

Projet P6 :
**Macération de menthe fraîche puis dosage
du menthol en CPG**



STPI 2
2019-2020
Responsable projet : Mme Delaroche

Océane Quideau
Jade Blanchard
Yann Liepchitz
Morgan Fourcin
Mihaela Magdei
Océane Riga

Remerciements

Ce projet a été réalisé dans le cadre de notre quatrième semestre au sein de l'INSA Rouen Normandie, afin de valider des compétences de recherches en groupe.

Nous tenons à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ce projet.

Tout d'abord, nous tenons à remercier les personnes qui ont accepté de permuter les emplois du temps afin de nous permettre de pouvoir demander des projets qui nous intéressaient et notamment celui-ci.

C'est pourquoi nous aimerions également remercier la personne en charge de la répartition des projets qui nous a accordé l'opportunité de faire des recherches sur un sujet qui nous a plus donné envie que d'autres.

De plus, nous aimerions remercier l'ensemble du personnel du laboratoire qui nous a permis d'accéder aux différentes ressources dont nous avons pu avoir besoin et notamment la Chromatographie en Phase Gazeuse.

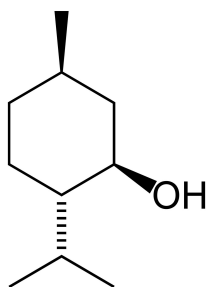
Enfin, nous tenons à remercier tout particulièrement Madame Delaroche, enseignante à l'INSA Rouen Normandie en Chimie. Elle a toujours été là pour nous encadrer lors de nos recherches, nous conseiller malgré les circonstances qui nous ont empêchés de mener à bien certaines de nos recherches, notamment la réalisation des expériences. Elle fut toujours disponible pour répondre à nos questions.

Merci également à toutes les personnes qui consacreront du temps à la lecture de ce rapport.

Table des matières

Introduction	p.3
<u>I - Les méthodes d'extraction traditionnelles</u>	p.4
a) Distillation à la vapeur	
b) Hydrodistillation	
c) Par solvant	
1) Par infusion	
2) Par macération	
3) L'extraction au Soxhlet	
<u>II - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)</u>	p.7
a) Principes des méthodes chromatographiques	
b) Principe de fonctionnement de la CPG	
c) Éléments d'un chromatographe en phase gazeuse	
1) Injecteur	
2) Colonne	
3) Four	
4) Détecteur	
d) Étalonnage	
e) Méthode de lecture d'un chromatogramme en CPG	
<u>III - Partie expérimentale</u>	p.12
a) Infusion de feuilles de menthe	
b) Essais préliminaires en CPG	
c) Etalonnage	
d) Analyse des solutions d'extraction du menthol dans la menthe	
e) Amélioration des résultats	
1) Optimisation des conditions opératoires CPG	
2) Optimisation méthodes d'extraction	
<u>IV - Proposition de TP pour les STPI 2</u>	p.17
<u>Conclusion</u>	p.18
Sources	p.19
Annexes :	
- protocole d'hydrodistillation	
- protocole extraction par infusion de la menthe	
- protocole macération de la menthe (extraction par solvant)	
- protocole préparation des solutions d'étalonnage	
- proposition de TP	

Introduction



Le menthol est un alcool facilement reconnu pour son odeur et sa saveur unique. Il possède une large gamme d'utilisations, notamment dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

Dans l'Occident, c'est vers 1770 que le botaniste néerlandais H. David Gaubius a isolé le menthol pour la première fois de l'huile de *Mentha piperita*.

Avant la deuxième Guerre Mondiale, la production de menthol était contrôlée par le Japon et la Chine. Les chiffres des exportations indiquent 268 920 kg de menthol pour le Japon (1939) et 190 909 kg pour la Chine (1940). Les émigrants chinois et japonais commencent rapidement à cultiver la plante au Brésil. Ainsi, sa production culmine en 1960 à environ 3 000 000 kg.

Même si le prix et la demande du menthol fluctuent au fil des années, sa production augmente tous les ans. Après les années 80, la production du menthol recommence à augmenter. Cette hausse s'explique par le développement de nouvelles techniques de synthèse. Ainsi, en 2007, la production totale du menthol était estimée à plus de 26 000 000 kg.

CATÉGORIE DE PRODUIT	MENTHOL%
Hygiène buccale	28
Produits pharmaceutiques	26,6
Tabac	25,3
Confiseries	11
Produits de rasage	7
Divers	2,10

Domaine d'utilisation du menthol (en pourcentage)

Aujourd'hui, l'extraction et la production du menthol sont toujours des sujets de recherche intéressants et actuels. Bien qu'il existe de nombreuses procédures de synthèse, son extraction est toujours préférée.

Le but de ce projet P6 est de proposer un TP aux STPI 2 sur l'extraction du menthol et son analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Pour cela, nous allons tout d'abord vous présenter différentes méthodes d'extraction avant d'exposer le fonctionnement de la CPG. Ensuite nous présenterons les expériences que nous avons réalisées et finiront avec notre proposition de TP.

I - Les méthodes d'extraction traditionnelles

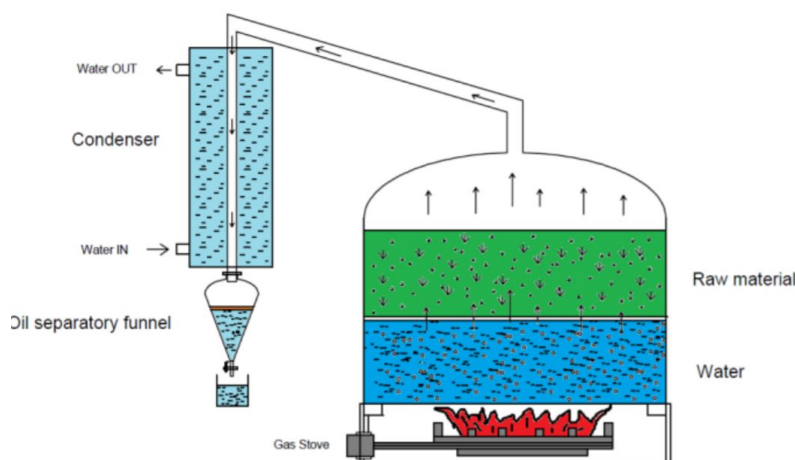
Il existe plusieurs méthodes d'extraction dont certaines ont été développées par les artisans parfumeurs bien avant l'essor de la chimie moderne. Le but de l'extraction est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un échantillon. Les méthodes d'extraction du menthol les plus couramment utilisées sont l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur, l'extraction par micro-ondes, l'extraction par fluide supercritique. Nous nous concentrerons principalement sur les trois premières, car elles nécessitent moins de matériel de laboratoire, les solvants utilisés sont moins chers et les protocoles sont plus faciles à suivre.

a) Distillation à la vapeur

La distillation à la vapeur est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, en raison de sa commodité économique. Cette méthode de distillation doit être effectuée à basse température, ce qui rend possible la séparation des substances non volatiles et des substances non solubles dans l'eau sous les points d'ébullition de chaque composant discret.

La masse d'huiles extraites (en g) / 100 g de feuilles de menthe variait entre 74% et 79%.

Les autres composants étaient : alpha-pinène, sabinène, beta pinene, myrcene, 3-octanal, limonene.



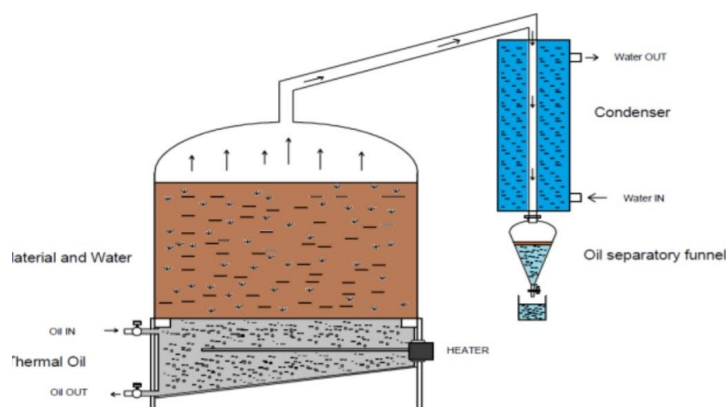
b) Hydrodistillation

Voir le protocole en annexe n°1

L'hydrodistillation consiste à récupérer les huiles essentielles contenues dans les végétaux par de la vapeur d'eau. La matière première aromatique naturelle est mise dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Sous l'action de la chaleur, les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes qui sont entraînées par la vapeur d'eau formée. Elles passent dans un réfrigérant pour y être condensées par refroidissement. La séparation de l'eau et de l'huile essentielle se fait par différence de densité dans un décanteur ou essencier. L'eau décantée appelée hydrolat reste très parfumée.

Les feuilles séchées sont soumises à une hydrodistillation pendant 3h à 30 degrés en utilisant un appareil de type Clevenger qui permet de réduire la perte d'huile essentielle dû à la dilution dans le solvant, de plus cela permet également de réduire le volume global d'eau, initialement nécessaire à la distillation. L'appareil réalise le processus de distillation par ébullition, condensation et décantation pour séparer l'huile. L'huile essentielle distillée a été séchée sur le sulfate de sodium anhydre. Après dessiccation, une filtration a été effectuée, l'huile essentielle obtenue a été stockée à -4 degrés C.

- ❖ La masse d'huiles extraites (en g) / 100 g de feuilles de menthe variait entre 78% et 82%.
- ❖ Autres composants : isomenthone



c) Extraction par solvant

1 - Par infusion

Le protocole est donné en annexe n°2

L'infusion est une technique d'extraction solide-liquide permettant d'extraire certaines des espèces chimiques présentes dans un composé solide (ici les feuilles de menthe) en les dissolvant dans un liquide (ici, l'eau) initialement bouillant que l'on laisse refroidir.

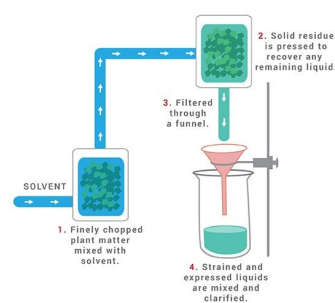
- ❖ Le solvant est pas cher et non-polluant
- ❖ Faible rendement



2 - Par macération

Le protocole est donné en annexe n°3

La macération consiste à laisser tremper un solvant pendant plusieurs heures, jours, ou alors semaines.

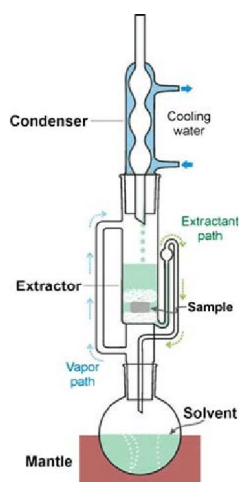


3 - L'extraction au Soxhlet

Le solvant est chauffé à reflux. Les vapeurs de solvant remontent le long d'un bras de distillation et se déversent dans la chambre qui abrite le solide. Le condenseur assure le refroidissement des vapeurs de solvant et les fait redescendre dans la chambre contenant le solide. Cette dernière se remplit lentement de solvant chaud. Une partie du composé désiré se dissout dans celui-ci. Lorsque la chambre Soxhlet est presque pleine, la chambre est vidée par le siphon. Le solvant est renvoyé dans le ballon de distillation. Le siphon veille à ce que le mouvement rapide du solvant ne transporte aucune matière solide vers la chaudière de distillation.

Le cycle se répète indéfiniment. On peut ainsi épuiser complètement le solide en quelques cycles sans intervention. Le résultat est équivalent à une série de macérations successives, mais cette technique ne nécessite pas un grand nombre d'opérations. De plus, cette méthode requiert nettement moins de solvant que la méthode des macérations successives pour une même efficacité d'extraction. L'intérêt est donc également économique.

- ❖ L'utilisation de buthanol et d'éthanol comme solvants donne les rendements les plus élevés.



Pour notre projet de P6 nous allons utiliser uniquement l'infusion et la macération pour extraire le menthol car les 2 techniques n'exigent pas beaucoup de matériel de laboratoire et les solvants sont non-polluants et pas chers. Si nous n'arrivons pas à extraire de la menthe, alors nous essaierons les autres méthodes.

Une fois le menthol extrait, il nous reste à vérifier sa présence dans notre échantillon et à en mesurer la concentration. Nous allons réaliser cette analyse à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse.

II - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Pour pouvoir évaluer l'efficacité de l'extraction il faut pouvoir connaître la teneur en menthol du distillat. Ainsi, nous allons utiliser une méthode d'analyse très répandue : la Chromatographie en Phase Gazeuse.

a) Principe des méthode chromatographiques

La chromatographie est un procédé qui consiste à séparer différents constituants d'un mélange afin de les identifier et de les doser. C'est une méthode très utilisée en analyse qui se base sur le principe d'équilibre des concentrations qui apparaît lorsque deux phases non miscibles sont mises en contact.

La première phase en chromatographie est désignée comme fixe ou stationnaire sur différents supports comme par exemple une colonne ou une plaque. La seconde phase est dite mobile et se déplace au contact de la première afin de porter l'élément à séparer.

Il existe différentes méthodes de chromatographie :

- **La Chromatographie Planaire** aussi appelée **chromatographie sur couche mince** ou CCM qui est sûrement la plus simple à mettre en place car elle ne demande aucune machine particulière. Elle est très utile pour séparer des molécules simples ayant des miscibilité avec la phase mobile très différentes. Elle est cependant très contraignante car modifier la vitesse de la phase mobile est impossible et cette dernière n'est même pas constante ;
- **La Chromatographie Ionique** ou CI est utilisée pour identifier différents ions minéraux ou organiques qui ne seraient pas identifiés en spectrométrie d'absorption et des molécules organiques à la condition que celles-ci soient polaires ;
- **La Chromatographie en phase supercritique** qui, comme son nom l'indique, utilise comme phase mobile des fluides supercritiques. Elle est utilisée pour les molécules thermolabiles ou possédant de grosses masses molaires ;
- **La Chromatographie d'exclusion stérique** qui trie les molécules par taille, très utile pour les polymères mais peu pour les petites molécules. Elle est le plus souvent utilisée en industrie dans les cas où il faut séparer des molécules avec de grands écarts de tailles ;
- **La Chromatographie liquide haute performance** propulse une phase mobile liquide sous haute pression dans une colonne.
- **La Chromatographie en phase gazeuse** consiste à faire passer le composé à analyser en phase gazeuse dans une colonne fixe très fine pour séparer les molécules assez volatiles et thermostables (<200°). Elle est très répandue car elle nécessite un temps de développement

rapide. Lorsque les molécules que l'on cherche à analyser sont moins volatiles ou thermolabiles, on se tourne vers une chromatographie liquide haute pression (HPLC).

b) Principe de fonctionnement

La CPG est une méthode de chromatographie utilisée principalement sur les composés volatiles et thermostables (**gazeux ou vaporisables par chauffage sans décomposition**). Comme les autres chromatographies, elle permet de séparer les composants d'un échantillon afin d'en déterminer la composition.

Le principe est assez simple. D'abord l'échantillon est rendu volatile dans un injecteur. Il est ensuite porté au travers d'une colonne capillaire par un gaz vecteur.

En effet, le produit à analyser est transporté tout le long de l'opération par un gaz appelé gaz vecteur, les plus utilisés étant l'hélium, le dihydrogène et le diazote. Ce dernier est injecté sous pression constamment et doit être pur. La principale propriété de ces gaz vecteurs est leur insolubilité dans les liquides. Leur signal électrique n'apparaîtra donc pas sur le chromatogramme.

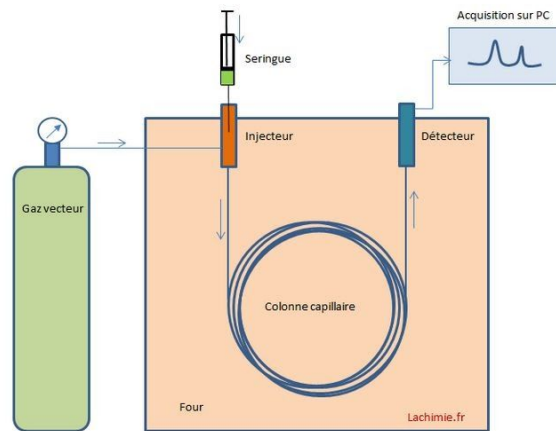
Ainsi, après avoir été vaporisé dans l'injecteur, l'échantillon est transporté dans la colonne. Celle-ci est recouverte d'une phase stationnaire permettant aux composants d'être séparés. Il s'agit d'un produit chimique ayant des affinités différentes avec les composants de l'échantillon. Ces composants vont alors être plus ou moins "freinés" par la phase stationnaire, c'est ce qu'on appelle la **Rétention Chromatographique**. Ils arriveront donc avec un temps de rétention différent au niveau du détecteur et propre à chaque composant

Il est aussi important de noter que la colonne est placée dans un four permettant de la maintenir à une température constante idéale à l'analyse.

Pour finir, les composants maintenant séparés arrivent à un détecteur. Celui-ci va mesurer le pourcentage de chaque élément au sein de l'échantillon. Ces éléments pourront ensuite être identifiés en fonction de leur temps de rétention à l'aide d'un échantillon de référence.

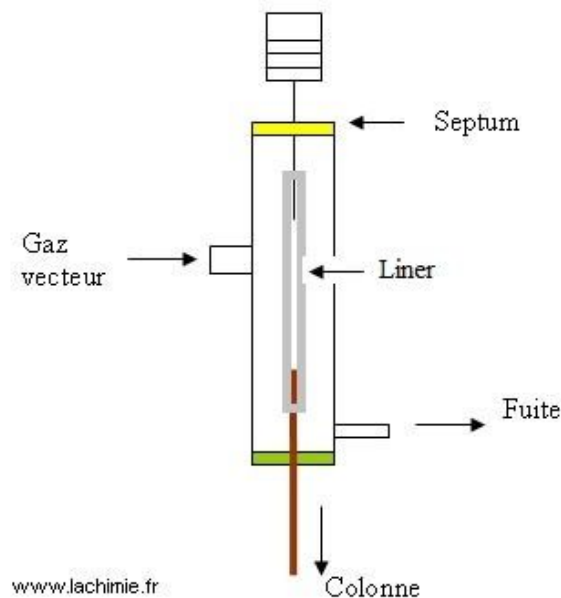
c) Éléments d'un chromatographe

Un chromatographe classique est équipé principalement de 4 éléments dont nous allons détailler les caractéristiques.



1 - L'injecteur

Comme on peut le voir sur le schéma ci-dessus, l'injecteur est l'élément dans lequel le produit à analyser est inséré. Sa fonction est de vaporiser l'échantillon, afin que ce dernier puisse être entraîné dans la colonne par la suite. L'injecteur lui-même est composé de plusieurs éléments permettant différents types d'injections.



D'abord, la micro seringue contenant l'échantillon passe au travers d'un Septum. Il s'agit d'une pastille auto obturante. Ainsi, lorsque la seringue est retirée, l'injecteur est étanche et l'échantillon rendu volatil ne peut s'échapper. Il est important de noter que la micro seringue peut être utilisée manuellement ou à l'aide d'un automate. Ce dernier permet d'automatiser le traitement de nombreux échantillons et est donc très répandu de nos jours.

Le bout de l'aiguille aboutissant dans le Liner, elle va y déposer l'échantillon. Le Liner est maintenu, tout comme le reste de l'injecteur, à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon.

Comme on peut le voir sur le schéma ci-dessus, l'injecteur dispose d'une entrée pour le gaz vecteur. Ainsi, ce dernier permet à l'échantillon de traverser le liner pour aller jusqu'à la colonne.

Le dernier élément de l'injecteur est une sortie appelée Split. Cette dernière va permettre de séparer 2 types d'injections : avec et sans split.

Pour résumer simplement, l'injection avec split consiste à injecter dans la colonne seulement une partie de l'échantillon de base. Le reste est évacué par la fuite. Ce ratio produit injecté / produit évacué est définissable par l'utilisateur et permet d'injecter de petites quantités d'échantillons concentrés sans devoir les diluer au préalable.

Lors d'une injection sans split (splitless), l'ensemble de l'échantillon va dans la colonne.

Il est aussi important de noter que parfois le produit est injecté à froid dans un injecteur "on column" depuis la seringue. Ce procédé permet entre autre d'éviter la dégradation des produits thermolabiles dû à la grande température de l'injecteur ainsi que d'éviter les effets indésirables du Septum tel que l'apparition de traces de polymères sur les chromatogrammes.

2 - La colonne

Comme expliqué dans la partie sur le fonctionnement d'un chromatographe, c'est dans la colonne que les éléments constituant l'échantillon vont être séparés. Cette dernière peut être de 2 types différents.

D'abord, les colonnes remplies. Celles-ci sont le plus souvent en inox ou en verre et mesurent environ 3 mètres. Elles sont remplies d'un support inerte imprégné de la phase stationnaire. Cette dernière consiste en un film liquide reposant sur des grains de silice. Les colonnes remplies sont maintenant très peu utilisées car remplacées par des colonnes capillaires permettant d'obtenir des pics très fins.

Contrairement aux colonnes remplies, les colonnes capillaires peuvent être très longues, jusqu'à 100 mètres. De plus, elles sont souvent en silice. La différence la plus importante est que la phase stationnaire est déposée directement sur les parois au lieu d'être sur des grains de remplissage de la colonne.

La CPG fonctionne sur le principe de séparation de composants à l'aide d'une colonne aussi appelée phase fixe dans laquelle est injectée la phase mobile c'est à dire les solutés à doser. Si la phase mobile est polaire, les composés polaires seront retenus plus longtemps que les apolaires. Si la phase mobile est apolaire, ce sont alors les composés apolaires qui seront retenus le plus longtemps. Ainsi, en connaissant la polarité de la phase fixe, on peut connaître et comparer les polarisations des éléments à doser.

De plus, plus la température d'ébullition est importante, plus les composés volatiles c'est à dire ceux avec la plus faible température d'ébullition, sortiront premiers de la colonne. La CPG est donc aussi un moyen de comparer les températures d'ébullition des différents composants d'un produit.

3 - Le four

Il s'agit simplement d'un four à chaleur tournante permettant de maintenir la colonne à une température constante. Il est généralement équipé d'un système de refroidissement rapide.

4 - Le détecteur

Le détecteur placé après la colonne peut être de différents types. En revanche, il s'agit toujours d'un détecteur très sensible.

Dans le cadre de nos manipulations, nous avons utilisé le type le plus répandu, un détecteur FID (Flame Ionization Detector). En français, cela donne : détecteur à ionisation de flamme. Lorsque les molécules traversent la flamme, elles sont brûlées et ionisées ce qui provoque entre deux électrodes un courant électrique qui est ensuite amplifié.

d) Étalonnage

Il existe 2 méthodes d'analyse classiques : la méthode de l'étalonnage et celle des additions standard (ou ajouts dosés).

La méthode des additions standard est une technique utile pour l'étalonnage, en particulier pour des échantillons occasionnels. Un ou plusieurs aliquotes de l'échantillon sont enrichis d'une concentration de l'étalon, et l'augmentation de la surface de pic est proportionnelle à l'ajout de la solution étalon. Cette méthode a l'avantage de vérifier que le temps de rétention de l'analyte inconnu est le même que celui de l'étalon.

En CPG, on utilise parfois comme méthode l'étalonnage interne qui consiste à enrichir l'échantillon et les étalons en une quantité égale d'un soluté dont le temps de rétention est proche de celui de l'analyte, mais ici nous avons fait un étalonnage simple (car nous n'avons pas de soucis de répétabilité des volumes injectés grâce à l'injection automatique).

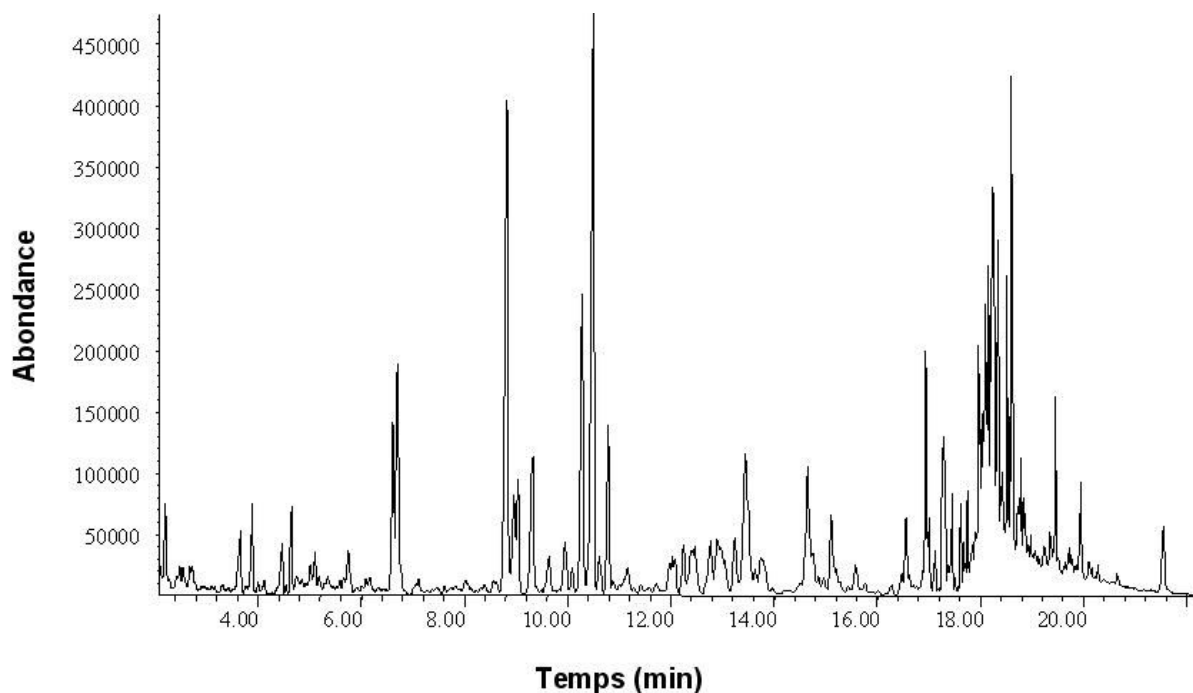
Habituellement, on réalise une droite d'étalonnage à l'aire des solutions étalons puis on utilise l'équation de celle-ci dans le but de déterminer la concentration en analyte des échantillons.

e) Méthode de lecture d'un chromatogramme en CPG

Un chromatogramme se présente sous la forme d'un graphique présentant plusieurs pics, plus ou moins grands.

En abscisse, on lit le temps de rétention. Celui-ci étant propre à une espèce chimique, il permet de caractériser la présence d'une molécule au sein de l'échantillon analysé.

En ordonnée, on retrouve un paramètre physique mesuré en sortie lié l'abondance du composant c'est à dire une valeur qui nous permet de déterminer la quantité présente de ce composant dans le produit.



L'aire du pic obtenue sur un chromatogramme est proportionnelle à la concentration dans le domaine de linéarité du détecteur.

Le but principal de ce projet est de mettre en place un TP d'extraction et d'analyse chromatographique. Cependant se contenter de recherches bibliographiques sur le sujet ne nous aurait pas permis d'adapter au mieux le TP selon le matériel du laboratoire et les capacités des élèves. Une partie expérimentale est donc essentielle dans ce projet.

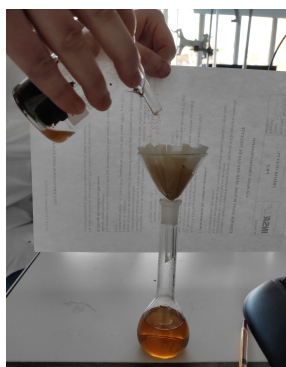
III - Partie expérimentale

Pour améliorer notre TP, nous avons comme projet de tester expérimentalement différentes méthodes d'extraction pour déterminer leur efficacité. L'analyse chromatographique étant différente pour chaque espèce il nous fallait aussi déterminer un protocole optimal pour réaliser des chromatogrammes exploitables. Cette partie est cependant moins fournie dû à la situation actuelle qui nous a empêchés de réaliser toutes les expériences que nous avions prévues.

a) Infusion de feuilles de menthe

Afin d'extraire le menthol contenu dans la menthe, nous avons réalisé une infusion des feuilles dans de l'eau. (*protocole en annexe n°2*)

Nous avons finalement obtenu une infusion de 50mL, de couleur pourpre foncé que l'on a ensuite analysé en CPG.



Filtration de notre macérat de menthe

b) Essais préliminaires en CPG

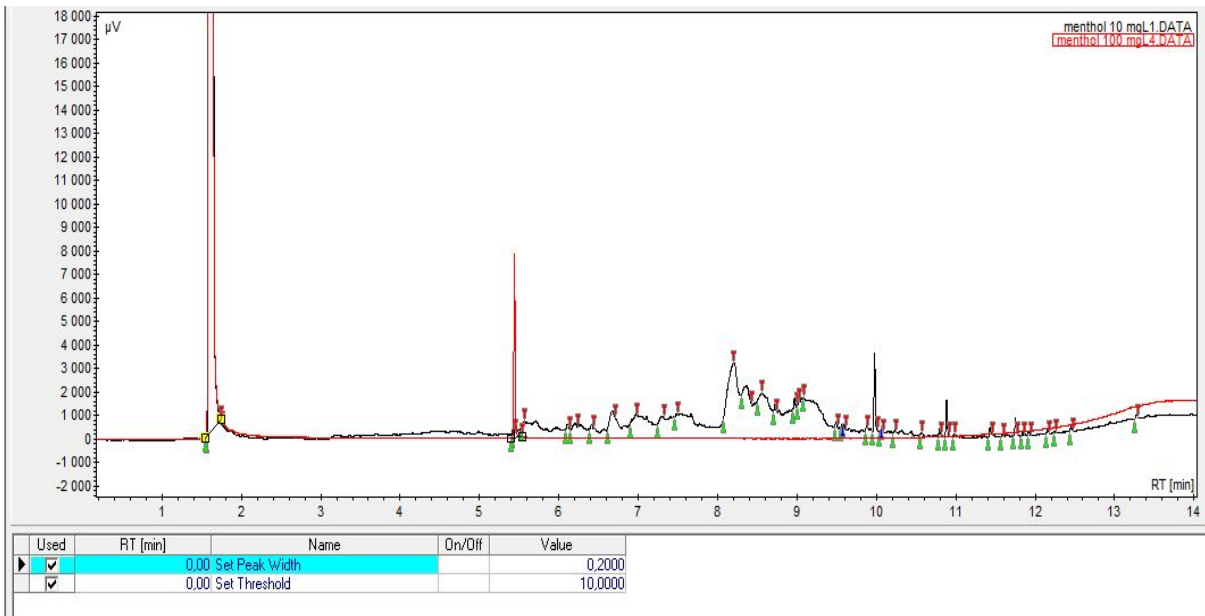
Pour notre acquisition du mardi 24 mars, nous avons préparé une solution étalon en diluant du menthol dans notre mélange 50/50 EtOH/Eau tel que sa concentration soit égale à 10 mg/L. (*voir annexe n°4*). Lors de notre premier essai, nous avons ainsi analysé le blanc, l'étalon 10 mg/L ainsi que l'échantillon de notre infusion.

Afin de réaliser nos acquisitions à l'aide de l'appareil Scion 436-GC Bruker, nous avons tout d'abord choisi les paramètres suivants : une phase stationnaire ZB5 composée de 5% diphenyl et de 95% polydiméthylsiloxane avec un diamètre 0.32 mm et une épaisseur de 0,25 μ m, avec une température maximale d'utilisation de 340°C.

La température de l'injecteur ainsi que du détecteur était de 250°C. Le gaz porteur était de l'hélium avec un débit de 1 mL/min. Nous avons injecté 0,2 μ L des échantillons dans la colonne avec un split de 1/30 et un run de 30 minutes. La température du four était de 80 degrés pendant deux minutes avec un gradient ensuite de 20 degrés par minute jusqu'à 300°C.

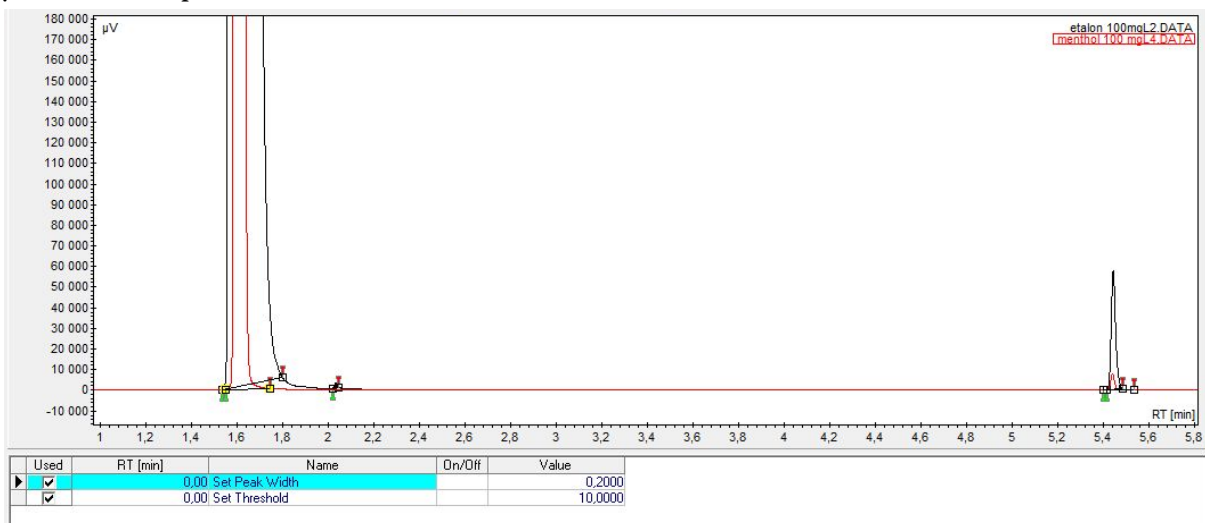
Cependant les résultats donnés par cet échantillon n'ont pas été concluants. En effet, nous avons obtenu un pic correspondant à un temps de rétention d'environ 5min50 mais celui-ci était d'intensité trop faible. On a réalisé un autre échantillon plus concentré de 100mg/L pour lequel le résultat a été plus lisible (valeur d'aire obtenue) et concluant. Malgré tout le signal n'était pas très intense.

Le premier pic très intense à 1min40 correspond à l'éthanol contenu dans les échantillons des deux solutions d'étalonnage. De plus on remarque beaucoup de bruit sur la courbe noire : la colonne était sale sur notre premier essai.



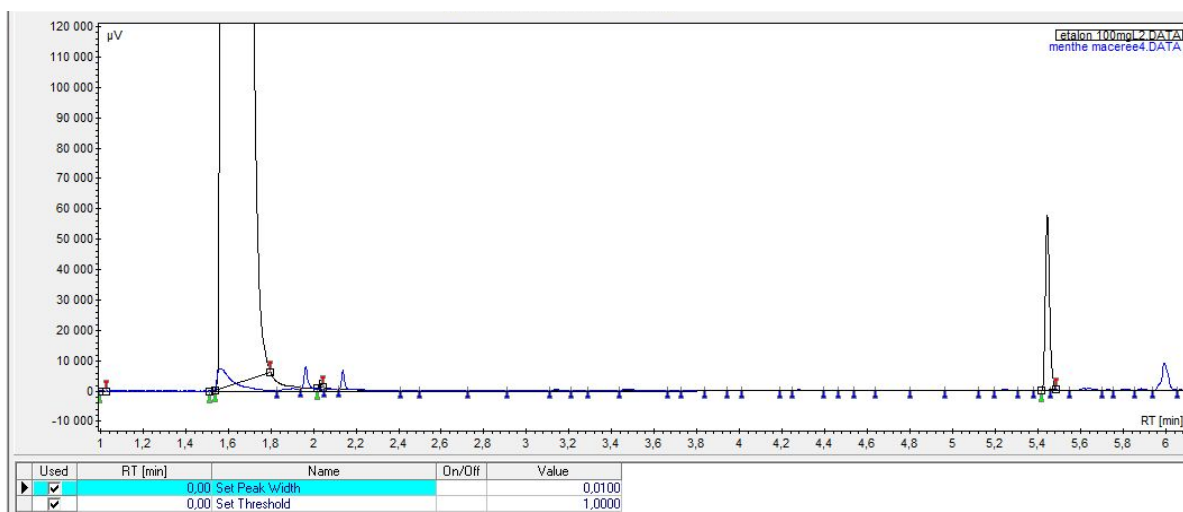
Première acquisition en CPG

Comme nous n'avions pas réussi à obtenir un pic pour le menthol dans notre macérât, nous avons réalisé une deuxième acquisition, le jeudi, en modifiant quelques paramètres. Nous avons injecté 1 µl des étalons dans la colonne. Le split a été augmenté à 1/10 tandis que la durée du run a été diminuée à 10,5 minutes. Enfin la température maximale est passée à 250°C car il n'y avait pas de pic après cette température. La vitesse du gradient en température a été conservée. L'étalon 100mg/L présente ainsi un pic avec un temps de rétention de 5min44 et une aire de 1296,9 µV/min correspondant au menthol.



Deuxième acquisition en CPG

Sur ce deuxième chromatogramme on observe bien l'augmentation d'aire liée au changement des paramètres chromatographiques pour la même solution étalon.



Comparaison en CPG de notre échantillon et des étalons

En comparant les chromatogrammes des étalons avec la courbe bleue correspondant à la menthe infusée on remarque qu'on ne détecte pas de menthol dans notre solution à cause de l'absence de pic bleu à 5min50. On peut expliquer cela par la possibilité que notre échantillon soit dégradé ou bien qu'il ne contient tout simplement pas de menthol extrait. En revanche, on observe un pic intense à 6 min, on peut supposer qu'il s'agit peut être de menthone. Pour vérifier cette hypothèse, nous aurions souhaité créer un nouvel échantillon à base de menthone que nous aurions injecté dans la CPG afin de regarder si on obtient un pic au même temps de rétention.

Afin de déterminer un ordre de grandeur de la teneur en menthol dans le macérât, nous aurions pu utiliser la solution étalon pour obtenir le coefficient de réponse du menthol et l'utiliser pour avoir un ordre de grandeur de la concentration en menthol du macérât qui nous aurait permis de calculer la teneur en menthol extrait de la menthe séchée en comparant les surfaces des pics des différentes solutions. Cependant, cela donne uniquement un ordre de grandeur et donc cette méthode est peu précise.

c) Etalonnage

Pour déterminer plus précisément la teneur en menthol, il faut utiliser la méthode de la courbe d'étalonnage. Pour cela, il faut préparer des étalons à 100, 200, 300, 400 et 500 mg/L puis les analyser.

On peut avoir juste une idée de l'équation de la courbe grâce à notre unique étalon.

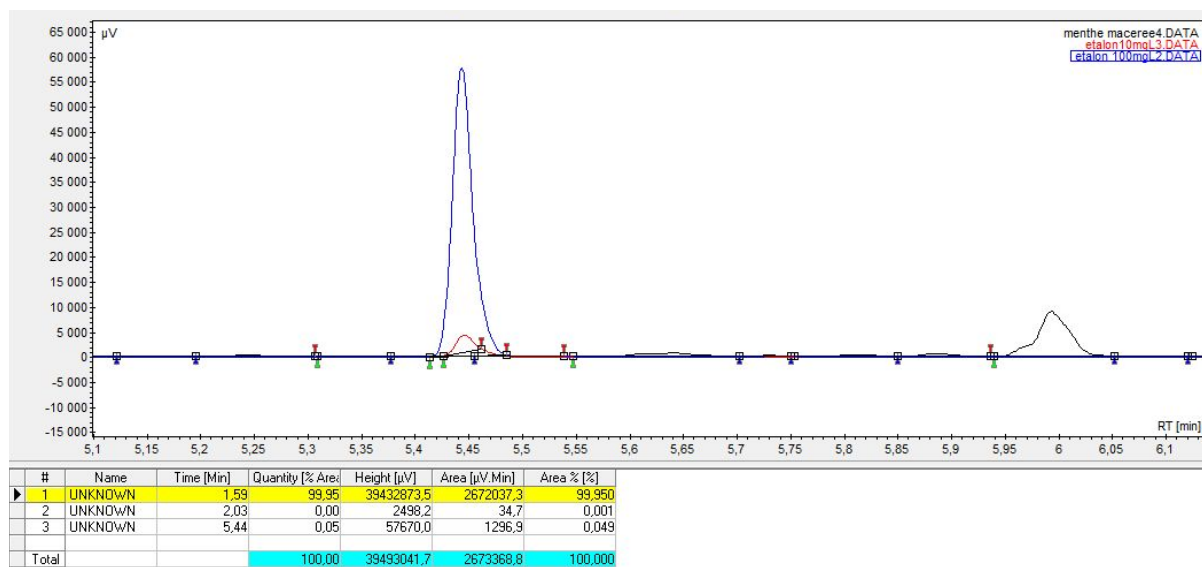
$$\text{Aire} = k \cdot c \text{ (mg/L)}$$

$$\text{C'est à dire ici } k = \text{Aire}/c = (1296,9 \text{ } \mu\text{V}/\text{min}) / (100\text{mg/L}) = 12969 \text{ (}\mu\text{V}\cdot\text{L}) / (\text{min}\cdot\text{g})$$

Après avoir calculé le facteur k et grâce à l'aire du pic de l'échantillon, on pourra déterminer la concentration en menthol de notre échantillon comme indiqué dans le paragraphe suivant.

d) Analyse des solutions d'extraction du menthol dans la menthe

En effet, sur les graphiques obtenus lors de notre CPG, nous avons pu prendre connaissance de l'air des pics du chromatogramme. Celles-ci sont indiqués dans le tableau situé en dessous du graphique.



Une fois la concentration des solutions obtenues nous aurions pu calculer les teneurs en menthol extrait grâce à la formule :

$$Teneur = \frac{\text{masse menthol obtenue}}{\text{masse de feuilles de menthe utilisée pour l'infusion}}$$

Cependant, notre CPG, n'ayant pas détecté de menthol dans notre échantillon, ne nous a pas permis de calculer une aire correspondante à la concentration en menthol.

La CPG nous aurait ainsi permis de déterminer la meilleure technique d'extraction du menthol en comparant les différentes teneurs obtenues pour chacune d'entre elles.

e) Amélioration des résultats

Pour augmenter le rendement d'extraction et la précision sur les résultats obtenus, il faut trouver respectivement la meilleure méthode d'extraction et les meilleures conditions opératoires pour la CPG.

Les résultats obtenus suite à ces deux expériences ne sont pas concluants. Ils peuvent venir du fait que nous avons trop attendu avant d'analyser notre échantillon de menthe infusée, ou bien peut être du solvant utilisé pour extraire notre menthol qui n'était pas efficace.

1) Optimisation des conditions opératoires CPG :

Si nous avons eu plus de temps, nous aurions pu essayer d'améliorer les conditions d'acquisitions en CPG en modifiant certains paramètres.

Tout d'abord il s'agit du choix de la colonne qu'il faut choisir de manière à ce qu'elle soit adaptée au type de séparation souhaitée.

Ainsi, il faut prendre en compte différents facteurs lors de ce choix :

1. Régler le débit pour avoir la Hauteur équivalente à un Plateau Théorique (HEPT) tel que le rapport $\frac{\text{la longueur colonne}}{\text{le nombre de plateaux théoriques efficaces}}$ soit le plus petit possible
2. Régler la température d'analyse afin que le temps d'analyse soit le plus court possible et que la résolution (séparation des pics) soit suffisante. (Normalement, si on travaille à haute température, la vitesse de diffusion est plus implorante donc on aura une meilleure séparation). Cependant si T augmente alors le temps de rétention diminue et la séparation est moins bonne.

Puis lors des acquisitions, il y a trois paramètres à optimiser :

- o La rapidité
- o La sensibilité
- o La résolution – des pics bien séparés et étroits => calcul plus précis de l'aire

Les 3 paramètres étant interconnectés, il faut trouver un compromis.

2) **Optimisation méthode d'extraction :**

Pour augmenter le taux d'extraction, lors d'une infusion il faut étudier l'influence de la température, solvant et le volume de solvant utilisé par gramme de feuilles de menthe. En faisant varier les 3 paramètres, on pourra éventuellement améliorer les conditions d'extraction pour avoir un rendement plus fort.

Si le rendement reste faible, il sera nécessaire d'explorer les autres méthodes traditionnelles d'extraction comme l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur ou encore l'extraction assisté par micro-ondes. Cependant, là encore, nous avons manqué de temps.

IV - Proposition de TP pour les STPI 2

Le but de ce projet étant de proposer un TP d'initiation à la CPG aux STPI2, vous trouverez *en annexe le protocole* correspondant à ce TP.

Dans ce dernier, nous avons d'abord présenté certaines notions indispensables afin de comprendre comment fonctionne une chromatographie en phase gazeuse. Ensuite, les élèves devront réaliser des infusions ou des macérations à l'aide de différents solvants afin d'extraire le menthol contenu dans des feuilles de menthe. Puis, ils devront préparer des solutions d'étalonnage afin de réaliser une courbe d'étalonnage pour leur CPG. Après avoir analysé leurs solutions obtenues lors de l'extraction de menthol, ils devront comparer les courbes d'étalonnage à celle de leur échantillon. Ainsi, si les temps de rétention correspondent aux espèces souhaitées, ils pourront obtenir la concentration de leur solution en calculant l'aire sur leur chromatogramme.

Conclusion

Tout d'abord, nous devons obligatoirement parler du contexte particulier dans lequel ce projet a été réalisé. La situation de crise provoquée par l'épidémie de Covid-19 qui a touché le pays a forcé l'INSA à fermer ses portes alors que nous venions à peine de réaliser les premières expériences. Nous avons donc été forcés de prendre une direction beaucoup plus théorique pour notre projet.

Malgré cela, nous avons pu développer de nombreuses connaissances et compétences qui nous seront assurément utiles plus tard. D'abord, nous avons étudiés les avantages et inconvénients de nombreuses méthodes d'extractions telles que la macération ou l'hydrodistillation. Dans un deuxième temps, nous avons appris à utiliser une technique de chromatographie très utilisée en chimie analytique : la chromatographie en phase gazeuse. Ainsi en plus d'étudier le fonctionnement de cette méthode, nous avons eu l'occasion de réaliser quelques expériences afin d'évaluer l'efficacité de différents solvants utilisés en macération.

Sur le plan travail de groupe, nous nous sommes initiés à l'utilisation de Trello, une application permettant de planifier le travail et de partager des documents. Et si l'utilisation des outils permettant le travail et les communications à distance étaient déjà importantes avant le confinement, elle s'est ensuite avérée indispensable. En alternant entre les logiciels Discord et Zoom, nous avons tout de même réussi à nous réunir de façon hebdomadaire afin de demander des conseils à notre professeur, partager le travail réalisé, et prévoir celui de la semaine suivante.

Notre objectif principal était de préparer un TP sur l'extraction et surtout l'analyse par CPG du menthol, qui sera réalisé par de futurs étudiants de l'INSA. Sur ce point, l'objectif est atteint. Cependant, à cause de la fermeture des laboratoires de l'école, nous n'avons pas pu optimiser nous-même le protocole. Pour choisir le solvant d'extraction avec le meilleur rapport risque minimal/efficacité, nous avons été obligés de nous baser sur des résultats qui n'étaient pas les nôtres et que nous n'avons pas pu vérifier par nos propres expériences.

Malgré une bonne réalisation générale du projet, nous avons rencontré quelques légers problèmes. D'abord, sur l'unique échantillon expérimental que nous avons eu l'occasion de faire, nous n'avons pas réussi à détecter de menthol lors de notre CPG, sûrement à cause d'une attente trop longue entre l'extraction et l'analyse. Ensuite, il y a parfois eu quelques petits problèmes de communication, notamment sur la répartition du travail. Toutefois cela ne nous a pas empêché de mener à bien notre projet.

Pour conclure, cette expérience nous a permis d'acquérir ou de renforcer de nombreuses compétences et connaissances, aussi bien théoriques que expérimentales. Mais mieux encore, nous avons développé des compétences relationnelles et de communication liées au travail de groupe qui nous serviront toute notre vie aussi bien dans notre vie privée qu'en entreprise dans un cadre professionnel.

Sources

- <https://www.compagnie-des-sens.fr/differences-huiles-essentielles-menthes/https://www.compagnie-des-sens.fr/differences-huiles-essentielles-menthes/>
- Informations sur les différentes menthes et comparaison de celles-ci
- Support de cours des CFI3 sur la CPG pour obtenir des informations sur celle-ci
- <http://tpe-huile-essentielle.e-monsite.com/pages/i-les-differents-procedes-d-extraction-d-u-ne-huile-essentielle/7-hydrodistillation.html>
 - Informations sur l'hydrodistillation
- Notice sur le fonctionnement de la CPG fourni par la professeure
- Priscilla P. Almeida & Natália Mezzomo & Sandra R. S. Ferreira , Extraction of Mentha spicata L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition
 - Données sur l'extraction de la menthe
- Iqra Batool, Shafaq Nisar, Lamia Hamrouni and Muhammad Idrees Jilani: Extraction, Production and Analysis Techniques for Menthol: A review
 - Données sur la production et l'extraction de la menthe
- Jianming Dai, Valerie Orsat , G.S. Vijaya Raghavan, Varoujan Yaylayan :Investigation of various factors for the extraction of peppermint (Mentha piperita L.) leaves
 - Recherches sur les facteurs influençant l'extraction de feuilles de menthe
- Analytical Chemistry 7e by Gary D. Christian
 - Données sur la chimie analytique
- John C. Leffingwell: Cooling Ingredients and Their Mechanism of Action
- <https://phytochemia.com/fr/2014/08/11/les-analyses-par-gc-partie-ii-le-detecteur-a-ionisation-de-flamme-fid/>

Annexe n°1:

Protocole d'hydrodistillation du menthol et de son extraction

Matériel nécessaire :

- Un chauffe-ballon muni d'un thermostat, un support élévateur
- Un ballon à tube à dégagement latéral (250 mL), un réfrigérant à eau
- Deux potences, deux noix de serrage et deux pinces quatre doigts
- Une éprouvette graduée de 200 mL, un erlenmeyer de 250 mL muni d'un bouchon
- Un bécher de 100 mL, une spatule, un mortier et un pilon
- Du chlorure de sodium en poudre, feuilles de menthe poivrée
- Graines de pierre ponce
- Entonnoire, papier filtre
- Ampoule à décanter

Notre expérience se réalisera en deux étapes : l'hydrodistillation puis l'extraction par un solvant.

Dans un mortier, introduire 5,0 g de feuilles de menthe puis écrasez les dans de l'eau distillé à l'aide d'un pilon.

Une fois le mélange obtenu, transvaser-le dans un ballon de 250 mL avec un entonnoire et un papier filtre, en le rinçant avec environ 150 mL d'eau distillée. Ajouter quelques grains de pierres ponces (elles servent à réguler l'ébullition en favorisant la formation de bulles d'air au sein du mélange réactionnel.).

Réaliser le montage d'hydrodistillation afin de pouvoir porter le mélange à ébullition. Puis laisser la distillation se produire jusqu'à l'obtention d'environ 20 mL de distillat. Enfin ajouter 1g de chlorure de sodium dans le distillat et agiter jusqu'à sa dissolution, car le menthol obtenu (ou huile essentielle) et très peu soluble dans l'eau salée. Le distillat obtenu contient une phase aqueuse et une phase organique.

Une fois l'hydrodistillation effectué, nous nous concentrons sur l'extraction de la phase organique, c'est à dire de l'huile essentielle (menthol) obtenu par un solvant. Nous avons choisis comme solvant le cyclohexane ou bien l'éther éthylique qui sont tout les deux très soluble avec l'huile essentielle et possèdent une densité équivalente. Ainsi dans une ampoule à décanter, introduire le distillat obtenu avec 2 mL de solvant. Après agitation, dégazage et décantation, récupérer la phase organique dans un erlenmeyer en éliminant la phase aqueuse qui se trouve dans le bas de l'ampoule. Pour obtenir un produit plus propre nous effectuons très souvent un séchage de la phase organique afin d'éliminer toute trace restante d'eau.

Annexe n°2 :

Protocole d'une extraction par infusion de la menthe

Matériels nécessaire :

- feuilles de menthe poivrée
- bécher de 100 ml
- thermomètre
- plaque chauffante
- agitateur magnétique
- fiole jaugée
- entonnoire et papier filtre
- flacon de 50 mL pour mettre l'infusion

Dans un bécher on met les feuilles de menthe hachées, environ 5g, en faisant attention à ne pas prendre les branches, puis on ajoute 40 mL d'eau distillée. On chauffe le mélange entre 50°C et 60°C et on agite le tout à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 min. A l'aide d'un entonnoire et d'un papier filtre on verse le mélange dans une fiole jaugée de 25 mL que l'on complète avec de l'eau distillée afin d'avoir un volume plus précis.

Annexe n°3 :

Protocole de macération de la menthe (extraction par solvant)

Matériel nécessaire:

- feuilles de menthe poivrée
- bocal refermable
- erlenmeyer de 200 mL
- entonnoir et papier filtre
- fiole jaugée 50 mL

Dans un bocal refermable on met les feuilles de menthe hachées qu'on recouvre de 30 mL d'éthanol qu'on a choisi comme solvant pour cette macération.

On a ensuite laissé notre macération reposer pendant 20 minutes. Enfin à l'aide d'un entonnoir et d'un papier filtre on verse le macérât obtenu dans un erlenmeyer de 200 mL préalablement pesé, que l'on remplit par la suite jusqu'au trait de jauge avec le solvant. Pour connaître le poids du produit obtenu on pèse de nouveau l'erlenmeyer et on soustrait au poids sans produit.

Annexe n°4 :

Protocole préparation des solutions d'étalonnage

Matériel nécessaire :

- Deux fioles de 100mL
- Une solution mère, noté S0, de menthol à 1g/L dilué dans un solvant eau/éthanol 50/50
- Pipette 1mL
- Pipette 10mL

Prélever 1mL de la solution S0 et la placer dans une fiole de 100mL puis Diluer et compléter avec le solvant. Il s'agit de la solution S1 de concentration $c_1 < c_0$

Prélever 10mL de la solution S0 et la placer dans une fiole de 100mL puis Diluer et compléter avec le solvant. Il s'agit de la solution S2 de concentration $c_2 < c_1$

Annexe n°5 :

Proposition de TP

Voir le fichier joint avec le rapport.