





## "Quantification de molecules bioactives naturelles et leurs caractérisations par HPTLC-MS"

Dr. DA SILVA David

## INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE (UMR7311, Université d'Orléans)



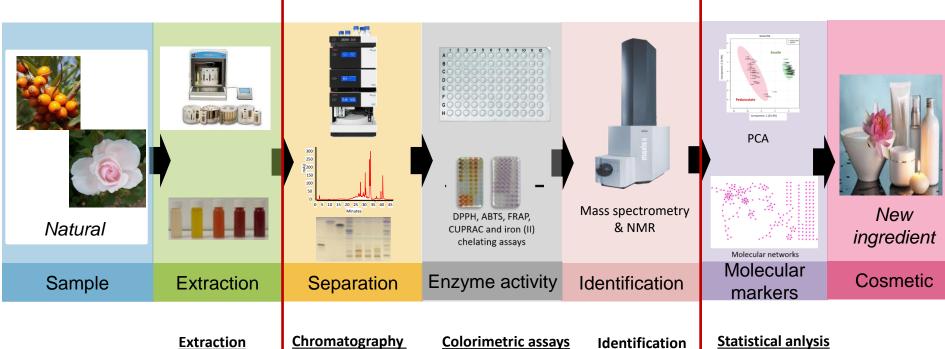
CLUB de CCM - 20 ans de Chromacim

Montpellier, 07 juillet 2022



## STRATEGIES ANALYTIQUES







- Microwave
- Pressurized liquid extraction
- Supercritical fluid extraction
- Liquid (UHPLC)
- Thin layer (HPTLC)
- Gas (GC)
- Supercritical fluid (SFC)
- Centrifugal Partition (CPC)
- Capillary electrophoresis (CE)

- DPPH, ABTS
- FRAP, CUPRAC
- Tyrosinase
- Elastase
- Collagenase

#### Enzyme immobilisation

- QTOF-HRMS
- TQ-MS
- MALDI-TOFMS
- ACP
- ACH
- PLS-DA
- Molecular Networking



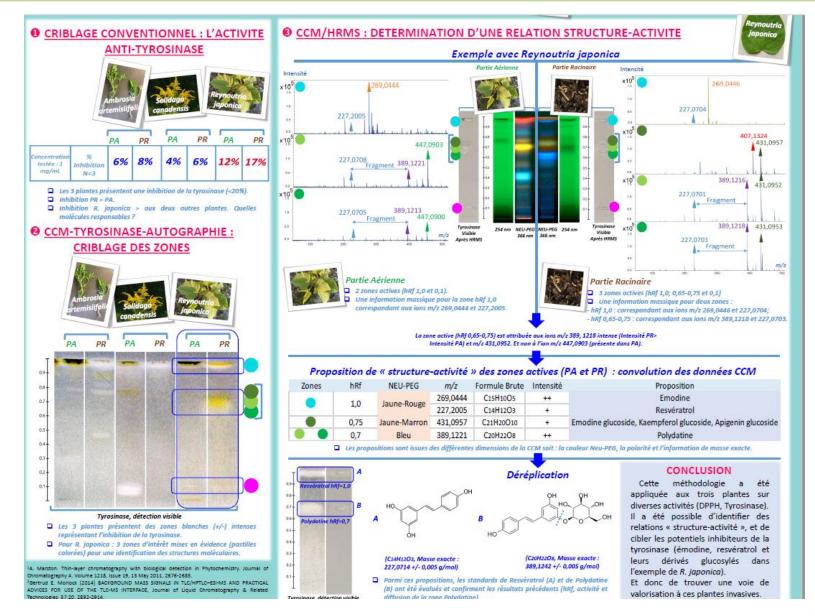
Exemples de l'apport de la CCM ou TLC



## Apport de "l'hyphenation" avant la quantification :



#### **HPTLC@Tyrosinase-ESI-Q-TOFMS**

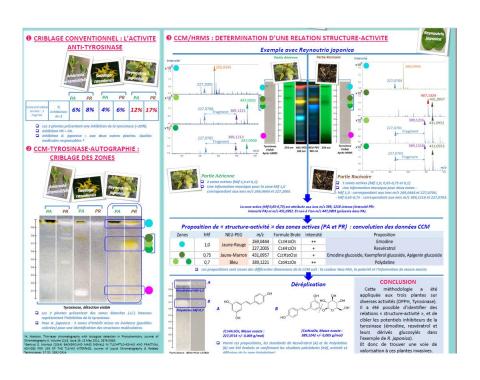


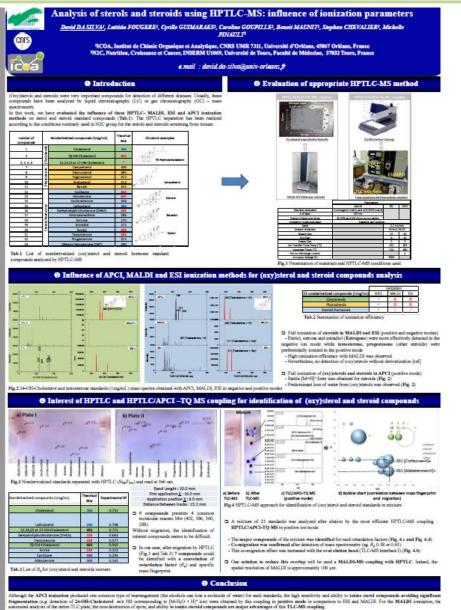


### Apport de "l'hyphenation" avant la quantification :



#### **HPTLC-UV-MS**





This optimized TLC-MS coupling proves its interest through fast characterization of sterol and steroid in complex extracts.



## Apport de "l'hyphenation" avant la quantification :



#### **HPTLC-UV-APCI-TQMS**

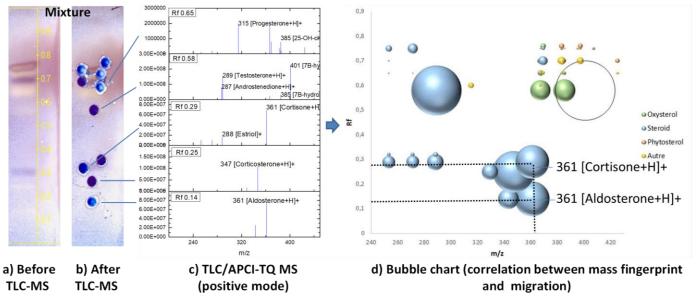


Fig.4 HPTLC-MS approach for identification of (oxy)sterol and steroid standards in mixture

- ☐ A mixture of 23 standards was analyzed after elution by the most efficient HPTLC-MS coupling : **HPTLC/APCI-TQ MS** in positive ion mode
  - The major compounds of the mixture was identified for each retardation factors (Fig. 4.c and Fig. 4.d)
  - Co-migration was confirmed after detection of mass spectrometry (eg.  $R_F$  0.58 or 0.65)
  - This co-migration effect was increased with the oval elution head (TLC-MS interface I) (Fig. 4.b)
- □ One solution to reduce this overlap will be used a MALDI-MS coupling with HPTLC. Indeed, the spatial resolution of MALDI is approximately 100 μm.

## Projet 1

# <u>Caractérisation de l'activité enzymatique de l'Invertase et criblage de substrats naturels</u>







Problématique pour nos collègues biochimistes

Mise en place d'une approche quantitative par HPTLC-UV

Mise en place d'une approche de criblage TLC-UV-MALDI-MS



## Quantification de l'activité catalytique de l'enzyme Invertase



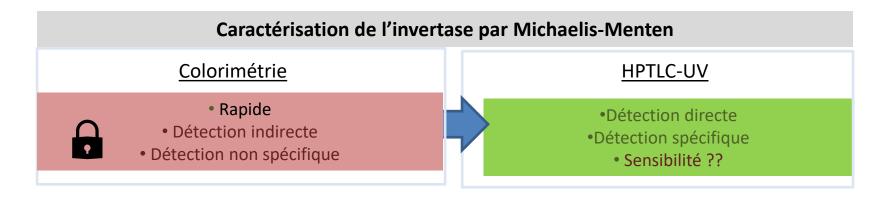


#### ☐ Apport de la chromatographie sur couche mince?



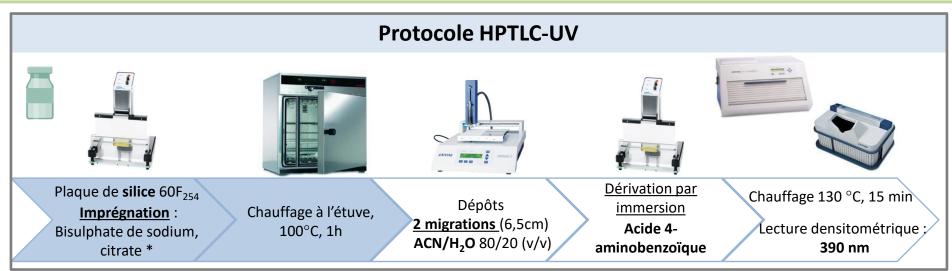
- Enzyme : invertase (8-fructosidase), hydrolyse spécifique du saccharose

#### Hydrolyse du saccharose par l'invertase CH<sub>2</sub>OH CH<sub>2</sub>OH *Invertase* HO ĊH₂OH ÒН **Sucrose** Glucose **Fructose** $M = 342,29 \text{ g.mol}^{-1}$ $M = 180,16 \text{ g.mol}^{-1}$ $M = 180,16 \text{ g.mol}^{-1}$ Substrat **Produit Produit**





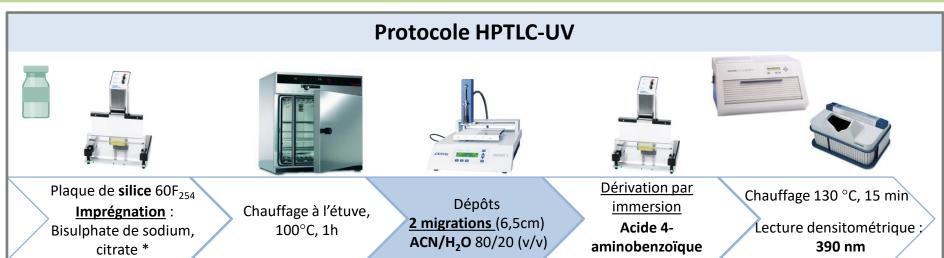




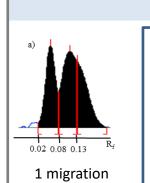
<sup>\*</sup> Ghebregzabher et al. and Fell

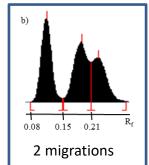


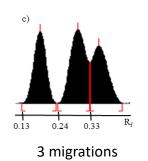




<sup>\*</sup> Ghebregzabher et al. and Fell





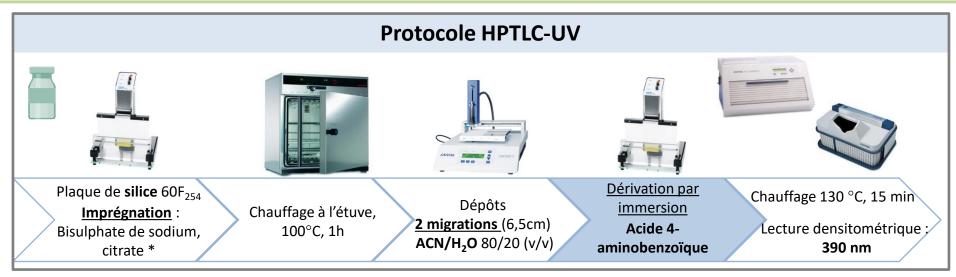


## **Optimisations**

- > Pas de gain avec 3 migrations
- 2 migrations pour un gain de 10 minutes



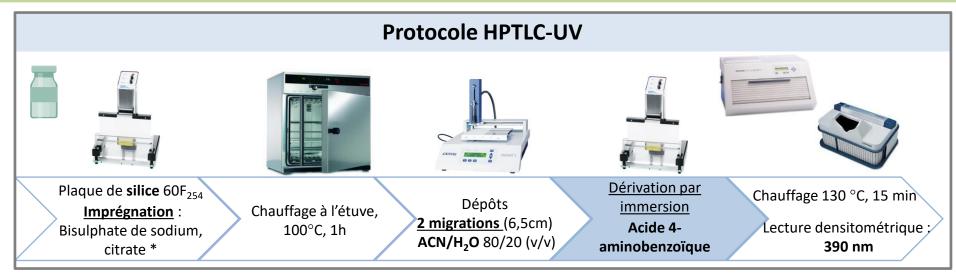




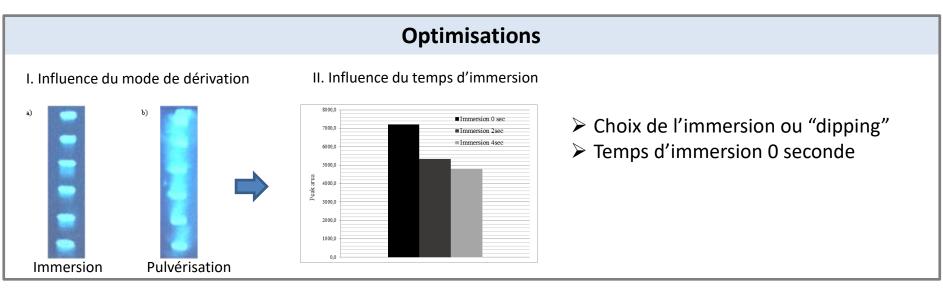
<sup>\*</sup> Ghebregzabher et al. and Fell





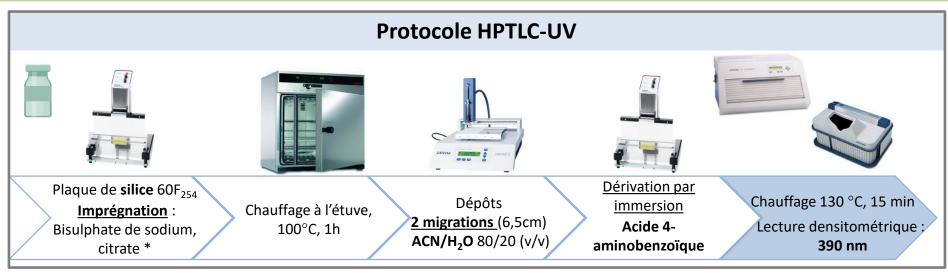


<sup>\*</sup> Ghebregzabher et al. and Fell





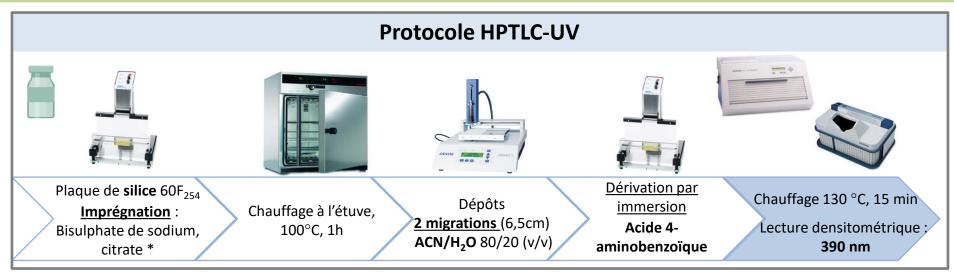




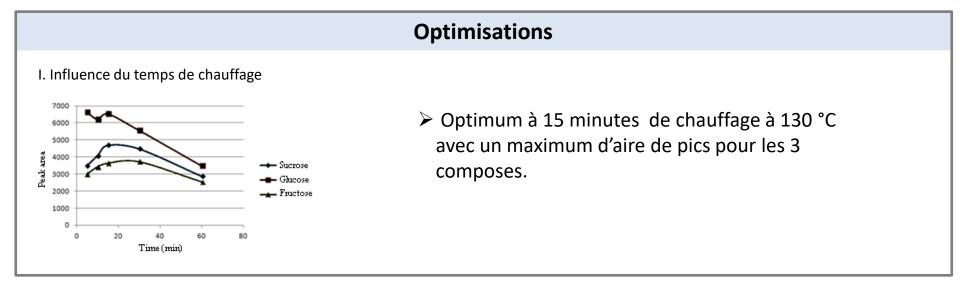
<sup>\*</sup> Ghebregzabher et al. and Fell







<sup>\*</sup> Ghebregzabher et al. and Fell



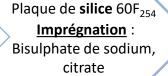


## Validation du protocole HPTLC-UV (ICH Q2(R1))



### **Protocole HPTLC-UV**







Chauffage à l'étuve, 100°C, 1h



Dépôts 2 migrations (6,5cm) ACN/H<sub>2</sub>O 80/20 (v/v)



<u>Dérivation par</u> <u>immersion</u> **Acide 4**-

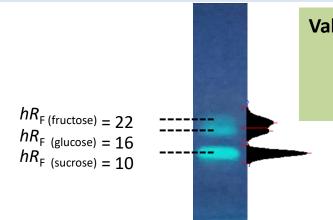
Acide 4aminobenzoïque



Chauffage 130 °C, 15 min

Lecture densitométrique 390 nm

#### Résultats



Validation de méthode (ICH guidelines Q2(R1))

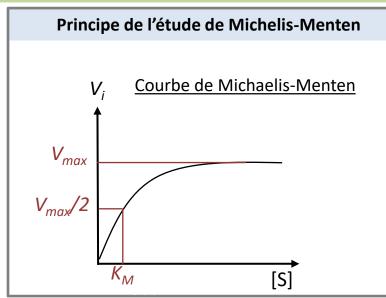
- Spécificité, précision, robustesse, limites de quantification et de détection (RDS <20%)
- LOD 20 ng/spot et LOQ 60 ng/spot
- harmonisation for better healt
- ✓ Séparation suffisante pour une approche quantitative
- √ Faisabilité de la caractérisation enzymatique

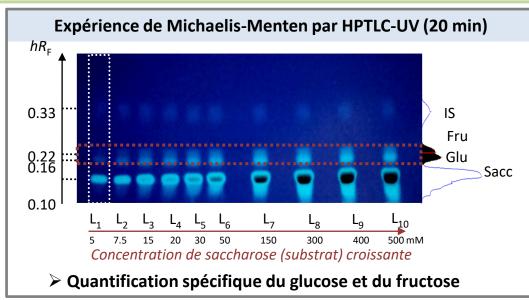
[1] FEREY J., Da SILVA D., J Chrom A, 2016, 1477, 108-113

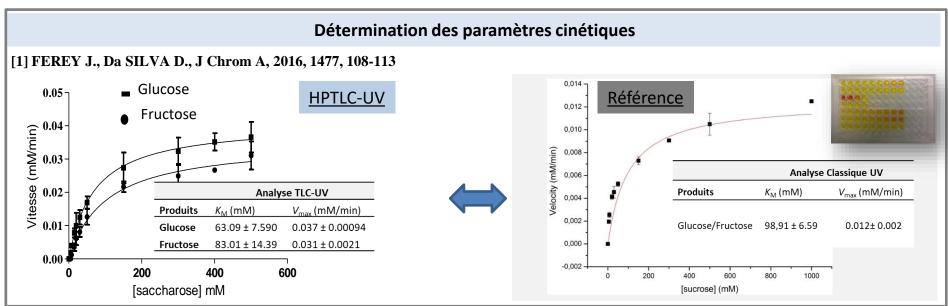


### Caractérisation Michaelis-Menten de l'invertase par HPTLC-UV









# <u>Caractérisation de l'activité enzymatique de l'Invertase et criblage de substrats naturels</u>



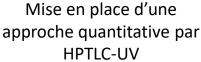






Problématique pour nos collègues biochimistes

ľ



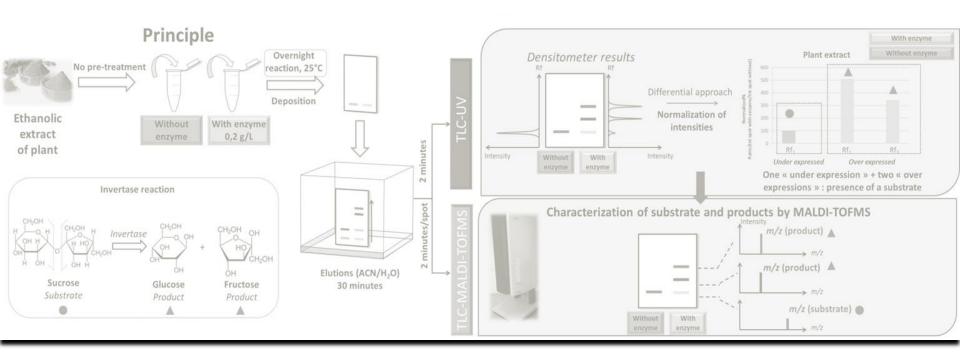


Mise en place d'une approche de criblage HPTLC-UV-MALDI-MS



## Criblage de <u>substrats de l'invertase</u> - extraits de plante





#### Enjeux

#### **HPTLC-UV**

- Séparation d'isomères (glucose/fructose)
- Quantification des sucres
- Estimation de sur- et de sous-expressions de tâches
- Dérivation (faibles LD et LQ): analyses de traces

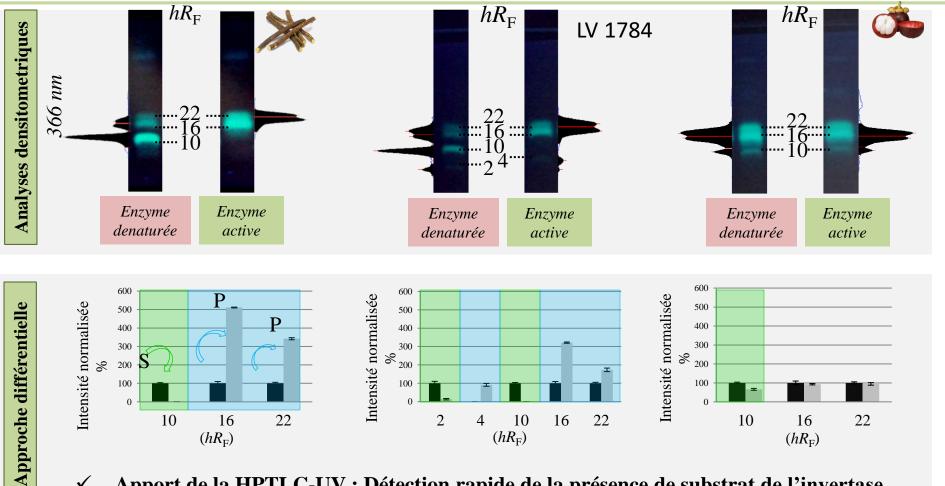
#### HPTLC-MALDI (choix d'une matrice)

- Résolution spatiale du laser MALDI (10-20 μm)
- •<u>Ionisation de petites molécules</u> (interférences matrice MALDI)
- Compatible à l'analyse TLC-UV non ciblée



## Criblage de <u>substrats de l'invertase</u> - extraits de plante





Apport de la HPTLC-UV : Détection rapide de la présence de substrat de l'invertase

Apport du couplage HPTLC-MALDI : empreinte massique du substrat et des produits ?

 $(hR_{\rm F})$ 

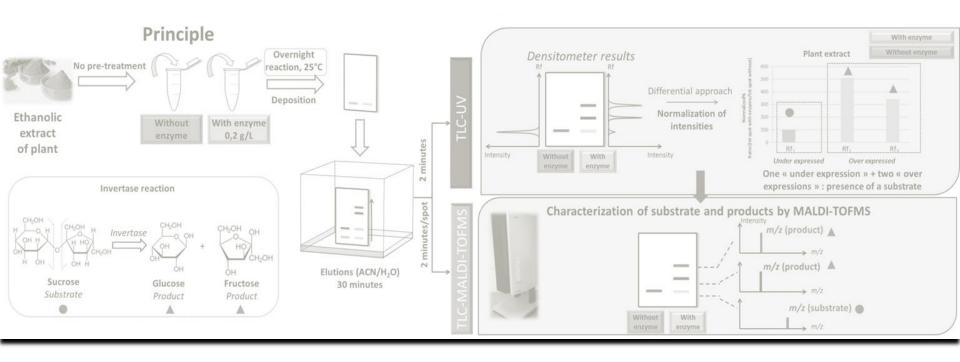
 $(hR_{\rm F})$ 

 $(hR_{\rm F})$ 



## Criblage de <u>substrats de l'invertase</u> - extraits de plante





#### **Enjeux**

#### **HPTLC-UV**

- Séparation d'isomères (glucose/fructose)
- Quantification des sucres
- Estimation de sur- et de sous-expressions de tâches
- Dérivation (faibles LD et LQ): analyses de traces

#### HPTLC-MALDI (choix d'une matrice)

- Résolution spatiale du laser MALDI (10-20 μm)
- •<u>Ionisation de petites molécules</u> (interférences matrice MALDI)
- Compatible à l'analyse TLC-UV non ciblée

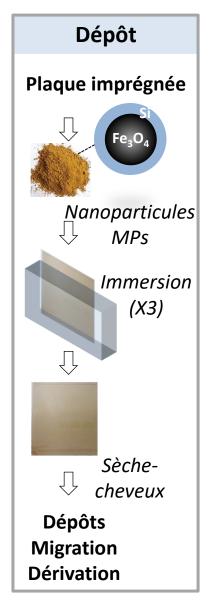


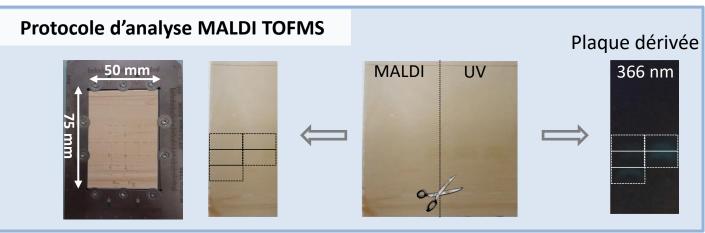
## Choix de la matrice MALDI : compatibilité avce l'analyse HPTLC-UV ?

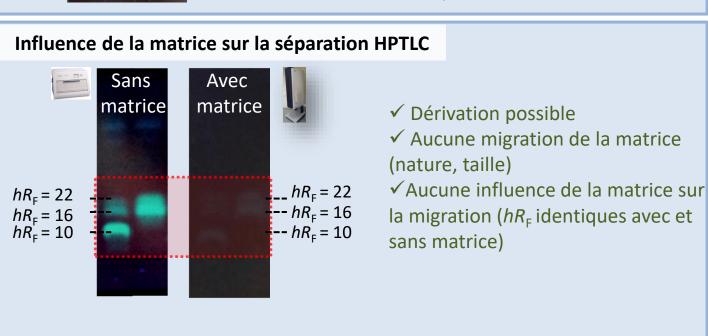




### <u>Objectif</u>: conservation de la séparation par HPTLC



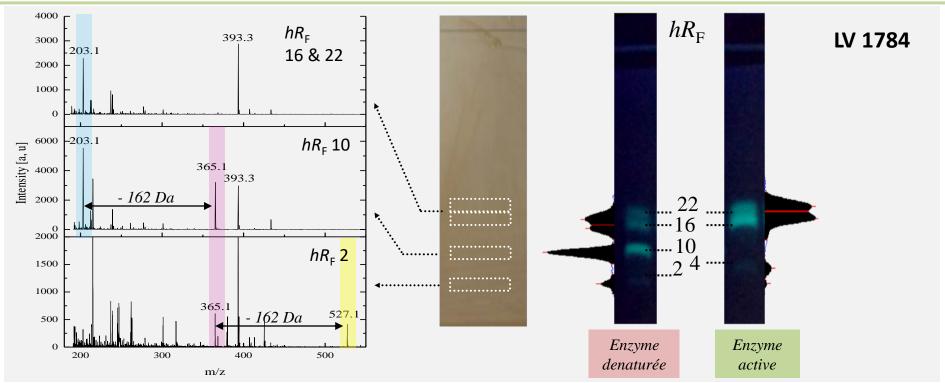






## **Identification des substrats: HPTLC-MALDI-TOFMS**





Spectres de masse du LV 1784 en mode positif [M+Na]+

FEREY J., Da SILVA D., TALANTA, 2017, 170, 419-424

✓ L'apport de la dimension séparative et de l'information massique a permi de conclure sur :

#### **Zone 2 : raffinose** (m/z 527 et fragment)

Zone 4 : lactose (*m/z* 365 sans fragment)

Zone 10 : saccharose (m/z 365 et fragment)

Zone 16 et 24 : glucose/fructose (m/z 203)

## Projet 2

## Certification de l'origine et la provenance de résines Boswellia et vérification de la qualité et la variabilité des lots

#### Etude des 4 résines Boswellia





Produits complexes et hétérogènes



Mise en place d'une approche quantitative par GC-MS (volatils, non volatils)



Mise en place d'une approche quantitative des triterpènes HPTLC-UV-MALDI-MS

Mono-/ Sesquiterpènes

Diterpènes

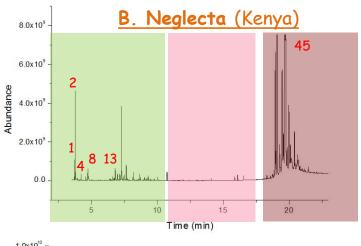
Triterpènes

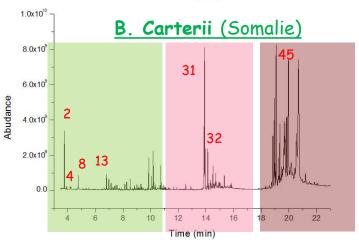


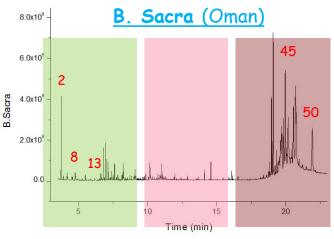
## Signatures phytochimiques des Résines Boswellia : CPG-MS

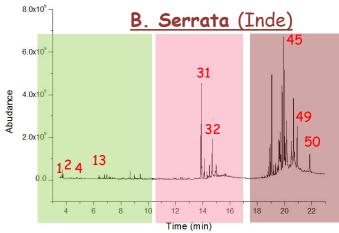












Mono-/ Sesquiterpènes

Diterpènes

Triterpènes

Identification de 50 composés/marqueurs de la localisation



## Signatures phytochimiques/quantification des Résines Boswellia :



**CPG-MS** 

	Composés	B. Neglecta (Kenya)	B. Carterii (Somalie)	B. Sacra (Oman)	B. Serrata (Inde)				
	Monoterpénoïdes and sesquiterpénoïdes								
1	α-thuyène	X			X				
2	α-pinène	×	X	X	×				
4	β-pinène	X	X		X				
8	D-limonène		×	X	×				
13	Verbénol	×			×				
Diterpénoïdes									
31	Incensole		X		X				
32	Serratol		×		×				
Triterpénoïdes									
44	Acide a-boswellique	X	X	X	X				
45	Acide β-boswellique	×	×	X	×				
47	Acide α-acétyl-boswellique		×	X	×				
48	Acide β-acétyl-boswellique		X	X	X				
49	Acide 11-kéto-β-boswellique				X				
50	Acide 3-O-acétyl-11-kéto-β- boswellique			X	X				

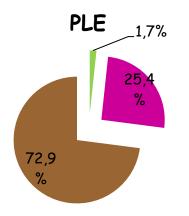


#### Quantification des triterpènes des Résines Boswellia : CPG-MS



Composés		B. Neglecta (Kenya)	B. Carterii (Somalie)	B. Sacra (Oman)	B. Serrata (Inde)			
Triterpénoïdes								
44	Acide a-boswellique	0.66 ± 0.14	1.08 ± 0.03	0.74 ± 0.03	1.23 ± 0.05			
45	Acide β-boswellique	1.80 ± 0.09	3.09 ± 0.03	1.66 ± 0.12	3.44 ± 0.01			
47								
• •	Acide a-acétyl-boswellique	-	1.56 ± 0.04	1.97 ± 0.03	$0.73 \pm 0.05$			
48	Acide β-acétyl-boswellique	-	4.98 ± 0.03	2.27 ± 0.05	1.73 ± 0.08			
49	Acide 11-kéto-β-boswellique	-	0.33 ± 0.04	0.29 ± 0.08	2.36 ± 0.10			
50	Acide 3-0-acétyl-11-kéto-β- boswellique	-	0.14 ± 0.14	3.66 ± 0.06	1.05 ± 0.16			

#### Distribution des composés terpèniques (résine Boswellia Serrata)



Mono- /
Sesquiterpènes
Diterpènes
Triterpènes

Screening exhaustif, successif et long pour le contrôle qualité des 4 résines Boswellia (terpéniques)



Screening rapide et simultané des 4 résines Boswellia: TLC-UV (Elution: 15 min) 26

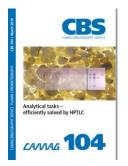


#### Signatures phytochimiques des Résines Boswellia : TLC-UV-MS



Conditions: Plaque gel de silice 60F<sub>254</sub> sur support aluminium

Extraction par solvant pressurisé (PLE), 3 cycles à 40°C avec le chloroforme et dépôt de 1 µL de l'extrait sur la plaque Dépôt à une vitesse de 4sec/µL avec des bandes de 6mm de largeur à une hauteur de 10 mm et à 10 mm du bord. Espacement de 5 mm entre 2 bandes Phase mobile: Toluène / Acétate d'éthyle / Heptane / Acide formique (8: 2: 1: 0.3, v/v/v/v)



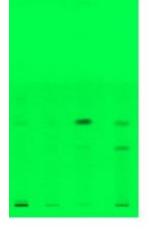
#### Lecture sous lampe UV à 254 nm

Dépôt de 1µL de solution

Extraction par solvant pressurisé

3 cycles à 40°C Chloroforme sous 100 bar







#### Visible







Plaque MALDI







Révélation au p-anisaldéhyde

Dépôt de la matrice inorganique

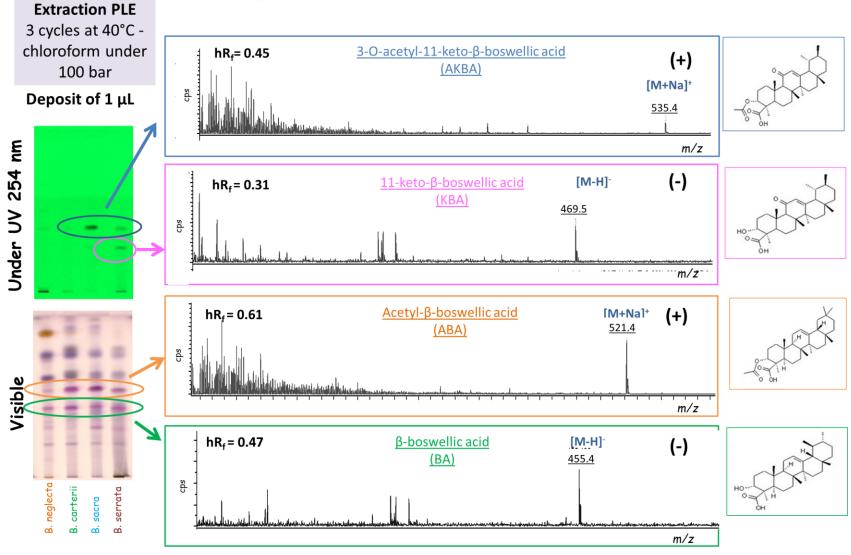
Z. Jemmali, D. Da-Silva, E. Destandeau A. Chartier, C. in preparation



## Signatures phytochimiques des Résines Boswellia : TLC-UV-MS



## Analyse TLC-MALDI-MS des résines Boswellia





#### Quantification des triterpènes des Résines Boswellia :



#### **HPTLC-UV**



Conditions: Plaque gel de silice 60F<sub>254</sub> sur support aluminium

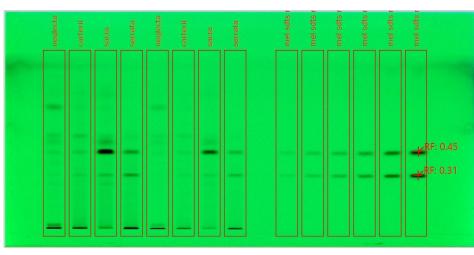
Extraction par solvant pressurisé (PLE), 3 cycles à 40°C avec le chloroforme et <u>dépôt de 1 µL</u> de l'extrait sur la plaque Dépôt à une vitesse de 4sec/µL avec des bandes de 6mm de largeur à une hauteur de 10 mm et à 10 mm du bord.

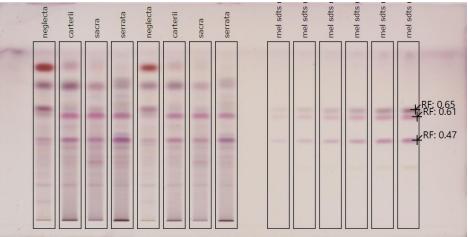
Espacement de 5 mm entre 2 bandes

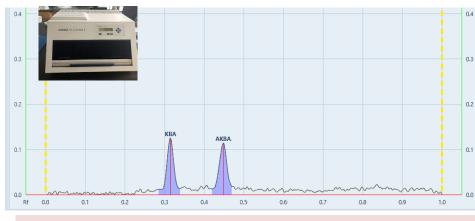
<u>Phase mobile:</u> Toluène / Acétate d'éthyle / Heptane / Acide formique (8: 2: 1: 0.3, v/v/v/v)

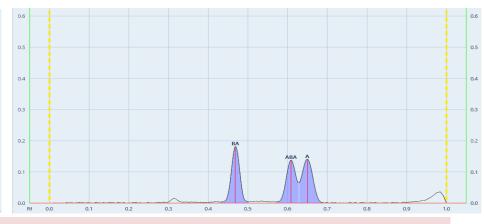
Derivatization; Anisaldéhyde











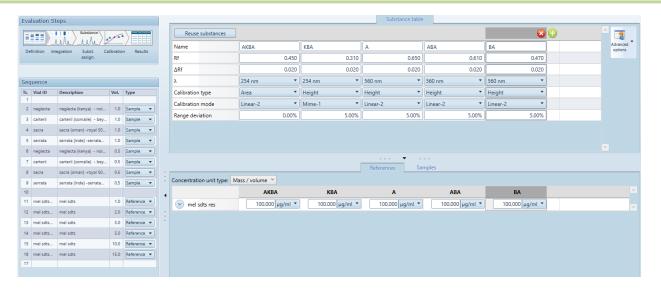
☐ Approche rapide, visuelle et discriminante des 4 triterpèrnes Boswellic suivis



## Quantification des triterpènes des Résines Boswellia :



## **HPTLC-UV**



#### Concentration en µg/mL

<u>Marqueurs majoritaires</u>	B. Neglecta (Kenya)	B. Carterii (Somalie)	B. Sacra (Oman)	B. Serrata (Inde)
a/β acide boswellique	692,1	1386	1004	1887
a/β acide acétyl-boswellique	916,4	1970	1932	1749
acide 11-kéto-β-boswellique	53,06	110,07	195,6	456,4
acide 3-O-acétyl-11-keto-β- boswellique	136,4	143,2	2258	537,6

## Certification de l'origine et la provenance de résines Boswellia et vérification de la qualité et la variabilité des lots

#### Etude des 4 résines Boswellia





Produits complexes et hétérogènes



Mise en place d'une approche quantitative par GC-MS (volatils, non volatils)



Mise en place d'une approche quantitative des triterpènes **TLC-UV-MALDI-MS** 







Diterpènes

Mono- / Sesquiterpènes

Triterpènes

- Quantification avec la même tendance
- Apport de la TLC pour le suivi et CQ des lots



### **Conclusions: Quantification**



## Apport du couplage HPTLC-Enzymotaugraphie-MS

- Apport d'une méthode de suivi d'interaction Ligand / enzyme
- Analyse spécifique du spot d'intérêt par HRMS pour une identification en vue d'une quantification d'une composé non connu

## Apport de l'HPTLC : Caractérisation de l'activité enzymatique de l'invertase

- Approche HPTLC parfaitement adaptée au suivi cinétique de l'invertase
- ☑ Criblage de substrats de l'invertase par approche différentielle HPTLC-UV et identification par HPTLC-MALDI-TOF MS

## Apport de la HPTLC-MS pour une quantification fiable

- Détection ciblée de la signature phytochimique des résines par HPTLC-UV-MALDI-MS
- Certification de l'origine et la provenance de résines Boswellia et vérification de la qualité et la variabilité des lots par une approche orthogonale



#### Remerciement





#### L'équipe analytique

Justine Ferey (PhD)
Le Thao Nhi (PhD)
Laetitia Fougère (PhD & IE)
Vanille Quinty (PhD)

Benoît MAUNIT
Cyril COLAS (CBM & ICOA)
Emilie Destandau

La Région Centre

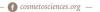


#### **Collaborateurs**

Richard DANIELLOU (ICOA)
Pierre LAFITE (ICOA)
Yoan LAURENT (CBM)
Patrick BARIL (CBM)
Eric DARROUZET (IRBI)
Lucie PETIT LESEURRE (CHIMEX)

**ARD 2020** 





Merci à Chromacim, au club CCM et merci à vous pour votre attention.