

**Projet de Physique P6**  
**STPI/P6/2020 – N°10**

**MACERATION D'ECORCES D'ORANGES  
PUIS DOSAGE DU LIMONENE EN CPG**



**Etudiants :**

**Jeanne CASENAVE**

**Amandine DE WARREN**

**Zoé LAROCHE**

**Flore LEROUX**

**Victoire LIAGRE**

**Hugo PASQUALINI**

**Enseignant-responsable du projet :**

**Isabelle DELAROCHE**



Date de remise du rapport : **15/06/2020**

Référence du projet : **STPI/P6/2020 – N°10**

Intitulé du projet : **Macération d'écorces d'oranges puis dosage du limonène en CPG**

Type de projet : **Projet expérimental de chimie**

Objectifs du projet :

**L'objectif pratique de ce projet est d'extraire et de doser le limonène présent dans une écorce d'orange. Pour cela, il y a deux sous-objectifs principaux :**

- **Ecrire et réaliser un protocole d'extraction.**
- **Découvrir la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et l'utiliser pour doser notre macérat.**

**Il y a par ailleurs, d'autres objectifs apportés par le projet :**

- **Travail en groupe**
- **La répartition des tâches**
- **La coordination**
- **La prise d'initiatives**
- **L'autonomie pour les manipulations.**

Mots-clefs du projet : **extraction-dosage-manipulations-CPG**

## TABLE DES MATIERES

### Table des matières

Introduction.....	5
Methodologie/organisation du travail .....	6
I. Partie bibliographique .....	7
A. Limonène et huiles essentielles .....	7
B. Méthodes d'extraction .....	8
1. Extraction solide-liquide (ESL) .....	8
2. Hydrodistillation .....	10
C. Méthodes d'analyse .....	13
1. Histoire de la chromatographie .....	13
2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	13
3. Chromatographie en phase liquide (CPL).....	14
II. Partie expérimentale.....	15
A. Présentation des méthodes retenues .....	15
1. Méthode d'extraction sélectionnée.....	15
2. Méthode d'analyse sélectionnée.....	15
3. Développement de la méthode analytique.....	15
B. Résultats expérimentaux.....	17
1. Etalonnage.....	17
2. Conclusion des expériences .....	19
Conclusion.....	20
Bibliographie.....	21
Annexes.....	22

## **INTRODUCTION**

Dans le cadre du cours de projet physique dispensé en STPI2 à l'INSA de Rouen-Normandie, nous avons réalisé le projet suivant : « *Macération d'écorces d'oranges puis dosage du limonène en CPG* ».

Nous avons choisi ce projet, pour différentes raisons. Premièrement nous avons tous un intérêt particulier pour la chimie des molécules. Deuxièmement, nous voulions approfondir nos connaissances et expérimenter de nouvelles techniques en laboratoire et notamment découvrir la chromatographie en phase gazeuse.

L'objectif de ce projet est d'extraire et doser le limonène présent dans les écorces d'oranges. Cette molécule est souvent utilisée dans le domaine alimentaire, la cosmétique, la parfumerie ou encore dans le milieu médical.

Pour mener à bien notre projet, nous avons effectué dans un premier temps, de nombreuses recherches bibliographiques pour déterminer les méthodes d'extraction les plus adaptées. Nous souhaitions les expérimenter, mais nous avons été limités dans nos expériences suite à la crise sanitaire due au Covid-19. Par ailleurs, nous avons pu faire une première analyse de CPG.

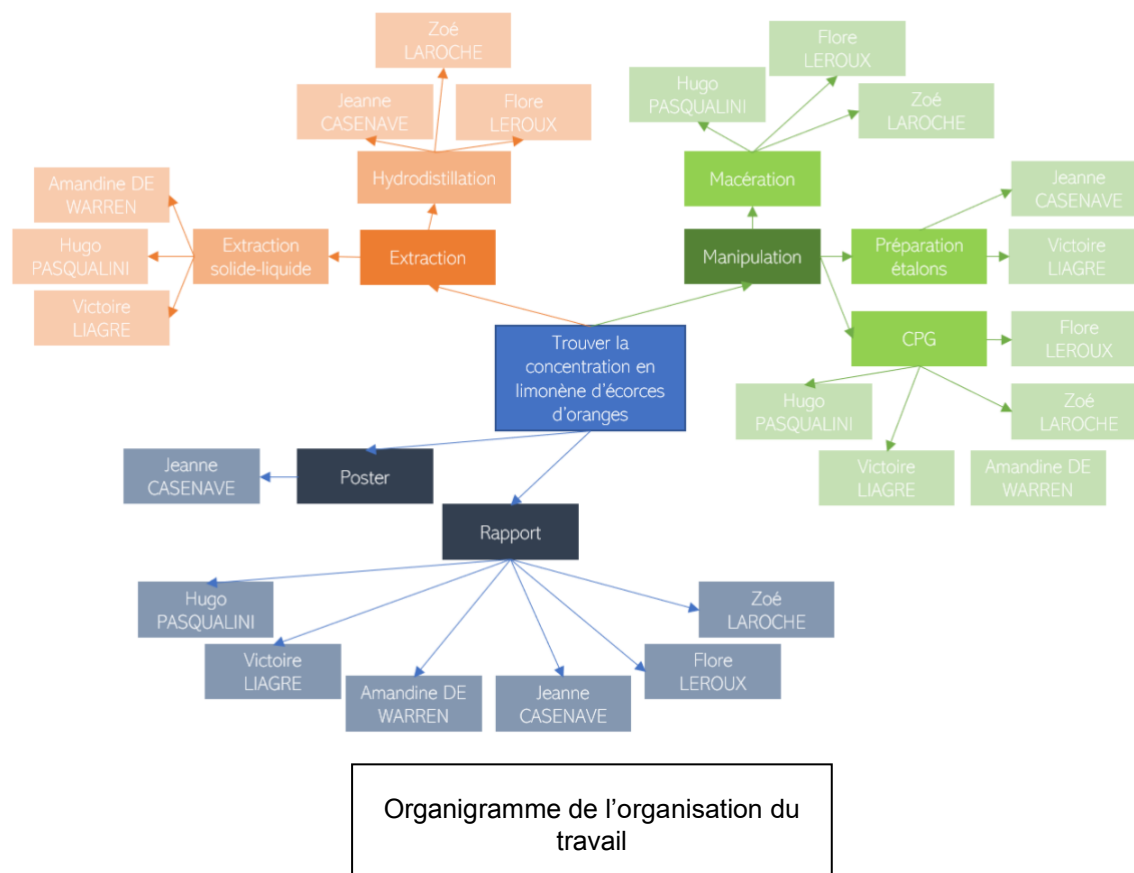
Pour présenter notre travail sur le sujet, nous allons dans un premier temps, pour chaque méthode d'extraction et d'analyse envisagée, expliquer leurs avantages, leur efficacité et la facilité de leur réalisation. Nous allons dans un second temps, expérimenter les différentes méthodes afin de pouvoir les comparer et ne retenir que la meilleure. Enfin, nous rédigerons un protocole de TP pour les STPI2.

## METHODOLOGIE/ORGANISATION DU TRAVAIL

L'un des objectifs de ce projet était de travailler en « grand groupe », groupe de 6 personnes. Jusqu'alors, nous avons travaillé maximum en groupe de 3 ou 4 sur des projets, comme le TPE en année de première. Il était donc très intéressant pour nous d'apprendre à s'adapter dans un groupe plus important. En effet, il a fallu que chacun trouve sa place, puisse s'exprimer tout en apprenant à écouter les autres et à s'adapter. Dans cette partie, nous allons développer notre méthodologie de travail et notre organisation.

Tout d'abord, nous avons commencé notre projet par de la recherche bibliographique. En effet, nous avons chacun cherché des méthodes d'extraction et ce qu'était la chromatographie en phase gazeuse. La mise en commun de ces premières recherches nous a permis de nous diviser en deux groupes. Un premier qui travaillait sur l'extraction solide-liquide et un autre sur l'hydrodistillation. Chaque groupe devait élaborer un protocole pour pouvoir ensuite le mettre en place. Une première extraction solide liquide a été menée comprenant une macération et la préparation d'un étalon. Cependant, suite à la situation sanitaire exceptionnelle à laquelle nous avons dû faire face, nous avons décidé d'annuler la séance dédiée à l'hydrodistillation afin de réaliser une analyse en CPG du macérat obtenu. A la suite de cette manipulation, nous avons été confinés. Ainsi, les séances suivantes ont été dédiées à l'analyse des résultats et à la rédaction du rapport. Chaque semaine, nous nous réunissions sur Zoom avec notre enseignant-responsable afin de mettre en commun nos avancées et discuter autour de ce qui avait été fait durant la semaine.

Ci-dessous, un organigramme de la répartition des tâches a été réalisé.



# I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

## A. Limonène et huiles essentielles

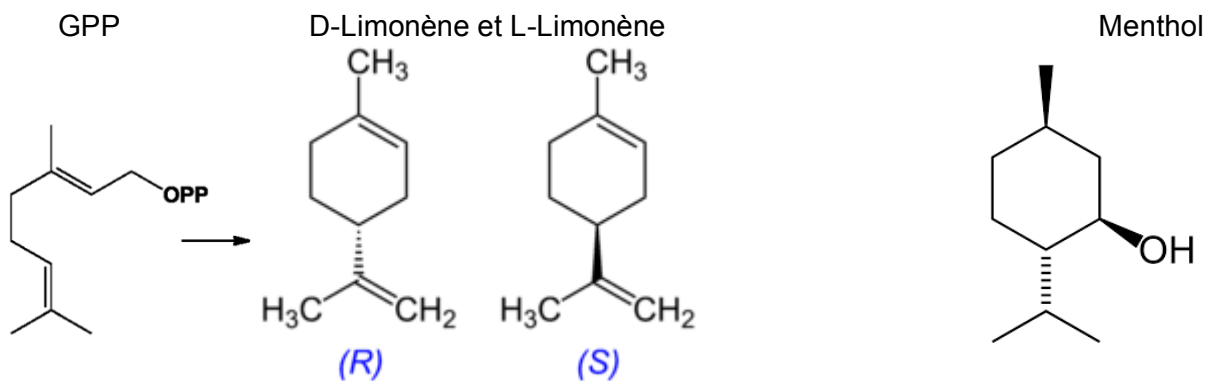
Nous vivons dans un monde aujourd'hui où les huiles essentielles prennent une place de plus en plus importante dans nos vies, que ce soit en parfumerie, pour le traitement de maladies ou problèmes physiques, etc. Cependant, nous en parlons beaucoup sans savoir exactement ce que sont les huiles essentielles. Nous pouvons donc nous demander comment sont définies les huiles essentielles, et comment nous avons exploité ce produit de la nature, de son origine jusqu'à aujourd'hui.

Tout d'abord, les huiles essentielles sont, d'après la définition de l'AFNOR, des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques. Les premières traces retrouvées des huiles essentielles remontent à l'époque de l'Égypte antique. On les obtenait après une distillation sommaire (macération à l'eau bouillante puis essorage). Leur utilisation était sacrée, donc privilégiée pour la médecine, la parfumerie, les cosmétiques, et les embaumements. On retrouve ensuite l'utilisation d'huiles essentielles dans toutes les grandes civilisations (Chine, Grèce, Empire Romain, etc.) toujours pour les mêmes fins. Cependant, ce n'est que récemment que leur utilisation connaît un tournant avec René-Maurice Gattefossé. En 1931, il écrit un ouvrage intitulé *Aromathérapie* dans lequel il met en relation les structures et les activités des différentes huiles essentielles selon leurs composants biochimiques. C'est la première personne à utiliser le terme de « soins par les huiles essentielles ». Cependant, c'est le Docteur Valnet qui démocratisera l'aromathérapie en Europe Occidentale grâce à l'ouvrage *Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes*, reprenant ainsi le travail de Gattefossé. Intéressons-nous maintenant à leur composition chimique.

Deux points importants sont à noter sur leur composition. Tout d'abord, elle est très complexe. En effet, si on enlève les constituants majeurs de l'huile (ceux qui donnent les propriétés physico-chimiques majeures), il reste un nombre énorme de constituants présents en traces. Le second point réside dans la proportion des constituants. En effet, certains éléments considérés comme majeurs dans la composition de l'huile ne représentent qu'une faible proportion du total, mais sont déterminants sur le plan gustatif, olfactif, etc. On peut prendre un exemple qui illustre ces deux points : l'huile essentielle de rose Bulgare. Parmi ses 275 constituants, 14 ont un rôle important : 9 représentent 85% du total et 5 représentent 1% du total mais sont déterminants sur le plan olfactif.

Nous allons à présent approfondir les recherches sur un des constituants majeurs des huiles essentielles : le limonène.

Le limonène, ou 1-méthyl-4-prop-1-èn-2-yl-cyclohexène, est une molécule qui appartient aux monoterpènes : ensemble de deux molécules d'isoprène  $C_5H_8$  assemblées linéairement cycliquement. Elle tire son nom du citron, pour une raison simple. En effet, elle permet au citron d'avoir son goût, que l'on connaît tous. Cependant, le limonène donne également le goût à l'orange. On peut donc se demander comment est-ce possible ? La réponse à cette question réside dans sa configuration. Dans la molécule de limonène, on retrouve un carbone asymétrique près du groupement isopropényle. Si on prend l'énantiomère R du limonène, appelé également D-Limonène, on obtient le goût de l'orange. En revanche, l'énantiomère S, le L-Limonène, donne le goût de citron.



Enfin, nous pouvons nous demander pour quelles raisons nous retrouvons du limonène dans plusieurs huiles essentielles, et pas seulement dans celles de citron et d'orange. Pour répondre à cette question, il est nécessaire de se pencher sur sa formation. Sans rentrer dans les détails, le limonène provient du pyrophosphate de géranyle (GPP), qui est considéré comme le précurseur des monoterpènes. Suivant les transformations qu'il subit, il devient des molécules de limonène, menthol, camphre etc., tous des monoterpènes donc proches dans leur composition. Il est donc normal de retrouver du limonène dans les fruits contenant du GPP, car ce dernier ne peut pas se transformer parfaitement en un monoterpène, mais en plusieurs dérivés suivant la nature de la transformation.

## B. Méthodes d'extraction

### 1. Extraction solide-liquide (ESL)

- A quoi l'ESL sert-elle ?

L'extraction solide-liquide (ESL) est un processus très commun dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique et alimentaire afin, entre autres, d'obtenir des ingrédients naturels, des arômes et fragrances à partir de matières premières brutes. Quelques exemples plus précis de domaines d'application : l'obtention d'huile de fruits oléagineux ou le lavage de minerais.

- Quel est son principe ?

L'ESL permet d'extraire un liquide ou un solide en utilisant un liquide comme solvant d'extraction. Pour choisir un solvant dans lequel l'espèce chimique à extraire y soit le plus soluble possible, il faut tenir compte de la solubilité de l'espèce dans ce solvant (elle doit être la plus grande possible). La solubilité d'une espèce chimique dans un solvant est égale à sa concentration dans une solution saturée de cette espèce dans le solvant considéré. Elle s'exprime en g/L.

Il existe différentes méthodes d'extraction solide liquide, notamment : la décoction, l'infusion, la digestion, la macération, etc.

C'est cette dernière qui nous intéresse et que nous allons développer.



- **La macération :**



La macération remonte à l'antiquité. Tout comme la décoction ou l'infusion, il s'agit d'une technique d'extraction solide-liquide destinée à retirer d'une substance solide les espèces chimiques qu'elle contient en les dissolvant dans un liquide (voir plus loin en quoi la macération se distingue des 2 autres techniques citées).

Cette technique est le plus souvent mise en œuvre avec des parties végétales (feuille, fleur, racine, écorce, etc.) en utilisant un solvant qui peut être de l'eau, de l'alcool ou souvent une huile ou une autre matière grasse.

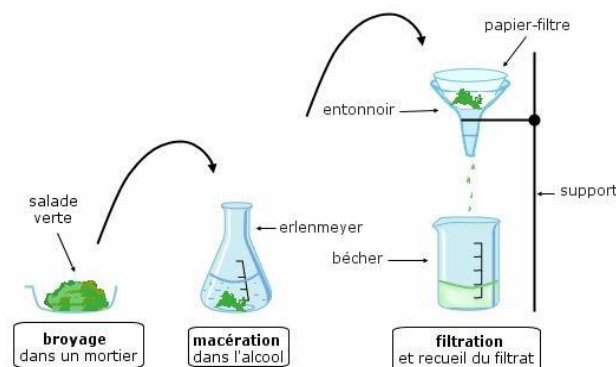
Voici les principaux domaines d'application de la macération : la cuisine avec la conservation des aliments ; la cosmétique ; la phytothérapie, qui est le traitement des maladies par les plantes ; la purification des minerais ; ou encore la vinification.

- Comment la réaliser ?

La macération se fait en plongeant directement les substances solides dans un liquide. Ces dernières sont en général laissées en suspension pendant un certain temps qui peut aller de quelques heures à quelques jours.

On dit que la macération est une extraction "à froid", c'est-à-dire qu'elle se fait à température ambiante. On appelle macérat le produit de la macération.

A la fin du processus on retire du solvant les résidus solides, cette étape se fait généralement par filtration.



Citons un exemple concret de la réalisation d'une macération. Dans la viticulture, la macération correspond au trempage des grappes de raisin et des solides dans le moût où l'alcool présent joue le rôle de solvant. Il permet d'extraire la couleur, les tanins et les arômes des pellicules pendant la fermentation du vin.

- En quoi la macération se distingue de l'infusion et de la décoction ?

La différence majeure réside dans les conditions opératoires. En effet, lors de l'infusion, le liquide est bouilli puis refroidi, quant à la décoction, pour la réaliser, le liquide est maintenu en ébullition, à la différence de la macération où tout se passe à température ambiante.

- Quels mécanismes chimiques participent à la macération ?

La macération est un processus de dissolution d'espèces solides dans un liquide (aussi appelé solvant). Pour que cette dernière se réalise, il faut que les espèces chimiques présentent une solubilité suffisante pour que le transfert se fasse. La solubilité est donc un critère primordial lors du choix de notre solvant.

Pour augmenter la vitesse de dissolution on peut faire deux choses : disperser la substance solide dans le solvant en la divisant (végétaux broyés, poudre, etc.) ou encore maintenir une agitation.

- Avantages et inconvénients par rapport aux autres techniques d'extraction :

La macération se fait à froid ce qui limite la perte d'espèces chimiques volatiles (qui serait bien plus importante s'il y avait eu une élévation de température). De plus, cela préserve certaines espèces chimiques organiques que la chaleur peut altérer. Finalement, cette manipulation est simple à réaliser et peu coûteuse.

D'un autre côté, la macération nécessite du temps (de plusieurs heures à plusieurs jours) et la solubilité est moins bonne à froid.

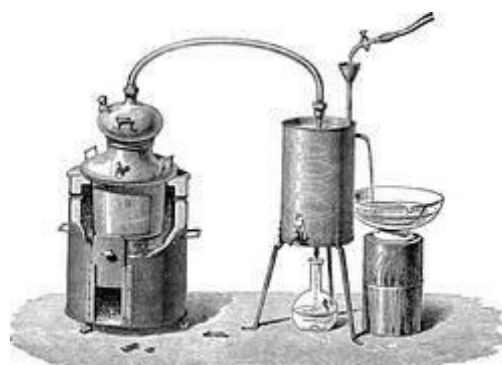
## 2. Hydrodistillation

### a. Histoire de l'hydrodistillation

L'hydrodistillation est l'une des techniques d'extraction des plus anciennes et des plus utilisées encore aujourd'hui. Ce processus est basé sur une différence de volatilité des molécules odorantes et de l'eau.

Son étymologie vient du grec « hydro » signifiant eau et de « distillare », mot d'origine latine qui signifie goutte-à-goutte. Cette technique remonte à l'Antiquité avec les Perses qui l'auraient créée pour produire de l'eau de rose, composant utilisé comme parfum ou comme remède médicinal.

Ce sont les Chrétiens d'Egypte et les coptes d'Alexandrie qui ont créé les premiers appareils à distiller. Ils étaient faits d'une cornue (*cucurbite*), d'un récipient de condensation (*ambix*) et d'un réceptacle des produits distillés (*phiale*). Ces appareils porteront plus tard le nom d'Alambic.



k13373158 fotosearch.com

Plus tard, un médecin perse du 1<sup>er</sup> siècle est le premier à décrire scientifiquement le principe de la distillation alcoolique, les appareils de laboratoire nécessaires, ainsi que la fabrication de l'eau de vie.

Cette méthode d'extraction se développe ensuite en Europe grâce aux médecins et apothicaires au 12<sup>ème</sup> siècle. Les premiers médicaments alcoolisés, ainsi que des liqueurs et des parfums sont créés.

Aujourd'hui, cette technique d'extraction, améliorée tout au long des siècles, est principalement utilisée dans l'industrie pétrolière ou encore dans la parfumerie/cosmétique.

### b. Principe : expérience

Le principe de l'hydrodistillation est simple. Dans un premier temps, les écorces du fruit dont on veut récupérer l'huile essentielle sont placées dans un ballon rempli d'eau.

Ce mélange est ensuite porté à ébullition. La chaleur entraîne l'éclatement et la libération des molécules odorantes. Les molécules les plus volatiles et non solubles dans l'eau sont entraînées par la vapeur d'eau créée puis passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis récupérées dans un récipient.

Deux phases sont obtenues dans le récipient : une phase aqueuse contenant de l'eau aromatique et une phase organique constituée de l'huile essentielle.

Enfin, l'hydrodistillation est généralement accompagnée d'une étape de décantation afin de récupérer l'huile essentielle recherchée. Cette dernière se base sur une différence de densité entre l'eau et l'huile essentielle. Le composé recherché est ainsi facilement identifiable.

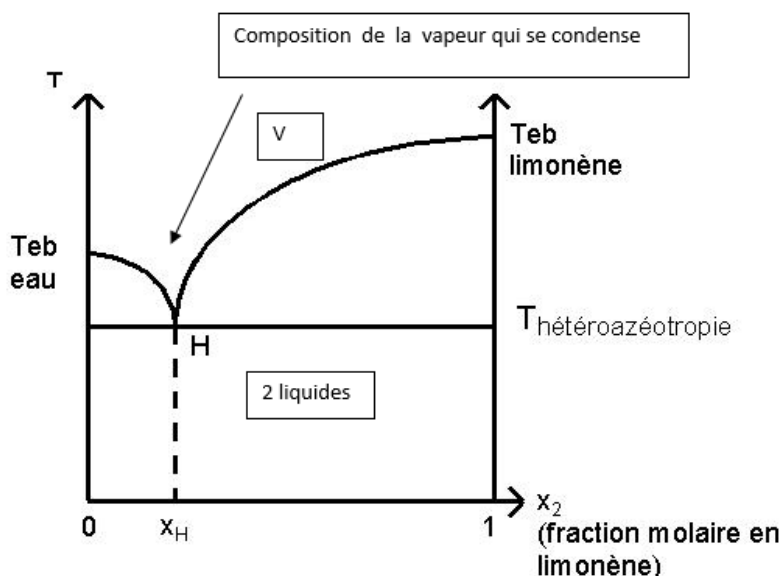


### c. Principe : théorie

L'hydrodistillation est en fait basée sur le principe des changements d'états liquide-vapeur.

En effet, il s'agit de la distillation de deux liquides non miscibles dont l'un est l'eau et l'autre un composé organique.

Nous remarquons à l'aide de ce diagramme que à l'équilibre L/V, la composition de la vapeur qui se condense est donnée par le point H. La vapeur entraîne donc le limonène lors de l'opération.



Un protocole d'extraction solide/liquide (cf. Annexe 5 : PR-3 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DU LIMONENE PAR HYDRODISTILLATION) permet de comprendre la pratique de cette extraction.

#### d. Avantages et désavantages

L'hydrodistillation comme méthode d'extraction présente des avantages et inconvénients.

L'un des principaux avantages de cette forme d'extraction est que l'hétéroazéotrope est distillé à des températures avoisinant les 100 °C.

De plus, nous venons de voir sur l'explication des digrammes L/V que la température d'ébullition de l'azéotrope est plus basse que les températures d'ébullition des différents mélanges. C'est pourquoi, si la réaction est effectuée aux alentours de 100 °C, la vapeur peut bien commencer à se former et les molécules odorantes sont préservées puisque la température d'ébullition du limonène est de 176°C. Les molécules odorantes ne sont ainsi pas « touchées » par des températures trop élevées.

Aussi, cette méthode d'extraction ne coûte pas cher à mettre en place et peut donc être facilement utilisée dans des expériences scolaires par exemple.

Par ailleurs, l'hydrodistillation à l'avantage de récupérer toutes les molécules très volatiles.

Cependant, plusieurs heures peuvent être nécessaires à l'extraction complète de l'huile essentielle. De plus, plus la durée de l'expérience est longue, plus les molécules de l'espèce à extraire risquent d'être altérées avec la chaleur qui augmente. Un dilemme se présente donc à nous.

La macération quant à elle limite la perte d'espèces chimiques volatiles puisqu'il n'y a pas d'élévation de température.

De plus, le produit issu de la macération peut donc avoir des composés chimiques qui ne sont pas souhaités dans la pureté de l'huile essentielle comparé à l'hydrodistillation où le composé formé est assez pur.

## C. Méthodes d'analyse

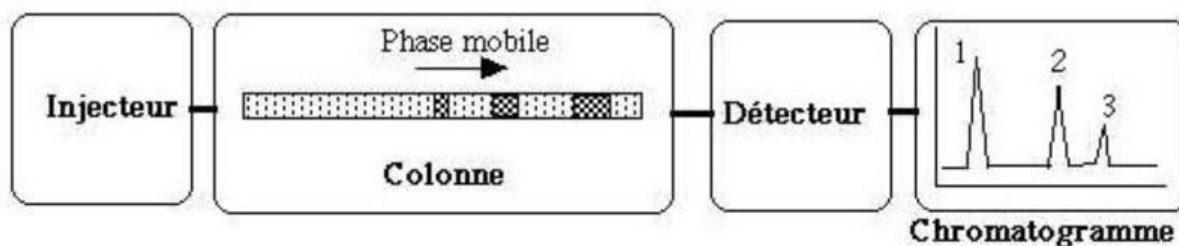
### 1. Histoire de la chromatographie

La chimie analytique concerne l'ensemble de la chimie portant sur l'analyse des produits. Elle a pour buts d'identifier et quantifier l'analyte. Il existe de nombreux moyens d'analyses aujourd'hui. Par exemple, on peut utiliser la spectroscopie, le titrage ou encore la chromatographie.

La naissance de la chromatographie remonte en 1906, lorsqu'un chimiste russe, Tswett a séparé des pigments végétaux colorés sur une colonne. Les pigments étaient entraînés par de l'éther de pétrole. Le chimiste a pu observer sur la colonne la formation de bandes de couleurs différentes. Mais la méthode reste peu utilisée jusqu'en 1940 où deux chimistes, Martin et Syngé développent la pratique et la théorie de la chromatographie. Elle est aujourd'hui considérée comme une évolution majeure du XXème siècle, en effet cette technique a contribué à de nombreux progrès dans tous les domaines de la science, et en particulier dans le domaine de la chimie analytique.

La chromatographie est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange. Le principe est basé sur les différences d'affinités des composés du mélange avec la phase stationnaire, aussi appelée phase fixe ou colonne ; et la phase mobile, aussi appelée éluant ou solvant.

#### *Schéma simplifié de la chromatographie*



Le chromatogramme obtenu à la fin de la chromatographie, permet d'étudier quels produits sont présents et en quelle quantité. Effectivement, chaque pic présent sur le chromatogramme correspond à un produit. On peut identifier ce dernier grâce au temps de rétention ( $t_r$ ). Effectivement, les produits qui ont le moins d'affinité avec la colonne vont être les moins retenus et donc sortir le plus rapidement. De plus, l'aire sous le pic va donner la quantité de produit présente initialement dans l'analyte.

Il existe différentes méthodes de chromatographie. On peut les classer selon la phase fixe, ou selon la phase mobile. Ici, nous présenterons deux méthodes : la CPG et la CPL.

### 2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Tout d'abord, intéressons-nous à l'appareillage de la CPG sous la forme la plus élémentaire. Elle est composée d'un petit four thermostable, dans lequel est localisée une colonne chromatographique. Cette dernière correspond à un tube capillaire de verre enroulé sur quelques mètres, et dont les parois intérieures sont induites de phase statique (substance solide ou liquide suffisamment stable pour pouvoir faire apparaître un certain degré d'affinité avec le mélange à analyser). L'échantillon est alors introduit avec un débit de gaz inerte qui est le gaz vecteur permettant d'entraîner le mélange le long de la colonne. Les composants se séparent alors en restant une durée propre à leurs propriétés dans le tube capillaire selon leur affinité avec la phase statique. Un capteur est placé au niveau de l'extrémité de la colonne

dans le but de signaler et analyser les éléments sortants. L'annexe 1, « ELEMENTS DE LA CPG » présente en détails les différents éléments composant un appareil de CPG (cf. *annexe 1 : ELEMENTS DE LA CPG*).

Comme toute méthode d'analyse, la CPG présente des avantages et des inconvénients :

- **Avantages**

En effet, la colonne est constamment régénérée par le gaz vecteur. De plus, cette technique est très efficace pour séparer les constituants, il n'y a alors aucun problème quant aux analyses qualitatives et quantitatives. Par ailleurs, le temps d'analyse est globalement court.

- **Inconvénients**

Cependant cette technique nécessite du matériel assez imposant et encombrant, et demande une légère implication financière pour pouvoir l'utiliser.

### **3. Chromatographie en phase liquide (CPL)**

La chromatographie en phase liquide, CPL en français, HPLC en anglais, est la méthode de chromatographie la plus ancienne. La phase mobile est un liquide, et la phase fixe, des particules de silice éventuellement greffées avec de la phase stationnaire, insérées dans une colonne. Il existe deux types majeurs de CPL : la CPL en phase normale et la CPL en phase inverse. Elles se différencient au niveau de la polarité de la phase fixe et la phase mobile.

#### **a. CPL en phase normale**

La CPL en phase normale est un phénomène d'absorption. La phase stationnaire est polaire. En effet, la colonne utilisée va contenir de la silice, sur laquelle seront greffés des groupements silanol SiOH.

La phase mobile est un solvant apolaire comme le cyclohexane ou encore l'acétate d'éthyle.

Le composé le plus retenu dans la colonne va être le composé qui a le plus d'affinité avec la colonne, ce sera donc le composé le plus polaire.

Par ailleurs, lorsque l'on augmente la polarité de l'éluant, les temps de rétention diminuent. Cela permet d'ajuster les conditions de séparation des analytes.

#### **b. CPL en phase inverse**

La CPL en phase inverse repose sur un phénomène de partage. A l'inverse de la phase normale, la phase stationnaire est apolaire. En effet, les colonnes utilisées seront appelées C18, C8, C2, etc. Cela correspond au nombre de carbone des chaînes alkyles greffées sur les particules de silice. Plus ces dernières sont longues, plus l'hydrophobie de la colonne augmente.

La phase mobile est un mélange eau/solvant organique comme le méthanol, ou encore le THF par exemple.

Plus le composé est apolaire, plus il est généralement retenu. Cependant il existe d'autres mécanismes qui peuvent intervenir. Par exemple si une espèce est sous forme ionique, elle interagit moins facilement avec la phase stationnaire apolaire.

Par ailleurs, lorsque l'on augmente la polarité de l'éluant, les temps de rétention augmentent.

## II. PARTIE EXPERIMENTALE

### A. Présentation des méthodes retenues

#### 1. Méthode d'extraction sélectionnée

La méthode d'extraction que nous avons retenue pour ce projet/cette expérience est l'extraction solide/liquide, ou macération. Nous avons choisi celle-ci par rapport à l'autre pour deux raisons : le temps et le rendement. En effet l'autre méthode d'extraction que nous avons trouvée était beaucoup trop longue (plus d'une heure) pour pouvoir tenir dans un créneau de TP de 3 heures, avec l'analyse CPG qui s'en suit. L'extraction solide liquide se fait, quant à elle, en 30 minutes environ, ce qui laisse le temps pour bien se concentrer sur l'analyse de l'échantillon.

Quant au solvant, nous avons choisi la propanone car, en comparaison avec d'autres solvants organiques (cyclohexane par exemple), ce solvant présente moins de risque (*cf. Annexe 2 : COMPARAISON PROPANONE/CYCLOHEXANE*).

De plus, ce solvant a une température d'ébullition nettement plus faible que celle du limonène, ce qui est idéal pour la méthode d'analyse que nous avons utilisée.

Nous avons fait une première expérience en utilisant un extrait de 5,1126 g d'écorces d'oranges que nous avons écrasées et mis dans une solution de propanone à température ambiante, la laissant reposer pendant 30 minutes en agitant. Nous avons ensuite filtré notre mélange pour obtenir une solution homogène (sans écorces). Le protocole plus complet peut être trouvé en annexe (*cf. Annexe 6 : PR-3 : PROTOCOLE D'EXTRACTION SOLIDE/LIQUIDE PAR MACERATION DU LIMONENE*).

#### 2. Méthode d'analyse sélectionnée

Pour mener à bien notre projet, nous garderons la méthode de la CPG. Effectivement, l'intérêt de la CPG réside dans le fait que les séparations sont simples à optimiser, n'utilisent pas de solvant pour l'élution. De plus, le laboratoire INSA possède des appareils de CPG relativement disponibles pour mener à bien notre projet mais aussi dans l'optique de proposer un TP pour les STPI2. Cependant, notre analyse d'écorce d'orange aurait pu être réalisée par CPL.

#### 3. Développement de la méthode analytique



L'objectif de l'analyse CPG est de déterminer la concentration en limonène de notre solution issue de la macération puis déterminer le taux de limonène dans les écorces. Finalement comparer ce taux avec ce qu'on a pu trouver comme valeurs lors de nos recherches biblio.

Pour cela on utilise l'appareil SCION 436-GC BRUKER, avec des paramètres spécifiques décrits ci-après :

##### Paramètres de la colonne :

La colonne capillaire utilisée est une Rxi-5ms, de 0,32 mm de diamètre et de 30 m de long. Sa phase stationnaire est apolaire et de type polysiloxane avec 5% de groupements diphenyle et 95% de diméthyle, épaisseur de 0,25 micromètres.

##### Paramètres d'injection :

L'aiguille est d'abord rincée 3 fois par solvant (du méthanol) puis rincée encore 3 fois avec notre échantillon, pour la mise en milieu de l'aiguille.

##### Paramètres injecteur :

La température de l'injecteur est de 250°C. Nous avons premièrement convenu d'un taux de split de 1/30 que nous avons ensuite augmenté à 10 (afin de maximiser la quantité de produit pour pouvoir détecter un signal tout en prenant garde à ne pas saturer la colonne). Le taux de split correspond à la quantité réellement injectée dans la colonne, afin de ne pas saturer cette dernière. Le volume injecté est de 1 microlitre.

**Paramètres four :**

La température maximum supportée par la colonne est de 350°C, nous avons décidé de commencé à 80°C pendant 2 minutes puis d'augmenter de 20°C par minute jusqu'à arriver à 250°C. Ce qui nous donne finalement un temps d'analyse de 10.5 minutes.

**Nature du gaz vecteur :**

Le gaz inerte est l'hélium et sert au transport des molécules à analyse. On utilise également de l'hydrogène et de l'air en sortie qui permettent de créer la flamme d'analyse.

Nous avons convenu d'un débit de gaz de 1mL/min.

**Réglage détecteur :**

Le détecteur est de type FID, c'est à dire fonctionnant par ionisation de flammes. C'est le plus courant des détecteurs en CPG. Son principe consiste à créer une flamme grâce à l'hydrogène et l'air, puis celle-ci vient brûler les produits organiques en sortie de colonnes ce qui génère des ions. Ce sont ces derniers qui sont finalement détectés sous forme de signal électrique grâce à une électrode. La température du détecteur est constante et de 250°C.

**Notre procédure :**

**1<sup>ère</sup> étape : préparation des vials :**

- 1 vial de blanc : c'est-à-dire un vial de solvant, dans notre cas d'acétone
- 1 vial de la solution étalon à 100mg/L (voir le protocole de préparation des étalons PR2)
- 1 vial de notre solution après macération d'écorces d'orange dans de l'acétone

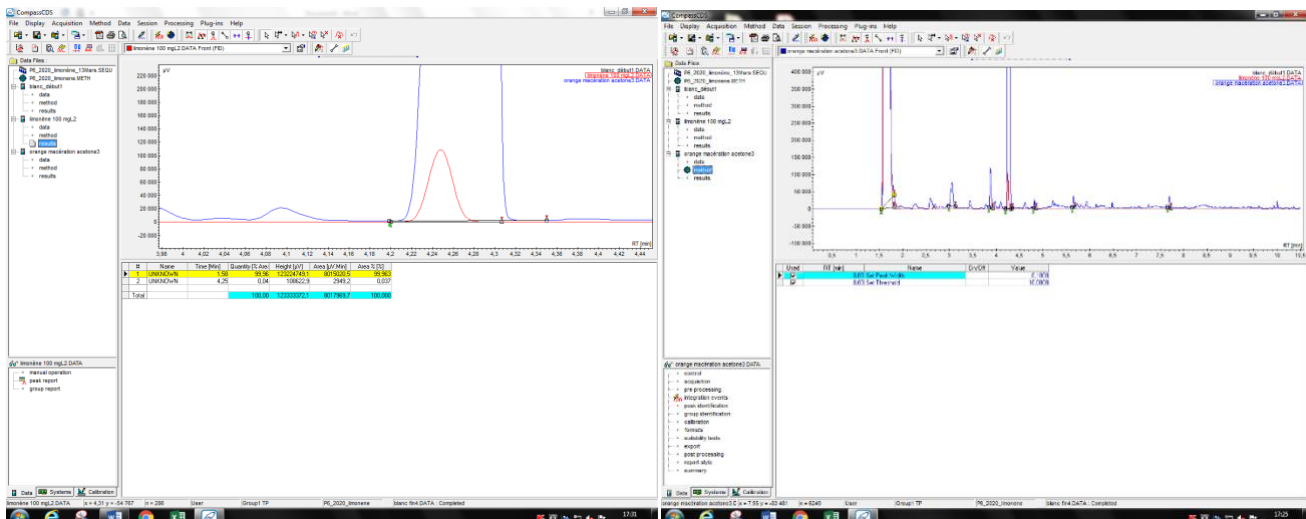
**2<sup>ème</sup> étape : réglage de la machine :**

Voir précédemment les paramètres de la machine.

**3<sup>ème</sup> étape : acquisition :**

Une séquence a été créée pour injecter tout d'abord le blanc (l'acétone), puis l'étalon, suivi de notre échantillon issu de la macération, et finalement de nouveau le blanc.

Voici les chromatogrammes obtenus :





### Analyse des chromatogrammes :

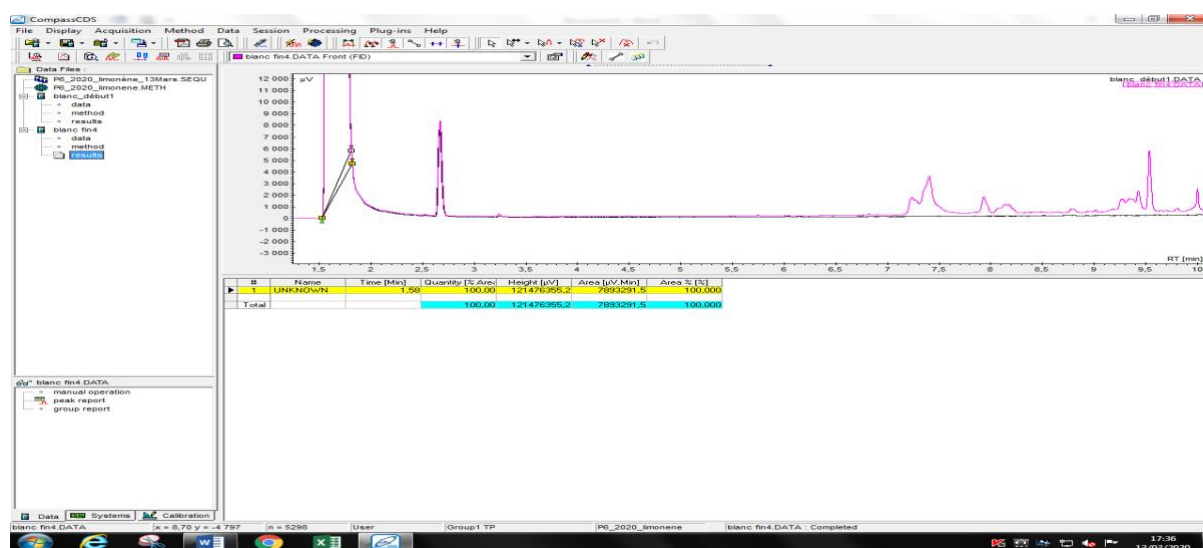
- Le blanc (= l'acétone, courbe noire) :

Après une première acquisition, on ne voit pas d'autres pics que celui de l'acétone à 1,8 minutes, le blanc est propre, ce qui signifie que notre solvant est pur. En particulier, il n'y a pas de pic sortant à 4,3 min lié à une impureté de l'acétone (et pas d'impureté plus généralement dans le solvant utilisé).

- L'étalon (= limonène, courbe rouge) :

Le temps de rétention (tr) associé au limonène est de 4,3 minutes et l'aire sous son pic est notable.

- L'échantillon issu de la macération (courbe bleue) :



On remarque bien la présence de limonène avec un pic à  $tr = 1,43$  min. On peut aussi remarquer qu'il y a plus de bruit sur la ligne de base de l'extrait naturel (molécules coextraites).

- De nouveau de l'acétone (courbe rose) :

Le blanc après injection de l'échantillon est sale. Peut-être faudrait-il modifier la température du four.

## B. Résultats expérimentaux

### 1. Etalonnage

Afin de pouvoir déterminer précisément la concentration en limonène de notre échantillon, nous souhaitons d'abord obtenir une courbe d'étalonnage. Cette dernière nous aurait permis de définir une fonction reliant l'aire des pics et la concentration en limonène. Effectivement, nous connaissons la concentration en limonène des étalons ; et la CPG nous aurait donné l'aire sous le pic pour chaque étalon. Ainsi, nous aurions pu en déduire une fonction. Par la suite, grâce à l'utilisation de cette fonction avec l'aire obtenue pour notre échantillon nous aurions identifié la concentration de ce dernier en limonène. Malheureusement, nous n'avons pu mettre en place ce projet à cause du confinement.

Nous avons tout de même réfléchi aux concentrations des étalons et au protocole de préparation de ces dernières (cf. Annexe 3 : PR-1 : PROTOCOLE DES ETALONS ETUDE PRELIMINAIRE).

Nous avons effectué une étude préliminaire avec un étalon de concentration en limonène de 100 mg/L. En effet, nous avons préparés plusieurs solutions étalons (cf. Annexe 4 : PR-2 : PROTOCOLE DE PREPARATION DES ETALONS).

et nous avons décidé de réalisé notre première étude avec la solution de concentration « moyenne », c'est-à-dire pas la plus concentrée, ni la moins concentrée.

L'étude de cet étalon nous a permis de déterminer une concentration en limonène d'environ 7g/L pour notre échantillon : nous avons relevé l'aire sous le pic de notre échantillon (203101), puis pour déterminer la concentration de ce dernier nous avons posé l'hypothèse d'une linéarité et avons fait un produit en croix.

	Étalon	Macération
Aire sous le pic	2949	203101
Concentration	100 mg/L	?

Concentration limonène dans m=5,1162g d'écorces d'oranges :  $c = 100 \cdot 203101 / 2949 = 6887$  mg/L = **6,89 g/L**

Volume du solvant (V) = 25 mL

[Macération] =  $c \cdot V / m = 6,89 \cdot 25 / 5,1162 = 33,67$  mg/g.

Rendement (%) :  $(33,67 / 1000) \cdot 100 = 3,367\%$

Notre rendement est d'environ 3%.

Ainsi, nous avons décidé de préparer des étalons avec une concentration comprise entre 1 g/L et 10 g/L.

## 2. Conclusion des expériences

Après avoir recherché des informations sur notre projet et les avoir expérimentées, nous pouvons en tirer quelques conclusions.

Avec la crise sanitaire que nous traversons, nous n'avons pas été en mesure de valider expérimentalement tout notre travail de recherches. Nous n'avons pas pu tester le cyclohexane comme solvant, et la méthode d'hydrodistillation n'a pas été expérimentée.

Malgré cette déconvenue, nous avons réussi à mener à bien l'expérience d'extraction par macération en utilisant la propanone, appelé plus communément acétone. Après avoir appris à comprendre les outils, nous avons analysé les échantillons obtenus grâce à la CPG. Nous avons pu retrouver le limonène sur la courbe d'analyse, et par le calcul, en déduire sa concentration et son rendement.

Les résultats ont dépassé nos attentes. En effet, en appliquant le protocole créé ensemble et après avoir analysé nos échantillons, nous avons obtenu, pour 5,1167 g d'écorces d'oranges, une concentration en limonène égale à 6,89 g/L, soit un rendement de 3,34 %. Ce résultat est supérieur au rendement théorique attendu, compris entre 0,4 % et 3 % avec la méthode d'hydrodistillation (*cf. Bibliographie-Rendement*), supposée meilleure que l'extraction solide/liquide, mais plus longue à réaliser. Une explication de cette concentration élevée de limonène pourrait être que le bouchon de notre solution n'était pas hermétique et que notre solution se soit concentrée en limonène pendant le stockage.

Finalement, nous avons réussi à obtenir des résultats satisfaisants, validant ainsi nos protocoles et expérimentations. Ceci nous a permis d'élaborer les contours d'un TP abordable pour les futures deuxièmes années.

## **CONCLUSION**

Pour commencer, ce projet a su répondre à notre goût à tous pour la chimie des molécules, et cela autant pour les étudiants n'ayant plus de cours de chimie ce semestre que les autres.

D'autre part, cela a été l'occasion d'appréhender la chimie d'une façon nouvelle, avec une approche bien différente des cours STPI enseignés jusqu'à maintenant. Une fois notre sujet choisi et le groupe composé, nous avons pu être à l'origine de la suite des événements. Nous étions guidés mais responsables et maîtres de nos choix d'expériences, de solvants, etc. ce qui était nouveau pour nous, mais bien plus gratifiant, notamment quand on a pu voir notre travail abouti. Dès le début nous savions où aller, nous avions un but : élaborer un protocole de TP. Celui-ci devait être complet, ludique, ni trop simple ni trop compliqué et initier les futurs STPI2 à de nouvelles méthodes d'extraction et d'analyse. Nous étions les mieux placés pour avoir un œil critique sur notre travail et évaluer si celui-ci serait adapté à des élèves de notre niveau d'étude. C'était motivant et gratifiant de savoir que notre travail allait être utilisé par la suite, ce n'était pas seulement travailler pour travailler mais il y avait une réelle perspective et finalité à ce projet.

Par ailleurs, il était très intéressant d'expérimenter le travail en groupe, à 6 plus précisément. Dans cette étape de notre cursus, on peut compter sur les doigts d'une main les projets de cette ampleur. C'était l'une des premières fois pour nous tous où nous devions travailler en si grand nombre. Chacun a dû apprendre à trouver sa place dans le groupe, s'y imposer et s'y exprimer en respectant les autres. On a pu en apprendre plus sur nous et sur comment nous évoluions dans une équipe, chose d'autant plus utile que ce sera notre quotidien dans notre future carrière.

D'autre part, nous avons dû faire face à la crise sanitaire et ses conséquences : le confinement et le travail à distance. Cela a été un vrai défi, d'autant plus qu'une partie considérable de notre travail devait se baser sur des expériences que nous n'avons pas pu mener. Nous avons donc dû repenser notre projet et l'axer davantage sur de la recherche bibliographique.

Parfois il a été dur de rester assidu par manque de motivation et en travaillant sans se voir, mais nous avons réussi à garder le cap grâce à une bonne organisation, des réunions hebdomadaires où nous faisons le point sur le travail fait et à faire et notre enseignante-responsable, très présente pour nous. Elle a su nous écouter et adapter ce projet à ces circonstances si particulières.

Merci Madame Delaroche, c'est grâce à vous que nous pouvons présenter ce dossier aujourd'hui.

## BIBLIOGRAPHIE

- Limonène et huiles essentielles

<https://www.compagnie-des-sens.fr/histoire-des-huiles-essentielles/>

<https://www-techniques-ingenieur-fr.ezproxy.normandie-univ.fr/base-documentaire/42337210-constantes-chimiques-des-solvants-et-produits/download/k345/huiles-essentielles.html>

- Extraction solide liquide

<http://webphysique.fr/maceration/>

<https://www.maxicours.com/se/cours/les-differentes-techniques-d-extraction/>

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Extraction\\_solide-liquide](https://fr.wikipedia.org/wiki/Extraction_solide-liquide)

<https://www.dedietrich.com/fr/solutions-et-produits/extraction/extraction-solide/liquide>

<https://jeretiens.net/difference-entre-infusion-decoction-et-maceration/>

- Hydrodistillation

[http://projet.parfum.free.fr/Pages/sciences/historique.htm?fbclid=IwAR3St\\_3AGCrpFEHUsHe5P2qx\\_LwfeVbwQA--z809cwEJJQtPbftD7tXksGg](http://projet.parfum.free.fr/Pages/sciences/historique.htm?fbclid=IwAR3St_3AGCrpFEHUsHe5P2qx_LwfeVbwQA--z809cwEJJQtPbftD7tXksGg)

- Histoire de la chromatographie

<https://www.universalis.fr/encyclopedie/chimie-analytique/>

<https://www.masterchimie1.universite-paris-saclay.fr/Chromatoweb/Generalites%20chromato.html>

<https://www.masterchimie1.universite-paris-saclay.fr/Chromatoweb/Generalites%20chromato.html#A01>

- Chromatographie en phase gazeuse

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Chromatographie\\_en\\_phase\\_gazeuse](https://fr.wikipedia.org/wiki/Chromatographie_en_phase_gazeuse)

<https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-chromatographie-phase-gazeuse-11186/>

<https://easyiut.fr/chromatographie-en-phase-gazeuse/>

<http://boowiki.info/art/chromatographie-en-phase-gazeuse-2/chromatographie-en-phase-gazeuse-3.html>

<http://culturesciences.chimie.ens.fr/la-chromatographie-en-phase-gazeuse-principe-et-exemples-d-applications-12>

- Chromatographie en phase liquide

Cours de madame MEZGHICH

<https://www.masterchimie1.universite-paris-saclay.fr/Chromatoweb/Generalites%20chromato.html#A01>

<file:///C:/Users/Victoire/Downloads/chromato2.pdf>

- Rendement

<http://lfrdrdc.org/wp-content/uploads/2016/01/TP-Oranges.pdf>

<https://dl.ummo.dz/bitstream/handle/ummo/2314/Aliouane%2C%20Fatih.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

## **ANNEXES**

Annexe 1 : ELEMENTS DE LA CPG

Annexe 2 : COMPARAISON PROPANONE/CYCLOHEXANE

Annexe 3 : PR-1 : PROTOCOLE DES ETALONS ETUDE PRELIMINAIRE


Annexe 4 : PR-2 : PROTOCOLE DE PREPARATION DES ETALONS

Annexe 5 : PR-3 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DU LIMONENE PAR  
HYDRODISTILLATION

Annexe 6 : PR-4 : PROTOCOLE D'EXTRACTION SOLIDE/LIQUIDE PAR MACERATION  
DU LIMONENE

Annexe 7 : Préparation TP pour STPI2

Annexe 8 : TP pour STPI2

	<b>ANNEXE 1 : ÉLÉMENTS DE LA CPG</b>	Création : 01/06/2020
		Mise à jour : 01/06/2020
P6 10 + limonène		Version : 1.0
		Rédacteur : Victoire Liagre
		Validation : ID (enseignante)

Cette annexe présente en détail les différents éléments composant un appareil de chromatographie en phase gazeuse :

- La colonne

Pour commencer, il y a deux types de colonnes : les colonnes remplies et les colonnes capillaires.

Les colonnes remplies possèdent un diamètre de l'ordre de quelques millimètres mais sont d'une longueur proche du mètre. Tout le long du tube, des granules de support inertes sont disposées, et dont la surface est greffée avec la phase stationnaire afin de la maintenir sur place.

Cependant, les colonnes capillaires ont un pouvoir de résolution bien supérieur, elles sont donc bien plus utilisées. Ces dernières sont faites en acier inoxydable, en silice fondue, ou encore en verre (matériau inerte vis-à-vis de la phase stationnaire). Leur diamètre intérieur est compris entre 0,1 et 0,5 mm, leur longueur, quant à elle, est de plusieurs dizaines de mètres parfois atteignant les 100m. Un film de 0,1 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur constitué de la phase stationnaire recouvre la surface interne du tube. La colonne est choisie de façon à ce que le temps de rétention des analytes à l'intérieur de la colonne soit important (faible diamètre, longue en taille, phase stationnaire épaisse).

- Le gaz vecteur


Le gaz vecteur entraîne les analytes le long du tube, de l'injecteur jusqu'au détecteur. Il est choisi en fonction du type de détecteur choisi, il faut qu'ils soient compatibles. C'est en général un gaz inerte (hélium, azote, argon, hydrogène), dans le but qu'il ne réagisse ni avec l'analyte, ni avec la phase stationnaire. Il s'écoule avec un débit de l'ordre de 30 à 40 ml/min pour les colonnes remplies et de 0,2 à 2 ml/min en ce qui concerne les colonnes capillaires. La température de l'injecteur doit être réglée de façon à ce que tous les analytes de l'échantillon soient vaporisés. Pour ce faire, elle dépasse généralement de 50 degrés Celsius la température d'ébullition du composant le moins volatil.

- L'injection

En ce qui concerne l'injection, elle se fait à l'aide d'une micro seringue. Le volume injecté est en général de l'ordre de 1  $\mu\text{L}$  d'analyte. On introduit cette dernière au travers d'un septum (permettant l'étanchéité) dans un liner (tube de verre rempli d'un petit morceau de coton). Dans le cas éventuel où l'échantillon possède des espèces non-volatiles, ces dernières sont alors retenues dans le coton et donc non-introduites dans la colonne. Les espèces volatiles sont alors vaporisées avant d'être envoyées en tête de colonne où elles se mélangeront avec le gaz vecteur.

Il existe deux types d'injections :

- Par vaporisation directe : est utilisée lorsque les analytes sont dans une solution diluée (pas très concentrée), les injecteurs ne divisent pas le flux.
- « Split » (injecteur diviseur) : est utilisée pour l'analyse de solutions concentrées et divise le flux afin d'éviter une saturation de la phase stationnaire.

	<b>ANNEXE 1 : ÉLÉMENTS DE LA CPG</b>	Création : 01/06/2020
		Mise à jour : 01/06/2020
P6 10 + limonène		Version : 1.0
		Rédacteur : Victoire Liagre
		Validation : ID (enseignante)


- Le four

La colonne est contenue dans un four permettant une chaleur tournante, et avec une température ajustable (généralement pouvant aller de 20 à 350 degrés Celsius). Le four permet d'éviter la condensation des analytes en maintenant la colonne à une température suffisante afin d'assurer la volatilité. Les températures utilisées dépendent de la stabilité de la colonne utilisée et des propriétés des composés utilisés. En utilisant une température élevée, les analytes se déplaceront plus rapidement le long du tube, cependant, ils seront ainsi moins en contact avec la phase stationnaire. Il est donc nécessaire de choisir une température suffisante mais pas trop élevée non plus afin de pouvoir séparer les éléments analysés de façon optimale.



- Le détecteur


Le détecteur est utilisé pour détecter la libération des substances de la colonne ainsi que leur spécificité. Il existe différents types de détecteurs. Afin de faire l'analyse la plus complète possible lorsque l'on fait face à des mélanges complexes, il est nécessaire que le détecteur soit d'une très grande sensibilité, et très stable. Il faut également qu'il soit utilisable sur un large domaine de température.



	<b>ANNEXE 2 : COMPARAISON PROPANONE/CYCLOHEXANE</b>	Création : 01/06/2020
		Mise à jour : 01/06/2020
P6 10 + limonène		Version : 1.0
		Rédacteur : Jeanne Casenave
		Validation : ID (enseignante)

Cette annexe présente une comparaison que nous avons faite entre le cyclohexane et la propanone.

Nom	Propanone	Cyclohexane
Toxicité		
Mentions de danger	<b>H225</b> Liquide et vapeurs très inflammables. <b>H319</b> Provoque une sévère irritation des yeux. <b>H336</b> Peut provoquer somnolence ou vertiges.	<b>H225</b> <b>H304</b> Peut être mortel en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires <b>H315</b> Provoque une irritation cutanée <b>H336</b> <b>H410</b> Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme

	<b>PROTCOLE DES ÉTALONS ETUDE PRÉLIMINAIRE</b>	Création : 03/03/2020
		Mise à jour : 15/03/2020
P6 10 + limonène	<b>PR-1</b>	Version : 1.3
		Rédacteur : Victoire Liagre
		Validation : ID (enseignante)

But: Préparer les solutions étalons pour l'analyse par CPG de limonène

Matériel:

- Fioles jaugées : 3 de 10 mL
- Pipettes : 3 de 1mL + propipette
- Pipettes pasteurs et poire
- 2 béchers
- 4 flacons de conservation
- Bidon de récupération

Réactifs:

- Limonène pur à 99 %
- Solvant : acétone


Sécurité:



Acétone : toxique et inflammable : porter les EPI et manipuler sous sorbonne

Mode opératoire:

- 1) Préparation de la solution S0 à environ 10g/L en limonène:
  - Dans un bécher, peser avec précision (sur une balance analytique) une masse proche de 100mg de limonène.
  - Transvaser dans une fiole jaugée de 10mL.
  - Compléter au  $\frac{2}{3}$  avec de l'acétone.
  - Homogénéiser.
  - Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'acétone.
  - Mettre un bouchon et homogénéiser.

	<b>PROTOCOLE DES ÉTALONS ETUDE PRÉLIMINAIRE</b>  <b>PR-1</b>	Création : 03/03/2020
		Mise à jour : 15/03/2020
P6 10 + limonène		Version : 1.3
		Rédacteur : Victoire Liagre
		Validation : ID (enseignante)

2) Préparation de la solution S1 à environ 1g/L en limonène :

- Prélever 1 mL de la solution S0 à l'aide d'une pipette graduée et la placer dans une fiole de 10 mL.
- Compléter au  $\frac{2}{3}$  avec de l'acétone.
- Homogénéiser.
- Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'acétone.
- Mettre un bouchon et homogénéiser.


3) Préparation des étalons :

Solutions étalons préparées dans des fioles de 10 mL à partir de 1 mL de solution mère

Étalons	S1	S2	S3
Concentration (en g/L)	1	0,1	0,01
Solution mère (en mL)	S0	S1	S2

4) Les solutions S0, S1, S2 et S3 sont à conserveres :

- Nommer chaque flacon de conservation de la manière suivante : "P6-date de fabrication-contenu-concentration".
- Verser chaque solution dans le flacon qui lui est propre.

	<b>PROTOCOLE DE PRÉPARATION DES ÉTALONS</b>  <b>PR-2</b>	Création : 20/03/2020
		Mise à jour : 16/04/2020
P6 10 + limonène		Version : 2.0
		Rédacteur : Victoire Liagre
		Validation : ID (enseignante)

**But :** Préparer les solutions étalons pour l'analyse par CPG de limonène

**Matériel :**

- Fioles jaugées : 4 de 10 mL, 1 de 50 mL
- Pipettes : 2 de 1mL, 2 de 2mL, 2 de 5mL + propipette
- Pipettes pasteurs et poire
- 2 béchers
- 5 flacons de conservation
- Bidon de récupération

**Réactifs :**

- Limonène pur à 99 %
- Solvant : acétone

**Sécurité :**




Acétone : toxique et inflammable : porter les EPI et manipuler sous sorbonne

**Mode opératoire :**

1) Préparation de la solution S0 à environ 10g/L en limonène :

- o Dans un bécher, peser avec précision (sur une balance analytique) une masse proche de 500mg de limonène.
- o Transvaser dans une fiole jaugée de 50mL.
- o Compléter au 2/3 avec de l'acétone.
- o Homogénéiser.
- o Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'acétone.
- o Mettre un bouchon et homogénéiser.

	<b>PROTOCOLE DE PRÉPARATION DES ÉTALONS</b>  <b>PR-2</b>	Création : 20/03/2020
		Mise à jour : 16/04/2020
P6 10 + limonène		Version : 2.0
		Rédacteur : Victoire Liagre
		Validation : ID (enseignante)

2) Préparation de la solution S1 à environ 1g/L en limonène :

- Prélever 1 mL de la solution S0 à l'aide d'une pipette graduée et la placer dans une fiole de 10 mL.
- Compléter au  $\frac{2}{3}$  avec de l'acétone.
- Homogénéiser.
- Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'acétone.
- Mettre un bouchon et homogénéiser.


3) Préparation des étalons :

Solutions étalons préparées dans des fioles de 10 mL à partir de la solution mère S0 à 10 g/L

Étalons	S1	S2	S3	S4
Concentration (en g/L)	1	2	5	8
V(S0) (en mL)	1	2	5	8

4) Les solutions S0, S1, S2, S3 et S4 sont à conserver :

- Nommer chaque flacon de conservation de la manière suivante : "P6-date de fabrication-contenu-concentration".
- Verser chaque solution dans le flacon qui lui est propre.

	<b>PROTOCOLE D'EXTRACTION DU LIMONENE PAR HYDRODISTILLATION</b>	Création : 22/04/2020
		Mise à jour : 23/04/2020
<b>PR-3</b>		Version : 1.1
		Rédacteur : Flore Leroux
		Validation : ID (enseignante)
P6 10 + limonène		

**But :** Extraire le limonène, arôme des écorces d'orange par un processus d'hydrodistillation.





**Matériel :**

- Balance de synthèse
- Ciseaux, mortier, pilon
- Ballon à fond rond de 250mL
- Chauffe-ballon, pierre ponce, thermomètre
- Pinces, potence, support élévateur, noix
- Réfrigérant à eau, tuyaux reliés au réfrigérant
- Pipettes graduées : 1 de 5mL, 1 de 20 mL + propipette
- Ampoule à décanter de 100mL
- Bêchers : 2 de 250 mL, 1 de 100mL
- Erlenmeyer de 100mL et son bouchon

**Réactifs :**

- Chlorure de sodium
- Acétate d'éthyle
- Eau distillée
- Limonène

**Sécurité :**

Espèce	Formule brute	Masse Molaire (g/mol)	T° ébullition (°C)	N°CAS	Toxicité	Protections
Limonène	$C_{10}H_{16}$	136,23	176	5989-27-5		
Acétate d'éthyle	$C_4H_8O_2$	8810	100	141-78-6		
Chlorure de sodium	$NaCl$	58,44	1 465	7647-14-5	-	-

Utiliser l'équipement de protection individuel requis. Éviter tout contact avec la peau, les yeux et les vêtements. Ne pas respirer les vapeurs/aérosols. Éviter les sources d'inflammation.

### Mode opératoire :

#### 1. Hydrodistillation :

- Éplucher une orange en laissant la partie blanche sur le fruit.
- Découper le zeste en petits morceaux à l'aide de ciseaux.
- Dans un bécher, peser 5 g de petits morceaux sur la balance de synthèse.
- Broyer le zeste humidifié dans le mortier en utilisant un pilon.
- Introduire la purée obtenue dans le ballon à fond rond de 250 mL à l'aide d'une spatule et la solvater dans 100 mL d'eau distillée.
- Réaliser le dispositif de distillation. (Cf. : image 1 ci-après)
- Placer une éprouvette graduée de 100mL pour recueillir le distillat à la sortie du réfrigérant.
- Ouvrir doucement le robinet pour permettre la circulation d'un filet d'eau.
- Allumer le chauffe-ballon et positionner le bouton du thermostat afin d'atteindre 176°C.
- Surveiller l'ébullition et baisser le thermostat quand cela devient nécessaire.
- Maintenir l'ébullition pendant environ 30 minutes jusqu'à obtenir 70 ml de distillat.
- Laisser l'eau du réfrigérant couler jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de distillat qui goutte.

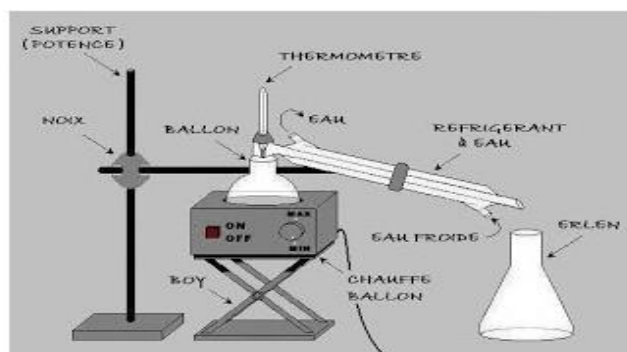




Figure 1 Montage hydrodistillation

	<p align="center"><b>PROTOCOLE D'EXTRACTION DU LIMONENE PAR HYDRODISTILLATION</b></p> <p align="center"><b>PR-3</b></p>	Création : 22/04/2020
		Mise à jour : 23/04/2020
P6 10 + limonène		Version : 1.1
		Rédacteur : Flore Leroux
		Validation : ID (enseignante)

2. Extraction de l'huile essentielle :

- Introduire le distillat dans une ampoule à décanter
- Dans un bécher de 100mL, ajouter une spatule de NaCl solide (étape de relargage).
- A l'aide d'une pipette graduée, prélever 5mL d'acétate d'éthyle et l'ajouter dans l'ampoule à décanter. Cette étape doit être réalisée sous une hotte.
- Agiter en dégazant sous la hotte plusieurs fois.
- Laisser reposer l'ampoule à décanter pour observer les deux phases.
- Eliminer la phase aqueuse en ouvrant progressivement le robinet et recueillir la phase organique dans un erlenmeyer bouché.



	<b>PROTOCOLE D'EXTRACTION SOLIDE/LIQUIDE PAR MACERATION DU LIMONENE</b>	Creation : 03/03/2020
		Mise à jour : 17/03/2020
		Version : 1.2
		de Warren, Hugo Pasqualini
P6 10 + Limonene		ID (enseignante)

Macération = méthode où on laisse séjourner, au froid ou à température ambiante, une substance dans un liquide pour en extraire les constituants solubles.

But : Dans ce TP, nous allons extraire du limonène, une espèce chimique contenue dans l'écorce d'orange. On procédera à une extraction par solvant.

Matériel :

- Bécher x2
- Râpe
- Pipette jaugée : de 15 mL + propipette
- Agitateur magnétique + barreau aimanté
- Balance de précision
- Entonnoir
- Papier filtre
- 

Produits :

- Propanone
- Orange
- 

Sécurité :

- Cf. fiches produits
- Port de gants, blouse et lunettes obligatoire
- 

Mode opératoire :

1. Extraction par solvant :
  - Laver soigneusement une orange.
  - Récupérer environ 5g d'écorce d'orange dans un bécher en utilisant la râpe.
  - Ajouter 15 ml de propanone.
  - Disposer le bécher sur un agitateur magnétique et ajouter un barreau aimanté.
  - Laisser macérer 30 min.
  
2. Séparation de la phase solide et de la phase liquide : filtration :
  - Disposer un papier filtre dans l'entonnoir, lui-même placé sur le bécher.
  - Verser le macérat obtenu dans l'entonnoir.

P6 10 + limonène

**QUESTIONS PRÉLIMINAIRES :**

Remplir la fiche ci-après :

**FEUILLE DE SÉCURITÉ : TP : Extraction de molécules naturelles et quantification par CPG**

Espèce	Formule brute	Masse Molaire (g/mol)	T° ébullition (°C)	N°CAS	Toxicité (symboles)	Risques	Sécurité
Limonène							
Acétate d'éthyle							



Création : 1/06/2020
Mise à jour : 1/06/2020
Version : 1.0
Rédacteur : Flore Leroux
Validation :
ID (enseignante)

P6 10 + limonène

- Dans l'étape d'extraction, la masse à peser au départ, doit-elle être précise ? Si oui, pourquoi et quelle balance (analytique précise à 0,1 mg près) ou balance de synthèse (précise à 0,1 g près) allons-nous choisir ?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

- Notre solution mère S0 en limonène à une concentration de 10g/L. Nous souhaitons une solution fille de concentration de 0,8g/L. Pourquoi, plusieurs dilutions sont nécessaires ? Prévoir alors le mode opératoire à suivre pour avoir cette concentration finale.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

CPG :

- Vous connaissez les différents types de liaisons chimiques qui existent en chimie : liaisons ioniques, liaisons covalentes, liaisons de Van der Waals. Donner le(s) type(s) de liaison(s) qui interviennent dans le cas du limonène.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....


P6 10 + limonène

**PREPARATION TP POUR STPI2**

Création : 1/06/2020
Mise à jour : 1/06/2020
Version : 1.0
Rédacteur : Flore Leroux
Validation : ID (enseignante)

- Le principe de la CPG est basé sur les différences d'affinités des composés du mélange avec la phase stationnaire et la phase mobile. Les notions de polarité entrent en jeux. Expliquez.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

- De plus, le détecteur utilisé ici est de type FID. Expliquer brièvement son fonctionnement.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

- Expliquer la méthode que nous devons appliquer afin d'obtenir la concentration finale de limonène en s'aidant du tableau à la fin du TP.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## **TP : Extraction de molécules naturelles et quantification par CPG**

### **I. But :**

L'objectif majeur de ce TP est de vous faire découvrir une méthode d'extraction et une méthode d'analyse, de la famille des méthodes chromatographiques. Pour ce faire, vous devrez déterminer la teneur de limonène extrait des écorces d'une orange grâce à une étape de macération puis d'analyse en CPG.

### **II. Extraction solide-liquide par macération :**

L'extraction solide-liquide (ESL) est un processus très commun dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique et alimentaire afin entre autres d'obtenir des ingrédients naturels, des arômes et fragrances à partir de matières premières brutes.

L'ESL permet d'extraire un liquide ou un solide en utilisant un liquide comme solvant d'extraction.

Il existe différentes méthodes d'extraction solide liquide, notamment : la décoction, l'infusion, la digestion, la macération, etc.

#### **Comment réaliser la macération ?**

La macération se fait en plongeant directement les substances solides dans un liquide. Ces dernières sont en général laissées en contact pendant un certain temps qui peut aller de quelques heures à quelques jours.

On dit que la macération est une extraction "à froid", c'est-à-dire qu'elle se fait à température ambiante. On appelle macérat le produit de la macération.

A la fin du processus on retire du solvant les résidus solides, cette étape se fait généralement par filtration.

### **III. Principe de l'analyse par CPG :**

#### **1/Généralité de la chromatographie :**

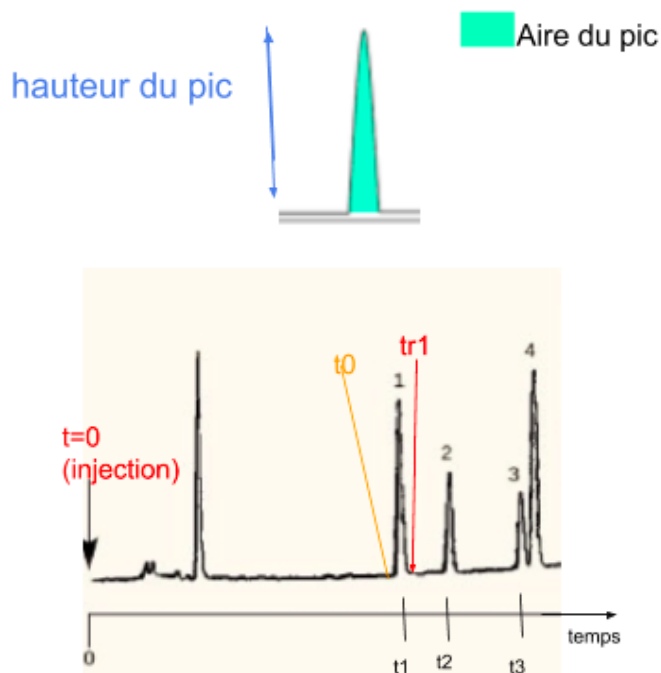
La chimie analytique concerne l'ensemble de la chimie portant sur l'identification et la quantification des produits. Elle a pour buts d'identifier et quantifier l'analyte. Il existe de nombreux moyens d'analyses aujourd'hui. Vous connaissez déjà les techniques de titrage et de spectroscopie UV visible. Ici vous allez découvrir la chromatographie et plus précisément la chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange. L'appareil est composé d'une phase mobile et d'une phase fixe. Le principe est basé sur les différences d'affinités des composés du mélange avec la phase stationnaire, aussi appelée phase fixe ou colonne ; et la phase mobile, aussi appelée éluant. Il existe un vocabulaire propre à la chromatographie. Voici quelques définitions qui vous permettront d'aborder cette technique d'analyse :

P6 10 + limonène

- Temps mort : temps que met l'éluant à parcourir la colonne jusqu'au détecteur.
- Temps de rétention : temps mis par le soluté pour parcourir la colonne : de l'injection au maximum du pic. Il permet l'identification du produit.
- Aire sous le pic : elle permet de quantifier le produit présent dans le soluté.
- Chromatogramme : c'est le diagramme obtenu à la fin de l'analyse. Il représente des pics en fonction du temps.

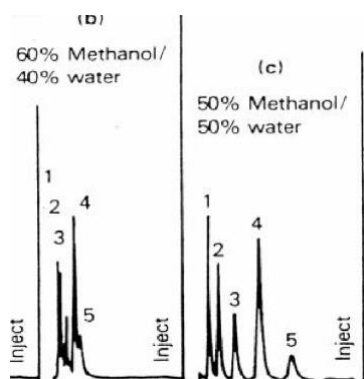
Ci-dessous, un chromatogramme résultant d'une CPG illustre les différentes définitions ci-dessus :



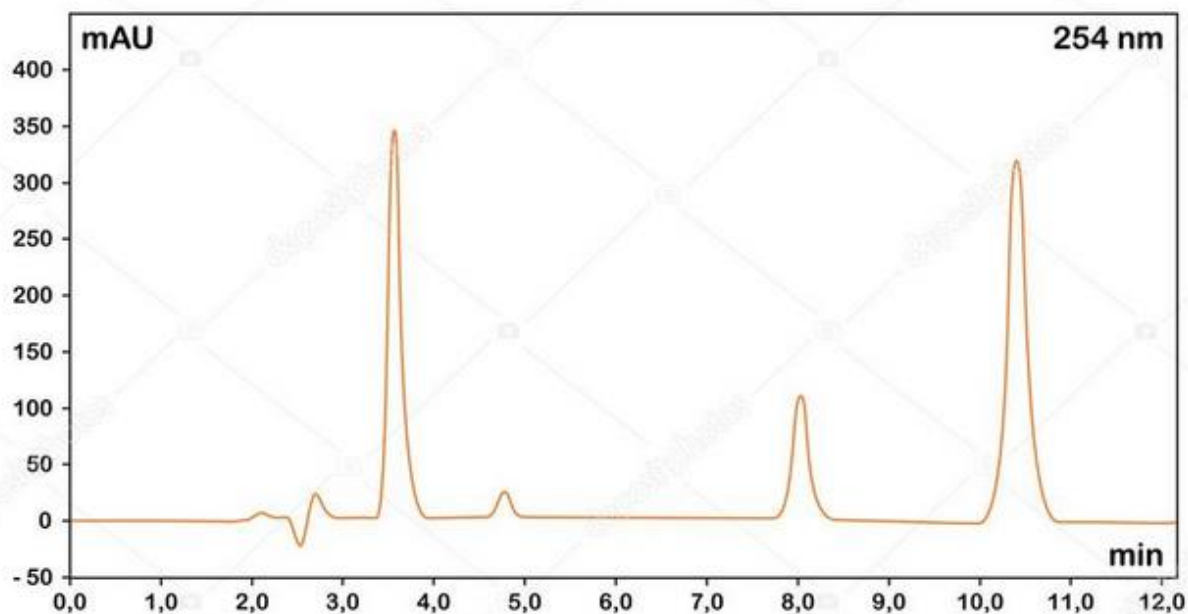
Explications : t1, t2 et t3 correspondent à des temps de rétention. L'intégration de la hauteur d'un pic donne l'aire bien que cette dernière vous soit généralement donnée par le logiciel. On remarque que les pics sont bien séparés, cela démontre que la résolution est correcte.

- Résolution : grandeur qui détermine l'aptitude à séparer deux solutés. Une bonne résolution correspond à la présence de pics bien séparés, qui ne se superposent pas.

P6 10 + limonène



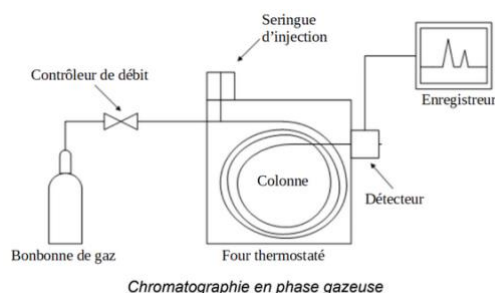
- Ici, on remarque que les pics du chromatogramme (b) se superposent alors que ceux de (c) sont bien séparés. La meilleure résolution est donc obtenue par une chromatographie réalisée dans les conditions de (c).



### 2/CPG :

Cette méthode utilise un gaz pour pousser les molécules dans la colonne. Le schéma de principe est présenté ci-dessous. Les différentes parties et caractéristiques principales sont expliquées après





Le chromatographe est composé des éléments suivants :

a. La colonne

Pour commencer, en CPG, il y a deux types de colonnes : les colonnes remplies et les colonnes capillaires.

Les colonnes remplies possèdent un diamètre de l'ordre de quelques millimètres mais sont d'une longueur proche du mètre. Tout le long du tube, des granules de support inertes sont disposées, et dont la surface est greffée avec la phase stationnaire afin de la maintenir sur place.

Cependant, les colonnes capillaires ont un pouvoir de résolution bien supérieur, elles sont donc bien plus utilisées. Ces dernières sont faites en acier inoxydable, en silice fondue, ou encore en verre (matériau inerte vis-à-vis de la phase stationnaire). Leur diamètre intérieur est compris entre 0,1 et 0,5 mm (d'où le terme "capillaire"), leur longueur, quant à elle, est de plusieurs dizaines de mètres parfois atteignant les 100m. Un film de 0,1 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur constitué de la phase stationnaire recouvre la surface interne du tube. La colonne est choisie de façon à ce que le temps de rétention des analytes à l'intérieur de la colonne soit suffisant (faible diamètre, grande longueur, phase stationnaire épaisse).

b. Le gaz vecteur :

Le gaz vecteur entraîne les analytes le long de la colonne, de l'injecteur jusqu'au détecteur. Il est choisi en fonction du type de détecteur choisi, il faut qu'ils soient compatibles. Le gaz vecteur le plus utilisé est l'hélium et il s'écoule avec un débit de l'ordre de 30 à 40 ml/min pour les colonnes remplies et de 0,2 à 2 ml/min en ce qui concerne les colonnes capillaires. La température de l'injecteur doit être réglée de façon à ce que tous les analytes de l'échantillon soient vaporisés. Pour ce faire, elle dépasse généralement de 50 degrés Celsius la température d'ébullition du composant le moins volatil.

c. L'injection :

En ce qui concerne l'injection, elle se fait à l'aide d'une micro seringue. Le volume injecté est en général de l'ordre de 1  $\mu$ L de solution. On introduit cette dernière au travers d'un septum (permettant l'étanchéité) dans un liner (tube de verre rempli d'un petit morceau de coton). Dans le cas éventuel où l'échantillon possède des espèces non-volatiles, ces dernières sont alors retenues dans le coton et donc non-introduites dans la colonne. Les espèces volatiles sont alors vaporisées avant d'être envoyées en tête de colonne où elles se mélangeront avec le gaz vecteur.

Il existe deux types d'injections :

- par vaporisation directe : est utilisée lorsque les analytes sont présents sous forme de trace dans une solution diluée (pas très concentrée).
- « split » (injecteur diviseur) : est utilisée pour l'analyse de solutions concentrées et divise le flux afin d'éviter une saturation de la phase stationnaire.

#### d. Le four

La colonne est contenue dans un four permettant une chaleur tournante, et avec une température ajustable (généralement pouvant aller de 20 à 350 degrés Celsius). Le four permet d'éviter la condensation des analytes en maintenant la colonne à une température suffisante afin d'assurer la volatilité. Les températures utilisées dépendent de la stabilité de la colonne utilisée et des propriétés des composés utilisés. En utilisant une température élevée, les analytes se déplaceront plus rapidement le long du tube, cependant, ils seront ainsi moins en contact avec la phase stationnaire. Il est donc nécessaire de choisir une température suffisante mais pas trop élevée non plus afin de pouvoir séparer les éléments analysés de façon optimale. Nous pouvons travailler également en conditions isothermes ou en gradient de température ce que nous ferons ici.

#### e. Le détecteur

Le détecteur est utilisé pour détecter la sortie des substances de la colonne ainsi que leur quantité. Il existe des types de détecteurs différents. Les caractéristiques associées les plus importantes sont la sensibilité (détermine la plus petite teneur détectable), la spécificité (certains détecteurs sont universels alors que d'autres sont spécifiques d'une catégorie de molécules) et la possibilité d'identification (spectromètre de masse).

### IV. Présentation des manipulations :

Dans un premier temps, vous ferez une extraction solide-liquide par macération des écorces d'orange, et des dilutions pour préparer des solutions étalons. Enfin, la dernière partie portera sur l'utilisation du chromatographe et l'étude des résultats.

#### A. Extraction solide-liquide par macération :

Nous allons étudier l'influence de la nature du solvant utilisé dans le cadre d'une extraction solide-liquide. Pour ce faire, nous allons diviser la classe en deux groupes distincts.

Les binômes 1,2 et 3 travailleront avec l'acétone comme solvant comme d'extraction.

Les binômes 4,5,6 et 7 utiliseront l'eau.

Mode opératoire :

1ère étape : extraction par solvant :

- Laver soigneusement une orange.
- Récupérer une masse précise, proche de 5g d'écorces d'orange dans un bécher de 100mL en utilisant la râpe et une balance analytique. Noter la masse pesée.
- Ajouter 15 ml de votre solvant de macération dans le bécher à l'aide d'une pipette graduée.
- Disposer le bécher sur un agitateur magnétique, ajouter un barreau aimanté et recouvrir d'un film plastique.
- Laisser macérer 30 min.

2ème étape : séparation de la phase solide et de la phase liquide : filtration

- Placer une fiole jaugée de 50mL sur la paillasse. Disposer un papier filtre dans l'entonnoir, lui-même placé sur la fiole.
- Verser le macérat obtenu dans l'entonnoir.
- Rincer avec environ 10 mL d'acétone.
- Compléter avec de l'eau déionisée.
- Récupérer le macérat obtenu dans la fiole.

Mettre chacun des macérat dans un vial référencé.

B. Etalonnage :

Afin de connaître la teneur en limonène des écorces d'orange, il faut connaître le facteur de réponse du limonène en CPG. Pour cela il faut d'abord réaliser une courbe d'étalonnage avec des solutions qui contiennent du limonène en proportions connues.

Vous utiliserez un flacon contenant du limonène pur à 99%.

Le détecteur de flamme à ionisation ayant une sensibilité élevée, la solution de limonène doit être suffisamment diluée pour obtenir de bons résultats.

Chaque binôme prépare une solution étalon de façon à ce que l'ensemble de la gamme soit préparée au sein du groupe de TP. Les concentrations des étalons sont les suivantes :

Etalons	S1	S2	S3	S4
Concentration (en g/L)	1	0,2	0,5	0,8
V(S0) (en mL)	1	2	5	8

Remplir un vial pour chaque étalon à l'aide d'une pipette pasteur à usage unique ainsi qu'une poire de prélèvement.

### C. Analyse par CPG

L'analyse par CPG va nous permettre de connaître la teneur en limonène du macérat obtenu.

L'encadrant du TP vous guidera pour cette étape.

#### Conditions opératoires :

Chromatographe Bruker CP-456 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).

##### -Phase stationnaire :

Rxi 5% diphenyl 95% diméthylsiloxane

Diamètre 0,32 mm, longueur 30 m, épaisseur de la phase stationnaire 0,25µm.

Tmax = 340 ° C

- Températures : injecteur : 250 ° C

-détecteur FID à 250 ° C

- Gaz vecteur : Hélium : débit : 1 mL / min

- injecteur Split : facteur de division 10 : 1

-Four à 80°C pendant 2min puis 20°C/min jusqu'à 250°C ; ce qui correspond à un Run time de 10,5 min.

Charger la méthode "CS2 limonène" qui présente les caractéristiques ci-dessus, préparer une séquence comportant, dans l'ordre :

-le blanc (mélange eau/acétone 50/50)

-les étalons

-les macérats

P6 10 + limonène

## D. Exploitation des résultats :

Résultats de l'étalonnage :

- Déterminer les aires et le temps de rétention du limonène sur chaque chromatographe. (On vérifiera que le temps de rétention est constant sur tous les chromatographes).

Solution	Concentration en limonène (g/L)	Aire	Temps de rétention
S1	1		
S2	0,2		
S3	0,5		
S4	0,8		

- Tracer la courbe d'étalonnage. En déduire par régression linéaire son équation de la forme Aire=f(c).
- Donner le coefficient de corrélation  $r^2$  associé.
- Pour chaque macérat, calculer sa concentration en limonène à l'aide de la courbe d'étalonnage et en déduire le taux d'extraction du limonène en mg/g d'écorces.
- Résumer toutes les données du TP en complétant le tableau suivant.

P6 10 + limonène

Binôme					
Méthode					
Masse d'écorces					
Concentration du macérat					
Taux d'extraction en mg/G					

- Conclure