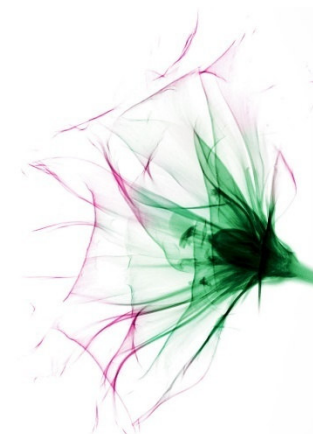


Développement et validation d'une méthode de dosage de la nicotine dans des extraits de Tabac par HPTLC

Lionel Paillat
Réunion CECM
17 Juin 2011



PLAN DE LA PRÉSENTATION

- La société Charabot S.A.
- La chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)
- Développement et validation du dosage de la nicotine par HPTLC
- Conclusion



LA SOCIETE CHARABOT S.A.

➤ Activité: Fabrication de matières premières à destination des arômes et parfums

➤ Localisation régionale:

Plan de Grasse: Site de production

Grasse: Centre administratif, achats, centre de création arômes et parfums, service R&D

**SERVICE
R&D**

(Hémi)synthèses de molécules
Procédés sur matrices végétales
Analyses



POURQUOI CHOISIR LA TLC/HPTLC

- Flexibilité de la technique
- Analyse de matrices complexes
- Complémentaire de l'HPLC (méthode orthogonale)
- Analyse de substances volatiles/non volatiles n'absorbant pas en UV
- Identification de composés (R_f , couleur, aspect...)
- Sensibilité de la technique

APPLICATIONS

- Développement des conditions de fractionnement
- Suivi de synthèse/fractionnement
- Screening phytochimique
- Analyses quantitatives



HPTLC: PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

PREPARATION D'ÉCHANTILLON

DEPOT

- Phase stationnaire
- Dimension des dépôts



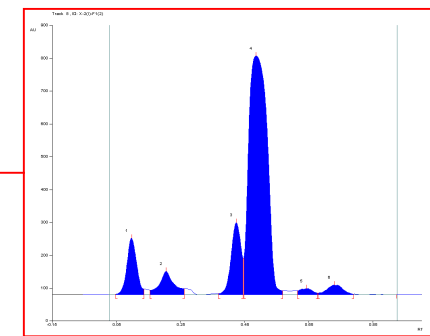
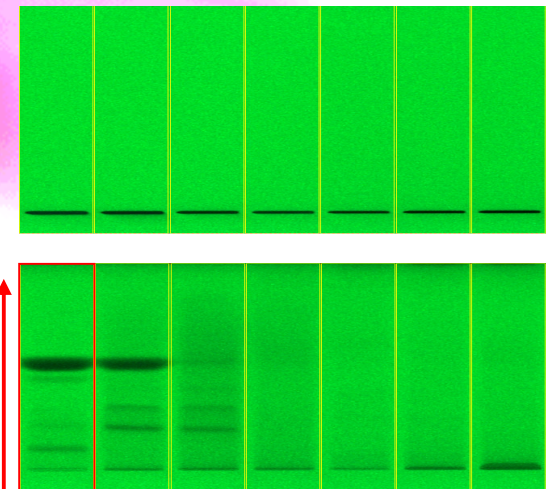
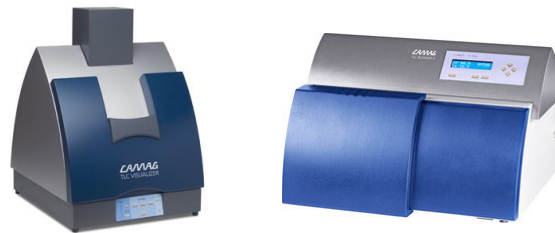
MIGRATION

- Phase mobile
- Géométrie de cuve
- Mode de développement

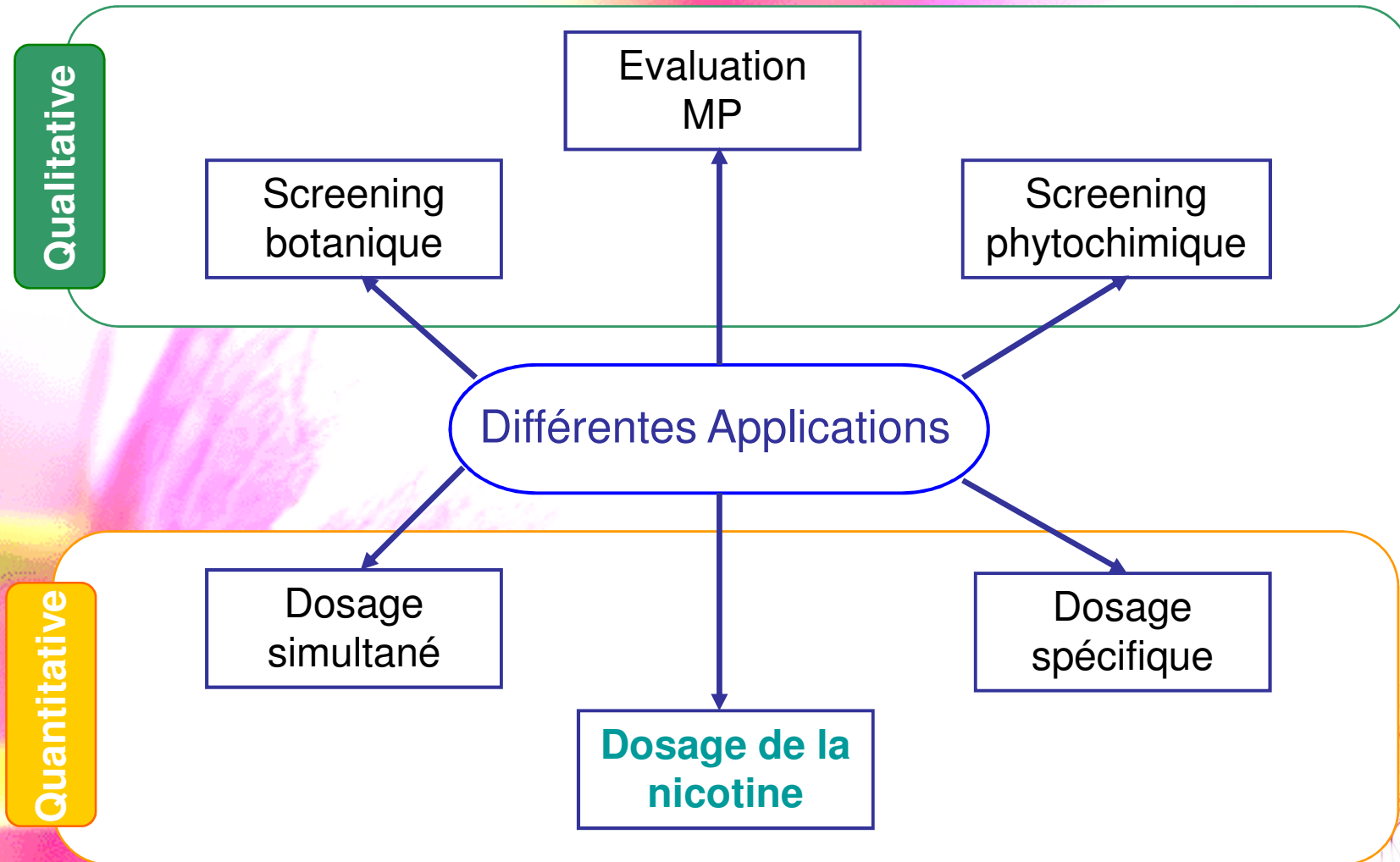


EVALUATION

- Révélateur et mode de révélation
- Biologique, Qualitative, Quantitative



APPLICATION DE L'HPTLC AU LABORATOIRE



COMPOSES TOXIQUES DU TABAC

Contexte

Nicotine = toxique (substance réglementée)

Réglementation (interne): teneur < 1000 ppm dans les extraits de Tabac

Objectifs

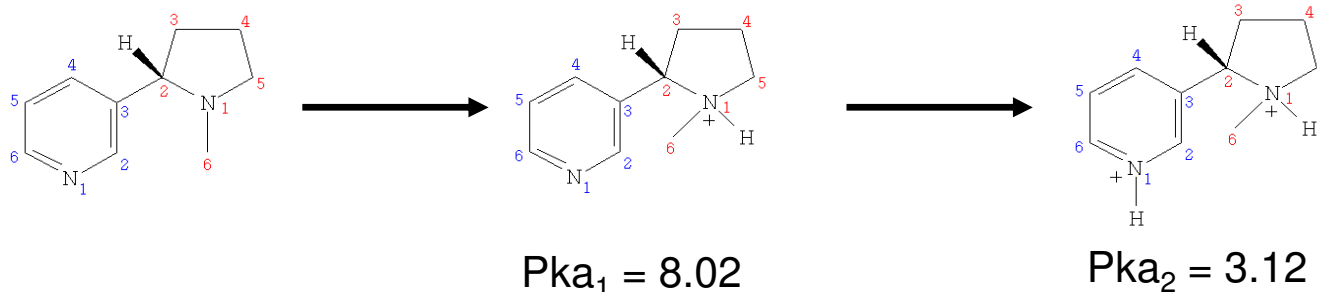
Développer une méthode de dosage rapide et sensible par HPTLC

Comparer les résultats à ceux obtenus par HPLC/UV

Les alcaloïdes du Tabac

Nicotine et nornicotine (majeur), cotinine, myosmine, anabasine... (mineur)

Nicotine: Caractère accepteur de protons



PROBLEMES RENCONTRES

Préparation d'échantillon

Le méthanol ne permet pas de libérer la totalité de la nicotine contenue dans les oléorésines de Tabac

↳ Solubilisation des extraits dans un mélange MeOH/Eau (80:20 v/v), bain-marie 15 min (60°C) puis filtration avant analyse

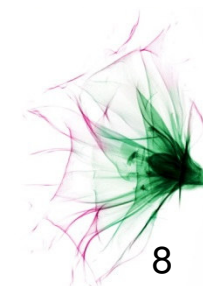
Dosage par GC/FID

Obtention de deux pics dus à la protonation de la nicotine

Extrait « low nicotine, LN »: mauvaise résolution du pic de nicotine

Oléorésine: Pollution du système par la matrice

Les solutions hydro- alcooliques ne peuvent être analysées



DEVELOPPEMENT DES CONDITIONS HPTLC

Etape 1

Nicotine = alcaloïde

Conditions HPTLC pour analyse
caféine et théobromine (AcOEt/MeOH/Eau
(20:2.7:2) sur silice en mode « sandwich »)

$$R_f (\text{nicotine}) < 0.1$$

Etape 2

Augmentation de la polarité du solvant:

	AcOEt	MeOH	Eau
A	20	5	2
B	20	10	2
C	20	5	4

R_f augmente mais la
nicotine traîne sur la
plaque

Etape 3

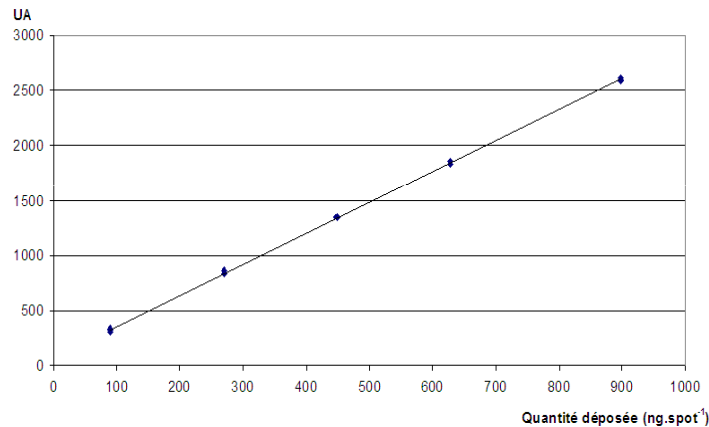
Substitution de l'eau par NH_4OH 2.8 % pour
stabiliser la nicotine (forme non protonée)

Conditions optimales:
**AcOEt/MeOH/ NH_4OH 2,5%
(20:10:4)**

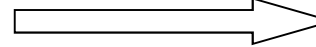
VALIDATION DE LA METHODE HPTLC

Linéarité/Domaine de travail

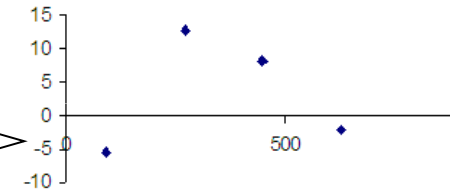
Dépôt des 5 niveaux de standards (répété 5 fois pour les premiers et derniers niveaux, en duplicata pour les niveaux intermédiaires).



Analyse de
Variance



Analyse des résidus



Test de Fisher

$F_{exp} < F_{th} (4, 11, 95\%)$

➔ Validation du modèle linéaire (90 – 900 mg/L)

Exactitude

Détermination du % de recouvrement en analysant un échantillon avant et après addition de 50, 100 et 150% de sa teneur initiale en composés à doser.

➔ % recouvrement = 99 – 101 %



VALIDATION DE LA METHODE HPTLC

DETERMINATION des LOD/LOQ

- Détermination du bruit de fond:
Intégrer les pics au R_f des standards
- LOD = 3 × bruit de fond
- LOQ = 10 × bruit de fond

↳ LOD = 7 mg/L
↳ LOQ = 24 mg/L

PRECISION

- Dépôt d'un même échantillon 6 fois, analyse selon les conditions définies et détermination du % RSD: **répétabilité du dépôt d'échantillon**

%RSD < 0,5 %

- Dépôt d'un même échantillon 6 fois à 3 concentration différentes; l'analyse est répétée 3 fois le même jour (« **intra-day precision** ») et sur 3 jours différents (« **inter-day precision** ») et détermination du %RSD.

%RSD < 1 %

ROBUSTESSE

Impact de la variation de plusieurs paramètres sur les résultats:

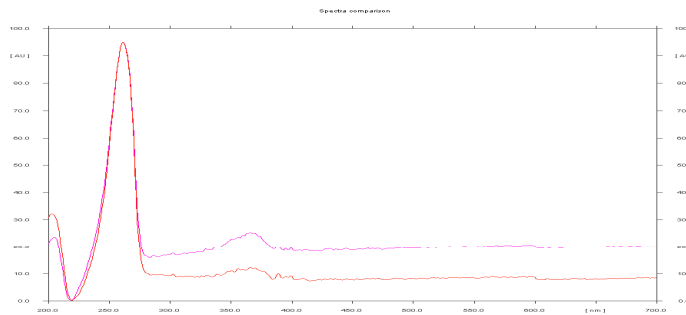
- composition de la phase mobile (A)
- volume de la phase mobile (B)
- distance de migration (C)
- pré-lavage de la plaque (D)

Paramètre	S.D	% R.S.D.	S.E.
A	1.17	0.14	0.28
B	1.61	0.19	0.93
C	1.24	0.15	0.71
D	1.53	0.18	0.88

VALIDATION DE LA METHODE HPTLC

SPECIFICITE

Test 1: Comparer les spectres UV



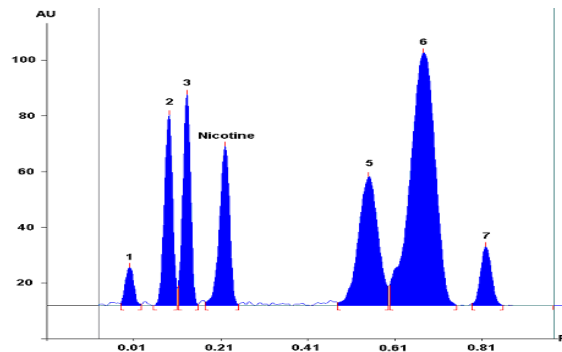
Signal nicotine
dans standard

Signal nicotine
dans échantillon

Spectre UV
superposable

Test 2: Vérifier l'absence de co-élution

Substances déposées:
D,L-nornicotine (2)
Anabasine (3)
Nicotine
Cotinine (5)
Myosmine (6)



Pas de coélution
détectée

↳ La méthode développée est spécifique au dosage de la nicotine

DOSAGE DANS DES EXTRAITS DE TABAC PAR HPTLC et HPLC

Phase stationnaire
Phase mobile

Conditions

Détection

Gamme de calibration

HPTLC

HPTLC plate Silica gel 60F254
AcOEt/MeOH/NH₄OH (20/10/4)

Migration en cuve horizontale
(mode « sandwich ») sur 50 mm

263 nm

90 – 900 mg/L

HPLC

Gémini NX 5µm C18
A: 10 mM NH₄HCO₃ (pH10)

B: Acétonitrile
A/B (95:5) puis (5:95) en 10 min,
isotherme 15 min et retour au
conditions initiales

261.9 nm

90 – 900 mg/L

Résultats de dosage HPTLC/HPLC

	HPTLC	HPLC	S.D.	%R.S.D.
Absolue (%)	37.91	36.80	0.78	2.1 %
Oléorésine (%)	2.61	2.66	0.04	1.4 %
Extrait « LN » (ppm)	228	214	10	4.5 %

BILAN SUR L'HPTLC

Comparaison HPTLC/HPLC

	HPTLC	HPLC
Durée d'une analyse	40 – 60 min	30 – 40 min
Echantillons / analyse	20 – 40	1
Tps / échantillon	1,5 – 2 min	30 – 40 min
V_{solvant} /analyse	5 – 10 mL	60 mL
V_{solvant} /échantillon	0,25 mL	60 mL

Pour conclure...

- Rapidité d'analyse
 - Faible consommation de solvant
 - Méthode précise, répétable, sensible et robuste
 - Résultat comparables à ceux issus de l'analyse HPLC
- } **Faible coût analytique**

*MERCI DE VOTRE
ATTENTION*

