

Méthode

Version 2

Statut: En vigueur

En vigueur au 11/06/2021

Prochaine date de revue au 11/06/2023

6.2.1-Réalisation de l'essai

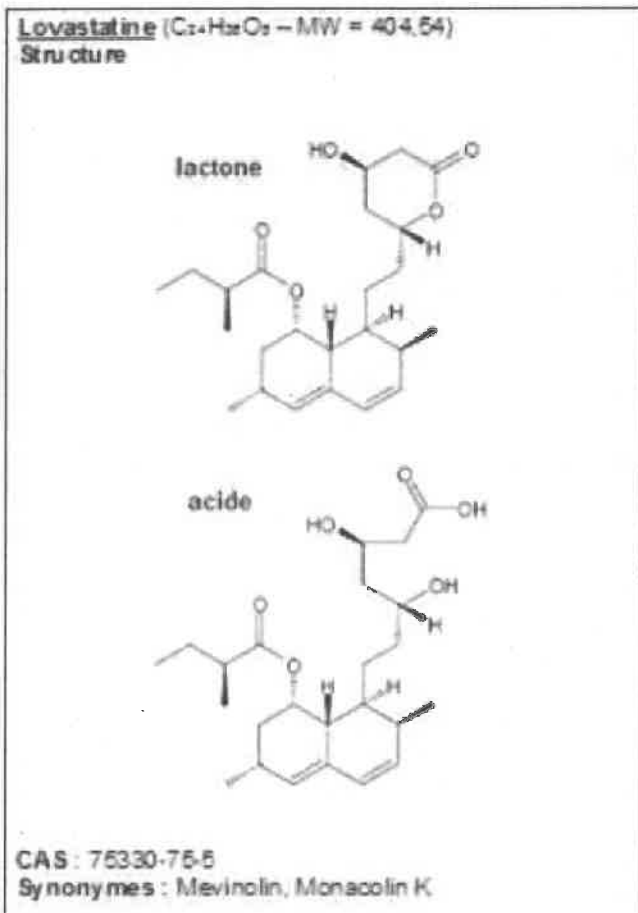
Dosage de la lovastatine par CLHP - D15

Objet

La présente prescription technique décrit le mode opératoire à appliquer pour déterminer par chromatographie en phase liquide les teneurs en lovastatine des aliments du type riz rouge fermenté.

Les analytes extraits de la levure de riz rouge à l'aide d'éthanol absolu sont séparés en phase inverse isocratique. La lovastatine est détectée par absorption à 238 nm.

La quantification est effectuée par étalonnage externe.



1. Domaine d'application

La méthode décrite ci-dessous a été développée pour le dosage de la lovastatine dans des matrices alimentaires, du type riz rouge fermenté. On ne connaît pas ses performances pour d'autres applications.

2. Ressources nécessaires à la méthode

2.1 Consommables - Réactifs

- @ Lovastatine (Mevinolin from *Aspergillus niger*) - code labo 10918 ou équivalent
- Ethanol absolu - code labo 16 ou équivalent
- Acétonitrile (CLHP) - code labo 240 ou équivalent
- Acide trifluoroacétique - code labo 3312 ou équivalent
- Méthanol - code labo 21 ou équivalent

2.2 Consommables

Petit matériel de laboratoire à usage unique.

2.3 Consommables - Fournitures de laboratoire

@ colonne CLHP et précolonne adaptés à la séparation effectuée dans cette prescription technique

Petit matériel réutilisable de laboratoire.

2.4 Matériels

@ Appareil de chromatographie liquide haute performance possédant un détecteur UV-visible.

@ Balance de précision (au milligramme près)

@ Bain thermostatique réglé à 60°C

Cuve à ultrasons

3. Santé, sécurité et environnement

Toutes les manipulations ou analyses doivent s'effectuer conformément à la PRE.PRO.4 « Les règles de bonne conduite en matière de santé, sécurité et environnement dans les lieux de travail au SCL »

Tous les déchets doivent être gérés conformément à la PRE.PRO.27 « Gestion des déchets ».

EPI : gants, lunettes.

EPC : hotte ventilée.

4. Précautions spécifiques

Les solutions étalons et les solutions préparées au cours de l'analyse doivent être conservées suivant les instructions données dans le paragraphe 2-1 ou dans le mode opératoire. Pour les autres réactifs utilisés, des informations relatives à leur stockage sont données dans DIR.PRO.116 "Organisation du domaine scientifique - D15".

Sauf conditions de stockage particulières nécessaires à leur conservation, les matériaux de référence utilisés pour le suivi analytique de la méthode (carte de contrôle) doivent être conservés à température ambiante et à l'abri de la lumière directe.

5. Mode opératoire

- **Etalonnage**

- solutions mère de Lovastatine :

dissoudre 50 mg de lovastatine dans 10 mL de méthanol. Cette solution mère est à environ 5000 µg/mL.

Cette solution peut se conserver 1 semaine au congélateur.

- Gamme d'étalonnage

La préparation de la gamme d'étalonnage s'effectue selon le tableau suivant :

Étalon	Préparation, dans de l'éthanol	Lovastatine µg/mL
1	0,5 mL de la SM de lovastatine dans une fiole de 10 mL	250
2	0,5 mL de la SM de lovastatine dans une fiole de 20 mL	125
3	1 mL de la solution 2 dans une fiole de 10 mL	12,5
4	1 mL de la solution 3 dans une fiole de 10 mL	1,25
5	1 mL de la solution 4 dans une fiole de 5 mL	0,25

- **Conditions chromatographiques**

- *Colonne* : colonne Waters Xterra MS C18 (réf. 186000494) - Granulométrie : 5 µm - Longueur : 250 mm - Diamètre intérieur : 4,6 mm ou équivalent + Pré-colonne Waters Xterra MS C18 (réf. 186000660) - Granulométrie : 5 µm - Longueur 20 mm - Diamètre intérieur : 3,9 mm

(Colonne Purospher non adaptée)

Référence

- *Phase mobile* : Acétonitrile – eau – acide trifluoroacétique (55 + 45 + 0,05, v/v)

mélanger 550 mL d'acétonitrile avec 450 mL d'eau UHQ puis ajouter 500 µL d'acide trifluoroacétique.

Le mélange est filtré sur membrane de cellulose régénérée afin de dégazer. Travailler de préférence en circuit ouvert.

- *Paramètres* :

Débit : 1 mL/min

Volume d'injection : 30 µl

Détection : UV 238 nm

• Protocole d'extraction

Introduire 1 g d'échantillon préalablement broyé et homogénéisé, pesé au mg près (PE – masse exprimée en g) dans un flacon bouché à vis.

Ajouter 5 mL d'éthanol absolu. Agiter pour disperser la poudre dans le solvant. Porter au bain marie à 60 °C durant 30 minutes.

Retirer la flacon du bain. Agiter à la main pour homogénéiser le milieu. Laisser décanter le temps de sédimenter la plus grande partie de la poudre.

Diluer si besoin dans de l'éthanol absolu puis transférer une partie du surnageant dans un flacon pour injecteur CLHP en le filtrant sur une membrane de cellulose régénérée de 0,2 µm.

6. Critères d'approbation des résultats

L'identification des pics de lovastatine dans les échantillons se fait par comparaison avec les temps de rétention des substances étalons préalablement injectés. La lovastatine peut se présenter sous une forme acide ou une forme lactone. Les spectres UV de ces deux substances sont similaires.

Le temps de rétention relatif de la lovastatine acide par rapport à la lovastatine lactone est de 0,65. On peut préparer un étalon qualitatif de la forme acide en dissolvant 50 mg de l'étalon lactone dans 50 mL de méthanol à 0,1 N de NaOH. La réaction est assez longue, compter plusieurs heures. Diluer cette solution au 1/10 dans l'éthanol absolu avant de l'injecter.

La série analytique est validée si l'étalonnage du jour est correct (vérification des A/C) et si les critères d'acceptation définis pour la carte de contrôle par ANA.PRO.23 sont remplis.

7. Expression des résultats

Le pic de lovastatine acide est quantifié avec l'étalonnage de la forme lactone en multipliant par un facteur correctif de 1,05 pour convertir la forme acide en forme lactone.

Les formes acides et lactones sont sommées.

Référence

Les concentrations des extraits injectés sont calculées par étalonnage externe en comparant les surfaces mesurées, avec celles obtenues pour la gamme d'étalonnage.

$$T.I = \frac{C.I \times V \times Dil \times 100}{PE \times 1000}$$

Avec :

T.I = teneur en Lovastatine, en mg/100g

C.I = concentration mesurée en Lovastatine, en $\mu\text{g/mL}$

V = volume d'éthanol utilisé pour l'extraction, en mL (5 mL en général)

Dil = facteur de dilution éventuel

PE = prise d'essai, en g.

100 = facteur pour ramener pour 100g.

1000 = facteur de conversion des unités (μg en mg)

Les résultats obtenus sont exprimés par rapport à 100 g d'échantillon à partir des concentrations mesurées dans l'extrait, avec au maximum 3 chiffres significatifs et au plus 1 décimale.
