

# HPTLC: vers la connaissance moléculaire d'extraits végétaux d'application cosmétique

Sylvie Darnault  
CCCM – 23 Octobre 2008 -  
Lyon



LVMH RECHERCHE  
PARFUMS & COSMETIQUES

# PLAN



- 1 – LE DEPARTEMENT INNOVATION ACTIFS ET LA PHYTOCHIMIE
- 2 - LA DIVERSITE POUR UN CHOIX DE MATIERES VEGETALES
- 3 - METHODOLOGIE PAR HPTLC
  - 3a - Phytochimie Globale
  - 3b - Phytochimie Approfondie
- 4 – APPLICATION A QUELQUES ACTIFS DEVELOPPES
- 5 – SUPPORT AU DEVELOPPEMENT
- 6 – IMPLICATION ET AVENIR DE L'HPTLC AU DIA

# 1 - Le Département Innovation Actifs



## ■ Missions

- Recherche d'actifs à partir de végétaux
- Valorisation de plantes
  - Connaissance moléculaire
  - Connaissance des activités biologiques
  - Mise en forme d'un extrait pour formulation future

## ■ Outils

- Bibliographiques (connaissance ethnobotanique), chromatographiques, d'extraction et à visée biologique.

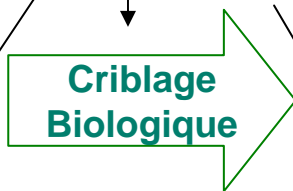
# Département Innovation Actifs



**Ethnobotanique**  
Sélection plantes  
Écorces, feuilles, fleurs, graines,...



**Extrait standard**

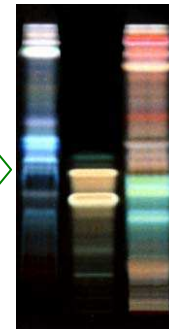


**Activité potentielle en cosmétique**



**Procédé industriel**

**Ingrédient actif**



**Marqueurs potentiels phytochimiques et/ou biologiques**

**Purification**

**Identification de Molécules/ Marqueurs biologiques**  
HPLC, OPLC,  
Partage L/L, HPLC prép.,  
GC, GC/MS...



LVMH RECHERCHE  
PARFUMS & COSMETIQUES



## ■ Missions:

- Sur les extraits végétaux
  - Mettre en évidence des molécules caractéristiques
  - Orienter vers des marqueurs spécifiques et/ou biologiques
  - Assurer un suivi de développement pour valider un procédé d'obtention de l'extrait final
  - Etudier la stabilité des extraits via les marqueurs trouvés et identifiés

## ■ Méthode:

- Screening Phytochimique ou approche globale
  - Etablir une cartographie moléculaire des extraits étudiés
  - Rechercher différentes familles chimiques pour évaluer leur présence ou absence
- Phytochimie approfondie ou recherche d'identification structurale
  - Rechercher des caractéristiques spécifiques aux familles et/ou composés propres aux extraits
  - Développement de techniques analytiques complémentaires

# 2 – Biodiversité végétale et moléculaire

## Diversité végétale

Végétaux supérieurs

Arbres

Fougères

Algues

Mousses

...

## Partie de la plante

*écorces*



*bourgeons*



*fleurs*



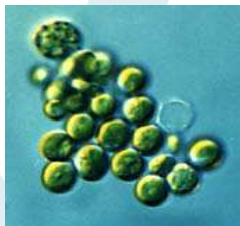
*feuilles*



*fruits*



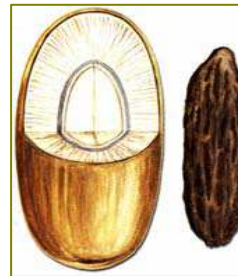
*totum*



*racines*



*graines*



## Biodiversité moléculaire

Glucides

Acides Aminés

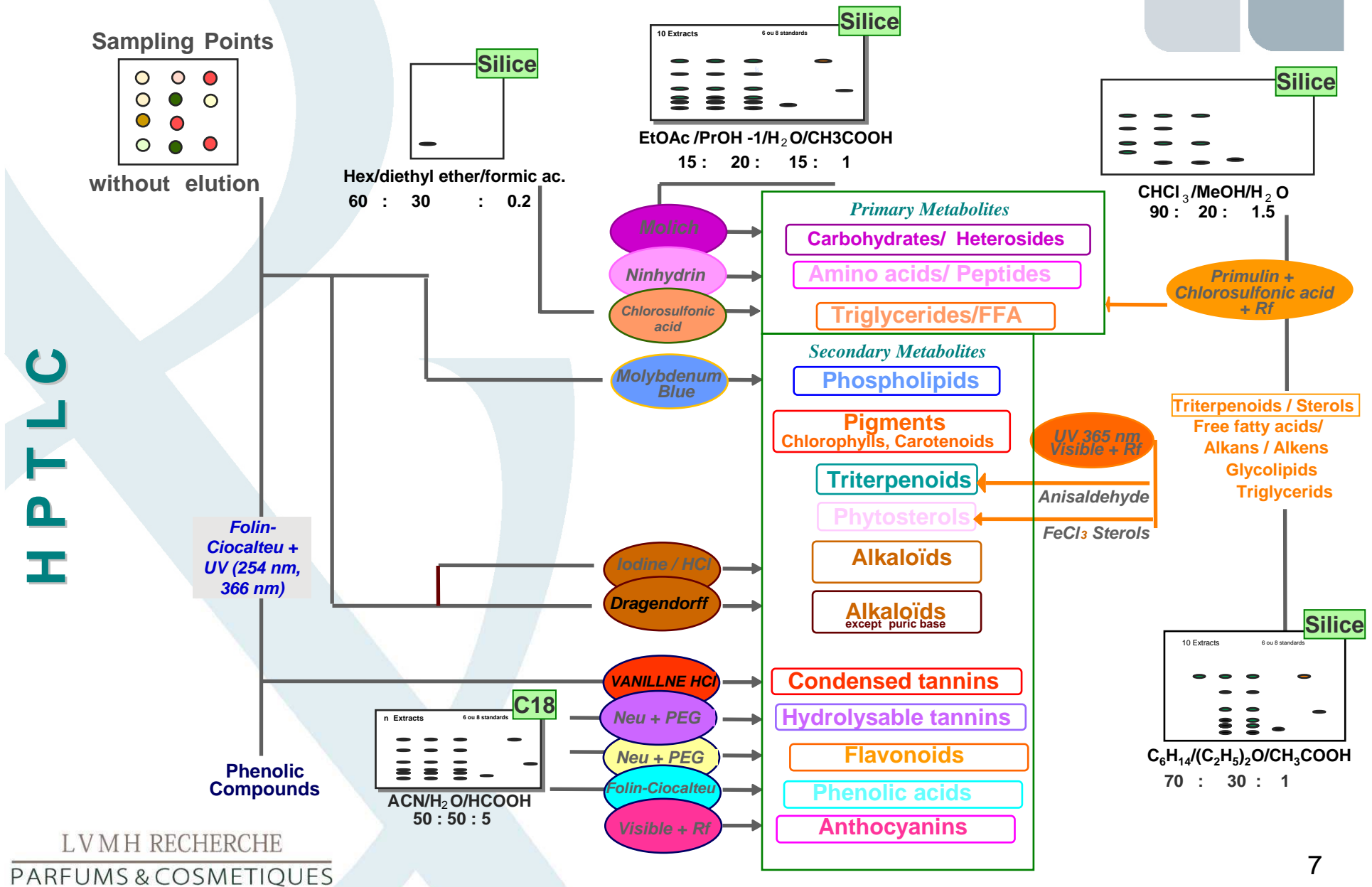
Lipides...

Terpénoïdes...

Polyphénols

Composés colorés

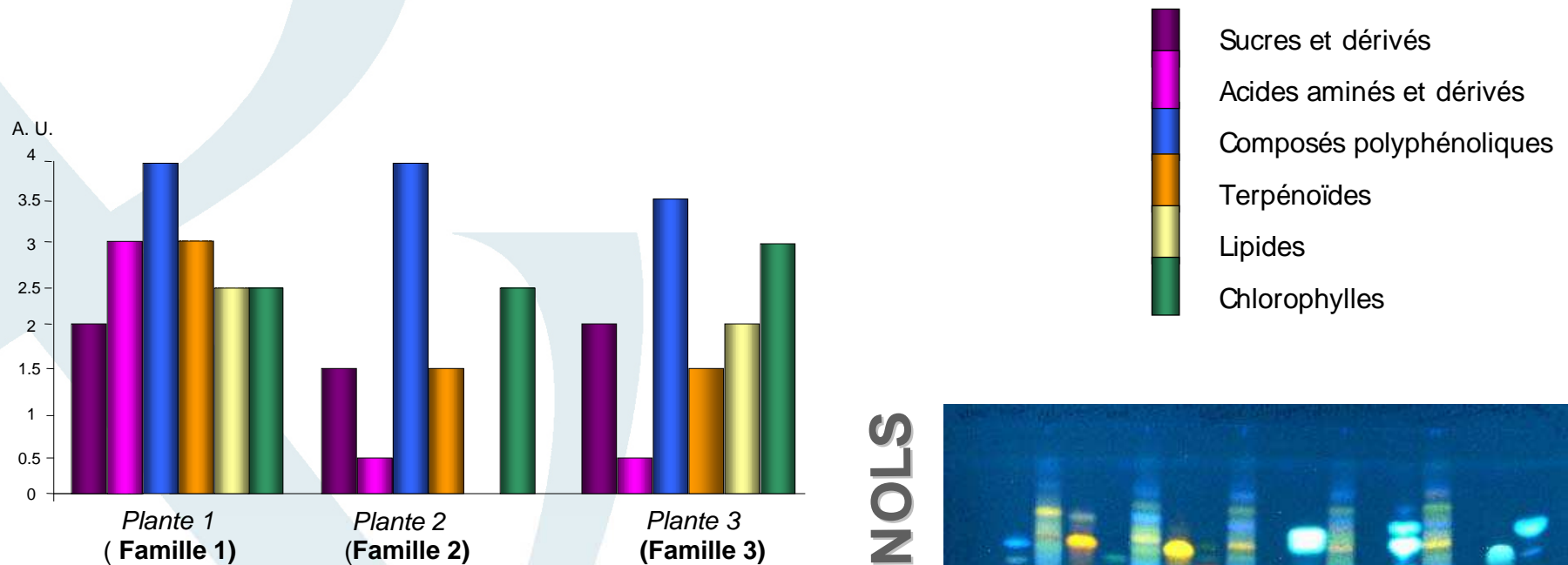
# 3 - Outil de Connaissance de l'approche globale



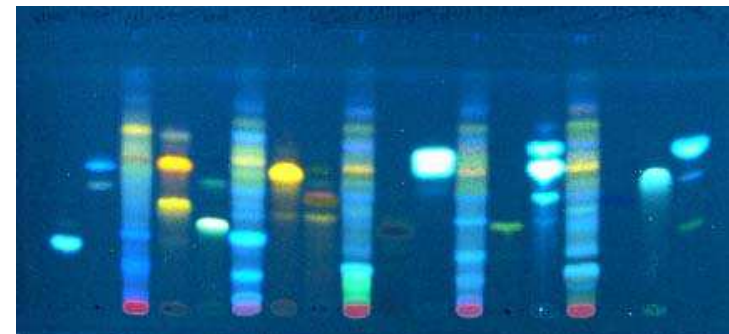
# 3a - Carte d'identité Moléculaire



## ■ Profils moléculaires de plantes d'origine diverse



PHENOLS



Conditions:

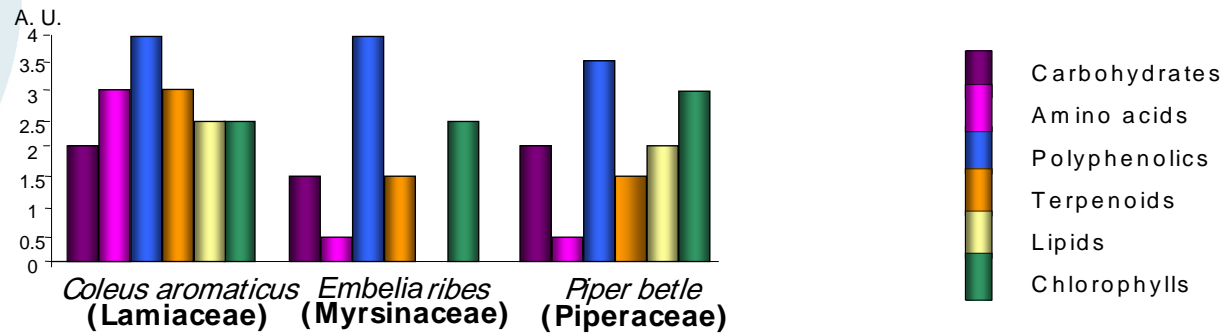
Phase Stationnaire: RP18F254s - Phase Mobile: ACN/H<sub>2</sub>O/HCOOH - 50/50/5

Révélation: Neu + Peg



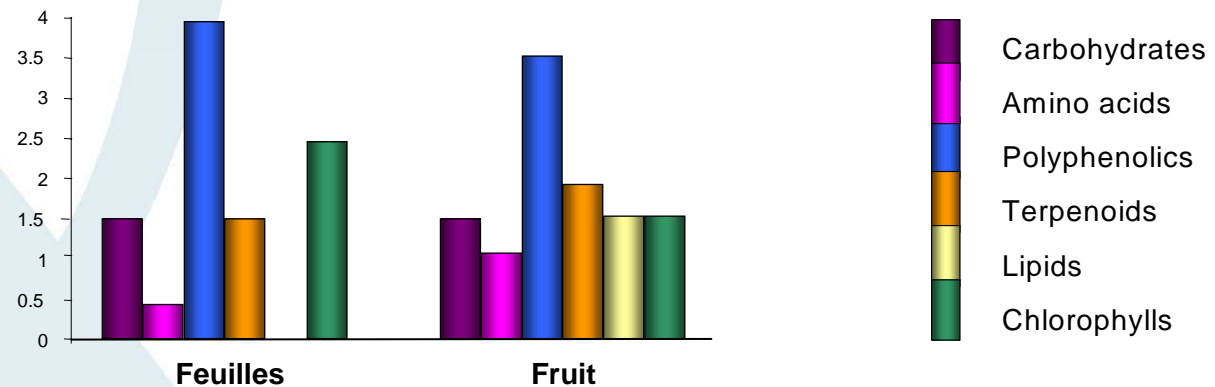
# Un Organe, différentes plantes

## ■ FEUILLES



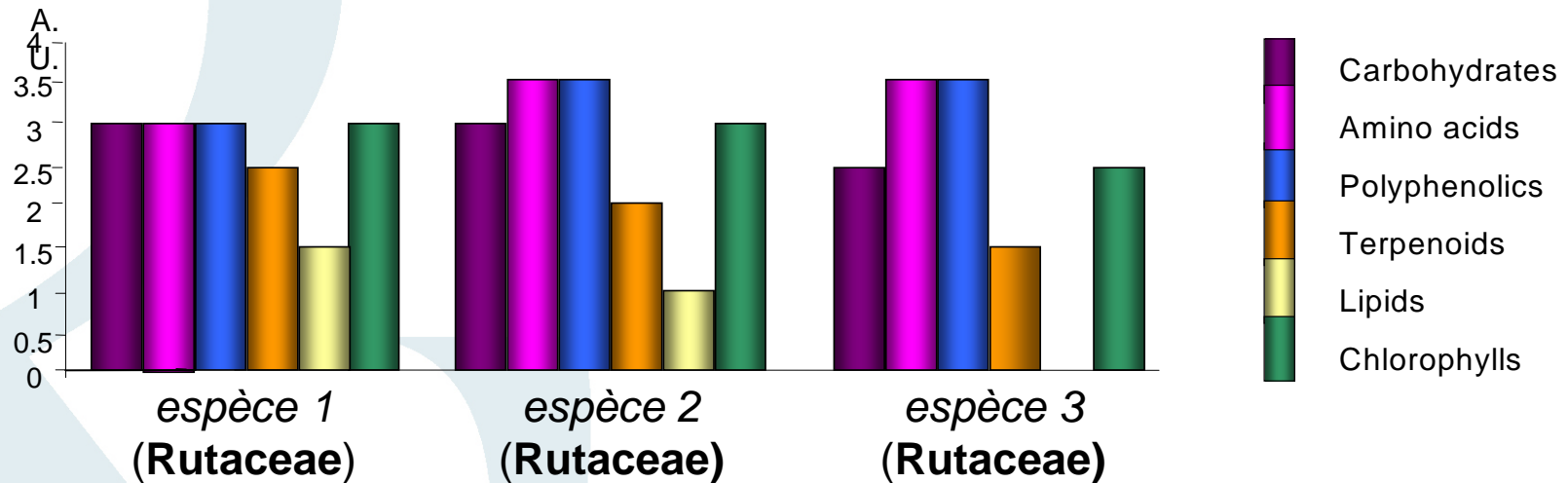
# Une Plante, différents organes

## ■ *Embelia ribes*



# Même organe – même famille – même genre

## ■ ESPECE DIFFERENTE



➤ Profils spécifiques à chaque extrait pour conditions données (famille, genre, espèce, organe)

➤ Chaque extrait végétal est unique..avec sa propre carte d'identité

# Du screening vers l'ingrédient Actif



## ■ Ingrédient Actif pour Cosmétique

- Cibler les molécules à risque
  - Coumarines (spectres UV,..), alcaloïdes (révélation complémentaire,..),...
- Cibler les molécules d'interférence
  - Pour les tests biologiques (tanins, polymères,...)

## ■ Cas de détection par le screening

- Statut sur le devenir de l'extrait → abandon?
- Elimination de ces composés par obtention d'un autre extrait?
- Permet anticipation d'un procédé pour l'ingrédient final

# 3b – Phytochimie Approfondie



Sur une famille d'intérêt



- **But:** 1ères orientations et hypothèses d'identifications de marqueurs à partir d'extraits et de fractions

- *HPTLC – AMD*



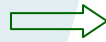
Autres conditions (élution, révélation, Gradient automatisé,...)  
Densitométrie (spectres UV-Visible, Recherche de molécules par longueur d'onde, 1ères estimations quantitatives)

- HPLC/DAD



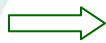
Confirmation des informations obtenues par densitométrie  
Mise au point de méthode analytique et Quantification (étalon choisi)

- GC et GC/MS



Analyse de génines natives et/ou après hydrolyse  
Analyse de marqueurs spécifiques (acides gras, terpènes, ...)

- (RMN)



Confirmation des hypothèses structurales des marqueurs spécifiques

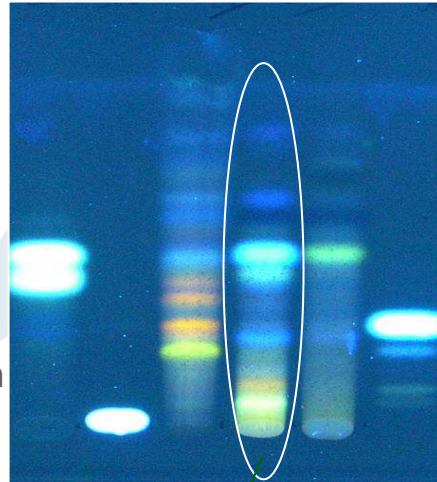
# Intérêt de la densitométrie et AMD



HPTLC – C 18

Éluant :  
ACN/H<sub>2</sub>O/HCOOH:  
40/60/5

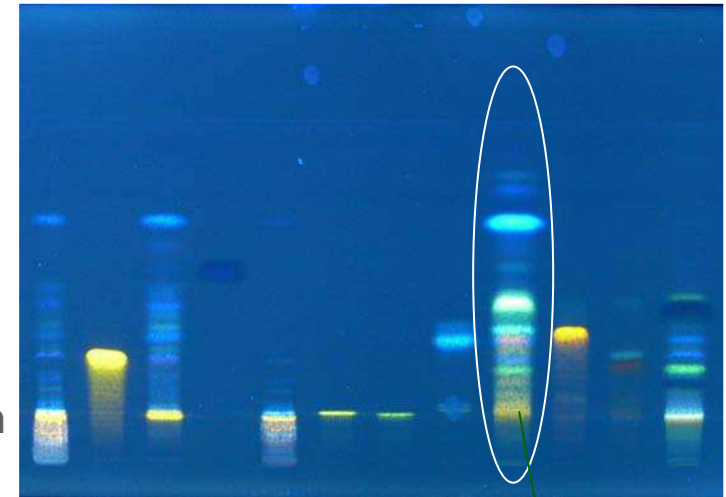
Révéléteur :  
Neu + Peg – 366 nm



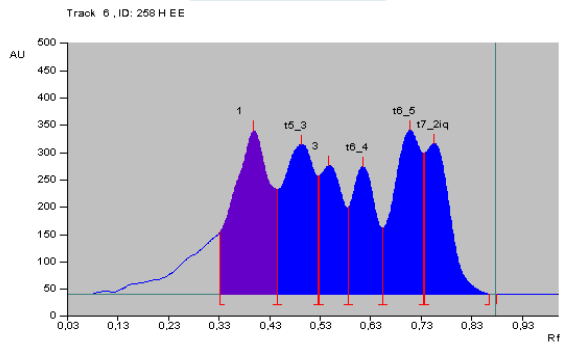
AMD – Diol

Éluant :  
gradient optimisé  
pour phénols

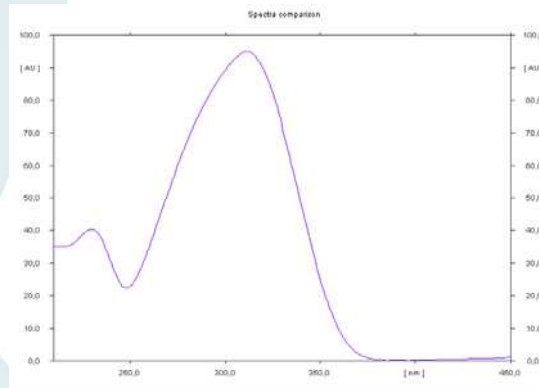
Révéléteur :  
Neu + Peg – 366 nm



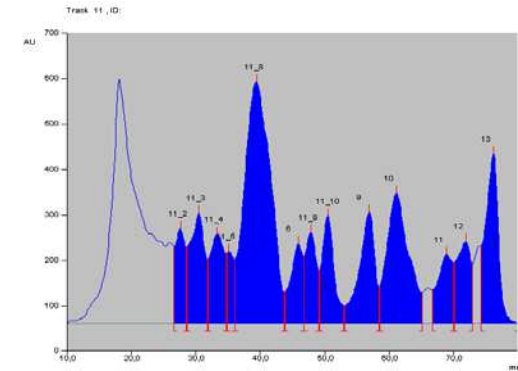
Densitogramme natif  
à 250 nm



Spectre UV extrait  
d'un pic



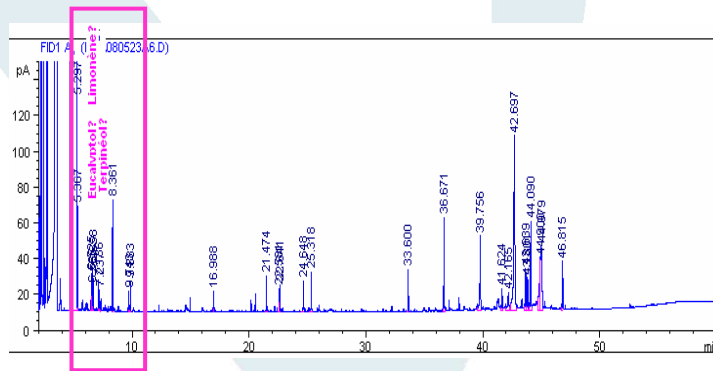
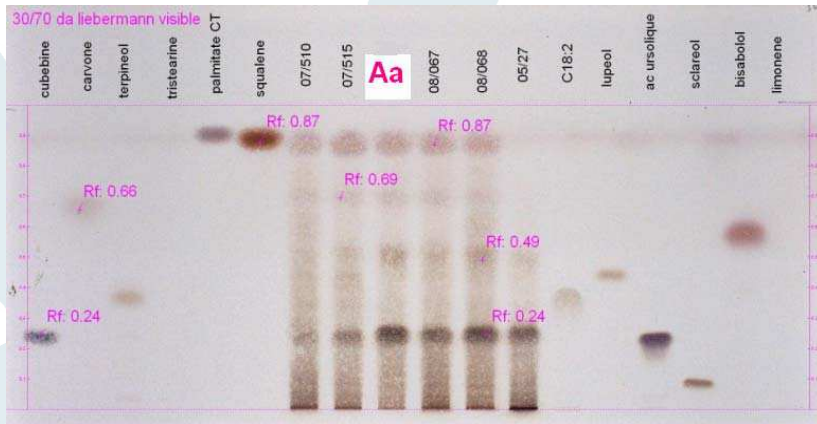
Densitogramme natif  
à 250 nm



# Autre exemple d'application AMD

## ■ Complémentarités de techniques

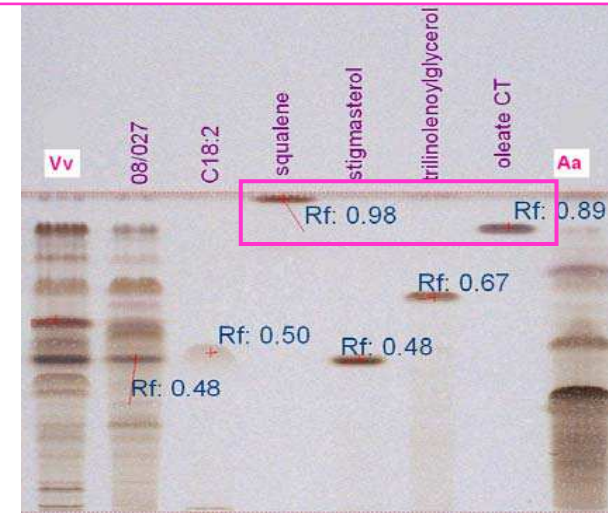
Heptane/ éther - (30/ 70) (v/ v) - silice  
permet de voir les terpènes et AG



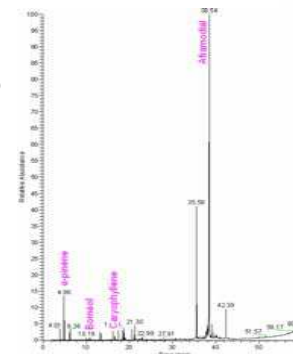
Extrait Aa TMS

Gradient AMD optimisé - silice

permet de séparer alcènes et esters de stérols



GC/MS



# 4 - *Leontopodium alpinum* développé au DIA

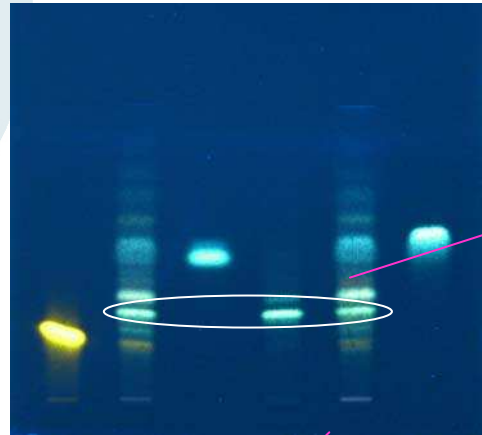
HPTLC – C 18

Éluent: ACN/H<sub>2</sub>O/HCOOH:

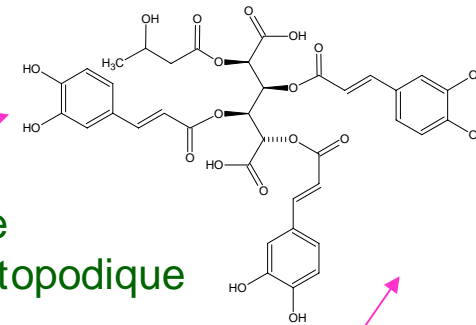
40/60/5

Révéléteur:

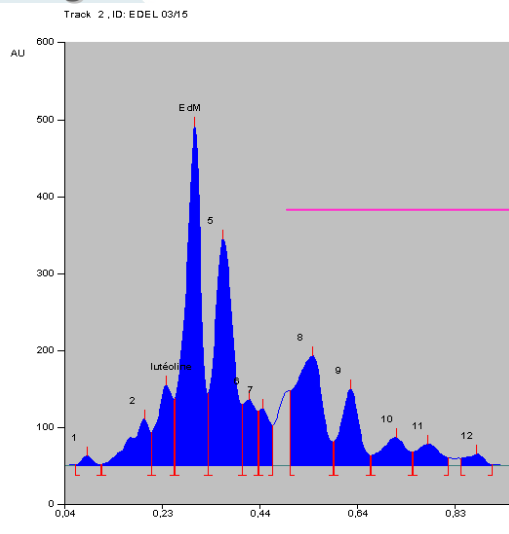
Neu + Peg – 366 nm



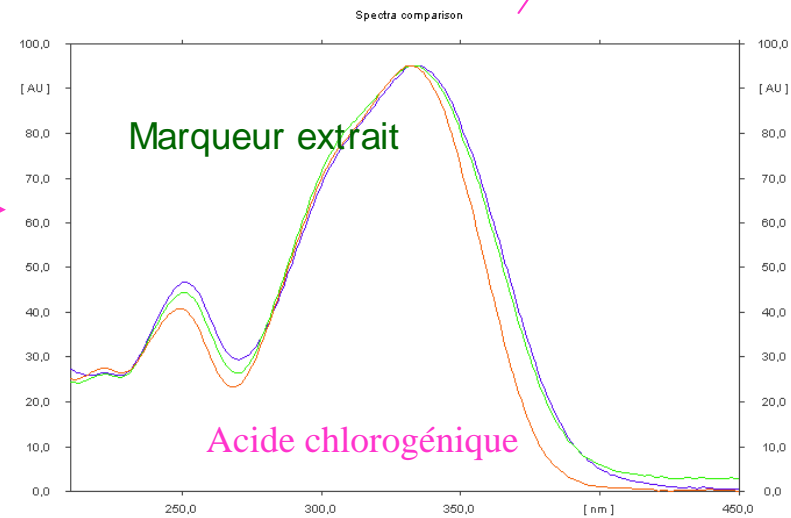
Structure identifiée



Densitogramme natif à 330 nm

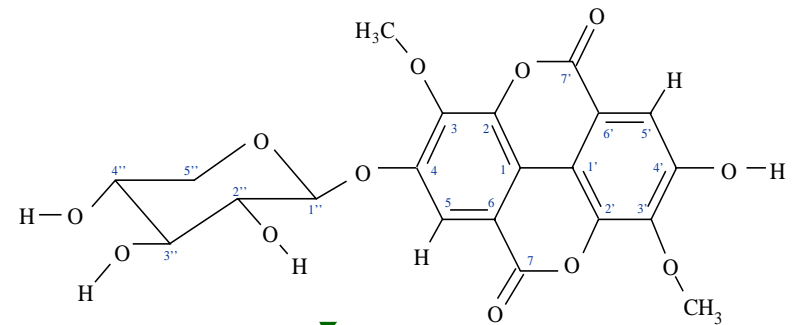
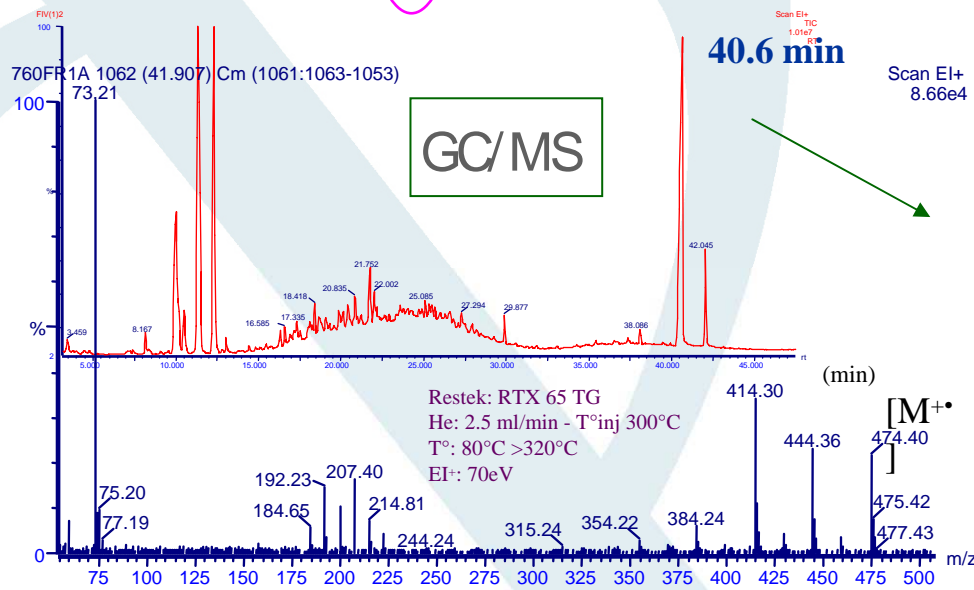
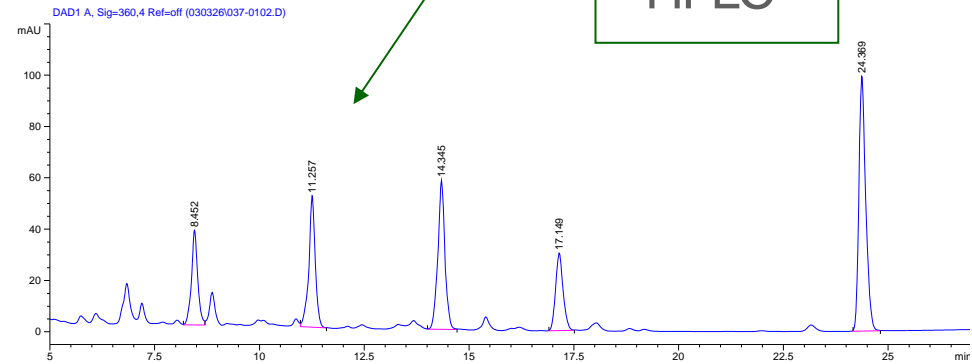
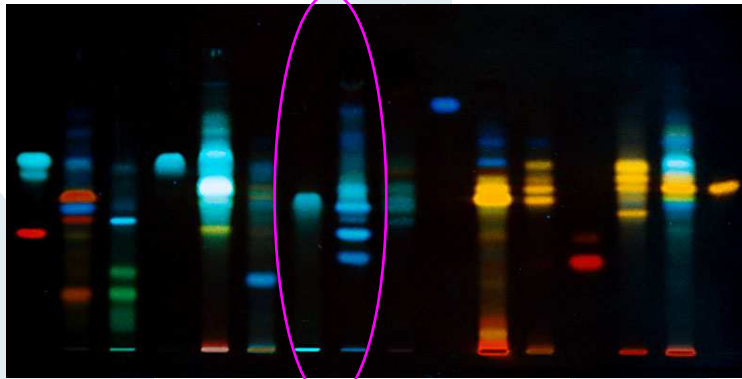


Spectre UV extrait d'un pic/étalon



# Anogeissus leiocarpus développé au DIA

HPLC



Acide 3,3'-di-O-methyl-ellagique-4-β-xylopyranoside



# 5 - Support au Développement

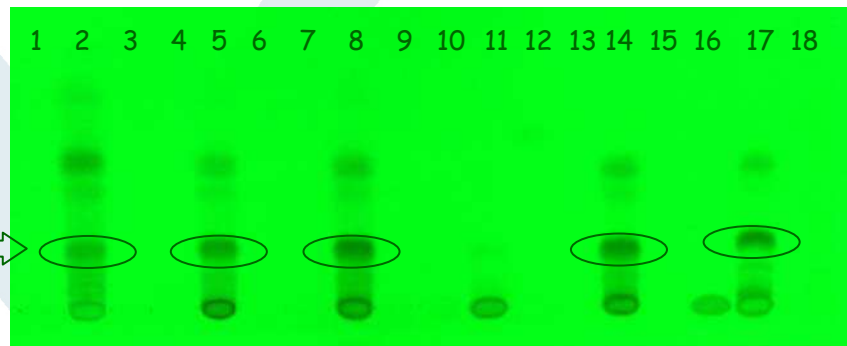


## *Aframomum angustifolium*

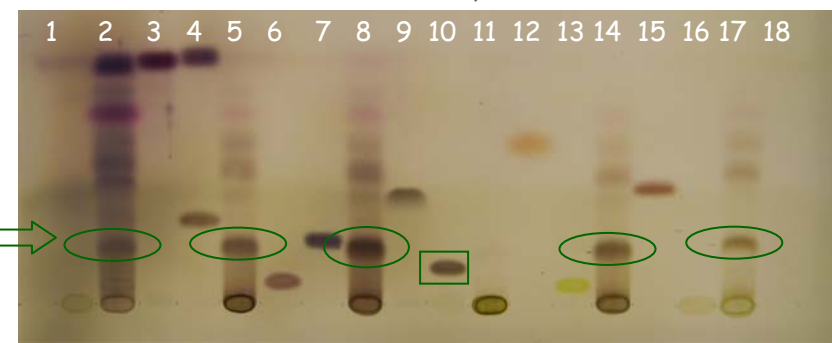
Screening d'échantillons issus de différents procédés d'extraction dans un domaine 'Apolaire'

Conditions: Silice – Heptane/Ether éthylique – 30/70 – v/v

Révélation: lecture sous 254 nm



Révélation: Anisaldéhyde - visible



→ *Marqueur commun et majoritaire*

Légende:

- |  |                       |
|--|-----------------------|
| 1 - MGDG                                     | 10 - Marubiin         |
| 2 - Fraction Heptane 05/10                   | 11 - 05/05            |
| 3 - Squalène                                 | 12 - Thymol           |
| 4 - $\beta$ sitostérol/cholestérol palmitate | 13 - Hécogénine       |
| 5 - 05/11                                    | 14 - 05/27            |
| 6 - Sclaréol                                 | 15 - $\alpha$ amyrine |
| 7 - acide ursolique                          | 16 - $\beta$ ecdysone |
| 8 - 05/04                                    | 17 - 04/347           |
| 9 - C18:3                                    | 18 - Tristéarine      |

**Molécule avec insaturation (254 nm)**

**Labdane diterpène (proche de l'étalon marubiin)**

→ *Structure caractéristique identifiée par GC/MS*

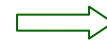
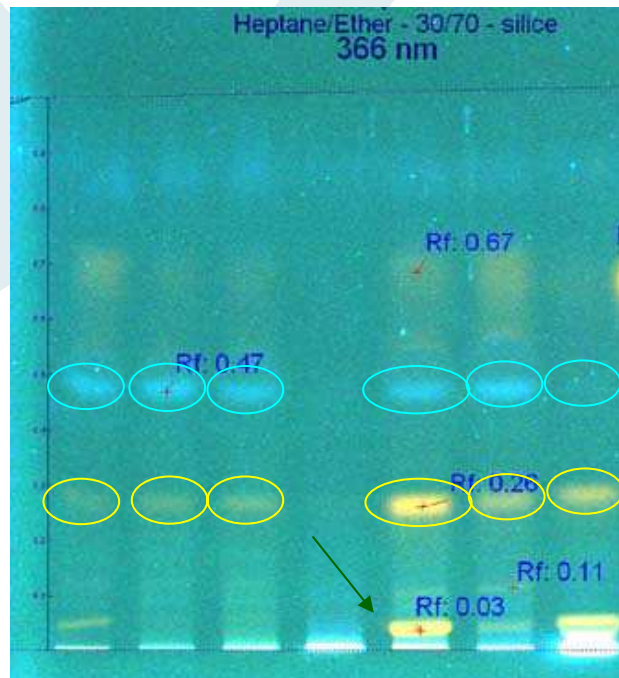
# Support au Développement



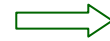
*Kniphofia uvaria*

Screening d'échantillons issus de différents procédés d'extraction

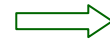
Conditions: Silice – Heptane/Ether éthylique – 30/70 – v/v



*Deux Marqueurs communs –  
différenciation en terme de  
concentration*



*Différenciation moléculaire plus  
spécifique pour deux extraits*



*Investigations spectrales via la  
densitométrie en cours*

## 6 - Implication et avenir de l'HPTLC au DIA

### ■ Implication

- Obtention d'une cartographie globale d'un grand nombre de familles moléculaires
- Mise en évidence rapide de molécules (à risques, d'interférence)
- Connaissance de l'environnement moléculaire de la famille d'intérêt pour élaborer un procédé
- Contribution à l'identification structurale des molécules d'intérêt



Recherche de marqueurs phytochimiques et biologiques

- Permet un suivi des marqueurs et profil caractéristique d'un extrait au cours d'un développement
- Traçabilité matière (origine plante, lieu, temps de récolte,...)



Reproductibilité résultats biologiques et validation matière végétale



Choix des lots de matières premières, analyse des premiers pilotes,...

### ■ Avenir

- HPTLC: Outil de *Recherche* ET outil de *Développement*
- Traçabilité matière à développer
- Travail en couplage?
- Détection par bioluminescence?



Mise en valeur justifiée au sein de LVMH



Merci de votre attention

*Plumeria acutifolia*