

C o l l o q u e

**Extraction par solvant  
pour la Valorisation  
des Matières Premières Végétales**



**Toulouse (France) , 27 - 28 avril 2000**

## **Extraction et caractérisation de colorants végétaux par différentes méthodes**

**G. VILAREM, I. BAREAU, E. MATADAMAS, S. NARANJO**

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle  
UMR INRA 1010 – INPT - ENSCT  
118, route de Narbonne - 31077 TOULOUSE CEDEX 4

### RESUME

Depuis quelques années, un intérêt croissant de la part des consommateurs pour les colorants naturels se fait ressentir (1-3). Plusieurs projets nationaux et internationaux mettent en culture diverses plantes tinctoriales dans l'objectif d'une production industrielle de colorants naturels. Le LCA/CATAR est impliqué dans certains de ces programmes au travers de leur coordination, pour la mise au point de méthodes d'extraction et de caractérisation, ainsi que pour la recherche de nouvelles valorisations de pigments et colorants naturels. De fait, en fonction des propriétés physico-chimiques des molécules recherchées, de leur localisation cellulaire et des propriétés physiologiques des plantes, plusieurs protocoles d'extraction faisant appel à des solvants (solvants organiques, aqueux, gazeux) et des technologies variées (Ultrasons, CO<sub>2</sub> supercritique, etc.) ont dû être adaptées.

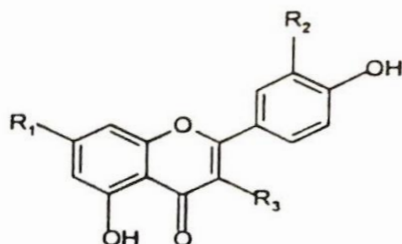
Since some years an interest growing the share of consumers for the natural dyes is made feel. Several national and international projets put in various dye plants in the objective of an industrial production of natural dyes. The LCA/CATAR is implied in some of these programs for the development of extraction methods and characterization, as well as for the new valorization research of natural pigments and dyes. Made in function of the physic and chemical properties of researched molecules, their cellular location and physiology properties of plant them. Several protocols of extraction (organic, aqueous, and gaseous solvents) and the technological varied (ultrasonic sounds, supercritic CO<sub>2</sub>, etc) have to be adapted it.

Dans les projets présentés, trois procédés distincts d'extraction se dégagent :

- l'extraction liquide-solide par solvants hydro-alcooliques,
- l'extraction liquide-solide par solvants aqueux,
- et enfin l'extraction liquide-gaz-solide sous-conditions supercritiques.

Le choix du procédé est fait en fonction des propriétés physico-chimiques des produits à extraire ou de la forme métabolique sous laquelle le produit visé se trouve dans la plante ou encore en fonction du domaine d'utilisation du produit final.

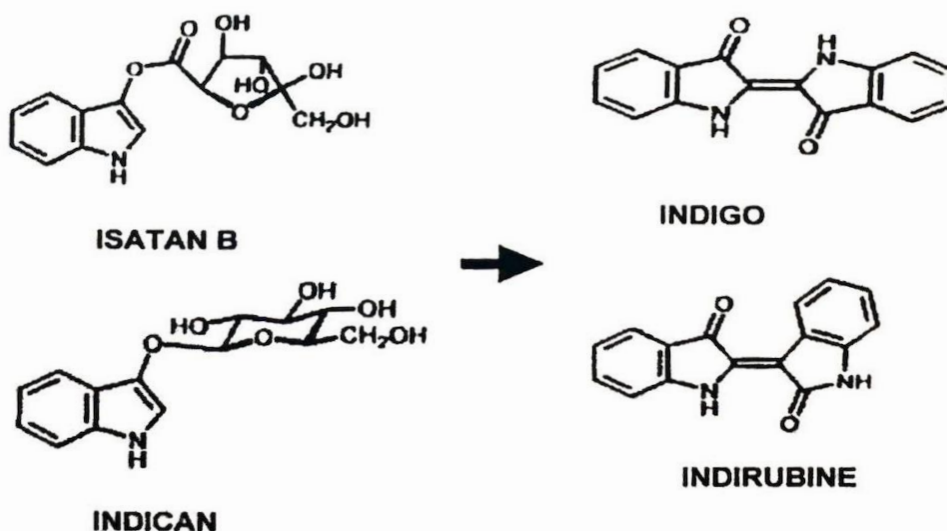
Les molécules colorantes de la gaude (*Reseda luteola*), sont la lutéoline et ses dérivés glycosilés, lutéoline 7-O-glucoside, lutéoline 3',7-O-diglucoside (figure 1) qui arborent des couleurs s'étendant du jaune au jaune orangé (4, 5). Les deux composés présents sont solubles dans les solutions alcooliques à chaud.



Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Lutéoline	OH	OH	H
Lutéoline 7-O-glucoside	O-glucose	OH	H
Lutéoline 3',7-di-O-glucoside	O-glucose	O-glucose	H

**Figure 1 : Structures chimiques des dérivés de la lutéoline**

Les molécules colorantes du pastel (*Isatis tinctoria* L.), n'existent pas sous leur forme finale dans la plante, mais sous forme de précurseurs : l'isatan b et l'indican. Ces derniers sont respectivement un ester et un éther glycosylé d'indoxyle solubles dans l'eau. Par hydrolyse et oxydation, les précurseurs cités précédemment mènent majoritairement à l'indigo et minoritairement à l'indirubine (figure 2).



**Figure 2 : Structures chimiques de l'indigo, de l'indirubine et des précurseurs**

L'objectif de cette étude a été de déterminer l'effet du pH du solvant d'extraction sur le rendement en indigo et en indirubine.

*Tagetes erecta* ou œillet d'Inde est une plante cultivée au Mexique pour la production de diesters de caroténoïdes (6) à usage alimentaire (coloration des poulets, des œufs,... etc) (figure 3).

L'extraction industrielle se fait à l'échelle industrielle par l'hexane qui a l'inconvénient d'entraîner avec lui d'autres composés gênants de nature lipophile. La mise au point d'un procédé d'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique permet l'extraction sélective de la fraction colorante et des fractions de type terpénoïde afin d'obtenir des dérivés de caroténoïdes plus purs et de qualité alimentaire.

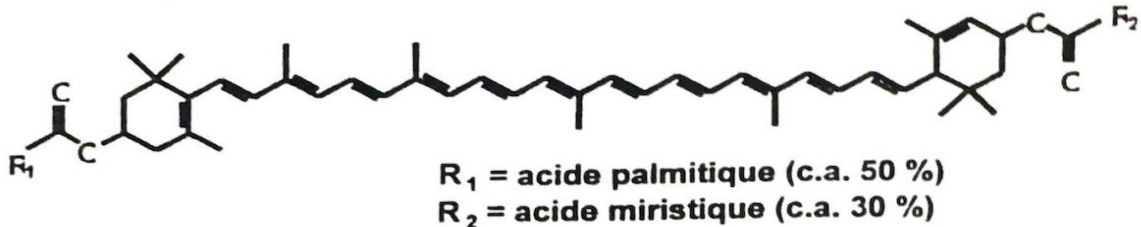


Figure 3 : Structures chimiques des diesters de caroténoïdes

## I EXTRACTION DES COMPOSES COLORANTS DE LA GAUDE (*Reseda luteola*)

### I.1 Matériel et méthodes

#### **Matériel végétal :**

Les parties aériennes de la gaude ont été collectées dans le sud de la France (Ariège).

#### **Analyse HPLC :**

L'HPLC en phase inverse, couplée à un détecteur à barrette de diode, permet au cours d'une analyse unique, la séparation, l'identification et la quantification des composés présents dans l'extrait analysé.

#### **Extraction des flavonoïdes :**

Les flavonoïdes sont extraits à partir de sommités séchées et broyées par 100 ml d'un mélange méthanol-eau (80 : 20 v/v). L'extraction est réalisée à température ambiante et à reflux à 80°C.

#### **Analyse statistique :**

Une analyse de variance ( $\alpha = 5 \%$ ) fut effectuée pour comparer la quantité de flavonoïdes obtenus par extraction à température ambiante et celle obtenue par extraction à reflux afin de déterminer la méthode d'extraction et le temps d'extraction les mieux adaptés à l'extraction des colorants de la gaude.

### I.2 Résultats et discussion

Les flavonoïdes de la gaude sont extraits à température ambiante et à reflux, pendant des temps d'extraction variant de 5 à 240 mn. Pour l'extraction à température

ambiante, une macération des parties aériennes de la gaude dans le MeOH pendant 24 heures est également réalisée.

La lutéoline 7-O-glucoside et la lutéoline présentes dans chacun des extraits sont quantifiés par HPLC. Chaque extraction a été répétée 4 fois.

**Extraction à température ambiante :**

La quantité de luteoline 7-O-glucoside et de lutéoline extraites à température ambiante augmente avec le temps de macération (tableau 1).

Temps (mn)	Lutéoline 7-O-glucoside		Lutéoline	
	Rendement (%)*	Ecart type	Rendement (%)*	Ecart type
5	0,151	0,020	0,194	0,022
15	0,165	0,006	0,202	0,012
30	0,183	0,008	0,238	0,012
60	0,226	0,002	0,283	0,001
120	0,267	0,034	0,346	0,036
240	0,292	0,015	0,370	0,012
1140	0,271	0,045	0,369	0,062

\* g composé/100g plantes sèches

**Tableau 1 : Rendements en lutéoline 7-O-glucoside et en lutéoline obtenus lors de l'extraction à température ambiante**

Une extraction à température ambiante des flavonoïdes de la gaude à l'aide de MeOH permet d'obtenir en moyenne 0,68 % de lutéoline 7-O-glucoside et de lutéoline (g composé/100g plante sèche utilisée).

**Extraction à reflux :**

La quantité de lutéoline 7-O-glucoside et de lutéoline obtenues par extraction à reflux est relativement constante au-delà de 30 minutes d'extraction (tableau 2).

Temps (mn)	Lutéoline 7-O-glucoside		Lutéoline	
	Rendement (%)*	Ecart type	Rendement (%)*	Ecart type
5	0,294	0,028	0,364	0,046
15	0,357	0,007	0,448	0,014
30	0,363	0,013	0,456	0,026
60	0,366	0,016	0,443	0,021
120	0,359	0,014	0,429	0,019
240	0,358	0,04	0,422	0,043

\* g composé/100g plantes sèches

**Tableau 2 : Rendements en lutéoline 7-O-glucoside et en lutéoline obtenus lors de l'extraction à reflux**

Une extraction à reflux pendant 30 minutes des flavonoïdes de la gaude à l'aide de MeOH 80 % permet d'obtenir en moyenne 0,82 % de lutéoline 7-O-glucoside et de lutéoline (g composé/100g plante sèche utilisée).

**Comparaison de l'extraction à température ambiante pendant 30 mn avec l'extraction à reflux pendant 24 h :**

L'extraction à reflux pendant 30 mn se révèle plus intéressante qu'une extraction à température ambiante pendant 24 h puisqu'elle permet d'obtenir des quantités significativement plus importantes en flavonoïdes (tableau 3).

Composé	Méthode d'extraction	Rendement (%)	Ecart type	F	Valeur de P
Lutéoline 7-O-glucoside	A reflux (30 minutes)	0,363	0,013	55,00	0,0003
	Température ambiante (24 heures)	0,289	0,015		
Lutéoline	A reflux (30 minutes)	0,456	0,026	14,27	0,0092
	Température ambiante (24 heures)	0,396	0,018		

**Tableau 3 : Comparaison par analyse de variance ( $\alpha = 5\%$ ) des rendements en lutéoline 7-O-glucoside et en lutéoline obtenus par extraction à température ambiante (24 h) et par extraction à reflux (30 mn)**

## II EXTRACTION DES PIGMENTS DE PASTEL (*Isatis tinctoria* L.)

### II.1 Matériel et méthodes

#### **Matériel végétal :**

Des feuilles de pastel ont été fournies par la société BLEU DE LECTOURE .

#### **Extraction de l'indigo :**

Les feuilles de pastel sont coupées en morceaux et mises dans un réacteur thermostaté à double enveloppe . Dans 1000 ml d'eau on introduit 100 g de feuilles fraîches en faisant augmenter la température jusqu'à 70 °C pendant 60 minutes. L'extraction accomplie, le milieu est basifié. Après oxydation, l'indigo précipite et est récupéré par filtration .

Le produit ainsi obtenu est analysé. L'indigo et l'indirubine sont dosés par CCM/densitométrie.

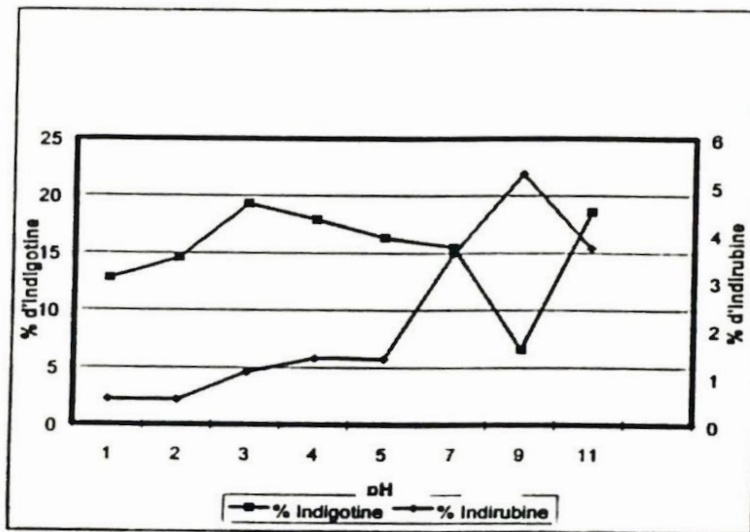
### **Analyse :**

Les échantillons sont déposés sur plaques de gel de silice (MERCK). Ces dépôts ont été effectués à l'aide d'un applicateur DESAGA AS 30 permettant de déposer les échantillons ainsi que les étalons. Les étalons utilisés sont l'indigo SIGMA et l'indirubine synthétisée au laboratoire.

Après son développement, la plaque est lue à l'aide d'un densitomètre DESAGA/HEIDELBER CD 60 qui mesure la densité optique des taches éluées.

## **II.2 Résultats et discussion**

Le rendement en indigo varie en fonction du pH du solvant d'extraction. Le meilleur rendement est obtenu avec un pH acide. Ces résultats sont en accord avec les travaux d'Epstein (7). La teneur en indirubine par contre augmente avec la basicité du pH.



**Figure 4 :** Effet du pH du milieu d'extraction sur le rendement en indigo et indirubine (pourcentage par rapport au poids sec de l'extrait brut)

## **III EXTRACTION DES FRACTIONS COLORANTES DE L'ŒILLET D'INDE (*Tagetes erecta*)**

### **III.1 Matériel et méthodes**

#### **Matériel végétal :**

Les échantillons industriels de farine de *Tagetes erecta* ont été fournis par Bioquimex - Reka (Querétaro, Qro., Mexique).

#### **Equipement supercritique :**

L'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique est réalisée grâce à un extracteur Hewlett Packard de type 7680T connecté à une chambre pour l'injection de co-solvants HP 1050.

### Extraction des caroténoïdes :

Les essais d'extraction par fluide supercritique sont menés à 40°C et ont été réalisés en faisant varier la densité de fluide de 0,7 à 0,9 g/ml en présence et en absence de co-solvants.

### III.2 Résultats

La densité de CO<sub>2</sub> pour laquelle les rendements d'extraction sont les plus élevés est de 0,9 g/ml (280 bars). Des densités inférieures à 0,7 g/ml n'extraient pas de colorants. Une élévation de la température d'extraction permet d'augmenter le rendement en caroténoïdes mais ces derniers sont dégradés (figure 5).

Les résultats de l'extraction des caroténoïdes par fluide supercritique mettent en évidence une relation positive entre l'augmentation du log P (index de polarité) et l'accroissement de rendement en ce qui concerne la série suivante d'alcool : CH<sub>3</sub>OH < C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH < C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH < C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH, (figure 6). Au-delà de C<sub>4</sub>, l'utilisation d'alcool de poids moléculaire plus important devient difficile du fait des points d'ébullition et des viscosités incompatibles avec une utilisation dans le domaine de cette étude.

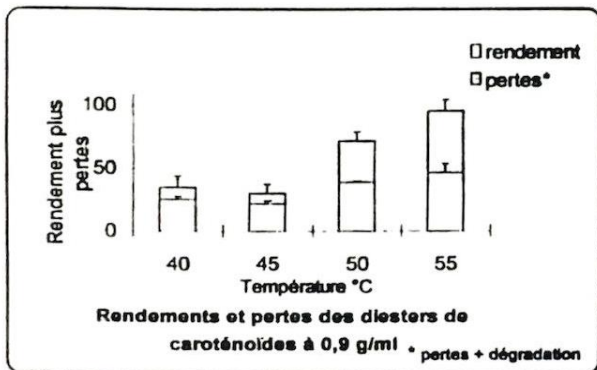


Figure 5 : Rendements et pertes des diesters de caroténoïdes à 0,9 g/ml

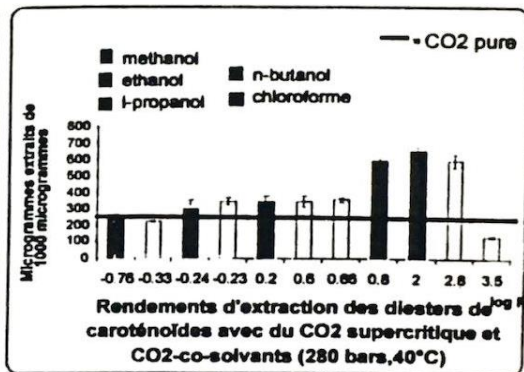


Figure 6 : Rendements d'extraction des diesters de caroténoïdes avec du CO<sub>2</sub> supercritique et du CO<sub>2</sub> co-solvants (280 bars, 40°C)

### REFERENCES

- (1) Hill, D.J, *Rev. Prog. Coloration*, **27**, 18 (1997).
- (2) Dedhia, M., *Colourage*, **45** (1998).
- (3) Glover, B., *Textile Chemist and Colorist*, **27**, 17 (1995).
- (4) Chevreul, E., *J. Chem. Med.*, **6**, 157 (1830).
- (5) Moldenhauer, F., *Ann. Chim. Pharm.*, **100**, 180 (1856).
- (6) El-Tantawy, *et al.*, *Bull. Fac. Pharm.*, Cairo Univ., **32**(1), 113-118 (1994).
- (7) Epstein, E., Nabors, M.W., Stowe, B.B., *Nature*, **216**, 547-549 (1967).