

# Approche phytochimique globale et intérêt de l'HPTLC-AMD

Sylvie Darnault  
CCCM - 05 juin 2013 - Orléans



LVMH RECHERCHE  
PARFUMS & COSMETIQUES

# Plan



- **Les Végétaux et leurs métabolites**
- **L'approche phytochimique globale**
- **Carte d'identité moléculaire**
- **L'HPTLC-AMD/Paramètres à maîtriser**
- **Pourquoi l'AMD?**
- **Exemples en images**
- **Conclusion et perspectives**

# Les Végétaux et leurs métabolites



## Métabolites primaires

- Sucres / Heterosides
- Amino acides / Peptides
- Triglycerides / FFA
- Phospholipides
- Pigments  
Chlorophylles, Carotenoides

Energie



Diversité  
Végétale

Organes:

fleurs, feuilles,  
tiges, graines,  
racines,....

Biodiversité  
moléculaire

## Métabolites secondaires

- Xanthophylles , phycobilliprot...
- Terpenoïdes
- Phytostérols
- Alcaloïdes  
Base purique
- Alcaloïdes  
sauf base purique
- Tanins condensés
- Tanins hydrolysables
- Flavonoïdes
- Dérivés Phénoliques

Relations avec  
l'environnement



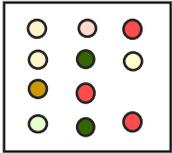
Complexité  
phytochimique

...

# L'Approche Phytochimique Globale

Méthodologie par HPTLC

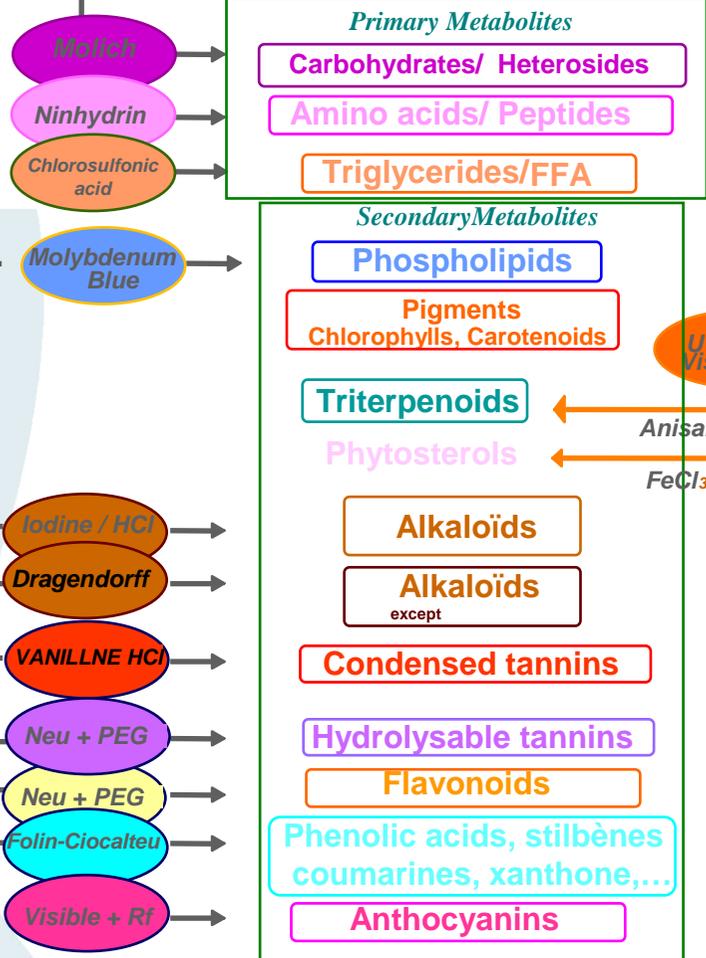
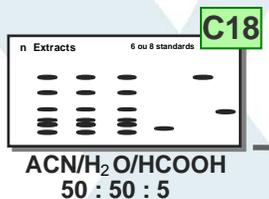
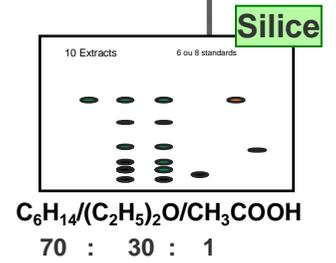
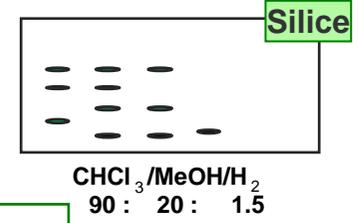
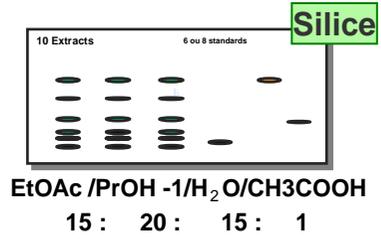
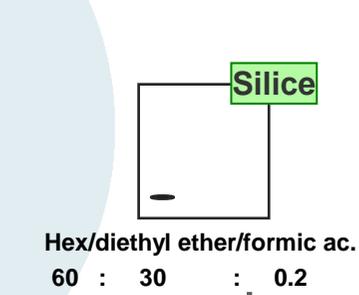
Sampling Points



without elution

Folin-Ciocalteu + UV (254 nm, 366 nm)

Phenolic Compounds



Primulin + Chlorosulfonic acid + Rf

Triterpenoids / Sterols  
Free fatty acids/ Alkans / Alkens  
Glycolipids  
Triglycerids

UV 365 nm  
Visible + Rf  
Anisaldehyde  
FeCl3 Sterols

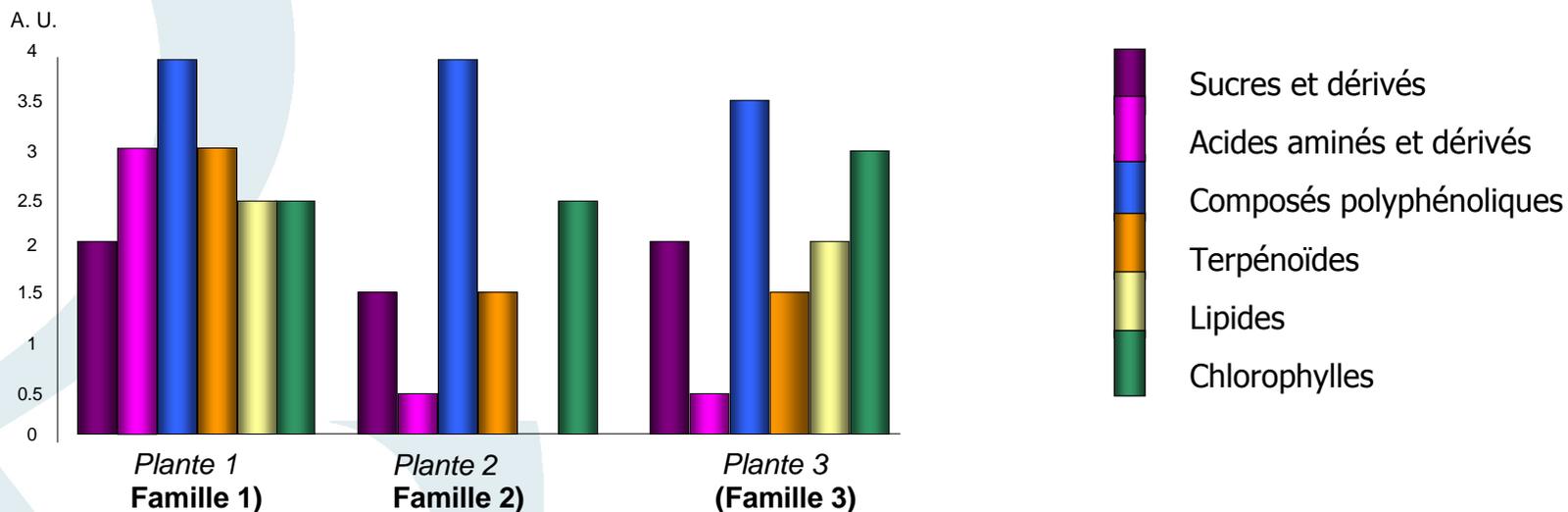
LVMH RECHERCHE  
PARFUMS & COSMETIQUES

HPTLC 2003 – Lyon: a useful support for research and development of active ingredients from selected plants

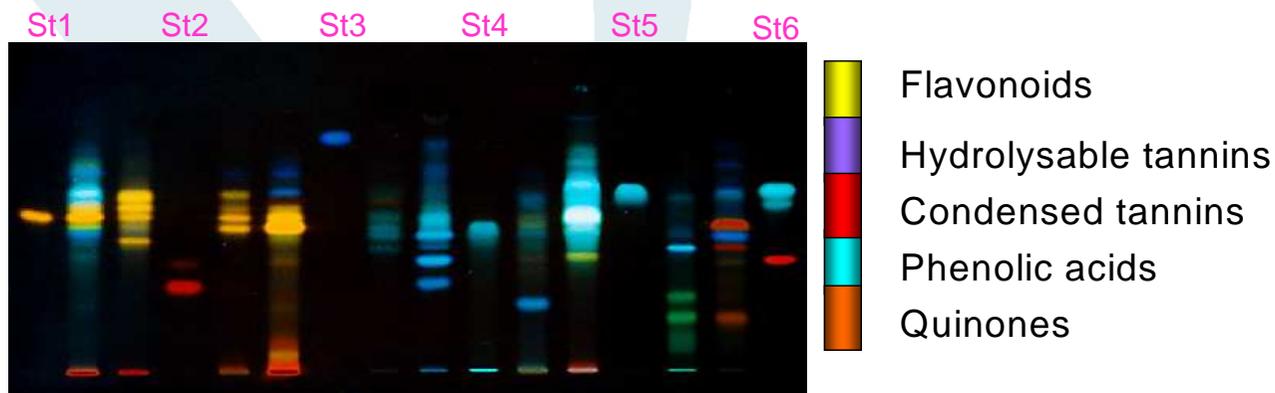
SDARNAULT – CCCM - 05/06/2013

# Carte d'identité Moléculaire

## ■ Profils moléculaires de plantes d'origine diverse



## ■ Profils moléculaires phénoliques par organe



↓ Fruits    
 ↓ Fruits    
 ↓ Barks    
 ↓ Flowers    
 ↓ Wood

*Profils spécifiques*

# L'HPTLC-AMD/Paramètres

## ■ Appareillage



## ■ Orientation des paramètres

- Viscosité
- Indices de polarité (Snyder)
- Paramètres de solubilité (Hildebrand)
  - Nature des composés

## ■ Principe

- Gradient d'élution

## ■ Paramètres à maîtriser

- Solvants (élutif, séparateur, 'fixateur)
  - Méthanol, dichlorométhane, heptane
- Préconditionnement (acide, neutre, basique)
- Séchage
- Phases stationnaires (1)
- Temps de développement
- Empty mixer

 ***Etape de focalisation***

# Pourquoi l'AMD (Automated Multiple Development)?



## ■ Buts

- Informations contenues sur une même plaque
- Automatisation donc reproductibilité
- Meilleure résolution
- Meilleure séparation

## ■ Intérêts

- Etirer une zone d'intérêt de concentration donnée pour optimiser la séparation, non réalisée en isocratique
- Vue globale du profil moléculaire d'un extrait végétal
- Densitométrie plus performante
  - Spectres des composés
  - Quantification

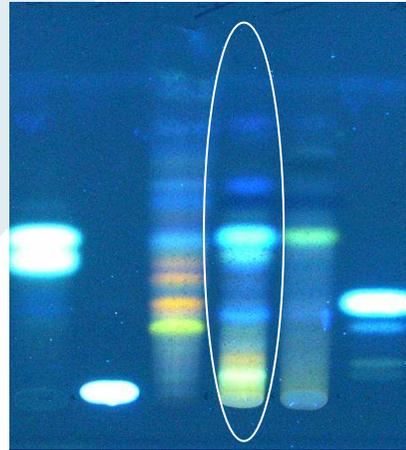
# Exemples en image

## Extrait végétal d'Ouzbékistan

HPTLC – C 18

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

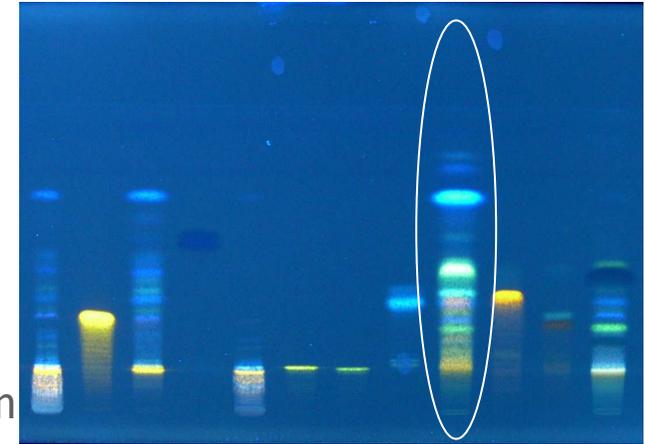
Révéléteur :  
Neu + Peg – 366 nm



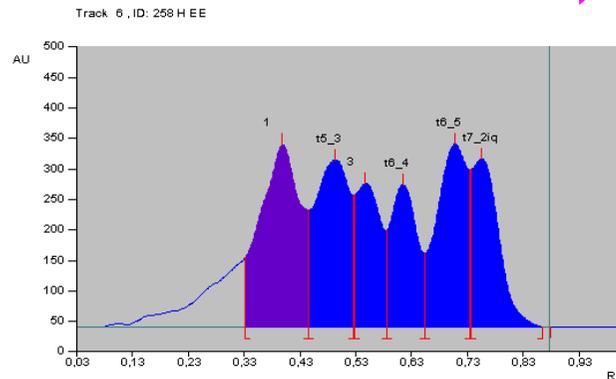
AMD – Diol

Éluant :  
gradient optimisé  
pour phénols

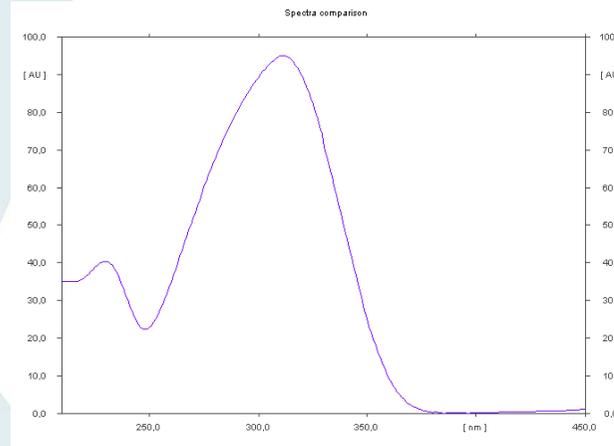
Révéléteur :  
Neu + Peg – 366 nm



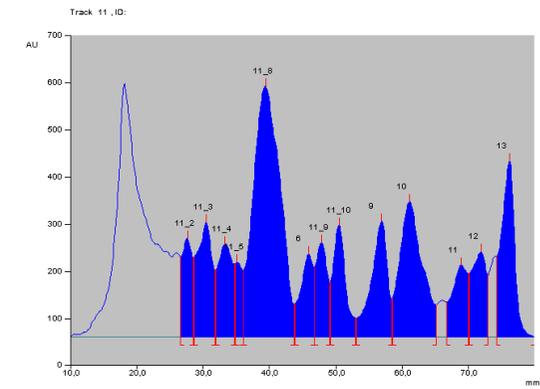
Densitogramme natif  
à **250 nm**



Spectre UV extrait  
d'un pic



Densitogramme natif  
à **250 nm**



# AMD...oui, mais optimisé!

*Sur phase silice*

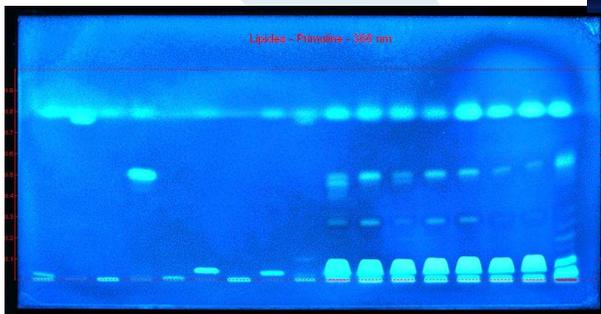


## Isocratique

Elution 1 – Heptane/Ether – 30/70

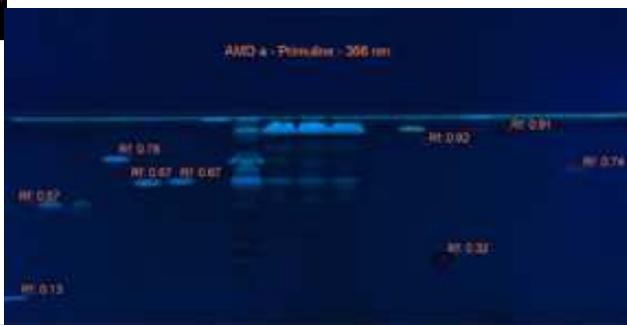


Cyclohexane/Ether/Ac.formique –  
90/10/0.2

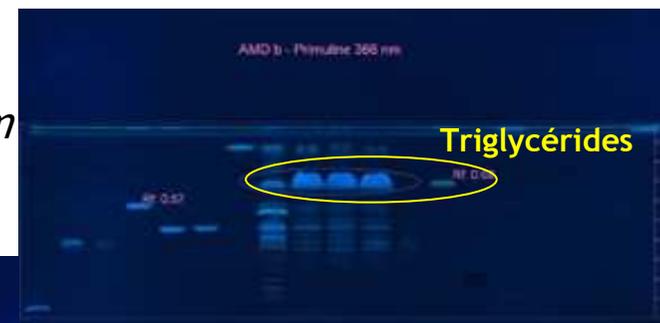


## Essai AMD

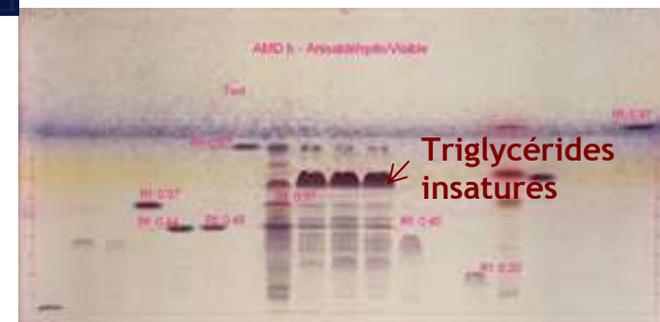
*Révélation à la Primuline-366 nm*



## AMD optimisé



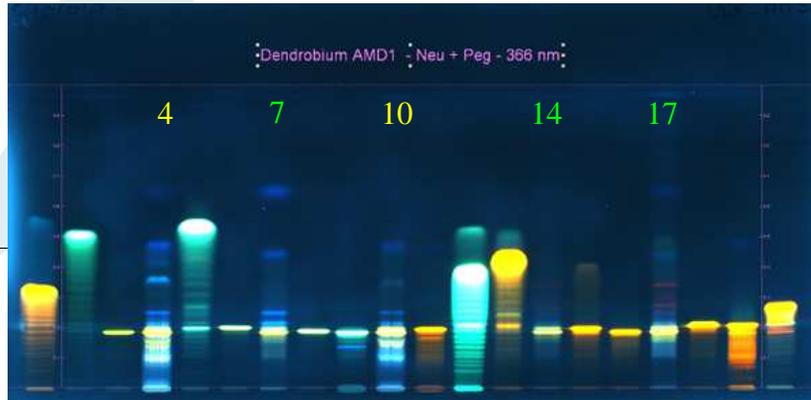
*Révélation à l'Anisaldéhyde-visible*



# Exemples en image, suite

## ↪ Extrait d'Orchidée 1

But: 'screener' un grand nombre d'étalons

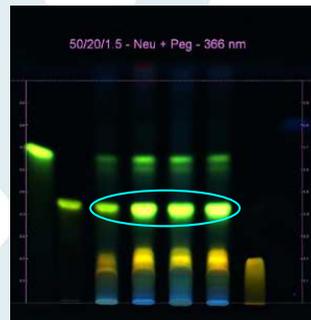


Sur phase Diol –  
réf.VWR:1.05636.0001

Recherche de flavonoïdes

Révélation: Neu + peg

<b>Etape</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>16</b>	<b>21</b>
<b>Bouteille</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Methanol</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>40</b>			
<b>Diisopropyl ether</b>		<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>60</b>	<b>40</b>
<b>Heptane</b>				<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>Séchage</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Preconditionnement</b>		<b>Acide</b>				



Phase stationnaire: silice 60F254 – réf.VWR: 5629

Phase mobile: chloroforme/méthanol/eau –  
50/20/1.5 – v/v/v

# Exemples en image, suite et fin

## Extrait d'Orchidée 2

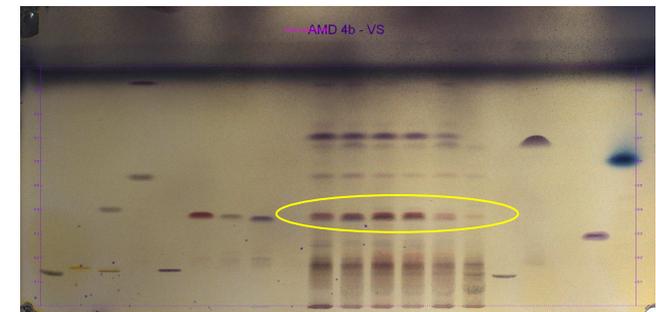
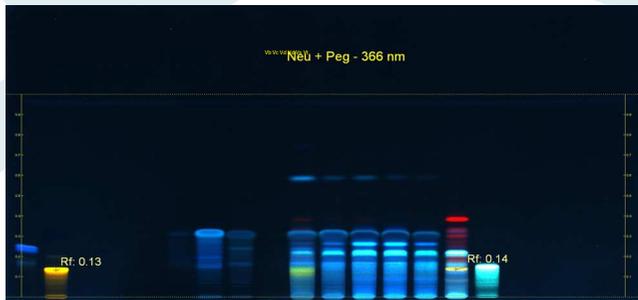
But: recherche de marqueurs spécifiques à une espèce

Stilbenes/Flavonoïdes

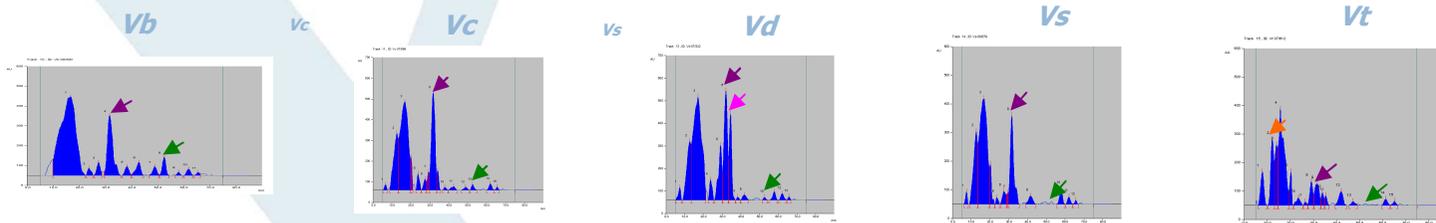
Gradient

Terpenoïdes/Acides Gras

Step	1	2	5	11	16	21
Bottle	1	2	3	4	5	6
Methanol	40	30	20			
Diisopropyl ether	60	70	80	50	30	
Heptan				50	70	100
Drying	5	5	5	4	3	3
Preconditioning	Acidic					



Densitogrammes à 254 nm - Spécificités aux espèces *Vanda*



# Conclusion et perspectives



## ■ Approche globale par HPTLC

- Conditions standards
  - 'tremplin'

## ■ HPTLC/AMD

- Gradient 'universel'
- Gradients spécifiques
  - Polyphénols
  - Terpènes

## ■ Perspectives

- Mettre en application des gradients de la littérature (lipides)
- Développer des gradients à d'autres métabolites spécifiques
- Utilisation dans notre quotidien