

# APPLICATION DES TECHNIQUES HPTLC À L'ANALYSE DES SUBSTANCES NATURELLES COMPLEXES (SNC) À DESTINATION DE LA PARFUMERIE, DES ARÔMES ET DE LA COSMÉTIQUE

Lionel Paillat

CCCM-Lyon

1 Décembre 2011

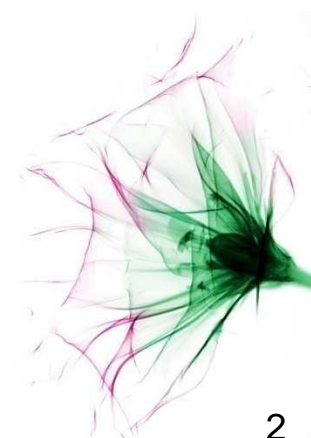
Responsable: Dr. Sophie Lavoine

Directeur: Dr. Xavier Fernandez

Co-directeur: Pr. Dr. Uwe J. Meierhenrich

## PLAN DE LA PRÉSENTATION

- Contexte de l'étude
- La société Charabot S.A.
- Pourquoi choisir la TLC/HPTLC
- Développement d'une stratégie d'approche globale d'un extrait naturel par HPTLC: Application au Yerba Mate
  - Approche phytochimique et fractionnement
  - Composition chimique de l'extrait
- Conclusion



## CONTEXTE DE L'ÉTUDE

- Extraits végétaux = produits clés
  - Seules les fractions odorantes connues
  - Extraits végétaux : majoritairement semi-volatils et non volatils
  - Besoin de caractériser le plus complètement les produits
- ➔ Valoriser les matrices végétales (recherche phytochimique)

## OBJECTIFS

- Évaluer l'apport de la chromatographie planaire dans le domaine des extraits végétaux
- Mettre au point une méthodologie d'approche phytochimique des extraits végétaux et caractériser l'extrait de Mate
- Développer et valider des méthodes de dosage par HPTLC

## LA SOCIETE CHARABOT S.A. (Groupe Robertet)

➤ **Activité:** Fabrication de matières premières à destination des arômes et parfums, formulation arômes et parfums

➤ **Localisation régionale:**

Plan de Grasse: Site de production

Grasse: Centre administratif, achats, centre de création arômes et parfums, service R&D

**SERVICE  
R&D**

Synthèse de molécules

Extraction de végétaux

Traitement d'extraits végétaux



## POURQUOI CHOISIR LA TLC/HPTLC

- Flexibilité de la technique
- Analyse de matrices complexes
- Complémentaire de l'HPLC (méthode orthogonale)
- Analyse de substances volatiles/non volatiles n'absorbant pas en UV
- Différentiations des composés ( $R_f$ , couleur, aspect...)
- Sensibilité de la technique

### APPLICATIONS

- Développement des conditions de fractionnement
- Suivi de synthèse/fractionnement
- Screening phytochimique
- Analyses quantitatives



## YERBA MATE: DONNÉES BOTANIQUES

### SYSTÉMATIQUE BOTANIQUE

**Nom commun :** Maté, Thé du Paraguay,  
Thé des Jésuites

**Nom latin :** *Ilex Paraguariensis* Saint-Hil.



Division: Anthophyta  
Classe: Magnoliopsida  
Sous classe: Rosidae  
Ordre: Celastrales  
Famille: Aquifoliaceae  
Genre: *Ilex*  
Espèce: *Ilex paraguariensis*

### DESCRIPTION BOTANIQUE

**Arbre ou arbuste dioïque**

**Feuillage:** Grandes feuilles (5-15 cm/2-5 cm) vertes claires, ovales et dentelées.

**Floraison:** Octobre à décembre, petites fleurs blanches groupées en cymes.

### ORIGINE ET CULTURE

**Aire de culture :** Argentine (1), Brésil (2), Paraguay (3), Uruguay (4)

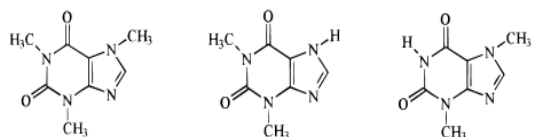
**Volume de production (2002):** 875000 tonnes sur 290000 hectares (152000 Ha seulement en Argentine)



6

# YERBA MATE: METABOLITES D'INTERET (12 %)

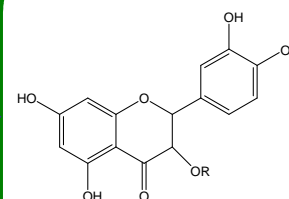
## BASES PURIQUES



**Caféine**      **Théobromine**      **Théophylline**

Marleny DA et al. J. Agric. Food. Chem. 47 (1999) 3804-3808

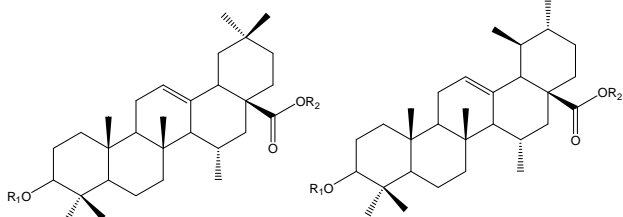
## FLAVONOIDES



R = H      **Quercetine**  
R = Galactose      **Hyperoside**  
R = Rutinose      **Rutine**

Bravo L, Goya L, Lecumberri E. Food Res. Int. 40 (2007) 393-405

## TRITERPENES

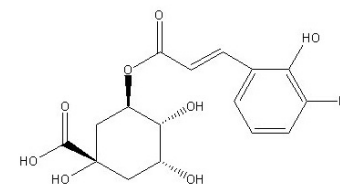


**Acide oléanolique**  
(R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H)

**Acide ursolique**  
(R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H)

Gnoatto SCB, Schenkel EP, Bassani VL. J. Braz. Chem. Soc. 16 (2005) 723-726.

## ACIDES/ESTERS PHENOLIQUES



Marleny DA et al. J. Agric. Food. Chem. 47 (1999) 3804-3808



# APPROCHE PHYTOCHIMIQUE PAR HPTLC

METABOLITES  
PRIMAIRE

SUCRES  
SILICE  
BuOH/MeOH/Eau (50:25:20)

Aniline/Diphénylamine  
Visible

ACIDES AMINES  
SILICE  
BuOH/Acetone/Eau/Acetic  
(35:35:23:7)

Ninhydrine  
Visible

LIPIDES  
RP18  
DCM/Acetic/Acetone (2:4:5)

Acide  
phosphomolybdique  
Visible

Extraits/Fractions (10g/L)  
Dépôt 1 et 10µL

METABOLITES  
SECONDAIRES

SAPONINES  
DMAB  
CHCl<sub>3</sub>/EtOH/Eau  
(x:y:z)

TERPENES  
Anisaldéhyde  
Vanilline  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Toluene/AcOEt/  
Acetic (x:y:z)

SILICE  
AcOEt/MeOH/Eau  
(ou NH<sub>4</sub>OH) (x:y:z)

ALCALOIDES  
Dragendorff

BASES  
PURIQUES  
KI/HCl

POLYPHENOLS

TANINS  
CONDENSES  
Vanilline/HCl  
Visible

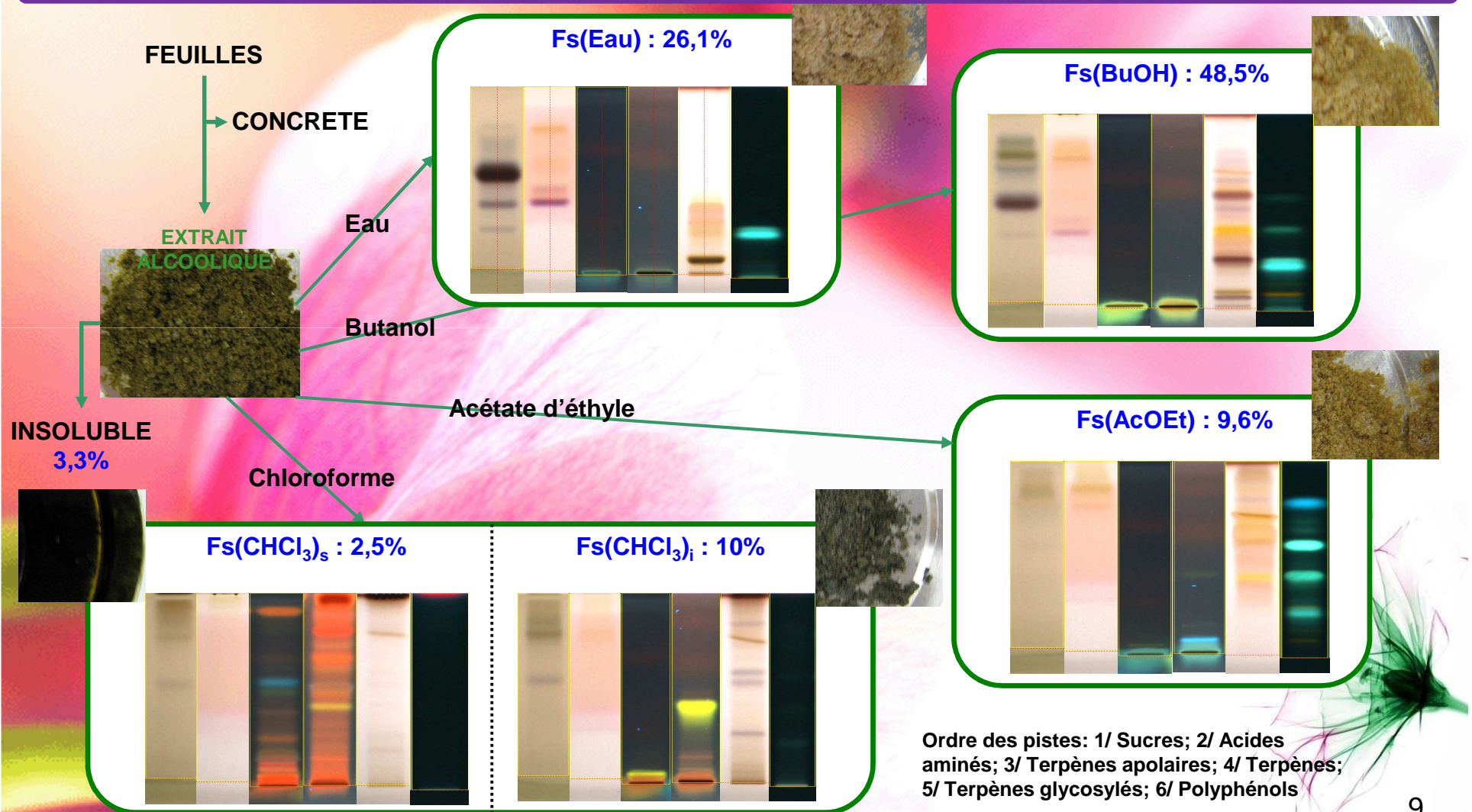
TANINS  
HYDROLYSABLE  
NP/PEG  
366nm

FLAVONOIDES  
NP/PEG  
366nm

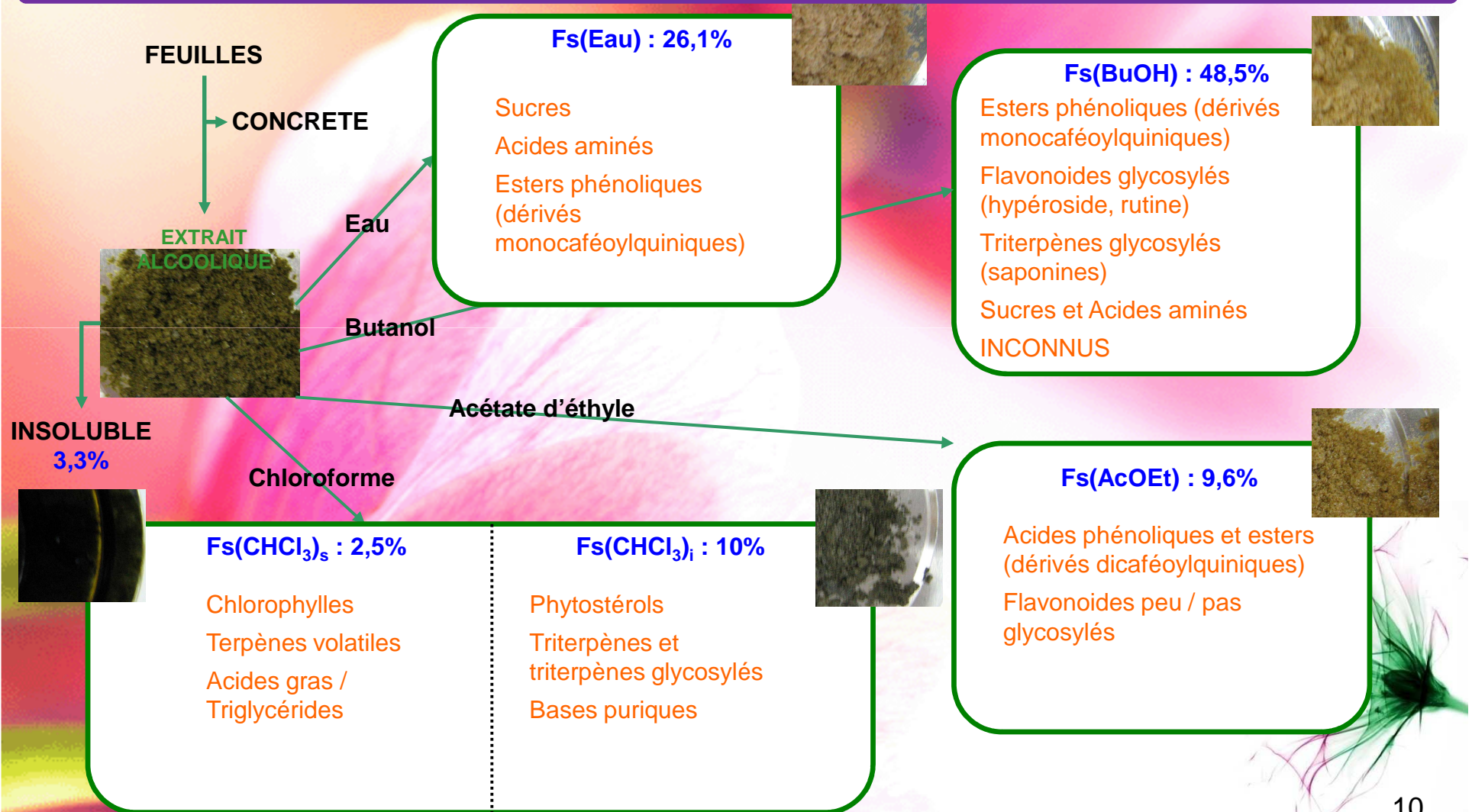
ACIDES/ESTERS  
PHENOLIQUES  
NP/PEG  
Folin-Ciocalteu  
FeCl<sub>3</sub>



# YERBA MATE: PARTITION L-L DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE



# YERBA MATE: PARTITION L-L DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE



# YERBA MATE: INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE

## Partition liquide-liquide

### Expériences réalisées

Partition L-L répétée quatre fois  
Masses engagées: 50 g par essai

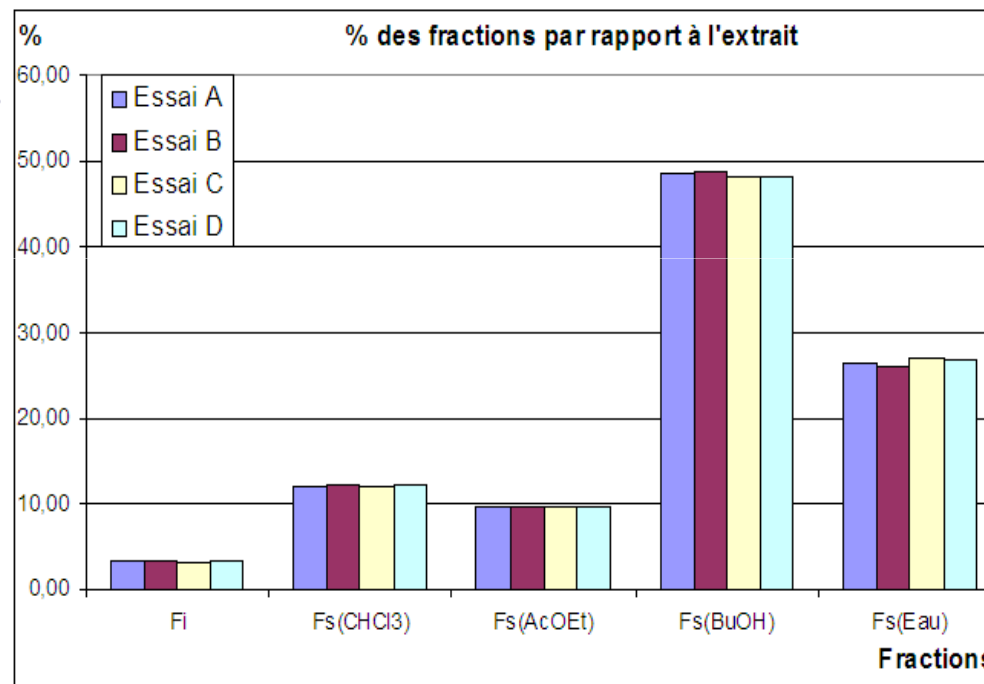
### Résultats

5 fractions obtenues  
Sdv < 0,5, %RSD < 3 %

→ **Fractionnement  
quantitatif**

→ **Applicable à  
d'autres extraits  
hydroalcooliques**

→ **Estimation de la teneur en métabolites d'un extrait alcoolique**

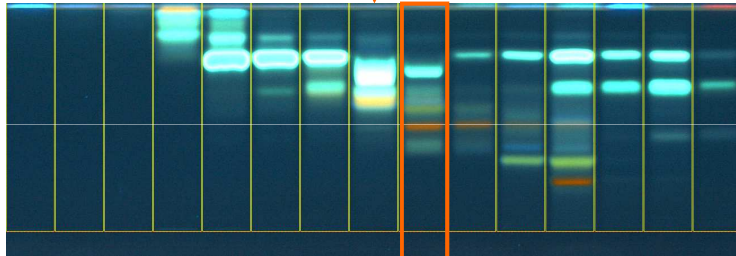


# YERBA MATE: INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE

## Purification/Identification polyphénols du Mate (à partir de Fs(AcOEt))

Fs(AcOEt)

1/ Fractionnement sur colonne ouverte de silice



2/ Isolement des composés par HPLC semi-préparative

7 substances purifiées

3/ RMN <sup>1</sup>H 200MHz

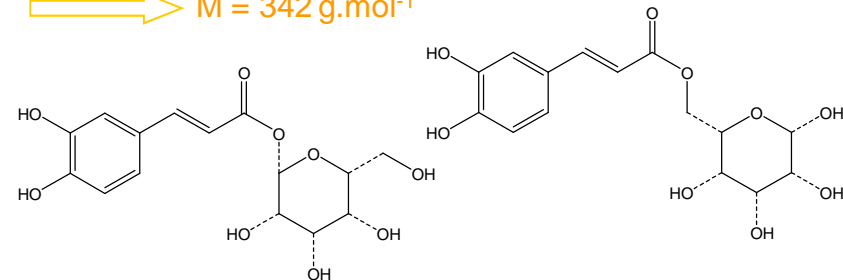
4/ MS mode positif et négatif

### 3 Dérivés caffeoyl-glycose (déjà rapportés)

m/z 365.2 [M+Na]<sup>+</sup>

m/z 706.9 [2M+Na]<sup>+</sup>

⇒ M = 342 g.mol<sup>-1</sup>



### Quercétine 3-O-glycoside (déjà rapporté)

m/z 465.3 [M+H]<sup>+</sup>

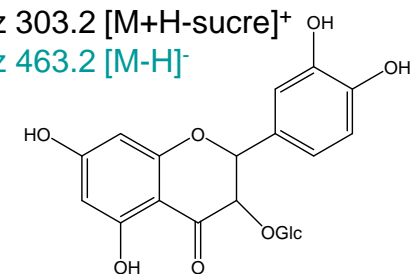
m/z 303.2 [M+H-sucre]<sup>+</sup>

m/z 487.4 [M+Na]<sup>+</sup>

m/z 463.2 [M-H]<sup>-</sup>

⇒ M = 464 g.mol<sup>-1</sup>

Glc: Glycoside

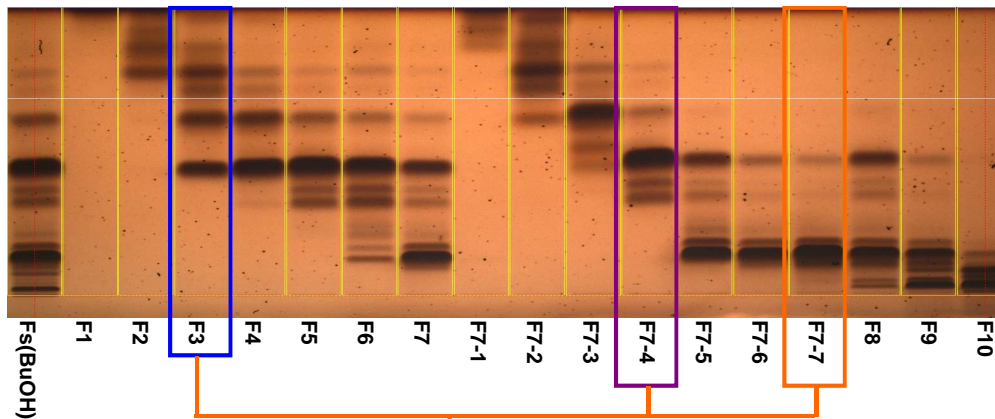


2 bases pures: Caféine et Théobromine  
1 dérivé dicaffeoylquinique

# YERBA MATE: INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE

## Purification des saponines du Mate (à partir de Fs(BuOH))

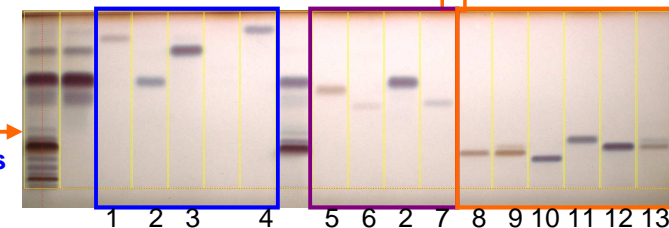
- 1/ Lavage basique (KOH 1% massique) de la fraction **Fs(BuOH)** : Récupération des saponines dans la fraction organique
- 2/ Fractionnement sur colonne ouverte de silice avec gradient d'élution  $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{Eau}$  x:y:z (v/v/v)



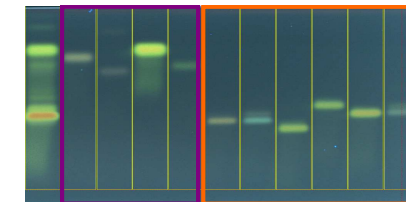
3/ HPLC semi-préparative

13 saponines isolées  
(5 caractérisées dans la littérature)

Control HPTLC: Différentiation des aglycones



Réponses colorées différentes: aglycones différents?

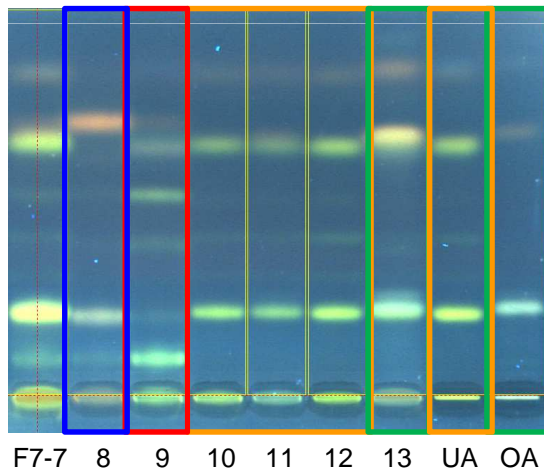


366 nm

## YERBA MATE: INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE

### Différentiation des aglycones (saponines 8-13): Hydrolyse acide *in situ* avant analyse

- 1/ Dépôt des échantillons
- 2/ Hydrolyse *in situ*
- 3/ Développement de la plaque (Réactif Liebermann-Burhard)



Saponines 10-12: Acide ursolique glucosylé

Saponines 13: Acide oléanolique glucosylé

Saponine 8: Aglycone non identifié

Saponine 9: Aglycone non identifié



Analyse HRMS et RMN

# YERBA MATE: ANALYSE QUANTITATIVE

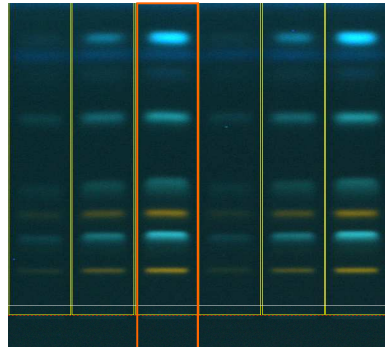
## Dosage des polyphénols

### HPTLC sur Silice

**Eluant:**  
FoOEt/MeOH/Formique/  
Acétique/Eau

**Migration en ADC2**

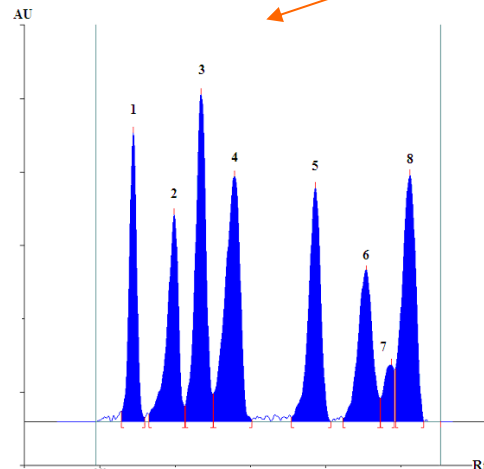
**Révélation: NP à  
366nm**



### Interprétation des couleurs

Composés	366nm	NP à 366nm	NP + chauffe à 366nm
Acide benzoïque	Bleu foncé	Bleu nuit	Bleu clair
Acide cinnamique	Bleu clair	Bleu clair	Bleu clair
Esters cinnamiques	Bleu clair	Bleu turquoise	Bleu clair
Flavonol monohydroxylé	Jaune	Jaune	Jaune
Flavonol dihydroxylé	Jaune	Orange	Orange
Flavonol glycosylé	Noir	Orange	Orange

### Densitogramme natif à 320nm



- 1: Rutine (Quercétine 3-O-rutinoside)
- 2: Acides chlorogéniques
- 3: Hypéroside (Quercétine 3-O-galactoside)
- 4: Acides 3,4- et 4,5-dicaffeoylquiniques
- 5: Acide 3,5-dicaffeoylquinique
- 6: Acide gallique
- 7: Impureté
- 8: Acide caféique

### Paramètre de la méthode

Répétabilité: % R.S.D. < 1%

Gamme: 50 – 200 ng/spot

LOD: 10 – 20 ng/spot

LOQ: 25 – 40 ng/spot

Exactitude (% recouvrement):  
98.9 – 102.1%

**> 31% de polyphénols (>27%  
d'esters phénoliques)**

# YERBA MATE: COMPOSITION DE L'EXTRAIT

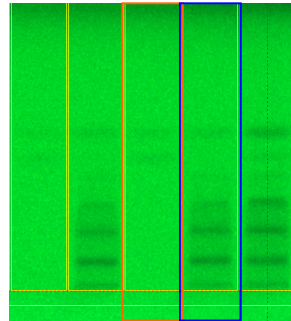
## Dosage des bases puriques

### HPTLC sur Silice

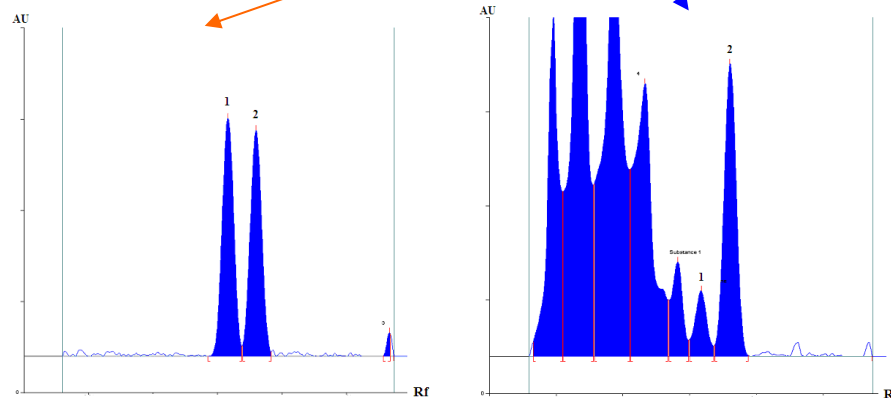
Eluant:  
AcOEt/MeOH/Eau  
(20:2.7:2) [1]

Migration en mode  
« sandwich »

Visualisation 254nm

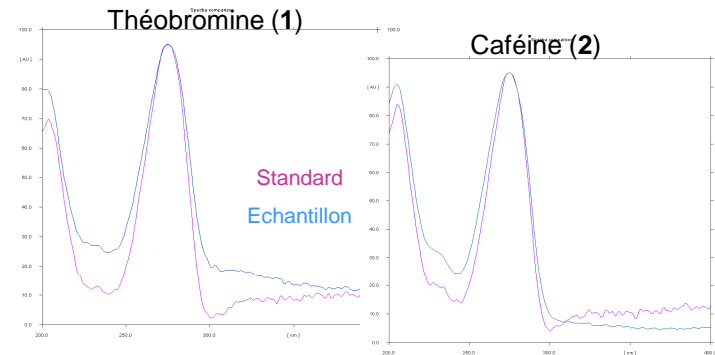


### Densitogramme à 273nm



1: Théobromine; 2: Caféine

### Spectres UV pics/étalons



### Paramètre de la méthode

Répétabilité: % R.S.D. < 1,5%

Gamme: 20 – 100 ng/spot

LOD: 5 ng/spot

LOQ: 15 ng/spot

Exactitude (% recouvrement):  
98.4 – 100.6%

**1.9% (1.7% de caféine, 0,2% de théobromine)**

[1] E. Reich, A. Schibli, High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants (2006) 210-214.



## YERBA MATE: COMPOSITION DE L'EXTRAIT

### Dosage acides triterpéniques libres et glycosylés

#### HPTLC sur Silice

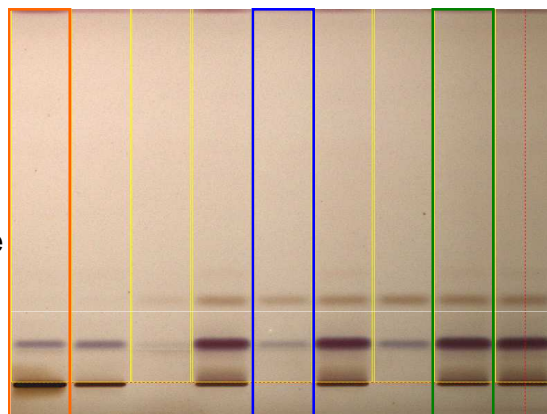
Pré-dérivation: KI 1% ds  
CHCl<sub>3</sub> sur 15mm [1]

#### Eluant:

*n*-Hexane/AcOEt/Acétone  
(33:7:0,5)

#### Migration en ADC2

Révélation: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%  
dans EtOH



#### Paramètre de la méthode

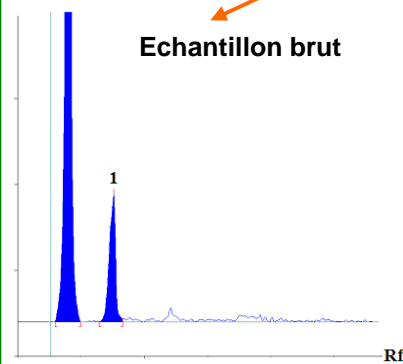
Répétabilité: % R.S.D. < 1,5%

Gamme: 40 – 160 ng/spot (OA)

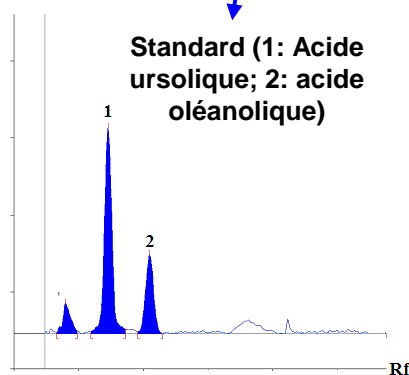
20 – 80 ng/spot (UA)

LOD: 10/5 ng/spot (OA/UA)

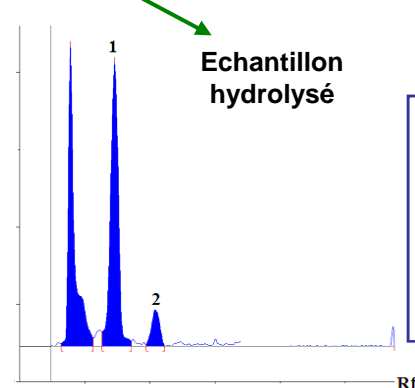
LOQ: 25/12 ng/spot (OA/UA)



Echantillon brut



Standard (1: Acide  
ursolique; 2: acide  
oléanolique)



Echantillon  
hydrolysé

#### Echantillon brut:

0,8% (UA)

Echantillon hydrolysé:

2,4% (UA)

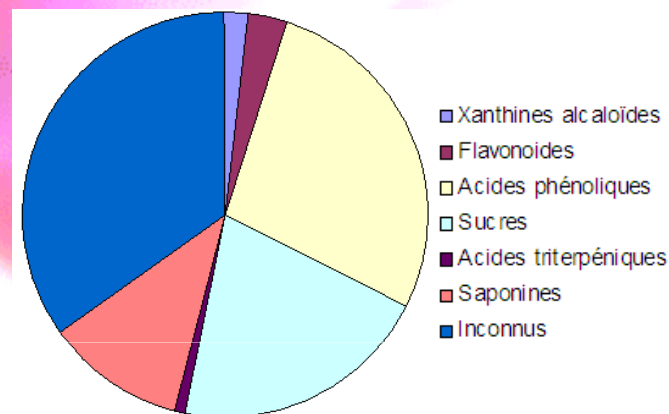
0,8% (OA)

[1] Wojciak-Kosior Magdalena. J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 337-340 | 7

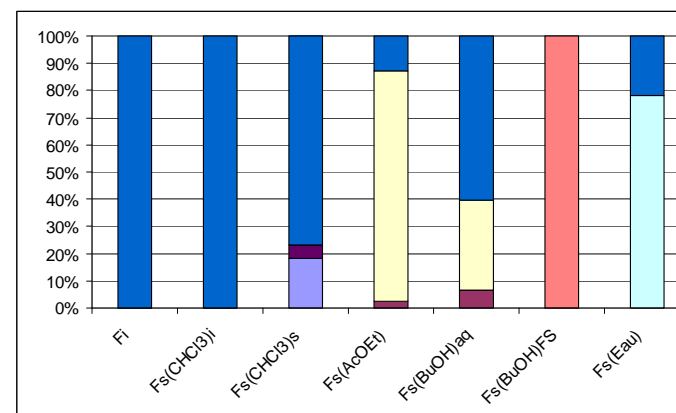
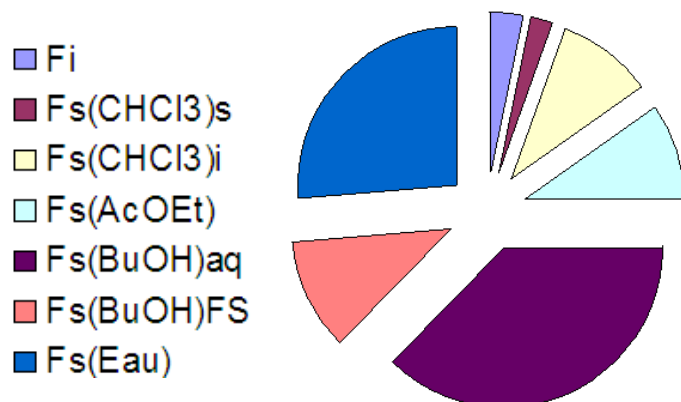
## YERBA MATE: CONCLUSION

### COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EXTRAIT DE MATE

- 65% de l'extrait connu, 35% inconnus
- Parmi les 35% inconnus:
  - 9% sont des composés insoluble dans le méthanol (hydrocarbures, lipides apolaires...)
  - 6% sont soluble dans le méthanol et l'hexane (Triglycérides, acides gras, terpènes volatiles, phytostérols, chlorophylles..)
  - 5% sont des sucres (autres que glucose, fructose, sucrose) et des acides aminés
  - 80% sont inconnus (fraction Fs(BuOH)aq)



### DISTRIBUTION DES COMPOSÉS DANS LES FRACTIONS



## MÉTHODE DE QUANTIFICATION PAR HPTLC

### Méthode de quantification développées par HPTLC

#### Dosage alcools et acétates dans HE vétiver

- Matrice complexe
- Difficulté d'un dosage juste par GC (plus de 200 composés)

#### Dosage phénols majoritaires dans extraits de vanille

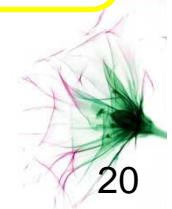
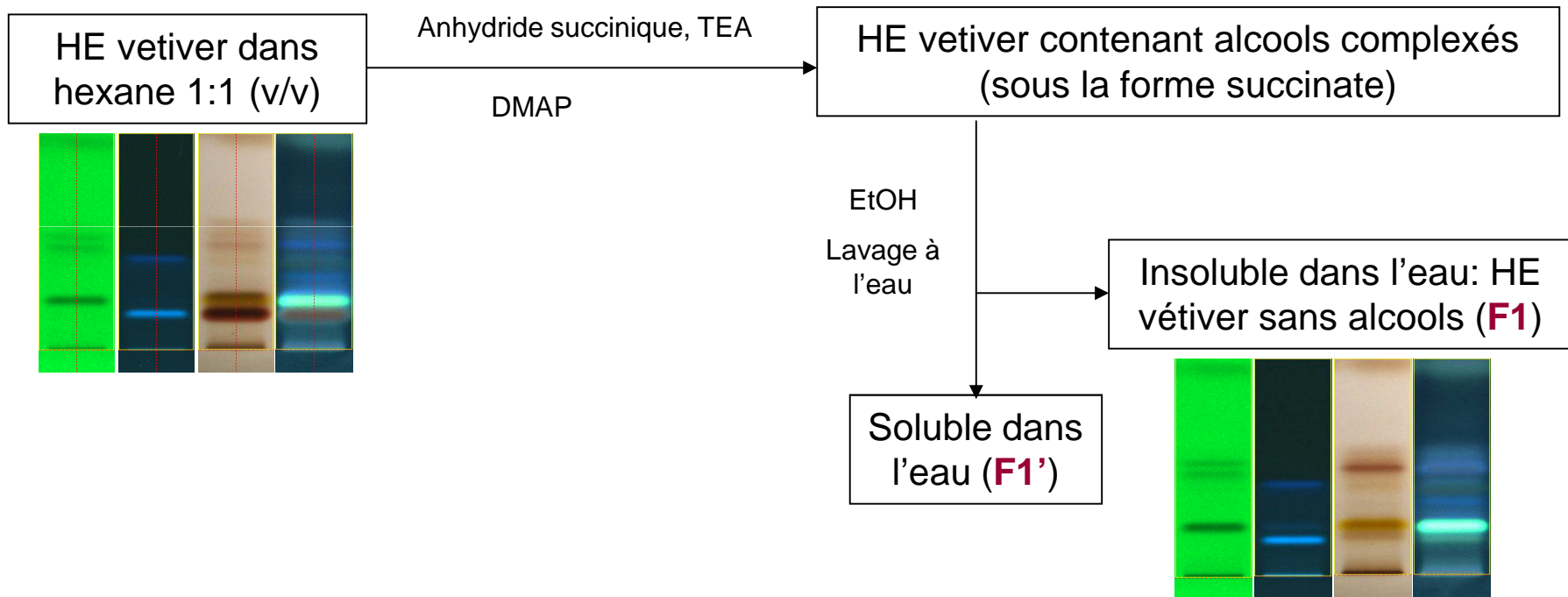
- Matrices complexes
- Différents types d'extraits

#### Dosage nicotine dans extraits de tabac

- Matrices complexes
- Différents types d'extraits
- Caractère diacide de la nicotine
- Extrait à faible teneur

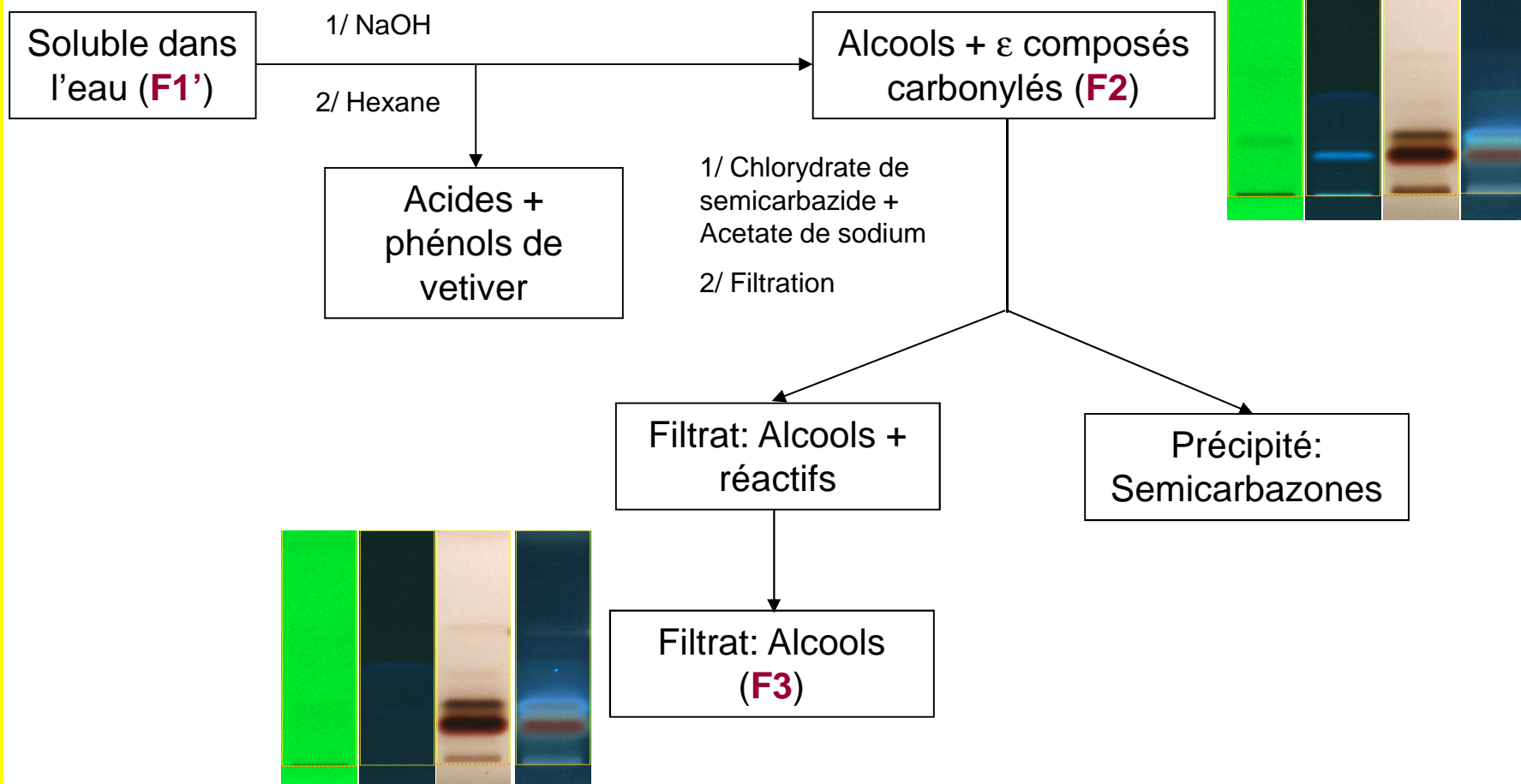
## VETIVER: PURIFICATION DES STANDARDS

### ETAPE 1: EXTRACTIONS DES ALCOOLS DE VÉTIVER À PARTIR DE L'HUILE ESSENTIELLE



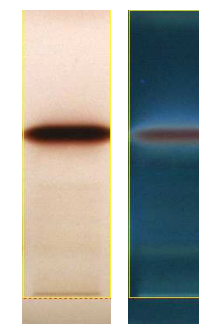
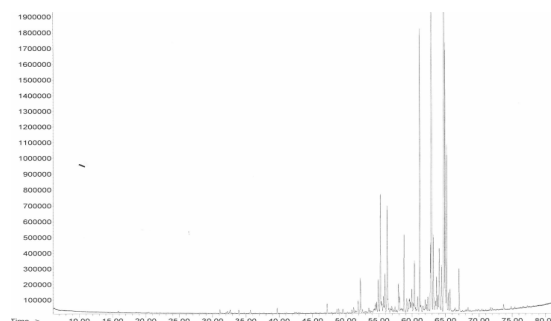
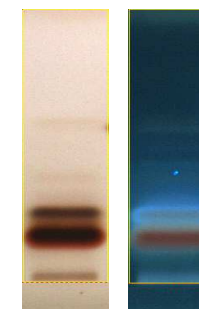
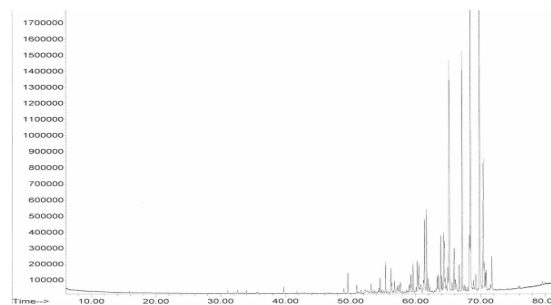
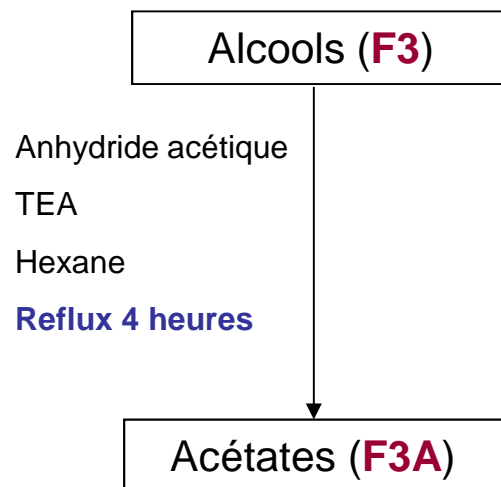
## VETIVER: PURIFICATION DES STANDARDS

### ETAPE 1': LIBÉRATION DES ALCOOLS ET PURIFICATION (EXTRACTION ALDÉHYDE ET CÉTONES).



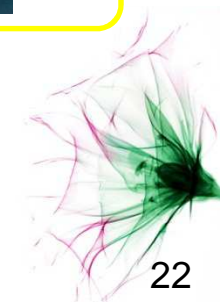
## VETIVER: PURIFICATION DES STANDARDS

### ETAPE 2: ACÉTYLATION DES ALCOOL DE VÉTIVER



### ETAPE 3: PURIFICATION DES STANDARDS PAR OPLC

- Standards alcools F3-1 (57,3mg, 94 %) et F3-2 (8,9mg, 92 %)
- Standard acetates F3A-1 (48,1mg, 95 %)

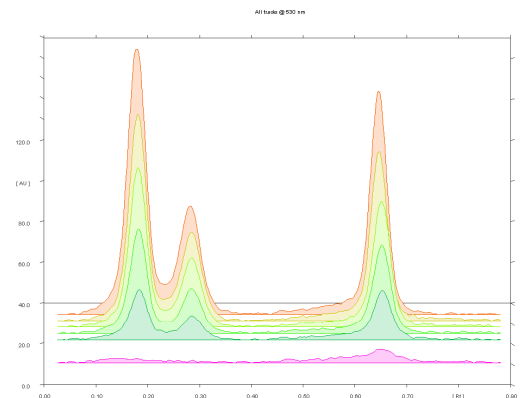


## VETIVER: VALIDATION DE MÉTHODE

### LIMITE DE DÉTECTION (LOD) ET LIMITE DE QUANTIFICATION (LOQ)

- Détermination du bruit de fond: Intégrer les pics au Rf des standards
- LOD = 3 x bruit de fond
- LOQ = 10 x bruit de fond

Standard	LOD (ng/spot)	LOQ (ng/spot)
F3-1	5	20
F3-2	10	40
F3A-1	10	30



### SPÉCIFICITÉ

En accord avec la méthode développée, application d'une HE de vétiver sans alcool (fraction F1)



Aucun spots correspondant aux alcools et acétates n'apparaît

### LINÉARITÉ/EXACTITUDE

Déterminer les gammes de concentration pour lesquelles les courbes de calibration suivent un modèle linéaire

- Détermination du % de recouvrement en analysant un échantillon avant et après addition de 50, 100 et 150% de sa teneur initiale en composés à doser

Standard	Gamme (ng/spot)	% recouvrement
F3-1	40-200	101,5%
F3-2	40-200	99,0%
F3A-1	40-200	98,8%



## VETIVER: VALIDATION DE MÉTHODE

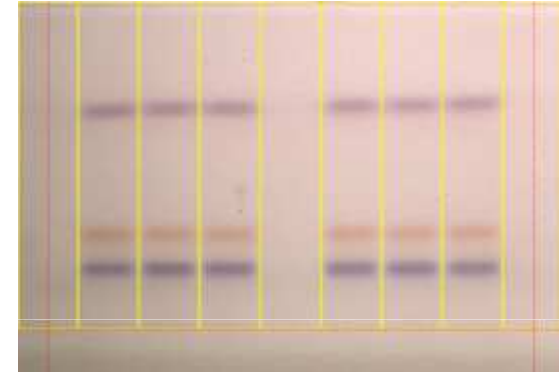
### PRÉCISION

- Dépôt d'un même échantillon 6 fois, analyse selon les conditions définies et détermination du % RSD: **répétabilité du dépôt d'échantillon**

$$\%RSD < 1 \%$$

- Dépôt d'un même échantillon 6 fois à 3 concentration différentes; l'analyse est répétée 3 fois le même jour (« **intra-day precision** ») et sur 3 jours différents (« **inter-day precision** ») et détermination du %RSD.

$$\%RSD < 3 \%$$



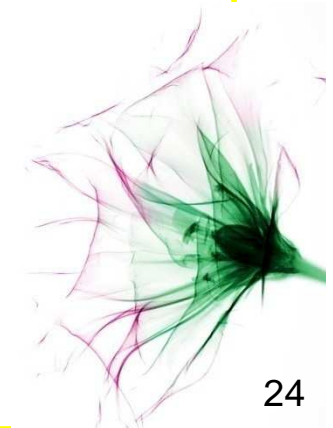
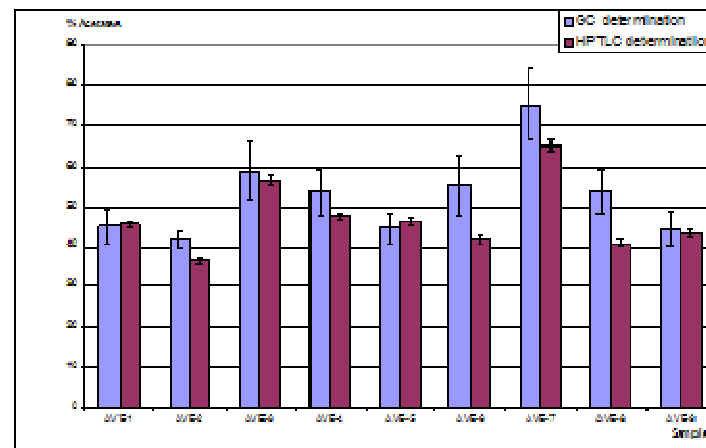
### EXEMPLE D'APPLICATION: DOSAGE ACÉTATE ET COMPARAISON AVEC RÉSULTATS GC

Analyse GC réalisée sur colonne polaire et apolaire:

$$15 < \%RSD < 35 \%$$

Analyse HPTLC réalisées en Triplicata

$$\%RSD < 3 \%$$





## BILAN DE L'ÉTUDE

### APPROCHE PHYTOCHIMIQUE GUIDÉE PAR HPTLC

- Technique HPTLC appropriée au screening phytochimique:
  - large choix de révélateur  $\pm$  spécifique
  - analyse multi-échantillons: comparaison visuelle et densitométrique
  - analyse multidimensionnelle
  - collecte d'informations spectrales
  - test d'activité in-situ (chimique et biologique)
  - mise au point des conditions de fractionnement sur colonne (transfert CCM à CC)
- Réalisation d'un schéma général de fractionnement applicable aux extraits alcooliques (tri chimique)

### QUANTIFICATION PAR HPTLC

- Méthode précise, sensible, répétable et robuste
- Méthode flexible: Large choix de conditions analytiques
- Méthode d'analyse rapide et « propre »
- Méthode approprié au dosage des composés sans chromophores



## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

### PUBLICATIONS

Paillat L, Périchet C, Lavoine S, Fernandez X, Meierhenrich U. **Validated high-performance thin-layer chromatography method for the determination of nicotine in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) extracts.** J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC 25 (2012) 23-29.

Paillat L, Périchet C, Lavoine S, Fernandez X, Meierhenrich U. **High-performance thin layer chromatography (HPTLC) method for quantitative determination of vanillin  $\beta$ -D-glucoside and four major phenolic compounds in vanilla (*Vanilla planifolia*) fruits, beans and extracts.** J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC 25 (2012) xxx-xxx.

Paillat L, Périchet C, Lavoine S, Pierrat J-P, Fernandez X, Filippi J-J, Meierhenrich U. **Quantitative analysis of alcohols and acetates in Haitian vetiver essential oils and acetylated Haitian vetiver oils by HPTLC.** J. Chromatogr.. A 1241 (2012) 103-111.

### COMMUNICATIONS ORALES

**HPTLC: Application au contrôle des huiles essentielles et extraits naturels de plantes** (29èmes Journées Internationales Huiles Essentielles & Extraits, Dignes-les-Bains, 24-25 Juin 2010)

**HPTLC: Développement et validation d'une méthode de dosage de la nicotine dans des extraits de Tabac** (L'OCCITANE en Provence, Manosque, 17 Juin 2011)

### POSTERS (HPTLC Symposium 2011 Basel)

Validated HPTLC methods for the determination of flavour compounds in plant extracts

Validated HPTLC method for the determination of nicotine in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) extracts



**MERCI DE VOTRE  
ATTENTION**

