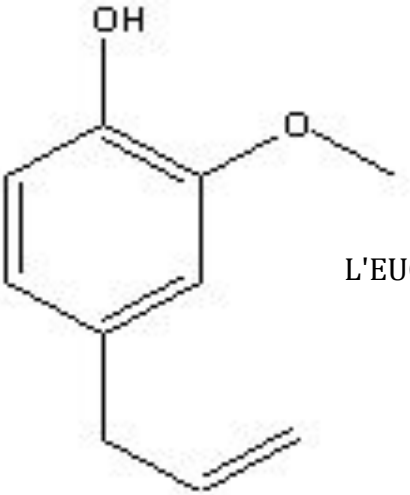
STRUGALA Aurore
PAOLI Adrien

M1 BVP VRV
Février 2011

Rapport de Phytochimie
Extraction de l'Eugénol dans le clou de girofle
Dosage UV et CPG

Le giroflier



L'EUGENOL

Le clou de girofle

Extraction et dosage UV

Table des matières

Introduction 2

Résultats 3

Absorbances (A) dans les UV de la gamme étalon : 3

Calcul d'epsilon : 4

Discussion 4

Conclusion 6

Introduction

Le principe de ce TP a été d'extraire l'Eugénol contenu dans le clou de girofle grâce à un Soxlhet et de le doser par la méthode des UV et de la chromatographie en phase gazeuse (CPG). De cette manière, il a été possible de comparer l'efficacité respective de ces méthodes.

- **Le Soxlhet**, qui a pour but de faire passer un liquide dans une matrice solide pour en extraire notamment l'Eugénol, avec un protocole de SPE ou extraction en phase solide. Ce dernier, accompagné d'impuretés, va être entrainé par le solvant (dichlorométhane) et regagner le ballon en colorant la solution en jaune. Puis, par décantations successives et ajouts d'une base et d'un acide, l'Eugénol a été séparé des autres composés avec lesquels il a été extrait. Ainsi, l'Eugénol a été purifié et a été utilisé pour les dosages ultérieurs.
- **Le dosage en UV** a été effectué par un étalonnage externe de solutions de 0,1 à 5 µg/L. Dans ce cas, la loi additive de Beer-Lambert s'applique :
  $A = \varepsilon.L.C$
  Où A = l'absorbance, ε = le coefficient d'absorption molaire, L = la longueur de la cuve traversée par le faisceau et C = la concentration de la solution dans la cuve.
  Enfin, la gamme nous a permis de connaître la concentration en Eugénol extrait en ayant recours à une régression linéaire des absorbances obtenues en fonction de la concentration, ainsi que l'ε.

Résultats

Pesée réelle des clous de girofle grossièrement pilés : **12,95g**
Masse de soude **: 1,97g**

Avant toute mesure d'absorbance, la longueur d'onde d'absorption maximale de l'Eugénol a été trouvée par balayage du spectre UV à **282nm**.

Absorbances (A) dans les UV de la gamme étalon :

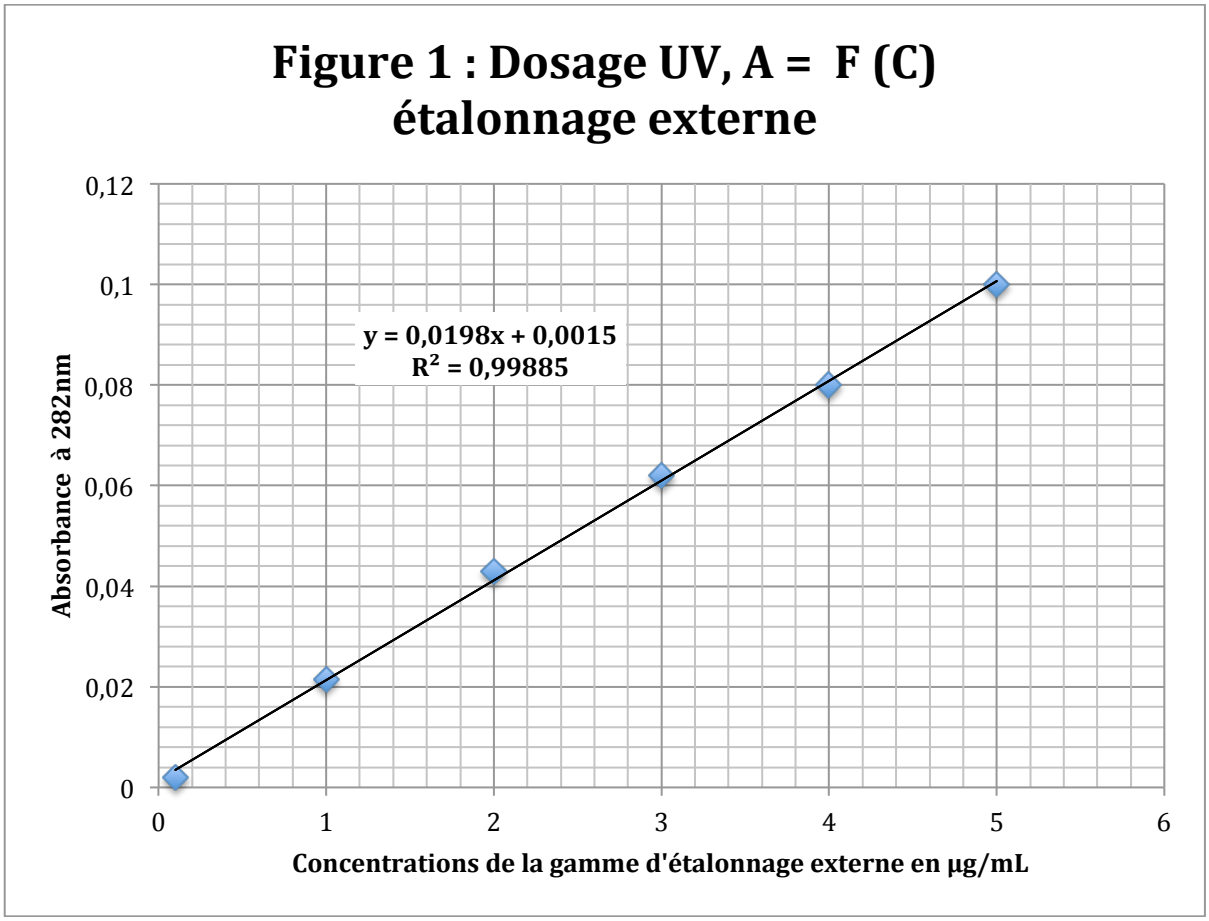
(Le blanc a été réalisé à partir d'éthanol.)
Les concentrations sont exprimées en µg/mL

C_{Gamme}	Blanc	0,1	1	2	3	4	5
$A_{282\ nm}$	0	0,0020	0,0215	0,0430	0,0620	0,0800	0,1000

Tableau 1 : absorbance de l'étalonnage externe

$C_{Eugénol\ extrait}$	blanc	X
$A_{282\ nm}$	0	**0.090**

Tableau 2 : absorbance de l'Eugénol extrait



À partir de l'équation de la courbe, on pose X = (Y – 0,0015) / 0,0198
Avec Y = 0,0900 on obtient X = 4,4697
Soit **4,4697 µg/mL ou mg/L**

En tenant compte des dilutions antérieures, nous obtenons le calcul suivant :
4,4697 (µg/mL) x 5000 (dilution) x 50 (volume de la solution d'extraction) / 12,95 (poids réel de clou de girofle) = 86,29 mg/g

Nous avons donc une masse de 86,29 mg d'Eugénol/g de clou de girofle

Calcul d'epsilon :

D'après la loi de Beer-Lambert et la masse molaire de l'Eugénol (164 g/mol), nous pouvons calculer le coefficient d'absorption molaire de la façon suivante :

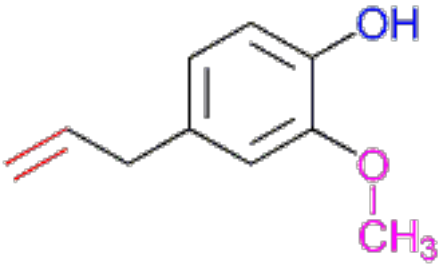
$A_{282nm} = \varepsilon_{280nm}. L . C$
$\varepsilon_{282nm} = A_{280nm} / (L . C_{Eugénol\ en\ mol/L})$
$\varepsilon_{282nm} = 0,0900 / (1 \times 4,4697.10^{-3}/164)$
ε_{282nm}= **3142 L/mol/cm**

Discussion

L'extraction de l'Eugénol repose sur une variation de polarité et de pH de ce composé au fil des étapes de purification. Il y a tout d'abord l'utilisation de la SPE avec le Soxlhet auquel il ne faut pas oublier de rajouter de la pierre ponce afin de réguler l'ébullition du dichlorométhane qui nous sert ici de solvant d'extraction. Ce solvant est de nature apolaire et extrait l'Eugénol peu polaire ainsi que d'autres composés à partir des clous de girofle pilés. La faible polarité de l'Eugénol s'explique par la présence d'une fonction alcène et d'un cycle phénolique (figure 2). Le dichlorométhane étant plus dense que l'eau, la phase organique apparaitra en-dessous de la phase aqueuse dans l'ampoule à décanter. Nous sommes donc en présence d'une phase organique de 300ml qui sera concentrée dans un volume de 50mL grâce à l'évaporateur rotatif. Il permet d'évaporer sous pression le dichlorométhane qui a une température d'ébullition de 45°C (tableau 3). Sous pression cette température est encore inférieure et donc encore plus facile à atteindre.

Densité de l'eau	**1**
Densité du dichlorométhane	1,328
Température d'ébullition du dichlorométhane	45°C
Température d'ébullition de l'Eugénol	253°C

Tableau 3 : densités et températures d'ébullition



Fonction alcène

Fonction phénol

Fonction éther

Figure 2 : fonctions chimiques principales de l'Eugénol.

Dans le but de purifier l'Eugénol et d'éliminer les impuretés ou autres composés parasites pour nos futurs dosages, l'usage d'une ampoule à décanter est nécessaire. Le solvant aqueux utilisé est la soude 1M qui rend non seulement le milieu plus basique mais qui rend l'Eugénol ionique et lui permet d'être polaire donc soluble dans l'eau (tableau 4 et figure 3). Ce dernier a donc été extrait dans la phase aqueuse. De façon à extraire le maximum d'Eugénol dans la soude 1M, l'opération est répétée deux fois. Cela réduit la perte de matière et améliore notre rendement.

Espèce	Densité	Solubilité dans l'eau
Eugénol (espèce acide)	1,07	Très peu soluble ➔ Affinité avec phase organique
Eugénate de sodium (espèce basique)	X	Très soluble ➔ Affinité avec phase aqueuse

Tableau 4 : densités et solubilités dans l'eau

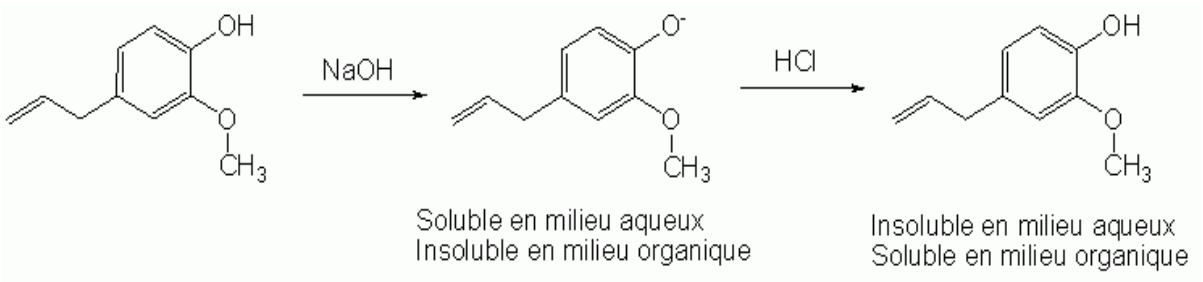


Figure 3 : couple Eugénol/Eugénate de sodium avec leur solubilité respective

L'ajout d'acide chlorhydrique va acidifier le milieu dont la vérification est faite au papier pH. Le goutte à goutte de l'acide est effectué jusqu'au saut de pH et l'équivalence de ce dosage acido-basique (pH-métrique) a été légèrement dépassée car le papier pH est passé de 14 (bleu foncé) à 6-7 (jaune) en l'espace de deux gouttes. Le passage de l'équivalence nous fait apparaitre un précipité jaunâtre qui correspond aux impuretés/composés parasites. Ces derniers précipitent en réaction à la baisse de pH. Cette propriété est ici essentielle à la purification de notre Eugénol.

La phase aqueuse est reprise dans une ampoule à décanter avec un volume de dichlorométhane et sous sa forme basique, l'Eugénol retrouve plus d'affinité avec le dichlorométhane apolaire alors que sa forme acide avait une affinité avec le solvant polaire. Tout le précipité obtenu contenant les impuretés est alors évacué et nous nous retrouvons avec un mélange Eugénol-dichlorométhane dont il est facile d'extraire le solvant par la même technique de l'évaporateur rotatif. Une fois le solvant éliminé et le précipité sec, il est resolubilisé avec de l'éthanol et filtré afin d'éliminer les éventuelles impuretés solides résiduelles. C'est avec cette fraction, filtrée ultérieurement, que le dosage UV suivant la gamme étalon a dû s'effectuer.

La gamme étalon que nous obtenons est bonne car les points sont bien alignés et le $R^2 = 0,99885$ (figure 1).
Plus cette valeur se rapproche de 1 et plus les points sont alignés sachant qu'un bon R^2 se situe entre 0,97 et 1. La méthode de spectrométrie UV est très sensible et varie de façon significative au moindre écart de manipulation ou à la moindre impureté dans la cuve en quartz. Les absorbances variant toutes les secondes, des valeurs moyennes à celles qui nous sont affichées ont été conservées. Cette sensibilité peut même être vectrice d'erreur car d'autres espèces peuvent absorber à 282nm et ainsi surévaluer l'absorbance de la solution d'Eugénol. Nous trouvons d'ailleurs une concentration d'Eugénol de 86,29 mg/g de clou de girofle alors qu'avec la méthode de la CPG nous trouvons environ 55,25 mg/g. Cette différence sera expliquée ci-après dans la partie discussion de la CPG.

Conclusion

L'extraction au Soxlhet apparait comme très pratique pour extraire une molécule d'intérêt mais reste une technique assez longue. En effet il est nécessaire d'attendre plusieurs écoulements de siphon avant d'obtenir une extraction satisfaisante. L'utilisation de dosage spectrométrique en UV par contre est une méthode très rapide et se révèle être très sensible. Toutefois, l'additivité de la loi de beer-Lambert peut nous amener à surévaluer la concentration d'un composé par l'absorption de plusieurs composés à cette longueur d'onde.