

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

ZEKRI Leila

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : **Chimie des substances naturelles**

Titre

**Contribution à l'étude chimique des huiles essentielles de *Menthe*,
d'*Eucalyptus* et de *Thym***

**Dosage du menthol dans la *Menthe* et d'eucalyptol dans
l'*Eucalyptus* par spectrométrie IRTF.**

Soutenu le 26/09/2011, devant le jury composé de :

O. MOHAMMEDI	Pr.	Université de Blida	Président
Y. DAGHBOUCHE	Pr.	Université de Blida	Examineur
B. KADRI	MCB.	Université de Blida	Examineur
N. BOUZIDI	MCB.	Université de Blida	Rapporteur



RESUME

Le présent travail porte sur l'étude chimique des huiles essentielles de menthe, eucalyptus et thym. Il contribue au développement des applications analytiques de la spectrométrie IRTF en offrant un outil d'analyse complémentaire, simple, rapide et disponible.

La première partie porte sur l'étude des huiles essentielles (HE) de la menthe, l'eucalyptus et le thym obtenues par hydrodistillation ou entraînement à la vapeur d'eau, avec des rendements de 0.93%, 0.21% et 3.07%, respectivement. L'identification des composés des huiles essentielles est réalisée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), en se basant sur les banques de données spectrales wiley7n et NBS 75k.

La deuxième partie consiste à doser quantitativement par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), le menthol, eucalyptol et thymol dans la menthe, l'eucalyptus et le thym, respectivement. Le taux des monoterpènes dans les échantillons a été calculé, en extrapolant les valeurs d'absorbance des huiles essentielles dans les droites d'étalonnage correspondantes.

Le taux de menthol dans la menthe obtenu en considérant le volet gauche à 1049 cm^{-1} corrigé avec une ligne de base comprise $947\text{-}1179\text{ cm}^{-1}$ de la bande direct à 1043 cm^{-1} est de 2.7%. Cette bande a été choisie en utilisant la calibration par addition standard. L'utilisation du spectre dérivé, en considérant le volet gauche à 1173 cm^{-1} de la bande direct à 1168 cm^{-1} a permis de donner une teneur de 6.5% d'eucalyptol dans l'HE d'eucalyptus.

La complexité du spectre de l'HE de thym rend la détermination du thymol dans le thym impossible. Un traitement préalable est indispensable.

Mots clés: menthe, eucalyptus, menthol, eucalyptol monoterpènes, CG-SM, spectrométrie IRTF, spectre dérivé, calibration par addition standard.

ABSTRACT

This work focuses on the chemical study of essential oils of peppermint, eucalyptus and thyme. It contributes to the development of analytical applications of FTIR spectrometry by providing a tool for further analysis, simple, fast and available.

The first part concerns the study of essential oils of peppermint, eucalyptus and thyme obtained by hydrodistillation or steam distillation of water, with yields of 0.93%, 0.21% and 3.07%, respectively. The identification of compounds of essential oils (EO) is achieved by the coupling of gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS), based on spectral databases wiley7n and NBS 75k.

The second part is to analyse quantitatively the menthol, eucalyptol and thymol in mint, eucalyptus and thyme by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The rate of monoterpene in the samples was calculated by extrapolating the absorbance values of essential oils in the corresponding calibration straight lines. The rate of menthol in mint obtained by considering the left peak at 1049 cm^{-1} corrected with a baseline range $947\text{-}1179\text{ cm}^{-1}$ of the live band at 1043 cm^{-1} is about 2.7%. This band was chosen by using the calibration by adding a standard. The spectrum derived using the left peak at 1173 cm^{-1} of the live band at 1168 cm^{-1} has given a grade of 6.5% of eucalyptol in EO of eucalyptus. The complexity of the spectrum of thyme essential oil makes the determination of thymol in thyme impossible, a pre-treatment is required.

Keywords: peppermint, eucalyptus, menthol, eucalyptol monoterpenes, GC-MS, FTIR, spectrum derived, standard addition calibration

ملخص

هذا العمل يركز على الدراسة الكيميائية للزيوت الأساسية للنعناع، الكافور و الزعتر. وهو يساهم في تطوير التطبيقات التحليلية للمطيافية تحت الحمراء بتحويل فوريي من خلال توفير أداة تكميلية، بسيطة، سريعة ومتوفرة.

الجزء الأول يتعلق بدراسة الزيوت الأساسية للنعناع، الكافور و الزعتر المحصل عليها عن طريق تقطير الماء أو تمرير بخار الماء، مع مردود 0.93%، 0.21% و 3.07% على التوالي. لمعرفة مكونات هذه الزيوت استعملنا الكروماتوغرافيا الغازية مع مطيافية الكتلة، مرتكزين على البيانات الطيفية وإيلي 7 ن و ن ب س 75 ك.

الجزء الثاني يخص المعايرة الكمية للمنتول، الكليتول و الثيمول في النعناع، الكافور و الزعتر، على الترتيب باستخدام المطيافية تحت الحمراء بتحويل فوريي. حساب نسبة أحادي تربين في العينات تم بإسقاط قيم الامتصاص للزيوت الأساسية على منحنى المعايرة المخصص لها.

نسبة المنتول في النعناع باعتماد الجزء اليساري للطيف المشتق عند 1049 سم⁻¹ مع قاعدة مصححة بين 947 و 1179 سم⁻¹ للموجة 1043 سم⁻¹ للطيف العادي هي 2.7%. وقد تم اختيار هذه الموجة باستعمال المعايرة بإضافة معيار.

استعمال الطيف المشتق في الجزء اليساري عند 1173 سم⁻¹ للطيف العادي عند 1168 سم⁻¹ أعطى نسبة 6.5% للاكلبتول في الكافور.

تعقد طيف الزيت الأساسي للزعتر جعل تحديد نسبة الثيمول فيه مستحيلة دون اللجوء لمعالجة الأولية.

الكلمات المفتاحية: النعناع، الكافور، المنتول، الكليتول، أحادي تربين، الكروماتوغرافيا الغازية مع مطيافية الكتلة، مطيافية تحت الحمراء بتحويل فوريي، الطيف المشتق، المعايرة بزيادة معيار.

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie des produits naturels de l'Université SAAD DAHLAB de Blida, sous la direction de Mr M. EL HATTAB. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et ma gratitude tout particulièrement pour ses efforts, son soutien et ses encouragements. Je le remercie vivement de m'avoir accueilli dans son groupe. Je remercie sincèrement Mme N. BOUZIDI qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail. Sa patience, sa gentillesse, sa disponibilité et pour la chaleur humaine qu'elle apporte.

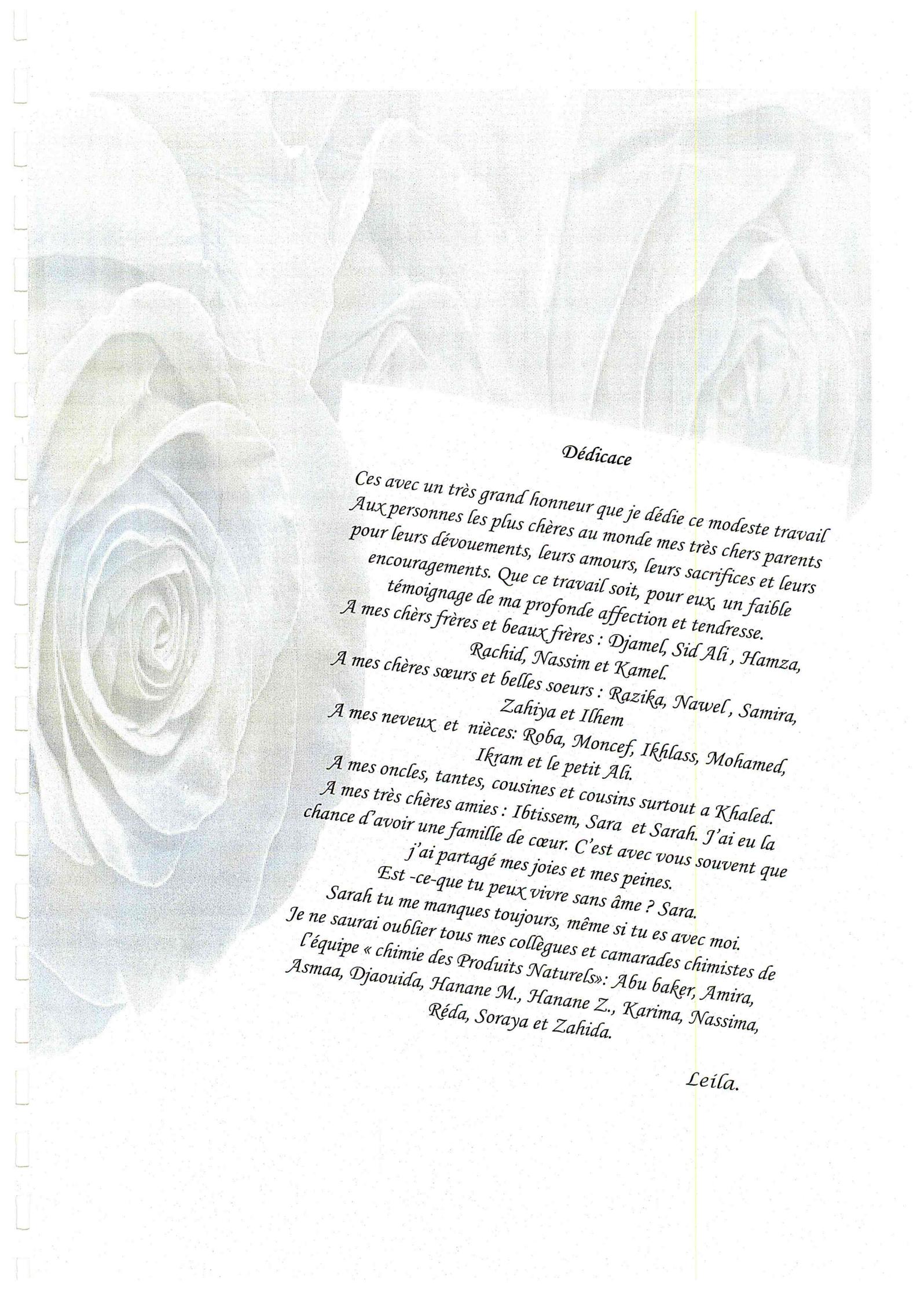
Je tiens à remercier Mme O. MOHAMMEDI pour le grand honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury.

Un immense merci à, Mme Y. DAGHBOUCHE pour ses conseils et ses commentaires mais aussi sa bienveillance et son humour auront été fort utile. Je tiens à la remercier aussi d'avoir accepté de juger ce travail.

Mr B. KADRI pour votre participation au jury de ce mémoire, veuillez accepter mes vifs remerciements.

J'aimerais encore remercier mes proches. Merci à mes parents sans qui tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et de m'avoir soutenu et supporté tout au long de ces années. Merci aussi à mes frères DJAMEL et SIDALI pour leur présence chaleureuse et leurs encouragements. Je n'oublie pas non plus le reste de la famille, merci pour votre patience, votre soutien et votre affection. Merci KHALED, pour avoir partagé tous ces moments avec moi, pour m'avoir réconforté mais aussi pour ton soutien de tous les instants.

J'exprime ma reconnaissance à tous les enseignants qui m'ont enseigné et à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de ce mémoire.



Dédicace

*Ces avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail
Aux personnes les plus chères au monde mes très chers parents
pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs
encouragements. Que ce travail soit, pour eux, un faible
témoignage de ma profonde affection et tendresse.*

*A mes chers frères et beaux frères : Djamel, Sid Ali, Hamza,
Rachid, Nassim et Kamel.*

*A mes chères sœurs et belles soeurs : Razika, Nawel, Samira,
Zahiya et Ilhem*

*A mes neveux et nièces: Roba, Moncef, Ikhllass, Mohamed,
Ikram et le petit Ali.*

A mes oncles, tantes, cousines et cousins surtout a Khaled.

*A mes très chères amies : Ibtissem, Sara et Sarah. J'ai eu la
chance d'avoir une famille de cœur. C'est avec vous souvent que
j'ai partagé mes joies et mes peines.*

Est -ce-que tu peux vivre sans âme ? Sara.

Sarah tu me manques toujours, même si tu es avec moi.

*Je ne saurai oublier tous mes collègues et camarades chimistes de
l'équipe « chimie des Produits Naturels»: Abu baker, Amira,*

*Asmaa, Djaouida, Hanane M., Hanane Z., Karima, Nassima,
Réda, Soraya et Zahida.*

Leïla.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	3
I.1 Introduction	4
I.2 Métabolites secondaires	5
I.2.1 Terpènes	6
I.2.1.1 Menthol	10
I.2.1.2 Eucalyptol	10
I.2.1.3 Thymol	11
I.3 Plantes étudiées	11
I.3.1 Menthe (Naanaa)	11
I.3.2 Eucalyptus	12
I.3.3 Thym (Zaatar)	13
I.4 Méthodes d'extraction	13
I.4.1 Hydrodistillation	14
I.4.2 Entraînement à la vapeur d'eau	14
I.5 Techniques d'analyse	14
I.5.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	15
I.5.2 Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CG-SM)	16
I.5.3 La spectrométrie infrarouge	16
Chapitre II : Extraction et analyse des huiles essentielles par CG-SM	19
II.1 Introduction	20
II.2 Procédure générale d'obtention des huiles essentielles	20
II.2.1 Récolte des espèces étudiées	20
II.2.2 Obtention des huiles essentielles	20
II.2.2.1 Extraction et récupération de l'huile essentielle de la menthe	20
II.2.2.2 Extraction et récupération de l'huile essentielle d'eucalyptus	22
II.2.2.3 Extraction et récupération de l'huile essentielle de thym	23
II.2.3 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)	23
II.2.4 Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse	23

couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)	
II.2.4.1 Description de l'appareil	23
II.2.4.2 Conditions opératoires	24
II.3 Résultats et discussion	24
II.3.1 Rendement en huile essentielle	24
II.3.2 Analyse des huiles essentielles par CCM	26
II.3.3 Identification des produits des huiles essentielles par CG-SM	26
II.3.3.1 Identification des produits de l'HE de menthe	26
II.3.3.2 Identification des produits de l'HE d'eucalyptus	31
II.3.3.3 Identification des produits de l'HE de thym	38
Chapitre III: Dosage des monoterpènes dans différentes huiles essentielles par IRTF	44
III.1 Introduction	45
III.2 Partie expérimentale	45
III.2.1 Appareillage et réactifs	45
III.2.2 Procédure générale	46
III.2.2.1 Préparation des échantillons	46
III.2.2.2 Dosage des monoterpènes dans les plantes aromatiques par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	46
III.2.2.3 Détermination des monoterpènes dans l'huile essentielle de plantes par spectrométrie IRTF	47
III.3 Résultats et discussions	47
III.3.1 Spectre de menthol	47
III.3.2 Analyse de menthol dans l'HE de la menthe par spectrométrie IRTF	51
III.3.3 Détermination du menthol dans la menthe par spectrométrie IRTF en utilisant le spectre dérivé	53
III.3.4 Spectre IRTF de 1,8 cinéole	57
III.3.5 Analyse d'eucalyptol dans l'HE d'eucalyptus par spectrométrie IRTF	60
III.3.6 : Spectre IRTF de thymol	63
III.3.7 Spectres IRTF de thymol et de l'HE de thym	65
CONCLUSION GENERALE	66
REFERENCES	68

Liste des tableaux

Tableau I.1	Propriétés physico-chimiques de thymol, menthol et cinéole	9
Tableau II.1	Rendement en huiles des trois plantes aromatiques	25
Tableau II.2	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>menthe</i>	28
Tableau II.3	Classes de produits terpéniques dans l'huile essentielle de <i>menthe</i>	29
Tableau II.4	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>eucalyptus</i>	33
Tableau II.5	Le taux des différentes classes de produits dans l'huile essentielle d' <i>eucalyptus</i>	35
Tableau II.6	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>thym</i>	40
Tableau II.7	Classes de produits terpéniques dans l'huile essentielle de <i>Thym</i>	41
Tableau III.1	Caractéristiques analytiques du menthol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé par l'amylène	50
Tableau III.2	Teneurs du menthol dans la menthe en utilisant la calibration par addition standard	53
Tableau III.3	Caractéristiques analytiques du menthol dans CH ₂ Cl ₂ en considérant les spectres dérivés	54
Tableau III.4	Taux du menthol dans la menthe en utilisant la spectrométrie IRTF dérivée	55
Tableau III.5	Caractéristiques analytiques de menthol à 1047 cm ⁻¹	56
Tableau III.6	Caractéristiques analytiques d'eucalyptol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé par l'amylène	59
Tableau III.7	Caractéristiques analytiques d'eucalyptol à 1168 cm ⁻¹ , en considérant le spectre dérivé	61
Tableau III.8	Teneur en 1.8 cinéole dans l'HE d'eucalyptus	62
Tableau III.9	Caractéristiques analytiques de thymol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé par l'amylène	64

Liste des figures

Figure I.1	Classement des monoterpènes	8
Figure I.2	Quelques structures de monoterpènes et leurs sources	9
Figure I.3	Menthol	10
Figure I.4	Eucalyptol	10
Figure I.5	Thymol	11
Figure II.1	Menthe des jardins	21
Figure II.2	Montage d'hydrodistillation	21
Figure II.3	Séparation et séchage de la phase organique	22
Figure II.4	Elimination du solvant de l'huile essentielle	22
Figure II.5	Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)	24
Figure II.6	Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de <i>menthe</i>	27
Figure II.7	Représentation de la composition chimique de l'huile essentielle de menthe	30
Figure II.8	Spectre de masse de carvone $C_{10}H_{14}O$	30
Figure II.9	Spectre de masse de dihydrocarveol $C_{10}H_{18}O$	31
Figure II.10	Spectre de masse de cinéole $C_{10}H_{18}O$	31
Figure II.11	Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle d' <i>eucalyptus</i>	32
Figure II.12	Représentation de la composition chimique de l'huile essentielle d' <i>eucalyptus</i>	36
Figure II.13	Spectre de masse de spathulenol $C_{15}H_{24}O$	37
Figure II.14	Spectre de masse de phytol $C_{20}H_{40}O$	37
Figure II.15	Spectre de masse de sabinène $C_{10}H_{16}$	38
Figure II.16	Spectre de masse de p-cimène $C_{10}H_{14}$	38
Figure II.17	Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de <i>Thym</i>	39
Figure II.18	Représentation de la composition chimique de l'huile essentielle de thym	42
Figure II.19	Spectre de masse de carvacrol $C_{10}H_{14}O$	43

Figure III.1	Montage IRTF utilisé pour la détermination	46
Figure III.2	Spectre d'absorbance IRTF de menthol (5 mg.ml ⁻¹)	48
Figure III.3	Spectres d'absorbance du menthol préparé dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre 0.75-10mg.ml ⁻¹	49
Figure III.4	Spectres IRTF de menthol a), HE de menthe sèche b), HE de menthe fraîche c)	51
Figure III.5	Spectres IRTF d'HE de menthe a), de menthe enrichie b) et de menthol c)	52
Figure III.6	Spectres dérivés d'une série d'étalons de menthol	54
Figure.III.7	Spectres dérivés de l'HE de menthe (jaune), d'HE enrichie et de menthol	56
Figure III.8	Spectre d'absorbance IRTF d'eucalyptol (5 mg.ml ⁻¹)	57
Figure III.9	Spectres d'absorbance d'eucalyptol préparé dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre 0.75-10 mg.ml ⁻¹	58
Figure III.10	Spectres IRTF de cinéole a), d'HE d'eucalyptus b) et d'HE enrichie c)	60
Figure III.11	Spectres dérivés d'une série d'étalons d'eucalyptol	61
Figure III.12	Spectres IRTF dérivés d'eucalyptol a) et d'HE d'eucalyptus	62
Figure III.13	Spectre d'absorbance IRTF de thymol (5 mg.ml ⁻¹)	63
Figure III.14	Spectres d'absorbance du thymol préparé dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec l'amylène pour un domaine de concentration compris entre 0.75-10 mg.ml ⁻¹	64
Figure III.15	Spectres IRTF de thymol a) et de l'HE de thym b)	65

Liste des abréviations

AcOEt: Acétate d'éthyle

°C: degrés Celsius

CCM: Chromatographie sur couche mince

CG -SM: Chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse

CH₂Cl₂: Dichlorométhane

cm: Centimètre

D.S.R. : déviation standard relative

EPS: extraction phase solide

eV: electron volt

HE: Huile essentielle

IRTF: Infrarouge à transformé de Fourier

L.B.: Ligne de base

L.D. : limite de détection

MgSO₄: Sulfate de magnésium

mm: Milimètre

mn: minute

%: Pourcentage

µm: Micromètre

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Elles sont capables de produire des substances naturelles très diverses qui connaissent un intérêt croissant pour des applications dans de nombreux produits de consommation. Il s'agit de métabolites dits secondaires parmi lesquels, les huiles essentielles, leur utilisation est encouragée car les produits équivalents issus de synthèses chimiques ont une mauvaise presse parmi le grand public.

Les huiles essentielles sont extraites de diverses familles botaniques, elles se localisent dans toutes les parties de la plante (écorces, feuilles, tiges et fleurs).

Il existe plusieurs techniques d'extraction qui peuvent être conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et élaborées (développées plus récemment).

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques. La technique, qui est la plus couramment employée, est le couplage d'une technique chromatographique, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) permettant l'individualisation des constituants, avec une technique spectroscopique, la spectrométrie de Masse (SM). Cependant, le développement de nouvelles méthodes d'analyse est toujours nécessaire aux chercheurs travaillant dans les différents domaines de la chimie des produits naturels.

Dans ce domaine, la spectrométrie IRTF a été sollicitée, surtout pour des analyses qualitatives et complémentaires. Le but principal de ce travail est de contribuer au développement d'une méthode analytique quantitative par spectrométrie IRTF. Une telle méthode simple, rapide, utilisant un appareil disponible s'avère très nécessaire dans nos laboratoires.

Les objectifs assignés à ce travail sont :

- L'étude chimique de la composition des huiles essentielles présentes dans les espèces étudiées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).
- Le dosage des monoterpènes dans les huiles essentielles de plantes médicinales et aromatiques par spectrométrie IRTF.

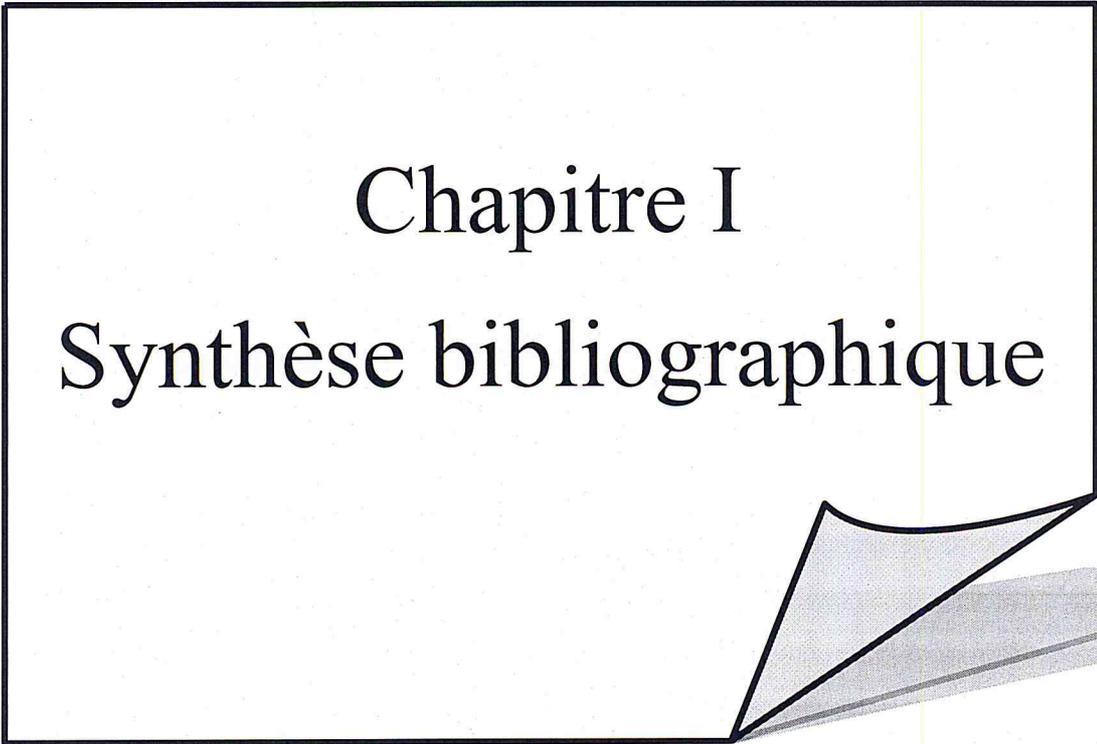
Notre mémoire est réparti en trois chapitres:

Le premier concerne une étude bibliographique recensant les espèces et les étalons concernés par cette étude, les procédés d'extraction des huiles essentielles dits traditionnels et les techniques d'analyse.

Le second est consacré à l'extraction des huiles essentielles, leur analyse par CCM et CG-SM.

Le troisième a pour objet le dosage quantitatif des monoterpènes contenus dans les espèces étudiées par spectrométrie IRTF.

Une conclusion ainsi qu'une bibliographie complète ce mémoire.



Chapitre I
Synthèse bibliographique

I.1 Introduction

Depuis les temps les plus reculés, l'homme a appris à chercher chez les végétaux et les animaux ses aliments et ses médicaments. L'étude des produits naturels à usage thérapeutique est pluridisciplinaire (biologie, pharmacologie, chimie...).

Les plantes ont toujours fait, partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ses rites religieux.

L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est originaire des millénaires jusqu'à la récente civilisation chinoise, indienne et du Proche-Orient. Elle est devenue certainement un art. Au fil des siècles, la thérapeutique par les plantes s'est dissociée des pratiques magiques pour devenir empirique puis scientifique. Cela était évident au début du 19^{ème} siècle qui marque la découverte des alcaloïdes (morphine, quinine...). Dans les pays industrialisés, les recherches dans le domaine des plantes médicinales se poursuivent durant les dernières décennies. Néanmoins, les substances actives isolées constituent environ 25% des préparations médicamenteuses [1].

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui auraient une activité pharmacologique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. Cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain. Elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie, ainsi que dans la confection de boissons, soit nature, soit en préparation galéniques, soit encore sous forme de principes actifs, comme matière pour l'obtention de médicaments [2,3].

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une importante place dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisent autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. Les huiles essentielles sont des mélanges odorants, complexes et variables de composés volatils extraits par distillation de matériel

végétal de diverses origines : Racine (*Vétiver*), bulbe (*Ail*), rhizome (*Gingembre*), Tige (*Petits grains*), bois (*Bois de Rose, Cèdre, Santal*), écorce (*Cannelle*), Feuille (*Citronnelle, Eucalyptus*), bourgeon (*Pin*), sève (*Encens, Myrrhe*), Fleur (*Ylang-ylang, Rose, Lavande*), fruit (*Orange*), graine (*Muscade, Anis*). [4].

Les composants des huiles essentielles sont génériquement dits « aromatiques » en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique, ce qui peut prêter à confusion. Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable.

I.2 Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires des végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires (protéines lipides et glucides) qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal. Ces métabolites secondaires exercent cependant une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédatations d'insectes, sécheresse, lumière UV...). D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales. La grande valeur thérapeutique de certains de ces métabolites (taxanes de l'if, alcaloïdes de la pervenche de Madagascar...), allié à leur difficulté de production, à partir de végétaux (généralement moins de 1% du poids de matière sèche), explique les difficultés d'approvisionnement liées à ces molécules et, conséquemment, un prix de marché souvent exorbitant. Chez l'homme, ces éléments à l'état de traces jouent également un rôle important, en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leurs impacts sur la santé des consommateurs sont maintenant avérés (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers, ou au contraire micro toxiques indésirables). En dépit de ces rôles importants, peu de données sont aujourd'hui disponibles en ce qui concerne l'effet combiné des facteurs du milieu sur l'élaboration des métabolites secondaires par des végétaux cultivés.

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties des plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à l'autre.

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine [5].

I.2.1 Terpènes

Ils constituent entre autre le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. Ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Nombre d'entre eux possèdent des propriétés antiseptiques [6], d'où divers emplois dont l'embaument qui est resté dans le terme balsamique donné aux plantes et aux huiles qui en sont tirées. Ces terpènes sont biosynthétisés à la suite du couplage d'au moins 2 entités à 5 carbones dont la structure est celle de l'isoprène ou 2-méthylbuta-1,3-diène. En fonction du nombre n (entier) d'unités pentacarbonés (C5) ramifiées [7,8], on peut distinguer : Les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les sesterpènes (C25), les triterpènes (C30) et le caoutchouc naturel : les polyterpènes.

Bien que les terpènes au sens strict ne soient que des hydrocarbures, de nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques. Il n'y a pas de fonction chimique commune aux terpènes, seule leur structure et leur biosynthèse en font une catégorie.

Les monoterpènes sont avec les sesquiterpènes, un des éléments principaux des essences végétales aromatiques appelées huiles essentielles. Par exemple : camphre, géraniol, menthol, limonène et citral. On peut trouver des monoterpènes dans plus de deux milles plantes de soixante familles différentes. Les monoterpènes sont émis par les plantes. Ils forment des aérosols pouvant servir de noyau de condensation des

nuages. Ils augmentent la clarté des nuages et refroidissent le climat [9]. Ils sont un des principaux vecteurs de la propagation rapide des incendies de forêts.

Les monoterpènes sont une classe de terpènes constitués de deux molécules d'isoprène (C_5H_8). Ils peuvent être linéaires, monocycliques (thymol, menthol) ou bicycliques (camphre) (Figure I.1). Les fonctions des monoterpènes sont multiples. Certains protègent les plantes des prédateurs, inhibent la multiplication des bactéries et/ou champignons.

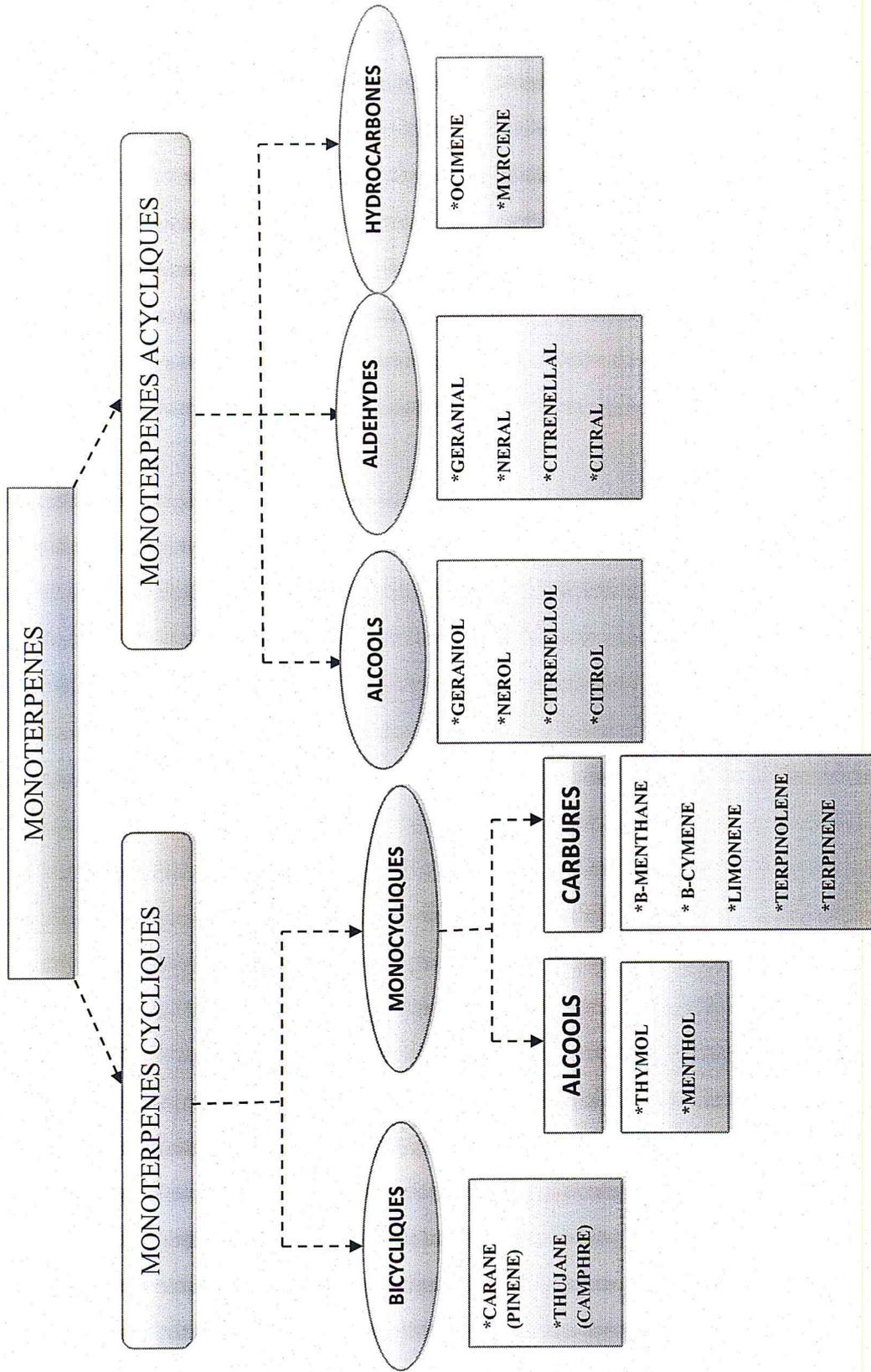


Figure I.1: Classement des monoterpènes [10]

La figure I.2 montre quelques structures de monoterpènes et leurs sources.

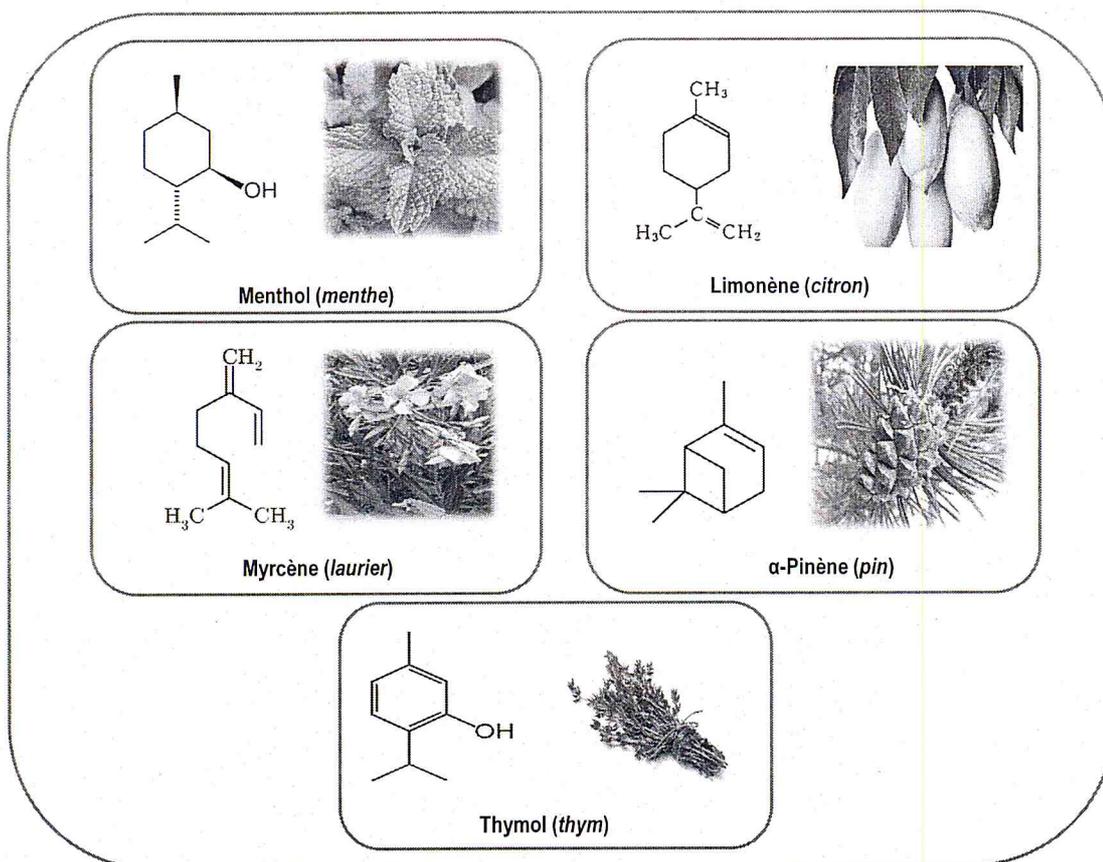


Figure I.2: Quelques structures de monoterpènes et leurs sources

Le tableau I.1 récapitule quelques propriétés physico-chimiques des monoterpènes considérés dans ce travail.

Tableau I.1 : Propriétés physico-chimiques de thymol, menthol et cinéole

Monoterpènes	Nom UPAC	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Température d'ébullition (°C)	Masse volumique (g/cm ⁻³)
Menthol	(1R, 2S, 5R)-5-méthyl-2-(propan-2-yl)cyclohexanol	C ₁₀ H ₂₀ O	156,2	212	0,903
Eucalyptol (cinéole)	1, 3, 3-triméthyl-2-oxabicyclo[2,2,2]octane	C ₁₀ H ₁₈ O	154,2	176 à 177	0,9225
Thymol	5-méthyl-2-(propan-2-yl)-phénol	C ₁₀ H ₁₄ O	150,2	233	0,97-0,93

I.2.1.1 Menthol

Le menthol est un composé organique (Figure I.3) covalent obtenu soit par la synthèse, soit depuis l'extraction à partir de l'huile essentielle de menthe poivrée ou d'autres huiles essentielles de menthe. Il appartient à la famille des monoterpènes. À température ambiante (20 à 25 °C), il se trouve sous forme solide, d'une couleur d'un blanc cireux. Il fond si l'on augmente légèrement la température. Le menthol a des propriétés anti-inflammatoires et antivirales. Il est d'ailleurs utilisé pour soulager les irritations mineures de la gorge. Il est également un anesthésique local.

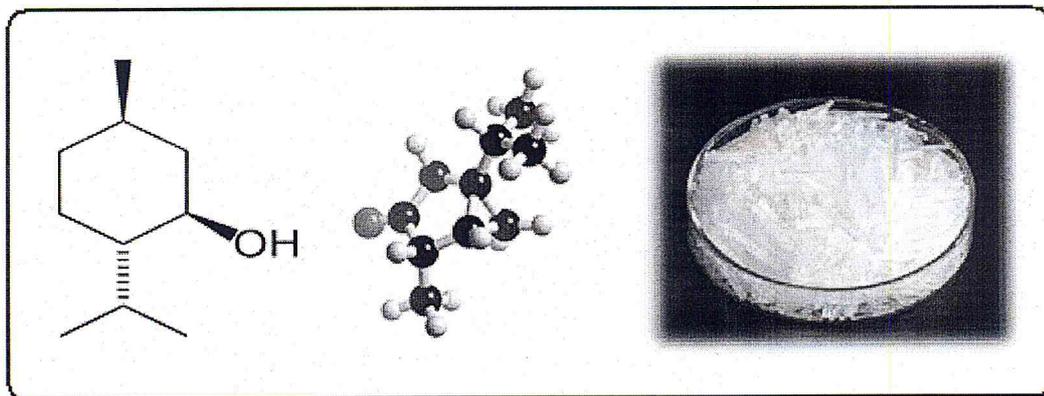


Figure I.3: Menthol

Le menthol a été identifié dans l'huile essentielle de diverses matrices [11,12].

I.2.1.2 Eucalyptol

L'eucalyptol est un composé naturel organique incolore. C'est un éther cyclique appartenant à la classe des monoterpènes. Il porte également toute une série d'autres noms équivalents : 1,8 cinéol, cinéol (Figure I.4).

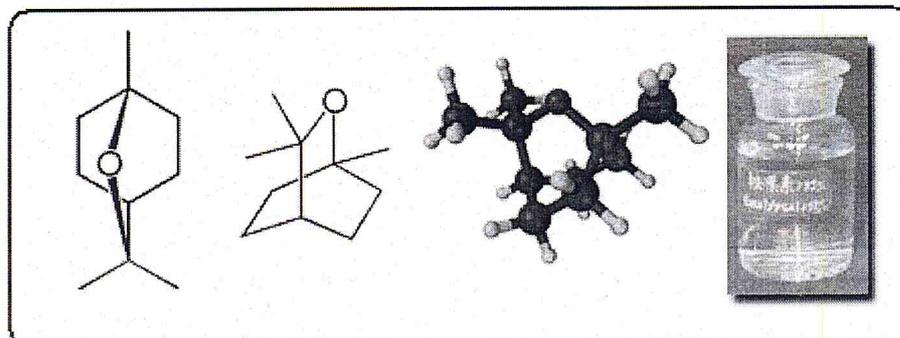


Figure I.4: Eucalyptol

Le cineole est l'un des monoterpènes entrant dans la composition de plusieurs huiles essentielles comme le montre les différents travaux [13-19].

I.2.1.3 Thymol

Le thymol est un monoterpène cyclique (Figure I.5) contenu dans l'huile de thym et dans les huiles essentielles (volatiles) de plusieurs autres plantes [20-24]. Il se présente sous forme de cristaux incolores avec une odeur aromatique caractéristique. Il est soluble dans les alcools, le gras et l'huile et peu soluble dans l'eau. On l'utilise notamment pour ses propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques ainsi que pour stabiliser les préparations pharmaceutiques.

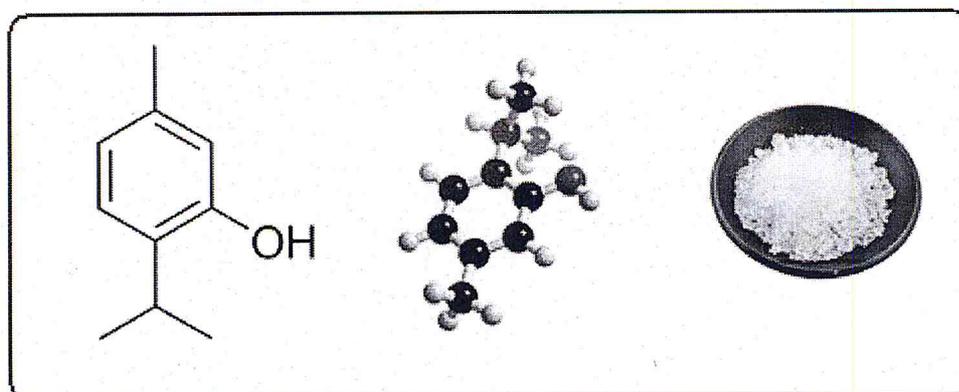


Figure I.5: Thymol

I.3 Plantes étudiées

I.3.1 Menthe (Naanaa)

La menthe appartient au vaste genre *Mentha*, de la vaste famille des Lamiacées à laquelle appartiennent aussi le basilic et le thym. Originaires d'Europe, les menthes se sont diffusées sur tout le globe jusqu'en Amérique du Nord, en Australie et au Japon. Plante vivace rustique, à souche traçante, ses feuilles sont opposées comme toutes les labiées. Sa multiplication est très facile par bouturage ou division des pieds, cependant elle peut devenir très vite envahissante. La dénomination «menthe» regroupe en réalité plusieurs espèces différentes du genre *Mentha* parmi lesquelles on peut citer la menthe poivrée (*Mentha piperita L.*), la menthe des jardins ou menthe crépue (*Mentha crispa L.*) qui ne dépasse rarement 60 cm de hauteur, ses fleurs sont mauves pâles au printemps et ses feuilles d'un vert vif sont ridées et frisées d'où son surnom de crépue.

L'huile essentielle de menthe des jardins est caractérisée par une teneur élevée en carvone (environ 50%) et en limonène comme cela est également le cas pour l'huile essentielle de carvi.

Comme beaucoup de plantes de la famille des Labiées, la menthe crépue ou menthe des jardins est utilisée comme plante aromatique en cuisine à la fois dans les plats et les boissons (sirop, infusion...). Son huile essentielle est aussi valorisée en parfumerie et en savonnerie.

L'infusion des feuilles de menthe crépue est utilisée pour ses propriétés : antiasthmatique, antiseptique, tonique et pour la digestion. De plus ses vertus sont reconnues pour soigner les désordres biliaires, la constipation et les jaunisses.

I.3.2 Eucalyptus

Les eucalyptus, soit le genre *Eucalyptus*, sont des arbres de la famille des Myrtaceae indigènes en Australie et en Tasmanie, et dont certaines espèces, notamment *E. globulus*, ont été introduites en Europe, où elles se sont très bien acclimatées sur les rivages méditerranéens et au Portugal, pays dans lequel d'immenses forêts d'eucalyptus ont été plantées pour la production de pâte à papier. L'arbre a également été planté en Afrique du Nord, notamment en Algérie, au Maroc, en Libye et en Tunisie. On le rencontre aussi à Madagascar, Mayotte et à la Réunion, au Sri Lanka, en Afrique du Sud ou en Californie.

L'eucalyptus est connu pour ses vertus sur l'appareil respiratoire, dues surtout au cinéol (ou eucalyptol) contenu dans les feuilles. Huile d'eucalyptus possède un effet rafraîchissant indéniable sur la température du corps. C'est un fébrifuge. Elle est utilisée dans de nombreuses spécialités pharmaceutiques pour ses multiples vertus sur l'appareil respiratoire. Elle facilite la dissolution et l'élimination des glaires bronchiques (balsamique, fluidifiant, expectorant), anti-infectieux vis-à-vis des bactéries et virus. Antiseptique pour les voies urinaires, elle est aussi antirhumatisme, stimulante et tonifiante. En outre, c'est un excellent antibiotique naturel.

I.3.3 Thym (Zaatar)

Le thym, *Thymus vulgaris L.*, appartient aussi à la famille des Lamiacées. Originaire du bassin méditerranéen, cet arbrisseau aux nombreux rameaux serrés, est une espèce végétale vivace rustique ou semi-rustique. Il existe plus de 100 espèces du genre *Thymus* dont 65 rien qu'en Europe, toutes se multipliant par bouturage. Quelque soit les espèces, les fleurs vont d'un rose pâle au mauve et les feuilles très petites sont généralement vertes et pointues.

Issue du feuillage de la plante, l'huile essentielle possède une composition chimique variable selon les chimiotypes, les sols, les climats, les périodes, les heures de récolte et les conditions du stockage. Elle est néanmoins toujours dominée par le thymol qui lui confère puissance et chaleur.

Utilisée en parfumerie, ou telle quelle, l'huile essentielle de thym rappellera facilement aux vacanciers l'odeur de la garrigue provençale. Ingrédient caractéristique et indispensable de nombreux plats méridionaux, son utilisation en cuisine est devenue aujourd'hui quasi universelle.

À la fois herbe magique et curative pour les Romains, Panacée universelle pour Sainte Hildegarde, il fut le remède miracle du 16ème siècle. Actuellement, l'huile essentielle de thym est utilisée pour ses vertus carminatives, antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques. Connue depuis toujours comme un antiseptique puissant, en infusion le thym peut être utilisé en bain de bouche ou en gargarisme pour lutter contre des gencives enflammées et les maux de gorges.

Différents procédés sont utilisés pour l'obtention des huiles essentielles et des extraits.

I.4 Méthodes d'extraction

L'extraction des huiles essentielles est certainement la phase la plus délicate et la plus importante du processus. Elle a pour but d'isoler les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal. De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction de ces substances [25].

La synthèse bibliographique effectuée a révélé que les deux protocoles d'extraction les plus utilisés sont l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur pour la préparation des huiles essentielles.

I.4.1 Hydrodistillation

La plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les HE se séparent de l'eau par différence de densité.

Un protocole général employé pour l'obtention des H.E est cité dans différents travaux [11-19, 21-23, 26-35]. Une macération préalable de la matière végétale broyée dans l'eau distillée est possible [11].

I.4.2 Entraînement à la vapeur

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur a été mis au point. La masse végétale repose sur une grille vers laquelle la vapeur est pulsée. Les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent. Ces dernières sont alors vaporisées et condensées dans un serpentin réfrigères. La récupération de l'huile essentielle est la même que dans le cas de l'hydrodistillation.

Le protocole classique relatif à l'entraînement à la vapeur a été utilisé par différents auteurs [20, 36, 37].

I.5 Techniques d'analyse

Une parfaite connaissance de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire pour en contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation. En effet, ces huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que

soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

De manière schématique, deux démarches analytiques se distinguent en fonction de l'objectif recherché. La première est l'analyse structurale qui consiste à élucider la structure d'une molécule qui n'a encore jamais été décrite dans la littérature. La seconde est d'identifier et de quantifier un produit déjà connu et dont les caractéristiques spectrales sont répertoriées [38]. La synthèse bibliographique effectuée montre que généralement l'étude de la composition de l'huile essentielle de la plante est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) [12, 14, 16, 18, 20, 21, 23, 29]. Souvent la détermination qualitative ou quantitative d'huile essentielle dans les plantes est effectuée par CPG [12-14, 18, 20-22].

Pour une séparation des composants, la chromatographie sur couche mince est utilisable il faut seulement trouver le meilleur éluant.

1.5.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants. On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f) :

R_f = hauteur de la tache / hauteur du front du solvant

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_f avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques; même R_f).

I.5.2 Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CG-SM)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) est un instrument qui sépare les mélanges de produits chimiques (la composante CG) et identifie les composants au niveau moléculaire (le composant SM) Il est l'un des outils les plus précis pour l'analyse des échantillons de l'environnement. La chromatographie gazeuse fonctionne sur le principe selon lequel un mélange se sépare en différentes substances lorsqu'elles sont chauffées. Les gaz chauds sont transportés à travers une colonne avec un gaz inerte (tel que l'hélium). Comme les substances séparées sortent de l'ouverture de la colonne, ils se jettent dans le SM. La spectrométrie de masse identifie des composés via la masse de la molécule d'analyte Une «bibliothèque» des spectres de masse connue, couvrant plusieurs milliers de composés, est stockée sur un ordinateur [39].

I.5.3 La spectrométrie infrarouge

La spectroscopie Infrarouge est une technique extrêmement utilisée notamment en chimie (physique, inorganique, organique et analytique). Plusieurs types de spectrophotomètres sont disponibles, mais ont certaines composantes en commun, soit une source infrarouge, un banc optique, un détecteur et un enregistreur. Le domaine infrarouge du spectre correspond aux radiations de nombre d'onde compris entre environ 10 cm^{-1} et 12800 cm^{-1} . Pour plus de facilité, on partage l'infrarouge en trois domaines : l'infrarouge proche, moyen et lointain [40, 41]. La partie de la région infrarouge la plus utilisée et la plus adéquate pour l'identification des espèces, organiques principalement, et la caractérisation des structures moléculaires est l'infrarouge moyen, à cause de la richesse et la multiplicité d'informations fournies par les bandes étroites du spectre.

Les instruments se répartissent en deux catégories : les spectromètres à transformée de Fourier qui réalisent une analyse simultanée de toute la bande spectrale à partir de mesures interférométriques et les nombreux analyseurs spécialisés. Dans le proche infrarouge on trouve également encore quelques spectromètres de type dispersif. Les spectromètres infrarouges à transformée de Fourier correspondent à un montage optique à simple faisceau qui comporte comme pièce essentielle un interféromètre souvent de type Michelson placé entre la source et l'échantillon [41].

Le grand développement de la technique IRTF est dû à son emploi tant pour l'identification qualitative que pour l'analyse quantitative et pour l'étude des structures chimiques

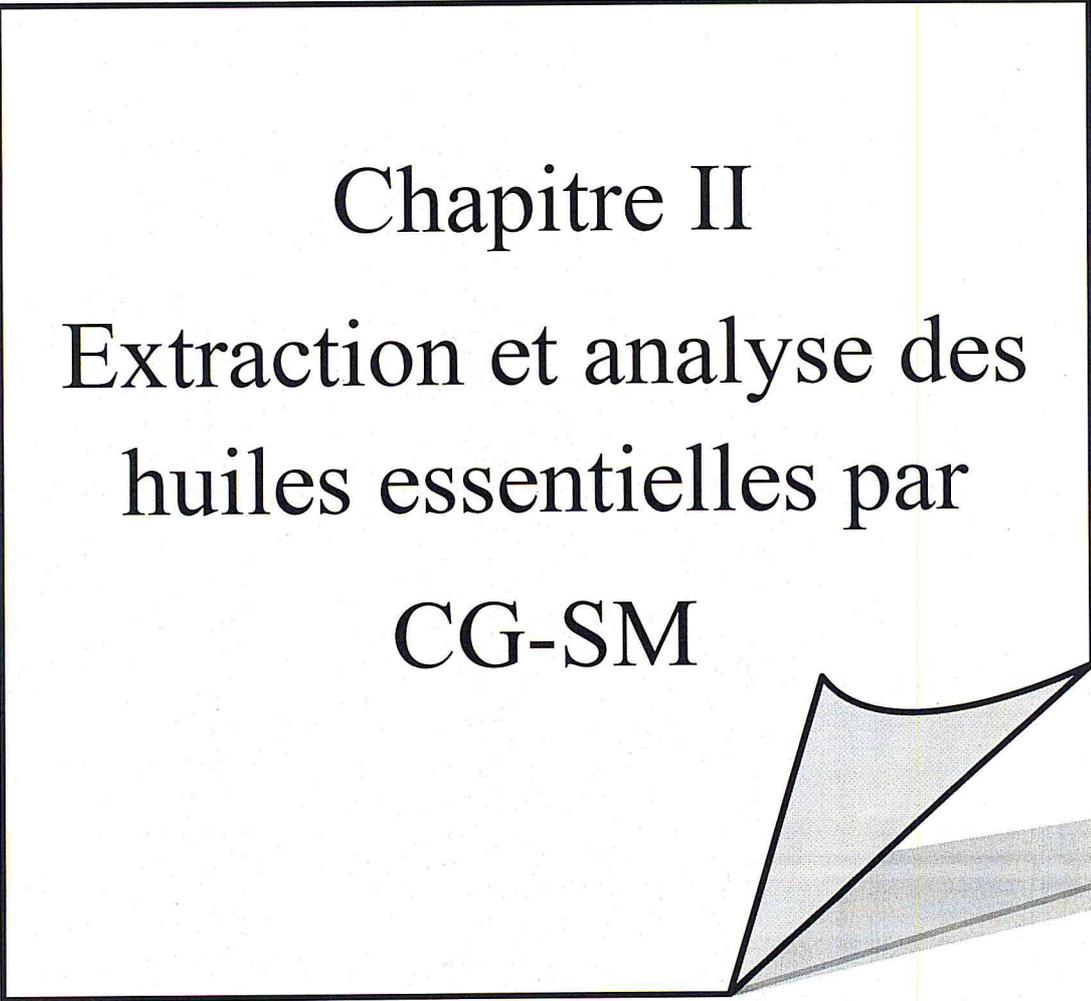
L'analyse qualitative se réalise généralement en deux étapes: (1) identification des groupements fonctionnels de la substance, il existe des atlas de spectres qui peuvent être consultés à cette fin [42], (2) confirmation de la structure moléculaire par comparaison de la totalité du spectre avec celui d'un composé connu. La concordance exacte entre le spectre d'un composé de structure connue et celui d'un analyte permet d'identifier ce dernier sans aucun doute possible, du fait qu'il n'existe pas deux composés de structure différente qui ont le même spectre IR (on parle "d'empreinte digitale" du composé) [43].

Les études quantitatives sont basées sur l'utilisation de la loi de Beer-Lambert qui établit une relation entre les mesures d'absorbance et la concentration des espèces à déterminer. Des analyses quantitatives à $\pm 10\%$ sont relativement aisées à obtenir, pour des analyses plus précises ($< 1\%$ en solution) il est nécessaire d'établir une courbe d'étalonnage et de s'assurer que les spectres sont enregistrés dans les conditions optimales. Dans cette partie, trois modes de mesures peuvent être considérés: (1) mesure en mode statique (batch) où la cellule IR est, à chaque mesure, retirée de son compartiment pour son nettoyage ou son remplissage, (2) mesure en écoulement bloqué (stop flow) où les échantillons sont conservés dans des récipients distincts pendant toutes les opérations unitaires jusqu'au transfert vers le dispositif d'analyse (on utilise une pompe péristaltique pour remplir la cellule, on stop momentanément le flux, on obtient le spectre et on rétablit le flux pour laver la

cellule avec le solvant ou la remplir avec une autre solution et ce, sans la déplacer), (3) en mode à flux continu (Flow Injection Analysis) où les diverses opérations unitaires de l'analyse s'effectuent pendant que l'échantillon circule du point d'injection jusqu'à l'unité de mesure [44].

La spectrométrie IRTF présente plusieurs avantages, tel que : le caractère non destructif, la bonne résolution des spectres, l'identification spécifique, liens chimiques, ainsi que la rapidité et la simplicité. Bien que la spectrométrie IRTF est devenue l'une des techniques d'analyse quantitative utilisée dans le plus grand nombre de disciplines scientifiques, elle présente des inconvénients, à savoir sa grande sensibilité à l'eau et au CO₂ en plus, l'absence d'indication sur la localisation des molécules. Cette technique a été utilisée dans plusieurs travaux scientifiques [43-47]. Notre équipe de recherche a développé une méthode de dosage des stérols dans les algues rouges, ensuite dans les algues brunes.

Chapitre II
Extraction et analyse des
huiles essentielles par
CG-SM



II.1 Introduction

Les huiles essentielles présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que la pharmacie, le cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire. Les huiles essentielles de menthe, d'eucalyptus et de thym sont composées par des molécules aromatiques végétales présentant une très grande diversité de structure.

Ce chapitre est consacré à l'étude analytique de l'huile essentielle de trois plantes : la menthe, le thym et l'eucalyptus. Il contient deux parties :

1-préparation des huiles essentielles.

2-Analyse des huiles essentielles par chromatographie sur couche mince et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour l'identification des différents constituants.

II.2 Procédure générale d'obtention des huiles essentielles

II.2.1 Récolte des espèces étudiées

Les feuilles de menthe fraîche utilisées ont été récoltées en juin à Blida. Les feuilles d'eucalyptus ont été récoltées en mai à Soumaa wilaya de Blida. La menthe sèche et le thym ont été achetés chez un herboriste.

II.2.2 Obtention des huiles essentielles

II.2.2.1 Extraction et récupération de l'huile essentielle de la menthe

Le protocole expérimental décrit ci-dessous a été utilisé pour les deux menthes (figure II.1): sèche (a) et fraîche (b).

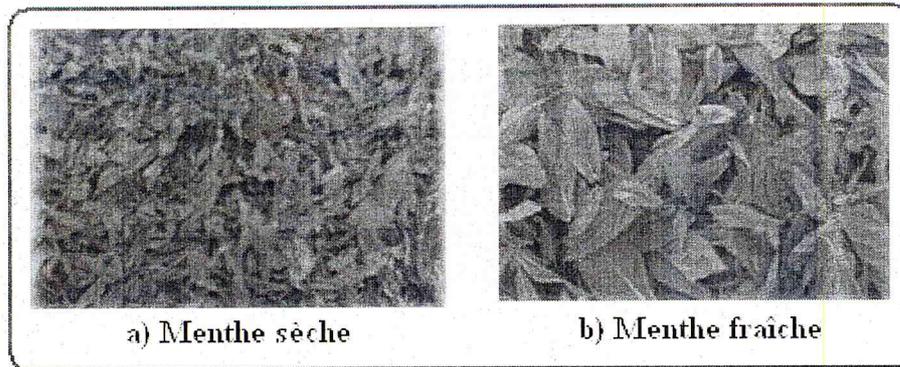


Figure II.1: Menthe des jardins

L'extraction d'huile essentielle est réalisée par hydrodistillation dans un montage à l'échelle laboratoire (figure II.2). Une masse végétale de 45 g est complètement immergée dans l'eau (600 ml), le tout est ensuite porté à ébullition. On maintient le chauffage à une température modérée pendant 4h, les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant. L'huile essentielle et l'eau se séparent par différence de densité.

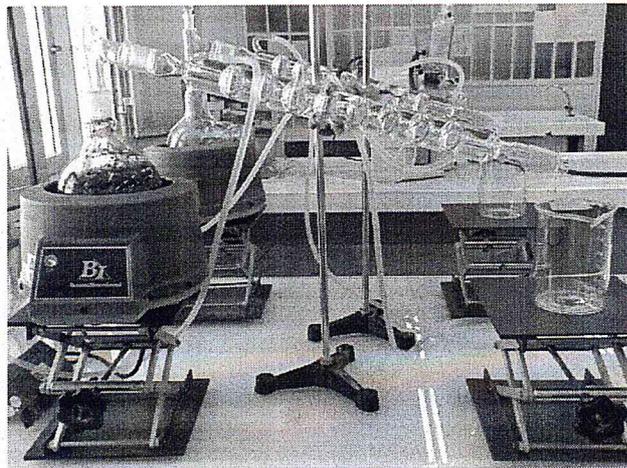


Figure II.2: Montage d'hydrodistillation

Le mélange eau-huile essentielle est soumis à une extraction liquide - liquide avec de l'éther diéthylique. On obtient deux phases distinctes, une phase organique contenant l'huile essentielle dans l'éther et une phase aqueuse, cette dernière est soumise de nouveau à une extraction liquide - liquide avec de l'éther diéthylique afin d'épuiser au maximum l'huile essentielle soluble dans l'eau. La phase organique est filtrée sur du Na_2SO_4 afin d'éliminer toutes traces d'eau (figure II.3).

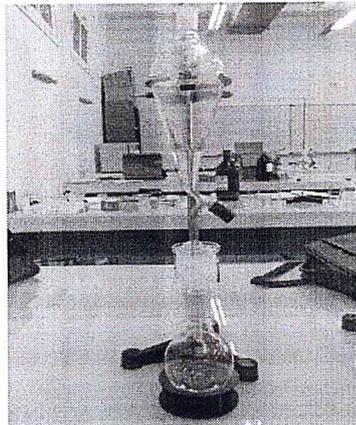


Figure II.3: Séparation et séchage de la phase organique

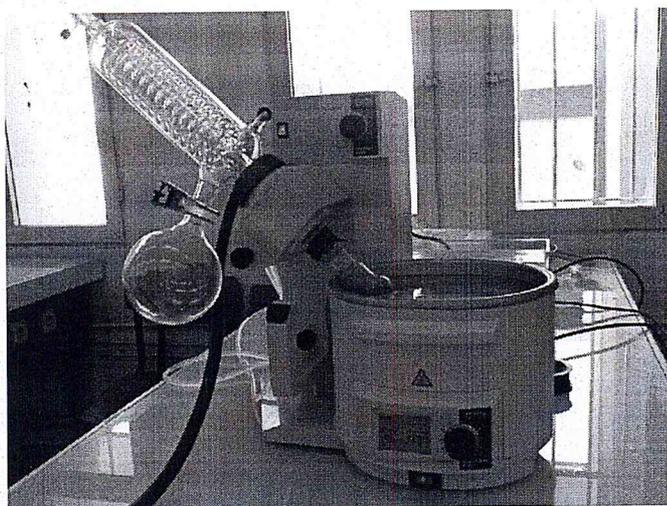


Figure II.4: Elimination du solvant de l'huile essentielle

II.2.2.2 Extraction et récupération de l'huile essentielle d'eucalyptus

L'extraction d'huile essentielle est réalisée par entraînement à la vapeur d'eau dans un montage à l'échelle laboratoire, comprenant un ballon rempli au deux tiers d'eau surmonté d'une ampoule à décanter contenant l'eucalyptus sèche. Le ballon est porté à ébullition, les vapeurs formées traversent la matière végétale contenue dans l'ampoule à décanter. Cette dernière est reliée à un réfrigérant permettant de condenser les vapeurs issues de l'ampoule à décanter. L'hétéro-azéotrope eau-huile condensé est récupéré dans un bécher. La durée de l'extraction est fixée à 3 h pour une masse de plante (feuilles) de 59.92 g.

Pour la récupération de l'huile essentielle, on a suivi le protocole cité auparavant (section II.2.2.2).

II.2.2.3 Extraction et récupération de l'huile essentielle de thym

Même protocole que celui utilisé pour l'extraction de l'HE d'eucalyptus (section II.2.3.1).

Le traitement et la récupération de l'huile essentielle a été réalisée par extraction liquide - liquide (voir section II.2.2.2).

II.2.3 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une technique idéale pour l'analyse préliminaire de l'HE de la plante avant de passer aux autres analyses. L'objectif de cette analyse est de vérifier la présence des étalons (menthol, eucalyptol et thymol) dans les huiles essentielles étudiées. Nous avons fait appel à cette technique parce qu'elle est très simple mais souvent fournit des informations très précieuses [48]. Nous l'avons utilisé dans un premier temps pour huile essentielle brute afin de vérifier la présence des terpéniques dans les échantillons.

La CCM est effectuée sur des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice. La plaque CCM est préparée en déposant les spots des trois HE obtenues, avec Les trois étalons. Celle-ci est placée verticalement dans une cuve contenant la phase mobile constituée par le mélange AcOEt/Hexane (30 :70 v/v). La révélation est réalisée dans un dessiccateur contenant l'iode.

II.2.4 Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)

II.2.4.1 Description de l'appareil

L'analyse qualitative de la composition chimique des huiles essentielles extraites a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) (Figure II.5).

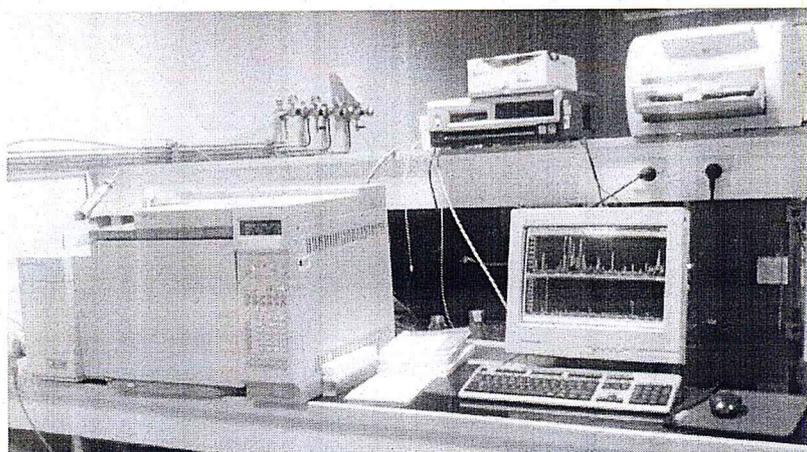


Figure II.5: Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

II.2.4.2 Conditions opératoires

L'analyse est effectuée sur un chromatographe type HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972, dans les conditions suivantes :

- Une colonne capillaire de type HP1 (polydiméthylsiloxane 100%), de longueur 30m d'un diamètre interne de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25 μm .
- un gaz vecteur (hélium) d'un débit de 0.3 ml/mn.
- Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale à 70 eV.
- La programmation du four est : 90°C (3') - 2°/mn - 250°C (10') - 10°/mn - 280°C.
- Injection d'une quantité de 1 μl en mode Split : 1/90.
- Les échantillons de l'huile essentielle sont dilués dans l'acétate d'éthyle à 1%.

II.3 Résultats et discussion

II.3.1 Rendement en huile essentielle

On définit le rendement en huile essentielle R_{HE} comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle (M_{HE}) obtenue et la masse de la matière végétale (M_{MV}).

Il est exprimé en pourcentage et donc donné par la relation suivante :

$$R = M_{HE} / M_{MV} * 100$$

Le tableau II.1 présente les résultats des rendements en huiles essentielles des trois plantes aromatiques obtenues.

Tableau II.1: Rendements en huile essentielle des trois plantes aromatiques

Espèces	Masse de la matière végétale (g)	Masse de l'huile essentielle (g)	Rendement (%)
Menthe sèche	45	0.42	0.93
Menthe fraîche	45	0.02	0.04
Eucalyptus	59.92	0.13	0.21
Thym	114	3.5	3.07

D'après le tableau II.1 on remarque que le thym est l'espèce qui fournit la plus grande quantité d'huile essentielle avec un rendement de 3.07%. La menthe sèche présente un rendement de 0.93%, l'eucalyptus avec une teneur de 0.21% et la menthe fraîche son rendement est de 0,04% seulement.

La teneur en huile essentielle dans la menthe sèche étant supérieure à celle obtenue dans la menthe fraîche, et inférieure à celle de la référence [12]. Le taux d'HE dans la menthe fraîche que nous avons trouvé par hydrodistillation est considéré faible en comparaison avec ceux obtenus par le même procédé et par extraction sans solvant assistée par micro-ondes [49].

L'entraînement à la vapeur d'eau d'eucalyptus fournit 0.21% d'huile essentielle. Le rendement en huile essentielle de thym a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la plante. L'échantillon de thym a fourni un taux d'environ 3% relativement plus élevé que celui obtenu à partir de différents genres de thym obtenus par hydrodistillation [23, 24] ou entraînement à la vapeur [50].

II.3.2 Analyse des huiles essentielles par CCM

Les huiles essentielles obtenues sont analysées par CCM dans les conditions citées (section II.2.3). L'analyse qualitative de la plaque CCM montre l'existence du thymol dans l'HE de thym, et ce, par l'apparition de tâches jaunes avec un R_f de 0.72.

II.3.3 Identification des produits des huiles essentielles par CG-SM

L'identification est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales de l'appareil (Wiley7n.1 et NBS75k.1). L'identification pour une base spectrale consiste à comparer le spectre de masse du produit avec celui du même produit de cette base, cette comparaison est donnée à un certain taux de similitude. Dans notre cas tous les produits ont été identifiés à un taux de similitude de plus de 90%. Les tableaux II.2, II.3 et II.4 regroupent les composés identifiés, leurs formules brutes et leurs teneurs, pour les trois huiles essentielles étudiées.

Nous tenons à rappeler que Wiley7n comprend 250000 molécules, et NBS75k est une banque comprenant les spectres de masse de 75000 molécules. Les profils chromatographiques des trois huiles essentielles étudiées sont donnés ci-dessous.

II.3.3.1 Identification des produits de l'HE de menthe

Les produits identifiés à partir de la figure II.6 et qui présente le profil chromatographique de l'huile essentielle de menthe des jardins sont représentés dans les tableaux II.2 et II.3.

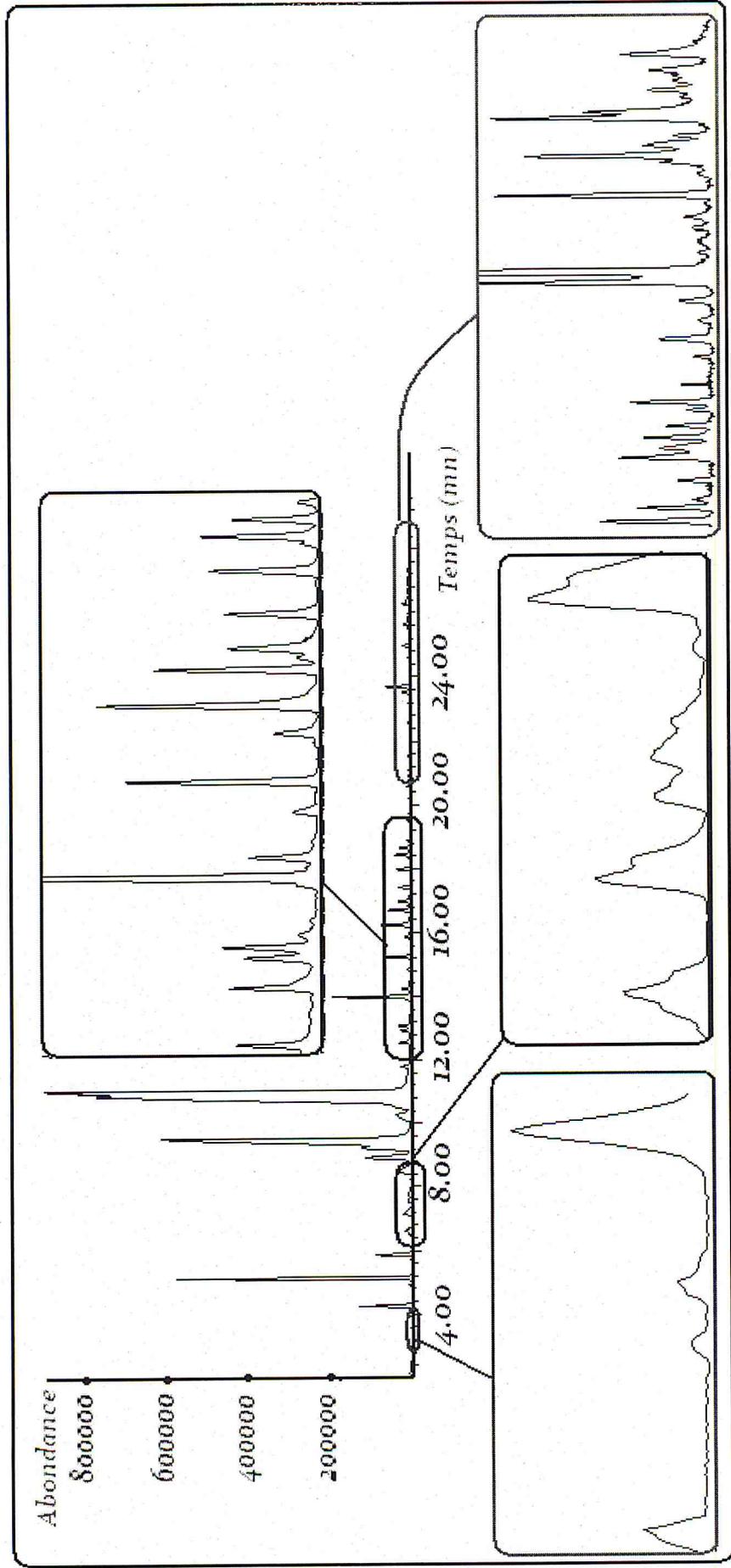


Figure II.6 : Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de *menthe*

Tableau II.2: Composition chimique de l'huile essentielle de menthe

Ordre d'élution	T _R (mn)	Nom	Formule	%
1	2.968	*NI		0.017
2	3.965	*NI		0.247
3	4.260	3-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	1.686
4	5.132	1,8-Cinéole	C ₁₀ H ₁₈ O	7.279
5	5.869	trans-Sabinene hydrate	C ₁₀ H ₁₈ O	1.340
6	6.605	cis-sabinene hydrate	C ₁₀ H ₁₈ O	0.441
7	7.160	trans-p-Mentha-2,8-dienol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.574
8	7.738	*NI		0.593
9	8.486	*NI		1.164
10	8.928	4-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	2.490
11	9.495	Cis-dihydro Carveol	C ₁₀ H ₁₈ O	22.295
12	10.254	trans-(+)-carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	1.406
13	10.991	Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	48.123
14	11.807	*NI		0.420
15	12.554	Acetic acid, 1,7,7-trimethyl-bicyclo[2.2.1]hept-2-yl ester	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.373
16	13.076	*NI		0.789
17	13.994	Dihydrocarvyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	2.303
18	14.243	trans-carvyl acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	0.339
19	14.844	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	0.146
20	15.240	cis-carvyl acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	0.728
21	15.875	3-Methyl-2-pent-2-enyl-cyclopent-2-enone	C ₁₁ H ₁₆ O	0.253
22	16.237	cis-Jasmone	C ₁₁ H ₁₆ O	1.123
23	16.702	beta.-Bourbonene	C ₁₅ H ₂₄	1.208
24	17.416	*NI		0.395
25	17.982	trans-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.499
26	18.424	*NI		0.527
27	18.651	*NI		0.335
28	18.866	*NI		0.082
29	20.577	*NI		0.270
30	21.507	Calamenene	C ₁₅ H ₂₂	0.085
31	22.572	*NI		0.063

32	23.694	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1.052
33	24.974	*NI		0.171
34	25.631	*NI		0.407
35	26.277	alpha.-Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.393
36	26.719	*NI		0.108
37	27.048	*NI		0.152
38	27.320	*NI		0.160

(*) : Non Identifié.

Tableau II.3: Classes de produits terpéniques dans l'huile essentielle de menthe

Classe		Analyte	Taux
Terpènes	hydrocarbonés	beta.-Bourbonene	1.208
		trans-Caryophyllene	0.499
		Calamenene	0.085
		1.792	
	oxygénés	1,8-Cinéole	7.279
		cis-sabinene hydrate	0.441
		trans-Sabinene hydrate	1.340
		trans-p-Mentha-2,8-dienol	0.574
		4-Terpineol	2.490
		Cis-dihydro Carveol	22.295
		Carvone	48.123
		trans-(+)-carveol	1.406
		Caryophyllene oxide	1.052
		alpha.-Cadinol	0.393
85.393			

L'examen des Tableaux II.2 et II.3 montre que la composition chimique de l'HE de *menthe* est dominée par les terpènes oxygénés (85.4%). Ces derniers sont sous forme de monoterpènes et de sesquiterpènes, il s'agit de la carvone, dihydrocarveol, 4-terpinéol, oxyde de caryophyllene et cadinol contre seulement environ 1.8% des hydrocarbures terpéniques. D'autres composés oxygénés ont été également identifiés (le 3-octanol, l'eugénol).

La répartition des différentes classes chimiques de l'huile essentielle est représentée par la figure II.7.

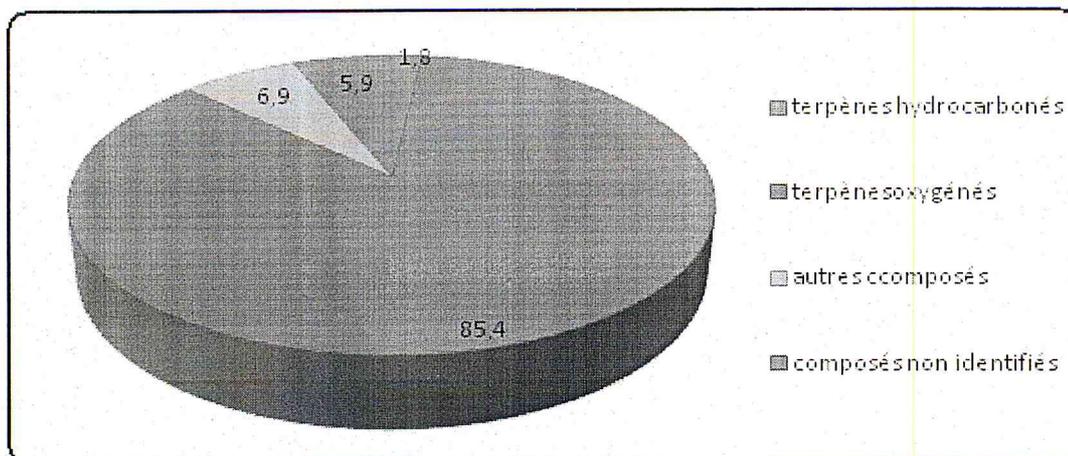


Figure II.7 : Représentation de la composition chimique de l'huile essentielle de menthe

Les composés majoritaires chez la *menthe* sont la carvone (48.12%), suivi par le dihydrocareol (22.29%) et le cinéole (7.27%). Leurs spectres de masse sont donnés respectivement par les figures II.8, II.9, II.10.

La composition chimique globale est similaire à celle obtenue pour la même espèce récoltée en novembre 2004 dans le nord de l'Algérie, mais on note une grande variabilité quantitative [51].

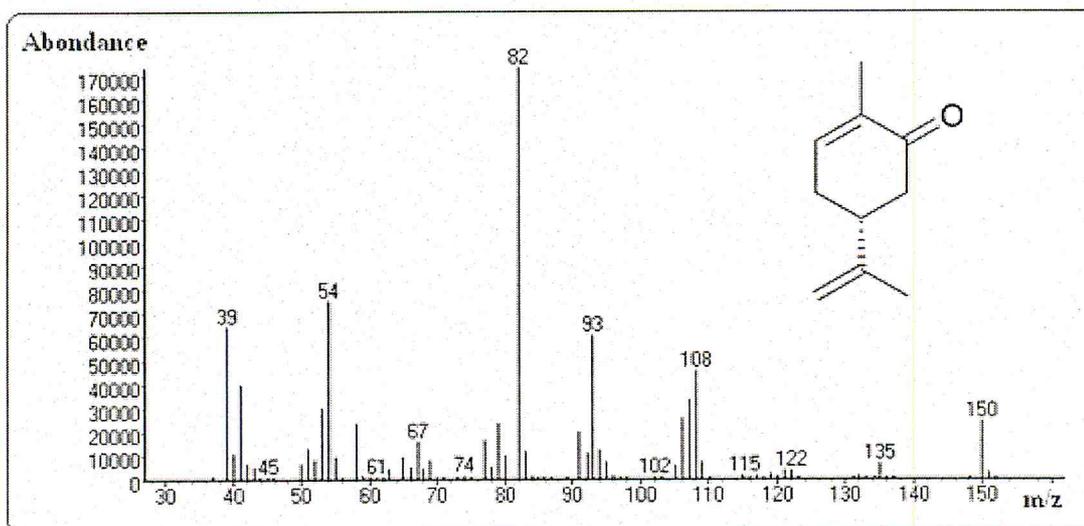


Figure II.8 : Spectre de masse de carvone C₁₀H₁₄O

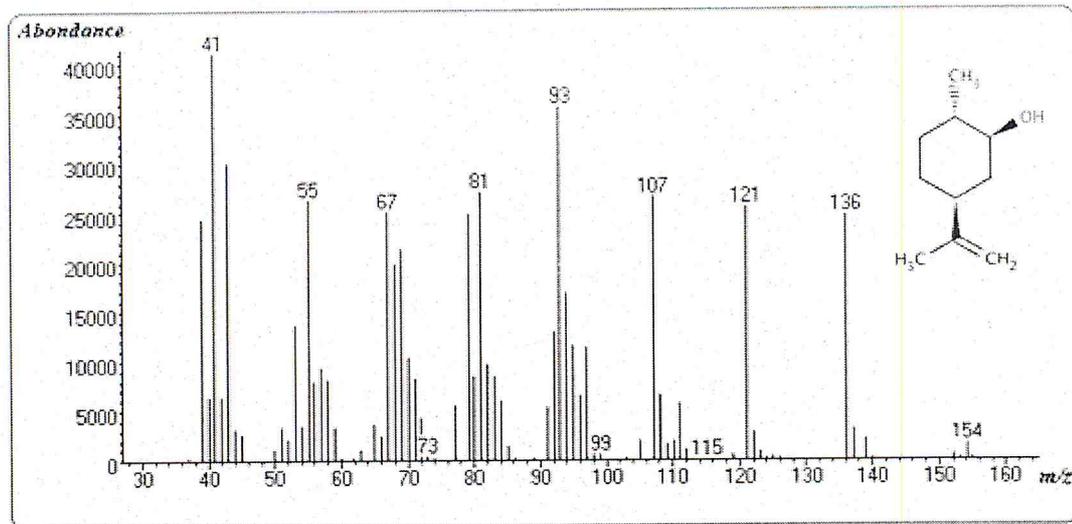


Figure II.9 : Spectre de masse de dihydrocarveol $C_{10}H_{18}O$

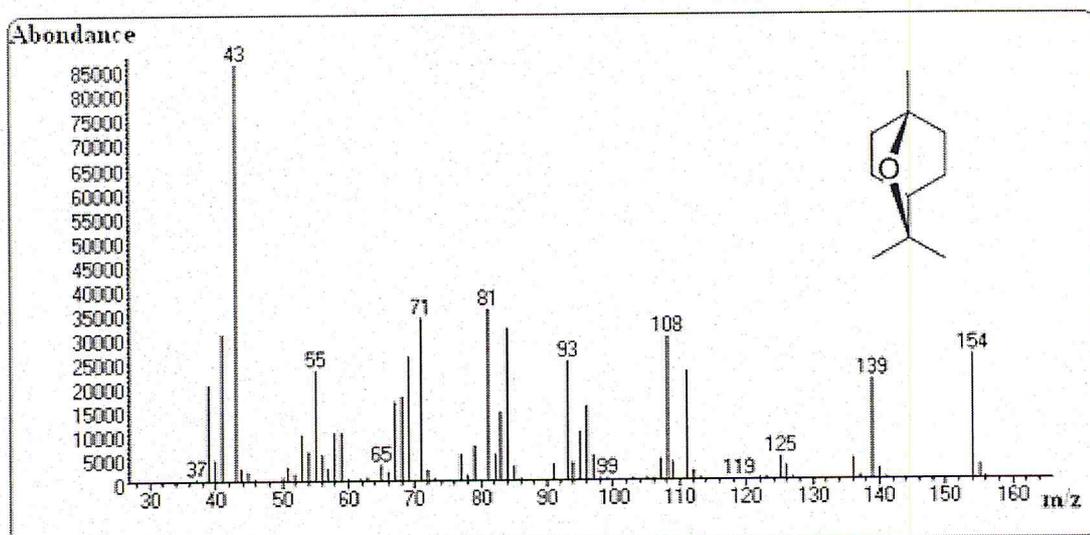


Figure II.10 : Spectre de masse de cinéole $C_{10}H_{18}O$

II.3.3.2 Identification des produits de l'HE d'eucalyptus

Le tableau II.4 représente les produits identifiés à partir de la figure II.11 et qui présente le profil chromatographique de l'HE d'eucalyptus.

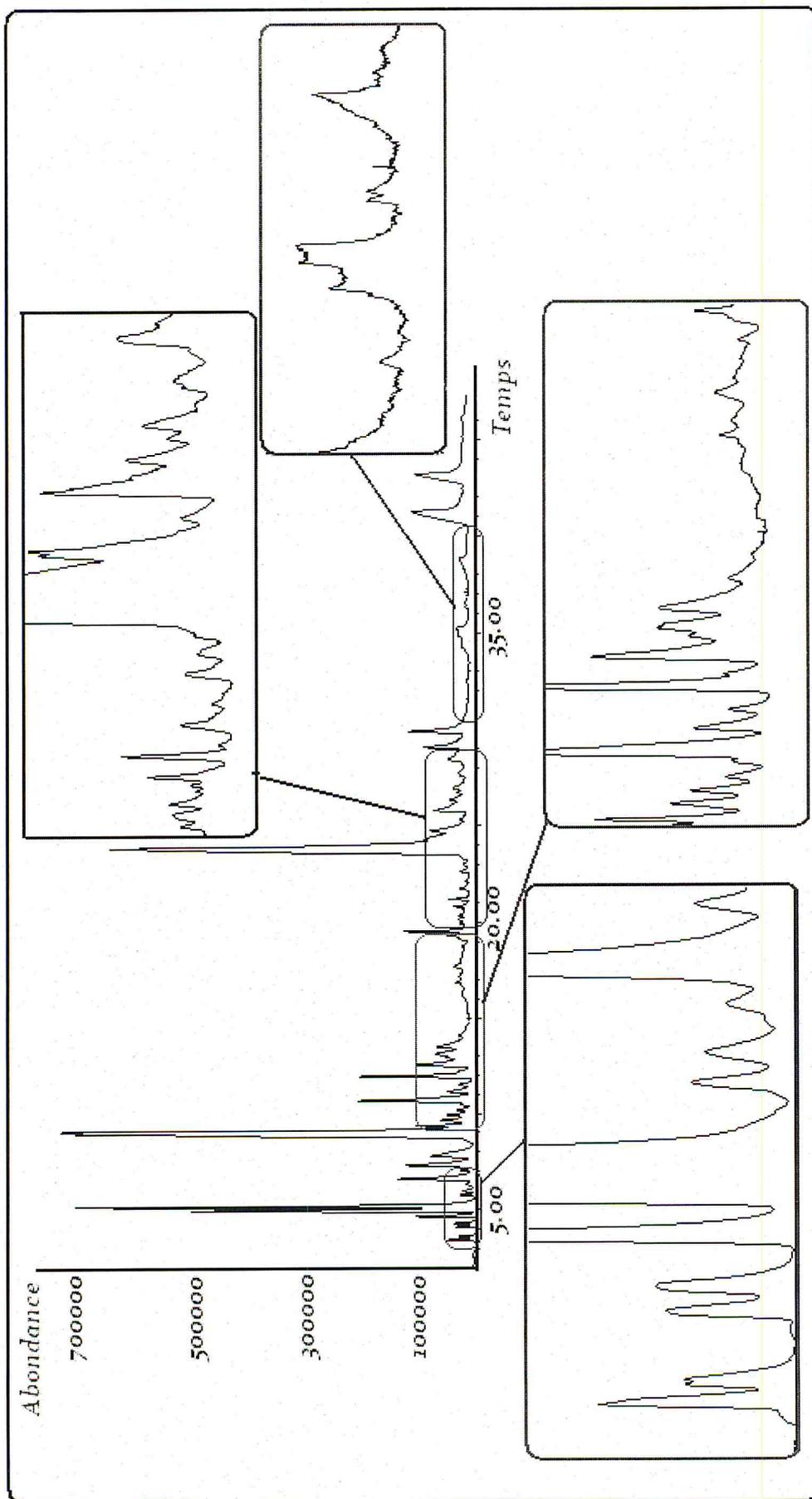


Figure II.11 : Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle d'*eucalyptus*

Tableau II.4 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*eucalyptus*

Ordre d'élution	T _R (mn)	Nom	Formule	%
1	2.735	*NI		0.011
2	3.460	alpha.-Thujene	C ₁₀ H ₁₆	0.608
3	4.299	beta.-Mycène	C ₁₀ H ₁₆	0.591
4	4.661	l-Phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	0.834
5	4.967	p-Cimène	C ₁₀ H ₁₄	4.261
6	5.171	Sabinène	C ₁₀ H ₁₆	6.009
7	5.749	gamma.-Terpinène	C ₁₀ H ₁₆	0.213
8	5.965	*NI		0.250
9	6.588	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	2.062
10	7.041	*NI		0.239
11	7.302	trans-p-Mentha-2-en-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	1.790
12	7.800	1-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	1.667
13	9.036	*NI		16.344
14	9.353	(-)-.alpha.-Terpineol (p-menth-1-en-8-ol)	C ₁₀ H ₁₈ O	0.924
15	9.659	*NI		0.798
16	9.919	*NI		0.610
17	10.191	*NI		0.398
18	10.679	Cuminal	C ₁₀ H ₁₂ O	3.072
19	11.155	Piperitone	C ₁₀ H ₁₆ O	0.677
20	11.506	*NI		0.348
21	11.959	Phellandral	C ₁₀ H ₁₆ O	2.377
22	12.560	Benzenemethanol	C ₁₀ H ₁₄ O	1.809
23	13.126	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	1.748
24	13.500	*NI		1.658
25	14.078	*NI		0.972
26	15.415	*NI		0.383
27	16.356	*NI		0.901
28	16.900	*NI		0.673
29	17.183	*NI		0.585
30	17.738	*NI		0.737
31	18.022	*NI		0.899
32	18.770	*NI		0.283

33	19.552	Allo-Aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	1.763
34	20.152	*NI		0.545
35	20.368	*NI		0.382
36	20.832	Ledene	C ₁₅ H ₂₄	0.448
37	21.206	*NI		0.366
38	21.739	*NI		0.297
39	22.113	*NI		0.141
40	22.623	*NI		0.250
41	22.997	*NI		0.204
42	23.824	Spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	17.456
43	24.730	*NI		1.666
44	25.331	*NI		0.335
45	25.796	isospathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	1.476
46	26.351	*NI		0.686
47	26.725	*NI		0.239
48	26.951	*NI		0.753
49	27.733	Longipinocarveol, trans-	C ₁₅ H ₂₄ O	0.534
50	28.459	*NI		1.326
51	29.093	*NI		1.569
52	29.898	(-)-Lepidozenal	C ₁₅ H ₂₂ O	2.180
53	32.481	*NI		0.096
54	34.238	*NI		0.417
55	35.201	n-acide hexadecanoique	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1.092
56	36.334	*NI		0.071
57	36.538	*NI		0.109
58	38.793	acide hexadecanoique	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.743
59	39.360	*NI		0.073
60	41.241	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	4.303
61	43.190	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	3.607
62	44.165	*NI		0.385
63	44.697	*NI		0.457
64	45.207	*NI		0.364
65	46.125	*NI		0.935

(*) : Non Identifié.

Le tableau II.5 résume le taux des différents produits de l'huile essentielle d'*eucalyptus*.

Tableau II.5: Le taux des différentes classes de produits dans l'huile essentielle d'*eucalyptus*

CLASSES		NOM	TAUX		
T E R P E N E S	M O N O T E R P E N E S	Hydrocarbonés	alpha.-Thujene	0.608	
			beta.-Mycène	0.591	
			l-Phellandrène	0.834	
			p-Cimène	4.261	
			Sabinène	6.009	
			gamma.-Terpinène	0.213	
			12.516		
			Oxygénés	Linalool	2.062
				trans-p-Mentha-2-en-1-ol	1.790
				l-terpineol	1.667
			(-)-.alpha.-Terpineol (p-menth-1-en-8-ol)	0.924	
			Cuminal	3.072	
			Piperitone	0.677	
			Phellandral	2.377	
			Benzenemethanol	1.809	
			Carvacrol	1.748	
			16.126		
		S E S Q U I T E R P E N E S	Hydrocarbonés	Allo-Aromadendrene	1.763
				Ledene	0.448
				2.211	
			Oxygénés	Spathulenol	17.456
			isospathulenol	1.476	
		Longipinocarveol, trans-	0.534		
		(-)-Lepidozenal	2.180		
		21.646			
	DITERPENES	Phytol	7.910		
	ACIDES	acide hexadecanoïque	1.835		

L'huile essentielle des feuilles d'*eucalyptus* s'est révélée être très riche puisqu'elle contient plusieurs classes de composés chimiques (figure II.12). Les analyses chromatographiques ont permis d'identifier 25 composés représentant plus de 62% de la composition globale (tableau II.5). Cette dernière est largement dominée par des sesquiterpènes oxygénés (22%), on peut citer le spathulenol (17.45%) comme produit majoritaire et des monoterpènes oxygénés (16%), tel que le linalool, le trans-p-mentha-2-en-1-ol et le cuminal. Les terpènes hydrocarbonés (monoterpènes et sesquiterpènes) occupent une fraction importante, puisqu'ils représentent environ 15%, on cite comme exemple le caryophyllene, l'aromadendrene, l'alpha.-pinene et le terpinene. Nous n'avons enregistré qu'un seul diterpène oxygéné qui est le phytol (8%). La composition de l'huile essentielle révèle également la présence en faible proportion d'acides gras (2%).

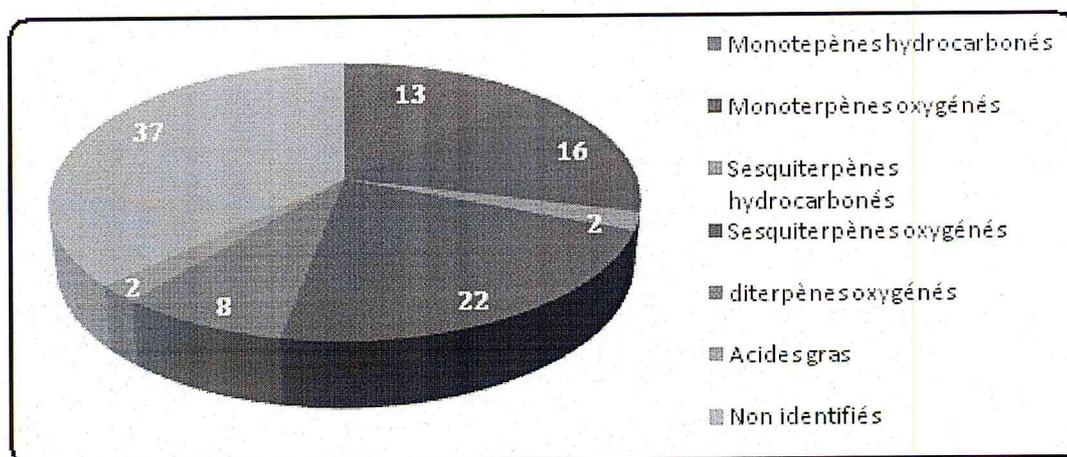


Figure II.12 : Représentation de la composition chimique de l'huile essentielle d'eucalyptus

Les constituants majoritaires de l'huile essentielle d'*eucalyptus* sont le Spathulenol (17.45%), le Phytol (8%), le Sabinène (6%) et le p-Cimène (4.261%). Les spectres de masse correspondants sont montrés sur les figures II.14, II.15, II.16 et II.17.

Cette huile diffère par sa composition de celle extraite des feuilles de la même espèce par hydrodistillation [29] dont le constituant majoritaire est le *p*-cimène (31,14 %).

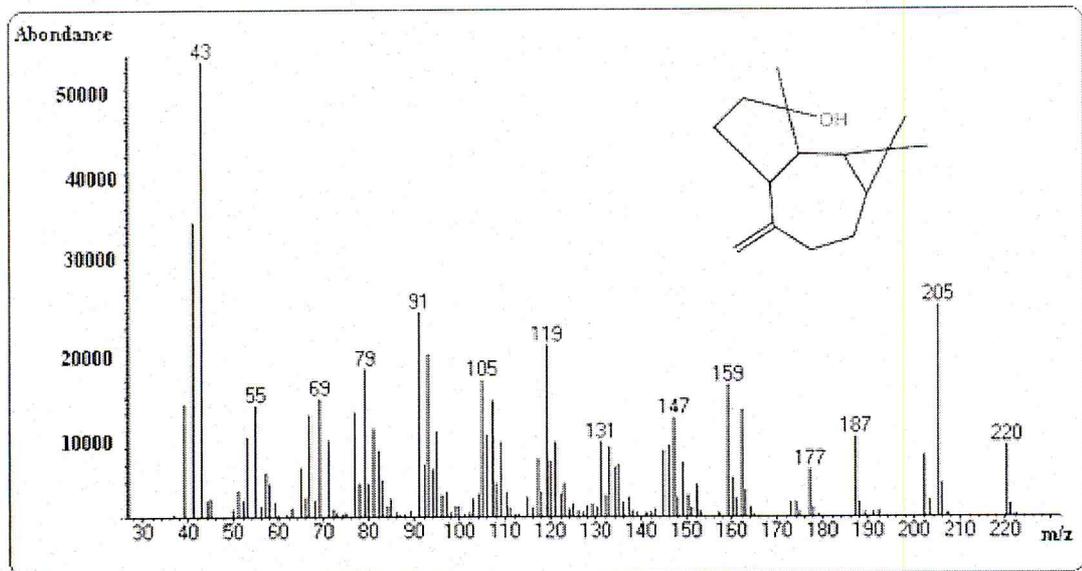


Figure II.13 : Spectre de masse de spathulenol $C_{15}H_{24}O$

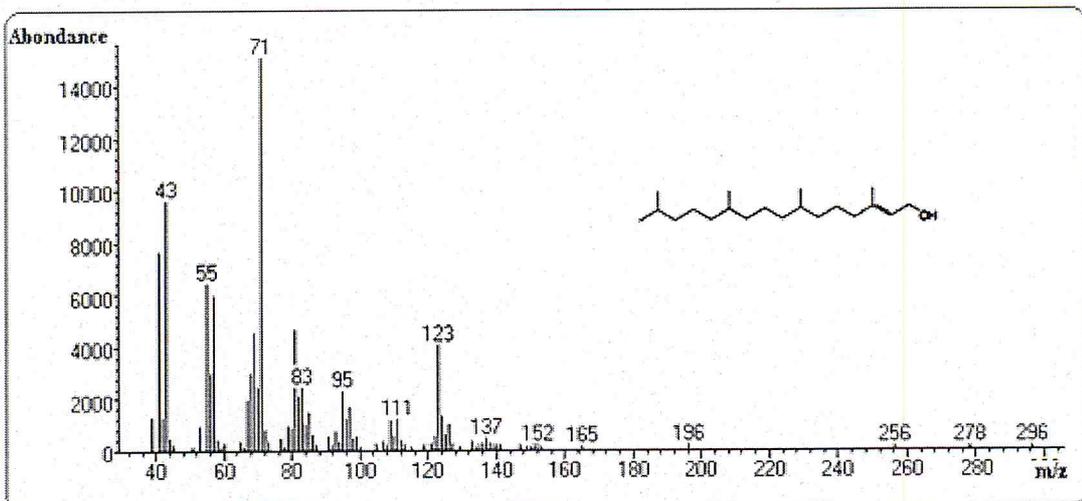


Figure II.14 : Spectre de masse de phytol $C_{20}H_{40}O$

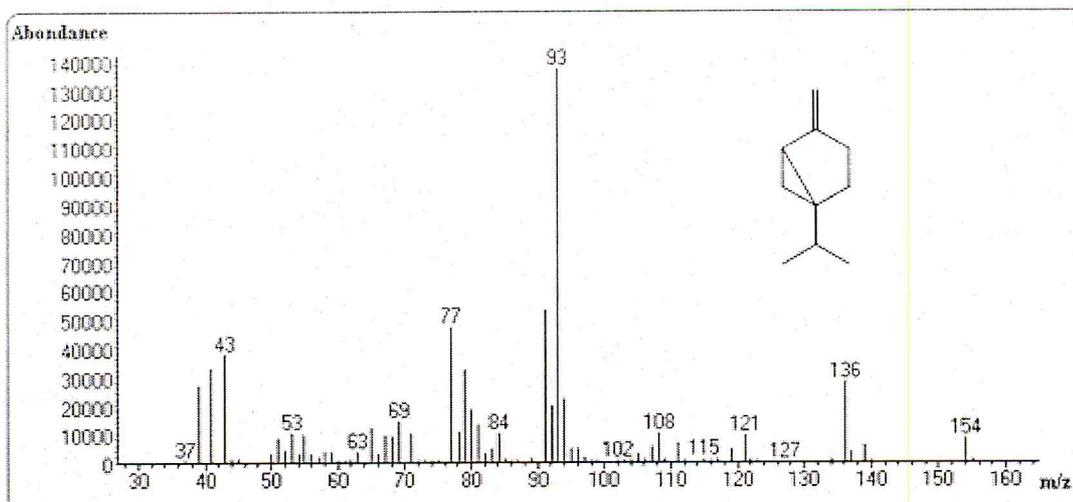


Figure II.15 : Spectre de masse de sabinène C₁₀H₁₆

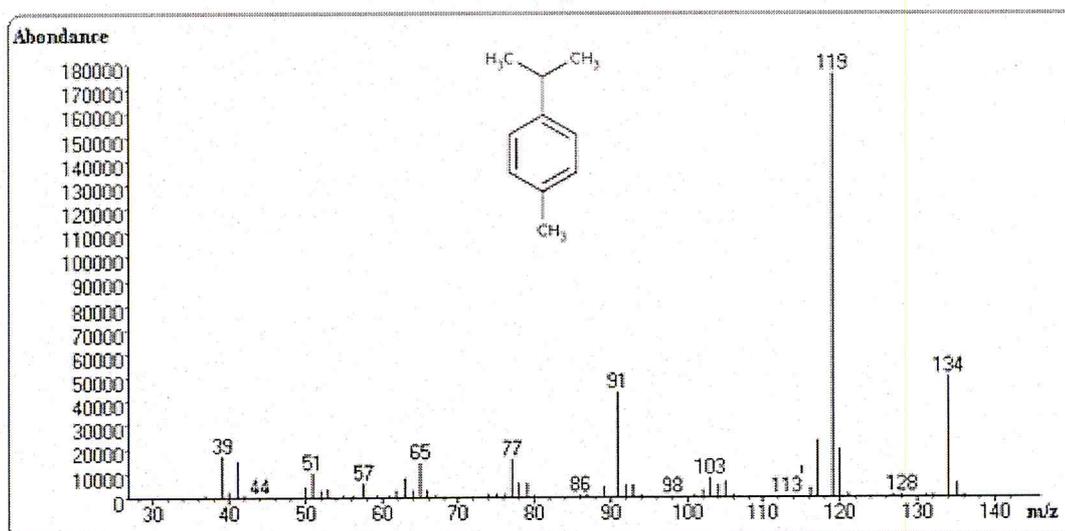


Figure II.16 : Spectre de masse de p-cimène C₁₀H₁₄

II.3.3.3 Identification des produits de l'HE de thym

A partir de la figure II.17 et des tableaux II.6 et II.7 la composition de l'HE de thym a été mise en évidence.

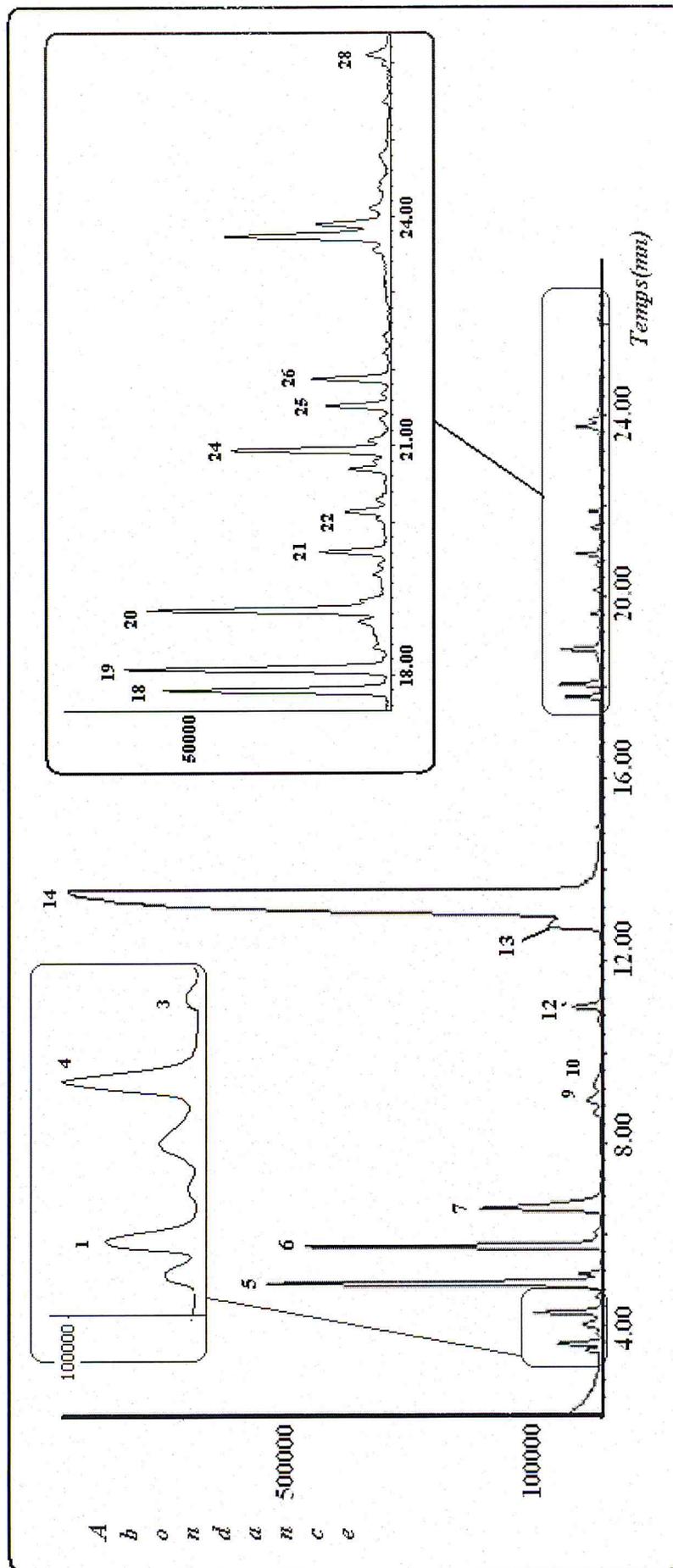


Figure II.17 : Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de *Thym*

Tableau II.6: Composition chimique de l'huile essentielle de *thym*

Ordre d'élution	T _R (mn)	Nom	Formule	%
1	3.596	alpha.-pinene	C ₁₀ H ₁₆	1.177
2	4.015	*NI		0.735
3	4.276	beta.-Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	1.556
4	4.638	l-Phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	0.131
5	4.933	o-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	9.313
6	5.737	gamma.-Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	7.093
7	6.576	linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	4.903
8	8.650	*NI		0.437
9	8.944	4-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.719
10	9.273	dihydrocarvone	C ₁₀ H ₁₆ O	0.599
11	10.723	*NI		0.174
12	11.007	carvacrol methyl ether	C ₁₁ H ₁₆ O	0.888
13	12.820	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	2.978
14	13.522	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	63.574
15	14.950	*NI		0.105
16	16.469	*NI		0.103
17	16.775	*NI		0.056
18	17.794	alpha.-Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	0.646
19	18.078	Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.802
20	18.837	Aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	1.147
21	19.619	adromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	0.219
22	20.140	alpha.-Copaene	C ₁₅ H ₂₄	0.254
23	20.707	*NI		0.162
24	20.945	Ledene	C ₁₅ H ₂₄	0.572
25	21.523	Gamma-cadinene	C ₁₅ H ₂₄	0.252
26	21.885	delta.-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	0.225
27	23.744	*NI		1.022
28	26.112	*NI		0.159

(*): Non Identifié.

Tableau II.7: Classes de produits terpéniques dans l'huile essentielle de *Thym*

Classes		Nom	Taux	
M O N O T E R P E N E S	Hydrocarbonés	alpha.-pinene	1.177	
		beta.-Myrcene	1.556	
		l-Phellandrene	0.131	
		o-Cymene	9.313	
		gamma.-Terpinene	7.093	
			19.270	
	Oxygénés	linalool	4.903	
		4-Terpineol	0.719	
		dihydrocarvone	0.599	
		carvacrol methyl ether	0.888	
		Thymol	2.978	
		Carvacrol	63.574	
		73.661		
S E S Q U I T E R P E N E S	alpha.-Gurjunene	0.646		
	Caryophyllene	0.802		
	Aromadendrene	1.366		
	adromadendrene	0.219		
	alpha.-Copaene	0.254		
	Ledene	0.572		
	Gamma-cadinene	0.252		
	delta.-Cadinene	0.225		
		4.117		

L'huile essentielle de *Thym* analysée est caractérisée par une importante fraction terpénique (figure. II.18). Il faut noter la prédominance des monoterpènes oxygénés environ 74% (carvacrol, thymol, linalool) et hydrocarbonés avec 19% (terpinène et myrcène) par rapport aux sesquiterpènes qui sont seulement des hydrocarbures avec un taux de 4%, on peut citer : l'aromadendrene et le caryophellene. Le spectre de masse du composé majoritaire (carvacrol) est donné par la figure II.19

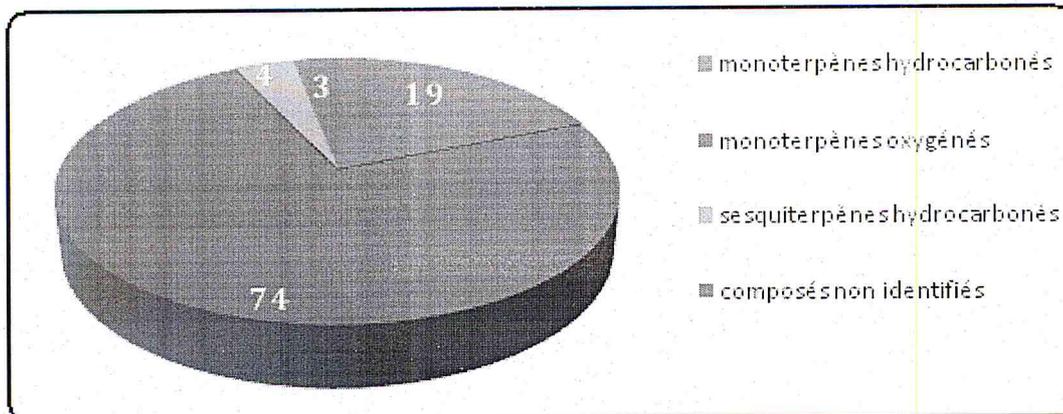


Figure II.18 : Représentation de la composition chimique de l'huile essentielle de thym

L'analyse par GC-MS a révélé que notre échantillon est composé principalement du carvacrol (63.57 %), accompagné d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : o-cymène (9.13 %), g-terpinène (7.09 %), linalool (4.9 %) et le thymol (2.98 %). Cette composition chimique est sensiblement analogue à celle d'une huile essentielle de *T.ciliatus* originaire de Tunisie et de Maroc [23].

Par contre notre huile essentielle est complètement distincte de celle de *T.algeriensis* [24]. En effet, le carvacrol composé principal de notre essence est absent dans le *T.algeriensis*. D'autre coté, le camphre composé dominant de *T.algeriensis* est absent dans l'huile essentielle qu'on a préparé. Aussi, l' α -pinène qui est un composé majoritaire de *T.algeriensis* existe en faible quantité dans l'HE qu'on a extraite.

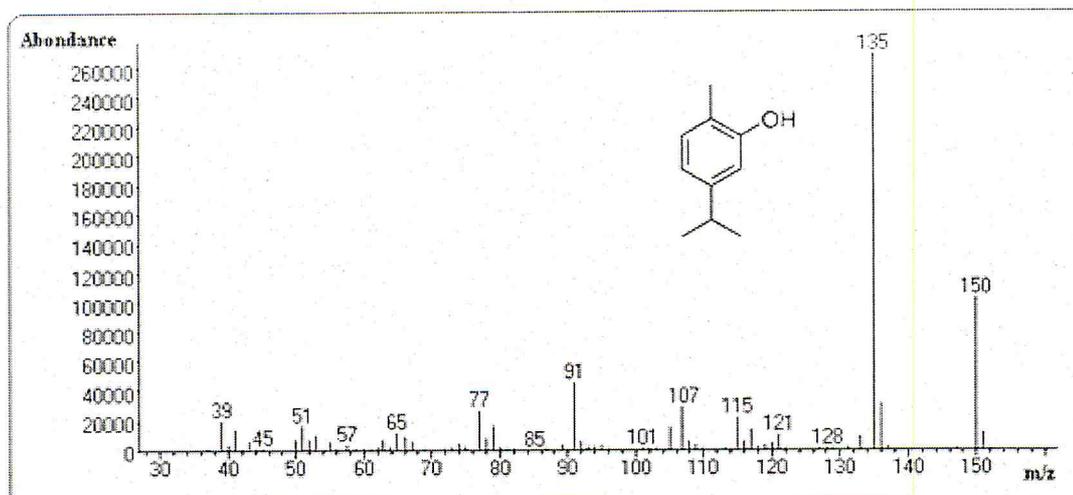
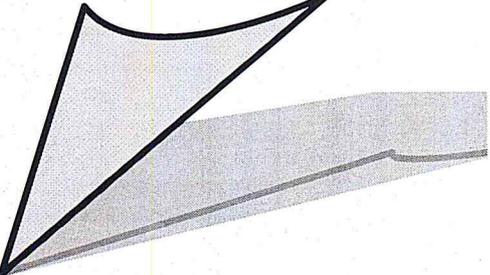


Figure II.19 : Spectre de masse de carvacrol $C_{10}H_{14}O$

Il est à noter que les résultats obtenus par CG-SM des huiles essentielles étudiées vont être considérer comme références dans les différentes déterminations par spectrométrie IRTF.

Chapitre III
Dosage de monoterpes de
différentes huiles
essentielles par IRTF



III.1 Introduction

La spectrométrie IRTF a été souvent utilisée pour des analyses qualitatives. Il existe peu de travaux qui ont utilisé la spectrométrie IRTF pour la détermination quantitative des métabolites secondaires dans les plantes. Recemment, nous avons développé au sein de notre laboratoire, une méthode d'analyse pour la détermination du taux de stérols dans l'algue rouge *asparagopsis armata* et dans une série d'algues brunes par spectrométrie IRTF [46, 47].

L'objectif principal du présent travail est le développement d'une nouvelle méthode analytique pour la détermination des monoterpènes menthol, eucalyptol et cinéole, contenus dans les huiles essentielles extraites à partir des plantes aromatiques : menthe, thym et eucalyptus, respectivement. Le dosage est effectué par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

III.2 Partie expérimentale

III.2.1 Appareillages et réactifs

Les spectres sont enregistrés sur un spectrophotomètre à transformée de Fourier type IRTF-4100, équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré (DSTG) à température stabilisée, d'une séparatrice de radiation en KBr, d'une fente type global et d'un système de processus digital (SPD) et ce, dans l'intervalle de nombre d'ondes de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ (infrarouge moyen). Les fenêtres utilisées sont de fluorure de calcium (CaF_2). Les spectres ont été obtenus à une résolution nominale de 4 cm^{-1} et en accumulant 10 balayages par spectre et par rapport à un background stabilisé préalablement dans les mêmes conditions instrumentales avec une cellule remplie de solvant pur utilisé pour la préparation de solution (CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène).

L'introduction des solutions se fait par écoulement bloqué (stop flow). Pour cela une cellule conventionnelle a été modifiée au niveau de notre laboratoire en une cellule de flux. L'avantage d'une telle 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. Des

tubes de téflon de diamètre intérieur de 0.8 mm, sont utilisés pour faire passer l'échantillon dans la cellule. Le flux est stoppé momentanément, une fois la cellule est remplie. A ce moment un spectre correspondant à l'échantillon est enregistré entre 1000 et 4000 cm^{-1} .

Les spectres enregistrés sont traités à l'aide d'un macro qui a été construit à partir de l'option (*ApPro*) développée par *Win first*.

La Figure III.1 montre l'instrumentation utilisée pour effectuer les mesures.

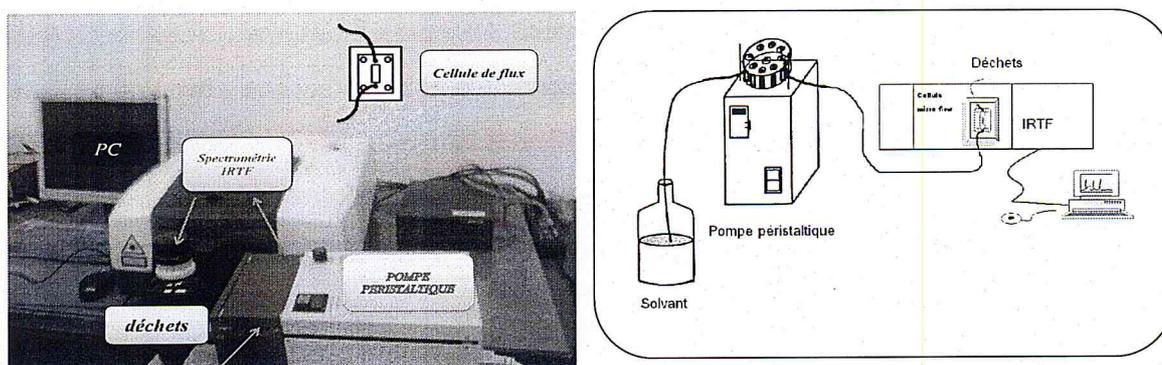


Figure III.1 : Montage IRTF utilisé pour la détermination

Tous les réactifs utilisés sont de grade analytique.

III.2.2 Procédure générale

III.2.2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons des HE de menthe, d'eucalyptus et de thym sont préparés comme indiqué dans la section II.2.

III.2.2.2 Dosage des monoterpènes dans les plantes aromatiques par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTFT)

Plusieurs méthodes ont été proposées pour la quantification des monoterpènes de différentes espèces. Dans ce travail on s'est intéressé à l'utilisation de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTFT) pour le dosage des terpènes sans traitement préalable dans des huiles essentielles.

Une masse bien précise d'HE de chaque plante étudiée a été diluée dans un volume bien déterminé de dichlorométhane stabilisé avec l'amylène.

Les spectres IRTF sont enregistrés à une résolution de 4 cm^{-1} avec l'accumulation de 10 spectres, en considérant le background de la cellule remplie avec du dichlorométhane obtenu dans les mêmes conditions spectrales.

Les valeurs maximales d'absorbance des monoterpènes considérés ont été obtenues, en mesurant la hauteur de pics à la bande sélectionnée.

Les valeurs d'absorbance corrigées avec des lignes de base appropriées ont été extrapolées dans la droite d'étalonnage correspondante dans un domaine de concentration qui varie de 0.75 à 10 mg.ml^{-1} .

III.2.2.3 Détermination des monoterpènes dans l'huile essentielle de plantes par spectrométrie IRTF

Des masses d'huile essentielle des menthes fraîche et sèche, d'eucalyptus et de thym de 37 mg, 91.5 mg, 82.6 mg et 437 mg, respectivement ont été diluées dans 5ml de dichlorométhane, dans le but de leur analyse par spectrométrie IRTF.

III.3 Résultats et discussions

III.3.1 Spectre de menthol

La figure III.2 montre le spectre IRTF de la solution étalon de menthol de concentration 5 mg.ml^{-1} réalisé en solution dans le CH_2Cl_2 .

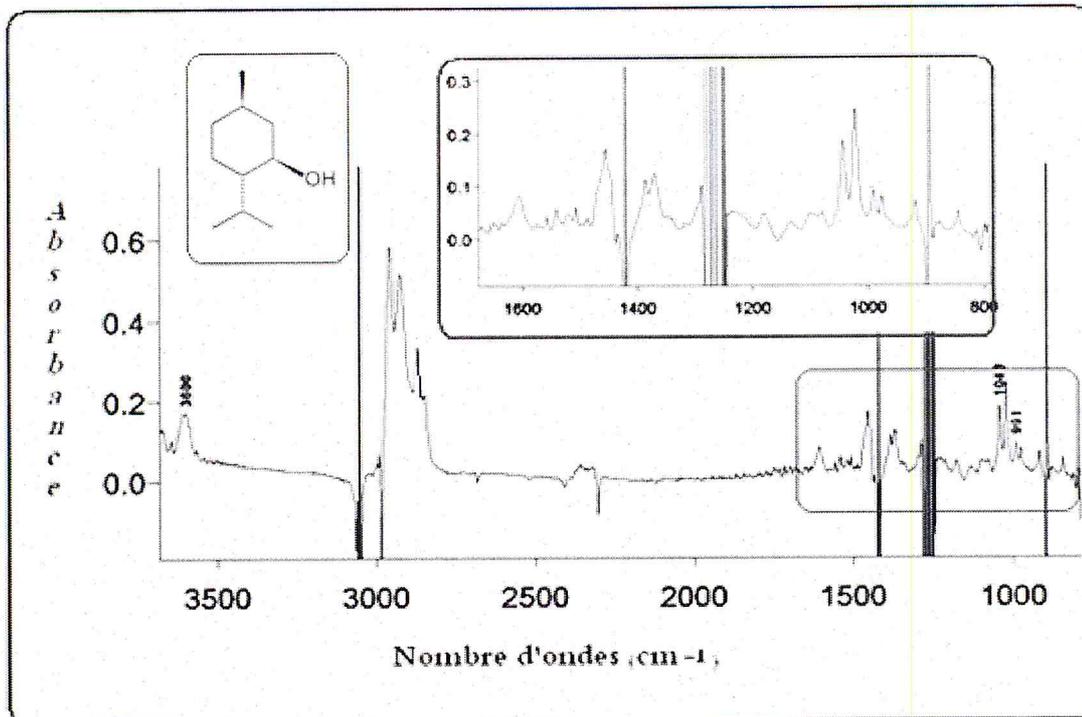


Figure III.2 : Spectre d'absorbance IRTF de menthol (5 mg.ml⁻¹)

Une étude détaillée relative au mode de mesure des valeurs d'absorbance et aux différentes alternatives de correction de ces valeurs par spectrométrie IRTF a été réalisée. La gamme s'étale de 800-4000 cm⁻¹ car au dessous de 800cm⁻¹ les fenêtres de la cellule sont opaques.

On constate que le spectre présente une bande intense à 3608 cm⁻¹ caractéristique des O-H, il montre aussi des bandes dans la région entre 2960 cm⁻¹ et 2850 cm⁻¹ liées aux vibrations des groupes CH₂ et CH₃, les bandes entre 1360 cm⁻¹ et 1450 cm⁻¹ présentent la déformation des groupes CH, CH₂ et CH₃. une zone entre 1020 et 1100 cm⁻¹, caractéristique du groupement C-O, la bande à 975 cm⁻¹ caractéristique de l'isopropyl.

Afin de sélectionner la bande spécifique du menthol pour réaliser la détermination quantitative, les spectres d'absorbance pour une série de solutions de menthol préparés dans le CH₂Cl₂ stabilisé avec l'amylène et ce, dans un domaine de concentration allant de 0.75 a 10 mg.ml⁻¹ sont obtenus (figure III.3).

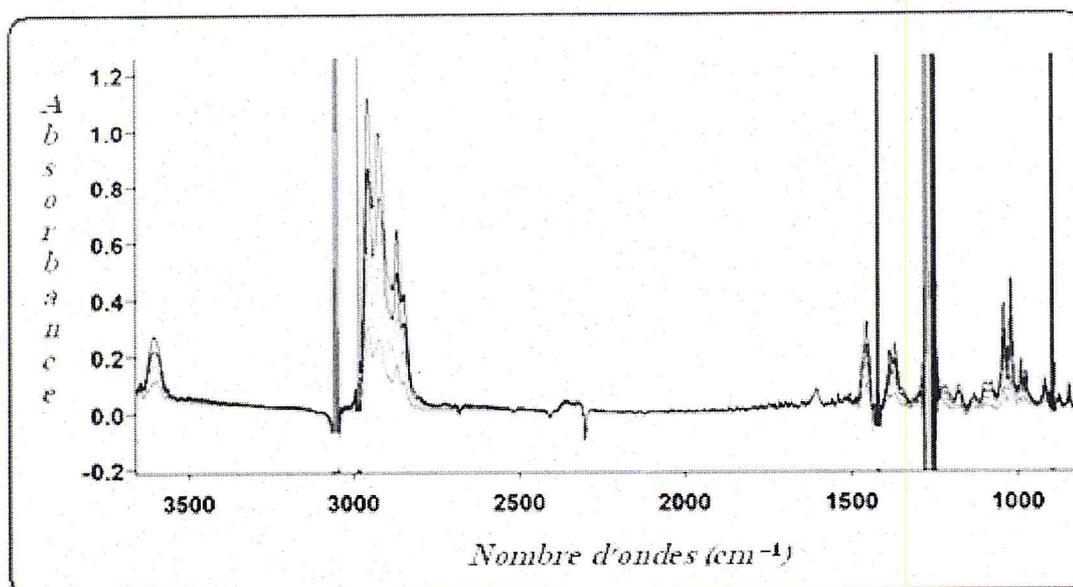


Figure III.3 : Spectres d'absorbance des solutions de menthol préparé dans CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre $0.75\text{-}10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Les caractéristiques analytiques du menthol dilué dans CH_2Cl_2 sont établies (tableau III.1).



Tableau III.1 : Caractéristiques analytiques du menthol préparé directement dans CH₂Cl₂ stabilisé par l'amylène

<i>max</i> <i>(L.B.)</i> <i>(cm⁻¹)</i>	<i>Droite de calibration</i>	<i>Coefficient</i> <i>de</i> <i>corrélation</i>	<i>L.D (μg.ml⁻¹)</i>	<i>D.S.R. en %</i> <i>(n=10)</i>
844 (832-857)	0.007722C+0.001266	0.9997	0.23	0.79
975 (852-969)	0.006577C+0.002148	0.9991	0.88	3.57
991 (982-1001)	0.010795C-0.003583	0.9998	0.52	2.78
1023 (1003-1033)	0.035407C+0.009070	0.9997	0.18	0.73
1043 (1032-1051)	0.024075C+0.000365	0.9999	0.15	0.77
2861 (2858-2871)	0.020573C+0.00079	0.9999	0.08	0.14
2958 (2942-2966)	0.042526C+0.005248	0.9998	0.41	2.35
3608 (3391-3776)	0.020256C+0.020845	0.9996	0.08	0.64

C: Concentration en mg.ml⁻¹.

D.S.R (%) : Déviation Standard Relative (pour C = 5 mg.ml⁻¹).

L.D: Limite de détection en μg.ml⁻¹ obtenue pour un niveau de confiance de 99.6 % (K=3).

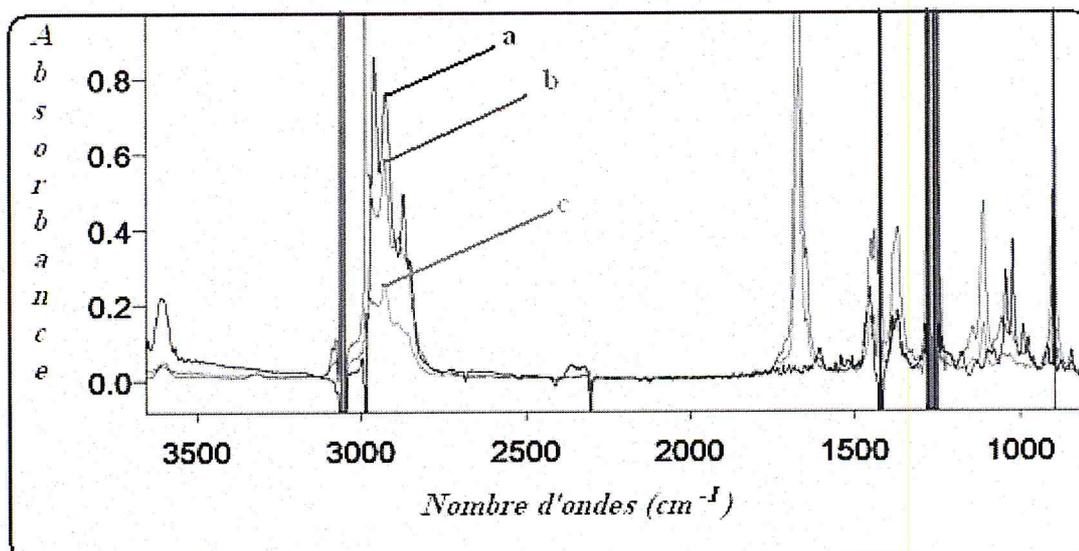
L.B: Ligne de base.

Les conditions expérimentales : Chemin optique 0.5 mm, résolution nominale 4 cm⁻¹, nombre de balayage 10, background de la cellule remplie de CH₂Cl₂/amylène.

D'après le tableau III.1, on constate que les différentes bandes étudiées fournies des caractéristiques analytiques moyennes à savoir la faible limite de détection et la déviation standard relative ainsi que la bonne corrélation. La quelle des bandes qu'il faut choisir pour quantifier le menthol ? Le choix est difficile.

III.3.2 Analyse de menthol dans l'HE de la menthe par spectrométrie IRTF

D'après la figure III.4, on a constaté que les deux spectres des menthes fraîche et sèche sont identiques, donc on peut utiliser l'un ou l'autre dans la détermination.



**Figure III.4 : Spectres IRTF de menthol a), HE de menthe sèche b),
HE de menthe fraîche c)**

Si on compare le spectre d'étalon de menthol avec celui d'un échantillon réel de menthe sèche (figure III.4), on observe que la bande intense à 1670 cm^{-1} dans l'échantillon est absente dans l'étalon. On a estimé que cette bande est caractéristique d'un produit majoritaire et à l'aide d'un travail effectué au sein de notre équipe nous avons trouvé que cette bande coïncide avec la bande caractéristique de la carvone qui donne un taux de 60%.

On peut constater que la détermination directe du menthol dans la menthe par spectrométrie IRTF pourrait être encore difficile pour cela on a fait appel à la calibration par addition standard qui consiste à ajouter des quantités connues d'une solution étalon à un prélèvement d'échantillon. Lors de l'enrichissement par addition standard un nouveau paramètre s'impose, alors on a calculé ce qu'on appelle l'exactitude.

$$Exactitude = \frac{C_{\text{trouvée}}}{C_{\text{présente}} + C_{\text{ajoutée}}} * 100$$

$C_{\text{trouvée}}$: concentration calculée à partir de la droite d'étalonnage dans le cas du spectre de l'HE additionnée d'étalon.

$C_{\text{présente}}$: concentration calculée à partir de la droite d'étalonnage pour le spectre de l'HE.

$C_{\text{ajoutée}}$: concentration d'étalon ajouté.

Dans la figure III.5 on a montré les spectres de menthol, d'HE de menthe et le de l'HE enrichie avec une masse bien précise de menthol.

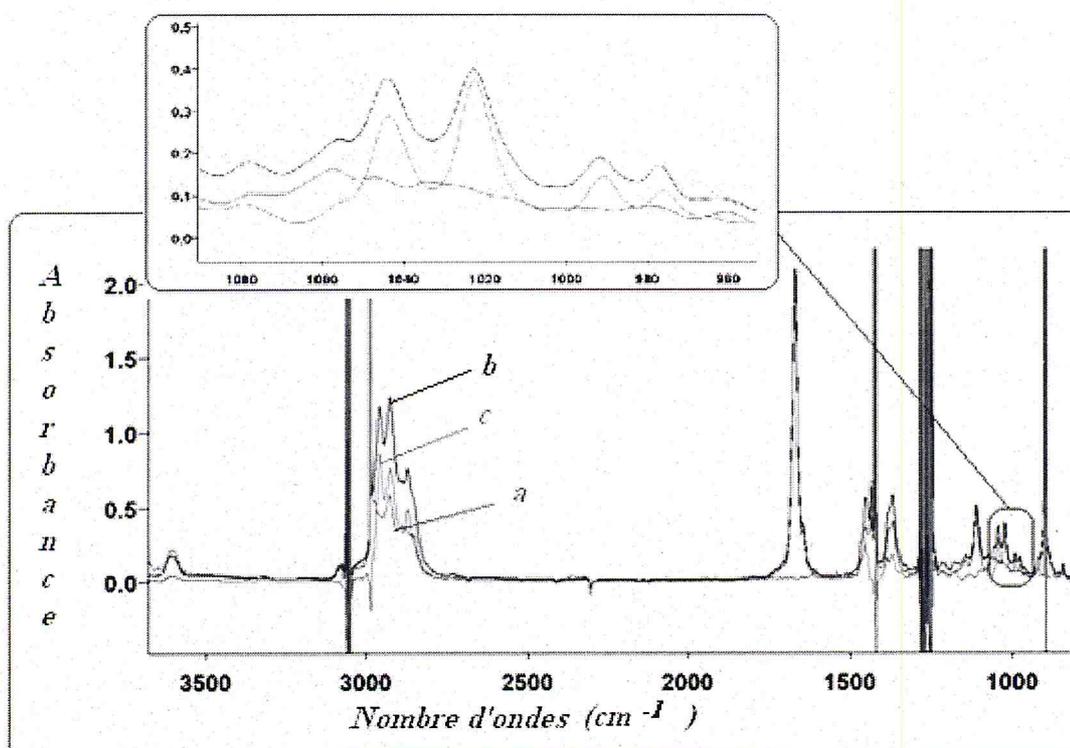


Figure III.5 : Spectres IRTF d'HE de menthe a), de menthe enrichie b) et de menthol c)

L'examen de la figure III.5 montre que les quatre bandes présentes dans l'étalon et dans l'HE, enrichie en étalon sont absentes dans l'HE de menthe. Ces quatre bandes qui sont 975 cm^{-1} , 991 cm^{-1} , 1023 cm^{-1} et 1043 cm^{-1} (situées dans la zone des empreintes digitales) vont être considérées dans la détermination du menthol dans la menthe (tableau III.2).

Tableau III.2 : Teneurs du menthol dans la menthe en utilisant la calibration par addition standard

Bande (cm ⁻¹)	Ligne de base corrigée (cm ⁻¹)	Concentration de menthol dans l'HE de menthe (mg.ml ⁻¹)	Teneur en masse de menthol dans l'HE de menthe (%)	Concentration de menthol dans l'HE de menthe enrichie avec menthol (mg.ml ⁻¹)	Exactitude (%)
975	973-986	2.78	15.19	20.48	278
991	987-1003	1.27	6.94	15.19	171
1023	1010-1034	3.3	18.03	11.02	117
1043	1019-1071	1.2	6.55	15.57	213

Le tableau III.2 montre des valeurs d'exactitude intolérables, ce qui rend la détermination du taux de menthol dans la menthe délicate. Pour plus de précision on a fait appel aux spectres dérivés.

III.3.3 Détermination du menthol dans la menthe par spectrométrie IRTF en utilisant le spectre dérivé

Pour quoi le spectre dérivé ?

La spectrométrie dérivée peut être très intéressante pour résoudre le problème d'identification ou permettre de savoir si un produit est pur ou en mélange. Cette méthode met très clairement en évidence les changements de pente des spectres et permet ainsi de noter les points d'inflexion avec précision. En conséquence, cette technique doit permettre de définir beaucoup plus clairement les caractéristiques du spectre d'une substance [52].

Cette méthode est déjà utilisée par notre équipe pour résoudre le problème des interférences [53].

Afin de donner le taux du menthol dans la menthe on a établi d'abord les droites de calibration à partir des spectres dérivés d'une série de solutions étalons de menthol préparée directement dans le CH₂Cl₂ dans un domaine de concentration varie de 0.75-10 mg.ml⁻¹ (figure III.6).

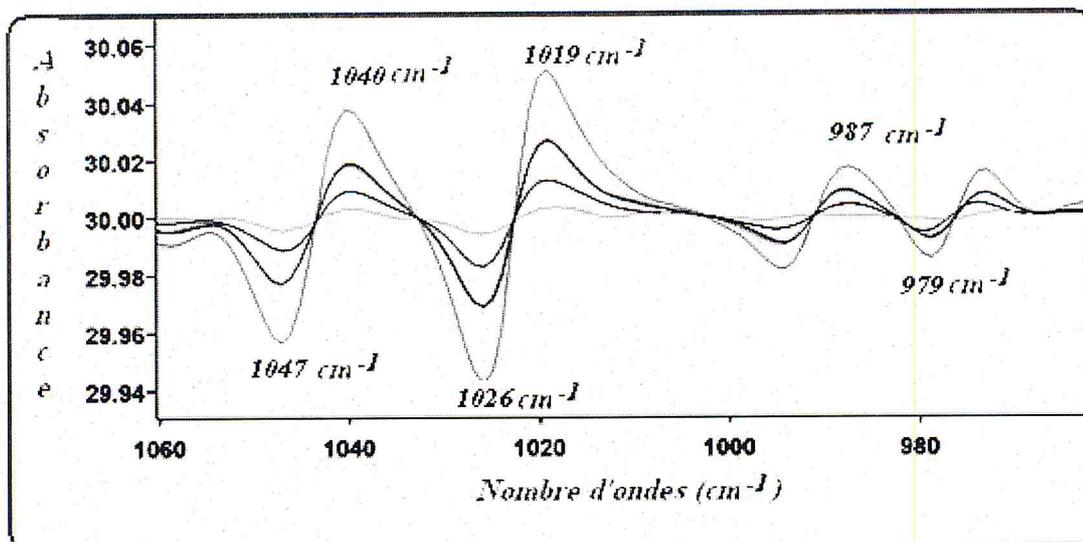


Figure III.6 : Spectres dérivés d'une série d'étalons de menthol

Le tableau III.3 regroupe les caractéristiques analytiques du menthol préparé dans CH_2Cl_2 en considérant le spectre dérivé.

Tableau III.3 : Caractéristiques analytiques du menthol dans CH_2Cl_2 en considérant les spectres dérivés

Bande (cm^{-1})		Ligne de base (cm^{-1})	Droites d'étalonnage.	Coefficient de corrélation.
975 : volet gauche (979).		970-1002	0.001806C+0.000580	0.9996
991 : volet droit (987).			0.0061661C+0.000446	0.9998
1023	1026	947-1179	0.005636C+0.001214	0.9993
	1019		0.005377C-0.000220	0.9999
1043	1047		0.004006C+0.000424	0.9999
	1040		0.003909C+0.000153	0.9996

Les valeurs d'absorbance de l'huile essentielle de menthe et de celle additionnée de menthol sont extrapolées dans les droites de calibration obtenues pour des solutions étalons de menthol, en considérant le spectre dérivé concernant chacune

des bandes 979 cm^{-1} , 987 cm^{-1} , 1019 cm^{-1} , 1026 cm^{-1} , 1040 cm^{-1} et 1047 cm^{-1} . Les étalons sont traités de la même manière que les échantillons.

Le tableau III.4 donne les taux de menthol dans la menthe ainsi que l'exactitude.

Tableau III.4: Taux du menthol dans la menthe en utilisant la spectrométrie IRTF dérivée

<i>Bande (cm-1). (par rapport l'HE)</i>	<i>Concentration de menthol dans l'HE de menthe (mg.ml⁻¹)</i>	<i>Teneur en masse de menthol dans l'HE de menthe (%)</i>	<i>Concentration de menthol dans l'HE de menthe enrichie avec menthol (mg.ml⁻¹)</i>	<i>Exactitude (%)</i>
<i>975 : volet gauche (985)</i>	2	10.92	6.24	77.08
<i>991 : volet droit (990)</i>	1.29	7.04	6.1	82.54
1023	1036	0.25	4.83	74.42
	1023	0.58	6.03	90.27
1043	1049	0.5	6.16	93.33
	1043	1.11	6.76	93.75

L'examen de tableau III.4 révèle une meilleure exactitude pour la bande à 1049 cm^{-1} stabilisée avec la ligne de base entre 947 cm^{-1} et 1179 cm^{-1} . On note que malgré l'utilisation du spectre dérivé il ya toujours un léger déplacement de cette bande par rapport à celle de l'étalon (figure III.7). Alors, on a extrapolé la valeur de l'absorbance de l'huile essentielle à 1049 cm^{-1} dans la droite de calibration du menthol à 1047 cm^{-1} . Le tableau III.5 donne les caractéristiques analytiques de cette bande.

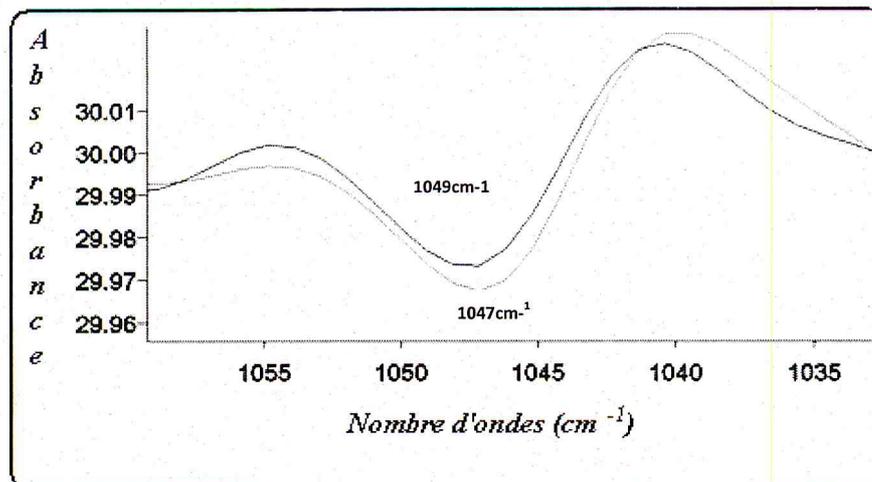


Figure III.7 : Spectres dérivés de l'HE de menthe (jaune), de l'HE enrichie et de menthol

Tableau III.5 : Caractéristiques analytiques de menthol à 1047 cm^{-1}

Droite de calibration	$0.004006C + 0.000424$
Coefficient de corrélation	0.9998
L.D. ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	0.298
D.S.R. (%)	0.28
Domaine de concentration (mg.ml^{-1})	0.75-10

C: Concentration en mg.ml^{-1}

D.S.R. (%) : Déviation Standard Relative (pour $C = 5 \text{ mg.ml}^{-1}$)

L.D : Limite de détection en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ obtenue pour un niveau de confiance de 99.6 % ($K=3$).

D'après les résultats du tableau III.5 on confirme que cette bande présente encore de faible limite de détection et de déviation standard relative. Alors cette bande caractéristique est choisie pour déterminer le menthol dans la menthe, elle donne un taux de menthol de 2.7 %.

L'analyse de l'huile essentielle de menthe par CG-SM a montré que cette dernière est dépourvue de menthol. On rappelle qu'il s'agit d'une huile essentielle qui a été préparée et stockée au laboratoire il y a quelques mois.

L'absence du menthol dans cette huile est du probablement à la perte de ce constituant volatil au cours de stockage [54]. Par contre, l'huile essentielle de menthe étudiée par spectrométrie IRTF a été fraîchement préparée et analysée.

III.3.4 Spectre IRTF de 1,8 cinéole

Le spectre d'absorbance d'un étalon d'eucalyptol préparé directement dans le CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène de concentration de 5mg.ml^{-1} est représenté dans la figure III.8.

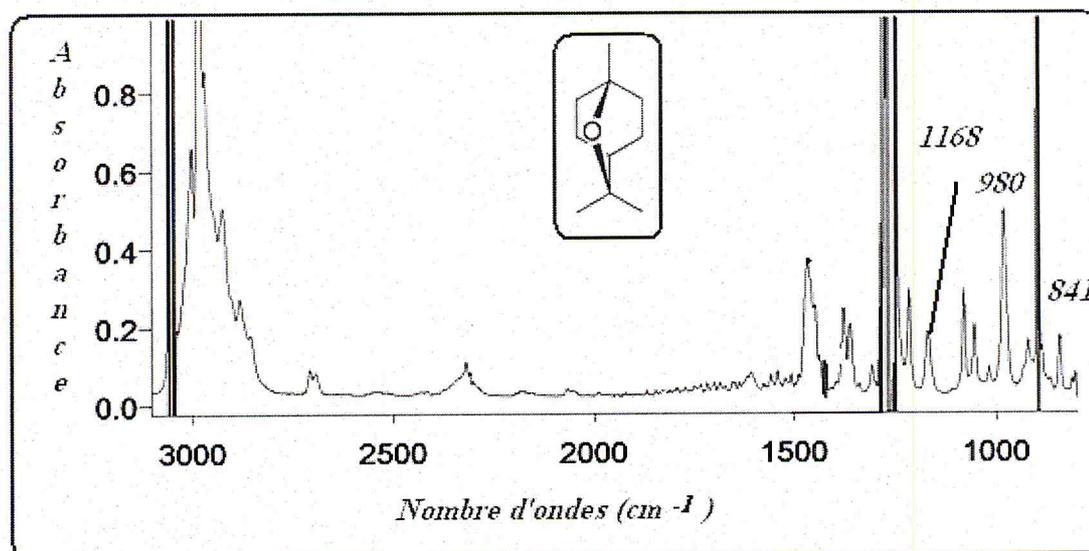


Figure III.8 : Spectre d'absorbance IRTF d'eucalyptol (5 mg.ml⁻¹)

Le spectre montre des bandes dans la région entre 2970 cm^{-1} et 2860 cm^{-1} liées aux vibrations d'élongation des groupes CH_2 et CH_3 , la région entre 1464 cm^{-1} et 1300 cm^{-1} présente les vibrations de déformation des groupes CH et CH_3 . Les 3 bandes à 1055 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} et 1168 cm^{-1} caractéristiques de groupement C-O d'un éther,

Afin de sélectionner la bande spécifique d'eucalyptol pour réaliser la détermination quantitative, les spectres d'absorbance pour une série de solutions d'eucalyptol préparée directement dans le CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène et ce, dans un domaine de concentration allant de 0.75 à 10 mg.ml^{-1} sont représentés sur la figure III.9.

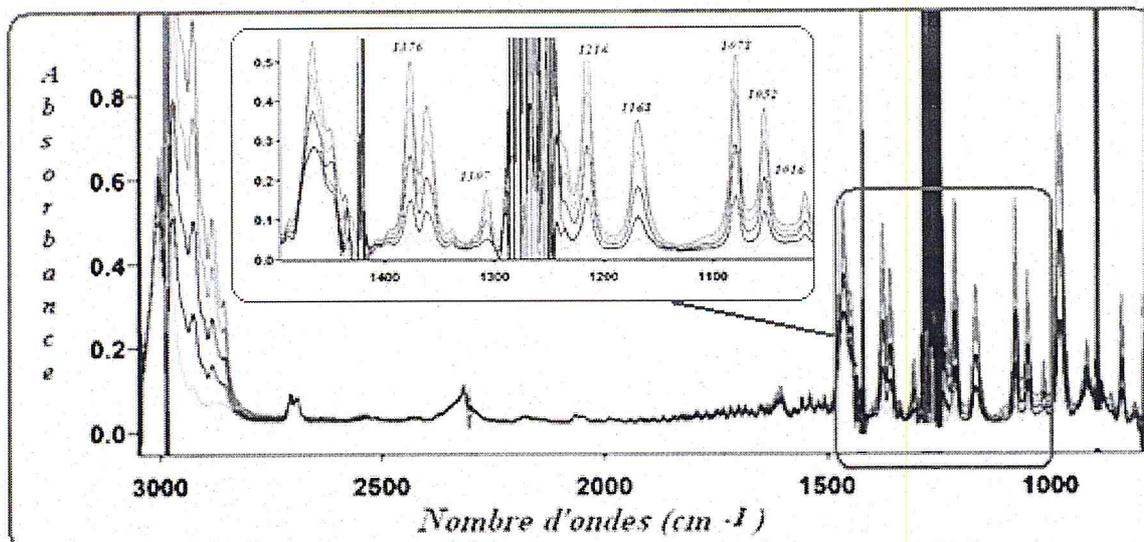


Figure III.9: Spectres d'absorbance des solutions d'eucalyptol préparées dans CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre $0.75\text{-}10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Les caractéristiques analytiques d'eucalyptol dans CH_2Cl_2 sont établies (tableau III.6).

Tableau III.6: Caractéristiques analytiques d'eucalyptol préparé directement dans CH₂Cl₂ stabilisé par l'amylène

<i>Max (L.B.) (cm⁻¹)</i>	<i>Droite de calibration</i>	<i>Coefficient de corrélation</i>	<i>L.D. (µg.ml⁻¹)</i>	<i>D.S.R. en % (n=10)</i>
841 (828-855)	0.0287597C-0.001505	0.9996	0.28	2.35
980 (954-1007)	0.084262C+0.008115	0.9999	0.29	1.98
1016 (1008-1062)	0.008267C-0.003272	0.9999	0.48	5.99
1052 (1036-1066)	0.028042C+0.001974	0.9998	0.27	0.75
1078 (1007-1104)	0.045178C+0.004099	0.9997	0.14	0.76
1168 (1143-1187)	0.029600C+0.003383	0.9999	0.41	0.27
1214 (1193-1227)	0.042484C+0.003430	0.9998	0.23	1.37

C: Concentration en mg.ml⁻¹.

D.S.R (%) : Déviation Standard Relative (pour C = 5 mg/ml).

L.D: Limite de détection en µg.ml⁻¹ obtenue pour un niveau de confiance de 99.6 % (K=3).

L.B: Ligne de base.

Les conditions expérimentales : Chemin optique 0.5 mm, résolution nominale 4 cm⁻¹, nombre de balayage 10, background de la cellule remplie de CH₂Cl₂/amylène

D'après le tableau III.6, on constate que les différentes bandes étudiées fournies des caractéristiques analytiques à savoir la faible limite de détection et la déviation standard relative ainsi que la bonne corrélation, cependant le choix de la bande spécifique est difficile, donc on a sollicité la calibration par addition standard (section III.3.2).

III.3.5 Analyse d'eucalyptol dans l'HE d'eucalyptus par spectrométrie IRTF

En comparant les sensibilités des différentes bandes des trois spectres des solutions : étalon d'eucalyptol (10 mg.ml^{-1}), de l'HE d'eucalyptus (18.52 mg.ml^{-1}) et d'HE d'eucalyptus enrichi avec l'eucalyptol (5 mg.ml^{-1}) préparées directement dans le CH_2Cl_2 (figure III.10), on peut constater que la bande à 1670 cm^{-1} présente dans le spectre de l'huile essentielle d'eucalyptus et celui de l'HE enrichie avec l'eucalyptol est absente dans l'étalon.

La bande à 1168 cm^{-1} peut être sélectionnée pour la détermination de cinéole dans l'HE d'eucalyptus par spectrométrie IRTF. La valeur d'absorbance à 1168 cm^{-1} pour l'HE d'eucalyptus a été corrigée, avec une ligne de base entre $1153 - 1196 \text{ cm}^{-1}$.

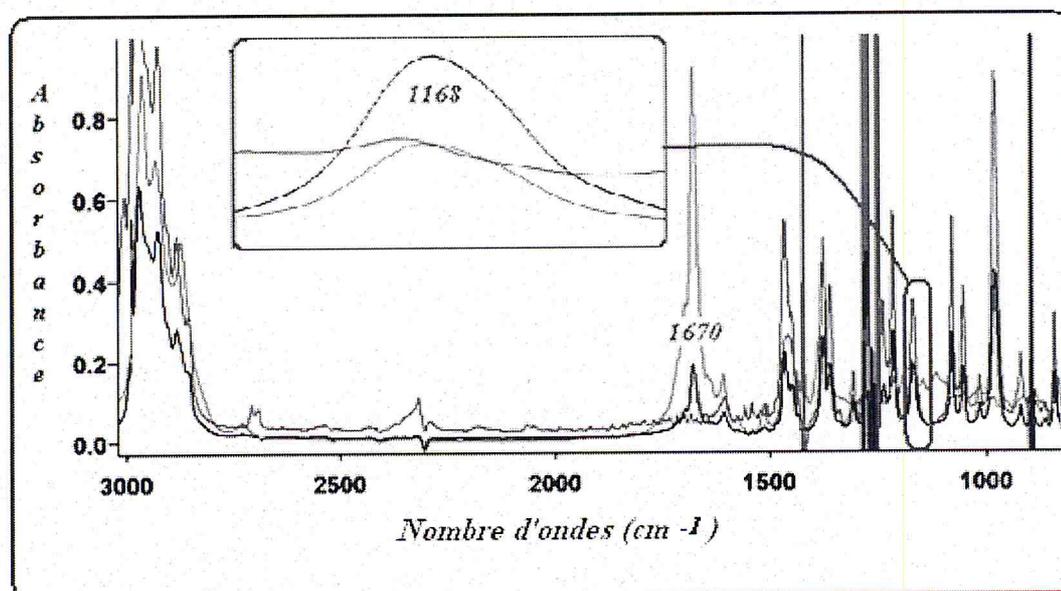


Figure III.10: Spectres IRTF de cinéole , d'HE d'eucalyptus (rouge) et d'HE enrichie

La figure III.10 montre que le spectre de l'HE d'eucalyptus préparée directement dans CH_2Cl_2 en considérant la bande à 1168 cm^{-1} , présente un léger déplacement par rapport aux étalons, pour cela on a fait appel au spectre dérivé (section III.3.3).

La figure III.11 montre les spectres dérivés d'une série d'étalon d'eucalyptol de concentration allant de $0.75-10 \text{ mg.ml}^{-1}$, en considérant les deux volets de la bande à 1168 cm^{-1} .

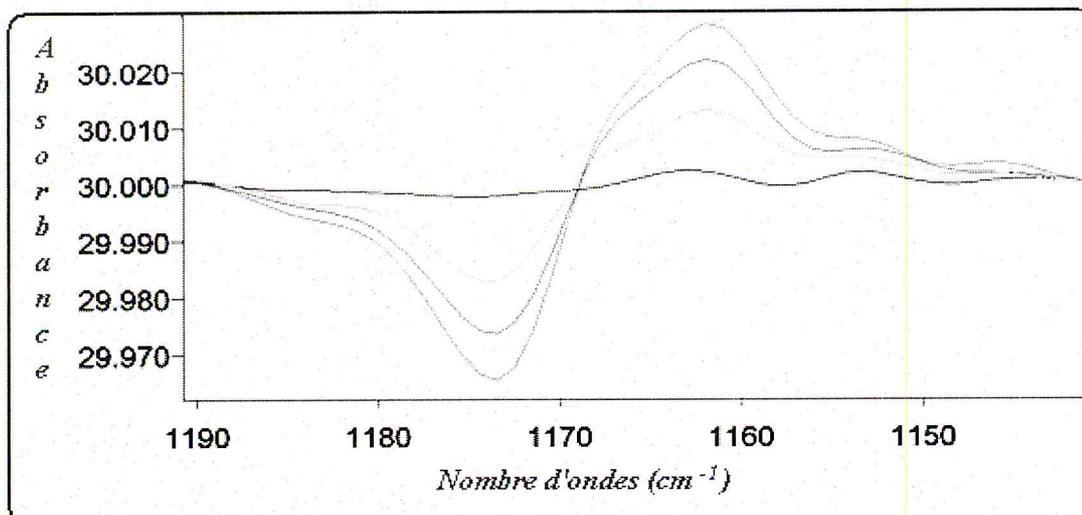


Figure III.11: Spectres dérivés d'une série d'étalons d'eucalyptol

Les caractéristiques analytiques du cinéole préparé dans CH_2Cl_2 en considérant le spectre dérivé sont regroupées dans le tableau III.7.

Tableau III.7: Caractéristiques analytiques d'eucalyptol à 1168 cm^{-1} , en considérant le spectre dérivé

	Volet gauche : 1173 cm^{-1}	Volet droit : 1161 cm^{-1}
Droite de calibration	$0.003567C + 0.000065$	$0.002545C - 0.000147$
Coefficient de corrélation	0.9991	0.9984
L.D. ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	0.21	8.25
D.S.R. (%)	4.62	8.25

D.S.R. (%) : Déviations Standard Relative (pour $C = 5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

L.D : Limite de détection en $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ obtenue pour un niveau de confiance de 99.6 % ($K=3$).

La figure III.12 représente les spectres dérivés d'un étalon d'eucalyptol et d'HE d'eucalyptus préparés directement dans le solvant.

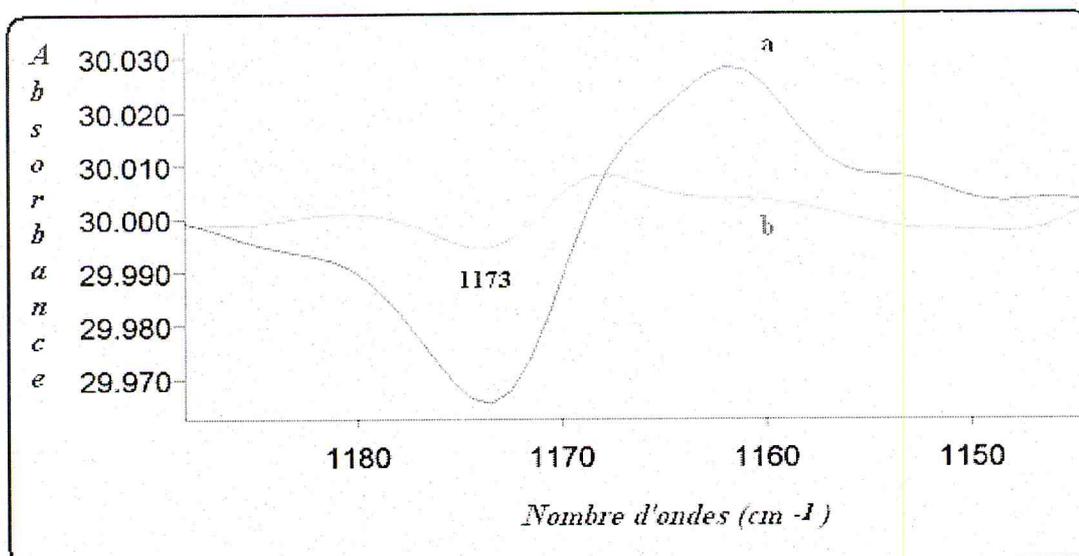


Figure III.12 : Spectres IRTF dérivés d'eucalyptol a) et d'HE d'eucalyptus b)

La spectrométrie IRTF dérivée a pu résoudre le problème d'interférence dans le cas de 1.8 cinéole, en donnant un spectre dérivé de l'HE avec un minimum à 1173 cm^{-1} (volet gauche de la bande directe à 1168 cm^{-1}) qui a la même allure que celle du spectre de l'étalon à cette bande. Seulement, on remarque que la sensibilité de l'HE a diminuée en comparaison avec celle obtenue en considérant la bande du spectre directe à 1168 cm^{-1} .

Le tableau III.8 donne le taux d'eucalyptol dans l'HE d'eucalyptus.

Tableau III.8: Teneur en 1.8 cinéole dans l'HE d'eucalyptus

Taux par IRTF (%)		
Spectre direct à 1168 cm^{-1} (L.B.1153-1196)	Spectre dérivé	
	Volet gauche à 1173 cm^{-1} (L.B.1027-1227)	Volet droit à 1161 cm^{-1} (L.B.1027-1227)
12.6	6.5	12.8

En considérant le volet gauche à 1173 cm^{-1} de la bande directe à 1168 cm^{-1} , le taux d'eucalyptol est de 6.5%.

Il est à noter que la CG-SM n'a pas révélé la présence d'eucalyptol dans l'HE d'eucalyptus cela est probablement dû au stockage qui a causé la perte de quelques composés volatils [54].

III.3.6 : Spectre IRTF de thymol

Le spectre infrarouge de la solution de thymol (10 mg.ml^{-1}) préparé dans CH_2Cl_2 est montré sur la figure III.13.

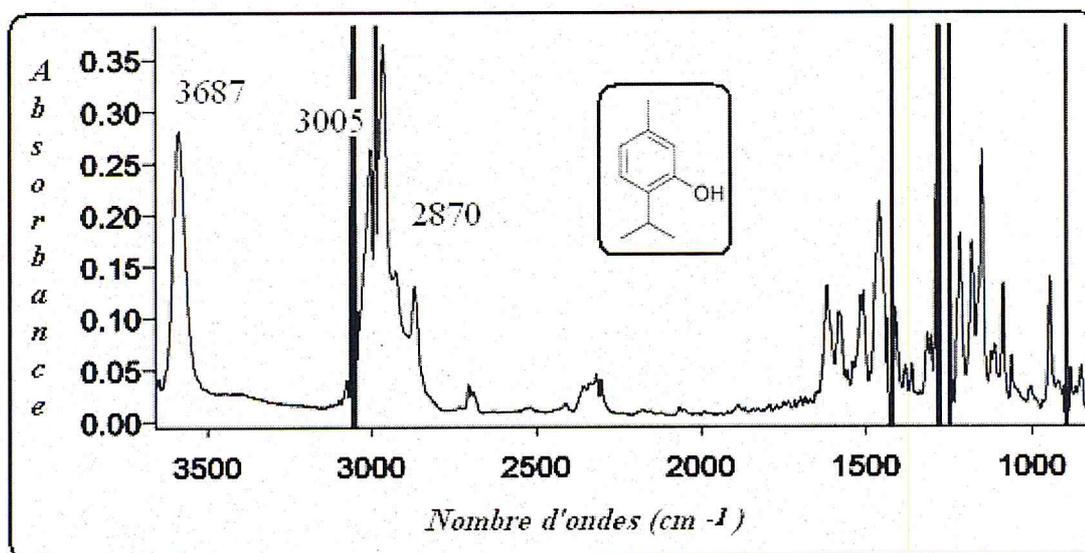


Figure III.13: Spectre d'absorbance IRTF de thymol (5 mg.ml^{-1})

En observant la figure, le spectre montre une bande à 3687 cm^{-1} caractéristique de la fonction OH, ainsi que la bande à 3005 cm^{-1} caractéristique de l'élongation de C=C. Les bandes intenses dans la région entre 2965 cm^{-1} et 2870 cm^{-1} à cause des groupes CH_2 et CH_3 , on peut constater la présence des quatre bandes 1460 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} et 1618 cm^{-1} caractéristique de C=C aromatiques. Le thymol présente également les bandes 1060 et 1085 cm^{-1} correspond à l'alcool C-OH.

Les spectres de thymol à des concentrations variant de 0.75 - 10 mg.ml^{-1} sont représentés dans la figure III.14.

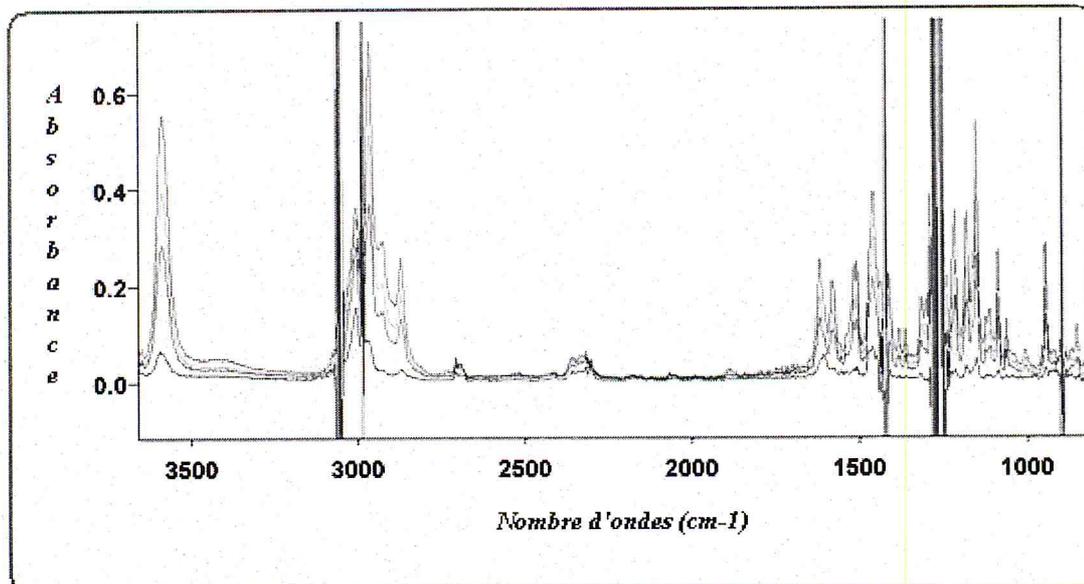


Figure III.14: Spectres d'absorbance du thymol préparé dans CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène pour un domaine de concentration compris entre $0.75\text{-}10 \text{ mg.ml}^{-1}$

Les caractéristiques analytiques de thymol préparé directement dans CH_2Cl_2 , aux différentes bandes d'absorbances sélectionnées, sont regroupées dans le tableau III.9.

Tableau III.9: Caractéristiques analytiques de thymol préparé directement dans CH_2Cl_2 stabilisé par l'amylène

<i>Max (L.B.) (cm⁻¹)</i>	<i>Droite de calibration</i>	<i>Coefficient de corrélation</i>	<i>L.D. (µg.ml⁻¹)</i>	<i>D.S.R. en % (n=10)</i>
945 (936-953)	0.020556C-0.002656	0.9987	0.19	1.18
1086 (1080-1099)	0.016284C+0.000938	0.9990	1.95	3.07
1181 (1169-1188)	0.017396C-0.000549	0.9988	0.24	3.53
1617 (1594-1642)	0.016888C+0.005132	0.9983	0.14	2.80
2871 (2844-2886)	0.012493C-0.005132	0.9960	1.78	7.21

C: Concentration en mg.ml^{-1} .

D.S.R (%) : Déviations Standard Relative (pour C = 5 mg/ml).

L.D: Limite de détection en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ obtenu pour un niveau de confiance de 99.6 % (K=3).

L.B: Ligne de base.

Les 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

III.3.7 Spectres IRTF de thymol et de l'HE de thym

En comparant les spectres des solutions étalons avec ceux d'un échantillon réel (figure.III.15), on peut constater que la détermination directe de thymol dans l'HE de thym par spectrométrie IRTF est impossible à cause du faible taux de thymol dans l'échantillon et la complexité de ce dernier. De ce fait on a fait appel à un traitement de l'HE de thym pour purifier le thymol.

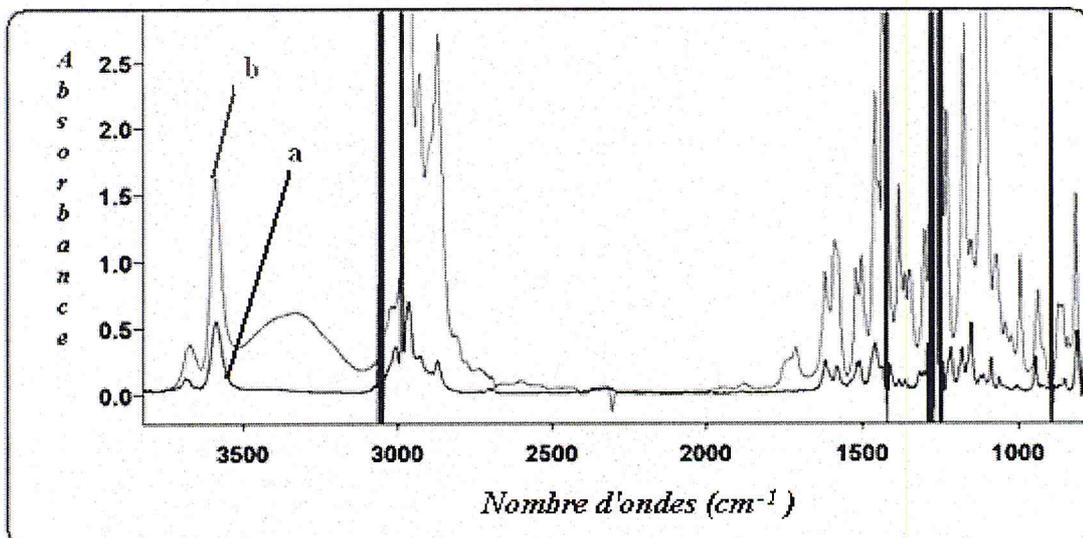


Figure III.15: Spectres IRTF de thymol a) et de l'HE de thym b)

En utilisant le protocole de la référence [55], on n'a pas pu isoler le thymol. En conclusion, pour doser le thymol dans l'HE de thym par spectrométrie IRTF il faut faire appel à une autre méthode de purification et de préconcentration telle que l'extraction en phase solide.

CONCLUSION GENERALE

Cette étude a porté essentiellement sur la contribution au développement d'une méthode analytique simple pour le dosage des monoterpènes dans des huiles essentielles d'origine végétale par spectrométrie IRTF.

L'extraction des huiles essentielles des menthes fraîche et sèche a été effectuée par hydrodistillation et a mené à un rendement de 0.04% et 0.93%, respectivement. Cependant, les huiles essentielles d'eucalyptus et de thym ont été extraites par entraînement à la vapeur d'eau. Les rendements obtenus sont de 0.21% et 3.07%, respectivement.

L'analyse des huiles essentielles obtenues par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) a permis d'identifier la composition chimique de chacune des huiles étudiées.

L'huile essentielle de menthe est dominée par les terpènes oxygénés (85.4%) contre seulement environ 1.8% d'hydrocarbures terpéniques. D'autres composés oxygénés ont été également identifiés.

Dans le cas de l'huile essentielle d'eucalyptus, la fraction principale de terpènes est celle des sesquiterpènes oxygénés (22%), suivie par les monoterpènes oxygénés (16%), les terpènes hydrocarbonés occupent aussi une classe importante avec 15%. On relève également la présence des acides gras (2%), et d'un diterpène oxygéné (8%).

L'analyse a montré également que la fraction terpénique est la fraction la plus prépondérante dans l'huile essentielle de thym avec un pourcentage élevé de monoterpènes oxygénés (74%). On a noté en plus, la présence de monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés.

Les pourcentages de monoterpènes obtenus par CG/SM constituent une référence préliminaire à l'analyse par spectrométrie IRTF.

L'analyse des échantillons d'huiles essentielles obtenue sans traitement préalable en utilisant la spectrométrie IRTF a montré que la détermination directe du taux de menthol et d'eucalyptol dans les huiles essentielles de menthe et d'eucalyptus respectivement, est difficile. Ce qui nous a poussé à faire appel à la spectrométrie infrarouge dérivée. En utilisant le spectre dérivé et pour confirmer le choix des bandes on a utilisé la calibration par addition de standard.

La valeur d'absorbance en considérant le volet gauche à 1049 cm^{-1} de la bande directe à 1043 cm^{-1} , corrigée avec une ligne de base comprise entre $947\text{-}1179\text{ cm}^{-1}$, donne une teneur de menthol dans la menthe de 2.7 %.

Dans le cas de la détermination d'eucalyptol dans l'eucalyptus, on a choisi le volet gauche à 1173 cm^{-1} de la bande directe à 1168 cm^{-1} , corrigé avec une ligne de base entre $1027\text{-}1227\text{ cm}^{-1}$. Le taux obtenu est de 6.5 %.

La détermination directe du taux de thymol dans l'HE de thym par spectrométrie IRTF, est impossible. Un protocole de purification et de préconcentration s'impose.

Les résultats obtenus sont préliminaires et méritent d'être complétés par l'utilisation du couplage de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier couplée à l'extraction en phase solide (IRTF-EPS) et confirmée par d'autres techniques telle que la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

REFERENCES

1. Benkiki, N., «Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : ruta montana, matricaria pubescens et hypericum perforatum », thèse de doctorat, université El-Hadj Lakhdar Batna, (2006).
2. Naghibi, F., Mosaddegh, M., Mohammedi, M.S. et Ghorbani, A., «Labiatae family in folk medicine in Iran :from ethnobotany to pharmacology», Iranian journal of pharmaceutical Research ,V.2, 2005.
3. Babulka, P., «Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales : de la médecine traditionnelle à la phytothérapie moderne », phytothérapie, V.5, (2007).
4. Pibiri, M.C., «Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles», thèse de doctorat N°3311, Institut des infrastructures, des ressources et de l'environnement Lausanne, (2006).
5. Mansour, A., «Investigation phytochimique de l'extrait *n*-butanol de l'espèce centaurea africana», thèse de magister, université Mentouri Constantine, (2009),
6. Klaas, C. A., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Loggia, R. D., Bomme, U., Pahl, H. L. et Merfort, I., «Studies on the anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals prepared from *Arnica* flowers», Planta Med., (2002), 385-391.
7. Qureshi, N. et Porter, J. W., « In Biosynthesis of isoprenoid Compounds; », Wiley : New York, V. 1, (1981), 47-94.
8. Cram, D. G. et Mahmoud, G. S., «Chimie organique », 2^{ème} Ed, Quatier-villars, (1968), 918-930.
9. Dominick V. Spracklen, Boris Bonn et Kenneth S. Carsla W, «Boreal forests, aerosols and the impacts on clouds and climate», (2008).
10. Mallem, T., «Etude phytochimique de l'exsudat et des huiles essentielles de l'espèce inula crithmoides», mémoire de magister, université Mentouri Constantine, (2003).
11. Christo, H., Rabia, S., Jawish, D. et Aitour, S., «huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des lamiaceae», Lebanese Science Journal, V. 7, No. 2, (2006).
12. Benayad, N., «des huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées», projet de recherche, faculté des sciences de Rabat, (2008).

13. Alfa, K., D., Abdoul D., S. et Nacro, M., «Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum americanum* Linn., syn. *O. canum* Sims du Burkina Faso», *C. R. chimie*, (2004), 1033-1037.
14. Ben Sassi, A., Harzallah-Skhiri, F., Chraief, I., Bourgougnon, N., Hammami, M., Aouni, M., «Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil of (Tunisian) *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. and Trab. flowerheads», *C.R. chimie*11, (2008), 324-330.
15. Alitonou, G., Avlessi, F., Bokossa, I., Ahoussi, E., Dangou, J. et Sohounhloué, C.K.D., «Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle de *Lantana camara* Linn.», *C. R. chimie*, (2004), 1101-1105.
16. Félicité, N., Kouninki, H. et Thierry, H., Haubruge, E., Ngamo, L., Maponmestsem, P.M., Ngassoum, M., Malaisse, F., Marlier, M., Lognay, G., «Composition of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich essential oils from Cameroon and identification of a minor diterpene: ent-13-epi manoyl oxide», *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, (2007), 193–199.
17. Atik Bekkara, F., Bousmaha, L., Bendia, T. et Boti, J.B., Casanova, J., «Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen», *Biologie & Santé*, V 7, n° 1, (2007).
18. Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., Bourkhiss, B., Bousta, D., Talbi, M., «composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *cladanthus mixtus*», *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, V.146, (2007), 85-96.
19. Okoh, O. O., Sadimenko, A. P. et Afolayan, A.J., «Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods», *Food Chemistry*, V.120, (2010), 308–312.
20. Koba, K., Sanda, K., Raynaud, K., Millet, J., Chaumont, J.P., «Composition chimique des huiles essentielles d'*Aeollanthus pubescens* Benth. acclimatée au Togo», *C. R. Chimie*, V.7, (2004), 1107–1111.
21. Akrouf, K., «Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie)», *Institut des Régions Arides*, 4119 Medenine, Tunisie.
22. Oussou, R.K., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Koukoua, G., Dosso, R., N'Guessan, T., Figueredo, G. et Chalchat, J.C., «Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire», *C. R. Chimie* 7, (2004), 1081–1086.

23. El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., Amarti, F., Aberchane, M., «Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'oeuvre», *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, V.12(4), (2008), 345-351.
24. Amarti, F., , Satrani, B , Ghanmi, M , Farah, A , Aafi, A , Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A., «Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *thymus algeriensis* Bois. et Reut. et *thymus ciliatus* Benth. du Maroc», *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, V.14(1), (2010), 141-148.
25. Sallé, J-L., «les huiles essentielles synthèse d'aromathérapie», Ed Frison-Roche, (2004).
26. Rojas, L.B., Usabillaga, A., Galarraga, F., «Essential oil of *Coespeletia timotensis* Cuatrec», *Phytochemistry*, V.52, (1999), 148-1484.
27. Matasyoh, J., Kiplimo, J., Karubi, U, N.K., Hailstorks, T.P., «chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarhonanthus camphoratus*», *Food Chemistry*, V.101, (2007), 1183–1187.
28. Özcan, M., Tzakou, O., Couladis, M., «Essential oil composition of the turpentine tree (*Pistacia terebinthus* L.) fruits growing wild in Turkey», *Food Chemistry*, V.114, (2009), 282–285.
29. Alitonou, G, Avlessi, F., Valentin, D.W., Ahoussi, E., Dangou, J., Sohounhloué, D.C.K., «Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm», *C. R. Chimie*, V.7, (2004) 1051–1055.
30. Skoc̃ibus̃ic, M., Bezic, N., Dunkic, V., «Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia», *Food Chemistry* 96 (2006) 20–28.
31. Ozturk, S., Ercisli, S., « The chemical composition of essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Ziziphora persica* Bunge», *Journal of Ethnopharmacology*, V.106 (2006) 372–376.
32. Grosso, C., Ferraro, V., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Coelho, J.A., Palavra, A.M., «Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds », *Food Chemistry*, V.111, (2008) 197–203
33. Khadri, A., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Neffati, M., Smiti, S., Araujo, M.E.M., «Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from

- Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC–mass spectrometry and ¹³C NMR», *Food Chemistry*, V.109 (2008) 630–637.
34. Tepe, B., Akpulat, H., Sokmen, M., Daferera, D., Yumrutas, O., Aydin, E., Polissiou, M., Sokmen, A., «Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisatum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey», *Food Chemistry*, V.97, (2006), 719–724.
 35. Özek, G., Demirci, F., Özek, T., Tabanca, N., Wedge, D.E., Khan, S.I., Can Bas, K.H., Duran, A., Hamzaoglu, E., «Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity», *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 741–748.
 36. Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., Chaabouni, M.M., « composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *juniperus phoenicea*», *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, (2008), 119-125.
 37. Gauvin, A., Ravaomanarivo, H., Smadja, J., «Comparative analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the essential oils from bark and leaves of *Cedrelopsis grevei* Baill, an aromatic and medicinal plant from Madagascar», *Journal of Chromatography A*, 1029 (2004) 279–282.
 38. Cavalli, J.F., «Caracterisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar», thèse de doctorat, Université de Corse Pascal Paoli, (2002).
 39. McLafferty, F.W., Michnowicz, J.A., « State-of-the-art GC-MS», *Chemtech.*, (1992), 182-189.
 40. Skoog, A., Holler, J. et Nieman, A., «Principes d'analyse instrumentale», 5^{ème} édition.
 41. Rouessac F., Rouessac A., «Analyse chimique », 6^{ème} édition, Dunod, Paris, (2004).
 42. Lide, Jr. D. R., "Status Report on Critical compilation of Physical Chemical Data", *Annual Review of Physical Chemistry*, V.24, (1973), 135-158.
 43. Lettington A.H., «Infrared Technology and Applications», SPIE-proceedings, Ed. Bellingham WA, London, UK, V.1320, (1990).
 44. Daghbouche, Y., Garrigues, S., Teresa Vidal, M., De la Guardia, M., «Flow injection FTIR determination of caffeine in soft drinks», *Anal .chem* 69, (1997), 1086-1091.
 45. Bunaciu, A.A., Aboul-Enein, H.Y., Fleschin, S., « FT-IR Spectrophotometric analysis of acetylsalicylic acid and its pharmaceutical formulations», *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, (2006), 253-259.



46. Bouzidi, N., Daghbouche, Y., El Hattab, M., Culioli, G., Piovetti, L., Garrigues, S., De la Guardia, M., « FTIR - Determination of total sterols from the red alga *Asparagopsis armata*: Comparative studies with HPLC », *Talanta* ,68, (2006), 1230-1235.
47. Bouzidi, N., Daghbouche, Y., El Hattab, M., Aliche, Z., Culioli, G., Piovetti, L., Garrigues, S., De la Guardia, M., « Determination of total sterols in brown algae by infrared spectroscopy », *Analytica Chimica Acta*, 616, (2008), 185-189.
48. . Abidi S.L. « Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils », *Journal of chromatographiy A*, 935, 2001, 173-201.
49. Lucchesi, M.E., «Extraction sans solvant assistée par Micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles», thèse de doctorat, Université de la Reunion, (2005).
50. Haddouchi, F., Benmansour, A., «Les huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. application à deux plantes aromatiques», *Les technologies de laboratoire*- N°8, Jan-Fév(2008)
51. Brada, M., Bezzina, M., Marlier, M., Carlier, A., Lognay, G., «Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie», *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, (2007).
52. Petit J. Prognon. P. Postaire E. Larue M. Laurençon Cowrteille F. Fradeau D; «Multicomponent analysis of hydrosoluble Polyvitamins by first-derivative Spectrophotometry ; - *J. Pharm.Biomed.Anal* », V. 8(1), (1930), 93-99.
53. Daghbouche Y, Garrigues S, et Miguel de la Guardia ; «Solid phase preconcentration- Fourier transform infrared spectrometric determination of carbonyl and 1-naphtol», *Analytica Chimica Acta* 314, (1995), 203-212.
54. Richard, H., « Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. In *Actualités scientifiques et techniques en industries agro-alimentaires* », Ialine Agorial - Normandie St-LÖ, (1974).
55. Khodair, A.I., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., El-Missiry, M.M., EL-Shahed, F.A. et Abdel-Azim, H., «Phytochemical investigation of *decassatus* L. Flavoids and volatile oil», *Quatar Univ.Sci.J.*, V.13 (2), 211-213.