît sur de nombreux types de sols bien que ceux-ci influencent sa croissance. Les sols sableux permettent la production d'une écorce de meilleure qualité [54-56].

I.7.4.2 Composition chimique de la cannelle de Ceylan

L'écorce contient des tanins, résines, mucilage, gomme, sucres, oxalate de calcium, peu de coumarine [59], de l'amidon, des diterpènes polycycliques, des oligomères proanthocyanidoliques et des huiles volatiles. L'espèce *C. Zeylanicum* possède la plus grande quantité d'eugénol parmi les variétés de l'huile d'écorce du genre *Cinnamomum* [59].

D'autres composés furent identifiés en 1892 et 1902 par les chimistes de la société Schimmel, en particulier, Walbaum et Hüthing, qui notent que la teneur en eugénol dans l'huile essentielle des feuilles est plus importante que celle de l'écorce [60], et ils mirent en évidence plusieurs composés par préparation de dérivés chimiques (réactions chimiques) [61].

Elle est très majoritairement composée de dérivés phenylpropaniques: E-cinnamaldehyde (pas moins de 60 % et pas plus de 80 % [62]), eugénol jusqu'à 10 %, et l'acétate de cinnamyle. L'huile essentielle de la cannelle renferme également de très nombreux mono et sesquiterpènes [7].

Tableau I.2 : Composition chimique approximative de l'huile essentielle de l'écorce de cannelle de Ceylan [63]

Constituants	Pourcentages
Cinnamaldéhyde (forme trans)	67
Eugénol	4
Cinnamyl acétate	5
l-linalol	2
β -caryophyllène	3
α -terpineol	0.7
Coumarine	0.7
1,8-cineole	0.6
Terpinene-4-ol	0.4

I.7.5 Cannelle de Chine

I.7.5.1 Description de la cannelle de Chine

La cannelle de Chine, parfois appelée cannelle de l'Indochine, est l'écorce du cannelier de Chine, encore nommé Cannelier d'Annam et du Tonkin, c'est la Cassia du commerce. Le cannelier est originaire de la Chine. Il s'agit d'un arbre de la famille des lauracées de haute taille (13 à 17m) et de 40-60 cm de diamètre avec un tronc droit et cylindrique et une écorce brune qui est à 13-15 mm d'épaisseur lorsqu'ils sont mûrs. Il possède des feuilles d'un vert sombre et d'aspect cireux, il croit à l'état sauvage dans les régions montagneuses de l'Indochine jusqu'à plus de 2 000 m d'altitude. Ailleurs en Asie et en Indonésie, il semble bien que l'arbre n'ait été vu qu'à l'état cultivé [51].

I.7.5.2 Composition chimique de la cannelle de Chine

Les huiles essentielles d'écorce de cannelle contiennent : β -caryo-phyllène (1.4 à 3.3 %), alcool cinnamique (0.7 à 4.9 %), linalol (2.3 à 4.9 %), benzaldéhyde (1.0 à 1.2 %), cinnamaldéhyde (58 à 78.1 %), cinéole-1,8 (1.7 à 2.3 %), benzoate de benzyle (0.7 à 1 %), acétate de cinnamyle (2.3 à 6 %), eugénol (traces à 8.8 %), acétate d'eugényle (0.1 à 1.5 %). L'huile essentielle de C. Cassia ou cannelle de Chine ressemble à celle de Ceylan. Ces essences ont néanmoins quelques différences entre elles : l'eugénol en très faible quantité dans la cannelle de Chine et peut atteindre jusqu'à 8.8 % dans la cannelle de Ceylan, le linalol, négligeable dans les huiles essentielles de cannelle de Chine est assez important dans celle de Ceylan (2.3 à 4.9 %), le cinéole-1,8 est plus abondant dans les essences de C. Zeylanicum, enfin l'hydroxycinnamaldéhyde semble présent uniquement dans les huiles essentielles de C. Cassia [51], cette dernière contient un taux de coumarine plus élevé que la cannelle de Ceylan [32, 51, 63].

I.7.6 Propriétés pharmacologiques et emplois de la cannelle

En plus de son utilisation comme arôme, l'écorce de cannelle et son huile essentielle ont été utilisées il y a des milliers d'années pour traiter la diarrhée

chronique, le rhumatisme, le froid, l'hypertension, les souffrances abdominales et du cœur, les troubles rénaux, ... etc [59]. En France ainsi qu'en Allemagne, l'écorce ou l'huile essentielle, sont traditionnellement utilisées par voie orale dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que les ballonnements épigastriques, la lenteur de la digestion, éructation, flatulence, dans les asthénies fonctionnelles, et pour faciliter la prise de poids [7].

L'écorce possède plusieurs propriétés: carminative, astringente [7], sudorifique, antispasmodique, antiseptique, tonique [64].

L'huile essentielle est aussi : carminative, de même qu'elle a une action antiseptique, antivirale, bactéricide et larvicide [59]. Ses activités antibactériennes et antifongiques ont été démontrées in vitro [7].

Le cinnamaldéhyde, qui est le constituant majeur de l'huile essentielle de la cannelle, a fait l'objet de plusieurs travaux expérimentaux pour vérifier ses actions notamment sédatives du système nerveux central chez la souris, l'effet stimulant respiratoire et myocardique chez le chien. Il est aussi antibactérien. Son action hypotensive (chien, cobaye) serait due à une vasodilatation périphérique. Il a une capacité à diminuer les mouvements gastriques et intestinaux (rongeurs). La plupart de ces activités ne sont en fait observées que pour des doses élevées administrées par voie parentérale [7]. Il possède aussi une activité antibactérienne vis-à-vis de plusieurs microorganismes [65].

En plus de toutes ces propriétés, la cannelle est réputée d'avoir une forte activité lipolytique [59]. Il a été rapporté aussi, que certains extraits de la cannelle (chloroforme, éther de pétrole et extraits aqueux) possèdent une activité mutagène, testée sur *Bacillus subtilis* [66].

D'autres travaux ont montré que l'extrait éthanolique de l'écorce de cannelle possède une action inhibitrice d'endotoxine bactérienne [67]. En parallèle de l'action pharmacologique voulue, l'huile essentielle et le cinnamaldéhyde peuvent

être à l'origine de certaines manifestations allergiques, se traduisant par une urticaire, des oedèmes de la face et des lèvres,... [7].

I.7.7 Travaux antérieurs réalisés sur la cannelle

L'huile essentielle de la cannelle a été utilisée pour la médecine et les additifs alimentaires. Les informations concernant le composé volatil des huiles essentielles à partir d'espèces différentes de cannelle sont encore limitées.

Cinq espèces de cannelle, à savoir : *Cinnamomum Cassia*, *Cinnamomum Zeylanicum*, *Cinnamomum Tamala*, *Cinnamomum Burmannii*, *Cinnamomum Pauciflorum*, ont été choisis pour préparer des huiles essentielles par hydrodistillation, identifier et quantifier leurs compositions des composés volatils. *C. Cassia* s'est distinguée par le meilleur rendement d'huile essentielle, suivie par *C. Zeylanicum*, *C. Pauciflorum*, *C. Tamala* et *C. Burmannii*. La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC / MS) a été utilisée pour identifier et quantifier la composition en composés volatils.

Les résultats ont montré la différence apparente dans les compositions des composés volatils d'huiles essentielles entre les espèces, ce qui permettra de comprendre leurs propriétés médicinales. La teneur en coumarine dans l'huile essentielle des feuilles de *C. Cassia* 6.36%, dans le *C. Zeylanicum* est de 0.05%, dans le *C. Burmannii* 13.39% [68].

Comme il a été mentionné plus haut, à savoir que la dose journalière admise est très largement dépassée par une cuillerée à café de cannelle de Chine. Et compte tenu du fait que cette épice est très utilisée en Algérie en cuisine et dans les remèdes traditionnels il est important de bien distinguer cette cannelle de la cannelle de Ceylan, et c'est dans ce cadre là que s'inscrit notre travail. Il s'agit en l'occurrence de déterminer le taux de coumarine dans deux espèces de cannelles par spectrométrie IRTF.

I.8 Spectrométrie infrarouge

La spectrométrie infrarouge, est l'un des outils les plus puissants dont dispose tout scientifique, qu'il soit chimiste biologiste médecin ou autre dans l'analyse.

La spectrométrie infrarouge moderne est un outil polyvalent permettant l'analyse qualitative et quantitative de nombreuses espèces moléculaires. Les applications de la spectrométrie infrarouge se classent en trois grandes catégories basées sur les trois régions spectrales de l'infrarouge (proche IR, moyen IR et lointain IR). La région la plus utilisée est l'infrarouge moyen qui s'étend de 4000 à 400 cm^{-1} (2-25 micro mètre) ou l'on utilise des spectres d'absorption, d'émission ou de réflexion dans le but d'analyse quantitative et qualitative [69].

Les spectres d'absorption infrarouge permettent, d'un côté, l'étude de la structure globale des molécules organiques par la détection de leurs groupes fonctionnels dans la région spectrale comprise entre (4000-1500 cm^{-1}) et de l'autre, fournissent des informations spécifiques à la molécule dans la zone spectrale comprise entre (1500-400 cm^{-1}), « zone des empreintes digitales du composé », ce qui conduit, dans certains cas, l'identification de celle-ci. Des analyses quantitatives d'échantillons complexes sont aussi de plus en plus fréquemment réalisées par spectrométrie d'émission et d'absorption vu le caractère unique d'un spectre infrarouge [70].

La spectrométrie infrarouge a connu un essor considérable dans les années 1940 avec le développement des spectromètres commerciaux comportant notamment des détecteurs de meilleures qualités que précédemment et des éléments dispersifs améliorés. C'est à cette période également qu'apparurent les monochromateurs à double faisceau. Plus récemment, vers 1970, les spectromètres conventionnels ont été largement supplantés par les dispositifs à transformée de Fourier (IRTF) [70].

Les dispositifs IRTF présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux spectromètres IR classiques à réseau. Parmi ceux-ci, on peut mentionner la possibilité de balayages rapides autorisant l'étude de l'échantillon en évolution, le fait que toutes les fréquences atteignent le détecteur simultanément et qu'un rapport signal sur bruit élevé peut être obtenu rapidement, le fait qu'une ouverture circulaire plus grande qu'une fente peut être utilisée, la possibilité d'utiliser un laser pour obtenir une précision en nombre d'onde très élevée (de l'ordre de $0.01\text{-}0.001\text{ cm}^{-1}$) et le fait que les temps d'échantillonnage sont courts et qu'ainsi les effets thermiques interviennent peu[70].

Bien que la spectrométrie IRTF soit devenue l'une des méthodes d'analyse quantitative utilisée dans le plus grand nombre de disciplines scientifiques, elle présente des limitations relatives particulièrement à la faible sensibilité de cette technique et au chevauchement des bandes des produits, ces problèmes peuvent être résolus en faisant appel à des méthodes de préconcentration (ELL, EPS, ...) et de séparations (CLHP) ou en utilisant les spectres dérivés [71, 72].

Chapitre II

**Détermination de la coumarine dans la
cannelle de Ceylan (*C. Zeylanicum*) et
la cannelle de Chine (*C. Cassia*) par
spectrométrie infrarouge à transformée
de Fourier**

II.1 Introduction

Ce chapitre est consacré au dosage de la coumarine contenue dans les extraits de l'écorce la cannelle de Ceylan (*Cinnamomum Zeylanicum*) et l'écorce de la cannelle de Chine (*Cinnamomum Cassia*) par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier. Dans ce domaine, les chercheurs se sont intéressés à la valorisation des extraits et des huiles essentielles de l'écorce de différentes espèces de cannelle soit par la détermination de la composition chimique de ces extraits par CG/MS [7, 59, 65, 66] soit par la réalisation de leurs tests d'activité biologiques [7, 59, 65, 66].

Une étude a été réalisée également sur la partie végétale du cannelier. En ce qui concerne le dosage de la coumarine dans les extraits des cannelles, la CLHP a été employée comme technique de quantification [34, 50].

On s'est rendu compte, lors de notre recherche bibliographique, que la spectrométrie IRTF a été utilisée que pour l'analyse qualitative de la coumarine [41, 42].

La cannelle est une épice très prisée en Algérie, Pour faciliter sa consommation, la cannelle est vendue généralement broyée. Il est évidemment impossible pour le consommateur d'être sûr de la provenance de la poudre de cannelle (écorce moulue) car l'espèce botanique n'est jamais indiquée sur les emballages [34].

Même si les deux cannelles possèdent les mêmes vertus thérapeutiques, il en demeure pas moins que la cannelle de Chine contient des niveaux de coumarine significativement plus élevés que la cannelle de Ceylan. La coumarine a soulevé certaines préoccupations des autorités de sécurité alimentaire qui ont fixé une limite maximale de 2 mg.kg^{-1} pour les aliments et les boissons en général à cause de sa toxicité [34].

De ce fait, l'objectif de ce mémoire est de contribuer au développement des applications analytiques quantitatives de la spectrométrie IRTF et d'offrir un outil d'analyse fiable complémentaire pour le contrôle de qualité des extraits de cannelle à la prolifération récente de règlements alimentaires.

II.2 Etude systématique de la cannelle de Ceylan (*Cinnamomum Zeylanicum*) et de la cannelle de Chine (*Cinnamomum Cassia*)

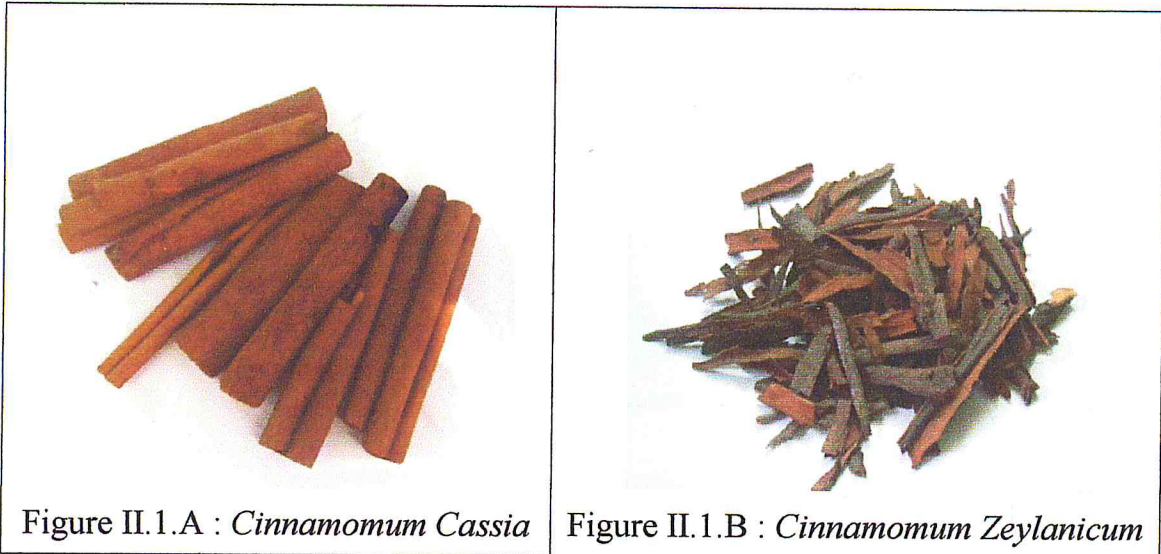
L'écorce de cannelle est l'une des principales épices utilisées par l'homme. Les produits d'extraction de l'écorce de cannelle sont utilisés comme aromatisant en confiserie, dans les assaisonnements alimentaires, dans les boissons ainsi que dans les parfums [73]. Beaucoup de sorte de cannelles existent à la surface du globe mais deux d'entre elles sont plus connues et plus usitées :

- La cannelle de Chine – *Cinnamomum Cassia* (Figure II.1.A).
- La cannelle de Ceylan – *Cinnamomum Zeylanicum* (Figure II.1.B).

Originnaire du Sri Lanka et du sud de l'Inde, la cannelle de Ceylan (*Cinnamomu Zeylanicum*) pousse dans les forêts tropicales de Ceylan, de l'Inde orientale, de Java, de, Madagascar, jusqu'à 500 mètres d'altitude. Elle est cultivée de manière intensive dans toutes les régions tropicales, notamment aux Philippines et aux Antilles [54].

On la multiplie par bouturage et, tous les deux ans, à la saison des pluies, on taille les arbrisseaux au ras du sol. L'écorce est récoltée sur les nombreux rejets et mise à fermenter pendant 24 heures. L'écorce interne peut alors être séparée de l'écorce externe [54].

La cannelle de Chine (*Cinnamomum Cassia*) est originaire de Chine et du Japon, elle est employée en médecine chinoise traditionnelle dans les mêmes cas que la cannelle de Ceylan [53].



Les bâtonnets de *Cinnamomum Cassia* sont facilement différenciables par rapport à ceux de *Cinnamomum Zeylanicum* car elle est plus épaisse que la précédente, moins roulée, et d'une couleur plus foncée. D'un point de vue du goût, les bâtonnets de la cannelle de Chine sont plus piquants, moins sucrés et légèrement plus amers que ceux de la cannelle de Ceylan [62].

Les deux cannelles ayant fait l'objet de ce travail ont été achetées au niveau de Blida. La cannelle de Chine a été facilement identifiable grâce aux caractéristiques que nous venons de citer. Pour ce qui est de la cannelle de Ceylan, les bâtonnets n'étaient pas disponibles sur le marché mais uniquement l'écorce externe. L'identification s'est donc faite sur la couleur (ocre), le goût sucré plus prononcé et surtout sur la friabilité.

La systématique de ces deux cannelles est décrite dans le tableau II.1

Tableau II.1 : Systématique de la cannelle de Ceylan et de Chine

Classification	<i>Cinnamomum Zeylanicum</i>	<i>Cinnamomum Cassia</i>
Phyllum	Planta	Planta
Sous phyllum	Trachéophyte = plantes vasculaires	Trachéophyte = plantes vasculaires
Embranchement	Spermatophytes = plantes à graines	Spermatophytes = plantes à graines
Classe	Dicotyledonae	Dicotyledonae
Sous classe	Magnoliidae	Magnoliidae
Ordre	Magnoliales	Magnoliales
Famille	Lauracée	Lauracée
Genre	Cinnamomum	Cinnamomum
Espèce	<i>C. zeylanicum</i> Nees ou <i>C. Verum</i>	<i>C. cassia</i> ou <i>C. Aromaticum</i>
Nom commun	Cannelle de Ceylan	Cannelle de Chine

II.3 Partie expérimentale

II.3.1 Appareillage et réactifs

Les spectres sont enregistrés sur un spectrophotomètre à transformée de Fourier IRTF de marque Jasco model FT/IR 4100 type A OMNIC. Il a été utilisé pour effectuer des mesures entre 4000-400 cm^{-1} .

Le système est équipé d'un détecteur de sulfate triglycine deutéré (DSTG) à température stabilisée, d'une séparatrice de radiation en Ge/KBr, d'une fente type global et d'un système de processus digital (SPD). Les fenêtres utilisées sont construites de fluorure de calcium (CaF_2), et d'entretoise en téflon de 0.5 mm d'épaisseur. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de balayage égal à 10 spectres.

L'introduction des solutions se fait par écoulement bloqué « stop flow » en modifiant au niveau de notre laboratoire la cellule conventionnelle en une cellule de flux. L'avantage de cette cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au

nettoyage et au remplissage des cellules conventionnelles, de minimiser la consommation des solvants organiques et de réduire le temps d'analyse.

L'échantillon est introduit dans la cellule à l'aide d'une pompe péristaltique comme le montre le montage de flux de la figure II.2, on stoppe à chaque fois momentanément, à ce moment un spectre correspondant à l'échantillon est enregistré entre 1000 et 4000 cm^{-1} , on rétablit le flux pour laver la cellule avec le solvant ou avec une autre solution.

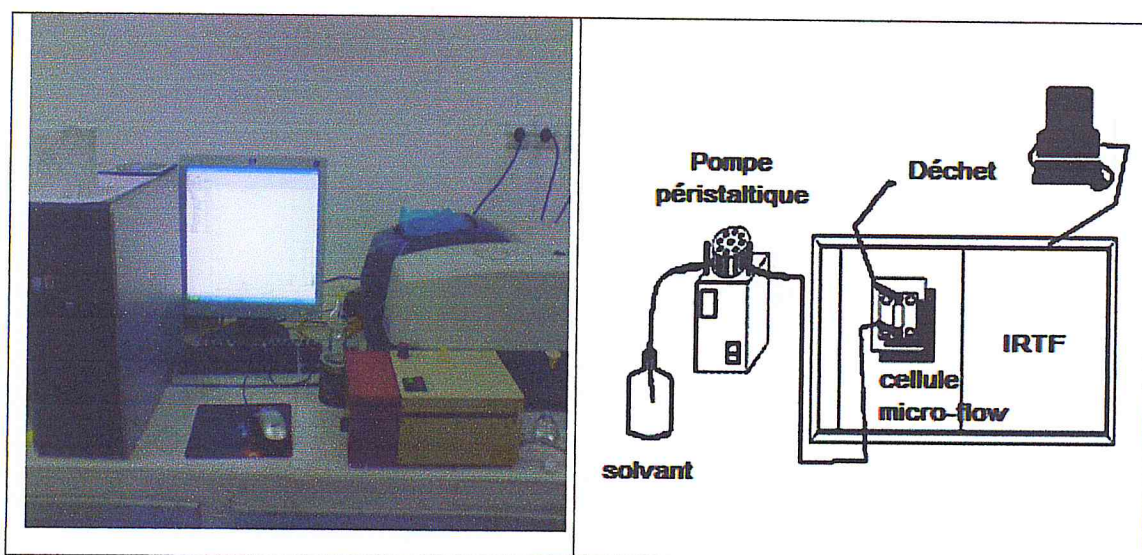


Figure II.2 : Montage de flux utilisé pour la détermination de la coumarine dans les extraits de cannelles

Les tubes de connections qui sont utilisés pour faire passer l'échantillon dans la cellule en fixant un débit de 2ml.mn^{-1} sont en téflon et de chlorure de polyvinyle.

Les spectres enregistrés sont traités à l'aide d'une macro qui a été conçue à partir de l'option « Appro » développée par Winfirst.

Tous les réactifs utilisés dans cette étude sont de grade analytique, la coumarine est fournie par Prolabo (Pelée, Paris), le dichlorométhane stabilisé

avec l'amylène, le diéthyléther et 2, 2, 4-triméthylpentane (l'isooctane) ont été obtenus auprès de SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Allemagne).

II.3.2 Procédure générale

II.3.2.1 Préparation de l'extrait

L'écorce de cannelle de Ceylan et de Chine ont été broyées chacune de son côté à l'aide d'un mortier afin d'obtenir une poudre fine pour augmenter la surface de contact avec le solvant.

Les extraits des deux espèces sont obtenus par stockage des poudres obtenues dans le dichlorométhane. 177.426 grammes de cannelle de Ceylan et 194.05 grammes de cannelle de Chine sont émergées chacune à part dans 500 ml de dichlorométhane pendant six jours à température ambiante. Les deux solutions solvant-extrait obtenues ont été distillées légèrement sous vide à une température de 42°C pour éliminer le solvant et afin d'obtenir le marc. Le protocole général d'extraction utilisé est indiqué par la figure II.3.

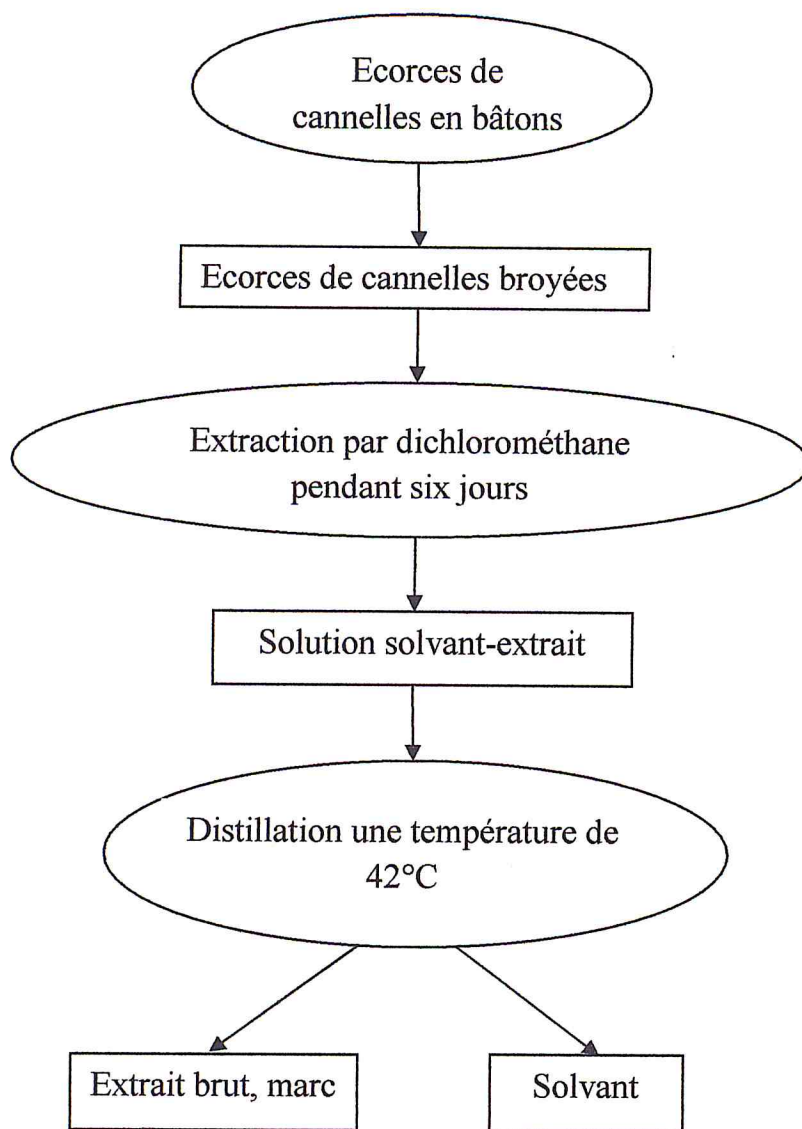


Figure II.3 : Protocole général de préparation de l'extrait

II.3.2.2 Caractéristiques organoleptiques des deux extraits

Tableau II.2 : Caractéristiques organoleptiques de l'extrait de cannelle de Chine et de Ceylan

Extraits	Couleur	Masse (g)	Aspect	Rendement (%)
C. Cassia	Marron	4.820	Liquide	2.48
C. Zeylanicum	Noir	3.933	Liquide	2.21

La figure II.4 montre les deux extraits obtenus après macération des deux espèces dans le dichlorométhane.

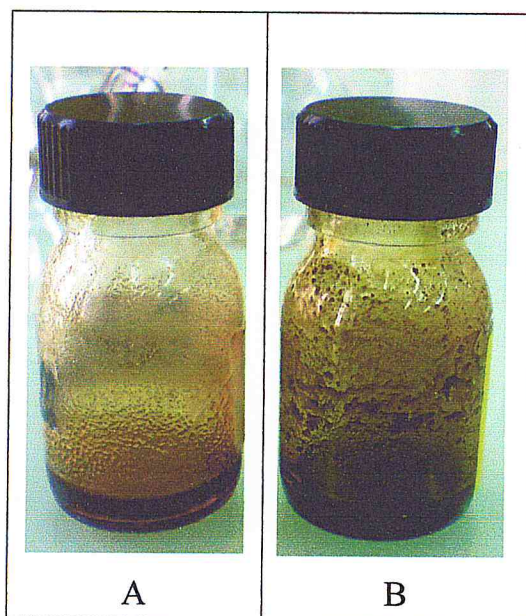


Figure II.4 : Extrait de cannelle de Chine(A), extrait cannelle de Ceylan(B)

II.3.2.3 Test d'identification de la coumarine dans les deux extraits de cannelles

Quelques gouttes d'extrait de cannelle ont été mises dans un papier filtre qui a été imbibé préalablement dans NaOH (1M). Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarine après examen sous une lampe UV à 366 nm [74].

Des fluorescences jaunâtres sont observées, en faveur de l'existence de coumarine dans l'extrait de cannelle de Chine. Les tests d'identification préliminaire sont montrés sur la figure II.5

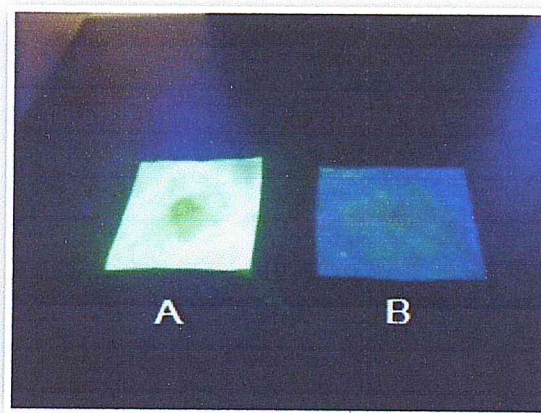


Figure II.5 : Test d'identification de la coumarine dans les deux extraits de cannelles (Chine A), (Ceylan B)

II.3.2.4 Procédé d'isolement et de préconcentration de la coumarine des extraits de cannelle

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools, l'éther ou les solvants organiques chlorés avec lesquels on peut les extraire.

Afin d'isoler la coumarine il est possible de jouer sur les propriétés de la lactone, ouverture et solubilité en milieu alcalin, fermeture en milieu acide, l'intérêt de ce procédé demeure toutefois limité par le risque qu'il présente d'induire des altérations des structures originelles [7].

La coumarine a un caractère légèrement acide et afin de stabiliser cette forme une quantité d'échantillon d'extrait brut est mélangée avec 15 ml de HCl (1M). Cette solution est soumise au chauffage et à l'agitation durant 15 minutes pour faire dissoudre la totalité de la coumarine. On y ajoute le mélange isooctane/dichlorométhane (95 : 5 v/v). Après la décantation on récupère la phase organique, cette dernière avait une couleur marron très claire et se trouvait dans la partie supérieure de l'ampoule à décanter. Le NaOH (1M) est ajouté à la phase organique pour mettre la coumarine sous sa forme ionisée, la phase aqueuse à couleur jaune est récupérée et neutralisée avec le HCl (1M) jusqu'à PH=1 c-à-d disparition de la couleur. A la fin on décante avec l'éther et on récupère la phase organique, cette dernière est distillée dans un rotavapeur à une température de

35°C pour éliminer le solvant et afin de récupérer la coumarine qui sera diluée dans le CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène pour son analyse par spectrométrie IRTF. La figure II.6 montre les différentes étapes de ce traitement d'isolement et de préconcentration.

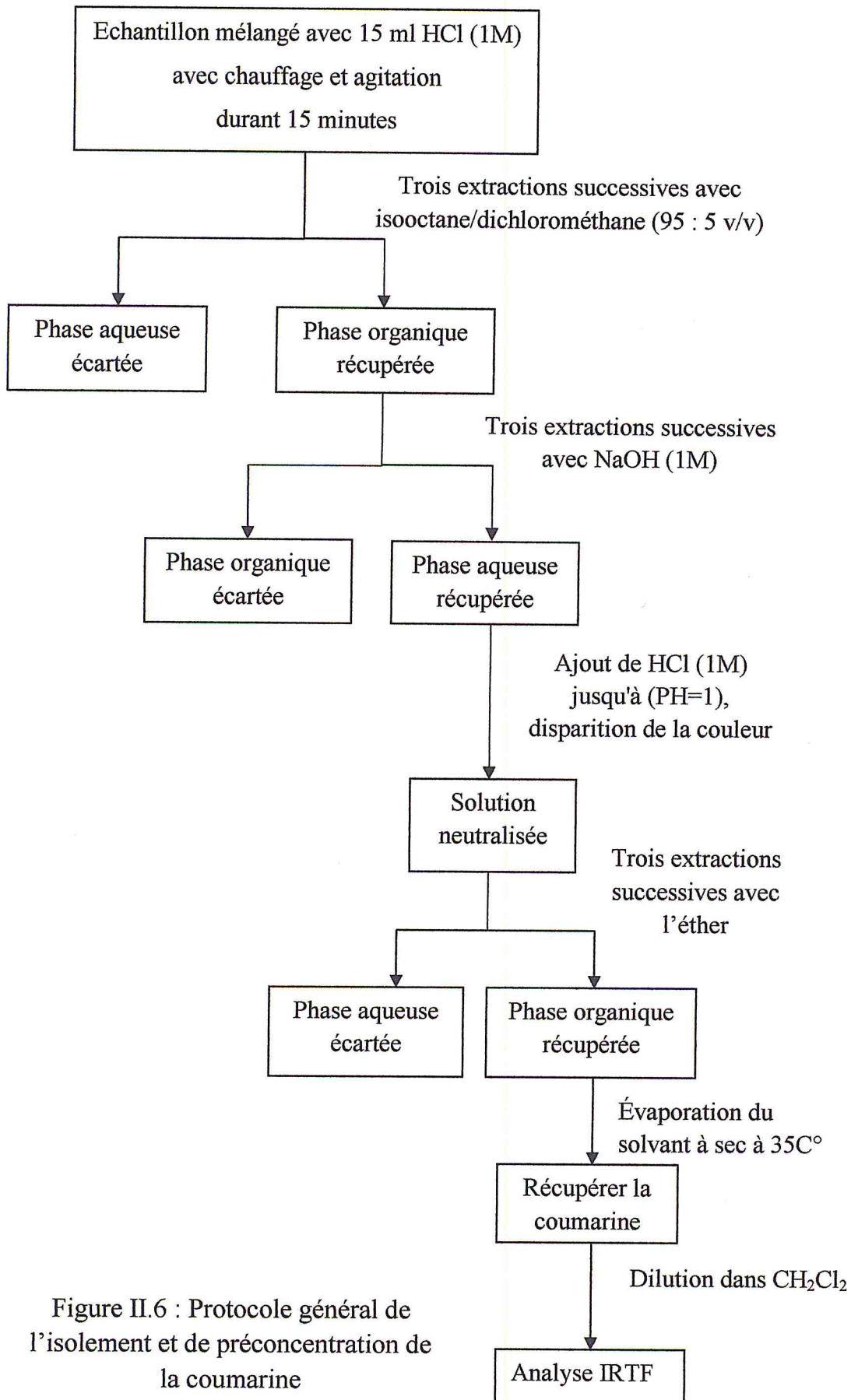


Figure II.6 : Protocole général de l'isolement et de préconcentration de la coumarine

II.4 Résultats et discussions

Notre recherche bibliographique nous a révélé que la teneur de la coumarine dans l'huile essentielle de la cannelle de Chine est plus importante que dans l'extrait de la cannelle de Ceylan, les teneurs sont de l'ordre de 6.36% et de 0.7% respectivement [63, 68].

De ce fait, on s'est fixé deux objectifs dans ce travail :

Le premier est de déterminer la teneur de la coumarine dans les extraits de cannelle après isolement et préconcentration de cette substance. Le deuxième est de vérifier la possibilité de la détermination directe de la teneur de la coumarine dans les extraits de cannelle sans traitement préalable en utilisant les bandes spécifiques. Les résultats obtenus par les deux les méthodes seront comparés et discutés.

II.4.1 Détermination de la coumarine dans les extraits de cannelles après préconcentration

II.4.1.1 Spectre IRTF de la coumarine

La première étape du travail consiste à sélectionner les bandes d'absorbance qui peuvent être utilisées pour les différentes déterminations IRTF.

La figure II.7 montre le spectre infrarouge de la coumarine préparée directement dans le CH_2Cl_2 .

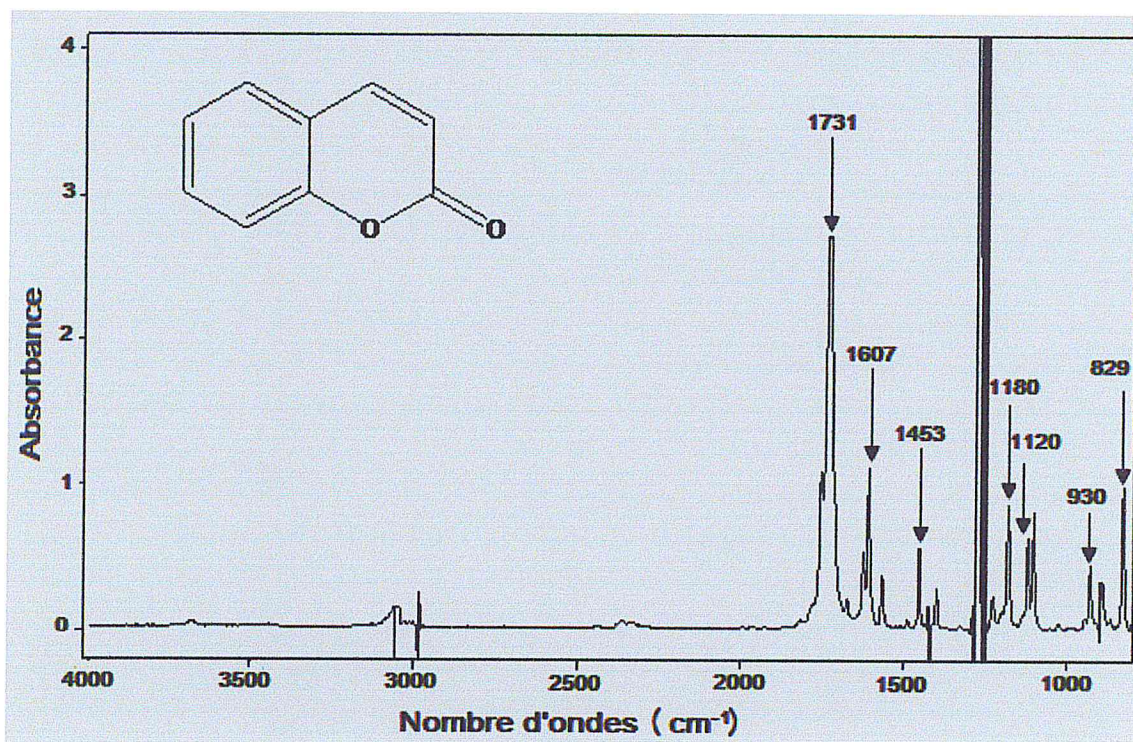


Figure II.7 : Spectre IRTF de la coumarine 10 mg.ml^{-1} préparée directement dans CH_2Cl_2 sans aucun traitement préalable

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.5 mm , Résolution nominale 4 cm^{-1} , Nombre de balayage 10, Background de la cellule remplie de CH_2Cl_2 /amylène

La gamme étudiée s'étale de 4000 à 810 cm^{-1} car en dessous de 800 cm^{-1} les fenêtres de la cellule utilisée sont opaques. Les bandes de la coumarine apparaissent à 1731 cm^{-1} caractéristique du groupe $\text{C}=\text{O}$, à 1607 cm^{-1} correspondant aux vibrations $\text{C}=\text{C}$ du cycle, à 1453 cm^{-1} due aux vibrations de déformation asymétriques des liaisons $\text{C}-\text{H}$, à 1180 cm^{-1} et 930 cm^{-1} de la vibration d'allongement $\text{C}-\text{C}$, à 1120 cm^{-1} caractéristique de la vibration de déformation dans le plan du noyau, et à 829 cm^{-1} spécifique au benzène disubstitué.

II.4.1.2 Caractéristiques analytiques de la coumarine obtenue directement dans CH_2Cl_2

Les caractéristiques analytiques de la coumarine préparée directement dans CH_2Cl_2 , en considérant les bandes d'absorbance sélectionnées, sont présentées dans le tableau II.3

Tableau II.3 : Caractéristiques analytiques de la coumarine préparée directement dans CH₂Cl₂ /amylène

Mode de mesure	Paramètres					
	Droites de calibration	Coefficients de corrélation	LD (µg.ml ⁻¹)	D.S.R % (n=10)	Domaine de concentration (mg.ml ⁻¹)	
829 cm ⁻¹ (851-810) cm ⁻¹	A=0.09522C+0.003321	0.9990	14	0.11	0.75-10	
930 cm ⁻¹ (970-911) cm ⁻¹	A=0.04036C+0.002747	0.9991	55	0.30		
1120 cm ⁻¹ (1199-973) cm ⁻¹	A=0.05438C+0.008564	0.9990	20	0.22		
1180 cm ⁻¹ (1199-973) cm ⁻¹	A=0.075108C+0.003554	0.9998	11	0.81		
1453 cm ⁻¹ (1468-1444) cm ⁻¹	A=0.04944C+0.02281	0.9994	74	0.65		
1607 cm ⁻¹ (2030-1528) cm ⁻¹	A=0.10824C+0.03089	0.9990	12	0.32		
1731 cm ⁻¹ (2030-1528) cm ⁻¹	A=0.398382C+0.003923	0.9998	3.9	0.41		

C : Concentration mg.ml⁻¹ ; D.S.R en% Déviation Standard Relative (pour C = 3 mg.ml⁻¹) ; LD : Limite de détection en µg.ml⁻¹ obtenue pour un niveau de confiance de 99.7 % (K=3).

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.5 mm, Résolution nominale 4 cm⁻¹, Nombre de balayage 10, Background de la cellule remplie de CH₂Cl₂ /amylène.

Les résultats montrent une bonne linéarité aux bandes d'absorbance considérées et des limites de détections acceptables avec une bonne précision.

Les spectres infrarouge de coumarine à des concentrations allant de 0.75 à 10 mg.ml⁻¹ dans le domaine spectral compris entre 2030 et 810 cm⁻¹ sont représentés dans la figure II.8

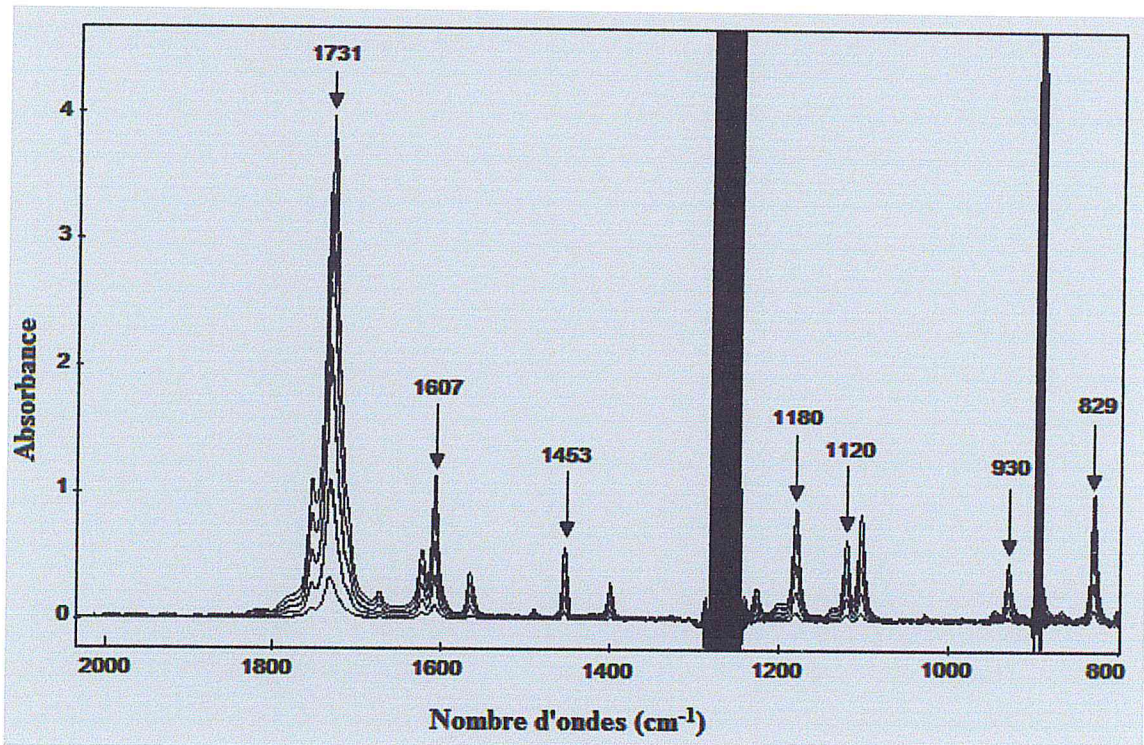


Figure II.8 : Spectres d'absorbance de la coumarine préparée directement dans CH₂Cl₂ stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre 0.75-10 mg.ml⁻¹

II.4.1.3 Comparaison des caractéristiques analytiques obtenues pour la détermination de la coumarine dissoute dans CH₂Cl₂ et obtenues après préconcentration

a) Choix de la composition du solvant d'extraction de la coumarine

Avant d'établir les caractéristiques analytiques de la coumarine après préconcentration, il nous semble important de vérifier les pourcentages de récupération de la coumarine en fonction de la composition du solvant d'extraction.

Environ 50 mg de coumarine ont subi un traitement de préconcentration, détaillé dans la figure II.5, en utilisant comme solvant d'extraction : soit le mélange hexane/dichlorométhane (95 : 5 v/v) soit le mélange isooctane/dichlorométhane (95 : 5 v/v).

Il y a lieu de noter que les spectres IRTF sont enregistrés par rapport à un background stabilisé préalablement dans les mêmes conditions instrumentales que la cellule remplie de solvant pur utilisé pour la dilution.

Les pourcentages de récupération sont calculés en extrapolant les valeurs d'absorbance trouvées dans la droite de calibration obtenue avec les étalons préparés dans CH_2Cl_2 aux fréquences correspondantes.

D'après les résultats du tableau II.4 on peut conclure que le mélange isooctane/dichlorométhane (95 : 5 v/v) extrait quantitativement la coumarine en révélant un pourcentage de récupération compris entre 71 et 85%.

Tableau II.4 : Taux de coumarine récupérée après traitement de préconcentration

Max (Lignes de base)	Composition du solvant d'extraction	Récupération(%)
829 cm ⁻¹ (810-851) cm ⁻¹	hexane/CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	45.3 ± 1.0
	isooctane/ CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	85 ± 1.4
930 cm ⁻¹ (970-911) cm ⁻¹	hexane/CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	43.9 ± 1.2
	isooctane/ CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	81 ± 1.0
1120 cm ⁻¹ (1199-973) cm ⁻¹	hexane/CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	44.7 ± 0.7
	isooctane/ CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	84.5 ± 2.1
1180 cm ⁻¹ (1199-973) cm ⁻¹	hexane/CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	42.4 ± 0.9
	isooctane/ CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	82 ± 1.3
1453 cm ⁻¹ (1468-1444) cm ⁻¹	hexane/CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	42.3 ± 0.95
	isooctane/ CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	85.5 ± 0.7
1607 cm ⁻¹ (2030-1528) cm ⁻¹	hexane/CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	44 ± 1
	isooctane/ CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	71 ± 0.8
1731 cm ⁻¹ (2030-1528) cm ⁻¹	hexane/CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	43.1 ± 0.8
	isooctane/ CH ₂ Cl ₂ 95:5 v/v	82 ± 2.0

b) Caractéristiques analytiques de la coumarine après traitement de préconcentration

Les caractéristiques analytiques de la coumarine après traitement de préconcentration en utilisant le mélange du solvant isooctane/ CH₂Cl₂ (95 : 5 v/v) sont établies et résumées dans le tableau II.5. Le pourcentage de récupération de la coumarine est établi comme étant le rapport de la pente de la droite de calibration des étalons après traitement sur la pente de la droite de calibration des étalons préparés directement dans CH₂Cl₂.

Tableau II.5 : Caractéristiques analytiques de la coumarine après préconcentration

Mode de mesure	Paramètres						
	Droites de calibration	Coefficients de corrélation	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	D.S.R % (n=10)	Domaine de concentration ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Récupération (%)	
829 cm^{-1} (851-810) cm^{-1}	$A=0.09799C+0.003036$	0.9995	12	0.88	1.05-13.49	102	
930 cm^{-1} (970-911) cm^{-1}	$A=0.04038C-0.002927$	0.9999	47	0.77		100	
1120 cm^{-1} (1199-973) cm^{-1}	$A=0.05522C-0.002879$	0.9998	24	0.73		101	
1180 cm^{-1} (1199-973) cm^{-1}	$A=0.073775C-0.006313$	0.9999	21	0.83		98	
1453 cm^{-1} (1468-1444) cm^{-1}	$A=0.05076C+0.00701$	0.9992	12	0.73		102	
1607 cm^{-1} (2030-1528) cm^{-1}	$A=0.107328C-0.063149$	0.9997	79	0.67		99	
1731 cm^{-1} (2030-1528) cm^{-1}	$A=0.394548C-0.041688$	0.9997	8.2	0.89		99	

C : Concentration $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, D.S.R en% Déviation Standard Relative (pour $C = 3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$); LD : Limite de détection en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenue pour un niveau de confiance de 99.7 % ($K=3$).

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.5 mm, Résolution nominale 4 cm^{-1} , Nombre de balayage 10, Background de la cellule remplie de CH_2Cl_2 /amylène.



L'analyse des pourcentages de récupération montrés sur le tableau II.5 illustre que les sept bandes d'absorbance qui apparaissent à 829, 930, 1120, 1180, 1453, 1607 et 1731 cm^{-1} sont adéquates pour la détermination de la teneur de la coumarine dans les extraits de cannelles du fait qu'elles fournissent un très bon pourcentage de récupération de l'ordre de 100%.

La figure II.9 montre les spectres de la série d'étalon de la coumarine après traitement de préconcentration compris entre 1.05-13.49 mg.ml^{-1} .

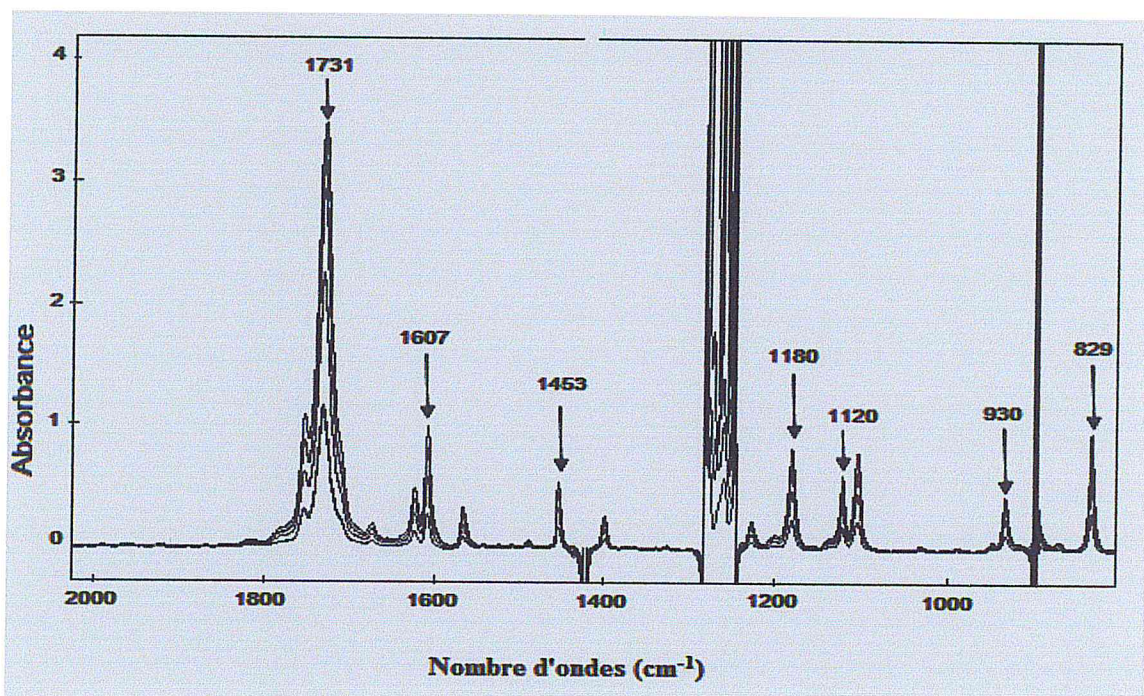


Figure II.9 : Spectres d'absorbance de la coumarine après traitement et préconcentration pour un domaine de concentration compris entre 1.05-13.49 mg.ml^{-1}

II.4.1.4 Détermination de la teneur de la coumarine dans les extraits de cannelles après préconcentration

a) Extrait de cannelle de chine

Environ 50 mg d'extrait de cannelle de Chine, préalablement traité selon les étapes décrites dans le paragraphe II.3.2.4, sont analysés par spectrométrie IRTF. Le contenu de la coumarine de l'extrait la cannelle de Chine est obtenu en extrapolant les valeurs d'absorbance dans la droite de calibration établie pour des étalons traités de la même façon que les échantillons réels. Les résultats résumés

dans le tableau II.6 montrent un contenu de coumarine moyen de 5.5% mis à part la bande à 1607 cm^{-1} qui donne un taux de 10%, ceci est dû probablement à un produit interférent qui a été entraîné avec la coumarine et qui absorbe à cette bande d'absorbance.

Tableau II.6 : Teneur en coumarine dans l'extrait de cannelle de Chine après traitement d'isolement et de préconcentration

Max (lignes de base)	Quantité d'extrait (mg)	Concentration de la coumarine (mg.ml^{-1})	Teneur (%)
$829\text{ cm}^{-1}(851-810)\text{ cm}^{-1}$	51.3 (dilués dans un volume final de 5ml de CH_2Cl_2)	1.00 ± 0.012	5.0 ± 0.1
$930\text{ cm}^{-1}(970-911)\text{ cm}^{-1}$		0.999 ± 0.055	5.0 ± 0.3
$1120\text{ cm}^{-1}(1199-973)\text{ cm}^{-1}$		1.39 ± 0.23	6.9 ± 1.2
$1180\text{ cm}^{-1}(1199-973)\text{ cm}^{-1}$		1.02 ± 0.031	5.1 ± 0.2
$1453\text{ cm}^{-1}(1468-1444)\text{ cm}^{-1}$		1.14 ± 0.10	5.7 ± 0.5
$1607\text{ cm}^{-1}(2030-1528)\text{ cm}^{-1}$		2.12 ± 0.10	10.6 ± 0.5
$1731\text{ cm}^{-1}(2030-1528)\text{ cm}^{-1}$		1.09 ± 0.020	5.4 ± 0.1

Valeur moyenne \pm déviation standard relative de trois mesures indépendantes.

La figure II.10, montre les spectres d'une solution étalon de coumarine (0.75 mg.ml^{-1}) et de l'extrait de cannelle de Chine après traitement de préconcentration.

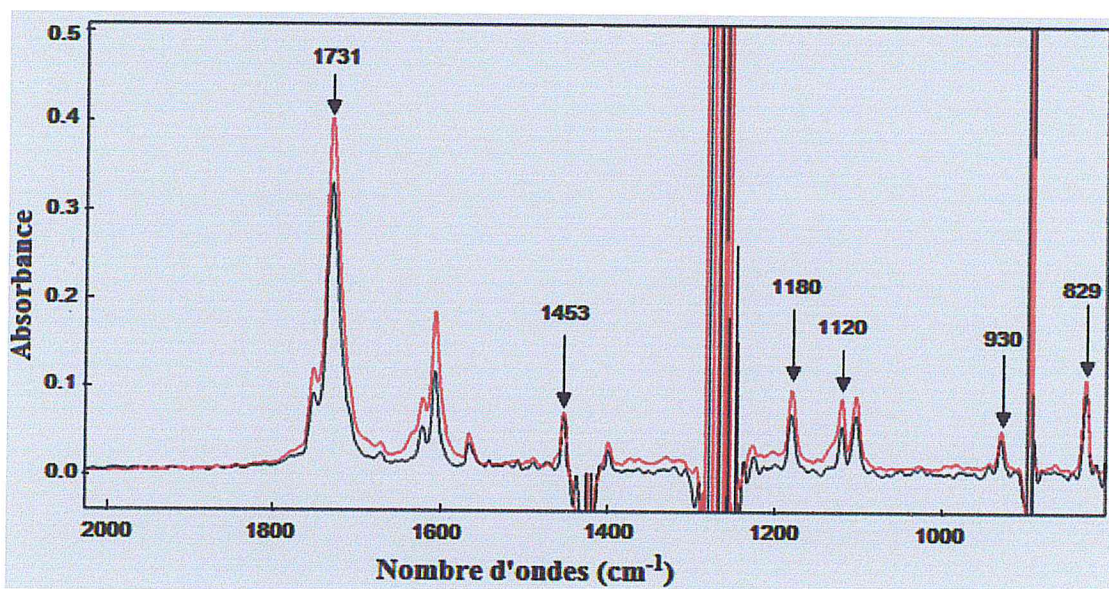


Figure II.10 : Spectres infrarouge de 20 mg.ml⁻¹ d'extrait de la cannelle de Chine traitées (en rouge) et de la coumarine pure 0.75mg.ml⁻¹ (en noir)

La superposition des deux spectres montrés sur la figure II.10 laisse comprendre que le protocole d'isolement et de préconcentration a mené plutôt à une purification de la coumarine. Pour confirmer s'il s'agit d'un protocole de préconcentration ou de purification une quantité plus élevée de 152.9 mg d'extrait de cannelle de Chine a subi le traitement, le résidu final a été dilué dans 1ml de dichlorométhane et analysé par spectrométrie IRTF, la figure montre le spectre de la coumarine pure et de l'extrait traité de la cannelle de Chine plus concentré.

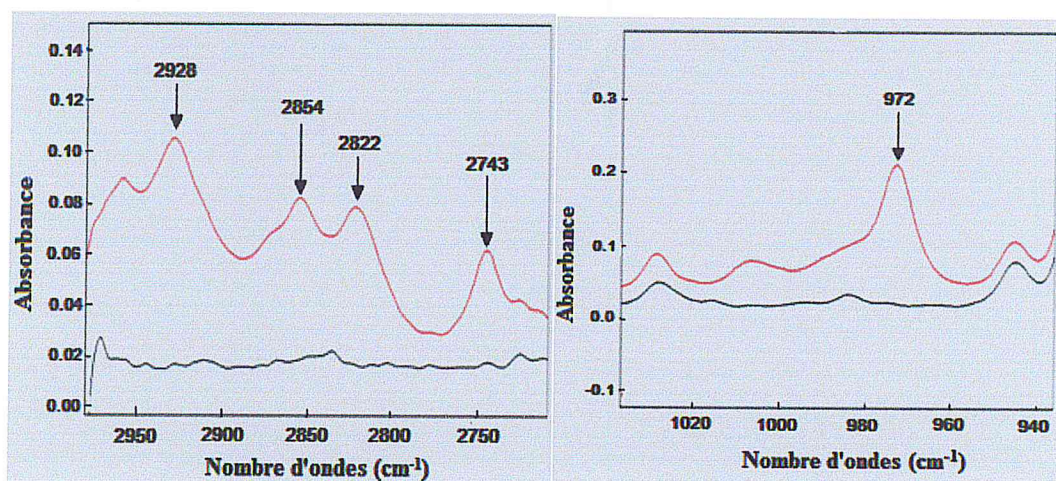


Figure II.11: Spectres infrarouge de l'extrait de la cannelle de Chine traitée 152.9 mg.ml⁻¹ (en rouge) et spectre de la coumarine pure 7.5 mg.ml⁻¹ (en noir)

La comparaison des deux spectres montre des bandes à 2730, 2940 et à 972 cm^{-1} pour l'extrait de cannelle de Chine. De ce fait on peut dire que le protocole utilisé dans cette étude est un protocole d'isolement et non pas de purification de la coumarine.

b) Extrait de cannelle de Ceylan

Sachant que le contenu de la coumarine dans l'extrait de cannelle de Ceylan est beaucoup plus faible que dans l'extrait de cannelle de Chine [34], il a été décidé d'augmenter le coefficient de préconcentration de 2. Ceci revient à diluer les 50mg d'extrait traité dans un volume final de 2.5 ml au lieu de 5 ml de CH_2Cl_2 . Cette concentration ne nous a pas permis de déterminer le contenu de coumarine d'où une expérience complémentaire, considérant des quantités d'extrait plus importantes dans des volumes de dilution plus faibles, soit environ 150 mg d'extrait préconcentré dilué dans un volume final de 1ml de CH_2Cl_2 a été réalisé. La figure II.12 montre que dans ce cas la détermination est possible.

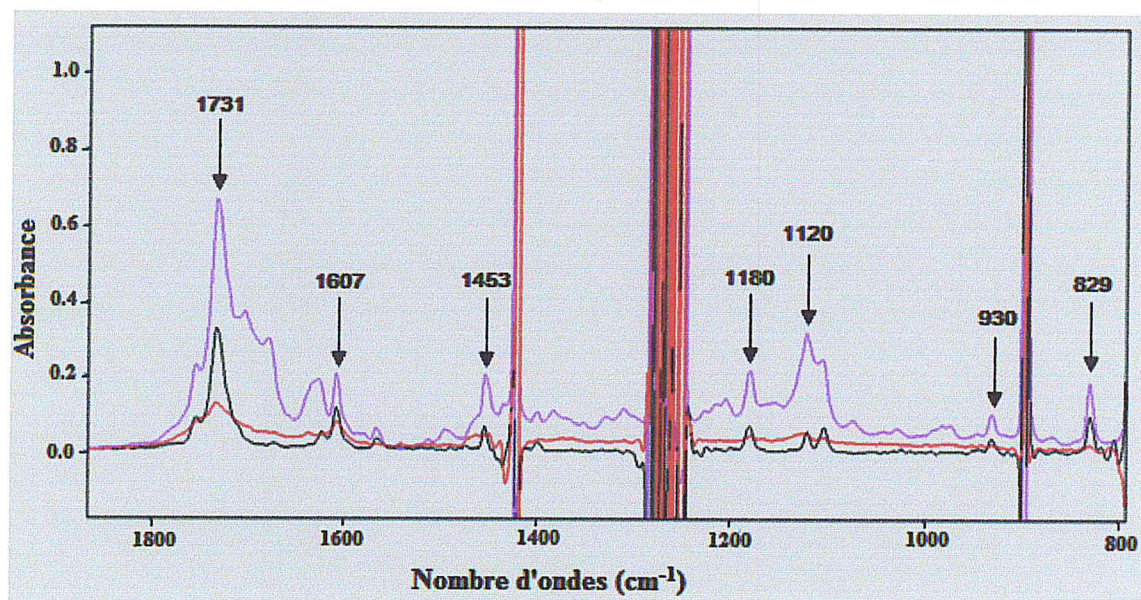


Figure II.12 : Spectres infrarouge de l'extrait de cannelle de Ceylan préconcentré et dilué dans 2.5 ml de CH_2Cl_2 : 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (en rouge) et 150 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (en violet), et de la coumarine pure 0.75 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (en noir)

Le contenu de la coumarine de l'extrait la cannelle de Ceylan est obtenu en extrapolant les valeurs d'absorbance dans la droite de calibration établie pour une

série des étalons traités de la même façon que les échantillons réels. Les résultats sont résumés dans le tableau II.7.

Tableau II.7 : Teneur en coumarine dans l'extrait de cannelle de Ceylan après traitement d'isolement et de préconcentration

Max (lignes de base)	Quantité de l'extrait (mg)	Concentration (mg.ml ⁻¹)	Teneur (%)
829 cm ⁻¹ (851-810) cm ⁻¹	150	1.67 ± 0.105	1.11 ± 0.07
930 cm ⁻¹ (970-911) cm ⁻¹		1.3 ± 0.006	0.88 ± 0.07
1120 cm ⁻¹ (1199-973) cm ⁻¹		3.6 ± 0.12	2.4 ± 0.1
1180 cm ⁻¹ (1199-973) cm ⁻¹		1.57 ± 0.072	1.02 ± 0.04
1453 cm ⁻¹ (1468-1444) cm ⁻¹		2.43 ± 0.498	1.6 ± 0.3
1607 cm ⁻¹ (2030-1528) cm ⁻¹		2.42 ± 0.044	1.61 ± 0.07
1731 cm ⁻¹ (2030-1528) cm ⁻¹		1.94 ± 0.253	1.2 ± 0.2

Valeur moyenne ± déviation standard relative de trois mesures indépendantes.

En analysant les spectres de figure II.12 et les résultats de la table II.7, on peut conclure que les bandes spécifiques à 829, 930 et 1180 cm⁻¹ sont adéquates pour la détermination de la teneur de la coumarine de l'extrait de cannelle de Ceylan car, d'un coté les résultats sont comparables avec ceux trouvés dans la littérature [63], et d'un autre coté, ces bandes d'absorbance ne sont pas interférées avec les autres produits de l'extrait qui sont entraînés avec la coumarine.

Il y a lieu de noter que dans ce mémoire on a travaillé sur l'écorce externe de la cannelle de Ceylan et non pas sur batonnets de l'espèce, c'est la raison qui a fait que la teneur de la coumarine, de cette espèce, déterminée par spectrométrie

IRTF soit relativement plus élevée que celle indiquée dans un travail antérieur (0.7 %).

II.4.2 Dosage de la coumarine dans les extraits de cannelles sans traitement préalable

Un spectre d'absorption infrarouge d'une molécule organique comporte souvent un nombre important de pics. L'analyse d'un composé dans une matrice complexe, sans traitement préalable, peut donner des chevauchements de pics et donc l'identification des groupements fonctionnels d'une molécule est rarement suffisante pour permettre l'identification certaine du composé. Néanmoins, la spectrométrie infrarouge constitue un outil analytique qui dispose d'un degré de sélectivité et de spécificité puissant pouvant séparer les pics interférés en exploitant la zone «des empreintes digitales» comprise entre 1500 et 400 cm^{-1} .

Un des objectifs de ce travail est de vérifier la possibilité de la détermination directe de la teneur de la coumarine sans traitement préalable des extraits en utilisant les bandes communes, à la solution étalon et aux solutions d'extraits, et en prêtant attention aux bandes spécifiques de la coumarine qui se trouvent dans la région spectrale comprise entre 1500-810 cm^{-1} .

Les spectres IRTF sont enregistrés par rapport à un background stabilisé préalablement dans les mêmes conditions instrumentales avec la cellule remplie de solvant. Le contenu de la coumarine dans l'extrait est obtenu par extrapolation des valeurs d'absorbance sur la droite de calibration établie pour des étalons préparés dans CH_2Cl_2 . Les concentrations des solutions des extraits sont préparées en prenant en considération les teneurs de la coumarine dans l'extrait de cannelle de Chine ($\approx 5\%$) et dans l'extrait de cannelle de Ceylan ($\approx 1\%$).

II.4.2.1 Dosage de la coumarine dans les extraits de cannelle de Chine

La figure II.13 montre le spectre infrarouge de la cannelle de Chine 10 mg.ml^{-1} et de la coumarine 0.75 mg.ml^{-1} préparées directement dans le CH_2Cl_2 sans aucun traitement préalable.

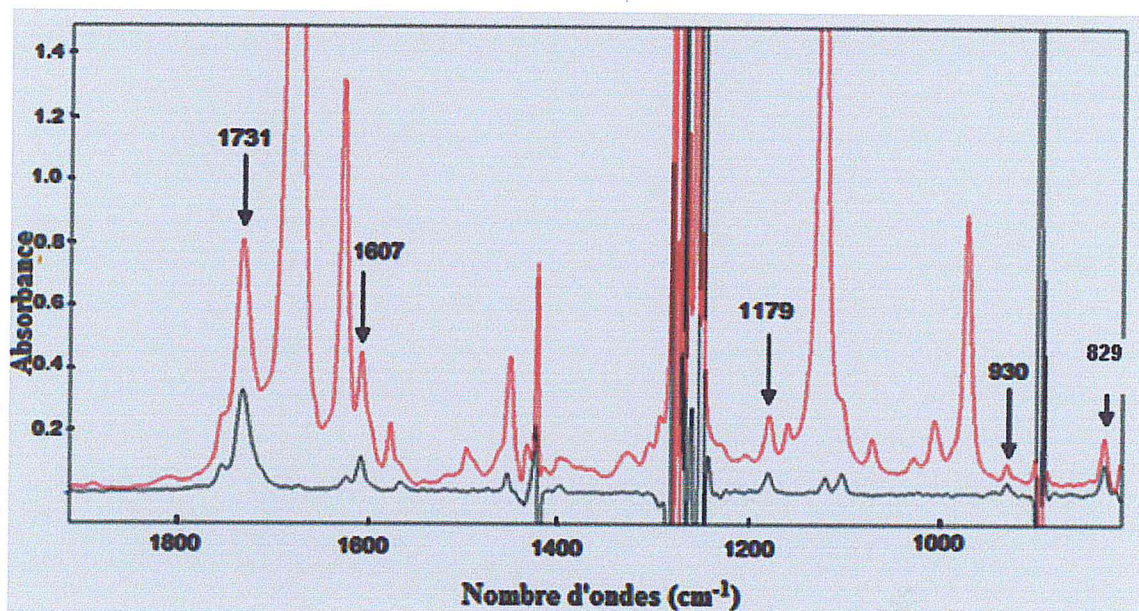


Figure II.13: Spectres infrarouge de cannelle de Chine 10.22 mg.ml^{-1} (en rouge) et de la coumarine 0.75 mg.ml^{-1} préparés directement dans le CH_2Cl_2 sans aucun traitement (en noir).

En comparant les deux spectres on peut constater que la détermination directe de la coumarine dans l'extrait de la cannelle de Chine par spectrométrie infrarouge est possible. Les cinq bandes communes entre l'étalon pur et l'extrait ont été étudiées. Pour éviter l'effet matrice, les lignes de base et les absorbances ont été établies manuellement.

Le tableau II.8 résume le taux de coumarine déterminé aux bandes sélectionnées des extraits.

Tableau II.8 : Teneur en coumarine dans l'extrait de cannelle de Chine

Max (lignes de base)	Concentration (mg.ml ⁻¹)	Teneur (%)
829 cm ⁻¹ (821-840) cm ⁻¹	1.44	5.6
930 cm ⁻¹ (922-938) cm ⁻¹	1.02	5.1
1179 cm ⁻¹ (1168-1186) cm ⁻¹	1.53	7.5
1607 cm ⁻¹ (1600-1614) cm ⁻¹	1.44	7.2
1731 cm ⁻¹ (1731-1743)	4.49	9.0

Effectivement les bandes spécifiques à 829 et 930 cm⁻¹, appartenant à la zone «des empreintes digitales» du composé, donnent le taux de coumarine de l'ordre de 5%. Ce résultat est en parfaite concordance avec celui trouvé après isolement et préconcentration de la coumarine. En ce qui concerne la bande 1179 cm⁻¹ qui donne un taux de 7%, ceci est du probablement à un produit interférent et qui absorbe à cette bande.

II.4.2.2 Dosage de la coumarine dans les extraits de cannelle de Ceylan

La figure II.14 montre le spectre infrarouge de cannelle de Ceylan 20 mg.ml⁻¹ et de la coumarine 0.75 mg.ml⁻¹ préparées directement dans le CH₂Cl₂ sans aucun traitement préalable. La faible teneur de la coumarine dans cet extrait a fait que les bandes spécifiques à 930 et 829 cm⁻¹ n'apparaissent pas sur le spectre. Une concentration de l'extrait plus élevé (de l'ordre de 80 mg.ml⁻¹) aurait sûrement permis la détermination du fait que le taux de la coumarine dans cette espèce de cannelle est de l'ordre de 1%.

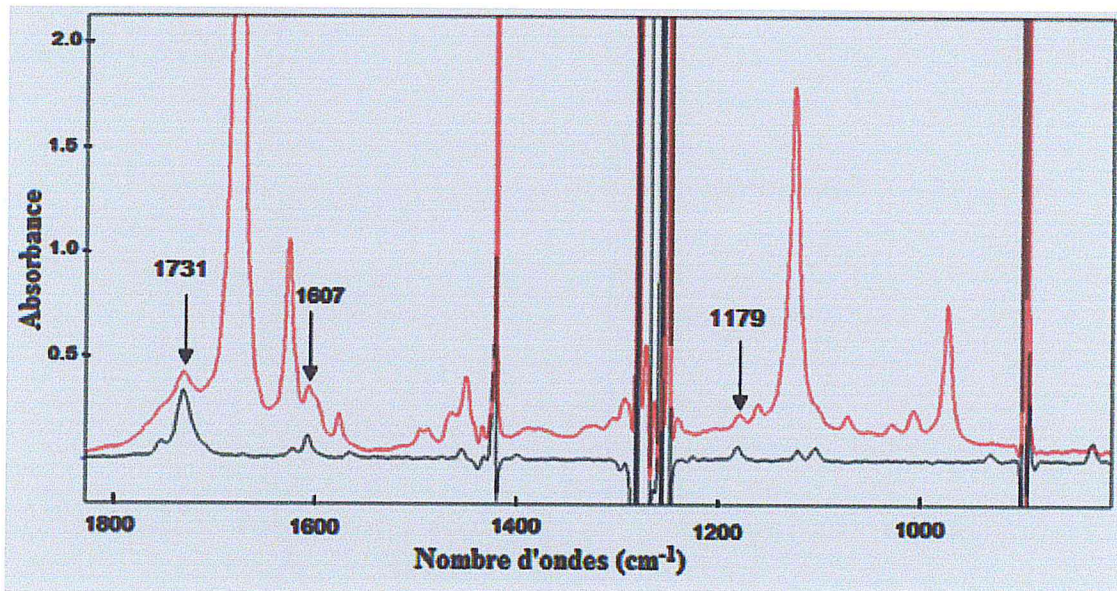


Figure II.14 : Spectres infrarouge de cannelle de Ceylan 20 mg.ml^{-1} (en rouge) et de la coumarine 0.75 mg.ml^{-1} (en noir) préparés directement dans le CH_2Cl_2 sans aucun traitement

Le tableau II.9 résume le taux de coumarine déterminée directement dans la cannelle de Ceylan par spectrométrie infrarouge. On constate que la bande à 1731 cm^{-1} peut être utilisée pour la détermination de la coumarine dans cette espèce mais, l'allure du spectre figure II.14 laisse supposer une interférence de la bande intense qui apparaît à 1676 cm^{-1}

Le tableau II.9 : Teneur en coumarine déterminée directement dans la cannelle de Ceylan

Max (lignes de base)	Concentration de l'extrait (mg.ml^{-1})	Concentration	Teneur (%)
$1731(1715-1740) \text{ cm}^{-1}$	20	0.22	1.1
$1607(1600-1613) \text{ cm}^{-1}$		0.33	1.6
$1179(1170-1184) \text{ cm}^{-1}$		0.41	2.0

Suite à cette étude, on peut conclure que les deux bandes spécifiques de la coumarine à 930 et 829 cm^{-1} sont adéquates pour la détermination de la teneur de cette dernière dans les extraits de cannelles, en considérant aussi bien l'analyse directe que l'analyse après traitement et séparation.

Il y a lieu de noter, que la bande intense des deux extraits qui apparait à 1676 cm^{-1} est caractéristique du groupement carbonyle C=O de l'aldéhyde. L'absorbance est plus intense dans le cas de l'extrait de cannelle de Ceylan, ceci est en accord avec le travail qui indique que le constituant principal de l'huile essentielle de cannelle de Ceylan est le cinnamaldéhyde ou aldéhyde cinnamique avec un taux de 76 % [65].

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Devant la prolifération récente de règlements alimentaires, l'objectif de ce mémoire, est de contribuer au développement des applications analytiques quantitatives de la spectrométrie IRTF et d'offrir un outil d'analyse fiable complémentaire et surtout disponible pour le contrôle de qualité des extraits de cannelles et ce, par le contrôle de leur teneur en coumarine.

Le spectre IR de la coumarine préparée directement dans CH_2Cl_2 montre des bandes communes à 1731 et 1607 cm^{-1} et des bandes spécifiques à 1180, 1120, 930, 829 cm^{-1} dans la gamme spectrale étudiée et comprise entre 4000-400 cm^{-1} .

Les procédés d'isolement et de préconcentration d'analyses se trouvant dans des matrices complexes, comme c'est le cas pour les extraits végétaux, offrent des solutions alternatives aux différentes déterminations quantitatives par spectrométrie IR en augmentant la sensibilité de cette technique.

Afin d'isoler la coumarine il est possible de jouer sur les propriétés de la lactone, ouverture et solubilité en milieu alcalin, fermeture en milieu acide. Le mélange iso-octane/dichlorométhane dans une proportion (95 : 5 v/v) extrait quantitativement la coumarine en révélant un pourcentage de récupération de l'ordre de 100 %. Il a été vérifié que le protocole d'isolement et de préconcentration utilisé ne permet pas la purification de la coumarine.

La teneur de la coumarine dans l'extrait de cannelle de Chine, préalablement traitée, a été évaluée à 5.5 % en utilisant toutes les bandes d'absorbance sélectionnées à l'exception de la bande d'absorbance 1607 cm^{-1} qui a donné une teneur de 10 %, ceci est probablement à un produit interférant de même nature chimique que la coumarine.

Cependant seulement les bandes spécifiques à 829, 930 et 1180 cm^{-1} ont été adéquates pour la détermination de la teneur de la coumarine dans l'extrait de cannelle de Ceylan. Cette dernière est évaluée à 1%.

Les résultats trouvés sont en parfaite concordance avec ceux trouvés dans les travaux antérieurs et confirment un taux de coumarine dans l'extrait de cannelle de Chine plus important que dans l'extrait de cannelle de Ceylan.

Un spectre d'absorption infrarouge d'une molécule organique comporte souvent un nombre important de pics. L'analyse d'un composé dans une matrice complexe, sans traitement préalable, peut donner des chevauchements de pics et donc l'identification des groupements fonctionnels d'une molécule est rarement suffisante pour permettre l'identification certaine du composé. Néanmoins, la spectrométrie infrarouge constitue un outil analytique qui dispose d'un degré de sélectivité et de spécificité puissant pouvant séparer les pics interférés en exploitant la zone «des empreintes digitales» comprise entre 1500 et 400 cm^{-1} .

Cette stratégie a été exploitée pour vérifier la possibilité de la détermination directe de la teneur de la coumarine dans les extraits de cannelles, et effectivement les bandes spécifiques de la coumarine à 829 et 930 cm^{-1} , appartenant à la zone «des empreintes digitales» du composé, ont fourni des teneurs du même ordre que celle trouvées après traitement des extraits.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] JG. Fouché, A. Marquet, A. hnbuckers, Les plantes médicinales de la plante au médicament, (2000).
- [2] H. Richard, Chimie des épices et herbes aromatiques.
- [3] C. Boisvert et A. Hubert, ABCdaire des épices, Edition Flammarion, (1998).
- [4] J. Marcheix, A. Fleuriet, et al, Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires, Jay-Allemand, (2005).
- [5] PM. Kris-Etherton, KD. Hecker, et al, Bioactive compounds in foods : their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113, 71S-88S, (2002).
- [6] R. Gayon ; Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris, (1968).
- [7] J. Bruneton, Pharmacognosie, 3e édition, Tec et Doc, Paris, (1999).
- [8] M. Resch, A. Steigel, Z.L. Chem et R. Bauer, 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*. *J. Nat. Prod*, 61, 347-350, (1998).
- [9] A. Marfak, Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de dépsides, Thèse de doctorat de l'université de Limoges, (2003).
- [10] Z. Mohammedi, Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, Thèse de Magistère de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, (2006).
- [11] M. Aicha, Thèse de magistère: Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques, (2009/2010).
- [12] P. Schauenberg, Les guide du naturaliste, guide des plantes médicinales, 3^e édition révisée et augmentée, (1977).
- [13] K. Sundram, Analytical, Nutritional and Clinical Methods compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99, 191–203, (2006).
- [14] O. Tiina, thèse de doctorat, université of Helsinki, (2001).
- [15] V.B. Perone, The natural occurrence and uses of the toxic coumarins. *Microb. Toxins*, 8, 67–91, (1972).
- [16] R.J. Marles, C.M. Compadre et N.R. Farnsworth, Coumarin in vanilla extracts: its detection and significance *Econ. Botany*, 41, 41–47, (1987).
- [17] P.M. Boisde et W.C. Meuly, Coumarin In : Kroschwitz, J.I et Howe-Grant, M., eds Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th Ed ; Vol. 7, New York, John Wiley, 647–658.
- [18] S. Budavari, ed. The Merck Index, 12th Ed., Version 12:2 [CD-ROM], Whitehouse Station NJ, Merck & Co, (1998).
- [19] B.G. Lake, Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessmen, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 423-453, (1999).
- [20] J. R, R. G. Casley-Smith, et N.B. Piller, Treatment of Lymphedema of the Arms and Legs with 5, 6-Benzo- α -pyrone, *New Engl. J. Med*, 329, 1158-1163, (1993).

- [21] O. DeGarmo and P. Raizman, Coumarin In Encyclopedia of Chemical Technology, ed. R. E. Kirk and D. F. Othmer, 2nd edn, Vol. 12, John Wiley & Sons, New York, 425-433, (1967).
- [22] D.L. Barnard, Z.Q.Xu, V.D. Stowell et al, Coumarins and pyranocoumarins, potential novel pharmacophores for inhibition of measles virus replication. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 13, 39–59, (2002).
- [23] I. Kostova, Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents, *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 5, 29-46, (2005).
- [24] S.D. Sarker, L. Nahar et al, Bioactivity of umbelliprenin, the major component found in the seeds of *Angelica sylvestris*, *Ars Pharmaceutica*, 46, 35-41 (2005).
- [25] I. Kostova, S. Raleva, P.Genova et R. Argirova, Structure Activity Relationships of Synthetic Coumarins as HIV-1 Inhibitors, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 68274, 1-9, (2006).
- [26] T. Fujioka, Furumi et al, Antiproliferative constituents from umbelliferae plants, V.A., New furanocoumarin and falcarindiol furanocoumarin ether from the root of *Angelica japonica*, *Chem. Pharm. Bull*, 47,96-100, (1999).
- [27] M.E. Marshall, J.L Mohler et al, An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyr-one) and 7-hydroxycoumarin, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 120 (Suppl.), S39-S42.
- [28] M. Resch, A. Steigel, Z.L. Chem et R. Bauer, 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*. *J. Nat. Prod.*, 61, 347-350, (1998).
- [29] M. Yoshikawa, E. Harada, Developpement of bioactive Function in *Hydrangeae dulcis folium*. III. On the antiallergic and antimicrobial Principles of *Hydrangeae dulcis folium* *Chem. Pharm. Bull*, 42, 2225-2230, (1994).
- [30] O. Kayser et H. Kolodziej, Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Plelargonium reniforme*. *Planta Med.*, 63, 509-510, (1997).
- [31] A. Mansour , Thèse de magistère, investigation phytochimique de l'extrait *n*-butanol de l'espece *Centaurea Africana*, Constantine, (2009).
- [32] Constanze Sproll, Winfried Ruge et al, Analytical Methods HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods *Food Chemistry* 109, 462–469, (2008).
- [33] Gregory M. Polzin, Stephen, B. Stanfill, Candace R. Brown, L. David ; Determination of eugenol, anethole, and coumarin in the mainstream cigarette smoke of Indonesian clove cigarettes, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, 10, 1948-1953, (2007).
- [34] Alan W. Archer, Determination of cinnamaldehyde, coumarin and cinnamyl alcohol in cinnamon and cassia by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, vol. 447, 272-276, (1988).
- [35] H. Wagner, S. Bladt et E.M. Zgainski, *Plant Drug Analysis*, springer, Berlin, (1984).
- [36] J.B. Harbone ; A Guide to modern Techniques of Plant analysis, *Phytochemical Methods* second edition, (1984).
- [37] K. Macek, *Pharmaceutical application of Thin-Layer and Paper Chromatography*, New York, (1972).

- [38] J.A.R Mead, J.M Smith et R.T Williams ; The Metabolism of Hydroxycoumarins. *J.Biochem*, 68, 61-67, (1958).
- [39] V. Prachyawarakor, C. Mahidol et S. Ruchirawat ; Pyranocoumarins from the twigs of *Mammea siamensis*, *Phytochemistry*, 67, 924-928, (2006).
- [40] I. Kostova, G. Momekov et P. Stancheva. New Samarium (III), Gadolinium (III), and Dysprosium (III) Complexes of Coumarin-3-Carboxylic Acid as Antiproliferative Agents, *Metal-Based Drugs*, 10, 1-8, (2007).
- [41] E.R.A. Abu et B.A. El-Tawil, The electronic absorption spectra of some coumarins, A molecular orbital treatment, *Can.J.Chem*, 63, 1173-1178, (1985).
- [42] E.E. Shults, T.N. Petrova et al ; Coumarin Compounds from Roots of *Peucedanum (Peucedanum morisonii)*, (2003).
- [43] S.F. Sariaslani et J.P. Rosazza ; Novel Biotransformations of 7-thoxycoumarin by *Streptomyces griseus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 468-474, (1983).
- [44] Tosun A., Ozkal N., Baba M et Okuyama T., Pyranocoumarins from *Seseli gymmiferum* subsp. *Corymbosum* Growing in Turkey, *Turk J Chem*, 29, 327-334, (2005).
- [45] Xiao W.L., Li S.H., Shen Y.H., Niu X.M et Sun H.D., Two New Coumarin Glucosides from the Roots of *Angelica apaensis* and Their Anti-Platelet Aggregation Activity, *Arch Pharm Res*, 30, 799-802, (2007).
- [46] Widodo G.P., Sukrasno S.E.Y et Adnyna I.K., A coumarin from *Ageratum* Leaves (*Ageratum conyzoides* L.), *International Journal of Pharmacology*, 4, 56-59, (2008).
- [47] Lalande J et Parenty A. ; Synthèse d'une coumarine, *L'actualité chimique*, 16, 27-30, (2003).
- [48] J. Braz, Printed in Brazil, Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng, *Chem. Soc.*, Vol. 12, 6, 706-709, (2001).
- [49] Pierre Delaveau, *Les épices*, édition Albin Michel (1987).
- [50] Xavier Reculeau-Arnoud, *La cannelle une épice pas comme les autres*.
- [51] P.N. Ravindran, K. Nirmal Badus and M. Shylaja, *Cinnamon and Cassia the genus Cinnamomum*, (2004).
- [52] Lucien Guyot (professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Grignon, *Que sais-je, Les épices*, Presse universitaire en France (1972).
- [53] Armand Trousseau, Hermann Pidoux ; *Traité de thérapeutique et de matière médicale ; Volume 2*, (1801-1867).
- [54] S.K. BHATTACHARJEE ; *Handbook of medicinal plants ; Pointer publisher, India*, p 474, (1998).
- [55] B. Boullard ; *Plantes médicinales du monde*. Editions ESTEM, France, p 636, (2001).
- [56] E.A. Weiss ; *Spice crops*, CABI Publishing, Wallingford, p 411, (2002).
- [57] R. Anton & A. Lobstein ; *Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ; Tec & Doc, Paris*, p 522, (2005).
- [58] E. Guenther ; *The essential oils ; Volume, D. Van Nostrand Company Inc ; New York*, p 752, (1950).

- [59] Y. Leung Albert ; Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics ; Wiley-Interscience Publication New York, (1980).
- [60] E. Guenther ; The essential oils Volumes II, IV and VI, Robert E Krieger Publishing ; (1975-1977).
- [61] F. Vernon, H. Richard ; Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles Vol.2, Lavoisier, Paris, (1976).
- [62] British Pharmacopoeia Volumes I, II, (1993).
- [63] J. Wright ; Essential oils, In Ashurst PR (Ed) Food flavorings ; Blackie Academic and Professional Edition, (1995).
- [64] S. Azumi, A. Tanimura, K. Tanamoto ; A novel inhibitor of a bacterial endotoxin derived from Cinnamon bark, Biochemical and Biophysical Research Communications. ; 234, 506-510, (1997).
- [65] S. Inouye, H. Yamaguchi and T. Takizawa ; Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. ; Journal of Infection and Chemotherapy ; 7, 251-254, (2001).
- [66] Ody Penelope ; Les Planes Médicinales, Encyclopédie pratique, Sélection Reader's Digest, (1995).
- [67] M. Ungsurungsi, O. Suthienkul and C. Paovallo ; Mutagenicity screening of popular Thai spices. ; Food Chem. Toxicol. ; 20, 527-530, (1982).
- [68] Rui Wang, Ruijiang Wang, Bao Yang ; Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions, Innovative Food Science and Emerging Technologies ; 10, 289-292, (2009).
- [69] M. Robert, B. Silverstein, C. Basler, Terence C. Morill ; Identification spectrométrique de composés organiques, édition de Boeck & Larcier (1998).
- [70] Émile Biémont boeck ; Spectroscopie moléculaire : Structures moléculaires et analyse spectrale (2008).
- [71] Y. Daghbouche, S. Garriques et M. de la Guardia ; liquide chromatography-Fourier transform infrared septicmetric determination of cholesterol in animal greases ; Analytica Chimica ; Acta 354, 97-106, (1997).
- [72] Y. Daghbouche, S. Garriques et M. de la Guardia ; solide phase preconcentration-Fourier transform infrared septicmetric determination of Carbaryl and 1-naphtol ; Analytica Chimica ; Acta 314, 203-212, (1995).
- [73] J. Garnero, B. Pelaiche ; Phytothérapie et médecine naturelle (1984).
- [74] A.M. Rizk ; Constituents of plants growing in Qatar ; Fitoterapia ; 52 (2), 35-42, (1982).