

## ANALYSE DE L'AZADIRACTINE PAR HPLC ET DEVELOPPEMENT D'UNE FORMULATION D'EXTRAITS DE NEEM

B.C. SCHIFFERS, A. DIEYE, P. NTEMA, B. DIEYE & G. EKUKOLE

Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques

Chimie analytique et Phytopharmacie

Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux

Senchim, Route de Rufisque Km13

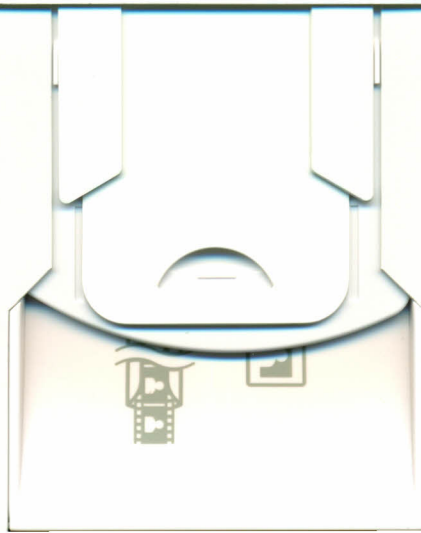
B.P. 3148, Dakar, Sénégal

### RESUME

Une méthode de dosage de l'azadirachtine a été développée. Après élimination de l'huile par l'hexane, l'azadirachtine est extraite des amandes broyées à l'aide de méthanol. Les extraits sont purifiés d'abord par partage liquide/liquide, ensuite par chromatographie sur colonne de Florisil. L'analyse HPLC est réalisée notamment sur colonne C18 ODS. Le taux moyen de récupération est de 97%. Des extraits des amandes du neem (*Azadirachta indica*) ont été formulés en solution émulsionnable EC. Cette formulation contient 0,3-1% d'azadirachtine, 18% d'huile de neem, et est destinée à être utilisée pour la protection insecticide du cotonnier à raison de 1 l EC/ha dans 9 l d'eau (technique du TBV). Le choix du solvant apparaît crucial pour la stabilité de l'azadirachtine (selon CIPAC MT 46); l'addition d'huile de neem est favorable à la stabilisation du composé en solution. Des surfactants efficaces en eaux douces (CIPAC A) ou dures (CIPAC D), même après 24 heures sans agitation, ont été sélectionnés (tenue en émulsion à 20°C et à 30°C selon CIPAC MT 36). Si les résultats des essais réalisés au Sénégal confirment qu'utilisée seule à 11 g M.A./ha la formulation EC est insuffisante pour contrôler totalement *H. armigera* et *A. gossypii*, ils démontrent aussi l'efficacité des associations de 5 g d'azadirachtine + 25 g de cyperméthrine par ha ou de 5 g d'azadirachtine + 300 g de chlorpyrifos-éthyl par ha (5 applications espacées de 14 jours). Le mélange huile de neem/chlorpyrifos-éthyl procure aussi un effet-choc contre les pucerons.

### INTRODUCTION

Les effets anti-appétant et dérégulateur de croissance, de même que l'efficacité insecticide de l'azadirachtine, composé actif principal du neem (*Azadirachta indica*), ne sont plus à démontrer même si cette matière active se révèle généralement plus intéressante en association (par exemple avec des pyréthrinoïdes) que seule. Son exploitation industrielle est aujourd'hui devenue une réalité avec l'apparition sur le marché de diverses formulations commerciales d'extraits de neem. Si la plupart des produits se présentent sous la forme de solutions émulsionnables (EC), il existe également des poudres mouillables (WP). Largement répandus en Inde, les insecticides à base d'huile de neem sont notamment utilisés par l'Indian Tobacco Company. Ainsi, KARAPUR AGRO produit une formulation EC ("NEEM SURAKSHA") titrant 0,03 % d'azadirachtine, utilisée sur le riz, l'arachide et les manguiers, et une formulation EC ("PRONEEM") titrant 0,15 % d'azadirachtine utilisée sur le coton, le thé et le café. Autorisés depuis 1985 aux USA sur des plantes ornementales, les extraits de neem y ont été agréés en 1994 sur certaines cultures alimentaires. WR GRACE commercialise le MARGOSAN O, le NEEMIX et le BIONEEM; l'ALIGN (de AGRYDINE) est autorisé depuis 1995 sur les cultures alimentaires dans l'état de New-York (ZACCOMER, 1996). Outre l'intérêt de l'azadirachtine, présente majoritairement dans les amandes, les autres produits du neem (principalement l'huile et les tourteaux) peuvent également être valorisés. Tous ces facteurs expliquent que la SENCHIM ait initié depuis trois ans un programme de recherche sur le neem, plante largement répandue au Sénégal dans le but de développer une formulation EC : (i) titrant entre 0,3 et 1% d'azadirachtine, (ii) contenant de l'huile de neem, et (iii) pouvant être utilisée avec la technique du TBV à une dose de 1 litre de formulation par hectare pour 9 litres d'eau.



## PURIFICATION ET DOSAGE DE L'AZADIRACTINE

### Introduction

L'analyse de l'azadirachtine par HPLC commencée dès 1979 par UEBEL et al. est rendue difficile pour les raisons suivantes: (1) l'amande de neem contient plusieurs composés ayant des structures proches de l'azadirachtine qui peuvent interférer avec celle-ci; (2) le spectre U.V de l'azadirachtine n'est pas spécifique. Il est donc nécessaire avant l'analyse par HPLC de procéder à une purification des extraits de neem pour isoler l'azadirachtine des autres composés et tous les auteurs s'accordent pour en souligner la difficulté car les amandes de neem ne titrent que 0,2 à 0,6% d'azadirachtine (GOVINDACHARI et al., 1990). Nous avons adopté pour nos travaux la méthode proposée par SUNDARAM et al. (1993).

### Extraction et purification de l'azadirachtine

Les amandes décortiquées, séchées et broyées sont soumises, dans un premier temps, à une extraction solide/liquide des matières solubles dans l'hexane. Dans ce cas c'est essentiellement de l'huile (40 à 50% des amandes). Cette première extraction permet d'éliminer les composés non ou peu polaires limitant l'extraction de l'azadirachtine dans les étapes qui suivent. Une seconde extraction avec un solvant alcoolique permet d'extraire l'azadirachtine et les autres composés contenus dans le marc dégraissé.

L'extrait alcoolique, contenant le principe actif, est ensuite purifié par trois extractions liquide/liquide successives à l'hexane. La phase hexane est éliminée, et l'azadirachtine contenue dans la phase alcoolique est extraite par partage avec le dichlorométhane. Après soutirage, ce dernier est évaporé et le résidu sec est repris dans l'acétate d'éthyle. La solution obtenue est ensuite éluée à travers une colonne de Florisil, pour une dernière purification; l'éluat est évaporé à sec et l'azadirachtine est reprise dans le mélange éluant utilisé dans l'analyse par HPLC.

Les essais menés avec l'azadirachtine standard purifiée montre que cette méthode permet un taux de récupération moyen de 97% à partir des extraits de neem. D'autre part nous avons pu montrer que deux passages sur la colonne permettent d'améliorer la résolution de l'analyse. Cette méthode sera utilisée non seulement pour le dosage des teneurs en composés actifs dans les amandes, puis dans les formulations préparées, mais aussi pour purifier des quantités plus importantes d'extrait qui seront formulées.

### Analyse de l'azadirachtine par HPLC

L'analyse par HPLC est réalisée sur un appareil Beckman muni d'un détecteur UV Module 166 et d'un logiciel Gold: développement isocratique avec un mélange acétonitrile super gradient et  $H_3PO_4$  (0,1 %) dans les proportions 70/30 v/v et un débit égal à 1 ml/min. Sur les trois colonnes qui ont été testées pour les analyses (colonne C18 ODS avec des particules de 5  $\mu m$ , 150 mm x 4,6 mm diamètre; colonne C18 ODS avec des particules de 3  $\mu m$ , 150 mm x 4,6 mm diamètre; colonne Nucléosil 100-7 phényl avec des particules de 7  $\mu m$ , 250 mm x 4,6 mm de diamètre), c'est la colonne C18 O.D.S (avec des particules de 3  $\mu m$ ) qui a permis d'obtenir les meilleurs résultats (pourcentage d'erreur faible et meilleure résolution). La spectrométrie de masse a permis de confirmer la présence de l'azadirachtine dans l'extrait purifié; elle met aussi en évidence l'existence de plusieurs isomères de l'azadirachtine.



## FORMULATION DES EXTRAITS DE NEEM

### Composition

Le choix de développer une formulation EC à partir des extraits végétaux purifiés répond à la maîtrise de cette technologie par la SENCHIM et à la disponibilité de ses installations industrielles. Les étapes du programme de R & D ont constitué à: (i) identifier le solvant adéquat; (ii) étudier la stabilité de l'azadirachtine dans les solvants; (iii) choisir et doser les surfactants aptes à conférer au produit une bonne émulsification; (iv) procéder à un contrôle de qualité, selon les normes usuelles en vigueur (méthodes CIPAC).

La formulation EC d'azadirachtine répond à la composition centésimale suivante:

- azadirachtine (extrait de neem): 0,6 g/litre
- d'huile de neem: 18,0 g/litre
- surfactants: 10,0 g/litre
- solvant: pour un litre

### Propriétés

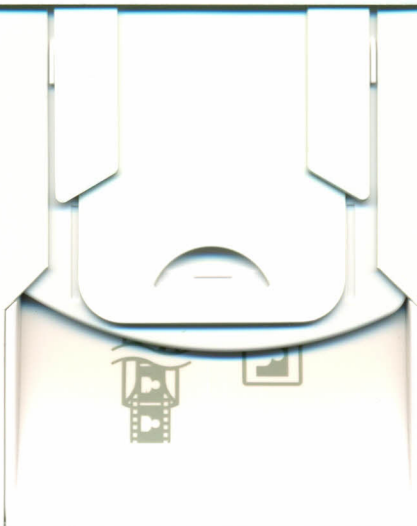
#### a) Stabilité de l'azadirachtine

Des essais de stabilité en fonction de la température ont montré que l'azadirachtine reste stable jusqu'à 60°C mais se dégrade à 80°C. Des essais de stabilité en fonction du temps et de la température de l'azadirachtine pure (standard) dans divers solvants, à la température du laboratoire (moyenne de 25°C) et à 54°C ± 2°C., montrent que la dégradation est d'autant plus importante que la température de stockage est élevée et que le temps de stockage s'accroît. Mais, il a également été démontré au laboratoire que non seulement l'addition d'huile de neem améliore la stabilité du composé actif en solution, mais aussi que la stabilité de l'azadirachtine présente dans les extraits végétaux de neem était bien meilleure (Tableau 1) que celle de l'azadirachtine standard (pure).

**Tableau 1:** Dégradation (en%) de l'azadirachtine après 14 jours en fonction du solvant et de la température (Tp.) de stockage (concentration initiale des solutions: 45 µg/ml).

Nature du solvant/mélange	Tp. 25°C.	Tp. 54°C.
Solvant A	7%	80%
Solvant B	46%	82%
Solvant C	0%	35%
Solvant C + 20% huile neem	0%	22%
Solvant C + 30% huile neem	0%	15%

Après le test de stabilité au stockage de 14 jours en étuve ventilée à 54°C ± 2°C (méthode CIPAC MT 46), la concentration en matière active mesurée dans la formulation EC est de 0,54 g/l soit une perte de 3,6% de la teneur initiale. Sur base des spécifications FAO, la stabilité de la matière active est jugée satisfaisante (à cette concentration, la tolérance est de 15% de la teneur déclarée).



## b) Emulsification

Des tests d'émulsification (selon la méthode CIPAC MT 36), avant et après stockage 14 jours à 54°C., ont été effectués sur la formulation EC. Les essais sur la qualité de l'émulsion réalisés avec 10 ml de la solution émulsionnable dans 90 ml d'eau - CIPAC A (20 ppm de CaCO<sub>3</sub>) ou CIPAC D (342 ppm de CaCO<sub>3</sub>)- visaient à déterminer la quantité d'huile libre ou le volume de crémage après 30 min, 1 h, 3 h et 24 heures sans agitation à 20°C et 30°C. ± 1°C. La dispersion de la formulation EC dans l'eau est correcte, mais l'auto-émulsification est moyenne à faible. Aucune séparation de phase n'a été observée. La remise en émulsion est aisée et complète. Très peu de mousse se forme, même en eau CIPAC A; 2 à 3 ml de mousse, non persistante, peuvent apparaître à la réémulsification (après 24 h 30 min.).

Parmi les 45 surfactants ou associations de surfactants qui ont été testés lors de la mise au point de la formulation, seuls deux surfactants non-ioniques avec des valeurs indicatives H.L.B élevées (de 14 à 17.4) ont été retenus. Sur base des spécifications FAO, l'émulsification de la formulation EC et la stabilité de l'émulsion dans l'eau peuvent être considérées comme valables, même après conservation. On notera également l'absence de mousse persistante gênante.

## c) Autres propriétés

Le pH après dispersion, la densité et la viscosité peuvent être considérés comme normaux par rapport aux formulations de même nature.

## ESSAIS D'EFFICACITE REALISES AVEC LES FORMULATIONS D'EXTRAITS DE NEEM

Les essais ont été conduits au Sénégal à la Station d'Expérimentation de l'ISRA à Sinthiou-Malème (Tambacounda) en culture cotonnière en associant l'azadirachtine à différents doses soit de cyperméthrine, soit de chlorpyrifos-éthyl. L'effet sur l'efficacité de la cyperméthrine et du chlorpyrifos-éthyl de l'addition d'huile de neem dans la bouillie a également été étudié.

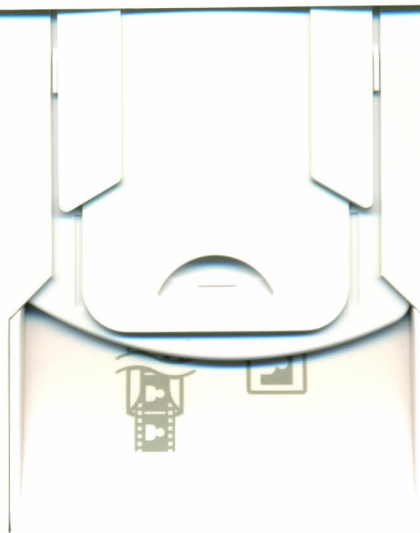
## Matériel et méthode

### a) Les essais

Les précipitations ont débuté en juin pour s'arrêter en octobre, soit un total annuel de 777,5 mm pour 44 jours de pluie. Les semis sont réalisés le 10 juillet 1996. Les cotons de la variété STAM 42 sont cultivés en lignes de 5 m avec un écartement de 0,80 x 0,20 m. La fumure comprend: l'engrais NPKSB (14.23.14.4.1) appliqué à la dose de 200 kg/ha au 10e jour après la levée, et l'urée à la dose de 50 kg/ha apportée au 35e jour après la levée. Dans ce dispositif expérimental en blocs de Fisher; les parcelles élémentaires sont de 5 lignes de 5 m dont 3 sont traitées. Chaque objet est répété 3 fois.

### b) Les objets

Dans cette série d'essais, en plus des témoins non traités, la formulation EC d'azadirachtine (à 3 g m.a./l) est associée à différentes doses de cyperméthrine (CYPERAX 50 EC) ou de chlorpyrifos-éthyl (PYRIFOS 480 EC, 480 g m.a./l) et l'efficacité obtenue est comparée à celle de l'association cyperméthrine/méthamidophos (CYPERFOS 36/300 EC soit respectivement 36 + 300 g m.a./l). L'huile de neem, seule ou en mélange avec la cyperméthrine ou le chlorpyrifos-éthyl, a également été intégrée dans le plan expérimental. Dans 3 essais, des doses de 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 g d'azadirachtine/ha sont associées à 25,



30 ou 36 g de cyperméthrine/ha. Dans 4 essais, des doses de 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 g d'azadirachtine/ha sont associées à 75, 125, 150, 300 et 400 g de chlorpyrifos-éthyl/ha. Dans deux autres essais, l'efficacité de la cyperméthrine à 36 g/ha, sans et avec l'huile de neem, et du chlorpyrifos-éthyl à 400 g/ha, sans et avec l'huile de neem est comparée. Le programme de traitement comprenait 5 applications espacées de 14 jours entre 29 août et 24 octobre 1996. L'appareil de traitement utilisé était le « MICRON-ULVA+ » à buse noire, à raison d'un passage toutes les 3 lignes.

### c) Les observations

L'efficacité de la protection du coton a été recherchée essentiellement à l'égard de *Helicoverpa armigera* (ravageur le plus important dans les essais), *Aphis gossypii*, *Bemisia tabaci*, *Syllepte derogata*, *Spodoptera littoralis*, etc.. L'infestation par *Aphis gossypii* est demeurée moyenne; celle de *Bemisia tabaci* est remarquée tradivement début octobre. *Anomis flava* est observé précocement et la pression de *Syllepte derogata* et *Spodoptera littoralis* a été très faible. Les observations portent sur:

- les chenilles (are): observations de 10 cotonniers sur 2 lignes centrales une fois par semaine,
  - *Syllepte*: % plants infestés sur 2 lignes centrales une fois par semaine;
  - *Spodoptera*: chenilles (are) sur 2 lignes centrales une fois par semaine;
- les acariens: % plants acariables sur 10 cotonniers de la ligne centrale
- les piqueurs-suceurs:
  - pucerons (*Aphis gossypii*): % feuilles infestées (5 feuilles subterminales de 20 plants sur 2 lignes centrales 2 fois par semaine. On distingue effet choc (EC) et effet global (EG).
  - *Bemisia tabaci* (cumul de larves /9 cm<sup>2</sup>): comptage de 10 feuilles sur 10 plants sur 2 lignes centrales 2 fois par semaine par parcelle élémentaire à l'aide d'une loupe (taille de 9 cm<sup>2</sup>).

Outre l'efficacité, les observations ont porté sur: la floraison avec deux comptages par semaine sur 2 lignes centrales par parcelle élémentaire; l'abscission des organes fructifères (shedding): 2 fois par semaine sur 2 lignes centrales par parcelle élémentaire (% BFS: bouton floraux sains; % BFT: boutons floraux troués; % CVS: capsules vertes et saines; % CVT: capsules vertes et trouées) et sur la récolte (en kg/ha) effectuée sur les 3 lignes centrales de chaque parcelle élémentaire. L'analyse sanitaire à la maturité (ASM) est réalisée à la veille de la récolte sur 3 lignes centrales (avec %CMS: capsules saines à la maturité et % CMT: capsules trouées à la maturité).

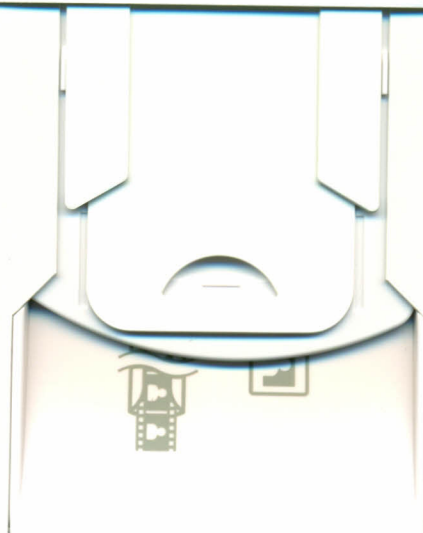
### Résultats

Les moyennes des observations figurent dans les tableaux. La classification est effectuée selon la méthode NEWMANN-KEULS.

Dans les essais « associations azadirachtine + cyperméthrine », les objets non traités présentent moins de fleurs que les objets traités.

L'azadirachtine employée à 11 g m.a./ha se révèle moins efficace vis-à-vis de *Helicoverpa armigera* que les associations ainsi qu'en témoigne les pourcentages de capsules vertes saines et capsules vertes trouées notés dans les essais. En ce qui concerne le pourcentage de capsules saines à maturité, l'azadirachtine employée à 11 g m.a./ha est meilleure que le témoin non traité mais le résultat reste faible par rapport aux associations.

À la récolte, l'azadirachtine employée à 11 g m.a./ha procure néanmoins un gain de plus de 500 kg/ha par rapport au témoin non traité, mais les résultats sont encore supérieurs pour les associations.



**Tableau 2** - Effet des associations azadirachtine + cyperméthrine (CYP: 25, 30 ou 36 g/ha) sur la floraison, sur le nombre de chenilles d'*H.armigera* et sur le % de capsules saines.

	Fleurs / are			H.armigera / 10 plants			% Capsules saines		
Témoin	14133,3 a	17033,3	15866,7	6,7 b	6,7 b	3,7	80,4 ab	69,0a	71,4 a
Azadir. 11 g	18933,3 ab	15833,3	17433,3	6,7 b	8,7 b	6,7	74,3 a	78,3 ab	74,8 a
Cyperméthrine 36	24633,3 c	20900,0	18300,0	3,3 a	3,0 a	3,0	90,6 b	92,3 b	85,9 b
Cyperfos 36-300	24666,6 c	23566,7	16166,7	0,7 a	1,3 a	0,7	90,3b	90,0 b	89,7 b
avec CYP:	25 g	30 g	36 g	25 g	30 g	36 g	25 g	30 g	36 g
Azadir. 10 g	20733,3 bc	19333,3	20966,7	5,0 b	1,7 a	4,3	79,7 ab	86,1 b	86,9 b
Azadir. 9 g	21400,0 bc	20666,7	19066,7	6,7 b	4,0 a	4,0	81,7 b	86,6 b	86,9 b
Azadir. 8 g	24433,4 c	20766,7	16166,7	3,3 a	1,0a	2,0	82,2 ab	83,1 b	84,3 b
Azadir. 7 g	23500,0 bc	21266,7	19500,0	3,3 a	3,0a	2,0	84,6 ab	86,5 b	82,4 b
Azadir. 6 g	18633,3 ab	17266,7	16900,0	1,7 a	2,7 a	3,7	81,7ab	81,9 b	82,5 b
Azadir. 5 g	22133,3 bc	22766,7	22106,7	4,3 a	2,0 a	2,0	87,4 b	86,5 b	80,4 b
Ft	2,71	0,49	1,20	3,72	3,74	1,55	4,35	3,83	2,56
CV %	16,6	30,1	17,6	45,0	64,9	71,6	5,0	6,9	7,5

**Tableau 3** - Effet des associations azadirachtine + cyperméthrine (CYP: 25, 30 ou 36 g/ha) sur le % de capsules saines à maturité et sur la récolte (en kg de coton/ha).

Objets	% capsules saines à maturité			Récolte (kg/ha)		
Témoin	71,8 a	72,6 a	68,5a	729,2 a	895,8 a	875,0a
Azadir. 11 g	81,2 ab	88,5 b	91,7b	1312,5 b	1500,0 b	1270,8 ab
Cyperméthrine 36	95,3 c	96,6 b	94,3b	2895,8 c	2500,0 bc	1812,5 bc
Cyperfos 36-300	98,1 c	98,2 b	97,6b	3395,8 d	3041,7 c	1833,3 bc
avec CYP:	25 g	30 g	36 g	25 g	30 g	36 g
Azadir. 10 g	90,6 bc	96,3 b	92,1b	2083,3 c	2229,2 bc	2250,0 c
Azadir. 9 g	93,8 c	98,1 b	96,8b	2641,7 c	2675,0 bc	1770,8 bc
Azadir. 8 g	95,9 c	92,7 b	90,8b	2770,8 c	1979,2 bc	1666,6 bc
Azadir. 7 g	91,3 bc	95,7 b	96,1b	2562,5 c	2270,8 bc	2145,8 c
Azadir. 6 g	90,7 bc	93,0 b	93,8b	1916,7 c	1895,8 bc	1541,7 c
Azadir. 5 g	93,7 c	94,0 b	94,3b	2354,2 c	2395,8 bc	2041,7 c
Ft	8,48	13,97	9,78	6,63	2,85	2,21
CV %	5,2 %	3,8	5,1	23,4	36,1	28,0

Dans les essais « associations azadirachtine + chorpyriphos-éthyl », les populations de chenilles phyllophages et d'acariens sont demeuré faibles, ne permettant pas de dégager des différences.

Pour *Aphis gossypii*, en cas de pression forte, l'azadirachtine à 11 g est moins efficace par rapport aux autres objets traités mais garde un effet choc intéressant. Pour *Bemisia tabaci*, le CYPERFOS 36/300 g m.a./ha assure le meilleur contrôle et l'azadirachtine à 11 g m.a./ha se montre équivalent aux associations. La meilleure protection des capsules mûres est obtenu avec CYPERFOS 36/300 g m.a./ha.

A la récolte, le CYPERFOS 36/300 g m.a./ha assure un bon rendement. L'azadirachtine à 11 g m.a./ha et les associations sont équivalentes et supérieures au témoin non traité.



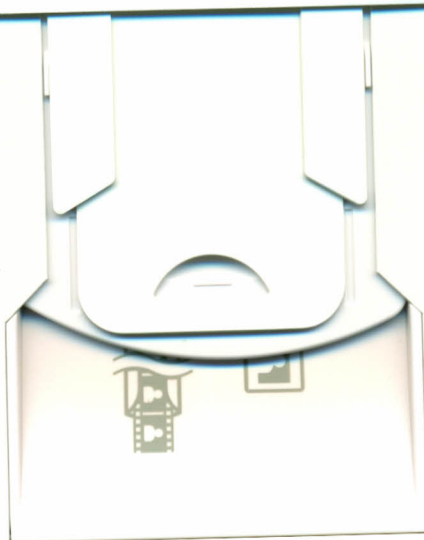
**Tableau 4** - Effet des associations azadirachtine + chlorpyrifos-éthyl (CPE: 300 ou 400g/ha) sur les pucerons (EC: effet choc; EG: effet global) et sur *Bemisia*.

Objets (g/ha)	Effets sur les pucerons				Bemisia/9cm <sup>2</sup>	
	E C		E G			
Témoin non traité	31,7 b	11,7 b	25,1 b	10,3 c	26,2 c	19,9 c
Azadir. 11 g	18,3 b	1,3 a	9,4 a	4,1 b	8,5 b	7,9 b
Clorpyrifos 400g	1,0 a	0,3 a	4,4 a	1,9 a	6,0 b	3,5 b
Cyperfos 36-300	5,0 a	0,0 a	2,5 a	0,8 a	1,6 a	1,1 a
avec CPE:	300 g	400 g	300 g	400 g	300 g	400 g
Azadir. 10 g	2,3 a	0,0 a	5,3 a	2,2 a	9,2 b	6,0 b
Azadir. 9 g	7,3 a	1,7 a	3,7 a	1,7 a	4,7 b	5,6 b
Azadir. 8 g	2,7 a	0,3 a	4,3 a	2,5 a	8,5 b	3,8 b
Azadir. 7 g	7,0 a	0,7 a	5,8 a	1,8 a	8,3 b	4,4 b
Azadir. 6 g	2,3 a	0,0 a	5,1 a	1,8 a	5,6 b	3,9 b
Azadir. 5 g	8,3 a	0,0 a	6,9 a	2,3 a	7,7 b	4,0 b
Ft	2,75	2,36	16,19	27,48	15,66	10,74
CV %	60,0	50,2	39,0	30,4	33,5	45,6

**Tableau 5** - Effet des associations azadirachtine + chlorpyrifos-éthyl (CPE: 75 à 400g/ha) sur les capsules à maturité et sur la récolte (en kg de coton/ha).

Objets (g/ha)	% capsules saines					Récolte (kg/ha)				
	75 g	125 g	150 g	300 g	400 g	75 g	125 g	150 g	300 g	400 g
Témoin non traité	67,1 c	77,8	56,0 c	68,6 c	76,0 b	824 c	875	618 c	750 c	667 c
Azadir. 11 g	71,3 c	81,6	67,3 c	76,8 bc	80,1 ab	1181 b	979	835 c	967 bc	967 bc
Clorpyrifos 400g	84,4 a	81,2	71,9 bc	82,9 a	84,4 ab	1418 a	1434	1218 b	1255 b	1402 b
Cyperfos 36-300	89,1 a	87,1	95,3 a	95,9 a	94,2 a	1548 a	1917	2875 a	2125 a	2275 a
avec CPE:	75 g	125 g	150 g	300 g	400 g	75 g	125 g	150 g	300 g	400 g
Azadir. 10 g	73,9 c	83,9	79,4 bc	81,4 b	74,8 b	1148 b	1333	1230 b	1118 b	1036 b
Azadir. 9 g	80,8 ab	82,6	85,9 ab	88,1 b	79,2 b	1269 b	1388	1318 b	1174 b	1227 b
Azadir. 8 g	73,7 c	75,4	78,6 bc	82,1 b	85,4 ab	1185 b	1208	1604 b	1017 b	1358 b
Azadir. 7 g	77,7 ab	79,4	70,5 bc	80,7 b	82,4 ab	1037 b	1379	1262 b	1123 b	1229 b
Azadir. 6 g	85,0 a	83,3	79,5 bc	83,7 b	81,2 ab	1000 b	1646	1218 b	1290 b	1196 b
Azadir. 5 g	78,8 ab	79,1	80,7 ab	80,8 b	76,5 b	875 c	1333	1292 b	1192 b	1106 b
Ft	2,31	0,81	4,34	5,87	2,69	2,76	0,89	6,96	5,71	4,72
CV %	10,0	7,2	11,6	6,0	9,2	24,5	41,1	29,3	21,8	25,9

Un effet choc marqué sur *Aphis gossypii* apparaît avec le chlorpyrifos-éthyl associé avec l'huile de Neem. L'ajout d'huile de neem apporte un gain de rendement de 275 kg/ha par rapport au chlorpyrifos seul à 400 g m.a./ha.



**Tableau 6** - Effet de l'addition d'huile de neem en tank mix avec la cyperméthrine à 36 g/ha sur la floraison, le nombre de chenilles d'*H. armigera*, le shedding et la récolte (en kg/ha).

Objets (g/ha)	Nbre fleurs (are)	Chenilles (are)	SHEDDING				A S M		RECOLTE (kg/ha)
			% BFS	% BFT	% CVS	% CVT	% CMS	% CMT	
Cyperméthrine 36	23790,0	56,9	46,3	53,7	84,0	5,9	95,5	4,5	2600,0
Cyperméthrine 36 + huile de neem	22310,0	61,3	50,8	49,2	83,9	6,1	95,6	4,4	2437,8
Ft	1,03	0,45	2,43	2,42	0,01	0,01	0,01	0,0	8,88
CV %	14,2	24,8	13,3	12,6	4,0	21,0	1,9	41,7	15,7

avec: BFS: bouton floral sain; BFT: bouton floral troué; CVS: capsule verte saine et CVT: capsule verte trouée.

**Tableau 7** - Effet de l'addition d'huile de neem en tank mix avec chlorpyriphos-éthyl à 400 g m.a./ha sur la floraison, le nombre de chenilles d'*H. armigera*, le shedding et la récolte (en kg/ha).

Objets (g/ha)	Feuilles pucerons (%)		Bemisia (nbre /9 cm <sup>2</sup> )	A S M		Récolte (kg/ha)
	EC	EG		% CMS	% CMT	
Chlorpyriphos 400	3,0 b	4,5	9,5	80,2	19,8	918,8 a
Chlorpyriphos 400 +huile de neem	0,7 a	3,8	6,7	83,6	16,4	1193,8 b
Ft	4,2	1,0	1,95	1,21	1,21	4,35
CV %	108,0	34,0	55,5	8,2	37,2	27,9

## CONCLUSIONS

Une méthode de dosage de l'azadirachtine par HPLC a été mise au point. La spectrométrie de masse a permis de confirmer la présence de l'azadirachtine dans les extraits purifiés, libres d'interférences pouvant gêner la détection du composé. L'analyse HPLC est réalisée sur colonne C18 ODS. Cette opération d'extraction et de purification permet d'atteindre un taux moyen de récupération de 97%.

Le produit développé avec la SENCHIM se présente donc sous forme d'une solution émulsionnable (EC) titrant 0,6% d'azadirachtine, 18% d'huile de neem et 10% de surfactants non-ioniques. Le choix du solvant de formulation était crucial pour satisfaire au test de stabilité, la dégradation de l'azadirachtine pouvant être très rapide et très importante. L'addition d'une certaine proportion d'huile de neem - outre l'avantage qu'elle présenterait du point de vue de l'efficacité - est favorable à la stabilisation du composé en solution. De même, une grande attention a été accordée à la sélection de surfactants capables d'émulsionner la solution dans des eaux douces (CIPAC A) ou dures (CIPAC D), sans séparation de phase ni crémage excessif même après 24 heures sans agitation.

D'une série d'essais avec cette formulation, il apparaît que si les résultats confirment qu'utilisée seule et à 11 g/ha, la formulation EC d'azadirachtine est insuffisante pour contrôler totalement *H. armigera* et *A. gossypii*, par contre des doses de 5 g d'azadirachtine + 25 g de cyperméthrine par hectare ou de 5 g d'azadirachtine + 300 g de chlorpyriphos-éthyl par hectare ont été jugées les plus intéressantes quant à l'efficacité vis-à-vis de ces deux ravageurs; l'association azadirachtine /cyperméthrine a procuré des rendements plus élevés que le mélange azadirachtine /chlorpyriphos-éthyl. Malgré une performance jugée moins élevée sur base des dénombrements de ravageurs dans les parcelles, le traitement avec l'azadirachtine à 11 g/ha a toutefois procuré des rendements supérieurs ou égaux à une tonne/ha dans tous les essais: ceci





est probablement l'indication d'un effet anti-appétant plutôt que réellement insecticide. Par ailleurs, un effet-choc marqué à l'égard de *A. gossypii* apparaît dans les parcelles traitées avec le mélange huile de neem/chlorpyriphos-éthyl.

L'association de l'azadirachtine à un pyréthrianoïde ou un organo-phosphoré apparaît donc comme une solution intéressante car elle offre non seulement la possibilité de réduire les doses d'insecticide à l'hectare sans perdre l'efficacité, mais aussi elle représente une alternative et un complément aux traitements insecticides habituels. Cette formulation EC d'azadirachtine développée avec la SENCHIM s'inscrit donc bien dans les objectifs actuellement recherchés en culture cotonnière: diminution des doses/ha, gestion intégrée des ravageurs et gestion de la résistance des insectes aux molécules les plus employées.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ZACCOMER, B., 1996 - Margousier Indien: Mythe et réalité. Biofutur 153, Février 1996: 31-33.  
UEBEL, E.C., WARTHEN, J.D. & JACOBSON, J., 1979. - Preparative reversed phase liquid chromatographic isolation of azadirachtin from neem kernels. J. Liq. chromat. 2 : 875-882.  
GOVINDACHARI *et al.*, 1990. - Simple method for isolation of azadirachtin by preparative high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography, 513: 389-391.  
SUNDARAM *et al.*, 1993. - High performance liquid chromatographic method for the analysis of azadirachtin in two commercial formulations and neem oil. J. Environ. Sci. Health, Part B, B28 (2): 221-241

Adresse utile pour la correspondance:

SENCHEM  
Route de Rufisque Km 13  
BP 3148  
DAKAR, Sénégal.

## SUMMARY

### HPLC ANALYSIS OF AZADIRACHTIN AND FORMULATION OF NEEM SEED EXTRACTS

An analytical method for the dosage of azadirachtin has been developed. Neem oil is removed from seeds with hexane, and azadirachtin is extracted from the neem seeds with methanol. The extracts are first purified with a liquid/liquid partition, followed by a chromatographic separation on a Florisil column. HPLC analysis requires a C18 ODS phase. The efficacy of the method is about 97%. Extracts from neem seeds (*Azadirachta indica*) have been formulated as a emulsifiable concentrate (EC). This formulation contains 0.3-1% azadirachtin, 18% neem oil, and will be used as an insecticide on cotton at 1 l EC/ha mixed with 9 l of water (very low volume spraying technique). The nature of the solvent appeared to be crucial for the stability of azadirachtin (according to CIPAC MT 46) and neem oil can improve the stability of the compound. Surfactants have been selected (emulsification tests according to CIPAC MT 36) to give a good emulsion in soft (CIPAC A) and hard (CIPAC D) waters, after 24 hours without agitation. Field results from Senegal confirm that azadirachtin used alone at 11 g a.i./ha (EC) cannot control completely *H. armigera* and *A. gossypii*, but demonstrate that these can be controlled by mixtures of 5 g azadirachtin + 25 g cypermethrin per ha or 5 g azadirachtin + 300 g chlorpyriphos-ethyl per ha (5 sprays each 14 days). The mixture of neem oil and chlorpyriphos-ethyl has shown a knock-down effect.

