

Analyse par HPTLC de la plante à l'extrait végétal

Apport de l'instrumentation



Edwige RANOUILLE – Greentech S.A.

Club de CCM – Lyon – 1er décembre 2011



Plan

I - Présentation de Greentech

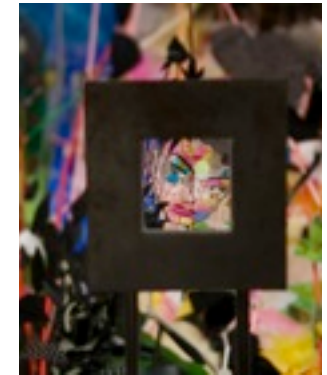
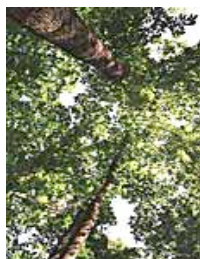
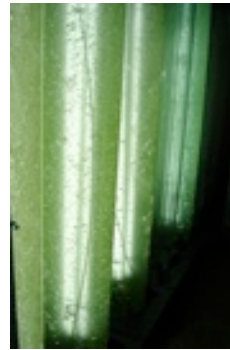
II- Intérêt de la CCM

1. Outils HPTLC
2. Analyse MP
3. Analyse PF

III – Discussion

1. Méthode
2. Outils

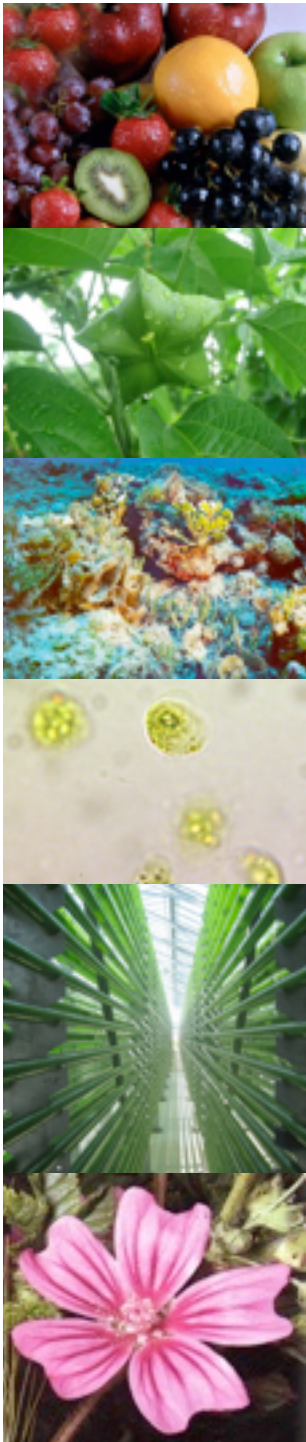
IV - Perspective



GREENTECH
naturally

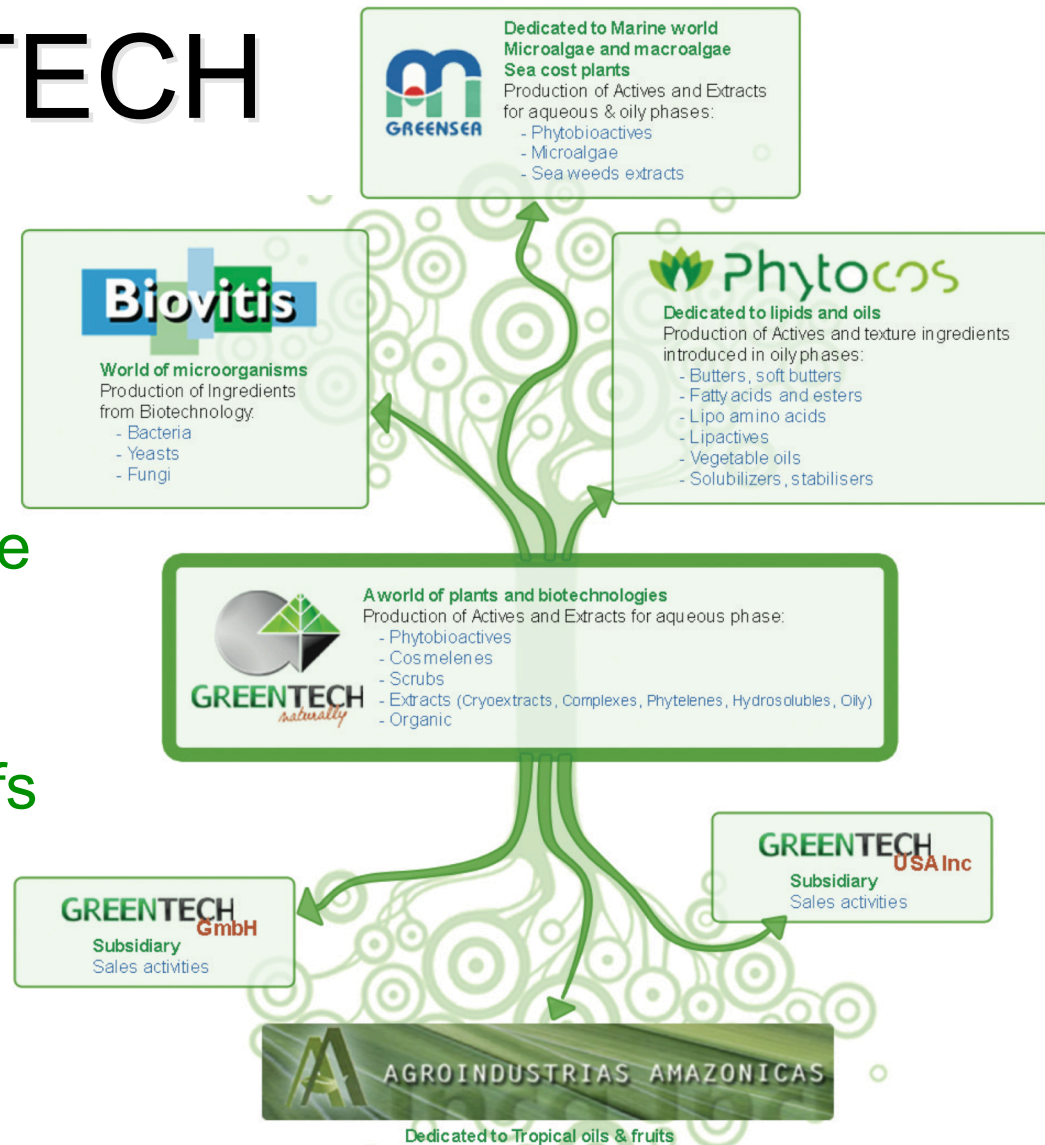
© GREENTECH

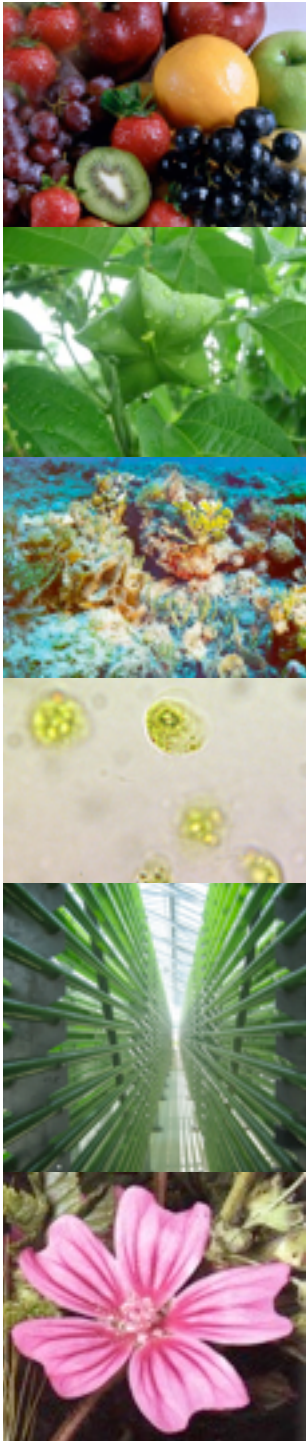
DOC 03_259 V11/11



GREENTECH

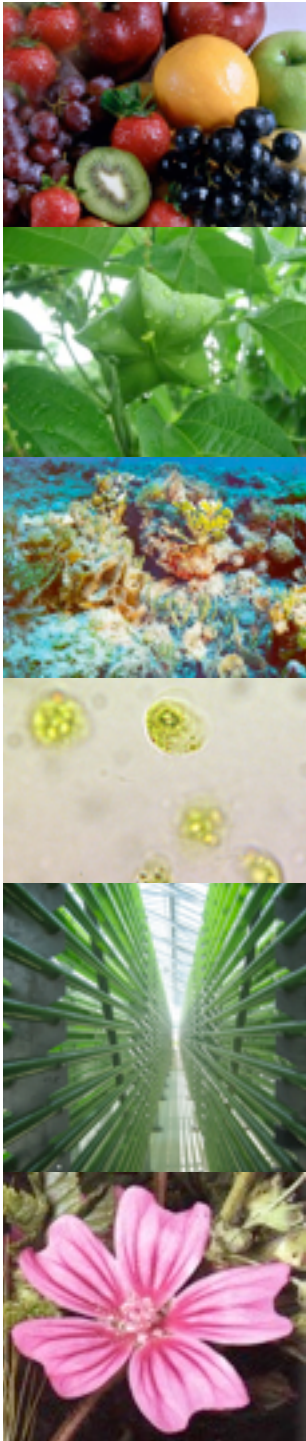
Une synergie de
compagnies
dédiées aux
ingrédients actifs





GREENTECH

- Recherche de nouveaux composés bio-actifs
- Développement de nouveaux ingrédients
- Développement à façon, industrialisation
- Différents Domaines d'activités des Biotechnologies
 - Cosmétique
 - Pharmacie
 - Nutrition & Alimentation
 - Agronomie & Elevage
 - Environnement



GREENTECH

- **Extraits** : Origine végétale ou marine,

➔ **Dossier** : bibliographies, usage traditionnel

-**Type de solvant** : aqueux, glycérine, glycols, alcool, huiles ...

➔ Pb conservateurs et réglementaire

-**Forme** : liquides hydrosolubles ou liposolubles, sèche

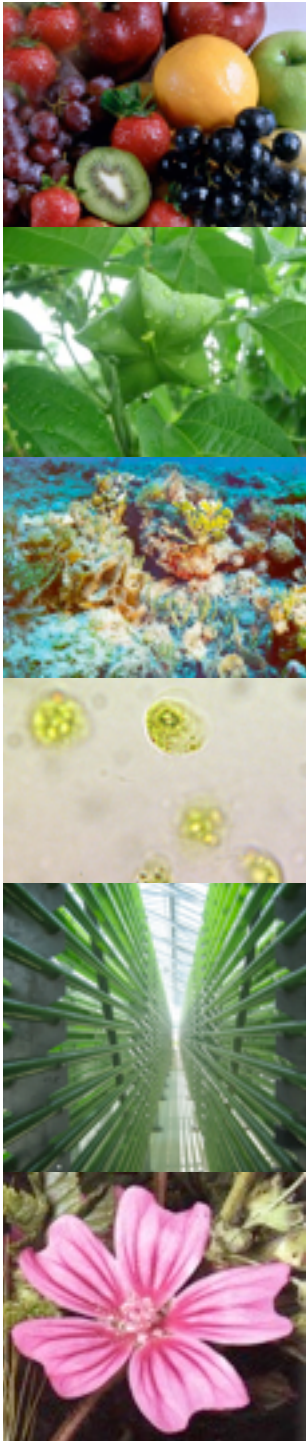
-**Procédé d'extraction** :

- Macération, décoction, percolation...

- Procédé breveté : la cryo-extraction

-**Gamme BIO ECOCERT** : Certifiés ou autorisés

-**Spécificité** : titration, concentration (Matière sèche), marketing, produit sur mesure, décoloration ...



GREENTECH

- **Actifs** : Origine végétale, marine ou biotechnologique
 - **Procédé élaboré** : Orientation des phases d'extraction pour obtention d'un ingrédient spécifique pour une activité biologique
 - Plusieurs étapes d'extraction sélectives
 - Concentration
 - Cryo-extraction
 - Biotechnologie ...
 - **Objectivation** : Tests in vitro ou in vivo

➔ **PHYTOBIOACTIFS**



Plan

I - Présentation de Greentech

II- Intérêt de la CCM

1. Outils HPTLC

2. Analyse MP

3. Analyse PF

III – Discussion

1. Méthode

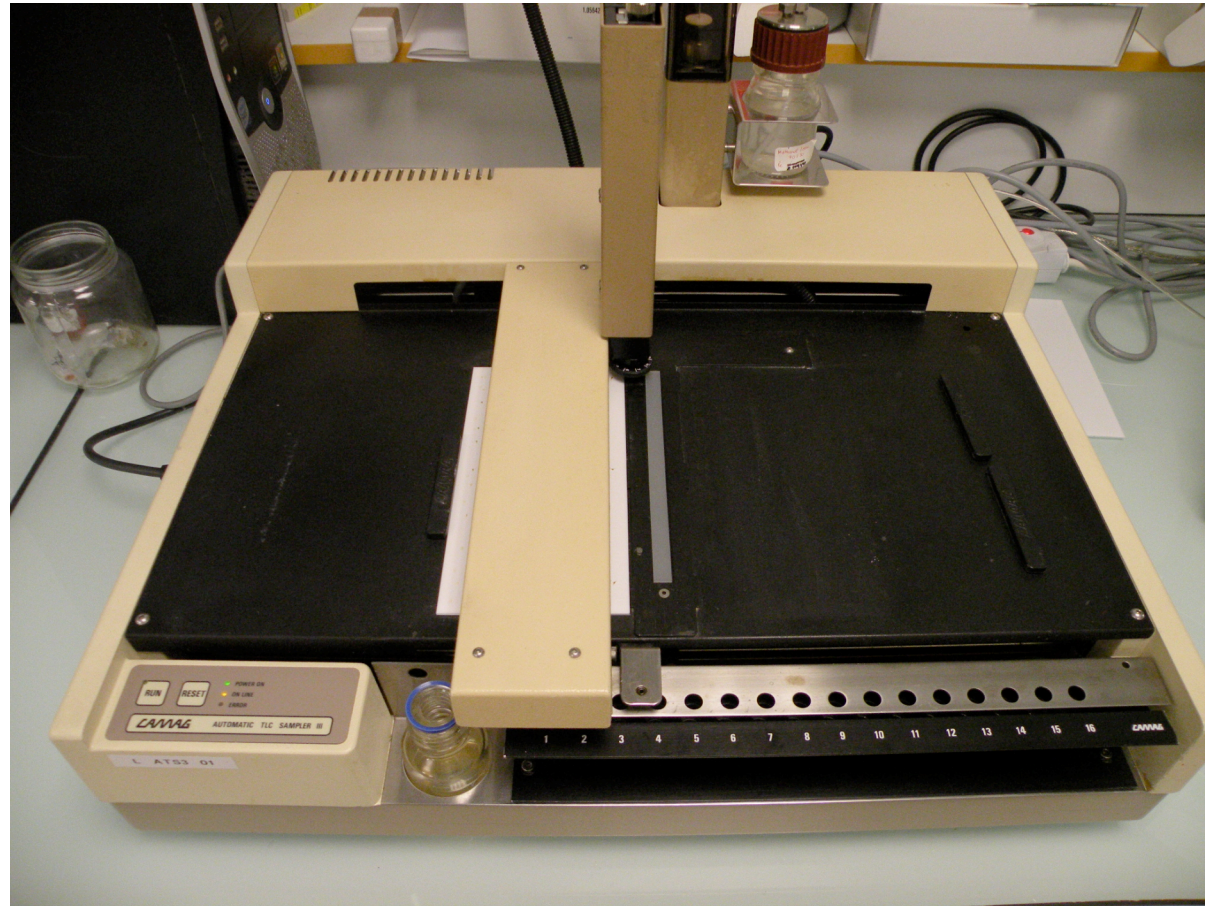
2. Outils

IV - Perspective

Chaîne HPTLC dans son ensemble



Module HPTLC



Déposeur automatique : ATS3

Module HPTLC



Chambre de migration automatique : ADC2

Module HPTLC



Caméra : TLC visualizer



Plan

I - Présentation de Greentech

II- Intérêt de la CCM

1. Outils HPTLC

2. Analyse MP

3. Analyse PF

III – Discussion

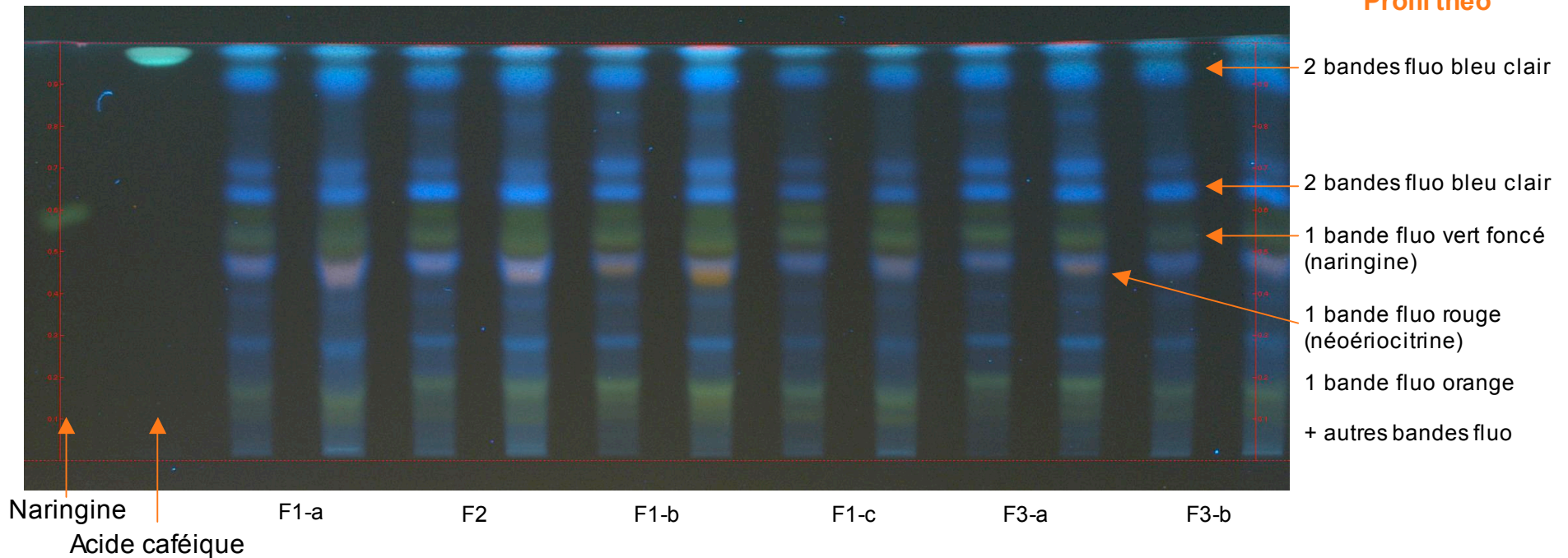
1. Méthode

2. Outils

IV - Perspective

II – 2. Intérêt de l'analyse CCM : comparaison de MP issues de différents fournisseurs

Exemple 1 : Orange amère épicarpe et mésocarpe. Monographie 01/2009:1603. Ph. Eur. 7.0



Conditions

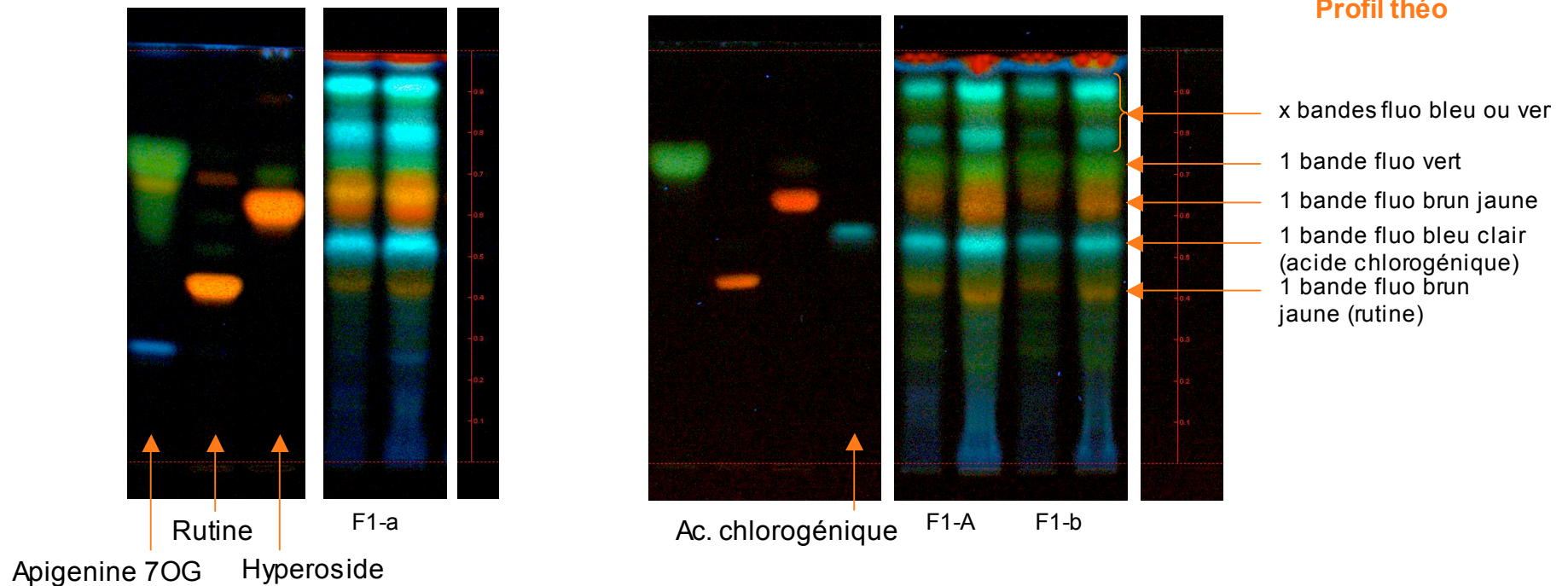
Extraction : 1,0 g drogue pulvérisé + 10 mL méthanol. 65°C, agitation, 5 min
Phase mobile : eau/acide formique/acétate d'éthyle 10/15/75 V/V/V
Dépôt : 2 et 4 µL
Détection : diphénylborate d'aminoéthanol + macrogol 400
Observation : UV 365 nm

→ Profils conformes

→ MP validées

II – 2. Intérêt de l'analyse CCM : suivi qualité de différents lots de MP issus du même fournisseur

Exemple 2 : Matricaire fleur. Monographie (extrait fluide) 01/2008:1544. Ph. Eur. 7.0



Conditions

Extraction : 1,0 g drogue pulvérisé + 10 mL méthanol. 65°C, agitation, 5 min

Phase mobile : acide formique/acide acétique/eau/acétate d'éthyle 7,5/7,5/18/67 V/V/V/V

Dépôt : 3 et 5 µL

Détection : diphénylborate d'aminoéthanol + macrogol 400

Observation : UV 365 nm

F1-a : échantillon reçu et analysé en oct 2010

F1-A : même lot taille production. Reçu et analysé en fév 2011

F1-b : nouvel échantillon reçu et analysé en fév 2011

- Echantillon conforme : validé pour commande
- Lot pour production conforme à l'échantillon reçu : MP validée
- Fournisseur fiable



Plan

I - Présentation de Greentech

II- Intérêt de la CCM

1. Outils HPTLC

2. Analyse MP

3. Analyse PF

III – Discussion

1. Méthode

2. Outils

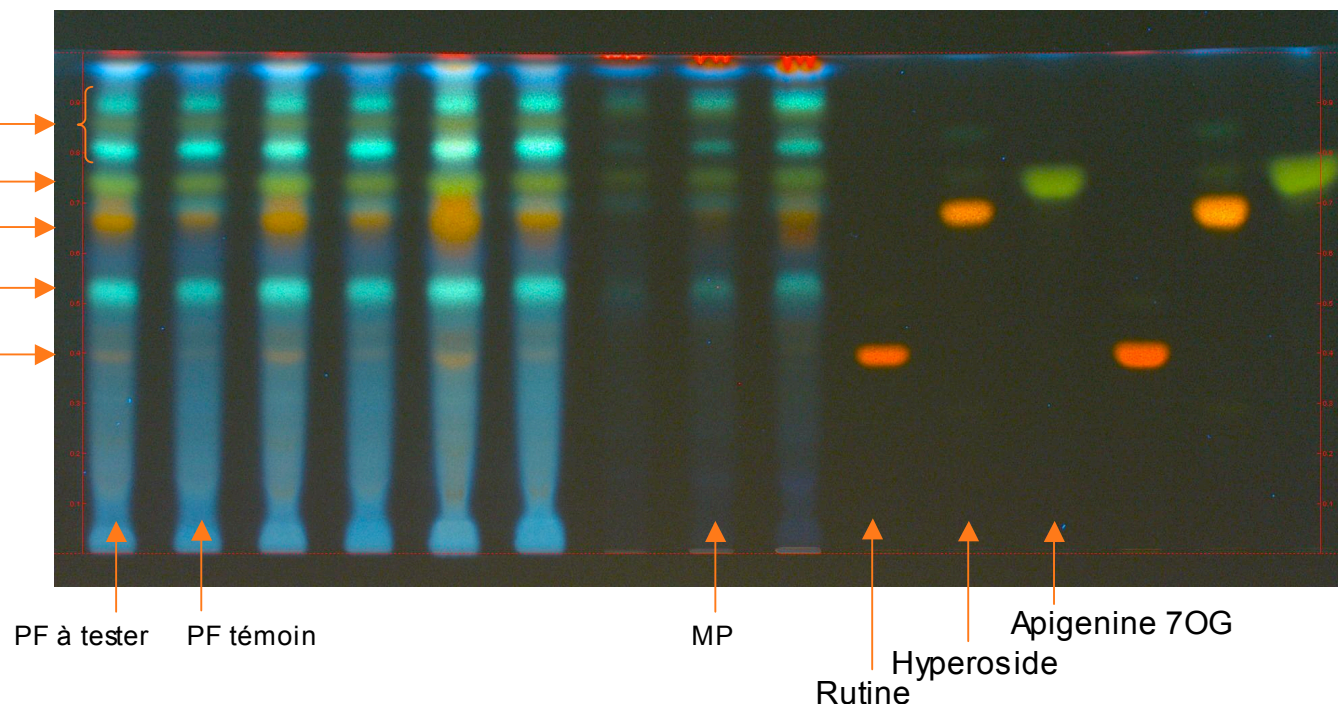
IV - Perspective

II – 3. Intérêt de l'analyse CCM : conformité PF

Suite exemple 2 : Matricaire fleur. Monographie (extrait fluide) 01/2008:1544. Ph. Eur. 7.0

Profil théo

x bandes fluo bleu ou vert
1 bande fluo vert
1 bande fluo brun jaune
1 bande fluo bleu clair
1 bande fluo brun jaune



Conditions

Phase mobile : acide formique/acide acétique/eau/acétate d'éthyle 7,5/7,5/18/67 V/V/V/V
Dépôt : PF : 3, 4, 6 µL / MP : 2, 5, 10 µL / STD : 5, 10 µL
Détection : diphénylborate d'aminoéthanol + macrogol 400
Observation : UV 365 nm

- profil PF conforme Ph. Eur
- profil PF semblable profil MP
- profil PF à tester semblable profil PF témoin
- PF conforme



Plan

I - Présentation de Greentech

II- Intérêt de la CCM

1. Outils HPTLC
2. Analyse MP
3. Analyse PF

III – Discussion

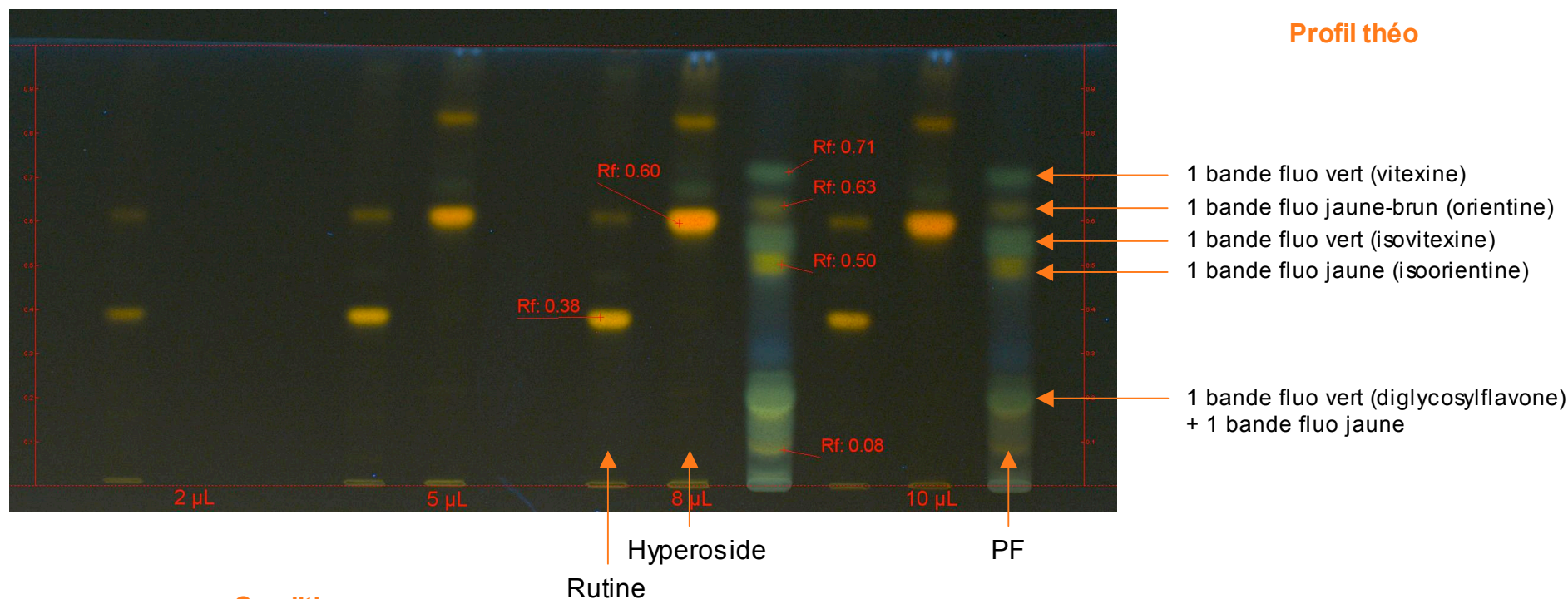
1. Méthode

2. Outils

IV - Perspective

III – 1. Discussion : méthode Ph. Eur

Exemple 3 : Passiflore fleur. Monographie 01/2008:1459 corrigé 6.0. Ph. Eur. 7.0



Conditions

Phase mobile : acide formique/eau/
méthyléthylcétone/acétate d'éthyle
10/10/30/50 V/V/V/V
Dépôt : 2, 5, 8 et 10 µL
Détection : diphénylborate d'aminoéthanol
+ macrogol 400
Observation : UV 365 nm

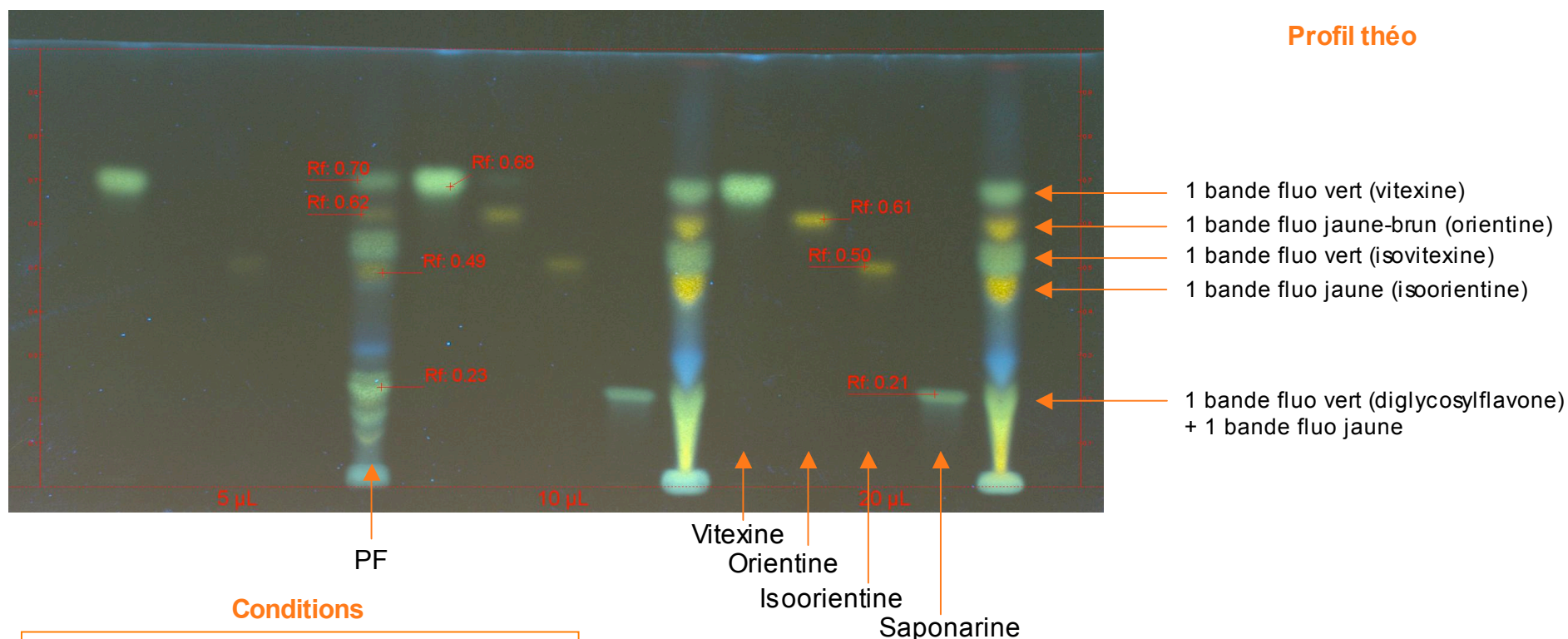
→ Profil conforme monographie Ph. Eur.

→ PF validé

→ Mais marqueur non pertinent

III – 1. Discussion : méthode Ph. Eur

Suite Exemple 3 : Passiflore fleur. Monographie 01/2008:1459 corrigé 6.0. Ph. Eur. 7.0 adaptée



Phase mobile : acide formique/eau/
méthyléthylcétone/acétate d'éthyle
10/10/30/50 V/V/V/V
Dépôt : 5, 10 et 20 µL
Détection : diphénylborate d'aminoéthanol
+ macrogol 400
Observation : UV 365 nm

- Profil conforme monographie Ph. Eur.
- Marqueur caractéristique présent dans le PF
- PF validé



Plan

I - Présentation de Greentech

II- Intérêt de la CCM

1. Outils HPTLC

2. Analyse MP

3. Analyse PF

III – Discussion

1. Méthode

2. Outils

IV - Perspective

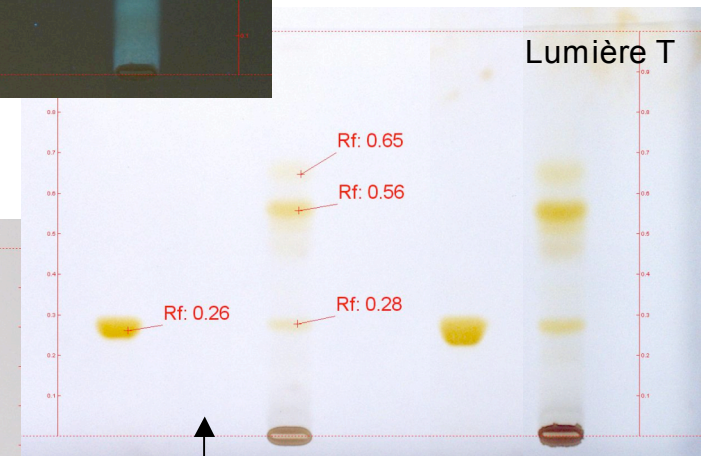
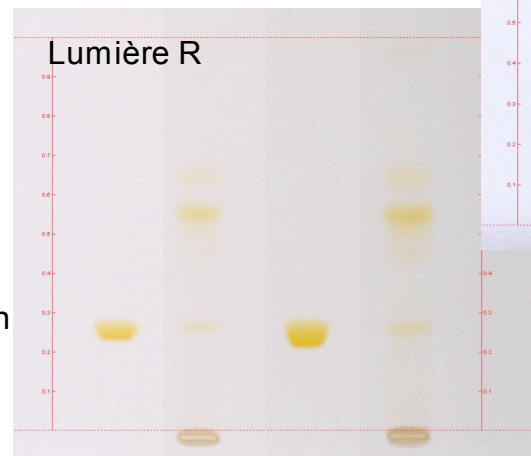
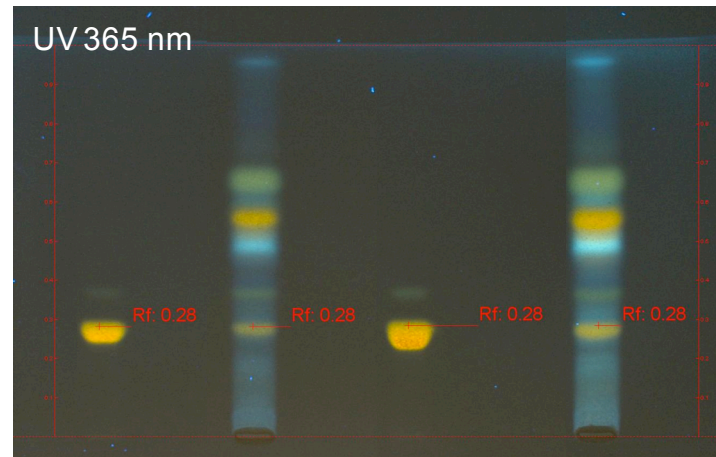


III – 2. Discussion : outils

- Comparatif CCM manuelle / HPTLC



- Dépôt non régulier
- Distance de migration non contrôlée
- Couleur des spots non conservée



- Choix de la lumière
- Calcul auto des Rf
- Données enregistrées : pas de perte d'info



III – 2. Discussion : outils

- Problèmes rencontrés :
 - Déposeur ATS3 : bouchage du capillaire
 - Conséquences : dépôt irrégulier, volume non contrôlé, aucun dépôt
 - Causes : incompatibilité de solvant, extrait trop concentré ?
 - Solutions : rinçage acétone + ultrasons. Changement du capillaire
 - Chambre de développement ADC2 : bouchage des vannes de solvant
 - Conséquences : solvant ne descend plus dans la cuve. Quantité versée non reproductible
 - Causes : systèmes de solvants non miscibles
 - Solutions : rinçage à l'acétone
 - Caméra TLC visualizeur : photos moins pertinente que la visualisation en directe
 - Conséquences : interprétation plus difficile lors de réouverture de dossier
 - Solutions : jouer sur les contrastes (pas toujours suffisant)



Plan

I - Présentation de Greentech

II- Intérêt de la CCM

1. Outils HPTLC
2. Analyse MP
3. Analyse PF

III – Discussion

1. Méthode
2. Outils

IV - Perspective



IV - Perspectives



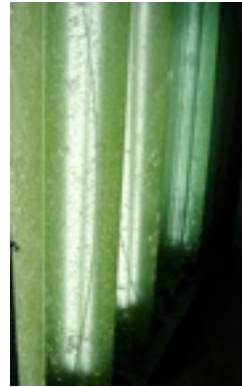
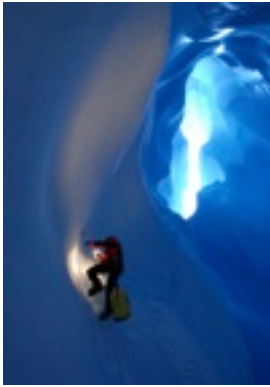
- Dépôt : ATS4 ?
- Développement : contrôleur d'humidité
- Révélation : cuve d'immersion
- Quantification : densitomètre





Conclusion

- Intérêt réel de l'HPTLC/CCM d'antan :
 - Confort (étapes automatisées)
 - Reproductibilité (méthodes enregistrées)
 - Traçabilité (enregistrement des données, édition de rapport)
- Application :
 - Analyse matière première : plante
 - ✓ Comparer différents fournisseurs
 - ✓ Valider échantillon avant commande
 - ✓ Valider conformité pour production
 - Produit fini
 - ✓ Valider conformité / témoin



Biopôle Clermont Limagne
 63360 Saint Beauzire
 00334 73 33 99 00
www.greentech.fr

greentech@greentech.fr

Merci !

