

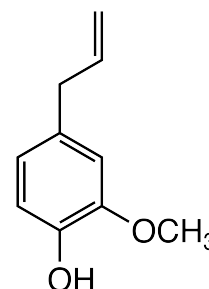
Extraction et dosage de l'Eugénol dans le clou de girofle

Le clou de girofle provient du Giroflier (*Syzygium aromaticum* L.), arbre de la famille des Myrtacées. Il s'agit du bouton floral qui a été récolté et séché jusqu'à l'obtention de sa couleur brun foncé caractéristique. Il est beaucoup utilisé en cuisine pour parfumer le pain d'épices, la choucroute et les currys par exemple.

Le clou de girofle contient de 15 à 20% d'huile essentielle. Celle-ci présente de nombreuses propriétés pharmacologiques comprenant une action anti-inflammatoire, antiseptique, analgésique, bactéricide mais est également très utilisée en parfumerie. L'huile essentielle du clou de girofle est composée majoritairement d'eugénol (85 à 90%), de caryophyllène, de tanins et d'acide oléanolique.

L'eugénol est un composé phénolique.

- Formule brute : $C_{10}H_{12}O_2$
- Masse molaire : 168 g.mol^{-1}
- Soluble dans l'alcool ($d = 0,78$), le dichlorométhane ($d = 1,33$)
- Très peu soluble dans l'eau



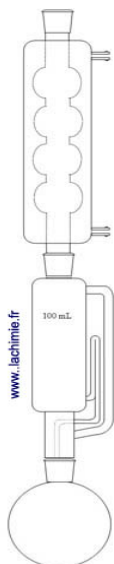
Dans ces travaux pratiques, nous allons extraire de l'eugénol à partir de clous de girofle, puis doser la quantité de cet eugénol extrait à l'aide de différentes techniques telles que la spectrophotométrie UV-Visible, l'HPLC et la CPG. Dans notre compte-rendu ne seront abordés que l'extraction, la spectrophotométrie UV-Visible et la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

EXTRACTION

Extraction solide-liquide au Soxhlet

Le système soxhlet est composé d'un ballon, d'un extracteur et d'un réfrigérant. L'extracteur comporte un tube permettant la vidange automatique du réservoir. Ce système est complété par une cartouche de cellulose contenant la matière première à partir de laquelle nous voulons extraire le composé (ici le clou de girofle pour l'eugénol). La cartouche est placée dans le réservoir. Cette technique est relativement longue et demande de chauffer le mélange solvant-composé, ce qui rend la technique délicate pour les composés sensibles à la chaleur. Mais elle permet d'utiliser peu de solvant car il est réutilisé en continu, ceci lui permet de rester pur et de rendre la solubilisation du composé plus efficace.

Fig. 1 : extracteur Soxhlet



Nous avons pesé 12.8g de clou de girofle que nous avons broyé grossièrement. Le broyat a été introduit dans la cartouche de cellulose qui est bouchée avec du coton pour éviter le reflux. La cartouche a été introduite dans l'extracteur Soxhlet. Un ballon contenant 300ml de dichlorométhane et quelques grains de pierre ponce est fixé sur l'extracteur Soxhlet et chauffé afin de permettre l'évaporation du solvant. Le dichlorométhane est un solvant apolaire non miscible avec l'eau (l'eugénol y est soluble). Les pierres-ponce empêchent l'ébullition du solvant. L'extraction a duré 5h.

Evaporation rotative

La solution obtenue, contenant différentes molécules apolaires du clou de girofle, est concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif.

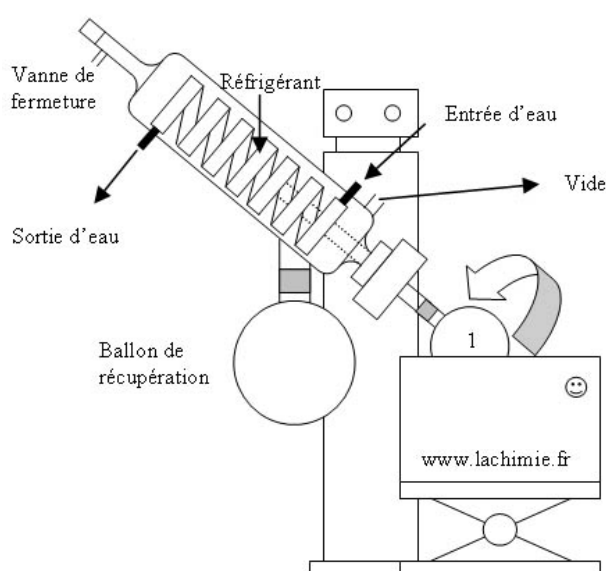


Fig. 2 : évaporateur rotatif

L'évaporateur permet d'éliminer rapidement un solvant par évaporation.

La solution, placée dans un ballon en rotation (1), est chauffée au bain-marie (45°C).

Une pompe crée un vide dans le ballon, ce qui permet de diminuer la température d'évaporation du solvant. Ce dernier est alors récupéré dans un ballon de récupération.

Le volume de notre extrait concentré est alors ramené à 50mL environ afin de faciliter la suite des manipulations.

Extraction liquide-liquide

Notre solution subit deux extractions liquide-liquide successives dans une ampoule à décanter à l'aide de 25ml de NaOH à 1M.

Préparation de 50mL de soude à 1M :

$$m = C \cdot V \cdot M = 1 \cdot 0,05 \cdot 39,3971 = 1,97 \text{ g de NaOH à peser}$$

La soude est une base (pH 13-14). Lors du mélange, le NaOH alcalinise le milieu. L'Eugénol devient alors un sel, l'Eugénolate (groupement alcool (-OH) perd son proton). L'Eugénolate est plus polaire et passe donc en phase aqueuse. Après la première extraction, on récupère la phase organique qui subit la seconde extraction de la même façon. Les phases aqueuses contenant l'Eugénolate sont récupérées.

On ramène notre solution à pH acide (pH 2-3) en ajoutant de l'acide chlorhydrique (HCl). L'Eugénolate (groupement (O-) récupère son proton) redevient Eugénol. Cette fraction est réintroduite dans une ampoule à décanter, et extraite avec 50mL de dichlorométhane. L'Eugénol repasse de la phase aqueuse à la phase organique. Celle-ci est récupérée et

évaporée à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'Eugénol est repris dans un volume précis de 50mL d'éthanol (car l'eugénol est soluble dans l'alcool), puis filtrée à l'aide d'un filtre 0,45µm.

DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE

La spectrométrie d'absorption consiste à mesurer l'atténuation d'un signal lumineux traversant un milieu afin de déterminer les concentrations des substances absorbantes, chromophores, présentes dans le milieu.

L'eugénol, de par ses propriétés physiques (cycle aromatique), absorbe dans l'UV.

Pour connaître la quantité d'Eugénol extraite de nos clous de girofle, on réalise un dosage par spectrophotométrie en utilisant la méthode d'étalonnage externe à l'aide de solutions de référence de concentrations connues : 0,1-0,5-1-2,5-5µg/mL.

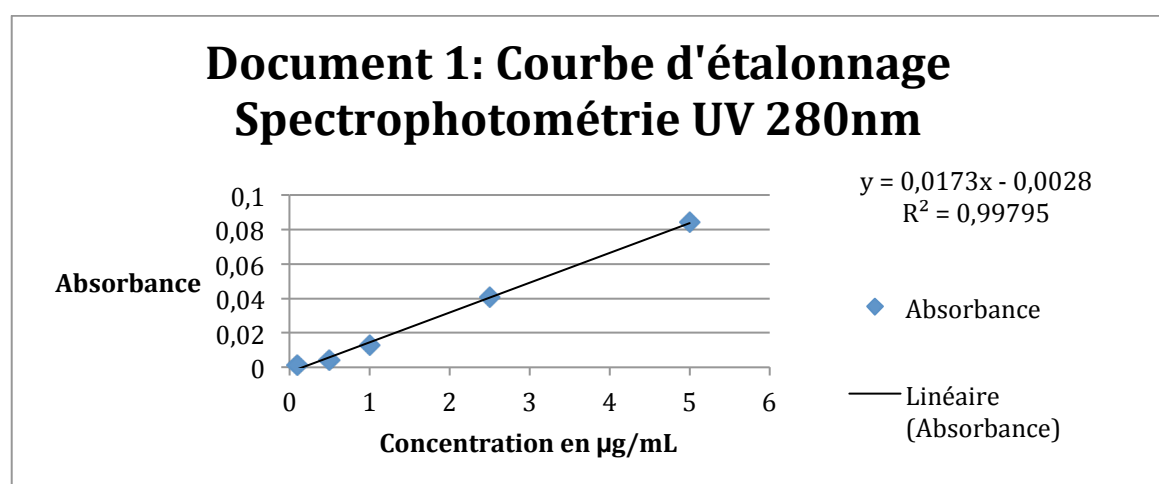
Le spectrophotomètre UV-Visible comporte :

- une source lumineuse qui permet d'éclairer dans l'UV (ex : lampe au deutérium) et dans le visible (ex : lampe au Tungstène).
- Un monochromateur, qui permet de sélectionner une longueur d'onde précise du spectre UV-Visible.
- Le compartiment où se trouvent l'échantillon et le blanc. Ils sont placés dans des cuves en quartz (car le quartz n'absorbe pas dans l'UV contrairement aux cuves en plastique) de 1 cm de longueur.
- Un détecteur à photodiode ou photomultiplicateur, qui récupère les signaux lumineux ayant traversé l'échantillon.

Une des solutions de référence est utilisée pour déterminer le $\lambda_{\max}$ (longueur d'onde du maximum d'absorption de l'Eugénol).

$$\lambda_{\max} = 280\text{nm}$$

Grâce aux valeurs des absorbances de nos solutions de références, nous réalisons une courbe étalon (document1). Puis nous avons mesuré l'absorbance de notre solution obtenue à la fin de l'extraction. Notre solution est diluée 5000 fois afin d'entrer dans la zone de linéarité de la loi de Beer-Lambert.



Calcul de la concentration d'eugénol dans notre extrait dilué

Nous obtenons une absorbance $A = 0,780$. À partir de l'équation de la courbe étalon, nous en déduisons la concentration d'eugénol, soit :

$$y = 0,0173x - 0,0028 \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} x = \text{concentration en eugénol en } \mu\text{g/mL} \\ y = \text{absorbance à } 280\text{nm} \end{array}$$

$$x = 0,780 + 0,0028 / 0,0173$$

$$x = 4,63 \mu\text{g/mL}$$

Calcul du coefficient d'extinction molaire de l'eugénol :

$$\epsilon = A / l.C \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} l : \text{longueur de la cuve (1 cm)} \\ C : \text{concentration en eugénol (mol .L}^{-1}\text{)} \\ A : \text{absorbance à } 280\text{nm} \end{array}$$

ϵ est égal à la pente de la courbe étalon

$$x_a = 1 \mu\text{g/mL} \rightarrow \text{en utilisant la courbe étalon : } y_a = 0,0173 * 1 - 0,0028 = 0,0145$$

$$x_b = 2 \mu\text{g/mL} \rightarrow y_b = 0,0318$$

Rappel : Le coefficient d'extinction molaire s'exprimant en $\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}.\text{L}$, nous convertissons les concentrations x_a et x_b grâce à la masse molaire de l'eugénol.

$$MM = 164,2 \text{ g.mol}^{-1}.$$

$$\epsilon = (y_b - y_a) / (x_b - x_a)$$

$$= (0,0318 - 0,0145) / [(2.10^{-6} - 1.10^{-6}) / 164,2] * 10^3 = 2840,7 \text{ mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}.\text{L}$$

Calcul du rendement d'eugénol extrait

La concentration d'eugénol dans notre extrait est de $4,63 \mu\text{g/mL}$. Cet extrait a été dilué 5000 fois. Nous avons donc $4,63 * 5000 = 23,15 \text{ mg.mL}^{-1}$

Notre extrait avait été repris dans un volume précis de 50mL d'éthanol. Nous avons donc obtenu $0,02315 * 50 = 1,1575 \text{ g}$ d'eugénol.

Nous avons utilisé 12,8g de clou de girofle pour l'extraction. Nous avons donc un rendement $R = 1,1575 * 100 / 12,8 = 8,98 \%$.

Soit 89,8 mg d'eugénol par g de clou de girofle.

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG):

La CPG est une technique de séparation de molécules présentes dans un mélange qui peut être complexe, avec des volatilités différentes. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans être dégradés.

Les appareils à chromatographie gazeuse sont principalement composés :

- d'un four
- d'un système d'injection, permettant d'introduire et de vaporiser notre échantillon
- d'une colonne de séparation
- d'un système de détection

Les composés vont être séparés en fonction de leur volatilité et de leur polarité. Les composés les plus volatiles (ayant une température d'ébullition plus faible) sortiront en premier. Mais si deux composés ont une volatilité proche, le composé le moins polaire sortira en premier.

L'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé. C'est cette propriété qui rend possible la quantification de notre composé. Nous utilisons deux méthodes d'étalonnage (externe et interne) pour déterminer la concentration d'eugénol dans notre extrait.

Pour l'étalonnage externe nous injectons des volumes constants de solutions de concentrations en eugénol connues et mesurons l'aire des pics correspondants. Nous construisons ensuite une courbe étalon : $\text{Aire} = f(\text{concentration eugénol})$.

Pour l'étalonnage interne nous introduisons dans le mélange à doser un étalon interne. Il possède des propriétés très proches de l'eugénol, et son pic chromatographique doit être bien séparé mais proche des autres composés présents dans l'échantillon.

La méthode d'étalonnage interne est beaucoup plus précise car elle est indépendante du volume injecté dans le chromatographe, qui est une des principales sources d'erreur des résultats (surtout pour les injections manuelles). Néanmoins il n'est pas toujours aisé de trouver un bon étalon interne (pur et commercialisé).

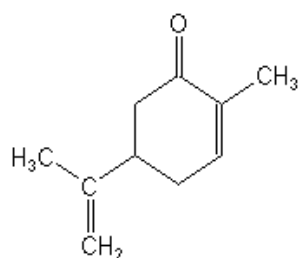
Optimisation des conditions de séparation

Afin d'optimiser les conditions de séparation des pics chromatographiques, nous disposons d'une solution contenant 4 composés majeurs de l'huile essentielle de clou de girofle qui sont l'eugénol, la carvone, l'alpha-terpinéol et l'aldéhyde cinnamique.

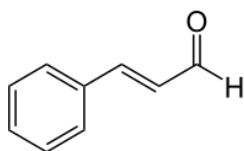
Nous effectuons un premier essai en injectant 1 µL de mélange, à une température de 219°C. Les pics étaient mal résolus. Un second essai à une température de 190°C a permis une bonne séparation des pics. (Document 2, voir fin). C'est donc cette température que nous avons retenue pour nos analyses.

Identification des composés

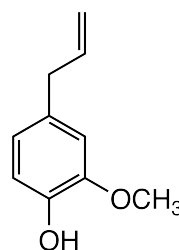
Avant de réaliser les chromatogrammes de chaque composé et ainsi déterminer l'ordre d'élution à l'aide des temps de rétention, nous pouvons réfléchir sur l'ordre de sortie de ces 4 composés grâce à leurs formules chimiques et leurs propriétés.



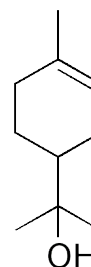
Carvone



Aldéhyde cinnamique



Eugénol

 α -terpinéol

Dans nos conditions de séparation ($T^\circ = 190^\circ\text{C}$), on peut déduire que :

- l' α terpinéol sortirait en 1^{er} car il est le plus volatile, il a la température d'ébullition la plus basse de tous les composés
- La carvone a une température de volatilisation un peu plus basse que les deux derniers composés, mais surtout a une polarité inférieure à l'eugénol et à l'aldéhyde cinnamique. Il va donc être moins retenu que les deux derniers.
- L'eugénol a à peu près la même température de volatilisation que l'aldéhyde cinnamique mais est moins polaire que celui-ci, il sortira donc avant.
- L'aldéhyde cinnamique, le composé le plus polaire sortira en dernier

En comparant les temps de rétention des spectres individuels avec le chromatogramme du mélange, on a pu confirmer l'ordre d'élution des composés.

	α - terpinéol	Carvone	Eugénol	Aldéhyde cinnamique
T° ébullition ($^\circ\text{C}$)	219	230	252-253	250-252
Tps de rétention (min)	2,84	3,00	3,42	4,38

Dosage de l'eugénol par étalonnage externe

L'étalonnage externe est effectué à l'aide de solutions de références d'eugénol commerciales de concentrations connues : 0,2-0,4-0,6-0,8 et 1 mg.mL^{-1}

L'analyse des chromatogrammes de ces solutions nous a permis de construire une courbe étalon de l'aire sous courbe des pics d'eugénol en fonction de la concentration en eugénol (document 3).

Nous avons chromatographié notre extrait que l'on a préalablement dilué 20 fois afin que les résultats entrent dans les valeurs de la gamme étalon (dilution déduite des résultats obtenus par dosage UV).

L'aire obtenue pour notre échantillon est : 8901,51.

L'équation de la courbe étalon est : $y = 11104x + 604,22$

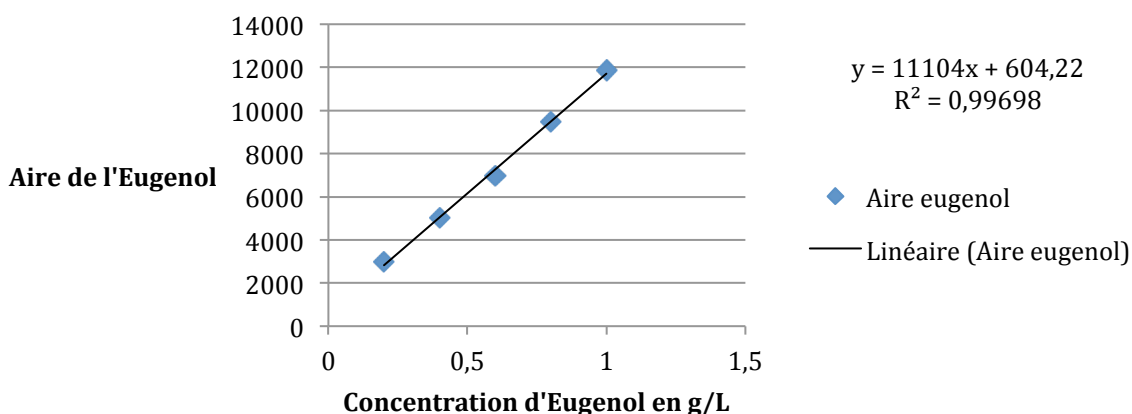
Nous en avons déduit la concentration d'eugénol dans notre extrait dilué:

$$(8901,51 - 604,22) / 11104 = 0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$$

Donc en tenant compte du facteur de dilution, nous obtenons une concentration de :

$$0,75 \times 20 = 15 \text{ mg.mL}^{-1}$$

Document 3: Etalonnage Externe



Calcul du rendement d'eugénol extrait

Notre extrait avait été repris dans un volume précis de 50mL d'éthanol. Nous avons donc obtenu $0,015 \times 50 = 0,75$ g d'eugénol.

Nous avons utilisé 12,8g de clou de girofle pour l'extraction. Nous avons donc un rendement $R = 0,75 \times 100 / 12,8 = 5,86 \%$.

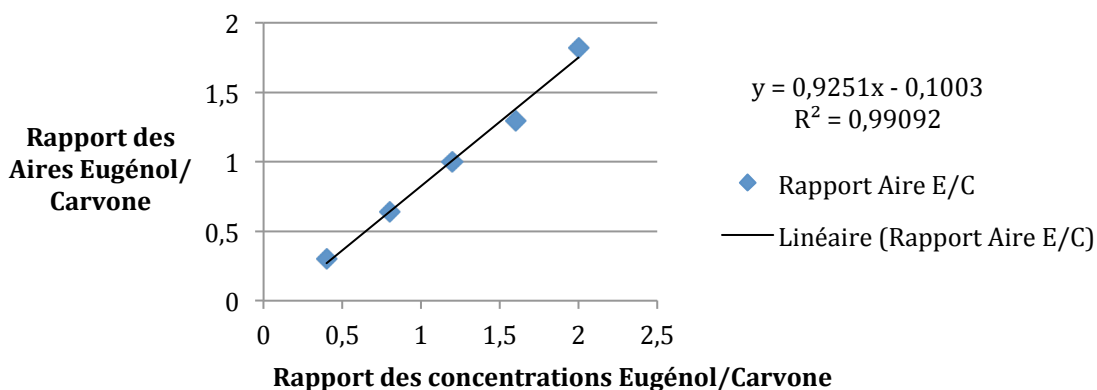
Soit 58,6 mg d'eugénol par g de clou de girofle

Dosage de l'eugénol par étalonnage interne

Pour cela nous avons utilisé une concentration constante de carvone (étalon interne $0,5 \text{mg.mL}^{-1}$) ajoutée dans nos solutions de références de concentrations 0,2-0,4-0,6-0,8 et 1 mg.mL^{-1} d'eugénol.

Une nouvelle courbe étalon a pu être construite, grâce aux rapports des aires des pics de l'eugénol sur la carvone en fonction du rapport des concentrations d'eugénol sur carvone (document 4).

Document 4: Etalonnage Interne



Remarque : Plusieurs essais ont été réalisés pour la concentrations de 0,8 mg.mL⁻¹ d'eugénol (4^{ème} point de la courbe étalon) afin d'obtenir de meilleurs résultats. Mais nous n'avons pas obtenus mieux.

Le rapport des aires obtenu pour notre échantillon est : 8901,51 / 7703,55

L'équation de la courbe étalon est : $y = 0,9251x - 0,1003$

Nous en avons déduit le rapport des concentrations d'eugénol sur carvone :

$$[\text{eugénol}]/[\text{carvone}] = (8901,51 / 7703,55) + 0,1003 / 0,9251 = 1,3575$$

La concentration de carvone étant de 0,5 mg.mL⁻¹, nous pouvons en déduire la concentration d'eugénol dans notre extrait dilué : $1,3575 * 0,5 = 0,6787 \text{ mg.mL}^{-1}$

En tenant compte du facteur de dilution : $0,6787 * 20 = 13,57 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'eugénol.

Calcul du rendement d'eugénol extrait

Notre extrait avait été repris dans un volume précis de 50mL d'éthanol. Nous avons donc obtenu $0,01357 * 50 = 0,68 \text{ g}$ d'eugénol.

Nous avons utilisé 12,8g de clou de girofle pour l'extraction. Nous avons donc un rendement $R = 0,68 * 100 / 12,8 = 5,31 \%$.

Soit 53,1mg d'eugénol par g de clou de girofle

CONCLUSION

Les résultats des rendements obtenus en eugénol sont :

- 8,98% à l'aide de la spectrophotométrie UV-Visible
- 5,86% à l'aide de la CPG à étalonnage externe
- 5,31% à l'aide de la CPG à étalonnage interne

On observe une certaine différence entre la méthode de spectroscopie UV et celles de la CPG, tout en restant dans un même ordre de grandeur.

La spectrométrie UV est très sensible, elle permet de détecter de faible concentration (de l'ordre du µg/mL dans notre étude par exemple). Lors de notre expérimentation, l'absorbance obtenue (DO) n'était pas très stable, ce qui nous a donné des résultats approximatifs, influençant sur l'équation de la courbe étalon, et donc sur les résultats finaux (concentration, rendement). Et à ces faibles concentrations, chaque erreur de manipulations lors de l'établissement de la gamme étalon influence énormément les résultats finaux. Il est nécessaire de bien connaître les propriétés spectrales de la molécule à étudier, et d'avoir à disposition un échantillon pur pour déterminer le λ_{max} et réaliser la courbe étalon. Enfin, si d'autres molécules absorbant dans les UV sont présentes dans le mélange, elles peuvent « recouvrir » le pic d'absorption du composé étudié.

Cette méthode peut être très sensible, et détecter de faibles concentrations de composés, mais elle n'est pas très précise pour le dosage.

C'est pourquoi nous avons utilisé d'autres techniques pour doser l'eugénol que nous avons extrait, telle que le dosage par chromatographie en phase gazeuse.

Comme dit précédemment, la méthode d'étalonnage interne est plus précise que l'externe car supprime les erreurs des volumes injectés. Donc le rendement le plus pertinent obtenu serait celui de la CPG à étalonnage interne : 5,31%.

Le clou de girofle est composé d'environ 15% d'eugénol (cf. Monographie du clou de girofle). Nous avons donc extrait environ 1/3 de l'eugénol total par la technique d'extraction Soxhlet.

Pour améliorer le rendement, nous aurions pu augmenter le temps d'extraction (nous avons extrait l'eugénol pendant 5h).

De plus, il est conseillé au bout de 4 à 5 passages du solvant, de le renouveler car celui ci est de plus en plus saturé, et donc l'efficacité d'extraction est diminuée à chaque passage.

BIBLIOGRAPHIE

Monographie du clou de girofle

http://jardinsdumonde.org/index.php?option=com_content&view=article&id=87:eugenia-caryophyllata&catid=11:monographie-de-plantes&Itemid=16

Extraction soxhlet ; évaporateur rotatif

<http://www.lachimie.fr>

Dessins des molécules :

<http://www.wikipedia.fr>