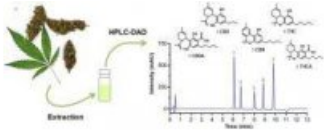
https://ww2.ac-poitiers.fr/biochimie/spip.php?article481 - Auteurs : Jules Guittard - Wilfrid Grossin



Dosage du CBD d'huiles commerciales et d'extraits de chanvre par méthode chromatographique.

publié le 02/08/2022 - mis à jour le 07/11/2023

Descriptif :

Cet article décrit une activité technologique qui propose d'extraire le CBD d'une feuille de Chanvre et d'une huile commerciale puis la quantification de ce cannabinoïde issu de ces extractions par chromatographie HPLC quantitative.

De nombreux cannabinoïdes sont présents dans le chanvre (Cannabis sativa) et peuvent en être extrait pour la réalisation de différents produits comme des huiles relaxantes, des infusions ou encore des confiseries.
Parmi ces cannabinoïdes, on trouve :

- Le cannabidiol (CBD) auquel on attribue des vertus relaxantes, antioxydantes et anti-inflammatoire sans effet psychoactif. Ce CBD est en vente libre en France. Il est légal.
- Le tétrahydrocannabinol (THC) utiliser pour la fabrication de produits stupéfiants comme de la résine de cannabis. Le THC est lui interdit à la vente libre.
- Le cannabinol (CBN) présente un effet légèrement psychotrope mais beaucoup que le THC. Il provient de l'oxydation du THC et se développe lorsque, celui-ci est exposé aux rayons UV ou à l'oxygène. On lui attribue à ce CBN un léger pouvoir analgésique.
- Le cannabigerol (CBG) et le cannabichromene (CBC), présents aussi dans la fleur de chanvre, possèderaient, quant à eux, des effets antibactériens, analgésique ou encore anticoagulant.

Dans le cadre d'une activité technologique de niveau BTS, on se propose de quantifier par méthode chromatographique, le CBD présent dans différents produits du commerce vendus comme contenant du CBD.

- Une huile de CBD à 10%.
- Des fleurs séchées de chanvre avec une quantité de CBD estimée à 5% d'après le commerçant.

Pour être quantifier en chromatographie (Chromatographie de partage HPLC). Les produits contenants du CBD doivent être traités au préalable pour en extraire ce CBD. Cette extraction aboutie à l'obtention de solutions de CBD prêtes pour l'injection.

Dans cet article, différents documents sont mis à disposition pour réaliser ces extractions et ces quantifications.

- Fiche protocole 1 : Extraction des cannabinoïdes (du CBD) de la fleur de Chanvre = $CBD_{Chanvre}$
- Fiche protocole 2 : Préparation d'une solution de CBD à partir d'une huile de chanvre = $CBD_{commercial}$
- Fiche protocole 3 : Analyse quantitative de solutions de CBD par HPLC-
- Exemples de résultats-

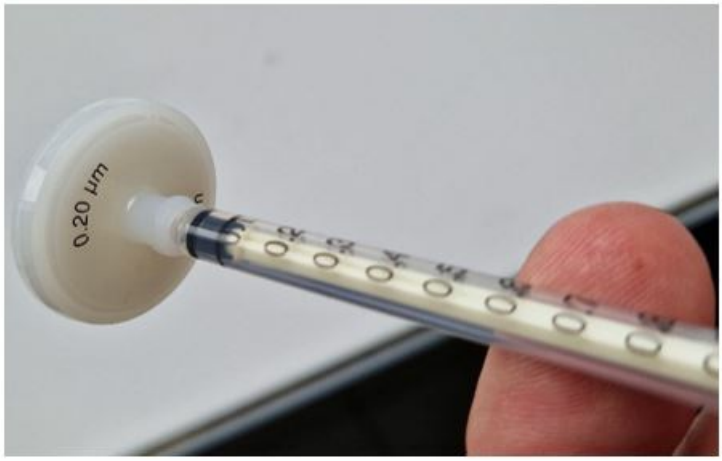
Fiche protocole 1 : Extraction des cannabinoïdes (du CBD) de la fleur de Chanvre = $CBD_{Chanvre}$

L'échantillon de bourgeon de chanvre doit être broyé en petites particules homogènes pour garantir l'extraction du maximum de cannabinoïdes.

- Pesez avec précision 0,200 ± 0,005 g d'échantillon broyé dans un tube à centrifuger
- Rajouter 8 ml d'éthanol dans un tube et vortexer pendant 1 min,

- Placer le tube sur un agitateur horizontal pendant 30 min.
- Centrifuger l'échantillon à 4000 tr/min pendant 5 min pour granuler le matériel végétal.
- Verser le surnageant dans une fiole jaugée de 20 ml recouverte d'aluminium.
- Garder le culot pour la deuxième extraction.
- Effectuer une deuxième extraction comme précédemment sur le culot obtenu.
  —> Rajouter 8 ml d'éthanol dans un tube et vortexer pendant 1 min,
  —> Placer le tube sur un agitateur horizontal pendant 30 min.
  —> Centrifuger l'échantillon à 4000 tr/min pendant 5 min pour granuler le matériel végétal.
- Verser le nouveau surnageant obtenu dans la fiole jaugée de 20 ml contenant déjà le contenu de la première extraction.
- Compléter la fiole avec de d'éthanol jusqu'au trait de jauge et bien mélanger.
- Filtrer l'échantillon dans un flacon adapté à l'aide d'une seringue montée d'un filtre PTFE de 0,2 µm.
- Conserver dans le flacon bouché, le filtrat obtenu = $CBD_{Chanvre}$

Si l'échantillon donne un signal trop important, effectuer la dilution suivante
Réaliser une dilution de 1/10ème de l'échantillon avec de l'éthanol.
Conserver dans des tubes bouchés les solutions obtenues = $CBD_{Chanvre\ 1/10}$



Seringue avec un filtre PTFE de 0,2 µm

Fiche protocole 2 : Préparation d'une solution de CBD à partir d'une huile de chanvre = $CBD_{commercial}$

Première partie : Préparation d'échantillon d'huile de chanvre

- Introduire 400 µL d'isopropanol dans un tube à hémolyse en verre.
- Ajouter 10 µL d'échantillon d'huile de chanvre par pipetage inverse.
- Boucher le tube.
- Agiter pendant au moins 30 secondes pour dissoudre complètement l'huile dans isopropanol.
- Ajouter 400 µL de méthanol au mélange.
- Boucher et agiter de nouveau pendant 30 secondes.
- Filtrer le mélange à travers une seringue avec un filtre PTFE de 0,2 µm dans un flacon HPLC.
- Conserver dans un tube bouché le filtrat obtenu.

Deuxième partie : Préparation d'échantillon d'huile de chanvre pour analyse quantitative HPLC

- Introduire 800 µL de méthanol dans un tube à hémolyse en verre.
- Ajouter 200 µL du filtrat obtenu dans la partie 1.
- Boucher et agiter pendant 30 secondes.
  (Remarque : facteur de dilution total 405X (partie 1 + partie 2)).
- Conserver dans un tube bouché la solution obtenue = $CBD_{commercial}$

Remarque : Le méthanol sera utilisé sur un poste spécifique

Fiche protocole 3 : Analyse quantitative de solutions de CBD par HPLC

Matériels

Unité HPLC : VANQUISH CORE Thermo

- Colonne : phase inverse RP 18 [Ø= 4,6mm, L=150 mm] ;
- Boucle d'injection : 20 µL.
- Détecteur : spectrophotomètre UV

Solutions et réactifs

- Phase mobile : mélange Acétonitrile/eau 80/20
- Échantillon : solutions de CBD (ou autres solutions contenant des cannabinoïdes)

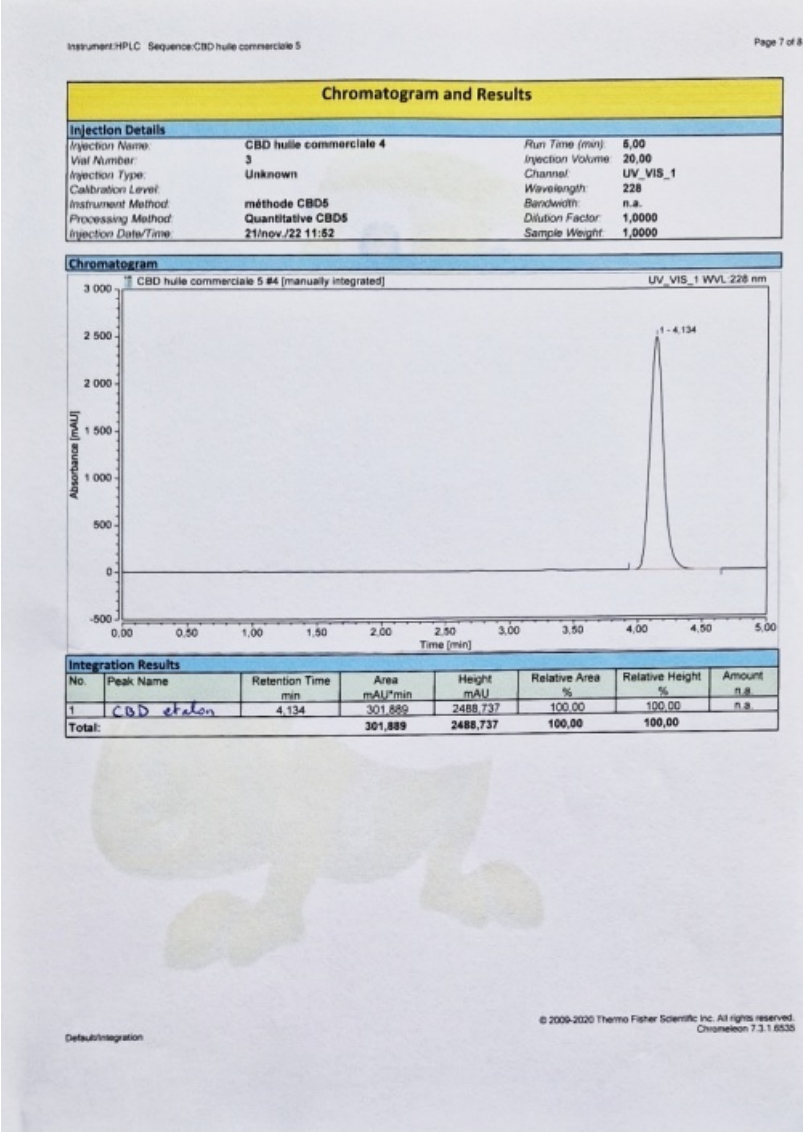
Technique

- Programmer l'unité d'HPLC
  1. Vérifier l'état de fonctionnement de l'unité d'HPLC
  2. Charger la méthode « CBD »
  3. Vérifier les paramètres de la méthode
  —> Débit 1,5 mL/min.
  —> Longueur d'onde : 228 nm.
  —> Durée 9 minutes
  4. Rajouter les injections à faire dans la séquence CBD (Voir tutoriel)

- Réalisation de la chromatographie
  1. Injecter tour à tour les différentes solutions de CBD (ou solutions contenant des cannabinoïdes) à analyser.
  2. Traiter les acquisitions sur chroméléon.
  3. Imprimer les résultats.

Exemples de résultats

Profils chromatographiques obtenus avec VANQUISH CORE Thermo piloté par le logiciel Chroméléon 7



Instrument:HPLC Sequence:CBD huile commerciale 5 Page 7 of 8

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	**CBD huile commerciale 4**	*Run Time (min):*	**5,00**
Vial Number:	**3**	*Injection Volume:*	**20,00**
Injection Type:	**Unknown**	*Channel:*	**UV_VIS_1**
Calibration Level:		*Wavelength:*	**228**
Instrument Method:	**méthode CBD5**	*Bandwidth:*	**n.a.**
Processing Method:	**Quantitative CBD5**	*Dilution Factor:*	**1,0000**
Injection Date/Time:	**21/nov./22 11:52**	*Sample Weight:*	**1,0000**

Chromatogram

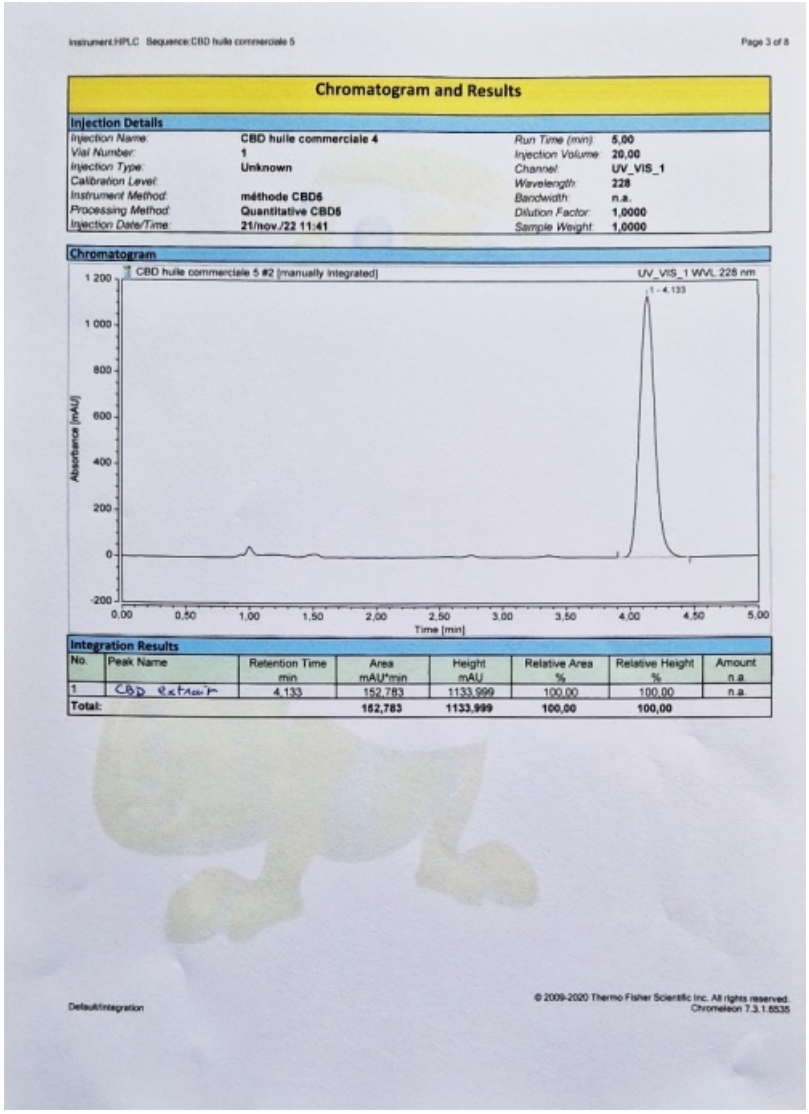
Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1	CBD étalon	4,134	301,889	2488,737	100,00	100,00	n.a.
Total:			**301,889**	**2488,737**	**100,00**	**100,00**	

© 2009-2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
Chromeleon 7.3.1.6535

Default/Integration

Figure 1 : Profil CBD étalon Sigma



Instrument:HPLC Sequence:CBD huile commerciale 5 Page 3 of 8

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CBD huile commerciale 4	Run Time (min):	5,00
Vial Number:	1	Injection Volume:	20,00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	228
Instrument Method:	méthode CBD6	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	Quantitative CBD6	Dilution Factor:	1,0000
Injection Date/Time:	21/nov./22 11:41	Sample Weight:	1,0000

Chromatogram

Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1	CBD extrait	4,133	152,783	1133,999	100,00	100,00	n.a.
Total:			**152,783**	**1133,999**	**100,00**	**100,00**	

DefaultIntegration

© 2009-2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
Chromeleon 7.3.1.8535

Figure 2 : Profil CBD extrait huile

Tableau des résultats

Sample	Tr (min) CBD	Aire UA	Tr (min) CBN	Masse pesée en g	Facteur de dilution	Concentration dans solution injectée g/L	Taux extrait en %	masse en mg/flacon	IR%
CBD étalon Sigma 0,5 g/L	4,133	301,889							
CBN sigma 0,01 g/L			7,644						
CBD extrait huile	4,134	152,783	-		405	102,4832223		1025	
CBD Isolat (5g/L)	4,138	299,871			10	4,966577119			0,67%
CBD extrait Feuille	4,135	118,359	-	0,2040	1	0,19603066	1,92%		

Une injection d'un étalon CBN est réalisée pour vérifier la spécificité du Tr du CBD.
Une injection d'un extrait d'isolat de CBD (CBD pur à 99,99%) est aussi réalisée pour calculer l'inexactitude relative.

Exemples de calculs : Calcul de la masse de CBD dans l'huile de commerciale

Calcul de la masse de CBD de l'huile commerciale (indication 1000 mg par flacon de 10 mL)

$$Concentration\ en\ CBD_{huile\ commerciale} = \frac{152.783}{301.889} \times 0{,}50 \times 405 = 102{,}48\ g.L^{-1}$$

Soit masse dans le flacon de 10 mL : 1025 ± 51 mg

Quelques rappels théoriques sous forme de documents :

Document 1 : Technique calculatoire pour l'ACQ

Principe général de l'analyse quantitative chromatographique :

L'analyse quantitative repose sur le fait que la surface du pic chromatographique (aire) d'une substance éluée est proportionnelle à la masse de substance x injectée dans l'échantillon et ayant donc traversé le détecteur.

On a alors : $\mathbf{m_x = k_x A_x}$

Avec :
$\mathbf{A_x}$ = aire du pic, m_x : masse du composé injectée.
$\mathbf{k_x}$ = coefficient de réponse absolu du détecteur

Dans la pratique, on injecte les composés en solution et on préfère utiliser les concentrations plutôt que les masses.
Il y a proportionnalité entre la masse injectée et la concentration du soluté, à condition de toujours injecter le même volume de solution.

On a : $\mathbf{m_x = \rho_x \times V_x = k_x A_x}$

L'aire des pics est déterminée par intégration automatique.

Pour les solutions de CBD analysées dans cette activité :

On mesure les aires des pics obtenus par HPLC des différentes extractions des produits contenant du CBD et les comparer à celle du même pic de la solution de CBD étalon.
L'aire obtenue est proportionnelle à la concentration de cannabidiol présente dans l'échantillon (huile commerciale ou fleurs de chanvre).

On donne :

$$Concentration\ en\ CBD_{échantillon} = \frac{Aire_{échantillon}}{Aire_{étalon}} \times Concentration\ en\ CBD_{étalon} \times Fd$$

$$Fd = Facteur\ de\ dilution\ de\ l'échantillon$$

Document 2 : Informations relatives sur la préparation de la solution d'isolat et rappel sur le calcul de l'inexactitude relative.

L'**isolat de CBD** est issu d'une extraction de CBD sous forme de cristaux, c'est à dire un CBD isolé de tous les autres cannabinoïdes. Cet isolat de CBD est à plus de 99,5% pur. L'isolat de CBD permet la réalisation de solutions pures en cannabidiol. Il est légal en France car il ne contient pas de THC.

Dans cette activité, la solution d'isolat fournie a été préparé selon le protocole suivant :

- Peser 0,022g d'isolat de Cannabidiol et les dissoudre dans 4,4 mL de méthanol
- Réaliser une dilution au 1/10ème dans le méthanol de cette solution.
- La solution est prête pour l'injection HPLC (= $\mathbf{CBD_{isolat}}$)

Cette solution permet de contrôler l'inexactitude potentielle de résultats,

L'aire du pic de cette solution d'isolat de CBD au 1/10ème (= $\mathbf{CBD_{isolat}}$) est aussi comparée à celle de l'aire du pic du CBD de la solution étalon (= $\mathbf{CBD_{étalon}}$), permettant de déterminer sa concentration massique (même calcul que pour le $\mathbf{CBD_{commercial}}$ et le $\mathbf{CBD_{chanvre}}$)

L'inexactitude est déterminée en comparant la valeur de la concentration massique obtenue par chromatographie avec la concentration théorique connue par le protocole de réalisation de cette solution.

$$Inexactitude\ relative\ (IR) = \frac{|\rho_{expérimental} - \rho_{théorique}|}{\rho_{expérimental}} \times 100$$

Académie de Poitiers

Avertissement : ce document est la reprise au format pdf d'un article proposé sur l'espace pédagogique de l'académie de Poitiers.

Il ne peut en aucun cas être proposé au téléchargement ou à la consultation depuis un autre site.