

L'IDENTIFICATION DES HUILES ESSENTIELLES D'AGRUMES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

par R. HUET

Laboratoire des Huiles essentielles.

Institut français de Recherches fruitières Outre-Mer (I. F. A. C.).

L'IDENTIFICATION DES HUILES ESSENTIELLES D'AGRUMES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

par R. HUET (I. F. A. C.)

Fruits, vol. 22, n° 4, avril 1967, p. 177 à 181.

RÉSUMÉ. — S'appuyant sur les travaux de L. M. H. RASQUINHO, l'auteur décrit une méthode d'analyse de routine des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse. L'utilisation de la programmation de température et du détecteur à ionisation de flamme permet d'établir des chromatogrammes ou « profils » reflétant la composition de l'ensemble de l'huile essentielle.

Cette méthode est illustrée par 35 « profils » de diverses espèces et variétés d'agrumes.

Les huiles essentielles de zeste d'agrumes sont des substances volatiles et odorantes, d'apparence huileuse, contenues dans des poches ou « glandes » visibles à la surface du fruit. De composition complexe, elles renferment plus d'une centaine de constituants différents dont la majeure partie appartient à la série des terpènes. Mais la série aliphatique est aussi représentée par des carbures, des aldéhydes et des alcools, la série aromatique par des composés comme le cymène ou des dérivés comme l'anthranilate de méthyle ou les coumarines.

L'analyse complète qualitative et quantitative d'une huile essentielle est une œuvre de longue durée, même en utilisant les méthodes les plus modernes de séparation et d'identification. Aussi dans la pratique commerciale, a-t-on défini un ensemble de données propres à caractériser l'origine, la pureté, la qualité des échantillons proposés. Il s'agit de données *physiques* : densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, solubilité dans l'alcool ; ou *chimiques* : indices d'acide, indice d'ester, indice de carbonyle. Pour chaque huile essentielle, les normes indiquent dans quelles limites acceptables peuvent varier les différentes données.

Mais ce genre d'analyse ne procure que des renseignements indirects sur la composition de l'huile essentielle et ne permet plus de détecter des adultérations rendues possibles par les progrès des chimistes.

Aussi, la tendance actuelle est-elle de compléter une analyse de routine classique par un chromatogramme. Des organismes nationaux comme l'A. F. N. O. R. ⁽¹⁾ et internationaux comme l'I. S. O. ⁽²⁾ ont pour tâche de préciser, codifier et standardiser les méthodes d'analyse classique. Ils n'ont pas épuisé le domaine de l'analyse classique ; celui de l'analyse chromatographique leur est désormais ouvert car il devient de plus en plus urgent de définir ce que doit

(1) A. F. N. O. R. : Association Française de Normalisation

(2) I. S. O. : International Standard Organisation.

être une chromatogramme représentant une huile essentielle et de normaliser la manière de l'obtenir.

Pour le producteur, comme pour l'industriel, le chromatogramme de routine est une représentation graphique de la composition chimique qualitative et quantitative du produit analysé. On lui donne le nom de « fingerprint » dans la littérature scientifique de langue anglaise. Nous préférierions le dénommer « profil », vocable qui rappelle d'avantage le trait du chromatogramme. « Empreinte digitale » ou « profil » représente l'ensemble de l'huile essentielle. Cet ensemble peut être plus ou moins détaillé et le travail de l'analyste consiste à réunir les conditions opératoires optimales, telles que le chromatogramme soit le plus complet. Il ne pourra empêcher cependant que des composés quantitativement importants masquent des constituants mineurs.

L. M. H. RASQUINHO a publié une méthode d'étude des huiles essentielles répondant à cette recherche. Partant du fait que dans une série homologue, le volume de rétention est une fonction linéaire du nombre d'atomes de carbone, à condition que la programmation soit linéaire, l'auteur établit une grille avec les esters méthyliques d'acides gras de C_1 à C_{20} , grille qui lui permet de repérer les pics du chromatogramme de l'huile essentielle passée dans les mêmes conditions.

L'indice de rétention de chaque pic est ainsi rendu visible, ce qui permet une comparaison visuelle rapide de diverses essences.

Après quelques recherches sur la phase stationnaire séparant le plus grand nombre de pics, RASQUINHO avait porté son choix sur sept phases stationnaires dont la F. F. A. P. était la plus efficiente (Carbowax modifié, Wilkens). Il opérait avec un programme de température de $5^\circ C$ par minute. Le débit du gaz vecteur était de 30 à 35 ml par minute ; la température d'injection de 250 à $275^\circ C$. La vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur de 24 pouces par heure ; les dimensions de la colonne $2\text{ m} \times 1/8$ pouce ; le support de la phase stationnaire, du chromosorb W. DMCS lavé à l'acide, de granulométrie 70/80 mesh. Le chromatographe était un Perkin Elmer modèle 800.

Le mélange standard de la série des esters méthyliques des acides gras était injecté immédiatement avant ou après l'huile essentielle de façon à vérifier la constance des températures de rétention.

En programmant de 50 à $250^\circ C$, le temps d'une analyse était de une heure.

Nous avons adopté la méthode de RASQUINHO pour obtenir les « profils » des huiles essentielles de diverses espèces et variétés d'agrumes et par comparaison des chromatogrammes, établir des rapprochements, des parentés entre ces variétés.

Conditions opératoires :

Appareil : Microtek 2 500 R à double détecteur à ionisation de flamme.

Double colonne en cuivre $1/4$ pouce, 2 m (1).

Phase stationnaire : Carbowax 20 M à 15 % sur chromosorb W. HMDS, 60/80 mesh, poids dans la colonne : 11,6 g, température de l'injecteur : $175^\circ C$.

Programmation de température : $5^\circ C$ par minute, de $60^\circ C$ à $240^\circ C$.

Débit du gaz vecteur : 50 ml/mn.

Quantité injectée : 0,4 ml.

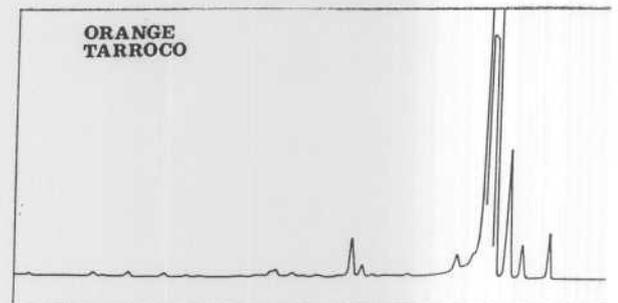
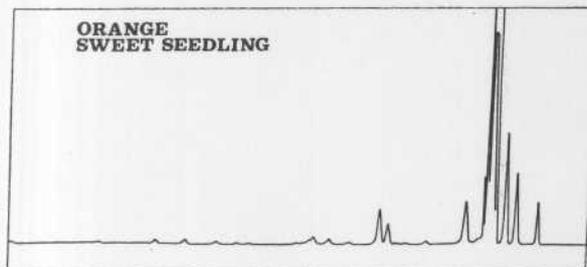
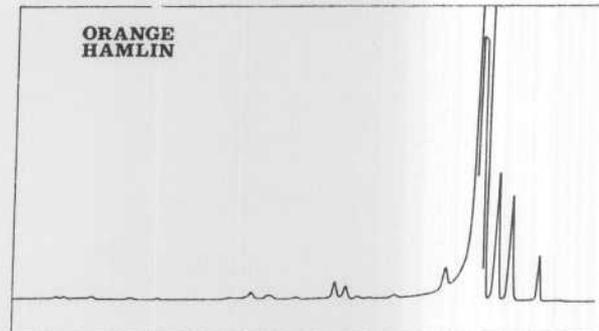
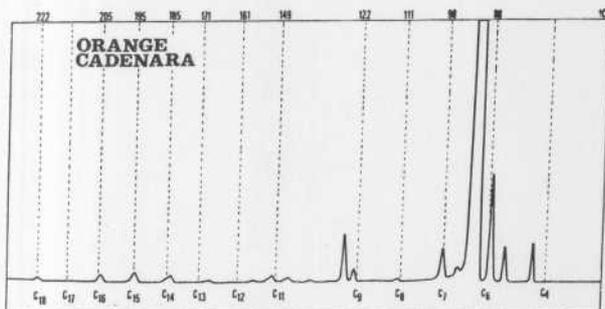
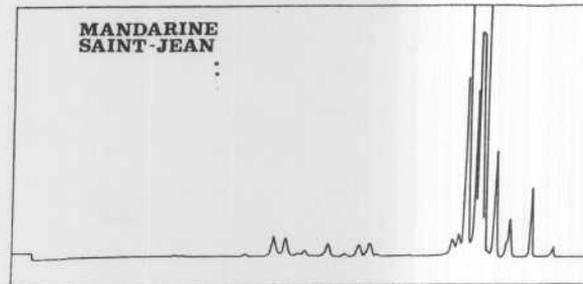
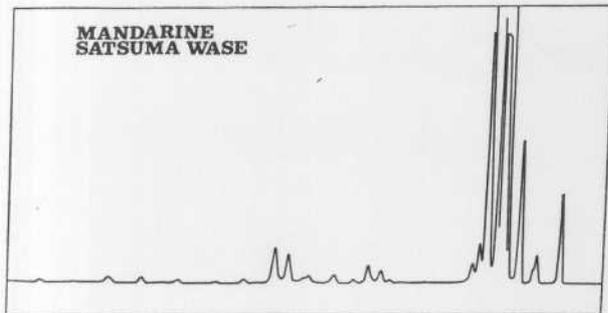
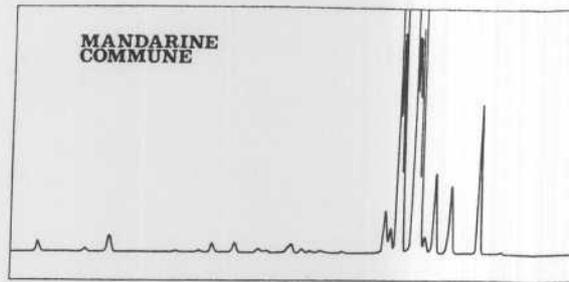
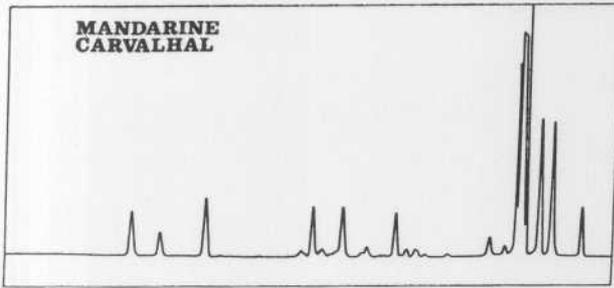
Sensibilité valable pour l'appareil Microtek $10^2 \times 16$, $10^2 \times 8$.

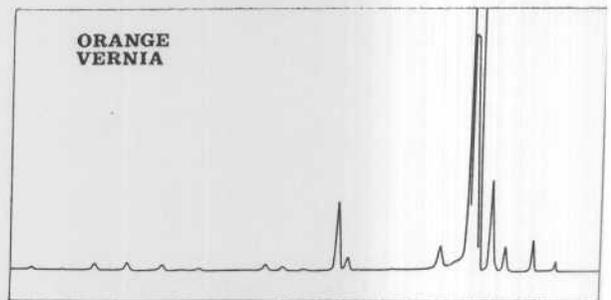
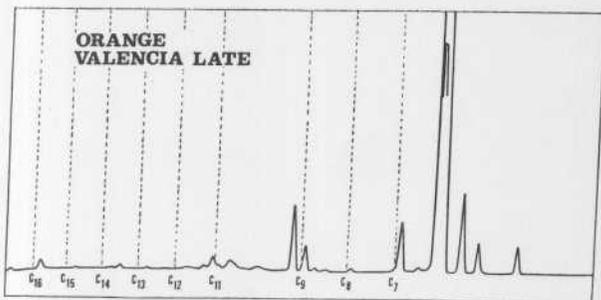
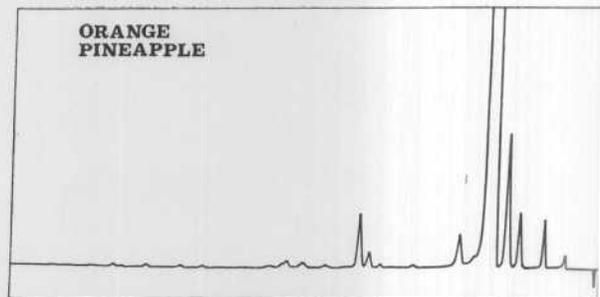
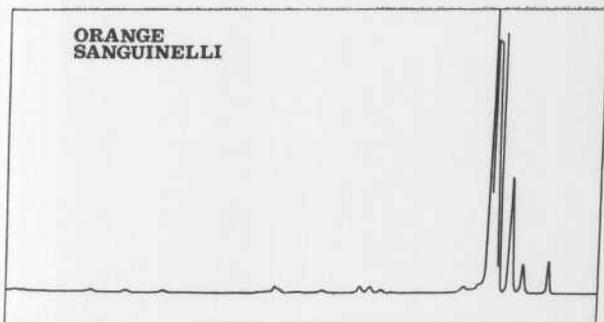
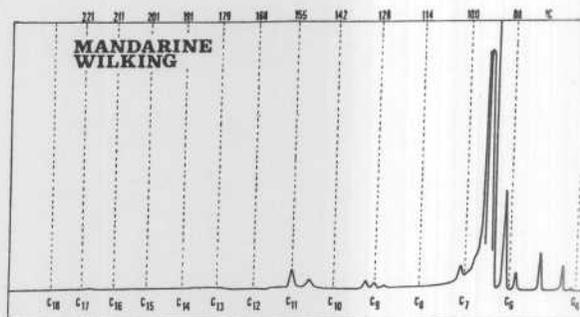
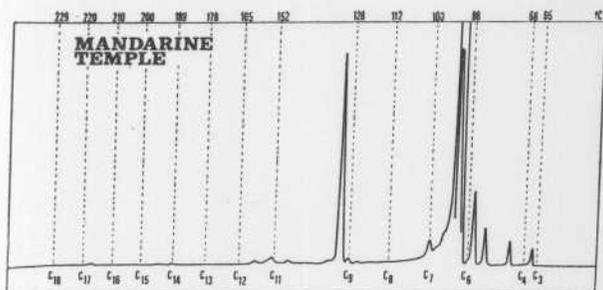
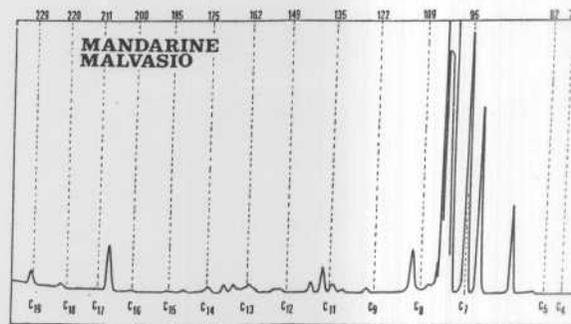
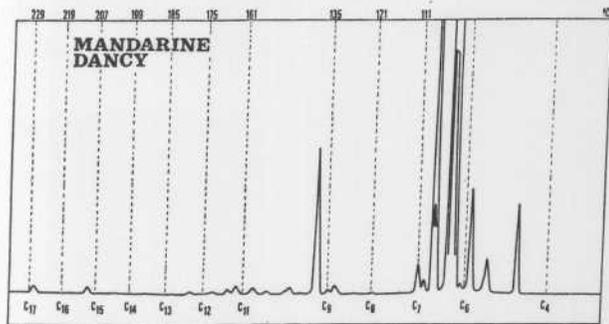
Déroulement du papier : 0,5 inch par minute.

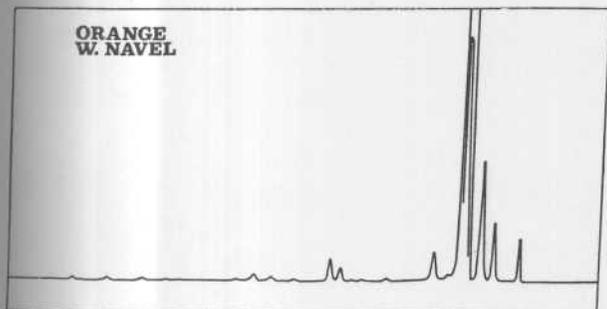
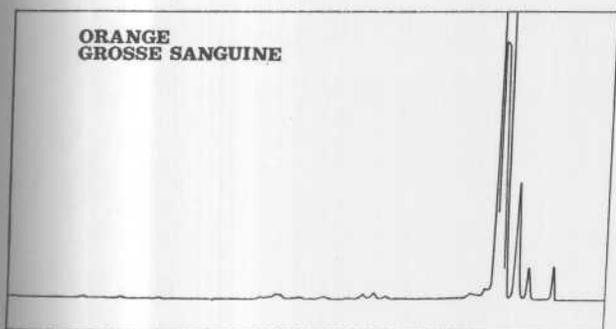
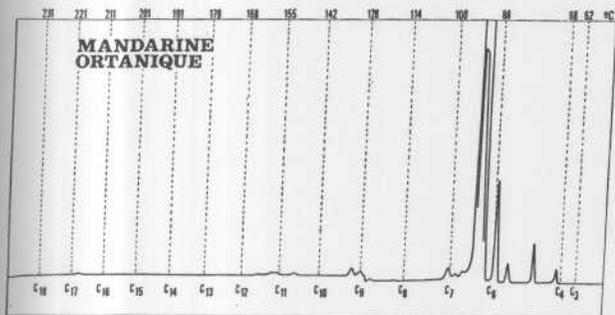
La température de l'injecteur a été abaissée, par rapport à celle déterminée par RASQUINHO afin d'éviter la décomposition de certains constituants fragiles. On sait qu'à pression normale l'acétate de linalyle, par exemple, bout et se décompose à $220^\circ C$.

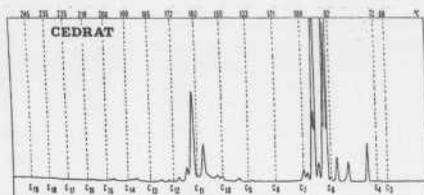
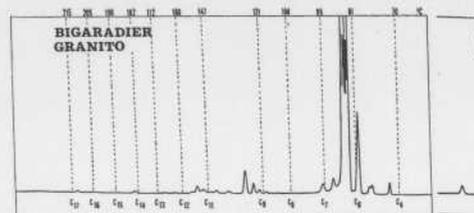
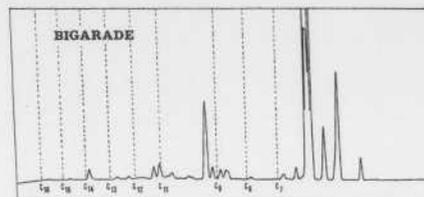
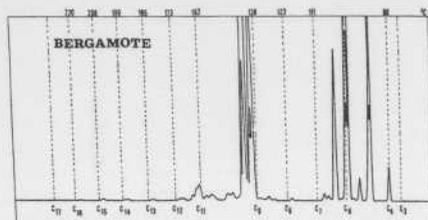
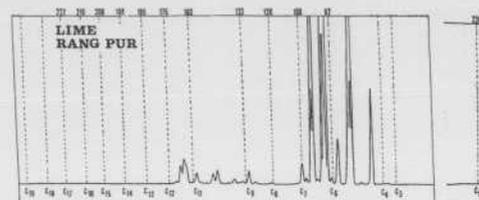
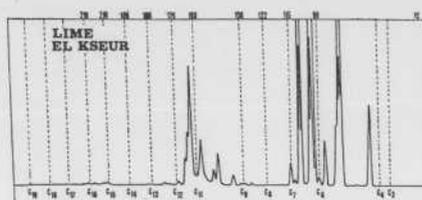
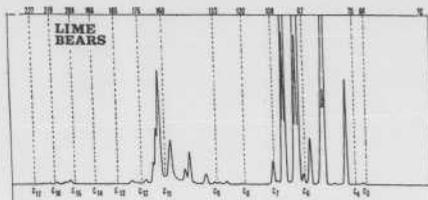
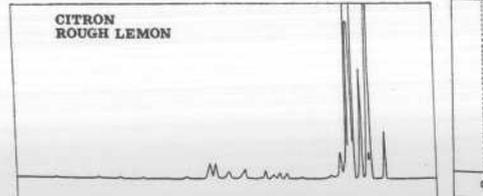
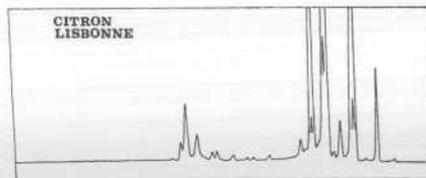
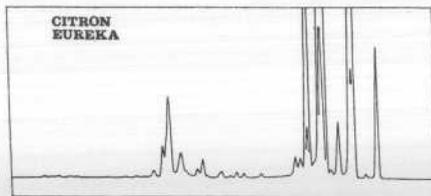
Le Carbowax 20 M a été choisi comme phase stationnaire car moyennement polaire, il permet une bonne séparation des différents constituants et il est suffisamment stable pour que la ligne de base ne dévie pratiquement pas en fin de programme. Cependant, des essais faits à

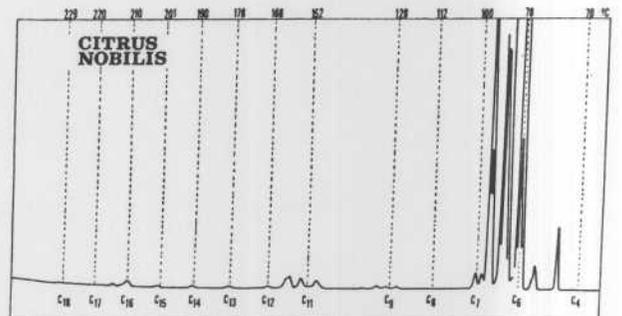
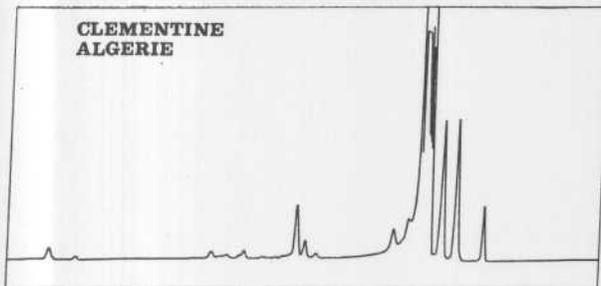
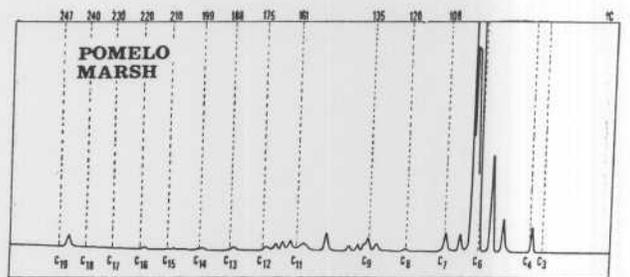
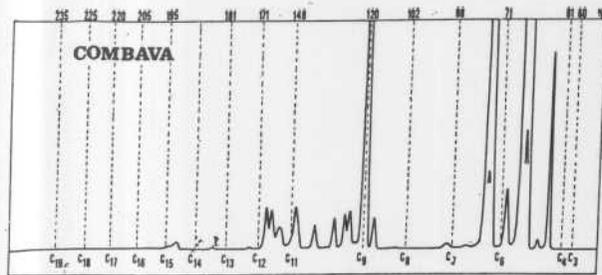
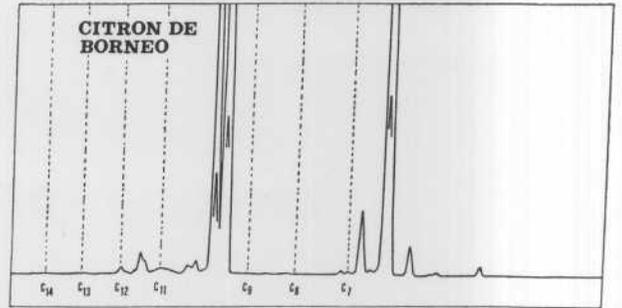
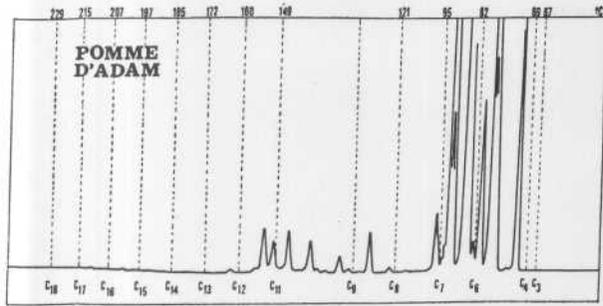
(1) Des colonnes en acier inoxydable utilisées par la suite ont donné des chromatogrammes identiques.











haute sensibilité montrent que cette phase stationnaire n'est plus stable à partir de 215° et les températures de rétention diminuent à mesure que s'use la colonne.

Le limonène, généralement principal constituant des essences d'agrumes, sature le détecteur.

Les pics ont été repérés par leur température de rétention et aussi par rapport aux pics des 18 premiers *n* esters méthyliques. La stabilité des conditions opératoires n'était pas satisfaisante et afin d'éviter toute erreur nous avons fait suivre chaque chromatogramme d'huile essentielle par un chromatogramme du mélange d'huile essentielle-*n* esters méthyliques.

BIBLIOGRAPHIE

RASQUINHO (L. M. A.). — A practical approach of the qualitative characterisation of Essential Oils by Programmed Temperature Gas Chromatographie. *J. of G. C.* October 1965. 340-344.

