

17/540.839

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes

2^{ème} Année Master

Dosage par HPLC de la caféine et étude de l'acidité des boissons des thés verts du marché Algérien.

Filière: Génie des procédés

Spécialité: Génie chimique

Présenté par :

ATAMENIA Nour El Houda

Sous la direction de :

Mme BOULMOKH Yamina

Juin 2016

Résumé

Ce travail dans lequel ont été étudiées dix marques de thé vert du marché de la ville de Guelma porte sur: Le dosage par HPLC de la caféine dans les boissons de thé vert préparées par infusion et par décoction, la comparaison des concentrations de la caféine dans les boissons de quelques marques ayant chacune deux lots différents, la mesure des pH des boissons de thé vert de différentes marques et le calcul des rendements des deux méthodes d'extraction utilisées (infusion et décoction).

Le dosage de la caféine dans les boissons préparées par infusion pendant 7 minutes à une température de 85°C a donné des concentrations entre 27,83 et 44,14 mg. L⁻¹, cette différence est due essentiellement au sol où la plante est cultivée et même à la saison et au type de la cueillette.

Les teneurs de la caféine dans les boissons de thé vert préparées par décoction ont légèrement augmenté par rapport à celles dans les boissons préparées par infusion. Sachant que la température à laquelle sont réalisées les deux méthodes d'extraction est 85°C avec une durée d'infusion de 7 minutes, on ne peut pas privilégier l'une ou l'autre méthode dans ces conditions de préparation.

Les concentrations du composé étudié dans deux lots différents pour quatre marques de thé vert ont montré une stabilité dans la production de ce type de thé.

Les valeurs des pH qui varient entre 5,18 et 5,70 indiquent que les boissons de thé vert étudié sont des acides faibles.

Les valeurs des rendements de l'extraction par infusion ou décoction pour les marques de thé vert étudié varient entre 6,4 et 14,2%. Ce résultat paraît logique parce que la solubilité des composés chimiques constituant le thé et parmi lesquels les polyphénols et les bases puriques est partielle.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail et cet événement

marquant dans ma vie,

D'abord a mes chers parents, mon père et ma mère

c'est à vous que je dis tout ce travail est le fruit de votre

éducation et votre patience et sacrifices.

A mes grands pères et mes grands mères.

A mes adorables sœurs *Maroua* et *Rofaida*.

A mes tantes et mes oncles.

A mes cousins et cousines.

A mes amies, Amel, Basma, Rokia, Amina, Fatma.

A tous les gens que j'aime.

Nour El Houda

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail, et qui m'a offert aussi toute la santé, le pouvoir et la patience pour accomplir ma tâche.

En second lieu, je tiens à remercier mon encadreur *Madame Boulmokh Yamina* pour ses précieux conseils et son aide durant toute la période du travail.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'examiner mon mémoire et de l'enrichir par leurs propositions.

Mes remerciements s'adressent aussi à ma grande famille pour son soutien, à mes parents, mes sœurs et à tous mes amis et à tous ceux qui m'ont apporté leur aide, ne serait-ce que par un simple mot d'encouragement .

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Sommaire

Introduction général.....1

Chapitre I: Généralités sur le thé vert
--

I.1. Introduction.....3

I.2. Histoire du Thé Vert.....3

 I.2.1. En Chine.....3

 I.2.2. En Japon.....4

I.3. Origine du Camellia Sinensis.....5

I.4. Description de Camellia Sinensis.....5

 I.4.1. La plante.....5

 I.4.2. La feuille.....6

I.5. Culture et production du thé.....6

 I.5.1. La culture des plants de théiers.....6

 I.5.1.1. Les conditions géographiques et climatiques.....6

 I.5.1.2. La plantation et la taille des plants.....7

 I.5.2. La cueillette des feuilles.....7

 I.5.2.1. Les périodes de cueillette.....7

 I.5.2.2. Les types de cueillette.....7

I.6. Les grades du thé vert.....8

I.7. La production du thé vert.....9

 I.7.1. La cueillette.....10

 I.7.2. Le flétrissage.....10

 I.7.3. La torréfaction.....11

 I.7.4. Le roulage.....11

 I.7.5. Le séchage.....12

I.8. Activité thérapeutique du thé vert.....	12
I.8.1. Activité antioxydante.....	12
I.8.2. Prévention des maladies cardiovasculaires.....	13
I.8.3. Prévention du cancer.....	13
I.8.4. Activité antimicrobienne.....	14
I.8.5. Activité cognitive.....	14
I.8.6. Contre les maladies de Parkinson et d'Alzheimer.....	14
I.9. Toxicité.....	14
I.10. Qualité du thé vert.....	14

Chapitre II: La composition chimique du thé vert

II.1. Introduction.....	16
II.2. La composition chimique du thé vert.....	16
II.2.1. Les polyphénols.....	16
II.2.1.1. Les flavonoïdes.....	16
II.2.1.2. Acides phénoliques.....	18
II.2.1.3. Tanins.....	19
II.2.2. Les bases puriques.....	20
II.2.2.1. La caféine.....	21
II.2.2.2. La théophylline.....	21
II.2.2.3. La théobromine.....	21
II.2.3. Les acides aminés.....	22
II.2.4. Les vitamines.....	23
II.2.4.1. Vitamine C (acide ascorbique).....	23
II.2.4.2. Vitamine E.....	23

II.2.4.3. Vitamine B9 (Acide folique).....	24
II.2.5. Les minéraux.....	24
II.2.5.1. Le potassium.....	24
II.2.5.2. Calcium.....	24
II.2.5.3. Phosphore.....	24
II.2.6. Les glucides.....	25
II.2.7. Les lipides.....	25
II.2.8. Les caroténoïdes.....	25
II.3. Etude de la caféine.....	27
II.3.1. Définition.....	27
II.3.2. Structure.....	27
II.3.3. Propriétés physico-chimiques.....	27
II.3.4. La caféine du thé vert.....	28
II.3.5. Les bienfaits généraux de la caféine sur la santé.....	28
II.3.6. Les effets antalgiques.....	29
II.3.7. Toxicité.....	29

<p style="text-align: center;">Chapitre III: Modes opératoires et méthodes de calcul et d'analyse</p>
--

III.1. Introduction.....	30
III.2. Matériels.....	30
III.3. Solvants et réactifs.....	30
III.4. Principe de fonctionnement du lyophilisateur.....	30
III.5. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	33
III.5.1. Définition et principe.....	33
III.5.2. Différents compartiments d'un appareil HPLC.....	34

III.5.3. Constituants de l'appareil Agilent 1260 infinity.....	35
III.6. Les données du composé étudié (la caféine).....	36
III.7. Echantillons de thés.....	37
III.8. Méthode de préparation et injection du standard (la caféine).....	39
III.9. Méthodes de préparation et injection des échantillons de thé.....	39
III.10. Mesure du pH des solutions de thé.....	39
III.11. Calcul des rendements.....	39
III.12. Dosage par HPLC-UV-DAD de la caféine dans les échantillons de thé.....	40
III.12.1. Conditions de l'analyse.....	40
III.12.2. Phase mobile.....	40
III.12.3. Phase stationnaire.....	41
III.12.4. Gradient.....	41
III.13. Validation de la méthode analytique.....	41
III.13.1. Courbe d'étalonnage.....	41
III.13.2. Détermination des limites de détection et de quantification.....	42
III.14. Injection.....	42
III.15. Intégration.....	42
III.16. Méthode de calcul de la concentration de la caféine dans les échantillons de thé vert.....	43
III.17. L'écart-type (S).....	44

Chapitre IV: Résultats et Discussions
--

IV.1. Introduction.....	45
IV.2. Résultats.....	45
IV.2.1. Données chromatographiques de la caféine.....	45

IV.2.2. Validation de la méthode d'analyse.....	46
IV.2.2.1. Linéarité des courbes d'étalonnage.....	46
IV.2.2.2. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de la caféine.....	47
IV.2.3. Présentation des chromatogrammes des échantillons de thé vert.....	47
IV.2.4. Concentrations de la caféine dans les différents échantillons.....	50
IV.2.5. Mesure du PH.....	51
IV.2.6. Rendements des extractions (infusion et décoction).....	52
IV.3. Discussion.....	53
IV.3.1. Concentrations de la caféine dans les échantillons du thé vert.....	53
IV.3.2. Discussion des valeurs du pH.....	55
IV.3.3. Discussion des résultats des rendements.....	57
Conclusion général.....	58

Listes des figures et des tableaux

Liste des figures	page
Figure I.1: Gâteau de thé	4
Figure I.2: Poudre de thé vert chinois	4
Figure I.3: Camellia Sinensis var. Sinensis	5
Figure I.4: Camellia Sinensis var. Assamica	5
Figure I.5: La plante Camellia Sinensis	6
Figure I.6: Les différentes cueillettes du thé	7
Figure I.7: Etapes de production du thé vert	9
Figure I.8: La cueillette manuelle	10
Figure I.9: La cueillette mécanique	10
Figure I.10: Flétriissage traditionnel sur plateau en bambo	10
Figure I.11: Torréfaction artisanale dans un wok	11
Figure I.12: Torréfaction à machine	11
Figure I.13: Roulage à la main	12
Figure I.14: Roulage mécanique	12

Figure I.15: Séchage traditionnel	12
Figure II.1: Structure de base des flavonoïdes	16
Figure II.2: Structure de base des catéchines	17
Figure II.3: Structure d'épicatéchine (EC)	17
Figure II.4: Structure d'épicatéchine gallate (ECG)	17
Figure II.5: Structure d'épigallocatechine (EGC)	18
Figure II.6: Structure d'épigallocatechine gallate (EGCG)	18
Figure II.7: Structure générale des flavonols	18
Figure II.8: Structure de l'acide caféique	19
Figure II.9: Structure de l'acide gallique	19
Figure II.10: Structure d'un tanin hydrolysable	20
Figure II.11: Structure d'un tanin condensé (proanthocyanidine)	20
Figure II.12: Structure de la Caféine	21
Figure II.13: Structure de la Théophylline	21
Figure II.14: Structure de la Théobromine	22
Figure II.15: Structure de la Théanine	22
Figure II.16: Structure de l'acide L-ascorbique	23

Figure II.17: Structure l'α-tocophérol	23
Figure II.18: Structure de l'acide folique	24
Figure II.19: Structure de la caféine	27
Figure III.1: Lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus	32
Figure III.2: HPLC (Agilent 1260 infinity) utilisé dans l'analyse	35
Figure III.3: Structure de la caféine	36
Figure III.4: Echantillons des thés étudiés	37
Figure IV. 1: Chromatogrammes en 2D et 3D de la caféine ; $t_R=1.35\text{min}$, $\lambda_{\text{max}}=273\text{nm}$	45
Figure IV.2: Courbe d'étalonnage de la caféine	46
Figure IV.3: Chromatogrammes des échantillons préparées par infusion du thé vert de la marque KA (lot 1 et lot 2)	47
Figure IV.4: Chromatogrammes des échantillons préparés par infusion du thé vert de marque : T1A, S1A et M1A	48
Figure IV.5: Chromatogrammes des échantillons préparés par décoction du thé vert de marque: T1A, S1A et M1A	49
Figure IV.6: Histogrammes en 3D des concentrations de la caféine dans échantillons de thé vert	53
Figure IV.7: Histogrammes en 3D des concentrations de la caféine dans les échantillons de thé préparés par infusion et décoction	54

Figure IV.9: Histogrammes en 3D des pH des échantillons de thé vert préparés par infusion	56
Figure IV.10: Histogrammes en 3D des pH des échantillons de thé vert avec 2 lots différents	56
Figure IV.11: Histogrammes en 3D des pH des échantillons de thé vert (infusion et décoction)	56
Figure IV.12: Histogrammes en 3D des rendements en fonction des marques du thé vert, de la méthode d'extraction et des lots	57

Liste des tableaux	Page
Tableau II.1: Composition chimique des feuilles de thé fraîches	26
Tableau II.2: Composition chimique de l'infusion d'une feuille de thé vert	26
Tableau III.1: Quelques caractéristiques de la caféine	36
Tableau III.2: Caractéristiques organoleptiques des échantillons de thé Vert	38
Tableau III.3: Quelques propriétés physicochimiques des solvants utilisés	40
Tableau III.4: Gradient HPLC pour l'analyse de la caféine dans le thé	41
Tableau IV.1: Données HPLC pour la caféine	46
Tableau IV.2: Concentrations de la caféine en mg.L^{-1} dans les échantillons préparés par infusion	50
Tableau IV.3: Tableau comparatif des concentrations de la caféine dans les boissons préparées par infusion de 4 marques de thé vert avec 2 lots différents	50
Tableau IV.4: Concentration de la caféine en mg.L^{-1} dans les échantillons préparés par décoction	50
Tableau IV.5: Les valeurs de PH des échantillons des thés verts à 25°C	51
Tableau IV.6: Les valeurs des rendements (%) de l'extraction (infusion et décoction)	52

Introduction générale

Introduction générale

Le thé est une boisson aromatique utilisant des feuilles et des bourgeons de théier (*Camellia Sinensis*) un arbuste originaire d'Extrême-Orient, de la famille des Théacées.

Le thé est aujourd'hui la boisson la plus bue au monde après l'eau et avant le café. Sa consommation peut prendre des formes très diverses : additionnée de lait et de sucre au Royaume-Uni, longuement bouillie avec des épices en Mongolie, bouillie avec des épices et du lait comme en Inde, préparée dans de minuscules théières par infusion dans une technique chinoise, battue comme au Japon et préparée par décoction en mettant un long temps jusqu'à l'obtention d'une boisson mousseuse au Sud algérien.

Le thé vert est un thé dont l'oxydation naturelle est rapidement stoppée après la cueillette. Il en résulte un thé non-oxydé. Il contient de la caféine et de nombreuses autres substances lui conférant plusieurs vertus thérapeutiques.

La caféine connue depuis des milliers d'années est un alcaloïde appartenant à la famille des bases puriques ou plus précisément des méthylxanthines, d'origine végétale et utilisée pour ses propriétés stimulantes sur le système nerveux. Elle est aujourd'hui très présente dans notre culture et ainsi on la retrouve sous différentes formes, notamment dans les boissons, dans des spécialités pharmaceutiques et dans les compléments alimentaires.

Vu l'ampleur de la consommation du thé vert dans notre société algérienne pour ses bienfaits sur la santé et l'importance de la caféine précisément, ce travail de fin d'études se focalisant sur le thé vert et sur l'un de ses principes actifs (la caféine) a été proposé.

Notre travail expérimental qui a été réalisé au laboratoire de chimie appliquée (LCA) de l'université de Guelma avait comme objectif les quatre points suivants:

- Le premier : Mesurer le pH des boissons de thé vert de différentes marques vendues au niveau de la ville de Guelma.
- Le deuxième : Dosage par HPLC de la caféine dans les boissons de thé préparées par infusion et par décoction.
- Le troisième : Comparer la concentration de la caféine de quelques marques ayant chacune deux lots différents.
- Le quatrième : Calculer les rendements des deux méthodes d'extraction utilisées (infusion et décoction).

La recherche bibliographique et le travail expérimental ont abouti à la rédaction d'un mémoire structuré comme suit :

- Une introduction générale où a été élucidé principalement l'objectif de cette étude.
- Le premier chapitre présente essentiellement : l'histoire, l'origine, la plante, la culture, le procédé de fabrication et les activités thérapeutiques du thé vert.
- Le deuxième chapitre a été consacré à la composition chimique de la feuille du thé vert et une étude particulière a été faite pour notre composé cible : la caféine.
- La partie expérimentale a été débütée par le troisième chapitre qui contient le matériel, les modes opératoires, les formules de calcul des paramètres de validation de la méthode de dosage (HPLC) et la méthode de calcul des concentrations de la caféine dans les boissons de thé.
- Les résultats et les discussions étant le fruit de la partie ^{tié} expérimentale ont été détaillés dans le dernier chapitre.
- A la fin de ce mémoire, une conclusion générale a récapitulé les deux parties théorique et expérimentale.

Chapitre I

Généralités sur le thé vert

Chapitre I: Généralités sur le thé vert

I.1. Introduction

Un thé vert est un thé peu ou non oxydé lors de sa fabrication, conservant ainsi intactes ses propriétés. [1]

Le thé vert est connu depuis plusieurs millénaires, en particulier dans les populations asiatiques qui lui attribuent des propriétés médicinales.

Après l'eau, le thé est la boisson la plus populaire dans le monde, il est consommé en raison de sa saveur, ses caractéristiques aromatiques et effets bénéfiques pour la santé. [2]

Les recherches scientifiques récentes ont mis en évidence ses propriétés thérapeutiques liées, en particulier, à sa riche teneur en polyphénols, à l'action antioxydante et aussi en caféine. [3]

I.2. Histoire du thé vert [4]

I.2.1. En Chine

L'histoire du thé vert commence il y a environ 5000 ans en Chine. La légende raconte que c'est l'empereur Shennong qui aurait découvert le thé en premier.

A l'origine, il s'agissait d'arbres sauvages principalement dans les régions montagneuses du sud de la Chine qui servaient à produire le thé.

La découverte de son effet tonique et rafraichissant, mais aussi de ses puissantes propriétés médicinales ont participé au développement de son utilisation principalement par les moines bouddhistes, mais aussi par la classe supérieure chinoise.

Aux IV^{ème} et V^{ème} siècles de notre ère, le thé était transformé d'une manière totalement différente d'aujourd'hui. Les feuilles étaient trempées après la récolte, réduites dans un hachoir puis pressées en briques de thé compactes (aussi appelé gâteau de thé). Le thé était ensuite mélangé et cuit avec de nombreux autres ingrédients: riz, gingembre, sel, zestes d'orange, oignons, etc.

Pendant la dynastie Tang, c'était ainsi que l'on avait pour habitude d'utiliser le thé. Mais il existait aussi des pochettes de thé concassé que l'on utilisait contre les rhumatismes. C'est durant cette période que le thé connu sa première expansion majeure.



Figure 1.1: Gâteau de thé. [4]

Une grosse impulsion à la culture du thé se produisit sous la dynastie Song. C'est à cette période que la première poudre de thé vert fut utilisée pour la cérémonie du thé et que ce produit commença à devenir un produit de consommation quotidienne dans cette région du monde (Chine et Japon).

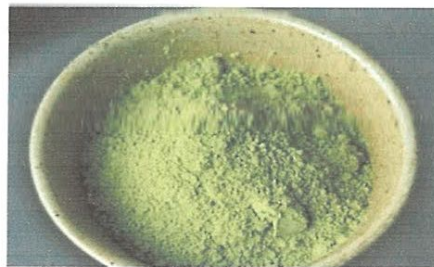


Figure 1.2: Poudre de thé vert chinois. [4]

Au XIII^{ème} siècle, les acquis en matière de thé furent détruits et presque totalement perdus du fait de la conquête et la domination des mongoles. Ces derniers étaient habitués à boire du thé totalement fermenté et n'avaient que très peu de curiosité pour la culture du thé sous dynastie Song.

De ce point de vue l'héritage Mongol fut durable. La poudre de thé vert ne réapparut que des siècles plus tard et ne joua malheureusement en Chine, contrairement au Japon, qu'un rôle mineur dans la culture du thé.

1.2.2. En Japon

Le thé vert arriva au Japon au VIII^{ème} siècle via des moines bouddhistes chinois. Ces moines auraient organisé des voyages dans ce but. Par ailleurs, il semblerait que des moines bouddhistes japonais seraient partis étudier «l'art du thé» en Chine et à leur retour auraient participé à rendre l'implantation de cette culture possible dans l'archipel.

Le thé vert était apprécié par les moines pour ses propriétés médicinales ainsi que pour son effet tonifiant et stimulant pour la concentration pendant de longues méditations.

En 1738, un certain Soen Nagatari inventa la méthode de roulage des feuilles de thé après la torréfaction à la vapeur d'eau. Cette méthode reçut un succès retentissant et est encore utilisée à ce jour.

En 1859, avec l'ouverture des ports commerciaux à plus grande échelle par les samouraïs que le thé devient une boisson de consommation quotidienne au Japon. Un peu plus tard, il se développe et prend une ampleur internationale grâce à l'utilisation de machines industrielles.

I.3. Origine du *Camellia Sinensis* [4]

L'arbre ou arbuste à thé, *Camellia Sinensis*, est à l'origine de tous les types de thés. Le terme *Sinensis* indique l'origine géographique de la plante, en l'occurrence la Chine. De même, la variété *Assamica* prend son nom de la région d'Assam au Nord de l'Inde. Les thés de qualité supérieure viennent avant tout de la variété *Sinensis*. Il n'est pas encore fermement établi laquelle des deux variétés était réellement la variété de base de cette espèce, mais il semblerait que l'espèce d'origine soit le *Camellia Sinensis* provenant de la province de Yunnan en Chine.



Figure I.3: *Camellia Sinensis* var.
Sinensis. [4]



Figure I.4: *Camellia Sinensis* var.
Assamica. [4]

I.4. Description de *Camellia Sinensis*

I.4.1. La plante

A l'état naturel, le théier est un arbre très rameux, de 5 à 10 mètres de haut et pouvant atteindre 15 mètres.

Les fleurs sont odorantes, axillaires et solitaires. Leur taille varie et peut aller jusqu'à 3 centimètres (cm). Elles sont dialypétales (les pétales sont indépendants entre eux), pentamères (formées de cinq pétales), actinomorphes (l'agencement des pièces florales est symétrique par rapport à l'axe de la fleur). Les pétales sont blancs, légèrement adhérents à la base et forment une corolle spiralée. Le calice, formé de cinq sépales, est également spiralé.

Le fruit est une capsule loculicide trigone (avec trois loges uniséminées), ne renfermant qu'une ou deux graines oléagineuses, exalbuminées, entourées d'un tégument sans arille.



Figure I.5: La plante *Camellia Sinensis*.

I.4.2. La feuille

Les feuilles du théier ont une longueur de 5 à 14 cm et une largeur de 1,9 à 5 cm. Elles sont persistantes, molles et duveteuses si elles sont jeunes, et deviennent glabres lorsqu'elles sont âgées.

Elles sont isolées, alternes, oblongues-ovales ou lancéolées, vert foncé, brillantes, à bord très dentelé et non stipulées. Les dents sont recourbées en forme de griffes, se terminant par des hydatodes.

Ces derniers sont constitués d'un stomate aquifère, associé à une chambre sous stomatique remplie de cellules parenchymateuses gorgées d'eau ou épithème, accueillant les extrémités terminales des nervures de la feuille.

I.5. Culture et production du thé [4]

I.5.1. La culture des plants de théiers

I.5.1.1. Les conditions géographiques et climatiques

Les caractéristiques des sols de culture et les conditions climatiques sont des facteurs influençant la qualité des feuilles du théier.

Le sol ne doit être ni calcaire, ni argileux, mais acide et meuble afin de permettre à la racine centrale du théier de s'ancrer en profondeur. Il doit également être en pente pour éviter la stagnation de l'eau.

Les meilleures zones de culture se trouvent dans les régions tropicales et subtropicales, à une altitude de 1000 à 2500 mètres. On y trouve le climat optimal au développement de l'arbuste :

- Une température entre 10 et 30° (le théier meurt en dessous de -5°).
- Des nuits fraîches.
- Un ensoleillement de 5 heures par jour.
- Des vents réguliers.
- Des précipitations nocturnes de 200 mm³ par mois.

Les cultures se situent ainsi dans les montagnes de la province du Yunnan en Chine, de Darjeeling au nord de l'Inde, du Ceylan (Sri Lanka), ou encore du Kenya. Cependant, les

plantations ont tendance à être délocalisées en plaine afin de permettre une mécanisation de la récolte.

I.5.1.2. La plantation et la taille des plants

Les théiers sont cultivés à partir de semences ou de boutures croissant en pépinière pendant 2 ans environ puis plantées en terre. Ces plantations sont appelées jardins et s'étendent sur plusieurs hectares.

Les théiers sont ensuite taillés afin de les garder à une hauteur facilitant l'accès aux feuilles, mais également pour limiter la floraison et augmenter le nombre de bourgeons.

I.5.2. La cueillette des feuilles [5]

I.5.2.1. Les périodes de cueillette

La récolte se fait durant les périodes de croissance de l'arbuste appelées flush, de mars à novembre. L'hiver correspond à une période de dormance. Il est à noter que l'arôme du thé varie avec la saison. Ainsi, les thés printaniers, first flush, seront ceux de meilleure qualité suite à l'accumulation des nutriments et des substances aromatiques durant l'hiver.

Pour les jardins situés autour de l'équateur (Sri Lanka, Kenya), où les variations climatiques sont faibles, la cueillette peut se faire toute l'année.

I.5.2.2. Les types de cueillette [6]

Idéalement la récolte se fait à la main, feuille par feuille. Le type de cueillette manuelle est défini par le nombre de feuilles récoltées en plus du bourgeon terminal.

Il s'agit d'un procédé essentiel qui conditionne la qualité du thé. En effet, les feuilles n'ont pas une composition équivalente : plus la feuille est située à l'extrémité de la tige, plus elle est concentrée en sève et donc plus elle est riche en composés chimiques.

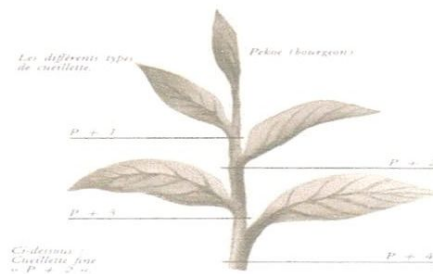


Figure I.6: Les différentes cueillettes du thé. [5]

a. La cueillette impériale ou P+1 [6]

On prélève le bourgeon terminal à peine déployé, ainsi que la première feuille qui suit. La qualité est excellente. C'était le thé que les Empereurs de Chine buvaient exclusivement.

b. La cueillette fine ou P+2

Lors de la récolte fine au printemps, considérée aujourd'hui comme donnant un thé de qualité supérieure, on prélève le bourgeon terminal non épanoui, et les 2 premières feuilles.

On appelle ce thé « pekoe » ou « flowerypekoe » ; « pekoe », le bourgeon terminal, dérive du chinois « pak ho », signifiant « cheveux », en raison du duvet blanc à la surface des bourgeons et des jeunes feuilles. Il faut également noter que ces pousses du printemps vert jade, sont les plus riches en tanins, théine (caféine) et autres composants conférant au thé son arôme.

c. La cueillette grossière ou P+3

Il s'agit de thé de qualité nettement inférieure, composé de la première pousse et des trois feuilles suivantes, voire plus, c'est ce qu'on appelle thé « souchong pekoe », sa qualité est légèrement inférieure au « pekoe ».

Le thé « souchong » est composé des quatrième et cinquième feuilles. C'est le thé le plus fréquemment vendu, à cause de son rendement de cueillette élevé.

On ne cueille pas les feuilles à la base de l'arbuste, car elles ne sont pas de bonne qualité, et elles sont indispensables à la survie du théier.

1.6. Les grades du thé vert [5]

Les grades du thé vert ne sont pas basés sur le type de cueillette, mais propres à chaque pays.

En Chine on distingue plusieurs grades, dont les plus connus sont :

- Les Young Hyson, Fine Hyson et Hyson. Les premiers sont des thés assez rares, composés de petites feuilles cueillies au début du printemps et roulées avec soin.
- Les Hyson sont constitués de feuilles récoltées juste après celles des Young Hyson.
- Les Gunpowder ou « poudre à canon », formés de très jeunes feuilles, roulées entre les doigts de façon à obtenir de petites boules très serrées de quelques millimètres et à saveur très aromatique.
- Les Chun Mee ou « cils précieux » sont caractérisés par des feuilles roulées dans le sens de la longueur.

Concernant les grades japonais :

- Gyokuro de qualité très élevée, est formé des premières pousses du printemps récoltées après un ombrage des théiers de trois semaines, de qualité très élevée.
- Matcha : les feuilles sont de qualité identique à celles du Gyokuro, mais sont moulues afin d'obtenir une poudre.

- Sencha : ces feuilles, cueillies au printemps ou au début de l'été et non soumises à un ombrage, ressemblent à celles du thé Gyokuro, mais de plus petite taille.
- Bancha : il s'agit d'un thé de qualité moindre, pour lequel on utilise les feuilles à partir de la quatrième ou cinquième, ainsi que des morceaux de tiges.

I.7. La production du thé vert [5]

Le thé vert est un thé dont les feuilles, après la cueillette, seront le plus souvent flétries et chauffées à haute température, afin de neutraliser les enzymes responsables de l'oxydation.

Elles seront ensuite roulées et séchées plusieurs fois afin d'obtenir une forme particulière.

On peut distinguer deux méthodes principales pour obtenir du thé vert. La méthode chinoise, d'une part, par laquelle les feuilles sont chauffées dans de grandes bassines de cuivre placées sur le feu ; la méthode japonaise, d'autre part, par laquelle les feuilles seront chauffées à la vapeur, très brièvement, en moins d'une minute, avant d'être roulées et séchées.

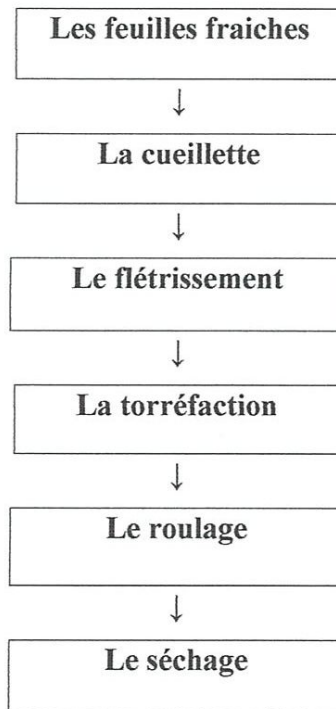


Figure I.7: Etapes de production du thé vert. [7]

I.7.1. La cueillette [8]

Les thés verts sont fabriqués à partir de jeunes pousses. Les jeunes pousses de thé, de couleur vert clair et les feuilles âgées, plus foncées.

La cueillette est traditionnellement manuelle et obligatoirement effectuée par des mains expertes pour les thés verts de qualité. En effet, selon le grade désiré, les cueilleuses doivent sélectionner le bourgeon seul ou le bourgeon accompagné d'une, deux ou trois jeunes feuilles.

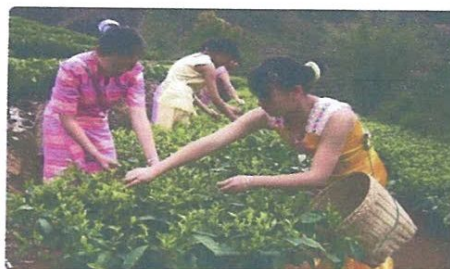


Figure 1.8: La cueillette manuelle. [8]

Certains producteurs n'hésitent pas, aujourd'hui, à la mécaniser la cueillette. Ce type de récolte, de piètre qualité est généralement destiné à fabriquer du thé en sachet ou des extraits.



Figure 1.9: La cueillette mécanique. [8]

I.7.2. Le flétrissage [8]

Le plus rapidement possible après la cueillette, les feuilles de thé vert sont étalées sur des plateaux de bambou et mises à sécher, le plus souvent en plein air. Le but du flétrissage est de réduire le plus rapidement la teneur en eau des feuilles afin de limiter les phénomènes d'oxydation.

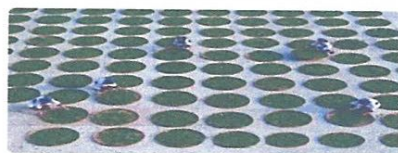


Figure 1.10: Flétrissage traditionnel sur plateau en bambou. [8]

La durée de cette étape est variable selon la saison. A vu d'œil, on décide si les feuilles sont suffisamment flétries pour pouvoir subir la deuxième opération.

I.7.3. La torréfaction [8]

Cette étape est sans doute la plus importante dans le processus de fabrication d'un thé vert. C'est elle qui va décider de la couleur, de l'odeur et du goût du thé vert.

En inactivant les enzymes présentes dans les feuilles fraîches, elle va définitivement arrêter l'oxydation enzymatique, préserver les précieux polyphénols et réduire, voire, éliminer la saveur végétale de la feuille fraîche et libérer les arômes.

Effectuée à la main, par petite quantité, dans un wok, pour les meilleurs thés verts, cette étape va encore réduire la teneur en eau des feuilles et des bourgeons et pour certains thés, donner un aspect caractéristique et faciliter l'avant dernière étape. Il existe aussi des machines à torréfier le thé.



Figure I.11: Torréfaction artisanale dans un wok. [8]

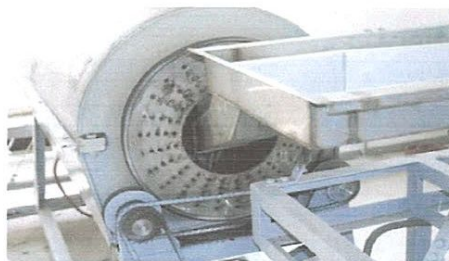


Figure I.12: Torréfaction à machine. [8]

I.7.4. Le roulage [9]

Cette étape déterminera la forme finale de la feuille. On pourra choisir par exemple de rouler la feuille en boule dans le sens de la largeur ou en aiguille dans le sens de la longueur.

Le roulage traditionnel est habituellement effectué à la main dans une cuve chauffée au bois. Le roulage mécanique utilisera une rouleuse.

Cette étape permet également aux cellules des feuilles de se briser et de libérer les huiles essentielles qui agiront pour l'étape de fermentation. Seuls les thés blancs ne subissent pas de roulage pour leur fabrication.



Figure I.13: Roulage à la main. [9]



Figure I.14: Roulage mécanique. [9]

I.7.5. Le séchage [10]

Les feuilles sont enfin séchées sur des claies dans des cuves ou des séchoirs avant d'être triées.



Figure I.15 : Séchage traditionnel. [10]

I.8. Activités thérapeutiques du thé vert [2]

De nombreuses propriétés pharmacologiques du thé vert ont été démontrées par plusieurs chercheurs.

I.8.4. Activité antioxydante [2]

Les antioxydants sont des molécules qui contribuent à la protection de notre corps contre des substances potentiellement dangereuses que l'on appelle radicaux libres. Le thé en est une source très importante notamment de flavonoïdes dont le rôle est la neutralisation des radicaux libres.

L'activité bénéfique de thé vert sur la santé est essentiellement attribuée aux propriétés antioxydantes de ses polyphénols. Cet effet thérapeutique est dû à la présence des groupes hydroxyles du noyau B des catéchines non gallate (EC) et (EGC) et aussi des hydroxyles du noyau B et D des catéchines gallate (ECg) et (EGCg).

La présence de trihydroxyl sur le noyau B a montré une activité antioxydant très importante. Il est capable de piéger et neutraliser les radicaux libres.

Les polyphénols du thé vert sont capables d'inhiber le stress oxydant non seulement en piégeant les espèces oxygénées réactives (EOR) par transfert d'électron ou d'atome

d'hydrogène, mais aussi, en chélate les ions des métaux de transition sous des complexes inertes.

De nombreux travaux scientifiques ont rapporté que les catéchines du thé vert ont un pouvoir antioxydant plus puissant que celui de la vitamine C et E.

I.8.2. Prévention des maladies cardiovasculaires [2]

Les agents qui inhibent l'agrégation anormale des plaquettes réduisent aussi les risques de maladies cardiaques. Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la consommation du thé est liée à une baisse importante des maladies cardiovasculaires.

Le thé inhibe l'agrégation des plaquettes et aussi le facteur d'activation des plaquettes (PAF).

Des études de laboratoire ont montré que les flavonols et particulièrement l'épigallocatechin-3-gallate (EGCG) de thé réduisent le taux de cholestérol et inhibe l'oxydation des lipoprotéines.

Le thé vert peut aussi diminuer la tension artérielle en inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA).

I.8.3. Prévention du cancer [2]

Ces dernières années, de très nombreux travaux publiés dans les revues scientifiques internationales ont fait état d'une activité préventive contre les maladies cancéreuses. Des recherches plus récentes ont montré que la consommation du thé pourrait avoir un effet protecteur contre le cancer de la prostate, de la peau, du colon et du pancréas.

Des travaux expérimentaux sont actuellement en cours sur de nombreux modèles de tumeurs provoquées chez l'animal, ils ont montré un effet préventif du thé et précisément le gallate d'épigallocatechine (EGCG) contre certaines tumeurs du sein, de la peau, de la prostate, et du poumon.

Des expériences sur l'animal ont démontré que le thé vert et l'EGCG peuvent empêcher la carcinogenèse à toutes les étapes, à savoir initiation, propagation et terminaison.

Le gallate d'épigallocatechine-3 (EGCG), est un catéchol qui bloque l'enzyme l'urokinase. Or cette enzyme est produite en quantité importante par la cellule.

L'inhibition de l'urokinase par l'EGCG empêche la tumeur de produire des métastases.

On sait que les crèmes solaires protègent contre les coups du soleil, mais pas contre les modifications cellulaires pouvant entraîner le développement de mélanome.

Les résultats de laboratoire révèlent que l'application topique ou la consommation orale de l'EGCG inhibent la cancérogenèse provoquée par les radiations ultraviolettes.

Ainsi des travaux ont montré clairement une activité inhibitrice du thé vert sur les lésions cutanées dues aux rayons ultraviolets B induit chez les souris.

Le thé vert piège les radicaux libres, ce qui pourrait expliquer en partie ses effets préventifs dans la survenue de cancers.

I.8.4. Activité antimicrobienne [2]

Des études scientifiques ont révélé que le thé vert a de puissants effets antimicrobiens sur les bactéries de la bouche, lesquelles sont communément incriminées dans la carie dentaire et le tartre.

I.8.5. Activité cognitive [2]

Le thé est un stimulant bien connu du système nerveux central. Cet effet, il le doit à la caféine, qui favorise aussi bien le travail intellectuel que l'effort musculaire.

I.8.6. Contre les maladies de Parkinson et d'Alzheimer [2]

Plusieurs chercheurs ont commencé à s'intéresser aux propriétés du thé vert à la suite d'études épidémiologiques montrant que des personnes qui consommaient plus de trois tasses par jour avaient moins de risque de développer les maladies de Parkinson et d'Alzheimer.

Des études *in vivo* ont montré que l'accumulation d'une grande concentration de fer dans le cerveau est parmi les causes des maladies neurodégénératives.

Une attention particulière a été portée sur l'étude des catéchines du thé vert et en particulier sur l'épigallocatechine-3-gallate qui possède une capacité antioxydante remarquable ainsi que la propriété de chélater les ions du fer.

I.9. Toxicité [2]

La consommation régulière du thé, sous forme d'infusion ou de décoction, comme c'est le cas dans les populations sahariennes, peut créer une intoxication chronique et le théisme qui se manifestent par de l'insomnie, de l'anorexie, de la perte de poids, de la constipation et des troubles nerveux.

I.10. Qualité du thé vert [11]

Les facteurs fondamentaux qui influent sur la qualité du thé sont:

- Sélection d'une bonne plante (variété *Sinensis*).
- Lieu et climat (climat extrême, altitude « high grown tea », ample exposition solaire, pluies fréquentes, pas de sols à humidité stagnante, qualité de la pluie, qualité du sol).
- Le rythme de la croissance de la plante.

- Label d'agriculture biodynamique (pas de produit chimique depuis plus de 15ans).
- Pas de pollution radioactive.
- Une récolte et un processus de transformation rapides et respectueux (récolte à la main dans certain cas).
- Un emballage 100% étanche et opaque.
- Fraicheur du thé (pour le Shinya transporté par avion).
- Pureté du thé et confiance dans le producteur (mélange avec des qualités inférieures pour augmenter le volume).

Les facteurs cités ci-dessus permettent principalement de distinguer les éventuelles qualités médicinales recherchés dans le thé. En termes de saveur et de prix, il y a encore d'autres facteurs à prendre en compte:

- Maturité et amertume de la cueillette (bourgeon et jeune pousses : « First Flush, two leaves and a bud »).
- Première, deuxième, troisième, ou quatrième récolte de la saison.
- Le thé d'ombre est significativement plus coûteux.

Chapitre II

La composition chimique du thé vert

Chapitre II: La composition chimique du thé vert

II.1. Introduction

Le thé vert renferme un grand nombre d'ingrédients excellents pour la santé qui sont sous forme soluble et particulièrement bio disponible. [12]

Il est donc intéressant de savoir quels sont les constituants organiques et minéraux à la base de ces effets.

Depuis longtemps des chercheurs analysent la composition des feuilles de thé, ainsi que de leur infusé. Au cours des siècles, les connaissances se sont de plus en plus concrétisées. [5]

II.2. La composition chimique du thé vert

II.2.1. Les polyphénols [5]

Aujourd'hui les polyphénols représentent une classe chimique vaste, regroupant plusieurs familles chimiques.

Le squelette chimique de base est composé d'un enchaînement de cycles aromatiques sur lequel est greffé un hydroxyle phénolique comme principal groupement fonctionnel

Les concentrations en polyphénols varient de 20 à 36%, exprimées par rapport au poids sec de la feuille de thé.

Ils représentent les principaux constituants; les jeunes feuilles et bourgeons sont les plus riches, suivis par les feuilles plus âgées et puis la tige. D'où l'intérêt de boire du thé de haute qualité, pour profiter au mieux des effets bénéfiques des polyphénols.

La classification des différentes familles de polyphénols est basée sur la complexité du squelette de base.

II.2.1.1. Les flavonoïdes [13]

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrone ou pyranone formant une structure C6-C3-C6. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques.

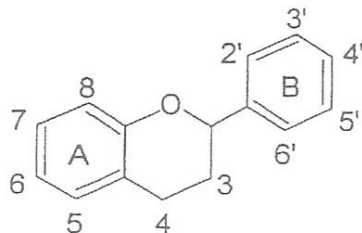


Figure II.1: Structure de base des flavonoïdes. [5]

Les flavonoïdes sont en général solubles dans l'eau et les alcools. L'extraction est réalisée habituellement à l'aide du méthanol ou de mélanges méthanol-eau parfois d'acétonitrile-eau. [14]

Les principaux flavonoïdes du thé vert sont les flavanols ou catéchines (EGC, EGCg, EC, ECg) et les flavonols (quercétine, kaempférol et myricétine). [5]

a. Les flavanols [5]

Les flavanols sont largement répandus dans les fruits et légumes, mais la source la plus riche de flavanols au sein de l'alimentation humaine est certainement le thé.

Les flavanols sont les principaux polyphénols responsables de la saveur âpre du thé. Leur passage de la feuille de thé vers l'infusé est facilité par leur caractère hydrosoluble. Il s'agit de dérivés hydrosolubles, essentiellement représentés par les catéchines ou flavan-3-ols, incolores et sont stockées dans les vacuoles cellulaires.

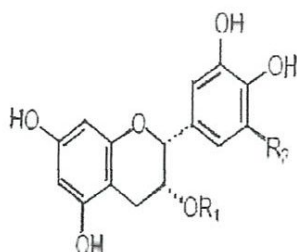


Figure II.2: Structure de base des catéchines. [5]

Différentes substitutions sur le squelette de base sont à l'origine des quatre principales épicatechines, les deux premières étant plus astringentes par rapport aux autres :

- Le gallate d'épigallocatechine (EGCg).
- Le gallate d'epicatechine (ECg).
- L'épigallocatechine (EGC).
- L'epicatechine (EC).

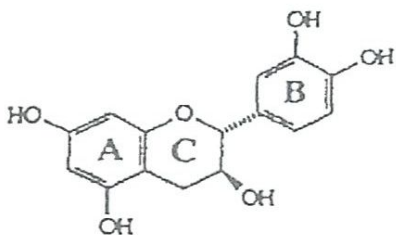


Figure II.3: Structure d'epicatechine (EC). [5]

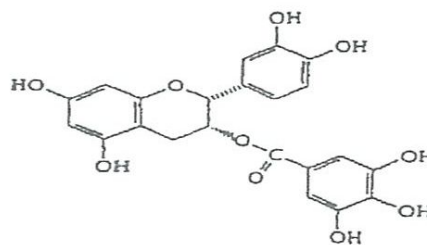


Figure II.4: Structure d'epicatechine gallate (ECG). [5]

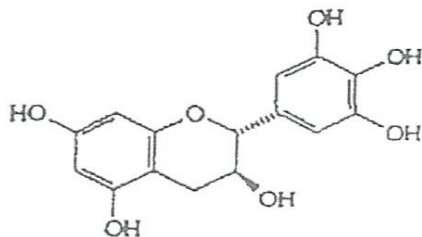


Figure II.5: Structure d'épigallocatechine (EGC). [5]

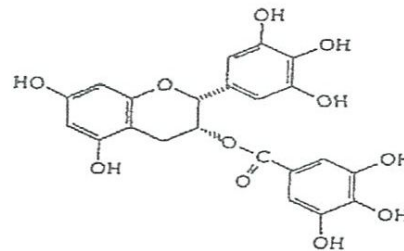
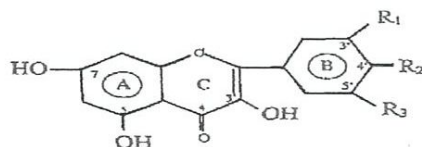


Figure II.6: Structure d'épigallocatechine gallate (EGCG). [5]

b. Les flavonols

Les flavonols sont réputés être les antioxydants les plus efficaces des flavonoïdes, très nombreux. [14]

Les flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3. Ils sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune, elles sont essentiellement représentés par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. [15]



$R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Myricétine
 $R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$: Quercétine
 $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = OH$: Kaempférol

Figure II.7: Structure générale des flavonols. [15]

II.2.1.2. Acides phénoliques

En analysant la composition de la feuille de thé, on retrouve des teneurs d'environ 5% d'acides-phénols. Leur importance pharmacologique est nettement moindre, par rapport à celle des autres polyphénols. [13]

Tous les acides-phénols sont extraits à l'aide d'un solvant organique, dans un milieu légèrement acide. [5]

Ils sont représentés par deux sous-classes ; les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique. [13]

a. Les dérivés hydroxylés de l'acide cinnamique : l'acide caféique [5]

Un acide aminé essentiel, la phénylalanine, est à la base de la biosynthèse de l'acide caféique : l'enzyme la phénylalanine-ammonia-lyase catalyse la transformation de la phénylalanine en acide trans-cinnamique par libération d'un ion ammonium.

Des réactions d'hydroxylation de l'acide cinnamique conduisent à des substitutions en position C6-C3. Suite à l'extraction en milieu acide ou alcalin, on a pu isoler des esters quiniques de l'acide caféique, les acides chlorogéniques et coumarylquiniques.

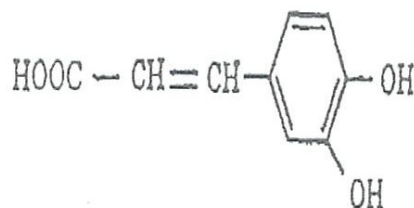


Figure II.8: Structure de l'acide caféique. [5]

b. Les dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque : l'acide gallique [5]

Des expériences ont démontré que les dérivés de l'acide benzoïque sont issus des composés cinnamiques, substitués en C6-C3.

En effet, les dérivés benzoïques sont hydroxylés en position C6-C1, comme par exemple l'acide gallique. L'inter-conversion est effectuée par le végétal lui-même, par dégradation de la chaîne latérale de l'acide caféique.

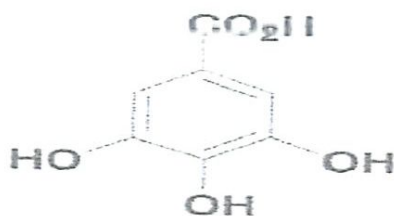


Figure II.9: Structure de l'acide gallique. [5]

D'autre part, on a pu isoler des esters d'acide gallique et de proanthocyanidines, formés par l'intermédiaire de la fonction hydroxyle.

Un autre composé, l'acide quinique, s'estérifie avec l'acide gallique pour former la théogalline, un composé mineur du thé.

II.2.1.3. Tanins [5]

La composition chimique du thé vert inclut des tanins, une famille chimique regroupant certains polyphénols ayant la propriété de se condenser avec un sucre ou une autre molécule à fort poids moléculaire. Les tanins sont divisés en deux groupes :

a. Tanins hydrolysables [15]

Les tanins hydrolysables ou acides tanniques sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation; l'acide éllagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés.

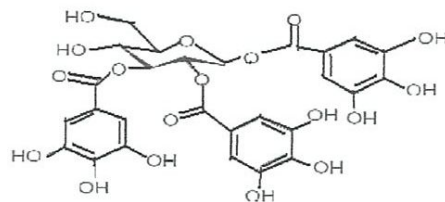


Figure II.10: Structure d'un tanin hydrolysable

(1, 2, 3-tri-O-galloyl- β -D-glucose) [13]

b. Tanins condensés [15]

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines. Les tanins condensés sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto-oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B.

Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de types A.

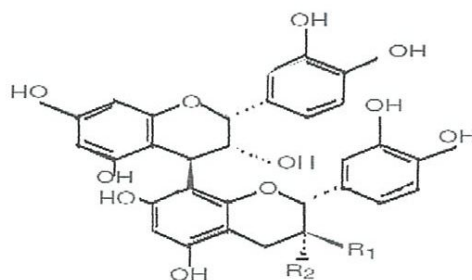


Figure II.11: Structure d'un tanin condensé (proanthocyanidine). [13]

II.2.2. Les bases puriques [5]

Les bases puriques ont comme structure centrale un noyau purine, formé par l'annélation d'un noyau pyrimidine à un noyau imidazole.

La biosynthèse des bases puriques se fait à partir de plusieurs acides aminés. On peut principalement citer la glycine, la glutamine et l'acide aspartique, intervenant dans la biosynthèse du noyau purine. Ces composés ne sont pas considérés comme alcaloïdes, par le

biais de leur caractère amphotère et de leur solubilité dans l'eau chaude et les solvants chlorés.

Malgré ces observations, certains scientifiques les considèrent comme « alcaloïdes puriques », car ils ont un effet pharmacologique marqué caractérisant les vrais alcaloïdes.

La plupart des bases puriques provient essentiellement de la dégradation des acides ribonucléiques.

Les bases puriques précipitent avec les polyphénols, particulièrement abondants au niveau du thé. Les bases puriques entrant dans la composition du thé :

II.2.2.1. La caféine [5]

La caféine, ou 1, 3,7-triméthylxanthine, a été isolée la première fois en 1820 à partir de graines de café. Sa formule semi développée est présentée dans la **figure (II.12)** :

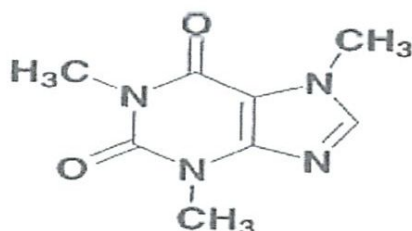


Figure II.12: Structure de la Caféine. [5]

II.2.2.2. La théophylline [5]

La théophylline, ou 1,3-diméthylxanthine n'est présente qu'en faible quantité dans les feuilles de théier.

La teneur varie de 0,02 à 0,04 % par rapport au poids sec du thé. Or, cette faible quantité ne diminue guère l'importance pharmacologique de la théophylline.

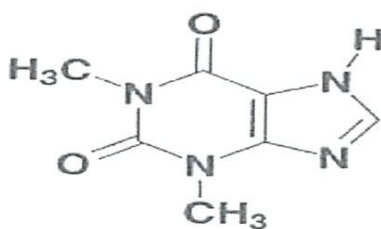


Figure II.13: Structure de la théophylline. [5]

II.2.2.3. La théobromine [5]

La théobromine ou 3,7-diméthylxanthine, est retrouvée en faible quantité, légèrement supérieure à celle de théophylline. On a isolé des teneurs de 0,15 à 0,2 % par rapport au poids sec.

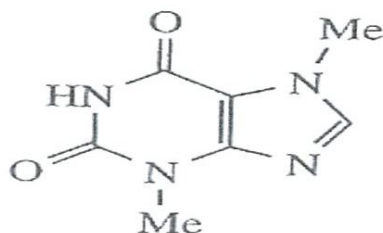


Figure II.14: Structure de la théobromine. [5]

II.2.3. Les acides aminés [5]

Les composés azotés de la feuille de thé sont, entre autres, représentés par 19 acides aminés.

Seule la théanine ou γ -n-éthyl-glutamine est propre au thé, représentant presque la moitié des acides aminés de la feuille de thé vert, et peut servir à son identification.

La théanine, ainsi que les polyphénols non oxydés sont principalement responsables de l'arôme du thé vert.

La théanine a également la capacité de contrecarrer les effets stimulants des bases xanthiques, notamment de la caféine, l'effet relaxant du thé vert, riche en théanine, étant prouvé. A côté, la théanine semble jouer un rôle dans l'immunité, dans la protection neuronale et comme adjuvant des chimiothérapies.

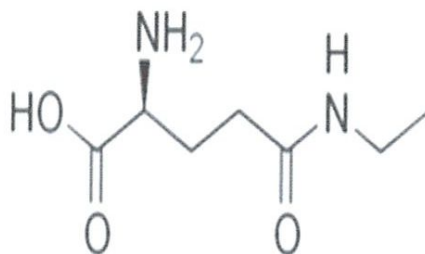


Figure II.15: Structure de la théanine. [16]

Parmi les autres acides aminés isolés on peut citer: l'acide γ -aminobutyrique, l'acide aspartique, la sérine, l'asparagine, l'arginine, l'acide glutamique, la lysine, l'histidine, la leucine, la valine, la glutamine, la cytidine, la thréonine, l'alanine, le tryptophane, l'isoleucine, la phénylalanine, des traces de proline et de glycine.

On peut retenir que la théanine, l'acide glutamique, l'acide aspartique et l'arginine sont les principaux acides aminés retrouvés dans les feuilles du printemps et au début de l'été.

II.2.4. Les vitamines [5]

La feuille de thé vert est plus riche en vitamines que celle de thé noir, la fermentation et une température supérieure à 30°C en dégradent une grande partie.

Parmi ces vitamines on peut citer la vitamine C ou acide ascorbique, avec une teneur de 2 à 2,5 g/kg de feuilles desséchées de thé vert, la vitamine E, ainsi que certaines vitamines du groupe B.

II.2.4.1. Vitamine C (acide ascorbique)

L'acide ascorbique ou acide oxo-3-gulofuranolactone (forme énolique), est un acide organique ayant des propriétés antioxydantes. [17]

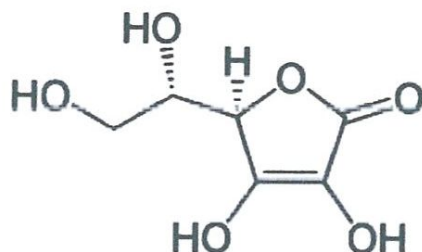


Figure II.16: Structure de l'acide L-ascorbique. [17]

La vitamine C joue un rôle dans la synthèse de la carnitine, la diminution du cholestérol, la désintoxication du foie (élimination des toxines hépatiques), une amélioration de l'absorption du fer, la production d'hormones, la production de collagène, la prévention contre les risques de contracter de nombreuses maladies, contre l'affaiblissement du système immunitaire, la fatigue, la dépression, etc. [18]

II.2.4.2. Vitamine E

La vitamine E est une vitamine liposoluble recouvrant un ensemble de huit molécules organiques, quatre tocophérols et quatre tocotriénols. Elles agissent, parallèlement à la vitamine C et au glutathion, essentiellement comme antioxydants contre les dérivés réactifs de l'oxygène produits notamment par l'oxydation des acides gras. [19]

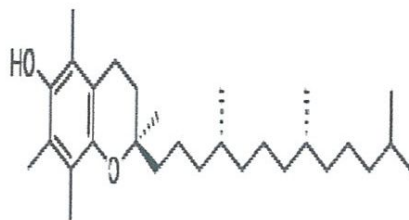


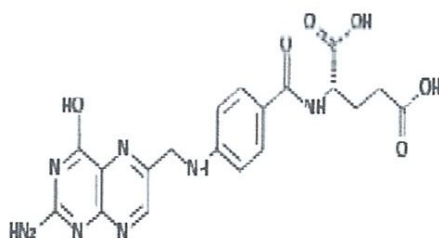
Figure II.17: Structure l'alpha-tocophérol. [19]

La vitamine E est un antioxydant liposoluble essentiel, aide à la fluidification du sang. Une carence en vitamine E peut provoquer une stérilité, une défaillance musculaire du cœur, des troubles neurologiques, favorise l'anémie. [18]

II.2.4.3. Vitamine B9 (Acide folique) [20]

La vitamine B9, autre nom de l'acide folique (folate, folacine ou vitamine M, acide pteroyl-L-glutamique, pteroyl-L-glutamate et acide pteroylmonoglutamique), est une vitamine hydrosoluble.

L'acide folique est le précurseur métabolique d'une coenzyme, le tétrahydrofolate (FH₄ ou THF), impliquée notamment dans la synthèse des bases nucléiques, purines et pyrimidines, constituant les acides nucléiques (ADN et ARN) du matériel génétique.



FigureII.18:Structure de l'acide folique. [20]

II.2.5. Les minéraux [21]

Les minéraux contenus en plus grande quantité dans les feuilles de thé vert sont le potassium, le calcium, le phosphore et le magnésium. Dans une moindre quantité nous avons le manganèse, le zinc, le cuivre et le fer.

II.2.5.1. Potassium [21]

Le potassium est un minéral essentiel pour le corps humain. Il est important dans la fonction nerveuse, et pour maintenir l'équilibre hydrique et électrolytique.

II.2.5.2. Calcium [21]

Comme nous le savons tous, le calcium est essentiel pour nos os. Il est également important dans la fonction des cellules sanguines.

II.2.5.3. Phosphore [21]

Le phosphore joue un rôle majeur dans la structure de la molécule d'ADN. En outre, le phosphore est présent dans l'ATP ou adénosine triphosphate, la molécule qui, dans la

biochimie de tous les organismes vivants connus, fournit par hydrolyse l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme.

II.2.6. Les glucides [5]

La feuille de thé renferme environ 25 à 30% de glucides, dont un tiers sont des fibres de cellulose. Seuls 5% des glucides vont être solubilisés et passer dans l'infusé. Cette teneur confère au thé une valeur nutritionnelle, certes faible.

L'aspect brillant des feuilles, plus ou moins visible pour les différents thés, résulte de la formation d'un vernis durant le séchage, issu de la transformation par une pectase des pectines en acides pectiques.

II.2.7. Les lipides [5]

La teneur globale en lipides varie de 4 à 16,5%, alors que différentes familles sont abondantes en fonction de l'âge de la feuille de thé. Ainsi la jeune feuille est particulièrement riche en phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine. Plus la feuille vieillit, plus elle s'enrichit en mono- et digalactosylglycéride. La dégradation des lipides participe, avec d'autres composés, à la formation de l'arôme du thé noir.

II.2.8. Les caroténoïdes [5]

Quatorze caroténoïdes, pigments jaunes orangés de la famille des tétraterpènes, ont été mis en évidence, essentiellement au niveau de la feuille de thé vert âgée. Or, leur teneur, par rapport à la composition chimique totale du thé, reste faible. Il n'en est pas de même pour l'importance pharmacologique de certains caroténoïdes.

L'oxydation des caroténoïdes participe au développement de l'arôme du thé noir. Entre autres, on peut citer : lycopène, γ -carotène, phytoène, phytofluène, cryptoxanthine, violaxanthine, lutéine, zéaxanthine.

Tableau II.1: Composition chimique des feuilles de thé fraîches.[5]

Composé chimique	Pourcentage massique par rapport à la matière sèche
Polyphénols	20 - 36 %
Flavanols	20 - 30 %
Flavonols	3 %
Acides phénoliques	5 %
Méthyl-xanthines	3,5 %
Caféine	2 - 4 %
Théobromine	0.2 %
Théophylline	0,02 – 0,04 %
Protéines	15 %
Acides aminés	4 %
Glucides	25 - 30 %
Lipides	2 - 16 %
Vitamines et minéraux	5 %
Acides organiques	0,5 – 1,5 %
Pigments liposolubles	< 0,5 %
Composés volatils	< 0,1 %

Tableau II.2: Composition chimique de l'infusé d'une feuille de thé vert.[5]

Composé chimique	Pourcentage massique de l'extrait sec
Flavanols	30 - 40 %
EGCG	10 - 30 %
Glycosides de flavonols	2 - 3 %
Caféine	4 %
Acides aminés	1 - 5 %
Oses simples	4 - 5 %
Lipides	traces
Vitamines et minéraux	4,5 %
Pigments liposolubles	traces
Composés volatils	0,02 %

II.3. Etude de la caféine

II.3.1. Définition [22]

La caféine est un alcaloïde de la famille des méthylxanthines, présent dans de nombreux aliments, qui agit comme stimulant psychotrope et comme léger diurétique. La caféine a été découverte en 1820 par le chimiste allemand Friedlieb Ferdinand Runge. Il la nomma « Kaffein » en tant que composé chimique du café, qui en français devint « caféine ».

La caféine est présente dans les graines, les feuilles et les fruits de différentes plantes comme les théiers où elle agit comme insecticide naturel, paralysant ou tuant les insectes qui s'en nourrissent.

II.3.2. Structure [22]

La caféine est de formule brute $C_8H_{10}N_4O_2$, et son nom chimique est 1,3,7-triméthylxanthine ou encore 1,3,7-triméthyl-1H-purine-2,6-dione.

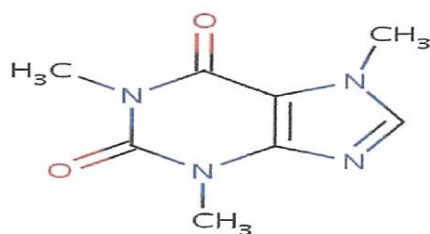


Figure II.19: Structure de la caféine. [23]

II.3.3. Propriétés physico-chimiques [23]

La caféine est une molécule de la famille des méthylxanthines, qui comprend également la théophylline et la théobromine. Sous sa forme pure, elle consiste en une poudre blanche d'un goût extrêmement amer. La caféine est modérément soluble dans l'eau et les solvants organiques. À haute température, la solubilité de la caféine dans l'eau augmente.

La caféine, stable dans les milieux relativement acide et basique, est une base faible et peut réagir avec des acides pour donner des sels. Cependant dans une solution aqueuse normale, elle n'est pas ionisée. Dissoute, elle peut être présente sous forme de dimères ainsi que de polymères.

La caféine est une substance absorbant dans l'UV avec un maximum à la longueur d'onde de 273 nm.

II.3.4. La caféine du thé vert

Le thé vert se distingue parmi les autres types de thés pour sa richesse en caféine (aussi appelée théine). L'effet tonifiant que le thé vert procure est une des raisons de son succès. [24]

L'effet de la caféine du thé vert est clairement bon pour la santé. Elle offre des bienfaits extraordinaires pour la santé. Elle fait partie intégrante des excellentes propriétés médicinales du thé vert.

Trois éléments principaux influent sur la teneur en caféine du thé vert:

- Les jeunes pousses (bourgeons et jeunes feuilles) offrent significativement plus de caféine que les feuilles plus mures.
- La première récolte possède plus de caféine que la 2ème et ainsi de suite.
- Le "thé d'ombre" (Gyokuro, Tencha, Matcha) est plus riche en caféine que les thés qui reçoivent une pleine exposition solaire. [25]

II.3.5. Les bienfaits généraux de la caféine sur la santé [26]

- La caféine renforce les fonctions cérébrales (améliore l'apprentissage en optimisant le traitement de l'information), y compris la mémorisation. Elle se fixe sur les récepteurs à l'adénosine au niveau cérébral (cortex et noyaux gris centraux) du système nerveux central.
- Elle améliore la vision et l'audition en assurant un meilleur traitement de l'information véhiculée par les stimuli visuels et auditifs.
- Elle stimule l'activité motrice et renforce la rapidité des réactions (réflexes).
- Elle augmente la performance (concentration) en cas de tâches répétitives ou dans le cas de manque de sommeil.
- Elle facilite les activités de coordination comme la conduite d'automobile.
- D'après des recherches récentes, il semblerait qu'elle diminue la sensibilité aux crises convulsives chez les sujets épileptiques.
- Elle retarde, voire empêcherait l'apparition des symptômes de la maladie de Parkinson.
- Elle augmente les sécrétions gastriques, pancréatiques et biliaires et facilite ainsi la digestion des graisses.
- Elle est légèrement laxative, et en augmentant la motricité intestinale, elle éviterait le développement de certaines tumeurs car, en accélérant le transit intestinal, elle permet

d'évacuer les selles avant qu'elles ne produisent des substances agressives pour les intestins.

- La caféine augmente la force de contraction musculaire en diminuant la fatigue musculaire (action directe sur le taux de calcium intracellulaire et le recaptage du potassium).
- Elle améliore les performances physiques en favorisant la mobilisation des graisses en épargnant le stock énergétique de glycogène qui reste utilisable si l'effort est prolongé.
- La caféine accélère le rythme cardiaque.
- Elle jouerait le rôle de neuroprotecteur vis-à-vis des accidents vasculaires cérébraux.

II.3.6. Les effets antalgiques [26]

- La caféine permet de lutter contre la douleur.
- En contractant les vaisseaux sanguins en général et ceux du cerveau en particulier, elle soulage les migraines et céphalées, et associée aux antalgiques de certains médicaments, aspirine et paracétamol par exemple, elle optimise leur effet.
- Elle lutte contre la dépression.

II.3.7. Toxicité [26]

- Effets neurologiques liés à une consommation excessive: céphalées, insomnies, nervosité, irritabilité, anxiété, tremblements.
- Accoutumance voire dépendance par une consommation régulière importante.
- Au niveau cardiovasculaire, elle peut provoquer une tachycardie, des palpitations, une arythmie, de l'hypertension. Pendant l'effort certaines études montrent que la prise de caféine diminue l'apport d'oxygène à destination des muscles. La caféine diminue l'afflux de sang au niveau du muscle cardiaque, c'est pour cela qu'il est déconseillé chez les patients ayant présenté un infarctus.
- Au niveau musculaire, elle peut également occasionner des myalgies, et même une rhabdomyolyse. Une concentration de lymphocytes plus élevée (+35%) a été constatée chez des footballeurs de haut niveau lorsque la caféine était associée à l'exercice d'où un risque accru de lésions musculaires.
- Sur le plan digestif, la caféine stimule les sécrétions gastriques et la motricité intestinale, elle peut conduire à des ulcères gastroduodénaux, des œsophagites érosives et des reflux gastro-œsophagiens.
- Intoxication aiguë : l'ingestion de 10 g serait mortelle pour 50% des hommes adultes.

Chapitre III

Modes opératoires et méthodes de calcul et d'analyse

Chapitre III: Modes opératoires et méthodes de calcul et d'analyse

III.1. Introduction

Nous présenterons dans ce qui suit: le matériel, les réactifs, les modes opératoires et la méthode de calcul et d'analyse pour le dosage de la caféine dans le thé vert vendu dans le marché Algérien.

III.2. Matériels

Dans ce travail, différents matériels et appareils ont été utilisés dont les plus importants:

- Verrerie usuelle de laboratoire.
- Agitateur magnétique.
- Balance technique.
- Balance analytique (sortoniuscp 2245).
- Lyophilisateur (Alpha 1-2 LD plus).
- pH-mètre du type HANNA, HI 208 pH mètre.
- HPLC-DAD du type Agilent, série 1260 Infinity.

III.3. Solvants et réactifs

- Acétonitrile grade HPLC.
- Méthanol grade HPLC.
- Acide formique.
- Eau distillée et filtrée.

- Caféine de pureté supérieure à 98%.

III.4. Principe de fonctionnement du lyophilisateur [27]

La lyophilisation consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre.

Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est-à-dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux. La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et on la capture par congélation à l'aide d'un condenseur, ou piège froid.

Cette technique permet de conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du produit traité.

On distingue trois phases majeures dans un cycle de lyophilisation:

a. Congélation [27]

La congélation est la phase la plus critique du cycle de lyophilisation. La baisse de température doit être très rapide pour former une glace (presque) amorphe (sans cristaux de glace) ; on évite ainsi la lésion des cellules et la dénaturation des molécules organiques sensibles (les protéines et leur agencement en particulier). Une congélation trop lente entraînera une augmentation du volume de l'eau en cristallisant, conduisant à une dénaturation du produit. Cette phase est donc essentielle, car elle doit garantir que le produit à lyophiliser ne sera pas altéré.

b. Dessiccation primaire [27]

Elle consiste à extraire l'eau dite libre, qui est sous forme de glace libre (ou interstitielle). Sous un vide situé aux environs de 100 μ bar mais pouvant varier fortement d'un produit à l'autre (de 5 μ bar à 500 μ bar), on apporte de la chaleur au produit afin que la glace se sublime. La chaleur est principalement apportée par radiation ou conduction avec les étagères contenant le fluide caloporteur, la convection pouvant être considérée comme nulle.

Suivant le produit et les besoins de production on peut faire varier la température pendant le cycle. La vapeur d'eau est captée par un « piège froid » ou « condenseur » et la déshydratation du produit se poursuivra en continu. Le niveau de vide, la température du produit et le temps de dessiccation sont des paramètres importants car ils déterminent le flux de sublimation à l'intérieur de la machine. Un flux de vapeur trop élevé peut emporter avec lui le produit que l'on cherche à lyophiliser.

Un cycle trop court laissera trop d'eau dans le produit, qui pourra être dégradé lors de la dessiccation secondaire. À l'inverse, un cycle trop long peut dégrader certaines molécules actives. Lorsque la plus grande partie de l'eau s'est sublimée, le produit initial a perdu environ 80 à 90 % de son eau.

c. Dessiccation secondaire [27]

Elle consiste à enlever l'eau « captive » du produit par désorption, car des molécules d'eau restent piégées en surface. C'est une étape délicate, car poussée trop loin, elle peut dénaturer le produit.

Dans cette étape, le vide est poussé jusqu'aux environs de 5 μ bar. On maintient ou on augmente la température du produit (jusqu'à des valeurs positives) pour arracher les molécules. On peut compléter l'opération en baignant le produit dans une atmosphère d'azote pur, dont les molécules prendront la place des quelques molécules d'eau restantes. À la fin du cycle, le produit est sec à 95 % ou plus.



*Figure III.1: Lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus
(Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).*

• Caractéristiques

- Performance 2 kg de glace par 24 h.
 - Piège -55°C en acier inox 316, volume 2,5 kg de glace.
 - Affichage numérique température condenseur et pression.
 - Contrôleur de vide et microvanne pour casser le vide.
 - Chambre transparente avec 8 embouts pour robinets.
 - Kit de tubulure pour raccordement DN16 pour pompe à vide livrée avec 8 flacons.
- pour lyophilisation sur manifold ayant :
- Un volume 75 ml.
 - Un col large 49 mm.
 - Filtre retenant le lyophilisat, stérilisable à 121°C.

- Diamètre 60 mm.
- Hauteur 87 mm.
- Poids 130 g.

III.5. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

III.5.1. Définition et principe [28]

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre.

Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase..).

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

III.5.2. Différents compartiments d'un appareil HPLC

a. Un réservoir de solvant (éluant) [30]

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluants (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

b. Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit et la stabilité du flux. [29]

Elle permet de travailler:

En mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant ou à des concentrations fixes de plusieurs éluants tout au long de l'analyse. [30]

- En mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants. Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min [30]

c. Injecteur [29]

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne. Dans les appareils actuels qui sont sophistiqués, l'injection de l'échantillon est réalisée automatiquement à l'aide d'un robot ; pour cela, il suffit seulement de programmer le volume de la solution à injecter.

d. Colonne [29]

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6 mm. Actuellement, les colonnes possèdent des diamètres plus faibles. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25 cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μm et même moins de 3 μm .

e. Détecteur [29]

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule. Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

III.5.3. Constituants de l'appareil Agilent 1260 Infinity

Un appareil HPLC-DAD de type Agilent, série 1260 (**Figure III.2**) est muni d'un réservoir contenant la phase mobile, d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur (G1354A), d'un auto-échantillonneur (G1313A), d'un compartiment de colonne thermostatée (G1316A) et d'un détecteur à barrette de photodiodes (G1315B). La colonne est de type C18 à silice greffée.

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel de chromatographie ChemStation.

Les appareils à barrette de diodes donnent la lecture simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre et permettent l'obtention de chromatogrammes en trois dimensions.



Figure III.2: HPLC (Agilent 1260 Infinity) utilisé dans l'analyse (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).

III.6. Les données du composé étudié (la caféine)

La structure moléculaire et quelques caractéristiques chimiques du standard sont représentées dans la figure (III.3) et le tableau (III.1).

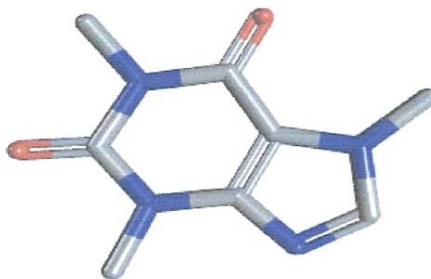


Figure III.3: Structure de la caféine.

Tableau III.1: Quelques caractéristiques de la caféine.

Formule brute	Nom chimique	Température de fusion (°C)	Masse volumique g/cm ³	Solubilité
C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	1,3,7 triméthylxanthine	227 à 228	1,239 à 18C°	Eau, méthanol, acétone, éther, chloroforme, dichlorométhane, benzène

III.7. Echantillons de thés

Des marques différentes de thés verts, avec quelques fois des lots différents ont été achetés du marché local dans la ville de Guelma et utilisées dans cette étude.



Figure III.4: Echantillons des thés étudiés.

Tableau III.2: Caractéristiques organoleptiques des échantillons de thé vert.

Thé	Origine	Couleur	Forme
A1A	Chine	Vert foncé	Oblongue + courbée
T1A	Chine	Vert clair	Oblongue + courbée
M1A	Chine	Vert clair	Oblongue + courbée + petits grains
W1A	Chine	Vert très foncé	Oblongue + petits grains
R1A	Chine	Vert foncé	Oblongue + petits grains
N1A	Chine	Vert très foncé	Oblongue
S1A	Chine	Vert clair	Oblongue
K1A	Chine	Vert foncé	Oblongue + courbée + petits grains
K2A	Chine	Vert foncé	Oblongue + courbée + petits grains
F1A	Chine	Vert clair	Courbée + petits grains
F2A	Chine	Vert foncé	Oblongue + courbée
F3A	Chine	Vert très foncé	Courbée
R2A	Chine	Vert foncé	Oblongue
W2A	Chine	Vert foncé	Oblongue + courbée

III.8. Méthode de préparation et injection du standard (la caféine)

Le but de cette étape est de construire la courbe d'étalonnage du composé pur (la caféine) qu'on veut doser, ultérieurement, dans les différents échantillons de thé vert.

La solution du composé pur est préparée à partir de 2,5 mg de la caféine dans 50 ml de méthanol. La courbe d'étalonnage a été ensuite tracée.

Des volumes de: 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l de la solution standard préparée ont été injectés en triplicata dans l'appareil d'HPLC.

La courbe d'étalonnage est une droite (tracée en utilisant Microsoft Excel 2010) qui donne la variation des aires des pics en fonction des volumes injectés.

La teneur du constituant dosé dans différents échantillons a été calculée en utilisant l'équation de régression de la meilleure ligne d'ajustement.

III.9. Méthodes de préparation et injection des échantillons de thé

Les échantillons de thé vert ont été préparés par deux méthodes de préparation: infusion et décoction.

Pour cela, une quantité de 5 g de chaque échantillon de thé vert a été mise en ébullition à une température d'environ 85°C dans 50 ml d'eau pure pendant 7 minutes. La solution obtenue a été ensuite filtrée et lyophilisée.

III.10. Mesure du pH des solutions de thé

Les pH des solutions de thé obtenues après filtration ont été mesurés à une température de 25°C.

III.11. Calcul des rendements

Les rendements montrent l'efficacité des méthodes d'extraction (infusion et décoction) utilisés dans notre étude.

Pour le calcul des rendements, la formule ci-dessous a été appliquée:

$$R = \frac{mf}{mi} \times 100$$

mi: Masse de thé vert avant extraction (g).

mf: Masse de l'extrait sec du thé après lyophilisation (g).

III.12. Dosage par HPLC-UV-DAD de la caféine dans les échantillons de thé

Pour l'analyse par HPLC, une quantité de 0,02 g de l'extrait de thé séché par lyophilisation a été dissoute dans 20 ml de méthanol, puis un volume de 20 μ l a été injecté trois fois pour chaque échantillon.

III.12.1. Conditions de l'analyse

Pour ce dosage, le débit de la phase mobile a été fixé à 1ml /min. La détection du composé étudié a été réalisée à 273 nm; la longueur d'onde maximale d'absorption de la caféine. La séparation a été réalisée en mode gradient et en phase inverse avec un temps d'acquisition de 14 minutes.

III.12.2. Phase mobile

Les solvants de la phase mobile utilisés dans le dosage de la caféine sont :

Solvant A: Eau / acide formique (0,1%).

Solvant B: Acétonitrile / acide formique (0,1%).

Tableau III.3: Quelques propriétés physicochimiques des solvants utilisés.

Formule chimique	Température d'ébullition (°C)	Masse volumique g/cm^3	Solubilité
CH ₃ CN	81,6°C	0,8	Eau, éthanol, méthanol, acétone, trichlorométhane, chloroéthylène, éther éthylique, acétate d'éthyle.
HCOOH	100,8 °C	1,22 à 25 °C	Eau, éther éthylique, acétone, acétate d'éthyle, méthanol, éthanol
CH ₃ OH	65,5°	0,7910	Eau, alcools, éthers, cétones

III-12-3- Phase stationnaire

Le matériau de la phase stationnaire est la silice greffée avec C18. Ce matériau est contenu dans une colonne de marque Poroshell 120 EC-C18, de longueur 50 mm et de diamètre intérieur de 3 mm. Les particules de la phase stationnaire ayant une de taille de 2,7 μm .

III.12.4. Gradient

Après plusieurs essais de séparation pour les différents échantillons de thé vert, nous avons constaté qu'une bonne séparation est obtenue pour un gradient établi sur 14 min avec un pourcentage initial de 85% du solvant A (**Tableau III.4**).

Tableau III.4: Gradient HPLC pour l'analyse de la caféine dans le thé.

Temps (min)	Composition volumique du solvant A (%)	Composition volumique du solvant B (%)
0	85	15
5	63	37
7	20	80
10	0	100
13	0	100
14	85	15

III.13. Validation de la méthode analytique

III.13.1. Courbe d'étalonnage

La caféine a été dosée par la méthode du standard externe. La gamme de volumes injectés était de 5, 10, 15 et 20 μl . La courbe d'étalonnage a été tracée en représentant les aires des pics (Y) par rapport aux volumes injectés (X, μl) pour quatre volumes différents, chaque point étant la valeur moyenne de trois mesures indépendantes de surface.

III.13.2. Détermination des limites de détection et de quantification

La limite de détection (LD) est la plus petite concentration ou teneur du composé à analyser (caféine) pouvant être détectée. Alors que, la limite de quantification (LQ) est la plus petite concentration ou teneur de la caféine pouvant être quantifiée, bien entendu, dans les conditions expérimentales de la colonne.

La limite de détection (LD) a été calculée en considérant une valeur égale à trois fois l'écart type des trois essais effectués pour tracer la courbe d'étalonnage, divisée par la pente de la courbe.

La limite de quantification (LQ) a été déterminée en tenant compte d'une valeur égale à 10 fois l'écart type obtenue, divisée par la pente de la courbe.

Les LD et LQ sont déterminées comme suit :

$$\text{LD} = 3. \text{ Ecart type/Pente}$$

$$\text{LQ} = 10. \text{ Ecart type/Pente}$$

III.14. Injection

L'appareil HPLC-UV-DAD analytique est équipé d'un injecteur automatique, les échantillons ont été préparés dans des cupules spéciales et injectés dans la colonne. Le volume d'injection était de 20 μl . L'appareil HPLC a été programmé pour exécuter une série de trois analyses consécutives.

III.15. Intégration

Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de deux paramètres:

- La largeur attendue des pics.
- Le seuil d'intégration (sensibilité).

La largeur du pic est à peu près prévisible en fonction de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic. Les surfaces des pics correspondant aux composés auxquels nous nous intéressons sont données par le logiciel dans un fichier contenant les

données chromatographiques sous forme de tableaux contenant entre autres; le numéro du pic, son temps de rétention et sa surface et cela, à la fin de chaque analyse.

III.16. Méthode de calcul de la concentration de la caféine dans les échantillons de thé vert

- 1- Peser 5 g de thé : 5 g → 50 ml d'eau distillée.
- 2- Après infusion, prendre 25 ml de 50 ml de l'infusé.
- 3- Prendre une quantité de l'extrait sec de thé après lyophilisation de masse (0,02 g). puis dissoudre cette quantité dans 20 ml de méthanol.
- 4- Injecter 20 µl de la solution obtenue dans l'appareil HPLC.
- 5- L'aire du standard (la caféine) est mesurée par intégration manuelle et cela pour chaque essai.
- 6- En se référant de l'équation de la courbe d'étalonnage : $y = 3113,3 x_{\text{caf}} + 11356$, trouver à chaque fois x_{caf} en µl qui représente le volume de la caféine dans 20 µl du mélange (échantillon de thé).
- 7- Convertir le volume de la caféine (µl) en mg comme suit :
2,5 mg (caféine) → 50 ml de méthanol
 $m_{\text{caf}}(\text{mg}) \rightarrow x_{\text{caf}}(\mu\text{l})$.
- 8- Trouver la masse de caféine en mg (m'_{caf}) dans 20 ml de la solution préparée initialement dans le méthanol.
 $m_{\text{caf}}(\text{mg}) \rightarrow 20 \mu\text{l}$
 $m'_{\text{caf}}(\text{mg}) \rightarrow 20 \text{ ml } (0,02 \text{ g de l'extrait})$.
- 9- Peser à chaque fois l'extrait sec (m extrait) qui a été obtenu après lyophilisation à partir d'une solution de 25 ml.
 $m^1_{\text{caf}}(\text{mg}) \rightarrow 0,02 \text{ g}$
 $m^{22}_{\text{caf}}(\text{mg}) \rightarrow m \text{ de l'extrait}(\text{g})$
 $m^{22}_{\text{caf}}(\text{mg}) \rightarrow 25 \text{ ml}$.
- 10- Calculer la concentration de la caféine (C_{caf}) dans les échantillons de thé dans 1 L d'eau.
 $m^{22}_{\text{caf}}(\text{mg}) \rightarrow 0,025 \text{ L}$
 $C_{\text{caf}}(\text{mg/L}) \rightarrow 1\text{L}$.

III-17- L'écart-type (S)

L'écart-type sert à quantifier la dispersion des valeurs (aires des pics) par rapport à la moyenne. L'écart-type a été calculé en utilisant Excel.

- L'écart-type = $\sqrt{\text{variance}}$.
- La variance (S^2): permet de combiner toutes les valeurs à l'intérieur d'un ensemble de données afin d'obtenir la mesure de dispersion.

$$S^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$\bar{x} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n x_i$$

- \bar{x} : la moyenne des mesures x_i (moyenne des aires).

Chapitre IV

Résultats et discussions

Chapitre IV: Résultats et Discussions

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons, la courbe d'étalonnage de notre composé pur (la caféine), les chromatogrammes de la caféine et des échantillons de thé étudié, les résultats du dosage par HPLC, les mesures des pH à une température de 25°C ainsi que les rendements d'extraction par infusion et décoction des échantillons de dix marques de thé vert du marché de la ville de Guelma, avec des lots différents pour quatre marques de thé vert. Dans ce travail, les marques de thé sont désignées par: A1A, F1A, FA, KA, M1A, N1A, RA, S1A, T1A, WA.

IV.2. Résultats

IV.2.1. Données chromatographiques de la caféine

La figure (IV.1) montre les chromatogrammes en 2D et 3D de notre composé pur (la caféine), la longueur d'onde maximale d'absorption étant à 273 nm et le temps de rétention est 1,35 min.

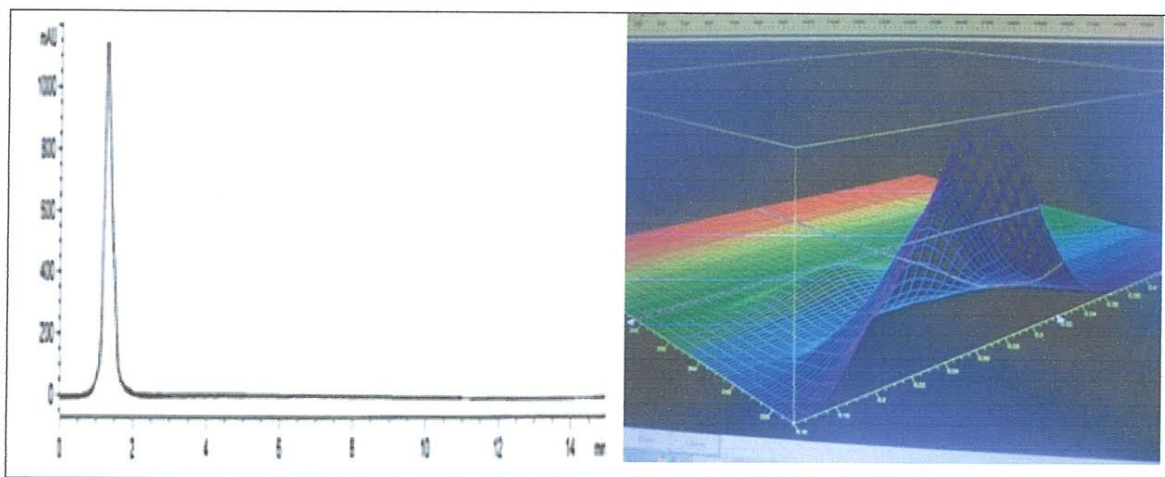


Figure IV.1: Chromatogrammes en 2D et 3D de la caféine ; $t_R = 1,35 \text{ min}$, $\lambda_{max} = 273 \text{ nm}$.

Tableau IV.1: Données HPLC de la caféine.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Ecart type
	1	2	3		
5	26924,70	26927,08	26927,12	26926,30	1,38
10	42487,50	42483,07	42484,43	42485,00	2,26
15	58050,70	58055,30	58050,30	58052,10	2,77
20	73624,14	73627,60	73623,26	73625,00	2,29

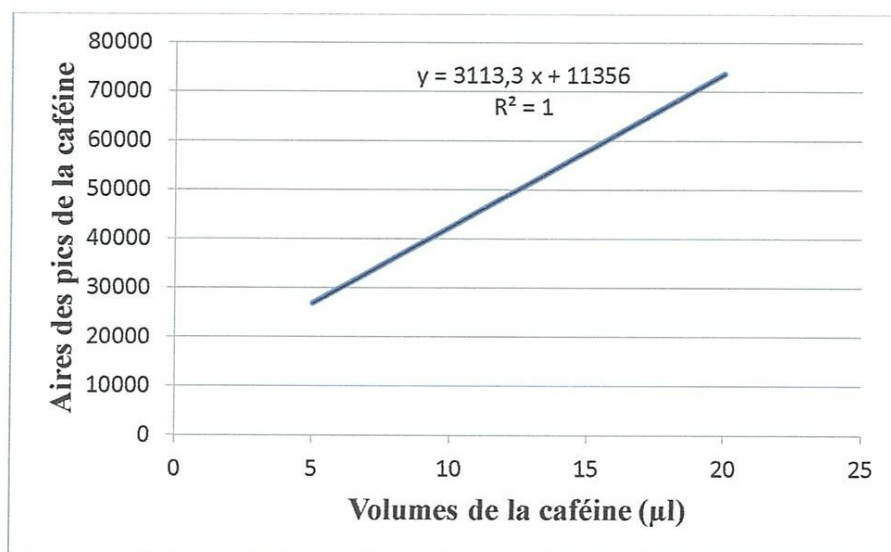


Figure IV.2: Courbe d'étalonnage de la caféine.

IV.2.2. Validation de la méthode d'analyse

IV.2.2.1. Linéarité de la courbe d'étalonnage

Comme nous l'avons vu précédemment, la courbe d'étalonnage était linéaire et un facteur de régression ($R^2 = 1$) a été obtenu pour notre composé standard (la caféine).

Concernant les écart-types calculés des aires des pics pour les quatre volumes injectés du standard, nous remarquons que la meilleure valeur trouvée (1,38) est celle pour un volume de 5 µl et la plus grande valeur d'écart-type est de (2,77), ces valeurs sont

acceptables, ce qui indique une homogénéité dans les trois valeurs des aires des pics pour les volumes injectés du standard étudié.

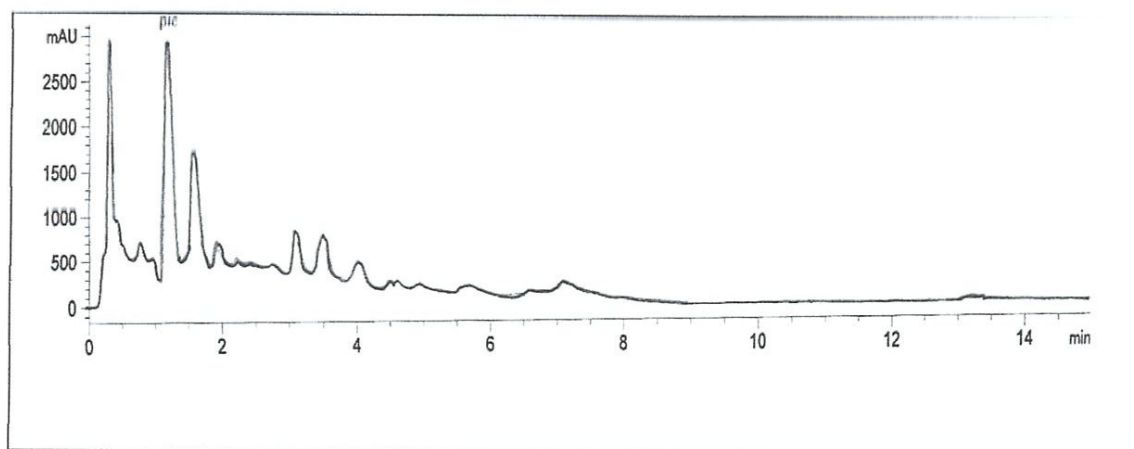
IV.2.2.2. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de la caféine

Nous avons calculé la limite de détection; LD ($2,25 \mu\text{g.L}^{-1}$) et la limite de quantification; LQ ($7,51 \mu\text{g.L}^{-1}$), ces valeurs sont donc tout à fait acceptables.

IV.2.3. Présentation des chromatogrammes des échantillons de thé vert

Nous représentons dans les figures (IV.3) à (IV.5), les chromatogrammes HPLC de quelques échantillons des thés verts, par infusion pendant 7 minutes et par décoction à température de 85°C . Le pic de la caféine est désigné par (pic).

- Infusion de KA (Lot 1)



- Infusion de KA (Lot 2)

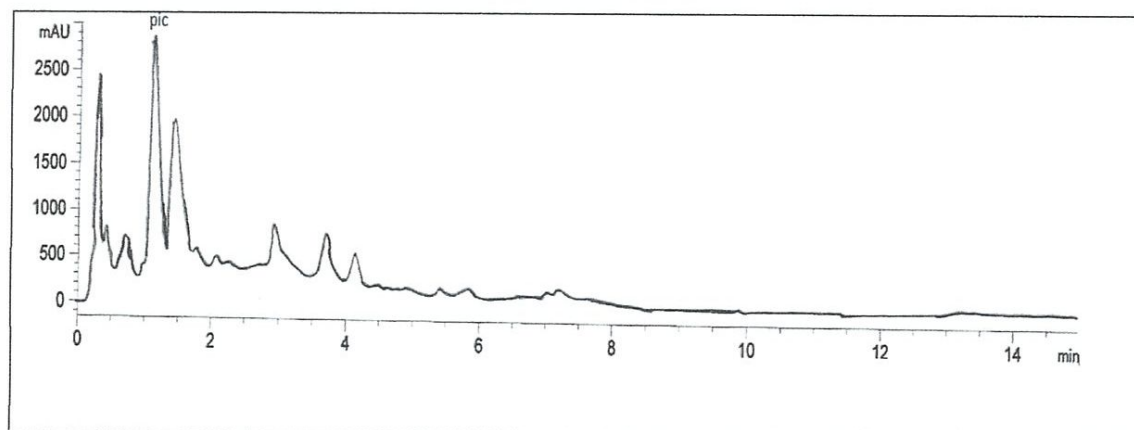
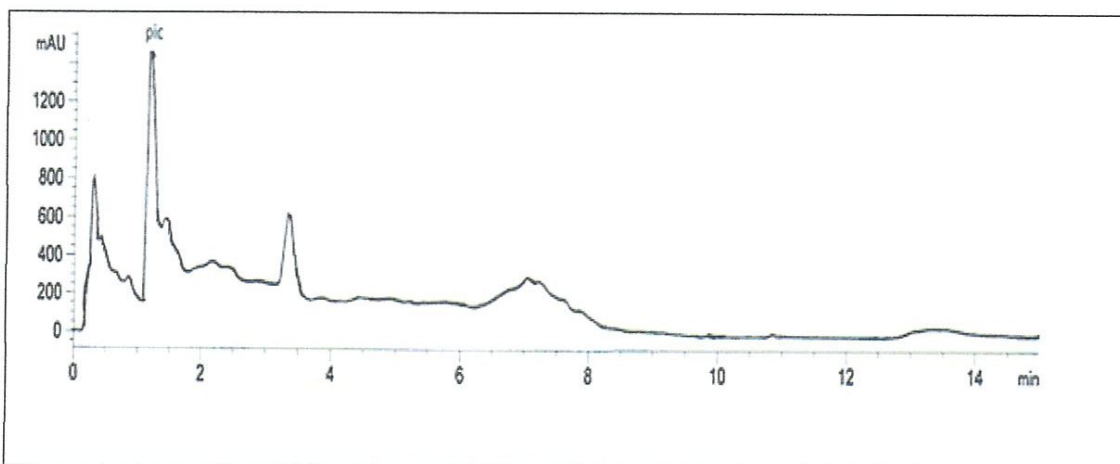
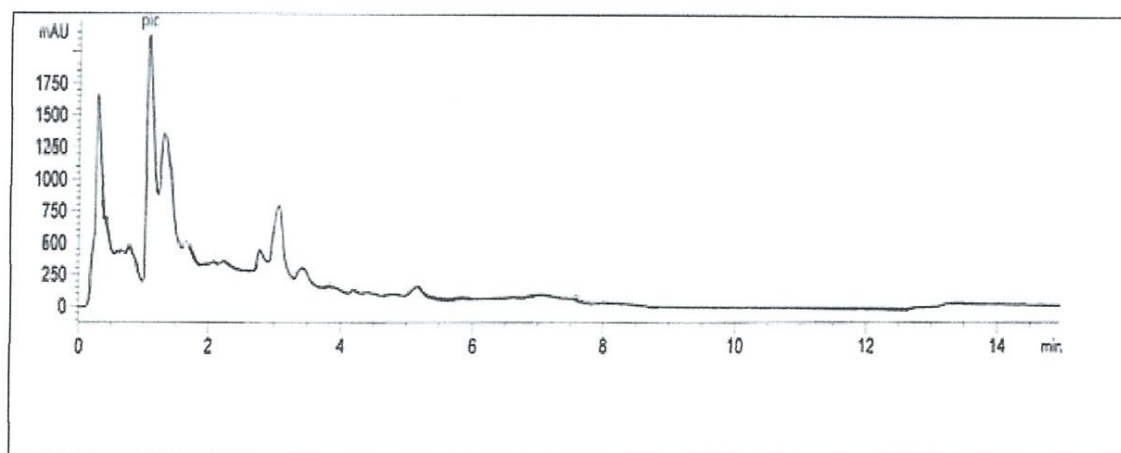


Figure IV.5: Chromatogrammes des échantillons préparés par infusion du thé vert de la marque KA (lot 1 et lot 2).

• Infusion de T1A



• Infusion de S1A



• Infusion de M1A

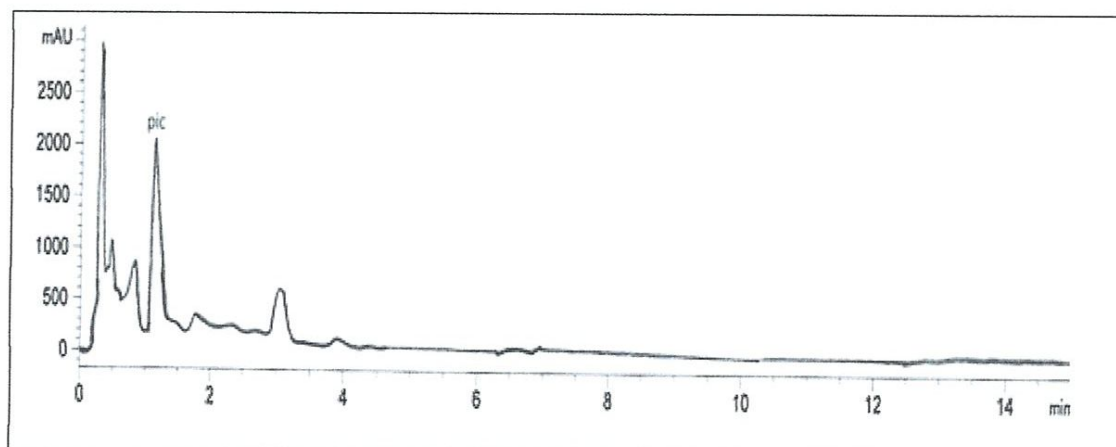
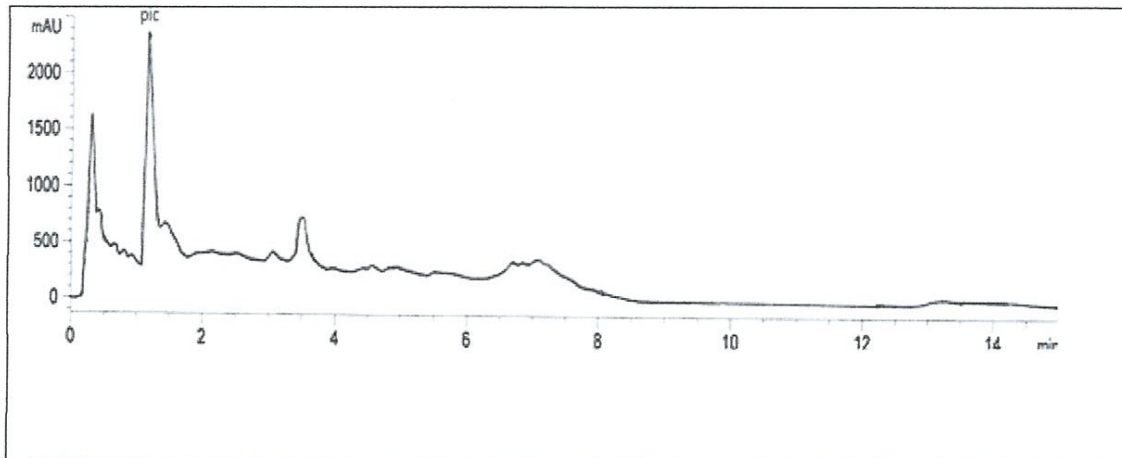
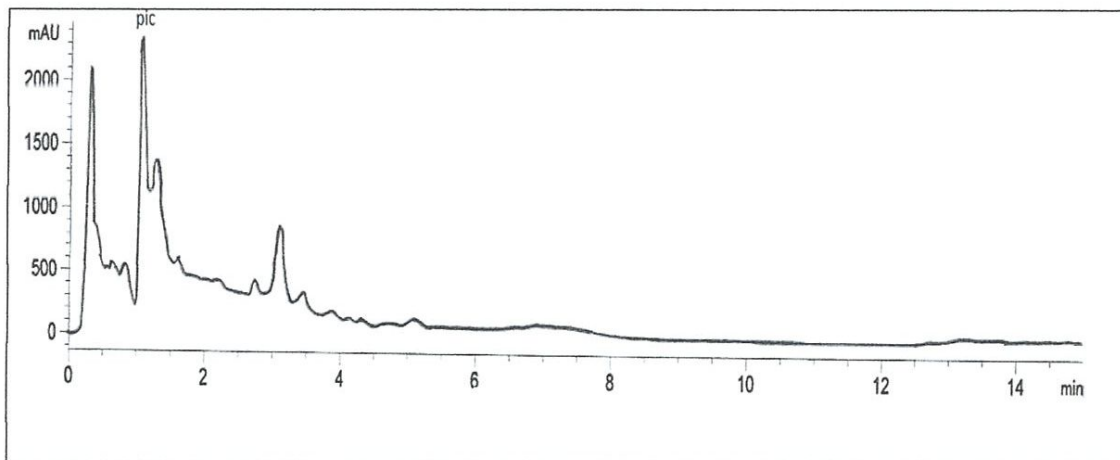


Figure IV.3: Chromatogrammes des échantillons préparés par infusion du thé vert de marques : T1A, S1A et M1A.

• Décoction de T1A



• Décoction de S1A



• Décoction de M1A

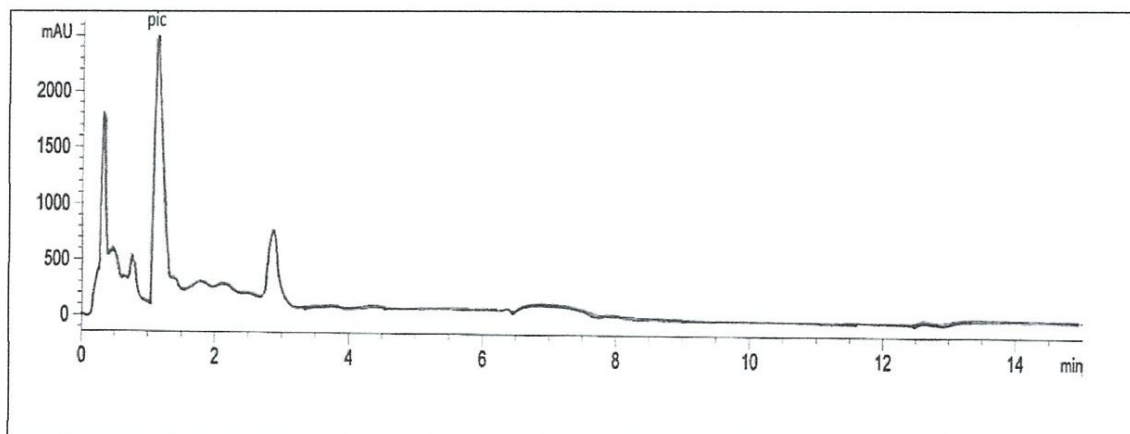


Figure IV.4: Chromatogrammes des échantillons préparés par décoction du thé vert de marques: T1A, S1A et M1A.

IV.2.4. Concentrations de la caféine dans les différents échantillons de thé

La concentration de la caféine a été déterminée par HPLC-UV-DAD pour des différentes marques de thé vert et la séparation des composés a été réalisée en 14 minutes.

Les concentrations en mg.L^{-1} du composé analysé sont résumées dans les tableaux (IV.2) à (IV.4) pour une infusion pendant 7 minutes ou décoction à température de 85°C .

Tableau IV.2: Concentrations de la caféine en mg.L^{-1} dans les échantillons préparés par infusion.

Echantillons	Concentration (mg.L^{-1})	Echantillons	Concentration (mg.L^{-1})
A1A	27,83±1,02	N1A	32,52±1,4
F1A	36,43±1,06	S1A	37,15±1,63
M1A	44,14±2,41	T1A	41,02±1,94

Tableau IV.3: Tableau comparatif des concentrations (mg.L^{-1}) de la caféine dans les échantillons préparés par infusion de 4 marques de thé vert avec 2 lots différents.

Echantillons	Concentration (mg.L^{-1})		Echantillons	Concentration (mg.L^{-1})	
	Lot1	Lot2		Lot1	Lot2
KA	28,15±1,45	28,95±1,24	RA	41,87±1,02	42,04±1,86
FA	37,86±1,86	38,23±1,25	WA	31,04±1,86	31,56±1,04

Tableau IV.4: Concentrations de la caféine en mg.L^{-1} dans les échantillons préparés par décoction.

Echantillons	S1A	T1A	M1A
Concentration (mg.L^{-1})	38,64±1,67	42,08±2,03	44,83±1,96

IV.2.5. Mesure du PH

Les résultats de mesure des pH à 25°C des échantillons de thé préparés par les deux méthodes: infusion et décoction sont récapitulés dans le tableau (IV.5).

Tableau IV.5: Les valeurs de pH des échantillons des thés verts à 25°C.

Echantillons	Méthodes de préparation		
	pH des échantillons (infusion)		pH des échantillons (décoction)
	Lot1	Lot2	
A1A	5,65	–	–
F1A	5,70	–	–
M1A	5,70	–	5,70
N1A	5,53	–	–
S1A	5,63	–	5,47
T1A	5,56	–	5,48
KA	5,18	5,28	–
FA	5,68	5,58	–
RA	5,30	5,47	–
WA	5,56	5,52	–

IV.2.6. Rendements des extractions (infusion et décoction)

Dans le tableau (IV.6), nous présentons les résultats des rendements des deux méthodes d'extraction (infusion et décoction) réalisées dans cette étude.

Tableau IV.6: Les valeurs des rendements (%) de l'extraction (infusion et décoction).

Echantillons	Méthodes de préparation		
	Rendement d'infusion (%)		Rendement de décoction (%)
	Lot1	Lot2	
A1A	12	–	–
F1A	10	–	–
M1A	14	–	14
N1A	9,8	–	–
S1A	9,6	–	11
T1A	13	–	14,2
KA	6,4	6,4	–
FA	11,4	11,6	–
RA	11	11,2	–
WA	9,8	11	–

IV.3. Discussion

IV.3.1. Concentrations de la caféine dans les échantillons du thé vert

- Selon la marque du thé

Notre étude a été portée sur des différentes marques de thé vert d'origine chinoise. Néanmoins, les théiers peuvent être plantés dans des régions différentes c'est-à-dire, les feuilles de la plante sont cultivées de différents sols. Ainsi, les concentrations de la caféine dans nos échantillons préparés par infusion varient de 27,83 à 44,14 mg.L⁻¹.

En raison de la diversité du sol où la plante du thé est cultivée et même la saison et le type de la cueillette, il est tout à fait logique de trouver des différences entre les teneurs de la caféine dans les marques de thé vert étudiées.

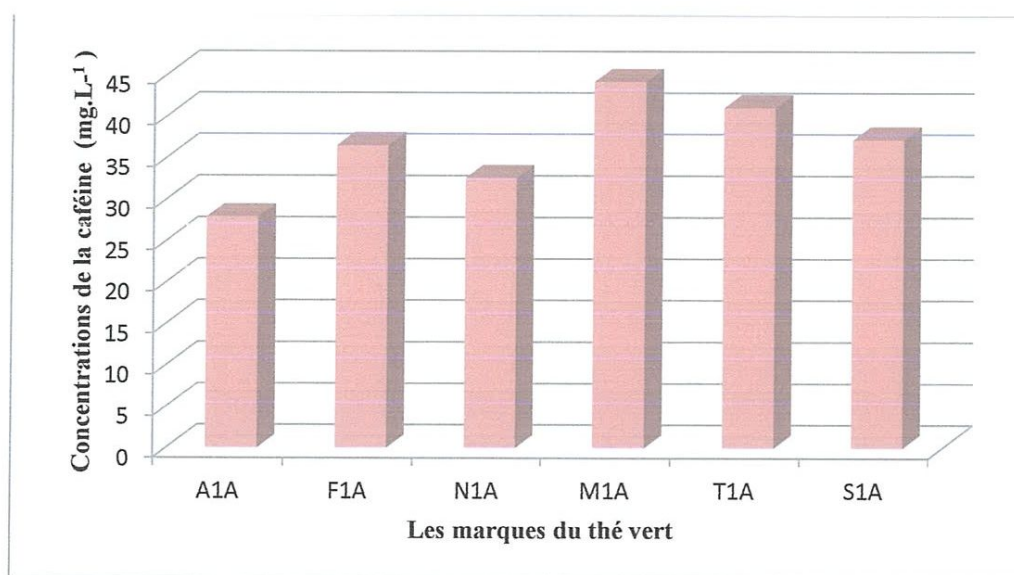


Figure IV.6: Histogrammes en 3D des concentrations de la caféine dans les échantillons de thé vert.

• Selon la méthode d'extraction

Les teneurs de la caféine dans les échantillons de thé vert préparés par décoction ont augmenté mais d'une façon non considérable si on les compare avec celles de l'extraction par infusion. Les valeurs trouvées sont: pour S1A, T1A et M1A pour l'infusion et décoction dans cet ordre: 37,15 et 38,64; 41,02 et 42,08; 44,14 et 44,83 mg.L⁻¹ respectivement.

Donc pour une infusion à température 85°C, et une durée égale à 7 min, et pour une décoction jusqu'à 85°C, les concentrations de la caféine dans l'eau sont très proches ce qui

nous amène à conclure qu'à cette température, les deux méthodes d'extraction utilisées sont à maintenu pour préparer une boisson de thé vert.

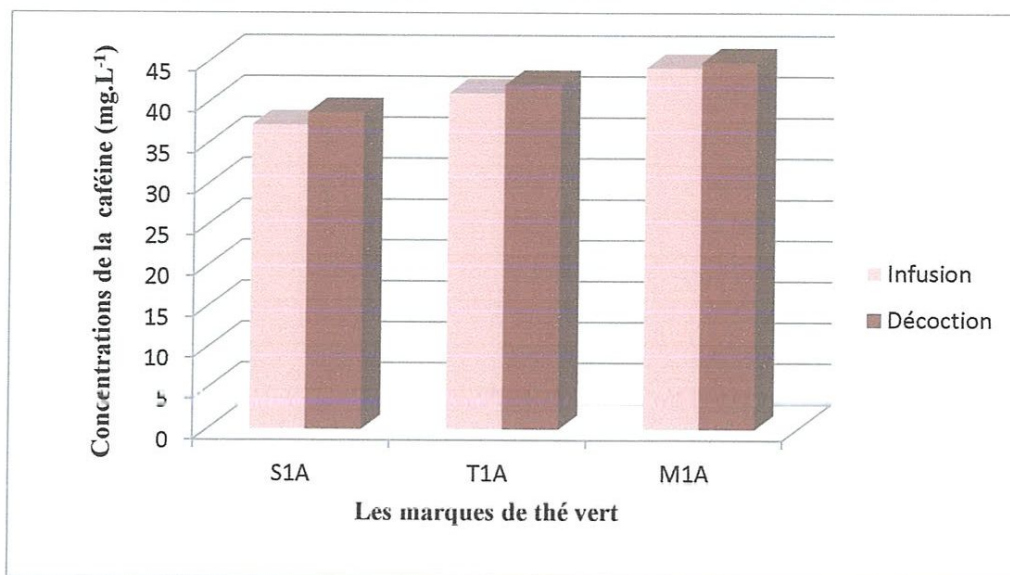


Figure IV.7: Histogrammes en 3D des concentrations de la caféine dans les échantillons de thé préparés par infusion et décoction.

- **Selon la variation du lot**

Les concentrations de la caféine dans les échantillons des thés verts des marques, (KA, FA, RA, et WA) préparés par infusion sont respectivement pour les lot1 et lot2: 28,15 et 28,95; 37,86 et 38,23; 41,87 et 42,04; 31,04 et 31,56 mg.L⁻¹.

A travers ces résultats, nous pouvons dire que les concentrations de la caféine dans les deux lots pour chaque marque de thé vert sont très proches, Ce qui nous permet de conclure que la production est stable depuis la plantation des théiers jusqu'au procédé de fabrication des thés verts étudié.

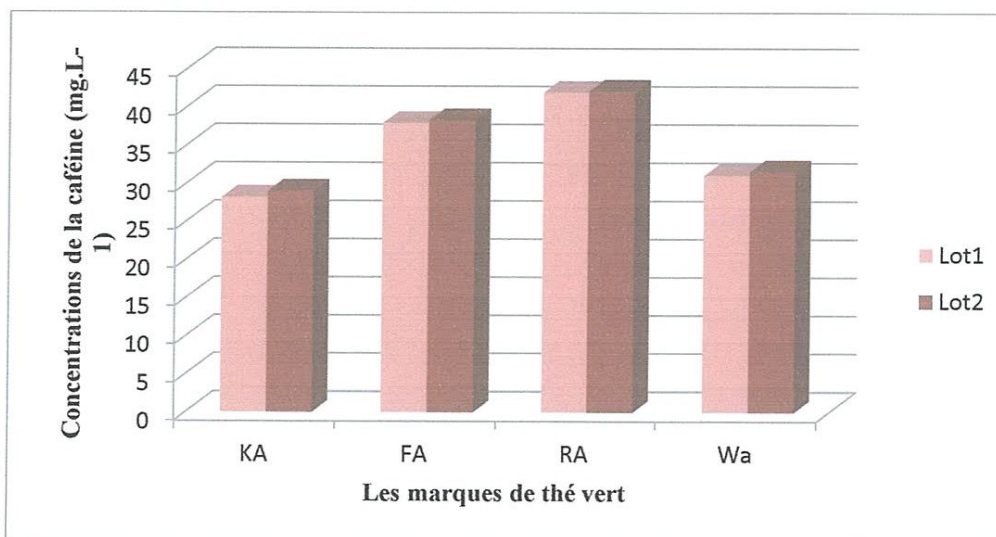


Figure IV.8: Histogrammes en 3D des concentrations de la caféine dans les échantillons de thé vert dans les marques ayant 2 lot.

IV.3.2. Discussion des valeurs du pH

Les valeurs des pH qui varient entre 5,18 et 5,70 indiquent que les échantillons (préparés par infusion ou décoction) du thé vert des marques étudiées sont des acides faibles.

Les résultats qui confirment l'acidité des boissons du thé vert sont logiques du fait de la composition chimique de la feuille de thé où on trouve parmi autres les polyphénols possédant des groupements OH sur le cycle benzénique et ayant des propriétés acides en l'occurrence des acides phénols comme (l'acide gallique et l'acide caféique), aussi pour les vitamines (l'acide ascorbique et l'acide folique) ainsi que pour les catéchines et les acides aminés comme (la théanine).

Nous constatons, à travers les résultats obtenus, que la méthode d'extraction que ce soit l'infusion ou la décoction et aussi le changement de lot pour la même marque n'ont pas une influence significative sur les valeurs des pH.

- [18] <http://www.thevert.com/vitamines/>.
- [19] https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitamine_E.
- [20] https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitamine_B9.
- [21] <http://art-du-the.fr/mineraux-the-vert>.
- [22] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Caf%C3%A9ine>.
- [23] <https://www.terre-des-thes.fr/la-theine-cafeine/>.
- [24] <http://www.thevert.com/cafeine/>.
- [25] S.KELLOU, Conformation moléculaire et calcul du potentiel intermoléculaire de la caféine, Mémoire de magister, Université Mentouri Constantine, 2009.
- [26] http://wwwold.chu-montpellier.fr/publication/inter_pub/R277/A5270/LaCafeine.pdf.
- [27] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Lyophilisation>.
- [28] <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>.
- [29] http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/article_PDF/HPLC-Principe-et-appareillage_a9.pdf.
- [30] http://www.ebanque-pdf.com/fr_dosage-de-la-cafeine-par-hplc.html.