

Analyse	Noms - Prénoms	2MC App
TP 8bis	Séparation des parabènes par HPLC	Date du Tp :

### **Objectifs du TP :**

Il s'agit d'une séance d'initiation à la technique de Chromatographie Liquide Haute Performance.

Le but est la prise en main d'une chaîne HPLC dans une optique d'analyse qualitative et quantitative d'un mélange de parabènes. Vous exploiterez les différents paramètres comme :

- ✓ l'effet du pourcentage d'eau de la phase mobile
- ✓ l'effet du type de solvants organiques de la phase mobile
- ✓ Les conséquences du mode de travail isocratique ou gradient

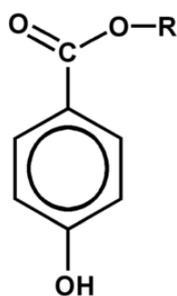
### **Les parabènes :**

Le terme de « parabènes » désigne un groupe de produits chimiques largement utilisé comme conservateurs dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique et alimentaire pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques.

On estime que plus de 80 % des produits de beauté en contiennent, notamment des shampoings, des crèmes hydratantes, des mousses à raser et des gels nettoyants.

Ce sont des esters de l'acide parahydroxybenzoïque, résultant de l'estérification de l'acide parahydroxybenzoïque avec un alcool.

La structure générale d'un parabène est donnée par la figure suivante :

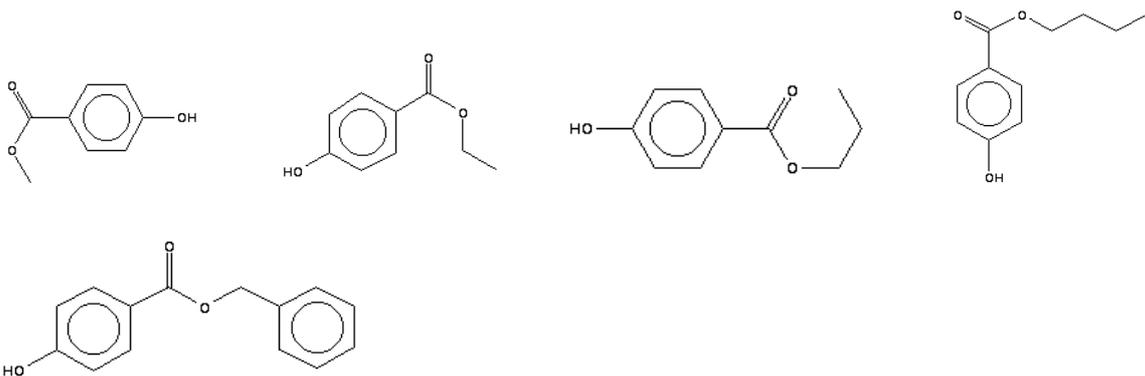


**Structure générale d'un parabène**

Analyse	Noms - Prénoms	2MC App
TP 8bis	Séparation des parabènes par HPLC	Date du Tp :

Bien que l'on parle souvent de parabène au singulier, en fait il existe différents composés dans cette famille qui diffèrent par la nature du groupe alkyle R. Les plus couramment utilisés sont :

- le méthylparabène, ou 4-hydroxybenzoate de méthyle (E218), et son sel de sodium (E219) ;
- l'éthylparabène, ou 4-hydroxybenzoate d'éthyle (E214), et son sel de sodium (E215) ;
- le propylparabène, ou 4-hydroxybenzoate de propyle (E216), et son sel de sodium (E217) ;
- l'isopropylparabène ;
- le butylparabène ; l'isobutylparabène ;
- le benzylparabène.



#### **structure chimique du méthylparabène, de l'éthylparabène, du propylparabène, du butylparabène et du benzylparabène**

Les parabènes se trouvent aussi à l'état naturel dans certains aliments tels que la mûre, l'orge, la fraise, le cassis, la vanille, la carotte ou l'oignon. Le propylparabène, par exemple, existe dans de nombreuses plantes et chez quelques insectes.

On les trouve aussi dans le corps humain comme précurseur du coenzyme Q10 où ils sont rapidement absorbés, métabolisés et excrétés.

#### **Utilisation des parabènes :**

Leur utilisation principale est donc liée à leur activité effective antibactérienne et antimycosique.

Analyse	Noms - Prénoms	2MC App
TP 8bis	Séparation des parabènes par HPLC	Date du Tp :

Les parabènes les plus rencontrés sont le méthylparabène et le propylparabène dont les propriétés de grande solubilité et d'effet synergique compensent une activité antimicrobienne moins importante que celle produite par les parabènes de plus longues chaînes carbonées. Par exemple, on rajoute du méthylparabène dans les anesthésiques locaux pour limiter la contamination<sup>1</sup>. A l'état pur, le méthylparabène est incolore, insensible au chaud et au froid. En solution, il est stable dans un milieu acide (pH entre 3 et 6) et hydrolysé facilement dans un environnement alcalin. Le propylparabène présente les mêmes caractéristiques. Enfin, le méthylparabène, à l'état solide (sous forme de poudre) est aussi utilisé comme plastifiant pour certains médicaments à cause de ses propriétés semi-conductrices.

### **Toxicité :**

Les parabènes sont des conservateurs très controversés. Pourtant, à l'origine, ils sont apparus pour remplacer d'autres conservateurs, les formaldéhydes, jugés alors dangereux et dont l'usage dorénavant est limité à certains vernis à ongles.

Leur emploi dans les produits de beauté a soulevé une vive polémique depuis qu'une étude britannique, parue en 2004, les a accusés de provoquer des cancers du sein.

D'autres études les soupçonnent d'être néfastes à la fertilité masculine.

Cependant, des recherches sont toujours en cours pour déterminer un risque avéré dans l'utilisation médicamenteuse des parabènes et des seuils de toxicité. Aucune disposition réglementaire n'existe donc à l'heure actuelle.

En l'absence de confirmations des risques, l'AFSSAPS (Agence française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) a déclaré le 29 septembre 2005, que « la commission de cosmétologie s'est prononcée favorablement à la poursuite de l'utilisation, aux conditions prévues par la réglementation actuelle, de quatre à cinq des cinq parabènes les plus couramment utilisés (méthyl, éthyl, propyl, et butyl parabènes) ».

*Remarques :* face à l'inquiétude des consommateurs, la mention « sans parabène » apparaît sur les emballages et devient un véritable argument de vente. L'utilisation de ces produits est notamment interdite dans les cosmétiques biologiques où ils sont remplacés par des méthodes de conservation naturelles (les huiles essentielles, par exemple).

---

<sup>1</sup> Ces conservateurs ne remplacent absolument pas les techniques de stérilisation mais aident seulement à diminuer la charge microbiologique.

Analyse	Noms - Prénoms	2MC App
TP 8bis	Séparation des parabènes par HPLC	Date du Tp :

**Activité 1 : Importance du pourcentage de l'eau de la phase mobile dans la séparation d'un mélange de parabènes.**

**1<sup>ère</sup> étape :**

Cette première activité a pour but de démontrer, en utilisant la même colonne, l'importance du rôle du pourcentage d'eau dans un mélange eau/méthanol sur la qualité de la séparation d'un mélange de cinq parabènes de faible concentration (chaque parabène ayant une concentration massique de 2 mg.L<sup>-1</sup>).

- 1) Mise en place de la colonne Waters Symmetrie 4,6 x 150 mm C18, 5µm, et du vial (ne pas oublier de repérer l'emplacement !!)
- 2) Création de la méthode :
  - a. mode Isocratique
  - b. phase mobile : 40/60 H<sub>2</sub>O/MeOH pendant 15 min
  - c. Débit à 1 mL/min
  - d. injection de volume : 20 µL
  - e. longueur d'onde de travail : 254 nm
- 3) Relevé la pression en début de colonne, Obtention du chromatogramme.
- 4) Impression.

**2<sup>ème</sup> étape :**

- 1) Création de la méthode :
  - a. mode Isocratique
  - b. phase mobile : 50/50 H<sub>2</sub>O/MeOH pendant 40 min
  - c. Débit à 1 mL/min
  - d. injection de volume : 20 µL
  - e. longueur d'onde de travail : 254 nm
- 2) Relevé la pression en début de colonne, Obtention du chromatogramme.
- 3) Impression

Analyse	Noms - Prénoms	2MC App
TP 8bis	Séparation des parabènes par HPLC	Date du Tp :

### **Activité 2 : Choix du solvant**

Ce second thème a pour but de montrer, en utilisant la même colonne, l'importance de la nature du solvant organique utilisé sur la qualité de la séparation du mélange de 5 parabènes de faible concentration (chaque parabène ayant une concentration massique de 2 mg.L<sup>-1</sup>). Cette étude est basée sur les propriétés physico-chimiques de trois solvants utilisés classiquement en HPLC.

- 1) Création de la méthode :
  - a. mode Isocratique
  - b. phase mobile : 50/50 H<sub>2</sub>O/ACN pendant 10 min
  - c. Débit à 1 mL/min
  - d. injection de volume : 20 µL
  - e. longueur d'onde de travail : 254 nm
  
- 2) Relevé la pression en début de colonne, Obtention du chromatogramme.
  
- 3) Impression

### **Activité 3 : Utilisation d'un gradient**

Nous allons maintenant aborder le dernier thème de notre séance : l'influence du mode de travail choisi pour réaliser la séparation du mélange de cinq parabènes. Toutes les analyses précédentes ont été obtenues dans des conditions dites isocratiques. Nous allons, puisque la chaîne le permet, travailler en mode gradient.

- 1) Création de la méthode :
  - a. mode gradient linéaire
  - b. phase mobile : H<sub>2</sub>O 50 → 40 /MeOH 50 → 60 pendant 24 min
  - c. Débit à 1 mL/min
  - d. injection de volume : 20 µL
  - e. longueur d'onde de travail : 254 nm
  
- 2) Relevé la pression en début de colonne, Obtention du chromatogramme.
  
- 3) Impression

Analyse	Noms - Prénoms	2MC App
TP 8bis	Séparation des parabènes par HPLC	Date du Tp :

Compte rendu :

	temps de rétention (min)					
% eau	MetPHB	EtPHB	PropylPHB	ButPHB	BenzPHB	% solvant
40						60
50						50

Quel est l'impact du pourcentage d'eau dans la phase mobile sur les temps de rétention des composés du mélange ? Étayer votre affirmation en traçant sous Regressi, sur la même feuille, les graphes  $t_R = f(\%eau)$ .

Analyse	Noms - Prénoms	2MC App
TP 8bis	Séparation des parabènes par HPLC	Date du Tp :

Conclure sur l'ordre d'élution des parabènes, sur la séparation effective ou pas, et sur la durée de l'analyse.

Quel est le chromatogramme fournissant le meilleur compromis ?

Analyse	Noms - Prénoms	2MC App
TP 8bis	Séparation des parabènes par HPLC	Date du Tp :

	temps de rétention (min)					
solvants	MetPHB	EtPHB	PropylPHB	ButPHB	BenzPHB	solvants
Méthanol (50 %)						Eau (50 %)
Acétonitrile (50 %)						Eau (50 %)

Est-ce que les temps de rétention des 5 parabènes suivent le même ordre de sortie que l'ordre des coefficients de polarité des 2 solvants organiques testés ?

Comparer la viscosité des solvants utilisés avec la pression relevée en tête de colonne. Est-ce conforme avec la loi de variation de Darcy ?

Conclure sur l'importance de la polarité, de la viscosité des solvants. Conclure sur l'élution des parabènes (séparation effective ou pas, durée de l'analyse).

Analyse	Noms - Prénoms	2MC App
TP 8bis	Séparation des parabènes par HPLC	Date du Tp :

Comparer les chromatogrammes, chromatogramme obtenu en 50/50 H<sub>2</sub>O/MeOH en mode isocratique et ceux obtenus en mode gradient linéaire.

Conclure, en indiquant quels sont les avantages et les inconvénients de ce mode de travail ?

Analyse	Noms - Prénoms	2MC App
TP 8bis	Séparation des parabènes par HPLC	Date du Tp :

## Propriétés PHYSICO-CHIMIQUES de quelques solvants

solvant	masse molaire (g)	polarité E° Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	viscosité (cP <sup>20</sup> )	"cut-off" UV* (nm)
<b>EAU</b> <i>solvant le plus polaire</i>	<b>18</b>	<b>&gt;&gt; 1,1</b>	<b>1,00</b>	<b>---</b>
méthanol	32	0,95	0,60	210
ethanol	46	0,88	1,20	210
acétonitrile	41	0,65	0,37	210
diméthyl sulfoxyde	78	0,62	2,24	---
dioxane	88	0,56	1,54	220
tétrahydrofurane	72	0,45	---	220
butanol - 1	74	---	2,98	---
chloroforme	119	0,40	0,57	245
éthyl éther	74	0,38	0,23	220
iso - propyl - éther	102	0,28	0,37	220
tétrachlorure de carbone	154	0,18	0,97	265
cyclohexane	84	0,04	1,00	210
isooctane	114	0,01	---	210
n - pentane	72	0,00	0,23	210

\*Le "cut-off" est la longueur d'onde à partir de laquelle l'absorbance du solvant est telle que l'on ne peut plus l'utiliser (voir figure).

Si la différence des miscibilités est supérieure à 14, les deux solvants concernés ne sont pas miscibles.  
1 cPo = 10<sup>-3</sup> Pa.s.

### La loi de Darcy

La Chromatographie Liquide Haute Performance faisant appel à de nombreuses notions physico-chimiques, comme la pression, le diamètre des particules du support, il est important ici de rappeler la loi de Darcy qui relie tous ces éléments entre eux selon l'équation suivante :

$$P = \frac{32 \cdot \eta \cdot L \cdot D_{flux}}{d_c^2 \cdot d_p^2}$$

Avec P la différence de pression ou perte de charge dans la colonne,  
 $\eta$  la viscosité de la phase mobile, L la longueur de la colonne, D<sub>flux</sub> le débit de la phase mobile, d<sub>c</sub> le diamètre de la colonne et d<sub>p</sub> le diamètre des particules.