

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI
BOUMEDIENE (U.S.T.H.B)
FACULTE DE CHIMIE



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

En : CHIMIE

Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE

Par: Mr Thaha Bachir FERFAD

Thème

EXTRACTION ET ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES DE
***Santolina chamaecyparissus* L.**

Soutenu publiquement le : 28 / 04 / 2008, devant le Jury composé de :

Mr. M. H. GUERMOUCHE	Professeur (U.S.T.H.B.)	Président
Mlle. L. BOUDARENE	Maître de conférences (U.S.T.H.B.)	Directeur de thèse
Mr. M. HAMDI	Professeur (U.S.T.H.B.)	Examineur
Mr. S. SEBIH	Professeur (U.S.T.H.B.)	Examineur
Mr. A. Y. BADJAH HADJ AHMED	Professeur (U.S.T.H.B.)	Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de la faculté de chimie à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari BOUMEDIENNE, dirigé par Monsieur A.BAALIOUAMER, professeur à l'U.S.T.H.B, que je remercie pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et conseillé dans mon travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier M^{elle} L.BOUDARENE maître de conférences à l'U.S.T.H.B, pour m'avoir dirigé tout au long de ce travail, pour l'aide précieuse, les conseils éclairés et les encouragements qu'elle n'a cessés de me prodiguer, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Qu'il me soit permis d'exprimer mes remerciements à Mr B.Y.MEKLATI, professeur de chimie à l'U.S.T.H.B et Directeur du CRAPC ainsi qu'à son personnel, pour leurs aides précieuses concernant les analyses de nos extraits.

Par la même occasion, je tiens à remercier toute l'équipe de l'Institut National d'Agronomie (I.N.A) d'El Harrach qui m'ont permis de réaliser un bon échantillonnage de la matière végétale.

Ma gratitude va également au défunt Monsieur A.BELOUED, l'expert botanique de l'I.N.A que l'Algérie a perdu, pour l'aide inestimable qu'il m'a apportée.

Je prie Monsieur M.H. GUERMOUCHE, professeur à l'U.S.T.H.B, d'accepter mes plus vifs remerciements, en me faisant l'honneur de présider le jury de thèse.

Ma gratitude et mes plus vifs remerciements vont également à M^r M. HAMDI professeur à l'U.S.T.H.B, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Je tiens à remercier très chaleureusement M^r S. SEBIH, professeur à l'U.S.T.H.B, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tien à remercier très vivement M^r A.Y.BADJAH HADJ AHMED, Professeur à l'U.S.T.H.B, pour son aide précieuse et ses encouragements et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Que tous mes collègues du laboratoire trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de ma sympathie pour leurs encouragements et leur aide.

Mes remerciements vont également à mes proches et amis (es) qui m'ont, de près ou de loin, soutenu durant ces années afin de mener à bien ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------------	---

1^{ère} PARTIE

CHAPITRE I

LA MATIERE VEGETALE : LA SANTOLINE

I.1.Classification	3
I.2.Noms communs	3
I.3.Noms vernaculaires arabe et tamazight	3
I.4.Description botanique	4
I.5.Habitat et environnement	5
I.6.Domaines d'applications	6
I.7.Travaux antérieurs	7

CHAPITRE II

LES HUILES ESSENTIELLES

II.1. Définition	10
II.2. Répartition et localisation des huiles essentielles	10
II.3. Méthodes d'extractions	10
II.3.1. Introduction	10
II.3.2. L'extraction par hydrodistillation	11
II.3.2.1. Introduction.....	11
II.3.2.2. L'extraction à l'échelle du laboratoire.....	11
II.4. Conservation des huiles essentielles	13
II.5. Composition chimique	13
II.6. Utilisation des huiles essentielles	15
II.7. Toxicité des huiles essentielles	15
II.7.1. Introduction	15
II.7.2. Neurotoxicité.....	16
II.7.3. Phototoxicité.....	16
II.7.4. Irritation de la peau	17
II.7.5. Conclusion	17
II.8. Indices physiques	17
II.8.1. Introduction.....	17

II.8.2. La densité	18
II.8.3. L'indice de réfraction	18
II.8.4. Le pouvoir rotatoire	19

CHAPITRE III

L'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES PAR GC

III.1. Introduction.....	20
III.2. Le gaz vecteur	22
III.3. L'injecteur	23
III.4. Les colonnes	25
III.5 Les phases stationnaires	27
III.5.1 Introduction.....	27
III.5.2 Critères de choix d'une phase stationnaire.....	27
III.5.3 Effet de la polarité sur l'ordre d'élution.....	28
III.5.4. Exemples de phases stationnaires	28
III.5.4.1. Les polysiloxanes	28
III.5.4.2. Les phases de polyéthylène glycol	30
III.5.5. Dégradation des phases stationnaires	31
III.5.6. Conclusion	31
III.6. Le four de la colonne	32
III.7. Le détecteur	35
III.7.1. Introduction.....	35
III.7.2. Le détecteur à ionisation de flamme	35
III.8. L'analyse qualitative	37
III.8.1. Introduction.....	37
III.8.2. Utilisation des étalons	37
III.8.3. Emploi de diverses colonnes.....	38
III.8.4. Emploi de l'indice de rétention comme moyen d'identification	38
III.8.4.1. L'indice de KOVATZ	38
III.8.4.2 L'indice de rétention en programmation de température	39
III.8.5. Méthode du " Finger-print "	40
III.9. Conclusion	40

CHAPITRE IV

L'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES PAR GC/MS

IV.1. Introduction	42
IV.2. Description du GC/MS	42
IV.3. L'interface GC/MS	43
IV.3.1. Introduction	43
IV.3.2. L'interface directe	43
IV.4. Le détecteur à spectrométrie de masse ou MSD.....	44
IV.4.1. Description du MSD.....	44
IV.4.2. L'analyseur	44

IV.5. L'outil informatique	45
IV.5.1. Introduction	45
IV.5.2. Installation et configuration du matériel au logiciel.....	45
IV.5.3. Traitement des données – L'analyse qualitative	45
IV.5.3.1. Introduction	45
IV.5.3.2. Principe de fonctionnement des logiciels de traitement des données	46
IV.5.3.2.1. Introduction	46
IV.5.3.2.2. Diversité des modes d'investigations	46
IV.5.3.3. Les banques de données numérisées	47
IV.5.3.3.1. Introduction	47
IV.5.3.3.2. Problèmes rencontrés dans les banques de données	48
IV.5.3.4. Présentation des résultats	50
IV.5.3.4.1. Introduction	50
IV.5.3.4.2. Décision finale	50

2^{ème} PARTIE

CHAPITRE V ECHANTILLONNAGE ET EXTRACTION

V.1. Echantillonnage	51
V.1.1 Lieux	51
V.1.2 Dates de cueillette	51
V.1.3 Organes.....	52
V.1.4. Méthode d'échantillonnage	52
V.2 Extractions et rendements	53
V.2.1 Méthode et matériel	53
V.2.2 Résultats et discussion	53
V.2.2.1 Rendement des feuilles en fonction des dates de cueillette.....	53
V.2.2.2 Rendement des organes en période florale	55
V.2.2.3 Rendement de la plante entière en fonction des lieux.....	57
V.3 Indices physiques.....	59
V.3.1 Matériel et méthodes	59
V.3.2 Résultats	60
V.4. Conclusion.....	61

CHAPITRE VI L'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES DE LA SANTOLINE PAR GC/MS ET GC/FID

VI.1. Matériel et conditions expérimentales	62
VI.1.1. Analyse qualitative par GC/MS	62
VI.1.1.1. Matériel et logiciels	62
VI.1.1.2. Les conditions expérimentales	63
VI.1.2. Analyse semi quantitative par GC/FID.....	63
VI.1.2.1. Le matériel	63
VI.1.2.2. Les conditions expérimentales	64
VI.2. Méthode de traitement des données	64

VI.2.1. Reconstitution d'une base de données	64
VI.2.2. Traitements des données.....	65
VI.3. Etude de la variabilité de l'essence de la plante entière en fonction du lieu	67
VI.3.1. Introduction	67
VI.3.2. Résultats	67
VI.3.3. Discussion	74
VI.3.3.1. Comparaison des pourcentages en composés majoritaires	74
VI.3.3.2. Comparaison des pourcentages en monoterpènes et sesquiterpènes	76
VI.3.3.3. Comparaison des pourcentages en composés oxygénés et hydrocarbonés	77
VI.3.3.4. Comparaison des pourcentages en fonctions oxygénées	78
VI.4. Etude de la variabilité des essences en fonction de l'organe.....	79
VI.4.1. Introduction	79
VI.4.2. Résultats	79
VI.4.3 Discussion	87
VI.4.3.1. Comparaison des pourcentages en composés majoritaires	87
VI.4.3.2 Comparaison des pourcentages en monoterpènes et sesquiterpènes	89
VI.4.3.3. Comparaison des pourcentages en composés oxygénés et hydrocarbonés	91
VI.4.3.4. Comparaison des pourcentages en fonctions oxygénées	92
VI.5. Conclusion	93
CONCLUSION GENERALE	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	96
ANNEXE A	104
ANNEXE B	110

Liste des abréviations

ADM	: Armes de destruction massive
AMDIS	: Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System
CAS	: Chemical Abstracts Service Registry Numbers
CI	: Chemical Ionisation (ionisation chimique (IC))
D _{dp}	: Durée du dernier palier
D _{pp}	: Durée du premier palier
ECD	: Détecteur à capture électronique
EI	: Ionisation en impact électronique
Eq.	: Equation
FID	: Détecteur à ionisation de flamme
Fig.	: Figure
GC	: Gas Chromatography (Chromatographie gazeuse)
GC/FID	: Chromatographe avec un FID comme détecteur
GC/MS	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GLC	: Gas-Liquid chromatography (chromatographie gaz-liquide)
GSC	: Gas-Solid chromatography (chromatographie gaz-solide)
H.E.	: Huile essentielle
I.D	: Internal diameter (diamètre interne)
I _{exp 20M}	: Indice de rétention établi selon la colonne polaire CW 20M
I _{expHP5MS}	: Indice de rétention établi selon la colonne apolaire HP5MS
IUPAC	: Union internationale de chimie pure et appliquée
LC	: Liquid Chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
LC/MS	: Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LRI	: Linear retention index (Indice de rétention linéaire)
MSD	: Détecteur à spectrométrie de masse
O.D	: Outer diameter (diamètre externe)
OT	: Open Tube (tube ouvert)
P _a	: Pente d'ascension de température
PBM	: basée sur la probabilité de correspondance (concordance)
P.E.G	: Polyéthylène glycol
PLOT	: Colonne capillaire à couche poreuse
PTV	: Température de vaporisation programmée
RI	: Rétention index (indice de rétention)
Scan/s	: Scan par seconde
SCOT	: Colonne capillaire à support imprégné
SIM	: Selected Ion Monitoring
Tab	: Tableau
TCD	: Détecteur à conductivité thermique
T _{dp}	: Température du dernier palier
T _I	: Température de l'injecteur
TIC	: Chromatogramme en courant ionique total
Th	: Thomson
T _{me}	: Température minimale d'emploi
T _{Me}	: Température maximale d'emploi
T _{PP}	: Température du premier palier

T_{prb} : Température du "point de rosée" la plus basse
 t_R : Temps de rétention
 t_r : élément à l'état de traces
UV : Ultra violet
WCOT : wall-coated open tubular column

Introduction générale

Introduction générale

L'Algérie occupe une position géographique, entre la méditerranée et les pays du Sahel, possède une superficie de plus de deux millions de Km² et un relief formé par quatre zones :

- le littoral méditerranéen.
- l'atlas tellien.
- les hauts plateaux.
- le grand Sahara.

Ces données ont permis l'émergence d'une diversité dans le domaine de la flore. Cette richesse du patrimoine national offre des potentialités d'utilisation dans des domaines variés.

Le patrimoine national doit être préservé et valorisé, c'est la responsabilité des institutions de l'état et l'une des fonctions de l'élite scientifique. Dans ce cadre, le laboratoire d'analyses organique fonctionnelle (L.A.O.F) apporte sa contribution à travers les analyses du produit naturel, notamment celles des huiles essentielles en vue de leurs utilisations dans les domaines adéquats.

De notre part, nous avons choisi l'analyse des huiles essentielles de la santoline comme thème de recherche. Ce choix est suscité à la fois par l'utilisation de la santoline en médecine populaire et par les travaux antérieurs entrepris à l'étranger par de nombreux auteurs. Ces travaux ont montré des possibilités d'applications, notamment, dans le domaine thérapeutique.

L'optimisation de l'analyse exige de nous, non seulement la connaissance des principes de bases, mais aussi, la connaissance du matériel et des logiciels utilisés.

Notre travail est divisé en deux parties :

- une partie bibliographique
- une partie expérimentale.

La partie bibliographique comprend quatre chapitres : Le premier chapitre donne un aperçu botanique sur la santoline, sur ses différentes applications et sur les travaux antérieurs. Le second chapitre est une introduction aux huiles essentielles. Il rappelle aussi les modes d'extraction, la composition, les différentes utilisations et les dangers que peuvent présenter les huiles essentielles. Afin d'arriver à une optimisation du matériel et du logiciel dans les analyses, les troisième et quatrième chapitres rappellent les fondements de base de deux techniques d'analyses, (la GC et la GC/MS). Ces deux chapitres mettent l'accent sur la mise en place des conditions expérimentales et sur la nécessité de la maîtrise de l'outil informatique, notamment les logiciels d'acquisitions et de traitements de données.

La partie expérimentale, constituée de deux chapitres, représente la finalité de ce travail. Le cinquième chapitre traite le premier objectif de ce mémoire ; Il est consacré à l'échantillonnage, l'extraction des huiles essentielles et leurs caractérisations par leurs indices physiques ainsi qu'à l'étude du rendement en fonction de plusieurs facteurs. Le sixième chapitre rapporte la méthode utilisée, dans le traitement des données, pour parvenir à l'optimisation des logiciels et des banques de spectres. Il comporte, aussi, l'étude de la variabilité de la composition des huiles essentielles en fonction du site et en fonction de l'organe.

1^{ère} Partie

Revue bibliographique

Chapitre I

La matière végétale : La santoline

I La matière végétale : La santoline

I.1. Classification

Le genre *Santolina* ou santoline, selon MALOS (1979), est classé comme suit :

- **Classe** : *Magnoliopsida (Dicotyledonopsida)*.
- **Sous classe** : *Asteridae*.
- **Ordre** : *Asterales (compositales)*.
- **Famille** : *Asteraceae (Compositae)*.

Ce genre "*Santolina*" compte parmi plusieurs espèces de sous-arbrisseaux parmi lesquelles deux existent en Algérie [1] :

- *Santolina rosmarinifolia* Linn : Santoline à feuilles de romarin.
- *Santolina chamaecyparissus* Linn, appelée également : *Ormenis africana* par JORDAN [2].

I.2. Noms communs

Aurone femelle alors que l'*Artemisia abrotanum* est appelée aurone male [3, 6] ; garde robe [4], petit cyprès, santoline blanche [5]. En Grande Bretagne, la santoline porte le nom de "lavander cotton" [4] et aux États-Unis celui de "cotton lavander" [14].

I.3. Noms vernaculaires arabe et tamazight

En arabe, la santoline porte le nom de "القيصوم" elqeïçoum [4,6]. En Algérie, elle porte les noms, "عرفج, وادمي البيض, جيسوان, القيصوم" [6] et "العريرة" [5] ; en tamazight, elle porte les noms de "تيبودوشين, تيمريت" [6] et "تعرفت" [5].

I.4. Description botanique

La santoline est un sous-arbrisseau [3], vivace [5,6], buissonnant très odorant, d'un vert cendré, ayant l'aspect d'un duvet blanchâtre plus ou moins abondant [5].



Fig. I.1. Buisson de santoline.

Les tiges sont très ramifiées, raides, dressées, striées, hautes de 25 à 50 cm [5], jusqu'à 100 cm [6].

Les feuilles sont linéaires et dentées [3], un peu charnues [3, 7], à lobes courts, obtus, qui lui donnent un aspect particulier d'où le nom de santoline cyprès [7], blanchâtres, ont 2mm de largeur [5].



Fig. I.2. Feuilles de santoline.

Les capitules sont discoïdes [2], solitaires, longuement pédonculés, globuleux, entourés d'un involucre semi-sphérique à bractées écailleuses et glabres. Les fleurs sont de couleur jaune d'or, toutes tubuleuses [5]. La période de floraison se situe entre mai et juin [5].



Fig. I. 3. Capitules de santoline.

I.5. Habitat et environnement

La plante cultivée dans les jardins, croît à l'état spontané dans les rochers de la région méditerranéenne [7] ; c'est une plante calcicole cultivée également en Amérique du nord [3].

En Algérie, la santoline se trouve dans les hauts plateaux à Sourdjouab, Sétif, Daya, Ain-Beida, dans les Aurès [1], les pâturages steppiques [2] et dans le littoral algérien du côté de la daïra d'El Kol, ainsi que dans les montagnes de Dirah [6].

De son vivant Monsieur BELOUED nous a montré, dans les archives de l'I.N.A, des échantillons provenant d'une zone rocailleuse dans les montagnes du Djurdjura près de Tizi N 'Koulei (1600 M d'altitude) et un autre échantillon de Morsott près de Tébessa datant du 24/04/1924.

I.6. Domaines d'application

Les domaines d'application sont variés. Les noms donnés à cette plante reflètent ses utilisations. Elle est utilisée comme antimité d'où le nom de "garde robe", c'est une *plante médicinale* [3] d'où le nom de santoline du latin sanctolina (c-à-d. plante sainte) [5]. Elle est utilisée en Algérie selon BELOUED [5] surtout comme vermifuge.

La santoline qui se prête à la taille est utilisée à l'échelle mondiale surtout comme plante ornementale.

Dans l'algérois, elle est utilisée pour orner certaines places (Fig. I. 4).



Fig. I. 4. Utilisation de la santoline comme plante ornementale.

I.7. Travaux antérieurs

La santoline étant une plante médicinale, il est donc normal qu'elle soit étudiée dans ce domaine. Les travaux, de nature médicinale, ont été entrepris notamment par J.L. RIOS [8], B. Suresh [9] et Rosa M. Gener [10].

Des études chimiques ont été effectuées sur la partie aérienne de la plante ou sur une partie d'elle (entre autres celle des capitules), nous avons notamment :

- Les travaux de Alan F. Thomas et B. Willhalm [11], qui ont porté sur la santoline suisse, le produit majoritaire identifié étant l'artémisia ketone. Le second composé (8%) a été identifié comme étant le myrcène; Les composés identifiés étant des produits hydrocarbonés (l' α -thujène, l' α et le β -pinène, le β -phellandrène et l' α -curcumène), ainsi que des produits carbonylés (acétone, cryptone et phellandral). Ils ont également noté la présence pour la première fois, du santolina triene dans le genre *Santolina*. En plus, l'huile des capitules de la plante de Sardaigne (1200 m d'altitude) a été étudiée. Elle présente une composition plus complexe que celle de l'huile de la plante entière. D'autre part, l'examen de l'huile essentielle de la santoline, originaire du sud de la France, a confirmé que l'artémisia ketone constitue le produit majoritaire, avec un pourcentage relatif de 45 % dans l'H.E de la santoline.
- Les travaux de Villard [12] sur la santoline de Valence (Espagne) où l'analyse a montré la présence de 50 composés dont 39 ont été identifiés parmi lesquels 28 correspondent à la fraction monoterpénique et 11 à la fraction sesquiterpénique. Cette huile essentielle contient un taux de composés oxygénés supérieur à celui des hydrocarbonés. Le camphre (25,19 %), le *p*-cymène, le 1,8-cinéole, le bornyl et l'isobornyl acetate, l'alloaromadendrene et l' α -muurolène constituent les produits majoritaires totalisant un pourcentage de 68,11% dans l'huile essentielle, à l'inverse de la santoline du sud de la France : l'artémisia ketone, ne représente qu'un taux faible de 0,64%. Les auteurs ont noté aussi la présence de deux alcools sesquiterpéniques inconnus de masses égales à 222 et 220.

- Les travaux de M.J Pérez-Alonso et A. Velasco Negueruela [13] qui ont été effectués sur plusieurs sous-espèces à l'état spontané (de différentes régions d'Espagne, péninsulaire et insulaire) et des milieux de cultures. Selon la composition des huiles, trois groupes ont été proposés :

- groupe des milieux de culture
- groupe des insulaires
- groupe péninsulaire.

L'artémisia ketone et le t-cadinol (avec des taux variant respectivement de 27,8 à 35,6% et de 23,6 à 4,8%) constituent les produits caractéristiques du groupe des milieux de culture. Le groupe des insulaires est caractérisé par deux composés majoritaires : le camphre avec 42,9% et le cubenol avec 17,3%. Les monoterpènes prédominent dans les huiles essentielles du groupe péninsulaire correspondant aux sous-espèces *Incana* avec (85,9%) et au *Squarrosa* (de 45,2 à 68,5%). Les composés majoritaires de ces extraits sont le camphre (9,2 à 24,9%), le bornéol (11,6 à 28,4%) et le 1,8-cinéole (2,3 à 8,7%). La sous-espèce *tomentosa* est principalement composée de sesquiterpènes (61,4%) avec l'elemol (5,0%), le nérolidol et le spathulénol (9,3%), le copaenol (15,2%), le ledol (4,1%) et le cubenol (6,7%) comme composants majoritaires.

- Les travaux de K.H.C BASER [14] sur la partie aérienne de la plante ont permis l'identification de 71 composés où l'artémisia ketone (38,1%), le camphre (11,7%) et le β -phellandrène (9,2%) constitue les produits majoritaires. Les monoterpènes hydrocarbonés constituent 22,8%, les monoterpènes oxygénés 57,9%, les sesquiterpènes hydrocarbonés 0,7% et les sesquiterpènes oxygénés 8,8%.
- Les travaux de A. FRIDLENDER [15] ont porté sur les huiles essentielles de feuilles et de capitules de la santoline originaire du Gard (France). Une quarantaine de composés ont été identifiés représentant 90% et 95% de l'huile essentielle respectivement extraite des capitules et des feuilles. Ces deux huiles renferment principalement des terpènes

oxygénés : 67% pour les capitules et 50% pour les feuilles (61 et 43% de monoterpènes, 6 et 7% de sesquiterpènes). Les composés majoritaires présents dans l'huile des capitules et des feuilles sont respectivement, le terpinène-4-ol (34% et 20%), le bornéol (17% et 16%), le germacrène D (5% et 15%) et le γ -terpinène (7% et 7%).

- Les travaux de A. AHUDJA [16] ont montré l'existence de 49 composés dont 25 ont été identifiés correspondant à 80% de l'huile essentielle. Parmi les constituants identifiés, nous trouvons des monoterpènes hydrocarbonés (43%), des monoterpènes oxygénés (31%), des sesquiterpènes hydrocarbonés (7,4%) et des sesquiterpènes oxygénés (4%). Les constituants majoritaires sont le myrcène, le limonène, le (E) linalool, le Z- β ocimène et le β - caryophyllène oxide.
- En Algérie, les travaux de A. LAYADI et S. SOUADKI [17] ont porté sur l'étude de la partie aérienne de la plante provenant du jardin du HAMMA.

L'analyse par GC, sur un échantillon récolté le 27/07/1999, révèle la présence de 72 composés. 46 composés ont été identifiés ; 7 composés en se référant aux étalons et 39 autres en se basant sur les indices de rétention de la littérature. Le γ -terpinène (40,33 %), le trans-pinocarvéol (9,82 %), le limonène (6,87 %) et le lylal (6,74 %) constituent les produits majoritaires ; Cependant, l'injection en GC/MS donne un "TIC", avec un produit majoritaire inconnu. Le spectre de masse du produit majoritaire possède un pic de base à M/Z égal à 83. L'histogramme des groupements chimiques donne les pourcentages suivants : les cétones (0,027 %), les alcools (11,98 %) et les aldéhydes (10,42 %).

Chapitre II

Les huiles essentielles

II

Les huiles essentielles

II.1. Définition

Une définition absolument scientifique du terme *huiles essentielles* ou huiles volatiles est à peine possible, mais pour des considérations pratiques, elles peuvent être définies comme des corps odoriférants d'une nature huileuse obtenue presque exclusivement de sources végétales, généralement liquides (parfois semi-solides ou solides) à température ambiante [18].

II.2. Répartition et localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs [19]. Elles sont présentes dans les parties les plus diverses de l'anatomie de la plante ; dans certains cas, on les trouve dans divers organes, dans d'autres, elles sont limitées à une partie spéciale de la plante. Ainsi, dans les conifères comme le pin, beaucoup d'huiles essentielles se trouvent dans la plupart des parties de l'arbre ; cependant dans la rose, l'huile est "confinée" dans la fleur ; dans la cannelle, elles se trouvent dans l'écorce et dans les feuilles, un peu dans la racine ; dans l'orange, elles sont présentes, principalement au niveau des fleurs et de l'écorce du fruit ; dans le muscadier, elles se trouvent au niveau du fruit [18].

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont associées à la présence de structures histologiques spécialisées à proximité de la surface de la plante : poils, poches, canaux sécréteurs [19].

II.3. Méthodes d'extractions

II.3.1. Introduction

Les méthodes d'extractions, qui dépendent du génie des procédés, sont multiples par leurs usages et diversifiées par leurs techniques ; ces méthodes

applicables à l'extraction des huiles essentielles, le sont aussi pour d'autres domaines ; elles peuvent être divisées en deux catégories :

- les méthodes conventionnelles.
- les méthodes dites innovantes [20,21].

Dans la catégorie conventionnelle on trouve :

- l'hydrodistillation.
- l'entraînement à la vapeur d'eau.
- l'extraction par Soxhlet.

Dans la catégorie dite innovante on trouve :

- l'extraction par fluide supercritique.
- l'hydrodistillation assistée par micro-ondes.
- la distillation sèche assistée par micro-ondes.
- l'extraction assistée par ultra-sons.

Le choix d'une méthode est dicté par divers facteurs :

- la disponibilité du matériel.
- le coût financier.
- l'usage de l'extraction.

II.3.2. L'extraction par hydrodistillation

II.3.2.1. Introduction

Dans l'hydrodistillation, la matière première végétale est en contact direct avec l'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet alors l'éclatement du lieu de sécrétion (poils, poches ou canaux) et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. A la sortie, le mélange circule dans un serpentin où il se condense, et est recueilli dans un essencier ou un vase florentin. L'huile essentielle est ensuite séparée par décantation [20].

II.3.2.2. L'extraction à l'échelle du laboratoire

Au laboratoire, l'hydrodistillation peut s'effectuer avec un système d'hydrodistillation simple avec, ou sans, recyclage de la phase aqueuse présente dans le distillat obtenu. Dans le cas d'un recyclage, l'appareil utilisé est le Clevenger modifié (Fig.II.1) [22].

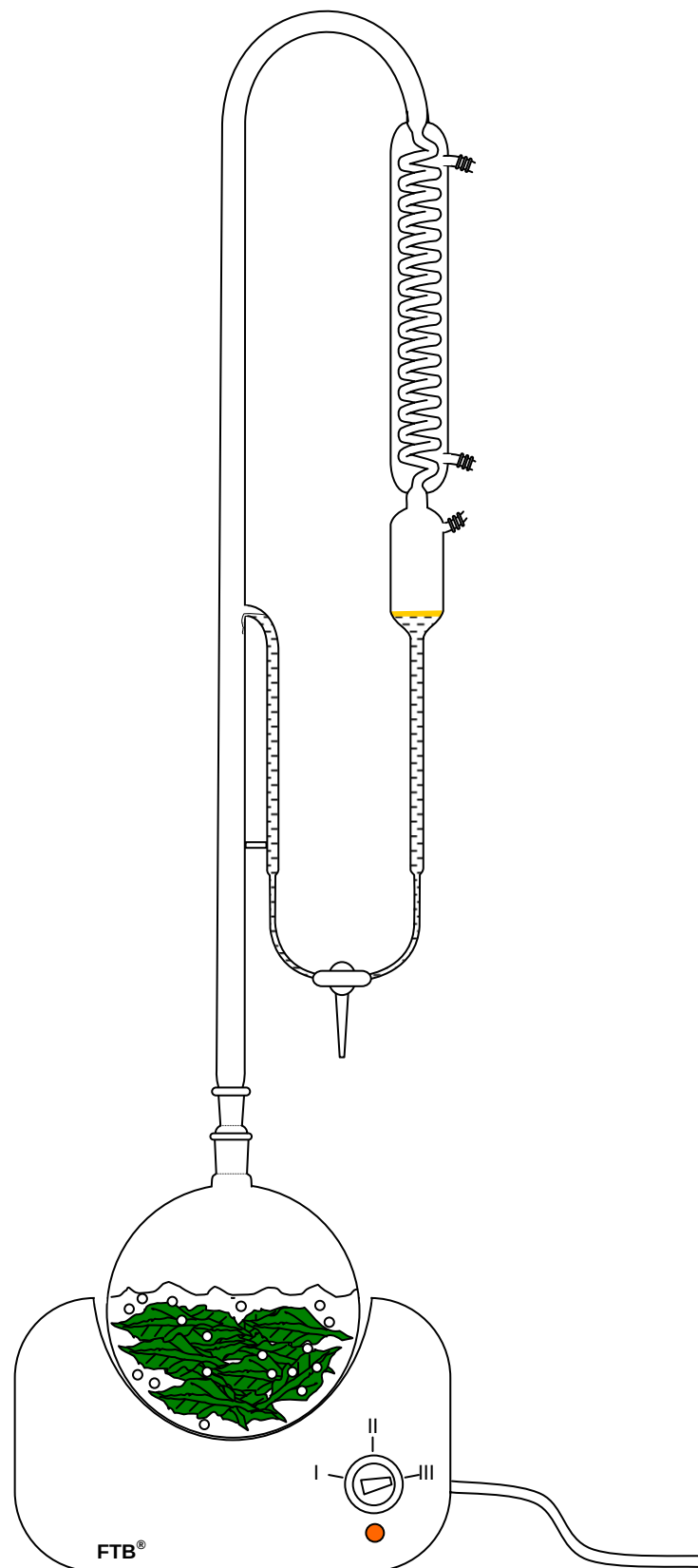


Fig. II.1 L'hydrodistillation par utilisation de l'appareil de Clevenger modifié

II.4. Conservation des huiles essentielles

La suite logique de l'extraction d'une huile essentielle, avant tout usage, est sa conservation.

Afin d'éviter toute altération pouvant affecter la composition de l'huile essentielle, certaines exigences sont demandées concernant :

- le contenant d'une part, qui doit être inerte vis-à-vis des composés chimiques.
- les conditions de conservation d'autre part.

La température doit être basse et l'huile essentielle ne doit pas être exposée directement à la lumière ; pour cela des flacons en verre fumé sont généralement utilisés, et l'H.E est gardée dans un endroit frais (un réfrigérateur).

Les parties internes des bouchons de flacons, comportant des parties en élastomère, sont susceptibles de contaminer l'H.E, par contact prolongé, afin d'éviter ce problème, les flacons sont maintenus dans une position verticale.

II.5. Composition chimique

L'étude de la composition des huiles essentielles a commencé en occident au 19^e siècle dont notamment les travaux de WALLACH en 1877 [23] ; ces études ont permis de découvrir un certain nombre d'hydrocarbures isomères de formule $C_{10}H_{16}$ appelés : *terpènes* [24].

Les huiles essentielles peuvent comprendre, en plus des terpènes, des composés répondant à la formule $(C_5H_8)_n$, $n > 2$, appelés *polyterpènes* et qui se subdivisent en sesquiterpènes $C_{15}H_{24}$ et diterpènes $C_{20}H_{32}$ [25].

La formule brute des terpènes et polyterpènes montre la présence d'insaturations, d'où l'existence :

- de composés insaturés acycliques.
- de composés monocycliques.
- de composés polycycliques [25].

Un très grand nombre de dérivés oxygénés existent particulièrement dans les séries polycycliques.

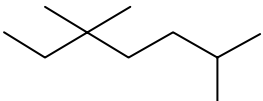
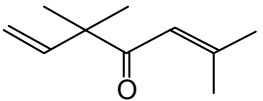
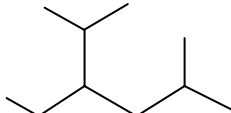
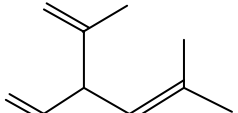
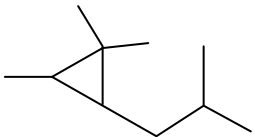
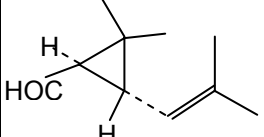
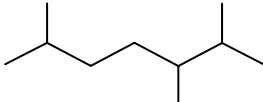
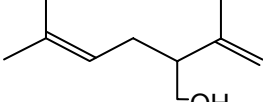
Dans la série des monoterpènes *acycliques* oxygénés, on trouve des alcools (ex. le géraniol) et des aldéhydes (ex. le géraniol) qu'on rencontre dans les essences de certaines fleurs [23].

Dans la série des terpènes monocycliques et bicycliques oxygénés, le nombre de types de fonction augmente en regard à celles citées plus haut, on trouve des éthers (ex. le 1,8 cinéole), des peroxydes (ex. l'ascaridole), des cétones (ex. le camphre, et la thujone), etc.

Si les constituants cités plus haut, appelés couramment terpénoides ou isoprénoides, obéissent à la règle dite isoprénique [23] et forment la majorité des terpénoides, il existe cependant une autre classe de terpènes qui sort de cette règle et qu'on nomme *terpènes irréguliers* [26-28] ; cette classe de terpénoides qu'on rencontre rarement dans la nature est limitée à certaines familles, notamment la famille des astéracées (compositae) [28,29].

Les monoterpènes irréguliers ont des structures reposant sur quatre (4) squelettes carbonés de bases, qui sont présentés dans le tableau II.1 [26].

Tab.II.1. Squelettes et exemples de monoterpènes irréguliers

Artemisyl		ex. artemisia ketone	
Santolinyl		ex. santolina triene	
Chrysanthemyl		ex. <i>trans</i> -Chrysanthemol	
Lavandulyl		ex. lavandulol	

Dans la même classe, il y a les sesquiterpènes irréguliers [30] et les diterpènes irréguliers [31].

Dans la composition des huiles essentielles, on peut trouver aussi des composés phénoliques parfois majoritaires (ex. *Ocimum americanum*).

Nous trouvons, aussi, des huiles essentielles à forte teneur en alcanes, comme dans le cas du *Brassica rapa*, de même pour les composés soufrés, qui sont majoritaires dans certains cas (*Pseudocytisus integrifolius*).

Le dernier exemple que nous citons est celui des huiles essentielles riches en composés azotés, comme dans le cas du *Diplotaxis tenuifolia* [32-37].

II.6. Utilisation des huiles essentielles

Les plantes aromatiques, dues à la présence d'huiles essentielles, ont été utilisées depuis longtemps en additif alimentaire, pharmaceutique, produit de beauté et parfumerie. Plusieurs activités biologiques, y compris des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, sont habituellement assignées à ces huiles ou à certains de leurs constituants [23].

Les huiles essentielles riches en 1,8-cinéole, notamment celles contenant plus de 70% de ce dernier, sont les plus utilisées en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique. Ce produit est généralement obtenu à partir de l'*Eucalyptus globulus*.

Le marché mondial du 1,8-cinéole, connu commercialement sous le nom d'eucalyptol, provenant des huiles essentielles, représente plus de 1500 tonnes/année, dont les deux-tiers proviennent de Chine [38].

L'aromathérapie est une thérapie utilisant les huiles essentielles comme remède, elle relève de la capacité des spécialistes du domaine. Dans certains pays, la vente d'huiles essentielles à usage thérapeutique est réglementée et relève du monopole pharmaceutique [39].

II.7. Toxicité des huiles essentielles

II.7.1. Introduction

Comme avec la plupart des médicaments qu'ils soient de synthèses ou d'origine naturelle, des constituants d'huiles essentielles ont le potentiel de créer des effets toxiques mortels, ***s'ils sont pris à fortes doses***.

Il y a de nombreux cas enregistrés en littérature toxicologique, concernant des cas sérieux (non fatals) et mortels de l'ingestion d'huile essentielle par

notamment des enfants et des adultes [40].

Certaines huiles essentielles, réputées pour être fortement toxiques, sont sous contrôle dans certains pays notamment la tanaïsie commune (*Tanacetum vulgare*), qui est un puissant vermifuge ; il en est de même pour l'huile essentielle du cèdre blanc du Canada (*Thuja occidentalis*) contenant jusqu'à 60% de **thujone** et qui peut être **mortelle** à fortes doses [41].

La toxicité peut affecter un ou plusieurs organes [42]. Dans ce qui suit, nous présentons quelques cas.

II.7.2. Neurotoxicité

Une substance neurotoxique est celle qui a un effet toxique ou destructif sur le tissu nerveux. Des convulsions sont le résultat le plus commun de neurotoxicité. L'une des huiles essentielles convulsivantes les plus efficaces est l'hysope (*Hyssopus officinalis* L.) contenant 40% de **pinocamphone** et 30% d'**iso-pinocamphone**.

L'huile d'hysope est un neurotoxique puissant. Des saisies épileptiformes ont été constatées à la suite d'ingestion d'huile par des humains.

Les huiles essentielles classées comme étant contre-indiquées chez les épileptiques, sont celles riches en cétones (le pinocamphone, le camphre, le thujone ou le pulegone).

Certains considèrent que les cétones, en général fortement stimulant du système nerveux central, présentent un risque pour les personnes prédisposées à l'épilepsie. Cependant, s'il est vrai que tous les convulsivants trouvés dans les huiles essentielles soient des cétones, il n'est pas nécessairement vrai que toutes les cétones trouvées dans les huiles essentielles soient des convulsivants et il n'y a aucune raison de croire que les huiles essentielles riches en d'autres cétones présentent un quelconque danger à l'épileptique [42].

II.7.3. Phototoxicité

Lorsque des huiles essentielles sont appliquées sur la peau et que celle-ci est exposée à des quantités significatives de rayonnement UV sous forme de lumière du soleil ou autres, le mauvais « coup de soleil » est le résultat commun. Dans des cas plus sérieux ceci peut mener aux brûlures de 2ème degré ; d'autres

résultats communs sont :

- changement de couleur.
- bronzage rapide.
- hyper pigmentation.

Cette *phototoxicité* est due aux divers composés de **furanocoumarines** (molécules polycycliques) trouvés en faibles quantités dans quelques huiles essentielles dont notamment, la bergamote et le cumin [40,43].

II.7.4. Irritation de la peau

Les réactions d'*irritation* représentent un niveau de dommages directs à la peau. Elles surgissent rapidement et dépendent de la quantité du composé appliquée ; ainsi, la réaction est directement proportionnelle à la quantité utilisée dans le traitement. Les huiles essentielles pouvant être la cause des réactions d'irritation sont celles qui contiennent de grandes quantités de **phénols**, des **aldéhydes aromatiques** et des **hydrocarbures oxydés**. Ces essences sont généralement à la disposition du public, ceci inclut celles de la cannelle (écorce et feuilles), du clou de girofle (bourgeon et feuilles), du thym, de l'origan et les huiles de pin [40].

II.7.5. Conclusion

Les huiles essentielles peuvent constituer une thérapie bénéfique tant que nous les utiliserons avec une connaissance précise de leurs propriétés, cependant elles peuvent aussi facilement devenir un poison si nous les utilisons imprudemment et/ ou par ignorance de leurs effets potentiels inverses [44].

II.8. Indices physiques

II.8.1. Introduction

Les corps purs possèdent un ensemble de constantes physiques appelées **critères de pureté**. Ces constantes physiques sont utilisées pour l'identification et la vérification de la pureté de ces composés. A l'inverse des corps purs, les *mélanges naturels*, d'une manière générale (et en particulier les huiles essentielles) ne possèdent pas de constantes physiques telles que la densité ou l'indice de réfraction, qui *varie(nt)* d'un échantillon à l'autre, mais dans des **limites étroites**. Une grande

précision des appareils de mesure, dans ce cas, n'est pas indispensable ; prises ensemble, ces grandeurs constituent un moyen de **contrôle de qualité**, voir même la détermination de *l'origine* de l'échantillon. Ces grandeurs sont mesurées à la température de 20°C.

II.8.2. La densité

La densité relative d'un corps liquide ou solide est par définition le *rapport* de deux masses :

- la masse d'un échantillon de ce corps
- par la masse *d'eau*, ayant le *même volume* que l'échantillon, prise à la *même température*.

La détermination de la densité d'une huile essentielle peut se faire par utilisation d'un **pycnomètre**, généralement d'un (1) ml. Pour cela *trois pesées* sont effectuées :

- la masse m_0 du pycnomètre vide.
- la masse m_1 du pycnomètre rempli d'huile essentielle.
- la masse m_2 du pycnomètre rempli d'eau.

On a donc :

$$d = \frac{(m_1 - m_0)}{(m_2 - m_0)} \quad \text{Eq.II.1}$$

II.8.3. L'indice de réfraction

L'indice de réfraction à une température donnée d'un milieu donné est le *rapport* de deux vitesses :

- la vitesse de propagation de la lumière dans le vide.
- par la vitesse de propagation de la lumière dans le milieu considéré.

La vitesse de la lumière dans le vide étant toujours supérieure à celle dans un autre milieu, *l'indice de réfraction est toujours supérieur à l'unité*. Un **réfractomètre** est utilisé pour mesurer l'indice de réfraction.

II.8.4. Le pouvoir rotatoire

Pour expliquer les phénomènes dus à la lumière, on doit faire appel à l'une des deux théories :

- La théorie corpusculaire, pour expliquer par exemple l'effet photo-électrique.
- La **théorie ondulatoire**, qui considère que la lumière est **une onde électromagnétique**, pour expliquer alors des phénomènes tels que les interférences lumineuses ou celle de la **polarisation de la lumière**.

Le **plan de polarisation** de la lumière est dévié d'un certain angle lorsque celle-ci traverse un milieu, dit **optiquement actif**, on dit alors que ce milieu a ou possède un **pouvoir rotatoire**.

L'angle de déviation α mesuré à l'aide d'un **polarimètre** est caractéristique du milieu, il dépend du solvant et de la concentration de la solution, ainsi que de la température et de la longueur d'onde de la lumière utilisée.

Afin que des comparaisons puissent être faites, nous devons choisir des conditions standards. Pour cela on utilise une **cellule** de longueur l égale à 1dm, une lumière incidente de longueur d'onde $\lambda = 589,3$ nm, correspondant à la raie D de la lampe au sodium, ainsi le **pouvoir rotatoire spécifique** d'une HE dissoute dans du CHCl_3 ou du MeOH est défini par l'Eq.II.2.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \times c} \quad \text{Eq.II.2.}$$

α : angle de déviation du plan de polarisation de la lumière en degrés

l : longueur de la cuve en dm

c : concentration de la solution en mg/ml

Chapitre III

L'analyse des huiles essentielles par GC

III

L'analyse des huiles essentielles par GC

III.1. Introduction

La question posée est : Comment peut-on utiliser la chromatographie en phase gazeuse (GC) comme méthode d'analyse des huiles essentielles ?

Pour répondre à la question, il faut tout d'abord définir la chromatographie d'une manière générale et la GC en particulier, ensuite discuter sur son aptitude et sa validité comme méthode d'analyse des huiles essentielles. L'**IUPAC** (en 1993) donna la définition suivante :

La chromatographie est une méthode physique de séparation dans laquelle les composés à séparer, sont distribués entre deux phases, l'une stationnaire (**la phase stationnaire**) tandis que l'autre (**la phase mobile**) se déplace dans une direction définie [45-47].

La phase mobile déplace les constituants à travers la phase stationnaire, jusqu'à ce qu'ils sortent de celle-ci. Ce processus chromatographique s'appelle **l'élution** ; la séparation des constituants de l'échantillon, l'un de l'autre, est basée selon leurs affinités pour la phase stationnaire.

Les différentes variétés chromatographiques sont nommées selon l'état physique de la phase mobile ; donc, en chromatographie gazeuse (**GC**), la phase mobile est un gaz (**le gaz vecteur**), et en chromatographie liquide (**LC**) la phase mobile est liquide.

Un sous-classement est fait selon l'état solide de la phase stationnaire ; si la phase stationnaire est solide, la technique GC est appelée chromatographie gaz-solide (**GSC**), et si elle est liquide, chromatographie gaz-liquide (**GLC**) [47].

La GLC est la forme la plus fréquente de la GC, la phase stationnaire est un liquide non volatile ou peu volatile, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer qui, pour cette raison, sont souvent appelés **solutés** [48].

L'instrument qui permet la mise en œuvre de la chromatographie en phase gazeuse, le **chromatographe**, réalise à la fois la séparation des constituants de l'échantillon et la mesure des quantités de produits séparés [48].

L'utilisation d'un gaz vecteur implique obligatoirement le contrôle de son débit, de sa pression et de sa vitesse, d'où l'existence d'un système de contrôle adéquat ; l'approvisionnement en gaz est assuré à partir de bouteilles de gaz comprimé.

L'élément essentiel d'un chromatographe est la **colonne**, lieu de la phase stationnaire ; la colonne est un tube qui peut être en acier, en verre ou autre, contenant la phase stationnaire et permettant plus ou moins facilement l'écoulement du gaz vecteur.

L'introduction de l'échantillon au niveau de la colonne est assurée par un **système d'injection** ; dans le cas le plus simple, **l'injection** de l'échantillon se fait manuellement par utilisation d'une **seringue** au niveau de **l'injecteur** lié directement à la colonne.

Les constituants introduits ensemble au niveau de la première extrémité de la colonne sont **retenus** différemment selon leurs affinités vis-à-vis de la phase stationnaire ; dans leur course pour atteindre l'autre extrémité de la colonne, les constituants sont séparés l'un de l'autre ; chaque constituant met donc un temps pour parcourir la totalité de la longueur de la colonne. Ce temps de séjour dans la colonne ou **temps de rétention** lui est propre.

Chaque constituant, l'un après l'autre, est recueilli à l'extrémité de la colonne, suivant un ordre donné, cet ordre dit **ordre d'élution**, rappelant celui des lettres d'un alphabet et dépendant de la nature de la phase stationnaire utilisée.

A la sortie, chaque constituant est pris en charge par un système signalant la présence de tout composé éluant de la colonne et passant à travers lui : Le **détecteur**.

La détection se solde par le tracé d'une représentation graphique bidimensionnelle appelée **chromatogramme**, au niveau d'un périphérique ou organe de sortie.

L'absence de composé éluant de la colonne se traduit au niveau du chromatogramme par la formation d'une ligne appelée **ligne de base**.

Dans le cas idéal, la présence d'un constituant est signalée par la formation d'une déviation par rapport à la ligne de base et perpendiculaire à celle-ci sous forme d'un **pic**.

Chaque pic du chromatogramme représente donc, dans le cas idéal, un constituant du mélange. Il est caractérisé par deux grandeurs :

- son temps de rétention.
- sa surface.

Un système GC, Fig. III.1, est donc constitué essentiellement :

- d'un système d'approvisionnement et de contrôle de gaz.
- d'un système d'injection/introduction de l'échantillon.
- d'une colonne chromatographique.
- du four de la colonne.
- d'un système de détection.
- d'un système de contrôle et d'acquisition des données.

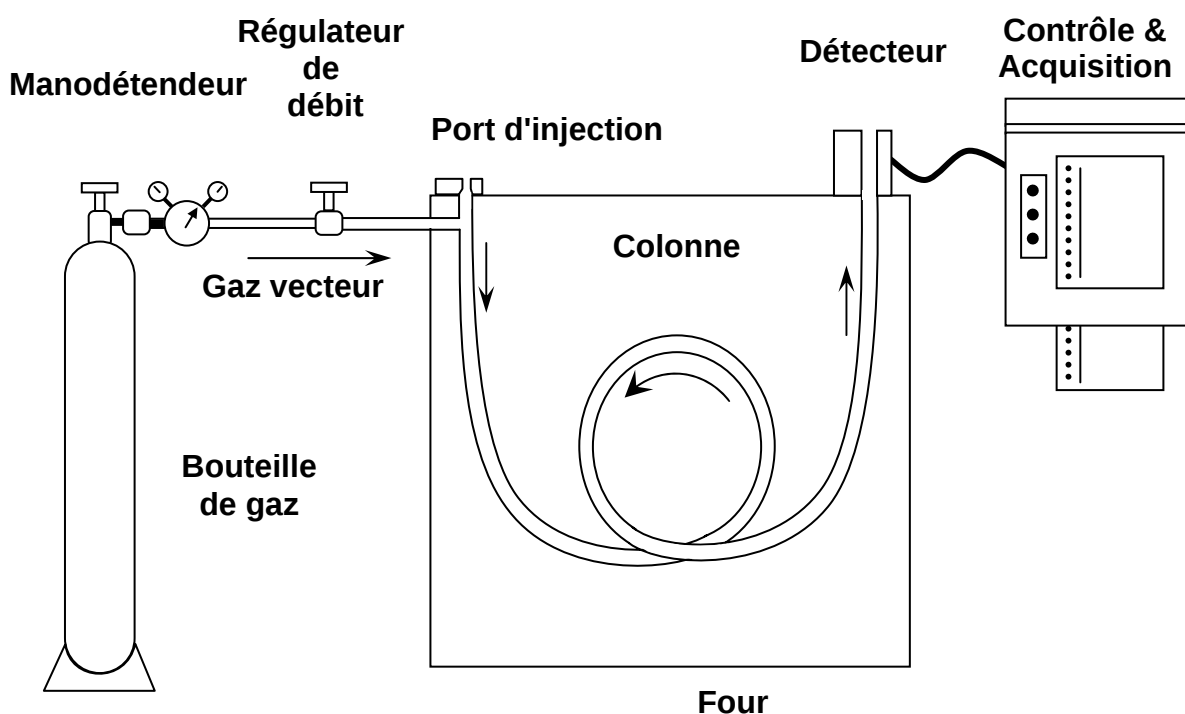


Fig.III.1 Schéma d'un chromatographe gaz [49]

III.2. Le gaz vecteur

Le rôle principal d'un gaz vecteur est de transporter l'échantillon à travers la colonne, c'est la phase mobile. Il est inerte et n'interagit pas chimiquement avec

l'échantillon.

Le second rôle est de fournir une matrice adéquate pour le détecteur dans l'analyse quantitative des constituants.

Le choix de la nature du gaz vecteur, qu'il soit l'azote, l'hélium, l'argon ou autre est lié à celui du détecteur.

Le contrôle du débit, de la pression ou de la vitesse du gaz peut être fait manuellement au moyen de régulateurs, ou automatiquement à l'aide d'un module de contrôle de débit.

III.3. L'injecteur

Le but principal de l'utilisation d'un injecteur est de faire parvenir, sans détérioration, soit la totalité de l'échantillon à la colonne, on parle alors d'injection sans division ou en **mode splitless** ; soit une partie représentative de celui-ci, on parle alors d'injection avec division ou en **mode split**.

Selon le type de colonne utilisée, l'état physique de l'échantillon, la quantité disponible de ce dernier, divers types d'injecteurs ont été proposés, on parle alors :

- d'injecteur on-column.
- d'injecteur splitless.
- d'injecteur splitter.
- d'injecteur à température de vaporisation programmée ou PTV.

Faire parvenir les constituants au niveau de la colonne exige, au préalable, un chauffage de l'injecteur par un système qui lui est propre ; la *température de l'injecteur* (T_I) est choisie de telle façon à faire évaporer tous les constituants de l'échantillon. Elle doit être supérieure à la température d'ébullition du constituant le moins volatile.

Les huiles essentielles doivent être analysées *sans dilution*, car le solvant masquerait les premiers pics [48].

Comme exemple d'injecteur utilisé, pas exclusivement, dans l'analyse des huiles essentielles, citons celui de la Fig. III.2 qui représente un injecteur pouvant être utilisé avec division (ou mode split), ou sans division (ou mode splitless).

La quantité à injecter ainsi que le choix d'un rapport de division (ou d'un débit de fuite) dépendent de plusieurs paramètres [48] :

- le volume du liner.
- la colonne.

- l'huile essentielle.
- le constructeur.

La purge du septum est faite afin d'éviter la contamination de l'échantillon par le passage des produits volatils de dégradation du septum dans **le liner** [48]

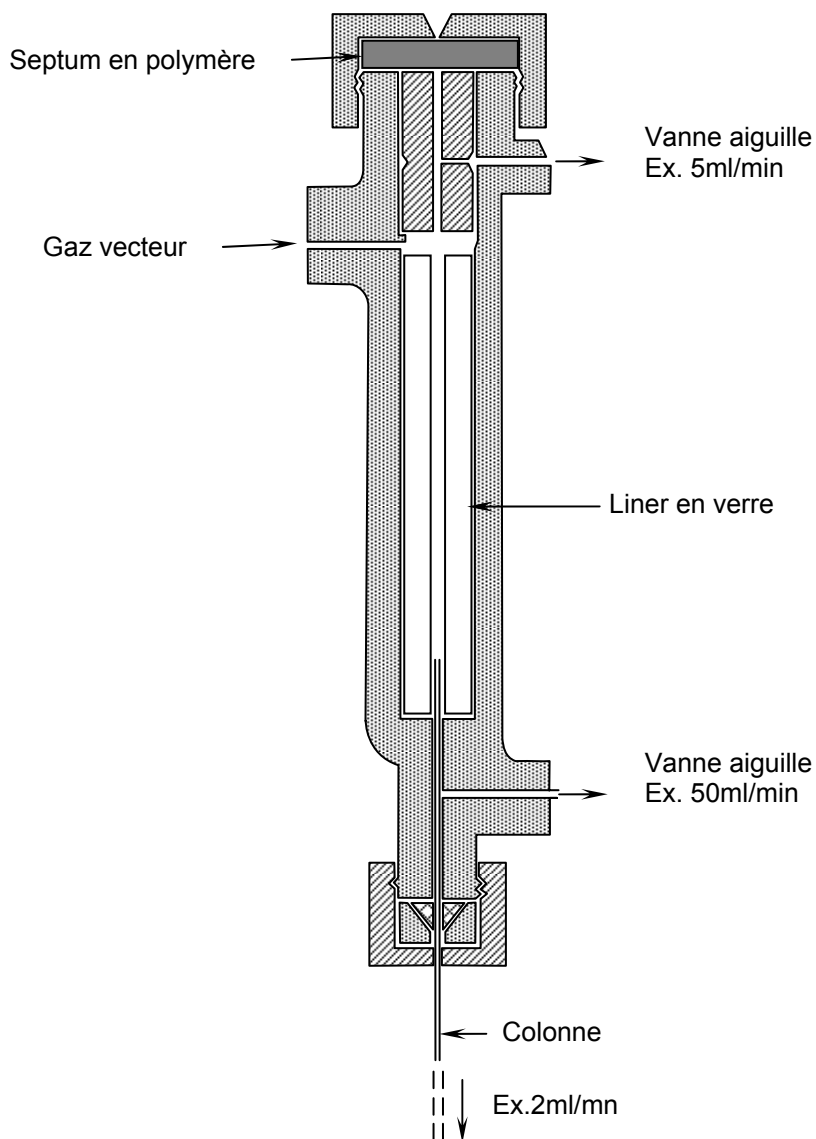


Fig.III.2. Représentation schématique d'un injecteur-diviseur [47]

III.4. Les colonnes

La colonne est le cœur du chromatographe [47] l'expression qui, à elle seule, suffit pour décrire l'importance de celle-ci. Elle est le lieu et l'outil de la séparation, but " suprême " de la chromatographie.

Les premières colonnes utilisées étaient des *tubes* métalliques **remplis** de supports inertes revêtus ou enduits de phases stationnaires.

Aujourd'hui, la majorité des colonnes utilisées sont fabriquées en *silice fondue* et sont des tubes ouverts (open tubes ou **OT**) de dimensions **capillaires** [47].

La colonne capillaire originale, inventée et brevetée par le Dr. Marcel Golay, était composée d'un *tube* avec un fin film de phase liquide imprégné sur sa surface interne, d'où le nom " wall-coated open tubular column " ou **WCOT** ; le tube peut être en silice fondue, en verre, ou en acier inoxydable.

Les colonnes capillaires introduites en 1959 n'ont pas été aussitôt largement utilisées. Ce n'est qu'à partir du début des années 1980 qu'ils ont vu leur succès s'agrandir [47].

Les deux types de colonne sont représentés dans la Fig.III.3.

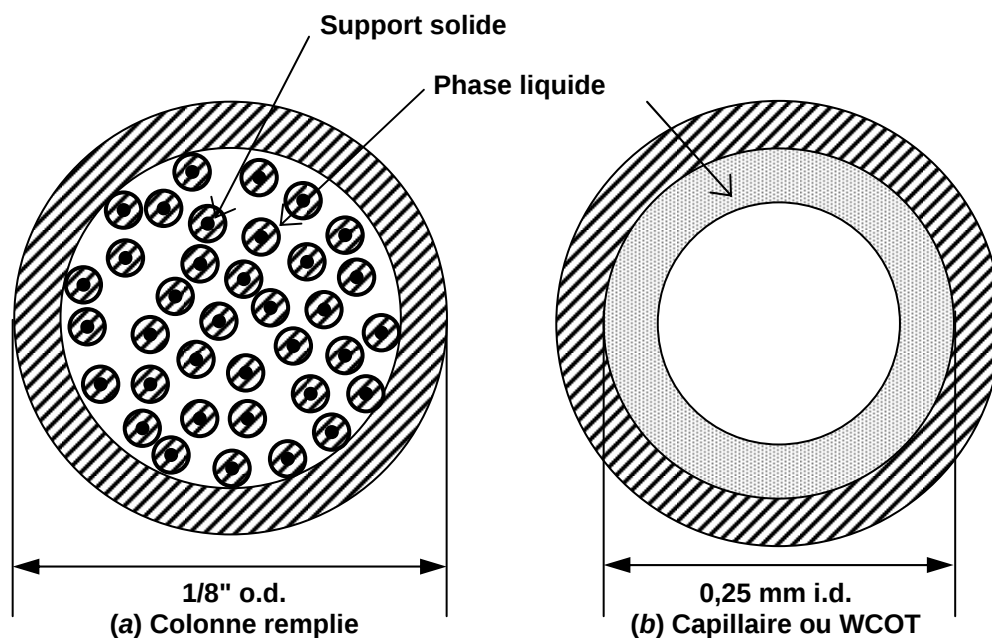


Fig.III.3. Représentation schématique (a) Colonne remplie et (b) Colonne capillaire [47]

L'introduction des colonnes capillaires de silice fondue *inerte* en 1979 a changé nettement la pratique de la chromatographie en phase gazeuse, permettant l'accomplissement des séparations à haute résolution dans la plupart des laboratoires. Antérieurement, de telles séparations ont été réalisées avec des colonnes en acier inoxydable *réactif* et avec des colonnes en verre.

La silice fondue est le matériau le plus *inerte* disponible pouvant être utilisé comme *tube* de colonne [47]. La plupart des colonnes chromatographiques ont un tube très mince, environ 25 micromètres, de cette manière, la silice fondue montre une *excellente flexibilité*. Cependant, le tube mince, extrêmement fragile, est sujet à la corrosion rapide lors d'exposition aux conditions atmosphériques. Pour éliminer la dégradation et augmenter la longévité de la colonne, une *gaine protectrice* mince, habituellement en *polyimide*, est appliquée à l'extérieur du tube (Fig.III.4) bien que d'autres matériaux soient utilisés. Cette couche de polyimide, qui obscurcit avec l'âge, protège la silice fondue contre l'humidité atmosphérique, et rend la colonne facile à manipuler [47,49].

La colonne capillaire de silice fondue a clairement émergé comme colonne de choix pour la plupart des applications de chromatographie gazeuse [49].

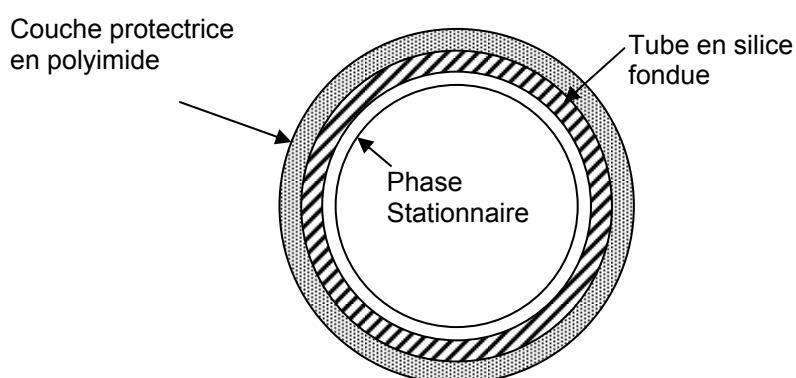


Fig.III.4 Colonne capillaire avec couche protectrice en polyimide

Après 1979, l'utilisation des colonnes remplies a commencé à diminuer. Une autre diminution dans l'utilisation des colonnes remplies s'est produite en 1983, avec l'arrivée de la colonne capillaire megabore de diamètre intérieur de 0,53 millimètres, qui sert comme alternative à la colonne remplie. Ces développements, avec

l'apparition des phases stationnaires immobilisées ou greffées, particulièrement adaptées pour les colonnes capillaires de silice fondue, et les améliorations globales en technologie de colonnes, ont été responsables de l'utilisation plus grande de la GC capillaire [49].

De nos jours, les colonnes remplies sont principalement utilisées en GSC comme dans les analyses de gaz [49].

Les colonnes capillaires de silice fondue sont synonymes de GLC. Cependant, des colonnes capillaires en chromatographie d'adsorption existent, nous avons alors :

- les colonnes capillaires à couche poreuse ou PLOT.
- les colonnes capillaires à support imprégné ou SCOT [47, 48,50]

Les colonnes capillaires WCOT présentent les meilleures *résolutions* parmi toutes les colonnes de la GC. Les diamètres internes (i.d.) des tubes de 0.10, 0.20, 0.25, 0.32, et 0.53 millimètres sont disponibles dans le commerce. Les longueurs typiques varient de 10 à 50 mètres, bien que des colonnes de 100 mètres aient été parfois utilisées et soient disponibles dans le commerce. Ces longues colonnes permettent des séparations très efficaces ; cependant, elles exigent de longues durées d'analyse [47].

L'épaisseur du film de la phase stationnaire varie de 0,1 à 5,0 micromètres.

III.5 Les phases stationnaires

III.5.1 Introduction

Il est commun de nommer une colonne par sa phase stationnaire ; et vice versa, on parle d'une colonne Carbowax 20 M ou d'une colonne polaire pour évoquer la structure ou la polarité de la phase stationnaire.

Définir une phase stationnaire, c'est parler de ses caractéristiques essentielles qui sont :

- sa température minimale d'emploi (T_{me}).
- sa température maximale d'emploi (T_{Me}).
- sa structure chimique.
- sa polarité [51].

III.5.2 Critères de choix d'une phase stationnaire

Une phase stationnaire est choisie principalement pour sa capacité de séparation des composés d'intérêt, mais des facteurs tels que la stabilité, la

disponibilité, la facilité d'utilisation, et le coût doivent être également pris en considération.

Deux types de phases stationnaires sont le plus couramment employés :

- les polysiloxanes.
- les phases de polyéthylène glycol.

Les deux types de phases peuvent être caractérisés par leur grande *viscosité* nécessaire et la capacité à la *réticulation* et/ou au *greffage* avec la silice fondue [49].

III.5.3 Effet de la polarité sur l'ordre d'élution

La séparation est régie par des interactions solutés-phase stationnaire, comme les interactions polaires et non polaires (dispersives). La colonne contenant une phase stationnaire polaire peut afficher une plus grande rétention pour un soluté ayant un groupe fonctionnel polaire donné, comparé à d'autres solutés de fonctionnalité différente, tandis que sur une phase stationnaire moins polaire l'ordre d'élution peut être modifié à des degrés variables [47-49].

III.5.4. Exemples de phases stationnaires

III.5.4.1. Les polysiloxanes

Beaucoup de polysiloxanes sont des gommes visqueuses. En tant que telles, elles s'étalent bien sur la silice fondue et peuvent être réticulées. Elles sont idéalement adaptées à la GC capillaire [49].

Les méthylpolysiloxanes sont les polysiloxanes de plus faible polarité. Ces phases forment les films les plus uniformes et les plus stables sur le verre et la silice fondue ayant pour résultat les efficacités de colonne les plus élevées. Leur excellente inertie, la large plage de fonctionnement de température (-60 °C à 350 °C) et leur longévité relative expliquent leur large utilisation en GC. La basse T_{me} de -60°C est également un avantage particulièrement dans l'analyse des composés extrêmement volatils [52].

L'interaction entre les solutés et les méthylpolysiloxanes sont en grande partie des forces de dispersion ; l'élution de solutés est basée sur leur tension de vapeur et, généralement, les solutés s'éluent selon leurs points d'ébullitions [49,52].

Les composants d'un échantillon sont toujours élués à une plus basse température dans le cas des colonnes apolaires, comparativement aux colonnes polaires, parce que les interactions moléculaires des phases apolaires avec les

composés de l'échantillon sont minimales. Ceci mène à une réduction de la température d'analyse qui est un avantage dans l'analyse des substances thermolabiles [52].

La relative haute T_{Me} de 350 °C est également un avantage particulièrement dans l'analyse des composés polaires à hauts points d'ébullitions.

Pour l'analyse des composés à l'état de traces, leurs faibles taux de " bleeding " est salulaire [52].

La structure de base du diméthylpolysiloxane à 100% peut être décrite par la Fig.III.5 ; elle est vendue sous les noms : DB1, HP1, RTX1 etc.

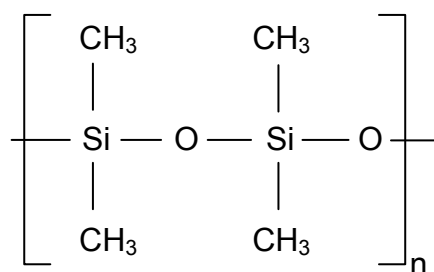


Fig.III.5. Structure de base à 100 % de diméthylpolysiloxane

La substitution des groupes méthyliques avec une autre fonctionnalité permet d'attribuer au polymère une polarité relative.

La structure des polysiloxanes substitués peut être décrite par la Fig.III.6, là où les groupes R peuvent être CH₃ (Methyl), C₆H₅ (phényle), CH₂CH₂CF₃ (Trifluoropropyl), ou CH₂CH₂CH₂CN (Cyanopropyl) ; m et n indiquent le pourcentage d'un agrégat dans la composition globale de la phase stationnaire du polymère. Un intervalle de polarités peut être fourni en changeant le pourcentage des groupes polaires ; par exemple les groupes de phényle et de cyanopropyl [47,49].

Dans le cas de la phase HP-5 ou de ses équivalents chimiques, R1 et R2, sont des groupes phényles ; m et n ont respectivement les valeurs de 95 et de 5%.

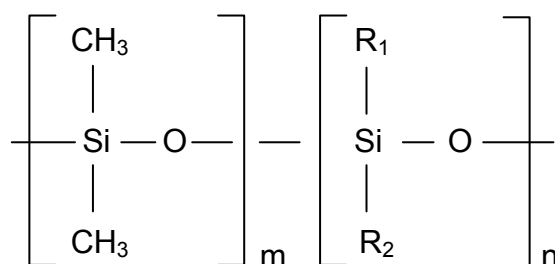


Fig.III.6. Structure des polysiloxanes substitués

III.5.4.2. Les phases de polyéthylène glycol

Les phases stationnaires non-polysiloxanées les plus couramment employées sont les polyéthylèneglycols (P.E.G). Elles sont disponibles dans le commerce dans un éventail de poids moléculaires sous plusieurs désignations, tels que Carbowax 20M et Superox-4. La structure générale d'un polyéthylène glycol peut être décrite par la Fig.III.7.

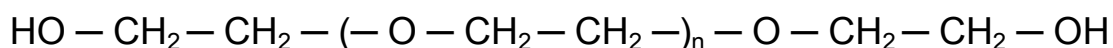


Fig.III.7. Structure générale d'un polyéthylène glycol

En général, les phases polaires permettent une meilleure séparation des isomères même lorsque les différences structurales sont minimales comme dans le cas des isomères du xylène. Malheureusement, leurs propriétés de fonctionnement sont inférieures à celles des polysiloxanes. Elles ont des T_{me} relativement élevées, et les T_{Me} basses [52].

Les Superoxes ont une température de fonctionnement plus élevée que le Carbowax 20M tout en maintenant une polarité similaire.

La polarité du polymère polyéthylène glycol est influencée par son poids moléculaire. Les polyéthylèneglycols de poids moléculaire inférieur (tels que les Carbowaxes 6000, 4000, 1500, 400) ont une polarité plus élevée que celle du

Carbowax 20 M et des T_{me} et T_{Me} inférieures également à celles du Carbowax 20M [52].

III.5.5. Dégradation des phases stationnaires

Des traces d'oxygène et d'eau ont des effets nuisibles sur la plupart des phases liquides, en particulier le Carbowax 20M, où elles accélèrent le processus de dégradation de la phase, particulièrement à températures élevées [47,49, 50, 52]. L'oxydation du Carbowax 20M produit des traces d'acétaldéhyde [49, 50,52] et d'acide acétique [50,52].

Les colonnes de polyéthylèneglycol devraient être gardées sous gaz inerte avec les extrémités scellées [52].

La perte de fragments de faible poids moléculaire avec le chauffage est une source de " *bleeding* " de la colonne et peut également mener aux changements de la polarité de la colonne. Des changements dans l'ordre d'élution des solutés peuvent alors se produire.

III.5.6. Conclusion

Les huiles essentielles ont une composition très complexe pouvant contenir à la fois des composés polaires et apolaires avec des teneurs variables. Le cas d'existence d'énantiomères n'est pas à écarter, cependant, le nombre de colonnes pour un laboratoire particulier peut être réduit à quelques unes.

La majorité des analyses peuvent être réalisées sur des colonnes contenant 100% de polysiloxane diméthylque (DB-1) ou methylpolysiloxane phénylique de 5% biphenyle/ 95% dimethylsiloxane (DB-5), un cyanopolysiloxane, et un polyéthylène glycol (DB-wax).

Une sélectivité supplémentaire dans une séparation peut être réalisée en utilisant un trifluoropropylpolysiloxane ou en changeant la teneur cyano et phénylique des phases [49].

III.6. Le four de la colonne

La colonne est placée dans une enceinte, qui est le four, thermiquement contrôlée par un système électronique.

La colonne fonctionne à une température où l'échantillon a une **tension de vapeur**, il n'est pas nécessairement demandé qu'il soit à l'état gazeux. En GC, la température de la colonne doit être supérieure au "point de rosée" de l'échantillon mais non pas supérieure à son point d'ébullition [47].

Il est possible, et selon le cas, de faire une analyse en **isotherme**. L'existence de pics de volatilités très proches et de polarités similaires diminue la "distance" entre les pics voire même à les co-éluer. Dans de telles circonstances, il faut plutôt travailler en isotherme, à une température assez basse permettant la meilleure résolution.

Lorsque l'échantillon comporte des constituants de volatilités différentes, utiliser l'isotherme comporte beaucoup d'inconvénients, notamment la perte de contrôle de la durée de l'analyse ou de la résolution des pics, comme le montre la Fig. III.8 [49].

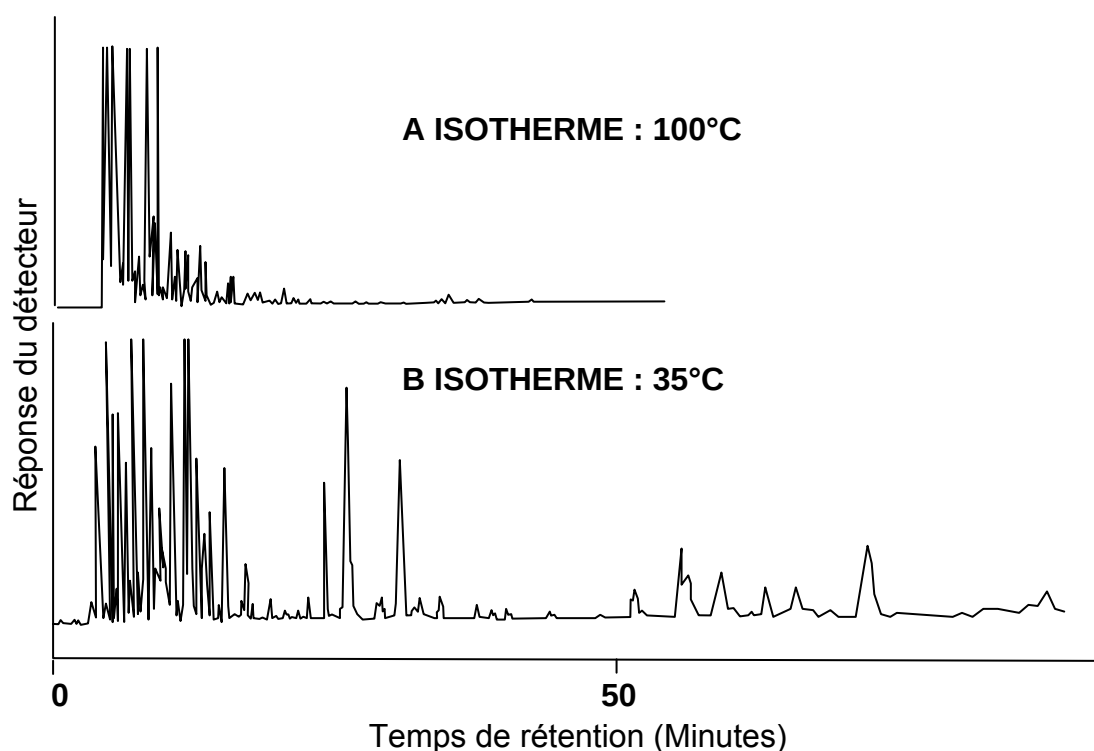


Fig.III.8. Effet de la température d'analyse sur la résolution et le temps d'analyse [49]

Il est fort recommandé de recourir à la **programmation de température du four** de la colonne lorsque l'on est en présence d'un mélange aussi complexe, comme c'est très souvent le cas des huiles essentielles.

La programmation de température ne se fait pas d'une manière aléatoire, ni d'une manière systématique ; elle obéit à certaines règles. La théorie de la programmation de température en GC a été étudiée pour la première fois par HABGOOD et HARRIS [53]. Il existe différents types de programmation de température balistique, linéaire, et multilinéaire. (Fig.III.9).

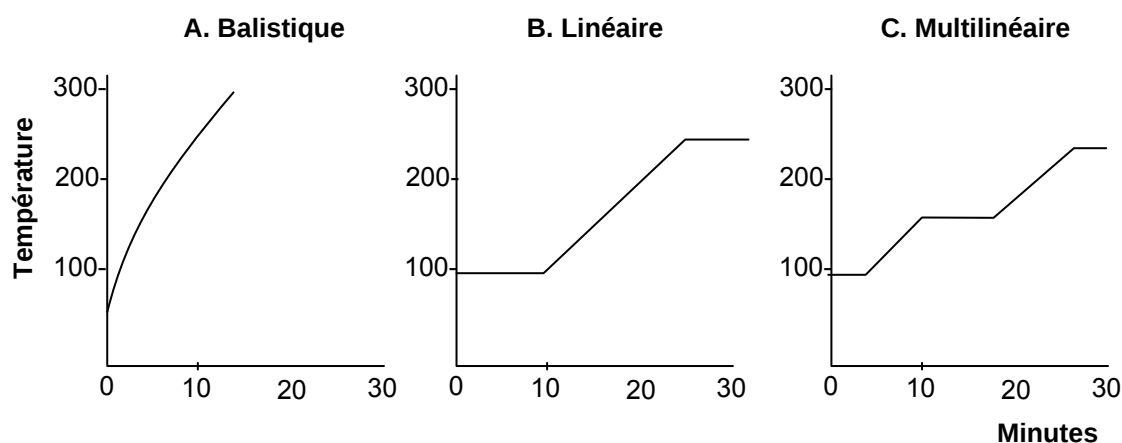


Fig.III. 9.Types de programmation de température : A. Balistique, B. Linéaire, et C. Multilinéaire [49].

Dans le cas le plus simple (c.-à-d. celle d'une **programmation linéaire de température**), elle commence par un palier isotherme, d'une certaine durée, suivi d'une ascension de température avec une pente donnée, et se terminant enfin par un dernier palier isotherme d'une certaine durée. Les questions qui se posent sont les suivantes :

1. Sur quelle base se fixe la température du premier palier T_{PP} ?
2. Sur quelle base se fixe la durée de ce premier palier D_{pp} ?
3. Sur quelle base se fixe la valeur de la pente d'ascension de température P_a ?
4. Sur quelle base se fixent la température T_{dp} et la durée du dernier palier D_{dp} ?

Une T_{PP} très élevée rapproche temporellement les pics, ce qui diminue la résolution.

La température du premier palier est régie par deux grandeurs :

- La température minimale d'emploi de la phase stationnaire T_{me} .
- La température du "point de rosée" la plus basse des constituants T_{prb} .

Dans le cas où T_{me} est inférieure à T_{prb} , le problème ne se pose pas et T_{PP} est égale ou légèrement inférieure à T_{prb} . Dans le cas contraire (c.-à-d. $T_{prb} < T_{me}$), il faut prendre $T_{PP} = T_{me}$.

L'augmentation de la D_{pp} augmente la résolution des premiers pics, en conséquence, elle doit être suffisante pour résoudre ces derniers.

A la question 3, une première tranche de la réponse est donnée par la figure Fig.III.10 qui montre que le temps d'analyse globale diminue lorsque la pente augmente (A), ce qui est en lui-même un avantage, mais la résolution diminue ce qui est un inconvénient, et vice versa dans (B).

La deuxième tranche de la réponse est que la pente de la rampe peut avoir une influence sur le profil de la ligne de base. L'accroissement de la pente de la rampe augmente la montée de la ligne de base [49].

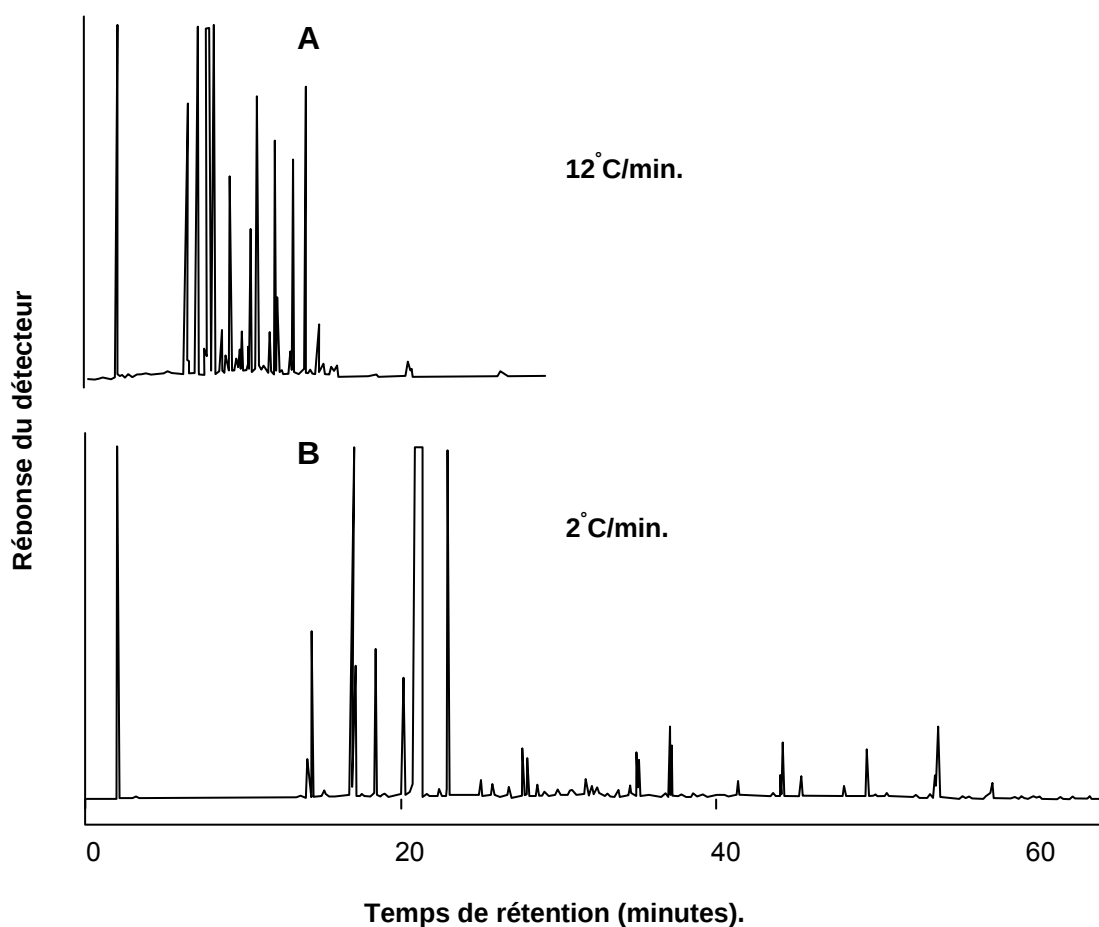


Fig.III.10. Effet de l'élévation de la température sur la résolution et le temps d'analyse [49].

La réponse à la première tranche de la question 4 est que la T_{dp} dépend essentiellement de deux (2) paramètres :

- La T_{Me} , où l'on doit avoir $T_{dp} \leq T_{Me}$.
- La T_I , où l'on doit avoir $T_{dp} \geq T_I$.

La durée du dernier palier D_{dp} est très souvent limitée par le constructeur de la colonne. En règle générale, le maintien des hautes températures d'élution pour des périodes prolongées réduit d'une part la durée de vie de la colonne et augmente d'autre part le " bleeding " de la colonne [49].

III.7. Le détecteur

III.7.1. Introduction

Le principe de base du fonctionnement d'un détecteur repose sur la surveillance des propriétés physico-chimiques, soit de tous les constituants ou spécifiquement de certains d'entre eux à leurs sorties de la colonne, soit celle du gaz vecteur, en produisant un signal en réponse aux variations de ces propriétés en raison des composants élués [45,48]. Des détecteurs tels que les détecteurs à ionisation de flamme (FID), à capture électronique (ECD) et à conductivité thermique (TCD) n'identifient pas les composants. Des techniques supplémentaires, comme la spectrométrie de masse, sont utilisées pour aider à l'identification des composants élués [45].

Le chromatogramme est un tracé du signal du détecteur en fonction du temps. Il constitue un profil de concentration des molécules présentes dans le gaz vecteur lorsqu'elles passent dans le détecteur [45].

III.7.2. Le détecteur à ionisation de flamme

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) a été introduit en 1958 par MC William et al [49]. Pour plusieurs raisons Il est devenu le détecteur le plus utilisé :

- Il répond pratiquement avec une sensibilité élevée à tous les composés organiques.
- Les variations simples du flux, de la pression, ou de la température ont un effet minimal sur ses caractéristiques de réaction.
- En mode de fonctionnement normal, il ne répond pas aux impuretés communes du gaz vecteur telles que l'eau ou l'anhydride carbonique.

- Une fois correctement installé, il a une ligne de base stable.
- Il possède un domaine de linéarité très large, autour de 10^8 .
- Il est facilement ajustable [45,49].

Le FID est un exemple de détecteurs à ionisation inventé spécifiquement pour la GC. Si des composés organiques, effluents de la colonne, brûlent dans une petite flamme oxyhydrique, quelques ions sont alors formés dans le processus. Ceux-ci sont rassemblés à une électrode et produisent une augmentation du courant proportionnelle à la quantité de carbone dans la flamme. Le courant est amplifié par un électromètre, courant qui devient le signal [47,49].

Une conception typique d'un FID est montrée sur la Fig. III.11.

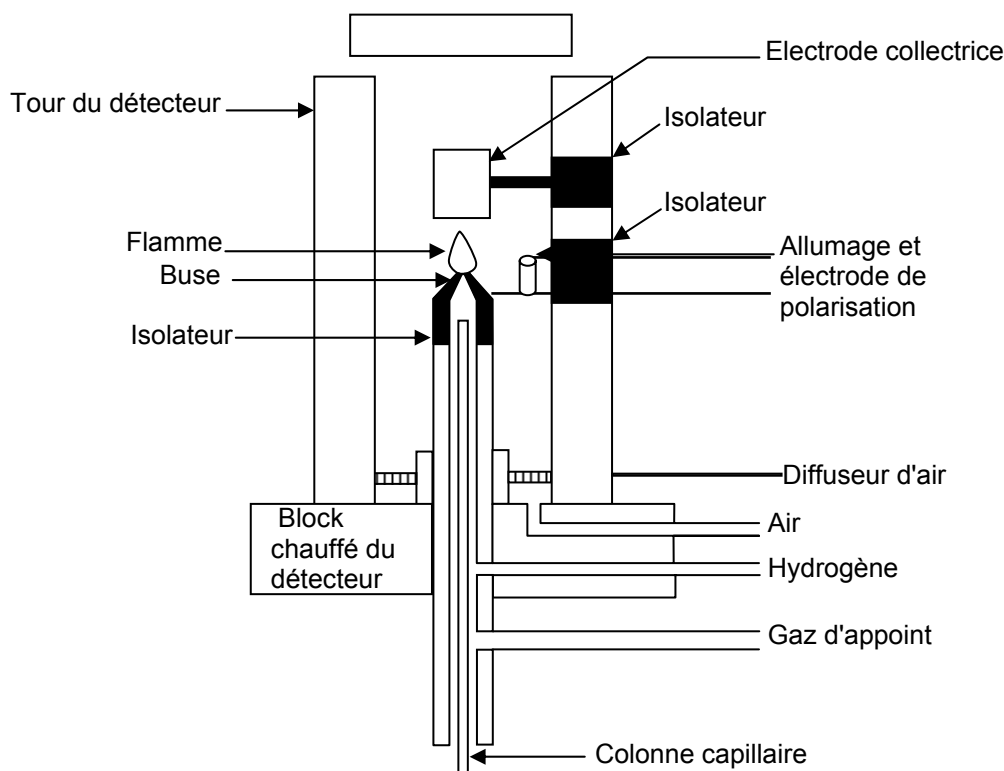


Fig.III.11. Schéma d'un détecteur à ionisation de flamme [49].

Puisque l'eau est produite dans le processus de combustion, le détecteur doit être chauffé au moins à 125°C pour éviter la condensation de l'eau [47] et doit être supérieure de 20°C à la température maximale programmée pour le four de la colonne pour éviter la condensation des constituants à hauts points d'ébullition [54]. La plupart des FID fonctionnent à 250°C ou plus [47].

III.8. L'analyse qualitative

III.8.1. Introduction

Le premier élément obtenu à partir d'un chromatogramme GC est simplement le temps de rétention pour un constituant donné du mélange ; c'est cette information qui est utilisée dans l'analyse qualitative [49].

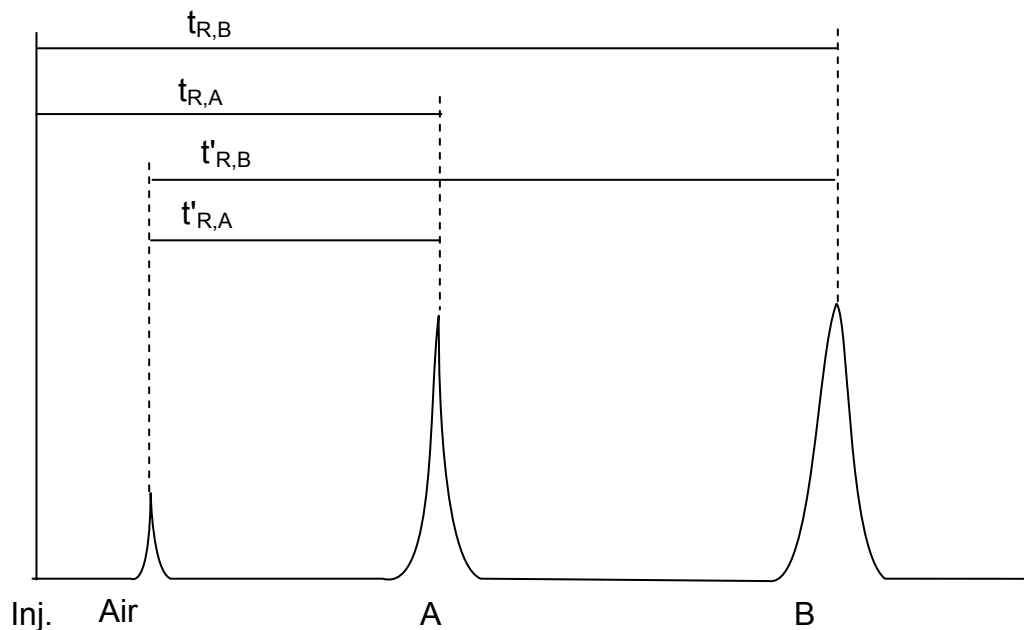


Fig.III.12 Chromatogramme illustrant la nomenclature de rétention :
 t_R = temps de rétention, t'_R = temps de rétention ajusté.

III.8.2. Utilisation des étalons

L'analyse qualitative par GC dans le sens classique comporte la comparaison des données de *rétention* d'un composé inconnu avec celles d'un composé authentique connu [49, 52,55].

Le *temps de rétention* pour un soluté indiqué peut être utilisé pour son identification si les variables suivantes de la colonne sont constamment gardées : longueur, phase stationnaire et son épaisseur, température, et pression [47].

III.8.3. Emploi de diverses colonnes

Question : Pourquoi utilise-t-on toujours deux colonnes de polarités différentes lors de l'analyse des huiles essentielles ?

Réponse : La multitude de substances qui sont analysées aujourd'hui n'excluent pas une co-élution. Ce qui peut mener à de fausses interprétations. En effet, deux composés appartenant à deux séries homologues différentes peuvent avoir, des temps de rétention identiques sur une colonne particulière ; cependant, si les deux mêmes composés sont examinés avec une colonne de polarité différente, il est peu probable que l'égalité des temps de rétention se reproduise encore [45].

III.8.4. Emploi de l'indice de rétention comme moyen d'identification

III.8.4.1. L'indice de KOVATS

L'enregistrement des données de rétention tel que le temps de rétention absolue t_R est sans signification, parce que pratiquement chaque paramètre chromatographique et chaque fluctuation expérimentale qui lui sont associés, affectent la mesure du temps de rétention.

Dans l'approche de Kovats, l'indice I de rétention d'un n-alcane lui est assignée une valeur égale à 100 fois son nombre de carbone. Ainsi, par exemple, les valeurs I du n-octane, du n-décane, et du n-dodécane sont par définition, respectivement égales à 800, 1000, et 1200 et sont applicables sur n'importe quelle colonne, remplie ou capillaire, pour n'importe quelle phase stationnaire et sont indépendants de chaque condition expérimentale, y compris la température de la colonne.

Pour tous les autres composés, l'indice de rétention est alors égal à 100 fois le nombre de carbones d'un n-alcane hypothétique, montrant le même temps de rétention que la substance étudiée [52], les conditions chromatographiques, telles que :

- la température de la colonne.
- la phase stationnaire et son support (dans le cas des colonnes remplies).
- l'épaisseur du film (pour les colonnes capillaires), doivent être indiqués ; autrement les valeurs I sont sans signification [49].

L'indice de Kovats peut être calculé à partir de l'équation Eq.III.1.

$$RI_x = 100 \times \left[N + \frac{\text{Log} \frac{t'_{R,X}}{t'_{R,N}}}{\text{Log} \frac{t'_{R,N+1}}{t'_{R,N}}} \right] \quad \text{Eq.III.1}$$

où $t'_{R,x}$, $t'_{R,N}$ et $t'_{R,N+1}$ représentent respectivement les temps de rétention ajustés du composé x et des n-alcanes de référence, ayant N et (N+1) atomes de carbones et élués juste avant et juste après le composé x.

L'indice de rétention attribué à Kovats est devenu une méthode fiable d'échanges des données de rétention, remplaçant ainsi les paramètres absolus de rétention. Si un paramètre de rétention doit être utilisé pour l'identification, l'indice de rétention de Kovats est une méthode de choix [47].

La combinaison de deux indices mesurés une fois avec une phase stationnaire apolaire et l'autre fois avec une colonne polaire, peut suffire pour caractériser la substance en question [56].

Ce système d'identification fonctionne très bien dans tous les cas d'analyses de routine où l'on est sûr de la composition chimique une fois établie [56].

III.8.4.2 L'indice de rétention en programmation de température

Afin d'appliquer le concept d'indice dans l'analyse en GC dans des cas non-isothermes, KRATZ et VAN DEN DOOL ont modifié en 1963 [57] le système de KOVATS pour qu'il puisse être appliqué dans le cas particulier d'une programmation linéaire de température (caractérisée par deux variables : température initiale, et son taux d'incrément, on a dans ce cas $D_{pp}=D_{dp}=0$), on parle alors d'indices de rétention linéaire LRI.

$$RI_x = 100 \times \left[N + \frac{(t_{R,X} - t_{R,N})}{(t_{R,N+1} - t_{R,N})} \right] \quad \text{Eq.III.2.}$$

Cependant, les valeurs ainsi obtenues sont moins précises que dans le cas d'une chromatographie isotherme [48].

III.8.5. Méthode du " Finger-print "

Il y a beaucoup de cas, particulièrement dans l'analyse des mélanges très complexes, où l'identification de la source du mélange peut être déterminée sans identification individuelle de toute entité chimique unique dans le mélange. Dans ces cas, les chromatogrammes des mélanges sont simplement utilisés en quelque sorte en tant qu'empreinte digitale ; l'origine d'un échantillon peut être déterminée en comparant son chromatogramme d'empreinte digitale avec l'empreinte digitale d'un échantillon connu pour être véritable [49].

Cette méthode est utilisée en particulier par le contrôle des fraudes pour les produits naturels ; la présence ou l'absence de certains pics permet de savoir si le composé est naturel ou non.

Cette méthode est perfectionnée par l'emploi de l'outil informatique par la constitution de banques de données de profils chromatographiques permettant ainsi une comparaison précise [48].

Cette méthode d'empreinte digitale est une technique importante de la GC qui ne devrait pas être négligée [49].

III.9. Conclusion

Il y a trois principes au sujet des temps de rétention obtenus sur un instrument donné avec une colonne donnée fonctionnant dans des conditions expérimentales données. Ces principes doivent être **connus et compris**, avant que des données qualitatives utiles puissent être obtenues à partir du GC seulement.

- Le premier principe (le plus important) : " si le temps de rétention d'un composé A est égal au temps de rétention d'un composé inconnu, ***ceci ne montre pas*** que le composé inconnu est le composé A". Ce qui est *le plus grand piège de l'analyse qualitative* ; C'est ce constat qui empêche la GC d'être un outil qualitatif exceptionnel.
- Le deuxième principe : " si le temps de rétention d'un composé A n'est pas égal au temps de rétention d'un composant inconnu, alors nous pouvons dire, avec la *certitude absolue*, que le composant inconnu n'est pas le composé A ".
- Le troisième principe : " si nous n'avons aucun pic perceptible ayant le temps de rétention du composant A, nous pouvons dire avec

certitude que le composé A n'est pas présent dans l'échantillon dans nos limites de détection.

Beaucoup de facteurs doivent être considérés dans la comparaison de toute mesure de rétention.

La précision des données dépend généralement de la capacité de l'instrument à contrôler la température de la colonne et le débit du gaz vecteur [49].

L'existence de plus de 30000 composés organiques d'usage courant ne permet pas à la GC, à elle seule, d'être utilisée pour identifier un composé unique parmi ce grand groupe [47].

La technique GC est, dans le meilleur des cas, un moyen **insuffisant** d'analyse qualitative [49]. Des techniques supplémentaires, comme la spectrométrie de masse, sont utilisées pour aider à l'identification des composés élués.

Chapitre IV

L'analyse des huiles essentielles par GC/MS

IV

L'analyse des huiles essentielles par GC/MS

IV.1. Introduction

La chromatographie est surtout une méthode de séparation et d'analyse quantitative. La spectroscopie de masse est une méthode essentiellement d'identification. Le premier système, en tandem, efficace à être développé était la combinaison de la GC avec le spectromètre de masse par HOLMES et MORREL. Le couplage GC/MS réunit le meilleur de ces deux techniques. Ce couplage répond aux exigences de base de toute analyse et qui sont :

- la séparation.
- l'identification.
- la mesure quantitative.

Les analystes du pétrole, des huiles essentielles et des industries de solvants étaient les premiers à être satisfaits par cette combinaison de séparation/identification [48,54].

IV.2. Description du GC/MS

Le système GC/MS comporte (Fig.IV.1) :

- un chromatographe GC.
- une interface.
- un spectromètre de masse.
- un système informatique.

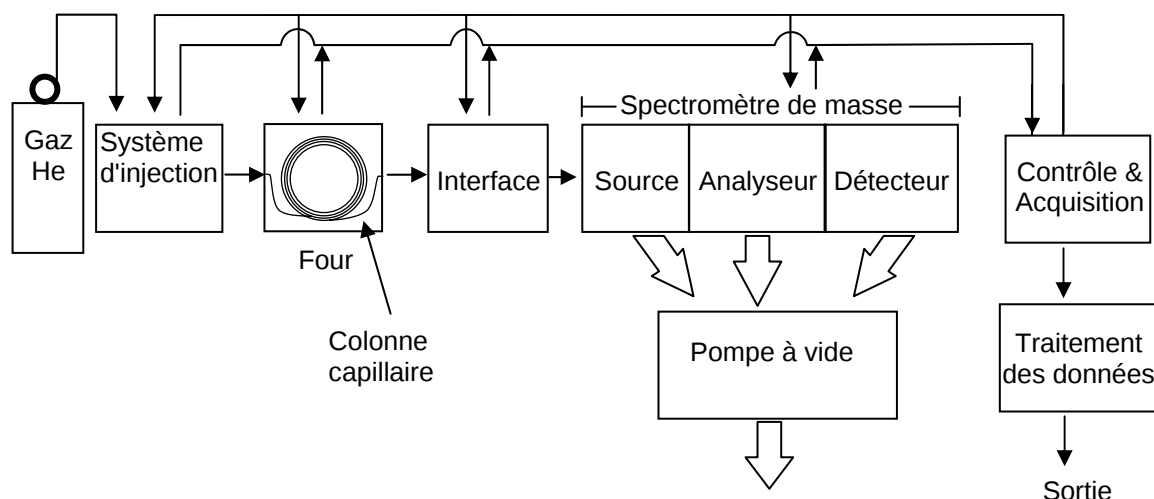


Fig.IV.1 Représentation schématique du système GC/MS

IV.3. L'interface GC/MS

IV.3.1.Introduction

L'interface GC/MS constitue le système d'introduction des éluants de la colonne GC au spectromètre de masse (MSD).

Avant que les colonnes capillaires aient été introduites en GC, diverses interfaces étaient développées pour les systèmes GC/MS utilisant des colonnes remplies. Le but de tous ces dispositifs étant l'élimination de la majeure partie du gaz vecteur, éluant du chromatographe avec un débit d'environ 30 ml/mn, avant son introduction dans le spectromètre de masse, en enrichissant de ce fait la concentration en constituants [45, 47,49, 54].

IV.3.2. L'interface directe

La GC capillaire permet le raccordement direct de la colonne chromatographique au spectromètre de masse puisque les débits sont sensiblement réduits, typiquement, de 30 à 1 ml/mn [49].

Lorsqu'une interface de raccordement direct est utilisée, l'extrémité de la colonne GC n'est pas à la pression atmosphérique, comme avec un FID, mais sous vide (Fig.IV.2.). Le vide, nécessaire pour le bon fonctionnement du spectromètre de masse (MSD), signifie que le débit maximum de colonne pouvant être utilisée dépend du système de vide du MSD.

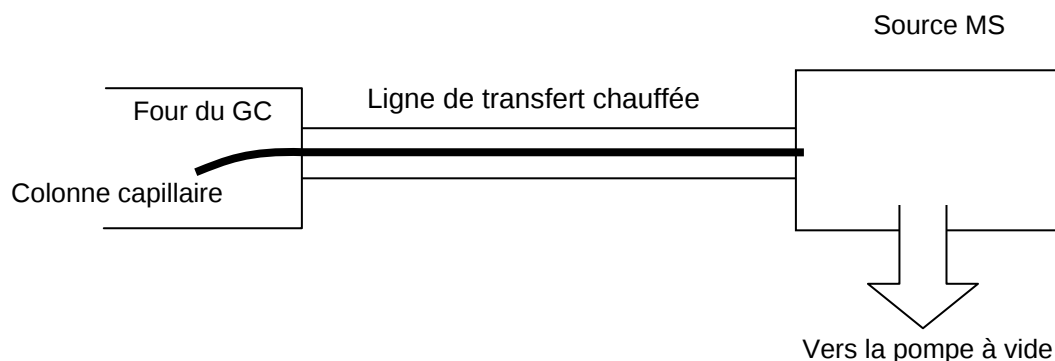


Fig.IV.2. Schéma simple de la ligne de transfert

Afin de préserver l'intégrité de l'échantillon et d'éviter la condensation de constituants dans la ligne de transfert, la température de la ligne de transfert doit être contrôlée. Elle doit être, au minimum, égale à la température T_{dp} du four. La température de la ligne de transfert est communément appelée température de l'auxiliaire.

IV.4. Le détecteur à spectrométrie de masse ou MSD

IV.4.1. Description du MSD

Le spectromètre de masse joue le rôle du détecteur pour le système GC, d'où le nom MSD, il comprend (Fig.IV.1) :

- la source d'ionisation
- l'analyseur
- le détecteur
- les pompes à vide
- le système de chauffage

IV.4.2. L'analyseur

A leur sortie de la source, les ions sont séparés selon leurs rapports masse/charge (M/Z). L'analyseur agit sur les ions par application d'une force électrique et/ou d'une force électromagnétique. On distingue deux types d'analyseurs :

- les analyseurs statiques dont le champ de force appliqué par l'analyseur est constant.
- les analyseurs dynamiques, dans le cas contraire [60].

Les analyseurs sont caractérisés par leurs performances qui sont :

- la résolution.
- la sensibilité.
- la gamme de masse analysable.
- la précision sur la mesure d'une masse.
- la vitesse d'acquisition.

Ces diverses performances varient selon le type d'analyseur [61].

IV.5. L'outil informatique

IV.5.1. Introduction

L'acquisition des données est précédée par un **calibrage** du MSD, condition " sine qua none " d'un traitement de données. Tout calibrage erroné conduit obligatoirement à des résultats erronés [45].

A l'inverse du GC où il y a possibilité de travailler sans micro-ordinateur, nul ne peut prétendre aujourd'hui avoir la possibilité de le faire avec la GC/MS.

La GC/MS n'est pas une équation qui peut être réduite à : $GC/MS = GC + MS$.

La présence d'une chemstation, c'est-à-dire d'un **micro-ordinateur** équipé d'un **logiciel**, qui a au moins pour tâche le *contrôle d'instruments*, l'*acquisition* des données et son bon déroulement nécessite la présence obligatoire d'un *microprocesseur*, donc d'un *micro-ordinateur* dans le GC/MS ; elle en est une partie intégrante [45].

IV.5.2. Installation et configuration du matériel au logiciel

Le logiciel, conçu pour piloter la GC/MS, peut être utilisé pour le pilotage de un ou de plusieurs instruments. L'installation complète du logiciel ne peut se faire qu'après **configuration** du matériel au logiciel c'est-à-dire indiquer au logiciel les instruments qui lui sont attachés et leurs caractéristiques, c'est le cas du logiciel chemstation d'AGILENT et du logiciel Xcalibur de FINNIGAN.

IV.5.3. Traitement des données – L'analyse qualitative

IV.5.3.1. Introduction

Si le contrôle d'instruments et l'acquisition des données est du seul ressort du logiciel lié à la marque, il existe cependant pour le traitement des données plus d'un logiciel.

Comme exemple de logiciel non lié à une seule marque, et ayant de hautes performances, l'**AMDIS** (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System). Ce logiciel conçu au début pour le traitement des cas relatant des institutions spéciales, comme celles du contrôle de non-prolifération d'ADM ou des affaires de drogues, est livré avec des bibliothèques de données correspondant à ces missions en plus d'autres, dont une relative aux huiles essentielles.

L'inconvénient de ce logiciel est qu'il ne peut pas gérer de grandes bibliothèques comme la **WILEY** ou la **NIST**.

Le grand avantage de ce logiciel est qu'il peut traiter des fichiers de données provenant de "**presque n'importe quelle marque**" de GC/MS et que l'inconvénient cité ci-dessus peut être surmonté en travaillant en **DUO** avec le **logiciel NIST (MS Search)** qu'il faut distinguer de la **bibliothèque NIST** [58].

IV.5.3.2. Principe de fonctionnement des logiciels de traitement des données

IV.5.3.2.1. Introduction

Plusieurs **algorithmes** ont été développés avec succès, pour comparer le spectre de masse d'un inconnu à ceux d'une bibliothèque de composés connus, le plus largement utilisé est celui **basé sur la probabilité de correspondance (PBM)**, développé par le prof McLafferty et ses collaborateurs à l'université de Cornell [59].

Cet algorithme de recherche compare le spectre de masse d'un composé inconnu à une bibliothèque de spectre en utilisant une **recherche inverse**.

Une recherche inverse vérifie si les pics se trouvant dans une référence de spectres sont présents au niveau du spectre de l'inconnu [49].

IV.5.3.2.2. Diversité des modes d'investigations

Le fichier informatique résultat de l'acquisition, visualisé par le logiciel de traitement de données, nous donne en apparence un chromatogramme qu'on désigne par **TIC** (ou *Courant Ionique Total*) ; il diffère complètement de celui obtenu en GC. Il cache en chacun de ses " points " un spectre de masse correspondant, dans le cas idéal, à un seul composé inconnu. Le TIC est un chromatogramme "tridimensionnel".

L'investigation ou recherche de l'identité de chaque inconnu nécessite obligatoirement la présence, au moins, d'une bibliothèque de spectres de références.

Cette investigation peut se faire, selon les performances du logiciel, de deux manières ou modes, on a :

- **Le mode manuel** qui effectue une recherche inverse relative à un seul spectre de masse.
- **Le mode automatique** qui effectue une recherche inverse selon un **paramétrage** du logiciel, sur une **partie** du chromatogramme (TIC), ou sur sa **totalité**.

Les modes cités précédemment sont expliqués en détail dans les manuels de l'utilisateur des logiciels correspondants.

IV.5.3.3. Les banques de données numérisées

IV.5.3.3.1. Introduction

Les banques (ou bibliothèques) de données constituent un outil capital dans l'identification des constituants d'un échantillon. La richesse d'une bibliothèque dépend de trois critères :

- la qualité de chaque spectre de masse des différents constituants de la bibliothèque.
- le nombre de composés incorporés.
- la diversité des spectres de masse pour un même composé (Fig.IV.5).

Une bibliothèque comporte des spectres de masse d'un certain ensemble de composés sous formes numérisées (la **NIST 05** comporte **190 825** spectres de masse pour **163198** composés). Pour un spectre d'un composé donné on a obligatoirement un nom (et parfois des synonymes), et un numéro de référence interne propre à la bibliothèque.

Très souvent, il y a présence d'un **numéro de CAS** (du chemical abstract), la présence d'une structure du composé étant facultative.

Un numéro de CAS s'écrit avec l'une des formes suivantes :

- 123456-12-1 (six chiffres au maximum, un premier tiret, deux chiffres, un deuxième tiret, et enfin un chiffre)
- 123456121 (absence de tirets)

IV.5.3.3.2. Problèmes rencontrés dans les banques de données

Malgré l'attention donnée à la réalisation des bibliothèques de spectres, des erreurs et/ou des défauts existent. Ces erreurs ou défauts peuvent être une entrave lors de l'identification des inconnus. Parmi ces problèmes nous avons :

- Un premier problème, qui est de taille, est celui **du numéro de CAS** ; par :
 - son absence, pour certains composés (Fig.IV.3)
 - une multitude de numéros, pour d'autres (Fig.IV.4).
 - ou par une forme erronée de son écriture.
- Un second problème est celui de la diversité des noms et des synonymes (Fig.IV.4)
- Un troisième problème est celui de la diversité des spectres de masse pour un même composé (Fig.IV.5(f)), dus à la diversité des types d'analyseurs, d'une part, et aux conditions expérimentales d'autre part [59], ce qui affecte le pourcentage de concordance lors de la comparaison d'un spectre de référence avec un spectre expérimental. Les analystes, qui au passé, par manque ou par pauvreté de bibliothèques numérisées, se sont confrontés avec ce type de problèmes en essayant de comparer visuellement des spectres expérimentaux avec d'autres se trouvant dans la littérature et ayant été obtenus dans des conditions différentes.

Name: trans-chrysanthemol
Formula: C₁₀H₁₈O
MW: 154 CAS#: N/A NIST#: N/A ID#: 53230 DB: wiley7n
Other DBs: None
Comment: QI=560, Source=LQ-1992-3188-0
10 largest peaks:
123 999 | 81 609 | 51 240 | 93 170 | 67 170 |
79 170 | 154 150 | 111 150 | 95 150 | 124 120 |
Synonyms:
no synonyms.

Fig.IV.3. Exemple d'absence du numéro de CAS

(a)

Name: 3,3,6-Trimethyl-1,4-heptadien-6-ol

Formula: C₁₀H₁₈O

MW: 154 CAS#: 30458-12-9 NIST#: 281697 ID#: 7064 DB: mainlib

Other DBs: None

Contributor: W.Epstein ET AL.J.Chem.Eng.Data,21,500(1976)

10 largest peaks:

43 999	59 509	85 342	81 296	139 294
41 260	96 239	67 193	55 187	93 180

Synonyms:

1.Yomogi alcohol

2.(3E)-2,5,5-Trimethyl-3,6-heptadien-2-ol #

(b)

Name: 2,5,5-trimethyl-3,6-heptadien-2-ol

Formula: C₁₀H₁₈O

MW: 154 CAS#: 26127-98-0 NIST#: N/A ID#: 53206 DB: wiley7n

Other DBs: None

Comment: QI=900, Source=UT-1990-993-0

10 largest peaks:

43 999	59 617	85 469	81 418	41 352
67 327	95 268	97 263	55 260	139 256

Synonyms:

1.yomogi alcohol

Fig.IV.4. Exemple de multitude de numéro de CAS pour le même composé

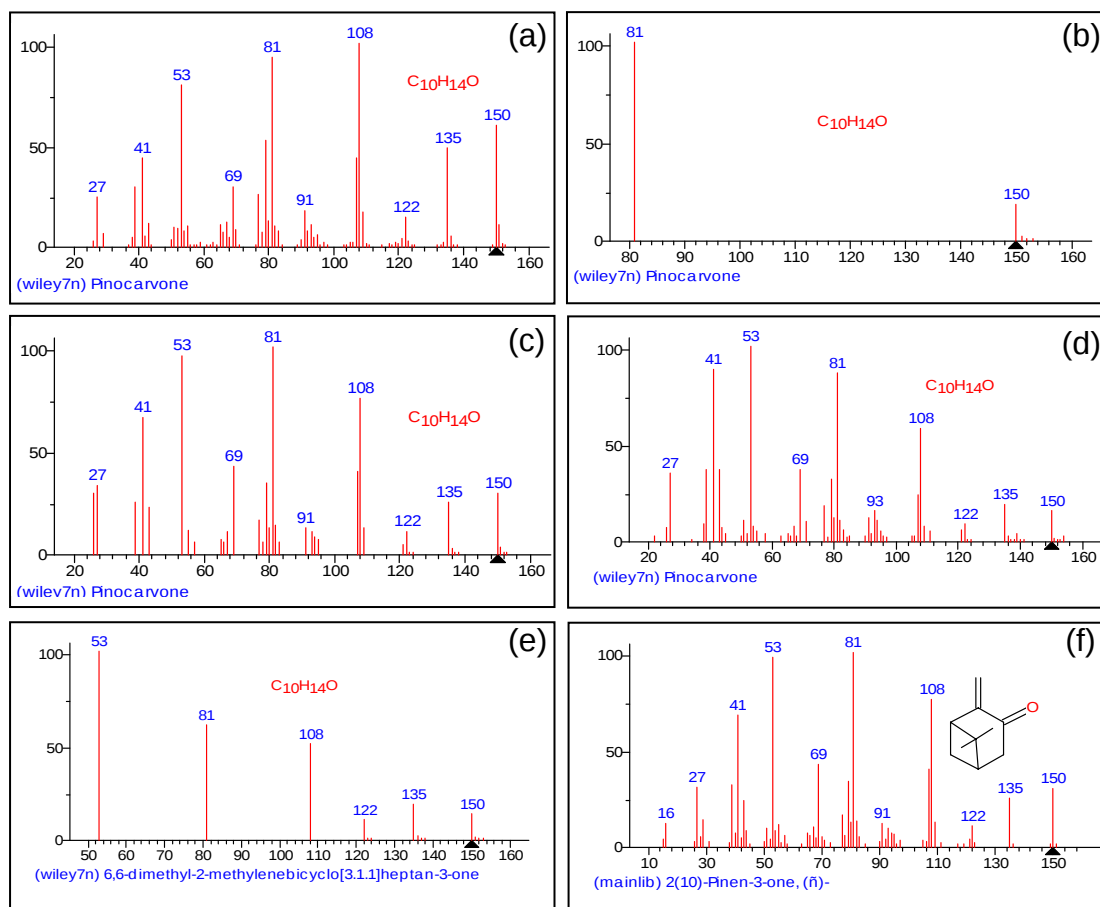


Fig.IV.5. Diversité des spectres de masse pour un même composé, entre autres, l'exemple du pinocarvone

IV.5.3.4. Présentation des résultats

VI.5.3.4.1. Introduction

Lorsque la recherche inverse est invoquée par l'analyste, avec l'un des modes cités plus haut, le logiciel **propose** alors, dans le cas du mode manuel, une liste par ordre décroissant de probabilité de concordance entre **le spectre de référence** et **le spectre extrait** du **spectre expérimental**; le nombre de propositions dépend du logiciel et de son paramétrage.

Dans le cas du mode automatique, l'AMDIS propose sous forme d'un fichier au **format PDF** une liste de liste de propositions, c'est-à-dire pour chaque inconnu, il y-a une liste de propositions ; par contre le logiciel chemstation d'AGILENT propose :

- Un premier fichier au **format Txt** comportant trois propositions pour chaque inconnu.
- Un second fichier au **format CSV** comportant une proposition unique, ayant la plus grande probabilité de concordance, pour chaque inconnu. Le format de fichier CSV peut être converti par le tableur **Excel** de Microsoft office au **format XLS**, d'où le grand avantage qu'a le logiciel chemstation dans la suite de l'analyse qualitative.

C'est à l'analyste que revient l'interprétation des résultats notamment par l'utilisation des étalons ou des indices de rétention.

IV.5.3.4.2. Décision finale

De façon générale, il est utile de rappeler qu'il revient à *l'analyste* de trancher sur les **propositions** données par le ou les logiciels de traitement des données ; *sa responsabilité est totale* aussi bien sur le plan scientifique, juridique que moral.

Les résultats présentés par l'analyste ont des conséquences qui vont de *l'innocence* (ou *l'incrimination*) d'une personne, dans des affaires de drogues ou de dopages, ...à la *survie* de milliers de personnes dans le cas d'ADM.

Dans le cas particulier du produit naturel, ce dernier renferme aussi bien la thérapeutique que le toxique.

2^{ème} Partie

Partie expérimentale

Chapitre V

Echantillonnage et extraction

V

Echantillonnage et extraction

V.1. Echantillonnage

V.1.1 Lieux

Notre travail est basé sur deux sites :

1. un site principal : le jardin botanique de l'I.N.A (Fig.V.1.)
2. un site secondaire : un site ornemental à Bab Ezzouar

Le but fixé étant l'étude de la variabilité de l'H.E en fonction du lieu.

V.1.2 Dates de cueillette

Durant l'année 2005 nous nous sommes intéressés uniquement au site principal où trois (3) cueillette ont été faites aux dates suivantes :

1. 15/03/2005
2. 02/05/2005
3. 14/06/2005

Durant l'année 2006 l'étude s'est portée sur les deux sites et au total quatre (04) cueillette ont été faites :

Deux (2) cueillette au site principal (ou site 1), aux dates suivantes :

1. 02/05/2006
2. 03/06/2006

Deux (2) cueillette au site secondaire (ou site 2) aux dates suivantes :

1. 20/04/2006
2. 20/05/2006

Le but fixé étant l'étude de la variabilité de l'H.E en fonction du temps.



Fig.V.1.. Le jardin botanique de l'I.N.A (site 1)

V.1.3 Organes

Le site principal a reçu une attention particulière vu que l'origine de la plante est connue avec certitude (c.-à-d. qu'elle est algérienne).

L'étude s'est portée d'une part sur la totalité de la partie aérienne de la plante, et d'autre part sur les trois organes suivants :

1. les tiges
2. les feuilles
3. les fleurs ou capitules.

Le but de l'étude étant la variabilité de l'H.E en fonction de l'organe.

V.1.4. Méthode d'échantillonnage

Le soin apporté à l'échantillonnage est déterminant dans la suite du processus de l'analyse, il doit être représentatif de la plante du point de vue espace et temps ; afin de satisfaire ces deux exigences, la cueillette s'est portée sur l'étendue de la surface du site et la coupe a été effectuée sur la partie haute de la plante, donc des parties juvéniles et jeunes pousses, ce qui permet aussi de préserver la plante.

La matière végétale a été nettoyée et lavée ainsi que la verrerie nécessaire à l'extraction.

Le tri des organes a été réalisé méticuleusement, vu que la taille des feuilles est très petite et que la moindre négligence peut conduire à des résultats erronés.

V.2 Extractions et rendements

V.2.1 Méthode et matériel

Notre travail est basé sur l'hydrodistillation comme méthode d'extraction, sachant que celle-ci est une méthode des plus utilisées à l'échelle industrielle vue sa simplicité et son coût.

Le matériel utilisé est un appareil de Clevenger modifié (Fig.II.1), toutefois nous avons fait deux essais avec un four à micro-ondes :

1. le premier étant une hydrodistillation assistée par micro-ondes
2. le second étant une extraction à sec assistée par micro-ondes

Afin d'éviter toute équivoque sur l'origine de certains composés susceptibles d'exister dans l'H.E et qui sont d'usage commun dans le nettoyage de la verrerie, en particulier l'éthanol et l'acétone, aucun solvant organique n'a été employé.

L'hydrodistillation, une fois terminée, nous avons effectués les opérations suivantes :

1. Récupération de l'H.E à partir du Clevenger en utilisant une ampoule à décanter.
2. Stockage de l'H.E dans des flacons codés et au préalable pesés, à basse température dans un réfrigérateur, dans l'attente des mesures d'indices physiques et de son analyse.
3. Le calcul du rendement de chaque essence s'est effectué selon la relation suivante :

$$R = 100 \times (m/M) ;$$

où m et M représentent respectivement la masse de l'huile essentielle et la masse de la charge végétale.

V.2.2 Résultats et discussion

V.2.2.1 Rendement des feuilles en fonction des dates de cueillettes

Le rendement des feuilles en fonction des dates est consigné dans le Tab.V.1.

L'étude des rendements des feuilles en fonction de la date de récolte révèle un fort rendement observé pour le mois de juin et ceci durant deux années

consécutives (Fig.V.2). Ce maximum de rendement, pendant cette période, peut être expliqué par la grande activité biologique de la plante pendant la période florale.

La relative supériorité du rendement de la cueillette de juin 2005 sur celle de juin 2006 est expliquée par la durée de séchage. Au regard du tableau V.1 on remarque que la durée du séchage de la cueillette de juin 2005 est presque d'une année alors que celle de juin 2006 est de quelques jours. Au cours du séchage la plante perd de sa masse par perte d'une partie d'eau, alors que l'huile essentielle est "jalousement" gardée.

Ce qui ressort de cette étude est d'une grande importance. Dans le cas d'un usage à grande échelle, il est plus rentable de faire une cueillette en juin, et extraire l'H.E selon le besoin, que de faire plusieurs cueillettes dans l'année.

Tab.V.1 Rendement des feuilles en fonction des dates de cueillettes

Date de cueillette	Masse végétale (g)	Date d'extraction	Durée d'extraction (h : min)	Rendement (%)
15/03/2005	408,57	16/03/2005		0,3
02/05/2005	117	08/05/2005	1:35	0,8
14/06/2005	90,76	12/06/2006	3 :00	1,8
02/05/2006	203	03/05/2006	2:00	0,6
03/06/2006	156,08	11/06/2006	3:14	1,6

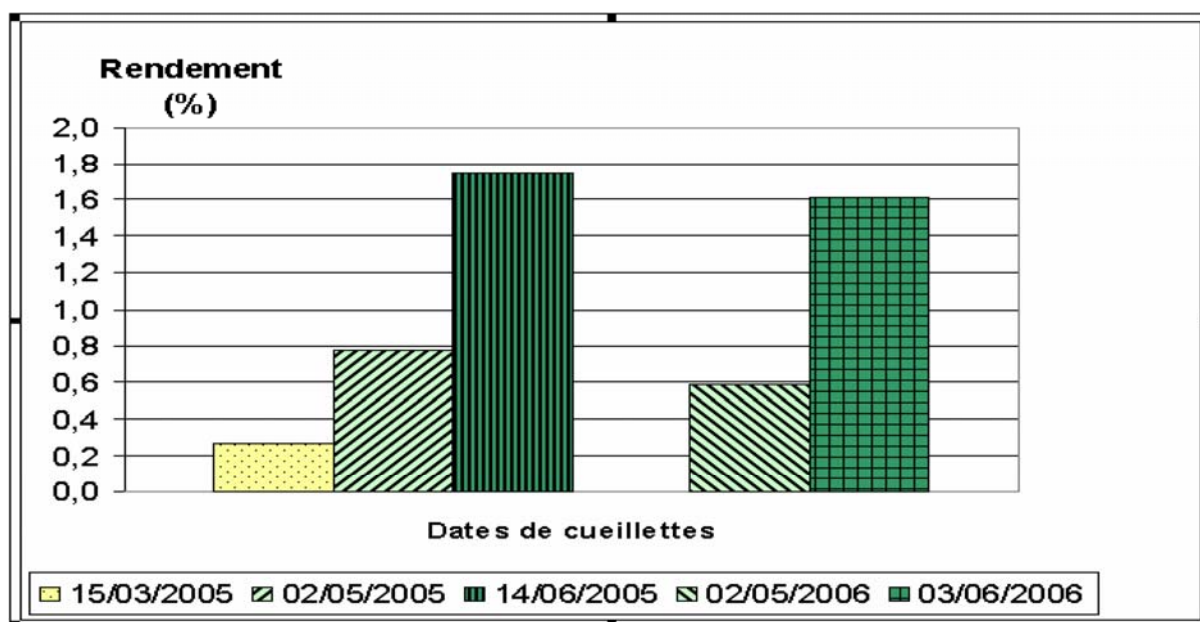


Fig.V. 2 Rendement des feuilles en fonction des dates de cueillettes

V.2.2.2 Rendement des organes en période florale

Le rendement en fonction de l'organe en période florale est consigné dans le Tab.V.2.

Le choix de la période florale pour l'étude comparative des rendements des organes est justifié par le maximum de rendement obtenu pendant cette période et la présence des capitules.

L'histogramme (Fig.V.3) met en évidence l'influence de l'organe sur le rendement de l'huile essentielle extraite. En effet, les plus grandes valeurs de rendements sont observées sur les extraits de feuilles et les plus faibles rendements pour les extraits de tiges.

L'explication la plus probable sur les différences existant entre rendements des divers organes, réside dans la constitution histologique des zones sièges de stockage d'huiles essentielles. Des vues microscopiques de coupes d'organes sont nécessaires pour infirmer ou affirmer cette explication, chose que nous n'avons pas eu la possibilité de faire.

Tab.V.2. Rendement des organes en période florale (juin 2006)

Date de cueillette	Organe	Masse végétale (g)	Date d'extraction	Durée (h:min)	Masse de l'H.E. (g)	Rendement (%)
03/06/2006	Plante entière	531,44	07/06/2006	3:16	3,9468	0,7
03/06/2006	Tiges	216,73	07/06/2006	3:00	0,2802	0,1
03/06/2006	Feuilles	156,08	11/06/2006	3:14	2,5167	1,6
03/06/2006	Capitules	523,22	05/06/2006	3:01	1,6600	0,3

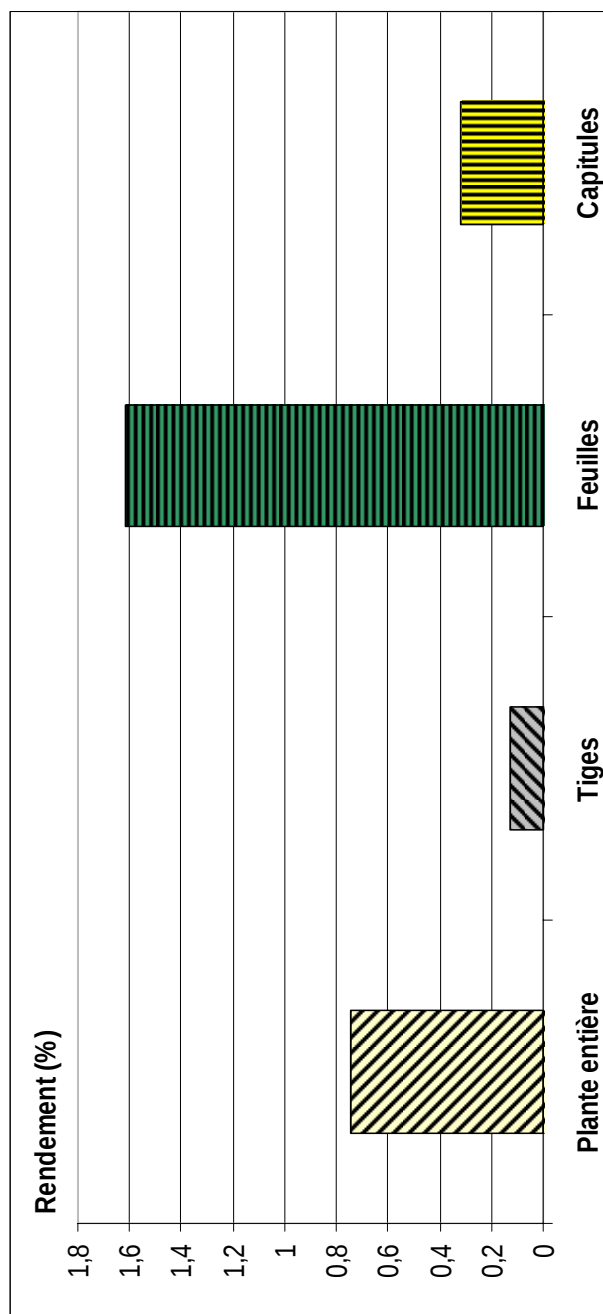


Fig.V.3. Rendement des organes en période florale (juin 2006)

V.2.2.3 Rendement de la plante entière en fonction des lieux

Les rendements des essences des plantes entières en fonction des lieux (sites 1 et 2), de la période allant d'avril à juin 2006, sont consignés dans le tableau V.3.

Au vu de l'histogramme (Fig.V.4), nous déduisons que les plus grands rendements sont obtenus dans les extraits du site 1.

Dans ce cas de figure, aucune tentative d'explication des résultats obtenus ne peut avoir lieu sans les réponses aux questions suivantes :

1. S'agit-il du même chémotype et/ou du même génotype ?
2. Quelle est la nature du sol dans les deux sites ?
3. Quelle est le mode d'arrosage et sa cadence pour chaque site ?
4. S'agit-il du même micro climat ?

Les réponses rigoureuses à ces questions sortent du cadre de notre recherche. Cependant, l'analyse fine des essences des deux plantes (chapitre VI) permettra de répondre partiellement à la première question.

Tab.V.3. Rendement de la plante entière en fonction des lieux

Date de cueillette	Lieu	Masse végétale (g)	Date d'extraction	Durée de l'extraction (h:min:s)	Rendement (%)
02/05/2006	Site 1	300,70	06/05/2006	02:33:00	0,4
03/06/2006	Site 1	531,44	07/06/2006	03:16:24	0,7
20/04/2006	Site 2	500	20/04/2006	02:00:00	0,2
20/05/2006	Site 2	179	21/05/2006	02:30:00	0,3

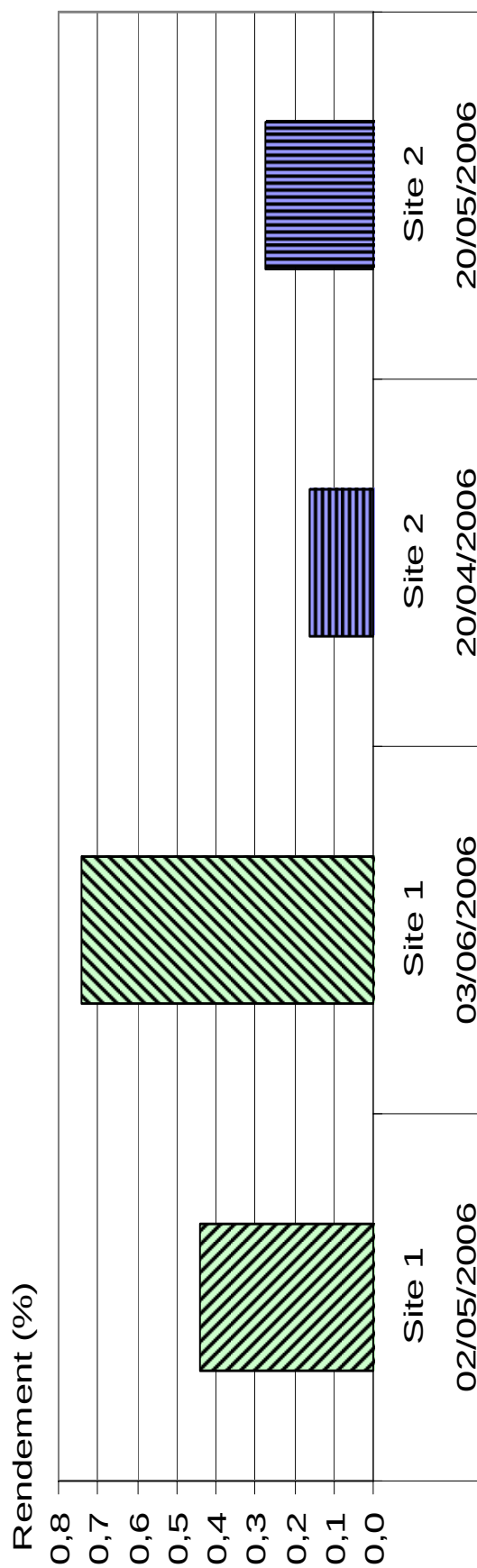


Fig.V.4. Rendement des plantes entières en fonction des lieux

V.3 Indices physiques

V 3.1 Matériel et méthodes

Pour la mesure de densité, nous avons utilisé un pycnomètre d'un ml et une balance d'une précision égale à 0,1 mg , la méthode étant décrite au chapitre II.

La mesure des indices de réfraction a été faite par utilisation d'un réfractomètre de marque KRUSS et d'un système de refroidissement (Fig.V.5).

La température, dans les deux cas de mesures, est égale à $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

L'eau distillée utilisée dans le cas de la densimétrie a été fraîchement préparée.



Fig.V.5. Réfractomètre et système de refroidissement thermostaté

V.3.2 Résultats

Le tableau V.4 regroupe les différents indices de réfraction et de densité obtenus pour les différents extraits de Santoline selon l'organe, le site et la date de cueillette. Il faut noter que les différentes huiles essentielles de santoline ont une couleur jaune.

Tab.V.4. Indices physiques des essences de Santoline

Organe	Date de cueillette	Lieu d'échantillonnage	Date d'extraction	Indice de réfraction	Densité
Plante *	03/06/2006	Site 1	07/06/2006	1,474	0,871
Capitules	03/06/2006	Site 1	05/06/2006	1,471	0,871
Tiges	03/06/2006	Site 1	06/05/2006	1,496	**
Feuilles	03/06/2006	Site 1	10/06/2006	1,474	0,869
Plante *	20/05/2006	Site 2	21/05/2006	1,483	**
Feuilles	14/06/2005	Site 1	12/06/2006	1,476	0,891

* partie aérienne de la plante

** quantité d'H.E. insuffisante

V.4. Conclusion

Dans le cas d'un usage à grande échelle, pour la santoline ou pour une plante similaire, il est plus rentable de faire une cueillette en période florale et extraire l'H.E selon le besoin, que de faire plusieurs cueillettes dans l'année.

Les plus grandes valeurs de rendements sont observées sur les extraits de feuilles et les plus faibles pour les extraits de tiges. Les feuilles représentent la source principale de la plante en huiles essentielles.

L'organe de faible rendement (dans notre cas les tiges) doit être traité d'une manière méticuleuse, faute de quoi on aura un risque de "contamination" de l'organe à fort rendement (dans notre cas les feuilles), ce qui nuit d'une part à la valeur de son rendement et d'autre part à sa composition chimique.

La séparation des organes est injustifiée dans les cas suivants :

- La composition de l'organe de faible rendement est similaire à celle des autres organes
- L'organe séparé ne renferme pas un ou des composés d'un usage particulier.

Les valeurs d'indices physiques ne permettent pas de différencier les différents organes ou plantes des différents sites mais donnent, cependant, un ordre de grandeur de ces indices.

Chapitre VI

L'analyse des huiles essentielles de la santoline par GC/MS et GC/FID

VI L'analyse des huiles essentielles de la santoline par GC/MS et GC/FID

VI.1. Matériel et conditions expérimentales

VI.1.1. Analyse qualitative par GC/MS

VI.1.1.1. Matériel et logiciels

Le matériel et les logiciels utilisés dans l'acquisition et le traitement des données sont consignés dans le tableau VI.1.

Tab.VI.1. Matériel et logiciels utilisés en GC/MS

Appareil GC/MS		Chromatographe GC		HP 6890
		Interface		Directe
		Détecteur MSD		HP 5973 A
Type de colonne	Colonne polaire :	Caractéristiques :	Code :	STABILWAX
			Molécule :	PEG 20M
			Longueur :	60 m
			Diamètre :	0,25 mm
			Epaisseur du film :	0,25 µm
	Colonne apolaire :	Caractéristiques :	Code :	HP5MS
			Molécule :	95%ms, 5% biphénylés
			Longueur :	30 m
			Diamètre :	0,25 mm
			Epaisseur du film :	0,25 µm
Logiciels :		Chemstation, AMDIS, NIST MS search 2002		
Bibliothèques de spectres :		NIST 2002, WILEY 7		

VI.1.1.2. Les conditions expérimentales

Les conditions expérimentales en GC/MS sont regroupées au sein du tableau VI.2.

Tab.VI.2. Conditions expérimentales en GC/MS

	Type de colonne	
	Colonne polaire :	Colonne apolaire :
Débit du gaz vecteur :	0,7 ml/mn	0,5 ml/mn
Nature du gaz vecteur :	Hélium (He)	
Volume injecté :	1µl	1µl
Mode split :	1 : 80	1 : 90
Programmation en température	45°C pendant 8,5 mn puis élévation à raison de 2°C/mn jusqu'à 250°C pendant 14 mn	45°C pendant 6 mn puis élévation à raison de 2°C/mn jusqu'à 290°C pendant 6,5 mn
Température de l'injecteur :	250°C	
Température de l'auxiliaire :	250°C	
Température de la source :	230°C	
Tension d'ionisation :	70 V	
Température du quadripôle :	150°C	
Vitesse de balayage :	2,83 Scan/s	
Domaine de la masse (M/Z) :	29 - 550 Th	27-550 Th

VI.1.2. Analyse semi quantitative par GC/FID

VI.1.2.1. Le matériel

Le matériel et le logiciel utilisés dans l'acquisition et le traitement des données sont consignés dans le tableau VI.3.

Tab.VI.3. Matériel et logiciels utilisés en GC/FID

Chromatographe GC :		HP 6890		
Type de colonne	Colonne polaire	Caractéristiques :	Code :	HPWAX
			Molécule :	PEG 20M
			Longueur :	60 m
			Diamètre :	0,32 mm
			Epaisseur du film :	0,15 µm
Logiciel :		Chemstation		

VI.1.2.2. Les conditions expérimentales

Les conditions expérimentales en GC/FID sont mentionnées au tableau VI.4.

Tab.VI.4. Conditions expérimentales en GC/FID

Nature du gaz vecteur :	Azote (N ₂)
Débit du gaz vecteur :	0,8 ml/mn
Débit de fuite :	43,7 ml/mn
Volume injecté :	0,5 µl
Température de l'injecteur :	240°C
Température du détecteur :	250°C
Programmation en température :	45°C pendant 8,5 mn puis élévation à raison de 2°C/mn jusqu'à 240°C pendant 14 mn

VI.2. Méthode de traitement des données

VI.2.1. Reconstitution d'une base de données

En l'absence partielle d'étalons l'identification des constituants se fait par utilisation des indices de rétention. Les éléments essentiels, qu'on peut tirer des tables de la littérature, sont l'ordre de grandeur des indices et surtout l'ordre d'élution des constituants (avec les possibilités d'interversion). Ces tables ne renferment qu'un nombre réduit de composés, dont les noms sont très souvent "triviaux", et sont établies dans des conditions expérimentales différentes ; Cependant, il existe deux références connues et utilisées à l'échelle internationale, celle d'Adams [36] pour la DB5 (et colonnes équivalentes) et celle de Shibamoto *et al* [35] pour la Carbowax 20 M (et les colonnes polaires équivalentes) et OV101. La référence de Shibamoto est ancienne et comporte des lacunes. Nous nous sommes tournés, donc, vers la littérature afin de trouver une référence plus récente et plus riche. Le centre de recherche turque (TBAM), sous la direction du Pr BASER, possède quelques centaines d'articles sur le produit naturel (surtout les huiles essentielles) et une bibliothèque de données chromatographiques sur colonne polaire (la bibliothèque BASER). Ces publications sont établies dans les mêmes conditions expérimentales, ce qui constitue une référence de choix. Les tables de ces références, renfermant les compositions de différentes huiles essentielles, constituent des parties de la "dite" bibliothèque. Les références [62-122] font partie de ces articles. Ils nous ont servi comme base de reconstruction partielle de la bibliothèque BASER. Par utilisation du

logiciel "**Omnipage**", nous avons transformé les tables des " dites " références du format PDF (d'**Adobe**) au format XLS (d'**Excel**), puis fusionné au sein d'un seul fichier. La table, ainsi obtenue, a été triée par ordre croissant selon l'indice de rétention. Le résultat, est une table renfermant à la fois les noms des composés, leurs indices et le plus important, leur ordre d'élution avec certaines interversions. Nous avons trouvé une grande correspondance entre les valeurs d'indices provenant des différentes références citées ci-dessus (à quelques exceptions, comme c'est le cas pour la référence [83]). La seconde étape, étant l'affectation à chaque composé de la liste, de son numéro de CAS (s'il existe). Par indexation de cette table et de la base de Shibamoto, nous avons eu un accès rapide aux données ; la recherche a pu se faire alors, par plusieurs paramètres et surtout par le numéro de CAS, ce qui a facilité la tâche de l'identification.

VI.2.2. Traitements des données

L'optimisation des traitements de données nécessite à la fois l'optimisation des logiciels et celle des banques de spectres. Un logiciel, quel qu'il soit, s'installe par défaut, son optimisation passe par son bon paramétrage. Selon le besoin, l'utilisateur personnalise les différents paramètres disponibles. Le seuil de sensibilité, le pourcentage de correspondance admissible, les pourcentages et l'ordre de consultation des banques de spectres constituent des paramètres qui peuvent avoir une influence, sur les propositions données et par la suite sur les résultats des analyses. Pour notre part, après un paramétrage adéquat des logiciels, nous avons procédé comme suit :

-1^{ère} étape :

- Injection des huiles essentielles dans les mêmes conditions.

-2^{ème} étape :

- Pour chaque H.E (fichier), traitement en mode automatique par utilisation, tour à tour, des banques de spectres NIST et WILEY
- conversion des fichiers CSV en fichiers Excel
- ajout de colonnes dans le tableau de la feuille Excel des données :
 - type de colonne
 - code fichier
 - code organe
 - site

- division
- opérateur
- banques de spectres

-3^{ème} étape :

- pour une même colonne, fusion en un seul fichier Excel de tous les fichiers
- classement (ou tri) par temps de rétention
- calcul des indices de rétention
- positionnement des pics certains
- balayage entre les pics certains

-4^{ème} étape :

- confrontation des résultats obtenus dans les différents fichiers, colonnes et banques de spectres

-5^{ème} étape :

- recherche d'éventuels constituants par mode manuel dans les cas d'épaulement par utilisation du chemstation et de l'AMDIS

-6^{ème} étape :

- tri par organe et par fichier

-7^{ème} étape :

- traitement des fichiers issus de l'acquisition en GC/FID

-8^{ème} étape :

- correspondance entre les pics des chromatogrammes TIC de la GC/MS et ceux des chromatogrammes GC/FID.

-9^{ème} étape :

- présentation des résultats.

VI.3. Etude de la variabilité de l'essence de la plante entière en fonction du lieu**VI.3.1. Introduction**

Dans le but d'étudier la variabilité des huiles essentielles de Santoline en fonction du lieu V, nous avons injecté (en GC et GC/MS) les essences des plantes entières, provenant des deux sites (en mai 2006), dans les conditions expérimentales citées précédemment. Les injections, en GC/MS/EI, nous ont permis l'acquisition des chromatogrammes en courant ionique total (TIC) sur colonne polaire (Fig.VI.1 et Fig.VI.2) et sur colonne apolaire (Fig.A1 et Fig.A2 de l'annexe A). Celles effectuées en GC/FID sur colonne polaire nous ont permis l'acquisition des chromatogrammes (Fig.B1 et Fig.B2 de l'annexe B).

VI.3.2. Résultats

Les résultats, des traitements des données, sont présentés dans le tableau VI.5. Ces résultats sont obtenus après plusieurs essais et quelques difficultés.

L'étape la plus difficile étant l'étape 8. Cette difficulté est due à l'utilisation de deux appareils différents et opérants dans des conditions expérimentales différentes. La solution à ce problème est proposée par Agilent par l'utilisation d'un seul appareil équipé d'un détecteur MSD et un détecteur FID. L'acquisition des deux signaux peut se faire, alors, en mode mixte. En l'absence de cette solution et dans le cas d'une difficulté de correspondance, les intensités des pics sujets au doute sont bornées par la valeur maximale donnée par la GC/FID pour le domaine concerné.

Une seconde difficulté est l'absence de données chromatographiques ou d'étalons pouvant valider une proposition à forte correspondance comme c'est le cas du composé numéro 4 (voir Tab.VI.5).

Une troisième difficulté est l'indétermination de l'isomère comme c'est le cas du composé numéro 48 (voir Tab.VI.5).

Une quatrième difficulté est l'indétermination entre deux composés différents ayant à la fois un indice et un spectre similaire comme c'est le cas du composé numéro 52 (voir Tab.VI.5).

Pour les deux "axes" de recherche, nous avons utilisé les mêmes numéros de pics et la même liste de constituants se trouvant dans toute l'espèce, même s'il y a absence du composé dans l'analyse. Le but de ce choix étant d'avoir une harmonie entre le premier et le second axe de recherche et faciliter les comparaisons.

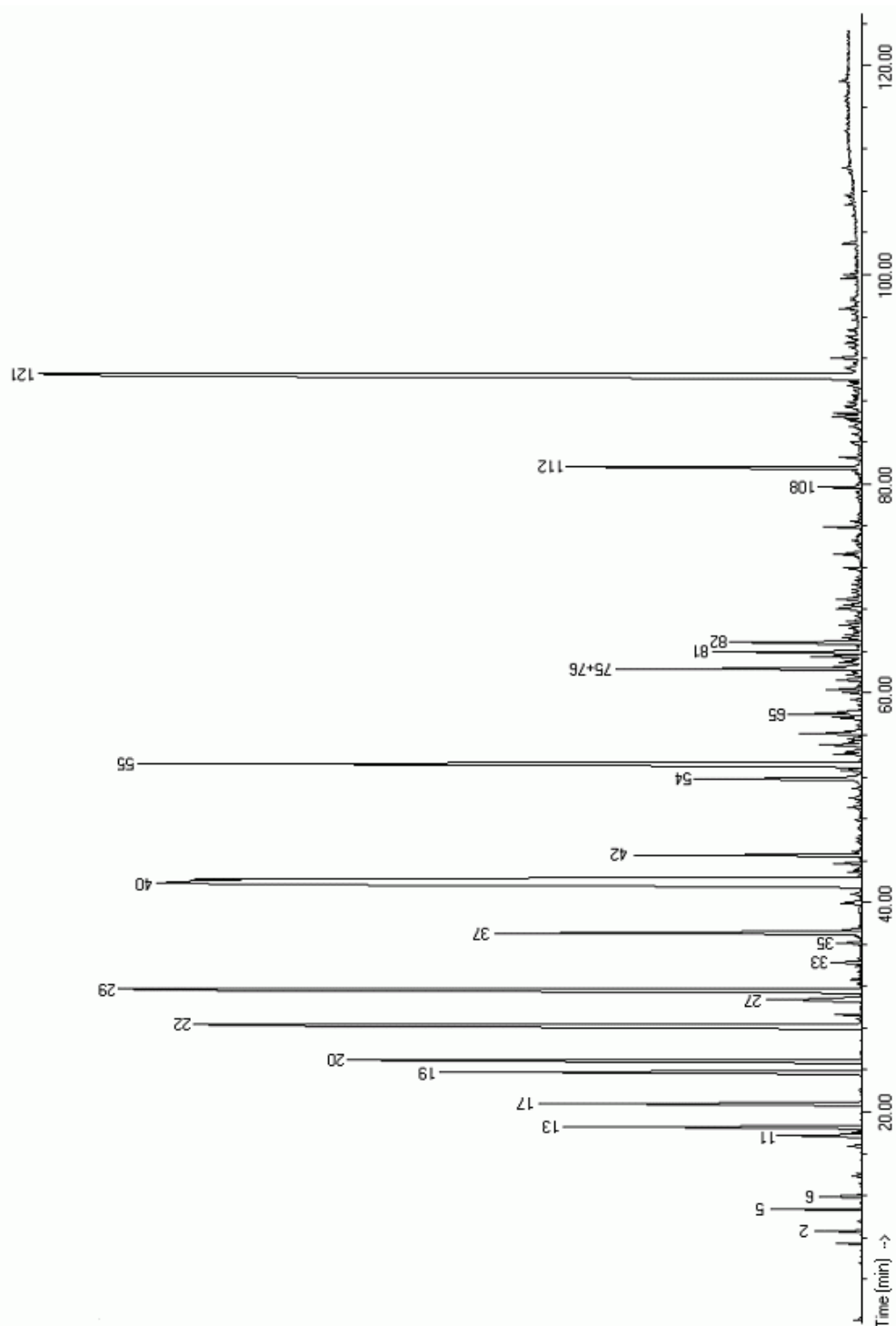


Fig.VI.1. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence de la plante entière du site 1 (en Mai 2006)

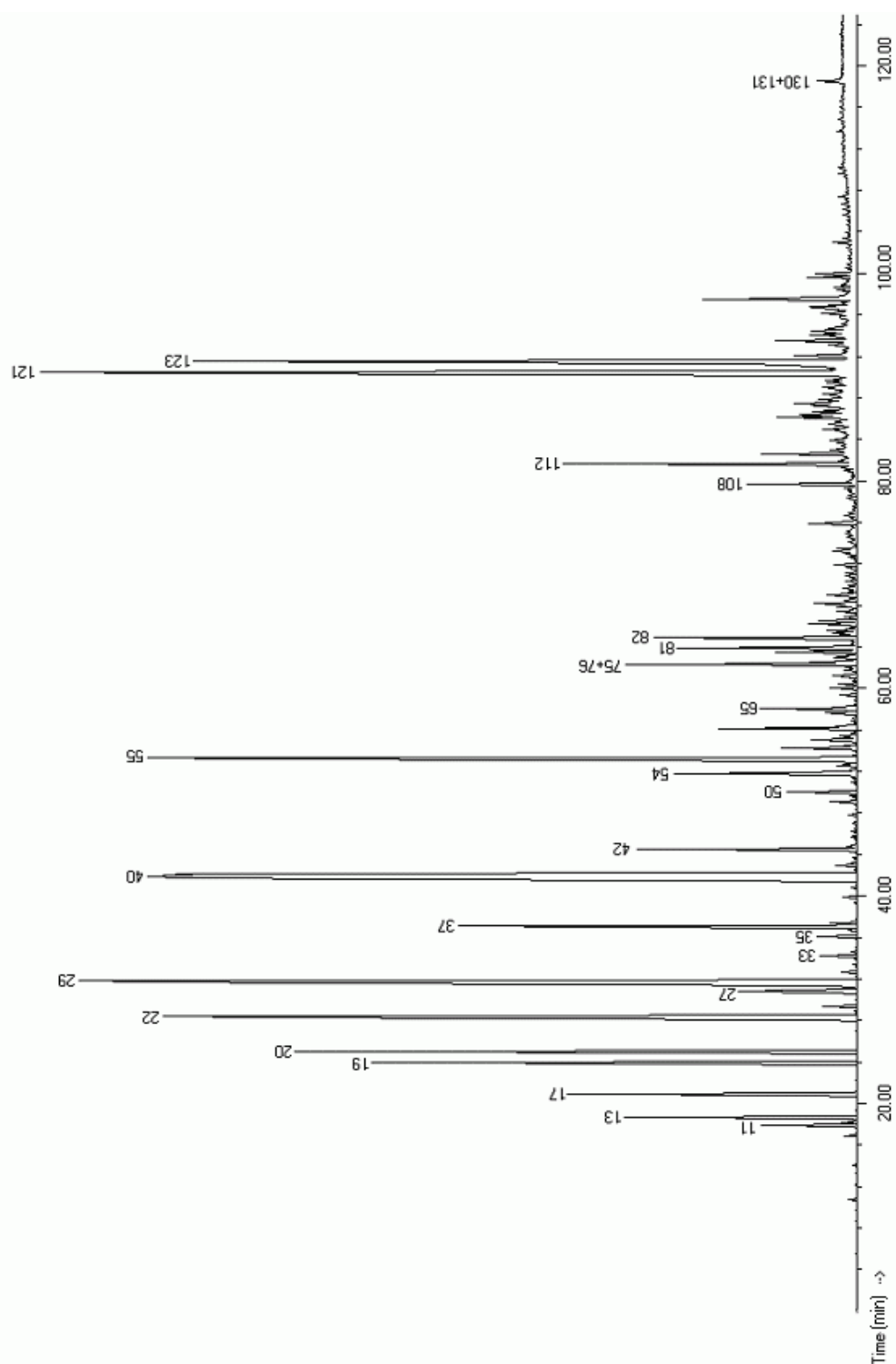


Fig.VI.2. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence de la plante entière du site 2 (en Mai 2006)

Tab.VI.5. Composition chimique des plantes des sites 1 et 2 (en Mai 2006)

N° Pic	COMPOSANTS	% PLANTE SITE 1	% PLANTE SITE 2	I _{exp} 20M	I _{exp} HP5MS
1	Dimethyl sulfide	0,1	0,1	746	521
2	ISO BUTYRALDEHYDE	0,2	tr	813	553
3	Acétone		tr	816	503
4	2-Methyl-2-heptène *	tr	tr	846	803
5	2-Methyl-2-Propénal	0,4	tr	879	568
6	2-Methylbutanal	0,2		913	658
7	Ethanol	tr		927	<500
8	1,3-octadiene	0,1	tr	951	823
9	Tricyclene	0,1	0,1	1007	917
10	Methyl 2-methylbutyrate			1011	774
11	α-Pinène	0,4	0,4	1021	927
12	α-Thujène	0,1	0,1	1026	924
13	Santolina triene	1,4	1,0	1033	908
14	2-Methyl-3-buten-2-ol			1035	610
15	Toluène			1042	760
16	Ethyl 2-methylbutyrate			1053	850
17	Camphène	1,7	1,5	1067	952
18	n-Hexanal	tr		1085	
19	β-Pinène	2,8	3,4	1109	976
20	Sabinène	3,3	3,9	1123	972
21	δ-3-Carene	tr	tr	1151	1011
22	Myrcene	8,5	8,7	1168	994
23	α-Phellandrène			1168	1004
24	Isobutyl 2-methylbutyrate			1177	
25	p-Mentha-1,7(8)-diene (Pseudolimonene)			1178	1000
26	α-Terpinene	0,1	0,1	1182	1013
27	Limonène	0,7	1,0	1202	
28	1,8-Cineole			1214	1033
29	β-Phellandrène	10,0	11,1	1214	1033
30	(E)-2-Hexenal		tr	1222	
31	Amyl furan (2-Pentyl furan)	tr	tr	1234	
32	(Z) -β-Ocimene	tr	tr	1238	1042
33	γ-Terpinène	0,1	0,1	1249	1057
34	(E) -β-Ocimene	tr	tr	1255	1049
35	p-cymene	0,1	0,3	1274	1025
36	2-Methylbutyl 2-methylbutyrate	tr	tr	1282	1106
37	Terpinolène	1,9	1,4	1287	1098
38	n-Tridecane			1300	1300

Tab.VI.5. (suite)					
N° Pic	COMPOSANTS	% PLANTE SITE 1	% PLANTE SITE 2	I _{exp} 20M	I _{exp} HP5MS
39	6-Methyl-5-hepten-2-one	0,1	tr	1340	
40	Artemisia ketone	37,1	33,5	1355	1067
41	(Z)-3-Hexenol	0,1	tr	1382	858
42	Yomogi alcohol	0,8	0,7	1392	1003
43	1,3,8 p-Menthatriene			1401	1112
44	Perillene	tr	tr	1423	1100
45	Hexyl-2-methyl butyrate	tr	tr	1428	
46	α , p-dimethylstyrene	tr	tr	1444	
47	trans-sabinene hydrate	tr	tr	1462	1099
48	Epoxyterpinolene *	tr	tr	1470	
49	δ -Elémène			1475	
50	α -Longipinène		0,2	1477	1344
51	cis-3-hexenyl isovalerate			1491	
52	α -Campholenal / α -Campholene aldehyde *			1497	
53	α -Copaene	<0,12	<0,12	1500	1371
54	Artemisia alcohol	<0,12	<0,12	1503	1095
55	Camphre	7,5	6,4	1524	1144
56	Benzaldehyde	tr	tr	1531	966
57	Linalool	0,8	0,9	1542	1104
58	cis-Sabinene hydrate	0,1	0,1	1545	1071
59	4-Acetyl-1-Methylcyclohexene	<0,4	tr	1560	1132
60	trans-p-Menth-2-en-1-ol	<0,4	<0,4	1561	
61	Pinocarvone	0,4	0,5	1575	1160
62	Bornyl acetate			1584	
63	β -Elémène			1595	1389
64	Thymol methyl ether	0,1	0,1	1596	1234
65	Terpinen-4-ol (Terpin-4-ol)	0,2	0,3	1602	1176
66	(E)-Caryophyllene (β -Caryophyllene)		tr	1605	
67	2-Methyl-6-methylene-oct-3,7-dien-2-ol	tr		1616	
68	cis-p-Menth-2-en-1-ol			1625	
69	trans-p-Mentha-2,8-dien-1-ol		tr	1625	
70	Myrtenal	tr	tr	1636	1193
71	Phenylacetaldehyde	tr	tr	1650	
72	trans-Pinocarveol	0,1	0,1	1657	1138
73	(E)- β -Farnesene	tr	tr	1666	1458
74	(Z)-3-Hexenyl tiglate	tr		1669	1325
75	trans-Chrysanthemol	0,1	0,1	1675	
76	Lavandulol			1675	1175
77	Cryptone	0,1	0,3	1679	1184

Tab.VI.5. (suite)					
N° Pic	COMPOSANTS	% PLANTE SITE 1	% PLANTE SITE 2	I _{exp} 20M	I _{exp} HP5MS
78	α -Humulene (α -Caryophyllène)			1680	
79	p-Mentha-1,8-dien-4-ol (Limonen-4-ol)	tr	tr	1686	
80	γ -Curcumene	0,5	0,3	1695	1476
81	Bornéol	0,9	1,1	1702	1170
82	Germacrene D	0,6	0,7	1720	1476
83	Neryl acetate			1727	1366
84	β -Bisabolene			1732	1505
85	Phellandral			1733	1274
86	Piperitone	<0,26	<0,26	1737	1254
87	Bicyclogermacrene	<0,26	<0,26	1745	1491
88	cis-Piperitol (cis-p-Menth-1-en-3-ol)			1746	
89	(E,E) - α -Farnesene			1751	1495
90	Naphtalène **			1754	
91	Geranyl acetate	<0,26	<0,26	1758	
92	δ -Cadinene	<0,26	<0,26	1766	1519
93	β -Sesquiphellandrene	tr	0,1	1778	1521
94	α -curcumene	0,1	0,1	1781	1480
95	p -Methylacetophenone		<0,2	1787	
96	Methyl salicylate	<0,2		1790	
97	Cumin aldehyde (Cuminaldehyde)		<0,2	1790	1242
98	Myrtenol	0,1	0,1	1797	1195
99	trans p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	0,1		1801	
100	Nerol			1802	
101	(E,E)-2,4-Decadienal		tr	1820	
102	trans-Carveol		tr	1837	
103	Geraniol			1846	
104	p-Cymen-8-ol	tr		1851	1184
105	Benzyl-2-methyl-butyrate	0,1	0,1	1876	1386
106	Benzyl Isovalerate	tr	tr	1899	
107	(E)- β -ionone			1948	
108	β -Caryophyllene oxide	0,1	0,3	2000	1576
109	Perilla alcohol			2009	
110	Salvial-4(14)-en-1-one	<0,2	<0,2	2026	1587
111	Pentadecanal		<0,2	2035	
112	(E)-Nerolidol	0,9	0,8	2038	1563
113	Octanoic acid			2054	
114	Germacrene D-4-ol	tr	0,4	2059	
115	Heneicosane			2100	2100
116	Cumin alcohol (p-Cymen-7-ol)		<0,23	2106	

Tab.VI.5. (suite)					
N° Pic	COMPOSANTS	% PLANTE SITE 1	% PLANTE SITE 2	I _{exp} 20M	I _{exp} HP5MS
117	Spathulenol	tr	tr	2133	1574
118	α -Bisabolol oxide B	tr	tr	2147	1650
119	Eugenol (2-Methoxy-4-(2-propenyl) phenol)	tr		2174	1361
120	epi- α -Muurolol (T-muurolol)	tr		2195	
121	α -Bisabolol	12,0	7,1	2221	1697
122	α -Cadinol		tr	2241	1652
123	Longiverbenone (Vulgarone B)	0	4,2	2251	1650
124	α -Cyperone	<0,33	<0,33	2368	1747
125	Pentacosane	tr	tr	2500	2500
126	gamma-Costol	tr	tr	2518	1748
127	Phytol	tr	tr	2614	2113
128	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	tr	tr	2690	
129	Heptacosane	tr	tr	2700	2700
130	Hexadecanoic acid	tr	tr	2900	1971
131	Nonacosane	tr	tr	2900	2900
Total(%) :		94,9	91,4		

* tentative d'identification

** composé trouvé dans les échantillons de 2005 à l'état de traces

tr (<0,1 %)

VI.3.3. Discussion

VI.3.3.1. Comparaison des pourcentages en composés majoritaires

Tab.VI.6. Composés majoritaires des plantes entières des deux sites
(en Mai 2006)

N° de PIC	Composés	% plante du site 1	% plante du site 2
5	2-Methyl-2-Propénal	0,4	tr
13	Santolina triene	1,4	1,0
17	Camphène	1,7	1,5
19	β -Pinène	2,8	3,4
20	Sabinène	3,3	3,9
22	Myrcene	8,5	8,7
27	Limonène	0,7	1,0
29	β -Phellandrène	10,0	11,1
37	Terpinolene	1,9	1,4
40	Artemisia ketone	37,1	33,5
42	Yomogi alcohol	0,8	0,7
55	Camphre	7,5	6,4
81	Bornéol	0,9	1,1
82	Germacrene D	0,6	0,7
121	α -Bisabolol	12,0	7,1
123	Vulgarone B	0	4,2
Total(%) :		89,5	85,6

Les essences des deux sites comportent un très grand nombre de composés à l'état de traces. Le tableau VI.6 comporte les seize composés majoritaires présents dans la partie aérienne de l'espèce *chamaecyparissus* et dont le pourcentage est proche de l'unité et au-delà. Afin de mettre en évidence la différence principale qu'il y a entre les essences des deux sites, la figure VI.3 représente les huit composés les plus importants. La Vulgarone B (pic 123) caractérise l'essence de la plante entière du site 2 par rapport à celle du site 1.

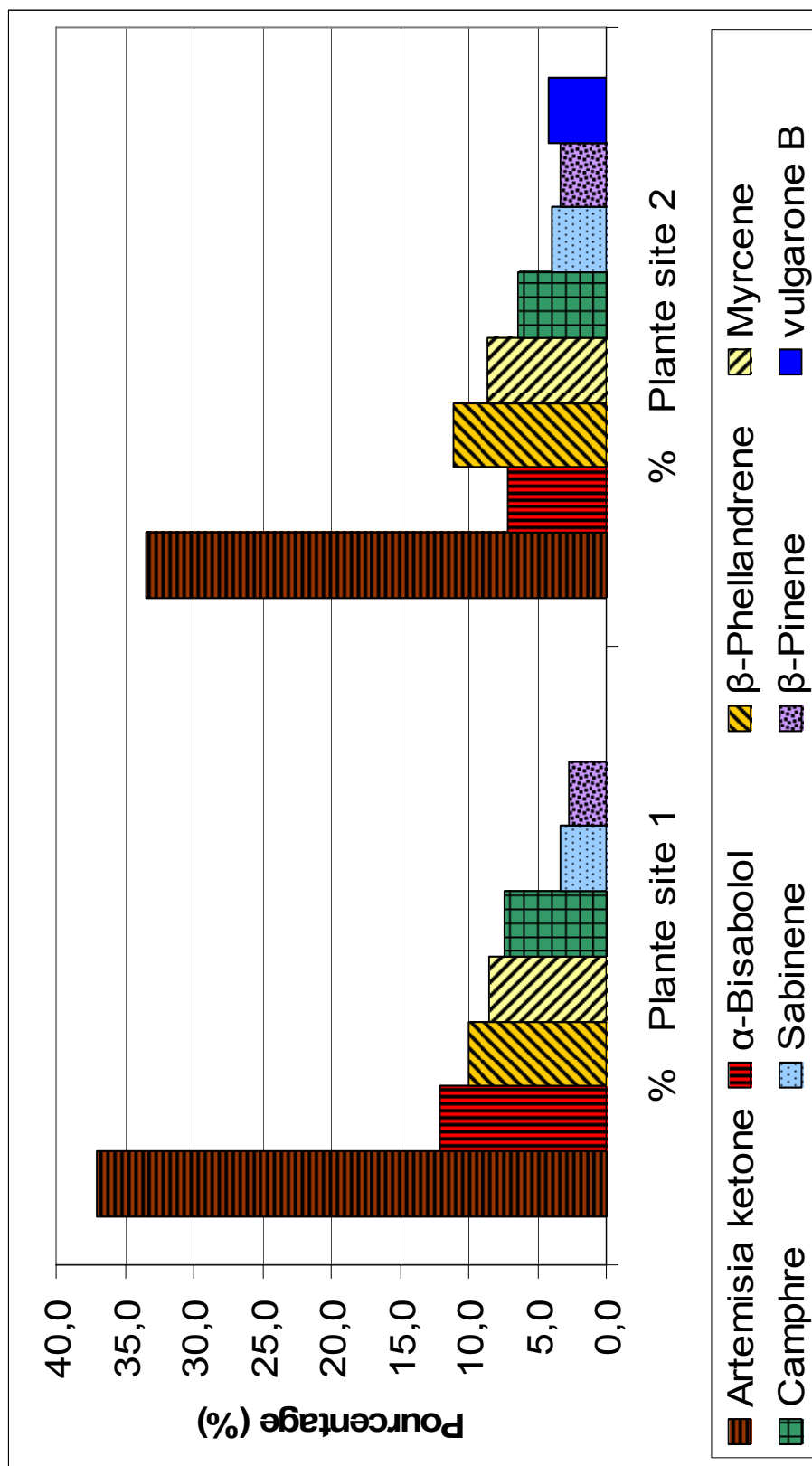


Fig.VI.3. Composés majoritaires des plantes entières des deux sites (en Mai 2006)

VI.3.3.2. Comparaison des pourcentages en monoterpènes et sesquiterpènes

Tab.VI.7. Pourcentage en monoterpènes et sesquiterpènes de la plante entière (en Mai 2006)

Classe	Plante du site 1	Plante du site 2
Monoterpènes hydrocarbonés (%)	31,2	32,8
Monoterpènes oxygénés (%)	48,1	44,0
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)	1,1	1,3
Sesquiterpènes oxygénés (%)	13,1	12,9
Monoterpènes irréguliers (%)	39,3	35,2

Le tableau VI.7 présente les différents pourcentages en monoterpènes et sesquiterpènes. Il met en évidence la supériorité du pourcentage total des monoterpènes (plus de 75%) sur celui des sesquiterpènes dans les essences des plantes des deux sites. Les monoterpènes irréguliers constituent une partie importante des monoterpènes. Les pourcentages des différentes classes, des deux sites, sont proches comme on peut le constater au vu de la figure VI.4.

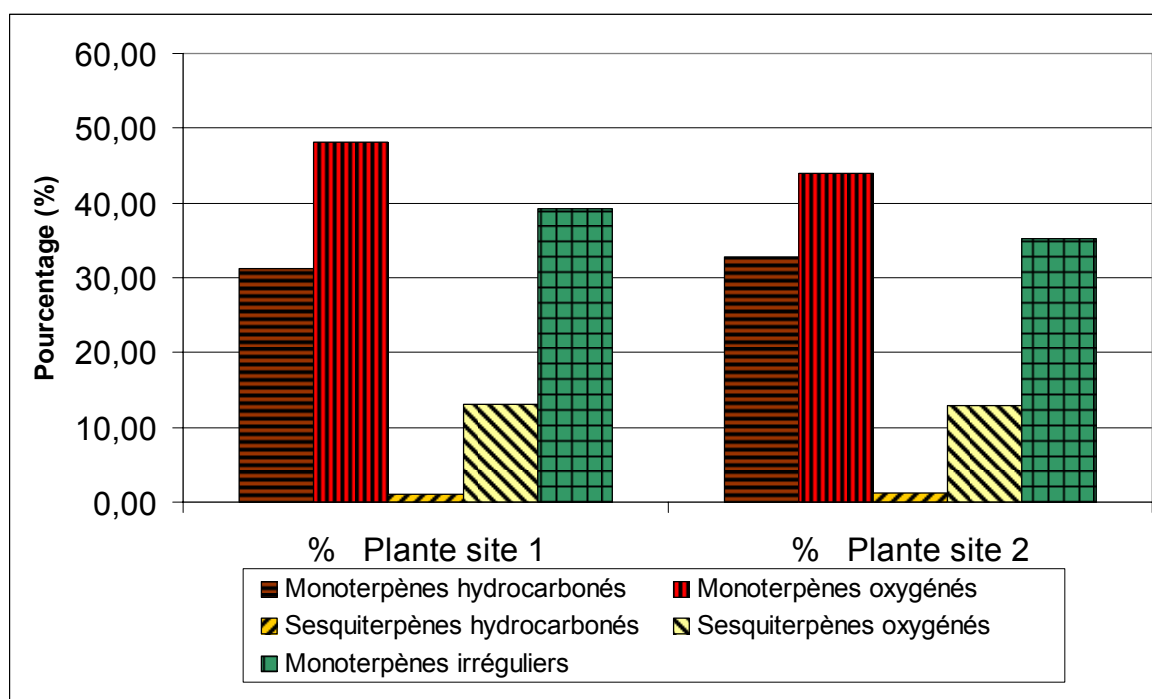


Fig.VI.4. Pourcentage en monoterpènes et sesquiterpènes de la plante entière (en Mai 2006)

VI.3.3.3. Comparaison des pourcentages en composés oxygénés et hydrocarbonés

Tab.VI.8. Pourcentage en composés oxygénés et hydrocarbonés de la plante entière (en Mai 2006)

Classe	Plante du site 1	Plante du site 2
Composés oxygénés (%)	62,6	57,7
Composés hydrocarbonés (%)	32,3	34,0

La figure VI.5 montre une similitude entre les pourcentages en composés oxygénés et hydrocarbonés des deux sites. Ce résultat est, en quelque sorte, la conséquence directe de ce qui a été vu au tableau VI.7, puisque la majorité des composés oxygénés ou hydrocarbonés sont de nature terpénique. Le pourcentage élevé en composés oxygénés majoritaires permet peut être d'expliquer la bonne résolution chromatographique obtenue avec la colonne polaire, alors que c'est le cas contraire avec la colonne apolaire ce qui a rendu l'identification très difficile avec cette dernière.

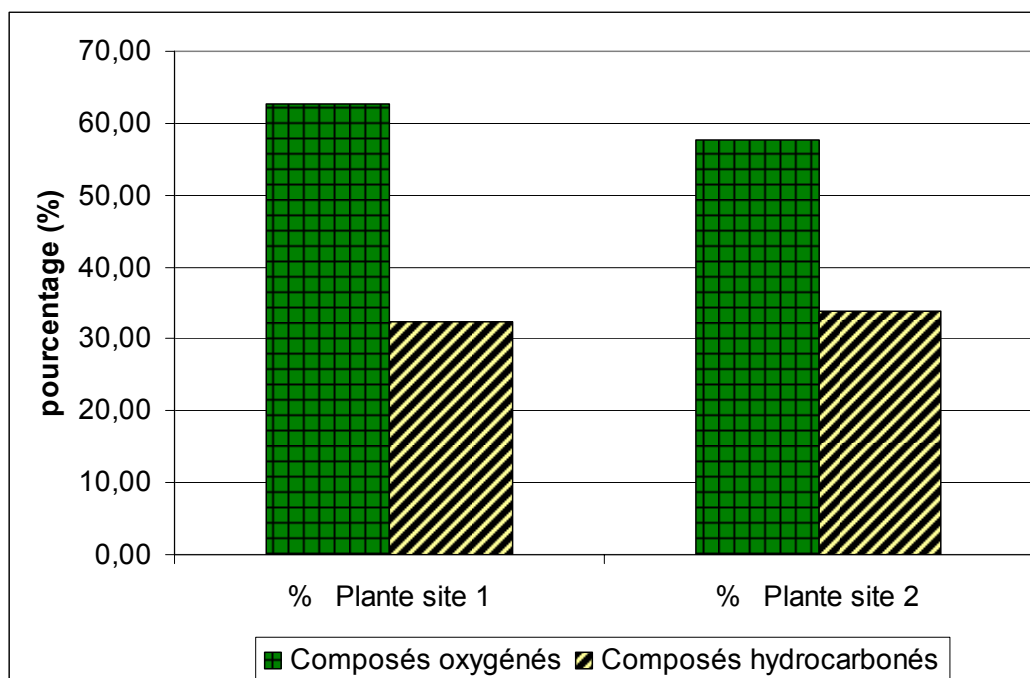


Fig.VI.5. Pourcentage en composés oxygénés et hydrocarbonés de la plante entière (en Mai 2006)

VI.3.3.4. Comparaison des pourcentages en fonctions oxygénées

Tab.VI.9. Pourcentage en fonctions oxygénées de la plante entière (en Mai 2006)

Classe	Plante entière du site 1	Plante entière du site 2
Aldéhydes (%)	0,8	0,1
Cétones (%)	45,1	44,9
Alcools (%)	16,3	11,8

Le tableau VI.9 donne les valeurs des fonctions oxygénées dans les essences des plantes. La figure VI.6 montre une très grande similitude des pourcentages, surtout de la fonction cétone, les ordres de grandeurs des pourcentages des fonctions aldéhydes et alcools sont similaires avec, toutefois, une légère supériorité des teneurs des trois fonctions dans l'H.E de la plante du site 1.

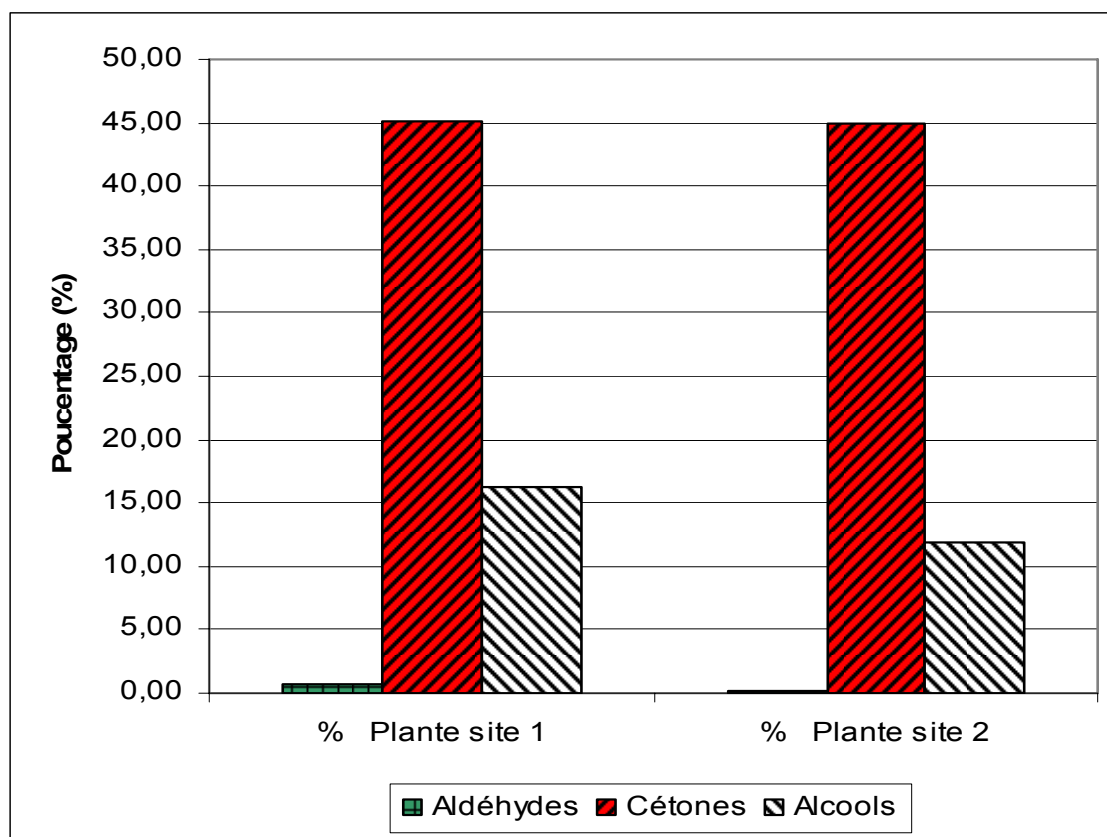


Fig.VI.6. Pourcentage en fonctions oxygénées de la plante entière (en Mai 2006)

VI.4. Etude de la variabilité des essences en fonction de l'organe**VI.4.1. Introduction**

Dans le but d'étudier la variabilité des huiles essentielles de Santoline en fonction de l'organe, nous avons injecté les essences des organes, provenant du site 1 (en juin 2006), dans les conditions expérimentales citées précédemment plus haut. Les injections en GC/MS/EI nous ont permis l'acquisition des chromatogrammes en courant ionique total (TIC) sur colonne polaire (Fig.VI.7 → Fig.VI.10) et sur colonne apolaire (Fig.A.3 → Fig.A.6 de l'annexe A). Les injections en GC/FID sur colonne polaire nous ont permis l'acquisition des chromatogrammes (Fig.B.3 → Fig.B.6 de l'annexe B).

VI.4.2. Résultats

Les résultats des traitements des données sont présentés dans le tableau VI.10.

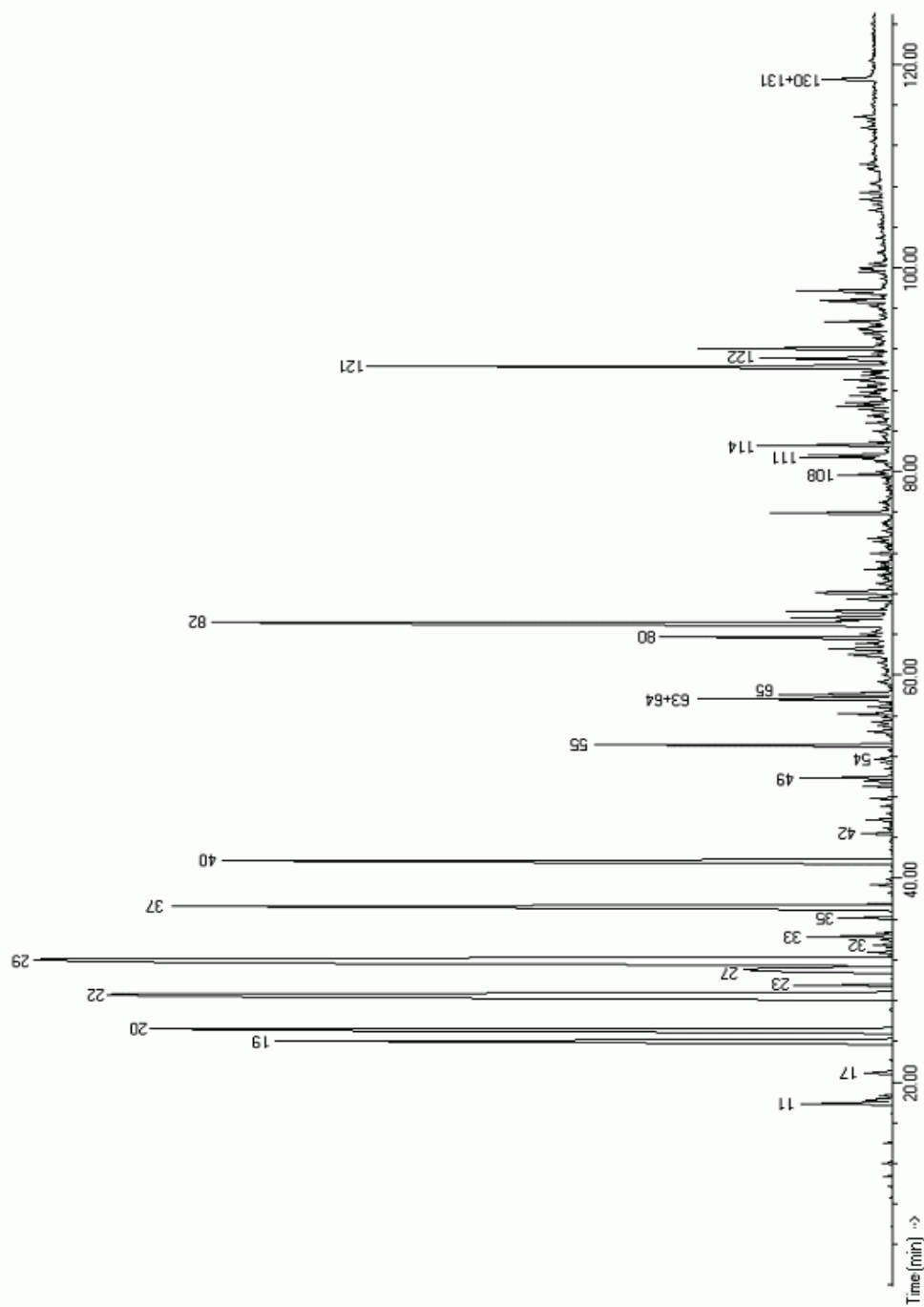
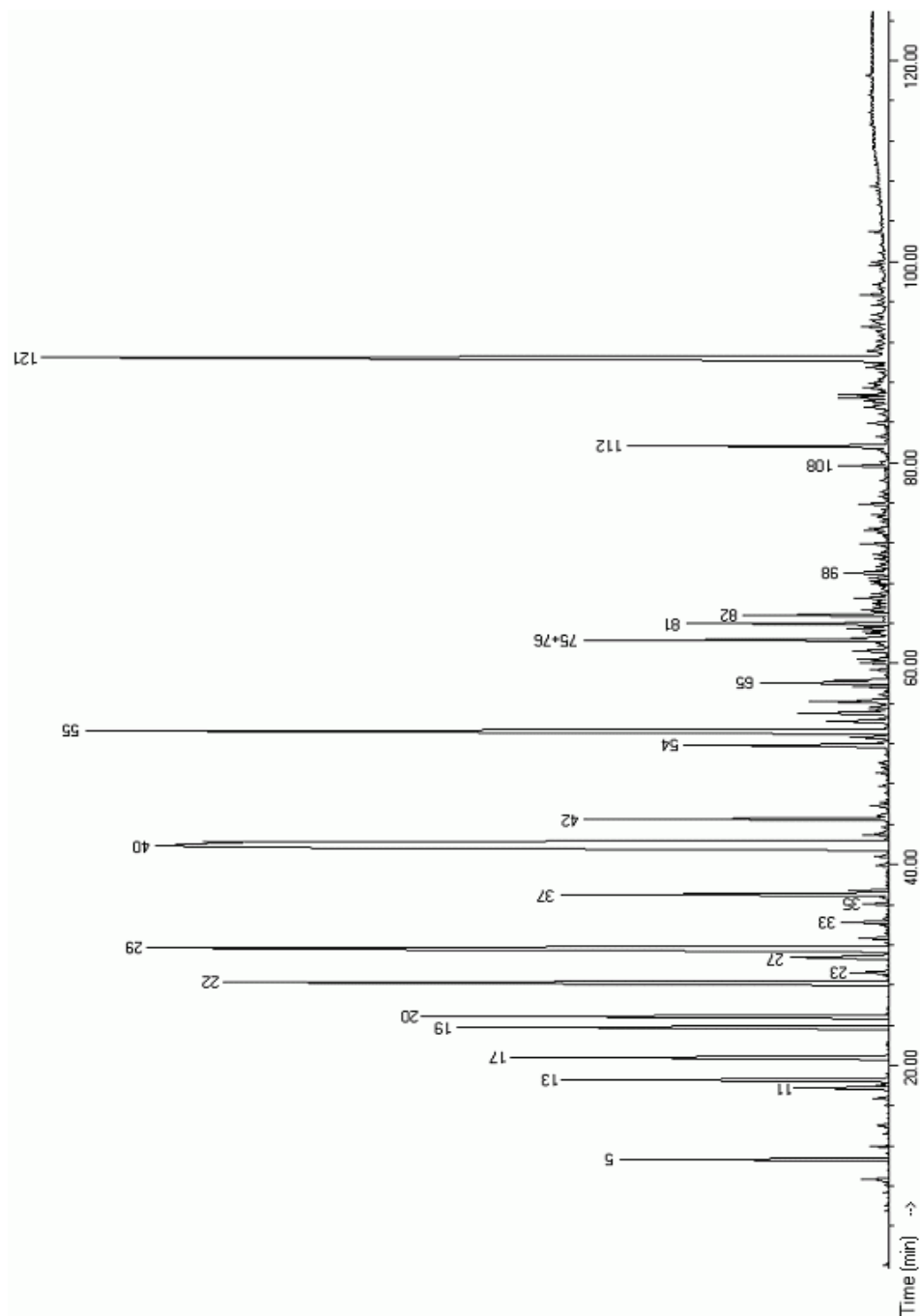


Fig.VI.7. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence des tiges
(juin 2006)



**Fig.VI.8. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence de feuilles
(juin 2006)**

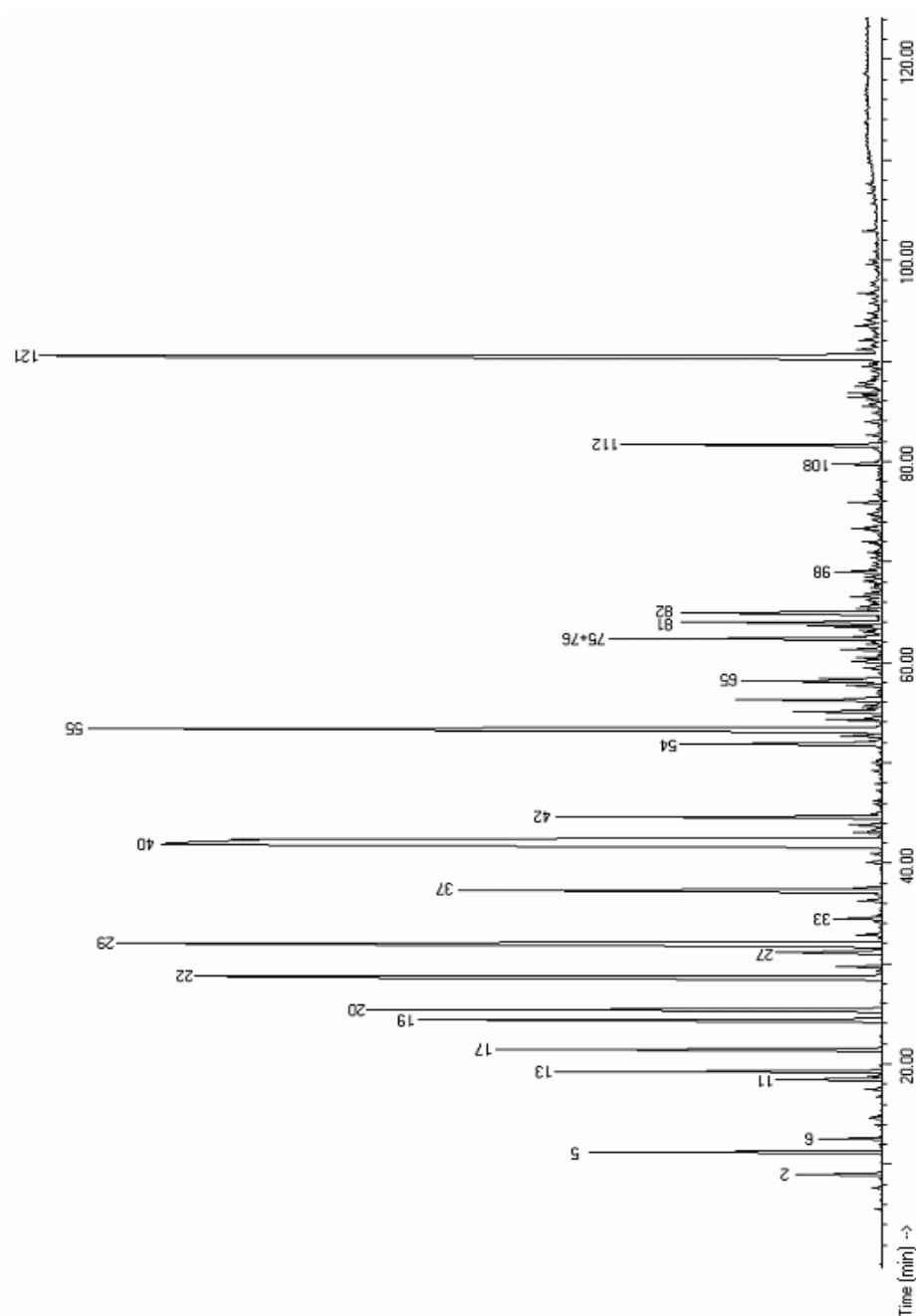


Fig.VI.9. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence de la plante entière (juin 2006)

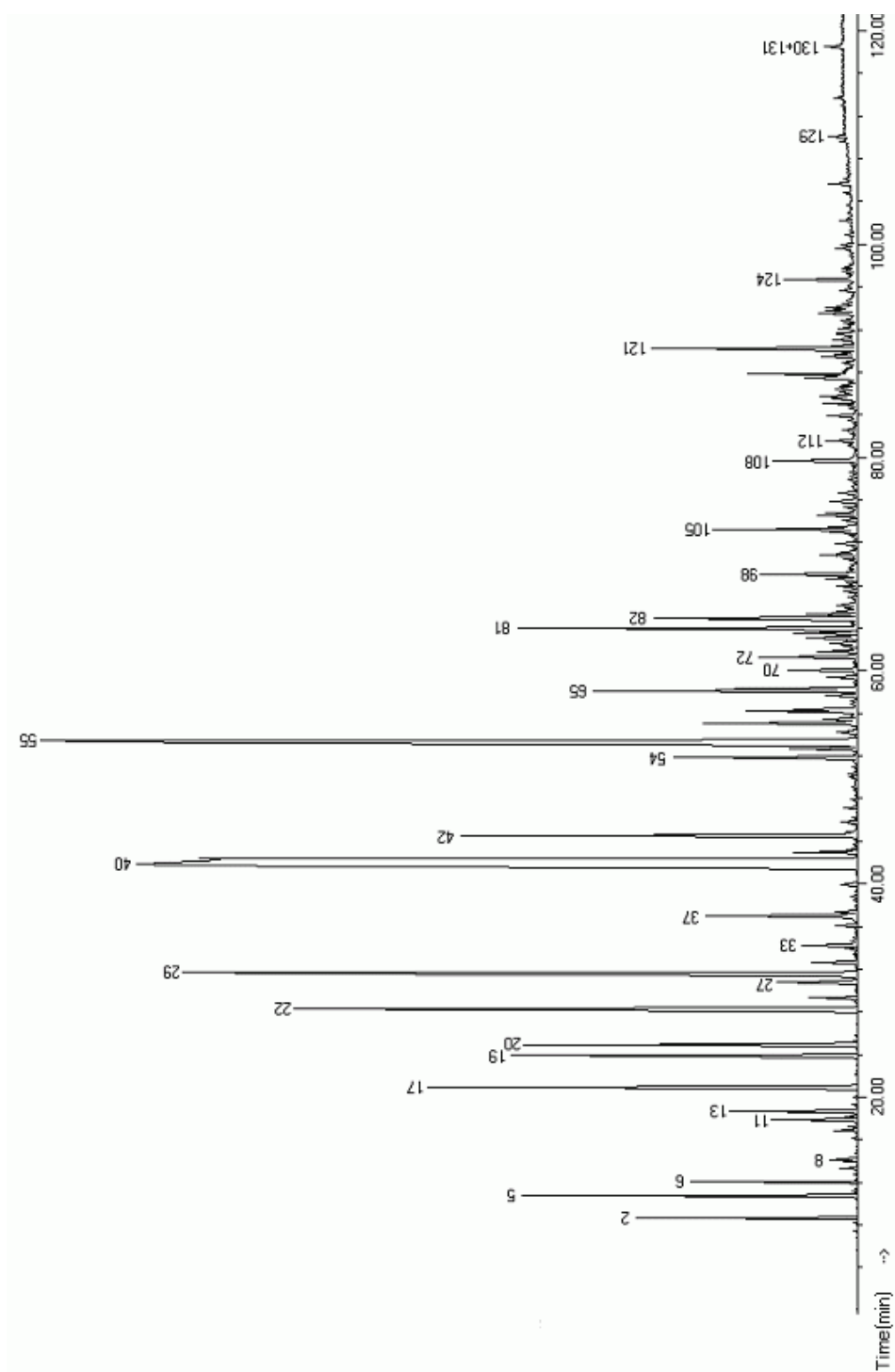


Fig.VI.10. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence des capitules (juin 2006)

**Tab.VI.10. Composition chimique des essences des organes en période florale
(juin 2006)**

N° pic	COMPOSANTS	% TIGES	% FEUILLES	% PLANTE INA	% CAPITULES	I _{exp} 20M	I _{exp} HP5MS
1	Dimethyl sulfide			tr	tr	746	521
2	ISO BUTYRALDEHYDE	tr	0,1	0,3	0,8	813	553
3	Acétone	tr	0,1	0,1	0,1	816	503
4	2-Methyl-2-heptène *	tr	tr	tr		846	803
5	2-Methyl-2-propénal	tr	1,2	1,2	1,5	879	568
6	2-Methylbutanal	tr	0,1	0,2	0,7	913	658
7	Ethanol				0,1	927	<500
8	1,3-octadiene	tr	0,1	0,1	0,1	951	823
9	Tricyclene	tr	0,1	0,1	0,1	1007	917
10	Methyl 2-methylbutyrate				tr	1011	774
11	α-Pinène	0,5	0,5	0,5	0,4	1021	927
12	α-Thujène	0,1	0,1	0,1	tr	1026	924
13	Santolina triene	0,1	1,5	1,3	0,5	1033	908
14	2-Methyl-3-buten-2-ol		tr	tr	tr	1035	610
15	Toluène		tr	tr	tr	1042	760
16	Ethyl 2-methylbutyrate		tr		tr	1053	850
17	Camphène	0,2	2,0	1,9	2,3	1067	952
18	n-Hexanal	tr				1085	
19	β-Pinène	6,2	2,6	2,6	1,9	1109	976
20	Sabinène	7,4	2,5	2,7	1,5	1123	972
21	δ-3-Carene	tr	tr	tr	tr	1151	1011
22	Myrcene	26,1	6,5	6,8	4,1	1168	994
23	α-Phellandrène					1168	1004
24	Isobutyl 2-methylbutyrate			tr		1177	
25	p-Mentha-1,7(8)-diene (Pseudolimonene)	tr				1178	1000
26	α-Terpinene	0,1	0,1	0,1	0,1	1182	1013
27	Limonène	0,7	0,7	0,7	0,5	1202	
28	1,8-Cineole	0	0	0	0	1214	1033
29	β-Phellandrène	26,5	7,9	8,9	5,9	1214	1033
30	(E)-2-Hexenal	tr	tr	tr		1222	
31	Amyl furan (2-Pentyl furan)	tr	tr	tr	tr	1234	
32	(Z)-β-Ocimene	tr	tr	tr		1238	1042
33	γ-Terpinène	0,2	0,2	0,2	0,2	1249	1057
34	(E)-β-Ocimene	tr	0,0	0,0	0,0	1255	1049
35	p-cymene	0,3	0,1	0,1	0,1	1274	1025
36	2-Methylbutyl 2-methylbutyrate		tr	tr	tr	1282	1106
37	Terpinolène	4,6	1,6	2,0	0,7	1287	1098
38	n-Tridecane				tr	1300	1300
39	6-Methyl-5-hepten-2-one		0,1	0,1		1340	
40	Artemisia ketone	6,0	40,7	40,8	50,7	1355	1067
41	(Z)-3-Hexenol		0,1	0,2	tr	1382	858
42	Yomogi alcohol	tr	1,0	1,0	1,6	1392	1003
43	1,3,8 p-Menthatriene	tr	tr	tr		1401	1112

Tab.VI.10. (suite)							
N° pic	COMPOSANTS	% TIGES	% FEUILLES	% PLANTE INA	% CAPITULES	I _{exp} 20M	I _{exp} 5MS
44	Perillene	tr	tr			1423	1100
45	Hexyl-2-methyl butyrate	tr	tr	tr		1428	
46	α, p-dimethylstyrene	tr		tr		1444	
47	trans-sabinene hydrate	tr	tr	tr	tr	1462	1099
48	Epoxyterpinolene *		tr	tr		1470	
49	δ-Elemene	< 0,2		tr		1475	
50	α-Longipinene	0	0	0	0	1477	1344
51	cis-3-hexenyl isovalerate	tr	tr	tr		1491	
52	α-Campholenal / α-Campholene aldehyde *		tr		tr	1497	
53	α-Copaene	tr				1500	1371
54	Artemisia alcohol		tr	tr		1503	1095
55	Camphre	1,2	10,1	9,4	12,6	1524	1144
56	Benzaldehyde		tr	tr	tr	1531	966
57	Linalool		0,9	0,9	0,7	1542	1104
58	cis-Sabinene hydrate	0,1	0,3	0,2	0,3	1545	1071
59	1-methyl-4-Acetyl-cyclo-hex-1-ene	tr	tr			1560	1132
60	trans-p-Menth-2-en-1-ol	tr		tr		1561	
61	Pinocarvone		0,5	0,5	0,6	1575	1160
62	Bornyl acetate		tr			1584	
63	β-Elemene	0,5		0,1		1595	1389
64	Thymol methyl ether	tr	0,2	0,2	0,3	1596	1234
65	Terpinen-4-ol (Terpin-4-ol)	0,3	0,4	0,4	0,8	1602	1176
66	(E)-Caryophyllene (β-Caryophyllene)	tr				1605	
67	2-Methyl-6-methylene-oct-3,7-dien-2-ol					1616	
68	cis-p-Menth-2-en-1-ol	tr				1625	
69	trans-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	0	0	0	0	1625	
70	Myrtenal	tr	0,1	0,1	0,1	1636	1193
71	Phenylacetaldehyde		tr	tr	tr	1650	
72	trans-Pinocarveol	0,1	0,1	0,1	0,3	1657	1138
73	(E)-β-Farnesene			tr		1666	1458
74	(Z)-3-Hexenyl tiglate	tr	tr			1669	1325
75	trans-Chrysanthemol					1675	
76	Lavandulol		0,1	0,1		1675	1175
77	Cryptone	0,3	0,1	0,1	0,2	1679	1184
78	α-Humulene (α-Caryophyllène)	tr				1680	
79	p-Mentha-1,8-dien-4-ol (Limonen-4-ol)			tr		1686	
80	γ-Curcumene	0,4	0,4	0,4	0,1	1695	1476
81	Bornéol		0,4	1,0	0,7	1702	1170
82	Germacrene D	4,8	0,7	0,6	1,2	1720	1476
83	Neryl acetate	tr	tr	tr	tr	1727	1366
84	β-Bisabolene			tr		1732	1505
85	Phellandral	tr	tr	tr	tr	1733	1274
86	Piperitone		tr	tr	tr	1737	1254
87	Bicyclogermacrene	0,2	tr	tr	tr	1745	1491
88	cis-Piperitol (cis-p-Menth-1-en-3-ol)		tr		tr	1746	
89	(E,E) -α-Farnesene	tr			tr	1751	1495

Tab.VI.10. (suite)							
N° pic	COMPOSANTS	% TIGES	% FEUILLES	% PLANTE INA	% CAPITULES	I _{exp} 20M	I _{exp} HP5MS
90	Naphtalène**					1754	
91	Geranyl acetate			tr		1758	
92	δ-Cadinene	0,1		tr		1766	1519
93	β-Sesquiphellandrene	0,1	tr	tr	tr	1778	1521
94	ar-curcumene	0,3	0,1	0,1		1781	1480
95	p -Methylacetophenone	0	0	0	0	1787	
96	Methyl salicylate			tr		1790	
97	Cumin aldehyde (Cuminaldehyde)	0	0	0	0	1790	1242
98	Myrtenol	tr	0,2	0,2	0,3	1797	1195
99	trans p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol			tr		1801	
100	Nerol	tr				1802	
101	(E,E)-2,4-Decadienal	0	0	0	0	1820	
102	trans-Carveol			tr		1837	
103	Geraniol			tr		1846	
104	p-Cymen-8-ol			tr		1851	1184
105	Benzyl 2-methylbutyrate	tr	0,1	0,1	0,4	1876	1386
106	Benzyl isovalerate			tr		1899	
107	(E)-β-ionone	tr				1948	
108	β-Caryophyllene oxide	0,1	0,1	0,1	0,2	2000	1576
109	Perilla alcohol		tr			2009	
110	Salvia-4(14)-en-1-one			tr		2026	1587
111	Pentadecanal		tr	tr		2035	
112	(E)-Nerolidol	0,4	0,6	0,6	0,1	2038	1563
113	Octanoic acid				tr	2054	
114	Germacrene D-4-ol			tr		2059	
115	Heneicosane				tr	2100	2100
116	Cumin alcohol (p-Cymen-7-ol)	0	0	0	0	2106	
117	Spathulenol	0,1	0,1	0,1	0,1	2133	1574
118	α-Bisabolol oxide B	0,1	0,1	0,1	0,2	2147	1650
119	Eugenol (2-Methoxy-4-(2-propenyl) phénol)		tr	tr	tr	2174	1361
120	epi-α-Muurolool (T-muurolool)					2195	
121	α-Bisabolol	1,6	8,9	8,4	0,5	2221	1697
122	α-Cadinol	tr				2241	1652
123	Longiverbenone (Vulgarone B)	0	0	0	0	2251	1650
124	α-Cyperone		tr	tr	tr	2368	1747
125	Pentacosane		tr		tr	2500	2500
126	gamma-Costol		tr	tr		2518	1748
127	Phytol				tr	2614	2113
128	Tetradecanoic acid (Myristic acid)				tr	2690	
129	Heptacosane		tr		tr	2700	2700
130	Hexadecanoic acid	tr	tr		tr	2900	1971
131	Nonacosane	0,1	tr		tr	2900	2900
Total(%) :		90,0	94,0	95,6	93,7		

* tentative d'identification

** composé trouvé dans les échantillons de 2005 à l'état de traces
tr (<0,1 %)

VI.4.3 Discussion

VI.4.3.1. Comparaison des pourcentages en composés majoritaires

Tab.VI.11 .Pourcentage des composés majoritaires en fonction de l'organe en période florale (juin 2006)

N° de Pic	Composants	Tiges (%)	Feuilles (%)	Plante entière(%)	Capitules (%)
5	2-Methyl-2-Propénal		1,1	1,2	1,5
13	Santolina triene	0,1	1,5	1,3	0,5
17	Camphène	0,2	2,0	1,9	2,3
19	β -Pinène	6,2	2,6	2,6	1,9
20	Sabinène	7,4	2,5	2,7	1,5
22	Myrcene	26,1	6,5	6,8	4,1
27	Limonène	0,7	0,7	0,7	0,5
29	β-Phellandrène	26,5	7,9	8,9	5,9
37	Terpinolène	4,6	1,6	2,0	0,7
40	Artemisia ketone	6,0	40,7	40,8	50,7
42	Yomogi alcohol	0,0	1,0	1,0	1,6
55	Camphre	1,2	10,1	9,4	12,6
81	Bornéol	4,8	0,4	1,0	0,7
82	Germacrène D		0,7	0,6	1,2
121	α -Bisabolol	1,6	8,9	8,4	0,5
Total (%) :		85,4	88,2	89,5	86,2

Au vu du tableau VI.11, la première remarque observable est l'absence totale de la Vulgarone B de tout organe. La seconde remarque est l'augmentation du taux du composé majoritaire dans la plante entière par rapport à celui de Mai. Le taux élevé de l'artemisia ketone dans les capitules permet d'expliquer son augmentation dans la plante entière (fleurie). Si l'artemisia ketone constitue le produit majoritaire pour les feuilles et les capitules, il n'en est pas de même pour les tiges. Pour ces dernières les deux produits majoritaires sont le myrcene (26,1%) et le β -Phellandrène (26,5%). La figure VI.11 montre la différence du chémotype des essences des feuilles et des capitules d'une part et celle des tiges d'autre part. La similitude par contre est frappante entre l'essence des feuilles et celle de la plante.

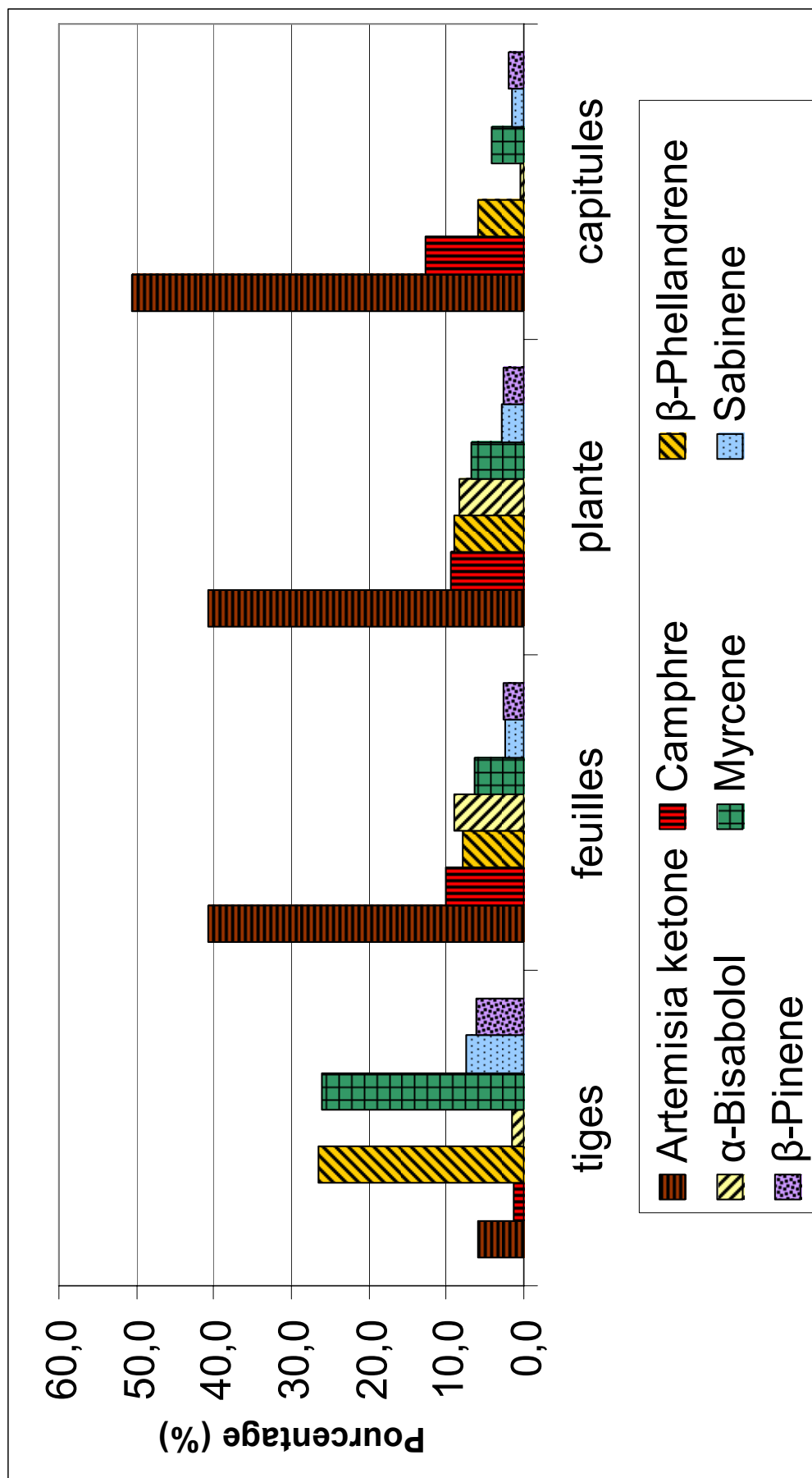


Fig.VI. 11. Pourcentage des composés majoritaires en fonction de l'organe en période florale (juin 2006)

VI.4.3.2 Comparaison des pourcentages en monoterpènes et sesquiterpènes

Tab.VI.12. Pourcentage en monoterpènes et sesquiterpènes en fonction de l'organe en période florale (juin 2006)

Classe	tiges	feuilles	plante entière	capitules
Monoterpènes hydrocarbonés (%)	73,0	26,2	28,0	18,5
Monoterpènes oxygénés (%)	7,8	54,8	54,7	68,6
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)	6,6	1,1	1,2	1,3
Sesquiterpènes oxygénés (%)	2,3	9,9	9,2	1,1
Monoterpènes irréguliers (%)	6,1	43,3	43,2	52,8

Les valeurs présentées dans le tableau VI.12 montrent que dans la composition chimique de chaque organe, les monoterpènes représentent la fraction majoritaire (plus de 80%). Au sein de cette dernière, dans la composition des tiges, les monoterpènes hydrocarbonés (73%) dépassent de loin les monoterpènes oxygénés. A l'opposé, dans la composition des feuilles et des capitules (avec plus de 54%) la fraction monoterpénique oxygénée est majoritaire. Les monoterpènes irréguliers sont présents avec un taux dépassant les 40% dans les essences des feuilles et des capitules ; cependant, ce taux est réduit à 6,1% dans la composition des tiges. La figure VI.12 montre clairement la distinction, entre les tiges d'une part et le reste des organes d'autre part.

La fraction sesquiterpénique, minoritaire dans les organes, est présentée par un taux très faible dans les capitules équivalent à (2,4%) et un taux avoisinant les 10% pour le reste des organes.

La similitude de la composition chimique entre la plante entière et celle des feuilles est affirmée. Cette similitude est en relation avec ce qui a été vu dans la conclusion du chapitre V, montrant que la plante puise l'essentiel de son "essence" à partir des feuilles.

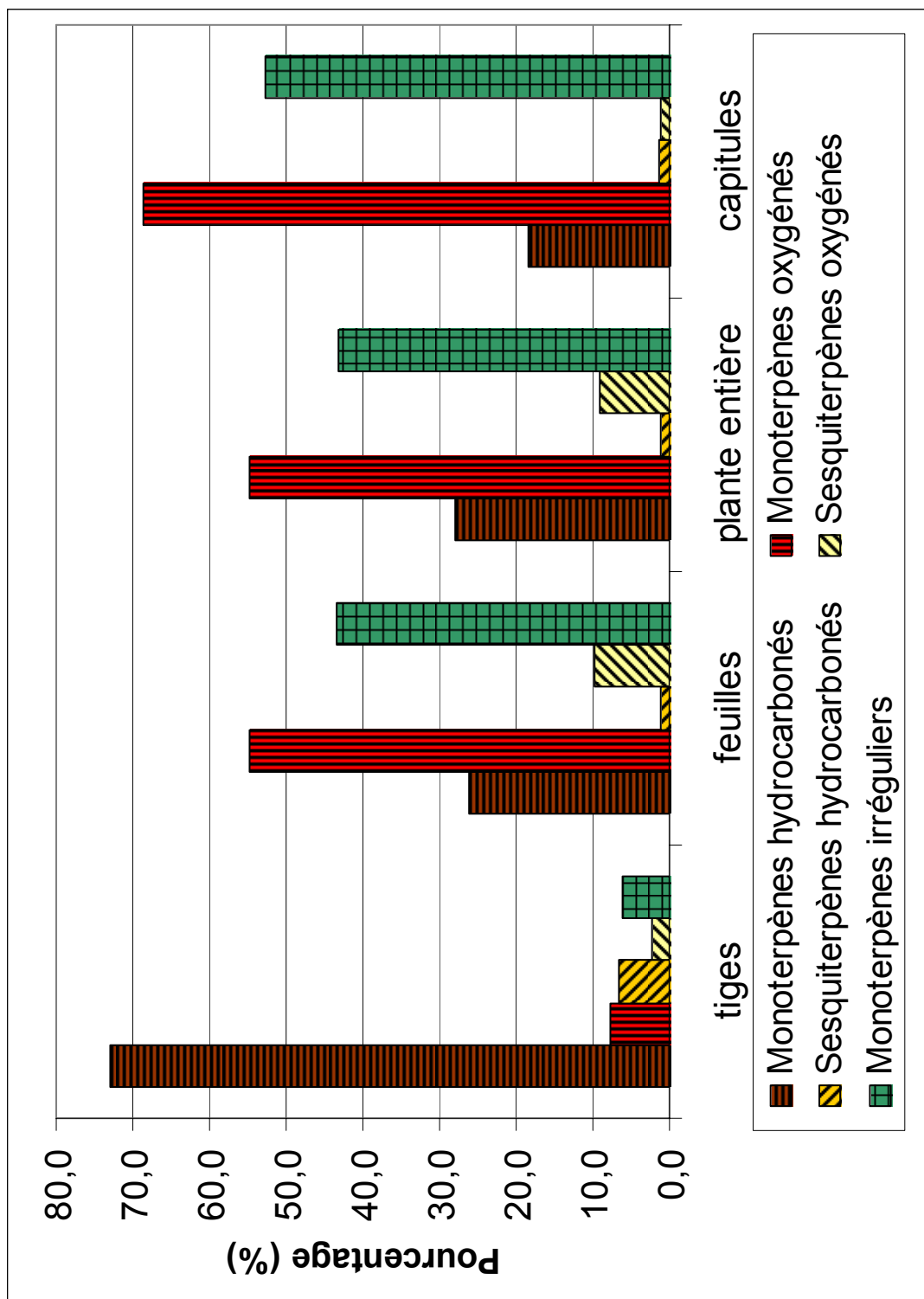


Fig.VI.12. Pourcentage en monoterpènes et sesquiterpènes en fonction de l'organe en période florale (juin 2006)

VI.4.3.3. Comparaison des pourcentages en composés oxygénés et hydrocarbonés

Tab.VI.13. Pourcentage en composés oxygénés et hydrocarbonés en fonction de l'organe en période florale (juin 2006)

Classe	tiges	feuilles	plante entière	capitules
Composés oxygénés (%)	10,5	66,4	66,2	73,4
Composés hydrocarbonés (%)	79,7	27,4	29,3	19,9

Les valeurs indiquées au tableau VI.13 récapitulent, en somme, ce qui a été déjà vu au tableau VI.12. Le taux de composés oxygénés représente globalement la somme des deux fractions oxygénés, monoterpéniques et sesquiterpéniques. Il est de même pour le taux de composés hydrocarbonés. La distinction entre les tiges d'une part et le reste des organes est visible (vu figure VI.13).

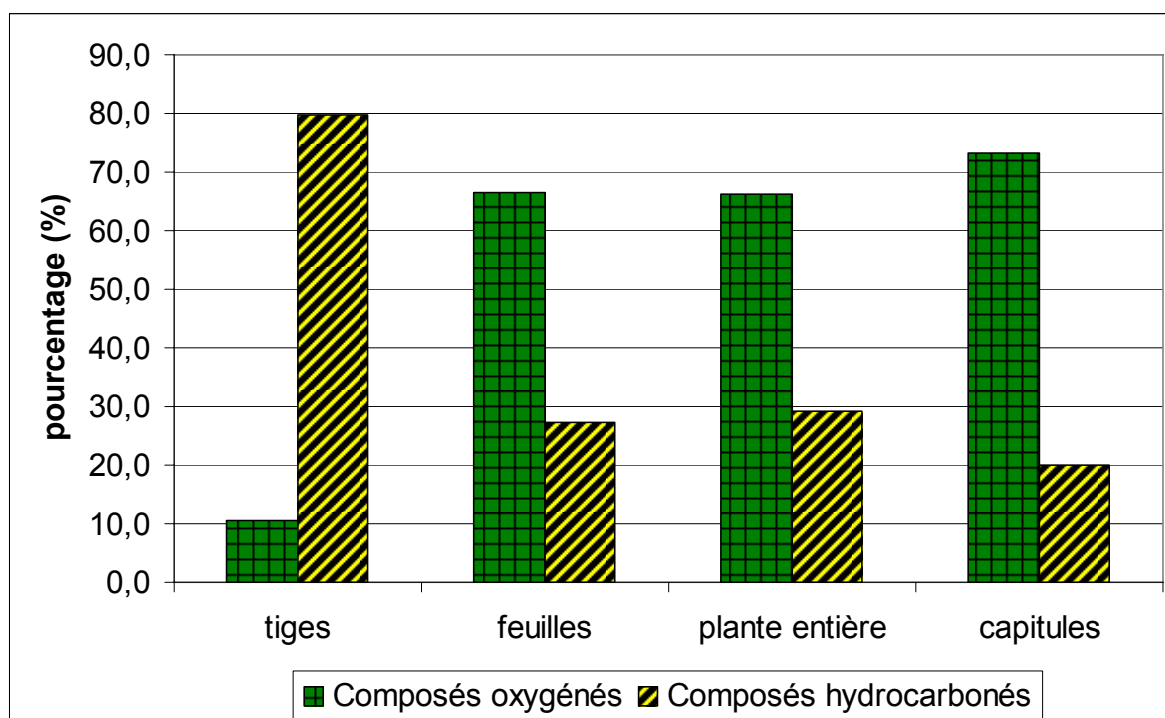


Fig.VI.13. Pourcentage en composés oxygénés et hydrocarbonés en fonction de l'organe en période florale (juin 2006)

VI.4.3.4. Comparaison des pourcentages en fonctions oxygénées

Tab.VI.14. Pourcentage en fonctions oxygénées en fonction de l'organe en période florale (juin 2006)

Classe	tiges	feuilles	plante entière	capitules
Aldéhydes (%)	0,1	1,4	1,8	3,1
Cétones (%)	7,6	51,6	50,9	64,0
Alcools (%)	2,6	13,1	13,1	5,4

Le tableau VI.14 détaille la fraction oxygénée. La figure VI.14 montre la nature cétonique des essences des feuilles et surtout celle des capitules. Ce taux élevé est dû essentiellement à la présence de l'artémisia ketone et au camphre. A l'inverse, dans les tiges les deux cétones citées ne représentent qu'un faible taux dans la composition. En seconde position, nous avons la fonction alcool avec un taux avoisinant les 13% pour les feuilles et la plante. Ce taux est plus faible pour les capitules et les tiges. Le pourcentage relatif des aldéhydes est le plus faible des trois fonctions chimiques avec un maximum atteint à 3,1%, attribué à l'essence des capitules.

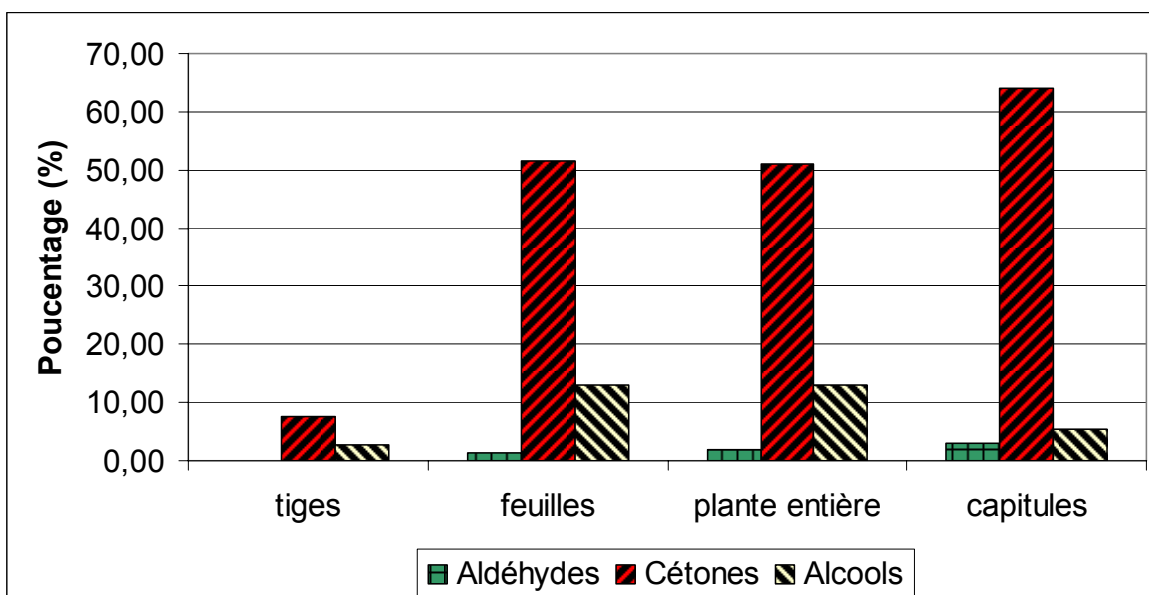


Fig.VI.14. Pourcentage en fonctions oxygénées en fonction de l'organe en période florale (juin 2006)

VI.5. Conclusion

La composition des essences de santoline est marquée par la présence surtout d'un très grand nombre de composés à l'état de traces.

L'étude de la variabilité des essences des plantes entières, en provenance des deux sites (en Mai 2006), nous a montré une grande similitude entre ces essences. Ces dernières sont caractérisées par une forte teneur en composés monoterpéniques. Ces derniers sont surtout oxygénés et renferment un taux élevé de composés irréguliers. Le taux global élevé des composés oxygénés est dû "probablement" à la bonne résolution chromatographique obtenue sur colonne polaire, ce qui n'a pas été le cas lors de l'utilisation de la colonne apolaire. Du point de vue qualitatif, la plus remarquable différence est l'existence de la Vulgarone B dans l'H.E de la plante du site 2 avec un pourcentage notable de 4,21% et son absence totale dans l'H.E de la plante du site 1. Le pic de la Vulgarone B permet à lui seul de différencier les chromatogrammes (ou les "TIC") des essences des deux sites. Il faut noter que ce composé caractérise la santoline des jardins de France [14]. La question qui s'impose est alors : Est ce que la plante du site 2 (qui est un site ornemental) est d'origine algérienne ou française ?

L'étude, de la variabilité des essences des organes de la plante du site 1 pendant la période florale, nous a montré à la fois une similitude et des différences entre les compositions des différents organes.

La similitude de la composition de l'essence des feuilles avec celle de la plante est frappante en tout point de vue. Ce résultat était prévisible ; il est la conséquence directe de la conclusion du chapitre V, montrant que la plante puise l'essentiel de ses huiles essentielles des feuilles.

La plus grande différence existe entre les tiges et les capitules. Elle est due essentiellement au taux élevé de l'artemisia ketone et du camphre dans les capitules, alors que dans l'essence des tiges, les produits majoritaires sont le myrcene et le β -phellandrène.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les plantes sont une source inépuisable à l'être humain. Les métabolites secondaires dont font partie les huiles essentielles contiennent des substances très recherchées par les industries des cosmétiques, de la pharmacie et de l'aromathérapie.

Ainsi, ce projet d'étude contribue à une meilleure connaissance d'une plante endémique comme la santoline algérienne, en mettant en évidence l'utilisation de ses huiles essentielles.

Dans une première étape nous avons effectué plusieurs extractions utilisant l'hydrodistillation comme méthode d'isolation des essences. L'examen des résultats des rendements obtenus des différentes parties aériennes de la plante ainsi que ceux de la plante entière nous a permis de constater que la meilleure période de production et de la richesse des huiles essentielles se situe en période florale. Le tri des organes doit être "très minutieux " pour qu'il n'y ait pas d'erreur sur l'évaluation des rendements et par la suite sur l'identification des constituants à l'état de trace.

Les feuilles représentent la " source" principale de la plante en huile essentielle ; par contre, les tiges présentent les rendements les plus faibles.

L'établissement des indices physiques des divers extraits a été réalisé utilisant uniquement des indices de réfraction et la densité ; ils présentent malheureusement des valeurs constantes qui ne peuvent pas faire la distinction entre les organes.

La séparation et l'analyse des constituants des mélanges complexes de santoline algérienne ont été réalisées sur deux colonnes capillaires de polarité différente, par GC/MS/EI et GC ; ce qui a permis d'en identifier la majorité des constituants (au total 131), et de déterminer la proportion de chacun d'eux.

La composition des essences de santoline est marquée par la présence surtout d'un très grand nombre de composés à l'état de traces. Ces produits identifiés ne diffèrent pas de ceux déjà rencontrés dans la littérature.

Au vu des difficultés rencontrées, lors de l'identification des constituants, l'optimisation des conditions expérimentales d'analyse (matériels et logiciels) s'avère nécessaire afin de réaliser une interprétation fiable des résultats issues de la GC et la GC/MS.

L'étude de la variabilité des huiles essentielles de santoline nous a permis de faire les différentes constatations suivantes :

- Les H.E de santoline sont caractérisées par une forte teneur en composés monoterpéniques oxygénés en majorité, renfermant un taux élevé de composés irrégulier.
- Des différences qualitatives et quantitatives sont observées pour les essences des sites 1 et 2. la différence la plus remarquable est l'existence de la vulgarone B dans l'extrait du site 2 (4,21%) et son absence totale dans celui du site 1. Etant donné que la vulgarone B caractérise la santoline des jardins de France (14), nous nous posons la question : est ce que la plante provenant du site 2 (site ornemental) serait elle d'origine algérienne ou française ?
- La composition chimique des essences des divers organes de la plante provenant d'un même site, présentent certaines similitudes (dans le cas des feuilles et de la plante entière), et des différences notables (dans le cas des tiges et des capitules). Il est à noter que l'étude de la composition des tiges, n'a pas, à notre connaissance, fait l'objet d'étude.

Ce travail est une contribution à la connaissance de la composition chimique des extraits de santoline récoltée en période florale. Cette étude pourrait être valorisée en considérant la plante dans son milieu naturel.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [01] L.TRABUT et J.A.BATTANDIER, Flore de l'Algérie. Dicotylédones XI Edition: Typographie Adolf Jourdan. Alger et Librairie F. Savy, Paris, 852 P, 1888-1890.
- [02] P.QUEZEL et S.SANTA, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol II, Edit : CNRS Paris, 1962-1963.
- [03] L.BEZANGER-BEAUQUESNE *et al.* , Plantes médicinales des régions tempérées, Edit : Maloine S.A. Editeur, 1980.
- [04] E. GHALEB, Dictionnaire des sciences de la nature, Office des Publications universitaires, Alger, 1990.
- [05] A. BELOUED, Plantes médicinales d'Algérie, Edit : Office des Publications universitaires, Alger, 2001.
- [06] A. HELIMI, Les plantes médicinales en Algérie, Edit : BERTI Editions, 2004.
- [07] E.M. PERROT, Matières première usuelles du règne végétal, 2 vol, Edit : MASSON et C^{ie}, PARIS, 1943-1944.
- [08] R.M. Giner, J.L.Rios, A.Villar, Inhibitory effects of *Santolina chamaecyparissus* extracts against spasmogen agonists. *J. Ethnopharmacol.* 27, 1–6., 1989.
- [09] B. Suresh, S. Sriram, S.A. Dhanaraj, K. Elango, K. Chinnaswamy, Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. , *Journal of Ethnopharmacology* 55, 151–159., 1997.
- [10] A. Sala, M. Carmen Recio, R.M. Giner, S. Manez and J.L Rios, Anti-Phospholipase A2 and Anti-Inflammatory Activity of *Santolina chamaecyparissus*, *PHARMACOLOGY LETTERS*, 2000.
- [11] A.F. Thomas and B. Willhalm, The oil of *Santolina chamaecyparissus* L. a new, non isoprenoid C10 hydrocarbon, *Tetrahedron Letters* No. 49, pp. 3775-3778, 1964.
- [12] A. VILLAR, R.M. GINER, J.L. Rios, CHEMICAL COMPOSITION OF *SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS* SSP. *SQUARROSA* ESSENTIAL OIL, *Journal of Natural Products* Vol. 49, No. 6, 1986.
- [13] M.J Pérez-Alonso, A. Velasco Negueruela, Essential oil components of *Santolina chamaecyparissus*.L, *Flavour Frag. J.* 7, 37–41., 1992.
- [14] B.Demirci, T. Ozek and K.H.C. Baser, Chemical Composition of *Santolina Chamaecyparissus* L. Essential Oil, *J. Essen. Oil Res.* 12, 625-627, 2000.

- [15] A. FRIDLENDER, V. MASOTTI, J-M. BESSIERE, J. VIANO, Composition des huiles essentielles de feuilles et de capitules de *Santolina chamaecyparissus* originaire du Gard (France), *SOCIETE FRANCAISE DE CHIMIE Section PACA XVe, Journée de la chimie - 18-19 avril 2002*, 2002.
- [16] Ashok Ahuja, S. K. Bakshi, S. K. Sharma, R. K. Thappa, S. G. Agarwal, S. K. Kichlu, R. Paul and M. K. Kaul, Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender), *Flavour Fragr. J.* ; 20: 403–406, 2005.
- [17] A. LAYADI, S. SOUADKI, Contribution à l'étude des huiles essentielles de deux plantes : *Ocimum basilicum* L. et *Santolina chamaecyparissus* L. (Santoline), *Mémoire d'ingénieur INA*, ELHARRACH, 1999.
- [18] E.J. PARRY, The Chemistry of Essential Oils and Artificial Perfumes, *Scott, Greenwood and Son*, LONDON, 1922.
- [19] C. BOUTEKEDJIRET, Thèse de Doctorat d'état : Etude des procédés d'extraction appliqués à la récupération des essences de romarin. Transfert de matière et modélisation, E.N.P., EL HARRACH, 1999.
- [20] S. Chemat, Thèse de Doctorat : Contribution à l'étude de l'extraction de la carvone et du limonène, U.S.T.H.B., 2004.
- [21] S. MITRA, Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, Wiley-Interscience, NEW JERSEY, 2003.
- [22] J.F. Clevenger, Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type, *Amer. Perf. & Ess. Oil Rev.*, Oct. 1928, 467-503.
- [23] J.D. ROBERTS et M.C. CASERIO, Chimie organique moderne, Edit : Ediscience S.A., PARIS, 1968.
- [24] N.L. ALLINGER, Chimie organique, Vol III, Edit: McGraw-Hill, PARIS, 1984.
- [25] B. PAVLOV, A. THERENTIEV, Chimie organique, Editions MIR , Moscou, 1975.
- [26] W.W. EPSTEIN, C.D. POULTER, A Survey of Some Irregular Monoterpenes and their Biogenetic Analogies to Presqualene Alcohol, *Phytochemistry*, 1973, Vol. 12, pp. 737 to 747, 1973.
- [27] W.W. EPSTEIN *et al.*, Mass Spectral Data for Gas Chromatograph-Mass Spectral Identification of Some Irregular Monoterpenes, *Journal of Chemical and Engineering Data*, Vol.21, No 4 1976.

- [28] D.V. BANTHORPE et al, Biosynthesis of Irregular Monoterpenes in Extracts From Higher Plants, *Phytochemistry*, 1977, Vol. 16, pp. 85-92, Pergamon Press.,1977.
- [29] U. MAHMOOD et al, Sesquiterpene and long Chain ester from *Tanacetum longifolium*, *Phytochemistry* 61 (2002) 913-917, 2002.
- [30] F. Tomi et al., Spectral Assignments and Reference Data, *Magn. Reson. Chem.* **43**: 73-74, 2005.
- [31] C. Zidorn a, N.B. Perry b, A chemosystematically significant 6,8,11-trihydroxygermacrane derivative from the New Zealand Apiaceae *Anistome pilifera* *Biochemical Systematics and Ecology* 30 (2002) 1055–1063.
- [32] L.JIROVETZ et al, *Eur Food Res Technol* 217:120–124, 2003.
- [33] M. MIYAZAWA et al., Volatile components of the leaves of *Brassica rapa* L. var. *perviridis* Bailey, *Flavour and Fragrance Journal.* ; 20: 158-160., 2005.
- [34] X. FERNANDEZ et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 2974-2952., 2005.
- [35]A.P.Murray et al, *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 353-355, 2006.
- [36] W. Jennings and T. Shibamoto, Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography, *Academic Press NY*, 1980.
- [37] R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Allured Publishing, Carol Stream, Illinois, 1995.
- [38] A. Farah, M. Fechtal, A. Chaouch and S. Zrira, The essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* and its natural hybrid (clone 583) from Morocco, *Flavour Fragr. J.*; 17: 395–397, 2002.
- [39]H. LAMENDIN et al., Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires, *EMC-Dentisterie* 1 176-192, 2004.
- [40] R. GUBA, Toxicity Myths- The Actual Risks of Essential Oil Use, *International Journal of Aromatherapy* Vol. 10, No 1/2, 2000.
- [41] Encyclopédie des plantes médicinales, Edit : Larousse, 2001.
- [42] R. TISSERAND, Essential Oil Safety II Metabolism, Neurotoxicity, Reproductive Toxicity. *The International Journal of Aromatherapy* Vol. 7, No 4, 1996.
- [43] R. TISSERAND, Essential Oil Safety III Cancerogenesis Phototoxicity, *The International Journal of Aromatherapy* Vol. 8, No 1, 1997.

- [44] K.-M. Yoo, Statistical analysis of aromatherapy preferences and complications for 3000 otolaryngology patients, *The International Journal of Aromatherapy* **16**, 181-185, 2006.
- [45] A. Braithwaite, F. J. Smith, Chromatographic Methods, *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, the Netherlands, 1999.
- [46] R. E. Ardrey, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction, *Wiley*, Chichester, ENGLAND, 2003.
- [47] H.M. McNair, J. M. Miller, Basic Gas Chromatography, *Wiley InterScience*, NEW YORK, 1998.
- [48] J. Tranchant, Manuel pratique de chromatographie en Phase gazeuse, *Masson*, 1995.
- [49] R.L. Grob, Modern Practice of Gas Chromatography, *Wiley InterScience*, NEW YORK, 1995.
- [50] W. JENNINGS *et al.*, Analytical Gas Chromatography, *ACDEMIC PRESS*, SAN DIEGO, CALIFORNIA, 1997.
- [51] G. LAVOUE, La chromatographie en phase gazeuse et se applications, *LABO-France EDITEUR*, PARIS, 1976.
- [52] R. Wittkowski et R. Matissek, Capillary Gas Chromatography in Food Control and Research, *TECHNOMIC Publishing Co, Inc.*, Pennsylvania, U.S.A., 1993.
- [53] W. E. Harris and H. W. Habgood, Programmed Temperature Gas Chromatography, *John Wiley & Sons*, NEY YORK, 1966.
- [54] R.P. W. Scott, Tandem Techniques, *John Wiley & Sons*, ENGLAND, 1997.
- [55] I.A. FOWLIS, Gas Chromatography, *John Wiley & Sons*, ENGLAND, 1995.
- [56] H. RICHARD, J.-L. MULTON, Les arômes alimentaires. Paris : APRIA : Tech.& Doc./Lavoisier, PARIS, 1992.
- [57] VAN DEN DOOL, H. and KRATZ, P. D., *Journal of chromatography*. 11, 463–471, 1963 .
- [58] P. D'Arcy, W.G. Mallard, J. Reed, AMDIS MANUAL, *U.S. Department of Commerce*, U.S.A., 2005.
- [59] F.W. McLafferty, F. Turecek, Interpretation of Mass Spectra, *University Science Books*, SAUSALITO, CALIFORNIA, 1993.
- [60] R.E. MARCH, An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, Vol. 32, 351-369, (1997).
- [61] Anonyme, Les techniques de l'ingénieur, Bersoft, (1997).

- [62] E. Bedir et al, *Food Chemistry* 100, 553-559, 2007
- [63] A.M. Viljoen et al., *South African Journal of Botany* 72, 99-104, 2006
- [64]. A.M. Viljoen et al., *South African Journal of Botany* 72, 287-290, 2006.
- [65] Nurhayat Tabanca et al., *Journal of chromatography A*, 1117, 194-205, 2006.
- [66] B. DEMIRCI et al., *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3146-3150, 2006.
- [67]. GOCALP ISCAN et al., *J. Agric. Food Chem.*, 54, 170-173, 2006.
- [68]. M. Kurkcuglu, K. H. C. Baser M. Vural, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 42, No. 1, 2006.
- [69] A. Altintas, M. Kosar, N. Kirimer, K. H. C. Baser, B. Demirci, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 42, No. 1, 2006.
- [70] A.M. Viljoen, S. Subramoney, S.F. Van Vuuren, K.H.C. Baser, B. Demirci, *Journal of Ethnopharmacology* 96, 271-277, 2005.
- [71] H. Zeytinoglu et al., *Food Chemistry* 93, 551-556, 2005.
- [72] A.M. Viljoen et al., *Journal of Ethnopharmacology* 102, 382-390, 2005.
- [73] K. Husnu Can Baser et al., *Journal of chromatography A*, 1097, 192-198, 2005.
- [74] G. Iscan, N. Kirimer, M. Kurkcuglu and K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 41, No. 6, 2005.
- [75] E. Sezik, E. Kocakulak, K. H. C. Baser and T. Ozek, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 41, No.3, 2005.
- [76] F. Demirci, K. H. C. Baser, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 19, 72-73, 2004.
- [77] A.C.U. Lourens, D. Reddy, K.H.C. Baser, A.M. Viljoen, S.F. Van Vuuren, *Journal of Ethnopharmacology* 95, 253-258, 2004.
- [78] F. DEMIRCI et al. , *J. Agric. Food Chem.*, 52, 251-254, 2004
- [79] A. Allintas, Y. B. Kose, E. Yuçei, B. Demirci, K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 40, No. 6, 2004.
- [80] B. Demirci, F. Demirci, K. H. C. Baser, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 18, 87-90, 2003.
- [81] B. Demirci, K. H. C. Baser, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 18, 43-44, 2003.
- [82] B. Demirci, K. H. C. Baser, B. Yildiz and Z. Bahcecioglu, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 18, 116-121, 2003.
- [83]. K. H. C. Baser, M. Kurkcuglu, B. Demirci and T. Ozek, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 18, 98-99, 2003.
- [84] K. H. C. Baser, B. Demirci and A. A. Domez, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 18, 122-123, 2003.

- [85] A. Kaya, B. Demirci , K.H. C. Baser, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 18, 159-161, 2003.
- [86] K. H. C. Baser, B. Demirci, A. Dekebo and E. Dagne, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 18, 153-156, 2003.
- [87] M. Kurkcuoglu, B. Demirci, N. Tabanca, T. Ozek and K. H. C. Baser, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 18, 192-194, 2003.
- [88] A. Viljoen *et al.*, *Journal of Ethnopharmacology* 88, 137-143, 2003.
- [89] N. Erdemoglu, B. Sener, B. Demirci and K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 39, No.2, 2003.
- [90] B. Demirci, K.H.Can Baser and G. Tumen, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 17, 23-25, 2002.
- [91] K. H. C. Baser, B. Demirci, N. Kirimer, F. Satil and G. Tumen, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 17, 41-45, 2002.
- [92] Z. Tunalier, N. Kirimer and K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 38, No.1, 2002.
- [93] K. H. C. Baser, H. R. Nuriddinov, T. Ozek, B. Demirci, N. Azkan and A. M. Nigmatullaev, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 38, No.1, 2002.
- [94] K. H. C. Baser, T. Ozek, H. R. Nuriddinov and A. B. Demirci, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 38, No.1, 2002.
- [95] N. Goren, B. Demirci and K. H. Can Baser, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 16, 195-200, 2001.
- [96] K. H.C. Baser, B. Demirci, N. Tabanca, T. Ozek and N. Goren, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 16, 191-194, 2001.
- [97] K. H.C..Baser *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4300-4303, 2001.
- [98] N. Kirimer, N. Tabanca, B. Demirci, H. C. Baser, H. Duman and Z. Aytac, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No. 3, 2001.
- [99] F. Demirci, K. H. C. Baser, I. Calis and E. Gokhan, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No. 4, 2001.
- [100] N. Tabanca, F. Demirci, T. Ozek, G. Tumen and H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No. 3, 2001.
- [101] K. H. C. Baser, B. Demirci and H. Duman, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No. 3, 2001.
- [102] A. Kaya, B. Demirci and K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No. 4, 2001.

- [103] B. Kivcak, T. Meri, B. Demirci and K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No. 5, 2001.
- [104] S. Erken, H. Malyer, F. Demirci, B. Demirci and K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No.5, 2001.
- [105] H. Saglam, T. Gozier, B. Kivcak, B. Demirci and K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No.5, 439 - 441, 2001.
- [106] H. Saglam, T. Gozier, B. Kivcak, B. Demirci and K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No.5, 442 - 444, 2001.
- [107] K. H. C. Baser, B. Demirci, F. Demirci, N. Kirimer and I. C. Hedge, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No.4, 2001.
- [108] Ye. M. Suleimenov, G.A. Atazianova, T. Ozek, B. Demirci, A. T. Kulyyasov, S. M. Adekenov and K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 37, No.5, 2001.
- [109] K. H. C. Baser, T. Ozek, B. Demirci and H. Duman, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 15, 47-49, 2000.
- [110] K. H. C. Baser, T. Ozek, B. Demirci and H. Duman, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 15, 45-46, 2000.
- [111] K. H. C. Baser, N. Tabanca, T. Ozek, B. Demirci, A. Duran and H. Duman, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 15, 43-44, 2000.
- [112] K. H. C. Baser, T. Ozek, B. Demirci, M. Kurkcuoglu, Z. Aytac and H. Duman, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 15, 371-372, 2000.
- [113] A. Ahmed, M. I. Choudhary, A. Farooq, B. Demirci, F. Demerci and K.H.C. Baser, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 15, 388-390, 2000.
- [114] E. Bagci, K. H. C. Baser, M. Kurkcuoglu, T. Babac and S. Celik, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 14, 47-49, 1999.
- [115] A. Kaya, K. H.C. Baser and F. Koca, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 14, 50-54, 1999.
- [116] Ayla Kaya, K.H.C. Baser, B. Demirci and F. Koca, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 14, 55-59, 1999.
- [117] A. Kaya, K H.C. Baser, G. Tumen and F. Koca, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 14, 60-64, 1999.
- [118] N. Kirimer, N. Tabanca, G. Tumen, H. Duman and K. H. C. Baser, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 14, 421-425, 1999.

- [119] A. S. Kamariah, Linda B. L. Lim, K. H. C. Baser, T. Ozek and B. Demirci, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 14, 237-240, 1999.
- [120] G. Tumen, K. H. C. Baser, B. Demirci and N. Ermin, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 13, 65-67, 1998.
- [121] T. Ozek, B. Bozan and K. H. C. Baser, *Chemistry of Naturel Compounds*, Vol. 34, No.6, 1998.
- [122] K. H. C. Baser, N. Kirimer and H. Duman, *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 12, 289-291, 1997.

Annexe A

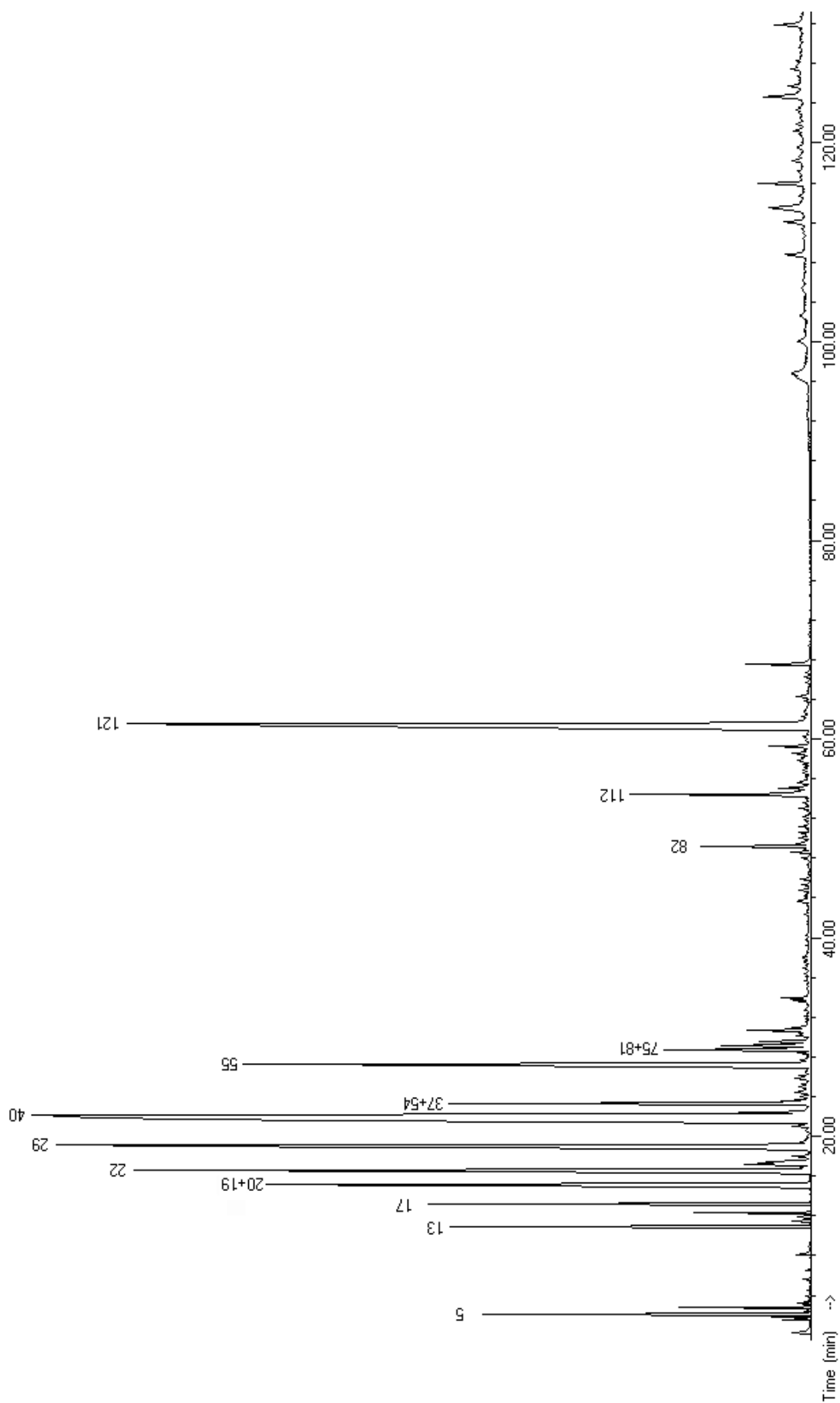


Fig.A.1. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence de la plante entière du site 1 (en Mai 2006)

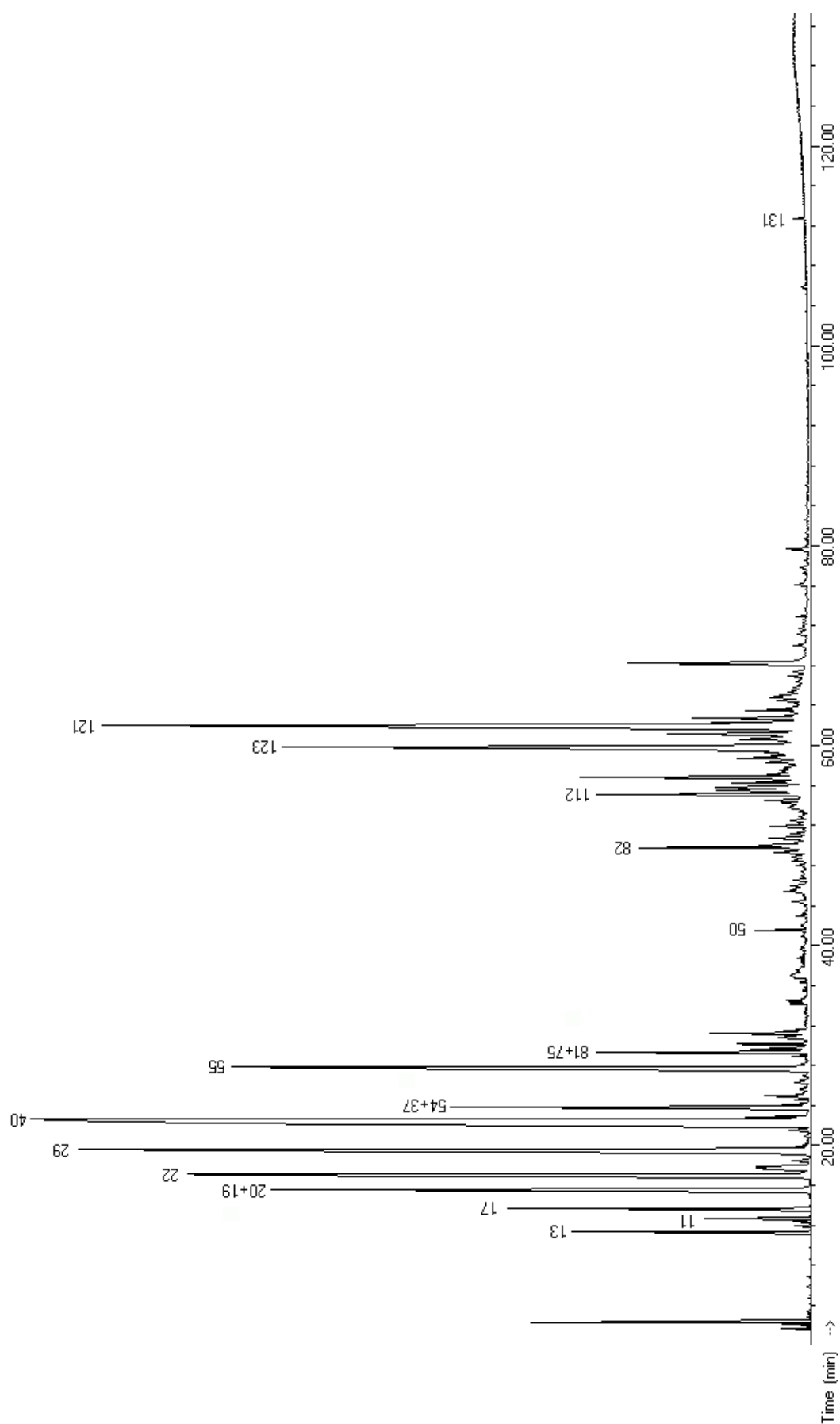
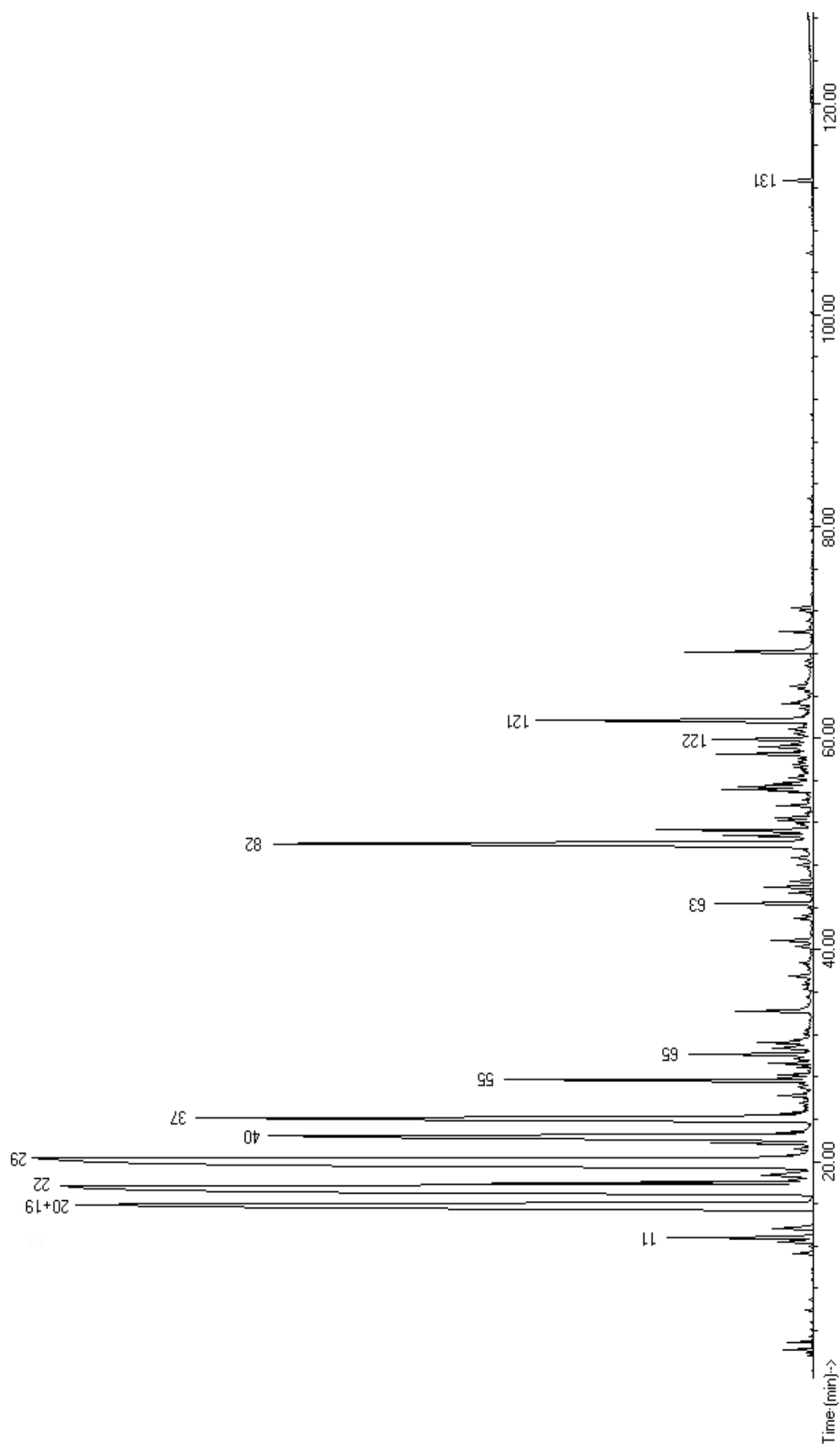
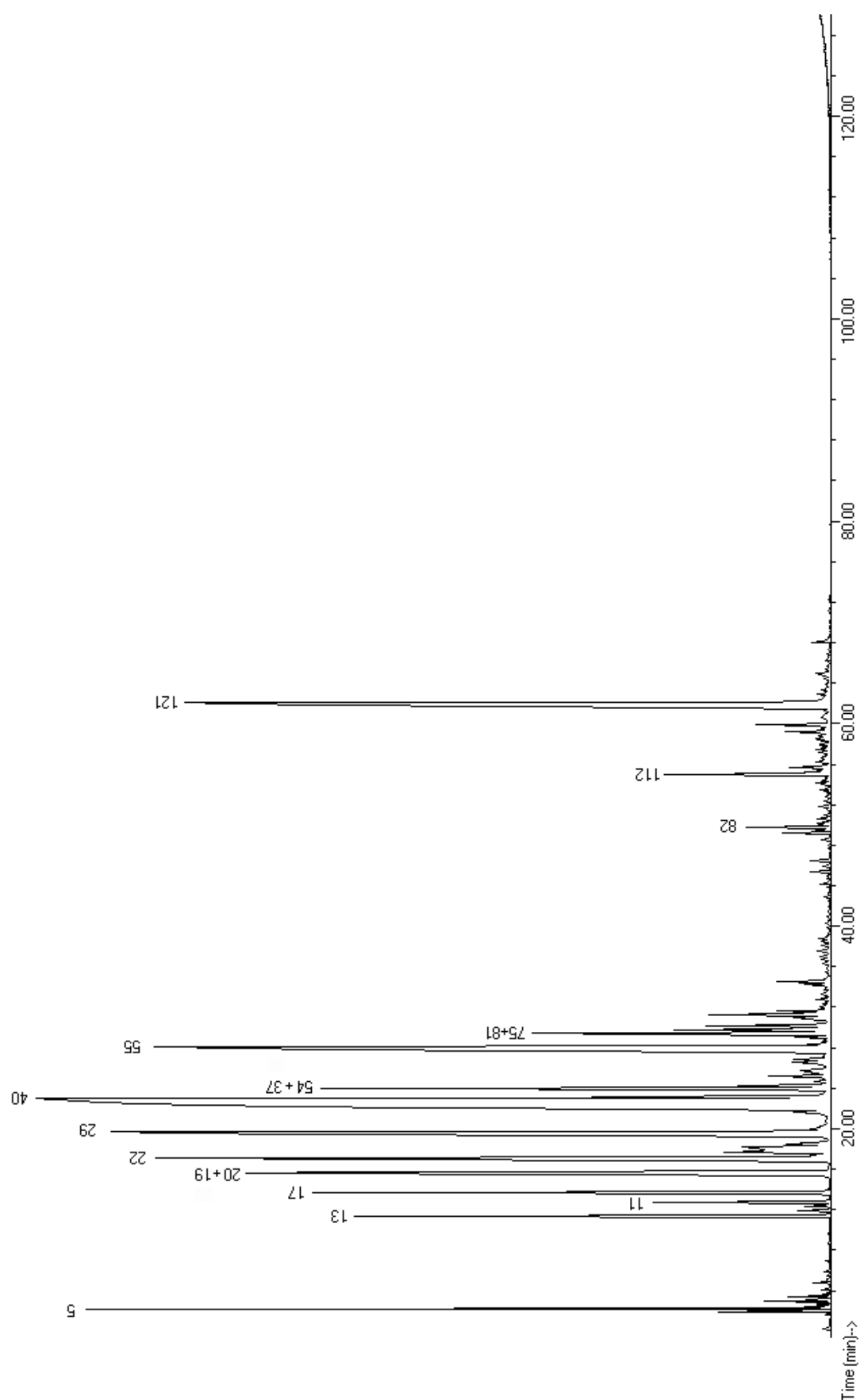


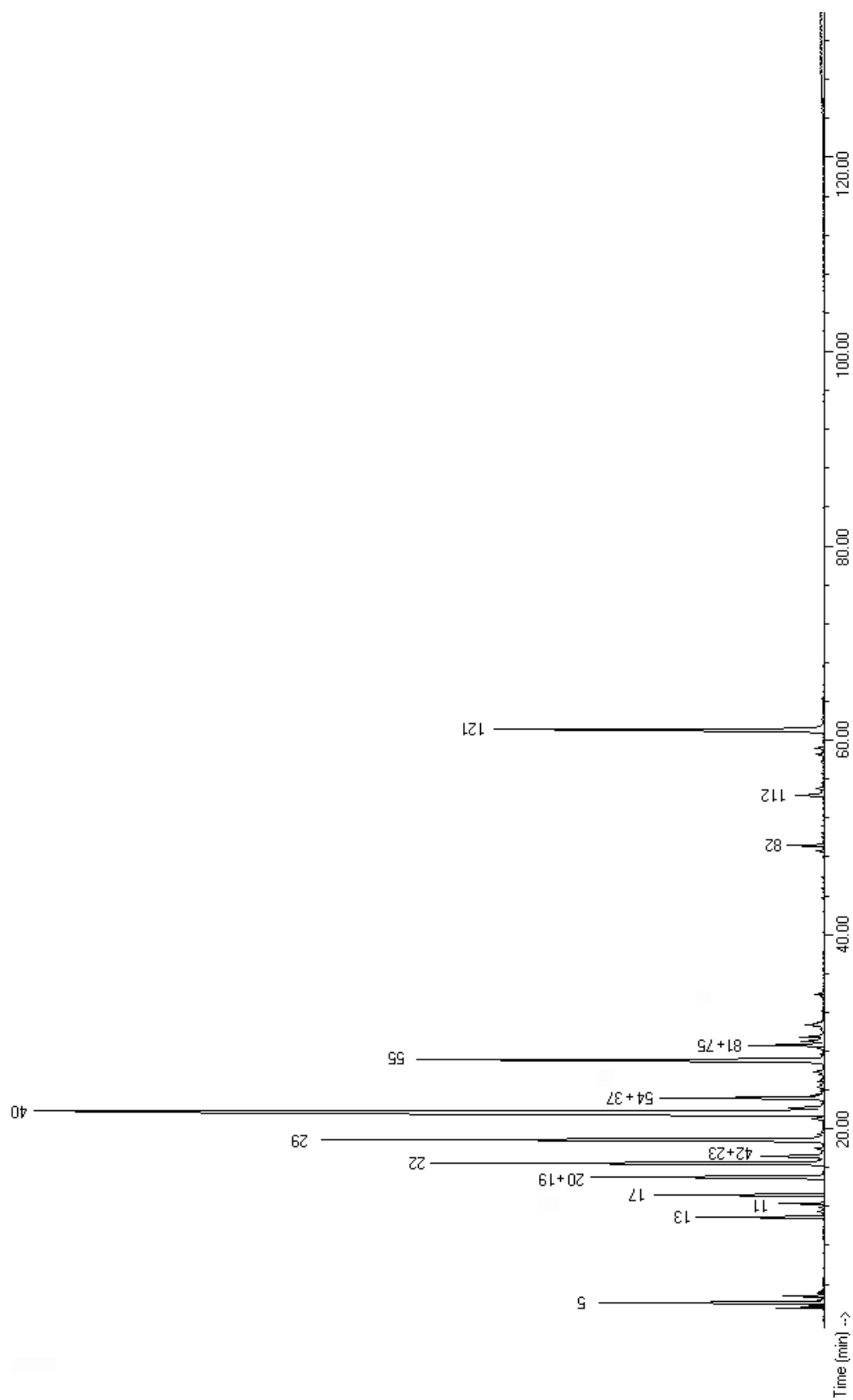
Fig.A.2. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence de la plante entière du site 2 (en Mai 2006)



**Fig.A.3. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence des tiges
(juin 2006)**



**Fig.A.4. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence de feuilles
(juin 2006)**



**Fig.A.5. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence de la plante entière
(juin 2006)**

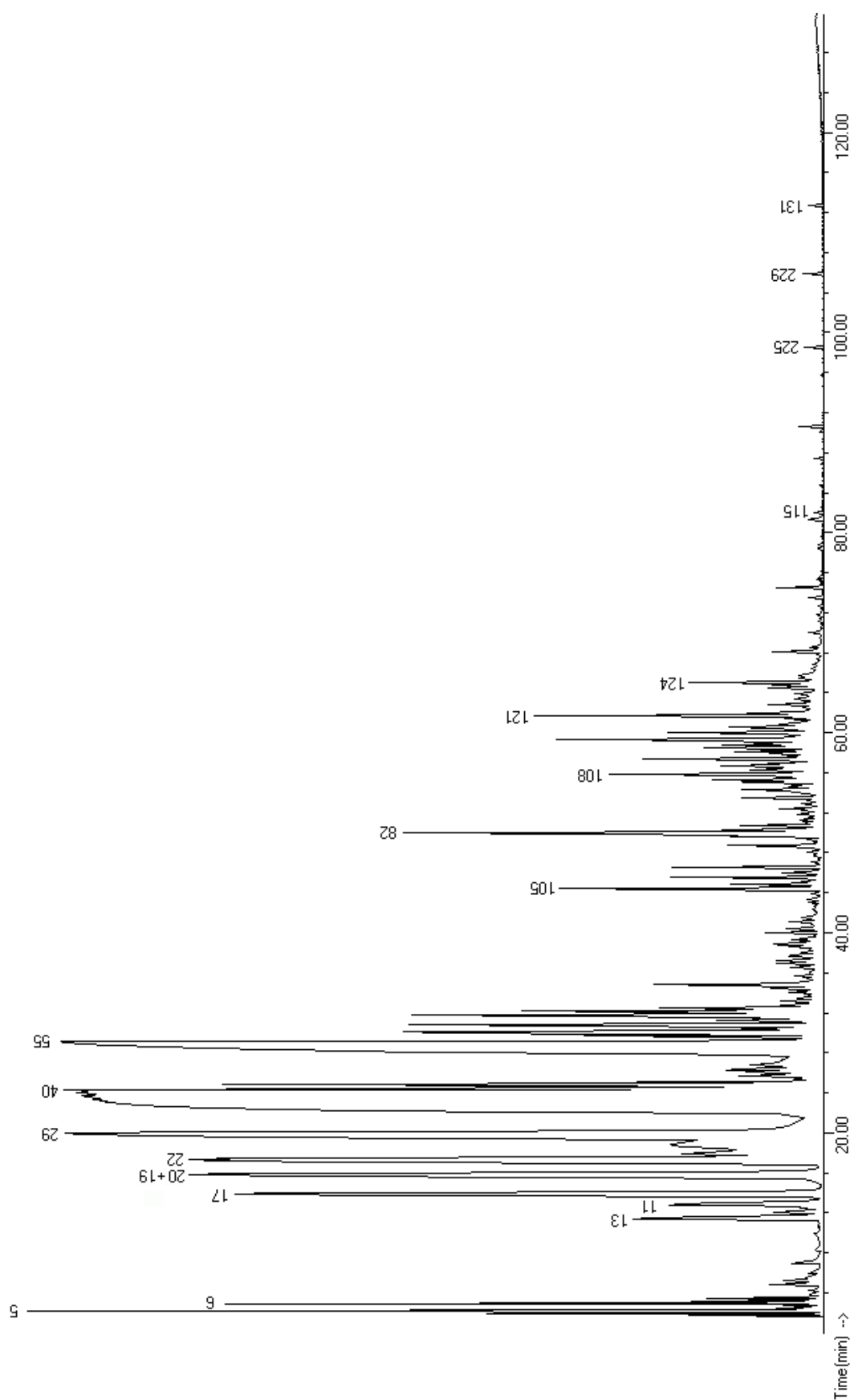


Fig.A.6. Chromatogramme en courant ionique total de l'essence des capitules (juin 2006)

Annexe B

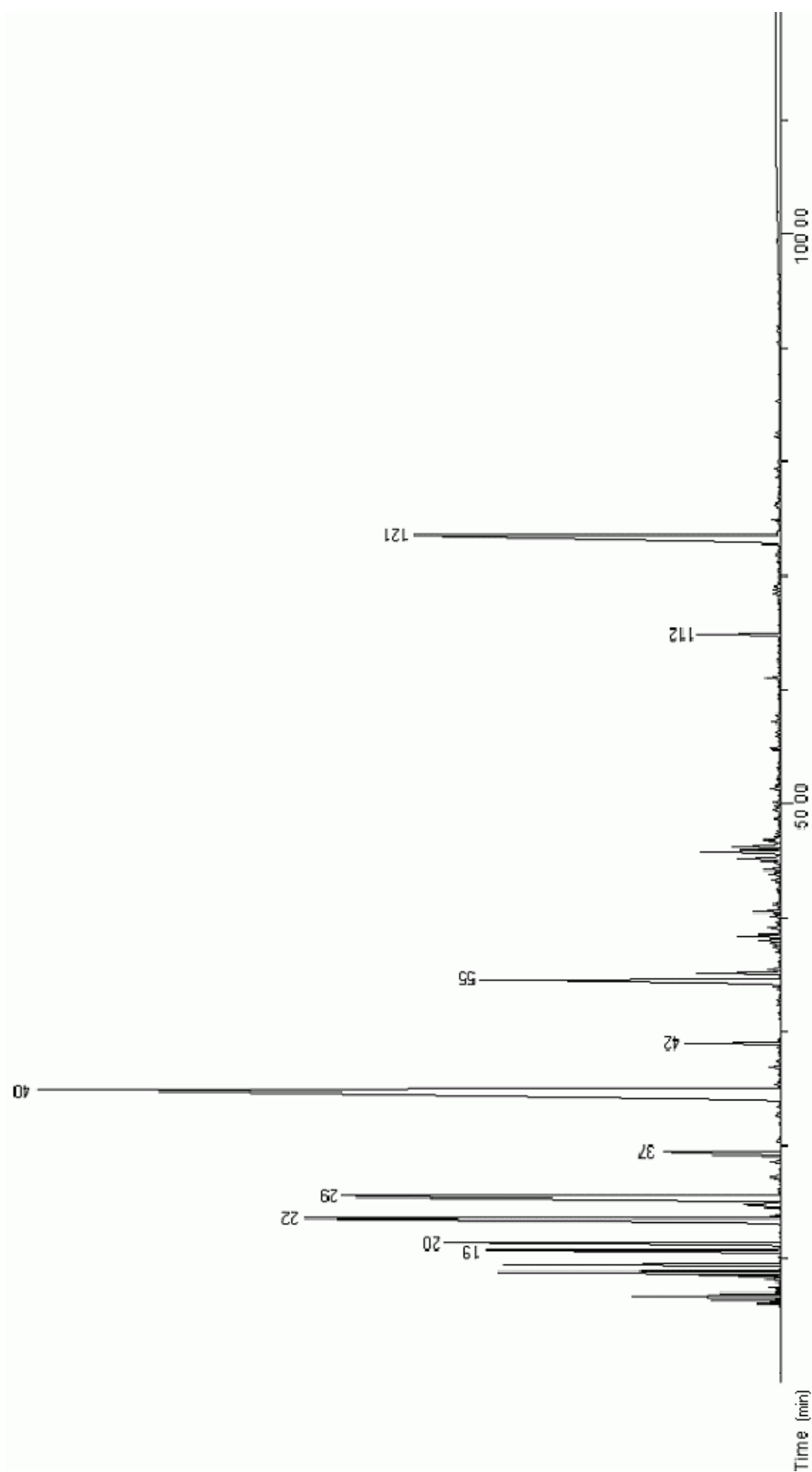


Fig.B.1. Chromatogramme GC/FID de l'essence de la plante entière du site 1 (en Mai 2006)

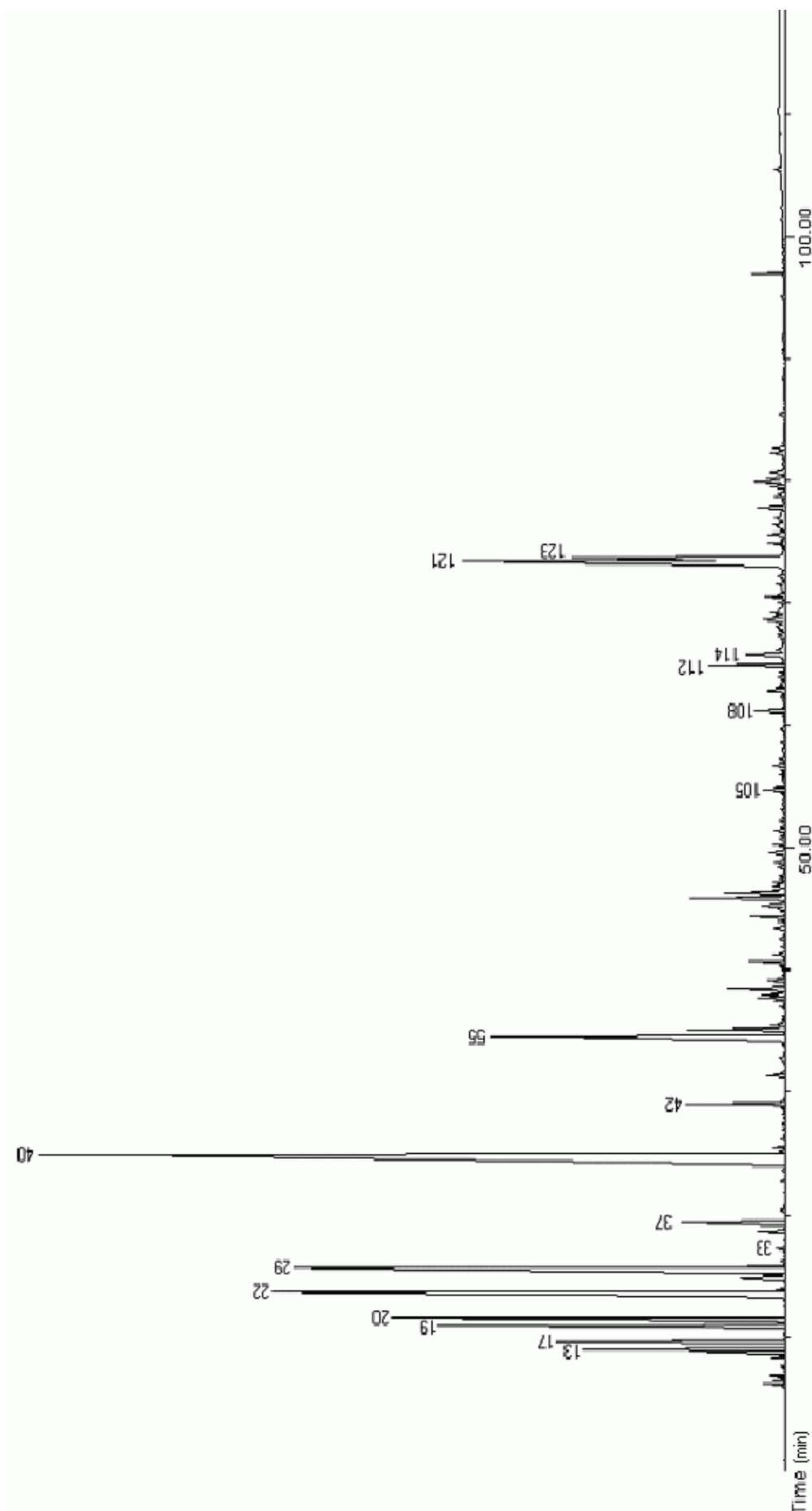


Fig.B.2. Chromatogramme GC/FID de l'essence de la plante entière du site 2 (en Mai 2006)

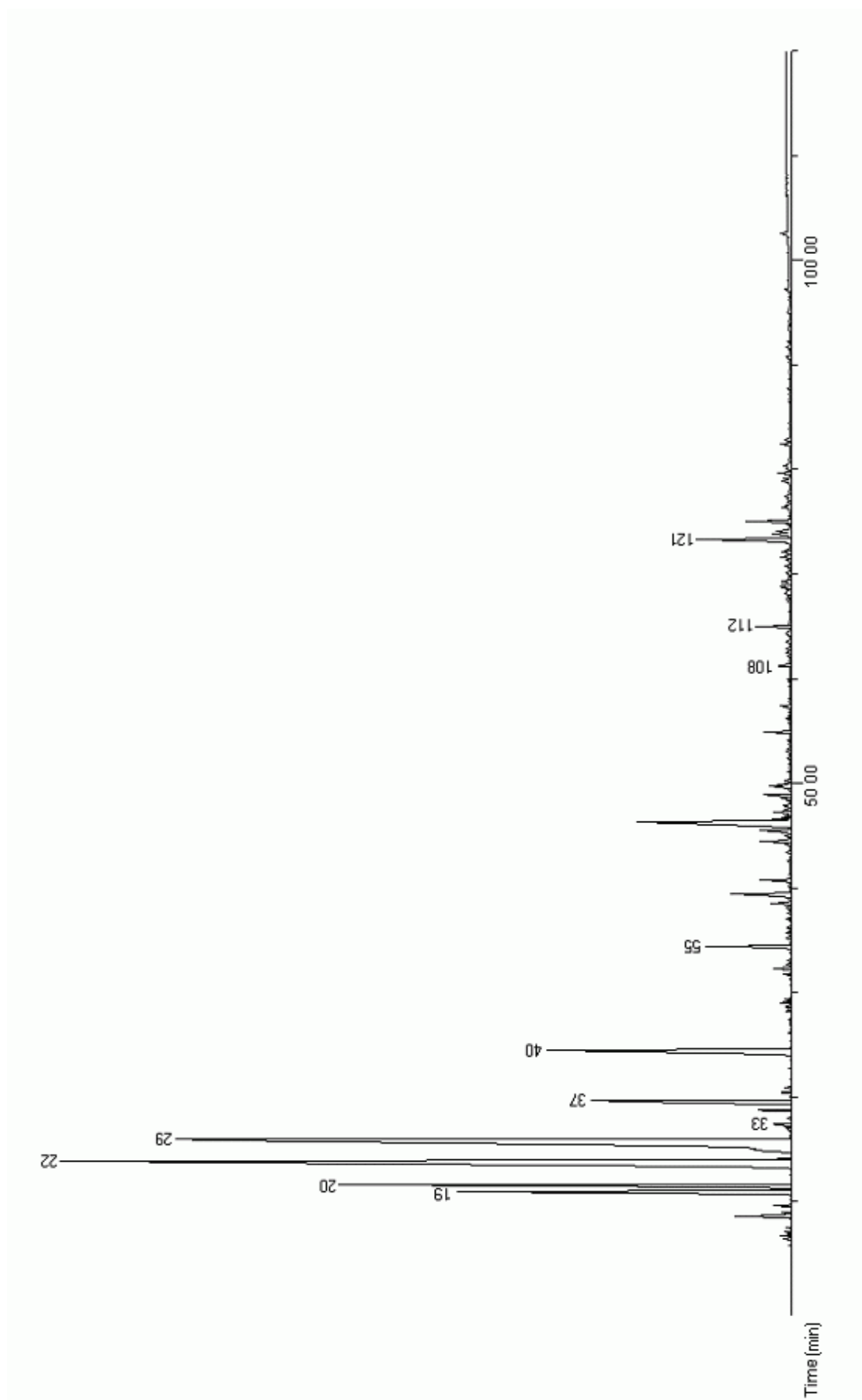


Fig.B.3. Chromatogramme GC/FID de l'essence des tiges
(juin 2006)

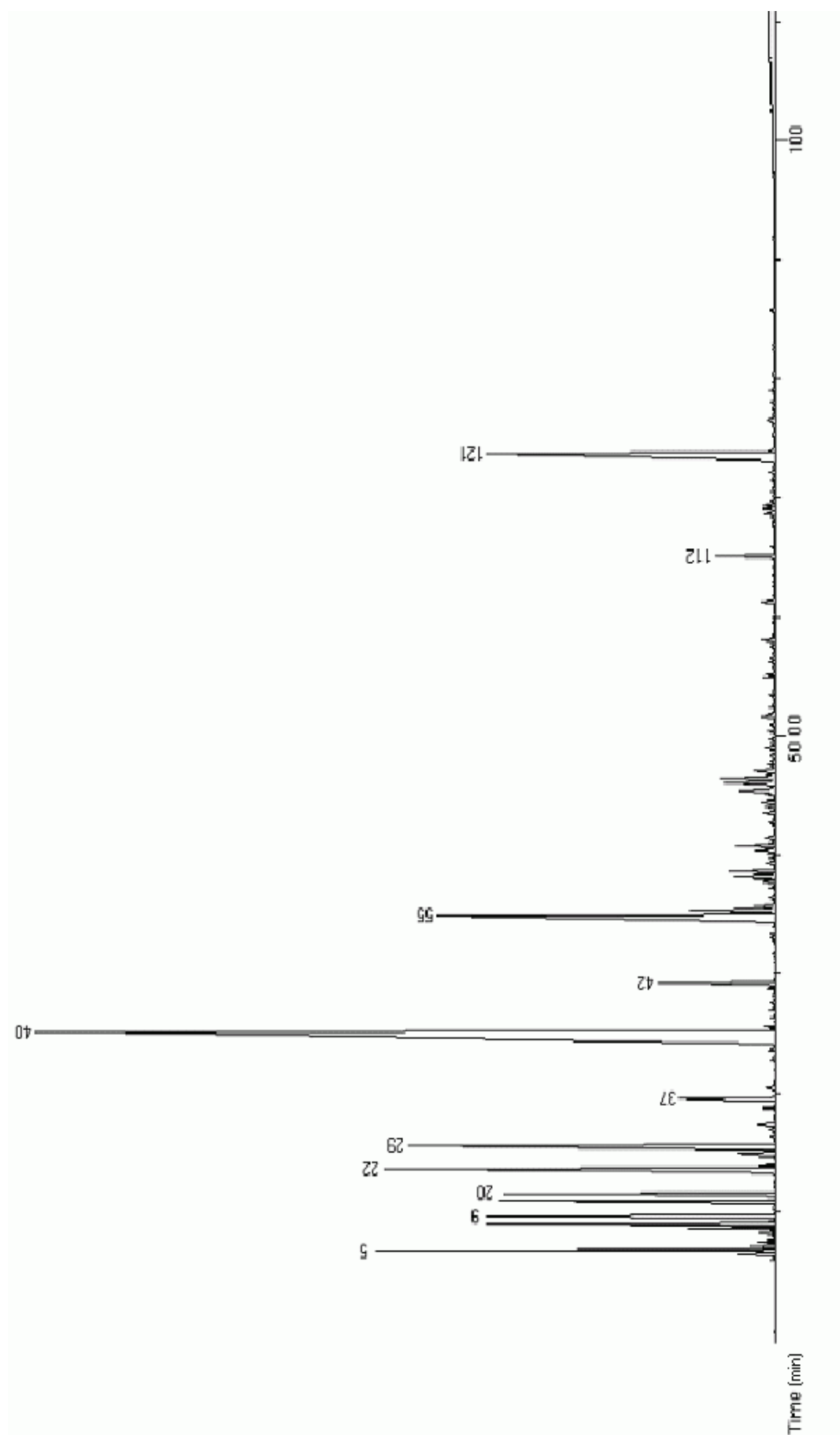


Fig.B.4. Chromatogramme GC/FID de l'essence de feuilles
(juin 2006)

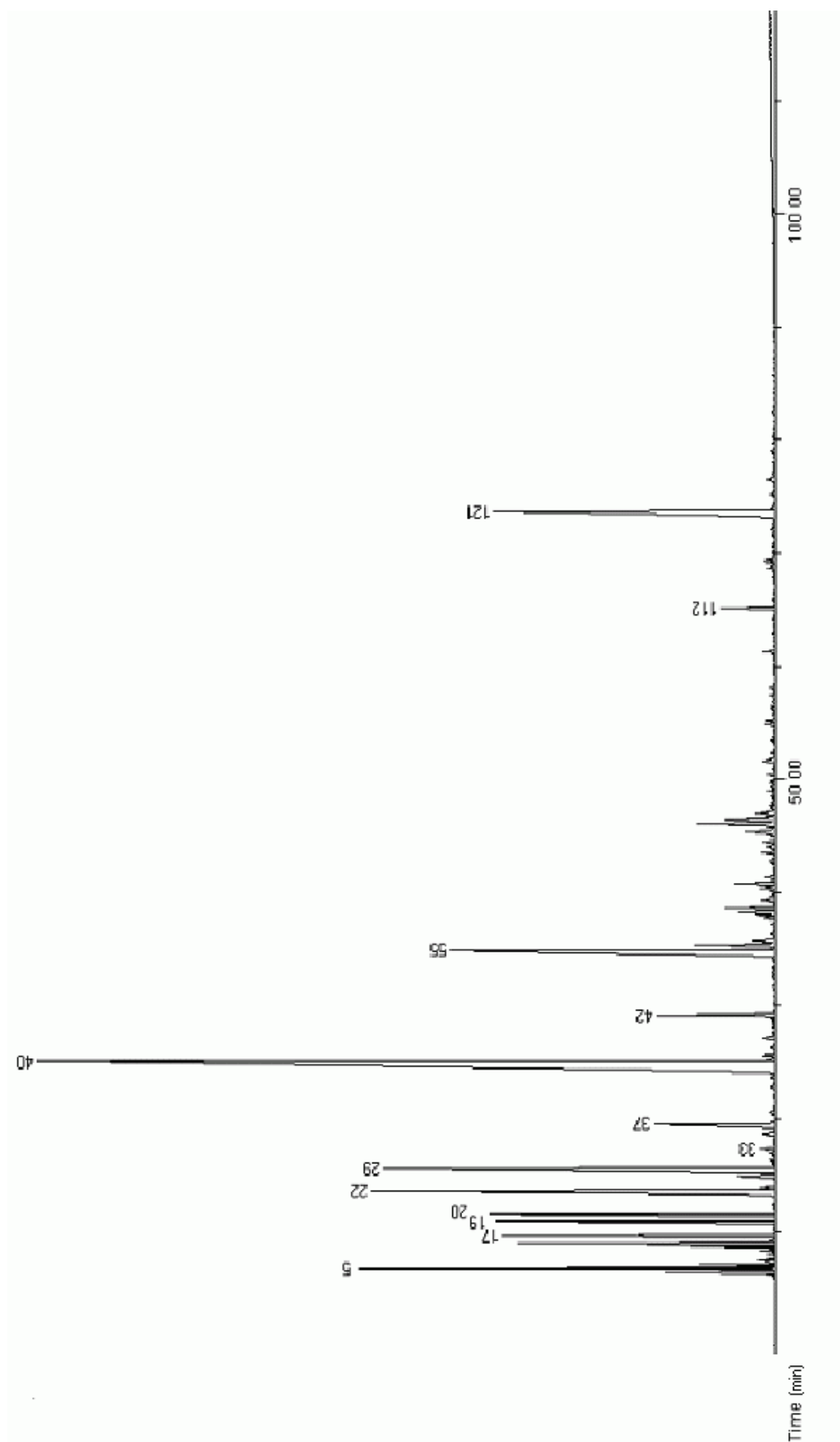
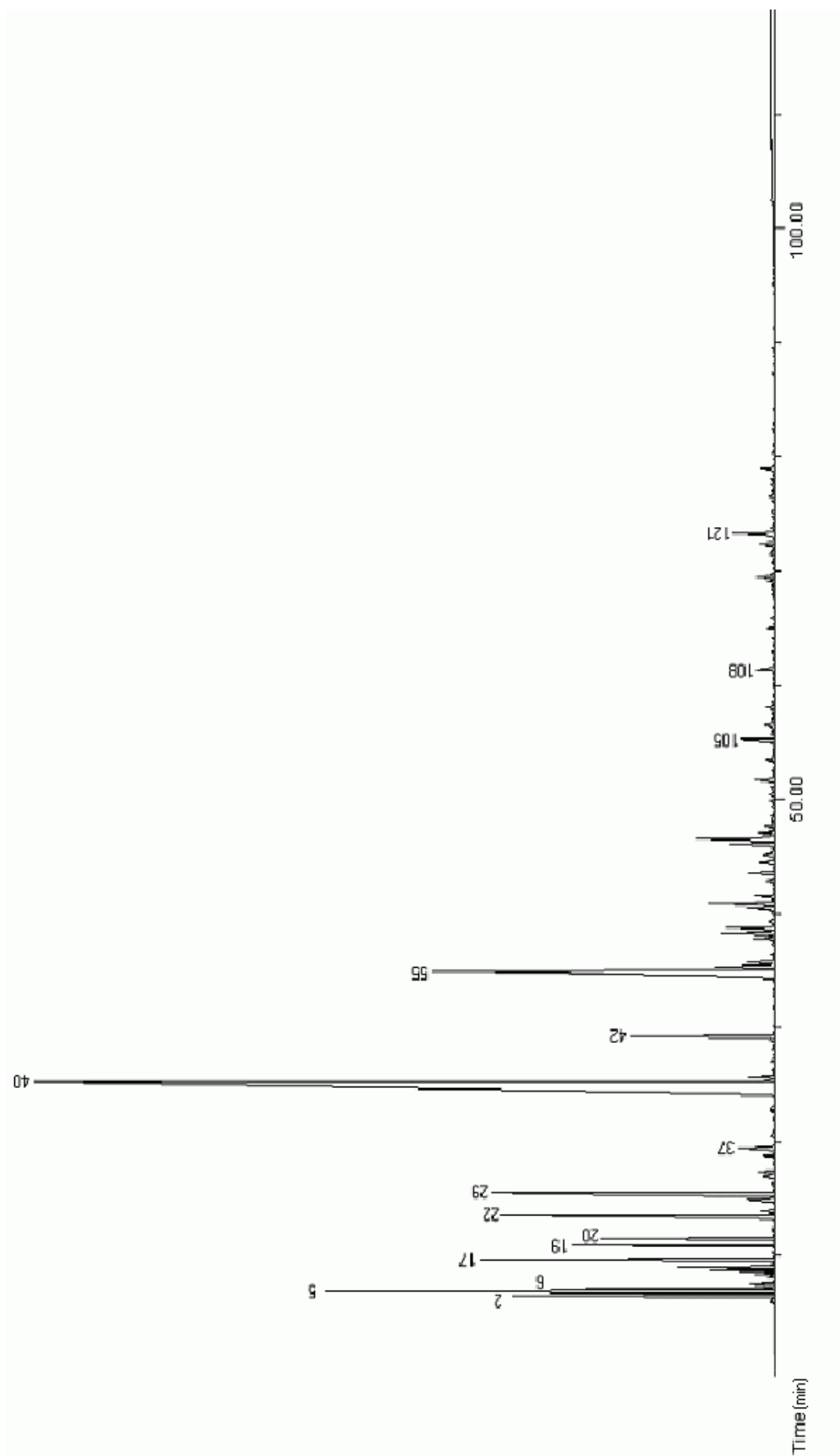


Fig.B.5. Chromatogramme GC/FID de l'essence de la plante entière (juin 2006)



**Fig.B.6. Chromatogramme GC/FID de l'essence des capitules
(juin 2006)**