

ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT : Génie Chimique



PROJET DE FIN D'ETUDES

S U J E T

EXTRACTION ET ANALYSES
PAR CROMATOGRAPHIE DE L'HUILE
ESSENTIELLE D'EUCALYPTUS GLOBULUS
ESSAIS DE FRACTIONNEMENT

Proposé par :

Mr. BELABBES

Etudié par :

Melle. Z KAABACHE

Dirigé par :

Mr. BELABBES

Mme. BOUCHTAOUI

PROMOTION : Février 1988



DEDICACES

A mon jeune frère Karim.

A mes parents.

A mes soeurs.

A mes frères.

A mon petit neveu.

A mes beaux frères.

A tous mes amies et amis.

MEMBRES DU JURY

Président:

Madame DERRICHE chargée de cours à l'E.N.P.

Examineurs:

Monsieur BELABES Professeur à l'E.N.P.

Madame BOUCHTACUI Maître Assistante stagiaire à l'E.N.P.

Madame CHARCIARI Maître Assistante Titulaire à l'E.N.P.

Madame DJELLAS Chargée de cours à l'E.N.P.

REMERCIEMENTS.

Ce travail a été réalisé au département de Génie Chimique E.N.P. sous la direction de :

Monsieur BELABRES, Professeur à l'E.N.P.
et Madame BOUCHTAOUI, Maitre Assistante Stagiaire à l'E.N.P.

Qu'ils trouvent ici, l'expression de mon profond respect et de ma profonde gratitude, pour leur aide constante et leurs précieux conseils.

J'exprime mes sincères remerciements à :

Madame DERRICHE, chargée de cours à l'E.N.P.
pour l'honneur qu'elle me fait de présider mon jury.

Mes remerciements vont également à :

Madame CHARCHIARI, Maitre Assistante Titulaire à l'E.N.P.
Madame DJELLAS, Chargée de cours à l'E.N.P.

pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie infiniment Monsieur BOUMCHAR pour m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je remercie Monsieur MOHAMED bibliothécaire du département de technologie ,
I.N.A.

Je remercie mademoiselle BELKHODJA et Madame YAICHE pour l'élaboration de ce document.

Je remercie Mademoiselle ZAHIA et remercie particulièrement Monsieur SID ALI KECILI pour son aide technique.

Je remercie tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

S O M M A I R E



PARTIE THEORIQUE

INTRODUCTION

A) HUILES ESSENTIELLES

- I- HISTORIQUE
- II- DEFINITIONS
- III- ORIGINE ANATOMIQUE
- IV- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES
- V- COMPOSITION CHIMIQUE
 - 1- TERPENES
 - 2- CLASSIFICATION DES TERPENES
 - 2.1- Monoterpènes
 - 2.2- Sesquiterpènes
- VI- MODE D'OBTENTION
 - 1- DEFINITION DE L'ENTRAINEMENT A LA VAPEUR
 - 2- PRINCIPE
- VII- EUCALYPTUS
 - 1- DEFINITION
 - 2- CONSTITUTION CHIMIQUE
- VIII- EUCALYPTUS GLOBULUS
 - 1- DEFINITION
 - 2- CARACTERISTIQUES PHYSIQUES
 - 3- COMPOSITION CHIMIQUE
- IX- USAGES

B) CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION LIQUIDE-SOLIDE

- I- GENERALITES
- II- DEFINITIONS
- III- DIVERS ASPECTS DE LA CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION
 - 1- ANALYSE PAR ELUTION
 - 2- ANALYSE FRONTALE
 - 3- ANALYSE PAR DEPLACEMENT

IV-THEORIES DE LA CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

1-THEORIE DE L'ANALYSE PAR ELUTION

2-THEORIES CINETIQUES

V-NATURE DU PHENOMENE

1-PRINCIPE DE SEPARATION

2-SELECTIVITE EN CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

VI-FACTEURS DEPENDANTS DES SEPARATIONS

VII-ADSORBANTS

1-CHOIX DE L'ADSORBANT

2-INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS

3-PROPRIETES DES ADSORBANTS

4-GEL DE SILICE

VIII-PHASE MOBILE

1-CONTRAINTES PRATIQUES

2-FORCE ELUANTE DE LA PHASE MOBILE

2.1-Mélanges de phase mobile

2.2-Gradient d'éluion

3-INFLUENCE DE LA NATURE DU SOLVANT

4-INTERACTIONS DIELECTRIQUES

5-FORCE D'UN SOLVANT ET POLARITE

5.1-Pouvoir éluant

5.2-Polarité

6-SELECTIVITE DI UN SOLVANT

C) ANALYSE

PARTIE EXPERIMENTALE

I-INTRODUCTION

II-EXTRACTION

1-DESCRIPTION DE L'APPAREILLAGE ET METHODES

2-ANALYSES

III-ANALYSES PAR CPG

1-APPAREILLAGE

2-METHODE

3-ANALYSES QUALITATIVES DE L'HUILE ESSENTIELLE

IV-FRACTIONNEMENT DE L'HUILE ESSENTIELLE DE L'EUCALYPTUS GLOBULUS

1-APPAREILLAGE

2-METODES

V-CONCLUSION

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
المكتبة — BIBLIOTHEQUE
Ecole Nationale Polytechnique

PARTIE THEORIQUE

-1-

I N T R O D U C T I O N

On sait depuis l'antiquité que les constituants odorants des plantes peuvent être concentrés sous forme "d'huiles essentielles" par chauffage modéré de la matière végétale. Plus tard, on a trouvé que l'entraînement à la vapeur est une meilleure méthode d'extraction des huiles essentielles. L'étude chimique des composants des huiles essentielles au 19ième siècle a permis de découvrir un certain nombre d'hydrocarbures isomères, de formule $C_{10}H_{16}$, et qui furent appelés terpènes. On découvrit ainsi des terpènes oxygénés surtout des alcools et des cétones, ainsi que d'autres constituants volatils des plantes qui contiennent des squelettes en C_{15} , C_{20} ou C_{30} . La nomenclature utilisée a pour base une "unité terpénique" en C_{10}

C_{10} monoterpènes	C_{15} sesquiterpènes
C_{20} diterpènes	C_{30} triterpènes (1)

L'analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques et méthodes. L'évolution des moyens techniques a conduit à une plus grande précision des résultats et à une réduction des masses d'échantillon à analyser (2). L'analyse par chromatographie permet non seulement l'obtention d'un reflet de la composition chimique d'une huile essentielle, mais aussi l'évaluation précise de la concentration de chacun des constituants considérés comme importants (3).

La chromatographie en phase liquide (CPL) est peut être, plus que toute autre méthode d'analyse, celle où l'optimisation de la séparation est fondamentale, compte tenu du grand nombre de paramètres sur lesquels il est possible d'agir (5). On peut donner, aujourd'hui de la chromatographie d'adsorption en phase liquide, la définition suivante : "C'est une technique dans laquelle un courant ^{de} liquide provoque la migration différentielle des composants d'un mélange à partir d'une zone initiale étroite dans un milieu poreux doué de propriétés d'adsorption" (5). La chromatographie d'adsorption liquide-solide met en oeuvre des phases stationnaires ayant des propriétés adsorbantes, principalement des gels de silice poreux et des gels d'alumine. Elle s'applique bien à la séparation des composés présentant des groupements fonctionnels différents et à celle de certains isomères (4).

Le présent travail est une contribution à l'optimisation du fractionnement sur colonne de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus.

Cette étude portera tout d'abord sur l'obtention de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus par distillation à la vapeur d'eau. L'opération suivante de fractionnement sur colonne, à l'aide de solvants de différentes polarités, permettra de séparer les différents constituants de cette huile. Enfin, nous tenterons d'analyser et d'identifier par chromatographie en phase gazeuse ces différentes fractions obtenues.

A - HUILES ESSENTIELLES

I HISTORIQUE

Les documents historiques les plus anciens montrent que les arômes faisaient partie des premiers objets d'échange et de commerce de l'antiquité (6).

L'extraction des huiles essentielles remonte à la plus haute Antiquité. Les Chinois, les Indiens, les Perses, les Egyptiens savaient retirer les substances aromatiques des plantes et les utilisaient pour les sacrifices et l'embaumement (7).

Il faudra attendre le début du 16 ième siècle pour voir PARACELSE, le génial alchimiste et médecin suisse, s'intéresser à l'extraction des principes actifs des drogues. Il appelle "quintessence" (quinta essentia) l'extrait d'une drogue contenant sous la forme la plus concentrée, l'ensemble des principes actifs.

C'est à la même époque que furent publiés les deux livres de Hiéronymus BRUMSCHWIG, médecin à Strasbourg, "Arte Distillandi" qui traitent de la distillation en général (8).

La première analyse d'huile essentielle, faite par application des nouvelles théories et ayant une réelle valeur scientifique, est celle de HOUTON-LABILLARDIERE (1818) qui établit la composition élémentaire de l'essence de térébenthine et montra qu'il existe, comme dans tous les hydrocarbures terpéniques, une proportion constante de cinq atomes de carbone pour huit atomes d'hydrogène. C'est à cette même époque que le mot de "terpène" fut introduit dans la science (6). En 1866, A. KEKULE inventa le terme de terpènes pour désigner la classe des constituants la plus répandue dans les formules d'huiles essentielles (8).

C'est surtout à M.O. WALLACH, créateur de la chimie des terpènes moderne, que l'on doit de pouvoir actuellement différencier le grand nombre des terpènes et de leurs dérivés. L'établissement de la constitution des dérivés terpéniques reste un des problèmes les plus ardues de la chimie organique, en raison de la grande altérabilité de ces composés et des nombreuses transpositions moléculaires auxquelles ils donnent lieu (6).

Les travaux sur les huiles essentielles se sont alors accélérés à un rythme qui correspondait à l'étonnante expansion que connaissait l'usage de ces produits.

L'essence de térébenthine reste indubitablement le vétéran des huiles essentielles, puisqu'elle fut la première à être produite industriellement aux Etats-Unis (8).

II - DEFINITION DES HUILES ESSENTIELLES

Les essences naturelles, appelées encore huiles essentielles, sont des produits liquides ou semi-fluides, huileux, presque toujours volatils sans décomposition et que certaines plantes renferment en proportions parfois considérables. Ce ne sont pas des combinaisons chimiques définies, mais au contraire des mélanges souvent très complexes de produits organiques appartenant aux classes les plus diverses (9).

Les huiles essentielles sont des liquides volatils localisés dans diverses parties des plantes telles que les fruits, les feuilles, les fleurs, les écorces et les racines. Elles ont de fortes odeur et saveur, et sont utilisées dans la préparation des essences et des parfums. La qualité d'huile essentielle dépend de différents facteurs : la partie de la plante utilisée, la variété et son lieu d'origine, la méthode d'extraction et son processus de rectification (10).

Les propriétés parfumantes, aromatisantes, thérapeutiques et toxicologiques d'une huile essentielle sont étroitement liées à sa composition chimique. La recherche de la conformité de cette composition chimique à celle d'une huile essentielle de référence est la base du contrôle de la qualité.

Les huiles essentielles doivent être définies à la fois d'après :

- La matière végétale d'où elles proviennent
- Leur mode d'obtention
- Leur composition chimique (3)

III- ORIGINE ANATOMIQUE

Les huiles essentielles sont extraites de plantes ou d'arbres de diverses familles dont le caractère commun est de pousser dans les régions chaudes du globe (8).

Il arrive très fréquemment que la composition de l'essence d'une même plante est très variable selon qu'elle est extraite de l'un ou l'autre organe de cette plante, il s'ensuit que ces produits ont également des propriétés fort différentes (6). Dans la plante elles sont localisées soit dans les cellules épidermiques des pétales (rose), soit dans des poils sécréteurs (menthe), des cellules sécrétrices internes (laurier), des des poches sécrétrices (zeste d'orange) ou des canaux sécréteurs (pin) (7).

Les essences sont des mélanges très complexes de composés définis, mais très différents entre eux. De plus, au lieu d'être en quantités constantes pour une même essence, les proportions de ces composés varient dans des limites très grandes suivant le lieu d'origine, l'état de sécheresse ou d'humidité de l'année où s'est faite la récolte, la nature du sol, etc (11).

La plupart des plantes odorantes doivent leur parfum à un mélange complexe de combinaisons différentes, rarement à un corps unique. Bien que toutes les parties de la plante puissent produire du parfum, celui-ci s'accumule de préférence dans un organe déterminé (12).

Parmi les constituants d'une huile essentielle, il s'en trouve souvent un dont l'odeur est caractéristique de cette essence ; ce constituant est alors en même temps la fraction qui a la plus grande valeur (6).

IV - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les essences ou huiles essentielles, connues également sous le nom d'huiles volatiles, de parfums, etc., sont des substances odorantes, huileuses, volatiles, incolores ou jaunâtres, inflammables, s'altérant facilement à l'air ou se résinifiant (12).

Les essences sont peu solubles ou insolubles dans l'eau à laquelle elles communiquent leur odeur. Elles sont solubles dans l'alcool à divers degrés, ainsi que dans l'éther et les autres solvants organiques. A leur tour ce sont des dissolvants de matières grasses, de résines et de plusieurs produits organiques (11).

A la température de 15°C, toutes les essences sont liquides, ou tout au moins en partie, car il y en a qui précipitent un stéaroptène même à la température ordinaire : le degré de fluidité des essences est évidemment variable ; les essences vieilles sont plus consistantes que celles fraîchement distillées par suite d'une résinification partielle due à l'action de l'oxygène de l'air. Les essences sont très inflammables et brûlent avec une flamme fuligineuse (12).

V - COMPOSITION CHIMIQUE

Les parfums et les huiles essentielles ne sont pas des combinaisons chimiques définies mais au contraire des mélanges souvent très complexes de produits organiques appartenant aux classes les plus diverses (9).

Les huiles essentielles constituent un mélange complexe de substances aromatiques et surtout terpéniques (13)

- Composés aromatiques

Les composés aromatiques sont caractérisés par l'existence dans leurs formules d'un cycle à six atomes de carbone avec trois doubles liaisons alternées.

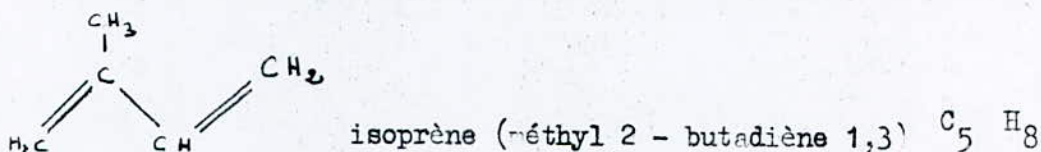
- Composés terpéniques

La série terpénique ne peut pas, comme la série aromatique être caractérisée par l'existence d'un noyau fondamental que l'on retrouve plus ou moins substitué mais intact dans tous les corps de la série (9).

1) Terpènes

Les terpènes se présentent sous diverses formes isomères dans les huiles essentielles dont ils constituent souvent par la portion principale. (13) Les terpènes forment une très vaste famille de substances naturelles, surtout dans le groupe des essences et des résines. Ils appartiennent en majorité au règne végétal. Parmi les terpènes dans le sens étroit du mot et parmi les composés qui leur sont étroitement liés par une structure très voisines et des relations métaboliques, on trouve par exemple une abondance de constituants des parfums naturels, une gamme de produits d'intérêt pharmaceutiques, un groupe de colorants et la vitamine A. (14)

L'intérêt des huiles essentielles, comme l'a montré WALLACH dès 1877, est qu'on peut ici considérer leurs constituants comme des dérivés de l'isoprène



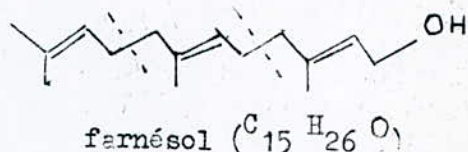
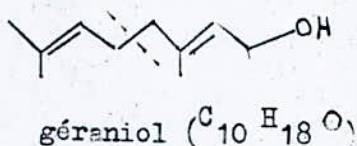
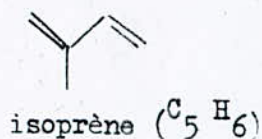
Non seulement leurs squelettes carbonés sont divisibles en unités isopréniques, mais les hydrocarbures terpéniques sont des multiples exacts de C₅ H₈ (15)

Au sens strict, les terpènes sont des hydrocarbures, mais de nombreux dérivés fonctionnels de structure apparentée (alcools, aldéhydes, cétones, acides, ...) sont également considérés comme composés terpéniques.

Les composés terpéniques ont pour formule brute : C₁₀ H₁₆ (monoterpènes), C₁₅ H₂₄ (sesquiterpènes), C₂₀ H₃₂ (diterpènes), C₃₀ H₄₈ (triterpènes) ou C₄₀ H₆₄ (tétraterpènes). (16)

L'établissement de la structure de terpènes de plus en plus nombreux révéla que pratiquement tous peuvent être considérés comme résultant de la "condensation" d'unités identiques en C₅, de même squelette que l'isoprène C₅ H₈. Cette constatation conduisit à la formulation de la règle isoprénique, selon laquelle tous les terpènes peuvent être théoriquement décomposés en unité isopréniques, comme le montre les deux exemples ci-dessous (1)

Les traits pointillés ajoutés à certaines des formules montrent comment elles peuvent ainsi être "sectionnées" en unités structurales correspondant au squelette de l'isoprène. (16)



De nos jours, nous savons que les terpènes ne sont pas vraiment formés dans la nature à partir de l'isoprène ; ce dernier n'ayant jamais été détecté dans un organisme vivant. Le véritable précurseur universel de tous les terpènes est l'acide mévalonique qui n'est connu que depuis 1956. (1)

2) Classification des terpènes

2.1 Monoterpènes

En plus des terpènes formés directement à partir du pyrophosphate d'isopentényle, divers alcools allyliques isomères, accompagnés de leurs produits d'oxydation ou de réduction, existent dans diverses essences.

La plupart des terpènes connus sont des substances cycliques, biosynthétisées à partir de précurseurs acycliques par des réactions de cyclisation par ion carbénium.

Les monoterpènes les plus importants et présentant la plus grande richesse de réactions, en particulier des transpositions, sont les terpènes bicycliques. Le constituant type est le pinène, comportant un cycle hexagonal avec un pont cyclobutanique, dont la tension confère une certaine instabilité au système.



α -Pinène

Les terpènes cycliques mono-oxygénés comprennent par exemple le menthol, le camphre et le cinéol - 1,8, constituant majeur d'essence d'eucalyptus.

2.2) Sesquiterpènes - Diterpènes

Les sesquiterpènes ont parfois des structures inhabituelles, comme le caryophyllène ou le cédrol alcool tricyclique donnant au bois de cèdre son odeur caractéristique.(1)

Quelques essences sont presque exclusivement constituées par des sesquiterpènes, mais en général ces hydrocarbures ne jouent qu'un rôle secondaire par rapport aux autres constituants ; on les rencontre si fréquemment qu'ils doivent être rangés au nombre des constituants le plus largement répandus parmi les huiles essentielles.(6)

Parmi les diterpènes, le plus connu est l'acide abiétique, constituant principal de la colophane, qui est un sous produit de la fabrication de l'essence de térébenthine.(1)

VI - MODE D'OBTENTION

L'extraction des huiles essentielles se fait par différentes méthodes. Cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains parfums ; ce qui oblige à n'employer que des moyens peu violents sans intervention d'agents chimiques trop énergiques.(9)

Parmi ces méthodes, nous pouvons citer : l'expression, la distillation, la dissolution et plus particulièrement l'entraînement à la vapeur.

Ce procédé permet non seulement d'isoler les huiles essentielles à l'état de pureté mais encore il est celui qui tout en fournissant les meilleurs rendements permet, avec un matériel et une main d'oeuvre relativement restreints de traiter de grandes quantités de matière première à la fois et de produire par la suite, à bon marché une quantité d'essence considérable.(6)

1) Définition

La distillation est un processus de séparation des constituants d'un mélange qui est basée sur la différence de leur volatilité ou de leur tension de vapeur.

La distillation à la vapeur est une technique dans laquelle la vapeur d'eau est en contact direct avec le mélange à distiller. Essentiellement, il s'agit de vaporiser une substance en faisant passer de la vapeur d'eau dans un mélange d'eau et de cette substance.

Cas des huiles essentielles : Un système d'eau et d'huile essentielle forme un liquide à deux phases. La pression de la phase vapeur est maintenue constante, soit en reliant l'espace vapeur avec l'atmosphère soit par contrôle judicieux pour maintenir une pression réduite élevée. (18)

2) Principe

Le principe sur lequel est basée cette opération a été mis en évidence par LIEBIG en 1832 et n'est en fait qu'une conséquence de la loi de DALTON sur le mélange des gaz et des vapeurs. (9)

La loi de DALTON est applicable lorsque l'on peut considérer toutes les vapeurs présentes dans un mélange de vapeurs comme des gaz parfaits. Elle s'énonce de la manière suivante:

- "La pression partielle de chaque constituant du mélange est égale au produit de sa fraction molaire dans la vapeur par la pression totale".

$$P_i = P y_i \quad P_i = \text{pression partielle du constituant dans le mélange}$$

$$P = \text{pression totale (19)}$$

Lorsque des corps liquides non miscibles et n'exerçant aucune action l'un sur l'autre se trouvent mélangés la tension de vapeur du mélange est la somme des tensions maxima de chacun des corps à la température considérée.

Il en résulte que :

- a) Le mélange entrera en ébullition lorsque la somme des tensions de vapeur sera égale à la pression qu'il supporte, c'est-à-dire à une température qui sera nécessairement inférieure à la température d'ébullition du constituant le plus volatil.

b) Tant que les corps resteront en présence et quelles que soient leurs proportions relatives, le point d'ébullition du mélange restera fixe et comme chaque corps distille proportionnellement à sa tension de vapeur, la composition du distillat restera constante.(9)

Ceci peut également s'énoncer comme suit :

- La pression partielle de chaque substance est égale à sa pression de vapeur à la température considérée :

$$p_1 = p_1^{\circ}$$
$$p_2 = p_2^{\circ} \quad \text{avec } P = p_1 + p_2$$

A une pression d'une ou quelques atmosphères, il est justifié de considérer que la phase vapeur obéit à la loi des gaz parfaits. Il en résulte que la composition de la phase vapeur est déterminée par application de la loi de DALTON :

$$y_1 = \frac{p_1}{P} = \frac{p_1^{\circ}}{P} \quad \text{et} \quad y_2 = \frac{p_2}{P} = \frac{p_2^{\circ}}{P}$$

La composition de la phase vapeur est donc indépendante de la composition de la phase liquide, et reste constante tant que les deux constituants sont présents dans la phase liquide.(19)

VII - L'EUCALYPTUS

L'huile volatile d'Eucalyptus la plus anciennement connue est celle de l'Eucalyptus Pipérita Sm., qui a été mentionnée dès l'année 1790. En 1853, le botaniste Ferdinand v. MULLER recommanda la distillation des feuilles d'Eucalyptus au gouverneur de Victoria BOSISTO, qui avait fait à Londres des essais de distillation avec les feuilles sèches, fonda en 1854, la première fabrique en Australie, et peut en conséquence être considéré comme le fondateur de cette industrie actuellement si développée.(6)

Les Eucalytus ou gommiers de la famille des Myrtacées forment un genre qui se distingue, en Australie.(20) Il existe un grand nombre de variétés d'Eucalyptus qui sont employées pour la préparation de l'essence : l'Eucalyptus amygdalina, l'Eucalyptus Globulus, l'Eucalyptus citriodora, etc...

Dans son bulletin d'octobre 1904 ; SCHIMMEL a dressé une table complète de toutes les variétés d'Eucalyptus avec le nom botanique, indigène, le rendement, la provenance et les constituants reconnus.(11) Il existe plus de 200 variétés dont la plus importante est : Eucalyptus Globulus.(13)

Les Eucalyptus sont d'ordinaire de grands arbres, spontanés, pour la plupart en Australie. LA croissance des Eucalyptus est extrêmement rapide et certains atteignent des dimensions colossales, dépassant 100 mètres de hauteur avec 2,5 mètres de circonférence.(21) Les arbres sont peu exigeants du point de vue des conditions du sol. Les pays producteurs les plus importants sont actuellement l'Australie, les Indes, l'Algérie, et l'Amérique du Nord.(20)

1) Définition

L'huile volatile est obtenue par distillation à la vapeur d'eau de feuilles fraîches d'Eucalyptus Globulus Labillardière, et d'autres espèces d'Eucalyptus l'Héritier. C'est un liquide incolore ou jaune pâle rappelant le 1,8 - cinéole, un peu l'odeur du camphre et a une saveur piquante, épicée et rafraîchissante.

L'arbre est natif de l'Australie, de la Tasmanie et de la Nouvelle Guinée, et est cultivé dans les régions tempérées.

Il existe plusieurs espèces d'Eucalyptus fournissant des huiles essentielles à constituants chimiques différents. Ces espèces sont classées comme suit :

- | | |
|---------------------------------|-----------------------|
| - Eucalyptus Globulus | (Cinéol) |
| - Eucalyptus Australiana von B. | (Phellandrène) |
| - Eucalyptus Macarthuri | (Acétate de Géranyle) |
| - Eucalyptus Citriodora | (Citronellal) |
| - Eucalyptus Stagerana | (Citral, Li-onène) |

2) Constituants chimiques

Les huiles essentielles d'Eucalyptus contiennent principalement les constituants suivants :

α - pinène	cinéol (important)	aldéhyde en C^8
camphène	<u>mais aussi</u> δ -terpinène	α -terpinéol
β - pinène	p - cyène	acétate de citronellyl
phellandrène	citronellal	bornéol
li-onène	linalol	et des alcools(22)

Dans les nombreuses variétés d'Eucalyptus, on rencontre des proportions très variables d'Eucalyptol ou cinéol :

- Eucalyptus macrocryncha	53,2 %
- Eucalyptus capitellata	38,4 %
- Eucalyptus engenioïdes	28,4 à 31,4
- Eucalyptus dextropinca	piniène } peu de cinéol
- Eucalyptus laevopinea	
- Eucalyptus punetata	46,4 à 64,4
- Eucalyptus exophleba	15 à 20 odeur désagréable
- Eucalyptus restrata	teneur forte en cinéol

Dans toutes ces essences, on rencontre les éléments suivants cinéol, citral, citronellal, aldéhyde cuminique, cyrène, pinène, phellandrène. L'eucalyptol serait le constituant le moins actif, puis viennent le phellandrène et l'aromadendral ; ce dernier est le plus actif.(11)

VIII - L'EUCALYPTUS GLOBULUS

Son nom latin, Eucalyptus Globulus lui a été donné en raison de la forme spéciale de ses fleurs. Elles sont en effet fermées, donc "bien couvertes" soit en grec : Eu = bien et Kaluptos = couvert.(8)

- Dénomination usuelle : Eucalyptus Globulus
- Désignation botanique : Eucalyptus Globulus Labillardière
- Famille : Myrtacées
- Partie de la plante utilisée : Feuilles (3)

L'Eucalyptus Globulus, dit gommier bleu de Tasmanie ou arbre à fièvre est, de toutes les espèces de ce genre la plus connue et la plus appréciée.(20) Cet arbre a été découvert par LABILLARDIERE en Tasmanie en 1792 et introduit en Europe par RAMEL en 1856.(12) L'Eucalyptus Globulus vit sous un climat très doux, régulièrement tiède et humide avec une pluviométrie relativement faible.(23) C'est un arbre très intéressant qui pousse sur les sols argilo-sableux au niveau de la mer.(24) Ses propriétés remarquables et excellentes en ont fait propager la culture dans presque tous les continents.(20)

L'Eucalyptus Globulus est un arbre qui, dans la région méditerranéenne, atteint facilement 30 à 40 mètres de hauteur et dans son pays d'origine s'élève à 60 à 80 mètres et même plus.(21)

1) Définition

Obtenue par distillation à la vapeur des feuilles et aussi des boutons floraux, l'essence de l'Eucalyptus Globulus est un liquide très mobile incolore ou dont la couleur peut aller jusqu'au jaune clair ou verdâtre pâle ; elle a une odeur aromatique forte, agréable et rafraîchissante de cinéol, une saveur épicée et réfrigérante rappelant à la fois le camphre et la lavande de saveur fraîche puis brûlante. (20' - (21'). Elle doit son odeur au principal constituant : L'Eucalyptol.(8)

Dans l'essence brute la présence d'aldéhydes (surtout aldéhyde valérienique) se manifeste désagréablement en provoquant la toux. Les essences bien rectifiées ne possèdent plus ce caractère fâcheux, ou à un degré minime seulement.(20)

2) Caractéristiques physiques

Densité d_{20}^{20}

minimum : 0,906

maximum : 0,925

Indice de réfraction à 20° C.

minimum : 1,459

maximum : 1.467

Pouvoir rotatoire à 20° C

compris entre 0° C et + 10° C (3')

Soluble dans 2 à 3 volumes et plus d'alcool à 70°.(25)

Les feuilles adultes sont plus riches en huile que les jeunes et leur huile est également plus riche en cinéol.(24)

L'Eucalyptus Globulus donne les rendements suivants en essence :

Feuilles fraîches 0,8 %

Feuilles sèches 1,6 à 3 %

Plus l'essence est riche en cinéol, plus sa densité sera forte et son pouvoir rotatoire faible, les essences dont le titre en cinéol est très élevé se solidifient, en une masse blanche et cristalline lorsqu'on les place dans un mélange réfrigérant formé de glace et de sel de cuisine.(11)

3) Composition chimique

La première analyse de l'essence d'Eucalyptus a été entreprise en 1870 par CLOEZ. Il en retire par distillation fractionnée un corps bouillant à 175° qu'il nomma eucalyptol. Cette fraction était encore fortement souillée de terpène. C'est pourquoi l'analyse élémentaire de CLOEZ le conduisit à la formule inexacte $C_{12}H_{22}O$.

La composition exacte de l'eucalyptol, soit $C_{10}H_{18}O$, a été reconnue par M.E. JAHNS, qui démontra l'identité de ce corps avec le cinéol. L'hydrocarbure, qui accompagne le cinéol, et qu'on désignant jadis par le terme d'eucalyptus n'est autre que du α -pinène droit. D'après une autre observation, il est probable que l'essence de globulus contient encore d'autres terpènes que le α -pinène. L'odeur secondaire désagréable et piquante de l'essence d'eucalyptus brute, qui provoque la toux est due à plusieurs aldéhydes surtout les aldéhydes valérienique, butylique et caproïque. Outre ces corps, on trouve dans la fraction de tête, selon M.M.G. BOUCHARDAT et OLIVIERO de l'alcool éthylique et de l'alcool amylique, ainsi que selon M.M. WALLACH et GILDEMEISTER, des acides gras. (20)

Les constituents principaux sont : α -Pinène, camphène, β -pinène, carène, phellandrène, limonène, eucalyptol, p-cyène, linalol, camphre, terpinéol, géraniol, aromadendrène, caryophyllène, acétate de géranyl, γ -terpinène, terpinène 1-ol4, carvone, terpinolène

Quelques formules des constituents :

Hydrocarbures: -Terpènes cycliques



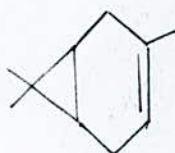
α -Pinène



β -Pinène



Camphène



Δ^3 -Carène

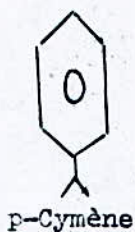


Phellandrène

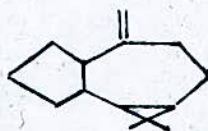


Limonène

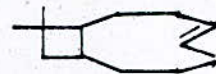
-Aromatiques



-Sesquiterpènes



Aromadendrene

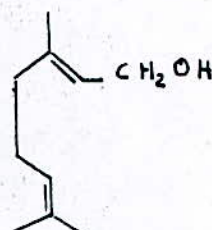


Caryophyllène

Alcools: -Aliphatiques



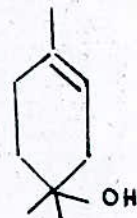
Linalol



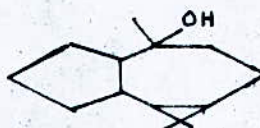
Géraniol

-Terpènes cycliques

α -Terpinéol

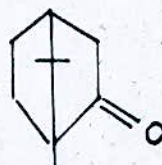


-Sesquiterpène



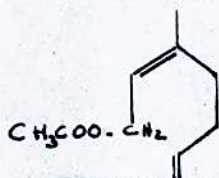
Globulol

Cétones: Terpènes Bicycliques



Camphre

Esters: Terpènes



Acétate de Géranyl

Oxydes:



Cinéol

L'essence d'Eucalyptus Globulus, qui est l'essence commerciale, a pour constituant principal, le cinéol qui atteint jusqu'à 70 à 80 %.(11) A l'état pur le cinéol constitue un liquide incolore, optiquement inactif à l'odeur camphrée ; il se cristallise sous l'action du froid. Le cinéol est très stable vis-à-vis des agents réducteurs. L'odeur caractéristique du cinéol révèle le plus souvent sa présence.(6) Le cinéol possède d'étroites relations avec les terpènes. Il se trouve parmi les produits d'oxydation du phellandrène et peut prendre naissance à partir du terpinéol.(26)

IX - USAGES

C'est surtout par leurs propriétés antiseptiques mais aussi par leur parfum que les huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps. Ces propriétés antiseptiques ne sont pas employées seulement pour la toilette, mais également dans un but plus directement thérapeutique.

L'action antiparasitaire des huiles essentielles est utilisée pour éliminer les vers intestinaux et en particulier les oxyures. Elles sont tonocardiaques, et elles favorisent l'élimination du cholestérol.(8)

Le bois dur et résineux est excellent pour la construction ; on l'utilise encore pour sa cellulose, comme bois de mine et de chauffage.

L'Eucalyptus assainit les régions marécageuses. Les écorces de certaines espèces d'Eucalyptus sont riches en tanin et sont utilisées pour le tannage des peaux. De ses feuilles, on retire l'eucalyptol, qui possède des propriétés désinfectantes et qui est assez couramment utilisé en pharmacie.(7)

- Emploi de l'Eucalyptus Globulus
- Inhalations : diphtérie, scarlatine, coqueluche, catarrhe, bronchite, pneumonie, influenza
- Frictions : contre les rhumatismes
- Injections sous cutanées : septicémie, érysipèle.

L'Eucalyptus n'est pas toxique.(11)

B - CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION LIQUIDE SOLIDE

I - GENERALITES

Le terme chromatographie, du grec KHROMATOS (couleur) et graphos (écrire), fut employé tout d'abord par le botaniste russe Michael TSWETT en 1906 pour décrire la séparation de pigments végétaux en zones colorées distinctes.(27)

La chromatographie est une technique de séparation très puissante mais aussi considérablement complexe. Les séparations par chromatographie mettent en oeuvre des techniques basées sur les propriétés physiques générales des molécules.

Ces propriétés sont : (a) la tendance d'une molécule à se dissoudre dans un liquide (solubilité), (b) la tendance d'une molécule à se lier à un solide finement divisé (adsorption) et (c) la tendance d'une molécule à passer à l'état de vapeur ou à s'évaporer (volatilité).

Ainsi, une des phases (la phase mobile) passe à travers l'autre phase (la phase stationnaire), tout en restant à peu près en équilibre avec elle.

Si la phase mobile est un liquide et la phase stationnaire un solide doué de propriétés adsorbantes, le résultat est une chromatographie d'adsorption. (28)

La chromatographie en phase liquide sur colonne est la plus ancienne des méthodes chromatographiques ; fait remarquable, elle est à nouveau considérée comme l'une des techniques les plus précieuses pour le chercheur.(29) Son développement est dû aux nouveaux appareillages qui permettent de réaliser des analyses plus rapides en utilisant des colonnes hautement efficaces et des systèmes de détection de plus en plus sensibles.(30) En plus de cette méthode, toujours employé actuellement, il en existe d'autres pour résoudre des différents problèmes de fractionnement et récupérer les produits séparés.(31)

La chromatographie liquide - solide convient à des échantillons dont le poids moléculaire n'est pas trop élevé comme des échantillons peu volatils de poids moléculaire inférieur à 1000, par exemple ; et elle est particulièrement adaptée à ceux qui sont solubles dans un solvant organique.

La chromatographie liquide - solide est cependant moins prometteuse en ce qui concerne les échantillons à poids moléculaire élevé, tels les polymères, les composés ioniques et les composés solubles dans l'eau.(29)

Le choix d'une méthode face à un problème est notablement plus compliqué ici qu'en chromatographie en phase gazeuse en raison des interactions supplémentaires entre la phase mobile et, d'une part, le soluté d'autre part la phase stationnaire. Or la connaissance de ces interactions et de celles entre soluté et phase fixe est encore trop souvent insuffisante et empirique.(4)

II - DEFINITIONS

La chromatographie en phase liquide parfois appelée chromatographie liquide, est une des branches de la chromatographie, la technique la plus utilisée à l'heure actuelle. Le principe général du processus chromatographique peut être défini comme suit :

- La chromatographie est avant tout une méthode de séparation dans laquelle les composantes à séparer sont réparties entre deux phases ; l'une d'entre elle est constituée par un lit de matériau stationnaire au travers duquel s'infiltrer, la deuxième phase. Le processus chromatographique est le résultat d'adsorption et de désorption répétées, lors de la traversée de la phase stationnaire, et la séparation obtenue est due aux différences entre les coefficients de partage des composantes de l'échantillon.(30)

Puisque l'adsorption correspond essentiellement à un phénomène de surface, il est évident que le degré de séparation dépend de la surface développée de l'adsorbant ; d'où l'intérêt d'un adsorbant de faible granulométrie. Dans tous les cas cependant, le facteur le plus important est le coefficient de partage K d'une substance entre les deux phases du système. On a :

$$K = \frac{\text{Quantité de soluté par unité de volume de la phase stationnaire}}{\text{Quantité de soluté par unité de volume de la phase mobile.}}$$

En chromatographie d'adsorption, ce coefficient dépend de la température et généralement de la concentration de la substance étudiée.(27)

La substance solide servant de phase stationnaire en chromatographie d'adsorption est généralement appelée adsorbant. L'écoulement de la phase mobile sur l'adsorbant est le développement. Après séparation des substances sur le chromatogramme par développement, elles sont détectées ou visualisées. Lorsque les substances sont complètement

séparées de l'adsorbant, il y a élution. Les substances séparées sont nommées solutés ou échantillons. Le liquide ayant traversé la colonne et apparaissant au bas est appelé l'effluent.(30)

III - DIVERS ASPECTS DE LA CHROMATAGRAPHE D'ADSORPTION

En chromatographie sur colonne, les forces de contrainte sont dues à l'action d'un courant de liquide au travers de la colonne et celles de résistance aux diverses affinités d'adsorption que manifestent les solutés pour l'adsorbant. Pour obtenir une séparation effective, les forces de contrainte et les forces de résistance doivent agir sélectivement sur les solutés. Ce sont les forces d'adsorption qui présentent ici un tel caractère de sélectivité.(5)

On utilise trois techniques distinctes pour les séparations chromatographiques : l'analyse par élution, l'analyse frontale et l'analyse par déplacement.(27)

1) Analyse par élution

La méthode, qui a fait l'objet des recherches les plus approfondies pour les substances incolores, est due à REICHSTEIN et à son école qui a poursuivi le lavage de la colonne jusqu'à ce que les substances finissent par passer dans l'effluent où elles sont recueillies séparément et caractérisées par toutes sortes de procédés appropriés. Deux modifications importantes de cette méthode d'analyse par élution ont été introduites : l'une consiste à utiliser, comme liquide de développement, non plus un liquide unique mais une "série" de liquides appelés "éluants successifs". Ce choix judicieux de la suite des éluants permet dans certains cas d'obtenir de meilleures séparations.

La deuxième modification apportée à la technique de l'analyse par élution consiste, non plus à faire varier la nature des éluants, mais à appliquer au sommet de la colonne un "gradient de pouvoir éluant". On l'obtient par le mélange progressif et continu de deux solvants.(5)

2) Analyse frontale

On verse le mélange de façon continue. Au début, le composant le moins adsorbé traverse la colonne et l'autre se rassemble près du sommet.

Mais lorsque la capacité limite de l'adsorbant est atteinte, le composant le plus fortement adsorbé commence aussi à se déplacer le long de la colonne. Les premières fractions ne contiennent donc que le corps le moins adsorbable mais il apparaît ultérieurement un mélange de deux substances. Un tel phénomène peut aussi se rencontrer lors de l'analyse par élution, en particulier lorsqu'on introduit dans la colonne une trop grande quantité de substance. Au lieu de zones distinctes, on observe un chevauchement, à l'exception d'une partie du premier composant. L'analyse frontale est de ce fait une technique préparative plutôt qu'analytique ; de plus, elle présente l'inconvénient par rapport aux deux autres techniques de nécessiter une plus grande quantité de mélange puisque ce dernier doit être admis en continu dans la colonne (27).

3 - Analyse par déplacement

TISELIUS en 1940, a modifié la méthode d'analyse frontale en combinant ses avantages avec ceux de l'analyse par élution. Le nouveau procédé, proposé en 1943, consiste à introduire au sommet de la colonne une quantité finie de la solution à examiner, comme en analyse par élution et à effectuer le lavage, non plus avec un solvant ordinaire, mais avec une solution d'un corps choisi de telle sorte qu'il soit plus fortement adsorbé qu'aucun des constituants de la solution initiale. Dans ces conditions, les solutés initialement adsorbés sont "déplacés" et lorsqu'un état stationnaire est atteint, ils se meuvent "en procession", les moins adsorbés précédant les plus adsorbés. Il s'ensuit que la méthode d'analyse par déplacement se prête de manière parfaitement correcte à l'examen qualitatif et quantitatif des mélanges ; elle souffre simplement de la restriction qu'un équilibre parfait doit être instauré entre la phase liquide et la phase solide (5).

IV - THEORIES DE LA CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION LIQUIDE-SOLIDE

1) Théorie de l'analyse par élution

WILSON a établi le premier l'équation différentielle du mouvement d'un soluté unique dans une colonne d'adsorbant sous l'influence d'un liquide de développement.

Pour l'établir, on exprime qu'il y a conservation de la matière dans la tranche AB de colonne d'épaisseur δx , à distance x du sommet, la quantité de soluté présente dans cette tranche peut se modifier de trois manières différentes, pendant le temps δt :

- par la variation de la concentration de la solution qui pénètre par A (concentration C) et sort par B (concentration $C + (\frac{\delta C}{\delta x}) \delta x$)
- par la variation de la concentration de la solution dans l'espace interstitiel des grains AB

- par la variation de la "concentration" du soluté adsorbé sur les grains de la tranche AB.

A ces trois causes de variations correspondent trois termes dont la somme doit être nulle.

$$V \delta t \left(\frac{\delta C}{\delta x} \right) \delta x + P \delta x \left(\frac{\delta C}{\delta t} \right) \delta t + \left(\frac{\delta Q}{\delta t} \right) \delta t \delta x = 0$$

P = Volume interstitiel des grains de la colonne

V = Vitesse d'introduction constante du solvant dans le développement

Q = Quantité de soluté adsorbé par gramme d'adsorbant.

La vitesse de migration est constante et indépendante de la concentration, tous les points de la zone se déplacent à la même vitesse, la zone conservant sa forme initiale.

2) Théories cinétiques

THOMAS introduit par exemple la cinétique du processus d'adsorption qui mène à l'isotherme de LANGMUIR, en supposant que la vitesse de désorption est du premier ordre par rapport à la "concentration" du soluté adsorbé et que la vitesse d'adsorption est proportionnelle à la concentration de la solution et à la "surface libre de l'adsorbant".

Par ailleurs, GIDDINGS et EYRING partis d'un point de vue fort différent ont bâti une théorie entièrement basée sur la position de centres actifs d'adsorption et sur la probabilité qu'à la molécule, dans l'unité de temps d'être éluee au pied de la colonne (5).

V - NATURE DU PHENOMENE

Comme nous l'avons déjà vu, à propos de la définition même de la chromatographie, l'analyse se fait par transport des molécules de l'échantillon dans la phase mobile au travers d'un lit de matériau constituant la phase stationnaire.

Pendant ce transport, la phase stationnaire retarde les molécules de l'échantillon en les retenant plus ou moins en fonction de leur interaction avec les phases mobile et stationnaire. Ce retard est un phénomène sélectif dans un système phase mobile - phase stationnaire donné et la durée de retard est différente pour chacun des composés de l'échantillon.

1) Principe de la séparation

La chromatographie d'adsorption liquide-solide est normalement utilisée pour la séparation des composés de polarités différentes. La polarité d'une molécule est une conséquence de la présence et/ou de la position de ses différents groupements fonctionnels. Le tableau 1 donne une liste de groupements fonctionnels courants par ordre de polarité croissante. En général, si la molécule d'un composé comprend plus d'un groupement fonctionnel, la polarité du composé, et donc son temps d'élution, sont déterminés par le groupement de plus forte polarité. La chromatographie d'adsorption sépare donc souvent les mélanges suivant la classe des composés ; la classe d'un composé étant déterminée par son ou ses groupements les plus polaires.

Une manière commode de visualiser le déroulement de ce mécanisme, consiste à envisager le processus d'adsorption comme l'établissement d'un équilibre à l'intérieur de la colonne. On choisit une phase mobile dont la polarité est voisine de celle de l'échantillon ou légèrement plus faible. Une molécule d'échantillon, adsorbée sur un groupement hydroxyle à la surface de la phase stationnaire, est heurtée de manière continue par les molécules du courant de phase mobile. L'énergie de ce courant est suffisante pour affaiblir progressivement la liaison de l'échantillon - phase stationnaire. Le flux continu de molécule de la phase mobile, dont la polarité est presque identique à celle du composé adsorbé ; réussit à la déloger et à l'entraîner jusqu'au premier groupement -OH disponible, où sa polarité légèrement supérieur lui permettra de prendre la place de molécules de la phase mobile arrêtées sur le site d'adsorption.

L'augmentation du nombre de ces étapes de désorption - adsorption allonge d'autant plus le temps de séjour dans la colonne des composants de l'échantillon que leur charge est plus élevée, améliorant ainsi leur séparation.(31)

TABEAU 1 : GROUPEMENTS FONCTIONNELS INTERVENANT EN CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

(Classés approximativement par ordre de polarité)

GROUPEMENTS FONCTIONNELS	STRUCTURES
Méthyle	- CH ₃
Fluoro	- F
Chloro	- Cl
Nitro	- NO ₂
Aldéhyde	- CHO
Acétyle	- O - $\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$ - CH ₃
Hydroxyle	- OH
Cétone	$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-} \end{matrix}$
Amine	- NH ₂
Carboxyle	- COOH
Amide	- CO NH ₂

2) Sélectivité en chromatographie d'adsorption

Les séparations en chromatographie d'adsorption s'effectuent sur des adsorbants polaires tels que le gel de silice, l'alumine ou d'autres supports minéraux. C'est le groupement fonctionnel d'une molécule d'échantillon qui détermine avant tout autre facteur son adsorption relative : c'est-à-dire la valeur de son k'. Cette adsorption croît avec la polarité et le nombre de ses groupements fonctionnels, car les interactions entre la molécule et la surface de l'adsorbant polaire augmentent.

L'originalité de la rétention et de la sélectivité en chromatographie liquide-solide a pour origine deux caractéristiques de l'adsorption en solution :

Une compétition entre les molécules de l'échantillon et celles du solvant à la surface de l'adsorbant et des interactions multiples entre les groupements fonctionnels d'une molécule d'échantillon et les sites correspondants fixés de façon rigide à la surface de l'adsorbant.

L'adsorption d'une molécule d'échantillon X, qui se trouve en phase mobile, m, a pour origine le déplacement d'un certain nombre n de molécules de solvant M, initialement situés dans la phase adsorbée à :



Ainsi la surface de l'adsorbant en contact avec un liquide (le solvant est entièrement recouverte par des molécules de solvant ou d'échantillon : l'adsorption de X nécessite la désorption d'un nombre suffisant de molécules de solvant pour lui permettre de s'adsorber à la surface. L'énergie nette d'adsorption de X qui détermine son adsorption relative, et son k', est, par conséquent égale à la différence entre les énergies d'adsorption des groupements individuels et des molécules de solvant déplacées de la surface par ces groupements :

k' est défini comme étant le facteur de capacité

$$k' = KV_S / V_m$$

K coefficient de distribution (rapport des concentrations)

V_S = Volume de la phase stationnaire dans la colonne, ou volume de solvant dans les pores d'un remplissage pour chromatographie d'adsorption.

V_m = Volume de la mobile dans la colonne, ou Volume interstitiel (29)

VI - FACTEURS DEPENDANTS DES SEPARATIONS

Nature de l'isotherme

Par définition, une séparation de deux solutés A et B dans une colonne chromatographique est correcte lorsqu'aucune trace de A ne se retrouve dans la zone de B et réciproquement, aucune trace de B dans la zone de A. Ainsi la séparation dépend de la nature des isothermes d'adsorption de A et de B.

En fait, il arrive assez souvent que le constituant le moins adsorbé soit "déplacé" par le constituant qui le suit immédiatement ; cet effet se traduit par un "raidissement" de la limite arrière trainante du constituant le plus adsorbé.

Nature de l'adsorbant

Dans de nombreux cas, il est impossible de distinguer la nature des forces de résistance sélectives qui permettent la migration différentielle des solutés. La quantité d'adsorbant à utiliser pour une séparation chromatographique n'est pas indifférente, il semblerait que l'on doive augmenter la quantité d'adsorbant pour améliorer les résultats.

Grosseur des grains

C'est un fait d'expérimentation reconnu depuis TSWETT lui-même que la grosseur des grains est un facteur important avec les grains les plus fins. La dimension des grains peut influencer trois facteurs expérimentaux importants ; la vitesse de filtration, l'homogénéité de remplissage du tube ; c'est-à-dire l'homogénéité de la colonne elle-même et la finesse des limites dépassant les zones.

Vitesse de percolation

La vitesse de percolation ou vitesse de passage du solvant au travers d'une colonne donnée dépend de la nature de l'adsorbant du coefficient de remplissage de l'adsorbant dans le tube ou perméabilité et de la différence des pressions qui règnent au sommet et au pied de la colonne.

La vitesse de percolation ne doit pas être trop rapide, sinon l'équilibre d'adsorption entre la phase liquide et la phase solide n'a pas le temps de s'établir. Inversement, la vitesse de filtration ne doit pas être trop faible, sinon une certaine diffusion des solutés des portions de zone où la concentration est élevée vers celles où la concentration est faible se manifeste, entraînant également une diffusion des fronts.

Dimension de la colonne d'adsorbant

Il est connu que les dimensions de la colonne exercent une influence relativement grande sur l'efficacité de séparation. Il en résulte que l'on a intérêt à avoir des colonnes aussi longues et aussi fines que possible. Un rapport recommandé est de 100 pour la colonne et 1 pour le diamètre (5).

Nature du solvant

C'est le paramètre le plus important. Les solvants utilisés en chromatographie d'adsorption doivent être purs, c'est-à-dire être débarrassés d'impuretés polaires, et ne doivent pas laisser de résidus qui contamineraient les substances éluées. Les solvants commerciaux doivent être donc spécialement purifiés (34).

Température

L'effet d'une élévation de température sur l'adsorption est double : d'une part il y a élévation de la vitesse d'adsorption et de désorption, c'est-à-dire élévation de la vitesse avec laquelle l'équilibre est atteint et d'autre part, il y a réduction du taux d'adsorption. La nature affecte simultanément les comportements du soluté et du solvant.

Modifications des conditions

On peut influencer le processus d'adsorption en changeant la nature des adsorbants ou celle des solvants et en général, changer le solvant est le plus pratique. Le premier choix important est celui de l'adsorbant. Les substances acides seront séparées sur gel de silice, alors que les substances basiques doivent l'être sur l'alumine.

Après ce choix préliminaire, on peut encore modifier les propriétés de l'adsorbant. L'alumine se prépare à plusieurs activités ou polarités différentes et sous diverses formes plus ou moins acides. On modifie parfois les propriétés du gel de silice par addition d'acide ou de base et, plus spécialement par addition d'agents complexants comme la trinitro-2,4,7-fluorénine ou le cation Aq_+ .

Par un choix approprié et un mélange de certains solvants, on obtiendra la polarité nécessaire à une séparation donnée. Il arrive que certains solvants paraissent doués de propriétés spéciales pour la séparation de certaines molécules. Notons que la polarité résultant d'un mélange de solvants ne varie pas linéairement mais selon une fonction logarithmique. Ce sont des solvants de polarité très voisine qui doivent de préférence être mélangés. (28).

VII - LES ADSORBANTS

Un adsorbant idéal doit posséder un certain nombre de qualités. Son pouvoir adsorbant doit être étendu au plus grand nombre possible de substances et sa capacité d'adsorption doit être assez élevée afin que la saturation ne soit pas provoquée par des solutions relativement diluées. Il n'existe pas de règles qui permettent de sélectionner un adsorbant déterminé pour un objet précis. C'est avant tout une question d'expérience personnelle et d'essais. (5)

L'adsorbant a une importance fondamentale dans l'établissement d'un système chromatographique. Bien qu'il existe de nombreuses variétés, nous nous limiterons ici à l'étude d'adsorbants polaires, d'utilisation très souple ; l'alumine et le gel de silice. (28)

1) Choix de l'adsorbant Théorie de SNYDER

Dans le cas des solvants peu polaires, SNYDER a montré que le facteur de capacité k' s'exprime par la relation :

$$\log k' = \log V_a + \beta^* (E_o - A_s \epsilon_o) + \log \frac{W_a}{W_M}$$

V_a = volume de la phase mobile adsorbée par gramme d'adsorbant

W_a = masse de l'adsorbant contenu dans la colonne chromatographique

W_M = volume de phase mobile contenu dans la colonne.

β^* = Mesure l'activité de l'adsorbant et permet de prendre en considération le nombre de groupements silanol libres (c'est-à-dire non recouverte par des molécules d'eau) β^* est un nombre sans dimension. Compris entre 0 et 1.

E_o est l'énergie libre d'adsorption des molécules de solutés dans les conditions d'activité standards ($\beta^* = 1$).

L'énergie d'adsorption E_o s'exprime par le rapport adimensionnel :

$$E_o = \frac{-\Delta G_s^\circ}{2,3 RT}$$

ΔG_s° étant la variation d'énergie libre d'adsorption d'une molécule de soluté, R est la constante des gaz parfaits et T la température exprimée en K.

A_s : surface occupée sur l'adsorbant par une mole de soluté

ϵ_o : énergie libre d'adsorption des molécules de phase mobile par unité de surface de solvant adsorbé dans les conditions d'activité standards.

$$(\beta^* = 1) \quad \xi_0 = \frac{-\Delta G_M^\circ}{2,3 RT A_M}$$

A_M : surface occupée sur l'adsorbant par une molécule de solvant.

2) Influence de différents facteurs

2.1 Surface spécifique

D'une façon générale plus la surface spécifique d'un adsorbant est grande, plus le soluté est retenu.

On peut dire, en première approximation que le volume de la phase mobile adsorbée V_g est proportionnel à la surface spécifique du support. Augmenter la surface spécifique d'un support augmente V_g et par la même le facteur de capacité k' , toutes choses égales par ailleurs.

La capacité disponible est proportionnelle, à la surface spécifique et, dans certains cas, il peut être intéressant de disposer d'un support ayant une grande surface spécifique, pour diminuer la longueur des colonnes chromatographiques et par là, leur volume sans entraîner pour autant une surcharge des colonnes. Mais de grandes surfaces spécifiques entraînent une diminution des diamètres des pores du support.

2.2 Activité

L'Activité β^* d'un adsorbant dépend de sa teneur en eau. L'activité standard correspond à $\beta^* = 1$, ce qui est le cas des supports activés par séchage prolongé à 200° C, sous vide. Dans la pratique, il n'est pas conseillé d'utiliser des phases stationnaires trop activées car des adsorptions irréversibles ou des réactions catalytiques peuvent se produire généralement, on désactive les phases stationnaires par addition d'un peu d'eau ou d'un solvant polaire, ce qui a pour effet de diminuer la valeur de β^* et d'entraîner un nivellement de l'activité des sites du support. Pour obtenir des séparations reproductibles. Il faut donc maintenir constante la teneur en eau de l'adsorbant, c'est-à-dire utiliser des solvants ayant une teneur en eau en équilibre avec celle de l'adsorbant. (22)

3) Propriétés des adsorbants

Quelques solides sont capables d'adsorber des liquides sur leur surface spécialement s'ils ont une structure poreuse ou une surface spécifique importante. L'adsorption peut être chimique ou physique, mais il est souvent difficile de faire une distinction, depuis que les deux phénomènes peuvent opérer simultanément.

Les adsorbants les plus utilisés sont rassemblés sur le tableau 2

Dans le cas le plus simple, l'adsorption physique est défini comme étant : La substance est retenue à la surface par des forces de VAN DER WAALS. Les forces provoquent une concentration à l'interface de la substance, c'est-à-dire à l'interface entre deux phases. Usuellement, l'inter-face est une épaisseur monomodéculaire. Le taux et la teneur de l'adsorption dépendent largement de la nature de l'adsorbant et de la composition chimique de la substance absorbée.

La chimiesorption est due à des forces qui sont plus importantes que celles supposées en adsorption physique et les liaisons chimiques sont formées entre l'adsorbant et l'adsorbé.

Généralement, l'adsorption se stabilise plus rapidement sur une surface sans rugosité que sur une surface poreuse, et les substances sont adsorbées dans une large mesure, sur des irrégularités que sur une surface lisse.

La porosité de l'adsorbant peut souvent augmenter l'étendue de l'adsorption, et la taille des pores joueront une part importante dans la détermination du degré d'adsorption dépendant principalement de la nature de la surface de l'adsorbant. Les irrégularités, appelées centres actifs, ont d'une manière significative, une haute capacité d'adsorption et lient la substance adsorbée plus fortement à la surface.

Quelquefois, la liaison est assez forte pour causer des modifications chimiques telles que l'isomérisation des substances adsorbées.

TABLEAU 2. ADSORBANTS USUELS

Adsorbant	Taille des grains (mm)	Taille moyenne des pores (Å)
. Gel de silice	0,149 - 0,040	30 - 200
. Alumine	0,105 - 0,062	90
. Silicate de Magnésium synthétique	0,250 - 0,149	---
. Charbon activé	0,500 - 0,040	20 - 40 (34)

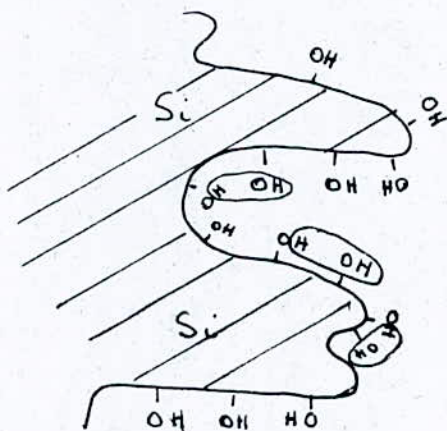
Les adsorbants utilisables sont nombreux. Cette variété, ainsi que celle des solvants, permet de nombreuses combinaisons ; c'est une des raisons de l'efficacité et de l'universabilité de cette méthode d'analyse (31).

4) Gel de silice

Le gel de silice (Si O_2) ou acide silicique, tout comme l'alumine, est un adsorbant très employé et probablement le plus souple d'utilisation que l'on puisse trouver (28). Les gels de silice utilisés en chromatographie liquide se présente surtout sous deux formes : des particules de gel de silice entièrement poreuses ou de billes de verre recouvertes d'une mince couche de gel de silice de forme irrégulière.

La surface du gel de silice de ces deux types de remplissage est recouverte de groupements Si-OH et Si-O-Si qui peuvent présenter une interaction avec les molécules de l'échantillon. Les groupements les plus importants sont les radicaux hydroxyles. Comme le montre la figure 1, il en existe deux types : les hydroxyles libres (OH) dont le niveau d'énergie est environ 30KJ/Mole (7Kcal/mole) et les hydroxyles réactifs dont l'énergie de liaison est de l'ordre de 55Kj/mole (13Kcal/mole).

Figure 1 : Groupements hydroxyles libres et réactifs à la surface de la silice.



Les derniers radicaux forment des liaisons fortes qui peuvent provoquer l'adsorption permanente de certains composants polaires de l'échantillon et qui adsorbent des molécules d'eau sur le gel de silice. Cette double activité est souvent responsable d'un élargissement ou d'une division des pics d'un manque de ~~reproductibilité~~ des résultats.

Les hydroxyles réactifs peuvent être désactivés en ajoutant dans la colonne de l'eau ou un alcool (éthanol ou isopropanol) ou en utilisant une phase mobile mélangée contenant de l'eau ou, de préférence un alcool. Les remplissages de gel de silice désactivé sont à préférer pour la séparation de composés très polaires, par exemple alcools, amines ou acides.

Par contre, pour des composés de faible polarité ou pour des composés apolaires tels que les hydrocarbures, les silices non modifiées donnent de meilleurs résultats.(30)

La silice est un adsorbant faiblement acide (pH 4), du fait des groupes - OH de la surface. C'est un bon adsorbant, d'utilisation à peu près universelle, commercialisé, sous des formes très variées. De plus, la silice apparaît comme l'adsorbant idéal pour les raisons suivantes : réactivité faible ou nulle vis-à-vis de la plupart des échantillons, forte capacité linéaire (c'est-à-dire, volume de rétention constant pour des charges d'échantillon élevées) et grande efficacité.(29)

Le gel de silice peut être utilisé avec tous les solvants, mais il développe des liaisons hydrogènes avec certains solutés et solvants lorsque l'eau est présente. Par suite de cette propriété, l'utilisation du méthanol et de l'éthanol est limitée à cause du ralentissement de l'écoulement du solvant en présence d'eau.(28)

L'activation de la silice est obtenue par chauffage. La silice d'activité maximum est obtenue par chauffage à 300 °C. Les activités inférieures s'obtiennent aussi par addition d'eau, ou par mélange avec des alumines plus humides.(31) On l'obtient en neutralisant une solution de silicate de soude par un acide minéral dilué. Il se forme un gel qui est ensuite lavé pour le débarrasser des sels minéraux formés au cours de la neutralisation puis desséché et grillé.

Le produit obtenu contient 92 % de silice, 6 % d'eau et 2 % de sels minéraux résiduels et se présente généralement sous forme de grains translucides (32).

Les pores du gel de silice doivent être suffisamment larges pour permettre l'entrée et la sortie des molécules d'échantillon. Un diamètre de pores trop faible provoque une exclusion stérique préjudiciable à l'efficacité (30).

Les caractéristiques usuelles de silice sont les suivantes :

<u>Composition</u> :	SiO ₂	92 à 94 %
	H ₂ O	5 % environ
	Sulfates (ou chlorure) et sels	2 %
<u>Propriétés</u> :	Densité	0,7 à 0,8
	Taille des particules	de 1 à 6 mm
	Surface spécifique BET	600 à 800 m ² /g
	Volumes des pores	20 Å environ
	Chaleur d'adsorption	700 Kcal/Kg eau
	Température de régénération	120 à 200°C
	Point de rosée pouvant être obtenu	-65° C
	Chaleur massique	0,25 cal/g ° C (32) (38)

Le silicagel est stable jusqu'à 400°C. Il est sensible à la présence d'impuretés telles que vapeurs d'huile, eau sous forme vésiculaires, poussières, etc... (32).

VIII - PHASE MOBILE

La phase mobile d'un système de chromatographie en phase liquide joue un rôle actif dans le mécanisme de séparations. Le choix d'une phase mobile convenable représente l'une des étapes les plus importantes dans la détermination des paramètres analytiques d'une séparation en chromatographie en phase liquide.

Les phases mobiles utilisées pour les analyses de chromatographie en phase liquide peuvent être constituées par une seule substance ou par un mélange de deux composés ou plus, suivant les caractéristiques recherchées. D'autre part, la composition de la phase mobile peut rester fixe ou être modifiée au cours de l'analyse.

Le premier cas est celui du fonctionnement isocratique et le second celui du fonctionnement avec gradient d'élution (30)

1) Contraintes pratiques

- Compatibilité avec le système de détection
- Miscibilité des solvants et solubilités des solutés. Si la phase mobile est constituée par plusieurs solvants, ceux-ci doivent être totalement miscibles et les solutés doivent y être solubles
- Faible viscosité. La viscosité de la phase mobile a une influence sur la cinétique d'adsorption et sur la pression en tête de la colonne. En chromatographie d'adsorption, on utilise en général des solvants dont la viscosité est comprise entre 0,3 et $2 \cdot 10^{-3}$ Pa.s.

2) Force éluante de la phase mobile

On assimile la force éluante d'un solvant à ξ_0 , c'est-à-dire à l'énergie d'adsorption des molécules de solvant à la surface de l'adsorbant (-OH libres actifs ou recouverts d'une couche d'eau).

Le choix d'un solvant de force éluante convenable permet de contrôler les valeurs des facteurs de capacité. Plus la force éluante du solvant est élevée, plus les facteurs de capacité sont faibles.

Il est donc important de classer les solvants les plus couramment utilisés en chromatographie d'adsorption par ordre croissant de leurs forces éluantes. C'est ce qu'on appelle une série éluotropique.

2.1 Mélanges de phase mobile

Il est très rare qu'un solvant unique permette d'aboutir à des valeurs de facteurs de capacité convenables et surtout à une résolution optimale. C'est pourquoi on utilise très souvent des mélanges de solvants.(4)

Le processus d'adsorption fait intervenir une compétition entre les molécules pour l'occupation des sites actifs du support. L'addition d'une quantité même très faible, d'un liquide de polarité plus élevée remplit donc une grande partie des sites provoquant une augmentation rapide de la polarité réelle de la phase mobile. Même de faibles changements de polarité peuvent modifier considérablement le degré de séparation.

Les composés polaires nécessitent une phase polaire pour les éluer de la colonne, mais un excès de polarité de la phase mobile la fait entrer en compétition avec les molécules de l'échantillon pour l'occupation des sites de la phase stationnaire et diminue donc l'efficacité de séparation des composants de l'échantillon.(30)

2.2 Gradient d'élution

Le gradient d'élution est utilisé, en présence de composants de polarités très différentes, quand la séparation des derniers composants élués peut être améliorée par le changement de la polarité de la phase mobile. Le gradient d'élution fait généralement d'une substance pure à laquelle vient s'ajouter un pourcentage croissant de l'autre ou d'autres composants. Ce changement peut être linéaire ou suivre des courbes diverses.(30)

En effet, un solvant peu polaire séparera bien les solutés peu polaires, mais l'élution de composés les plus adsorbés exigera un volume de solvant, considérable ; à contrario un solvant plus polaire conviendra bien aux composés très retenus mais la résolution deviendra très mauvaise pour des solutés peu retenus.

3) Influence de la nature du solvant sur la sélectivité

Si la formule de SNYDER régit de manière à peu près satisfaisante, le phénomène d'adsorption dans les milieux peu polaires, elle devient incapable dans le cas des solvants de force éluante assez grande, ce qui est fréquent en chromatographie liquide solide.

4) Interactions diélectriques

Les ions polarisent les molécules de solvant de forte constante diélectrique créant des interactions électrostatiques entre l'ion et les molécules de solvants. Les solvants de constante diélectrique élevée (eau, méthanol, etc...) dissolvent ainsi que les composés ionisés ou ionisables.

5) Force d'un solvant et polarité

5.1 Pouvoir éluant

Il faut tout d'abord choisir le solvant de force éluante moyenne. (4) Le pouvoir éluant des solvants a été aussi étudié en utilisant différentes propriétés physiques telles que la constante diélectrique. La tension superficielle, la solubilité dans l'eau, les chaleurs de mouillage, etc...

En chromatographie d'adsorption, le choix de la phase mobile est facilité par l'utilisation de l'échelle dite de HILDEBRAND, qui donne la force éluante du solvant, ϵ_0 de différents liquides utilisés comme phase mobile. Le tableau 3 donne cette échelle pour des liquides sélectionnés.

Les valeurs de ϵ_0 sont rapportées à celle du pentane, dont ϵ_0 est choisi arbitrairement égal à zéro. Les mesures initiales effectuées par HILDEBRAND, en 1932, portaient sur un "paramètre de solubilité" mais, pour définir un paramètre plus pratique, cette échelle a été remaniée par SNYDER. Le tableau 3 est celui mis au point par BRISTOW à partir de celui de SNYDER. Bien que ces premières mesures aient porté sur l'alumine, l'activité sur le gel de silice étant généralement identique. L'échelle reste donc valable. (30)

5.2 Polarité

Le terme "polarité" est très utilisé en chromatographie. Fondamentalement, c'est la propriété d'une molécule de posséder des centres positifs et négatifs séparés ; cet arrangement résulte de la nature des atomes mis en jeu et de leur configuration. Une telle molécule possédant un moment dipolaire est ainsi attirée par une molécule ayant elle aussi une polarité. La distance entre les autres, ou pôles positif ou négatif déterminera le degré de polarité et de là, le

degré d'attraction. En chromatographie, cependant la définition est élargie et englobe des propriétés telles que la liaison hydrogène et le phénomène de polarisation. C'est essentiellement une notion relative qui s'applique aux solvants, solutés et adsorbants. La polarité relative des solvants est concrétisée par leur constante diélectrique qui se mesure directement.(28)

Un composé polaire est un composé retenu par la phase stationnaire, tandis qu'un composé non polaire tend à se déplacer avec la phase mobile.(4)

6) Sélectivité d'un solvant

Une bonne phase mobile doit avoir deux propriétés distinctes :

- a) Elle doit avoir une force éluante telle que les facteurs de capacité des solutés à séparer soient compris entre 2 et 5 pour un mélange simple, entre 0,5 et 0,20 pour un mélange complexe.
- b) Elle doit avoir une bonne sélectivité (α) pour le couple le plus difficile à séparer du mélange considéré.

Une fois mis au point un mélange qui à la force éluante appropriée, on peut donc être amené à changer sa nature pour obtenir la sélectivité recherchée (sans changer sa force éluante). (4)

Lorsqu'on mélange deux solvants, la variation du pouvoir éluant n'est pas toujours linéaire, et l'élution est parfois plus forte qu'avec chaque constituant séparé.(31)

PROPRIETES DE SUBSTANCES UTILISEES COMME PHASES MOBILES
 LES PRODUITS SONT CLASSES PAR FORCES D'ELUTION (ϵ_0) CROISSANTES

Substances utilisées comme phase mobile	ϵ_0	Viscosité en mPa.s (cP) à 20°C	Indice de réfraction
Fluoroalcanes	-0,25	0,39	1,267
Trichloro 1-1-2 Trifluoro-1-2-2 éthane	--	0,69	1,356
N-Pentane	0,00	0,23	1,358
Triméthyl -2-2-4 pentane (iso-octane)	0,01	0,50	1,404
N-Hexane	0,01	0,33	1,375
Cyclohexane	0,04	1,00	1,427
Cyclopentane	0,05	0,47	1,406
Tétrachlorure de carbone	0,18	0,97	1,466
Ether n-propylique	0,28	0,37	1,368
Toluène	0,29	0,59	1,496
Chlorobenzène	0,30	0,80	1,525
Benzène	0,32	0,65	1,501
Bromoéthane	0,37	---	1,424
Ether isopropylique	----	0,33	1,368
Ether éthylique	0,38	0,23	1,353
Dichlorométhane	0,42	0,44	1,424
Tétrahydrofuranne	0,45	0,55	1,408
Acétone	0,56	0,32	1,359
Dioxane	0,56	1,54	1,422
Acétate d'éthyle	0,58	0,45	1,370
Diméthylsulfoxyde	0,62	2,24	1,478
Nitrométhane	0,64	0,67	1,394
Acétronitrile	0,65	0,37	1,344
Pyridine	0,71	0,94	1,510
Trichloroéthylène	---	0,57	1,476
Diméthylformamide	----	0,92	1,428
Trifluoroéthanol	----	1,20	1,219
Propanol 2	0,82	2,30	1,380
Ethanol	0,88	1,20	1,361
Acide acétique	élevé	1,26	1,372
Eau	élevé	1,00	1,330
Méthanol	0,95	0,60	1,329

C - ANALYSE

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) a, depuis son apparition, apporté une contribution inestimable à la séparation des produits organiques. Dans le domaine des produits naturels en particulier, elle facilite l'identification des constituants, même à l'état de traces, fournissant ainsi des informations précieuses pour la comparaison et la classification des espèces végétales.

Cette contribution importante pour la chimiotaxonomie est due au fait que la CPG est utile aussi bien dans les déterminations qualitatives que quantitatives tout en se prêtant bien à la standardisation. De nombreux travaux ont été ainsi consacrés à la mise au point des meilleures conditions analytiques pour l'étude des terpènes hydrocarbonés ou oxygénés. Ceci a permis entre autres, la préparation de colonnes particulièrement adaptées à la séparation des huiles essentielles. Cependant, les conditions opératoires doivent être soigneusement choisies afin d'éviter la formation d'artefacts dus le plus souvent à des réarrangements thermiques au niveau de l'injecteur ou catalytiques au contact du support.

Dans l'analyse des huiles essentielles, l'utilisation des données de rétention est souvent considéré comme un artifice analytique important dans l'identification des substances (35).

La CPG constitue l'une des techniques les plus puissantes pour séparer et identifier tout corps gazeux ou volatilisables (36).

- Le principe

Un fluide appelé phase mobile parcourt une tube appelé colonne, renfermant un granulé poreux éventuellement imprégné d'un liquide appelé solvant ou phase liquide stationnaire.

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers celle-ci. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange appelés généralement "solutés", sont inégalement retenus par celle-ci lors de la traversée de la colonne. De ce phénomène appelé "rétention", il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont en outre inégale ;

Ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres.

Le processus de séparation chromatographique essentiellement discontinu, consiste donc en la séparation d'un mélange complexe dilué dans un fluide en une succession de mélanges binaires soluté-fluide. Ce processus analytique conduit à une méthode d'analyse au sens moderne du mot, grâce à un analyseur de mélange binaire appelé détecteur qui complète l'installation placée à la sortie de la colonne

Accessoirement on enregistre un signal constant, appelé ligne de base, en présence du fluide porteur, seul, et un pic, au passage de chaque soluté séparé. Le temps de chaque pic ou "temps de rétention", caractérise qualitativement la substance concernée. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté objectif fondamental de la chromatographie moderne. (37)

PARTIE EXPERIMENTALE

I- INTRODUCTION

Notre étude traitera tout d'abord de l'extraction de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus par entraînement à la vapeur d'eau. L'évaluation de ses caractéristiques physiques telles que densité, indice de réfraction et teneur en cinéol permettra une comparaison de celle-ci avec les différentes huiles essentielles d'Eucalyptus Globulus de divers pays.

Son analyse par chromatographie en phase gazeuse nous servira à la comparer à d'autres études analytiques effectuées antérieurement.

Enfin, un fractionnement sur colonne à l'aide de solvants pourra éventuellement améliorer les analyses ultérieures.

II- EXTRACTION

1- Description de l'appareillage et méthode

Les principaux éléments de l'appareil distillatoire sont les suivants :

La chaudière

Elle sert à la production de vapeur d'eau. Le chauffage se fait grâce à 5 résistances alimentées par une tension de 230 Volts par deux disjoncteurs.

L'alambic

Il comprend deux parties l'une appelée cucurbite et l'autre "col de cygne". La cucurbite sert principalement à contenir la matière végétale et comme récipient dans lequel la vapeur d'eau est en contact avec la matière végétale. Le col de cygne relie l'alambic au condenseur.

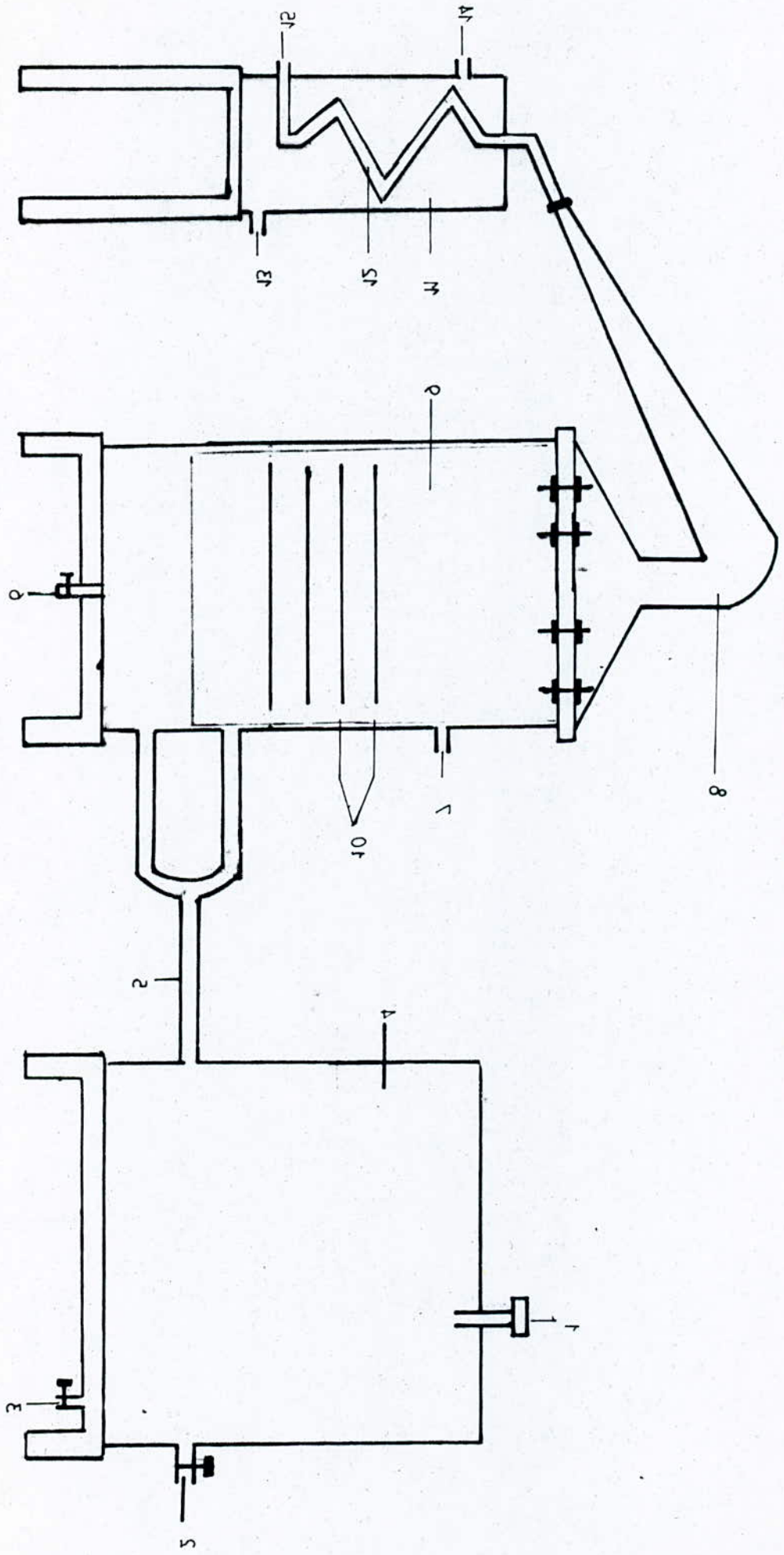
Le condenseur

Il convertit toute la vapeur d'eau ainsi que les vapeurs chargées d'huile en liquide. Ces vapeurs circulent à l'intérieur d'un serpentin.

L'alambic et le condenseur sont tous deux en cuivre.

Le matériel végétal est l'Eucalyptus Globulus provenant de deux sites différents : Ben Aknoun et la forêt de Bainem.

Le matériel végétal (feuilles, branches et fruits) est placé à l'intérieur de l'alambic et il est réparti uniformément sur les plateaux.



SCHEMA DE Γ'ΑΡΒΑΡΕΙΩΝ ΔΙΣΤΙΛΛΑΤΩΝ

LEGENDE DE L'APPAREIL DISTILLATOIRE

1. Sonde thermométrique
2. Vanne
3. Vanne
4. Chaudière
5. Conduite de vapeur
6. Purge
7. Sortie de vapeur
8. Châpiteau à col de cygne
9. Cucurbite
10. Plateaux
11. Condenseur
12. Serpentin
13. Entrée d'eau
14. Sortie d'eau
15. Récupération du condensat

L'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus est obtenue par entraînement à la vapeur d'eau dans l'appareil cité.

Les constituants de l'huile sont entraînés par la vapeur d'eau, puis sont condensés et récupérés sous forme de condensat (mélange d'eau et d'huile essentielle) dans une éprouvette de 3 litres - placée à la sortie du condenseur.

L'huile phase surnageante est séparée par simple décantation dans une ampoule à décanter. Afin d'obtenir le meilleur rendement et un pourcentage élevé en cinéol, nous avons effectué toutes les extractions dans les conditions opératoires optimales suivantes déterminées par des travaux antérieures (38).

- Puissance de chauffe : 5,4 litres/Heure
- Charge par plateau : 600 grammes
- Nombre de plateaux : 4
- Temps de distillation : 4 heures

L'huile essentielle ainsi obtenue subit des examens organoleptiques et physiques.

Caractéristiques organoleptiques

L'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus a un aspect limpide, de couleur jaune pâle ; son odeur caractéristique rappelle celle du cinéol.

Il est à noter que lors d'une extraction, nous avons obtenu une huile de couleur verdâtre, ainsi nous avons constaté que l'huile essentielle s'altère à l'air libre.

Caractéristiques physiques

- Densité

La densité relative à 20 C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20 C, à la masse d'un égal volume d'eau distillée à 20 C.

La densité relative, d_{20}^{20} est donnée par la formule suivante :

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où m_0 est la masse en gramme du pycnomètre vide ;

m_1 est la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau ;

m_2 est la masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile essentielle (39).

- L'indice de réfraction

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

La longueur d'onde spécifiée est de $(589,3 \pm 0,3)$ nm, correspondant aux radiations D_1 et D_2 du spectre du sodium.

L'indice de réfraction, n_D^t , à la température de référence t est donné par la formule :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0,0004 (t' - t)$$

où $n_D^{t'}$ est la valeur de la lecture obtenue à la température t' , à laquelle a été effectuée la détermination (40).

- Le pourcentage en cinéol (Eucalyptol)

Nous anticipons sur les résultats à l'aide du chromatogramme de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus pour en déduire la teneur en cinéol.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Densité, indice de réfraction et teneur en cinéol de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus.

	Valeurs expérimentales	Valeurs AFNOR
Densité à 20 C	0,9136	(min) 0,906 (max) 0,925
Indice de Réfraction à 20 C	1,4648	(min) 1,459 (max) 1,467
% en cinéol	64,738	(min) 70

Nous remarquons que les valeurs expérimentales de la densité et de l'indice de réfraction sont comprises dans l'intervalle des valeurs données par les normes AFNOR pour l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus.

La teneur en cinéol est faible, ceci est peut être dû au phénomène d'entraînement à la vapeur et au débit de vapeur, car celui-ci influe directement sur le pourcentage en cinéol : plus le débit de vapeur est grand et plus le pourcentage en cinéol est faible.

Etude comparative des huiles essentielles d'Eucalyptus Globulus de trois pays : Espagne
Australie
Colombie.

Tableau 2 : Indice de réfraction, densité et teneur en cinéol de diverses huiles essentielles.

	Australie (41)	Espagne (42)	Expérience	Colombie (42)
Densité à 20 C	0,920	0,917	0,9136	0,907
Indice de réfraction à 20 C	1,4628	1,4630	1,4648	1,4644
Teneur en cinéol (%)	75	71,3	64,74	55,42

D'après le tableau 2, nous pouvons conclure que la densité de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus augmente quand son pourcentage en cinéol augmente et par contre, son indice de réfraction diminue.

Nos valeurs expérimentales se rapprochent de celles des huiles d'Espagne et de Colombie.

De part sa densité et son % en cinéol, l'huile essentielle est proche de celle d'Espagne, ce qui peut s'expliquer par la position géographique identique des deux pays et de son climat tiède, humide relativement doux.

Etude des caractéristiques physiques des étalons.

Nous présentons dans le tableau 3 les caractéristiques des étalons.

Tableau 3 : Résumé des différentes caractéristiques des étalons.

Etalon	Densité à 20 C (d_4^{20})	Indice de réfraction à 20 C	Masse moléculaire
α -Pinène	0,856	1,466	136,24
Camphène	0,870	1,470	136,24
Δ^3 -Carène	0,864	1,473	136,24
Phellandrène	0,838	1,471	136,24
β -Pinène	0,860	1,472	136,24
Limonène	0,842	1,473	136,24
p -Cymène	0,857	1,491	136,24
Aromadendrène	0,912	1,497	204,36
Caryophyllène	0,907	1,499	204,36
Linalol	0,862	1,462	154,24
Géraniol	0,880	1,477	154,24
α -Terpinéol	0,934	1,483	154,24
Camphre	0,990	1,460	152,24
Acétate de Géranyl	0,912	1,462	196,28
Eucalyptol	0,924	1,458	154,24

Nous pouvons dire que la densité décroît par rapport aux groupements fonctionnels de la manière suivante :

Cétone - Alcools terpéniques - Oxyde - Ester -

Alcools aliphatiques - Hydrocarbures

et que l'indice de réfraction décroît par rapport aux groupements fonctionnels de la façon suivante :

Hydrocarbures - Alcools - Ester - Cétone - Oxyde.

Dans notre tableau, nous pouvons classer les étalons :

Hydrocarbures :

Terpènes cycliques : $0,838 \leq d^{20} \leq 0,870$ $1,466 \leq n_D \leq 1,473$

Aromatiques : $d^{20} = 0,857$ $n_D = 1,491$

Sesquiterpènes : $0,907 \leq d^{20} \leq 0,912$ $1,497 \leq n_D \leq 1,499$

Alcools :

Aliphatiques : $0,862 \leq d^{20} \leq 0,880$ $1,462 \leq n_D \leq 1,477$

Terpènes : $d^{20} = 0,934$ $n_D = 1,483$

Cétone
Terpènes bicycliques : $d^{20} = 0,990$ $n_D = 1,460$

Ester
Terpène : $d^{20} = 0,912$ $n_D = 1,462$

Oxyde : $d^{20} = 0,924$ $n_D = 1,458$

Ainsi nous dirons en première approximation que notre huile est constituée d'alcools aliphatiques, ester, d'oxyde et cétone.

Donc les caractéristiques physiques nous ont permis de vérifier les qualités de notre huile et d'approximer les constituants de celle-ci.

D'après nos valeurs, nous constatons que la densité de notre huile se situe dans la tranche oxyde (Eucalyptol) et ester (acétate de Géranyl) et selon l'indice de réfraction, notre huile se situe dans la tranche alcools aliphatiques et ester.

III- ANALYSE PAR CPG

Rappelons que la chromatographie en phase gazeuse est une technique de séparation pour des substances volatiles basée sur les différences de coefficient de partage des produits à séparer entre la phase mobile gazeuse et la phase fixe solide disposée dans une colonne traversée par un courant gazeux.

Les huiles essentielles sont parmi les mélanges les plus compliqués auxquels la CPG ait été appliquée.

En effet, l'analyse en chromatographie en phase gazeuse est une analyse qui consiste à identifier les constituants majeurs ou mineurs des huiles essentielles.

Elles renferment de nombreux constituants qui diffèrent par leur volatilité, polarité et concentration. La CPG nous a permis de mettre en évidence la composition de l'huile essentielle.

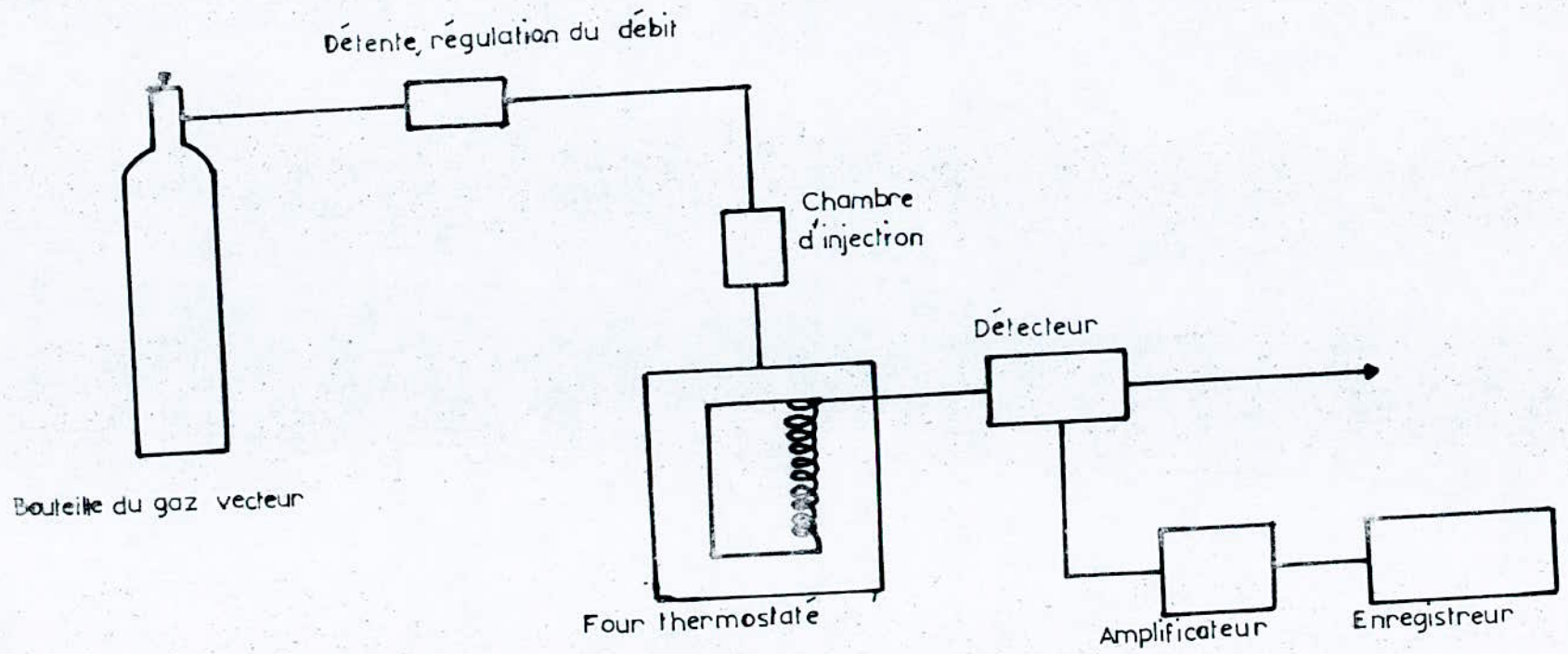
1- Appareillage

Chromatographie type PYE -UNICAM série 304
Enregistreur intégrateur électronique type PYE - UNICAM 4810
computing integrator Philips
Détecteur à ionisation de flamme FID
Colonne

2- Conditions d'utilisation

Colonne	Colonne classique en verre 1,5 m de long diamètre intérieur 4 mm
Phase stationnaire	OV 17 (50 % Méthyl, 50 % Phényl silicone)
Gaz vecteur	Azote
débit	30 ml/mn
Température injecteur	200°C
Détecteur	Ionisation de flamme
débit : hydrogène	33 ml/mn
air	330 ml/mn
Température détecteur	300°C
Température de la colonne	Programmation linéaire
début	80°C
fin	200°C
vitesse	4 C/mn
Volume injecté	0,5 l
Atténuation	32
Vitesse du papier	0,5 cm/mn
Sensibilité	10 ³

SCHEMA D'UN CHROMATOGRAPHE



3- Analyses qualitatives

L'objectif de la plupart des séparations chimiques est de fournir une analyse qualitative de l'échantillon.

Elle permet de déterminer le nombre et la nature des composants de l'échantillon.

L'identification des différents constituants de l'huile est basée sur la comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux mesurés à l'aide d'un mélange connu d'étalons témoins élués.

Analyse de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus.
 Les différents pics identifiés par comparaison des temps de rétention sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Identification des constituants de l'huile essentielle sur colonne OV17.

Constituants	t_R (mn) des étalons	% dans l'huile
α -Pinène	2,41	16,622
Camphène	2,72	---
Carène	3,14	----
Phellandrène	3,41	0,503
β -Pinène	3,77	1,301
Limonène	4,49	-
Eucalyptol	4,77	61,738
ρ -Cymène	5,13	----
Linalol	6,60	0,085
Camphre	8,65	3,011
α -Terpinéol	10,25	1,709
Géranol	11,88	0,547
Aromadendrène	15,56	1,498
Caryophyllène	16,07	3,889
Acétate de Géranyl	17,13	0,767
Globulol	21,10	0,551

Nous avons pu identifier 12 constituants de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus. Nous pouvons remarquer que le constituant majeur est le cinéol et viennent ensuite: -Pinène

Caryophyllène

Camphre

Ainsi, l'analyse par CPG complète l'examen physique qui reste assez imprécise dans le domaine de l'identification des constituants d'une huile.

Le pourcentage du caryophyllène est du au fait suivant: les fruits contiennent des sesquiterpènes.

Analyse comparative des divers constituants de différents pays
Les différents constituants existants dans l'huile sont donnés dans le tableau 5.

Les croix (+) indiquant que les constituants sont décelés mais ne précisant pas les pourcentages.

Nous constatons que notre huile se rapproche plus de celles du Maroc et d'Espagne de par le grand nombre de constituants en commun. Ce qui confirme que la qualité d'une huile dépend de son lieu d'origine, de l'humidité de l'année et de la nature du sol;

et
Aussi bien que de la partie de la plante utilisée, du mode d'extraction.

Tableau 5

CONSTITUANTS	huile d' % V ESPAGNE (43)	huile de % MAROC (44)	huile d' AMERIQUE (46)	huile d' INDE (45)	VALEURS EXPERIMENTALES
Valéraldéhyde	0,4	-	-	-	
α -Pinène	14,4	12,13	-	-	1,622
Camphène	0,4	0,12	-	+	-
β -Pinène	0,3	0,11	+	-	2,304
ρ -Menthane	-	-	-	+	-
Δ^1 -Carène	-	0,08	-	-	-
sa Pinène	-	-	-	+	-
Myrcène	0,4	-	-	+	-
α -Phellandrène	0,3	-	+	-	0,503
β -Terpinène	-	-	-	+	-
γ -Terpinène	-	0,70	-	-	-
α -Terpinène	-	-	+	-	-
Limonène	2,7	2,16	-	-	-
1.8 Cinéol	71,3	59,66	+	+	64,738
ρ -Cymène	1,8	1,59	-	-	-
Fenchone	-	-	-	+	-
Terpinolène	0,1	-	-	-	-
α -Pinène epoxyde	0,3	-	-	-	-
α -Thujone	-	-	-	+	-
β -Thujone	-	-	-	+	-
Linalol	0,1	0,08	+	-	0,085
Camphre	-	-	-	-	3,001
Piperitone	-	-	+	-	-
α -Gurgurène	-	0,41	+	-	-
Bornéol	-	-	+	-	-
Terpinène 1.014	-	0,20	+	+	-
Piniocarvone	1,0	-	-	-	-
Trans-Piniocarvone	2,6	-	-	-	-
α -Carvone	-	0,21	-	+	-
α -Terpinéol	0,3	1,03	-	-	1,709
Cumaldéhyde	0,1	-	-	-	-
Myrténol	0,7	-	-	-	-
α -Terpénylacétone	0,7	0,5	-	-	-
Citral	-	-	-	+	-
Cis-carvéol	0,3	-	-	-	-
Géranol	-	-	-	-	0,542
Aromadendrène	1,1	6,39	+	-	6,882
γ -Cadinène	-	-	-	+	-
Acétate de Géranyl	-	0,11	-	-	0,767
Globulol	-	6,34	+	-	0,551

IV- FRACTIONNEMENT DE L'HUILE ESSENTIELLE D'EUCALYPTUS GLOBULUS

1- Appareillage

Pour la séparation des divers constituants de notre huile, nous utiliserons une colonne ouverte aux deux extrémités, de type simple : un tube en verre cylindrique vertical, dont la longueur est de 96 cm, et diamètre intérieur 2 cm (en essayant d'avoir une colonne aussi longue et fine que possible pour obtenir une meilleure séparation).

Le système d'obturation au bas de la colonne est en verre fritté de porosité n°3.

Le système sert à retenir la phase stationnaire. Un étranglement prévu dans le bas du tube permet de récupérer l'effluent. Une burette contenant le solvant est placée au dessus de la colonne, cette burette permet de contrôler l'admission du solvant dans la colonne.

2- Méthodes

Préparation de la phase stationnaire

Toutes les préparations ont été réalisées en respectant la proportion d'une partie du mélange à analyser pour 100 parties de silicagel Merck - 60 mesh.

Le gel de silice imprégné de nitrate d'argent (AgNO_3) à 10 % est préparé comme suit : on agite à l'obscurité 100 g de silicagel Merck 60 à 100 ml de solution aqueuse d' AgNO_3 à 10 % (et adjonction de la quantité suffisante d'eau pour obtenir un gel très fluide).

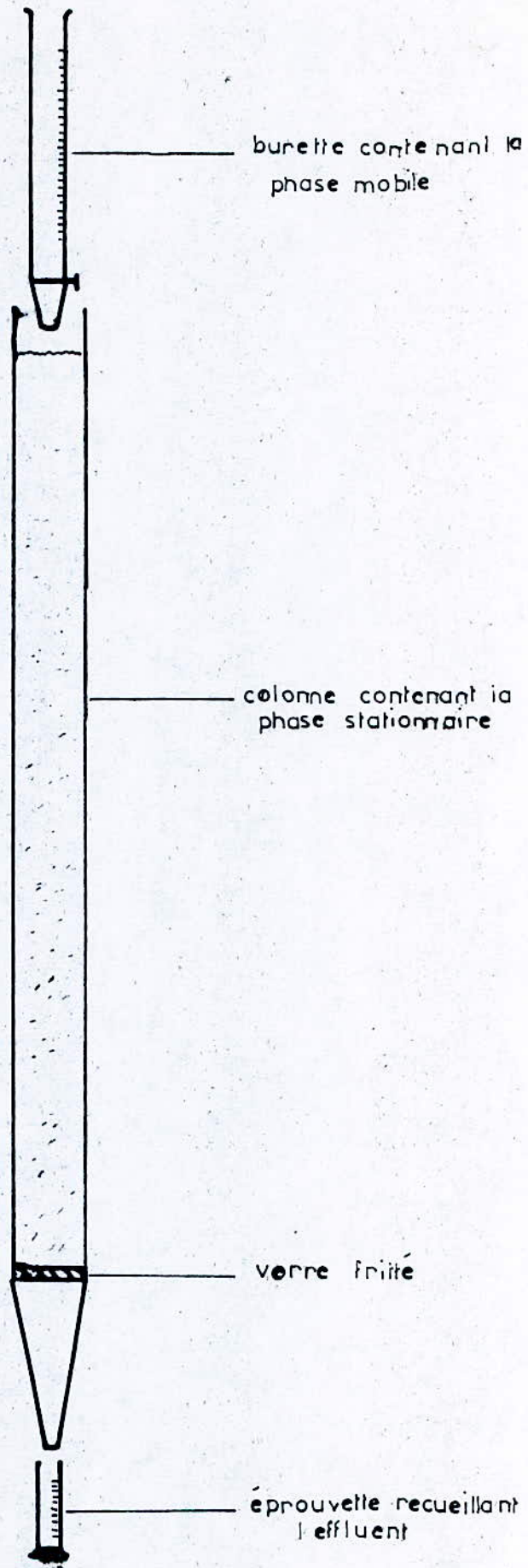
On élimine l'eau à l'aide d'un évaporateur rotatif en travaillant dans l'obscurité (46).

Préparation de la colonne

Une préparation correcte de la colonne est essentielle pour une bonne résolution des mélanges.

Tout d'abord, le tube doit être recouvert de papier aluminium pour éviter que le nitrate d'argent ne perde ses propriétés car il noircit à la lumière.

SHEMA DE LA COLONNE
CHROMATOGRAPHIE



Le remplissage consiste à introduire la phase stationnaire, poudre sèche, dans le tube. Nous procédons par petites fractions. Il convient de bien faire le tassement dans un soucis d'obtenir une meilleure séparation.

Introduction de l'échantillon

L'introduction du soluté se fait en pipetant un certain volume de la solution à séparer. Nous introduisons, au sommet de la colonne, la solution à chromatographier lorsque l'épaisseur du solvant au dessus du sommet de la colonne devient négligeable.

Lorsque le soluté disparaît, nous ajoutons le solvant en vérifiant tout au long de l'expérience que le sommet de la colonne est recouvert en permanence d'une couche de solvant de hauteur constante.

Par gravité de la phase mobile (éluant), les divers constituants du mélange migrent dans la colonne à des vitesses différentes selon leur nature, ce qui conduit à leur séparation basée sur des étapes d'adsorption et de désorption successives.

Puis nous recueillons différentes fractions de 10 ml du mélange solvant, constituants lorsque le débit devient constant. Pour cela, nous mesurons le temps mis pour recueillir 10 ml de mélange.

Expériences

Première expérience =

Nous avons choisi un mode d'élution isocratique c'est-à-dire que la phase mobile reste fixe durant tout le fractionnement.

Nous avons utilisé pour cela :

- un solvant apolaire, l'hexane
- une phase stationnaire polaire, le gel de silice imprégné de AgNO_3 à 10 %
- et un volume d'échantillon de 5 ml.

Deuxième expérience =

Nous avons adopté un mode d'élution isocratique mais différent de la précédente expérience de part le solvant utilisé.

En effet, nous utilisons un mélange de solvants à pourcentage constant de 50 % :

- solvant apolaire, hexane
- solvant polaire, acétate d'éthyle.

Troisième expérience =

Nous avons choisi une méthode plus perfectionnée : le gradient d'élution qui permet d'éluer en une seule opération les divers constituants.

Ce gradient est réalisé en mélangeant graduellement deux solvants de polarité différentes. La concentration du solvant polaire augmentant au cours de l'analyse.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- solvant apolaire l'hexane
- solvant polaire, acétate d'éthyle
- phase stationnaire : gel de silice imprégné de AgNO_3 à 10 %
- volume d'échantillon : 3 ml.

Après avoir lavé la colonne avec de l'hexane et introduit l'échantillon, nous commençons l'élution par l'hexane pur, auquel vient s'ajouter un pourcentage croissant d'acétate d'éthyle.

Le volume total de mélange, hexane acétate d'éthyle pour un pourcentage donné est fixé à 50 ml.

Avant l'introduction de chaque mélange, nous devons vérifier que le mélange précédent ne recouvre plus le sommet de la phase stationnaire.

Le gradient réalisé est le suivant :

% d'hexane	% d'acétate d'éthyle
100	0
95	5
90	10
85	15
30	70
0	100

L'analyse des effluents par chromatographie en phase gazeuse n'est pas concluante

Les chromatogrammes ne présentent aucun constituant que nous puissions identifier, ceci est dû à la teneur élevée du solvant.

IV-CONCLUSION

Cette étude nous a permis de déterminer les divers constituants de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus et de les séparer en chromatographie en phase gazeuse.

La détermination des caractéristiques physiques a évalué les groupements fonctionnels majeurs qui, par suite ont été confirmés par une analyse en CPG.

Ainsi, nous avons pu constater que la teneur en eucalyptol croît avec la densité et décroît avec l'indice de réfraction.

Le fractionnement sur gel de silice imprégné de AgNO_3 a été utilisé suivant deux modes de fractionnement qui sont:

-Le mode isocratique

-Le mode avec gradient d'élution.

De part la complexité de l'huile, l'expérience menée avec gradient d'élution semble être la plus appropriée pour la séparation des constituants des huiles essentielles.

L'étude analytique par CPG des fractions devra être affirmée ultérieurement, ainsi les fractions subiront une évaporation du solvant de manière à augmenter la sensibilité.

B I B L I O G R A P H I E

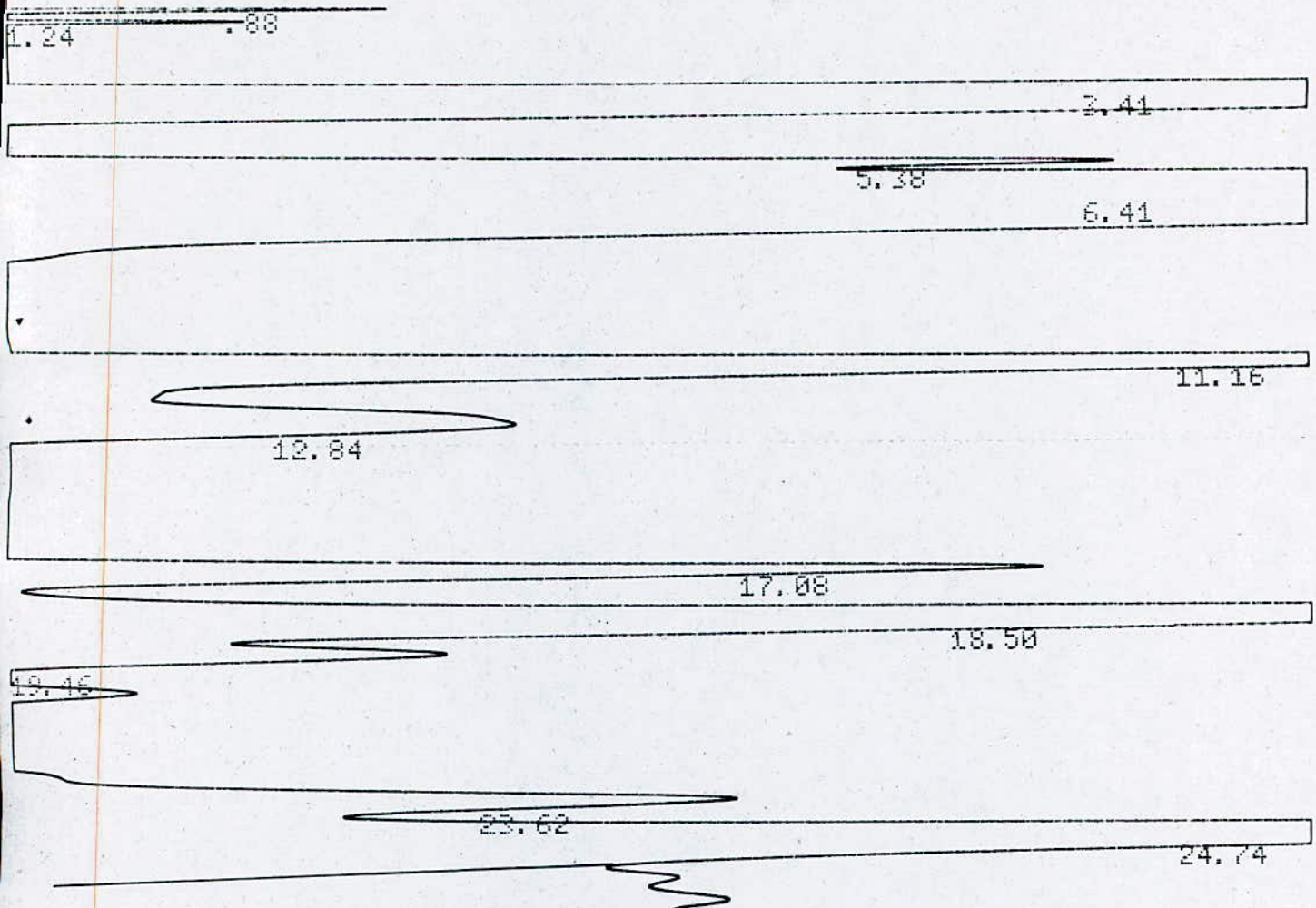
- 1 - ALLINGER - CAVA - JOHNSON.
Chimie organique, tome 3
Ed. Mac Graw Hill, 1983.
- 2 - G.DJEGHERI.
Contribution à l'étude des huiles essentielles du Géranium
et du Cyprès.
Thèse d'ingénieur agronome, INA, Alger, 1975.
- 3- NORME AFNOR
Huile essentielle d'Eucalyptus Globulus
N.F.T 75-404, Juin 1987.
- 4 - M.ROSSET.
Manuel pratique de la chromatographie en phase liquide.
Ed. Masson et Cie, 1982.
- 5 - E.LEDERER.
Chromatographie en chimie organique et biologique, tome 1.
Ed. Masson et Cie, 1959.
- 6 - E.GILDEMEISTER - FR.HOFFMANN.
Les huiles essentielles, tome 1
Ed. Schimmel et Cie, 1912.
- 7 - LAROUSSE, Encyclopédie, Tome 4, 1961.
- 8 - P.DURAFFOURD.
Les huiles essentielles et la santé.
Ed. La Maison du Bien-être, 1987.
- 9 - H.TATU.
Industrie moderne des parfums.
Ed. J.B. Baillièrre et Fils, 1932.
- 10 - G.J.DICKES - P.V.NICHOLAS.
Gas chromatography in food analysis.
Ed. Butter Worth, Ltd, 1976.
- 11 - M.P.OTTO.
L'industrie des parfums.
Ed. Dunod, 1924.
- 12 - J.P.DURVELLE.
Fabrication des essences et des parfums.
Ed. Librairie Centrale des Sciences, 1930.

- 13 - T.BASSIRI
Introduction à l'étude des parfums d'origine naturelle et de synthèse.
Ed. Masson et Cie, 1960.
- 14 - A.KJRRMANN
Chimie organique.
Ed. O.P.U, 1984.
- 15 - J.D.ROBERTS - M.C.CASERIO.
Chimie organique moderne
Ed. Inter Editions, 1977.
- 16 - P.ARNAUD
Cours de chimie organique
Ed. Gauthier Villars 1985.
- 17 - R.DFLANGER
Essences naturelles et parfums
Ed. Armand Colin, 1930.
- 18 - M.VAN - WINKLE
Distillation
Ed. Mac Graw Hill, 1967.
- 19 - J.GROCHOWSKI
Distillation et rectification
Polycopié E.N.P Alger, 1985-1986.
- 20 - E.GILDEMEISTER et FR.HOFFMANN
Les hilles essentielles, tome 3
Ed. J.B Baillière et fils, 1912.
- 21 - J.PERROT
Matières premières usuelles du règne végétal
Ed. Masson et Cie, 1943-1944.
- 23 - A.SEIGUE
La forêt circumméditerranéenne et ses problèmes
Ed. Maisonneur et Larose, 1985
- 22 - Y.MASADA
Analysis of essentials oils by gas chromatography and mass spectrometry
Ed. John Wiley, 1976.
- 24 - N.LETREVCH - BELAROUCT
Les reboisements en Algérie et leurs perspectives d'avenir
Thèse de Docteur es sciences agronomiques, Gembloux, Belgique
1981.
- 25 - TECHNIQUES DE L'INGENIEUR - Constantes N. K2 (K330)
Ed. Imprimerie strasbourggeoise, 1985.

- 39 - NORME AFNOR
Huile essentielle, détermination de la densité relative à 20 C.
NFT 75 - 111 Juin 1982.
- 40 - NORME AFNOR
Huile essentielle, détermination de l'indice de réfraction.
NFT 75 - 112, Août 1982.
- 41 - J. GARNERO - P. BUIC
Contribution à l'étude de la composition chimique de l'huile
essentielle de rameaux de Cyprès de Grasse.
Ed. Rivista Italiana , E.P.P.D.S, 1978.
- 42- E. GUENTHER
The essential oils, tome 3
Ed. R. KREIGER, 1980.
- 43-D. GARCIA-MARTIN and M.C. GARCIA-VALLEJO
Comparative Study of Spanish Essential oil of Eucalyptus Globulus
and some others Essences that could be used for the same
Industrial Purposes
Madrid
- 44- R. CHENNOUFI
Contribution à la connaissance de l'huile essentielle
d'Eucalyptus Globulus cultivé au Maroc.
Thèse de magister, Décembre 1975.
- 45-R.K. BASLAS
Essential oil of fruits of EUCALYPTUS GLOBULUS raised in Nainital
India
- 46-H. NISHIMURA and M. CALVIN
Essential oil of Eucalyptus Globulus in California
Ed. Agriculture Food Chemical ,vol. 27 n. 2 ,1979.

- 26 - E.CHARABOT
Industrie des parfums naturels
Ed. Octave Doin et fils 1912.
- 27 - D.R.BROWNING
Chromatographie
Ed. Masson et Cie, 1971.
- 28 - J.M.BOBBITT
Introduction à la chromatographie
Ed. Gauthier-Villars, 1972.
- 29 - J.J.KIRKLAND
Chromatographie en phase liquide
Ed. Gauthier-Villars, 1972.
- 30 - R.YOST
Pratique de la chromatographie liquide
Ed. Technique et documentation, 1980.
- 31 - A.BERTHILLIER
La chromatographie et ses applications
Ed. Dunod, 1972.
- 32 - P.WUITHIER
Raffinage et génie chimique, tome 1
Ed. Technip, 1972.
- 33 - TECHNIQUES DE L'INGENIEUR
Généralités n. All
Ed. Imprimerie strashourgeoise, 1985.
- 34 - O.MIKES
Chromatographic methods
Ed. Van Nostrand Reinhold Company, 1970
- 35 - A.Y.BADJAH - HADJ - AHMED
Contribution à l'étude des terpènes dans les huiles essentielles
Thèse de Doctorat es-Sciences, U.S.T.H.B, 1986
- 36 - E.HETTMANN
Chromatography
Ed. Van Nostrand Reinhold Company, 1967.
- 37 - O.BENHABILES
Arômes alimentaires. Contributions à l'étude analytique des
huiles essentielles des principaux citrus.
Projet de fin d'études, E.N.P Alger, 1988.
- 38 - N.YAICI
Extraction de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus
Projet de fin d'études, E.N.P, Alger, 1987.

CHROMATOGRAMMES



14/03/88 14:23:06 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 17 INDEX 17

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.251	0.88	11201	01
2	0.197	1.24	8803	01
3	17.09	3.41	762361	01
4	1.004	5.38	44765	02
5	69.539	6.41	3102016	03
6	2.436	11.16	108672	01
7	0.898	12.84	40047	01
8	1.11	17.08	49529	01
9	3.502	18.5	156222	02
10	0.471	19.46	20993	03
11	0.554	23.62	24718	02
12	2.948	24.74	131509	03

TOTAL 100. 4460836

006

02 = 58

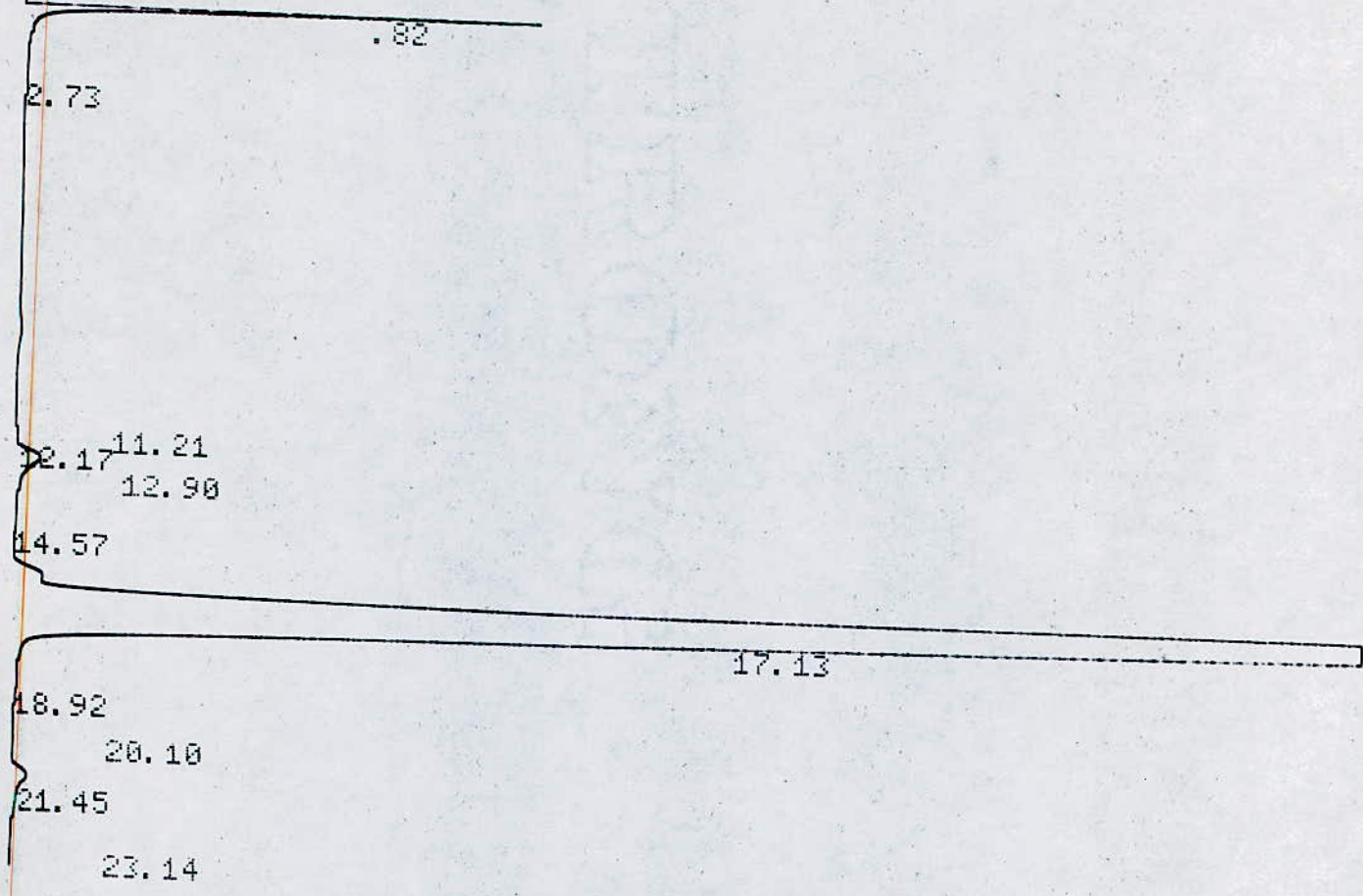
2.69	2.69
3.69	3.69
4.37	4.37
5.30	5.30
7.83	7.83
8.49	8.49
9.62	9.62
11.32	11.32
13.35	13.35
15.43	15.43
16.77	16.77
17.69	17.69
18.74	18.74
20.36	20.36
21.83	21.83
22.93	22.93

05/06/95 18:39:06 CH= "A" PS= 1.

FILE	METHOD	0.	RUN	8	INDEX	1
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC		
1	0.002	0.36	158	02		
2	0.001	0.45	117	02		
3	1.363	0.56	117407	02		
4	0.392	0.92	33737	03		
5	16.622	2.69	1431378	02		
6	0.503	3.69	43343	02		
7	1.301	4.37	112066	02		
8	64.738	5.3	5574641	08		
9	0.085	7.83	7323	06		
10	0.009	8.49	807	06		
11	3.011	9.62	259262	06		
12	1.709	11.32	147129	07		
13	0.547	13.35	47085	02		
14	1.498	15.43	129000	02		
15	3.889	16.77	334915	02		
16	0.767	17.69	66013	02		
17	0.381	18.74	32814	02		
18	0.022	20.36	1877	02		
19	0.551	21.83	47464	02		
20	2.608	22.93	324589	03		

0611125

CHANNEL A INJECT 03/02/88 12:35:36



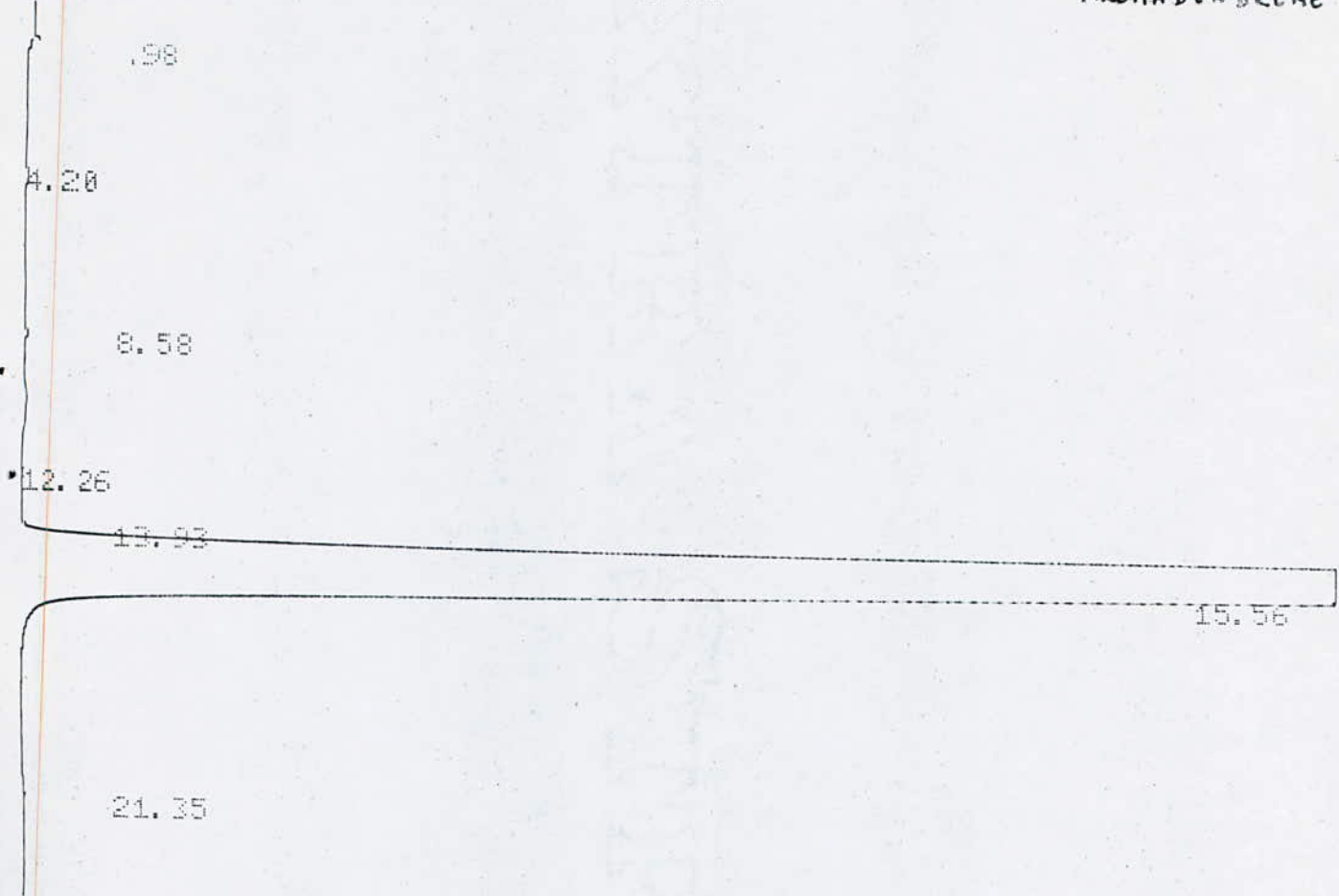
03/02/88 12:35:36 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 7 INDEX 7

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	2.44	0.82	109118	01
2	0.002	2.73	105	01
3	0.032	11.21	1419	02
4	0.035	12.17	1550	02
5	1.024	12.9	45814	02
6	0.08	14.57	3587	02
7	95.605	17.13	4275359	08
8	0.085	18.92	3816	05
9	0.021	20.1	923	05
10	0.66	21.45	29512	06
11	0.015	23.14	690	07

TOTAL 100. 4471893

171

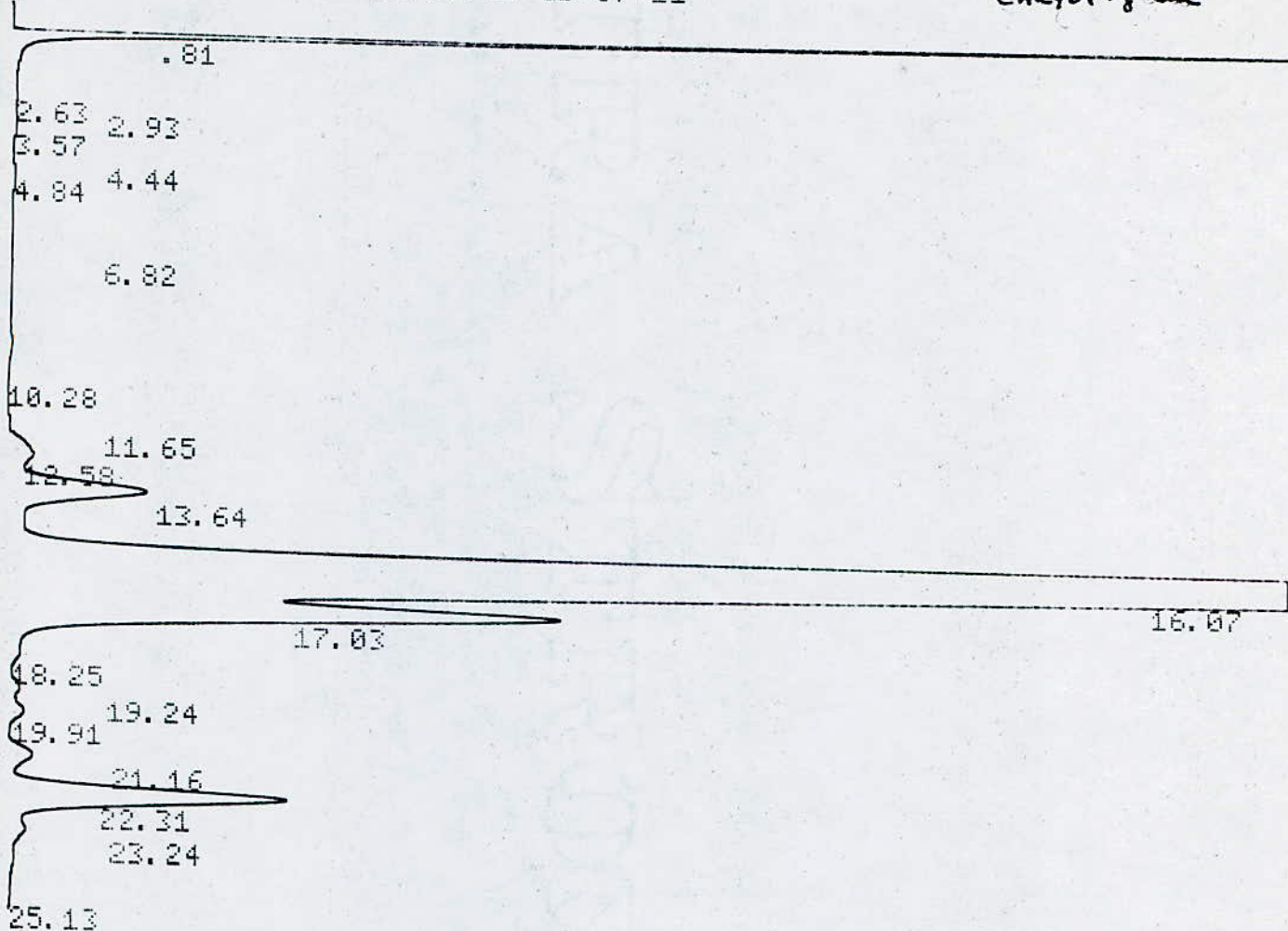


03/02/88 09:53:52 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 2 INDEX 2

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.024	0.98	2483	01
2	0.065	4.2	6652	01
3	0.019	8.58	1942	01
4	0.019	12.26	1899	02
5	0.015	13.93	1553	02
6	99.816	15.56	10208368	03
7	0.042	21.35	4309	01

TOTAL 100. 10227206



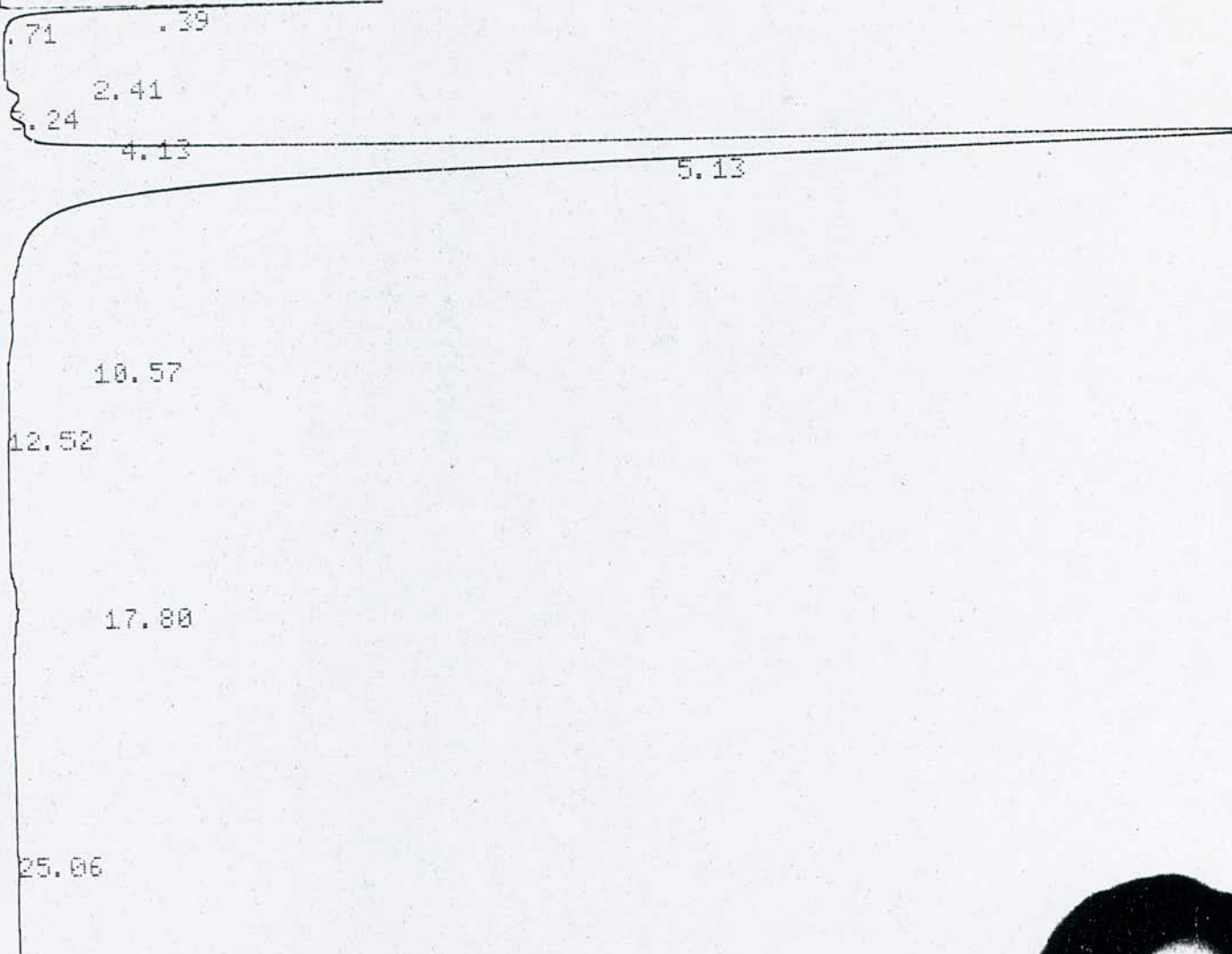
03/02/88 13:07:11 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 8 INDEX 8

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	3.578	0.81	364943	02
2	0.04	2.63	4111	02
3	0.015	2.93	1553	02
4	0.019	3.57	1922	02
5	0.013	4.44	1312	02
6	0.019	4.84	1900	03
7	0.005	6.82	483	01
8	0.006	10.28	588	02
9	0.017	11.65	1739	02
10	0.519	12.58	52941	02
11	2.47	13.64	251983	02
12	79.36	16.07	8095494	02
13	8.414	17.03	858295	02
14	0.143	18.25	14637	02
15	0.176	19.24	18003	02
16	0.226	19.91	23015	02
17	0.398	21.16	40603	02
18	4.225	22.31	430991	02
19	0.344	23.24	35099	02
20	0.013	25.13	1302	03

TOTAL 100. 10200914

p-cymene



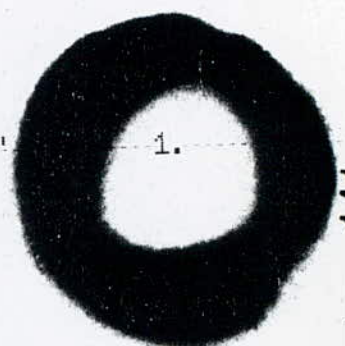
17/01/88 10:40:28

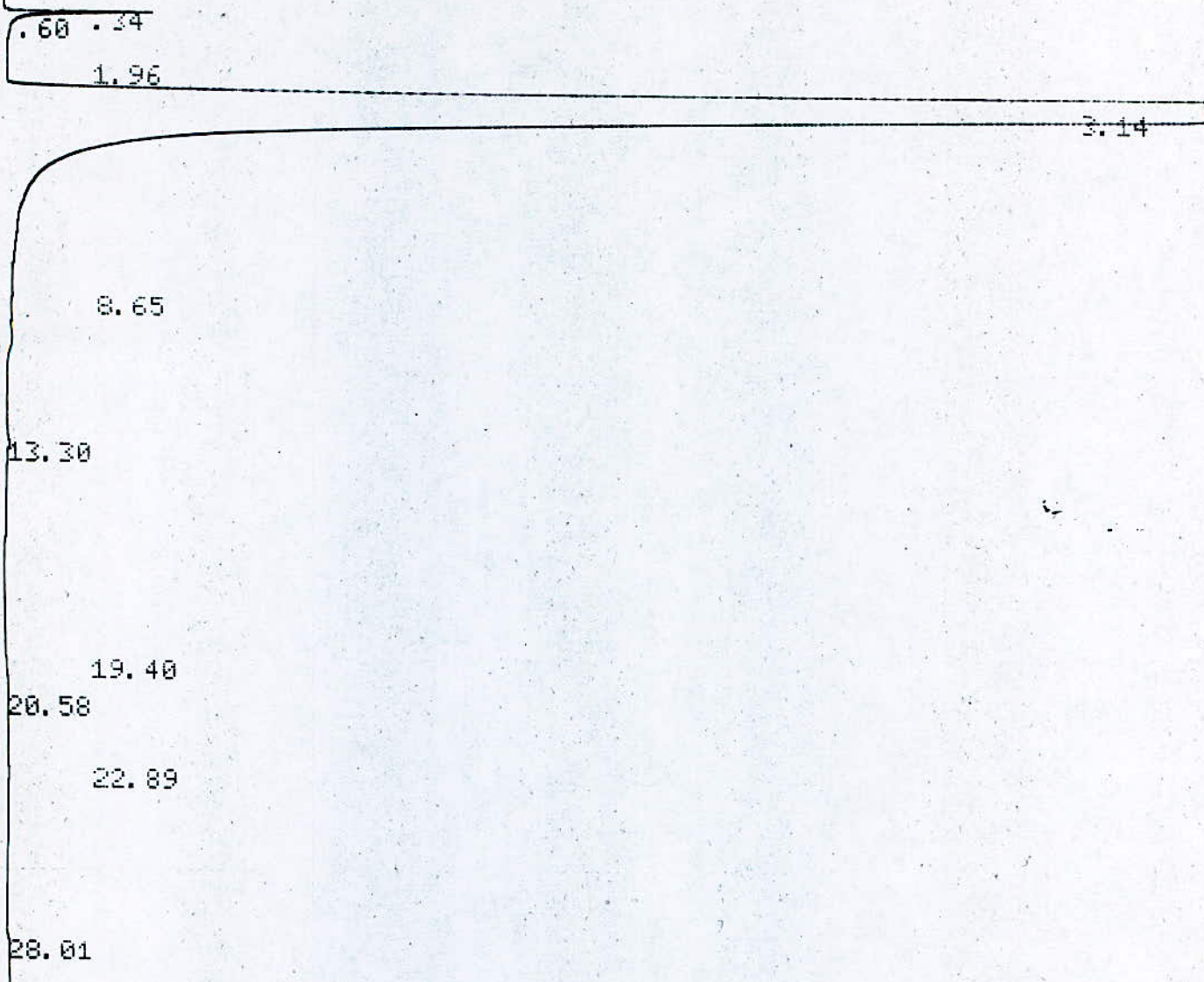
CH= "A"

1.

FILE	METHOD	RUN	INDEX
1.	0.	2	2

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.015	0.39	445	02
2	3.184	0.71	97356	02
3	0.099	2.41	3022	02
4	1.035	3.24	31635	02
5	1.004	4.13	30691	02
6	93.442	5.13	2856830	08
7	0.032	10.57	968	05
8	0.06	12.52	1832	05
9	1.082	17.8	33084	01
10	0.048	25.06	1461	01
TOTAL	100.		3057324	



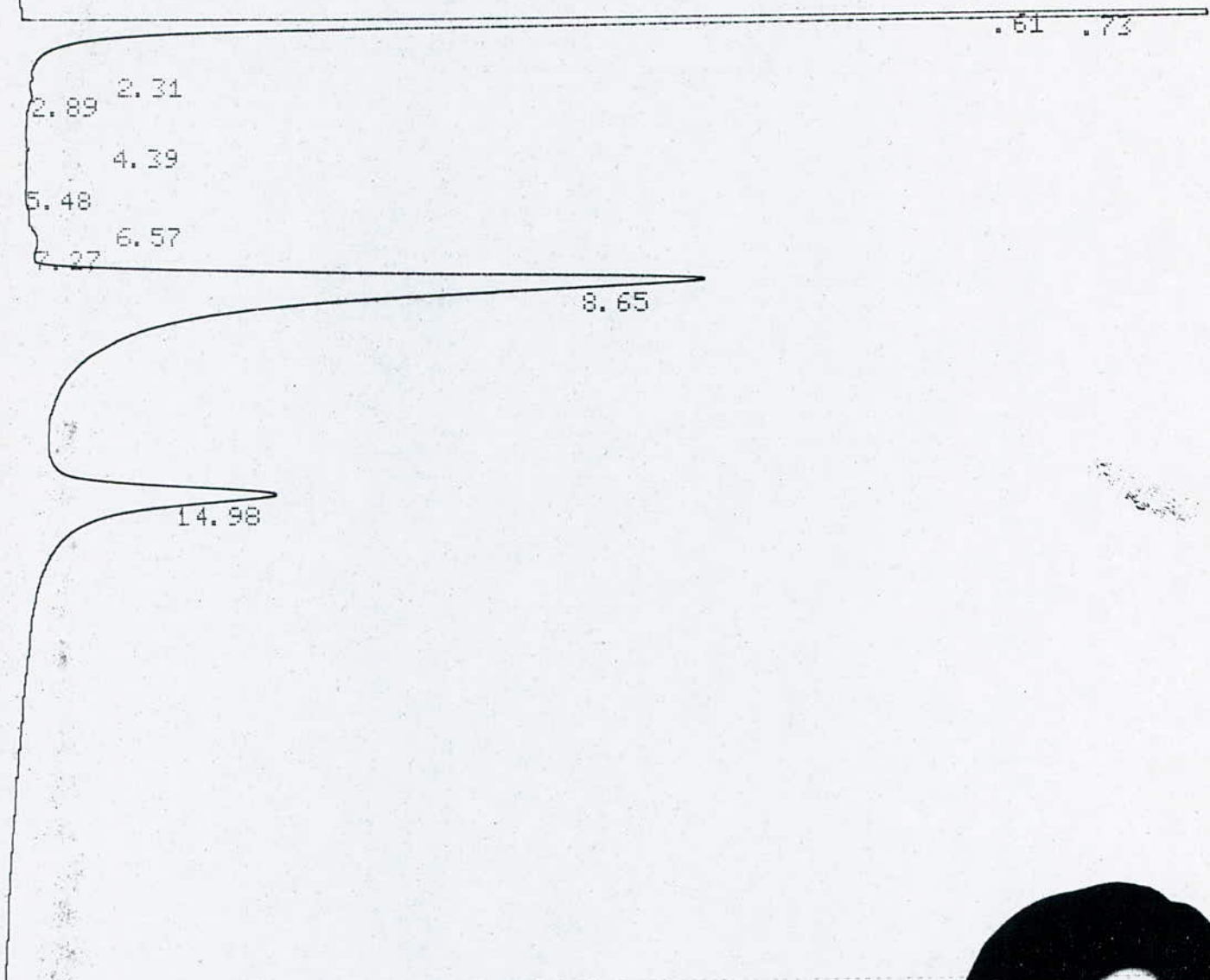


01/02/88 14:30:55 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 12 INDEX 12

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.004	0.34	260	02
2	0.644	0.6	46629	02
3	0.049	1.96	3538	02
4	98.993	3.14	7162938	08
5	0.015	8.65	1101	05
6	0.16	13.3	11544	05
7	0.017	19.4	1194	02
8	0.084	20.58	6077	03
9	0.033	22.89	2390	01
10	0.001	28.01	101	03

TOTAL 100. 7235772



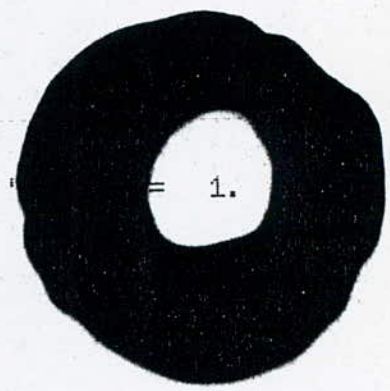
15/01/88 13:37:54

CH= 1.

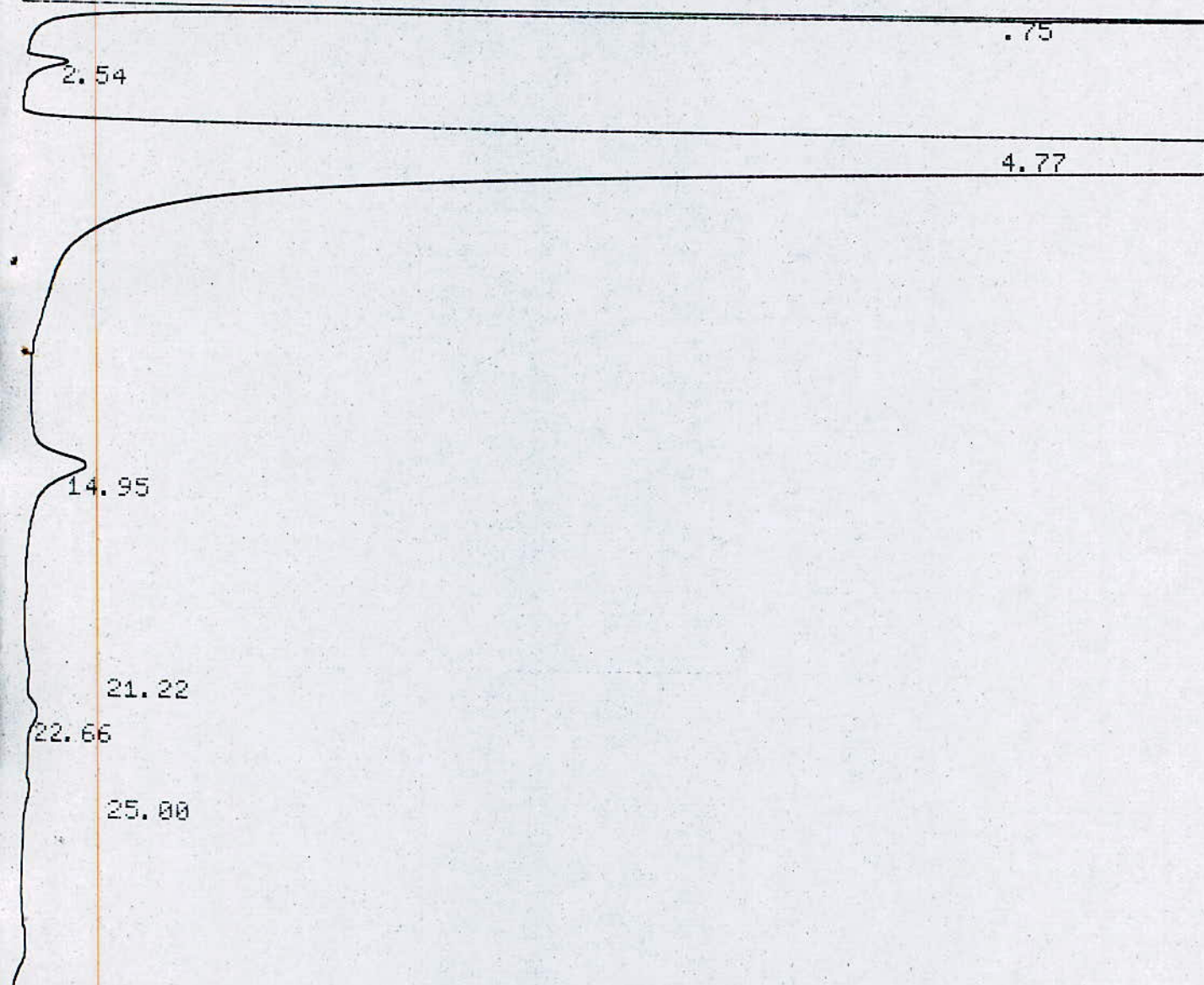
FILE 1. METHOD 0. RUN 6 INDEX 6

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.016	0.61	1069	02
2	40.236	0.73 X	2700790	08
3	0.	2.31	3	05
4	0.068	2.89	4558	05
5	0.045	4.39	3044	01
6	0.026	5.48	1755	02
7	0.112	6.57	7487	02
8	0.521	7.27	34990	02
9	48.629	8.65 X	3264120	08
10	10.347	14.98	694500	05

TOTAL 100. 6712316



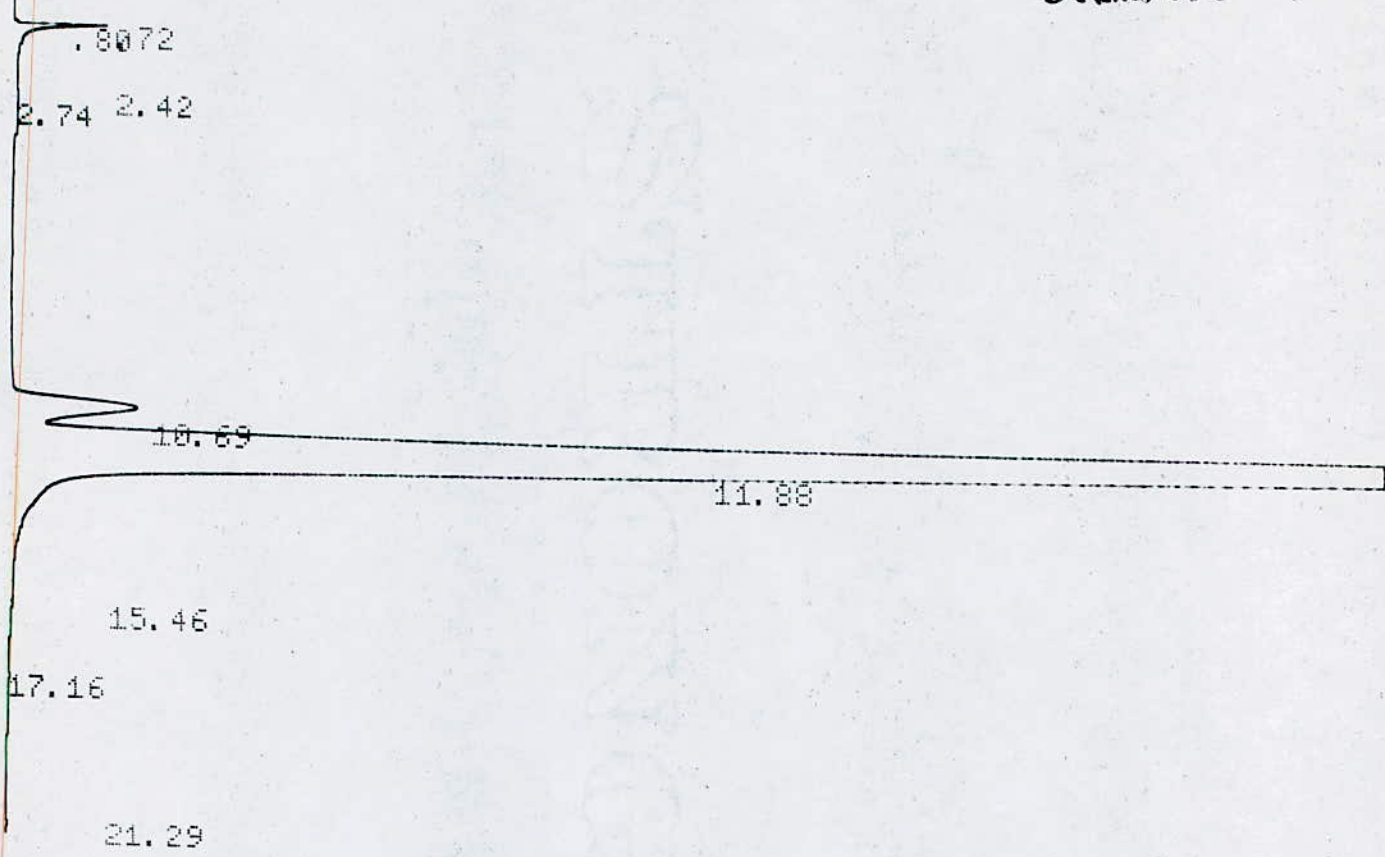
Eucalyptol



01/02/88 13:51:46 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 11 INDEX 11

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	6.56	0.75	308991	01
2	0.261	2.54	12301	01
3	91.872	4.77	4327100	01
4	1.065	14.95	50148	01
5	0.05	21.22	2350	02
6	0.144	22.66	6802	03
7	0.047	25.	2206	01
TOTAL	100.		4709898	



03/02/88 12:07:04

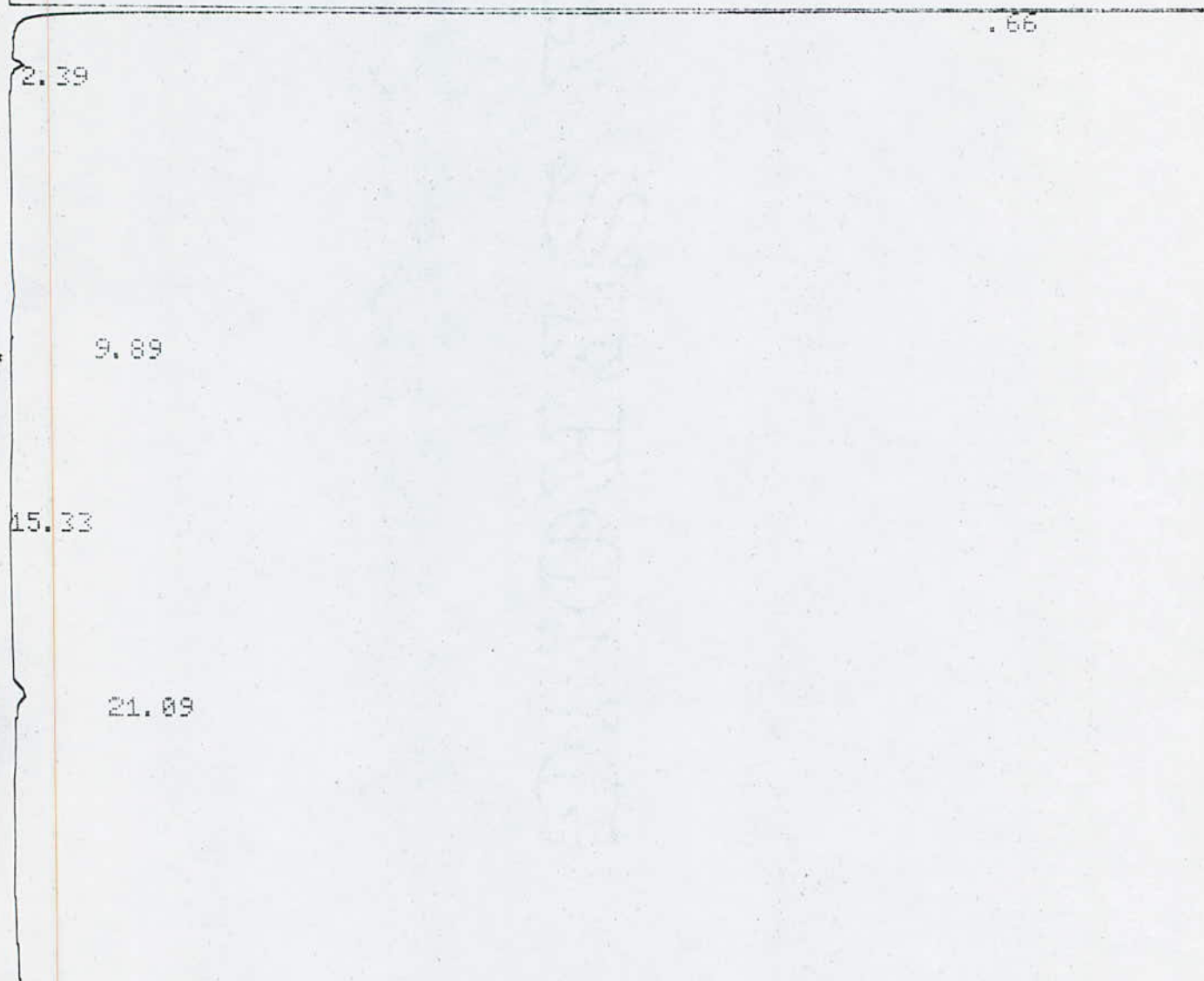
CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 6 INDEX 6

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.005	0.72	268	02
2	0.579	0.8	29963	03
3	0.009	2.42	483	02
4	0.014	2.74	714	03
5	3.035	10.69	157032	02
6	96.252	11.88	4980774	08
7	0.074	15.46	3822	05
8	0.01	17.16	530	05
9	0.022	21.29	1120	01

TOTAL 100. 5174706

CHANNEL A INJECT 03/02/88 10:50:19

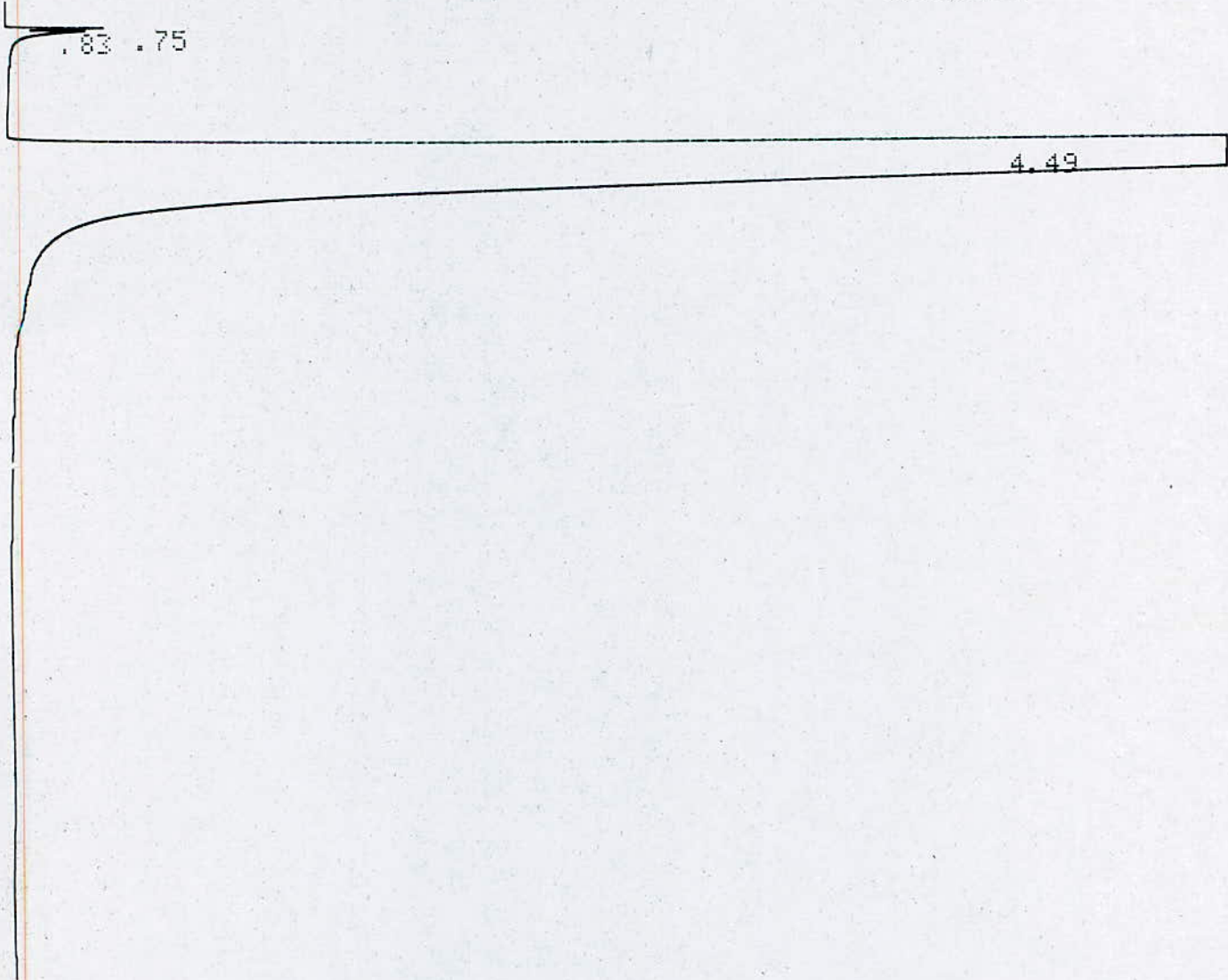


03/02/88 10:50:19 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 4 INDEX 4

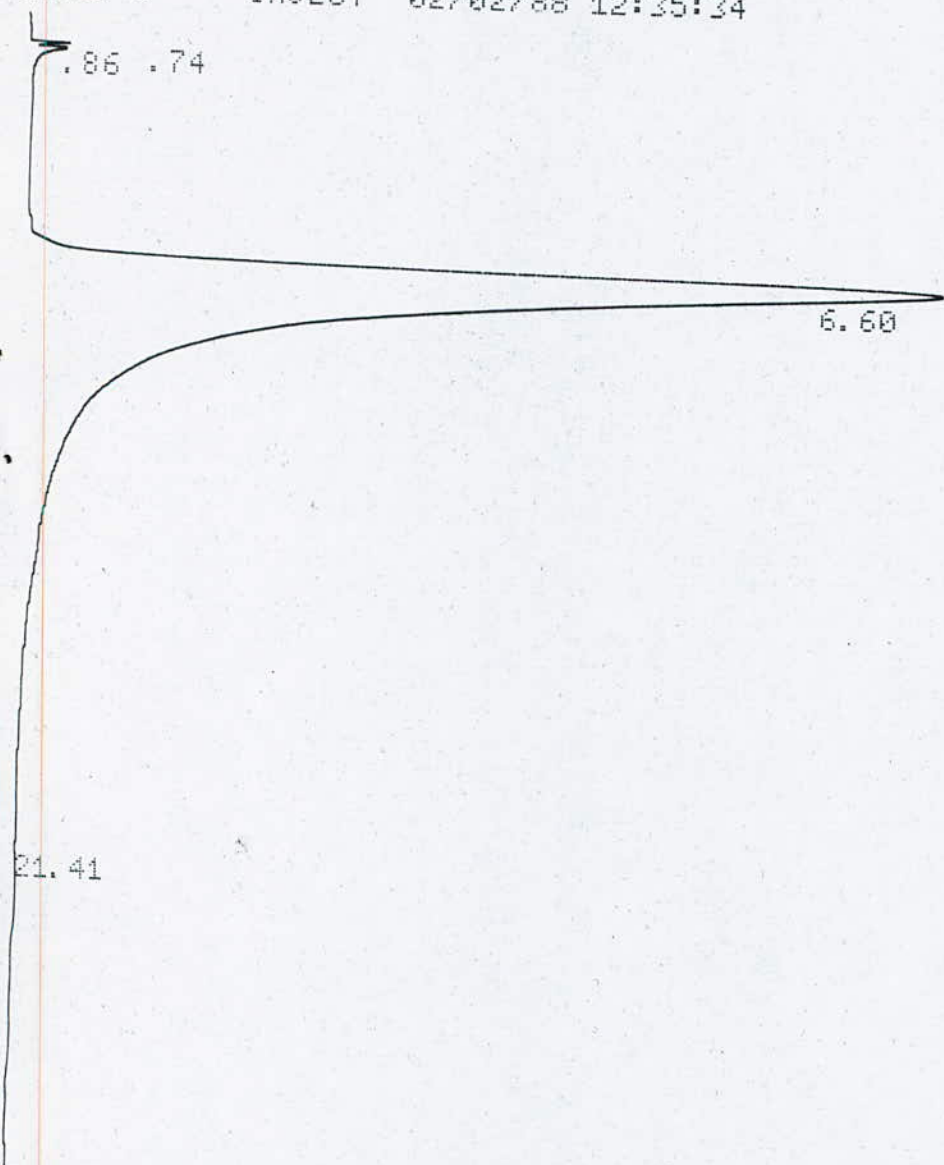
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	97.893	0.66	1631972	01
2	0.485	2.39	8090	01
3	0.126	9.89	2108	01
4	0.255	15.33	4244	01
5	1.241	21.09	20683	01
TOTAL	100.		1667097	

limonene



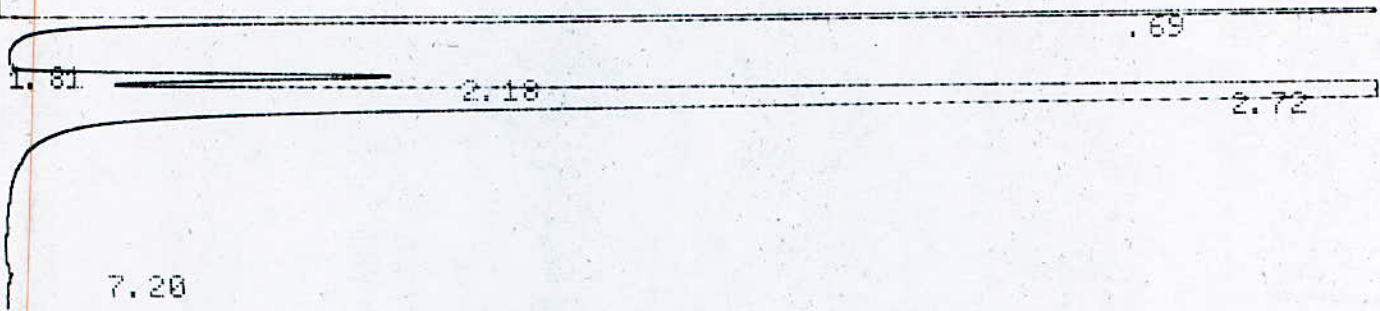
02/02/88 13:54:23 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	7	INDEX	7
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC			
1	0.182	0.75	16500	02			
2	0.395	0.83	35745	03			
3	99.423	4.49	8994539	01			
TOTAL	100.		9046784				



02/02/88 12:35:34 CH= "A" PS= 1.

K#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.17	0.74	6724	02
2	0.463	0.86	18277	03
3	99.347	6.6	3924832	08
4	0.02	21.41	780	05
AL	100.		3950613	



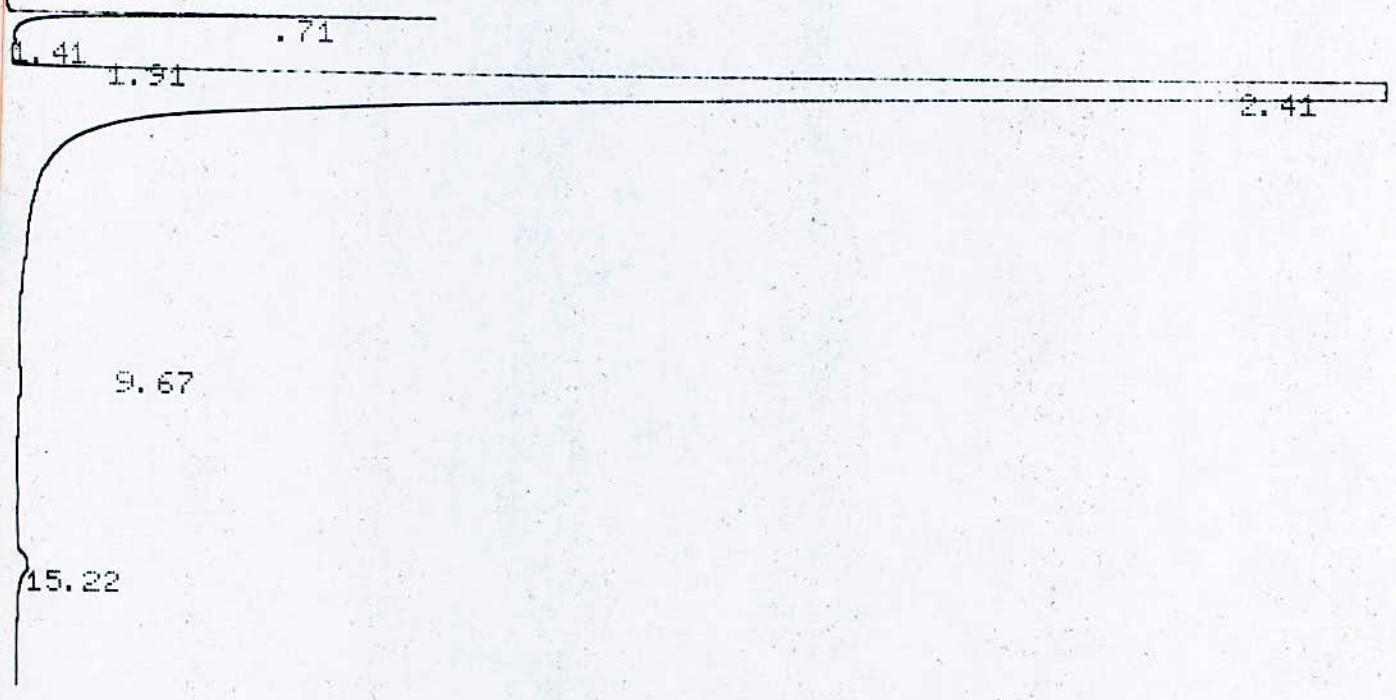
04/02/88 10:22:11 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 4 INDEX 4

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	21.499	0.69	1708553	08
2	0.002	1.81	192	05
3	2.751	2.18	218621	02
4	75.689	2.72	6015172	03
5	0.059	7.2	4663	01
TOTAL	100.		7947201	

α-pieter

CHANNEL A INJECT 03/02/88 10:25:53

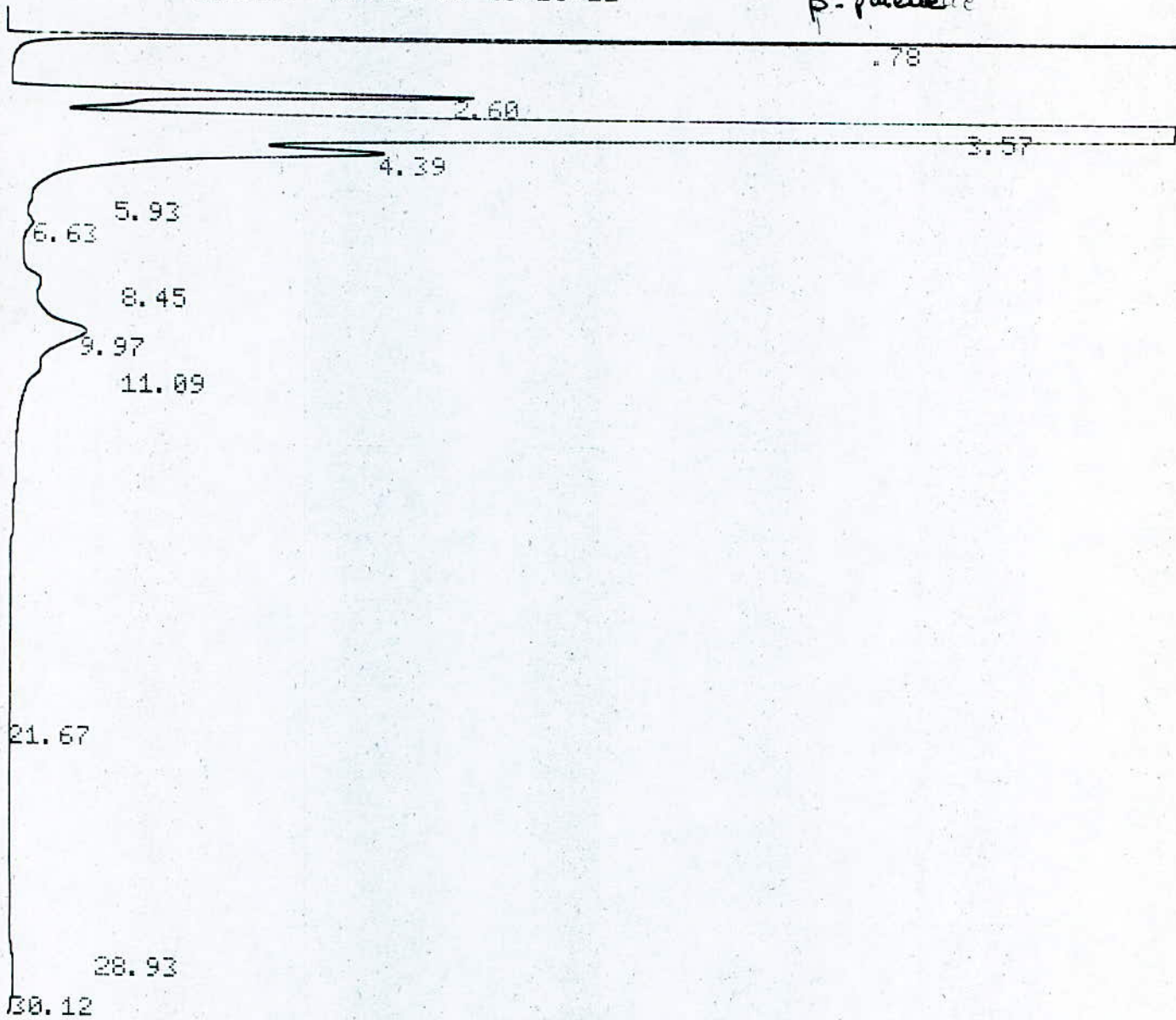


03/02/88 10:25:53 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 3 INDEX 3

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	1.214	0.71	81451	08
2	0.004	1.41	285	05
3	0.002	1.91	103	02
4	98.385	2.41	6598350	03
5	0.041	9.67	2783	01
6	0.354	15.22	23714	01
TOTAL	100.		6706686	

β-pinene



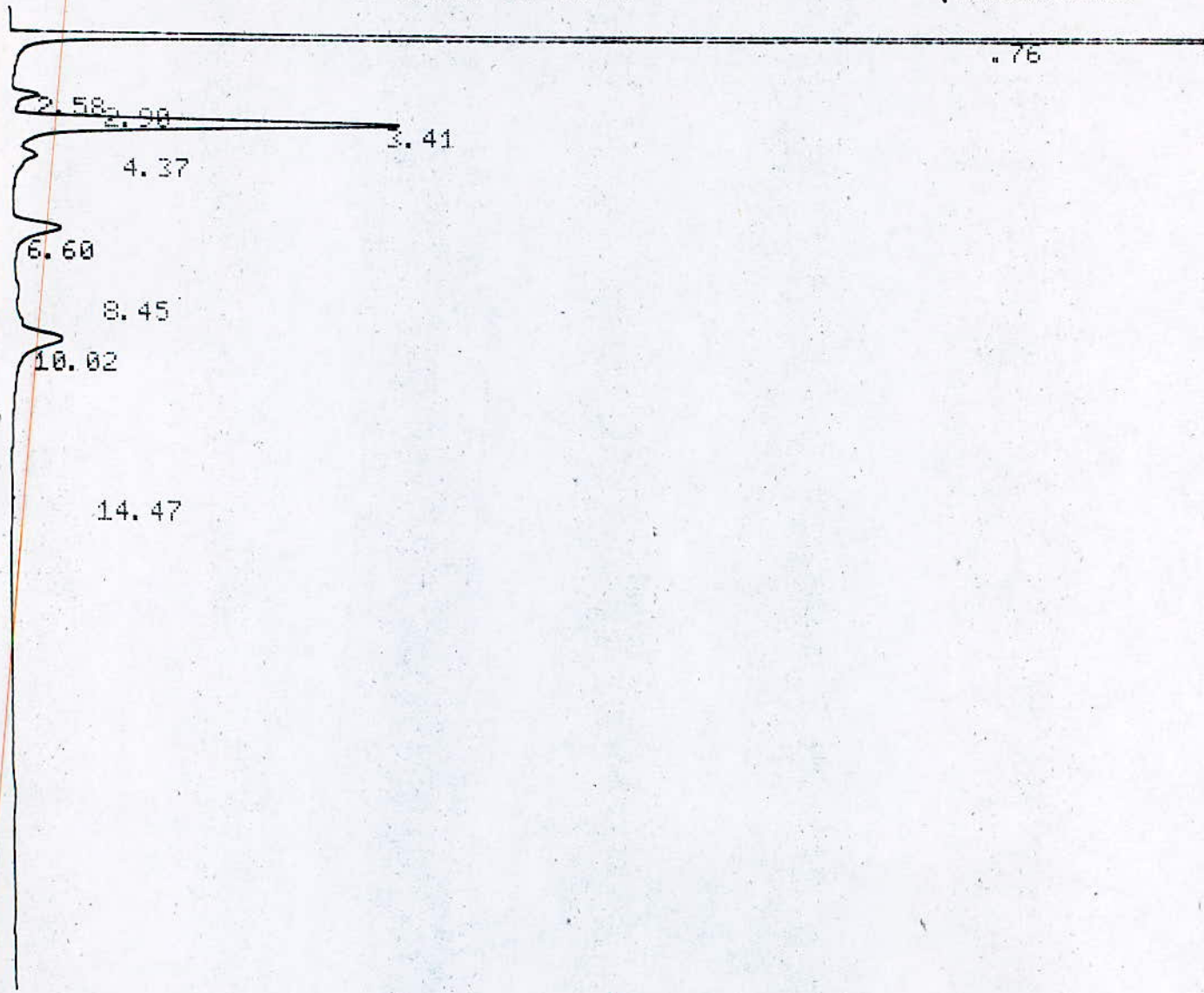
02/02/88 15:10:22 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 9 INDEX 9

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	3.596	0.78	342186	01
2	4.758	2.6	452827	02
3	80.956	3.57	7704063	02
4	6.87	4.39	653759	08
5	0.	5.93	3	05
6	0.108	6.63	10267	05
7	0.408	8.45	38809	02
8	2.508	9.97	238687	02
9	0.594	11.09	56562	03
10	0.01	21.67	993	01
11	0.046	28.93	4388	02
12	0.145	30.12	13808	03

TOTAL 100. 9516352

202



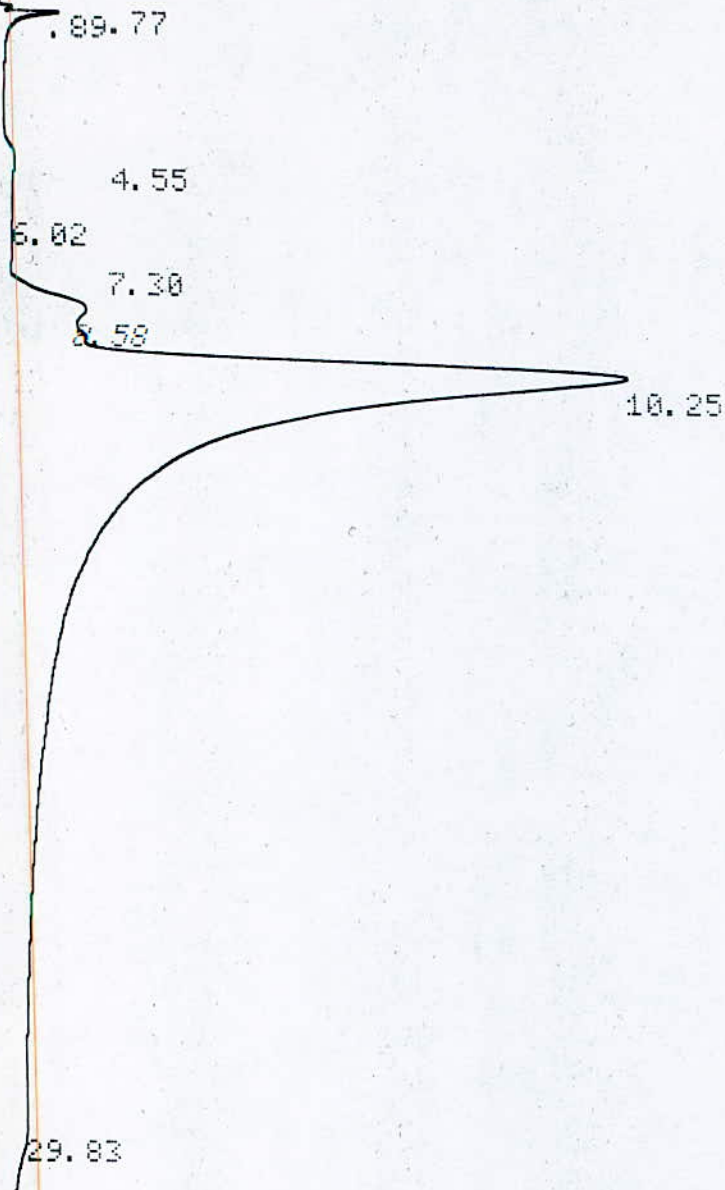
02/02/88 15:50:14 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 10 INDEX 10

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	63.716	0.76	1162425	01
2	1.173	2.58	21396	02
3	0.117	2.9	2127	02
4	20.925	3.41	381755	02
5	2.02	4.37	36856	03
6	4.29	6.6	78275	06
7	0.355	8.45	6478	06
8	7.266	10.02	132553	06
9	0.138	14.47	2518	05

TOTAL 100. 1824383

α-Terpinéol



164

02/02/88 14:31:20 CH= "A" PS= 1.

FILE	METHOD	RUN	INDEX
1.	0.	8	8

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.046	0.77	2374	02
2	0.582	0.89	29850	03
3	0.416	4.55	21326	02
4	0.248	6.02	12746	02
5	0.047	7.3	2398	02
6	3.301	8.58	169446	02
7	95.118	10.25	4881992	08
8	0.242	29.83	12431	05
TOTAL	100.		5132563	

3.301

