

PEGANUM HARMALA : SOURCE COMBINÉE D'AROMES ET DE COLORANTS

S. Tahrouch^{1*}; S. Rapior²; L. Mondolot-Cosson²; L. A. Idrissi-Hassani¹; J. M. Bessière³ et C. Andary²

Résumé:

La composition en substances volatiles des feuilles, tiges et racines de *Peganum harmala* a été étudiée sur matériel frais et sec. Trente et un composés ont été identifiés notamment l'acide propylique, le 2,3-dihydrobenzofurane, le 3-octanone et l'isovanilline. Les feuilles sont plus riches en substances volatiles que les racines et les tiges. Une méthode de séparation entre les colorants et les alcaloïdes des graines de *P. harmala* a été également mise au point. Les molécules colorées de nature anthraquinonique sont utilisées dans l'artisanat marocain, surtout pour teinter la laine. Nous avons, par histochimie, localisé les pigments anthraquinoniques dans le périsperme et les alcaloïdes dans l'albumen et les cotylédons de la graine de *P. harmala*. Plante sauvage du sud marocain, *P. harmala* est donc une source combinée d'arômes et de colorants, substances naturelles susceptibles d'intéresser l'industrie agro-alimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Mots clés : *Zygophyllaceae* - *Peganum harmala* – substances volatiles - Pigment - Chromatographie – Histochimie.

¹Laboratoire des Symbiotes Racinaires et de Biochimie Végétale, Faculté des Sciences, Agadir-Maroc

²Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie, 34060 Montpellier-France

³Laboratoire de Chimie Appliquée, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, 34296 Montpellier-France

INTRODUCTION

La famille des *Zygophyllaceae* compte environ 24 genres avec 240 espèces xérophytes et hallophytes (Ronse Decraene et al., 1996). Cette famille largement représentée dans les régions arides et semi-arides du globe, est connue pour la toxicité de certaines espèces pour l'homme telles *Peganum harmala* et *Larrea divaricata* (Bruneton, 1994).

Peganum harmala, de nom local harmel, est un remède populaire (les graines sont utilisées comme antispasmodiques et abortives) en Afrique du Nord (Bellakhdar, 1997) et au moyen orient (Siddiqui et al., 1987). *P. harmala* est très réputée pour sa richesse exceptionnelle en alcaloïdes (de type β -carbolinique), ce qui la classe parmi les plantes hallucinogènes à effets psychotropes (Duke, 1929; Farnsworth, 1968). Ces alcaloïdes ont donné lieu à de nombreux travaux d'isolement, d'études de structure et de synthèse chimique. Outre l'harmine et l'harmaline, les graines de *P. harmala* contiennent en effet d'autres alcaloïdes de type β -carbolinique tels que l'harmine, l'harmalol, l'harmol, l'harmalidine, ainsi que des alcaloïdes de type quinazolinique tels que la péganine, le péganol, la vasicine, l'oxyvasicine, la désoxyvasicine. Ces alcaloïdes possèdent diverses activités biologiques (analgésiques, diurétiques, anthelminthiques, antiprolifératives,

abortives, antimicrobiennes).

Une recherche sur les qualités organoleptiques de l'huile des graines de *P. harmala* a montré qu'elle était comestible (Siddiqui et Afza, 1978). Cette huile, composée majoritairement d'acide oléique, linoléique et palmitique (Al-Shamma et Abdul-Ghany, 1978 ; Kusmenoglu et al., 1995) constitue 10 à 12% des graines.

Par ailleurs, la recherche sur les substances volatiles et les pigments anthraquinoniques reste très limitée (Kasumov, 1971, 1983 ; Zakirov et al., 1989 ; Zhenli et al., 1994). Notre objectif est l'analyse des composés volatils contenus dans les différentes parties de la plante, la séparation des pigments anthraquinoniques des alcaloïdes, et la valorisation de ces molécules en vue d'une éventuelle utilisation industrielle.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

P. harmala L. dont le nom commun au Maroc est harmel, est collectée dans la région d'Agadir au printemps 1997. Les différentes parties de la plante, feuilles, tiges et racines sont mises à l'étuve pendant 24 heures à 35°C.

Un spécimen est gardé dans l'herbier de la faculté des sciences au département de Biologie (Université Ibnou Zohr, Agadir-Maroc).

Extraction des substances volatiles

Les différentes parties de la plante (graines, fruits, tiges, feuilles et racines) sont broyées et mises à macérer dans l'éther éthylique. Après filtration, l'extrait organique est concentré sous azote pour ne garder qu'un petit volume, qui est analysé directement par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

Analyse par CG/SM

L'analyse CG/SM a été effectuée sur un instrument Hewlett-Packard CG/SM. Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire (silice et polydiméthylsiloxane) de 25m x 0,20mm. Le gaz vecteur était l'hélium de débit 0,6ml/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont 220°C et 240°C, respectivement. La colonne est programmée aux températures suivantes : 50°C- 250°C à raison de 3°C/min. Le spectre de masse était enregistré par un détecteur de type quadrupole ; l'ionisation est réalisée par impact électronique sous un potentiel de 70eV. Les composés volatils sont identifiés grâce à leur spectre de masse et à leur indice de rétention (Stenhagen et al., 1976 ; The Mass Spectrometry Center, 1986 ; MacLafferty et Stauffer, 1989 ; Pacakova et Pelt, 1992). Les substances volatiles de *P. harmala* sont reportées dans le tableau 1 selon leur ordre d'élution.

Extraction des pigments anthraquinoniques

Les graines de *P. harmala* réduites en poudre sont d'abord délipidées à l'éther de pétrole dans un soxhlet. Le marc, séché à température ambiante, est ensuite extrait par l'eau dans le soxhlet pour éliminer le maximum d'alcaloïdes. Enfin, le marc sec est mis à macérer dans le chloroforme. Après filtration, l'extrait organique, de couleur rouge, est concentré à sec et repris dans l'éthanol. L'extrait alcoolique est analysé d'une part, par chromatographie sur couche mince (CCM) de polyamide 6 (Macherey-Nagel, réf. : 803013) avec différents mélanges hydroéthanoliques et d'autre part, par chromatographie sur colonne (CC) en moyenne pression (colonne : Büchi de 26 x 460mm, réf. : 104323 Roucaire), remplie à sec par du polyamide 6 SC (Macherey-Nagel, grain < 0,07mm) et tassée sous pression d'azote. Une précolonne a été utilisée (26 x 70 mm, réf. : 104270 Roucaire.). Le solvant d'élution est un gradient eau-éthanol. La détection des pigments anthraquinoniques et des alcaloïdes est réalisée en lumière visible et sous lumière ultra-violette (UV) à 366 nm.

Techniques histochimiques

•Obtention de coupes et réactifs

Les coupes de graines de *P. harmala* sont réalisées à l'aide d'un microtome à congélation au CO₂, Cryostat modèle 2800 Frigocut- E, Reichert-Jung, selon la méthode d'Andary et al. (1995). Les sections obtenues ont de 30 à 80 µm d'épaisseur. Les coupes sont immergées dans différents réactifs : eau distillée, hydroxyde de potassium à 5% dans l'éthanol et acétate de magnésium à 0,5% dans

le méthanol. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle, soit dans une goutte de glycérine ou dans les réactifs eux mêmes.

•Observation en microscopie optique

Après avoir réalisé les coupes des graines, des observations au microscope optique en lumière visible et à épifluorescence, permettent de confirmer la présence des pigments anthraquinoniques et des alcaloïdes dans des régions bien localisées de la graine.

L'appareil utilisé est le Microscope Optiphot (Nikon).

Les observations se font en lumière visible ou sous U.V. en présence de deux filtres soit :

- un filtre U.V. 1A : excitation 365 nm (filtre d'arrêt : 400 nm)

- un filtre B2A : excitation > 410 nm (filtre d'arrêt : 515 à 560 nm)

Des photographies sont effectuées au moyen d'un appareil reflex mono objectif 24 x 36 motorisé, Nikon F-301.

Résultats et discussion

Les composés volatils

Trente et un composés volatils ont été identifiés à partir des organes frais et secs de *P. harmala*. Nous n'avons pas détecté de substances volatiles dans les graines et les fruits. En revanche nous avons remarqué que les feuilles sont plus riches qualitativement, en ces composés que les tiges et les racines. En effet, les feuilles fraîches et sèches contiennent, respectivement, 12 et 19 constituants volatils. La N-acétylaniline (0,19ppm), l'aniline (0,11ppm) et l'isoquinoline (0,10ppm) sont les composés essentiels des feuilles fraîches alors que le 2,3-dihydrobenzofurane (3,39ppm) et l'acide propylique (3,10ppm) sont ceux des feuilles sèches.

Les tiges fraîches contiennent six composés volatils avec le 2,3-dihydrobenzofurane (1,24ppm) et la pipéridone (0,36ppm) comme composés majoritaires. Alors que les tiges sèches contiennent treize substances volatiles dont la 3-octanone (3,24ppm), l'acide propylique (1,94ppm) et la N-formylaniline (1,53ppm). Six constituants volatils ont été identifiés chez les racines tels l'acide propylique (46,67ppm) et l'acide tiglique (13,71ppm).

Le 3-octanone et l'isoquinoline ont été détectés dans les parties aériennes (fraîches et sèches).

L'isovanilline et l'acide caproïque sont présents uniquement dans les organes secs ; ceci est probablement dû au processus de séchage.

Les substances volatiles évoluent en richesse qualitative des racines aux feuilles. Les substances volatiles identifiées à partir de *P. harmala* d'origine marocaine sont relativement différentes de celles de *P. harmala* (feuilles et tiges) d'origine chinoise (Zhenli et al., 1994). Cependant des composés aminés tels que l'aniline, sont détectés dans *P. harmala* des deux origines, alors que la N-phenylformamide et la N-acétylaniline sont identifiées respectivement chez *P. harmala* d'origine chinoise et

marocaine.

Tableau I: Composition relative en ppm des Substances Volatiles chez *P. harmala*.

Composés	Temps de retention (min)	Feuilles fraîches (ppm)	Tiges fraîches (ppm)	Feuilles sèches (ppm)	Tiges sèches (ppm)	Racines sèches (ppm)
Non identifié	3,70			0,70		
Acide propanoïque	4,00	0,04		3,10	1,94	46,67
Butanol	4,30			0,98		
Pent-3-en-2-one	4,53	0,08		0,89		
Non identifié	5,45	0,03				
Acide valérique	6,40			1,40		7,56
(E)-3-Hexenol	6,65	0,03				
4-methyl valérate de methyl	6,80	0,04	0,06		0,15	
(E)-2-heptenal	7,88			0,36		
Acide tiglique	9,55					13,71
3-Octanone	11,10	0,04	0,04	1,48	3,24	
5-Methyl tetrahydrofurfural	11,14					6,75
(E,E)-2,4-hexadienal	11,40	0,01		1,20		
Acide hexanoïque	12,30			0,17	0,44	8,97
Non identifié	13,30	0,05			0,56	
Non identifié	14,45	0,07	0,05			
Aniline	18,90	0,11				
Non identifié	21,90	0,03	0,36			
N-Formylaniline	22,30			1,26	1,53	
Isoquinoline	23,60	0,10	0,11	0,39	0,66	
Non identifié	23,70	0,06		0,78		
2,3-Dihydrobenzofurane	24,80		1,24	3,49	0,15	
N-Acetylaniline	25,30	0,19		1,06		
(E,Z)-2,4-decadienal	27,28			0,78		
Indole	27,70	0,02				
Thymol	28,11				0,34	
(E,E)-2,4-decadienal	28,30			1,56		
Piperitenone	28,40		0,36			
5-Ethylidihydrofuran-2-one	31,45			0,14	0,71	
Isovanillin	31,70			0,50	0,39	13,51
Non identifié	35,05			0,73	0,56	
Acide 3,4-dihydroxybenzene acétique	36,80				0,83	
b-ionone	37,00				1,37	
Dihydroactinidiolide	37,71			0,25		
6-Methyl-2-propyl pyrimidone	38,40			0,98	0,86	
Pentadecane	39,45	0,02		0,14		
Non identifié	39,80	0,07		0,22		
Non identifié	40,45	0,13				
1,2-Dihydropyridin-6-one	40,80		0,06			
Non identifié	41,14			4,83		
Non identifié	44,80		0,12		0,13	3,53
Non identifié	47,38			0,53	2,39	
Non identifié	49,90				0,62	
Acide myristique	51,72	0,07				
Non identifié	56,30	0,26				
Non identifié	56,50	0,09				

Les pigments anthraquinoniques

a- Séparation pigments-alcaloïdes

Nous avons mis au point une méthode d'extraction des pigments anthraquinoniques tout en éliminant les lipides et une partie des alcaloïdes dont les graines sont riches (voir matériels et méthodes). En effet, les graines contiennent 10% d'huile (Siddiqui and Afza, 1978) et sont exceptionnellement riches en alcaloïdes.

Les graines de *P. harmala* réduites en poudre et fractionnées en cinq parties égales sont extraites par différents solvants : eau, méthanol, éthanol, dichlorométhane et chloroforme. Le chloroforme est le meilleur solvant d'extraction des pigments anthraquinoniques, suivi par l'éthanol puis le dichlorométhane et le méthanol. L'éthanol extrait aussi les alcaloïdes qui se trouvent bien solubilisés dans ce solvant (Index Merck, 1996). L'eau extrait très peu de pigments.

L'extrait organique concentré à sec et repris dans l'éthanol, est chromatographié sur CCM et injecté sur une colonne de polyamide SC6 fonctionnant en moyenne pression ce qui permet une séparation entre les pigments et les alcaloïdes. L'eau permet d'éliminer une grande partie des alcaloïdes. En augmentant le pourcentage d'éthanol, les fractions sont enrichies en pigments anthraquinoniques dont la couleur varie du rose clair au rouge sombre (rouge turc).

b- Histolocalisation

Le principe de l'histochimie est une imprégnation de tissus animaux ou végétaux par des réactifs spécifiques de certains composés puis une observation en microscopie optique permettant une localisation de ces composés *in situ*.

Parallèlement à l'étude chromatographique, nous avons procédé à une localisation *in situ* des pigments anthraquinoniques et des alcaloïdes en microscopie optique, en lumière visible et en épifluorescence.

L'observation des coupes de graines en lumière UV montre une forte concentration en alcaloïdes, d'autofluorescence jaune au niveau des cotylédons et bleue au niveau de l'albumen. L'observation en lumière visible permet de localiser les pigments anthraquinoniques, de couleur brun rouge, au niveau du périsperme. L'utilisation de réactifs à l'acétate de magnésium ou à l'hydroxyde de potassium accentue la coloration brun rouge et confirme la présence de pigments anthraquinoniques au niveau du périsperme.

Conclusion

De plus en plus d'entreprises industrielles sont à la recherche de nouvelles sources de substances naturelles. *P. harmala*, plante sauvage du sud marocain est une source probable de pigments, d'huiles essentielles et de composés volatils ; substances naturelles susceptibles

d'intéresser les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Références :

- Al-Shamma, L. A. and Abdul-Ghany, A. 1978. Gas Chromatographic Analysis of The Seed Oil of *Peganum harmala*. *Bull. Biol. Res. Cent.* **10** : 19-26.
- Andary, C., Mondolot-Cosson, L. et Dai, G.H L. 1996. *In situ* detection of polyphenols in plant microorganism interactions. In : M; Nicole and V. Gianinazzi-Pearson (Eds.), *Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions* : 43-53, Kluwer Academic Publishers, Netherlands;
- Bellakhdar, J. 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle (Médecine Arabe ancienne et savoirs populaires). Edit. Ibis Press, Saint-Etienne.
- Bruneton, J. 1994. Les Plantes Toxiques : Végétaux dangereux pour l'Homme et les Animaux, Edit. Lavoisier, Paris.
- Duke, James A. 1929. Handbook of Medicinal Herbs. Edit. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Farnsworth, N. R. 1968. Hallucinogenic Plants. *Science* **162** : 1086-1092.
- Kasumov, M. A. 1971. Wild dye producing plants of Azerbaïdjan and their prospective use in the carpet industry. *Rast. Resur.* **7** : 539-547.
- Kasumov, M. A. 1983. *Peganum harmala* and its use in dyeing wool yarn. *Izv. Nauk Az. SSR, Ser. Biol.* **5** : 19-25.
- Kusmenoglu, S., Turkoz, S. and Koca, U. 1995. Constituents of the seed oil of *Peganum harmala* L. *J. Fac. Pharm. Gazi* **12** : 141-144.
- MacLafferty, F.W. and Stauffer, D.B. 1989. The Wiley NBS Registry of Mass Spectra Data. Edits. Wiley and Sons, New York.
- Merck Index, 1996. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Edit. Merck & CO.,Inc. Rahway, N. J., U. S. A.
- Pacakova, V. and Pelt, L. 1992. Chromatographic Retention Indices. Edits. E. Horwood, New York.
- Ronse Decraene, L. P., De Laet, J. and Smets, E. F. 1996. Morphological studies in *Zygophyllaceae*. II. The floral development and vascular anatomy of *Peganum harmala*. *Am. J. Bot.* **83** : 201-215.
- Siddiqui, S. and Afza, N.1978. Seeds of *Peganum harmala* a possible new source of edible oil. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, **21** : 46.
- Siddiqui, S., Khan, O. Y, Siddiqui, B. S. and Faizi, S. 1987. Harmalidine, a β -Carboline alkaloid from *Peganum harmala*. *Phytochem.* **26** : 1548-1550.

Stenhagen, E., Abrahamsson, S. and MacLafferty, F. W. 1976. Registry of Mass Spectral Data. Edits. Wiley and Sons, New York. The Mass Spectrometry Data Centre, 1986. Eight Peak Index of Mass Spectra, 3rd ed.; The Royal Society of Chemistry, Nottingham, Great Britain.

Zakirov, P. K., Karimov, G., Norbobaeva, T. 1989. *Peganum*

harmala L. as a vegetable dye for yarns. *Dokl. Akad. Nauk Uz SSR* **5** : 52-53.

Zhenli, C., Zhibin, L., Jinao, D., Ronghan, Z and Shouxun, Z. 1994. Studies on the Volatile Constituents of *Peganum* Three Plants in China. *J. China Pharm. Univ.* **25** : 311-312.

Summary

Leaves, stems and roots of *Peganum harmala* from Morocco were investigated for volatile components. Thirty-one volatile constituents were identified. The main constituents were propylic acid, 2,3-dihydrobenzofurane, 3-octanone and isovanillin. The leaves contained more volatile molecules than stems and roots. A method was also developed for separation between dyes and alkaloids of *P. harmala* seeds. The dyeing compounds, identified as anthraquinones, are

used in the Moroccan craft industry for dyeing the wool. Histochemistry of excised seeds showed that anthraquinones were localised in perisperm and alkaloids in cotyledon and albumen. *P. Harmala*, savage plant originating from the south of Morocco, is then, a combined resource of natural substances that may interest the cosmetic, pharmaceutical and food industries.

Key words : *Zygophyllaceae* - *Peganum harmala* – Volatile – Pigment - Chromatography – Histochemistry

