



IDENTIFICATION PHYTOCHIMIQUE PAR HPTLC
-
**APPLICATION SUR L'ARRÊTÉ RELATIF À L'EMPLOI
DES PLANTES DANS LES COMPLÉMENTS
ALIMENTAIRES**



**Loïc LOFFREDO, QUALITY@BOTANICERT.COM
TECHNICAL DIRECTOR**

BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal



Convention de partenariat

Depuis début 2011
Effectif : 4 personnes

Siège social



F O Q U A L



master 2 professionnel

Pépinière d'entreprises
Espace J-L. Lions - Grasse

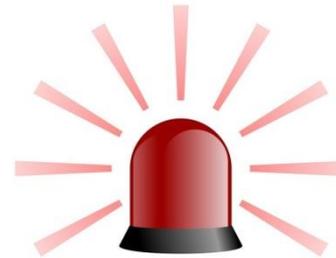
Master FOQUAL – Université de
Nice Sophia-Antipolis

**POLEAZUR
PROVENCE**
COMMUNAUTE
D'AGGLOMERATION

Université
Nice SOPHIA ANTIPOLIS

Contexte :

La sécurité du consommateur n'est plus une option et l'utilisation du végétal dans les aliments, les compléments alimentaires et les produits cosmétiques requiert des validations spécifiques.



Les contrôles doivent exister (ce sont des prérequis exigés par les consommateurs) et doivent être assez pertinents pour pallier aux problèmes que l'on peut rencontrer.

BotaniCert, laboratoire d'analyse des plantes dans les domaines :

- Nutraceutique
- Cosmétique
- Pharmaceutique
- Parfumerie
- Alimentaire



BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

BotaniCert, acteur tout au long de la chaîne de production :



Sourcing



Choix de la matière



Choix du fournisseur



CQ avant fabrication



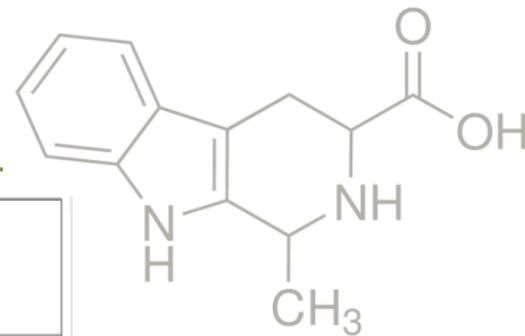
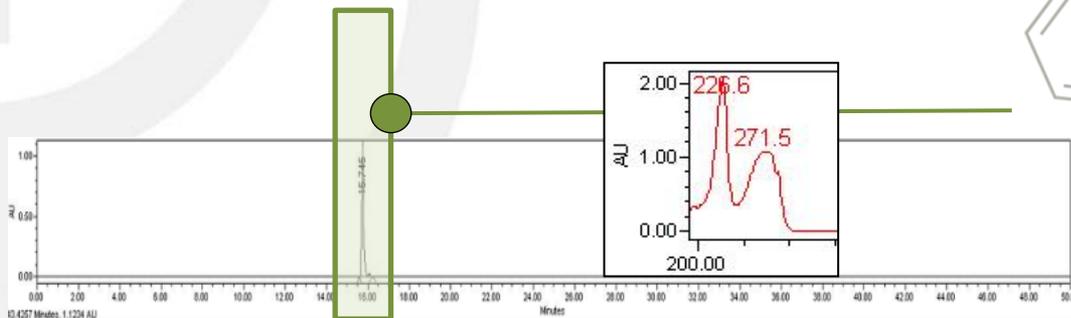
CQ sur intermédiaire



CQ sur PF

Sur ces produits, BotaniCert permet :

- D'identifier l'espèce végétale : BotaniCert est le garant de la **sécurité** de la **qualité** du produit
- De doser les métabolites secondaires
- Etudes à façon sur les plantes et leurs métabolites secondaires



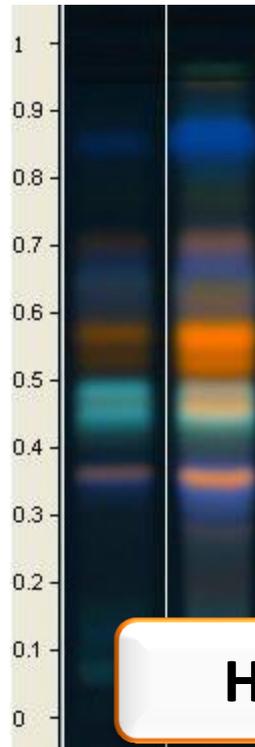
BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

Méthodologie :

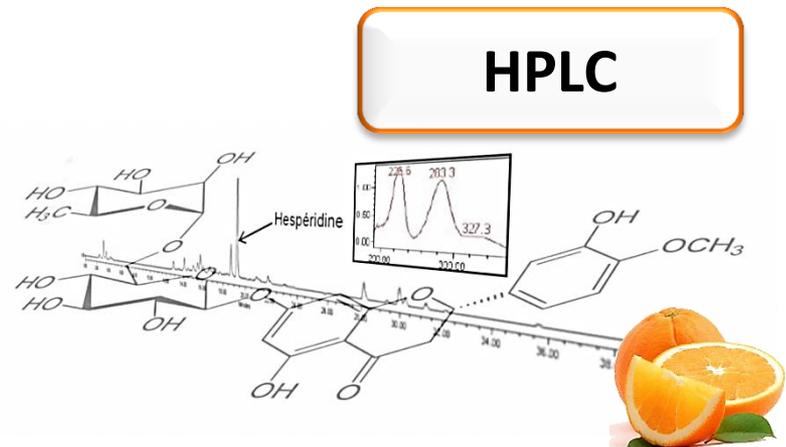
BotaniCert vérifie l'identité botanique des espèces utilisées dans les formules par les techniques suivantes:



BOTANIQUE



HPTLC



HPLC

BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

Chaîne HPTLC utilisée par BotaniCert :



DÉPOSEUR



**CUVE DE
DÉVELOPPEMENT**



VISUALISEUR



DENSITOMÈTRE



IDENTIFICATION PHYTOCHIMIQUE OU BOTANIQUE



→ *Symphytum officinale* L.

1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

3
Exemple de H.
perforatum

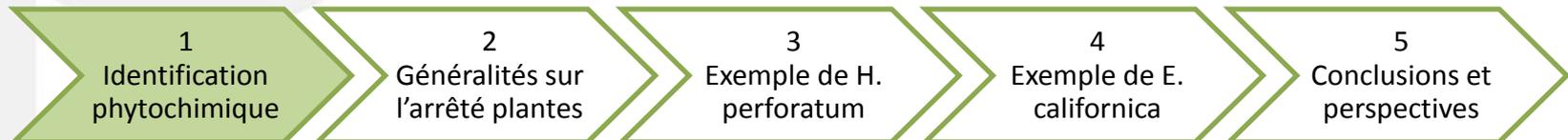
4
Exemple de E.
californica

5
Conclusions et
perspectives

Selon Pharmacopées : CCM de l'échantillon à analyser en comparaison à des substances de référence



Référentiels principaux des acteurs du métier



BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

Espèce végétale	Rutine	Acide Chlorogénique	Acide caféique	Hypéroside
<i>Alchemilla vulgaris</i>		•	•	
<i>Atropa belladonna</i>	•	•		
<i>Battola nigra</i>	•	•		
<i>Betula pendula</i>	•	•	•	•
<i>Calendula officinalis</i>	•	•	•	
<i>Crataegus laevigata</i>	•	•		•
<i>Equisetum arvense</i>	•		•	•
<i>Fagopyrum esculentum</i>	•			•
<i>Fraxinus excelsior</i>	•	•		
<i>Ginkgo biloba</i>	•	•		
<i>Hypericum perforatum</i>	•			•
<i>Malva sylvestris</i>		•	•	•
<i>Passiflora incarnata</i>	•			•
<i>Polygonum aviculare</i>		•	•	•
<i>Sambucus nigra</i>	•	•	•	•
<i>Taraxacum officinalis</i>	•	•		
<i>Tillia cordata / platyphyllos</i>	•		•	•
<i>Verbascum thapsus</i>	•		•	•
<i>Viola arvensis</i>	•		•	•

1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

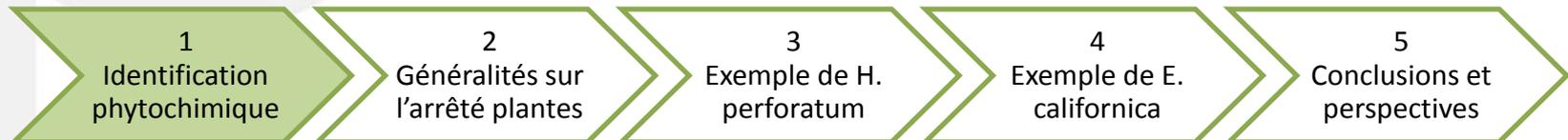
5
Conclusions et
perspectives

Selon BotaniCert :

HPTLC de l'échantillon à analyser

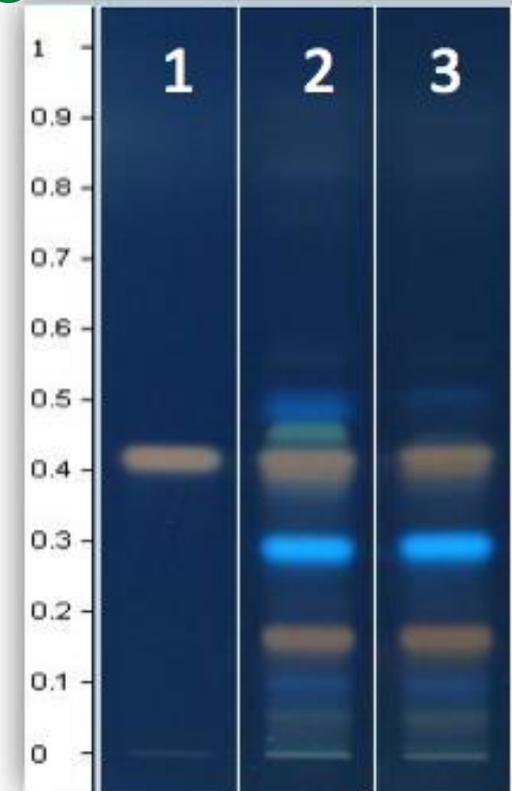
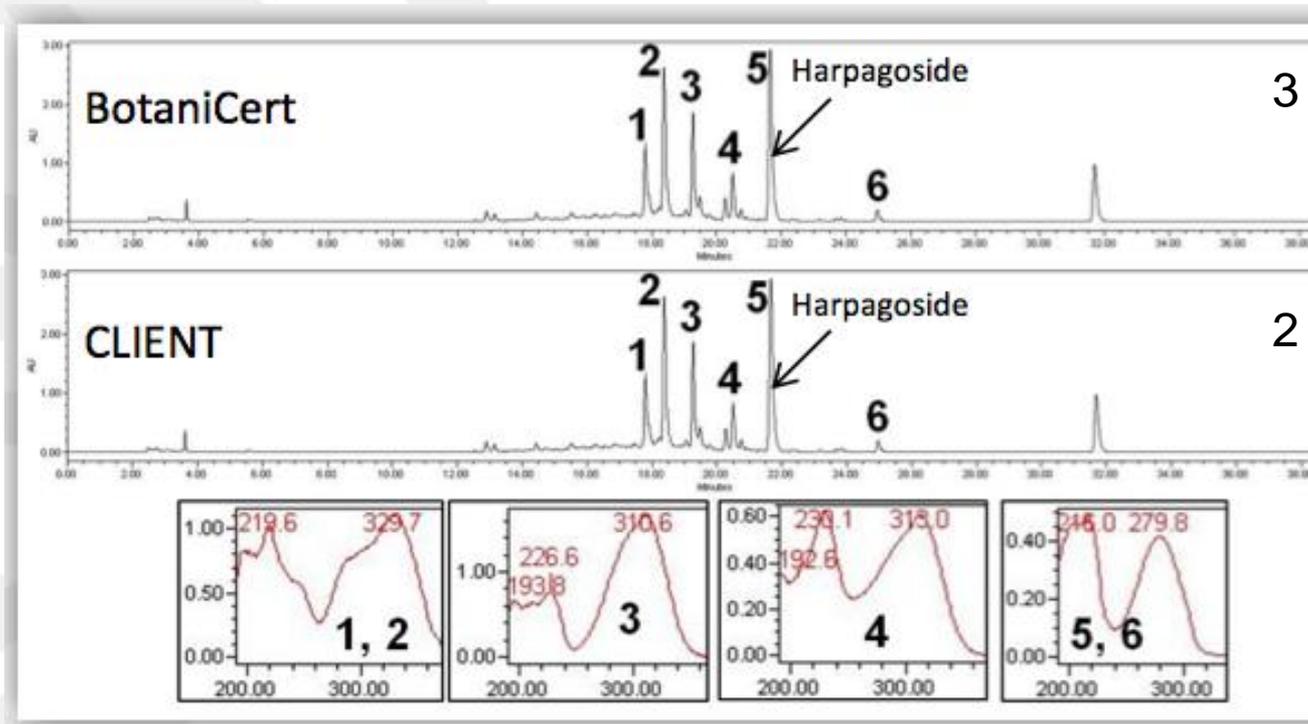
Comparaison avec étalon plante de la même espèce

Comparaison avec, si possible, des substances de référence spécifiques



BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

Exemple sur l'espèce *H. procumbens*



1
Identification
phytochimique

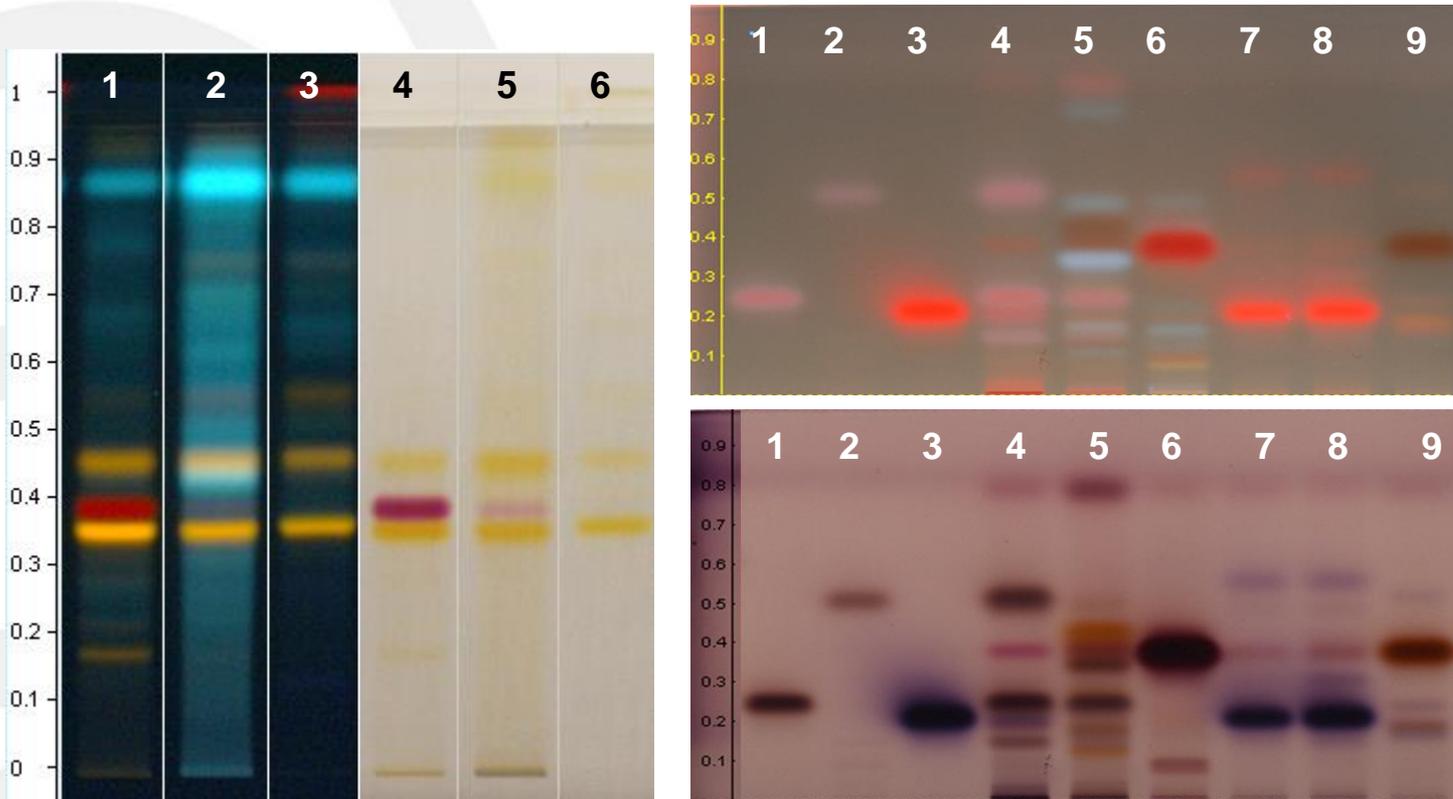
2
Généralités sur
l'arrêté plantes

3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

Identification HPTLC selon les métabolites ciblés



1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

3
Exemple de *H.
perforatum*

4
Exemple de *E.
californica*

5
Conclusions et
perspectives

Identification de marqueurs spécifiques



- 1 : Tiges de *V. arvensis*
- 2 : Tiges de *V. tricolor*
- 3 : Feuilles de *V. arvensis*
- 4 : Feuilles de *V. tricolor*
- 5 : Fleurs de *V. arvensis*
- 6 : Fleurs de *V. tricolor*
- 7 : Fruits de *V. arvensis*
- 8 : Fruits de *V. tricolor*
- 9 : Quercétine
- 10 : Hyperoside
- 11 : Rutine



1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

GÉNÉRALITÉS SUR L'ARRÊTÉ PLANTES



1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

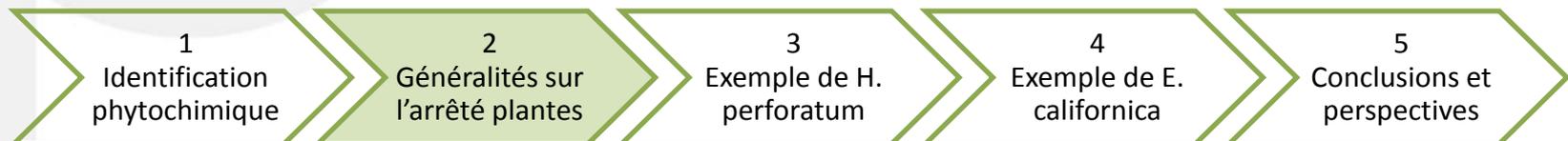
3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

Exigences des acteurs du domaine des compléments alimentaires :

A toutes les étapes, les différents acteurs doivent garantir la qualité de leur formule à base de plantes et la maîtrise de toutes ces étapes

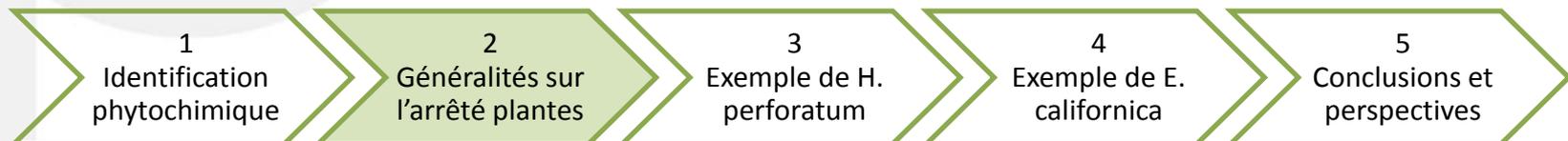


Exigences des acteurs du domaine des compléments alimentaires :

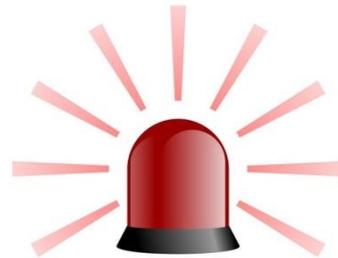
Point obscur pour les acteurs du métier : Annexe II – Point 2

Annexe II, point 2 :

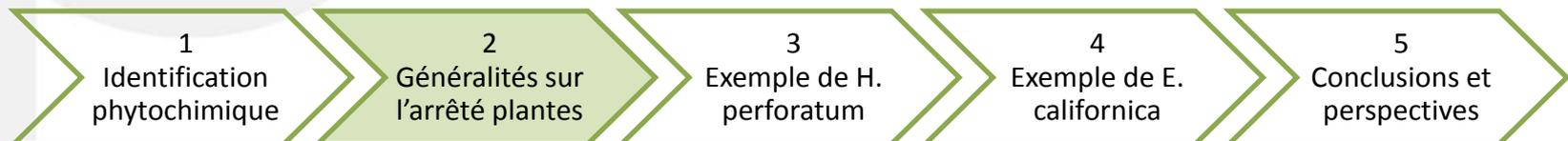
Informations à communiquer par les acteurs du domaine : tests d'identification, dosage des constituants d'intérêt et des substances à surveiller



Arrivée imminente de l'arrêté



L'HPTLC va permettre de répondre à tous les cas de figure



BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

- Identification de l'espèce végétale
- Dosage de métabolites d'intérêt
- Dosage de substances à surveiller

**HPTLC-
DENSITOMÈTRE**

1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

3
Exemple de *H.*
perforatum

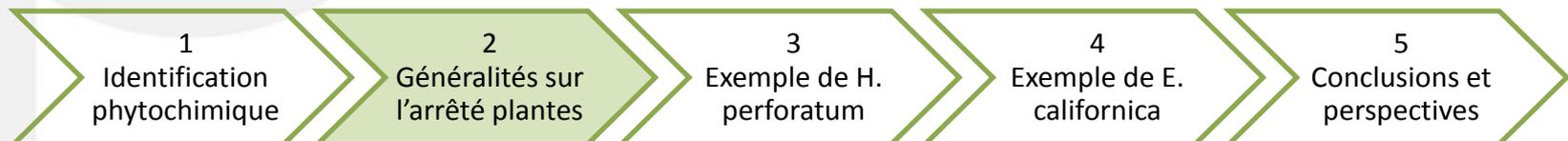
4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

Défauts de l'arrêté plantes : Substances à surveiller

Le dosage des substances à surveiller n'est pas toujours aisé.

Exemple *Lepidium meyenii* Walp. (Maca) : alcaloïdes type lepidiline, macaridine et beta-carboline.



APPLICATION SUR L'ESPÈCE *HYPERICUM PERFORATUM* L.



1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

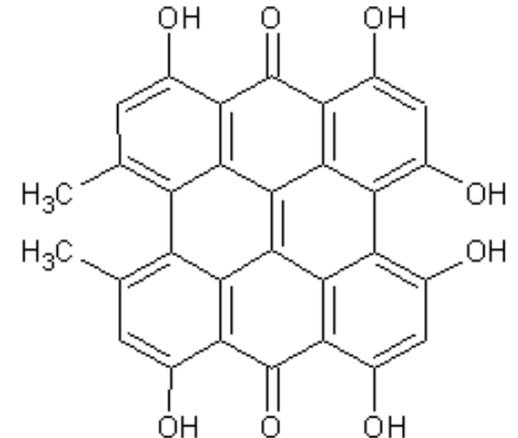
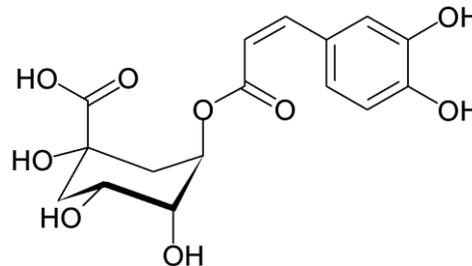
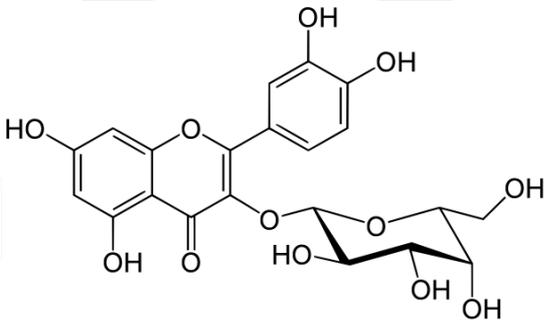
3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

Composition :

Le Millepertuis perforé contient majoritairement des naphtodianthrones comme l'hypéricine, de nombreux flavonoïdes comme l'hypéroside, des acides hydroxycinnamiques comme l'acide chlorogénique



1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

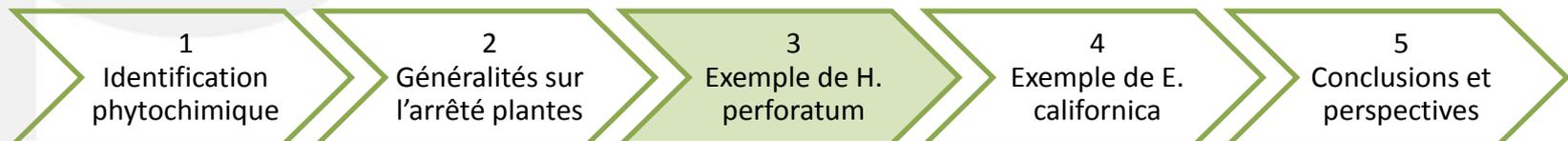
3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

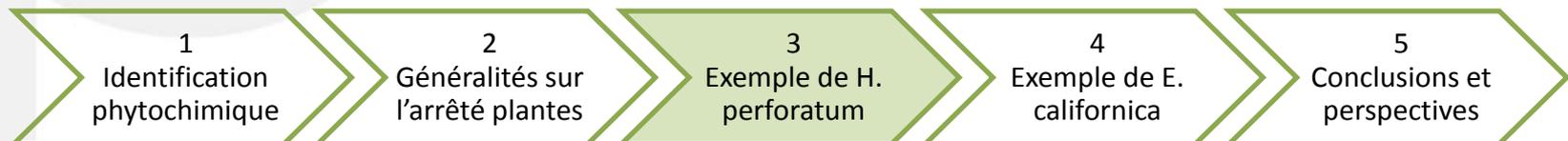
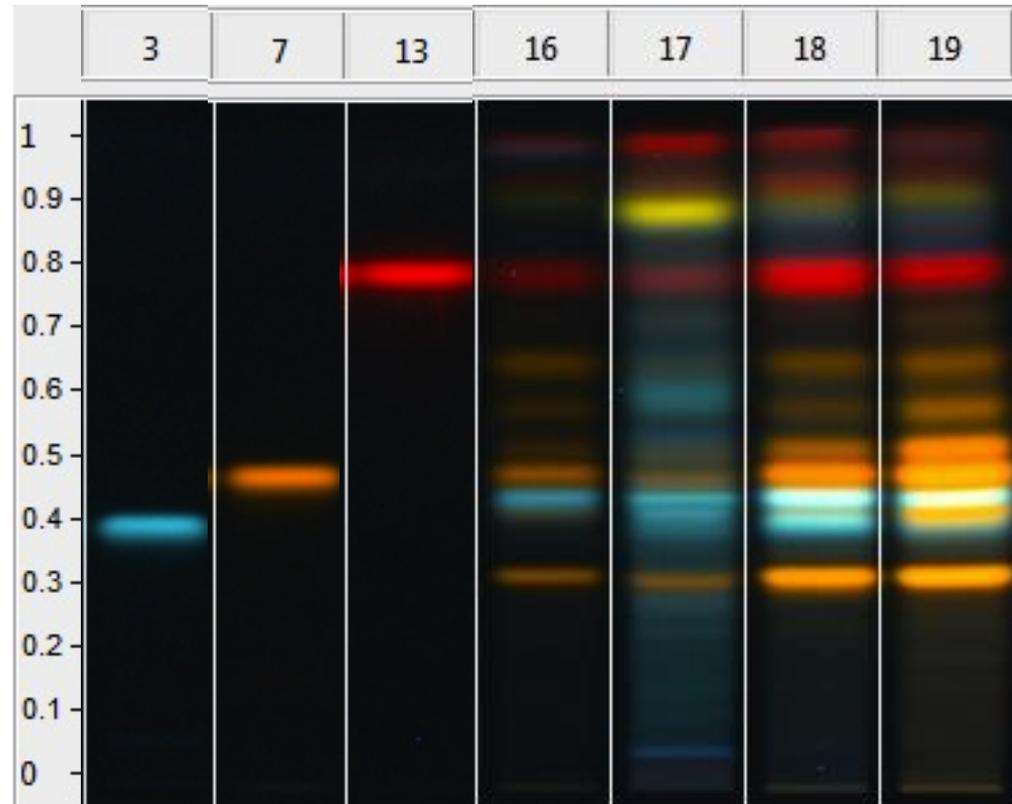
Exigences arrêté plantes :

- Identification des parties aériennes de *Hypericum perforatum* L.
- L'étiquetage doit recommander l'avis d'un médecin pour toute prise de médicaments en parallèle
- L'hypericine et l'hyperforine sont à surveiller

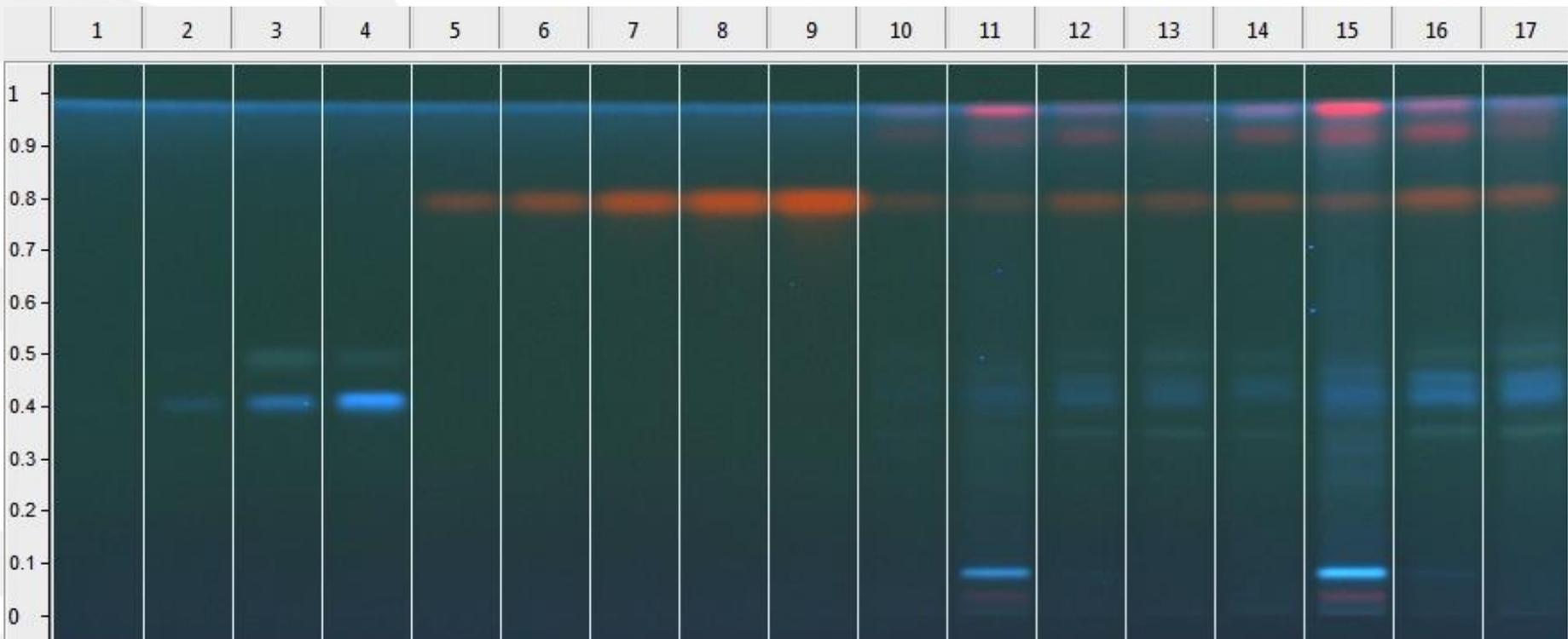


Méthode identification adaptée : Révélation polyphénols

- 3 : Acide chlorogénique
- 7 : Hypéroside
- 13 : Hypéricine
- 16 : *H. perforatum* BotaniCert
- 17 : *H. perforatum* CLIENT 1
- 18 : *H. perforatum* CLIENT 2
- 19 : *H. perforatum* CLIENT 3



Méthode dosage adaptée : sans révélateur



1
Identification
phytochimique

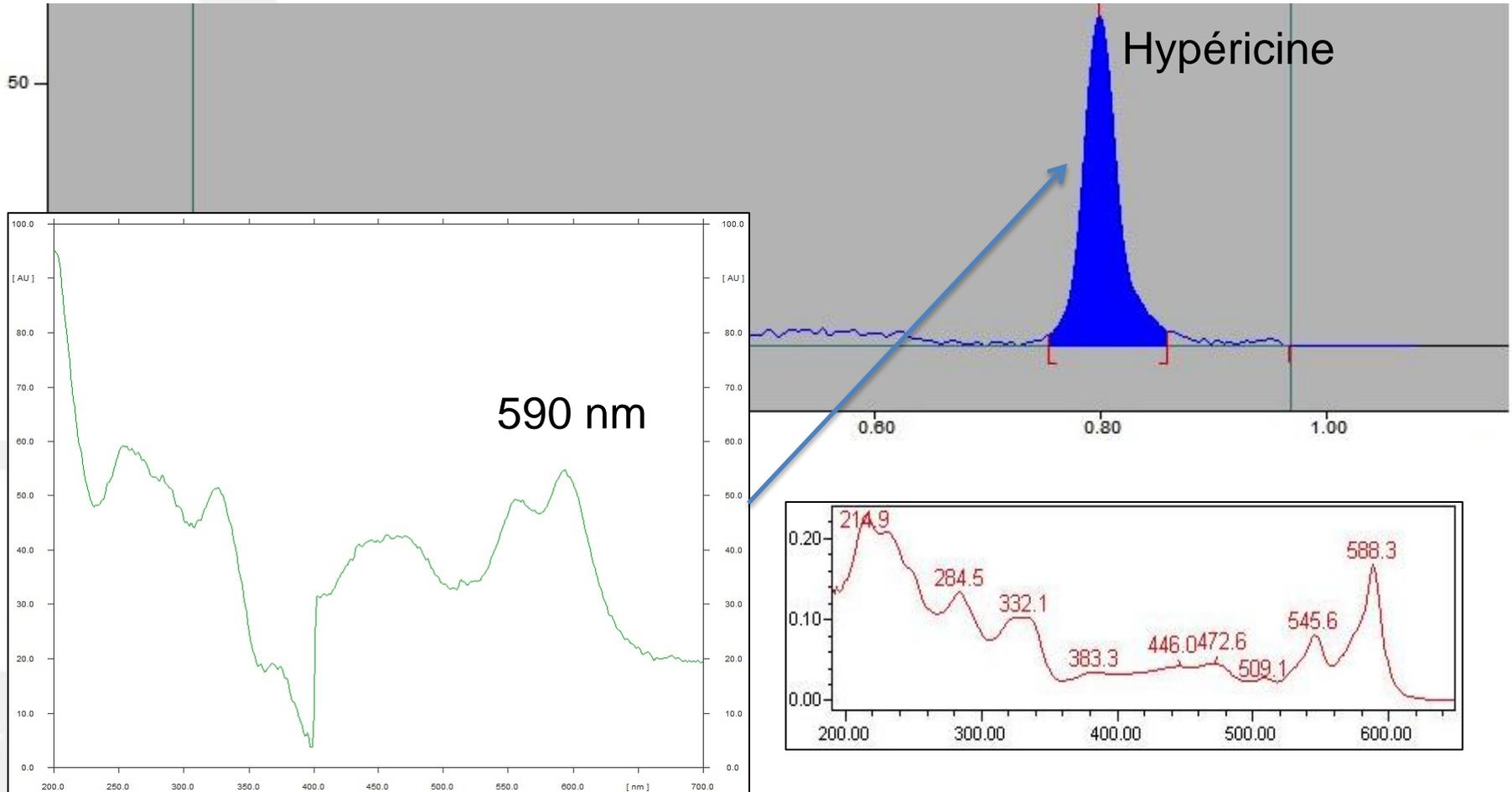
2
Généralités sur
l'arrêté plantes

3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal



1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

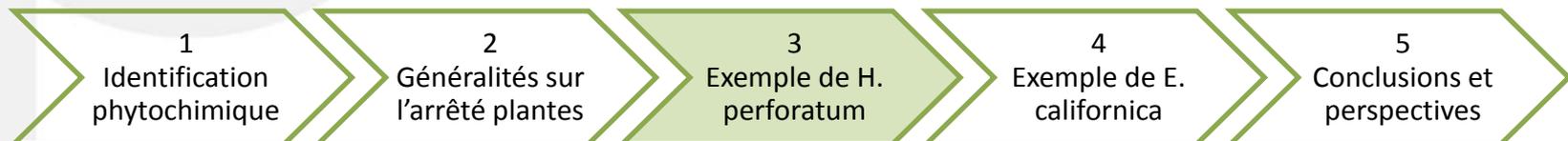
3
Exemple de *H.
perforatum*

4
Exemple de *E.
californica*

5
Conclusions et
perspectives

Inconvénient de passer uniquement par HPTLC-densitomètre :

- Méthodologie à respecter : dosage sans révéler puis révéler pour l'identification
- L'arrêté plante stipule de surveiller l'hypéricine et l'hyperforine qui présentent des structures très différentes. Deux méthodes différentes doivent être utilisées pour chaque substance
- Gamme de linéarité de chaque composé très faible



APPLICATION SUR L'ESPÈCE *ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA* CHAM.



1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

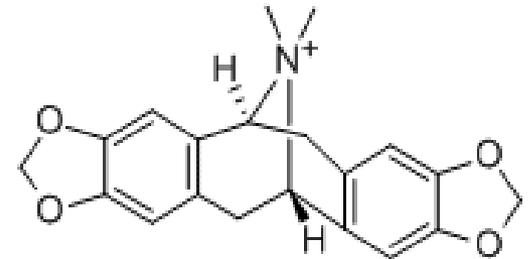
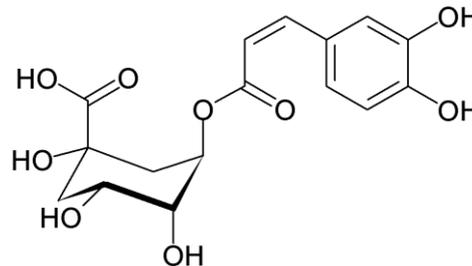
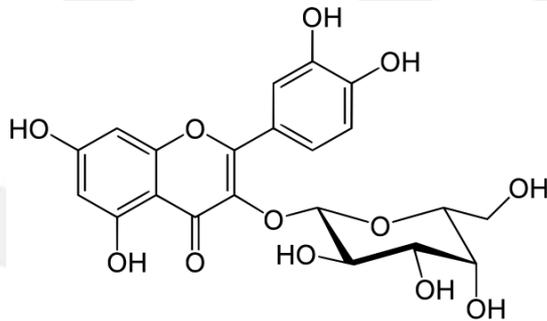
3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

Composition :

Le Pavot de californie renferme majoritairement des alcaloïdes isoquinoliniques comme la californidine, de nombreux flavonols dérivés de l'apigénine et de l'hypéroside, des acides hydroxycinnamiques comme l'acide chlorogénique



1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

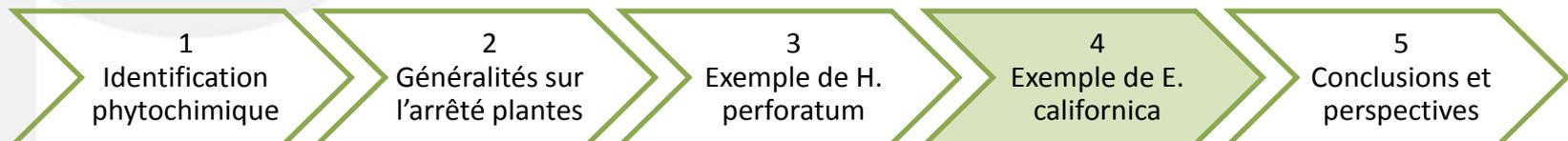
3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

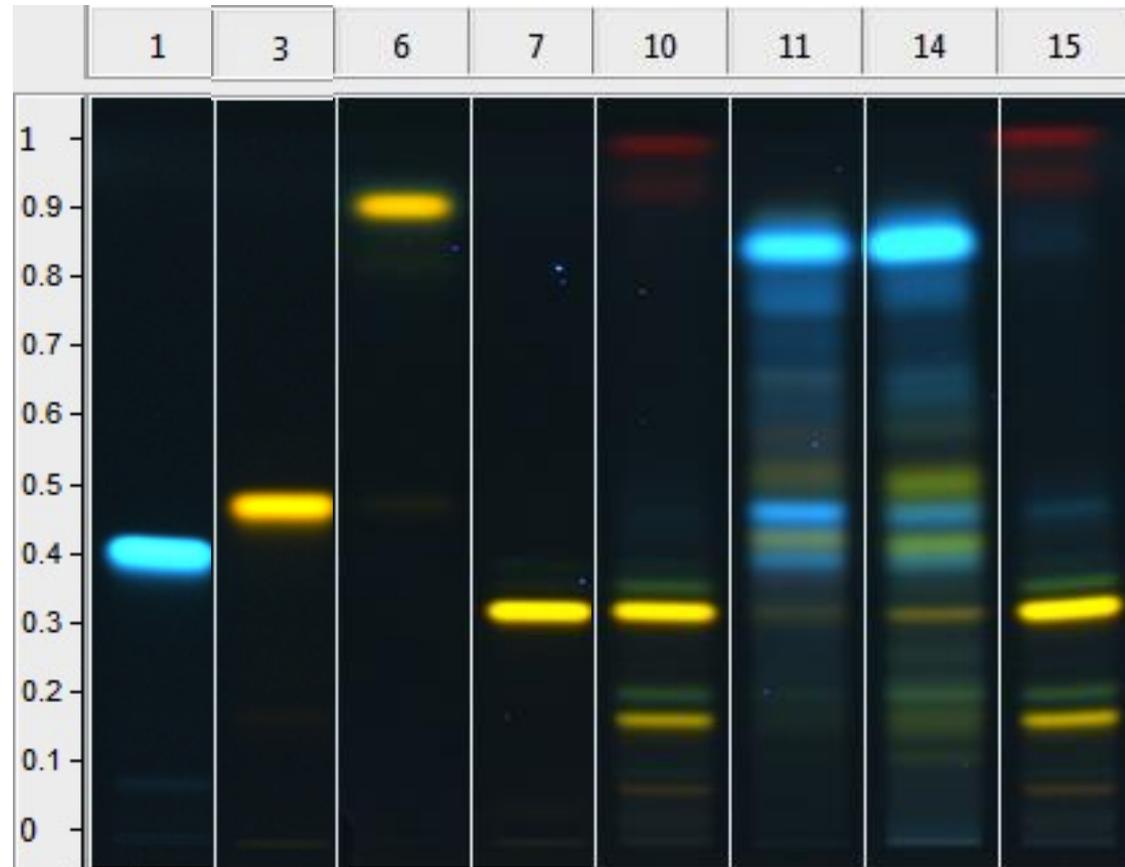
Exigences arrêté plantes :

- Identification des parties aériennes de *Eschscholtzia californica* Cham.
- Les alcaloïdes isoquinoliniques sont à surveiller en particulier la californidine



Méthode identification adaptée : Révélation polyphénols

- 1 : Acide chlorogénique
- 3 : Hypéroside
- 6 : Quercétine
- 7 : Rutine
- 10 : *E. californica* BotaniCert 1
- 11 : *E. californica* CLIENT 1
- 14 : *E. californica* CLIENT 2
- 15 : *E. californica* BotaniCert 2



1
Identification
phytochimique

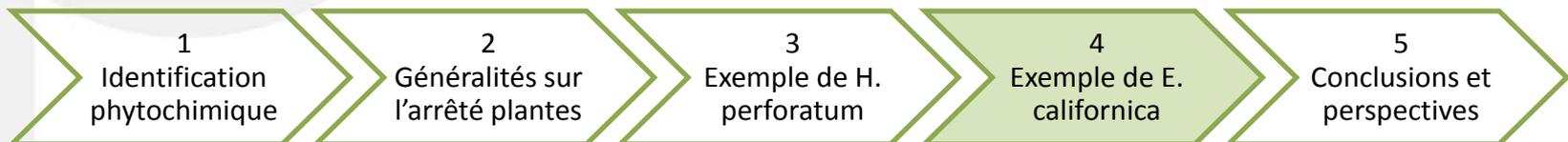
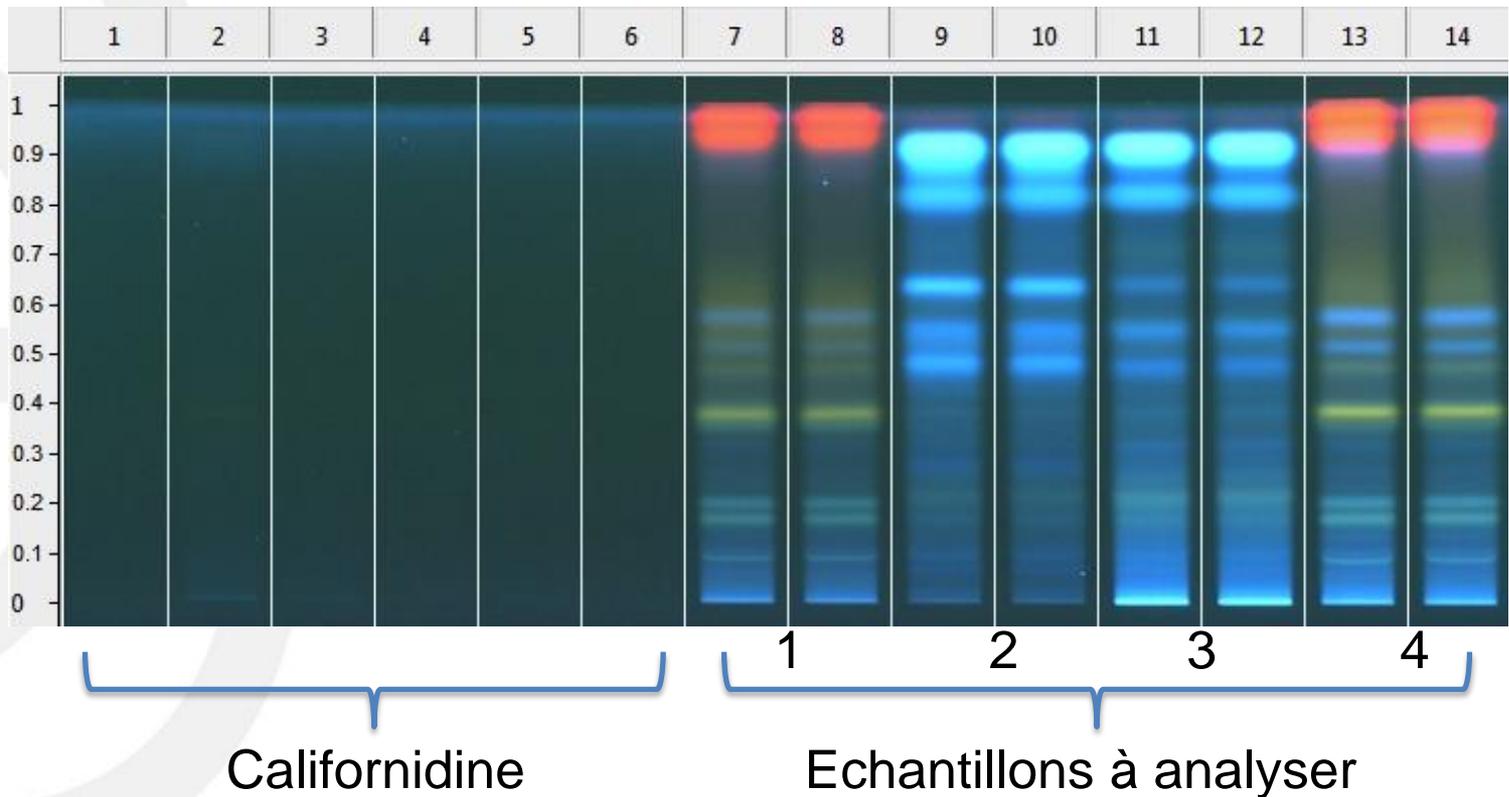
2
Généralités sur
l'arrêté plantes

3
Exemple de *H.*
perforatum

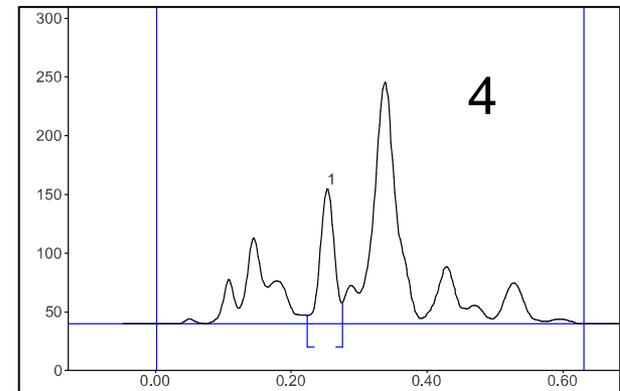
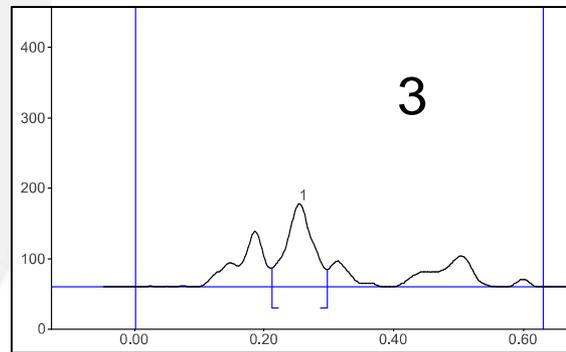
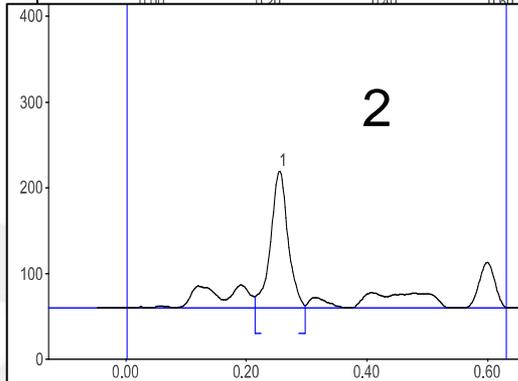
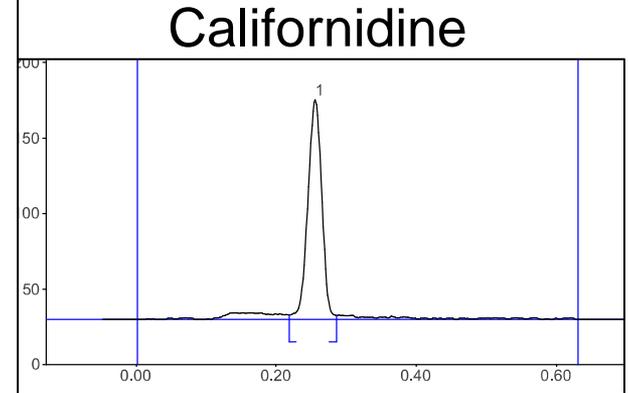
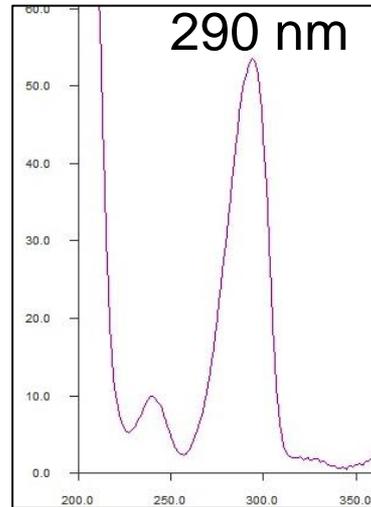
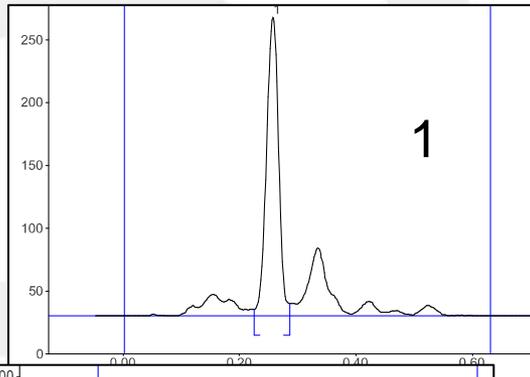
4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

Méthode dosage adaptée : sans révélateur



Retraitement:



1
Identification
phytochimique

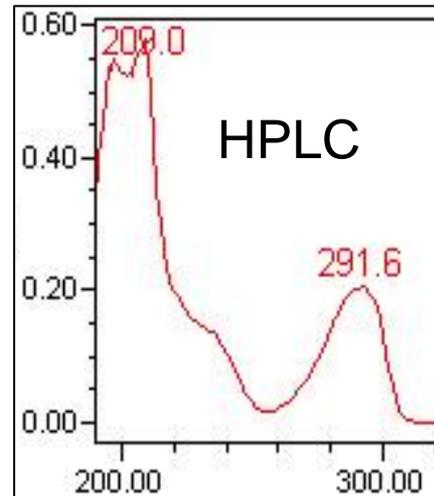
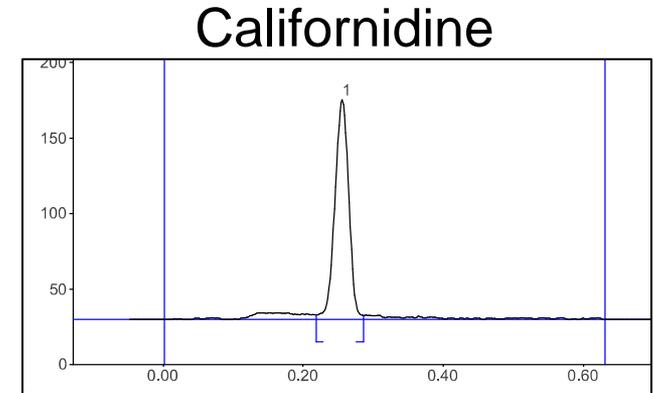
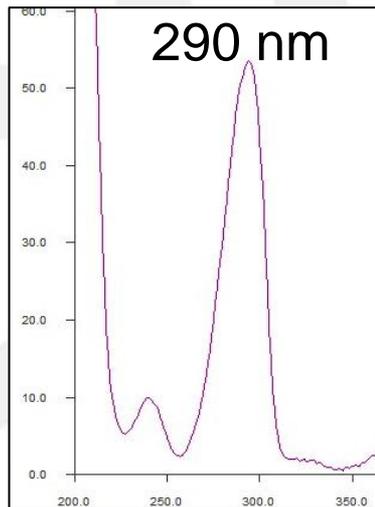
2
Généralités sur
l'arrêté plantes

3
Exemple de *H.
perforatum*

4
Exemple de *E.
californica*

5
Conclusions et
perspectives

Retraitement:



1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

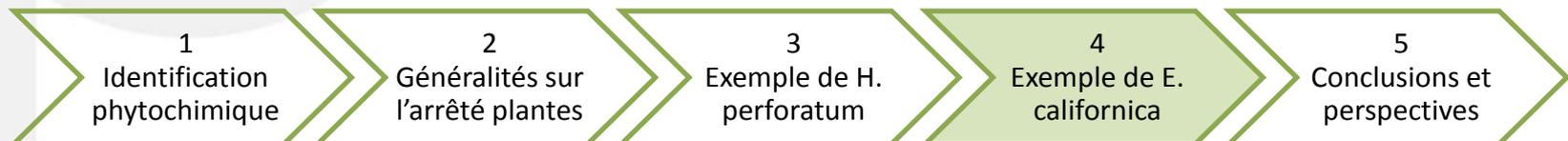
3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

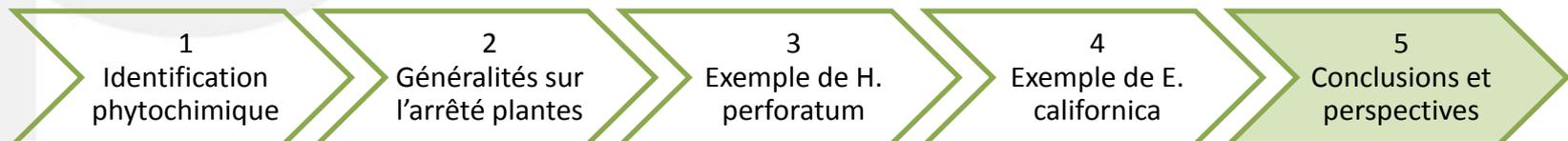
5
Conclusions et
perspectives

Inconvénient de passer uniquement par HPTLC-densitomètre :

- Méthodologie à respecter : dosage sans révéler puis révéler pour l'identification
- Gamme de linéarité de chaque composé très faible

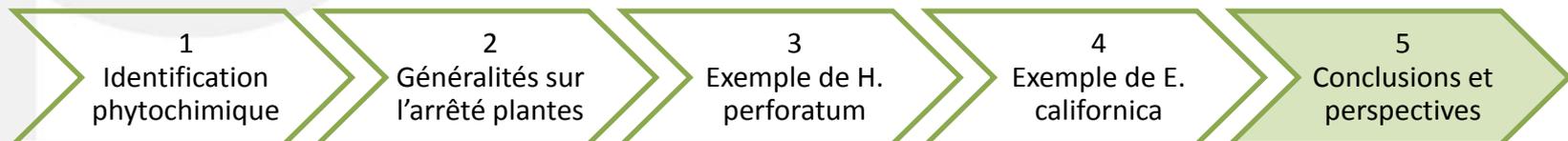


PERSPECTIVES ET CONCLUSION



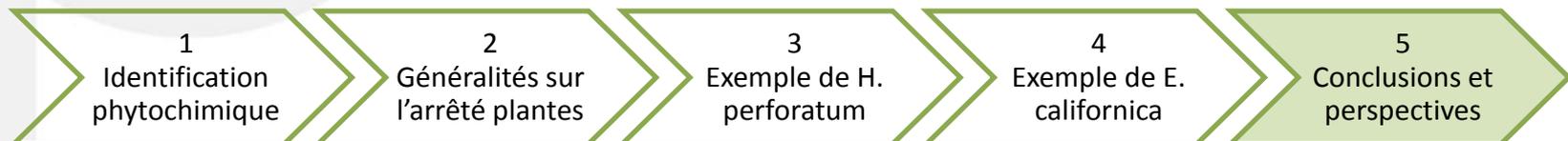
Avantages de l'HPTLC-densitomètre sur l'arrêté plantes :

- Méthode la plus efficace pour la comparaison de composition de différentes plantes : méthode très visuelle. Interprétation aisée pour toute personne.
- Dans certains cas, possibilité de réaliser le dosage et l'identification sur la même plaque
- Permet la détection de tout type de composés à l'aide des différents révélateurs (va plus loin que l'HPLC/UV)



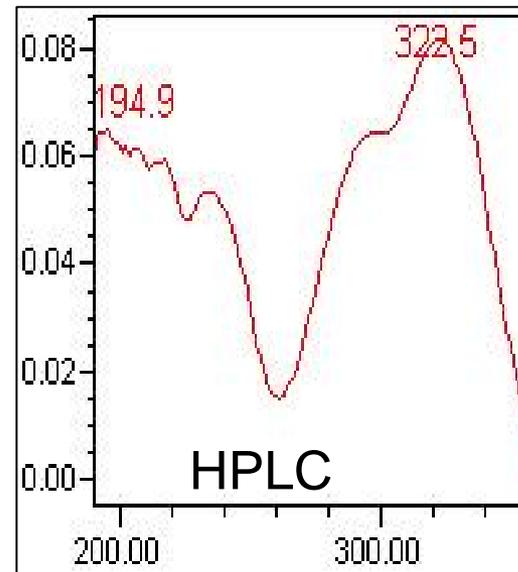
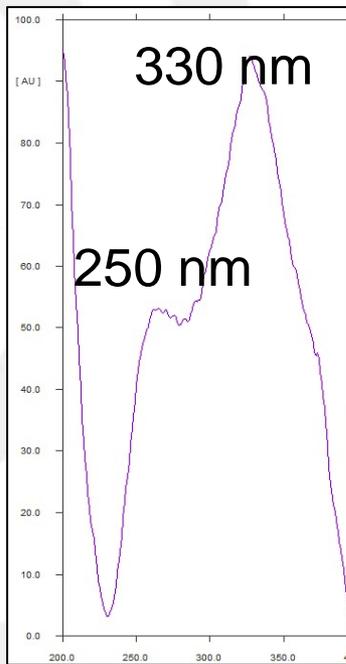
Inconvénients de l'HPTLC-densitomètre sur l'arrêté plantes :

- Parfois nécessaire de réaliser plusieurs méthodes différentes pour doser deux composés différents dans le même produit.
- Résolution plus faible qu'en HPLC
- Gamme de linéarité plus faible qu'en HPLC : nécessité de lancer plusieurs plaques pour entrer dans la droite d'étalonnage. Pour un chromophore, plus difficile de mettre en œuvre par rapport à l'HPLC/UV
- Spectres UV moins bien résolus qu'en HPLC/UV



Inconvénients de l'HPTLC-densitomètre sur l'arrêté plantes :

- Spectres UV moins bien résolus qu'en HPLC/UV



1
Identification
phytochimique

2
Généralités sur
l'arrêté plantes

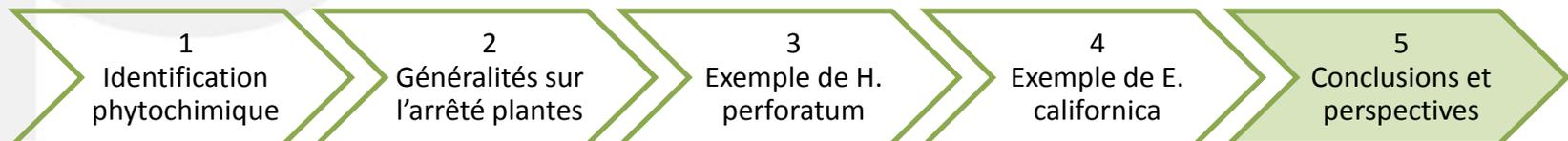
3
Exemple de *H.*
perforatum

4
Exemple de *E.*
californica

5
Conclusions et
perspectives

Matériels adaptés à l'analyse de plantes :

- Comparaison de composition de différentes plantes : **HPTLC**
- Dosage de chromophores : **HPLC/UV**
- Dosage de non chromophores : **HPLC/MS** et **HPTLC-Densito**
- Métabolomique : **HPLC/UV** et **HPLC/MS**





MERCI POUR VOTRE ATTENTION



**Loïc LOFFREDO, QUALITY@BOTANICERT.COM
TECHNICAL DIRECTOR**