

Acides gras et insaponifiables d'extraits obtenus à partir des sommités fleuries et des rhizomes de *Vetiveria nigriflora* (Benth.) Stapf, Poaceae

Pascal CHAMPAGNAT¹
 Gilles FIGUEREDO²
 André-Paul CARNAT¹
 Andrée CARNAT¹
 Jean-Louis LAMAISON¹

¹ Laboratoire de pharmacognosie et
 phytothérapie, Faculté de Pharmacie,
 28 Pl. H. Dunant, Clermont-Ferrand, F-63100
 Fax : + 33-473-282849.

<J-Louis.Lamaison@u-clermont1.fr>

² Laboratoire de chimie des huiles essentielles,
 Université Blaise Pascal, Campus des Cézeaux,
 Aubière, F-63177

Abstract: Extracts of *Vetiveria nigriflora* flowering tops and rhizomes were analyzed by mean of GC/MS for their fatty acids and unsaponifiable components. In flowering tops extract, the acid fraction is characterized by the presence of palmitic acid and other long chain fatty acids (until C₃₄). Unsaponifiable contains a high percentage of sterols (43.89%, mainly β -sitosterol). In rhizomes extract, acid fraction is composed by a high amount of typical organic acids of the genus *Vetiveria* and by a low quantity of fatty acids. Unsaponifiable fraction is characterized by the presence of a great percentage of sesquiterpenic derivatives (54.8%), and of sterols in low amount (13.7%).

Key words: *Vetiveria nigriflora*, fatty acids, unsaponifiable, flowering tops, rhizomes, GC/MS

Introduction

Vetiveria nigriflora (Benth.) Stapf, Poaceae, est une plante vivace originaire d'Afrique de l'ouest ; l'espèce croît le long des cours d'eau et dans leurs zones d'inondation [1-3]. Les travaux anciens relatifs à cette espèce concernaient seulement l'isolement de quelques composés de l'huile essentielle [4-6].

Plus récemment, P. Champagnat *et al.* ont identifié au moyen de la CPG/SM 57 constituants de l'huile essentielle des rhizomes [7]. D'autres travaux ont été réalisés par ces mêmes auteurs sur les dérivés flavoniques des sommités fleuries et ont permis de mettre en évidence des composés caractéristiques de la famille des Poaceae, en particulier un flavonoïde qui n'avait été mentionné qu'une seule fois dans le règne végétal [8].

À notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée sur la composition en matières grasses de cette espèce. Il existe cependant dans la littérature une abondante bibliographie concernant les lipides [9-15], stérols [16-21] et triterpènes [22, 23] de nombreuses espèces de la famille des Poaceae.

Au cours de ces travaux, nous nous sommes essentiellement intéressés aux lipides non polaires extractibles par l'éther de pétrole ; nous avons ainsi analysé les acides gras après saponification et les constituants des insaponifiables d'extraits obtenus à partir des sommités fleuries et des rhizomes de *Vetiveria nigriflora*.

Matériel et méthodes

Matériel végétal et extraction

Les sommités fleuries et les rhizomes de *Vetiveria nigriflora* ont été récoltés près de Bamako (Mali, Afrique). Leur identification a été confirmée par le professeur G. Aymonin (Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, France), et un échantillon authentique a été déposé à l'Herbarium de l'université de Clermont-Ferrand, France (n° CLF 049699).

Les rhizomes sont lavés pour éliminer le sable. Sommités fleuries et rhizomes sont ensuite mis à sécher à l'obscurité, à température ambiante, pendant environ une semaine. La matière végétale sèche est broyée dans un appareil à couteaux Ika Werke type MF 10 basic. Les poudres obtenues sont ensuite tamisées aux granulométries 0,355 et 0,600 mm, pour les sommités fleuries et les rhizomes, respectivement.

15 g (partie aliquote de chacune des poudres) sont extraits deux fois successivement par 100 mL d'éther de pétrole sous agitation magnétique. Après évaporation du solvant sous pression réduite, les extraits sont séchés puis pesés. Les rendements d'extraction établis sur la moyenne de trois extractions sont 0,40 % m/m pour les sommités fleuries et 1,32 % m/m pour les rhizomes.

Article reçu le 24 avril 2006
 Accepté le 14 juin 2006

FONDAMENTAL

Obtention des acides gras et de l'insaponifiable

La saponification des extraits est réalisée à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique 2N, à reflux pendant 1h 30. Après refroidissement, on ajoute de l'eau et les matières insaponifiables sont extraites par de l'hexane. La solution savonneuse est ensuite acidifiée jusqu'à précipitation des acides gras (pH 5-6) et les acides gras libérés sont alors extraits au moyen d'oxyde diéthylique [24-26].

Les acides gras sont ensuite transformés en leurs esters méthyliques par addition d'une solution méthanolique à 10 % de BF₃ [27], et les esters méthyliques obtenus sont extraits par de l'hexane en vue de leur analyse par CPG.

Conditions d'analyse par CPG/SM

Chromatographe HP 6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5973. Colonne capillaire HP-5 MS 30 m x 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 µm. Température injecteur 280 °C, température détecteur 300 °C.

Température colonne : 50 °C pendant 5 min, puis 50 °C à 300 °C, avec une pente de 5 °C/min.

Gaz vecteur : Helium 6.0 à 1,0 mL/min à débit constant, rapport de fuite 1/10^e.

Détecteur de masse en IE à 70 eV (les masses ont été enregistrées entre 33 et 550).

Mode d'injection : injecteur automatique.

L'identification des dérivés sesquiterpéniques a été réalisée précédemment lors de l'étude de l'huile essentielle de rhizomes de *Vetiveria nigritana* [7]. Les esters méthyliques d'acides gras ont été identifiés pour la plupart par comparaison de leur temps de rétention et de leur spectre de masse avec ceux de produits témoins chromatographiés dans les mêmes conditions. Pour ceux dont nous ne possédions pas les témoins, l'identification a été faite par comparaison de leur spectre de masse avec ceux de la littérature. Les autres constituants de l'insaponifiable ont été identifiés dans des conditions identiques à celles indiquées pour les esters méthyliques d'acides gras [28-30].

La quantification de chacun des constituants a été effectuée avec un chromatographe HP 6890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un logiciel d'acquisition de données HP Chemstation, dans les conditions opératoires décrites pour CPG/SM. Il a été admis que les coefficients de réponse sont égaux à 1 pour l'ensemble des composés analysés.

Les résultats exprimés ci-dessous représentent une moyenne calculée à partir de trois analyses.

Résultats et discussion

Acides gras

De l'extrait obtenu à partir des sommités fleuries

Les acides gras après isolement et pesée représentent 13,1 % de l'extrait à l'éther de pétrole ; 79,9 % des acides gras ont été identifiés et quantifiés ; ils sont listés par ordre d'élution sur la colonne (tableau 1). 71,5 % sont des acides gras saturés, parmi lesquels les acides palmitique (20,17 %), laurique (8,76 %) et myristique (7,11 %) sont les plus abondants. Les acides gras insaturés (7,75 %) sont uniquement représentés par les acides oléique (4,07 %) et linoléique (3,68 %).

Il convient de mentionner dans cette composition la présence d'acides gras à longue chaîne, de 22 à 34 atomes de carbone, ainsi que celle d'acides gras à nombre impair d'atomes de carbones, peu fréquemment signalés dans le règne végétal [31]. Quelques diacides (4 %) ont également été détectés.

Tableau 1. Composition en acides gras de l'extrait des sommités fleuries de *Vetiveria nigritana* (proportions m/m exprimées par rapport au total des acides gras).

Acides	Temps de rétention (min)	Proportions
Caprylique (octanoïque, C _{8:0})	15,1	0,18
Pélargonique (nonanoïque, C _{9:0})	18,5	0,14
Caprique (décanoïque, C _{10:0})	21,0	0,27
Subérique (octanedioïque, C _{8:0} , 2CO ₂ H)	24,2	0,41
Laurique (dodécanoïque, C _{12:0})	26,1	8,76
Azélaïque (nonanedioïque, C _{9:0} , 2CO ₂ H)	26,7	3,16
Tridécanoïque (C _{13:0})	28,5	0,16
Sébacique (décanedioïque, C _{10:0} , 2CO ₂ H)	29,3	0,37
Myristique (tétradécanoïque, C _{14:0})	30,7	7,11
Pentadécylrique (pentadécanoïque, C _{15:0})	32,8	1,22
Palmitique (hexadécanoïque, C _{16:0})	34,9	20,17
Margarique (heptadécanoïque, C _{17:0})	36,8	1,21
Linoléique (octadécadiénoïque, C _{18:2})	38,1	3,68
Oléique ((Z)-octadécénoïque, C _{18:1})	38,2	4,72
Stéarique (octadécanoïque, C _{18:0})	38,7	5,51
Nonadécanoïque (C _{19:0})	41,0	0,97
Arachidique (eicosanoïque, C _{20:0})	42,2	5,47
Hénéicosanoïque (C _{21:0})	43,8	0,54
Béhénique (docosanoïque, C _{22:0})	45,4	3,82
Tricosanoïque (C _{23:0})	46,9	1,18
Lignocérique (tétracosanoïque, C _{24:0})	48,4	3,17
Pentacosanoïque (C _{25:0})	49,8	0,89
Cérotique (hexacosanoïque, C _{26:0})	51,2	1,86
Carbocérique (heptacosanoïque, C _{27:0})	52,5	0,32
Montanique (octacosanoïque, C _{28:0})	53,8	1,69
Mélicissique (triacontanoïque, C _{30:0})	56,8	1,39
Dotriacontanoïque (C _{32:0})	58,6	0,92
Tétratriacontanoïque (C _{34:0})	60,9	0,60
Total composés identifiés		79,90
Total composés non identifiés		20,10
Total		100,00

De l'extrait obtenu à partir des rhizomes

La fraction acide après isolement et pesée représente 64,95 % m/m de l'extrait. 84 % des constituants de cette fraction ont pu être identifiés et quantifiés (tableau 2). À côté des acides gras classiques, il existe dans cette fraction une proportion importante d'acides organiques de nature sesquiterpénique qui sont caractéristiques du genre *Vetiveria* (68,39 %) ; l'un de ces acides de formule globale C₁₄H₂₁COOH qui représente 12 % est en cours d'identification structurale.

Les acides gras constituent seulement 15,39 % de la fraction acide ; ce sont principalement des acides saturés (9,49 %), avec comme principal composé l'acide palmitique (4,91 %). Les acides gras insaturés sont peu abondants (5,9 %).

Fraction insaponifiable

De l'extrait des sommités fleuries

Cette fraction après isolement et pesée représente 68,9 % de l'extrait à l'éther de pétrole. 82,56 % des constituants de cette fraction ont pu être identifiés (figure 1 et tableau 3).

Le principal groupe de constituants est représenté par les stérols (43,89 %) : deux composés sont majoritaires, le β-sitostérol et le stigmas-térol (18,36 % et 10,08 %, respectivement), le cholestérol représentant 1,64 %.

Tableau 2. Composition en acides gras et en acides organiques de l'extrait des rhizomes de *Vetiveria nigriflora* (proportions m/m exprimées par rapport au total des acides).

Acides	Temps de rétention (min)	Proportions
Isozizanoïque	30,3	2,05
Zizanoïque	33,1	54,34
C ₁₄ H ₂₁ COOH	33,7	12,00
Palmitique (hexadécanoïque, C ₁₆ :0)	34,9	4,91
Margarique (heptadécanoïque, C ₁₇ :0)	36,8	0,32
Linoléique (octadécadiénoïque, C ₁₈ :2)	38,1	2,23
Oléique ((Z)-octadécénoïque, C ₁₈ :1)	38,2	2,92
Élaïdique ((E)-octadécénoïque, C ₁₈ :1)	38,3	0,75
Stéarique (octadécanoïque, C ₁₈ :0)	38,7	1,20
Arachidique (eicosanoïque, C ₂₀ :0)	42,2	1,44
Béhenique (docosanoïque, C ₂₂ :0)	45,4	0,47
Tricosanoïque (C ₂₃ :0)	46,9	0,25
Lignocérique (tétracosanoïque, C ₂₄ :0)	48,4	0,59
Pentacosanoïque (C ₂₅ :0)	49,8	0,14
Cérotique (hexacosanoïque, C ₂₆ :0)	51,2	0,17
Total composés identifiés		83,78
Total composés non identifiés		16,22
Total		100,00

Les hydrocarbures aliphatiques saturés (C₂₃ à C₃₅) représentent le deuxième groupe important de constituants (30,1 %) ; parmi ceux-ci, 24,79 % sont des composés à nombre impair d'atomes de carbone, ce qui est habituel dans le règne végétal.

Les tocophérols représentent 1,48 % de l'insaponifiable, l'isomère γ -tocophérol à activité antioxydante élevée constituant environ la moitié des tocophérols totaux.

La présence de squalène doit également être mentionnée, bien qu'il soit en faible quantité (0,71 %). Un seul dérivé triterpénique a été identifié, le farnéol, composé signalé dans de nombreuses espèces de Poaceae.

De l'extrait obtenu à partir des rhizomes

Cette fraction après isolement et pesée représente 21,57 % de l'extrait. 73,07 % des constituants de cette fraction ont été identifiés (figure 2 et tableau 4).

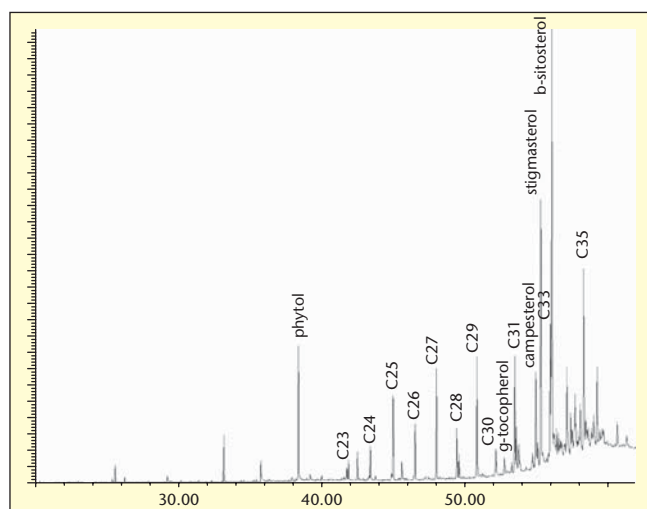


Figure 1.

Tableau 3. Composés identifiés dans l'insaponifiable de l'extrait des sommités fleuries de *Vetiveria nigriflora* (proportions m/m exprimées par rapport au total des constituants).

Composés	Temps de rétention (min)	Proportions
Phytol	38,3	4,22
Tricosane	41,5	0,34
Tétracosane	43,3	1,01
Pentacosane	44,9	2,45
Hexacosane	46,4	1,58
Heptacosane	47,9	3,51
Octacosane	49,3	1,60
Squalène	49,5	0,71
Nonacosane	50,7	3,94
Triacotane	52,0	1,23
γ -tocophérol	52,6	0,76
Henotriacotane	53,3	3,71
Cholest-5-èn-3-ol	53,5	1,64
α -tocophérol	53,6	0,72
Campesterol	54,8	4,34
Stigmasterol	55,2	10,08
Tritriacotane	55,8	4,69
β -sitosterol	55,9	18,36
Éthyl-cholestan-3 β -ol	56,1	1,99
Stigmasta-3,5-dièn-7-one	57,0	4,11
9,19-cyclolanostan-3-ol, 24-méthyl-	57,5	3,37
Fern-7-èn-3 β -ol	57,9	2,05
Pentatriacotane	58,1	6,15
Total composés identifiés		82,56
Total composés non identifiés		17,44
Total		100,00

Les composés majoritaires (54,8 %) appartiennent au groupe des sesquiterpénoïdes. Ce sont principalement des alcools sesquiterpéniques (46,84 %), avec notamment le cédre-8-ène-15-ol et le khusimol. Les autres composés se répartissent entre aldéhydes (4,57 %), cétones (1,88 %) et hydrocarbures (1,51 %).

Les stérols sont en plus faible pourcentage que dans l'extrait des sommités fleuries (13,7 %), ce sont des stérols fréquemment rencontrés dans le règne végétal.

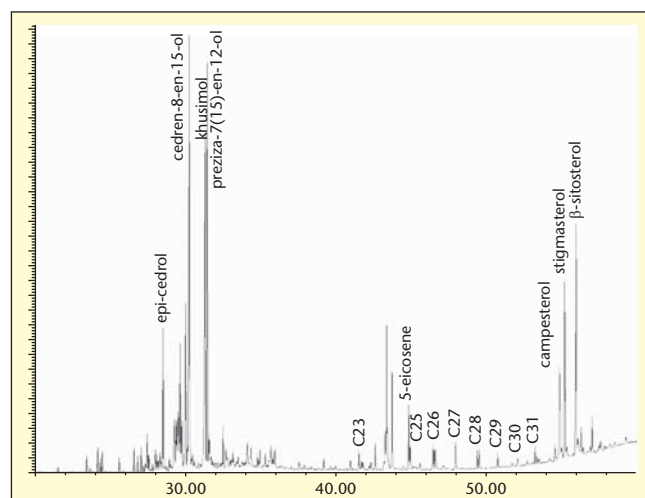


Figure 2.

Tableau 4. Composés identifiés dans l'insaponifiable de l'extrait des rhizomes de *Vetiveria nigritana* (proportions m/m exprimées par rapport au total des constituants).

Composés	Squelette	Temps de rétention (min)	Proportions
α -funébrène	cédrane	23,5	0,32
Préziza-7(15)-ène	prézizaane	24,4	0,26
Zizaène	zizaane	24,5	0,43
Érémophila-1(10),7(11)-diène	érémophilane	26,6	0,50
12-nor-préziza-7(15)-èn-2-one	prézizaane	27,5	0,86
15-nor-funébran-3-one	cédrane	28,0	0,64
Khusimone	zizaane	28,1	0,38
Cédrénol (cédra-8(15)-èn-9 α -ol)	cédrane	28,4	0,54
Epi-cédrol	cédrane	28,5	3,03
Prézizaan-15-al	prézizaane	29,3	1,83
α -funébrèn-15-al	cédrane	29,5	2,74
Préziza-7(15)-èn-3 α -ol	prézizaane	29,7	3,11
2-épiziza-6(13)-èn-3 α -ol	zizaane	29,8	1,25
Khusian-2-ol	khusiane	30,0	4,33
Cédr-8-èn-15-ol	cédrane	30,3	12,85
Khusimol	zizaane	31,3	12,25
Préziza-7(15)-èn-12-ol	prézizaane	31,5	9,48
Tricosane		41,5	0,42
Eicosène		44,8	1,43
Pentacosane		44,9	0,51
Hexacosane		46,4	0,50
Heptacosane		47,9	0,67
Octacosane		49,3	0,38
Squalène		49,5	0,39
Nonacosane		50,7	0,31
Triacotane		52,0	0,25
Hentriacotane		53,3	0,14
Campestérol		54,8	3,00
Stigmastérol		55,2	4,43
β -sitostérol		55,9	5,84
Total composés identifiés			73,07
Total composés non identifiés			26,93
Total			100,00

Enfin, dans le groupe des hydrocarbures aliphatiques, les saturés représentent 3,18 % de la fraction, les insaturés sont en très faible quantité (eicosène et squalène).

Conclusion

Les extraits à l'éther de pétrole des sommités fleuries et des rhizomes de *Vetiveria nigritana* sont caractérisés l'un et l'autre par la présence d'acides gras dont le principal est l'acide palmitique. Dans l'extrait des sommités fleuries, l'acide palmitique est accompagné d'acides gras à longue chaîne, de 22 à 34 atomes de carbone, alors que l'extrait des rhizomes se caractérise par la présence en quantité importante d'acides organiques de nature sesquiterpénique caractéristiques du genre *Vetiveria*.

Plus de 40 % de l'insaponifiable de l'extrait obtenu à partir des sommités fleuries est constitué par des stérols, avec principalement le β -sitostérol. Parmi les autres constituants, on peut remarquer la présence d'un triterpène, le fernenol, ainsi que celle du phytol et de tocophérols. Dans l'insaponifiable de l'extrait des rhizomes, les constituants majoritaires sont représentés par des dérivés sesquiterpéniques à squelette zizaène. Les stérols sont également présents, mais en plus faible proportion que dans les sommités fleuries.

RÉFÉRENCES

- BURKILL HM. *The Useful Plants of West Tropical Africa*. Vol. 2. 1994.
- BERHAUT J. *Flore du Sénégal*. 2e éd. Dakar : Clairafrique, 1967.
- HUTCHINSON J, DALZIEL JM. *Flora of West Tropical Africa*. 1st ed. London : Hepper FN. 2nd ed., 1972.
- CARDOSO DO VALE J, PROENÇA DA CUNHA A. *Vetiveria nigritana* (Benth.) Stapf. De Angola, II – Contribuição para o estudo do oleo essencial. *Garcia de Orta* 1964 ; 12 : 673-82 ; (Lisboa).
- CARDOSO DO VALE J, PROENÇA DA CUNHA A. *Vetiveria nigritana* (Benth.) Stapf. De Angola, II – Contribuição para o estudo dos alcools et cetonas do seu oleo essencial. *Garcia de Orta* 1967 ; 15 : 205-24 ; (Lisboa).
- NIGAM C, RADECKA C, KOMAE H. Essential oils and their constituents XXXVII, Isolation and structure of khusenol, a new sesquiterpene primary alcohol from oil of vetiver. *J Pharm Sci* 1968 ; 57 : 1029-30.
- CHAMPAGNAT P, FIGUEREDO G, CHALCHAT JC, BESSIERE JM. Essential oil composition of *Vetiveria nigritana* from Mali. *J Essent Oil Res* 2005.
- CHAMPAGNAT P, HEITZ A, FRAISSE D, CARNAT AP, CARNAT A, LAMAISON JL. MAJOR FLAVONOIDS OF VETIVERIA NIGRITANA (POACEAE) AERIAL PARTS. FITOTERAPIA (SOU MIS).
- HEGNAUER R. Gramineae. In : *Chemotaxonomie Der Pflanzen VII*. Stuttgart : Birkhäuser Verlag, 1986 : 620-57.
- GRAY JR. Fatty acids from certain Andropogoneae. *Phytochemistry* 1972 ; 11 : 1192-3.
- UCCIANI E. *Nouveau Dictionnaire des huiles végétales – Composition en acides gras*. Paris : Tec & Doc, Lavoisier, 1995.
- DAUN JK, TRACHUK R. Fatty acid composition of oil extracted from canadian weed seeds. *J Am Oil Chem Soc* 1976 ; 53 : 661-2.
- OSAGIE AU, KATES M. Lipid composition of millet (*Pennisetum americanum*) seed. *Lipids* 1984 ; 19 : 958-65.
- HEMAVATHY J, PRABHAKAR JV. Lipid composition of rice (*Oryza sativa* (L.) Bran). *JAACS* 1987 ; 64 : 1016-9.
- LOGNAY G, MARLIER M, BAUDART M, SEVERIN M. Contribution à l'étude du mil à chandelle (*Pennisetum americanum* (L.) Schum.). *Riv Ital Sost Grasse* 1988 ; 65 : 291-4.
- KNIGHTS BA. Identification of the sterols of oat seed. *Phytochemistry* 1965 ; 4 : 857-62.
- KNIGHTS BA. Comparison of the grain sterol fractions of cultivated and wild oat species. *Phytochemistry* 1968 ; 7 : 2067-8.
- OSSKE G, SCHREIBER K. Sterine und triterpenoide VI. 24-methylenlophenol, ein neues 4 α -methylsterin aus *Saccharum officinarum* L. und *Solanum tuberosum* L. *Tetrahedron* 1965 ; 21 : 1559-66.
- BOWDEN BN, WILLIAMS PM. Sterols in grass seeds. *Phytochemistry* 1971 ; 10 : 3135-7.
- BERRIE AMM, KNIGHTS BA. Sterols in the genus Triticum. *Phytochemistry* 1972 ; 11 : 2363-5.
- VAN NIEKERK PJ, BURGER AE. The estimation of the composition of edible oil mixtures. *JAACS* 1985 ; 62 : 531-8.
- NISHIMOTO K, ITO M, NATORI S, OHMOTO T. The structures of arundoin, cylindrin and fernenol : triterpenoids of fernane and arborane groups of *Imperata cylindrica* var. *Koenigii*. *Tetrahedron* 1968 ; 24 : 735-52.

23. OHMOTO T, IKUSE M, NATORI S. Triterpenoids of the Gramineae. *Phytochemistry* 1970 ; 9 : 2137-8.
24. AFNOR (NFT 60-205) Détermination de la teneur en matières insaponifiables.
25. WOLFF JP. *Manuel d'Analyse des Corps Gras*. Paris : Azoulay, 1968.
26. GÎRZU M, CARNAT AP, CHABARD JL. Composition en acides gras de la sommité fleurie de millepertuis (*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae). *OCL* 1995 ; 2 : 317-8.
27. METCALFE LD, SCHMITZ AA. Rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatography analysis. *Anal Chem* 1961 ; 33 : 363-4.
28. ADAMS RP. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*, ed. Carol Sream, IL, Allured Publishing Corporation, 2001.
29. MC LAFFERTY FW, STAUFFER DB. *The Wiley NBS registry of Mass Spectral Data. 2nd Edition*. New York : J. Wiley & Son, 1989.
30. VAN DEN DOOL H, KRATZ PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr* 1963 ; 11 : 463-71.
31. KARLESKIND A. *Manuel des Corps Gras*. Paris : Tec & Doc, Lavoisier, 1992.