

Dernières avancées en chimie analytique pour l'analyse des extraits naturels

Xavier Fernandez

Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes - UMR CNRS 6001
Université de Nice Sophia Antipolis ; Xavier.Fernandez@unice.fr



L'analyse des extraits naturels

- De plus en plus de contraintes
- Exigences des clients
- Exigences des consommateurs
- Le principe de précaution
- Exigences réglementaires (REACH...)

Les composés à usage limité

➤ De plus en plus nombreux

➤ Les allergènes

- ✓ Il n'existe pas encore de méthode satisfaisante
- ✓ Cas des mousses
- ✓ Etude des précurseurs (peroxydes)

➤ Les toxiques

- ✓ Les bien connus ; méthyl eugénol, safrole, coumarine, pulégone...
- ✓ Les nouveaux : HAP, pesticides, amines carcinogènes...

<http://www.ifraorg.org/>

LCMBA

Conséquences



- Caractérisation des extraits (REACH)
- Quantification des composés réglementés

Nombre croissant d'échantillons et d'analyses

LCMBA

Impacts pour les laboratoires d'analyse

➤ Développement de nouvelles méthodes de quantification

- ✓ Méthodes plus rapides
- ✓ Méthodes plus efficaces
- ✓ Repousser les limites de quantification et détection

➤ Nécessité d'utiliser de nouveaux outils analytiques

- ✓ Méthodes de préparation des échantillons
- ✓ GC rapide et à deux dimensions
- ✓ GC et HPLC/MS/MS
- ✓ Automatisation

UMR CNRS-UNSA 5002
LCMBA

Extraits : Echantillons complexes

- Grand nombre de constituants
- Composés qui ne sont pas souhaitables pour l'analyse
- Produits qui vont gêner l'analyse
- Analytes à l'état de traces

➔ **Les techniques d'analyse** peuvent apporter des réponses

- ✓ GC et HPLC/MS/MS
- ✓ HPLC/RMN
- ✓ GC-GC et GC×GC

↓

Intervention de techniques de préparation de l'échantillon plus performantes qui permettent :

- Eliminer les constituants gênants
- Isoler une catégorie de composés
- Concentrer des constituants à identifier ou à doser
- Modifier la nature des analytes pour rendre l'analyse réalisable (dérivatisation)

UMR CNRS-UNSA 5002
LCMBA



Méthodes de préparation de l'échantillon / méthodes d'isolement

- Méthodes de préparation de l'échantillon
- Nouveaux outils analytiques



UMR CNRS-UNSA 6005
LCMBA

L'ENRICHISSEMENT ET ISOLEMENT

- Etape incontournable dans le cadre de l'enregistrement REACH des concrètes, absolues, résinoïdes...
- Techniques de fractionnement (distillation, colonnes, lavages, partitions...)
- HPLC semi-préparative
Changement de colonne
- HPLC préparative
Changement de colonne et de système de pompage
- Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) ou Counter-Current chromatography (CCC)



UMR CNRS-UNSA 6005
LCMBA

Chromatographie Flash

- Système sous pression
- Parfaitement automatisé
- Muni d'un détecteur (généralement UV)
- Muni d'un collecteur de fractions
- Nombreuses phases stationnaires disponibles
- Très efficace et répétable



Extraction, Fractionnement

LCMBA

UMR CNRS-UNSA 6005

Chromatographie Flash

Les phases stationnaires



- Disponibles dans un éventail de tailles de 4 g à 1500 g pour optimiser la purification de quelques milligrammes à plus de 100 grammes de produit.
- Elles peuvent monter en pression jusqu'à 200 psi (13,8 bar).
- Très homogènes entre elles

Extraction, Fractionnement

LCMBA

UMR CNRS-UNSA 6005

Extraction en Phase Solide (SPE)



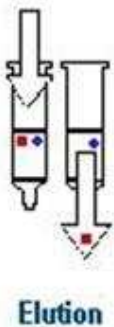
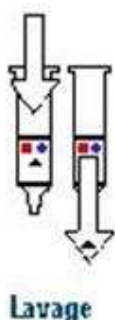
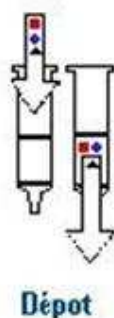
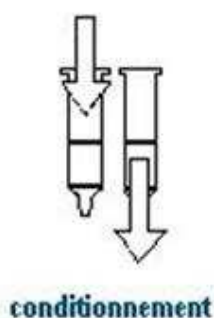
- Méthode très développée depuis les années 80
- Largement utilisée pour
 - la préconcentration de traces
 - la purification d'échantillons
- Plusieurs matériels d'extraction disponibles (colonnes, cartouches, disques, puits)
- Les cartouches sont les plus utilisées. Forme d'une seringue en polypropylène dans laquelle quelques centaines de milligrammes de particules en phase solide sont maintenues par deux frités.
- Possibilité de systèmes automatisés

J. Chromatogr. A, 2000, 885, 3-16

Extraction en Phase Solide (SPE)

LCMBA

SPE : Principe

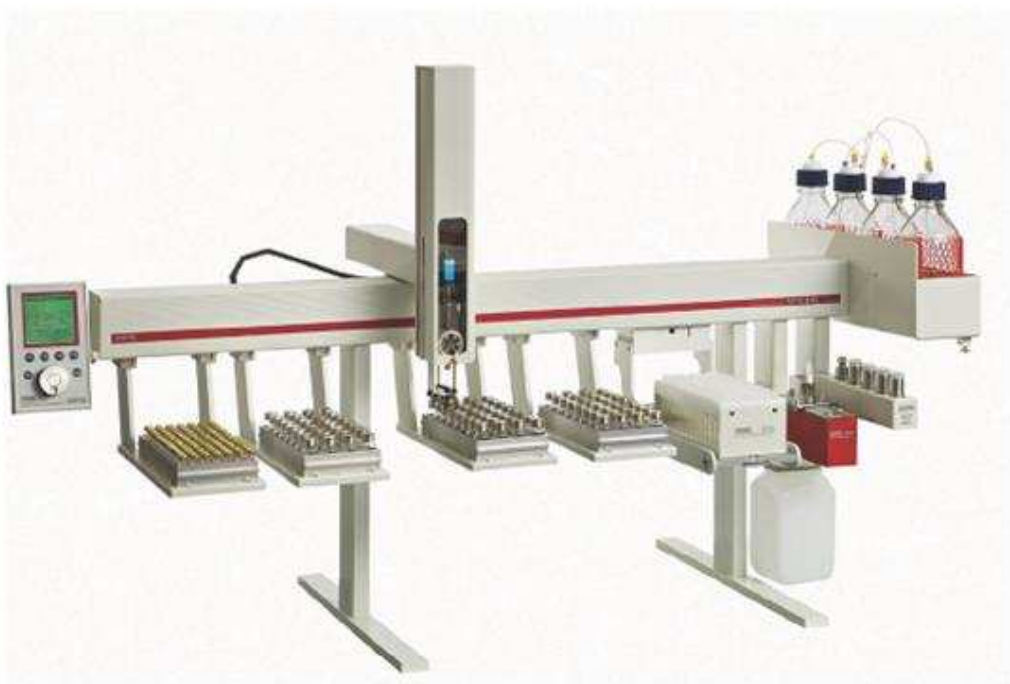


- Conditionnement de la phase
- Introduction de l'échantillon
- Éventuellement rinçage et purification de l'échantillon
- Éluion des composés d'intérêt par un solvant approprié. Choix du solvant dicté par la nature du sorbant et les caractéristiques des composés à isoler ainsi que par celle des interférents à éliminer
- Analyse d'une fraction d'éluion

Extraction en Phase Solide (SPE)

LCMBA

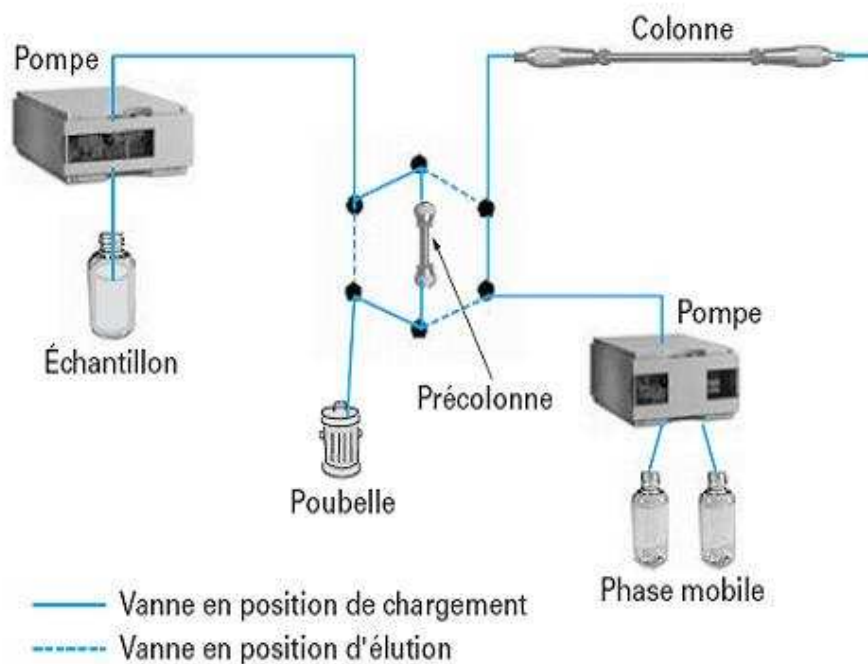
SPE : extraction en différé automatisée



Extraction en Phase Solide (SPE)

LCMBA

SPE : couplage en ligne (extraction – analyse)

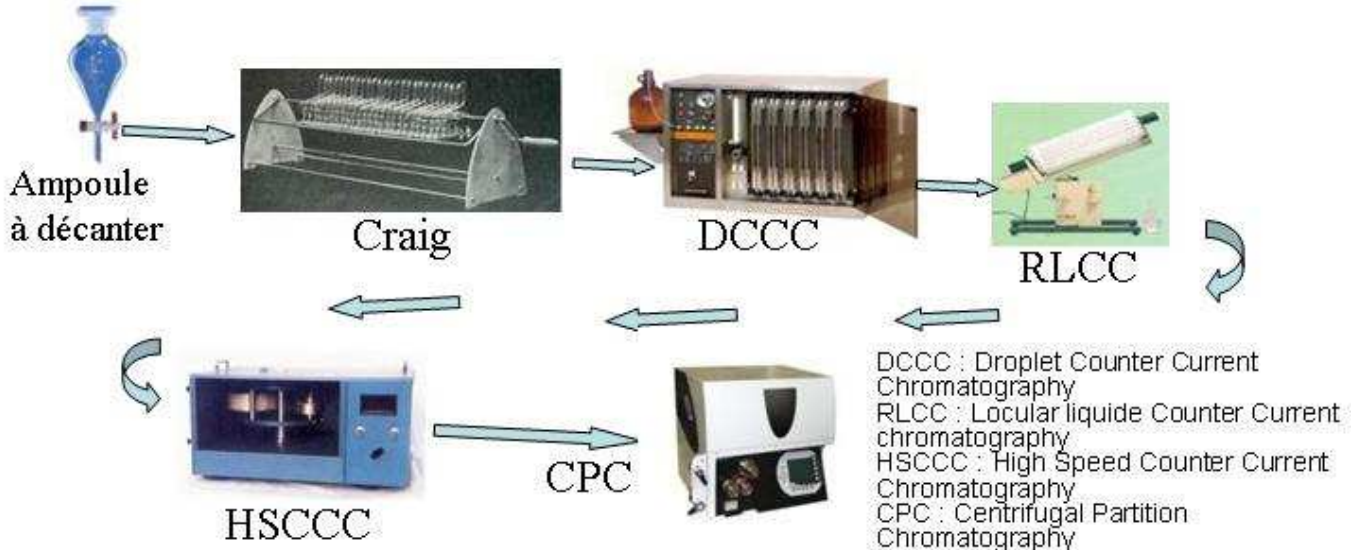


Extraction en Phase Solide (SPE)

LCMBA

Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

- Chromatographie liquide préparative et industrielle, caractérisée par l'absence de support solide et par l'utilisation de systèmes biphasiques pour la purification de tous types de molécules polaires, non polaires, organiques, inorganiques en solution



UMR CNRS-UNSA 6005

LCMBA

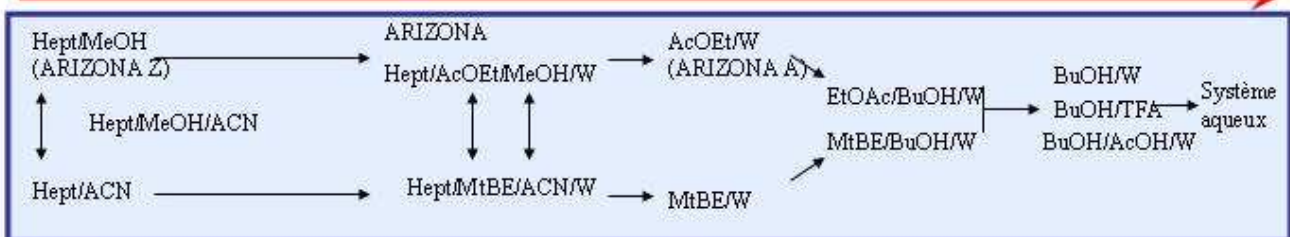
Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

- Chromatographie de partage liquide-liquide
 - deux phases liquides non miscibles
 - préparées par mélange de deux ou plusieurs solvants
- Phase stationnaire maintenue par force centrifuge
- Phase mobile pompée au travers
- Séparation des solutés en fonction de leur coefficient de partage (K_d)
- Même principe que l'HPLC mais sans support solide



Moins polaires

Plus polaires



Lipides ...

Polyphenols ...

Anthocyanes ...

Protéines, peptides ...

UMR CNRS-UNSA 6005

LCMBA

Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

CLHP

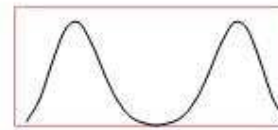
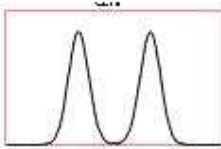


CPC



- Efficacité importante $N > 15000$
- Sélectivité limitée (choix du greffon limité)

- Efficacité plus faible $N > 1000$
- Sélectivité importante (système solvant illimité)



$R_s = f(N, \alpha, k')$
 R_s identique

UMR CNRS-UNSA 6005

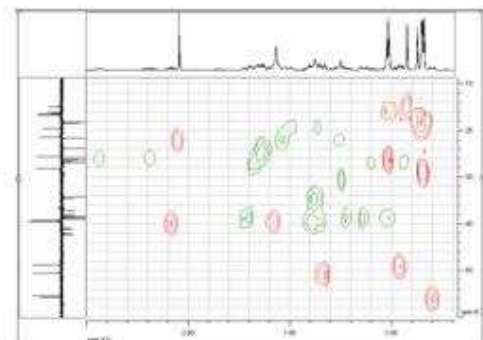
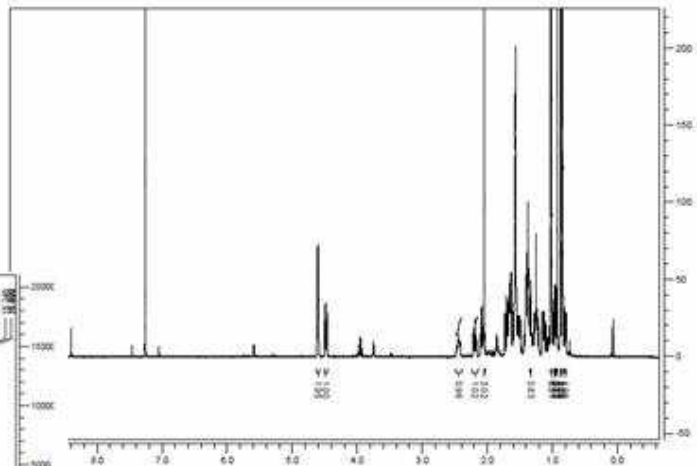
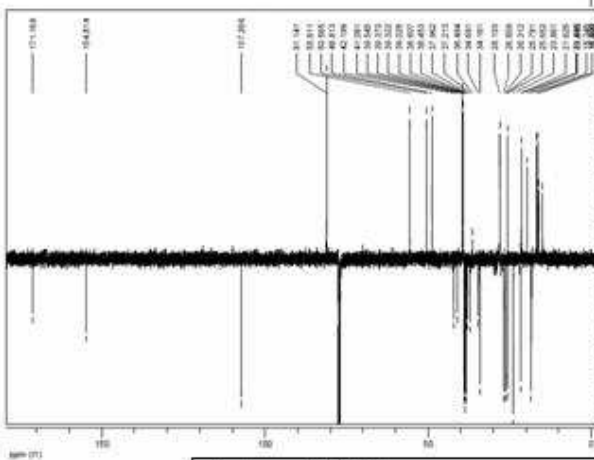
LCMBA

LA CARACTERISATION

RMN 500 MHz
 dans $CDCl_3$

Analyses effectuées:

- RMN ^{13}C
- RMN 1H
- COSY
- HSQC
- HMBC

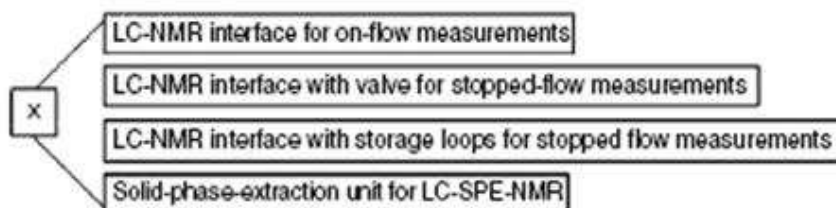
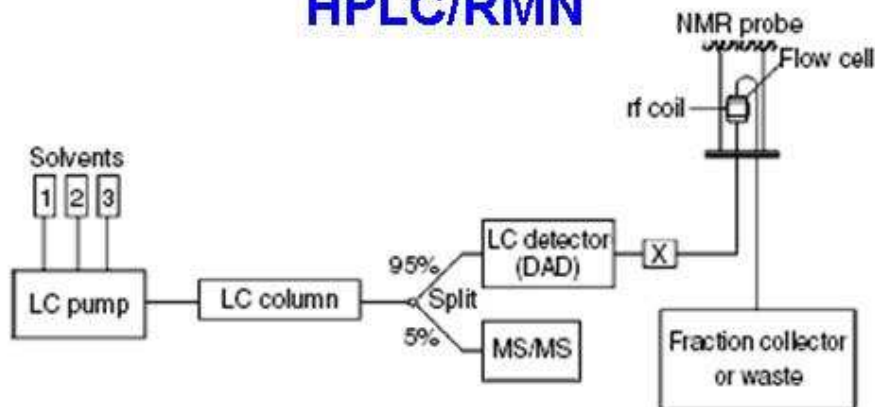


Analyses MS-ESI
 $m/z = 491$ M+Na
 $m/z = 431 \rightarrow$ perte fragment acétyle
 $M = 468$

UMR CNRS-UNSA 6005

LCMBA

Une alternative à l'isolement : le couplage HPLC/RMN

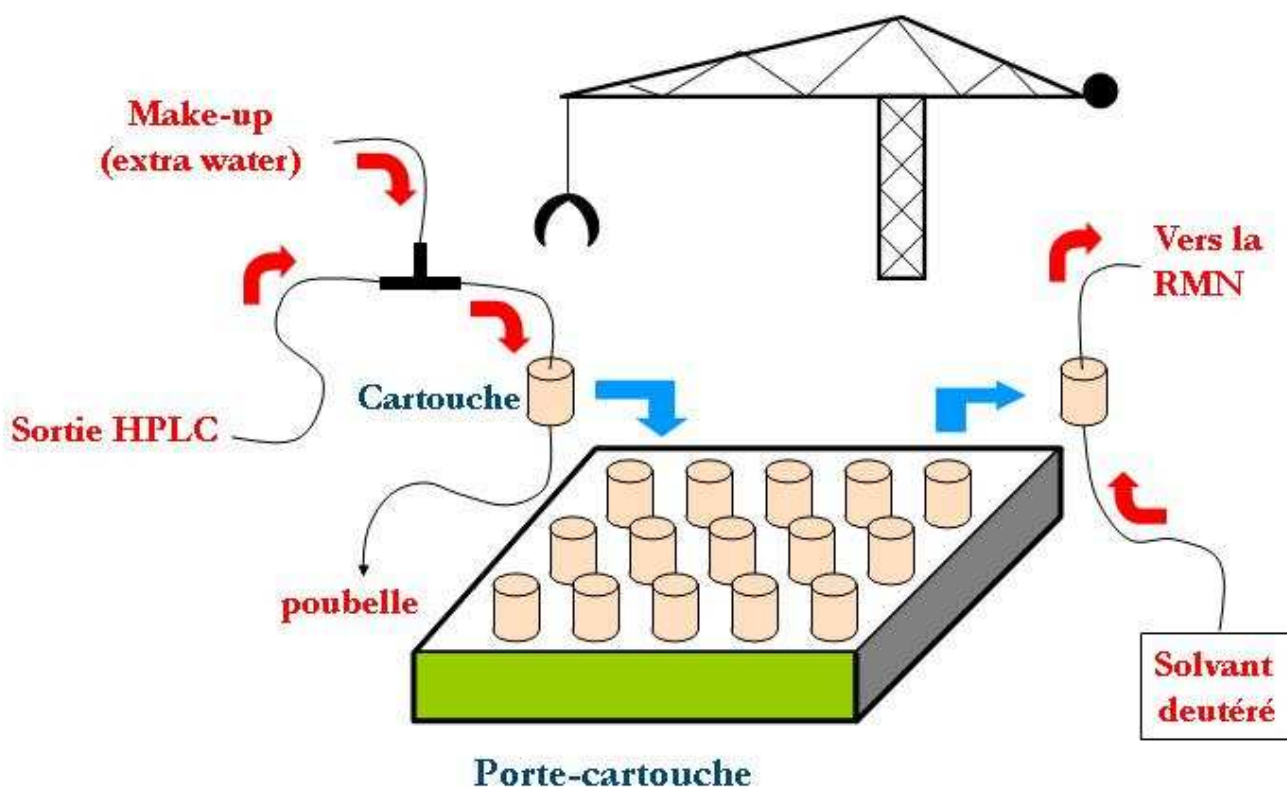


V. Exarchou, M. Krucker, T. A. van Beek, J. Vervoort, I. P. Gerothanassis, K. Albert, *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, 43, 681-687

UMR CNRS-UNSA 0005

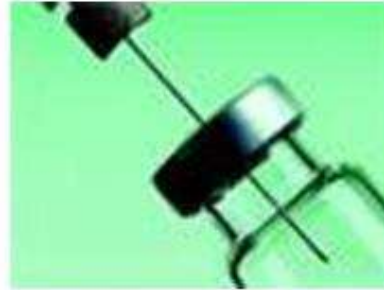
LCMBA

Principe du couplage HPLC/SPE/RMN



Espace de tête Statique

- HS-Statique : prélèvement d'une partie de l'espace de tête à l'aide d'une seringue à gaz ou d'une boucle d'injection



UMR CNRS-UNSA 6005

LCMBA

La SPME : microextraction en phase solide

- Extraction sans solvant
- automatisable
- peu d'investissement pour commencer
- améliore les limites de détection, nombreuses fibres
- réutilisation de la fibre jusqu'à 100 fois selon les conditions d'utilisation

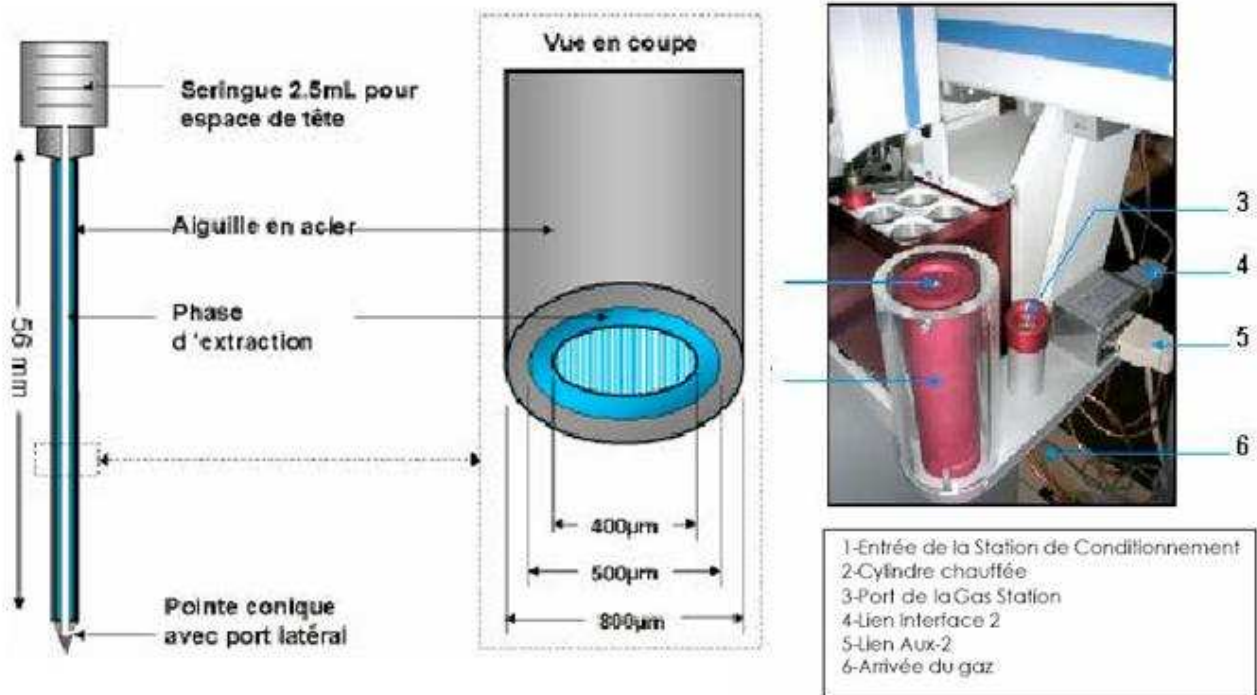


UMR CNRS-UNSA 6005

Généralités

LCMBA

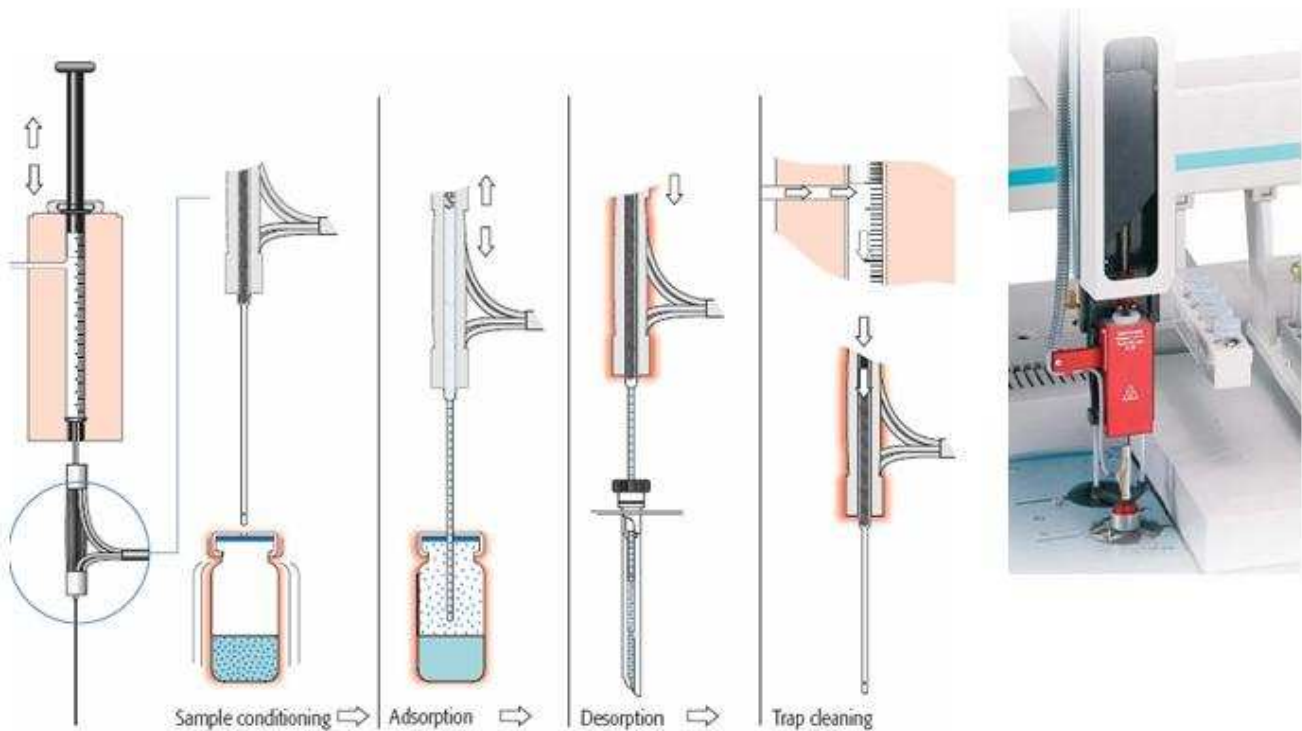
Solid Phase Dynamic Extraction (SPDE)



Solid Phase Dynamic Extraction (SPDE)

LCMBA

In-Tube EXtraction (ITEX) : Principe



In-Tube Extraction (ITEX)

LCMBA



Développement de méthodes de caractérisation et quantification rapides, automatisables et très sensibles



UMR CNRS-UNSA 6005

LCMBA

Avancées dans les techniques d'analyses des extraits

- **Extraits naturels : mélanges complexes**
 - ✓ Préparation de l'échantillon
 - ✓ Techniques chromatographiques
- **Chromatographie sur couche mince à Haute Performance (HPTLC)**
- **Chromatographie en phase gazeuse**
 - ✓ GC Rapide et Ultra-Rapide
 - ✓ GC à deux dimensions (GC-GC et GC×GC)
 - ✓ GC Masse exacte (GC/HRMS)
- **Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)**
 - ✓ Couplage HPLC/MS/MS
 - ✓ Couplage HPLC/HRMS

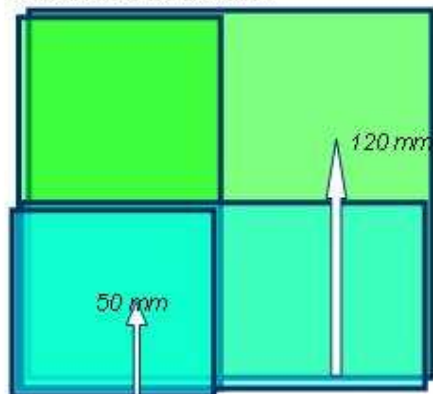
UMR CNRS-UNSA 6005

LCMBA

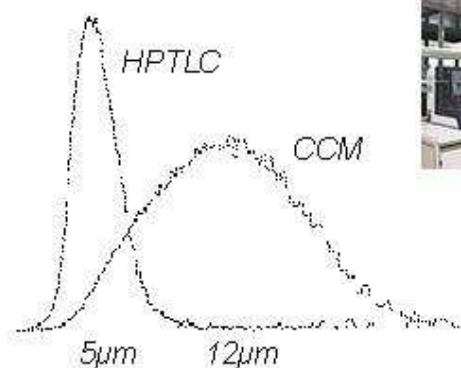


CCM / HPTLC : savoir évoluer

Taille des plaques et distances de migration optimales

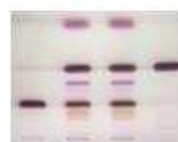


CCM 20x20 & 10x20
HPTLC 10x10 & 20x10



Répartition granulométrique

Lavendula officinalis



Comparaison

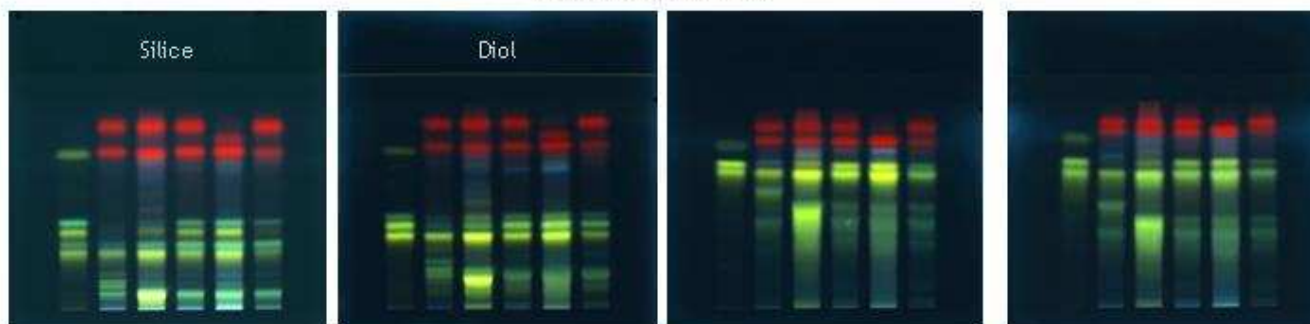


UMR CNRS-UNSA 6005

LCMBA

Phases greffées : exemple

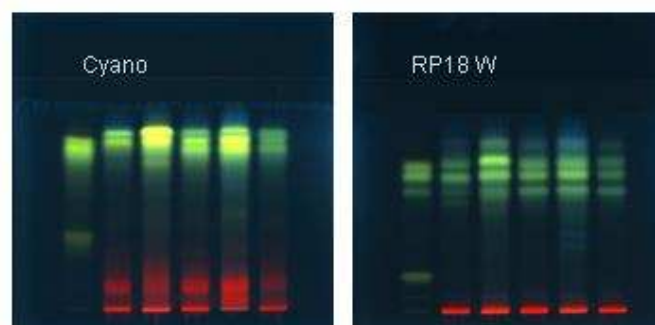
Phase normale



Solvants de migration : Normal = THF, toluène, acide formique, eau (24:12:3:1,5)

Inverse = méthanol, acide formique, eau (5.5:1:4.5).

Un témoin contenant : Vitexine, orientine, isovitexine, isoorientine, chryisine et 5 échantillons de Fleurs de la Passion



Phase inverse

UMR CNRS-UNSA 6005

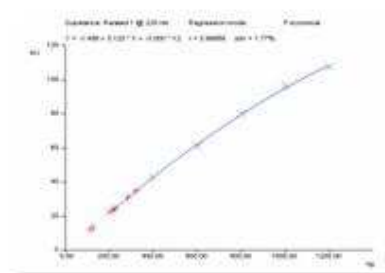
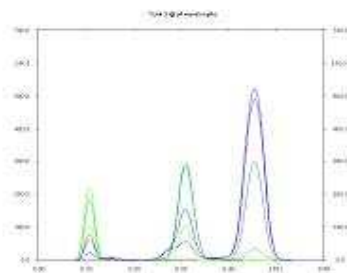
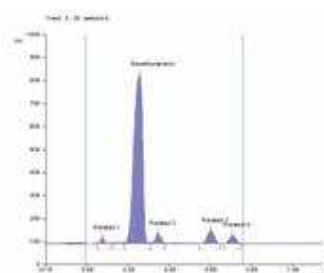
LCMBA

La révélation



➤ Mode le plus courant : densitométrie en absorbance UV (à partir de 190 nm), visible ou en fluorescence

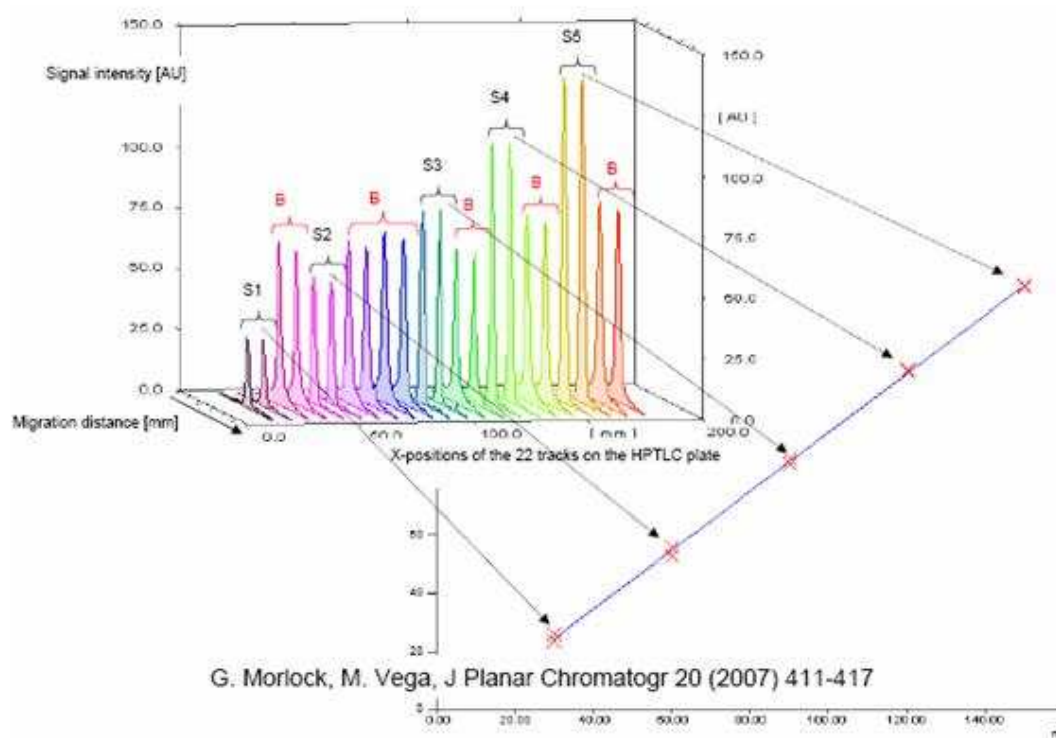
➤ Sensibilité : ~ 1 ng sur la plaque en absorbance et ~ 1 pg en fluorescence.



CCM, HPTLC

LCMBA

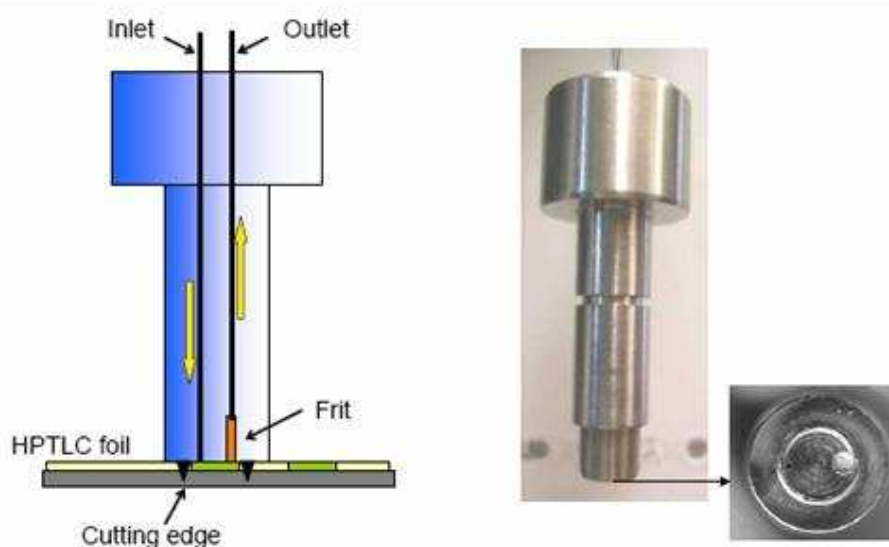
La quantification



CCM, HPTLC

LCMBA

Couplage HPTLC/MS



H. Luftmann, Anal Bioanal Chem 378 (2004) 964-968

A. Alpmann, G. Morlock, Anal Bioanal Chem 386 (2006) 1543-1551

CCM, HPTLC

LCMBA

UMR CNRS-UNSA 6005