

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA I
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire Présenté par

SAIDOUNE Fares

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Sciences de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Séparation et analyse des monoterpènes dans les huiles
essentielles par AFC-IRTF ; Elaboration et exploitation
d'une banque de données spectrales**

Soutenu publiquement en 28 juin 2016 devant le jury composé de :

M. EL HATTAB Pr
Z. CHEMAT MCA
Y. DAGHBOUCHE Pr

Président
Examinatrice
Promotrice

Université de Blida I
Université de Blida I
Université de Blida I

Promotion 2015-2016

Remerciements

Avant tout je remercie Dieu, le Tout Puissant, le Miséricordieux, qui nous a donné l'opportunité de mener à bien ce travail

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement Mme. Y.Daghbouche, Professeur à la faculté des sciences université de Blida 1, pour les enseignements qu'elle m'a prodigué, pour son encadrement et son aide scientifique avec générosité, il m'a guidé dans mon travail et m'a aidé à trouver des solutions pour avancer.

Je tiens à remercier Mr. M. ELHATTAB, Professeur à l'université Blida 1 pour m'avoir accueilli dans son groupe, aussi pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme. CHEMAT, maitre de conférence qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à tous les professeurs et les enseignants pour leurs efforts et encouragement le long de ce master.

Mes remerciements s'adressent aux membres du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules, et aussi du laboratoire des plantes médicinales et aromatiques du département d'agronomie, Université de Blida 1, qui ont mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Je n'oublie surement pas mes collègues et amies qui ont contribué par leur soutien et amitié.

Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes chers parents, pour leur soutien indéfectible et
encouragement durant toute ma vie.
Qu'ils soient assurés de mon profond respect et de ma gratitude pour tous les efforts
que vous avez fournis en ma faveur.*

A mon frère, ma sœur et à toute ma famille.

*A tous mes ami(e)s en qui j'ai toujours trouvé le soutien
et le réconfort.*

*Aussi à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce
travail.*

Résumé

Notre étude vient contribuer au développement des applications analytiques qualitatives et quantitatives de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et offre un outil complémentaire disponible, facile à manipuler et rapide aux utilisateurs travaillant dans le domaine des substances naturelles.

La mise en marche d'un système d'analyse en flux continu (AFC) et l'exploitation des logiciels contrôlant ce mode d'analyse sont réalisés avec succès, pour la première fois au sein de notre laboratoire, pour la détermination de la teneur des monoterpènes dans les huiles essentielles.

L'identification des composés des huiles essentielles séparées et éluées en continu à travers un support solide par spectrométrie IRTF, en exploitant la banque de données spectrale que nous avons créée est réalisée.

La comparaison des teneurs obtenues par AFC-IRTF et par CG-SM donne, d'un côté, des valeurs comparables indiquant que la méthode développée est prometteuse et d'un autre côté, des valeurs différentes du fait, probablement, que les huiles essentielles analysées par les deux méthodes sont différentes.

La procédure AFC-IRTF développée donne une identification comparable à la CG-SM dans le cas où le composé se trouve majoritaire dans l'huile essentielle.

Mots clés : Spectrométrie IRTF, analyse en flux continu, monoterpènes, huiles essentielles, séparation, banque de données spectrale.

Abstract

Our study reaches contribute to the development of qualitative and quantitative analytical applications of infrared spectrometry Fourier transform (FTIR) and provides an additional available, easy to handle and quick tool for users in the field of natural substances.

The commissioning of a continuous flow analysis system and software controlling the operation of this mode of analysis are carried out successfully, for the first time in our laboratory to determine the content of monoterpenes in essential oils.

The identification of separated and continuously eluted compounds of the essential oils through a solid support by FTIR spectrometry, by exploiting the spectral database that we created, is realized.

Comparing the tenor obtained by CFA-FTIR and GC-MS gives, on one side, comparable values indicating that the developed method is promising and on the other side, different values due, probably, that essential oils analyzed by the two methods are different.

The CFA - FTIR developed procedure gives a similar identification to the GC-MS in the case where the compound is major in the essential oil.

Keywords: Spectrometry FTIR, continuous flow analysis, monoterpenes, essential Oils, Separated, spectral database.

ملخص

تواصل دراستنا المساهمة في تطوير التطبيقات التحليلية النوعية والكمية لجهاز الأشعة تحت الحمراء (IRTF) و توفير أداة إضافية متوفرة، سهلة و سريعة التعامل معها للباحثين في مجال المواد الطبيعية.

استخدام نظام تحليل التدفق المستمر (AFC) وبرامج التحكم في تشغيل هذا النمط من التحليل، لأول مرة في المختبر، تم بنجاح لتحديد مكونات الزيوت العطرية من تربينات أحادية.

تحديد مكونات الزيوت العطرية المتدفقة بشكل مستمر والمنفصلة عبر العمود الصلب ثم تنفيذها من قبل جهاز الأشعة تحت الحمراء (IRTF)، وهذا باستغلال قاعدة البيانات الطيفية التي تم إنشاؤها.

مقارنة النسب التي حصل عليها بواسطة AFC-IRTF و CG-SM يعطي، من جهة، قيم متكافئة مشيرا إلى أن الطريقة التي تم تطويرها واعدة ومن جهة أخرى، قيم مختلفة يعود، على الأرجح، إلى أن الزيوت الأساسية المحللة بالطريقتين مختلفة.

تحديد المكونات بواسطة الطريقة AFC-IRTF يعطي تحديد مماثل للطريقة CG-SM في الحالة التي يكون فيها المركب غالب في الزيت العطري.

كلمات البحث: الأشعة تحت الحمراء، التحليل في تدفق مستمر، التربينات الأحادية، الزيوت العطرية، المنفصلة، قاعدة البيانات الطيفية.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Configuration typique d'un système d'analyse en flux continu AFC	4
Figure 2 :	Effet de la convection et la diffusion sur les profils de concentration d'analyte au niveau du détecteur	5
Figure 3 :	Représentation d'une cartouche EPS	7
Figure 4 :	Configuration typique d'un système d'analyse en flux continu par la combinaison EPS-IRTF	8
Figure 5 :	unité isoprénique	11
Figure 6 :	Structures chimiques de menthol, thymol, eucalyptol et camphre	12
Figure 7 :	boite de dialogue de logiciel Mesures multiples	17
Figure 8 :	boite de dialogue de logiciel CHROM	18
Figure 9 :	Procédure générale de l'analyse quantitative des monoterpènes dans les huiles essentielles	20
Figure 10 :	Spectres d'absorbance IRTF d'un mélange de camphre, eucalyptol, thymol et menthol (10mg.mL^{-1}) obtenus par dilution directe dans CH_2Cl_2 (bleu) et après élution à travers l'adsorbant de gel de silice en mode flux stoppé (rouge): (a) Spectres IRTF de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, (b) Spectres IRTF de $1780\text{-}950\text{ cm}^{-1}$	21
Figure 11 :	Montage d'analyse AFC : (a).utilisé habituellement, (b).Montage d'analyse AFC modifié pour cette étude	23
Figure 12 :	Type d'informations affichées par (a) le logiciel « CHROM » et (b) le logiciel « Mesures multiples » : cas de thymol de concentration de 10 mg.mL^{-1}	24
Figure 13 :	Chemigramme d'élution de thymol de 10mg.mL^{-1} établi par EXCEL	26
Figure 14 :	Chemigramme globale affiché à partir la fenêtre « Propriétés 3D »	26
Figure 15 :	Chemigramme de thymol à 1151cm^{-1} intégré par la fenêtre « Intégration » et ensuite affiché à partir de la fenêtre « Propriétés 3D »	27
Figure 16 :	Chemigrammes obtenus à les bandes spécifiques des quatre solutions étalons de concentration de 10 mg.mL^{-1} élués à travers l'adsorbant en flux continu : (a) Thymol, (b) Camphre, (c) eucalyptol et (d) menthol	28
Figure 17 :	Chemigrammes aux bandes spécifiques des monoterpènes se trouvant en mélange à différentes concentrations ($0.5, 2$ et 10 mg.mL^{-1})	29
Figure 18 :	Droites de calibration des solutions étalons des 4 analytes éluées en flux continu : Thymol, camphre, eucalyptol et menthol	29
Figure 19 :	Effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure de chemigramme du thymol à 1151 cm^{-1}	32
Figure 20 :	Effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure de chemigramme du camphre à 1738 cm^{-1}	32
Figure 21 :	Effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure de chemigramme d'eucalyptol à 980 cm^{-1}	33
Figure 22 :	Effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure de chemigramme du menthol à 1022 cm^{-1}	33
Figure 23 :	Etapas de la création d'une nouvelle bibliothèque spectrale	49
Figure 24 :	Etapas d'introduction des spectres dans la nouvelle bibliothèque	50
Figure 25 :	Etape d'extraction des spectres IR à partir du chemigramme	52
Figure 26 :	Etape d'identification d'un spectre IRTF	52
Figure 27 :	Résultats affichés suite à la recherche d'identification	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Propriétés physico-chimiques de thymol, eucalyptol, camphre, et menthol	13
Tableau 2 :	Rendements de récupération des quatre monoterpènes (thymol, camphre, eucalyptol et menthol) après élution en flux stoppé à travers l'adsorbant de gel de silice	22
Tableau 3 :	Paramètres caractéristiques des logiciels « CHROM » et « Mesures multiples »	24
Tableau 4 :	Valeurs d'absorbance en fonction de temps de mesure	25
Tableau 5 :	Coefficient de dispersion des quatre monoterpènes	30
Tableau 6 :	Rendement de récupération des quatre monoterpènes soient purs ou en mélange	30
Tableau 7 :	Effet de la quantité d'adsorbant sur les coefficients de dispersion	31
Tableau 8 :	Teneurs des monoterpènes dans les huiles essentielles	34
Tableau 9 :	Principaux composés de différentes classes de terpènes	37
Tableau 10 :	Principaux composés de différentes classes phénoliques	42
Tableau 11 :	Principaux composés de la classe des acides gras	44
Tableau 12 :	Principaux composés de différentes classes d'hydrocarbures	45
Tableau 13 :	liste des composés introduits dans la bibliothèque spectrale IRTF créée	48
Tableau 14 :	Composition chimique de chaque spectre de l'huile essentielle synthétique	54
Tableau 15 :	Composition chimique de l'huile essentielle synthétique par AFC-IRTF	56
Tableau 16 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Clémentine</i> établie par AFC-IRTF	57
Tableau 17 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thym</i> établie par AFC-IRTF	57
Tableau 18 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Clou de girofle</i> établie par AFC-IRTF	57
Tableau 19 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cyprès</i> établie par AFC-IRTF	58
Tableau 20 :	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus</i> établie par AFC-IRTF	58
Tableau 21 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Fenouil</i> établie par AFC-IRTF	58
Tableau 22 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Genevrier</i> établie par AFC-IRTF	59
Tableau 23 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Menthe</i> établie par AFC-IRTF	59
Tableau 24 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Menthe poivrée</i> établie par AFC-IRTF	59
Tableau 25 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Myrte</i> établie par AFC-IRTF	59
Tableau 26 :	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Oranger</i> établie par AFC-IRTF	60
Tableau 27 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Pin d'alpe</i> établie par AFC-IRTF	60
Tableau 28 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Lentisque</i> établie par AFC-IRTF	60
Tableau 29 :	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Anis étoilé</i> établie par AFC-IRTF	60
Tableau 30 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Citron</i> établie par AFC-IRTF	61

LISTE DES ABREVIATIONS

IRTF :	Infrarouge à transformée de Fourier
AFC :	Analyse en flux continu
EPS :	Extraction en phase solide
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
SM :	Spectrométrie de masse
CG-SM :	Couplage de la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse
CLHP :	Chromatographie liquide à haute performance
UV:	Ultraviolet
CH₂Cl₂ :	Dichlorométhane
BKG:	Background
FIR:	Far infrarouge
MIR :	Moyen infrarouge
NIR :	Near infrarouge

TABLE DES MATIERES

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

TABLE DES MATIERES

Objectif du travail

Chapitre 1 : Partie théorique

I Spectroscopie Infrarouge	1
I.1 Analyse qualitative	2
I.1.1 Identification d'un composé pur	2
I.1.2 Identification des constituants d'un mélange	3
I.2 Analyse quantitative	3
II Analyse en flux continu (AFC)	4
II.1 Introduction	4
II.2 Principe de la méthode d'analyse en flux continu (AFC)	4
II.3 Détecteur	6
III Exploitation des cartouches d'extraction en phase solide EPS	6
III.1 Composantes de la cartouche d'EPS	6
III.2 Combinaison EPS-IRTF	7
IV. Analyse par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CG-SM	9
V. Généralités sur les huiles essentielles	9
VI. Description des monoterpènes utilisés comme étalons	10
VI.1 Généralités	10
VI.2 Monoterpènes étudiés	11
VI.3 Propriétés physico-chimiques des monoterpènes utilisés	13

Chapitre 2 : Séparation et dosage des monoterpènes dans les huiles essentielles

I. Objectif	15
II. Matériel et méthodes	15
II.1 Spectrophotométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	15
II.2 Réactifs	16
II.3 Choix des étalons et des huiles essentielles	16
II.4 Conditionnement des cartouches d'EPS	16
II.5 Modes d'analyse utilisés	16
II.5.1 Analyse en flux stoppé	16
II.5.2 Analyse en flux continu	16
II.5.2.1 Description du logiciel « Mesures multiples »	17
II.5.2.2 Description du Logiciel « CHROM »	17
II.6 Procédure générale de l'analyse des monoterpènes dans les huiles essentielles	19
III. Résultats et discussion	20
III.1 Test de l'efficacité du phénomène rétention-élution de l'adsorbant de gel de silice	20

III.2 Méthodologie de l'éluion des analytes en flux continu	22
III.2.1 Etablissement de Background (la ligne de base zéro) pour l'analyse en flux continu	22
III.2.2 Comparaison entre les informations obtenues par les deux logiciels (CHROM et Mesures multiples)	23
III.2.3 Ordre d'éluion des quatre monoterpènes	27
III.3 Détermination des paramètres analytiques du processus rétention-éluion en mode AFC	28
III.3.1 Reproductibilité du processus rétention-éluion en mode AFC	28
III.3.2 Coefficient de dispersion des analytes dans l'adsorbant	30
III.4 Effet de la quantité d'adsorbant sur le processus rétention-éluion	31
III.4.1 Effet de la quantité d'adsorbant sur le coefficient de dispersion	31
III.4.2 Effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure de chemigramme	31
III.5 Teneurs approximative des monoterpènes dans les huiles essentielles	34

Chapitre 3 : Création et exploitation d'une banque de données spectrales pour l'identification des composés des huiles essentielles

I. Introduction	36
II. Composition chimique des plantes	36
II.1 Composés terpéniques	37
II.2 Composés phénoliques	42
II.3 Acides gras	44
II.4 Hydrocarbures	45
III. Création d'une bibliothèque spectrale IRTF	48
III.1 Spectres IRTF des étalons analysés au niveau de notre laboratoire	48
III.2 Spectres IRTF des étalons procurés de la littérature	48
III.3 Etapes de la création de la banque spectrale	49
IV. Identification des composés des huiles essentielles	50
IV.1 Préparation des solutions des huiles essentielles	51
IV.2 Eluion des huiles essentielles dans le système AFC-IRTF	51
IV.3 Etapes d'identification des composés des huiles essentielles	51
IV.4 Identification des composés de l'huile essentielle synthétique par AFC-IRTF	54
IV.5 Identification des composés des huiles essentielles par AFC-IRTF	57

Conclusion générale

Références bibliographique

Annexe

Objectif du travail

Objectif du travail

Les extraits des plantes sont chimiquement des mélanges complexes de plusieurs composés ou parfois une classe de produit est prédominante ou même un produit de la classe peut être majoritaire dans la composition chimique.

L'analyse qualitative et/ou quantitative des produits des extraits des plantes présente une grande importance afin de pouvoir valoriser les plantes ou même de vérifier s'il existe des possibilités de différenciation entre les espèces.

Bien que la méthode de choix pour l'analyse des produits des extraits, basée sur le couplage de méthodes séparatives (CPG, HPLC, ...) et de méthodes d'identifications (SM, UV-visible, ...) est la plus adéquate et la plus utilisée, elle reste généralement indisponible au niveau des laboratoires de recherche travaillant dans le domaine des substances naturelles.

Devant cette situation, les chercheurs utilisent la chromatographie sur couche mince (CCM) pour l'identification préliminaire de certains produits de la matrice ou font appel à la chromatographie sur colonne pour la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement pour leur postérieure analyse. Cependant, ces deux méthodes préparatoires restent laborieuses, nécessitent des quantités importantes de solvants et un temps de préparation assez long.

A cet effet, l'objectif principal de cette étude est le développement d'une nouvelle méthode d'analyse qualitative et quantitative des composés des huiles essentielles fournissant ainsi un outil complémentaire disponible, facile à manipuler et rapide aux utilisateurs travaillant dans les domaines des substances naturelles. La méthode développée exploite d'un côté les avantages de la séparation en continu des analytes à travers un adsorbant solide et d'un autre côté le potentiel de la spectroscopie IRTF par l'exploitation des bandes d'absorbance spécifiques.

Le contenu de ce mémoire est subdivisé en trois chapitres :

Le premier chapitre présente une partie théorique générale sur les connaissances de bases de cette étude.

Le deuxième chapitre comporte une partie expérimentale basée sur la séparation de différents monoterpènes à travers un adsorbant solide de type SiO_2 placé dans des cartouches d'EPS et la détection en continue de ces composés par spectrométrie IRTF. Dans cette partie deux principaux objectifs sont atteints pour la première fois au sein de notre laboratoire, le premier concerne la mise en marche d'un système d'analyse en flux continu (AFC) et le deuxième l'exécution des deux logiciels « Mesure multiple » et « CHROM » permettant le suivi rapide de la totalité du spectre IRTF en temps réel de l'éluion des constituants.

Le troisième chapitre est dédié à une étude qualitative des composés des huiles essentielles. Dans ce chapitre, nous avons réalisé deux parties, nous avons commencé par regrouper la majorité des produits chimiques des plantes qui appartiennent à la même classe chimique, puis nous avons créé une banque de données spectrales IRTF de quelques composés (selon la disponibilité) existant dans les plantes. Et nous avons développé une procédure d'identification des huiles essentielles.

Enfin, une conclusion générale qui résume les principaux résultats obtenus est présentée.

Chapitre I

Partie théorique

I. Spectroscopie Infrarouge

Une molécule ayant un moment dipolaire d'oscillation, à la suite de son mouvement de vibration ou de rotation, peut absorber un rayonnement infrarouge avec une longueur d'onde allant de 14000 à 10 cm^{-1} . Lorsque la fréquence du rayonnement correspond à une fréquence naturelle de la vibration de la molécule, un transfert net d'énergie a lieu, ce qui entraîne un changement de l'amplitude de la vibration moléculaire, et l'absorption du rayonnement.

A quelques exceptions près (les molécules symétriques et monoatomiques), pratiquement toutes les espèces moléculaires présentent une absorption infrarouge. La spectroscopie infrarouge regroupe plusieurs méthodes d'identification et de dosage non destructif basé sur l'étude de l'absorption (ou la réflexion), par l'échantillon. Les radiations électromagnétiques comprises entre 14000 et 10 cm^{-1} , cette bande spectrale est elle-même divisé en trois parties : proche (NIR 14000 à 4000 cm^{-1}), moyen (MIR de 4000 à 400 cm^{-1}) et lointain (FIR de 300 à 10 cm^{-1}). La partie la plus riche en informations est celle du moyen IR [1].

La spectroscopie infrarouge est très répandue dans la recherche académique et dans l'industrie en tant que technique simple et sûre de mesure et de contrôle de qualité. Afin de séparer les longueurs d'onde, il est nécessaire de moduler la source de signal et le faire passer à travers l'échantillon d'une manière telle qu'il puisse être enregistré comme un interférogramme. L'interférogramme est ensuite décodé par transformée de Fourier : une opération mathématique qui est commodément effectuée par l'ordinateur qui fait désormais une partie intégrante de tous les spectromètres.

En se calant sur une bande spécifique dans le temps, les modifications dans les propriétés ou la quantité d'une liaison particulière peuvent être mesurées. Cela peut se faire dans le même temps que d'autres mesures par d'autres techniques, ce qui permet l'observation de réactions et processus chimiques de manière plus rapide et plus précise.

Les spectrophotomètres infrarouge à transformée de Fourier offrent les avantages d'une grande sensibilité, la résolution et la vitesse d'acquisition des données (données pour un spectre entier peuvent être obtenues en une seconde ou moins). Les instruments d'analyse ne contiennent aucun élément de dispersion, et toutes les

longueurs d'onde sont détectées et mesurées simultanément en utilisant un interféromètre de Michelson.

Les instruments d'acquisition sont maintenant miniaturisés et donc transportables, même pour des usages en extérieur. Avec l'accroissement des technologies informatiques de traitement des résultats, les échantillons en solution peuvent maintenant être mesurés précisément. Certains instruments possédant leurs propres bases de données, l'identification peut ainsi également être automatisée.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier IRTF (Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)) permet l'analyse qualitative et quantitative pour les échantillons organiques et inorganiques en trois modes d'analyse : batch, flux stoppé et flux continu.

I.1 Analyse qualitative

Chaque composé chimique possède son propre spectre IR. Ainsi, les composés chimiques qui ont des structures très voisines peuvent avoir des spectres assez différents « empreinte digitale ». Un spectre d'absorption infrarouge, même pour un composé relativement simple, contient souvent un nombre important de pics. Ces pics sont utiles pour l'identification des groupes fonctionnels qui sont situés dans la région de plus courte longueur d'onde dans l'infrarouge moyen (entre 4000 et 400 cm^{-1}), où les positions des bandes ne sont que faiblement affectées par le squelette carboné de la molécule. Cette région du spectre abonde ainsi des informations relatives à la structure globale de la molécule étudiée. Des tableaux donnant des bandes caractéristiques des groupes fonctionnels communs sont disponibles sur les documents scientifiques et même dans les logiciels des spectrophotomètres IR [2].

La recherche des groupes fonctionnels dans une molécule est insuffisante pour identifier complètement le composé (pur ou en mélange), et l'ensemble du spectre doit être comparée à celle des composés connus. Les collections de spectres sont disponibles pour ce but sous forme de bases de données spectrales.

I.1.1 Identification d'un composé pur

De nombreux spectres de références sont maintenant à la disposition du chimiste dans des catalogues ou des banques de données à des fins comparatives. On parvient ainsi souvent à identifier une substance inconnue grâce à son seul spectre IR.

Les développements de l'interférométrie et de l'informatique ont, d'autre part, permis d'automatiser le travail de comparaison des spectres. Ainsi, il existe chez les constructeurs de spectromètres des banques de données informatisées plus ou moins volumineuses, gérées par des logiciels de recherche. Ces logiciels effectuent une comparaison numérique du spectre inconnu avec chacun des spectres de la banque de données. Cependant, il est important de vérifier le résultat par la comparaison visuelle des spectres de l'échantillon inconnu avec les spectres proposés.

I.1.2 Identification des constituants d'un mélange

Le spectre de vibration d'un mélange est, en première approximation, la superposition des spectres des composants.

Dans certains cas, l'identification des divers composants peut s'effectuer directement en superposant les spectres des corps purs ou en exploitant les bandes spécifiques des différents constituants. Les méthodes informatiques ne conduisent généralement qu'au spectre du mélange. Pour des mélanges très complexes, il faudra faire appel à une méthode de préparation. Il existe actuellement des spectromètres couplés avec un chromatographe qui permettent directement ce traitement.

Dans tous les cas il faut se méfier des interactions soluté - soluté et soluté - solvant qui peuvent perturber le spectre de certains constituants (liaison hydrogène, équilibre conformationnel...). L'analyse devra alors porter sur la comparaison des vibrateurs "peu sensibles" à ces interactions. L'effet soluté - solvant peut être pris en compte en comparant le spectre du mélange à celui du constituant en solution dans le même solvant. Dans le cas des solutions, le premier travail consistera à soustraire le spectre du solvant pour faire apparaître le spectre du ou des solutés.

I.2 Analyse quantitative

Bien que la sensibilité de cette technique reste 100 fois plus faible que celle de la spectrométrie UV-Visible, les mesures ont également trouvé une utilisation croissante dans l'analyse quantitative en raison de la richesse des spectres, l'étroitesse des bandes d'absorption et du développement des instruments infrarouges [3]. Les études quantitatives peuvent être monovariées basées sur l'utilisation de la loi de Beer-Lambert qui établit une relation mathématique entre le rayonnement infrarouge absorbé et la concentration des espèces à déterminer ou multivariées basées sur l'exploitation des logiciels de modélisation.

II. Analyse en flux continu (AFC)

II.1 Introduction

Une configuration typique d'un système AFC présenté sur la figure 1 montre l'introduction d'un volume défini de l'échantillon S dans un flux continu d'un liquide. Ce dernier est dirigé à travers le tube R vers le détecteur D. Ensuite, il est envoyé vers le déchet W. Une pompe péristaltique P a été utilisée pour assurer un débit fixe. La sortie analogique est de forme d'un chemigramme qui à l'allure d'un pic, H est la hauteur de pic, T est le temps d'éluion correspondant à la mesure de la hauteur du pic et A est l'intensité de signal de la sortie du détecteur, la hauteur et la surface du pic sont proportionnelles à la concentration de l'analyte.

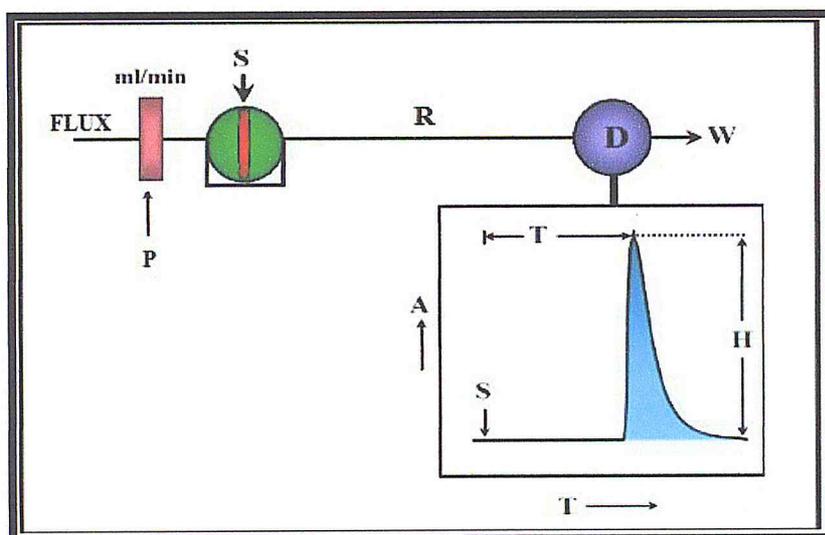


Figure 1 : Configuration typique d'un système d'analyse en flux continu AFC

II.2 Principe de la méthode d'analyse en flux continu (AFC)

Une courbe obtenue par la méthode AFC est due à deux processus : l'un implique un processus physique de la dispersion de la zone du courant porteur, l'autre implique le processus chimique, s'il y a lieu, résultant de la réaction entre l'échantillon et les réactifs. Une différence dans le gradient de concentration est ainsi générée.

La zone de profil de la concentration de l'échantillon est de forme rectangulaire représentée sur la figure 2a. Quand l'échantillon se déplace à travers le tube, la bande

s'élargie et la dispersion a lieu. La forme de la zone résultante est déterminée par deux phénomènes : Le premier est la convection résultant de l'écoulement laminaire dans lequel le centre du fluide se déplace plus rapidement que le liquide au voisinage des parois, créant ainsi le front de forme parabolique. Le profil de la zone déviée est montré sur la figure 2b.

L'élargissement se produit également à la suite de la diffusion. Deux types de diffusion peuvent, en principe, se produire : Une diffusion radiale (perpendiculaire) à la direction d'écoulement, et une diffusion longitudinale (parallèle) à l'écoulement. La diffusion radiale est plus importante car la dispersion radiale à partir des murs vers le centre est la fonction importante de la diffusion de l'analyte [4].

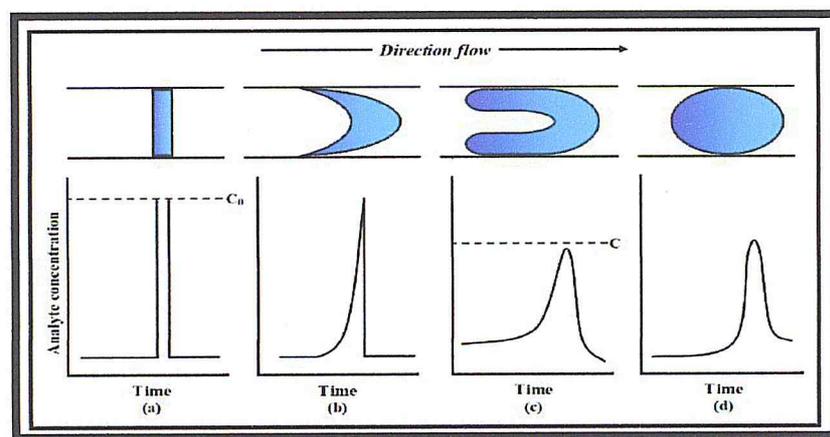


Figure 2 : Effet de la convection et la diffusion sur les profils de concentration d'analyte au niveau du détecteur : (a) pas de dispersion, (b) dispersion par convection, (c) dispersion par convection et diffusion radiale, (d) dispersion par convection et diffusion (radiale et longitudinale) [5]

La dispersion est définie comme l'intensité du signal chimique qui est réduit par l'écoulement de l'échantillon dans un système AFC. Ceci est représenté mathématiquement par la relation suivante :

$$D = \frac{C_{\text{Pur}}}{C_{\text{AFC}}}$$

Où D est le coefficient de dispersion donné par le rapport entre la C_{Pur} , la concentration d'un produit pur lors de son analyse directe, et la C_{AFC} , la concentration de ce même produit lors de son passage à travers le système AFC vers le détecteur.

Le coefficient de dispersion fournit un moyen de vérification et de contrôle de l'étendue de la dilution de l'échantillon de manière reproductible lorsqu'il se déplace à travers les différents tubes en un temps bien contrôlé vers le détecteur [6]. De ce fait, l'analyste a un contrôle complet sur la mesure de la dispersion de l'échantillon ou de la dilution qui se produit lorsque l'échantillon passe à travers le système AFC.

II.3 Détecteur

Le choix d'un détecteur pose les problèmes classiques de linéarité, répétabilité, sensibilité, spécificité. Les caractéristiques des détecteurs couplés avec la méthode AFC ne sont pas, sur le principe, différentes de celles des détecteurs de la chromatographie en phase liquide (CLHP). On peut aussi se rapporter aux nombreux ouvrages qui traitent ce problème [7]. Toutefois, depuis son introduction, la plupart des méthodes spectrométriques et électrochimiques d'analyse ont trouvé leur application en tant que détecteur dans un système AFC [8-17].

La spectrométrie IRTF comme un mode de détection dans les systèmes AFC donne les avantages suivants [18] :

- Le suivi rapide de la totalité de spectre ;
- Haute résolution dans une large zone de nombres d'onde ;
- Nombreuses bandes peuvent être utilisées pour la détermination d'un seul ou plusieurs composés dans le même échantillon ;
- Détection simultanée de plusieurs composés ;
- Possibilité d'élimination des interférences de deux bandes qui se chevauchent par l'utilisation du spectre dérivé.

III. Exploitation des cartouches d'extraction en phase solide EPS

III.1 Composantes de la cartouche d'EPS

La cartouche d'EPS est un dispositif constitué d'une colonne courte (généralement une seringue ouverte) remplie entre les filtres par un adsorbant solide (figure 3). Ces cartouches sont couramment utilisées dans les laboratoires d'analyse pour l'extraction des analytes se trouvant dans des matrices complexes. L'extraction intervient soit par rétention de la substance recherchée et élimination des autres corps présents par le lavage, soit par rétention des substances interférentes et élution du produit visé.

Le principe de base du phénomène rétention-élution réside dans la différence d'affinité d'un soluté envers l'adsorbant et l'éluant.

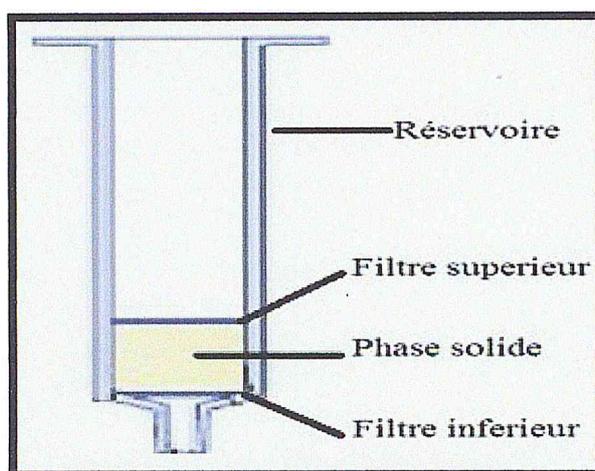


Figure 3 : Représentation d'une cartouche EPS

Son émergence est particulièrement liée aux réglementations sur les solvants organiques mais aussi au fait que l'extraction liquide-liquide longtemps utilisée est limitée par l'extraction de composés polaires qui ont peu d'affinité pour ces solvants. Son évolution a été facilitée par la commercialisation de phases très diverses dédiées à des composés et à des matrices très variées soutenue par une évolution rapide des formats disponibles (cartouches de différentes capacités, disques, plaques à 96 puits), ainsi que des automates adaptés à ces différents formats.

III.2 Combinaison EPS-IRTF

La combinaison de l'EPS avec la spectrométrie IRTF peut se faire en trois modes différentes : flux stoppé, flux continu et automatisation du système.

1) L'analyse en flux stoppé : Consiste à charger les cartouches, les sécher, si nécessaire pour éliminer l'eau, et les éluer avec un volume de solvant fixe et passer enfin à l'analyse de la solution obtenue.

2) L'analyse en flux continu : Consiste à charger les cartouches à part puis intégrer la cartouche dans le montage d'analyse pour une élution en continu (figure 4).

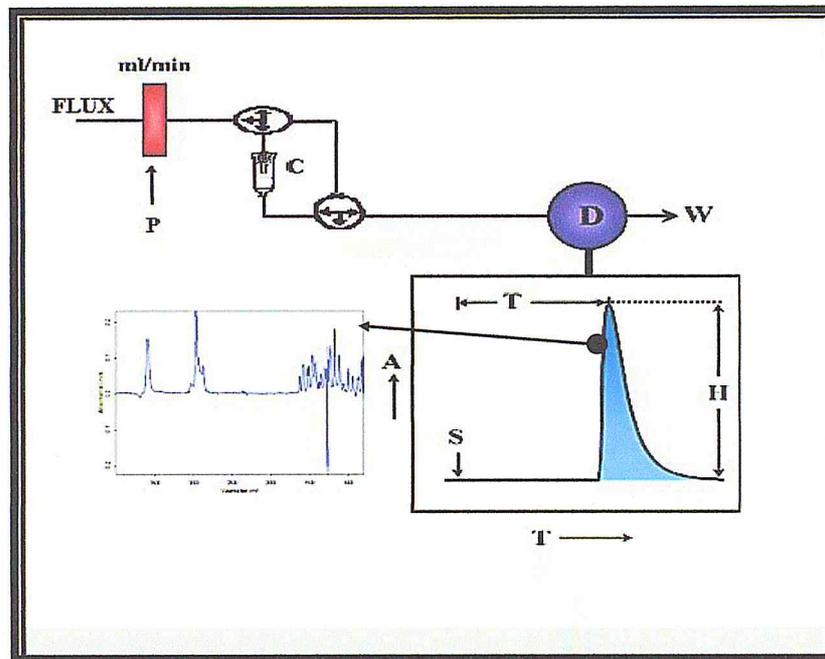


Figure 4 : Configuration typique d'un système d'analyse en flux continu par la combinaison EPS-IRTF

3) L'analyse en mode automatisé : Qui peut être effectuée avec divers degrés d'automatisation, les quatre étapes individuelles d'une séquence d'EPS en continu sont : (1) le conditionnement de l'adsorbant, (2) le chargement de l'échantillon, (3) le séchage et/ou le rinçage de l'échantillon, et (4) la désorption et la récupération des analytes. L'automatisation peut être réalisée de manière séquentielle de plusieurs cartouches en même temps. La séquence peut également être facilement automatisée avec des appareils maintenant disponibles par plusieurs entreprises qui utilisent des formats de cartouches ou d'extraction par disque commerciales.

Il y a lieu de noter que le système d'exploitation de traitement des spectres doit être muni d'un logiciel permettant le contrôle de l'analyse en continu ou automatisé. Ce logiciel n'est pas automatiquement intégré dans le système d'exploitation, et il faut le commander pour l'avoir comme option.

IV. Analyse par Couplage de la chromatographie gazeuse et la spectrométrie de masse CG-SM

La chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse sont des techniques qui ont connu des développements historiques très différents.

C'est en 1941, que Martin et Synge, mentionnèrent pour la première fois la possibilité d'utiliser un gaz comme phase mobile dans un système chromatographique [20]. Il a fallu attendre 1952 pour que soient présentés les premiers résultats de séparation par chromatographie en phase gazeuse des acides gras libres [20].

Cette technique analytique a connu un développement fulgurant mais il s'est avéré très vite qu'il est difficile, sinon impossible, d'identifier les composés d'un mélange complexe par CPG. Un détecteur dont la réponse serait différente et spécifique pour chacun des composés séparés est nécessaire. Un tel détecteur existait bien avant que la CPG soit décrite : c'était le spectromètre de masse dont les origines remontent à 1918 (travaux de Dempster et Aston) [21,22]. La fragmentation des molécules lors d'un bombardement sous vide par des électrons d'énergie contrôlée puis la séparation des ions ainsi formés selon leur rapport masse / charge dans un tube analyseur, constituent le principe de base de la spectrométrie de masse. Il est devenu donc possible d'identifier un par un les composés séparés par CPG grâce au couplage avec le spectromètre de masse.

Le premier couplage CG-SM fut réalisé en 1957 par Holmes en suède ; depuis des progrès spectaculaires ont été réalisés et se poursuivant pour aller vers une simplification de l'interface [23].

Le couplage CG-SM constitue une technique robuste très largement utilisée qui est caractérisée par une bonne sensibilité et une grande spécificité pour les classes d'analytes appropriées [24].

V. Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances odorantes, huileuses, volatiles, incolores ou jaunâtres, inflammables, s'altérant facilement à l'air en se résinifiant. Elles sont ordinairement liquides à la température ambiante, et n'ont pas le caractère gras et onctueux des huiles fixes, au toucher [25].

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » [26].

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs (bergamotier, tubéreuse...), mais aussi les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier...) et bien que ce soit moins habituel dans des écorces (cannelier), les bois (bois de rose, santal...), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre...), les fruits (toutes épices, anis, badiane...), les graines (muscade...).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de celle-ci peut varier selon sa localisation.

Selon Bruneton [27], les constituants des huiles essentielles appartiennent de façon quasi-exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phényle propane (beaucoup moins fréquent), d'autre part.

VI. Description des monoterpènes utilisés comme étalons

VI.1 Généralités

Chaque groupe de terpène est issu de la condensation « tête-à-queue » d'un nombre variable d'unités isoprénique, dans chaque groupe de terpènes, un précurseur unique conduit aux différents constituants connus par une succession de réactions classiques (cyclisations, fonctionnalisations, réarrangements...).

La formule brute générale des terpènes est $(C_5H_8)_n$ Avec $n = 1$ l'isoprène (figure 5).

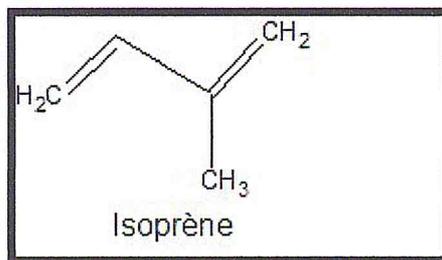


Figure 5 : unité isoprénique

- $n = 2$, $C_{10}H_{16}$: monoterpènes
- $n = 3$, $C_{15}H_{24}$: sesquiterpènes
- $n = 4$, $C_{20}H_{32}$: diterpènes
- $n = 5$, $C_{25}H_{40}$: sesterpènes
- $n = 6$, $C_{30}H_{48}$: triterpènes
- $n = 8$, $C_{40}H_{64}$: tétraterpènes ou caroténoïdes

Les terpénoïdes rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatiles, c'est à dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : ce sont les mono et sesquiterpènes.

Les monoterpènes sont des hydrocarbures constitués de deux unités isoprènes. Ils sont électropositifs et apolaires [28]. Stimulants du système immunitaire, leur action est révulsive sur la peau, utile en cas de douleurs localisées, ils sont donc antalgiques à action percutanée. Leur utilisation doit être limitée dans le temps, sinon ils deviennent dermo-caustiques et agressifs pour les muqueuses.

On distingue les hydrocarbures mono-terpéniques qui peuvent être acycliques (myrcène, ocimène...), monocycliques (α et γ -terpinène, p-cymène...) ou bicycliques (pinène, 3-carène, camphène, sabinène...); ils constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle : (citrus, térébenthines) [29].

VI.2 Monoterpènes étudiés

La figure 6 illustre les structures des quatre monoterpènes et leurs sources étudiés dans ce mémoire.

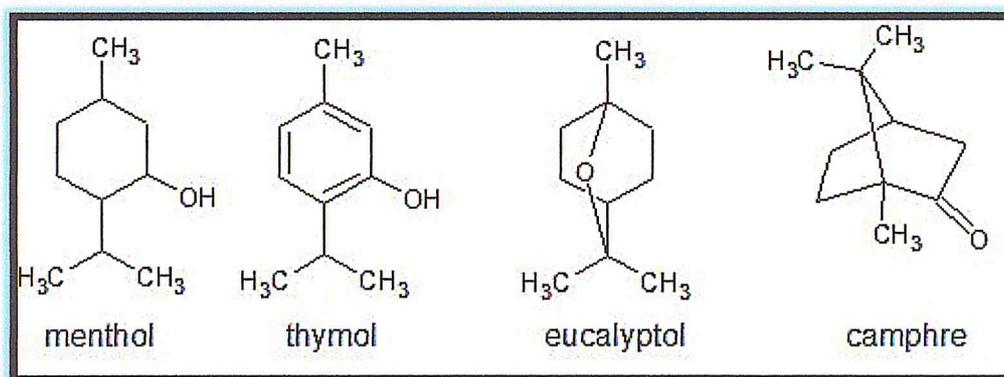


Figure 6 : Structures chimiques de menthol, thymol, eucalyptol et camphre

Thymol

Le thymol est un alcool cyclique contenu dans l'huile de thym et dans les huiles essentielles (volatiles) de plusieurs autres plantes [30-31]. Il se présente sous forme de cristaux incolores avec une odeur aromatique caractéristique. Il est soluble dans les alcools, le gras, 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.

Eucalyptol

L'eucalyptol est un composé naturel organique incolore. C'est un éther cyclique qu'il porte également toute une série d'autres noms équivalents : 1,8 cinéol, cinéol.

Le cinéol est l'un des monoterpènes entrant dans la composition de plusieurs huiles essentielles comme le montre les différents travaux [32, 33].

Camphre

Le camphre est un corps blanc incolore et translucide. Il est volatil dès la température ambiante, il est légèrement moins dense que l'eau. Il faut 840 fois son poids pour le dissoudre dans l'eau, mais il est soluble dans seulement 0,65 parties d'alcool à 95 °. Il est également très soluble dans l'éther, l'acide acétique, les huiles et les essences, mais reste insoluble dans la glycérine. On le synthétise également à partir de l'essence de térébenthine.

Il est inflammable mais non explosif (il entre cependant dans la composition de mélanges explosifs). Par contre, ses vapeurs mélangées à l'air peuvent exploser [34].

Menthol

Le menthol est un composé organique 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. A 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 [35, 36].

VII.3 Propriétés physico-chimiques des monoterpènes utilisés

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

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de thymol, eucalyptol, camphre, et menthol

Monoterpène	Nom UCPA	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Température d'ébullition (C°)	Masse volumique (g.cm ⁻³)
Thymol	5-méthyl-2-(propan-2-yl)-phénol	C ₁₀ H ₁₄ O	150.2	233	0.97-0.93
Eucalyptol	1,3,3-triméthyl-2-oxabicyclo[2,2,2]octane	C ₁₀ H ₁₈ O	154.2	176 à 177	0.9225
Camphre	1,7,7-Triméthylbicyclo(2,2,1)heptan-2-one	C ₁₀ H ₁₆ O	152.3	204	0.922
Menthol	5-méthyl-2-(propane-2-yl)cyclohexanol	C ₁₀ H ₂₀ O	156.2	212	0.903

Chapitre II

Séparation et dosage des monoterpènes dans les huiles essentielles

I. Objectif

Le dosage des produits des huiles essentielles des plantes présente une grande importance afin de valoriser les plantes ou même de vérifier s'il existe des possibilités de différenciation entre les espèces.

Du fait que les huiles essentielles sont constituées de plusieurs produits chimiques, les techniques chromatographiques sont de nos jours les plus utilisées pour identifier et quantifier ces produits [37].

A cet effet, l'objectif principal de ce travail est le développement d'une nouvelle méthode disponible, facile à manipuler et rapide aux utilisateurs travaillant dans le domaine des substances naturelles. La méthode est basée sur la séparation de différents composés monoterpéniques à travers un adsorbant solide de type SiO_2 placé dans une cartouche d'EPS et la détection en continu de ces composés par spectrométrie IRTF permettant le suivi rapide de la totalité du spectre en temps réel.

Dans ce travail, différentes huiles essentielles, préparées et commerciales, diluées dans CH_2Cl_2 sont analysées. Les produits thymol, camphre, eucalyptol et menthol ont été choisis comme standards représentant la classe monoterpénique.

Les deux logiciels « Mesures multiples » et « CHROM », permettant le suivi de l'analyse en continu, ont été testés, exécutés et comparés pour la première fois au sein de notre laboratoire.

II. Matériel et méthodes

II.1 Spectrophotométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Bruker type Tensor 27, équipé d'un détecteur de sulfate de triglycine deutéré DTGS à température ambiante, d'une source infrarouge moyen ($4000-400 \text{ cm}^{-1}$), d'un rayonnement de Laser et un déverseur de faisceau KBr a été utilisé. Les spectres ont été obtenus avec une résolution de 4 cm^{-1} . Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OPUS 6.5 sous le système d'exploitation Microsoft WindowsXP.

Les fenêtres utilisées pour l'analyse de liquide est en Fluorure de Baryum (BaF_2) avec un chemin optique de 0.1 mm, les tubes de connections utilisés sont en téflon avec un diamètre intérieur de 0.8 mm et le chargement est réalisé en employant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm.

II.2 Réactifs

Les étalons et le solvant utilisés sont de grade analytique. Toutes les solutions utilisées dans cette étude sont préparés avec le dichlorométhane stabilisé avec l'amylène.

II.3 Choix des étalons et des huiles essentielles

Comme application à notre étude une série de quatre monoterpènes cycliques qui peuvent être présents dans les huiles essentielles à savoir : le camphre, le menthol, le thymol et l'eucalyptol sont choisis.

Des huiles essentielles qui sont préparées au sein de notre laboratoire ou procurées dans le commerce « Extral Bio » de la région de chiffa, Willaya de Blida, ont été analysées par la méthode développée.

II.4 Conditionnement des cartouches d'EPS

Des cartouches de capacité de 3 ml d'adsorbant solide de type de gel de silice (60 m μ sh) pouvant contenir jusqu'à 500 mg d'adsorbant sont utilisées. Afin que le processus rétention-élution soit efficace, la phase solide doit être préalablement conditionnée avec deux fois 1.5 mL de CH₂Cl₂.

II.5 Modes d'analyse utilisés

Dans cette étude le logiciel OPUS permet deux modes l'analyse à savoir :

II.5.1 Analyse en flux stoppé

La solution à analyser est introduite directement vers la cellule de flux. Le système d'écoulement est effectué en utilisant une pompe péristaltique, le flux est stoppé momentanément une fois la cellule est remplie. On obtient le spectre et on rétablit le flux pour rincer la cellule avec le solvant et la remplir à nouveau avec une autre solution, dans ce cas un nombre de scan=5 est considéré.

II.5.2 Analyse en flux continu

300 μ L de la solution sont introduites dans la cartouche d'EPS qui est intégrée dans le système d'analyse en flux continu, une fois la mesure est terminée par l'élution complète de l'analyte le flux est stoppé. Dans ce cas on a diminué le nombre de scan (=1) pour ne pas perdre l'information avec le cumule de spectres.

Dans cette étude deux logiciels ont été exploités pour contrôler l'analyse en flux continu à savoir : « Mesures multiples » et « CHROM ».

II.5.2.1 Description du logiciel « Mesures multiples »

Le logiciel OPUS est constitué d'une fonction d'analyse en flux continu, intitulée «Mesures multiples» qui est intégrée automatiquement dans le système d'exploitation. La boîte de dialogue du logiciel « Mesures multiples » (figure 7) affiche deux listes de sélection : (a) nombre total de mesures (répétition de la mesure) et (b) délai écoulé entre la mesure de deux spectres consécutifs.

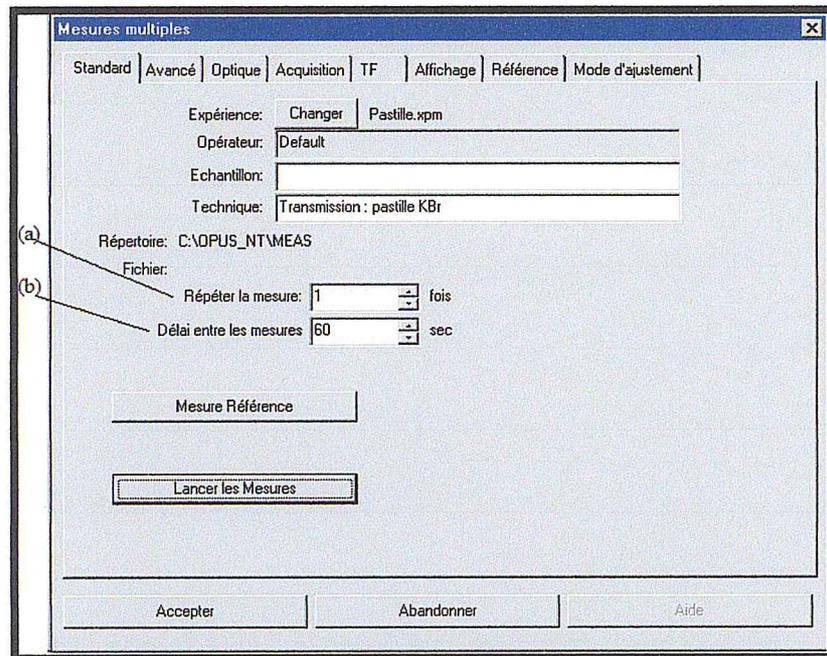


Figure 7 : boîte de dialogue de logiciel « Mesures multiples »

II.5.2.2 description du logiciel « CHROM »

Le logiciel « CHROM » est une option qui n'est pas automatiquement intégré dans le système d'exploitation, il faut le commander pour l'avoir, ce logiciel permet de suivre les processus dépendant de temps, comme les techniques couplées avec la spectrométrie IRTF (par exemple : CG-IR et CLHP-IR). En outre, il peut être utilisé pour acquérir les modifications spectrales pendant un processus cinétique, à condition que ce dernier ne passe pas trop vite.

La boîte de dialogue de logiciel « CHROM » (figure 8) affiche les sélections suivantes :

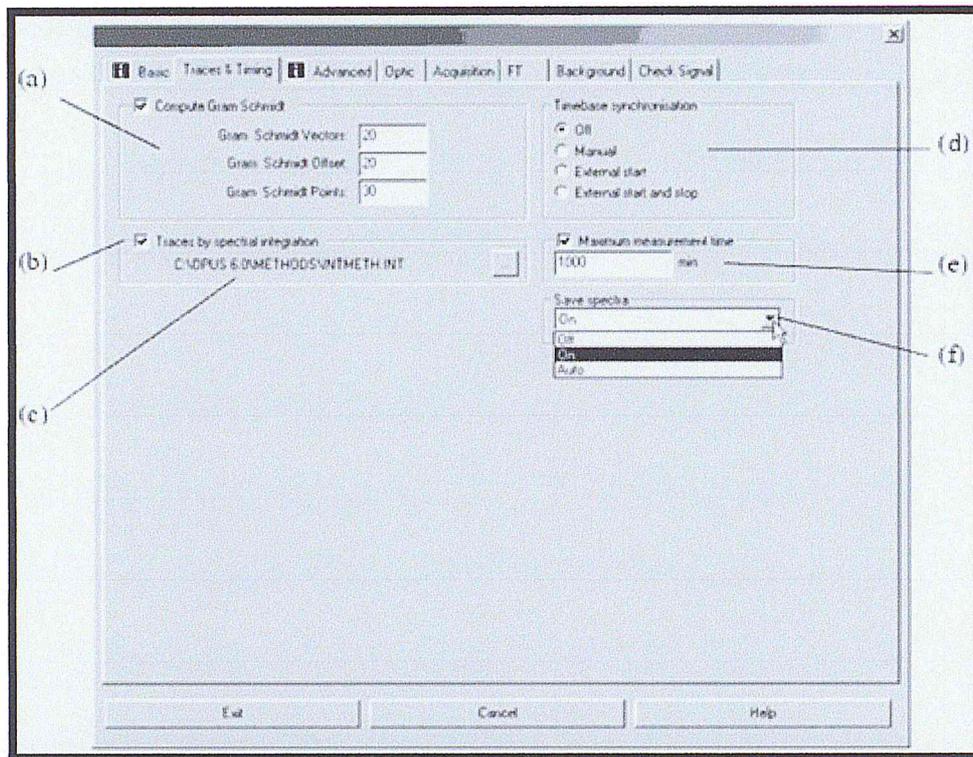


Figure 8 : boîte de dialogue de logiciel « CHROM »

a) Paramètres de chemigramme (« en anglais Gram Schmidt », Une courbe donnant l'absorbance en fonction du temps et chaque point du chemigramme représente un spectre IRTF)

Ces paramètres déterminent la façon dont les données de référence sont utilisées. Ils affectent la sensibilité de la trace calculée.

b) Traces par intégration spectrale

Les chemigrammes peuvent éventuellement être calculés en intégrant les spectres. Pour ce faire, on coche la case.

c) Méthode d'intégration : La méthode d'intégration actuellement sélectionnée est affichée avec la possibilité de la changer. La méthode d'intégration doit être mise en place à l'avance en sélectionnant l'intégration à partir de la fonction OPUS dans le menu Evaluation.

d) Temps de lancement de l'analyse :

-Auto : La mesure commence immédiatement après l'acquisition des interférogrammes de base du chemigramme.

-Démarrage manuel : Une fois les interférogrammes de base du chemigramme acquis, un message apparaît, demandant la confirmation du démarrage de la mesure « CHROM ».

-Démarrage externe : Une fois les interférogrammes de base de chemigramme acquis, le système attend un signal externe pour démarrer la mesure.

Démarrage externe et d'arrêt : Une fois les interférogrammes de base de chemigramme acquis, le système attend un signal externe pour démarrer la mesure. Le système arrête la mesure automatiquement dès que le signal externe disparaît.

e) Le Temps maximal de la mesure

L'activation de cette case permet de fixer un temps de fonctionnement maximum (en minutes). Après cette période, la mesure s'arrête automatiquement.

f) Enregistrement du chemigramme

La liste déroulante contient les options suivantes : On, Off et Auto.

II.6 Procédure générale de l'analyse des monoterpènes dans les huiles essentielles

L'organigramme de la figure 9 résume la méthodologie globale de l'analyse des monoterpènes dans les huiles essentielles en utilisant la détection IRTF des produits élués en continu à travers l'adsorbant solide de gel de silice.

La comparaison des valeurs d'absorbance obtenues par deux modes d'analyse différents permet la détermination des paramètres analytiques (rendement de récupération, coefficient de dispersion...) d'évaluation du processus rétention-élution.

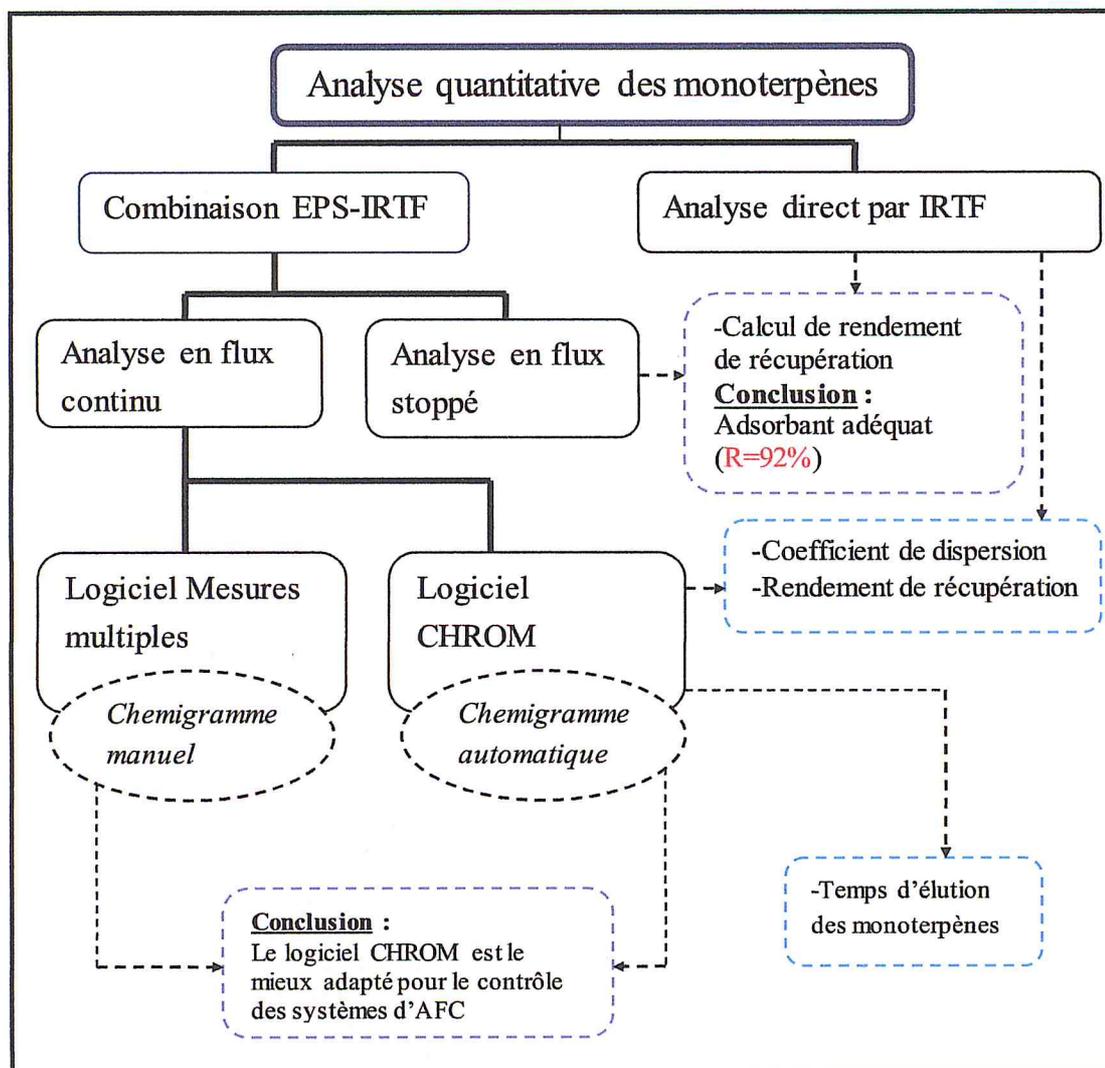


Figure 9 : Procédure générale de l'analyse quantitative des monoterpènes dans les huiles essentielles

III. Résultats et discussion

III.1 Test de l'efficacité du phénomène rétention-élution de l'adsorbant de gel de silice

Afin de tester l'efficacité du processus rétention-élution de l'adsorbant de gel de silice (SiO_2), utilisé dans cette étude, le rendement de récupération est calculé. Ce dernier est calculé par le rapport entre l'absorbance des analytes passés à travers le support solide de SiO_2 et élués en mode flux stoppé et l'absorbance des analytes préparés directement dans le CH_2Cl_2 .

Cette expérience est établie avec un mélange de solutions étalons de monoterpènes (camphre, eucalyptol, thymol et menthol) de concentration $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en utilisant des cartouches d'EPS contenant 500 mg de SiO_2 et en exploitant les bandes spécifiques de chaque étalon en mode d'intégration R comme résumé ci-dessous.

- Camphre 1738 cm^{-1} (corrigé avec la ligne de base comprise entre 1815 et 1550 cm^{-1}),
- Eucalyptol 980 cm^{-1} (corrigé avec la ligne de base comprise entre 1120 et 825 cm^{-1}),
- Thymol 1151 cm^{-1} (corrigé avec la ligne de base comprise entre 1200 et 1135 cm^{-1}),
- Menthol 1022 cm^{-1} (corrigé avec la ligne de base comprise entre 1065 et 1000 cm^{-1}).

La figure 10 illustre les spectres IRTF d'un mélange de quatre monoterpènes obtenues par dilution directe dans CH_2Cl_2 et après élution des étalons à travers le support solide en mode flux stoppé.

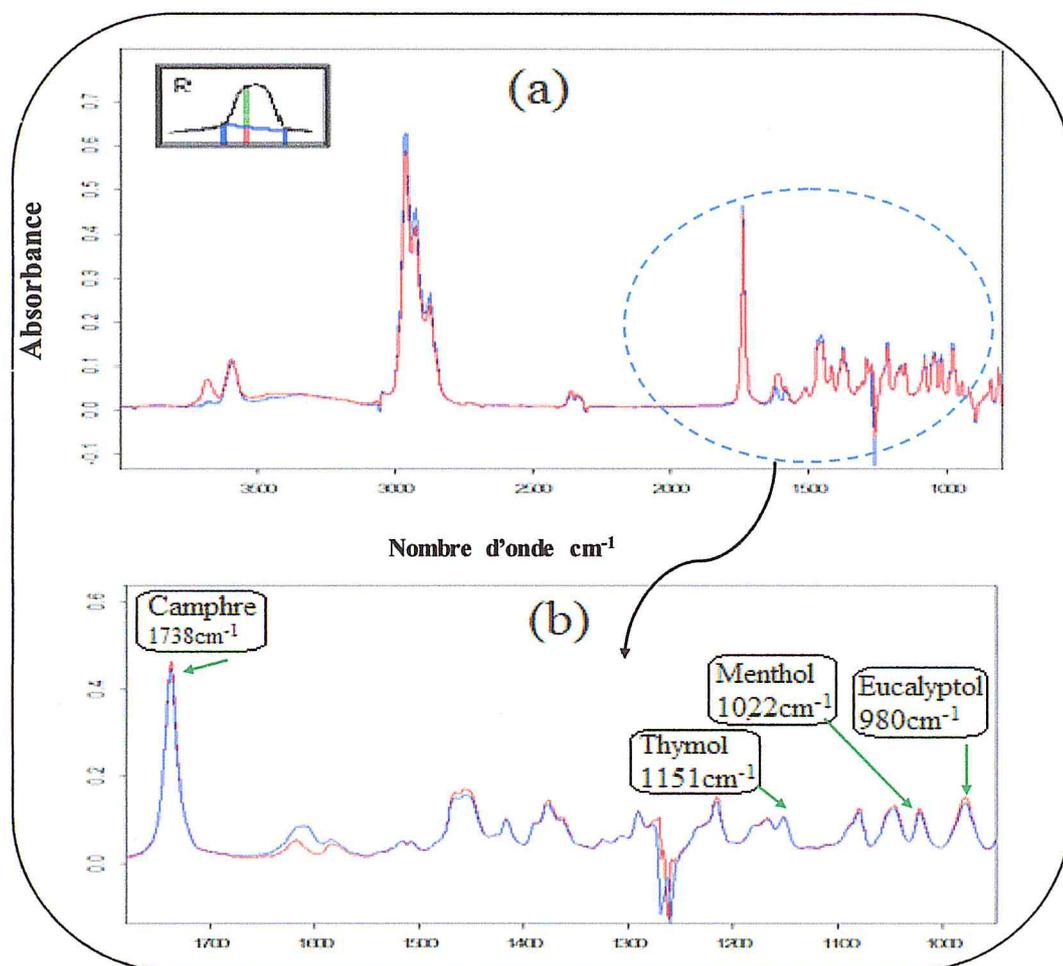


Figure 10 : Spectres d'absorbance IRTF d'un mélange de camphre, eucalyptol, thymol et menthol ($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtenus par dilution directe dans CH_2Cl_2 (bleu) et après élution à travers l'adsorbant de gel de silice en mode flux stoppé (rouge): (a) Spectres IRTF de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, (b) Spectres IRTF de $1780\text{--}950\text{ cm}^{-1}$

Les rendements de récupération sont calculés par la formule :

$$R(\%) = \frac{100 \times A_{fs}}{A_d}$$

- A_{fs} : Absorbance mesuré après élution des étalons à travers la cartouche de gel de silice en mode flux stoppé.

- A_d : Absorbance des étalons dilués directement dans CH_2Cl_2 .

Tableau 2 : Rendements de récupération des quatre monoterpènes (thymol, camphre, eucalyptol et menthol) après élution en flux stoppé à travers l'adsorbant de gel de silice

Étalon	Absorbance corrigée		Rendement de récupération (%)
	A_d	A_{fs}	
Thymol	0.068	0.065	95.5
Camphre	0.434	0.417	96
Eucalyptol	0.126	0.111	88
Menthol	0.086	0.077	89

Les résultats de tableau 2 montrent que le gel de silice est un adsorbant efficace permettant une récupération quantitative des 4 monoterpènes avec un rendement de récupération de l'ordre de 92%.

III.2 Méthodologie de l'élution des analytes en flux continu

III.2.1 Etablissement de Background (la ligne de base zéro) pour l'analyse en flux continu

Avant de lancer une mesure par spectrométrie IRTF il faut toujours commencer par l'établissement du background. La figure 11a illustre le système d'analyse AFC utilisé habituellement nécessitant deux vannes d'orientation de flux afin de choisir l'acheminement du solvant pour établir le background ou pour éluer les cartouches EPS.

Vu l'indisponibilité des vannes pour la réalisation de cette étude, le montage modifié de la figure 11b a été utilisé pour pouvoir éluer les analytes en flux continu sans être obligé d'arrêter la pompe. Pour cela, on a exploité une option qu'offre l'Opus permettant d'enregistrer un background dans les mêmes conditions expérimentales et de le rappeler par la suite pour n'importe quelle analyse.

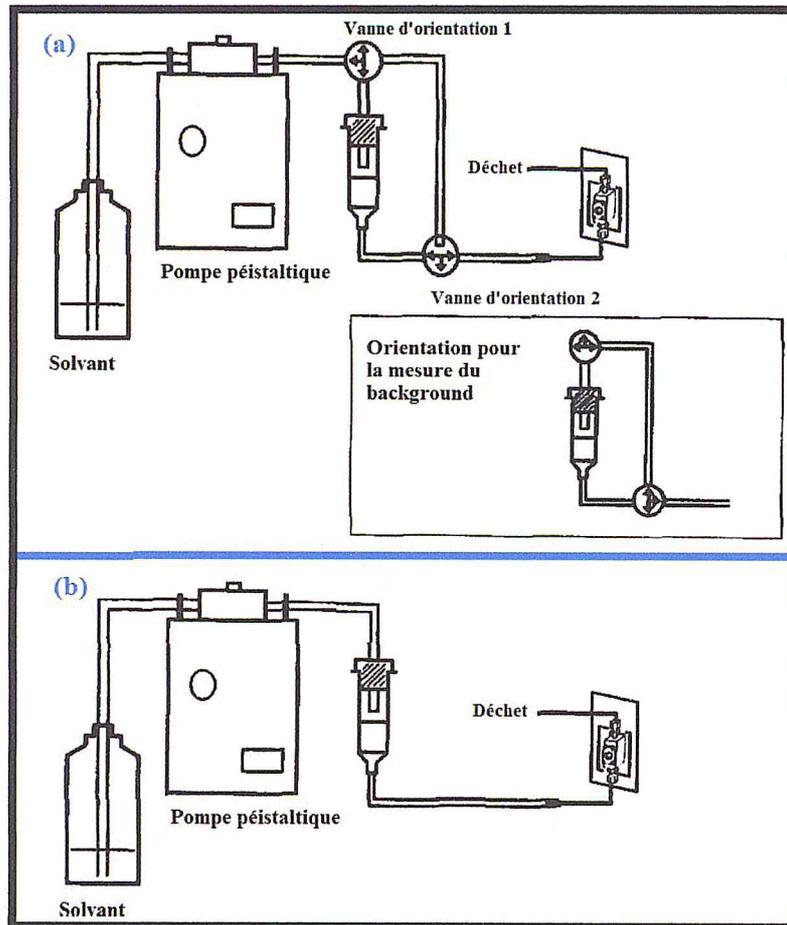


Figure 11 : Montage d'analyse AFC : (a). Utilisé habituellement, (b). Montage d'analyse AFC modifié pour cette étude

III.2.2 Comparaison entre les informations obtenues par les deux logiciels (« CHROM » et « Mesures multiples »)

Le tableau 3 indique la différence entre les paramètres caractéristiques donnés par le logiciel « CHROM » et le logiciel « Mesures multiples » et la figure 12 illustre le type d'informations affichées par chaque logiciel.

Tableau 3 : Paramètres caractéristiques des logiciels « CHROM » et « Mesures multiples »

Paramètres Caractéristiques de l'analyse	Logiciel « CHROM »	Logiciel « Mesures multiples »
Disponibilité	Option qu'il faut demander et acheter	Intégré dans le système d'exploitation
Début et fin d'analyse	Temps total de mesure	nombre de spectres
Temps entre les mesures des spectres IRTF	Par défaut	fixé par l'opérateur
Temps d'enregistrement d'un spectre	Donné par le logiciel	Calculé par l'opérateur
Chemigramme	Etabli par le logiciel	Etabli par l'opérateur
Fenêtre montrée (figure 12)	Spectres IRTF et chemigramme	Spectres IRTF
Informations affichée	Suivi de l'absorbance en temps réel	Obtention de $A=f(t)$ ultérieur
Temps d'analyse des résultats	Rapide	Lente

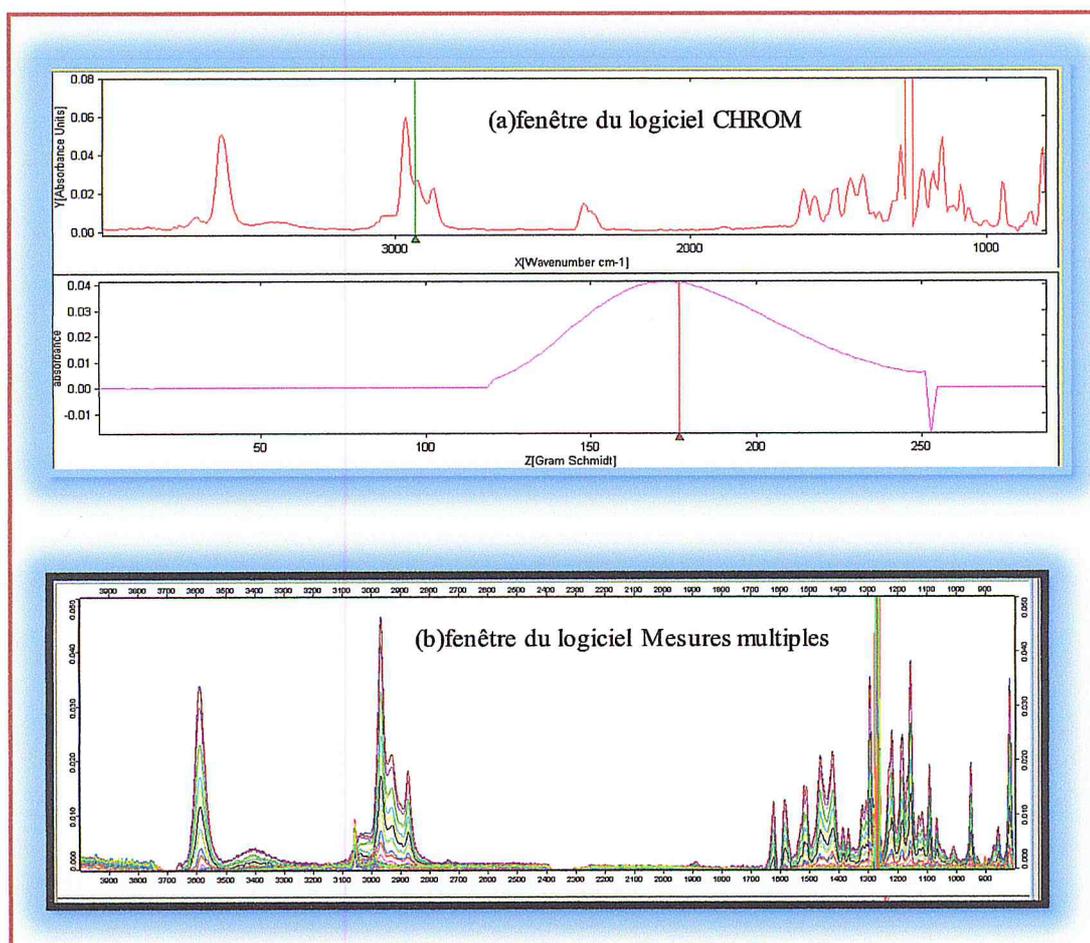


Figure 12 : Type d'informations affichées par (a) le logiciel « CHROM » et (b) le logiciel « Mesures multiples » : cas de thymol de concentration de 10 mg.mL⁻¹

En utilisant le logiciel « CHROM » le chemigramme est affiché en temps réel et obtenu directement à la fin de l'analyse. Pour le logiciel de « Mesures multiples » on le trace via le logiciel EXCEL. Nous présentons dans cette étude un seul exemple pour illustrer la différence pratique entre les deux logiciels et nous proposons les étapes d'obtentions du chemigramme du thymol de concentration de 10 mg.mL^{-1} .

a) Etapes d'obtention du chemigramme via le logiciel « Mesures multiples » :

Le chemigramme des spectres IRTF obtenus via le logiciel « Mesures multiples » est établi manuellement selon les quatre étapes suivantes :

Etape 1 : Elution de la solution de thymol en flux continu et l'enregistrement d'une série de 60 spectres consécutifs avec une fréquence d'un spectre chaque 10 seconds,

Etape 2 : Intégration des spectres de la série en utilisant la bande spécifique à 1151 cm^{-1} et corrigé avec une ligne de base adéquate,

Etape 3 : Exportation des valeurs d'absorbances vers le logiciel EXCEL où la 1^{ère} colonne représente le temps d'élution et la 2^{ème} représente l'absorbance maximale de l'analyte (tableau 4),

Tableau 4 : Valeurs d'absorbance en fonction de temps de mesure

T(Secondes)	Absorbance	T(Secondes)	absorbance	T(Secondes)	Absorbance
0	0	210	0,018	420	0
10	0	220	0,013	430	0
20	0	230	0,009	440	0
30	0	240	0,006	450	0
40	0	250	0,004	460	0
50	0	260	0,003	470	0
60	0	270	0,002	480	0
70	0	280	0,002	490	0
80	0	290	0,002	500	0
90	0	300	0,001	510	0
100	0	310	0,001	520	0
110	0,001	320	0,001	530	0
120	0,004	330	0,001	540	0
130	0,01	340	0,001	550	0
140	0,019	350	0,001	560	0
150	0,028	360	0,001	570	0
160	0,035	370	0,001	580	0
170	0,038	380	0,001	590	0
180	0,035	390	0	600	0
190	0,03	400	0		
200	0,024	410	0		

Etape 4 : Etablissement du chemigramme montré sur la figure 13 en considérant l'option » Insertion » nuage de points.

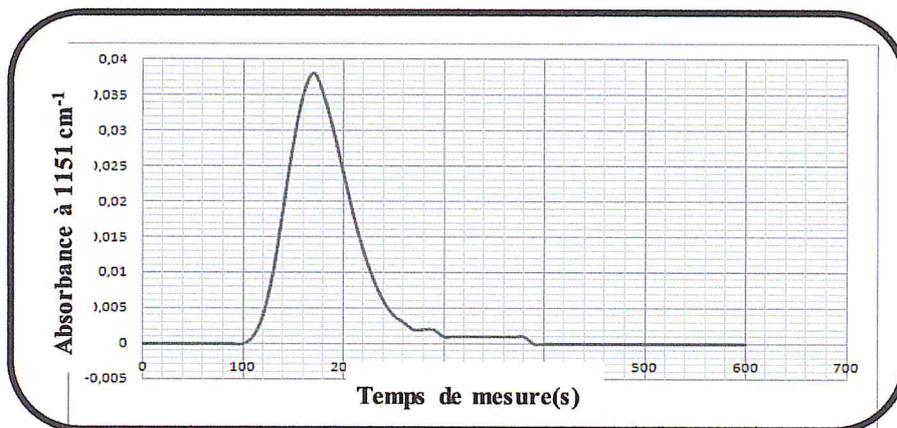


Figure 13 : Chemigramme d'éluion de thymol de 10mg.mL^{-1} établi par EXCEL

b) Etapes d'obtention d'un chemigramme via le logiciel « CHROM » :

Etape 1 : Après l'éluion de la solution du thymol à travers l'adsorbant dans le système AFC, c'est l'obtention de chemigramme globale de l'analyse de la Zone totale comprise entre 4000 et 800cm^{-1} (figure 14) ;

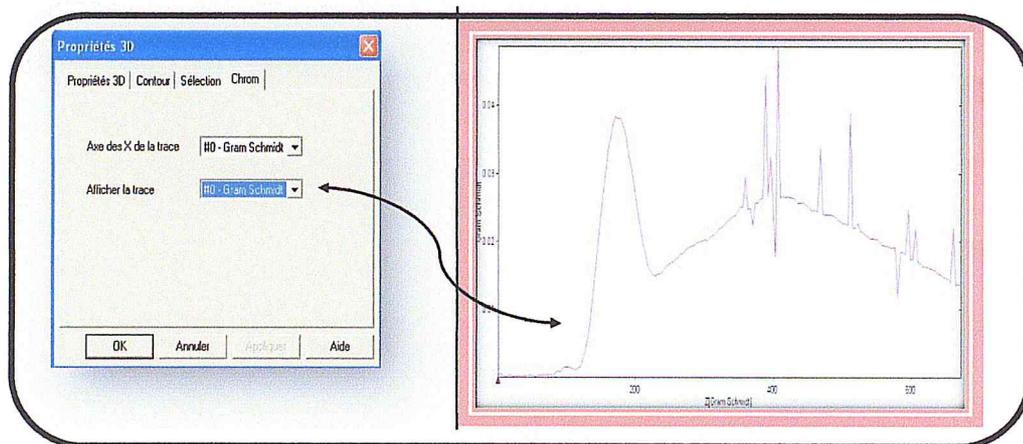


Figure 14 : Chemigramme globale affiché à partir la fenêtre Propriétés 3D

Etape 2 : Integration et affichage de chemigramme à une bande spécifique, pour le thymol à 1151cm^{-1} (figure 15) ;

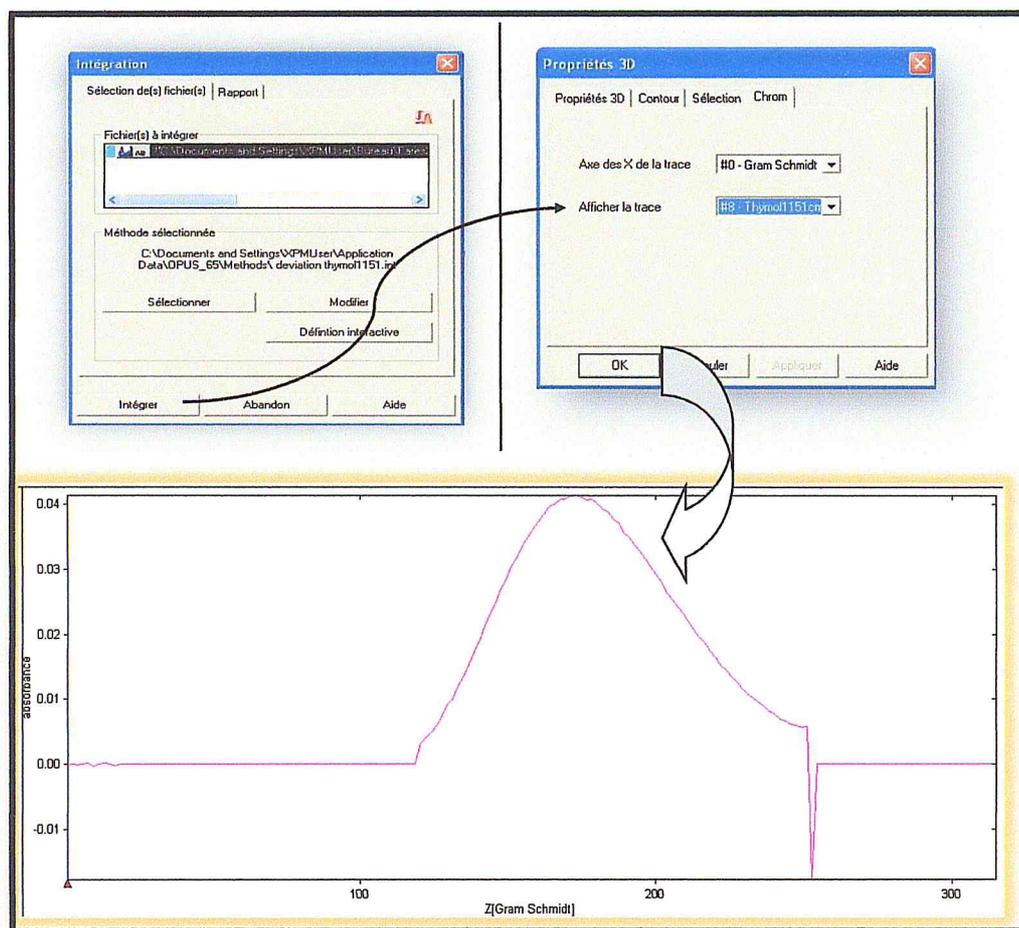


Figure 15 : Chemigramme de thymol à 1151cm^{-1} intégré par la fenêtre « Intégration » et ensuite affiché à partir de la fenêtre « Propriétés 3D »

Suite à ce qui précède, on finit par le résultat que chacun des deux logiciels permettant l'analyse en flux continu. Cependant le logiciel « Mesures multiples » est laborieux et nécessite un temps d'analyse beaucoup plus important.

Une fois l'aspect pratique des deux logiciels est mis en évidence, il a été décidé de poursuivre le reste des manipulations de cette étude avec le logiciel « CHROM ».

III.2.3 Ordre d'éluion des quatre monoterpènes

Afin de savoir l'ordre d'éluion des quatre monoterpènes, le chemigramme de chaque solution étalon de concentration de $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ préparés à part et traversant l'adsorbant de gel de silice est obtenu.

Comme l'illustre la figure 16, le premier étalon élué est le thymol dont l'absorbance maximale apparait après 176s suivi par le camphre après 256s puis l'eucalyptol après 358s et enfin le menthol après 450s.

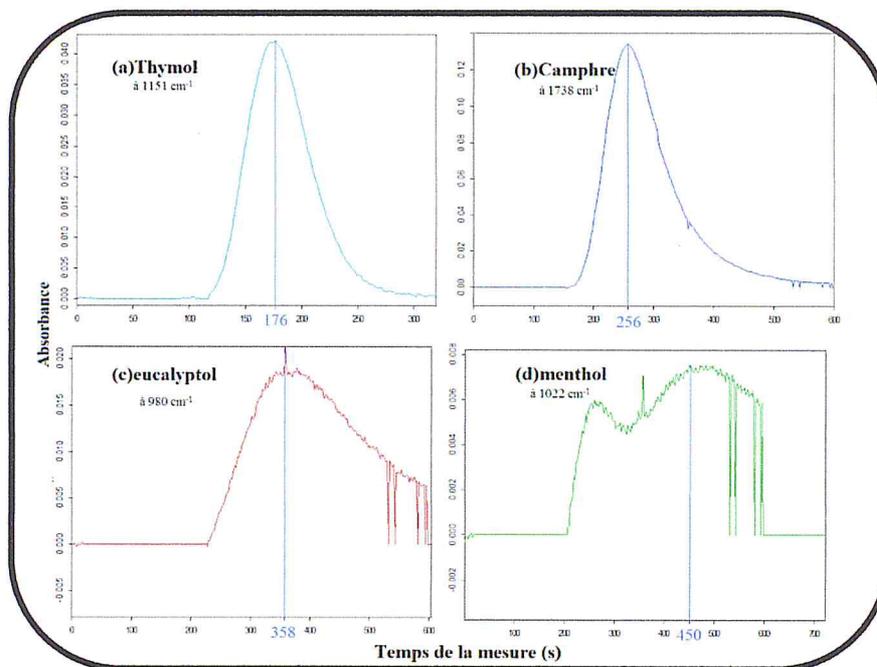


Figure 16 : Chemigrammes obtenus à les bandes spécifiques des quatre solutions étalons de concentration de 10 mg.mL^{-1} élués à travers l'adsorbant en flux continu : (a) Thymol, (b) Camphre, (c) eucalyptol et (d) menthol

Comme on peut bien le constater sur la figure 14, plus le temps d'éluion est grand plus l'allure gaussienne du chemigramme se dégrade.

III.3 Détermination des paramètres analytiques du processus rétention-éluion en mode AFC

III.3.1 Reproductibilité du processus rétention-éluion en mode AFC

Afin de tester la reproductibilité du processus rétention-éluion en mode AFC des solutions mélanges avec des concentrations différentes sont éluées à travers le support solide et analysées en mode AFC.

La figure 17 montre les chemigrammes de chaque monoterpène, se trouvant en mélange à différentes concentrations. Le coefficient de corrélation indiqué sur la figure 18 indique une très bonne corrélation entre les concentrations de monoterpène et la réponse analytique traduisant ainsi une très bonne reproductibilité de processus rétention-éluion indépendant de la concentration considérée.

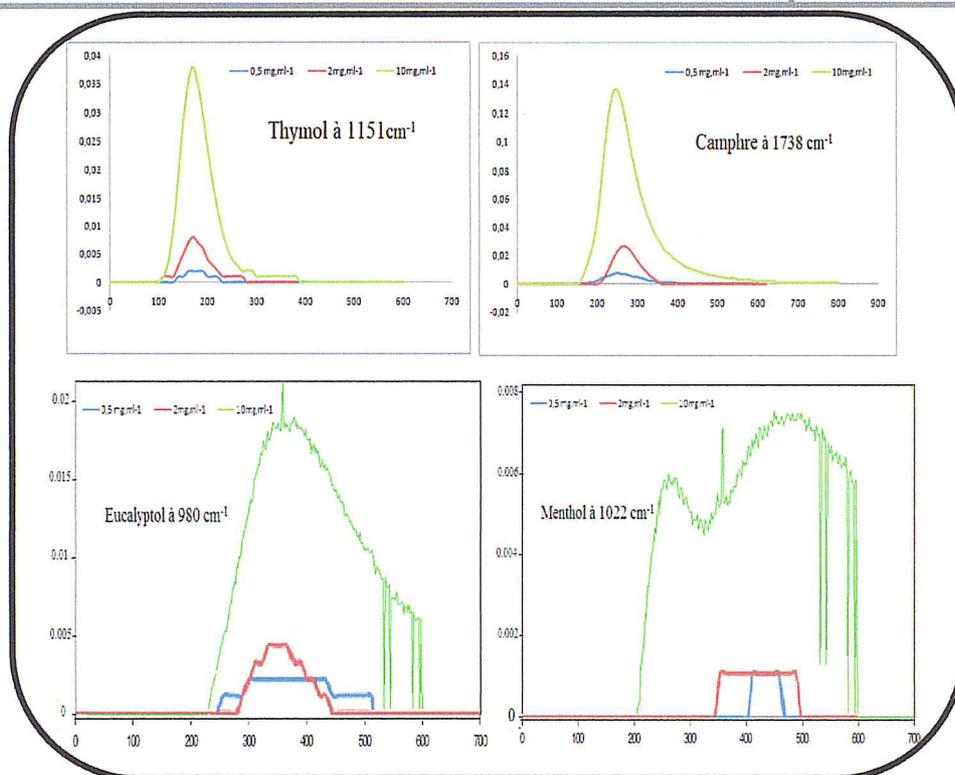


Figure 17 : Chemigrammes aux bandes spécifiques des monoterpènes se trouvant en mélange à différentes concentrations (0.5, 2 et 10 mg.mL⁻¹)

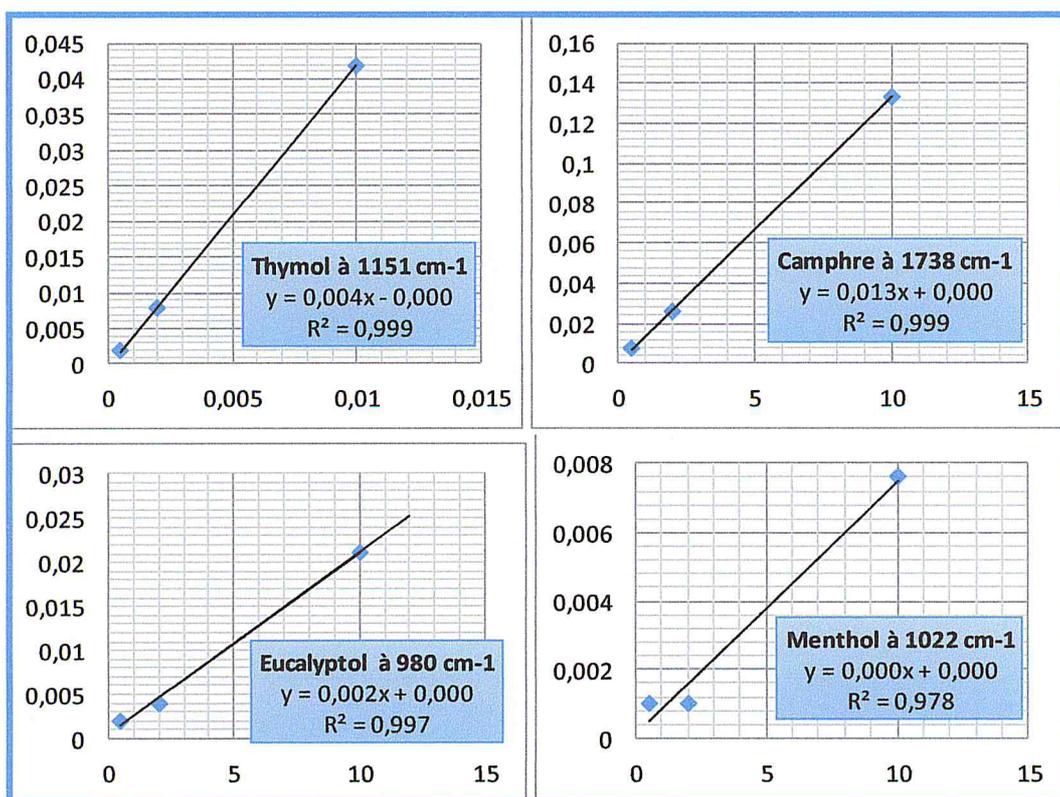


Figure 18 : Droites de calibration des solutions étalons des 4 analytes élues en flux continu : Thymol, camphre, eucalyptol et menthol

III.3.2 Coefficient de dispersion des analytes dans l'adsorbant

La comparaison de la pente de la droite de calibration des solutions étalons obtenus directement dans CH_2Cl_2 et après élution à travers le support solide donne la valeur du coefficient de dispersion des analytes.

Les résultats du tableau 5 montre que le coefficient de dispersion est lié directement au temps d'élution c.-à-d. plus l'analyte passe de temps au sein de l'adsorbant et plus le coefficient de dispersion est important.

Tableau 5 : Coefficient de dispersion des quatre monoterpènes

Etalon	Temps d'absorption maximale (s)	Pente		Coefficient de dispersion D $D = \frac{A_d}{A_e}$
		Courbe Directe A_d	Courbe Après élution A_e	
Thymol	176	0.008	0.004	2
Camphre	256	0.045	0.013	3.5
Eucalyptol	358	0.012	0.002	6
Menthol	450	0.007	0.000	>7

Afin de vérifier le comportement des analytes qui peuvent se trouver dans les huiles essentielles en proportion équitable ou comme produit majoritaire, des solutions de concentration de 10 mg.mL^{-1} des monoterpènes se trouvant à l'état pur ou en mélange sont analysées par la méthode développée.

Les résultats résumés dans le tableau 6 indiquent que les rendements de récupération sont du même ordre pour chaque analyte qu'il soit pur ou en mélange.

Tableau 6 : Rendement de récupération des quatre monoterpènes soient purs ou en mélange

Etalon	Absorbance		Rendement de récupération		
	Analyse direct	AFC après élution		Etalon Pur	Etalon en mélange
		Etalon pur	Etalon en mélange		
Thymol	0.083	0.041	0.042	50%	50%
Camphre	0.458	0.158	0.134	34%	29%
Eucalyptol	0.131	0.016	0.021	12%	16%
Menthol	0.076	0.013	0.007	18%	10%

Suite aux résultats obtenus, une étude d'optimisation s'impose pour diminuer le coefficient de dispersion et augmenter le rendement de récupération.

III.4 Effet de la quantité d'adsorbant sur le processus rétention-élution

Dans cette étude, seulement la quantité de phase est étudiée pour optimiser le processus rétention-élution.

III.4.1 Effet de la quantité d'adsorbant sur le coefficient de dispersion

Afin de diminuer le temps d'élution et par conséquent le coefficient de dispersion D ($D_{\text{Optimal}} = 1$), des quantités d'adsorbant de gel de silice de 500, 200 et 100 mg sont testées.

Les résultats dans le tableau 7 montrent que la masse de 100 mg de gel de silice donne les meilleurs coefficients de dispersion et permettant un temps d'analyse plus court avec un écart de 15 secondes entre le 1^{er} analyte élué et le dernier.

Tableau 7 : Effet de la quantité d'adsorbant sur les coefficients de dispersion

Quantité de gel de silice	Thymol		Camphre		Eucalyptol		Menthol	
	Temps A_{max} (s)	D						
500 mg	176	2	256	3.4	358	6.2	450	10
200 mg	62	1.4	67	1.6	80	2.7	93	3.2
100 mg	60	1.2	66	1.3	73	1.8	75	2

Temps A_{max} (s) : Temps d'absorption maximale (s)

III.4.2 Effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure de chemigramme

Les figures 19-22 illustrent l'effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure du chemigramme. Plus la quantité d'adsorbant est faible meilleure est l'allure des chemigrammes des quatre monoterpènes.

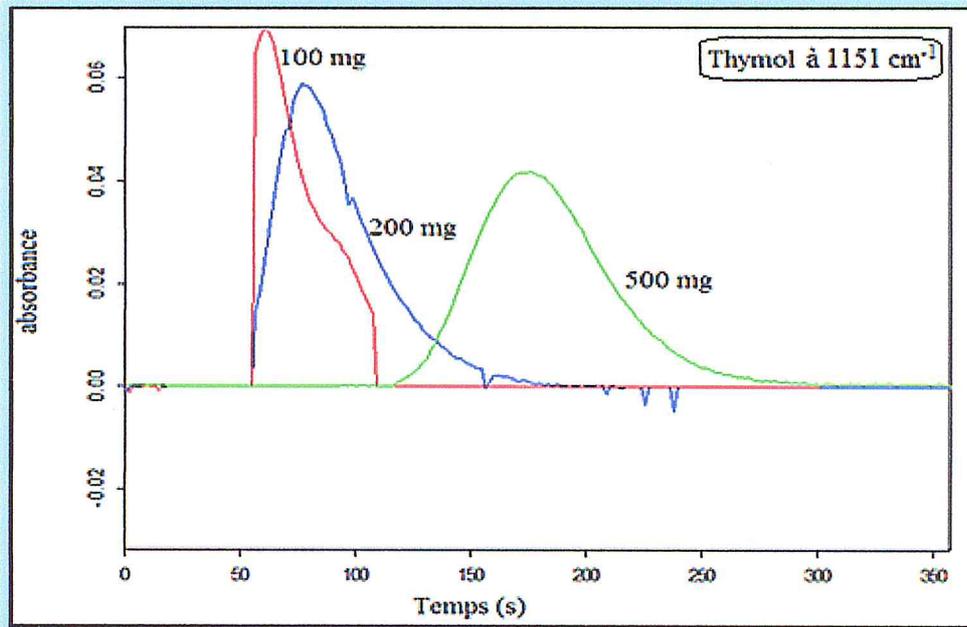


Figure 19 : Effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure de chromatogramme du thymol à 1151 cm⁻¹

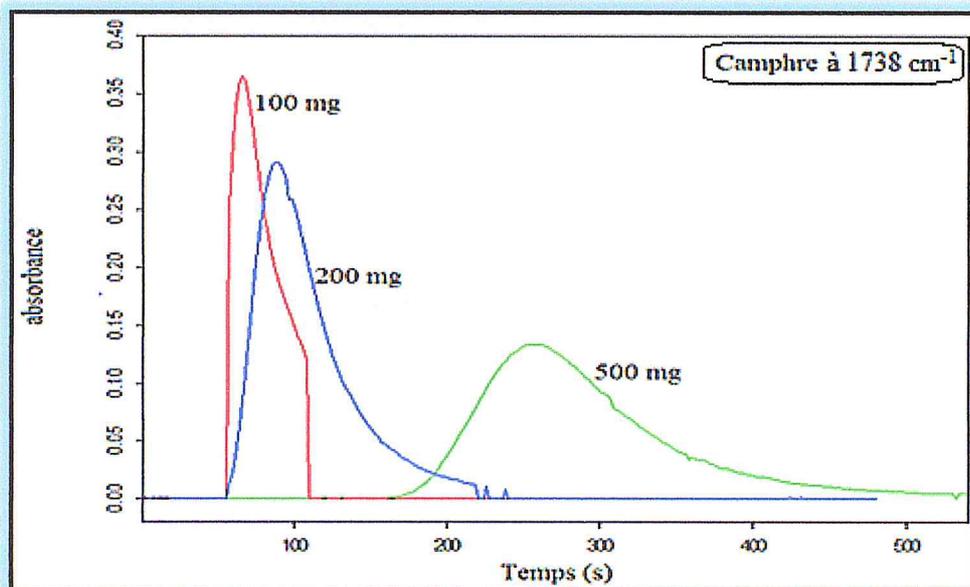


Figure 20 : Effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure de chromatogramme du camphre à 1738 cm⁻¹

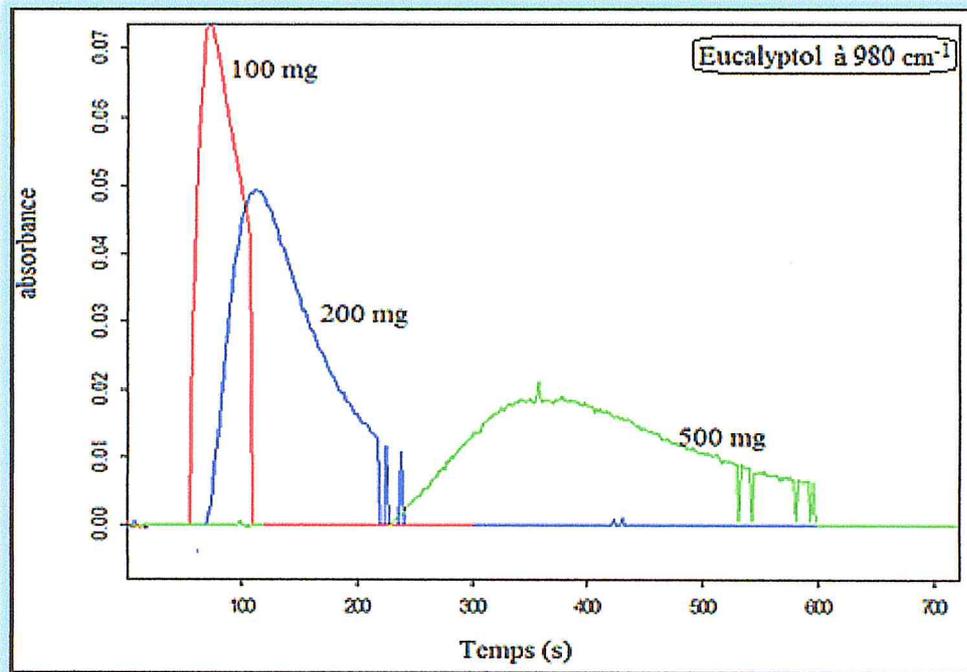


Figure 21 : Effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure de chemigramme d'eucalyptol à 980 cm⁻¹

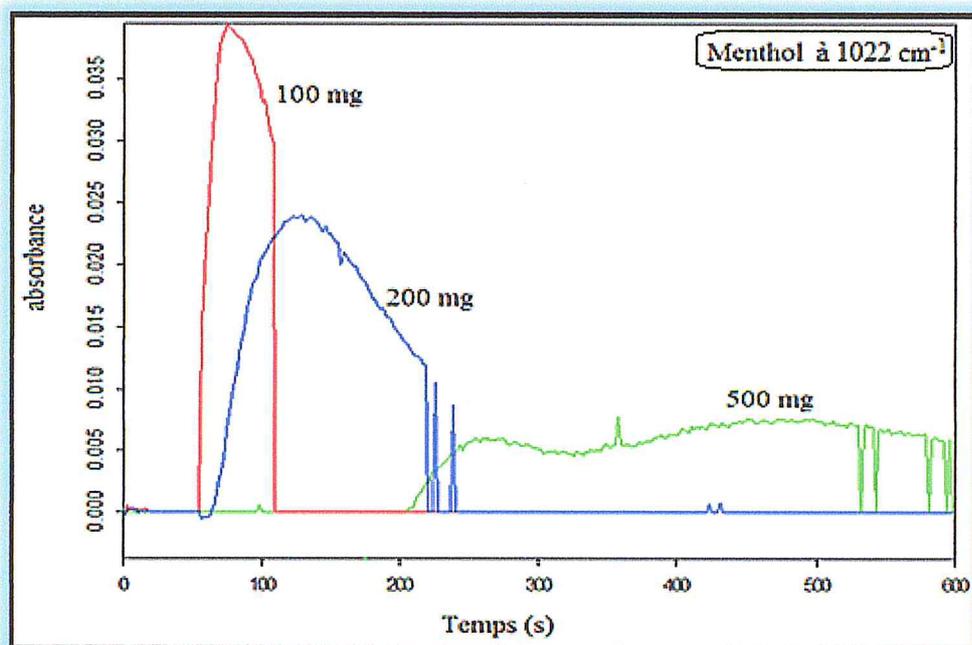


Figure 22 : Effet de la quantité d'adsorbant sur l'allure de chemigramme du menthol à 1022 cm⁻¹

Suite à ce qui précède la quantité de 100 mg d'adsorbant offre le meilleur coefficient de dispersion et la meilleure allure des chemigrammes.

III.5 Teneurs approximative des monoterpènes dans les huiles essentielles

0.3 mL de chaque huile essentielle diluée dans CH_2Cl_2 et de concentration de 32.5 mg.mL^{-1} sont élués à travers une cartouche d'EPS contenant 100 mg d'adsorbant solide et analysée en continu par spectrométrie IRTF.

La détermination de la teneur des monoterpènes dans les huiles essentielles est approximative car elle est calculée par rapport à une seule valeur de concentration de 10 mg.mL^{-1} et non pas par l'extrapolation dans une droite de calibration. La formule de calcul est montrée ci-dessous.

$$T(\%) = \frac{C_{MHE}}{32.5} \times 100 = \frac{A_i \times 10}{A_t \times 32.5} \times 100$$

T(%) :	Teneur du monoterpène dans l'huile essentielle considérée ;
C_{MHE} :	Concentration du monoterpène dans l'huile essentielle considérée ;
10 mg.mL^{-1} :	Concentration de référence des 4 étalons en mélange ;
A_t :	Absorbance de la solution des 4 étalons de 10 mg.mL^{-1} ;
A_i :	Absorbance de monoterpènes présent dans l'huile essentielle ;
32.5 mg.mL^{-1} :	Concentration de l'huile essentielle préparée.

Le tableau 8 montre les résultats obtenus par analyse AFC-IRTF et la comparaison avec celle du couplage CG-SM.

Tableau 8 : Teneurs des monoterpènes dans les huiles essentielles

Huile essentielle	Monoterpène	Teneur expérimentale AFC-IRTF	Teneur théorique CG-SM
Thym	Thymol	46.7%	20 à 40%
Menthe poivrée	Menthol	43%	40%
	Eucalyptol	12%	24%
Eucalyptus	Eucalyptol	14%	51%
Menthe	Menthol	45%	40%

La comparaison des teneurs obtenues par AFC-IRTF et par CG-SM donne, d'un côté, des valeurs comparables indiquant que la méthode développée est prometteuse et d'un autre côté des valeurs différentes du fait, probablement, que les deux huiles analysées par les deux méthodes sont différentes.

Chapitre III

**Création et exploitation d'une
banque de données spectrales
pour l'identification des
composés des huiles essentielles**

I. Introduction

Le grand développement de la Technique Infrarouge à Transformée de Fourier (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 méthodes, (1) l'identification des groupements fonctionnels de la substance, (2) la confirmation de la structure moléculaire à partir de la comparaison de la totalité de spectre avec celui d'un spectre de référence d'un composé connu.

L'objectif de cette étude est double :

- Le premier est consacré au regroupement de la majorité des produits chimiques des substances naturelles qui appartiennent à la même classe chimique (Tableaux 9-12). Ce travail facilitera les futurs travaux portant sur l'analyse qualitative et/ou quantitative des différents produits de la même classe par spectrométrie IRTF.
- Le deuxième est focalisé sur la création d'une modeste banque de données spectrales IRTF de quelques composés (selon la disponibilité) existant dans les substances naturelles.

Cette bibliothèque de spectres de grande utilité sera mise à la disposition des chimistes et des chercheurs travaillant dans le domaine des substances naturelles pour l'identification des produits.

L'application dans cette étude concerne la détermination des composés d'une série d'huiles essentielles éluées à travers un support solide de type silice (SiO_2).

L'identification des composés élués se réalise en faisant appel à la bibliothèque spectrale préalablement établie sur le logiciel Opus de la spectrométrie IRTF. Une analyse comparative sera réalisée par CG-SM. Il y a lieu de noter que la bibliothèque établie reste très pauvre et son enrichissement ne peut que renforcer l'étude qualitative.

II. Composition chimique des plantes

On rencontre chez les végétaux différents produits naturels qui se trouvent dans de nombreuses parties de la plante, ces produits naturels sont des composés terpéniques, des composés phénoliques et d'autres tels que les acides gras, les stéroïdes...etc. Dans ce travail nous intéressons à la composition chimique de quelques classes à savoir :

II.1 Composés terpéniques

Le tableau 9 regroupe une liste importante des composés des huiles essentielles appartenant à la même classe chimique des terpènes existants dans les plantes. On note les monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, tetraterpènes qui peuvent être hydrocarbonnées, oxygénées ou glucosidiques.

Tableau 9 : Principaux composés de différentes classes de terpènes

Classes		Nom de composé	Réf.	
T E M R T P E N S E	H	β -myrcène	40-42	
		3,7-diméthyl-1,3,6-octatriène ou Ocimène	43, 41, 44, 45, 46, 47	
		1(7)4,8-O-menthatriène	43	
		P-mentha-1(7),4(8)-diène	47	
		α -pinène ou (1R)-2,6,6-triméthylbicyclo (3.1.1) hept-2-ène	40, 41, 42, 48, 44, 45, 46	
		Limonène	41, 42, 44, 45, 49, 50, 47	
		γ -terpinène	40, 41, 44, 45, 46, 47	
		Terpinolène	45	
		α -terpinolène	41, 45, 47	
		β -Pinène	38, 44, 45, 46, 47	
		Camphène	48, 44, 45, 46	
		Alpha-tujène	40, 45	
		Phellandrène	40	
		p-cimène	40, 44, 46	
		Sabinène	40, 42, 39, 46	
		α -terpinène	45, 47	
		o-cymène	40, 44, 47	
		Myrcène	44, 45, 46	
		Camphre	41, 44, 46	
		α -phellandrène	44, 45, 46	
		β -phellandrène	45	
		2, 3,3-triméthyl-3-cyclopentène acétaldéhyde	48	
		Car-3-ène	41, 45	
		Δ -car-3-ène	44, 46	
		Car-4-ène	41	
		Benzène,1-(1,5-diméthyl-4-hexenyl)-4-méthyl	47	
		α -fenchène: bicyclo [2, 2,1] heptane-7,7-diméthyl-2-méthylène	42	
		Benzène-1-méthyl-3-(1-méthyléthyl)		
		O	Linalol	43, 40, 41, 42, 48, 44, 45, 46, 47

Thymol	40,43
Ester de linalyl	41
Hotrienol	43
α -thujone	46
Pulegone	43
Acétate d'isopulegol	41
Acétate de geranyl	43, 45
Iso-geraniol	41
Citral	43
bicyclo[2,2,1]hept-2-one,1,7,7-triméthyl-(15) comphone	ou 42
Nerol	41
Acétate de nerol	41
Safranal	51
Myrcénol	41
Trans-geraniol	41
Cis-geranyl acetone	41
Acétate de geranéol	41
Bergarniol	41
Neoisomenthol	44
(-)-cis-acétate de myrtanyl	41
8,8-diméthyl-4-méthylène-1-oxaspiro[2,5]oct-5-ène	43
Acétate de terpinéol	41, 43
Acide 4-(1'-méthylethyl)benzoïque	47
1,8-cinéole (eucalyptol)	40, 41, 44, 51
2-méthyl-6-méthylène-3,7-octadien-2-ol anitol	ou bien 43
3-méthyl-6-(1-méthylethylidène)2-cyclohexen-1-one (piperitenone; pulespenone; 3 terpinolenone)	43
(+)- (1S, 5S)-2(10)-3-pinadien-4-ylacetate	43
4-acétylcar-3-ène	43
Acétate de sabinyle	46
Acétate de linalyl	41, 43, 44,48
2-pin-4-ol	48
Acétate de nèryle	45
5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-triméthyl(2(4H)) benzofuranone	43
Oxyde de trans-carvone	43
Oxide de trans-limonène	43
Limonène acide	41
Limonène époxyde	41
Oxide de trans-linalool	48
2-méthyl-6-méthylène-3,7-octadien-2-ol anitol	ou bien 43
(+)-2-acétyl-2-carene	43
Aldehyde de féncholénique	48
Isobornéol	44
2, 3, 3-triméthyl-3-cyclopentène acétaldéhyde	48

Trans-pinocarveol	44, 48
Isopinocarveol	41
Pinocarvone	48
p-mentha-1,5-dien-8-ol	48
Bornéol	41,44, 46, 48
m-cymen-8-ol	44
p-cymene-8-ol	44, 48
pin-2-en-4-one	48
Carvéol	40, 42, 44, 48
Citronéllo	48
Oxyde d'acetoxy-cis-linalol	48
Acétate de dihydro linalol	44
Acetate d'isopalegol	48
4,6,6-trimethyl bicyclo [3.1.1]hept-3-ene-2-ol	42
Acide benzène-4-(1-méthylethyl)	47
1,4-Cineole	44
Trans-sabinene hydraté	40, 44
Cis-sabinene hydraté	40
Trans-p-mentha-2,8-dienol	40
P-mentha-1(7), 8(10)-dien-9-ol	51
Car-2-en-10-al	47
4-terpinéol	40, 41, 44, 45, 47
Trans-(+)-carvéol	40,42
Carvone	40, 42, 44
Acétate de dihydrocarvyl	40
Fenchone	46
Dihydro carvéol	40, 41, 44
Acetate de Cis-carvyl	40
Acetate de trans-carvyl	40
3-methyl-2-pent-2-enyl-cyclopent-2-enone	40
Cis-jasmone	40, 41
Trans-p-mentha-2-en-1-ol	40
Cis-p-menth-2-en-1-ol	45,46
1-terpineol	40
α -terpineol (p-menth-1-en-8-ol)	40, 41, 44
Cuminal	40
Piperitone	40
1-verbenone	41, 46
(S)-cis-verbenol	41
Dihydrocarvone	40, 42
Phellandral	40, 47
β -terpinéol	41
Acetate de bornyle	41, 44, 45
Methoxy de carvol	40
β -cyclocitral	51
Cuminaldehyde	47

S Q T	H	α -humulène	43, 45, 46
		α -muroène	43, 45, 48
		E-farnesène	43
		Alloaromdendrène	40, 43
		cis- α -bergamotène	43, 44
		γ -elemène	43
		Elemène	48
		Caryophyllène	40, 41, 43, 45, 48
		α -caryophyllène	41, 52
		β -caryophyllène	46, 52
		α -amorphène	48
		β -selinène	48
		(+)-epi-bicyclosesquiphellandrène	48
		Calamenène	40, 48
		γ -cadinène	40, 48
		α -cadinène	45
		Δ -cadinène	40, 41, 48
		Trans- β -farnesène	48
		α -calacorène	48
		Cedrène	48
		β -bourbonène	40
		Ledène	40
		m-camphorène	45
		p-camphorène	45
		D-Germacrène	45
		Germacrène	41
		α -Gurjunène	40, 53
		Aromdendrène	40
		3-aromadenedradiène	53
		α -copaène	40, 45
		δ -Cadinène	44, 46
		Cadina-1(10),6,8-triène	53
		(+)-calarène	53
		β -bisabolène	41
α -bisabolène	41, 45		
O	Gamma-cis-sesquicyclogeraniol	43	
	α -ionone	43	
	β -ionone	43, 51	
	Guaiol	45	
	2,3-dihydro-4-oxo- β -ionone	43	
	Ledol	43	
	Oxyde de bisabolol	43	
	α -bisabolol	43	
	(-)-elma-1,3,11(13)-trien-12-ol	43, 47	
	β -simensol	43	
	Elemol	48	

		Oxyde de caryophyllène	40, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 52	
		Cedrol	48, 26	
		Humulène-2- epoxyde	45, 48	
		B-eudesmol	48	
		Tau-cadinol	45	
		α -cadinol	40, 41, 45	
		Epi-cubénol	45	
		Spathulenol	40, 48	
		α -spathulenol	41	
		Isospathulenol	40, 48	
		Longipinocarveol, trans	40	
		Bêta-copaen-4 α -ol	53	
		α -acorénol	27	
		β -acorénol	27	
D T	O	Oxide de manoyl	48	
		Phytol ou hexadecen-1-ol, 3, 7, 11,15 tétraméthyl	40,42, 51, 53	
		Dérivés pimaranes	54	
		Totarolone	55	
		Totarolenone	56	
		Totaradiol	57	
		Totarol	55	
		Furrugénol	58	
		Methyl-12 β -hydroxy sandaracopimarate	59	
T T	H	Squalène	51	
		10-dimethyl squalène	53	
	O	Taraxasterol	60, 61,61	
		Calenduladiol		
		Arnidiol		
		Heliantriol		
	G	β -D-galactopyranosyl	73, 62	
		β -D-glucopyranosyl		
		Oleanolglycoside calendula glycoside-A6-O-méthyle ester		
	T T T	H	Carotène	60, 61
Lycopène				
Lutéine				
Flavoxanthin				
O		Taraxasterol	60, 61, 63, 64	
		Calenduladiol		
		Arnidiol		
		Heliantriol		
			Faradiol	

MT : Monoterpènes ; SQt : Sesquiterpènes ; DT : Diterpènes ; TT : Triterpènes ;
TTT : Tetraterpènes ; H : hydrocarbonné ; O : oxygéné ; G : glucosidique.

II.2 Composés phénoliques

Le tableau 10 regroupe les plus importants composés de différentes classes phénoliques issus des plantes.

Tableau 10 : Principaux composés de différentes classes phénoliques

Classes		Nom de composé	Réf.	
Composés phénoliques	Phénols simples	Anéthol	46, 42	
		Anisaldehyde	51	
		Eugénol	40, 43, 52	
		Phénol, 2-métoxy-3-(2-propenyl)	53	
		Acétyleugénol	52	
		p-crésol	53	
		Phénol, 2-méthoxy-4-(2-propenyl)	42	
		4-hydroxy-benzaldehyde	51	
		Isoeugenol	41	
		methoxyisoeugenyl	41	
		methoxyeugenol	41	
		Carvacrol ou Phénol, 2-methyl-5-(1-méthyléthyl)	40,42,43, 44, 50	
		Parachlorophénol	51	
		Parabromo-phénol	51	
		2,4-dibromo-phénol	51	
		2-[2'-[4''-(1''',1''',3''',3''',tetramethylbutyl)phenoxy]ethoxy]-ethanol	51	
		Octyl methoxycinnamate	51	
		Phénol	43	
		Benzophénone	43	
		3,5-dimethyl phénol	43	
		1-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)ethanone(acetophenone,o-acetyl-p cresol)	43	
		Dilapiole	43	
		Apiol	43	
		4-hydroxy-2-methylacetophénone	43	
		Acides phénoliques	Acide cafféique	61, 68
			Acide chlorogénique	
	Acide coumarique			
	Acide férulique			
	Flavonoïdes	(3-méthoxy-4,3,5,7tetrahydroxyflavone) isorhamnetin	60, 61, 65, 66, 67,68	
		Isorhamnetin-3-Oglycoside		
		Rutine		
		Quercetin-glycoside		
		7-méthyléthernaringénine (sakuranétine)		

		7-o-methyl aromadendrine	
		3-o- acetyl taxifoline	
		3-o- acetyl padmatine	
		4, 7,4`-trihydroxyflavone (apigénine)	
		6-methoxyscutellareine (hispiduline)	
		5,7,3`,4`-tetrahydroxyflavone (luteoline)	
		5,7,3`,4`-tetrahydroxy-3,6-dimethoxyflavone	69
		5,7,3`,4`-tetrahydroxy-6,3-dimethoxyflavone	
		5,6,3`,4`-tetrahydroxy-3,7-dimethoxyflavone	
		7-glucosyl-5, 6,3`,4`-tetrahydroxy-3-methoxyflavone	
		5,7,4`-trihydroxy-3,3`dimethoxyflavone	
		(2S)-5,7,4`-trihydroxyflavone (naungénine)	
		(2S)-5,4`-dihydroxy-methoxyflavone	
		(2R)(3R)-5,7,3`,4-tetrahydroxyflavone	
		(2R)(3R)-5,3`,4-trihydroxy-7-methoxyflavone	
		(2R)(3R)-3,5,4`-trihydroxy-7-methoxyflavone	
		(2R)(3R)-3,0-acetoxy-5,7,4`trihydroxyflavone	
		(2R)(3R)-3,0-acetoxy-5,4`-dihydroxy-7-methoxyflavone	
		(2R)(3R)-3,5,7,3`,4`-pentahydroxyflavone	
		2R)(3R)-3,5,3`,4`-tetrahydroxy-7-methoxyflavone	
		(2R)(3R)-3,0-acetoxy-5,3`,4`-trihydroxy-7-methoxyflavone	
		3-methoxykaempférol (isokaempféride)	
		3-methyl quercétine	
		3-methoxyquercétine	
		3-methoxy quercétine -7-glucoside	
		3-methoxyquercétine	
		7-méthoxyquercétine (Rhamnétine)	
		3`-methoxyquercétine (isoramnétine)	
		3,3`-dimethoxy quercétine	
		3,6-dimethoxyquercétagétine (axillarine)	
		6,3`-dimethoxyquercétagétine (spinacétine)	
		Eriodictyol	

		7-methoxy Eriodictyol	
		3-acetate aromadendrine	
		7-methoxy aromadendrine	
		3-acétate taxifoline	
		7-méthyl ether taxifoline	
		7-méthyl ether -3-acetate taxifoline	
		Aromadendrine (dihydrokaempférol)	
		Taxifoline (dihydroquercétine)	
	Coumarines	Esculetin	61
		Scopoletin	
		(7-hydroxycoumarin) umbelliféron	
		2H-pyran-2-one (coumalin)	
	Tanins	Catéchole et pyrogalol	61
	Lignane	Déoxypodophyllotoxin	70

II.3 Acides gras

Les principaux composés de la classe des acides gras extraits de plante sont montrés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Principaux composés de la classe des acides gras

Classe	Nom de composé	Réf.
Acides gras	Acide 3-methylbutanoïque (acide isovalérique)	43, 48
	Acide pentanoïque	43
	Acide 2-méthyl butanoïque	43
	Acide 2-éthyl butanoïque	43
	Acide tridecanoïque	51
	Acide pentanoïque	43
	Acide butanoïque	43, 48
	Acide -4-oxo-butan-2-oïque	43
	Acide hexanoïque	43, 48
	Acide heptanoïque	43
	Acide 9-octadécénoïque (acide oléique)	51, 52
	Acide octanoïque	43
	Acide nonanoïque	43, 50
	Acide octanoïque	43
	Acide décanoïque	43,61,71
	Acide dodecanoïque (acide laurique)	43, 61, 71
	Acide decanedioïque	38, 43
	Acide tétradécanoïque (Acide myristique)	40,42,43,51, 61,71
	Acide hexadécanoïque (Acide palmitique)	40,42, 51, 53, 61, 71
	Acide palmitoléique	51, 53
Acide linoléique	51	
Acide stéarique	51	

II.4 Hydrocarbures

Les composés des hydrocarbures issus des plantes peuvent être classés en hydrocarbonée non oxygéné et hydrocarbonée oxygénés comme illustré dans le tableau 12.

Tableau 12 : Principaux composés de différentes classes d'hydrocarbures

Classes		Nom de composé	Réf.
H Y D R O C A R B U R E S	H y d r o c a r b u r e s	2-méthyl-buta-1,3-diene	43
		3-héxyne	43
		1, 3,5-cycloheptatriene	43
		2,3-diméthyl-2-butène	43
		3,4-diméthyl-3-hexène	43
		(2E,4E,6Z,8Z)-undecatetra2,4,6,8-ène	43
		2, 4, 6,8-tetraméthyl-1-undecene	43
		Cyclohexane-1,3-diméthyl-2-méthylène	47
		Cyclotétradécane	51
		4-méthyl-1,4-héxadienne	47
		Heptadecane	43, 50, 51, 53
		Heptadec-8-ène	51
		Nonadecane	43, 49, 52, 72
		Tetradecane	43,72
		Tridecane	72
		1-tridecene	51
		2-méthyl tetradecane	51
	1,12-tridecadiène	53	
	Pentadecane	43, 53, 72	
	Hexadecane	72	
	n-heptadecane	72	
	Octadecane	72	
	(E)-9-octadecene	50	
	1-docosene	72	
	Docosane	72,45	
	1,2-diméthylcyclopropène	42,72	
	Éther méthyl 2[Z] hexenyl	47	
	3,3-diméthyl-6-méthylencyclohexene	47	
	Octadecane-1-chloro	42	
	Dotriacontane	51	
	Heneicosane	43, 51	
	Eicosane	49, 50,53	
	Eicosène	51, 72	
Tricosane	42, 47, 49, 72		
Tetracosane	72, 51		
Pentacosane	49,72		
	O x y g é n é s		

	Heptacosane	49, 72
	Octacosane	49
	Hexatriacontane	49, 72
	Tritetracontane	51
	1,5-décadiyne	47
	1-dodécèn-11-yne	47, 50
	1,4-héxadiene-4-méthyl	47
	Cyclohexane-1,3-diméthyl-2-méthylène	47
	Cis, 2methyl 1,3cyclooctadiene	47
	Cyclopropane,1,1-dichloro-2,2-diméthyl-3-(2-méthylpropyl)	47
	Cyclodécène	48
	1,2,3,3,4-pentaméthyl-cyclopentène	50
H y d r o c a r b u r e s	4-méthylpent-4-en-2-one (mésityloxyde)	43
	4-méthyl-4-hydroxy-pentan-2-one (alcool diacetone)	43
	Héxan-2-ol	43
	Benzaldéhyde	43
	(E, E)-hexa di-2-ène-4-al	43
	Benzène acétaldéhyde	43
	Cis-cyclopent-4-ene-1,3-diol	43
	2-méthylène cyclohexanol	43
	3,5,5-triméthylcyclohex-2-ene-1-one (isophorone)	43
	2-cyclopentèn-1-one	43
	Ketoisophorone	43
	1-ethoxy but-1-ène-3-yne	43
	4-pentèn-1-ol	43
	3-octanol	40, 44
	Octène-3-ol	44
O x y g è n é s	3-octanol acétate	41
	3-octanone	44
	Octadecanal	50
	(2Z,4E) hexa-2,4-dien-1-ol	43
	2-méthyl propen-1-one	43
	1(2-furaylcyclopropyl) ethanone	43
	4[2,6,6triméthylcyclohexa 1,3dienyl] pent3en2-ol	47
	4-propyl-4-cyclopentene-1,3-diene (oxyde d'isopropyl)	43
	(exo)-1-(hydroxyméthyl)-2-vinyl-2-méthylcyclopentane	43
	6-méthyl-5-(1-méthylethyl)5-hepten-3-yn-2-one	43
	2-méthylene cyclohexanol	43
	(3-méthyl butyl)-oxirane	43
	2,6-heptadione	43
	2-pentadecanone	43
	1-méthyl-6,7-dioxabicyclo [3, 2,1] octane	43
Delta-3-tetradecenol	43	
1-(2-hydroxy ethoxy) tridecane	43	

Formate d'isobutyle	43
2-methyloctadecane	43
2-undecanone	48
3-Decyn-2-ol	41
Hexyl-2-methyl butyrate	50
Hexyl butyrate	44
Hexyl-iso butyrate	44
Trans-3-methylpent-3-ene-5-ol	42
1-phényl-1-butanol	42
3-hexyn-2-ol	42
Decanal	42
E)-2-decenal	50
Propanal-2-methyl-3-phenyl	47
3-penten-2-ol	47
4(cyclohex-1'-enyl)but-2-en-1-ol	47
2,2-diméthyl-1-phenyl-1propanal	47
2-méthyl-1-phenyl-2-propen-ol	47
Benzene, 1(1-hydroxyethyl)'isobutyl	47
5-hepten-3-yn-2-one,6-méthyl-5(1-méthylethyl)	47
Cis, 2méthyl 1,3cyclooctadiene	47
Vinyl cyclohexanecarboxylate	50
Myristate d'isopropyl	50
2-méthyl-2-cyclopenten-1-one	51
(3Z, 41Z)-2-méthyl-3,13-octadécadién-1-ol	51
1-Dotriacontanol	51
1-hexadécanol	51
1-Nonadécanol	51
Benzène méthanol	40
9-octadecanoate de méthyl	51
Méthyl eicosa-5, 8, 11, 14,17-pentaénoate	51

III. Création d'une bibliothèque spectrale IRTF

Le logiciel OPUS contient une bibliothèque de 352 spectres IR de produits différents, ce logiciel permet à l'utilisateur de créer de nouvelles bibliothèques spectrales.

La bibliothèque que nous avons créée est spécifique pour les composés issus de végétaux, l'obtention des spectres IRTF des étalons est réalisée de deux manières différentes.

III.1 Spectres IRTF des étalons analysés au niveau de notre laboratoire

Les dix-sept composés, dont nous disposons (tableau 13), sont dilués directement dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2) avec une concentration de $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ et analysés par spectrométrie IRTF.

Les fenêtres utilisées dans cette étude sont en fluorure de baryum (BaF_2) avec une entretoise en téflon de chemin optique de 0.1 mm. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de scans égal à 5, en considérant un background stabilisé préalablement dans les mêmes conditions instrumentales avec une cellule remplie de solvant le dichlorométhane stabilisé par l'amylène.

Les spectres obtenus sont introduits dans la bibliothèque spectrale en suivant les instructions montrées sur la figure 24.

III.2 Spectres IRTF des étalons procurés de la littérature

Les vingt-six spectres IRTF des composés pouvant exister dans les végétaux (tableau 13), ont été procurés de la littérature et introduits dans la bibliothèque spectrale.

De ce fait, un ensemble de 43 spectres sont stockés pour leur ultérieure exploitation dans l'identification des composés des huiles essentielles.

Tableau 13 : liste des composés introduits dans la bibliothèque spectrale IRTF créée

	Les composés introduits dans la bibliothèque créée
Etalons analysés au niveau de notre laboratoire	transe anéthol (99%), eugénol (99%), vanilline (99%), thymol (99%), camphre (96%), eucalyptol (99%), menthol (98%), α -pinène (98%), β -pinène (99%), (R)-limonène (98%), D(+)-limonène (95%), myrcène (95%), bornéol (97%), Linalol (97%), camphène (95%), Cymène (99%), alcool cinnamyl (98%).
Etalons procurés de la littérature	mesityloxyde, furfural, benzophénone, acide octanoïque, acide stéarique, coumarine, n-tétracosane, n-décane, myristate d'isopropyle, morphine, nicotine, curcumin, cis-stilbene, hydroquinone, D (+)Glucose, cocaïne, acide ascorbique (vit C), acide nicotinique, glycérol, acetate de vinyle, acide glutarique, isophorone, acide citrique, Docosane, styrène et le cumène.

III.3 Etapes de la création de la banque spectrale

La création d'une nouvelle bibliothèque de spectres infrarouge, nécessite deux étapes, la première concerne la création de la bibliothèque (figure 23) et la deuxième est liée à l'introduction des spectres IRTF dans la bibliothèque (figure 24).

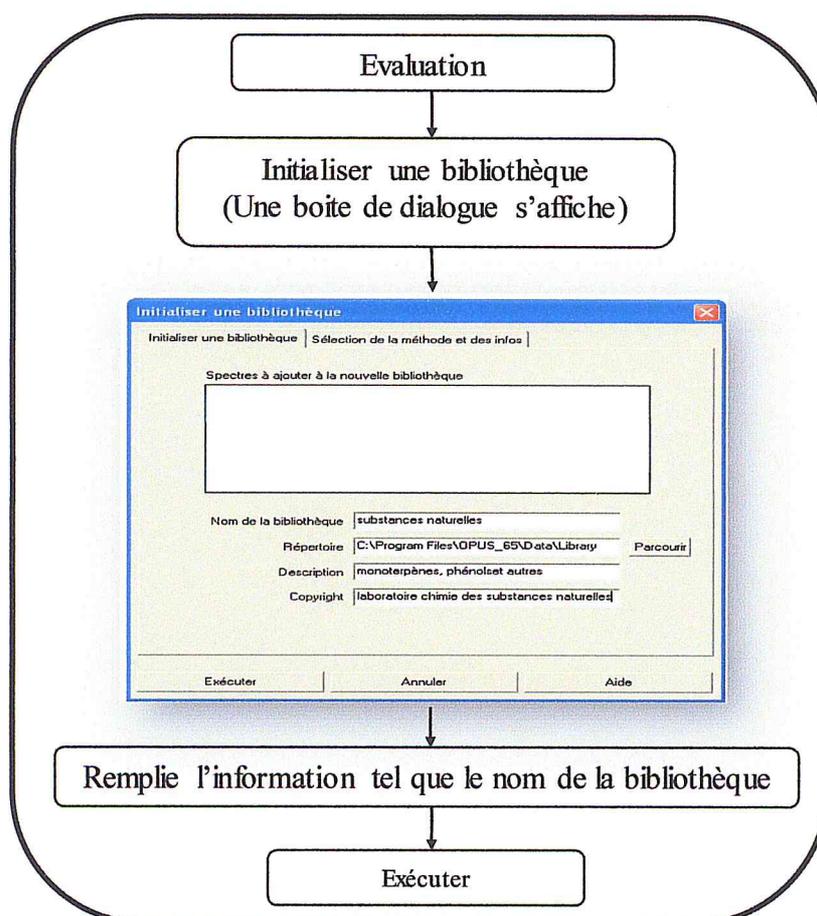


Figure 23 : Etapes de la création d'une nouvelle bibliothèque spectrale

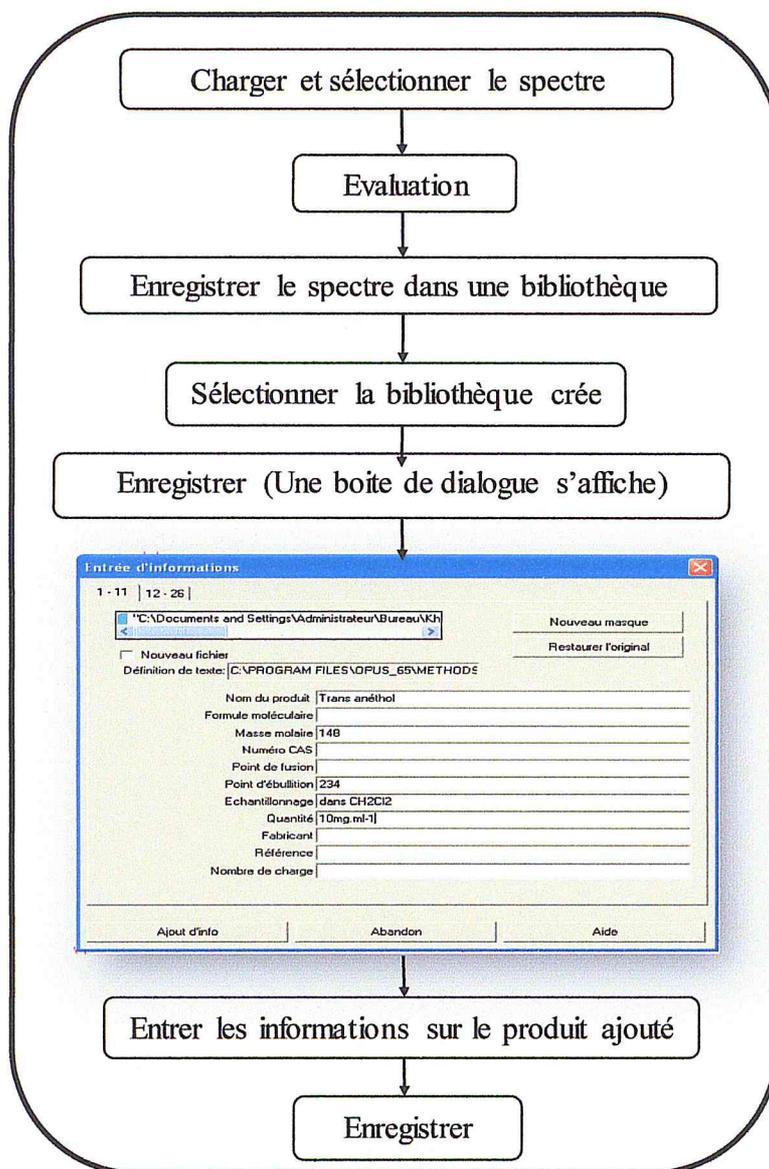


Figure 24 : Etapes d'introduction des spectres dans la nouvelle bibliothèque

IV. Identification des composés des huiles essentielles

Le but de cette partie est l'identification des composés des huiles essentielles élués en continu à travers un support solide par spectrométrie IRTF, en utilisant la banque de données créée, et la confirmation de la composition à partir de la comparaison avec les résultats de la CG-SM, et en exploitant le paramètre « score » fourni par le logiciel de recherche.

IV.1 Préparation des solutions des huiles essentielles

Des huiles essentielles de 15 plantes sont analysées par spectrométrie IRTF. Une masse précise de 65 mg de chaque huile essentielle est diluée directement dans un volume fixe de 2 ml de CH_2Cl_2 .

IV.2 Elution des huiles essentielles dans le système AFC-IRTF

Le montage de la figure 11b (chapitre II) a été utilisé pour élué en continu les composés des huiles essentielle. Un volume de 0.3 ml de chaque solution d'huile essentielle préparée a été chargé à l'intérieure d'une cartouche de volume de 3 ml contenant 100 mg de gel de silice. L'écoulement de solvant permet l'éluion en flux continu des différents composés d'huiles essentielles à travers le support solide, et l'ordre d'éluion des composée est influencé par la nature chimique du paire solvant-phase solide.

L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de scans égal à 1, et un temps d'analyse de 5 min.

L'enregistrement des spectres d'éluion en temps réel est suivi avec le logiciel « CHROM ».

IV.3 Etapes d'identification des composés des huiles essentielles

Afin d'identifier les différents composés des huiles essentielles élués en continu par spectrométrie IRTF nous exposons les 4 étapes à suivre pour y arriver.

Etape 1 : Extraction des spectres IR à partir du chemigramme

L'organigramme de la figure 25 montre les étapes à suivre pour extraire un spectre IR à partir de chemigramme.

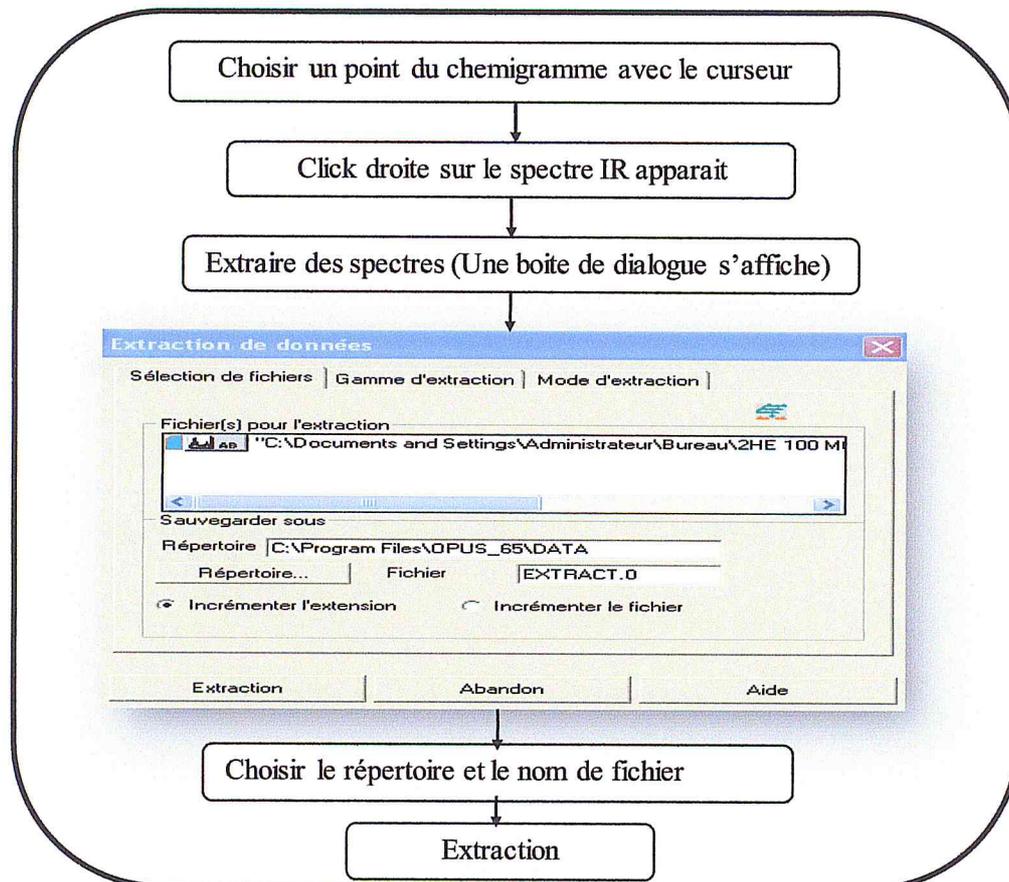


Figure 25 : Etape d'extraction des spectres IR à partir du chemigramme

Etape 2 : Exploitation de la nouvelle bibliothèque pour l'identification

Le spectre extrait est récupéré puis soumis à l'identification selon le protocole montré sur la figure 26.

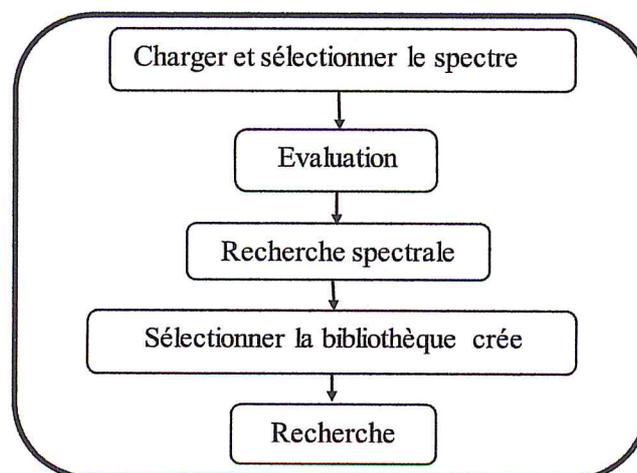


Figure 26 : Etape d'identification d'un spectre IRTF

Le résultat de recherche d'identification est un rapport constitué de quatre fenêtres (figure 27) :

- Fenêtre 1 : Montre la structure chimique du composé proposé.
- Fenêtre 2 : Indique les propriétés physico-chimiques du produit proposé.
- Fenêtre 3 : Montre le spectre IRTF du spectre extrait et du spectre du composé proposé.
- Fenêtre 4 : Indique la liste des produits probables correspondant au spectre IRTF extrait. Chaque produit de la liste est muni d'un score, ce dernier peut varier de 0 à 1000, plus le score est élevé plus la probabilité du produit proposé est élevée.

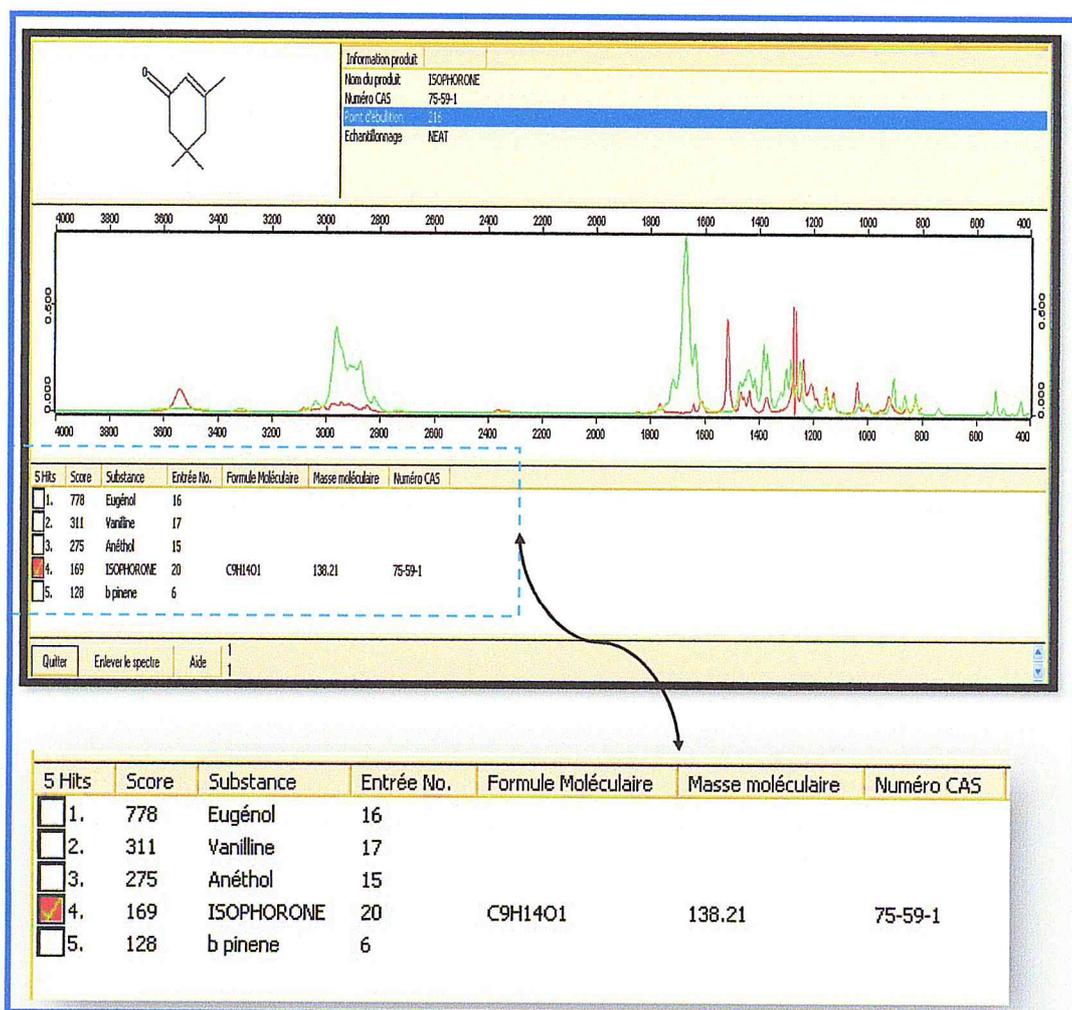


Figure 27 : Résultats affichés suite à la recherche d'identification

Étape 3 : Commence l'identification des produits de chaque spectre de la série du chemigramme, et chaque produit est muni d'un score indiquant sa probabilité de présence dans l'huile essentielle.

Étape 4 : Cette étape consiste à classer les composés identifiés en considérant le score plus élevé de chaque composé dans la série des spectres de chemigramme.

IV.4. Identification des composés de l'huile essentielle synthétique par AFC-IRTF

Pour vérifier la procédure d'identification que nous avons proposée, nous montrons les résultats de recherche d'une huile essentielle synthétique que nous avons préparée à partir de quatre étalons (thymol, camphre, eucalyptol et menthol) dans une proportion 1:1:1:1. Le tableau 14 indique la composition chimique de chaque spectre de l'huile essentielle établi selon l'étape 3.

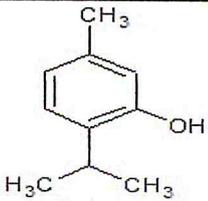
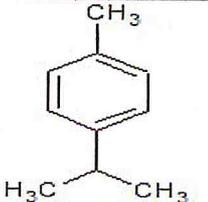
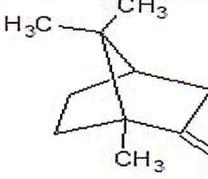
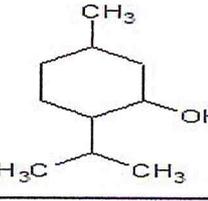
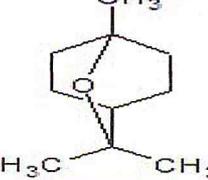
Tableau 14 : Composition chimique de chaque spectre de l'huile essentielle synthétique

N° Spectre	Composé chimique	Score	N° Spectre	Composé chimique	Score	N° Spectre	Composé chimique	Score
1	Camphre	344	2	Thymol	467	3	Camphre	322
	Thymol	293		Cymène	315		Thymol	286
	Bornéol	281		Linalol	267		Cymène	271
	Cymène	214		Bornéol	250		Linalol	205
	Isophorone	207		Myrcène	223		Isophorone	178
	Linalol	203		Menthol	184		camphène	164
	Cocaine	181		β -pinène	177		β -pinène	148
	Myrcène	160		Cumène	44		Bornéol	146
	Eugénol	159		Eucalyptol	158		Menthol	143
	Eucalyptol	151		Myristate d'isopropyl	150		Nicotine	110
Menthol	147							
4	Cymène	387	5	Camphre	359	6	Cymène	329
	Thymol	384		Cymène	317		Camphre	277
	Menthol	286		Thymol	276		Cumène	267
	Cumène	245		Linalol	227		Isophorone	254
	Camphre	207		Isophorone	226		Thymol	253
	Linalol	189		Cumène	216		Linalol	243
	Nicotine	167		Bornéol	204		Menthol	212
	Isophorone	166		Eucalyptol	197		Myristate d'isopropyl	211
7	Linalol	240	8	Cymène	326	9	Camphre	348
	Camphre	229		Camphre	280		Cymène	301
	Bornéol	224		Cumène	280		Cumène	294
	Camphène	218		Isophorone	248		Thymol	277
	Myrcène	194		Thymol	242		Isophorone	250
	α -pinène	176		Linalol	239		Menthol	232
	Anéthol	140		Myristate d'isopropyl	216		Linalol	229
	β -pinène	135					Myristate	217

	Thymol	111		Eucalyptol	213		d'isopropyl	
	R limonène	110		Menthol	211		Eucalyptol	204
10	Cymène	325	11	Camphre	216	12	Myrcène	259
	Cumène	283					Bornéol	258
	Camphre	281					Linalol	221
	Thymol	251					Camphre	214
	Isophorone	243					Camphène	203
	Eucalyptol	220					Anéthol	177
13	Cymène	252	14	Bornéol	284	15	Cymène	347
	Camphre	217		Myrcène	282		Camphre	301
	α -pinène	189		Linalol	264		Eucalyptol	279
	β -pinène	181		Camphène	255		Bornéol	278
	Menthol	170		α -pinène	247		Cumène	277
	Camphène	170		β -pinène	241		Thymol	264
	Anéthol	162		Anéthol	218		Linalol	261
	Alcool cinamyl	147		Cymène	215		Myrcène	217
	Linalol	142		Camphre	197		Camphène	216
	Thymol	140		Eucalyptol	178		benzophénone	215
	Eucalyptol	116		R limonène	155		Menthol	208
16	Cymène	296	17	Eucalyptol	306	18	Cymène	320
	Cumène	293		Thymol	291		Menthol	283
	Eucalyptol	289		Cumène	289		Linalol	260
	Camphre	278		Linalol	286		Cumène	250
	Myristate d'isopropyl	245		Cymène	285		Eucalyptol	213
	Isophorone	230		Camphre	274		Camphène	196
	Thymol	227		Menthol	261		Camphre	192
				Bornéol	254		Bornéol	190
19	Cymène	340	20	Cymène	351	21	Thymol	341
	Thymol	273		Eucalyptol	299		Cymène	339
	Eucalyptol	272		Bornéol	290		Bornéol	305
	Bornéol	269		Camphre	281		Eucalyptol	292
	Camphre	262		Myrcène	262		Cumène	282
	Myrcène	256		Thymol	259		Myrcène	269
	Cumène	246		Cumène	250		camphre	264
22	Cymène	367	23	Cymène	363	24	Menthol	332
	Bornéol	339		Thymol	308		Cymène	332
	Eucalyptol	305		Camphre	304		Linalol	363
	Cumène	292		Eucalyptol	304		Thymol	314
	Camphre	282		Cumène	289		Eucalyptol	267
	Thymol	262		Bornéol	278		camphène	264
25	Camphre	187	26	Camphre	234	27	Bornéol	288
	Bornéol	160		n-tétracosane	212		Myrcène	246
	Eugénol	151		Docosane	201		R limonène	223
	Menthol	150		n-decane	189		Cymène	223
	Eucalyptol	132		β -pinène	142		Camphre	213
	α -pinène	118		R limonène	135		Eucalyptol	203
	Alcool cinamyl	112		Anéthol	132		anéthol	202
28	Cymène	307	29	Cymène	364			
	Menthol	203		Camphre	320			
	β -pinène	200		Eucalyptol	318			
	Camphène	191		Bornéol	315			
	Linalol	178		Cumène	297			
	Bornéol	161		Thymol	281			

Le tableau 15 résume la composition chimique de l'huile essentielle synthétique.

Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle synthétique par IRTF

Le score le plus élevé	Composé chimique	Structure	N° du spectre du chemigramme
467	Thymol		02
387	Cymène		04
359	Camphre		05
332	Menthol		24
318	Eucalyptol		29

D'après les résultats montrés dans le tableau 16 nous apportons les remarques suivantes :

1) La présence du cymène alors qu'il n'a pas été considéré dans le mélange synthétique. Ceci s'explique probablement par la ressemblance des spectres IRTF du cymène avec le spectre de thymol. Effectivement, l'éluion en continu modifie l'allure de spectre IRTF du produit et ce, par rapport à l'intensité des différentes bandes (une bande de faible intensité n'apparaît pas au début de l'éluion de produit).

2) Les scores mentionnés sont proches, ceci est du probablement à la composition équimoléculaire des quatre composés.

3) Le numéro du spectre du chemigramme peut donner une estimation sur l'ordre d'éluion des différents composés.

4) Le nombre de composés de la composition chimique reste à l'appréciation de l'opérateur.

IV.5. Identification des composés des huiles essentielles par AFC-IRTF

Les tableaux 16 à 30 montrent la composition chimique la plus probable de chaque huile essentielle par la procédure développée par AFC-IRTF et par rapport à la banque de données spectrales que nous avons créée et qui reste limitée dans cette étude.

Il y a lieu de noter que les huiles essentielles analysées par CG-SM et par AFC-IRTF ne sont pas les mêmes, bien qu'elles soient préparées de la même espèce. Les huiles essentielles et leurs résultats d'analyse CG-SM sont fournis par la même entreprise.

Tableau 16 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Clémentine* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
Cymène	347	13	0.29	+
Camphène	315	16	0.05	+

Tableau 17 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Thym* par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM [74] (%)	Concordance avec la littérature
Thymol	493	4	36 à 55	+++

Tableau 18 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Clou de girofle* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM de la littérature (%)	Concordance avec la littérature
Eugénol	811	15	>70	+++

Tableau 19 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Cyprès* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
Myrcène	379	25	2.39	++
α -pinène	322	22	60	+++
Camphène	321	12	0.21	+
R limonène	316	22	1.83	++
Linalol	300	23	0.20	+

Tableau 20 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
D(+) Limonène	321	22	-	-
Camphène	277	11	0.117	+
Camphre	275	22	-	-
Myrcène	259	20	0.60	+
Linalol	246	11	-	-
n-decane	232	56	-	-
β -pinène	229	22	0.217	++
Bornéol	223	63	0.346	++
Acide gultarique	219	42	-	-
Cymène	209	63	-	-
eucalyptol	207	63	50%	+

Tableau 21 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Fenouil* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
Camphène	409	28	0.25	++
Cymène	343	28	-	-
Camphre	343	59	0.14	++
Myrcène	294	29	-	-
D(+) Limonène	291	30	29.39	++

Tableau 22 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Genevrier* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
D(+) Limonène	241	29	4.06	++
Myrcène	202	23	3.07	++
β -pinène	188	23	1.37	++
R Limonène	174	23	9.75	++

Tableau 23 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Menthe* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM de la littérature (%) [76]	Concordance avec CG-SM
Camphène	332	2	-	-
Cymène	295	32	-	-
Linalol	286	26	2.20	++
α -pinène	279	4	1.13	++
Alcool cinamyl	279	5	-	-
Eugénol	271	5	-	-
β -pinène	251	2	0.68	++
Menthol	247	5	21.33	++

Tableau 24 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Menthe poivrée* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
Menthol	586	48	32.93	+++
Cymène	401	46	-	-
Docosane	344	84	-	-
Camphène	323	21	-	-
B-pinène	316	52	1.54	+
Camphre	301	18	-	-

Tableau 25 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Myrte* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
Myrcène	304	32	0.98	+
Camphène	288	20	0.16	+
Linalol	278	38	2.82	++
D(+) Limonène	270	38	30.45	+

Tableau 26 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Oranger* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
Camphène	446	13	-	-
Cymène	438	24	0.14	++
Myrcène	367	19	3.57	++
Bornéol	359	17	-	-
β -pinène	334	19	-	-
Linalol	318	27	4.23	++
D(+) Limonène	251	13	7.48	++
α -pinène	247	16	0.58	+

Tableau 27 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pin d'alpe* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
Camphène	313	23	0.38	++
Linalol	296	23	0.22	++
Myrcène	281	15	17.48	++
Bornéol	239	15	0.30	+

Tableau 28 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Lentisque* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
Myrcène	370	35	21.47	+++
β -pinène	323	18	5.24	++
α -pinène	295	18	17.27	++
R Limonène	283	24	20.89	++
Camphène	252	36	2.03	++
Linalol	162	37	0.03	++

Tableau 29 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Anis étoilé* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Le score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM de la littérature (%) [77]	Concordance avec la littérature
Trans anéthol	759	13	71	+++

Tableau 30 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Citron* établie par AFC-IRTF

Composé chimique	Score le plus élevé	N° du spectre	Abondance relative par CG-SM (%)	Concordance avec CG-SM
D(+) Limonène	438	24	37.69	+++
Myrcène	313	30	1.43	++
Alcool cinamyl	241	44	-	-
Menthol	225	49	-	-
Camphre	218	15	-	-
Linalol	214	44	3.96	++
α -pinène	210	24	0.96	++
β -pinène	202	3	12.47	+

En comparant l'absorbance relative obtenue par CG-SM et le score obtenue par AFC-IRTF, nous proposons le barème suivant :

- | | |
|-----|----------------------|
| +++ | Concordance parfaite |
| ++ | Bonne concordance |
| + | Concordance faible |
| - | Aucune concordance |

Conclusion générale

Conclusion générale

Trois principaux objectifs sont atteints à travers ce mémoire et ce, pour la première fois au sein de notre laboratoire de recherche.

- 1) La mise en marche d'un système d'analyse en flux continu (AFC) ;
- 2) L'exécution et la comparaison des deux logiciels (Mesures multiples et CHROM) permettant l'analyse en continu ;
- 3) La création et l'exploitation d'une modeste banque de données spectrale IRTF de composés existant dans les huiles essentielles.

Un système d'AFC modifié a été utilisé, en exploitant l'option qu'offre l'OPUS permettant d'enregistrer un background et de le rappeler par la suite pour cette analyse.

Les deux logiciels ; « Mesures multiples » et « CHROM » permettent l'analyse en flux continu. Cependant, le premier logiciel est laborieux et nécessite un temps d'analyse beaucoup plus important.

Une masse de 100 mg d'adsorbant diminue le coefficient de dispersion des analytes et diminue par conséquent le temps d'analyse.

Les rendements de récupération des analytes qui peuvent se trouver dans les huiles essentielles en différentes proportions ou comme produit majoritaire sont du même ordre et ce, avec une bonne reproductibilité.

La détermination de la teneur des monoterpènes dans les huiles essentielles est approximative car elle est calculée par rapport à une seule valeur de concentration de 10 mg.mL⁻¹ et non pas par l'extrapolation dans une droite de calibration.

La comparaison des teneurs obtenues par spectrométrie IRTF et par CG-SM donne, d'un côté, des valeurs comparables indiquant que la méthode développée est prometteuse et d'un autre côté, des valeurs différentes du fait, probablement, que les huiles essentielles par les deux méthodes sont différentes.

La classification des composés des huiles essentielles appartenant à la même classe chimique est réalisée.

La création d'une modeste banque de données spectrale de 43 spectres IRTF des composés pouvant exister dans les végétaux est effectuée.

L'identification des composés de l'huile essentielle synthétique éluées en flux continu à travers un support solide par spectrométrie IRTF, en exploitant la banque de

données crée, indique la fiabilité de la procédure développée. L'inconvénient de cette procédure réside dans le fait que l'allure des spectres IRTF des produits change au cours de l'éluion en continu induisant à des confusions d'identification.

La procédure développée donne une identification comparable à la CG-SM dans le cas où le composé se trouve majoritaire dans l'huile essentielle et par conséquent le phénomène de dispersion n'affecte pas l'allure du spectre IRTF.

Bien que les résultats obtenus aussi bien pour l'analyse qualitative et quantitative sont intéressants, l'étude n'est qu'à son état préliminaire, et des expériences complémentaires et plus approfondies (optimisation du système AFC, élargissement de la composante de la classe chimique, enrichissement de la banque de données spectrales...) sont nécessaires.

**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

1. A.L.Smith, «Applied Infrared Spectroscopy», Chemical Analysis, Ed. Interscience, New York, 1979.
2. R. M. Silverstein, F. X. Webster, and D. Kiemle, « Spectrometric Identification of Organic Compounds », 7th ed., New York: Wiley, 2005.
3. A. L. Smith, « Treatise on Analytical Chemistry », 2nd ed., New York: Wiley, 1981.
4. J. Ruzicka, E. Hansen, « Flow Injection Analysis », 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1988.
5. D. Betteridge, Anal. Chem., American chemical society, 1978.
6. B. Karlberg, G.E. Pacey, « Flow Injection Analysis: A Practical Guide », Elsevier, 1989.
7. R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, « Manuel pratique de chromatographie en phase liquide », Masson, Paris, 1982.
8. A.N. Strohl et D.J. Curran, « Flow injection analysis with reticulated vitreous carbon flow-through electrodes », Anal. Chem., 1979.
9. H. Morita, T. Kimoto et S. Shimomura, « Flow injection analysis of mercury/cold vapour atomic fluorescence spectrophotometry », Anal. Lett., 1983.
10. P.L. Meschi, D.C. Johnson et G.R. Luecke, « The coulometric response of tubular electrodes applied to flow injection determinations », Anal. Chim. Acta, 1981.
11. B. Persson et L. Rosén, « Flow injection determination of isosorbide dinitrate with polarographic detection », Anal. Chim. Acta, 1981.
12. H.B. Hanekamp, P. Bos et O. Vittori, « The applicability of phase-sensitive alternating current measurements in flow-through detection », Anal. Chim. Acta, 1981.
13. M.E. Meyerhoff et Y.M. Fraticelli, « Flow injection determination of ammonia using polymer membrane electrode-based gas sensing systems », Anal. Lett., 1981.
14. J. Ruzicka, J.W.B. Stewart, « Flow injection analysis, part II, ultrafast determination of phosphorus in plant material by continuous flow spectrophotometry », Anal. Chim. Acta, 1975.
15. J.I. Braithwaite, J.N. Miller, « Flow injection analysis with a fluorimetric detector for determination of glycine and albumin », Anal. Chim. Acta, 1979.

16. D.K.Morgan, N.D.Danielson, J.E.Katon, «Aqueous flow injection analysis with Fourier transform infrared detection», *Anal. Lett.*, **1985**.
17. P.Maitoza (P.) et D.C.Johnson, «Detection of metal ions without interferences from dissolved oxygen by reverse pulse amperometry in flow injection systems and liquid chromatography», *Anal. Chim. Acta*, **1980**.
18. S.Garrigues et Miguel de la Guardia, «Flow Injection Analysis–Fourier Transform Infrared Spectrometry (FIA/FT-IR) », University of Valencia, Spain , **2006**.
19. Martin A.J.P. et Synge R.L.M., *Biochemical Journal*, **1941**.
20. AT James, AJP Martin, *Biochemical Journal*, **1952**.
21. A.D.Dempster, *Phys. Rev.* ,**1918**.
22. F. W. Aston, *Phil. Mag.* , **1919**.
23. J. De Graeve, F. Berthou, et M. Prost, « Methodes chromatographiques couplées à la spectrometrie de masse », Edition Masson, **1986**.
24. Halket et al., « Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS », *Journal of Experimental Botany*, **2004**.
25. J.P. Durvelle, « chimie des parfums », Ed : Librairie centrale des sciences de forages, Girald & Cie, Paris, **1930**.
26. Association Française de Normalisation, 1986, Recueil de normes Françaises « Huiles essentielles », AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-006.
27. J. Bruneton, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales, Partie03 : Terpenoydes et steroides*, Ed : Lavoisier, 2eme edition, Paris, **1993**.
28. J. Bruneton, « Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales, monoterpènes et sesquiterènes», tec & doc, 3eme edition, Paris, **1999**.
29. Christopher Gildewell, « Monoterpenes : An easily accessible but neglected class of natural products», *Journal of chemical Education*, March **1991**.
30. K. Koba et al., « Composition chimique des huiles essentielles d'*aeollanthus pubescens* Benth. Acclimatée au Togo », *B. R. Chimie*, **2004**.
31. F. Amarti et al., « Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *thymus algeriensis* Bios. et Reut. et *thymus ciliatus* Benth. Du Maroc », *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, **2010**.
32. K.D. Alfa, D.S. Abdoul, M. Nacro, « Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum americanum* Linn, syn. *O. canum* Sims du Burkina Faso », *C.R. chimie* **2004**.

33. O.O. Okoh, A. P. Sadimenko, A. J. Afolayan, « 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*, **2010**.
34. Agricultural Research, Beltsville Area Germplasm Resources Information Network (GRIN) « Taxonomy for Plants », **2001**.
35. H. Christo et al., « huile essentielle de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des lamiaceae », *Lebanese Science Journal*, **2006**.
36. N. Benayad, « les 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**.
37. S. Kataria *et al.*, « Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Applications », *International Journal of Pharmaceutical & Biological*, **2011**.
38. P-J. Teisseire, « Chimie de substances odorantes », Tec et Doc, Lavoisier, Paris, **1991**.
39. F. Bouvier, A. Rahier, B. Camara, « Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. Progress in lipid research », **2005**.
40. L. Zekri, « Contribution à l'étude chimique des huiles essentielles de menthe, d'eucalyptus et de thym. Dosage de menthol dans la menthe et d'eucalyptol dans l'eucalyptus par spectrométrie IRTF », Thèse de master, Université de Blida 1, Algérie, **2011**.
41. A. Ouibrahim, « Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L, *Ocimum bacilicum* L, et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien », Thèse de doctorat, Université badjimokhtar – Annaba, Algeria, **2014**.
42. S.Kebdani, «Détermination du taux de limonène dans différents extraits aromatique et médicinaux par spectrometrie infrarouge», Thèse de master, Université Blida1, Algérie ,**2011**.
43. DJ. Kritli, « Etude chimique et microbiologique de l'huile essentielle de calendula algeriensis », Thèse de master, Université de Blida1, Algérie, **2001**.
44. M. Barkat, I. Laib, « Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* », génie industrie, **2011**.
45. N.Fekih, « Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en algerie », Thèse de doctorat, Université Abou bekr belkaid –Tlemcen, Algeria, **2014**.

46. H.A.Lazouni et al., « Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare Mill* », Sciences & Technologie, 2007.
47. I. Bourahla, « Dosage de cuminaldéhyde dans l'extrait de Cumin et d'anisaldéhyde dans l'huile essentielle d'anis vert par spectrométrie IRTF », Thèse de master, Université Blida1, Algérie, 2011.
48. S. Didane, « Contribution à l'étude chimique de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* et détermination de l'activité antimicrobienne », Thèse de master, Université de Blida1, Algérie, 2011.
49. N.Mohamed mahmoud, « Etude chimique de l'huile essentielle de *Bunium Fontanesii*, Tests d'activité biologique », Thèse de master, Université Blida1, Algérie, 2012.
50. S.Boubekri, « Etude chimique de l'algue rouge *Gigartina pistillata* ; etude chimique de l'activité antimicrobienne de *Gigartin apistillata*, *Laurenciapinnatifida* et *Ulva lactuca* », thèse de master, Université Blida 1, Algérie, 2011.
51. S. Sekiou, « Etude chimique de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa* détermination de l'activité antimicrobienne », Thèse de master, Université Blida1, Algérie, 2015.
52. N. Ighili, « Dosage de l'eugénol dans les clous de girofle (*Eugenia CaryophyllataThunb*) par spectrométrie IRTF, Etude de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'extrait des clous de girofle », Thèse de master, Université Blida1, Algérie, 2011.
53. N. Djellouli, « Etude phytochimique de l'algue rouge *Laurencia Obtusa* : détermination de l'activité antimicrobienne », Thèse de master, Université Blida1, Algérie, 2015.
54. F. Alejandro, Barrero et al, « Diterpenoids from tetraclinisarticulata that inhibit various human leukocyte functions », J. Nat. prod., 2003.
55. Y.L. Chow, H. Erdtman, « Totarolone, a new diterpeneketophenol from heartwood of tetraclinisarticulata », Acta chemical scandinavica, 1960.
56. K. Doi, T.shiyuba, « Diterpenes of juniperus conferta », phytochemistry, 1972.
57. B.P. Ying, I. Kubo , « Complete 1H and 13C NMR assignments of totarol and its derivatives », phytochemistry, 1991.
58. J.M. Fang et al., « Diterpenes from the bark of juniperus chinensis », phytochemistry, 1993.

59. J.W. Apsimon, O-E. Edwards, « sandarac acids: 6 β -Hydroxysandaracopimaric acid », Can. J. chem., 1961.
60. A. förg, G. Leupold, H parlar, B. Weinreich, S. Grüner, F.Otto, « Supercritical fluid Extraction of *calendula officinalis* L in combination with adsorptive clean-up », journal of Eng. Life Sci., 2002.
61. D. Mooney, E. Antignac, E. Dufour, I. Bark, V. Srinivasan, G. Nohynek, « Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of calendula flower (*calendula officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products », Food and chemical toxicology, 2009.
62. R.Chemli et al., « arvensis A and B, triterpenoidsaponins from *calendula arvensis*», Journal of phytochemistry, 1987.
63. L. Danielski et al., « Ferreira marigold (*calendula officinalis* L.) oleoresin: solubility in SC-CO₂ and composition profile », chemical engineering and processing, 2007.
64. Z. Wojciechowski et al., « Stérol and triterpene alcohol esters from *calendula officinalis* », Phytochemistry, 1971.
65. M.Ukiya et al., « Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*calendula officinalis*) flower », Journal of natural products, 2006.
66. M. Albuiescu, N. Alexa, C. cojan, « *Calendula officinalis* flowers source of extract with antioxydant activity », Annals of West university of Timisoara series chemistry, 2004.
67. A. Bilia, M. Bergonzi, S. Gallori, G. Mazzi, F. Francesco Vincieri, « Stability of the constituents of calendula, Milk-thistle and passion flower tinctures by LC-DAD and LC-MS », journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2002.
68. S. Gordan, C. Cetkovi, M. Sonja Djilas, M.jasnacananovi. C. Brunet, T. VesnaTumbas, « Antioxidant properties of marigold extract », Food research international, 2004.
69. L. B. tounsi, « Etude in vitro de l'effet abtibactérien et antifongique d'I.viscosa-lawsonia-inermis-Asphodeluse-Microcarpus-aloberajuniperusoxycedrus », Thèse de magister, Université de constantine, Faculté des sciences, Département vétérinaire, 2001.
70. A. S. Feliciano et al., « lignans from *juniperus Sabina* », Phytochemistry, 1990.

71. G. Adler, Z. Kaspzyk, « Free strols, steryl ester, glucosides, acylatedglucosides and water- soluble complexes in calendula officinalis », Phytochemistry, pregaman press, **2004**.
72. S.Deriouch, « Etude chimique de l'huile essentielle d'Euphorbia paniculata syn. algeriensis. determination de l'activité biologique », Thèse de master; université Blida1, Algérie, **2012**.
73. C.Pizza, Z. Zhong-liang, N. Tommas, « plant metabolites. Triterpenoidsaponins from calendula arvensis », Journal of natural products, **1987**.
74. Mohammad Hudaib et al., « GC/MS evaluation of thyme (T. vulgaris L.) oil composition and variations during the vegetative cycle », elseveir, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,Italie, **2002**.
75. S.VIVEK et al. , « Comparative account on GC-MS analysis of Mentha arvensis L.corn mint. From three different locations of North India », *Int J.Drug Dev.& Res.*, **2009**.
76. J.Q.Cu ,F. Perineau, G.Goepfert, «GC/MS Analysis of Star Anise Oil », Journal of Essential Oil Research, **1990**.

Annexe

Annexe

Les principaux constituants donnés par CG-SM des huiles essentielles procurées

Huile essentielle	Composés majoritaires	Teneur
<i>Eucalyptus</i>	- Eucalyptol - α -pinène - L-pinocarvéol	51% 24.6% 9.98%
<i>Citron</i>	- Limonène - Acétate de néryle - β -pinène	24.6% 14% 12%
<i>Climentine</i>	- sabinène - linalol	38% 13%
<i>Menthe poivrée</i>	- isomenthol - isomenthone - Eucalyptol - carane	40% 24% 7.9% 8%
<i>Genevrier</i>	- α -pinène - limonène	22.6% 9.8%
<i>Orange</i>	- bicyclo [3.1.0] hexane-4-méthylène-1-(1-méthylethyl) - D-limonène	23% 7%
<i>Pin d'alep</i>	- α -pinène + thujène - myrcène - β -caryophyllène	31% 17% 25.8%
<i>Cypré</i>	- α -pinène - Δ -3-carène	60% 18%
<i>Fenouil</i>	- Bénézo-1-méthoxy-4-(1-propenyl) - Limonène	51% 29%
<i>Myrte</i>	- D-limonène - α -pinène	30.5% 22%
<i>Lentisque</i>	- α -pinène - myrcène - limonène	17% 21.7% 20.9%