



Avantages et limites de l'analyse HPTLC-MS par élution sur des extraits de plantes, résultats préliminaires

Institut de Chimie de Nice
UMR 7272 CNRS-UNS

APSM

Métabolome et Valorisation de la
Biodiversité Végétale



- 1 Professeur (X. Fernandez)
- 2 Maîtres de conférences
- 1 Post-doc
- 7 Doctorants
- 1 Ingénieur d'études
- 2 Stagiaires M2



Valorisation de la Biodiversité Végétale

Phytochimie

Extraction
Criblage phytochimique
Tests d'activité biologique
Caractérisation moléculaire

↳ Actifs cosmétiques,
pharmaceutiques

Ecologie Chimique

Interaction plante-insecte
Interaction plante-nématode
Identification de bouquet
odorant
Caractérisation d'éliciteur

Archéo-chimie

Histoire de matières premières
naturelles
Parfums antiques
Extraction et analyse d'objets
anciens
Reconstitutions

Métabolomique



Identification de biomarqueurs


Valorisation de la Biodiversité Végétale



Phytochimie


Extraction
Criblage phytochimique
Tests d'activité biologique
Caractérisation moléculaire


↳ Actifs cosmétiques,
pharmaceutiques

Projet SOLIDAGES (2013)  
Ingrédient naturel pour soin bucco-dentaire

Projet CHANEL (2014) 
Développement d'ingrédient cosmétique naturel

Projet NATUBAVAL (2015)  
Nouveau conservateur cosmétique naturel

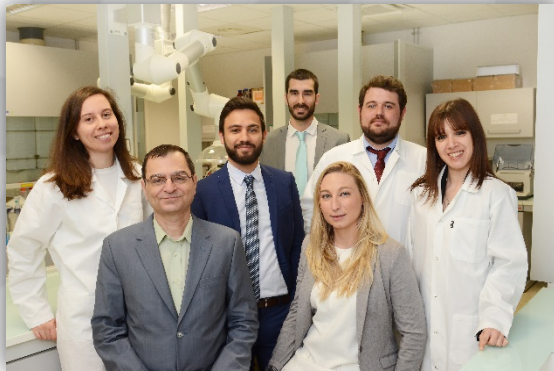
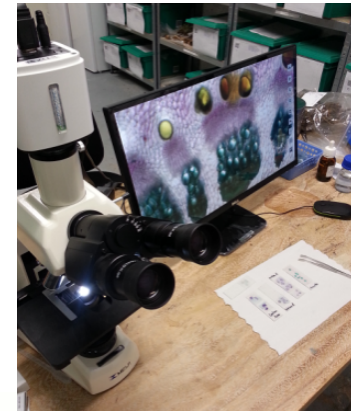
Projet OCCITANE (2016) 
Développement d'ingrédient cosmétique naturel

Projet JYTA (2017) 
Nouveaux actifs cicatrisants naturels

- Entreprise créée en 2011 : pépinière Innovagrasse



- Equipe de 7 personnes
- Identification botanique : > 1000 références internes
- Dosage de métabolites secondaires
 - Industrie pharmaceutique
 - Industrie cosmétique
 - Industrie agroalimentaire

 NATUREX LABORATOIRES
JUVA SANTÉ

Pierre Fabre



LABORATOIRES YVES PONROY

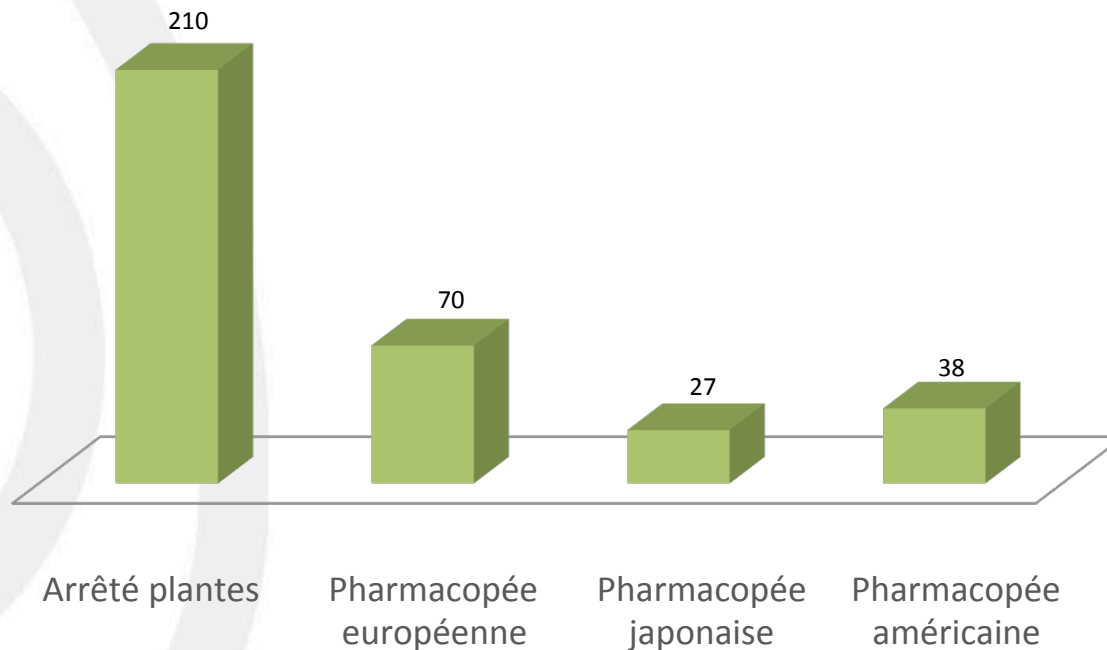


« Développement de méthodologies analytiques innovantes de caractérisation de plantes d'intérêt dans le domaine des compléments alimentaires - Mise en place de banques de données, purification et caractérisation de marqueurs spécifiques »



- Nouvelles exigences réglementaires : arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi
 - Identification de la plante au travers de marqueurs chimiotaxonomiques définis par les pharmacopées ou autre marqueurs pertinents
 - Quantification des substances dites « à surveiller »

Arrêté plantes du 24 juin 2014

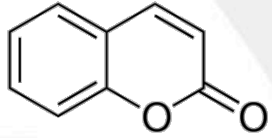


Nombre de plantes possédant des substances à surveiller et ayant une monographie dans 3 pharmacopées majeures

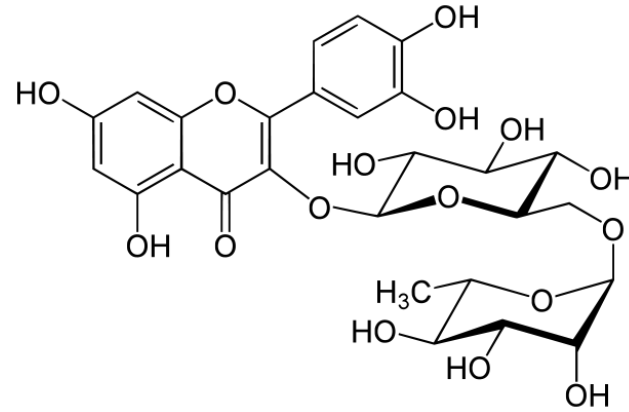
Potentiel Interface MS

- Absence de prélèvement manuel
- Caractérisation de bande inconnue : corrélation littérature

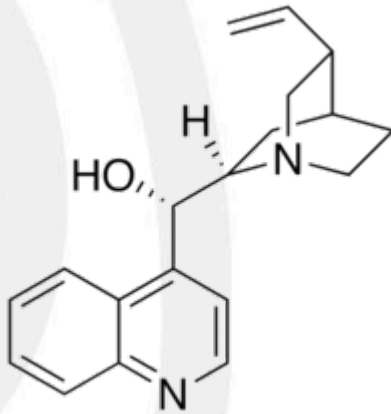




Coumarine



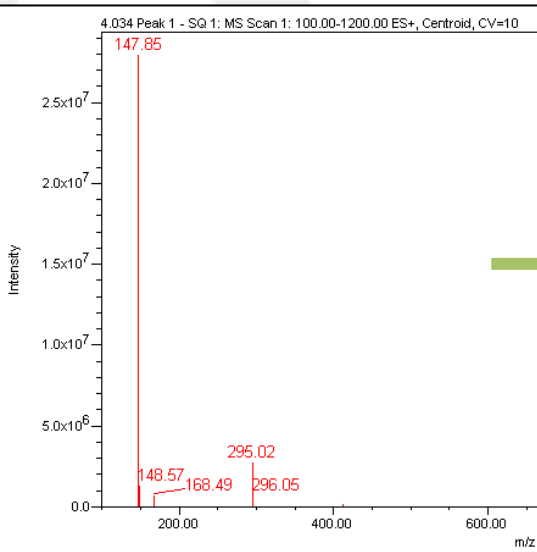
Rutine



Cinchonine

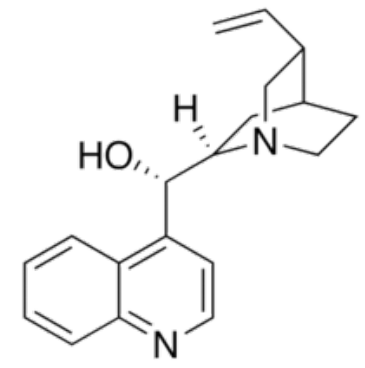
→ Solutions mères à ~200 µg/mL

Application	Cinchonine	Coumarine	Rutine
2,5 µL	500 ng	575 ng	475 ng
0,6 µL	120 ng	138 ng	114 ng
0,3 µL	60 ng	69 ng	57 ng

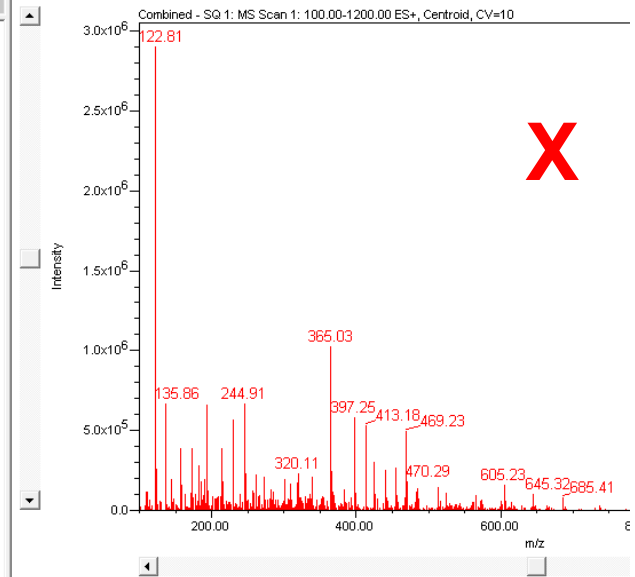
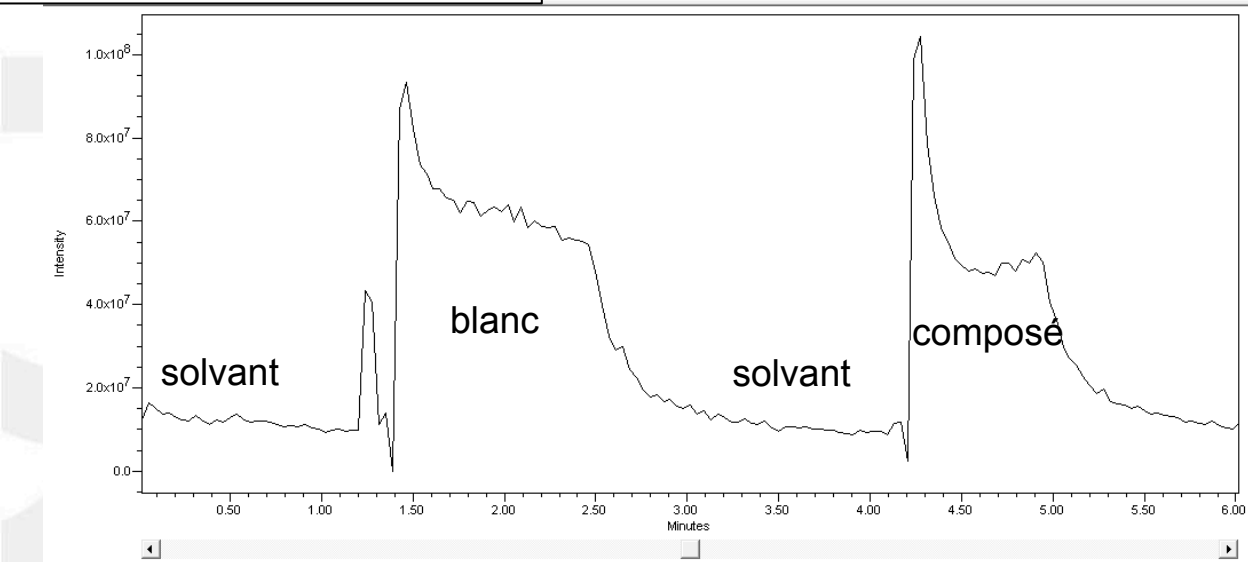


Sur plaque HPTLC Silice classique

[M+H⁺] m/z 295.02
Frag. m/z 147.85

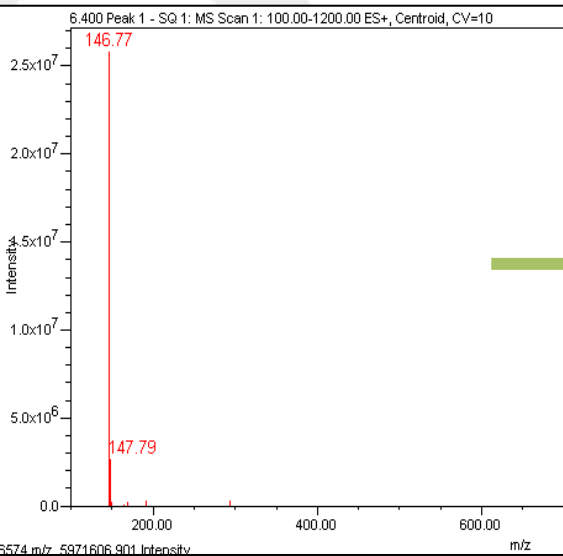


Cinchonine 500 ng



X

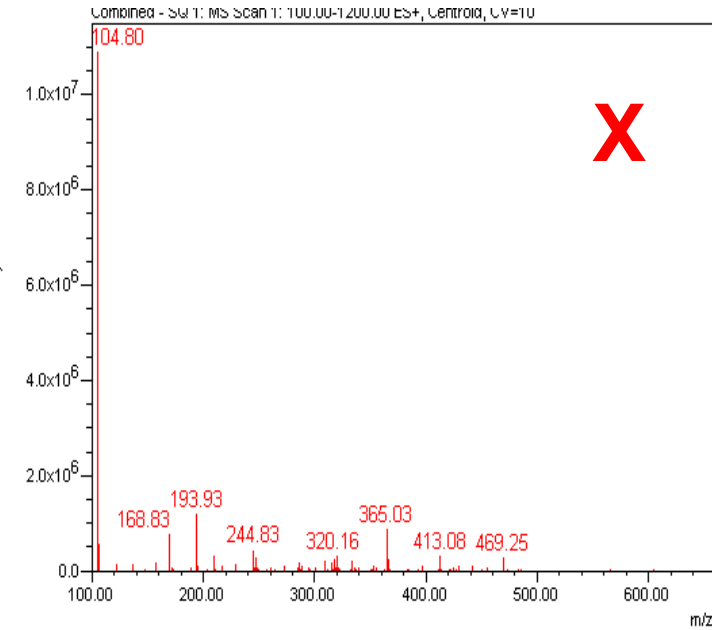
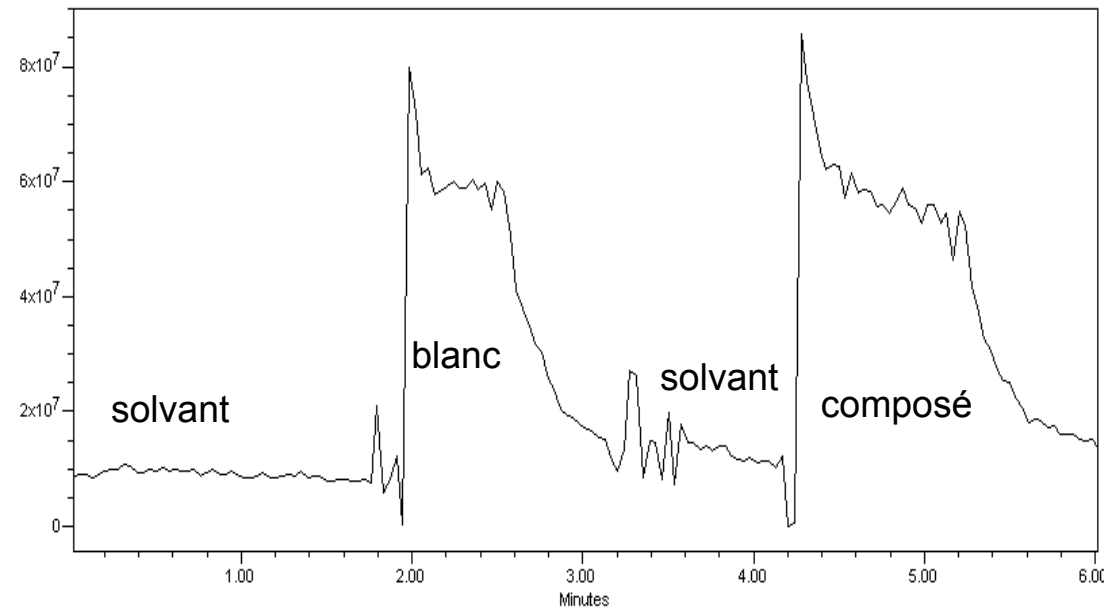
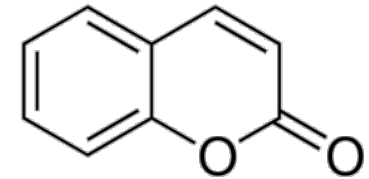
ACN/H₂O + 0,05 % HCOOH - 0,2 mL/min - SQD Waters



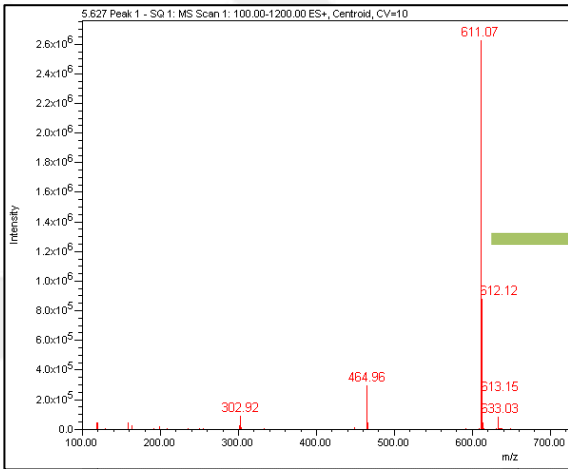
Sur plaque HPTLC Silice classique

[M+H⁺] m/z 146.77

Coumarine 575 ng



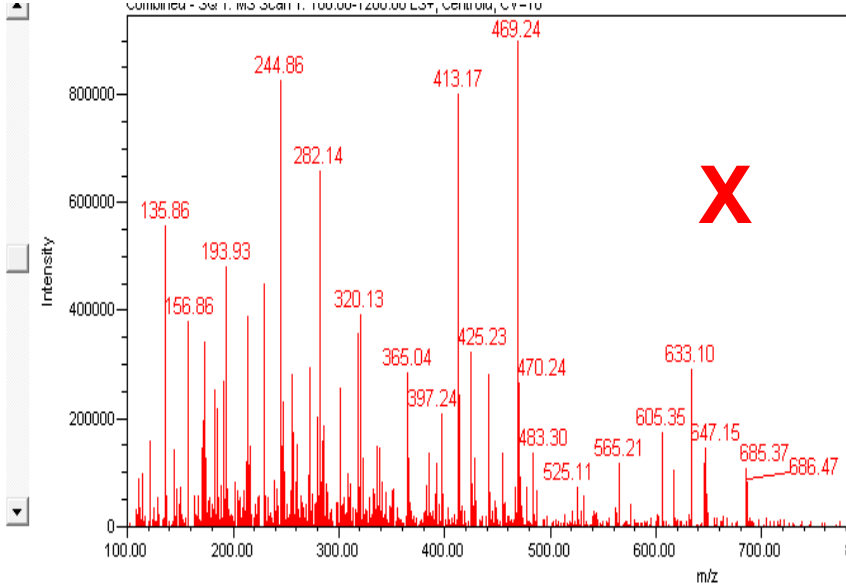
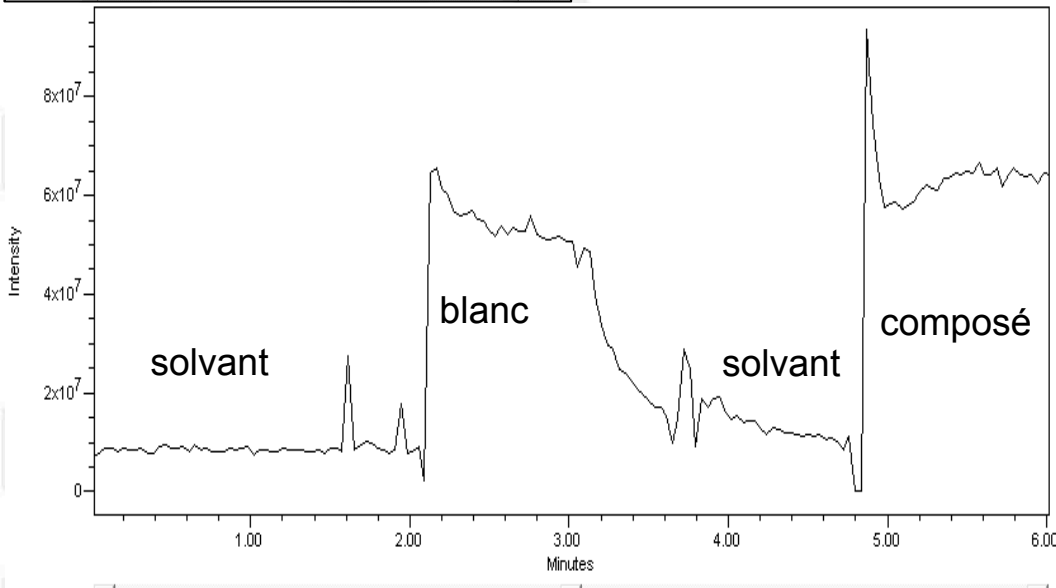
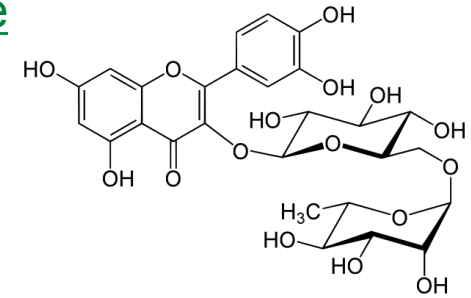
ACN/H₂O + 0,05 % HCOOH - 0,2 mL/min - SQD Waters



Sur plaque HPTLC Silice classique

[M+H⁺] m/z 611.07

Rutine 475 ng



ACN/H₂O + 0,05 % HCOOH - 0,2 mL/min - SQD Waters

Sur plaque HPTLC Silice classique

Absence de signal sur plaque HPTLC classique

Problème de soustraction du bruit de fond ?

Contact Waters

Source contaminée ?

Analyse par LC/MS satisfaisante

Tête de prélèvement bouchée ?

Essais à réaliser !

Sur plaque HPTLC Silice classique

Vérification de la tête de prélèvement

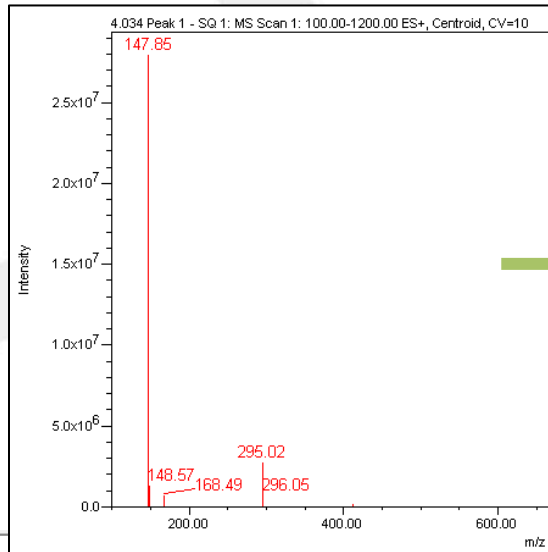
LC/MS

- 1) Coumarine 4 $\mu\text{g/mL}$
- 2) Analyse LC/PDA
- 3) Aire de $8 \cdot 10^4$ mAu

IMS/LC/MS

- 1) Coumarine 40 000 $\mu\text{g/mL}$
- 2) 0,1 μL appliqué = 4 μg
- 3) Prélèvement spot par IMS
→ 1 mL récolté = solution à 4 $\mu\text{g/mL}$
- 4) Analyse LC/PDA
Aire: $2 \cdot 10^4$ mAu

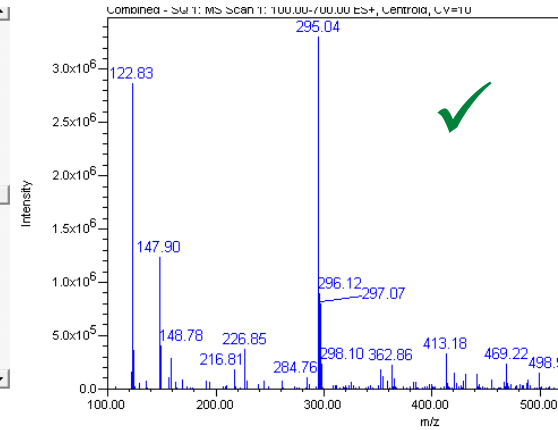
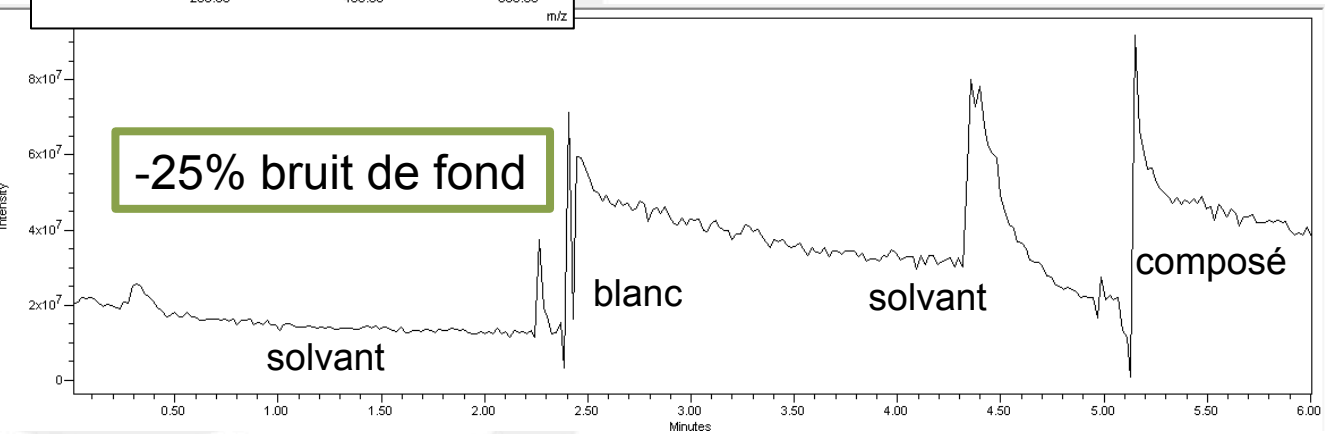
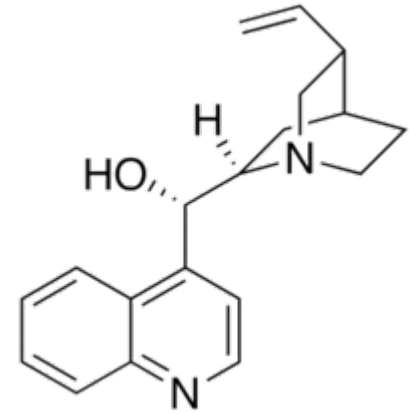
→ 4 fois moins de signal



Sur plaque HPTLC Silice MS Grade

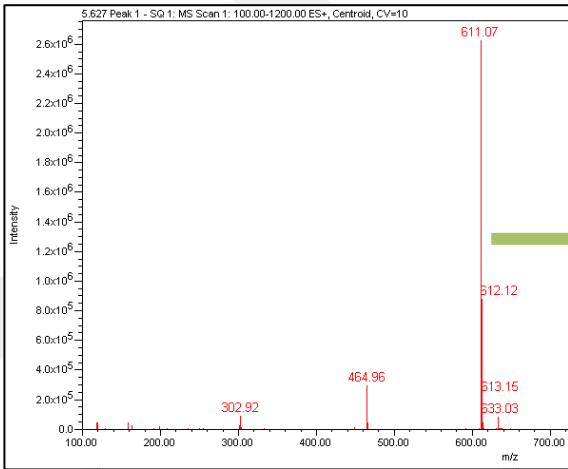
[M+H⁺] m/z 295.02
Frag. m/z 147.85

Cinchonine 60 ng

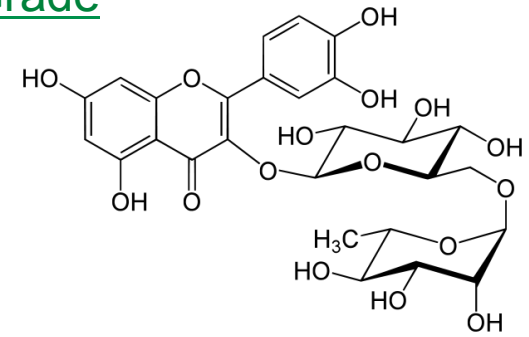


ACN/H₂O + 0,05 % HCOOH - 0,2 mL/min - SQD Waters

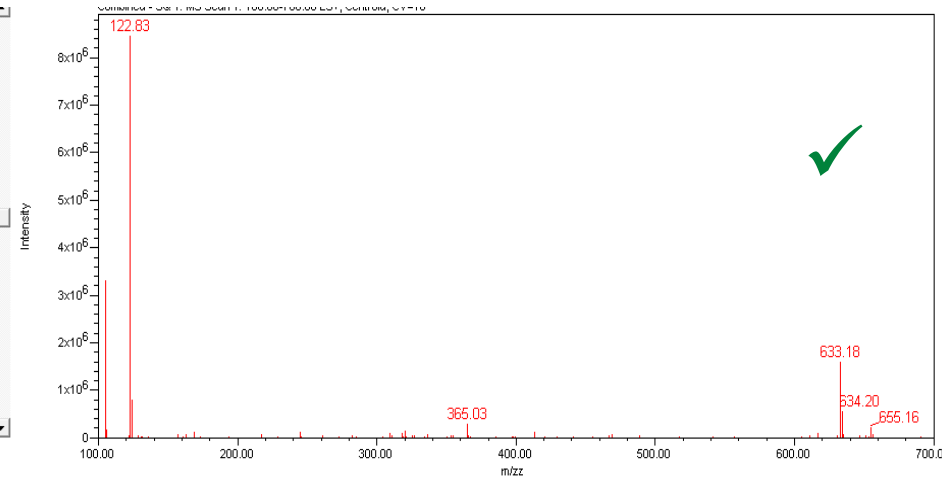
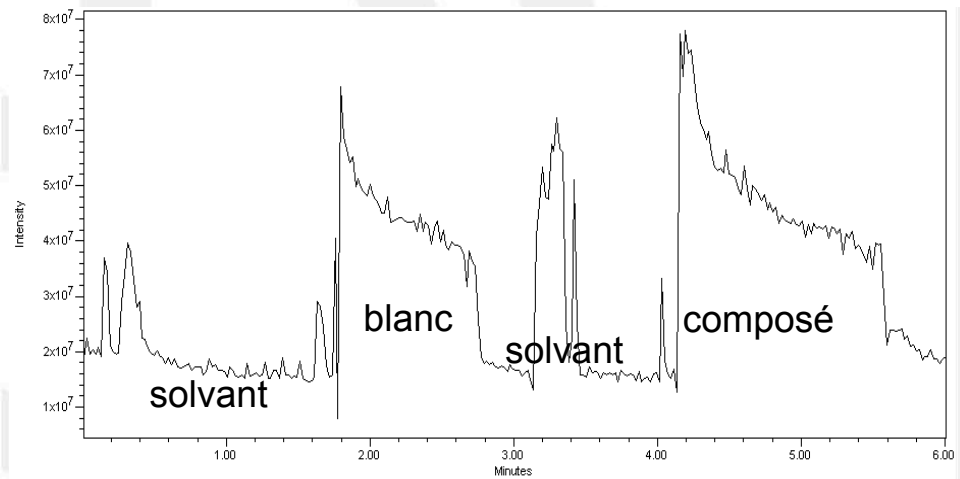
Sur plaque HPTLC Silice MS Grade



[M+Na⁺] m/z 633.03

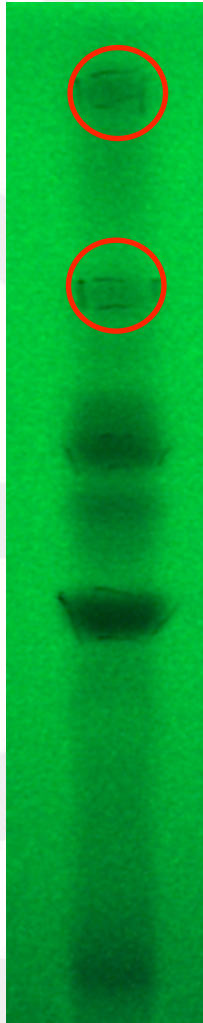


Rutine 475 ng



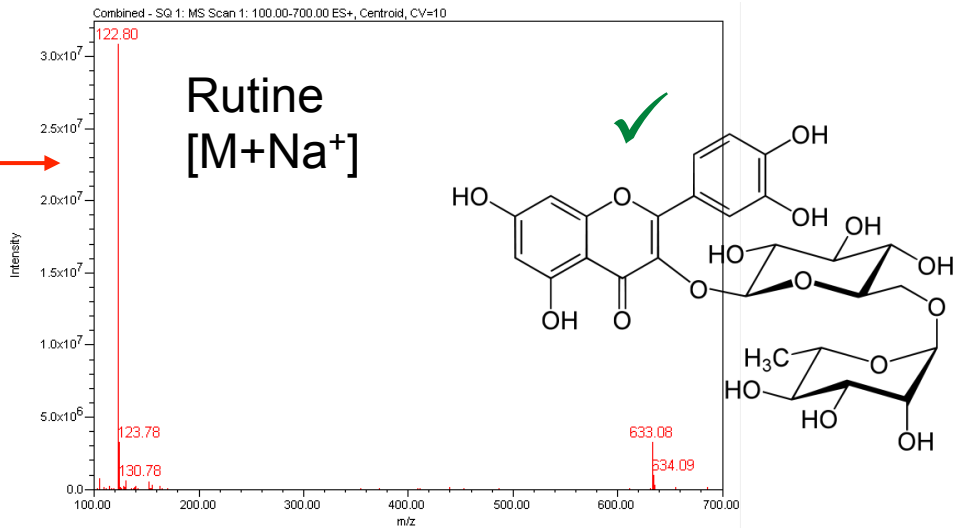
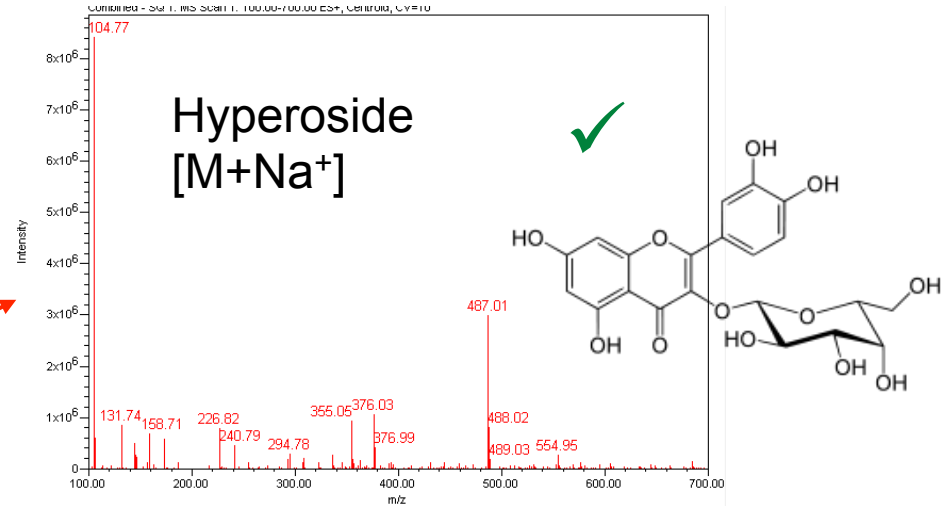
ACN/H₂O + 0,05 % HCOOH - 0,2 mL/min - SQD Waters

Extrait sec *Hypericum perforatum* L.



X

X

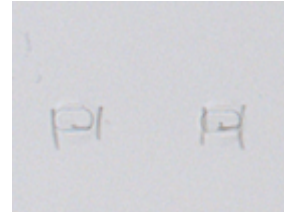


1 μL solution à 10%
100/11/11/26

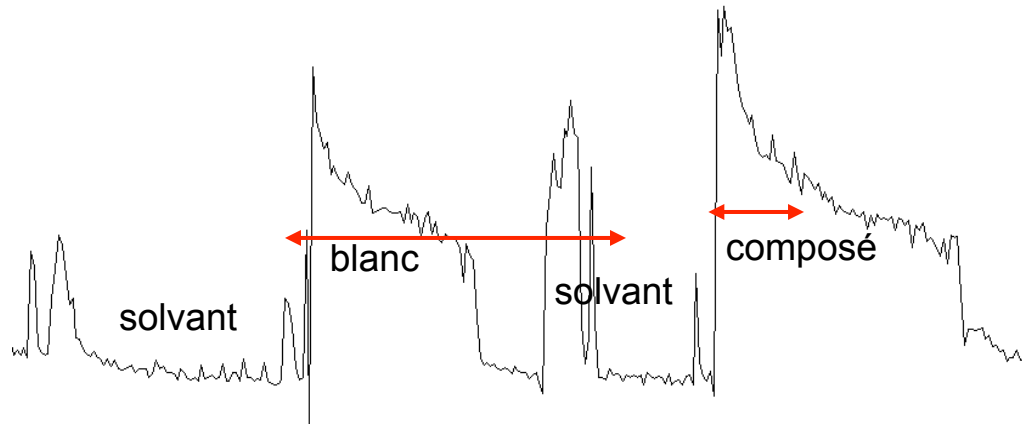
AcOEt/CH₃COOH/HCOOH/H₂O

Conseils mode opératoire:

- Nettoyage de la tête de prélèvement avant chaque prélèvement de spot



- Run classique:
 - 1 min solvant
 - 1 min blanc
 - 1 min solvant
 - 1 min spot



- Retraitement des résultats: soustraction à mi hauteur de chaque pic
- Privilège aux plaques *MS grade* : attention quantité appliquée limitée et R_s

Remerciements

Pr. Xavier Fernandez - *Professeur des Universités, responsable MVBV*

Dr. Francis Hadji-Minaglou - *CEO, Botanicert*

Loïc Loffredo - *Directeur Technique, Botanicert*



UNIVERSITÉ D'AVIGNON
ET DES PAYS DE VAUCLUSE





Merci pour votre attention