

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

KEBDANI Sara

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine Science de la matière
Filière Chimie
Option Chimie des substances naturelles

Titre

**DETERMINATION DU TAUX DE LIMONENE DANS
DIFFERENTS EXTRAITS AROMATIQUES ET MEDICINAUX
PAR SPECTROMETRIE INFTRAROUGE**

Soutenue le 15 septembre 2011, devant le jury composé de :

M. EL HATTAB	MCA.	Président	Université de Blida
Z. CHEMAT	MCA.	Examineur	Université de Blida
B. KADRI	MCA.	Examineur	Université de Blida
Y.DAGHBOUCHE	Pr.	Promoteur	Université de Blida

Résumé

L'objectif principal de ce travail est de contribuer au développement des applications analytiques quantitatives de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier et de mettre à la disposition des chercheurs, travaillant sur l'optimisation des critères de qualité des extraits aromatiques et médicinaux, un outil d'analyse complémentaire.

Cette méthode simple, rapide, reproductible et surtout disponible a été utilisée pour la détermination quantitative d'un monoterpène monocyclique, le limonène, des huiles essentielles d'orange et de citron (riche en limonène) et des huiles essentielles de thym, tétraclinis et de l'extrait de carvi (pauvre en limonène).

Le taux de la fraction monoterpénique monocyclique, analysée globalement sous forme de limonène, des HE d'orange et de citron est évalué à 51,6 % et 67,3 % respectivement et ce, en utilisant la bande d'absorbance à 1376 cm^{-1} corrigée avec une ligne de base comprise entre 1664 et 1620 cm^{-1} .

Dans les mêmes conditions spectrales, la préconcentration du limonène de l'extrait de carvi sur un support solide contenu dans une colonne ouverte a donné un taux de 0,98 %.

Les taux de limonène trouvés dans les différents extraits sont très proches de ceux trouvés par CG-SM.

Mots clés : Extraits aromatiques et médicinaux, CG-SM, limonène, spectrométrie IRTF et préconcentration.



Abstract

The main objective of this work is to contribute to the development of quantitative analytical applications of Fourier transform infrared spectrometry and make available to investigators, working on the optimization of quality parameters of aromatic and medicinal extracts, a tool further analysis.

This simple, rapid, reproducible and available method was used for the quantitative determination of a monocyclic monoterpene, limonene, in essential oils of orange and lemon (rich in limonene) and in essential oils of thyme, tetraclinis and in the extract of caraway (poor in limonene).

The rate of the monocyclic monoterpene fraction, globally analyzed as limonene, in essential oils of orange and lemon is estimated at 51.6% and 67.3% respectively and this, by using the absorbance band at 1376 cm^{-1} corrected with a baseline established between 1664 and 1620 cm^{-1} .

Under the same spectral conditions the preconcentration of limonene from caraway extract on a solid support contained in an open column gave a rate of 0.98%.

The rates of limonene found in different extracts are very similar to those found by GC-MS.

Keywords: aromatic and medicinal extracts, GC-MS, limonene, FTIR spectrometry and preconcentration.

ملخص

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو المساهمة في تطوير تطبيقات التحليل الكمي في القياس الطيفي بالأشعة تحت الحمراء بتحويل فوريي وإتاحتها للباحثين العاملين على تحسين معايير الجودة من مستخلصات العطرية والطبية بوسيلة إضافية للتحليل.

هذه التقنية بسيطة وسريعة ، استخدمت لتحديد كمية أحادي تربين أحادي الحلقة، هو الليمونين، للزيوت الأساسية من البرتقال والليمون (ذات الكمية العالية بالليمونين) ، والزيوت الأساسية من الزعتر، عرعار ومسحوق الكروية (ذات الكمية المنخفضة الليمونين).

يقدر معدل أحادي تربين حيدة الحلقة، المحلل في شكل الليمونين، من الزيوت الأساسية للبرتقال والليمون ب 51.6 % 67.3 % على التوالي، وهذا بأخذ طول الموجة الخاصة عند 1376 سم⁻¹ مع قاعدة مصححة بين 1620 و 1664 سم⁻¹.

في ظل نفس الظروف الطيفية التركيز للليمونين من مستخلص الكروية على دعم صلب الموجود في العمود يعطي نسبة 0.98 %.

مردود الليمونين التي وجدت في مختلف المستخلصات مشابهة جدا لتلك التي عثر عليها عن طريق الكروماتوغرافية الغازية المزوجة مع مطيافية الكتلة.

الكلمات الرئيسية : مستخلصات العطرية والطبية ، الكروماتوغرافية الغازية المزوجة مع مطيافية الكتلة CG-SM ، الليمونين ، الأشعة تحت الحمراء بتحويل فوريي IRTF والتركيز.

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier ALLAH le tout puissant, pour m'avoir donnée la force de la patience.

Le travail qui fera l'objet de ce mémoire a été réalisé au laboratoire de chimie des substances naturelles, à l'université Saad DAHLEB de Blida.

Je tiens à remercier :

Dr Daghbouche y. pour l'honneur d'avoir proposé ce thème et pour avoir dirigé ce travail ainsi que pour ses aides et ses conseils.

Dr EL HATTAB M. Maitre de conférences à l'Université de Blida, d'avoir accepté de présider ce jury.

Au membre de jury qui nous à fait honneur en examinant ce travail :

M^{me} Chemat Z. Maitre de conférences à l'université de Blida.

Mr. Kadri B. Maitre de conférences à l'université de Blida.

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Enfin, que tous ceux qui nous ont ouvert leur porte et offert leur amitié soient assurés de notre reconnaissance.

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes chers parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

*Mon très cher frère Houdhaïfa et beau frère Hassen
Mes très chères sœurs : Amina, Roumaïça, Wassila et ma petite Ihssen*

Mes très chers neveux : Hanaa, Omar et walaa

Mes chers oncles, tante, cousin et cousines

Ma très chère amie : Sarah et sa gentillesse, et ma petite amie Leïla.

Ainsi que pour tous mes amis : Amira, Asmaa, Djaouida, Hanane M., Hanane Z., Ibtissame, Karima, Nassima, Soraya, Zahida, hania, houria, wissem, Réda et boubeker.

Résumé (Français, Anglais, Arabe)	I
Remerciements	IV
Dédicace	V
Liste des figures	1
Liste des tableaux	2
Liste des abréviations	4
Introduction générales	5

Table des Matières

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Généralités	9
I.2 Terpène	10
I.3 Monoterpènes	12
I.3.1 Monoterpènes cycliques	13
I.3.2 Limonène	14
I.3.2.1 Propriétés physico-chimiques du limonène	15
I.3.2.2 Utilisations	15
I.3.2.3 Travaux antérieurs réalisés sur le limonène	16
I.4 Espèces végétales considérées	16
I.4.1 Le carvi	17
I.4.2 L'orange	17
I.4.3 Le thym	17
I.4.4 Le tétraclinis articulata	18
I.4.5 Le citron	18
I.5 Méthodes d'extraction des huiles essentielles	19
I.5.1 Hydrodistillation	19

I.5.2 Entraînement à la vapeur	19
I.5.3 Extraction par solvant	20
I.6 Techniques de préconcentration et d'analyse	21
I.6.1 Technique de préconcentration	21
I.6.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	21
I.6.1.2 Chromatographie sur colonne (CC)	22
I.6.2 Technique d'analyse	22
I.6.2.1 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)	23
I.6.2.2 Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	24

**Chapitre II : composition des huiles essentielles des espèces
végétales étudiées**

II.1 Préparation de l'huile essentielle des espèces étudiées	28
II.1.1 Hydrodistillation	28
II.1.2 Entraînement à la vapeur d'eau	30
II.2 Identification du limonène dans différents échantillons par chromatographie sur couche mince (CCM)	31
II.3 Analyse des HE obtenues par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)	32

**Chapitre III : Dosage de la fraction monoterpénique
monocyclique de différents extraits aromatiques et médicinaux
par IRTF**

III.1 Instrumentation et réactif	39
III.2 Préparation des extraits	40
III.3 Résultat et discussion	42

III.3.1 Détermination directe de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE d'orange et de citron	43
III.3.1.1 Détermination directe de la fraction monoterpénique monocyclique (analysé globalement sous formes de limonène) de l'HE d'orange	43
III.3.1.1.a Spectres infrarouges de limonène et de l'HE d'orange	43
III.3.1.1.b Caractéristiques analytiques de limonène obtenu directement dans CH ₂ CL ₂ /amylène	45
III.3.1.1.c Teneur de la fraction monoterpénique monocyclique dans l'HE d'orange	47
III.3.1.2 Détermination direct de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE de citron	48
III.3.1.2.a Spectres infrarouges de limonène et de l'HE de citron	48
III.3.1.2.b Teneur de la fraction monoterpénique de l'HE de citron	49
III.3.2 Détermination de limonène de l'HE de thym et de tétraclinis	50
III.3.3 Détermination de la teneur limonène de l'extrait de carvi	51
III.3.3.1 Analyse qualitative des fractions concentrées en limonène	52
III.3.3.2 Détermination du taux de limonène de l'extrait de carvi	56
Conclusion générale	59
Annexe	62
Références bibliographies	64

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Rendement de l'HE obtenu par Hydrodistillation	30
Tableau II.1 : Composition chimique de l'huile essentielle de l'orange	33
Tableau II.2 : Composition chimique de l'huile essentielle de thym	34
Tableau II.3 : Composition chimique de l'huile essentielle de carvi	35
Tableau II.4 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>tétracelinis articulata</i>	35
Tableau III.1 : Caractéristique analytique de limonène dans CH ₂ Cl ₂ aux différentes bandes d'absorbances	46
Tableau III.2 : Contenu de limonène de l'HE de l'orange en considérant différents modes de mesure	48
Tableau III.3 : Taux de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE de citron aux différentes bandes de mesure	50
Tableau III.4 : Regroupement des fractions chimique de même nature	53

Table des figures

Figure I.1 Squelettes d'une unité isoprénique (A) et de l'isoprénique actif (B)	11
Figure I.2 Classement des monoterpènes	12
Figure I.3 Mécanisme réactionnel d'ionisation-cyclisation du diphosphate de géranyle via de diphosphate de linalyl	13
Figure I.4 Structure moléculaire du d-limonène(R) (a) et du l-limonène (S) (b)	14
Figure I.5 Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier	24
Figure II.1 Montage de l'hydrodistillation	28
Figure II.2 Préparation de l'HE de la matière végétale	29
Figure II.3 Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau	31
Figure II.4 Identification du limonène par CCM	32
Figure II.5 (A) Chromatogramme d'huile essentielle de l'orange, (B) Spectre de masse du limonène	34
Figure III.1 Montage de flux utilisé pour les différentes analyses	40
Figure III.2 Préparation de l'extrait à partir de la matière végétale	41
Figure III.3 Montage de chromatographie sur colonne (CC)	42
Figure III.4 Spectre d'absorbance IRTF de limonène (7.5 mg/ml, en noir) et de l'huile de l'orange (9.49 mg/ml, en jaune) dans CH ₂ Cl ₂	44
Figure III.5 Spectres d'absorbance d'une série d'étalons de limonène préparée dans CH ₂ Cl ₂ pour un domaine de concentration compris entre 0.75 et 10mg/ml	45
Figure III.6 courbe d'étalonnage de différentes bandes d'absorbances	47
Figure III.7 Spectre de limonène (4.73 mg/ml, en noir) et l'HE de citron (5.96mg/ml, en jaune) dans CH ₂ Cl ₂	49
Figure III.8 Spectre de limonène (10 mg/ml), l'HE de thym (129 mg/ml) et de l'HE de tétraclinis (1505 mg/ml) dans CH ₂ Cl ₂	51
Figure III.8.a Variation de la teneur des hydrocarbures aliphatique dans l'extrait en fonction de la composition de la phase éluant	54
Figure III.8.b Variation de la teneur des carbonyles dans l'extrait en fonction de la composition de la phase éluant	54
Figure III.8.c Variation de la teneur des hydrocarbures aromatique dans l'extrait en fonction de la composition de la phase éluant	55
Figure III.8.d Variation de la teneur des alcools dans l'extrait en fonction de la composition de la phase éluant	55
Figure III.8.e Variation de la teneur du limonène dans l'extrait en fonction de la composition de la phase éluant	56

Figure III.9 Spectre IRTF de limonène (10 mg/ml) et de la fraction préconcentré en limonène
(7.52 mg/ml) dans CH₂Cl₂

57

Liste des abréviations

IRTF: Infrarouge à transformé de Fourier

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

CCM: Chromatographie sur couche mince

CC : Chromatographie sur colonne

HE: Huile essentielle

MgSO₄: Sulfate de magnésium

CH₂Cl₂: Dichlorométhane

cm: Centimètre

mm: Milimètre

%: Pourcentage

t_r : Temps de rétention

L.B: Ligne de base

µm: Micromètre

eV: electron volt

AcOEt: Acétate d'éthyle

Introduction générale

Les plantes aromatiques et médicinales sont susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes.

Ces plantes aromatiques sont, donc, à l'origine de produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits...) qui se présentent presque toujours comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation. Les techniques d'analyse permettent, dans la grande majorité des cas, de réaliser ce travail. Cependant, l'identification de certains constituants est parfois délicate et l'utilisation de plusieurs méthodes d'analyse complémentaires s'avère nécessaire.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines de composés, principalement terpéniques. Les terpènes, molécules construites à partir d'entités isopréniques, constituent une famille très diversifiée, tant au niveau structural qu'au niveau fonctionnel. Dans les huiles essentielles, on rencontre généralement des mono et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone) et plus rarement des diterpènes (20 atomes de carbone).

Les huiles essentielles de qualité sont rares, quelle que soient les prétentions publicitaires. Si aujourd'hui, de petites quantités sont falsifiées, c'est-à-dire mélangées avec divers composants parfois synthétiques, nombre d'entre elles sont encore mal distillées ou mal stockées, d'odeur grossière et de composition biochimique aléatoire. Les efforts qualitatifs demeurent nécessaires concernant :

1. La systématique d'origine souvent incomplète ;
2. les variétés de la plante dont dépendent les propriétés de l'essence ;
3. le moment de culture et de récolte ;
4. le stade de développement végétatif de l'espèce ou la partie de la plante que l'on a distillé ;

5. comme pour la constance dans leur spécificité biochimique.

Une grande attention doit être portée aux critères d'identification des HE, ou même des extraits, assurant la légitimation de leur usage thérapeutique, afin de les acheter et les utiliser en connaissance de cause.

Les méthodes chromatographique (CG, CG-SM) ont joué un rôle essentiel dans l'élucidation de la composition chimique de l'extrait ainsi que dans le contrôle quantitative des molécules aromatiques ou médicinales spécifiques fournissant ainsi une véritable carte identité de l'extrait.

Pour faire face à la complexité des extraits et répondre aux exigences de qualité, il est nécessaire de mettre au point de nouvelles méthodes d'analyse simples, reproductibles et fiables, à la disposition des chercheurs travaillant dans les différents domaines pour optimiser les critères de qualité des extraits végétaux.

Notre travail s'intègre à ce large domaine de recherche. Il contribue au développement des applications analytiques quantitatives de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier et offre un outil d'analyse complémentaire, surtout disponible aux chercheurs et aux utilisateurs des autres secteurs.

Un spectre d'absorption infrarouge d'une molécule organique comporte souvent un nombre important de pics. L'analyse d'un composé dans une matrice complexe peut donner des chevauchements de pics et donc l'identification des groupements fonctionnels d'une molécule est rarement suffisante pour permettre l'identification certaine du composé. Cependant, la spectrométrie infrarouge constitue un outil analytique qui dispose d'un degré de sélectivité et de spécificité puissant pouvant séparer les pics interférés en exploitant la zone des « empreintes digitales » comprise entre 1500 et 400 cm^{-1} .

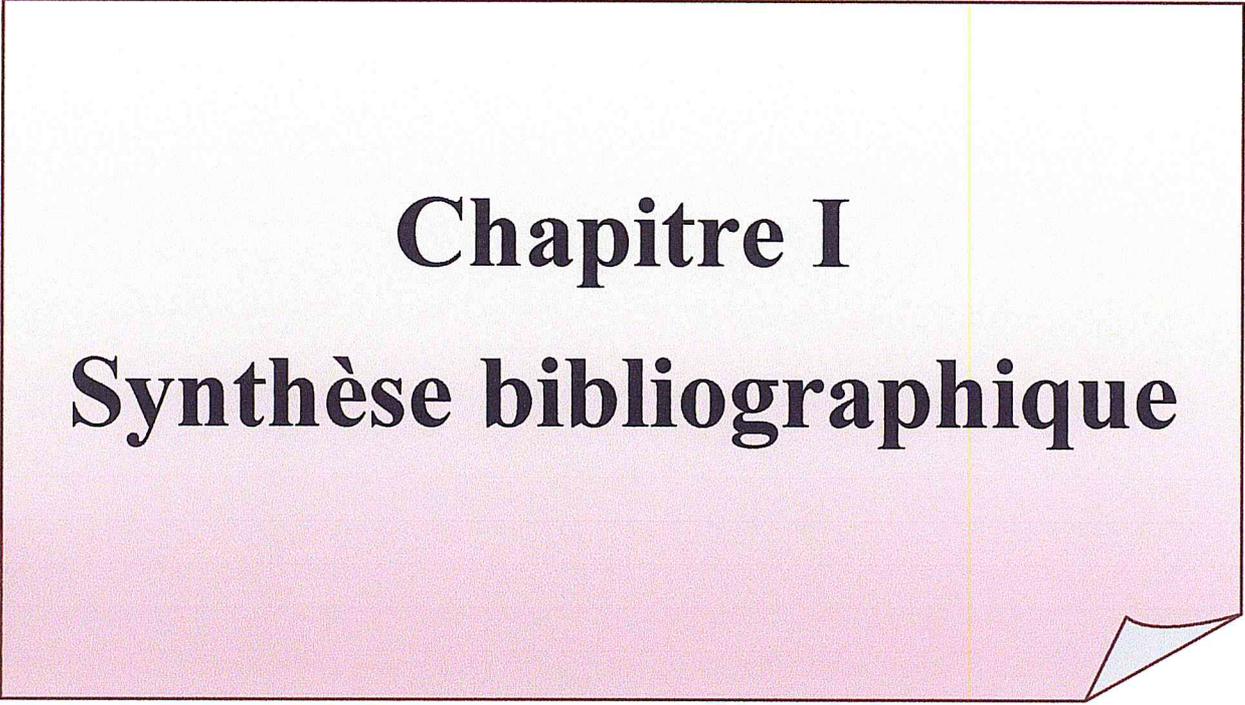
La loi de Beer-Lambert est aisément valable pour les analyses quantitatives à $\pm 10\%$, pour des analyses plus précises $< 1\%$, il est nécessaire de passer par une étape de séparation ou de préconcentration des analytes.

L'objectif de ce mémoire est double :

Le première concerne le dosage d'un analyte présent dans des extraits avec un taux élevé de l'ordre de 50% et ce, sans traitement préalable des extraits et en utilisant une bande spécifique.

Le deuxième propose un protocole de préconcentration d'un analyte présent dans un extrait avec un taux très faible inférieur à 1% .

L'application expérimentale a été réalisée sur le limonène qui est dans un cas le produit majoritaire de la fraction monoterpénique monocyclique, elle même majoritaire des huiles essentielles d'orange et de citron et dans un autre cas le produit minoritaire de l'extrait de carvi.



Chapitre I
Synthèse bibliographique

I.1 Généralités

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés médicinales des plantes médicinales dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques [1]. Ces substances actives sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie, ainsi que dans la confection des boissons [2]. On les retrouve dans la fraction d'huile essentielle ou d'extrait contenue dans les plantes [3].

L'huile essentielle ou l'extrait végétal provenant de plantes peuvent se retrouver dans toutes les parties de la plante (écorces, racines, feuilles, fleurs et fruits) et dans toutes les régions climatiques du globe [4]. Les facteurs environnementaux comme la température et la photopériode peuvent jouer un rôle primordial sur la qualité et la quantité de l'huile essentielle ou d'extrait [5]. Les matières nutritives indispensables à la croissance de la plante, l'eau, les éléments minéraux et l'azote jouent également sur la composition chimique et la qualité de l'huile essentielle [6].

Les extraits naturels bruts sont en général fabriqués sur les lieux de culture des plantes aromatiques. Selon l'origine des plantes (espèce, variété), l'écologie du milieu et le soin apporté par les pays producteurs (modes de récolte, de collecte, de préparation, de séchage, de stockage, de conditionnement), les épices et aromates présentent des variations importantes dans la composition des extraits.

Les industries préfèrent utiliser des extraits et des préparations élaborées, plutôt que les épices et aromates en l'état. Les huiles essentielles, souvent débarrassées d'une partie ou de la totalité des cires et des terpènes, présentent de nombreux inconvénients, comme leur insolubilité. Par exemple, on procède à une distillation fractionnée pour isoler le constituant olfactif prépondérant (comme le

limonène obtenu à partir de l'huile d'orange) ou à l'extraction de molécules aromatiques à l'aide de solvants (comme l'extraction du limonène à partir du carvi en utilisant un mélange alcool-eau comme solvant) [7].

En général, le rendement maximal en huile peut être atteint en ajustant les éléments nutritifs pour optimiser la production de la biomasse, la récolte de la matière végétale pouvant coïncider avec la concentration maximale d'un composé recherché dans la plante [8].

I.2 Terpène

Les terpènes forment un groupe de produits naturels très diversifiés et d'un intérêt chimique considérable. On les trouve fréquemment dans les huiles volatiles des plantes. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbone. Extraites, ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande).

Vers le milieu du XIX^{ème} siècle, l'essence de térébenthine est à l'origine du terme "terpènes" donné aux hydrocarbures de formule brute $C_{10}H_{16}$ [9].

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone $(C_5H_8)_n$ ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des anneaux [10]. Cet isoprène (Figure I.1.A) est à la base du concept de la "règle isoprénique" [11]. Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (Figure I.1.B), désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique ; d'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel on les désigne également.

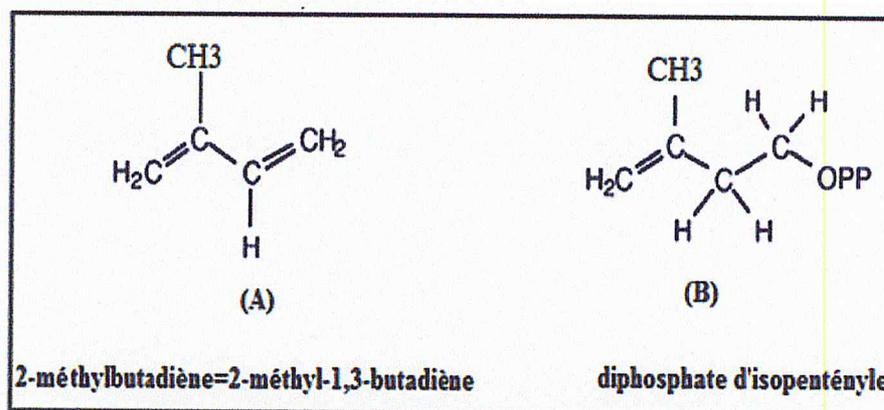


Figure I.1 : Squelettes d'une unité isoprénique (A) et de l'isoprénique actif (B)

Les terpènes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux [12]. Les huiles essentielles qui n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs et chez certains champignons où elles sont stockées dans toutes les parties des végétaux, sont principalement composées des terpènes. Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation.

Les rôles biologiques des terpènes et des huiles essentielles sont souvent complexes [13]. Ils jouent un rôle écologique dans les interactions végétales et végétale-animales [14]. En effet, les huiles essentielles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes, allopathiques dans les régions arides et peuvent servir de solvants bioactifs des composés lipophiles [15].

Les terpènes sont des mélanges complexes de constituants hétérogènes, elles appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes, le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe aromatique et aliphatique (alcane, alcène, alcénol, phénol etc...) d'autre part. Dans chaque groupe de terpènes, un précurseur unique conduit aux différents constituants connus par une succession de réactions classiques [16]. Les plus connus de ces

produits sont les monoterpènes qui répondent à la formule brute de (C₁₀H₁₆), les sesquiterpènes (C₁₅H₂₄) et les diterpènes (C₂₀H₃₂).

I.3 Monoterpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90 % des huiles essentielles sont des monoterpènes) [17]. Ils comportent 10 atomes de carbone et sont issus du couplage de deux unités isopréniques, selon le mode de couplage « tête à queue » [18] avec l'existence de nombreuses molécules fonctionnalisées (alcools, aldéhydes, cétones, esters, éthers, peroxydes). L'arrangement de leur squelette peut être Acyclique, Monocyclique, Bicyclique et Tricyclique [19] comme le montre la figure I.2.

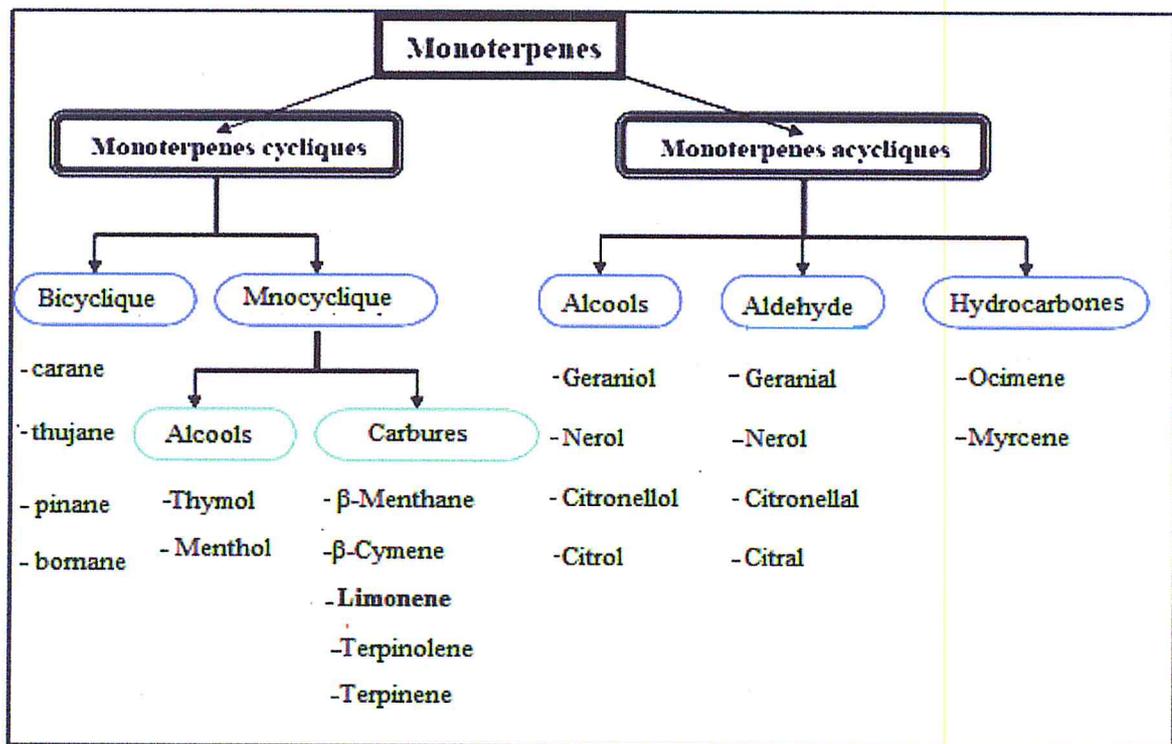


Figure I.2: Classement des monoterpènes [19]

I.3.1 Monoterpènes cycliques

Les monoterpènes cycliques dérivent d'un même mécanisme réactionnel électrophile (Figure I.3) : ionisation en carbocation géranyle puis réarrangement avec migration du groupement diphosphate et isomérisation. Cette étape ionisation-isomérisation conduit en fonction de la stéréospécificité de l'enzyme au (-)-3R ou au (+)-3S-LPP [20]. Le LPP subit ensuite une rotation C2-C3 suivie par une ionisation donnant naissance au cation linalyle.

Ce dernier régénère après sa cyclisation en C6-C1 son correspondant monocyclique, le carbocation (4R) ou (4S) - α -terpényle [21]. Il s'agit d'un cation terpényle-8, véritable plaque tournante dans la biogénèse des monoterpènes cycliques [22]. En effet, on peut concevoir facilement qu'il soit à l'origine du limonène, du terpinolène et de l' α -terpinéol. Il peut également donner le cation terpényle-4, précurseur immédiat commun de l' α - et du γ -terpinène ainsi que du terpinène-4-ol [23].

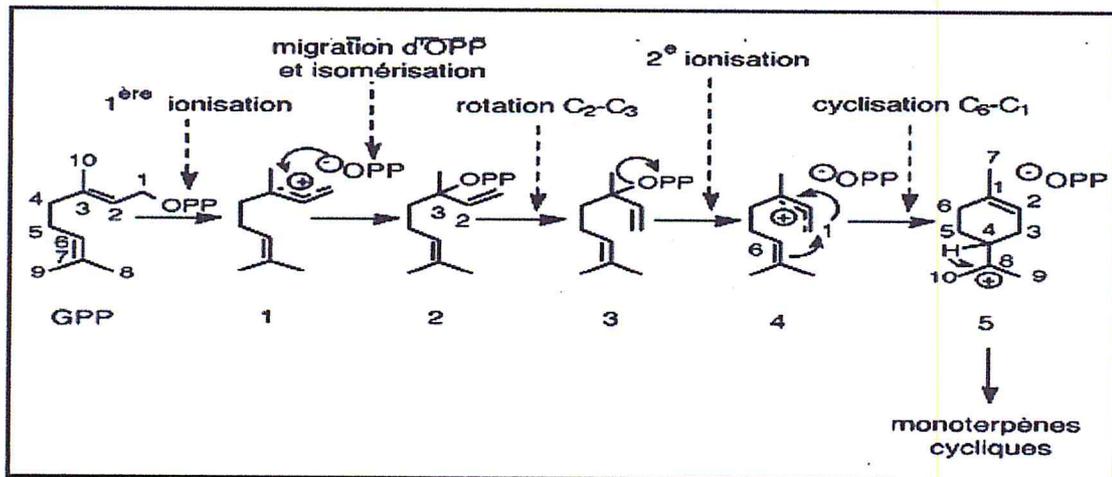


Figure I.3 : Mécanisme réactionnel d'ionisation-cyclisation du diphosphate de géranyle via de diphosphate de linalyl [23].

1 : carbocation géranyle, 2 : forme trans du LPP, 3 : diphosphate de linalyle, 4 : cation linalyle, 5 : carbocation α -terpényle (cation terpényle-8)

I.3.2 Limonène

Le limonène est un hydrocarbure liquide appartenant à la famille des terpènes monocycliques. Il est produit naturellement par divers végétaux, notamment le zeste d'orange et représente le constituant principal des huiles extraites des pelures de ces fruits. C'est un monoterpène formé de deux molécules d'isoprène. Le limonène est une molécule chirale (la chiralité est la propriété que possèdent certaines molécules de ne pas être identiques à leur image dans un miroir). Il existe sous la forme de deux énantiomères (seule la lumière polarisée peut différencier les deux formes). L'énantiomère d-limonène (le suffixe « d » signifie dextrogyre) dévie à droite le plan de la lumière polarisée (Figure I.4-a). L'énantiomère l-limonène (le suffixe « l » signifie lévogyre) dévie le plan de polarisation vers la gauche (Figure I.4-b). Le dipentène ou dl-limonène est le mélange racémique des deux molécules (d-limonène et l-limonène) [24].

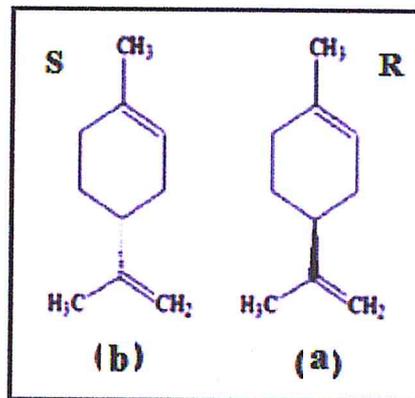


Figure I.4 : Structure moléculaire du d-limonène(R) (a) et du l-limonène(S) (b)

I.3.2.1. Propriétés physico-chimiques du limonène

Nom chimique	(R)-4-isopropényl-1-méthyl-1-cyclohexène
Formule moléculaire	C ₁₀ H ₁₆
Masse moléculaire	136,23
Pureté de la matière	95,9 %, nominale
Couleur et état physique	Liquide incolore à jaune clair
Odeur	caractéristique de l'orange et des agrumes
Point d'ébullition	178°C
Point de fusion	-74°C
Point d'inflammation	43°C
Densité	0.84
solubilité	Immiscible avec de l'eau

À température ambiante, le limonène est un liquide incolore possédant une odeur caractéristique des agrumes. Ce terpène combustible est soluble dans les solvants organiques et la plupart des huiles mais pratiquement insoluble dans l'eau. Le limonène s'oxyde lentement en présence d'air.

I.3.2.2. Utilisations

Le d-limonène est utilisé depuis un demi-siècle comme arôme dans les parfums, savons, crèmes, lotions et détergents et comme flaveur dans les aliments et boissons. Il servirait comme matière première dans la synthèse de résines terpéniques, pour la production de succédanés d'huiles essentielles et pour la fabrication d'édulcorants [25].

I.3.2.3 Travaux antérieurs réalisés sur le limonène

Différents travaux sur les HE riche en limonène ont été réalisés.

L'isolement et la purification de limonène par une nouvelle technique élaborée de la distillation sous vide (pour éviter les pertes et diminuer la température) fractionnée avec Vigreux de la colonne et identification par CG-SM a été testée [26].

Après identification de l'huile de zeste d'orange qui contient 95% de limonène par CG, la comparaison du taux d'extraction par deux techniques différentes: extraction par solvant et extraction avec fluide supercritique a été étudiées [27].

L'huile essentielle de carvi obtenue par hydrodistillation a été étudiée par CG et CG-SM. Les principaux composants de l'huile essentielle : la (R)-carvone (37,98%) et le D-limonène (26,55%) ont été identifiés. Les deux produits ont été séparés et purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice et de chromatographie préparative sur couche mince. Il a été porté dans ce travail, que la composition de l'huile essentielle de carvi varie selon l'origine de la plante [28].

L'extraction de la carvone et le limonène à partir de graines de carvi avec le fluide supercritique CO₂ a été développé [29].

I.4 Espèces végétales considérées

Dans ce travail nous proposons d'un côté l'étude chimique des HE de citron, d'orange, de carvi, de thym et de tétraclinis par CG/SM et d'un autre le dosage de la fraction monoterpénique monocyclique (sous formes de limonène des HE de citron, d'orange, de thym et de tétraclinis et de l'extrait de carvi par spectrométrie IRTF.

I.4.1 Le carum carvi (كروية)

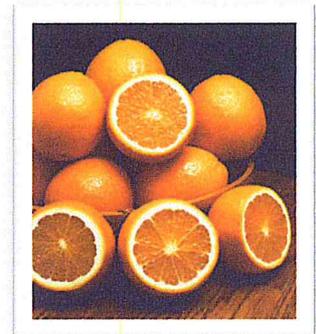
Le Carvi appelé aussi Cumin des prés, Anis des Vosges et Cumin des montagnes, de la famille des ombellifères, est une plante bisannuelle ou pluriannuelle de 50 à 60 cm avec des tiges striées et ramifiées. Les feuilles de la base apparaissent la première année. Les feuilles supérieures apparaissent la deuxième année. Les ombelles de fleurs blanches



fleurissent de mai à juillet. Le Carvi a une fructification annuelle. Toute la plante est fortement odorante. Les graines de carvi sont séparées du fruit mûr par battage, après séchage. Ils ont une longueur de 4 à 6 mm, et sont de forme incurvée. L'odeur de Carvi est très prononcée. La flaveur doit être caractéristique, aromatique et exempt d'odeur de moisi [30, 31]. La partie utilisée du Carvi est constituée par le fruit sec de Carvi. Il contient environ 4% d'huile essentielle [32]. Son huile essentielle possède une odeur spéciale et agréable.

I.4.2 L'orange

L'oranger ou *Citrus sinensis* (L.) Osbeck est un arbre fruitier de la famille des Rutacées, pouvant atteindre 10 mètres de hauteur, avec un feuillage vert sombre persistant [33]. L'écorce de l'orange est riche en essences odorantes, en pectines et en huiles essentielles [34,35]. Elle est également riche en d-limonène [36].



I.4.3 Le thym (زعتر)

Le thym, *Thymus vulgaris* L, appartient aussi à la famille des Lamiacées. Originaire du bassin méditerranéen, cet arbrisseau aux nombreux rameaux serrés, est une espèce végétale vivace rustique ou semi-rustique. Il existe plus de 100 espèces du genre *Thymus* dont 65 riens qu'en Europe, toutes se multipliant par bouturage. Quelque soit



les espèces, les fleurs vont d'un rose pâle au mauve et les feuilles très petites sont généralement vertes et pointues [37].

I.4.4 Le tétraclinis articulata (عرعار)

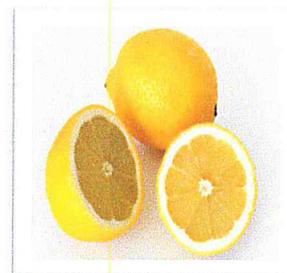
Le *Tetraclinis articulata* est un conifère résineux appartenant à la famille des Cupressacées plus communément appelé « sandarac », « thuya de Berberie » ou « Araar ». C'est un arbre pouvant atteindre 6 à 8 m de haut et 0,30 m de diamètre en moyenne. Il existe néanmoins quelques peuplements



difficiles d'accès où les dimensions peuvent être plus importantes (12 m pour 0,50 m). On a également observé quelques vieux sujets allant jusqu'à 20 m de haut pour 1m de diamètre mais cela reste très rare. Il possède souvent deux ou plusieurs troncs à la base. L'arbre fleurit en automne (octobre) et fructifie l'été suivant (juin-juillet). Cette fructification démarre vers l'âge de 15 ans et se répète tous les deux à trois ans jusqu'à un âge très avancé (Boudy 1952). L'ouverture des cônes, qui reste comme pour beaucoup d'espèces conditionnée par la chaleur, n'a lieu qu'à la fin de l'été [38].

I.4.5 Le citron

Le citronnier (*Citrus limon*) de la famille des Rutaceae est un agrume. C'est un arbuste de 5 à 10 m de haut, à feuilles persistantes. Le fruit a une écorce lisse jaune éclatant. Sa chair est juteuse, très acide et riche en vitamine C. De l'écorce jaune on extrait une huile essentielle qui contient entre autres substances du limonène et du citral [39].



I.5 Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Les essences sont extraites des matières végétales par différentes méthodes, le choix d'une méthode par rapport à une autre est lié à plusieurs paramètres tels que la nature de la matière végétale, sa fragilité au contact de l'eau et la variation de la température.

Les principales méthodes utilisées sont :

- Hydrodistillation
- Entraînement à la vapeur d'eau
- Extraction par solvant

I.5.1 Hydrodistillation

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de la qualité. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange hétéro-azéotropique (huile-eau) [40].

I.5.2 Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est

ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse (eau) et une phase organique (l'huile essentielle). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [41].

I.5.3 Extraction par solvant (macération)

Il est très difficile d'isoler les arômes naturels d'une matière végétale ou animale dans des conditions économiques favorables sans nuire à la qualité globale de ces arômes. Ceci est dû à leur fragilité et leur composition chimique qui est souvent complexe.

Le but donc est de garder l'essence après extraction avec ces propriétés et caractéristiques initiales, alors il s'avère que l'extraction par solvant peut être utile à la résolution de pareil problème. Afin d'éviter quelques inconvénients que présente cette méthode, il y a lieu de procéder à une étude approfondie du choix de solvant et à son élimination au cours de la distillation. Généralement, les solvants utilisés sont : Ether de pétrol, Benzène, Toluène, Alcool(Ethanol) [42].

Pour extraire de nombreux produits volatils naturels, on utilise aujourd'hui des solvants en se basant sur le fait que les huiles essentielles ou les matières premières odorantes sont solubles dans la plupart des solvants organiques, particulièrement des hydrocarbures aliphatiques tels que : n-Hexane, n-Pentane, Dichlorométhane...etc, qui respectent les constituants les plus fragiles et donnent des produits olfactivement plus ressemblants à la matière végétale.

Le principe consiste à faire immergée la matière végétale dans un solvant ou un mélange de deux solvants à froid ou à chaud, afin de faire passer les substances odorantes dans le solvant. Ensuite, on soutire la solution parfumée et on l'évacue à travers un décanteur filtre vers un évaporateur primaire où l'on

distille le solvant d'abord à pression atmosphérique puis sous vide [Extrait de l'Eucyclopédie].

I.6 Techniques de préconcentration et d'analyse

I.6.1 Techniques de préconcentration

Les HE ainsi que les extraits obtenus à partir de plantes constituent des échantillons complexes d'où, en général, l'étape de la préparation de l'échantillon pour la préconcentration ou la purification des analytes d'intérêt s'impose comme étape préalable à l'analyse. Nous exposons dans ce travail le principe de deux techniques qui ont été utilisées lors la réalisation de la partie expérimentale.

I.6.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une méthode basée principalement sur les phénomènes d'adsorption, elle s'apparente étroitement à la chromatographie sur colonne au niveau des phases impliquées et du mécanisme mis en œuvre pour la séparation [43].

Principe de la technique (CCM)

Lorsque la plaque sur laquelle nous avons déposé l'échantillon, est plongée dans la cuve à CCM, le solvant monte par capillarité le long de la phase stationnaire et permet ainsi la migration de chaque composé de l'échantillon, chacun avec sa propre vitesse. Cette dernière dépend d'une part des forces électrostatiques retenant le composé sur la phase stationnaire, d'autre part de sa solubilité dans la phase mobile. L'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. En chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires [44].

Dans ce travail la CCM a été utilisé pour l'identification qualitative du limonène.

I.6.1.2 Chromatographie sur colonne (CC)

Elle permet la séparation et l'isolement des constituants d'un mélange. Elle présente plusieurs inconvénients notamment l'utilisation de grandes quantités de solvants qui sont nécessaires à l'élution [45].

Principe de la technique (CC)

Le principe de cette chromatographie est basé sur les phénomènes d'adsorption sur la phase solide qui peut être l'alumine ou la silice. Les substances les plus polaires sont fortement retenues par l'adsorbant dans la colonne puis les solvants polaires entraînent facilement les composés polaires. Les proportions des molécules adsorbées dépendent de leur nature et du pouvoir de dissolution de l'éluant. Lorsque l'échantillon est déposé au sommet de la colonne, il est aussitôt adsorbé en une zone cylindrique. L'écoulement continu d'éluant dans la colonne par gravité provoque alternativement la désorption et l'adsorption des molécules de l'échantillon. Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant [46].

I.6.2 Technique d'analyse

Différentes techniques d'analyses ont été utilisées pour l'étude de la composition chimique des HE. Les travaux ont été consacrés aussi bien à l'identification qualitative qu'à l'analyse quantitative des différents constituants d'une huile essentielle.

Dans ce travail nous aborderons seulement les deux techniques qui ont été utilisées dans la réalisation de la partie expérimentale.

I.6.2.1 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Les premiers appareils de routine CPG/SM à colonnes capillaires datent de 1975. Depuis, cette méthode de couplage n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des produits pétroliers (carburants, matières synthétiques), des produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine), etc [47]. Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence [48]. Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe [49].

Principe théorique

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse basée sur la réactivité des ions organiques en phase gazeuse. Le spectromètre est un analyseur d'ions en fonction de leur masse. On réalise une ionisation des molécules après leur vaporisation dans la source du SM dont le principe de fonctionnement repose sur l'action d'un champ magnétique, électrique ou de radiofréquence sur une particule chargée afin d'en déterminer le rapport masse/charge. Parmi toutes les techniques d'ionisation, l'impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC) sont les plus couramment employés dans le couplage CG/SM. L'identification des molécules, qui se fait à partir de leur spectre de masse, est basée sur leur ionisation et sur leur fragmentation, qui sont elles-mêmes directement liées à leur stabilité énergétique. L'énergie nécessaire pour expulser un électron d'une molécule est liée à son potentiel d'ionisation, et donc à sa composition et à sa structure chimique ; lorsque l'énergie cinétique des électrons est comprise entre 30 et 100 eV, les ions formés résultent des réactions d'ionisation. L'ionisation par IE produit des ions parents (M^+), qui permettent de déterminer la masse moléculaire des produits détectés, et des ions fragments qui permettent de remonter à la structure moléculaire.

I.6.2.2 Spectrométrie Infra rouge à transformée de Fourier (IRTF)

La spectrométrie IRTF est une spectrométrie multiplex. La lumière incidente est détectée globalement après avoir été codée par un interféromètre (Figure I.5) qui remplace le monochromateur, et après avoir passé à travers l'échantillon [50].

Principe théorique

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée on peut déterminer les modes de vibration actifs en infrarouge grâce à la Théorie des Groupes. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

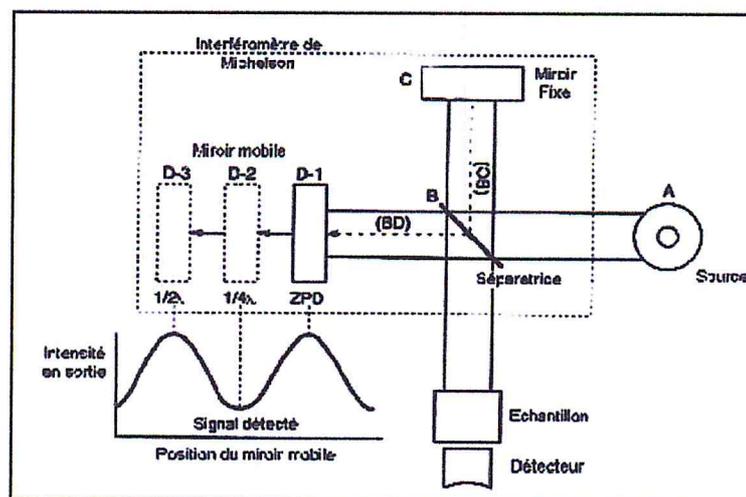


Figure I.5 : Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier

Les informations tirées des spectres infrarouges sont de deux sortes :

a) Informations qualitatives :

Un spectre d'absorption infrarouge d'une molécule organique comporte souvent un nombre important de pics. L'analyse de la section de gauche du spectre comprise entre $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ comporte la plupart des bandes qui sont caractéristiques de groupes fonctionnels et qui sont communs à toutes les molécules organiques. La présence ou l'absence de bandes pour les liens C=O, O-H, N-H, C=C, C-C est généralement évidente et procure de l'information structurelle importante.

L'identification des groupements fonctionnelles d'une molécule est rarement suffisante pour permettre l'identification certaine du composé, il faut exploiter la section de droite du spectre comprise entre ($1500 - 400 \text{ cm}^{-1}$), appelée zone des « empreintes digitales », qui comprend un très grand nombre de bandes aux formes variées qui peuvent être spécifiques à la molécule. Si toutes les bandes de cette région se retrouvent dans deux spectres IR (aux même positions et intensités relatives), on peut conclure avec confiance qu'il s'agit de spectres du même composé. Il existe des atlas et des logiciels qui permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents [51].

d) Informations quantitatives :

Presque toutes les espèces moléculaires absorbent dans la région de l'infrarouge moyen d'où la possibilité de les doser par cette technique. L'analyse d'un composé dans une matrice complexe peut donner des chevauchements de pics, cependant, la spectrométrie infrarouge constitue un outil analytique qui dispose d'un degré de sélectivité et de spécificité puissant pouvant séparer les pics interférés et ce, vu le caractère unique d'un spectre infrarouge.

Les échantillons peuvent être mesurés sous forme solides (pastilles de KBr 0.5-1%), liquides (solution 5%) et gaz (cellules spéciales ayant jusqu'à 20 voir 50 cm de long).

La loi de Beer-Lambert est aisément valable pour les analyses quantitatives à $\pm 10\%$ avec des déviations raisonnables, pour des analyses plus précises ($< 1\%$ en solution) il est nécessaire de s'assurer que les spectres sont enregistrés dans des conditions optimales. Dans certains cas, on peut également recourir à d'autres méthodes, par exemple l'utilisation des spectres dérivés ou le couplage de la spectrométrie infrarouge avec les méthodes de préconcentration comme la CC ou l'extraction en phase solide (E.P.S) ou encore de séparation comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [52].

Chapitre II

**Composition chimique des
huiles essentielles des
espèces végétales étudiées**

II.1 Préparation de l'huile essentielle des espèces étudiées

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation pour l'orange, le citron, le tétraclinis articulata et le carvi, entraînement à la vapeur pour le thym et l'extraction par solvant pour la poudre du carvi.

II.1.1 Hydrodistillation

On introduit la matière végétale dans un ballon de 1000 ml, puis on ajoute de l'eau distillée jusqu'à la couvrir complètement. On porte à ébullition le mélange pendant 3 à 4 heures après, la première goutte d'hydrolat, en utilisant le montage de l'hydrodistillation de la figure II.1. Ce qui provoque la formation d'un hétéro-azéotrope (eau-huile essentielle), dont les vapeurs sont condensées au niveau du réfrigérant pour donner environ 200 ml de distillat. Ce dernier est constitué d'eau et d'huile essentielle à l'état liquide

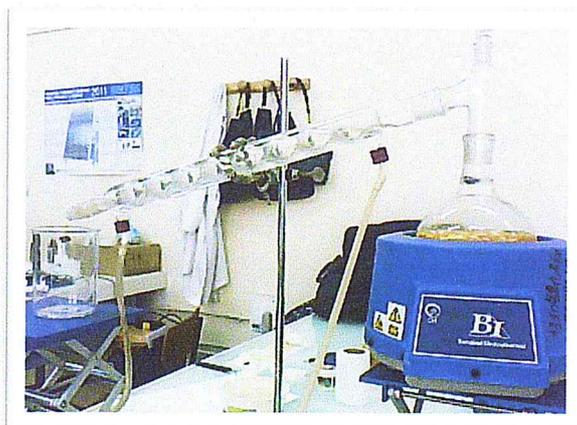


Figure II.1 : Montage de l'hydrodistillation utilisé

L'huile essentielle étant immiscible avec l'eau, le mélange forme un liquide légèrement trouble et sur lequel surnage une fine couche huileuse.

L'hydrolat recueilli est extrait avec un volume d'éther diéthylique, on obtient alors deux phases : une phase organique contenant l'huile essentielle et une phase aqueuse. Cette opération est répétée deux fois afin d'épuiser complètement l'huile essentielle. Les phases organiques obtenues de chaque

extraction sont regroupées et filtrées sur du sulfate de magnésium (MgSO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau. On procède alors à l'évaporation du solvant en utilisant un rotavapeur.

Cette procédure d'hydrodistillation est illustrée sur l'organigramme montré ci-dessous sur la figure II.2.

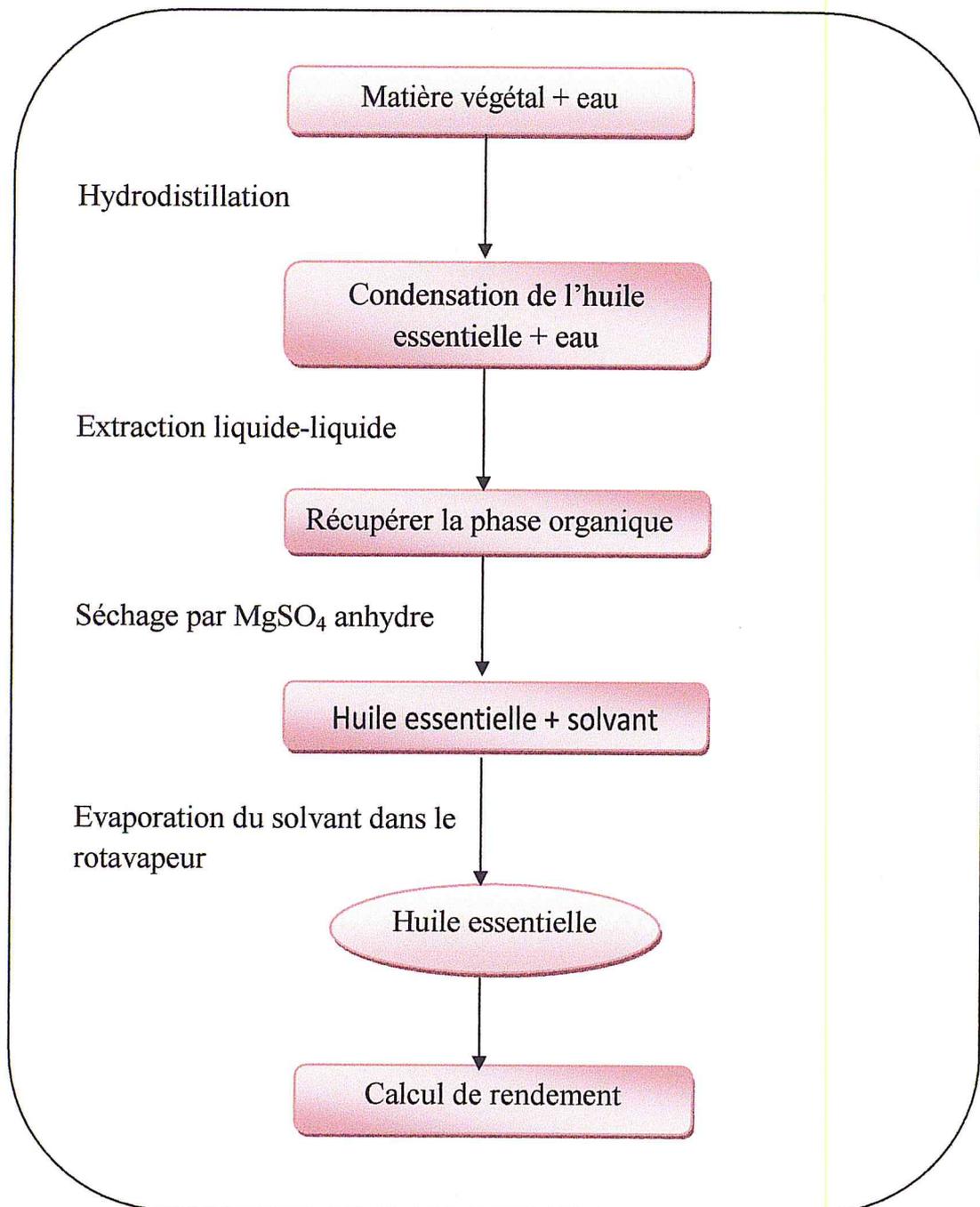


Figure II.2 : Préparation de l'HE de la matière végétale

Rendement de l'huile essentielle obtenue

Le rendement de l'huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue (M_{HE}) et la masse du matériel végétal traitée (M_{Mv}).

$$R = \frac{\text{la Masse de l'huile essentielle}}{\text{la masse de matière végétal}} * 100$$

Les résultats présentés dans le tableau suivant :

Huile essentielle	Rendement (%)
Zeste d'orange	0.13
Zeste de citron	0.12
Tétraclinis articulata	0.18

Tableau 2.1 : Rendement de l'HE obtenu par Hydrodistillation.

II.1.2 Entraînement à la vapeur d'eau

L'extraction d'huile essentielle de thym est réalisée par entraînement à la vapeur d'eau en utilisant le montage sur la figure II.3, constitué d'un ballon rempli au deux tiers d'eau surmonté d'une ampoule à décanter contenant le *thym vulgaris*. Le ballon est porté à ébullition, les vapeurs formées traversent la matière végétale contenue dans l'ampoule à décanter. Cette dernière est reliée à un réfrigérant permettant de condenser les vapeurs issues de l'ampoule à décanter. L'hétéro-azéotrope eau – huile condensé est récupéré dans un bécher. La durée de l'extraction est fixée à 3 h pour une masse de plante de 189,28 g.

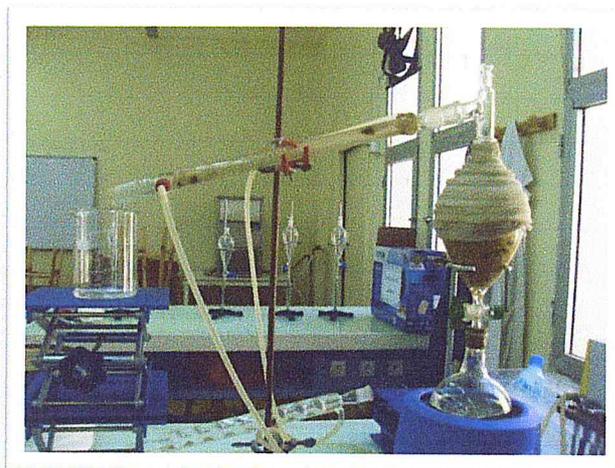


Figure II.3 : Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau

Afin de récupérer la totalité du distillat, on procède par extraction liquide-liquide avec un solvant organique (éther diéthylique). Les traces d'eau présente dans la phase organique sont éliminées par séchage sur du sulfate de magnésium (MgSO_4), suivie par l'évaporation du solvant. Le rendement global de l'huile est de $R = 3.18\%$.

II.2 Identification du limonène dans différents échantillons par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'objectif de cette analyse est de vérifier la présence du limonène dans les HE préparées. La CCM est effectuée sur des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 (Merck). L'élution est réalisée avec un mélange binaire de n-hexane / éther diéthylique à une proportion (6:2 ml, v/v) et la révélation est réalisée par la méthode d'iode ou par détection UV.

La plaque CCM est préparée en déposant les spots des HE déjà obtenues avec le limonène comme étalon. Celle-ci placée verticalement dans une cuve contenant la phase mobile. Après élution des composés et séchage de la plaque CCM, nous avons détecté le limonène soit en utilisant une lampe à 365 nm soit en observant l'apparition de taches brunâtres suite à la révélation par l'iode (Figure II.4) de rapport frontal $R_f=0.7$.

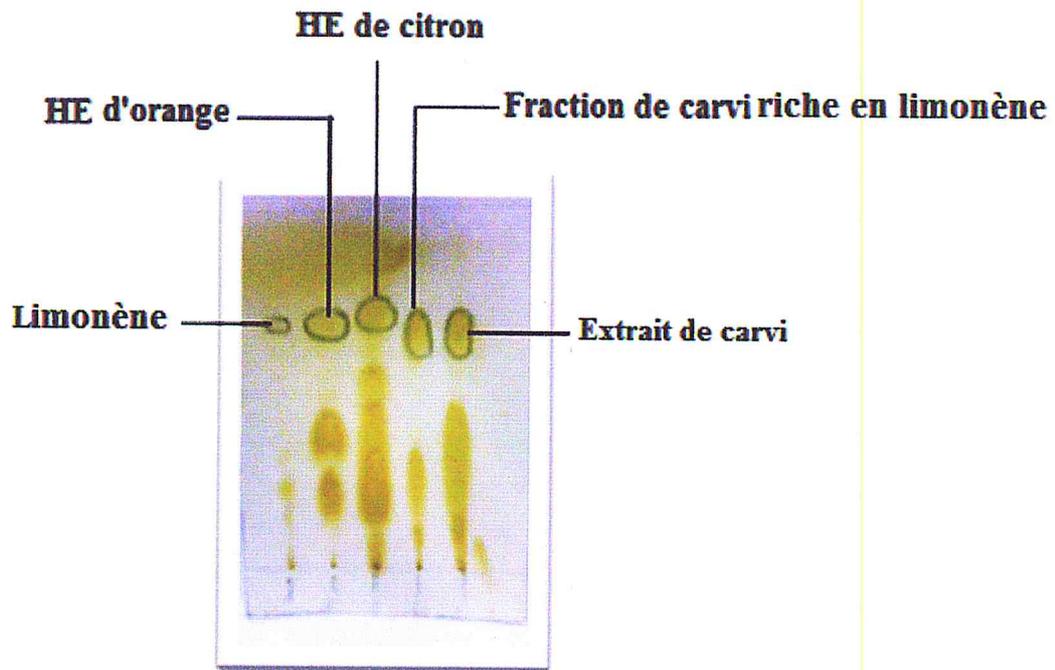


Figure II.4 : Identification du limonène par CCM

II.3 Analyse des HE obtenues par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Dans cette partie, nous allons étudier la composition chimique de l'huile essentielle des différentes plantes (zeste d'orange, citron, carvi, thym et tétraclinis articulata) par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG-SM.

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

- Une colonne capillaire de type HP1 (polydiméthylesiloxane 100%), de longueur 30 m d'un diamètre de 0,25 mm et une épaisseur du film de 0,25 μm .
- Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale à 70 eV.
- Le programme de température du four est : 90 (10') à 210 (10') à raison de 3 °/mn.
- Injection en mode Split : 1/90.
- L'échantillon de l'huile essentielle est dilué dans l'AcOEt à 1%.

Identification

L'identification est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales de l'appareil (NBS 75k.1, Wiley 7n.1) ainsi que sur les données de la littérature concernant les produits purs isolés. Nous tenons à rappeler que NBS 75 k est une banque comprenant les spectres de masse de 75 000 molécules, celle de Wiley 7 n comprend 250 000 molécules.

Les résultats de l'analyse chimique par CG-SM des HE obtenues sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau II.1 : Composition chimique de l'huile essentielle de l'orange

N° de pic	Nom	Temps de rétention	Masse molaire	%
1	(1R)-2.6.6-triméthylbicyclo (3.1.1)hept-2-ène *alpha pinène	3.625	136.13	1.596
2	Sabinène	4.135	136.13	3.659
3	Beta-myrcène	4.136	136.13	6.745
4	<u>Limonène</u>	5.302	136.13	<u>79.37</u>
5	l.linalool	6.560	154.14	1.26
6	Decanal(CAS)	9.540	156.15	1.229

Le spectre chromatographique de l'HE de l'orange est donné par la figure II.5.

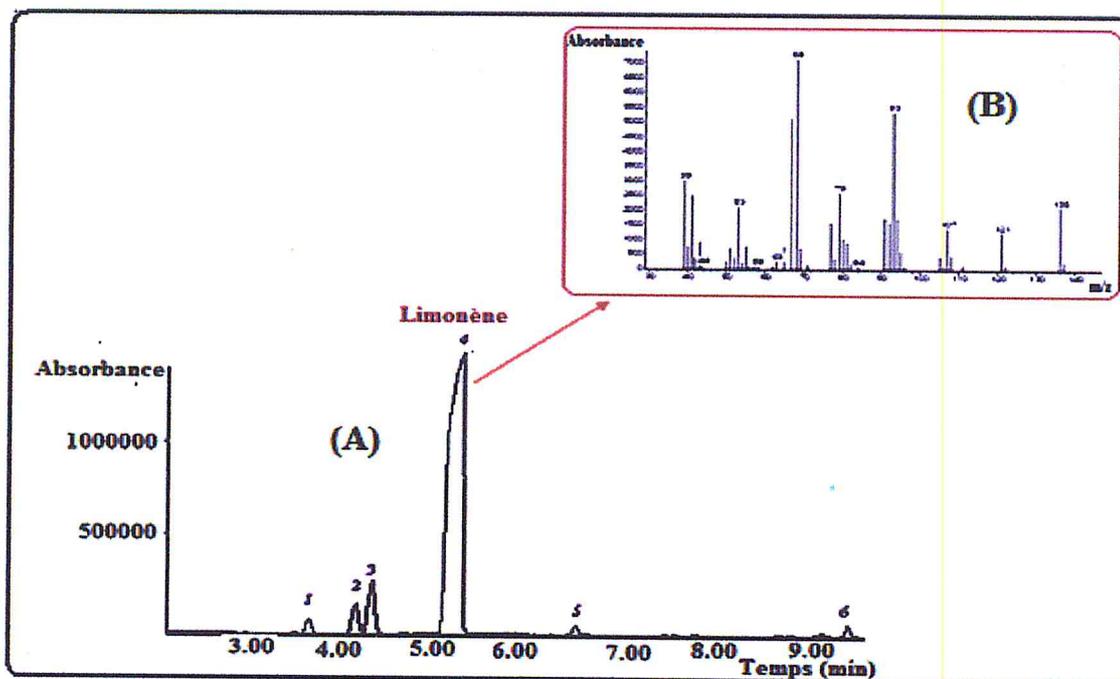


Figure II.5: (A) Chromatogramme d'huile essentielle de l'orange, (B) Spectre de masse du limonène

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

N° de pic	Nom	Temps de rétention (min)	Masse molaire	%
1	Bicyclo(3.1.0)hex-2,ene,2-methyl-5	3.448	136.13	0.301
2	Alpha-pinène	3.584	136.13	0.963
3	3-heptane, 6-methyl	4.004	128.12	0.699
4	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)	4.933	134.11	8.532
5	B-myrcène	4.276	136.13	1.521
6	<u>R(+)-limonène</u>	5.125	136.13	0.58
7	Gamma.terpinène	5.737	136.13	6.583
8	Linalool	6.565	154.14	4.804
9	3-cyclohexene-1-ol,4-methyl-1..	8.933	154.14	0.505
10	Carvacrol methyl ether	11.007	164.12	1.040
11	Thymol	12.797	150.10	2.916
12	Carvacrol	13.556	150.10	62.30
13	1H-cycloprop(e) azulene	17.794	204.19	0.662
14	Caryophyllène	18.078	204.19	0.830
15	1H-cycloprop	18.837	204.19	0.859
16	1H	20.945	204.19	0.587
17	Delta-cadinene	21.885	204.19	0.224
18	Iso spathulenol	23.744	220.18	0.617
19	Cyclooctene, 3-(1-methylethenyl)-	23.902	150.14	0.227

Tableau II.3 : Composition chimique de l'huile essentielle de carvi

N° de pic	Nom	Temps de rétention (min)	Masse molaire	%
1	Benzène-1-méthyl-3-(1-méthyléthyl)	134.11	4.944	0.104
2	<u>limonene/Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl).</u>	136.13	5.137	<u>0.523</u>
3	Linalool L	154.14	6.565	4.972
4	Bicyclo [3, 1, 1] hept-3-en-2-ol, 4, 6, 6- triméthyl- [1S-(1 α , 2 β , 5 α)]	152.12	7.188	0.106
5	Bicyclo [2, 2, 1] hept-2-one,1,7, 7-triméthyl-, (15)	152.12	7.743	0.166
6	Trans-3-méthylpent-3-ene-5-ol	100.09	8.933	0.100
7	Dihydrocarvone	152.12	9.228	2.021
8	Trans-(+)-carveol	152.12	10.304	0.589
9	2cyclohexen-1-one-2methyl-5-(1-méthyléthyl)	150.12	11.120	41.53
10	1,2-Diméthylcyclopropène	68.06	11.823	0.188
11	1-phenyl-1-butanol	150.10	12.219	0.111
12	Trans-Anethol	148.09	12.344	0.177
13	Phenol, 2-methyl-5-(1-méthyléthyl)	150.10	13.081	0.325
14	Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)	164.08	14.440	1.501
15	2-cyclohexen-1-ol,2-methyl-5-(1-methylethenyl)-propanoate	208.15	17.500	0.186
16	α -Fenchene/Bicyclo [2, 2,1] heptanes-7,7-dimethyl-2-methylene	136.13	18.611	0.156
17	3-hexyn-2-Ol	98.07	25.308	4.069
18	Acide tétradécanoïque	228.21	31.087	2.980
19	Acide hexadécanoïque	256.24	40.039	0.735
20	Phytol/Hexadécen-1-ol,3,7,11,15-tétraméthyl	296.31	44.0198	14.90
21	Octadécane,1-chloro	288.26	51.711	1.163

Tableau II.4 : Composition chimique de l'huile essentielle de tetraclinis articulata

N° de pic	Nom	Temps de rétention (min)	Masse molaire	%
1	Iso-valericacid	2.391	102	0.936
2	Alpha pinène	3.592	136.13	1.894
3	Hexanoic acid(CAS)	4	116	1.994
4	<u>limonène</u>	5.167	136.13	<u>0.077</u>
5	Trans-linalool oxide	6.051	170	0.757
6	1-methyl bicyclo(2,2,1)heptan-exo-2-ol	6.38	126	0.551
7	Linalool	6.697	154	1.996
8	2, 3,3 -triméthyl-3-cyclopentene acetaldehyde	7.422	152	2.824
9	Iso pinocarveol	8.114	152	8.854
10	Bicyclo (3, 1,1)hept-3-ene-2-ol-4,6,6-triméthyl-[1S (1 α ,2 β ,5 α)]	8.272	152	6.617

11	Cyclo octa-1.4-dien-3-one	8.623	126	3.015
12	P.mentha-1.5-dien-8-ol	8.861	152	5.39
13	Bornéol	9.043	154	1.094
14	1, 1,3-trimethyl-benzylalcohol	9.224	150	2.358
15	Benzene methanol- α,α -4-triméthyl-(CAS)	9.394	150	2.312
16	(+)- α -terpineol(p-menth-1-en-8-ol)	9.825	154	3.429
17	Bicyclo(3,1,1)hept-3-en-2-one-4,6,6-triméthyl	10.221	150	6.406
18	2-cyclohexen-1-ol-2-méthyle-5-(1-méthylethenyl)-trans	10.879	152	3.072
19	β -citronellol	11.332	156	1.460
20	linalyl acétate	12.510	196	0.220
21	7-oxabicyclo(4,1,0)heptane,1-méthyl-4-(1-méthylethenyl)	13.791	152	0.811
22	2-undecanone(CAS)	14.119	170	1.747
23	1-p-menthen-8-yl acetate	17.009	196	2.652
24	Cyclo hexane, 1-ethenyl-1-méthyl-2,4-bis (1-méthylethenyl)-1S-(1 α , 2, β , 4...)	19.695	204	0.753
25	Trans-caryophyllène	21.202	204	0.864
26	Naphtalene, 1, 2, 3, 4,4a, 5, 6,8a-octahydro-7-méthyl-4-méthylene-1-(1-méthylethyl)	24.114	204	1.097
27	β -Selinene	24.601	204	0.674
28	(+)-Epi-bicyclo Sesquiphellandrene	27.828	204	0.801
29	Naphtalene, 1, 2,4a, 5, 6, 8a-hexahydro-4, 7-diméthyl-1-(1-méthylethyl)-(1 α -4...)	25.429	204	0.700
30	5-méthyl-2-ethenyl cyclohexane carboxylic acid	25.803	168	0.928
31	Naphtalene, 1, 2, 3, 4,4a, 5, 6,8a-hexahydro-7-méthyl-4-méthylene-1-(1-méthylethyl)	26.041	204	0.996
32	1S, CIS-calamenene			
33	Delta-cardiene	26.267	202	2.347
34	1, 6,10-dodecatriene-7, 11,-diméthyl-3-méthylene, (Z)	26.573	204	3.236
35	α -calacorene	27.027	204	1.070
36	cyclohexane methanol, 4-ethenyl- α,α -4-triméthyl-3-(1-méthyl ethenyl)	27.23	200	0.846
37	cyclohexane-2-propenyl-CAS)	27.604	222	2.378
38	caryophellene.oxide	27.933	124	1.251
39	cedrol	29.316	220	5.381
40	12-oxa bicyclo(9,10)dodeca-3,7-diene,1,5,5	30.324	222	0.663
41	Cadina-1,4-diene	30.630	220	1.568
42	β -Eudesnol	30.911	204	4.872
43	2-Naphtalene methanol,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro- α,α ,4a,8-tetra	32.840	222	1.119
		33.112	222	1.403

Dans ce travail, on s'est intéressé à la composition chimique de ces huiles essentielles pour avoir une idée sur le taux de limonène de ces matrices. Ce dernier constituera une valeur de référence pour les déterminations par spectrométrie IRTF.

Comme on peut bien le noter, le taux de limonène de l'HE d'orange est de 79%. On a déduit que l'HE de citron est également très riche en limonène. Par contre, les HE de carvi, de thym et de *tétracclinis articulata* sont pauvres en limonène en présentant des taux très faible (<1%).

Chapitre III

**Dosage de la fraction
monoterpénique
monocyclique de différents
extraits aromatiques et
médicinaux par
spectrométrie IRTF**

Cette partie est destinée au dosage quantitatif d'un monoterpène monocyclique, le limonène, des huiles essentielles d'oranges, de citron, de thym, et de tétraclinis et de l'extrait de carvi par spectrométrie IRTF. Il ya lieu de distinguer entre deux cas d'études, le cas des HE riches en limonène et par conséquent ce dernier peut représenter sa classe (monoterpènes monocycliques) et le cas des HE pauvres en limonène où il ne peut pas représenter sa classe de produits chimiques.

III.1 Instrumentation et réactif

Un spectromètre Infrarouge à transformé de Fourier de marque (JASCO) modèle IRTF - 4100 a été utilisé pour effectuer des mesures dans l'intervalle de nombre d'ondes 4000 - 400 cm^{-1} . Le système est équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutré (DSTG) à température stabilisée, d'une séparatrice de radiation en KBr, d'une fonte type global et d'un système de processus digital (SPD). Les spectres ont été obtenus à une résolution nominale de 4 cm^{-1} et en accumulant 15 balayages par spectre.

Le travail a été réalisé avec un système à écoulement bloqué en modifiant au niveau de notre laboratoire une cellule conventionnelle en une cellule de flux. L'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au nettoyage et au remplissage des cellules conventionnelles, de minimiser la consommation des solvants organiques et le temps d'analyse (15-60 s). Dans le système à écoulement bloqué, on remplit la cellule en utilisant une pompe péristaltique, on stoppe momentanément le flux, on obtient le spectre et on rétablit le flux pour laver la cellule avec le solvant ou la remplir avec une autre solution.

Le montage de la figure III.1 a été utilisé pour effectuer les mesures dans l'infrarouge moyen, en employant des fenêtres de fluorure de calcium (CaF_2) et une entretoise de Téflon de 0.5 mm d'épaisseur. Les tubes de connections sont en téflon de diamètre intérieur de 0.8 mm et le chargement est réalisé en utilisant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm et en fixant un débit de 1.5 ml / mn⁻¹ [53].

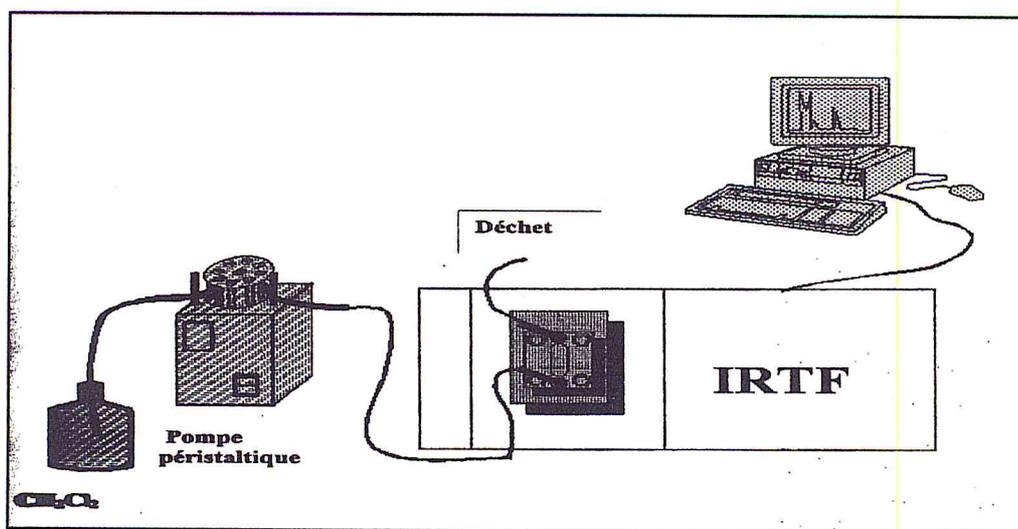


Figure III.1: Montage de flux utilisé pour les différentes analyses

Tous les réactifs utilisés dans cette étude sont de grade analytique.

III.2 Préparation des extraits

a) Préparation des HE

La préparation des HE est déjà décrite au chapitre précédent.

b) Préparation de l'extrait du carvi par solvant

L'extrait est obtenu par le stockage de 210 g de poudre du carvi dans 350 ml de dichlorométhane (CH_2Cl_2) pendant 5 jours, le miscella extrait-solvant est filtré sur du papier filtre afin d'éliminer toutes les poussières et les particules dues à la dégradation de la matière végétale. Suivie par l'évaporation à sec du solvant, le rendement global de l'extraction est de $R = 9,69 \%$.

La procédure générale de préparation de l'extrait par solvant est résumée dans l'organigramme montré ci-dessous.

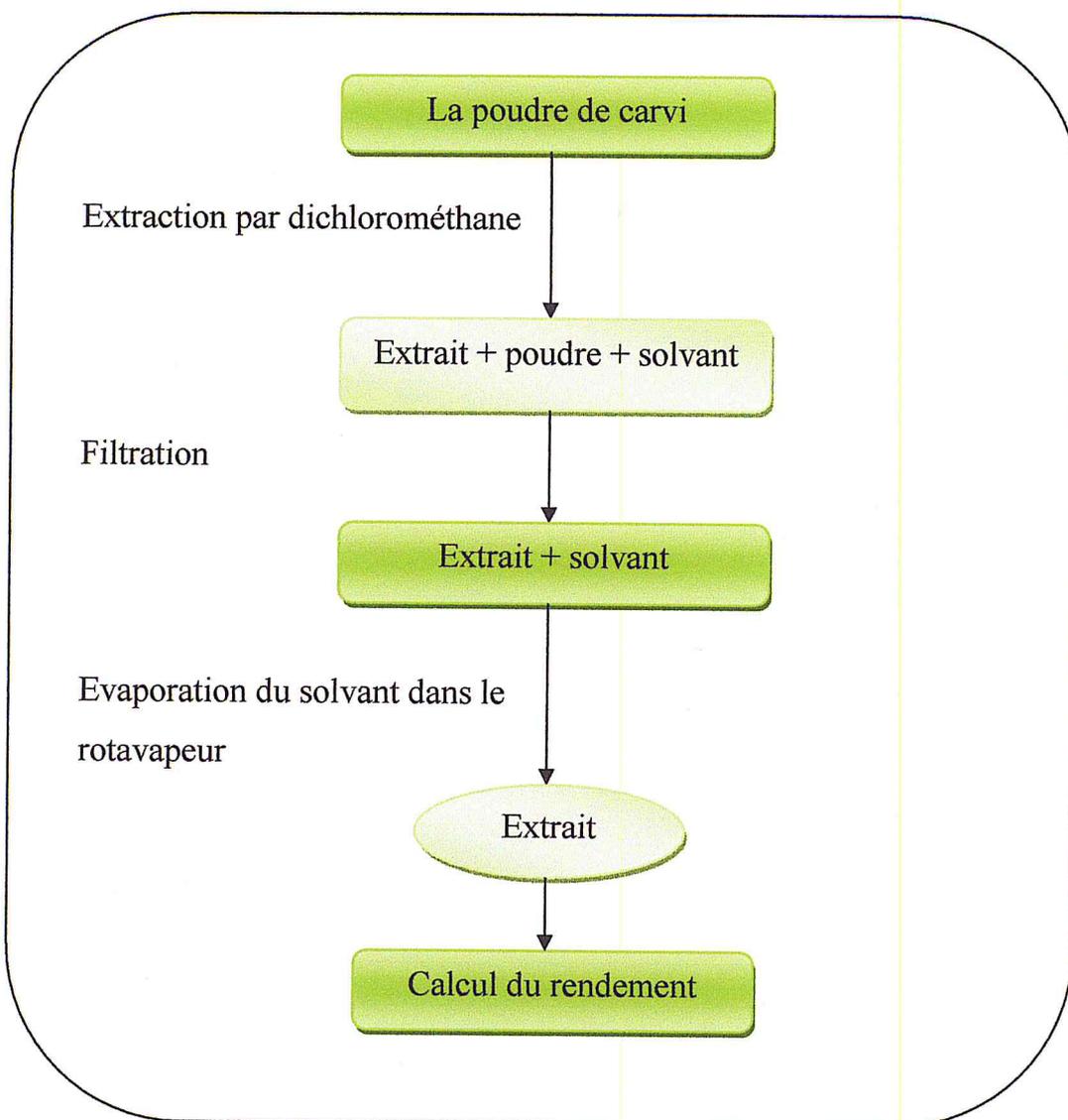


Figure III.2 : Préparation de l'extrait à partir de la matière végétale

a) Fractionnement de l'extrait du carvi par chromatographie sur colonne(CC) et obtention de la fraction riche en limonène

La chromatographie sur colonne est une chromatographie d'adsorption. Cette étape permet une séparation des classes de produits chimiques selon leur polarité.

Environ 3 g d'extrait est déposé sur une colonne de gel de silice, préparée dans de l'hexane (figure III.3). L'éluion est réalisée par un gradient de polarité du système Hexane-Acétate d'éthyle en commençant par la composition d'hexane 100 % jusqu'à 100 % d'AcOEt.

Nous avons procédé à un fractionnement en tenant compte de la couleur de la fraction, c'est ainsi que 48 fractions de 20 ml ont été récupérées.

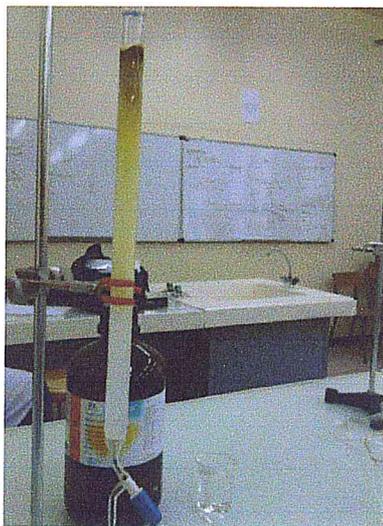


Figure III.3 : Montage de chromatographie sur colonne (CC)

L'analyse qualitative de toutes les fractions sera réalisée par spectrométrie IRTF afin de détecter les fractions contenant le limonène.

L'objectif de cette manipulation est de préconcentrer le limonène présent dans l'extrait de carvi pour sa postérieure analyse quantitative par spectrométrie IRTF.

III.3 Résultat et discussion

Les spectres IRTF sont enregistrés par rapport à un background stabilisé préalablement dans les mêmes conditions instrumentales avec une cellule remplie de solvant pur utilisé pour la préparation des solutions étalons (CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène). Pour traiter les spectres, on a utilisé un macro qui donne les valeurs d'absorbance à la bande sélectionnée corrigées avec une ligne de base adéquate et exprimées en termes de hauteur du pic de toute la série des spectres obtenus lors des mesures.

III.3.1 Détermination directe de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE d'orange et de citron

Le limonène constitue un produit majoritaire de l'HE d'orange et de citron avec des taux respectivement de 79% (CG/SM) et 70% [54]. Ces taux qualitatifs représentent des valeurs de référence pour démarrer les analyses par spectrométrie IRTF.

L'objectif principal de cette partie est de déterminer quantitativement le taux de la fraction monoterpénique monocyclique (analysée globalement sous forme de limonène) des huiles essentielles d'orange et de citron et ce, sans traitement préalable des échantillons. Lors de cette étude, aussi bien les bandes communes ($>1500\text{cm}^{-1}$) que les bandes spécifiques ($<1500\text{cm}^{-1}$) aux produits vont être étudiées.

III.3.1.1 Détermination directe de la fraction monoterpénique monocyclique (analysée globalement sous forme de limonène) de l'HE d'orange

III.3.1.1.a Spectres infrarouges de limonène et de l'HE d'orange

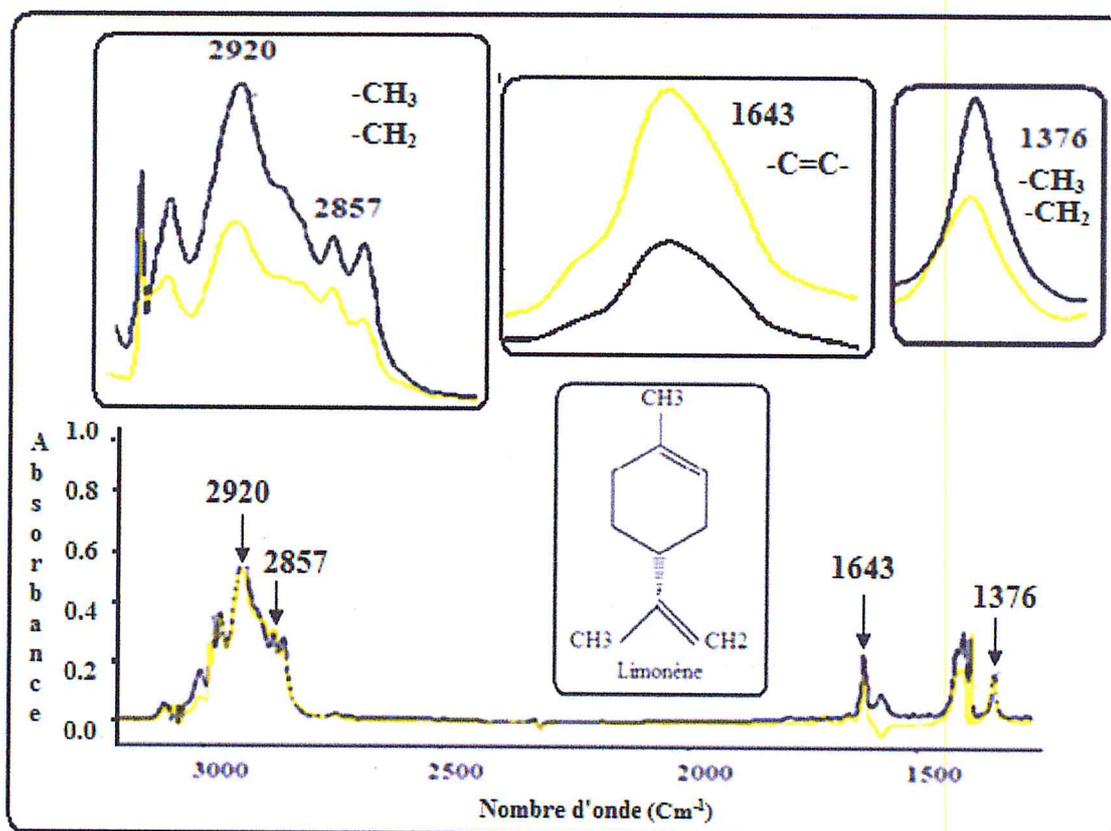


Figure III.4 : Spectres IRTF de limonène (7.5 mg/ml, en noir) et de l'huile de l'orange (9.49 mg/ml, en jaune) dans CH_2Cl_2

Conditions expérimentales : chemin optique 0.5 mm ; résolution nominale 4 cm^{-1} ; nombre de balayage 15 ; vitesse de l'interféromètre 0.6329 cm/s ; Background de la cellule remplie de CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène.

Les spectres infrarouges de la solution de limonène (7.5 mg/ml) et de la solution de l'HE d'orange (9.5 mg/ml) préparées dans CH_2Cl_2 sont montrés sur la figure III.4.

L'analyse de ces deux spectres montre des bandes communes au limonène et à l'HE à 2920 , 2857 , 1643 et 1376 cm^{-1} . Les bandes à 2920 cm^{-1} et 2857 cm^{-1} sont liées aux vibrations des groupes CH_2 et CH_3 , et à 1643 cm^{-1} correspond aux vibrations d'allongement des liaisons $\text{C}=\text{C}$. La bande qui apparaît à 1376 cm^{-1} est caractéristique à la déformation des groupes CH_2 et CH_3 .

III.3.1.1.b Caractéristiques analytiques de limonène obtenu directement dans CH₂Cl₂/amylène

Les spectres de limonène à des concentrations allant de 0.75 à 10 mg/ml sont représentés dans la figure III.5.

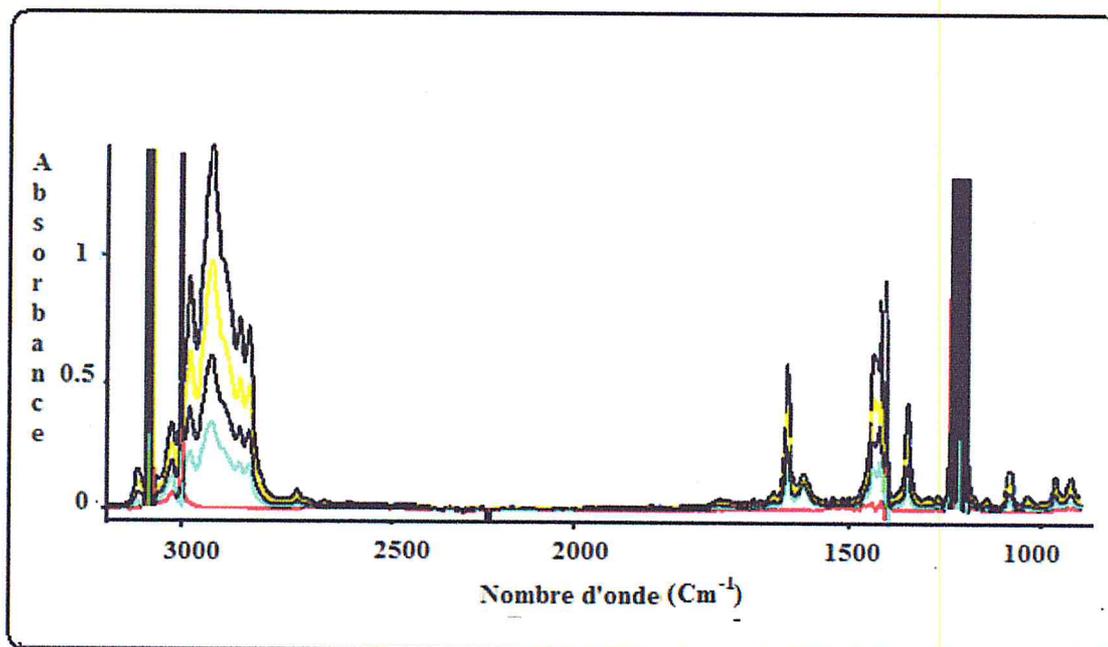


Figure III.5 : Spectres d'absorbance d'une série d'étalons de limonène préparé dans CH₂Cl₂ pour un domaine de concentration compris entre 0.75 et 10 mg/ml

Les caractéristiques analytiques de limonène préparé directement dans CH₂Cl₂, aux différentes bandes d'absorbances sélectionnées, sont regroupées dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Caractéristiques analytiques de limonène dans CH₂Cl₂ aux différentes bandes d'absorbance

Mode de mesure Max (Ligne de base)	Paramètres			
	Droite de calibration	Coefficient de corrélation (R)	Limite de détection (µg/ml) L.D	D.S.R (%)
2920cm ⁻¹ 2954-2899 cm ⁻¹	0.052015C-0.002056	0.9998	71	4.1
2857cm ⁻¹ 2866-2846 cm ⁻¹	0.013675C-0.00020	0.9999	32	4.3
1643 cm ⁻¹ 1308-1828 cm ⁻¹	0.046182C-0.003900	0.9998	110	2.7
1376 cm ⁻¹ 1664-1620 cm ⁻¹	0.032128C+0.000047	0.9998	80	0.35
Domaine de concentration (mg/ml)	0.75-10			

C : Concentration en mg/ml.

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

L.D : limite de détection en µg/ml obtenu par un niveau de confiance de 99.6 % (K=3).

Conditions expérimentales : chemin optique 0.5 mm ; résolution nominale 4 cm⁻¹ ; nombre de balayage 15 ; vitesse de l'interféromètre 0.6329 cm/s ; Background de la cellule remplie de CH₂Cl₂ stabilisé avec l'amylène.

Ces résultats montrent une très bonne linéarité avec une très bonne précision et des limites de détection de l'ordre de 80µg/ml en considérant la bande spécifique à 1376 Cm⁻¹.

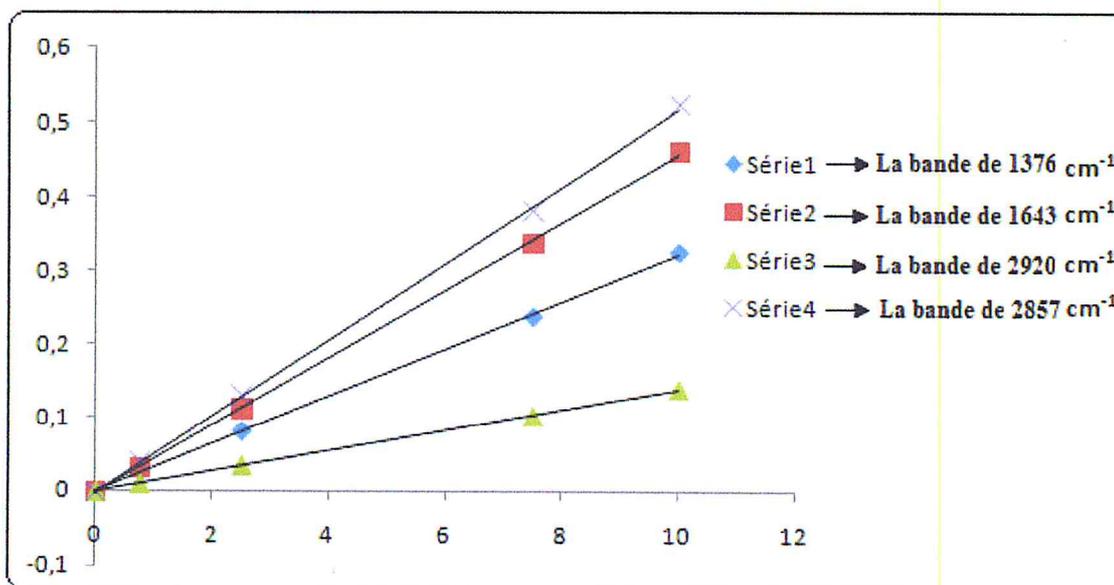


Figure III.6 : Les courbes d'étalonnage de différentes bandes d'absorbances.

III.3.1.1.c Teneur de la fraction monoterpénique monocyclique dans l'HE d'orange

47.46 mg de l'HE d'orange sont dilués dans 5ml de CH_2CL_2 ce qui donne une solution d'HE de concentration de 9.49 mg/ml.

Le contenu de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE de l'orange est obtenu en extrapolant les valeurs d'absorbance dans les droites de calibration établies pour des étalons de limonènes aux différentes bandes d'absorbance, les résultats sont résumés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 Contenu de limonène de l'HE de l'orange en considérant différents modes de mesure

	Mode de mesure : max (cm ⁻¹)			
	(Ligne de base (cm ⁻¹))			
	2920 (2954-2899)	2857 (2866-2846)	1643 (1308-1828)	1376 (1664-1620)
Taux de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE d'oranges(%)	114	271	38.7	51.6

Comme on peut le constater les bandes qui apparaissent à 2920 et 2857 cm⁻¹ ne peuvent pas être utilisées pour cette détermination. Ce résultat est logique car presque tous les composés organiques ont des absorptions dans cette région.

Le taux trouvé en utilisant la bande spécifique à 1376 cm⁻¹ est le plus proche de celui obtenu par CG/SM (79%). Il est important de noter que l'HE d'orange utilisée pour les analyses par CG/SM et par spectrométrie IRTF n'est pas la même et c'est peut-être une des raisons qui fait que les taux obtenus par les deux techniques soient si importants.

III.3.1.2 Détermination directe de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE de citron

III.3.1.2.a Spectres infrarouges de limonène et de l'HE de citron

La figure III.7 montre les spectres d'absorption de limonène (10 mg/ml) et de l'HE de citron (5.96mg/ml) préparé dans le CH₂Cl₂, le choix a été porté sur les bandes à 1376, 2857, 2920 cm⁻¹ du fait qu'elles soient communes au limonène et à l'HE de citron.

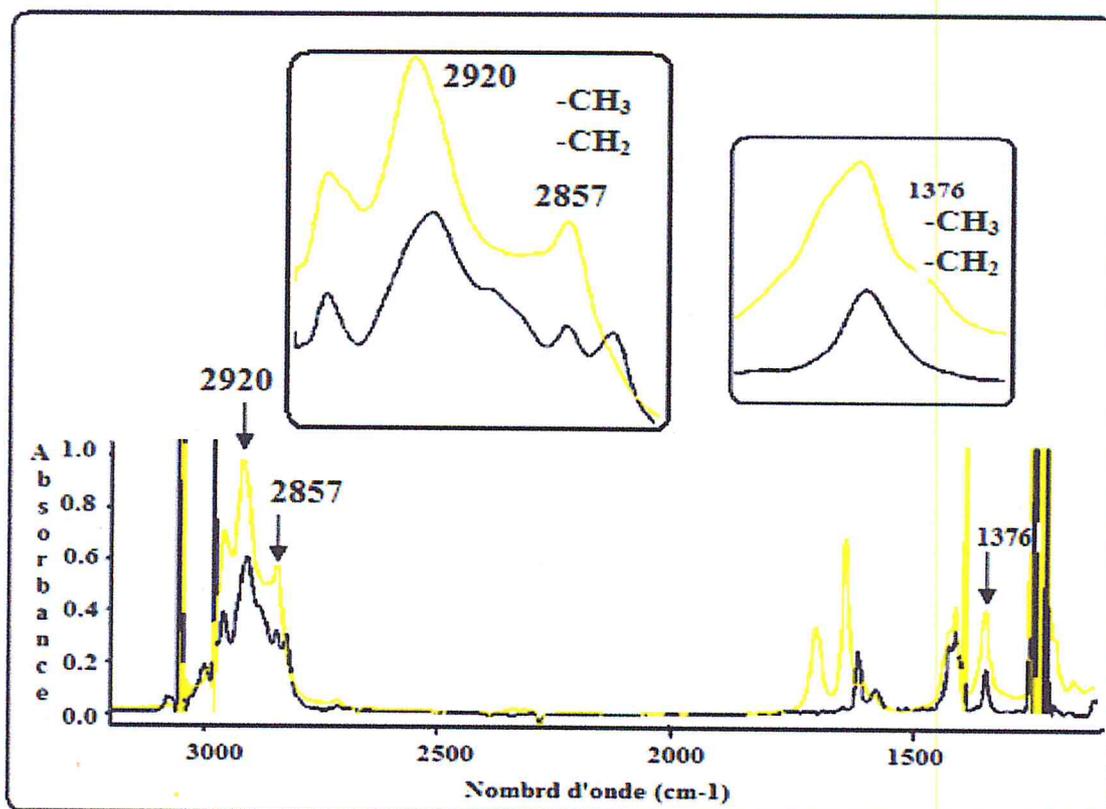


Figure III.7: Spectres IRTF de limonène (10 mg/ml, en noir) et de l'HE de citron (5.96mg/ml, en jaune) dans CH_2Cl_2

III.3.1.2.b Teneur de la fraction monoterpénique de l'HE de citron

La dilution de 29,8 mg de l'HE de citron dans 5 ml de CH_2Cl_2 donne une solution d'HE de concentration de 5,96 mg/ml.

En extrapolant les valeurs d'absorbance, mesurées aux bandes adéquates, de l'HE de citron dans les droites de calibration établies pour le limonène, on détermine le taux de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE de citron qui est indiqué dans le tableau III.3.



Tableau III.3 Taux de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE de citron aux différentes bandes de mesure

	Mode de mesure : max (cm ⁻¹) (ligne de base (cm ⁻¹))		
	2920 (2749-3201)	2857 (2749-3180)	1376 (1182-1689)
Taux de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE de citron (%)	119	277	67.3

De même que pour l'HE de l'orange c'est la bande spécifique à 1376 cm⁻¹ qui offre le meilleur taux de la fraction monoterpénique monocyclique de l'HE de citron. La valeur est en parfaite concordance avec celle trouvée dans la littérature est qui est de 70 %. Il a été remarqué un déplacement léger des pics de l'HE mais ceci n'affecte pas les mesures.

III.3.2 Détermination de limonène de l'HE de thym et de tétraclinis

En considérant des HE riches en limonène (HE d'orange et HE de citron), la détermination du taux de ce dernier, sans traitement préalable des HE, par spectrométrie IR a été réalisée avec succès en utilisant la bande spécifique à 1376 cm⁻¹. On a voulu, à travers cette étude, tester la spécificité de la bande en considérant des HE pauvres en limonène comme c'est le cas des HE de thym et de tétraclinis dont le taux est respectivement de 0.58 % et 0.08 % (taux déterminé par CG/SM dans la chapitre II).

Les spectres IR de la figure III.8 de limonène (10 mg / ml) de l'HE de thym (129 mg / ml) et de l'HE de tétraclinis (1505 mg / ml) illustrent la complexité des deux échantillons considérés et d'où l'impossibilité de la détermination directe.

Dans ce cas le passage par un procédé de séparation ou de préconcentration est indispensable.

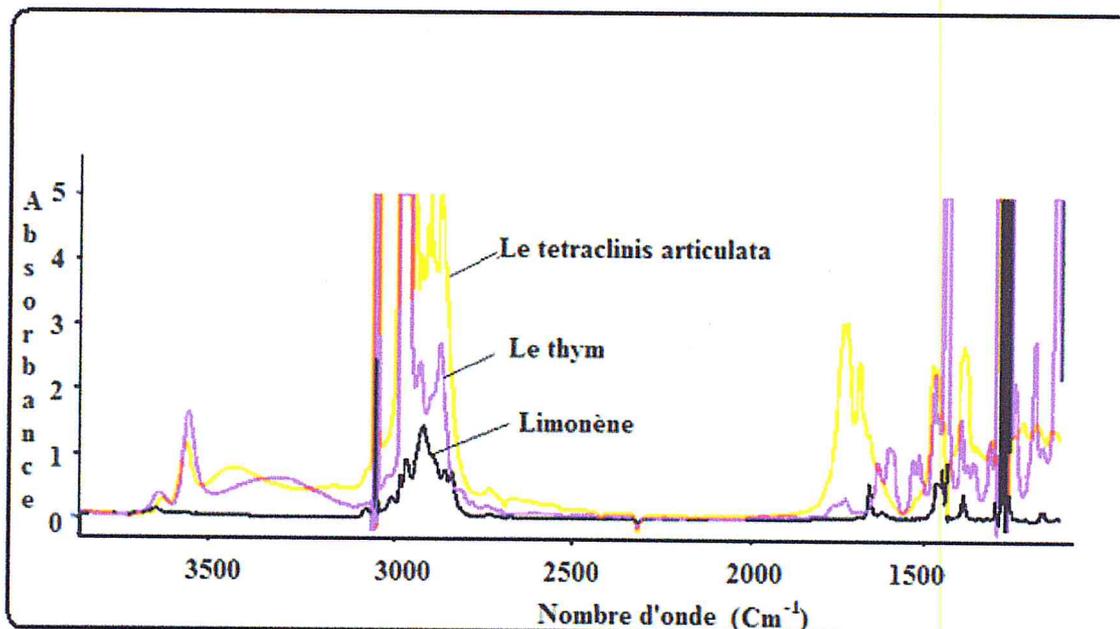


Figure III.8 : Spectres de limonène (10 mg/ml), l'HE de thym (129 mg/ml) et de l'HE de tétraclinis (1505 mg/ml) dans CH₂Cl₂

III.3.3 Détermination de la teneur limonène de l'extrait de carvi

Le limonène est l'un des produits minoritaires de l'extrait de carvi dont le taux est <1 %, sa détermination directe par spectrométrie infrarouge est donc impossible.

Pour pouvoir déterminer le taux de limonène dans l'extrait de carvi, on a procédé à la préconcentration de limonène sur un support solide contenu dans une colonne ouverte.

3g d'extrait de carvi sont introduits au sommet de la colonne (en respectant le rapport d'1g d'échantillon à chromatographier pour 30g d'adsorbant). Le regroupement des six premières fractions, contenant le limonène a donné une masse de 37,6 mg ce qui représente un taux de 1,25 %.

III.3.3.1 Analyse qualitative des fractions concentrées en limonène

L'utilisation d'une phase adsorbante polaire comme la silice (SiO_2) favorise la rétention des composés polaires.

La séparation des produits de matrice complexe, à grande échelle de polarité, exige la réalisation d'un gradient d'élution. En effet, le solvant apolaire comme l'hexane possède un mauvais pouvoir éluant, mais entraîne les produits apolaires ; en revanche, le solvant polaire comme l'acétate d'éthyle possède un pouvoir éluant élevé, fortement adsorbé, déplace les solutés polaires les plus retenues.

Au cours de notre séparation, on a augmenté progressivement la polarité de l'éluant en faisant passer la composition de 100 % d'hexane à 100 % d'acétate d'éthyle. Au fur et à mesure de l'élution, 48 fractions de 20 ml chacune ont été récupérées. Les fractions obtenues ont été évaporées à sec puis pesées. L'analyse qualitative par spectrométrie IRTF nous a d'abord permis de détecter les fractions contenant le limonène (en suivant l'évolution de la bande à 1376 cm^{-1}) puis de même nature (en comparant les spectres de deux fractions consécutives) de regrouper les fractions chimiques (tableau III .4). Elle nous a permis aussi d'avoir plus d'information sur le processus rétention-élution des constituants de l'extrait de carvi. Les fractions récupérées ont été analysées en utilisant le montage de la figure (III.1).

Tableau III.4 : Regroupement des fractions chimiques de même nature

Fraction identique	Composition d'une phase éluante
1-6 7-11	90/10
12-15 16-18 19	80/20
20 21-23	70/30
24 25-26	60/40
27 28-31	50/50
32 33 34-37	40/60
38-43	30/70
44-48	20/80 10/90

Les figures (a, b, c, d, e) illustrent la variation de la teneur des plus importantes classes de produits chimiques de l'extrait de carvi en fonction de la composition de la phase éluante constituée d'un mélange d'Hexane et d'acétate d'éthyle.

La figure III.8.a montre la variation de la teneur des hydrocarbures aliphatiques dans l'extrait et ce, en utilisant la bande caractéristique des

vibrations d'allongement C-H aliphatiques. Les premières fractions éluées avec le solvant constitué d'un mélange Hexane / AcOEt (90 : 10, v/v) donnent la teneur maximale de cette fraction.

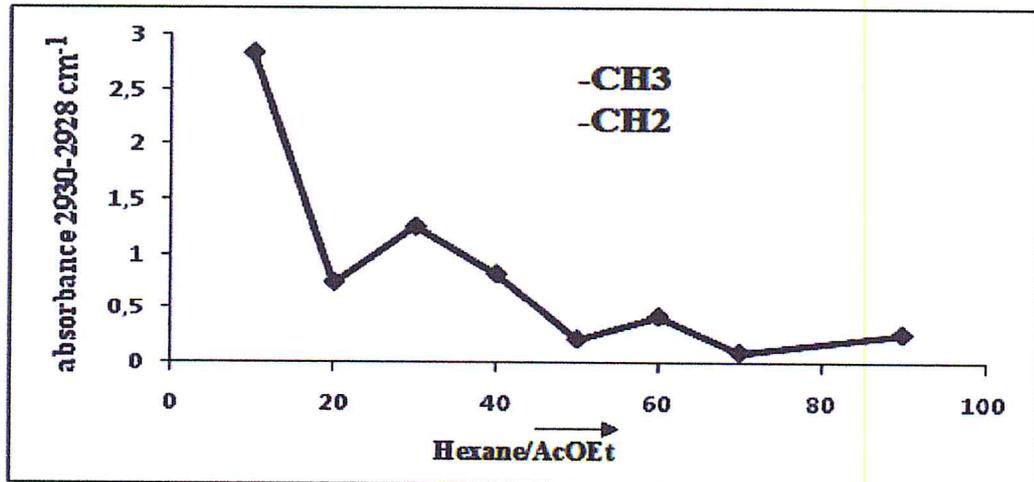


Figure III.8.a : Variation de la teneur des hydrocarbures aliphatiques dans l'extrait en fonction de la composition de la phase éluante

Les fractions contenant les composés carbonyles (figure III.8.b) peuvent être récupérées en utilisant un éluant de composition 70 / 30.

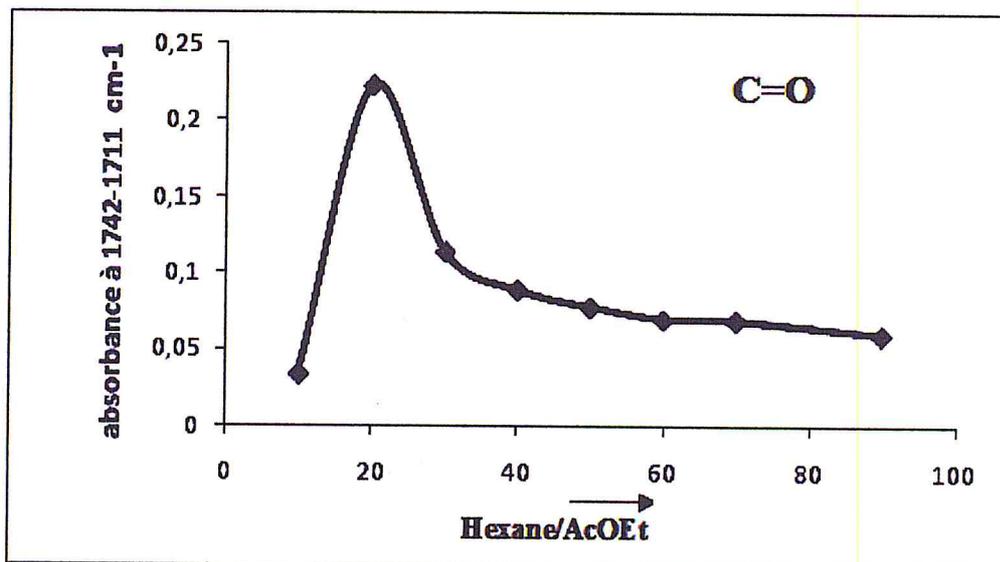


Figure III.8.b: Variation de la teneur des carbonyles dans l'extrait en fonction de la composition de la phase éluante

La bande correspondant aux vibrations C = C dans le noyau aromatique, qui apparait à 1606 cm^{-1} a permis le suivi d'éluion de cette classe de produits chimiques. La courbe de la figure III.8.c passe par des teneurs fortes correspondant à la composition de l'éluant allant de 40 à 70 en AcOEt.

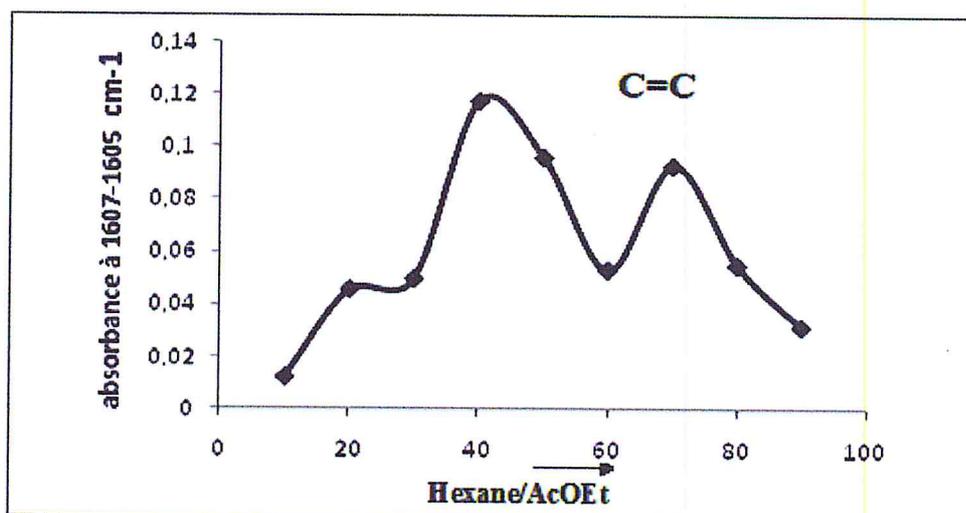


Figure III.8.c : Variation de la teneur des hydrocarbures aromatiques dans l'extrait en fonction de la composition de la phase éluante

Les alcools peuvent être récupérés dans les fractions polaires. La courbe grimpante (figure III.8.d) passe par la teneur maximale pour une composition de solvant de 30 / 70.

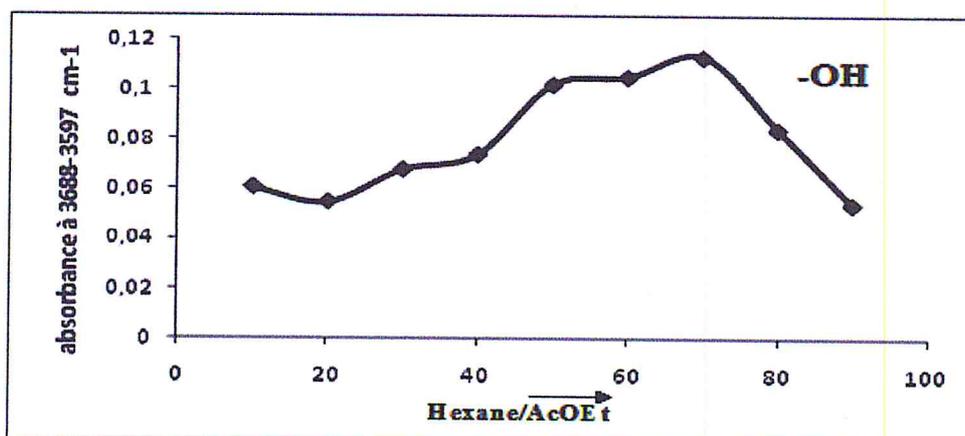


Figure III.8.d : Variation de la teneur des alcools dans l'extrait en fonction de la composition de la phase éluante

Pour repérer les fractions contenant le limonène nous avons utilisé la bande d'absorbance à 1376 cm^{-1} . Cette dernière a révélé la présence du limonène dans les six premières fractions obtenues avec le solvant de composition (90 : 10, v/v) (figure III.8.e). En rassemblant les six fractions, on obtient une fraction concentrée en limonène qui fera l'objet de la détermination quantitative par spectrométrie IRTF.

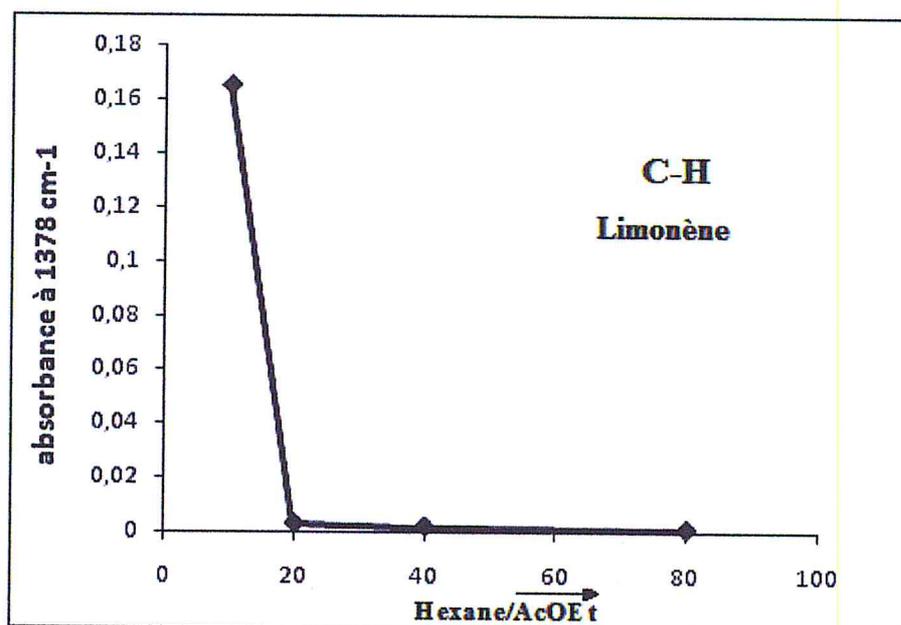


Figure III.8.e : Variation de la teneur du limonène dans l'extrait en fonction de la composition de la phase éluante

III.3.3.2 Détermination du taux de limonène de l'extrait de carvi

La masse de la fraction préconcentrée de 37,6 mg diluée dans 5 ml de CH_2Cl_2 donne une concentration de 7,52 mg/ml de la dite fraction.

La figure III.9 montre les spectres d'absorption de limonène (10 mg/ml) et de la fraction préconcentrée en limonène (7,52 mg/ml) préparée dans CH_2Cl_2 .

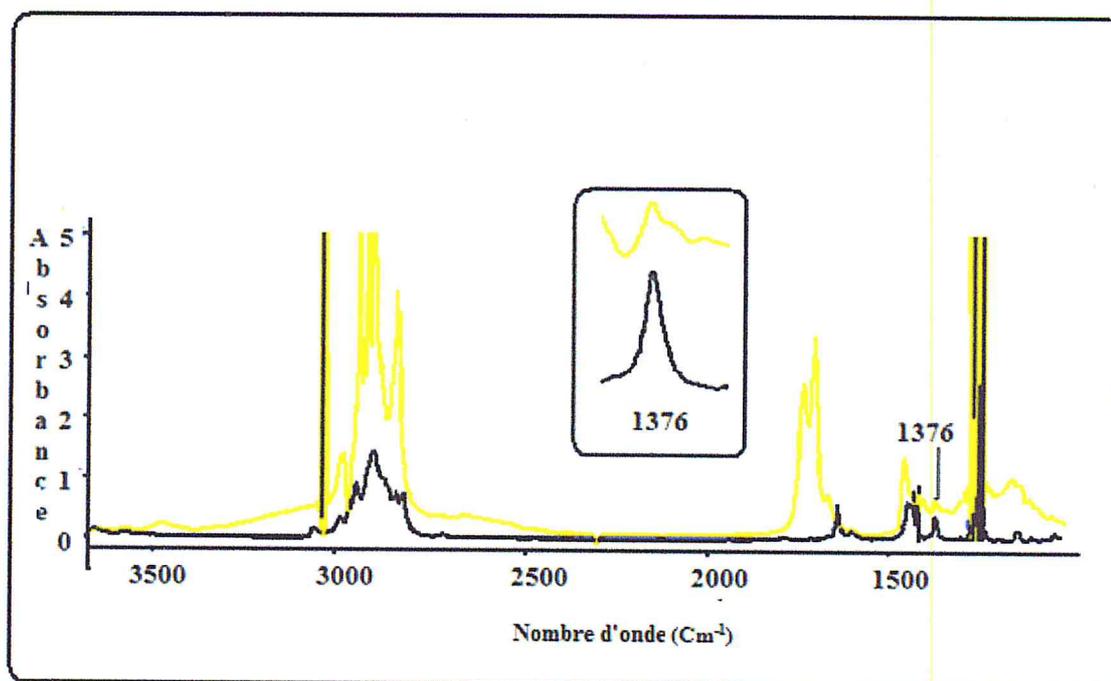
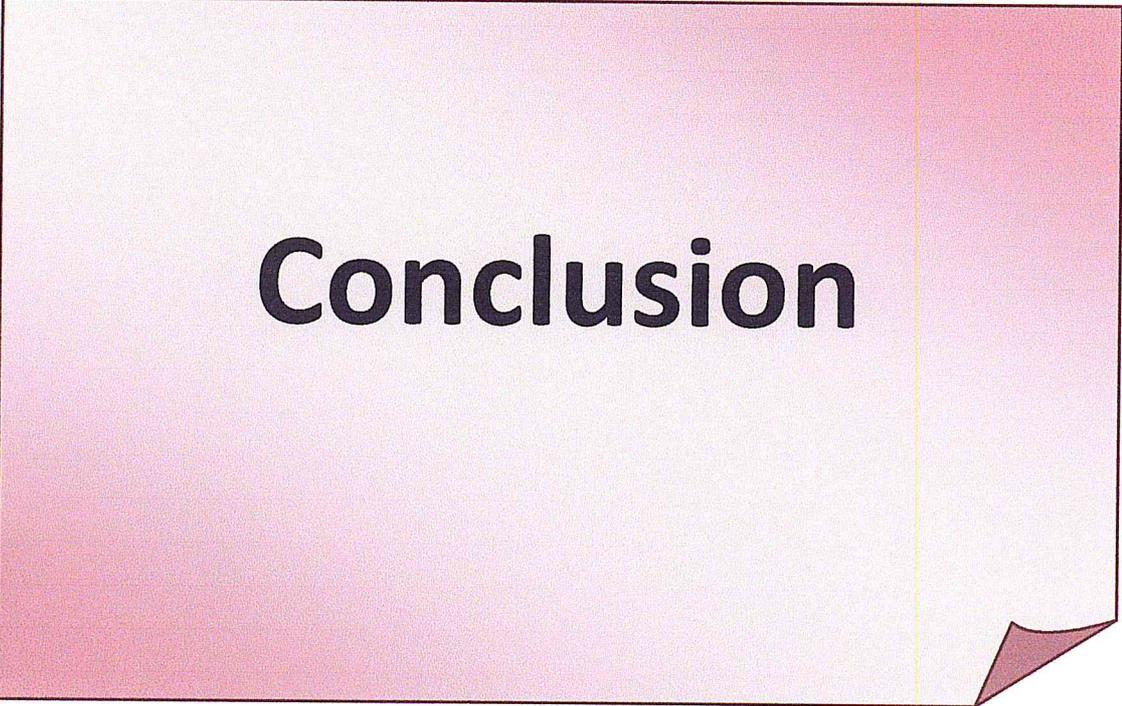


Figure III.9 : Spectres IRTF de limonène (10 mg/ml) et de la fraction préconcentrée en limonène (7,52 mg/ml) dans CH_2Cl_2

Cela semble évident que la bande d'absorbance à 1376 cm^{-1} est la plus adéquate pour la détermination. L'extrapolation de la valeur d'absorbance de la fraction préconcentrée de l'extrait de carvi dans la droite de calibration établie pour le limonène donne un taux de limonène de 79% dans la fraction et un taux de 0,98% dans l'extrait de carvi ce qui représente un coefficient de préconcentration de 80.

L'allure du spectre de la fraction préconcentrée montre la richesse de cette fraction en hydrocarbures aliphatiques, mais les bandes d'absorbance de cette fraction n'interfèrent pas avec la bande d'absorbance spécifique de limonène.

Le taux de limonène déterminé par cette méthode dans l'extrait de carvi est de 0,98 % ; cette valeur est proche de celle trouvée dans l'huile essentielle de carvi par CG-SM (0,53 %).



Conclusion

Conclusion générale

La mise au point de nouvelles méthodes d'analyse appropriées est indispensable et toujours nécessaire pour les chercheurs travaillant sur l'optimisation des critères de qualité des extraits aromatiques et médicinaux.

Dans ce travail nous proposons un outil d'analyse complémentaire et nous contribuons au développement des applications analytiques quantitatives de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier. Cette méthode analytique simple, rapide, reproductible et surtout disponible a été utilisée pour l'analyse quantitative d'un analyte présent avec un taux élevé (>5 %) dans des échantillons et avec un taux faible (< 1 %) dans d'autre.

L'extraction des HE par hydrodistillation à partir des zestes d'orange, de citron et des feuilles asséchées de *tétracelinis articulata* a donné des rendements respectivement de 0.12, 0.13 et 0.18 %. Le rendement de l'HE obtenue par entraînement à la vapeur des feuilles asséchées de thym est de 3,18 %. Le rendement de l'extrait de poudre de carvi a atteint les 9,69 %.

Le taux de limonène de l'HE d'orange est de 79 %, par contre, les HE de carvi, de thym et de *tétracelinis articulata* sont pauvres en limonène présentant des taux très faible (<1%). le taux de limonène trouvé sera pris comme valeur référence pour les différentes déterminations par spectrométrie IRTF.

Le limonène est le produit majoritaire des HE d'orange et de citron et de ce fait, il a été considéré comme étalon adéquat pour représenter la classe des produits monoterpéniques monocycliques pour leur dosage par spectrométrie IRTF.

En utilisant les valeurs d'absorbance de la bande spécifique à 1367 cm^{-1} , corrigées avec une ligne de base adéquate comprise entre 1664 et 1620 cm^{-1} , on a déterminé la teneur de la fraction monoterpénique, sous forme de limonène, des

HE d'orange et de citron à respectivement de 51,6 % et 67,3 %, et ce, sans traitement préalable des extraits.

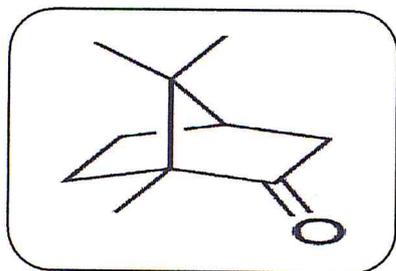
La détermination directe du taux de limonène dans les HE de thym, de tétraclinis et de carvi (taux <1%) par spectrométrie infrarouge, en utilisant la bande spécifique à 1376 cm^{-1} , s'est avérée impossible d'où le passage par un procédé de séparation ou de préconcentration s'impose.

La préconcentration du limonène de l'extrait de carvi a permis la détermination de cet analyte en utilisant la bande spécifique à 1376 cm^{-1} , le taux obtenu est de 0,98 %. Au cours de la séparation des fractions de l'extrait de carvi, sur un support solide contenu dans une colonne ouverte, on a réalisé une analyse qualitative des 48 fractions obtenues par spectrométrie IRTF.

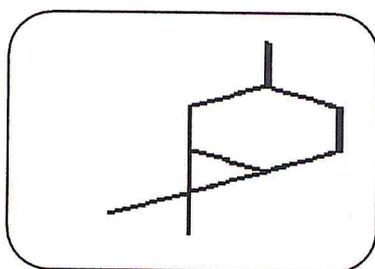
Enfin, nous récapitulons les différents résultats obtenus dans une conclusion générale.

Il nous semble intéressant d'étaler la méthode sur d'autres matrices en considérant un mélange de produits avec la perspective de coupler la spectrométrie infrarouge à la chromatographie liquide.

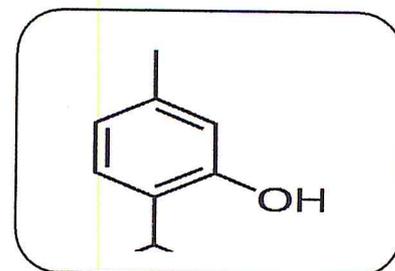
ANNEXE



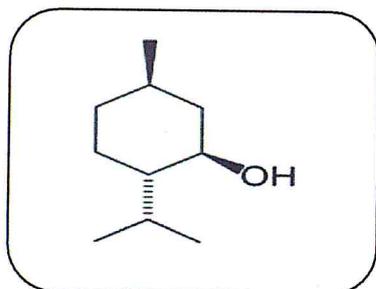
Camphre



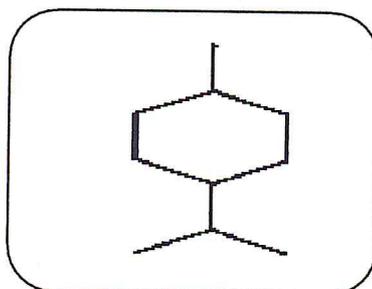
Carane



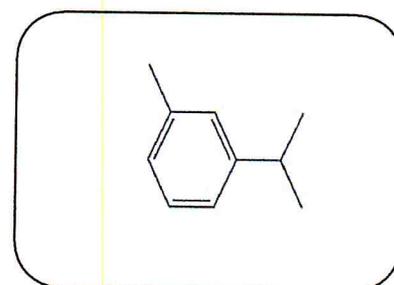
Thymol



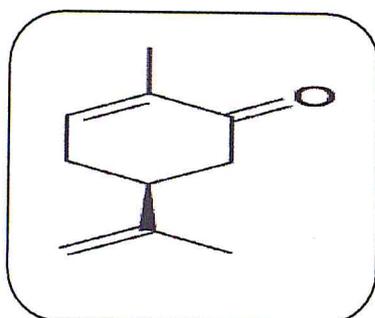
Menthol



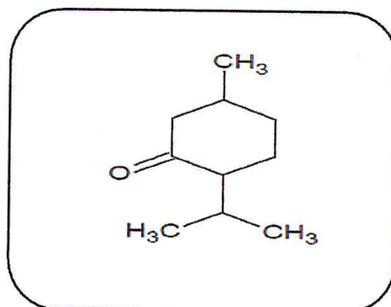
Menthane



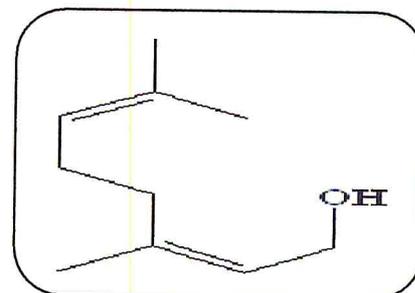
Cymene



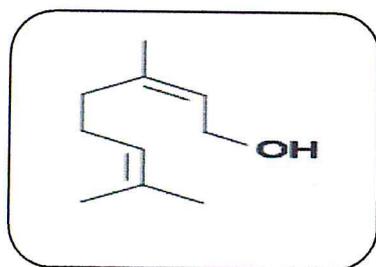
Carvone



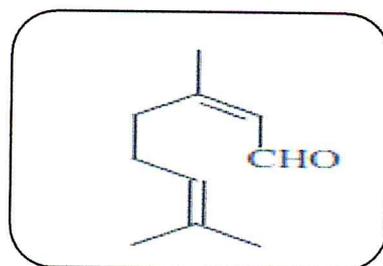
Menthone



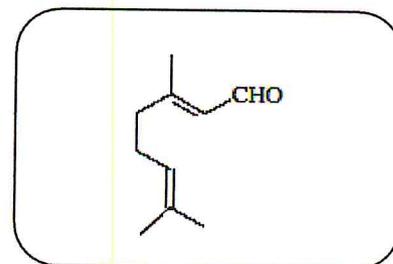
Geraniol



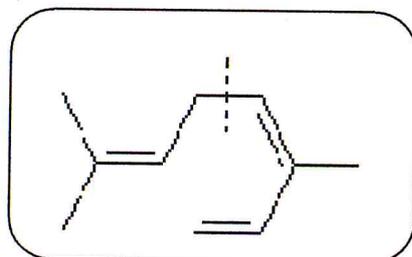
Nerol



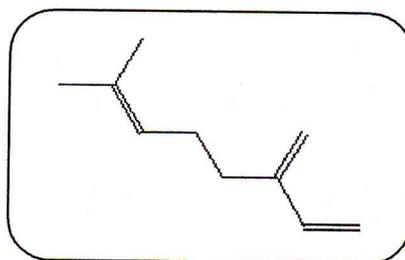
Geranial



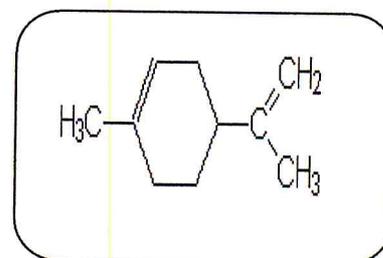
Neral



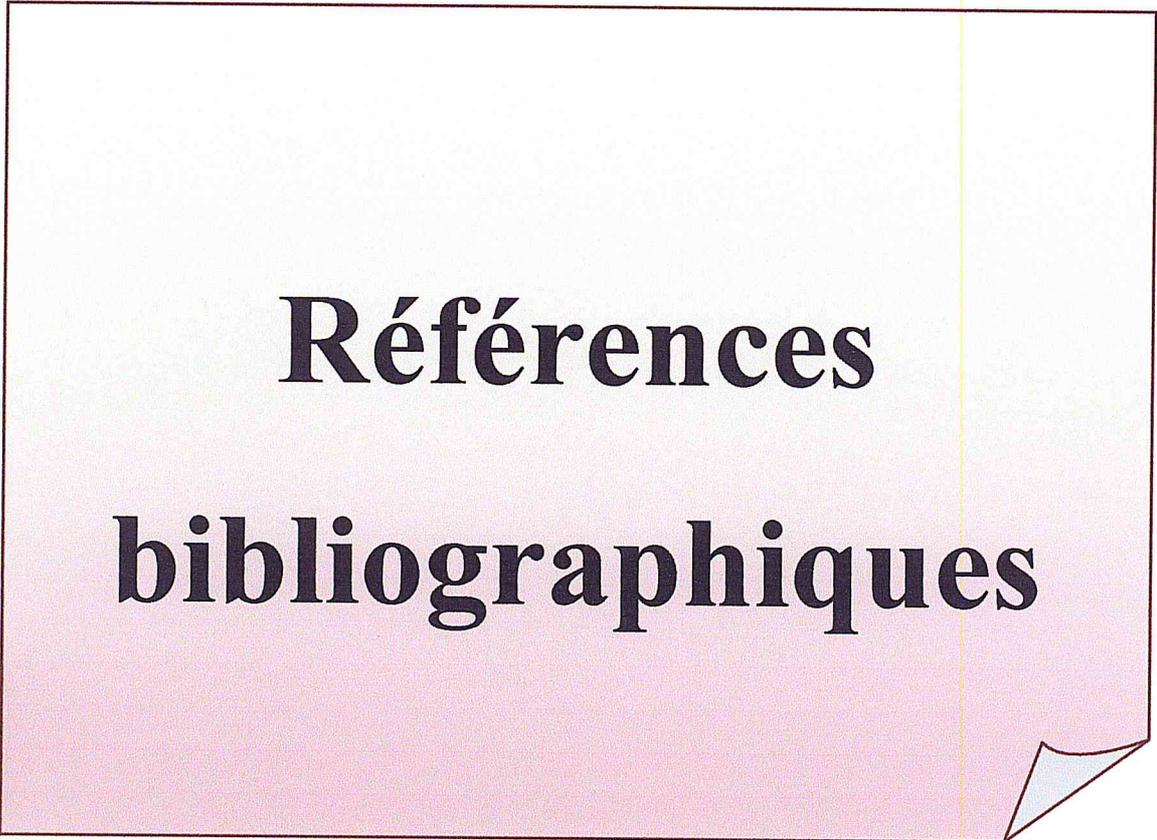
Ocimene



Myrcene



Limonene



**Références
bibliographiques**

- [1] D. Ouraini, A. Agoumi, M.I. Alaoui, K. Alaoui, Y. Cherraf, M.A. Alaoui, M.A. Belabbas, Activité antifongique de l'acide oleique des HE de *Thymus saturejoides* L et de *Mentha pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques, *Phytothérapie* (2007)
- [2] F. Naghibi, M. Mossadegh, M.S. Mohammadi, et A. Ghorbani, *Labiatae Family in folk Medicine in Iran : from Ethnobotany to Pharmacology*, 2005 et P Balbuka, *Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales de la médecine traditionnelle à la phytothérapie moderne* (2007)
- [3] J.L. Rios, M.C. Recio, *Medicinal plants and antimicrobial activity* (2005), Aug 22; 100(1-2):80-4
- [4] J. Costa, *37 les niouzes, Les Huiles essentielles dans l'Alimentaire* (2005)
- [5] E. Guenther, *The Essential Oils*, vol.1. Krieger Publishing (1948), Co., Florida. 427p
- [6] T. Yamaura, S. Tanaka and M. Tobana., *Light Dependent Formation of Glandular Trichomes and Monoterpenes in Thyme Seedlings* (1989), *Phytochemistry*, 28, 741-744
- [7] Rajeswara Rao, R. Bhaskaruni And P. Kakaraparathi, Sastry, *Variation in Yields and Quality of Geranium, under Varied Climatic and Fertility Conditions. J. Ess. Oil Res.*, (1990) ,2(2), 73-79
- [8] Hay Robert and K.M., G.Waterman Peter, *Volatile Oil Crops, Their Biology Biochemistry and Production* (1993), Longman Scientific & Technical, U.K. 185 p
- [9] Mme MALLEM tiba, *étude phytochimique de l'exsudat et des essentielles de l'espèce inula crithmoides*
- [10] O. Wallach, *Zur Kenntnis der Terpene und ätherischen Oele. – Justus Lieb. Ann. Chem* (1887), 238, 78-89
- [11] L. Ruzicka, *The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compound* (1953), Volume 9, Number 10, 357-367
- [12] J. Brunéton, *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales* (1993). 2^{ème} édition. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 915p
- [13] J. Alan Slusarenko, P. C. Croft Kevan and Jiittner Friedrich, *Volatile Products of Lipoxygenase Pathway Evolved from Phaseolus vulgaris (L.) Leaves Inoculated with Pseudomonas syringae pv phaseolicola. Plant Physiol* (1993), 101, 13-24

- [14] J. Brunéton, Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales (1993), 2^{ème} édition. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 915p
- [15] Hay Robert and K.M., G.Waterman Peter, Volatile Oil Crops, Their Biology Biochemistry and Production (1993), Longman Scientific & Technical, U.K. 185 p.
- [16] Kurt B.G. Torrsell, Natural Products Chemistry (1983), John Willy & Sons Limited. 401 p
- [17] F. Bakkali, Biological effects of essential oils. A review, Food Chem. Toxico (2007) Feb; 46(2):446-75
- [18] Padua de, L.S., Bunyaphatsara, N., Lemmens, R.H.M.J., Medicinal and Poisonous Plants 1. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands (1999), Plant Resources of South-East Asia, No. 12 (1)
- [19] J. Bruneton, Pharmacognosie : phytochimie-plantes médicinales 1999, pp 41-54
- [20] N.Singh, T.Luthra, R.S Sangwan , R.S.Thakur, Metabolism of monoterpenoids in aromatic plants. - *Curr. Res. Med. Aromat. Plants*, 1990, 11, 174-196
- [21] Alonso (W.R.), Croteau (R.) - Purification and characterization of the monoterpene cyclase γ -terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. - *Arch. Biochem. Biophys.*, (1991), 286, 511-517
- [22] D. Arigoni, D.E. Cane, J.H. Shim, R. Croteau, K. Wagschal, Monoterpene cyclization mechanisms and the use of natural abundance deuterium NMR-short cut or primrose path , *Phytochemistry* (1993), 32, 623-631
- [23] W.R.Alonso, R.Croteau, Purification and characterization of the monoterpene cyclase γ -terpinene synthase from *Thymus vulgaris*, *Arch. Biochem. Biophys.*, (1991), 286, 511-517
- [24,25] Denis Bégin, Michel Gérin, La substitution des solvants par le d-limonène
- [26] Yaghoub Amanzadeh, Mani Ashrafi, Fatemeh Mohammadi, Nouvelle Technique Elaboré pour Isolement et purification de Limonene d'huile d'orange Received: April 17, 2005; Accepted: November 1(2005)
- [27] *Journal of Supercritical Fluids* 23 (2002) 103–111
- [28] R. Fang, C.H. Jiang, X.Y. Wang, H.M. Zhang, Z.L. Liu, L. Zhou, S.S. Du, Z.W. Deng, Insecticidal Activity of Essential Oil of *Carum Carvi* Fruits from China and Its

- Main Components against Two Grain Storage Insects, *Molecules*. (2010), 15(12): 9391-9402
- [29] Mira, M. Blasco, A. Berna, S. Subirats, *Journal des fluides supercritiques*, 1^o, Volume 14, Numéro 2, 1 Janvier 1999, Pages 95 à 104B
- [30] M. Malecky, V. Fedele, and L.P. Broudiscou, Rumen degradability of terpenes present in the spring diet of lactating goats from Basilicata (Italy), *Rencontres Recherches Ruminants* (2006), Paris; Institut de l'Elevage - INRA; Vol. 13, pp. 134
- [31] J. Sedlakova., B. Kocourkova., L. Loujkova., V. Kuban, The essential oils content in caraway species (*carum carvi* L) (2003)
- [32] teneur différente de la norme AFNOR (Association Française de Normalisation), 1986. Huile essentielle de carvi (*Carum carvi* L.) AFNOR NF T 75-347. Paris.
- [33] H.J. Webber, W. Reuther, L.D. Batchelor, *The citrus Industry*, volume 1: History, world distribution, botany and varieties. University of California Press (1967)
- [34] R. Hardman, *Medicinal and Aromatic Plants, Industrial Profiles*,: Citrus Thegenus citrus, Taylor & Francis, London (2002), volume 26
- [35] V. Oreopoulou, C. Tzia, in *Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food*, chapitre 11: Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants and colorants. Springer, USA (2007), 209-232,
- [36] S. Yeoh, J. Shi, T.A.G. Langrish, Comparisons between different techniques for waterbased extraction of pectin from orange peels. *Desalination* (2008), 218, 229-237
- [37] M. Virost, V. Tomao, G. Ginies, F. Visinoni, F. Chemat, Green procedure with a greensolvent for fats and oils determination Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *Journal of Chromatography A* (2008)1196, 147-152
- [38] Bourkhiss M'barek and all, Effect of Age and Vegetative Stage on Essential Oil Content and Chemical Composition of *Thuya articulata*, *bull. Soc. Pharma. Bordeaux* (2007), 146, 75-84
- [39] Ariane LeiteRozza and all, Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (*Rutaceae*) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene, *chemico-biological interactions* (2010)

- [40,41] E. Bocchio, hydrodistillation des huiles essentielles, Théorie et applications, parfums, cosmétiques, arômes, 63 (1985), 61-62
- [42] M-el Hattab ; M.TEBOUCHE, comparaison des différents procédés d'extraction des huiles essentielles d'orange et de citron, mémoire de fin d'étude, Université de BLIDA, (1989)
- [43, 44, 45,46] Mme Mallem Tiba, Etude phytochimique de l'exsudat et des huiles essentielles de l'espèce *Inula crithmoides*
- [47] McLafferty, F. W.; J. A. Michnowicz, State of the Art GC/MS, ChemTech (1992), 22, 182-189
- [48] Longevialle P., Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris, (1981), 3-14 et 83-98
- [49] Constantin E., Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris, (1996), 1-14.
- [50] Low, M. J. D., Infrared Fourier transform Spectroscopy, Anal. Chem., V. 41, (1969), 97-108
- [51] Daghbouche Y. Garrigues S. Teresa Vidal M. De la Guardia M., Flow injection FTIR determination of caffeine in soft drinks, Anal .chem 69, (1997) 1086-1091.
- [52]Y. Daghbouche, S. Garrigues, M. de la Guardia, Liquid chromatography-FTIR spectrometric determination of cholesterol in animal greases, 354 (1997) 97-106
- [53] Daghbouche Y, Garrigues S, Miguel de la Guardia., Solid phase preconcentration-Fourier transform infrared spectrometric determination of carbonyl and α -naphthol , Analytica Chimica Acta 314 (1995) 203-212
- [54] Ariane LeiteRozza and all, Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (*Rutaceae*) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene, chemico-biological interactions (2010)

