

# Recherche de substances critiques identifiées dans un produit naturel par HPTLC

Présentation du 9 juin 2016,  
Marie BARTOLO, Sandrine CARISTAN  
SANOFI Montpellier R&D

# Optimisation méthode HPTLC

Notre **objectif** est l'analyse d'un produit naturel d'origine végétale

Procédé de transformation:

Substance naturelle → Farine → Lyophilisat  
➤ Matière première → Principe Actif

- Recherche et quantification des aflatoxines
- Recherche des principaux acides gras:
  - acide palmitique, acide linoléique et acide oléique
- Difficulté : pas de spécifications au moment de la mise au point
- Problématique sur la nature de l'échantillon :
  - sous forme de farine ou de lyophilisat
  - effet de matrice de l'échantillon
  - problème de quantité d'échantillon à disposition

# Première partie

---

## Recherche des Aflatoxines

# Optimisation méthode HPTLC

## Recherche des aflatoxines

---

- Premier essai de prise en main:

Utilisation de l'application CAMAG A97.1, détermination des aflatoxines AfB1 AfB2 AfG1 AfG2 dans l'extrait de tomates.

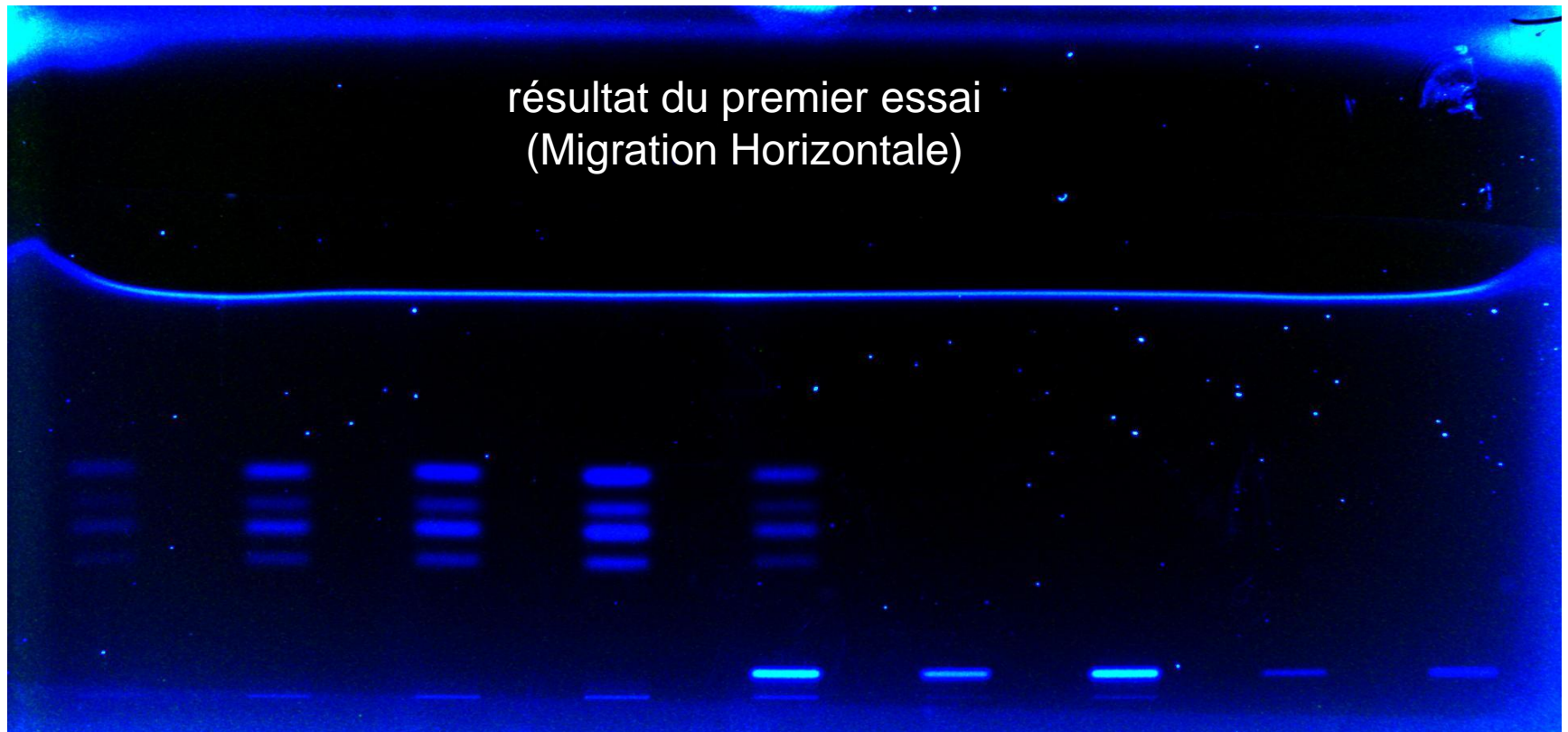
[A-97\\_1\\_Aflatoxins\\_in\\_tomato\\_extract.pdf](#)

- Multiples extractions de l'échantillon par décantation / évaporation
  - Essai sur témoin d'aflatoxines seules
    - (B1, G1, B2, G2, M1)
  - Dépôt sur HPTLC Si 60F254 20x10cm d'un mélange d'aflatoxines
-

# Optimisation méthode HPTLC

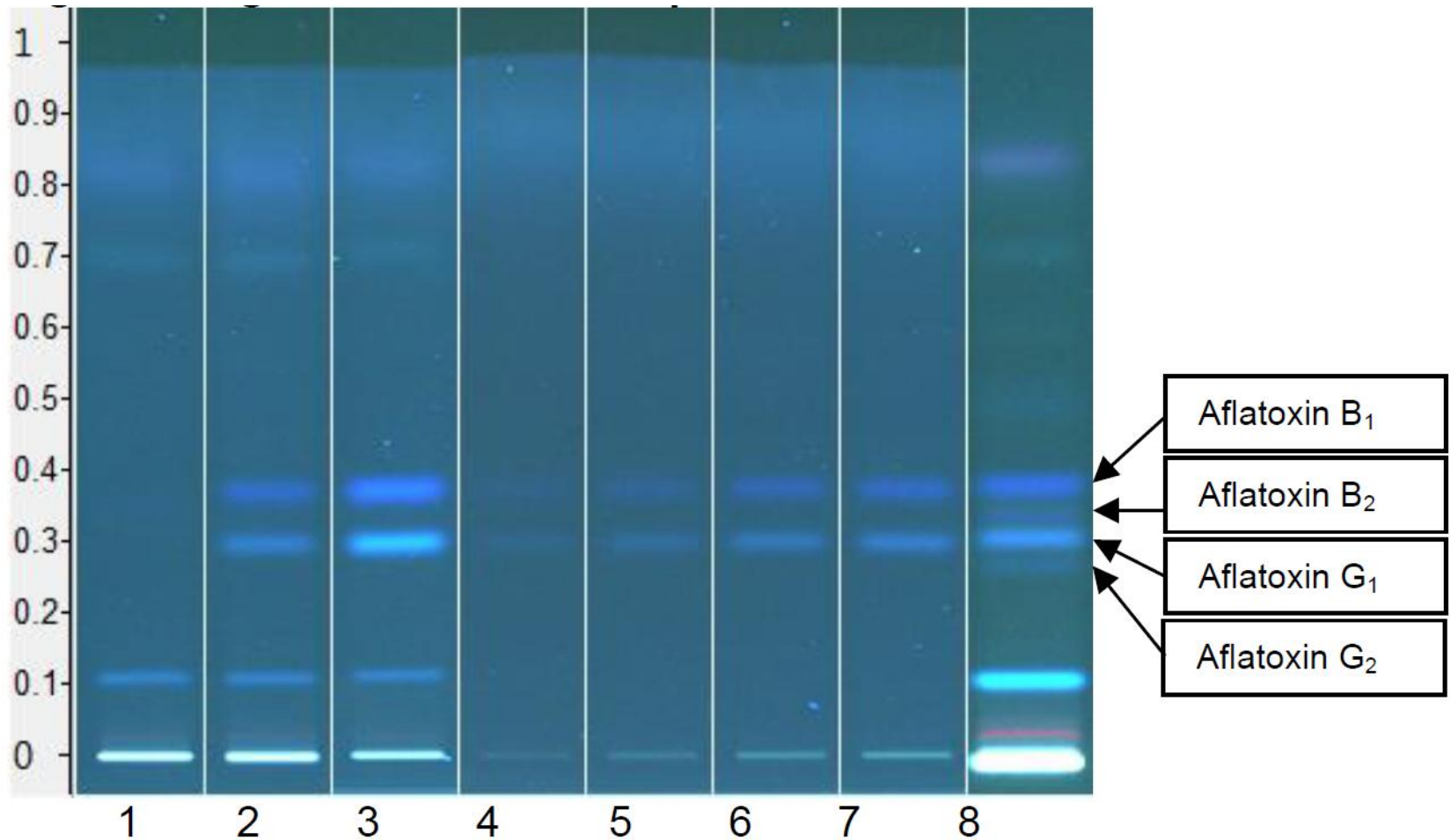
## Recherche des aflatoxines

---



# Optimisation méthode HPTLC

## Recherche des aflatoxines



# Optimisation méthode HPTLC

## Recherche des aflatoxines

---

- Utilisation de l'USP pour connaître la norme recherchée et sa LOQ :
  - valeur cible
    - 5 ppb pour AfB1
    - 20 ppb pour la somme des aflatoxines AfB1 AfB2 AfG1 AfG2

[USP 561 extract Article of botanical origin.pdf](#)

- Extraction / décantation
- Traitement échantillon sur cartouche IAC si nécessaire
- Une surcharge sur la plaque par overspotting.

# Optimisation méthode HPTLC

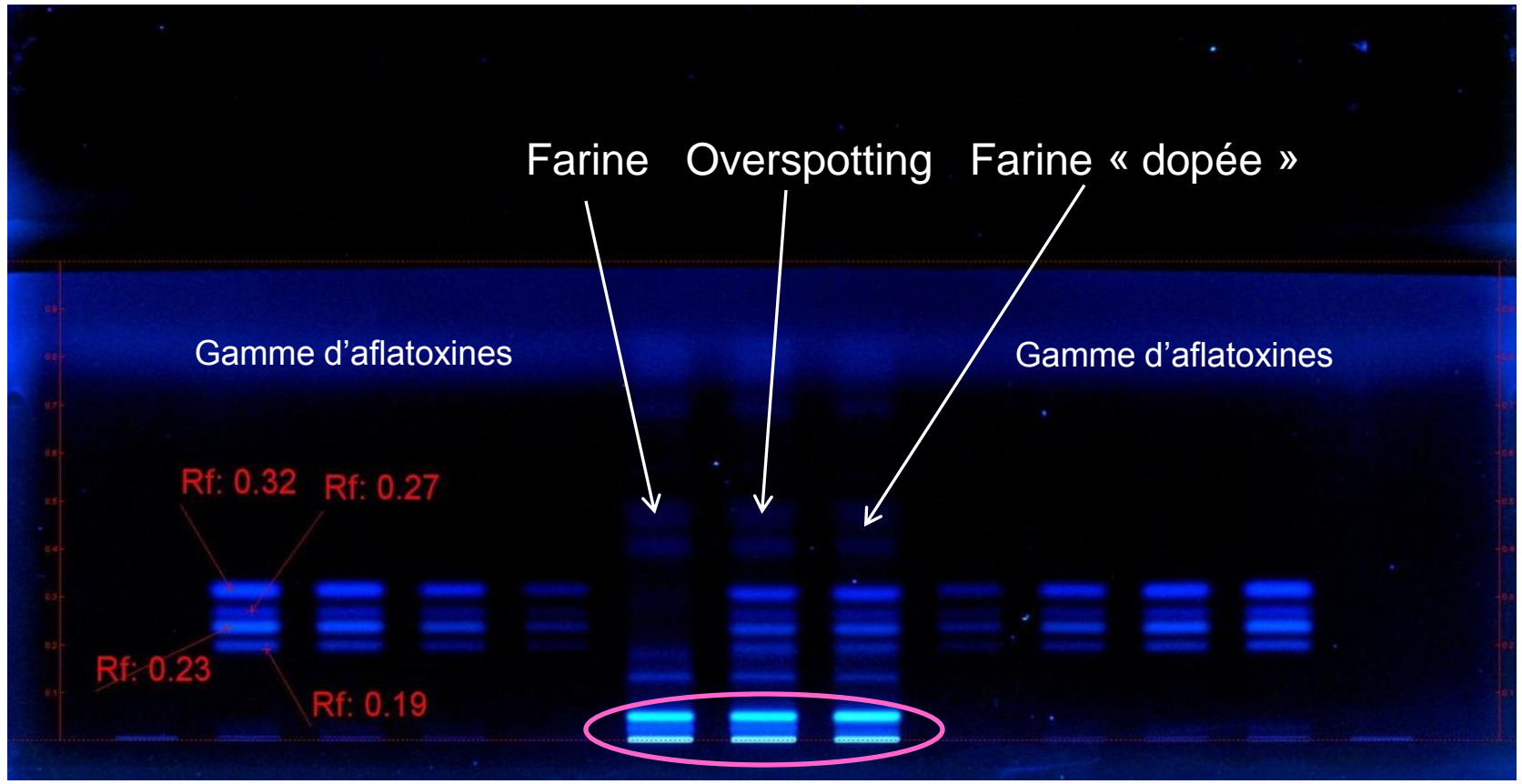
## Recherche des aflatoxines

---

- Décisions :
    - Travail sur farine pour descendre en limite de quantification (lyophilisat pas disponible en quantité suffisante)
    - Essai sans cartouche IAC (délai de préparation échantillon plus court)
    - Ajout d'un dépôt d'une farine « dopée » en aflatoxine (5 ppb)
      - vérification de l'entraînement des aflatoxines pendant le processus extraction/décantation
-



# Conditions CAMAG



# Optimisation méthode HPTLC

## Recherche des aflatoxines

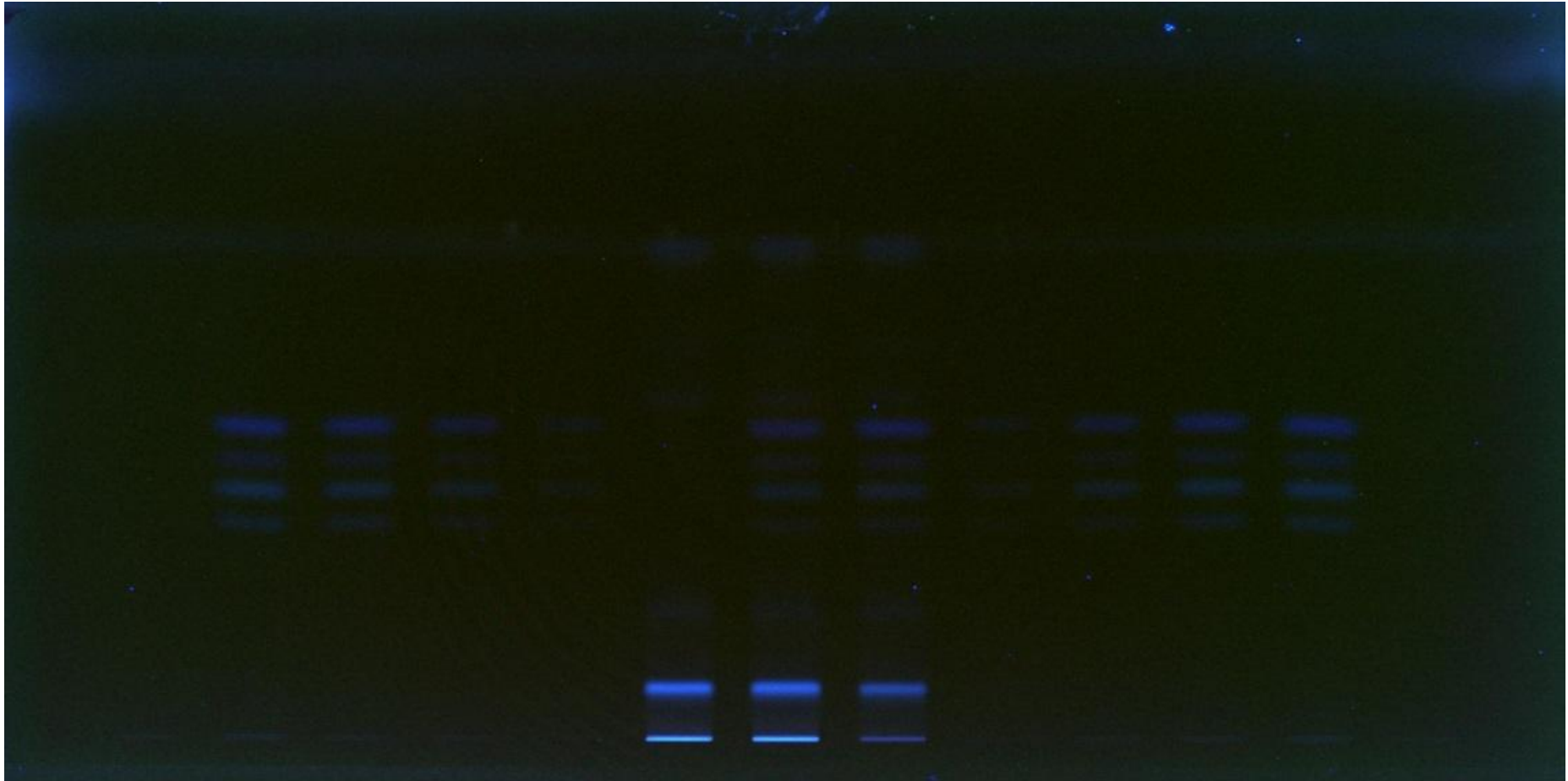
---

- Finalisation de la méthode
  - Optimisation Détection
  - Choix mode de migration
  
- Comparatifs de plaques

# Comparaison de plaques

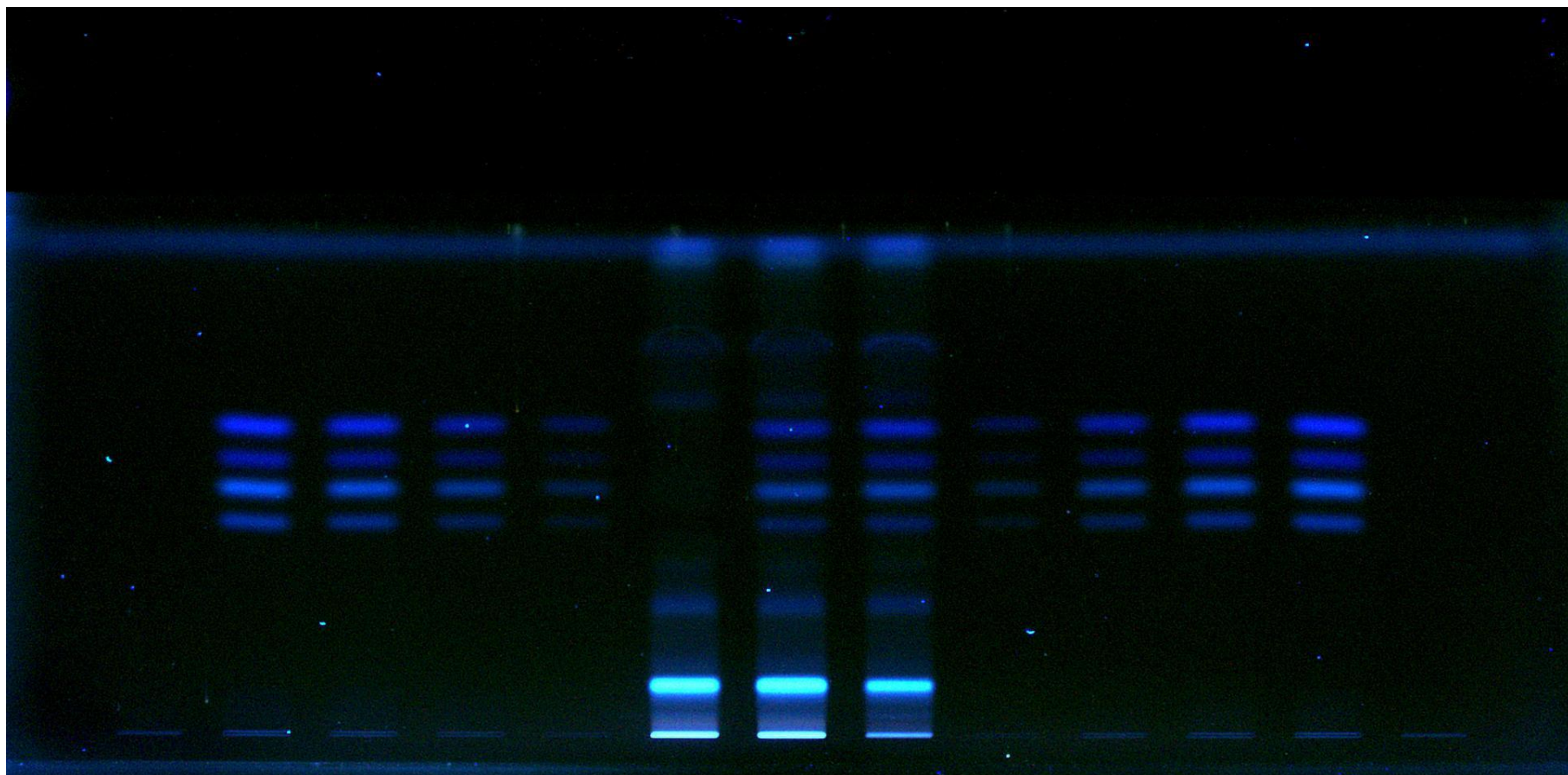
## Sans immersion dans la paraffine

---

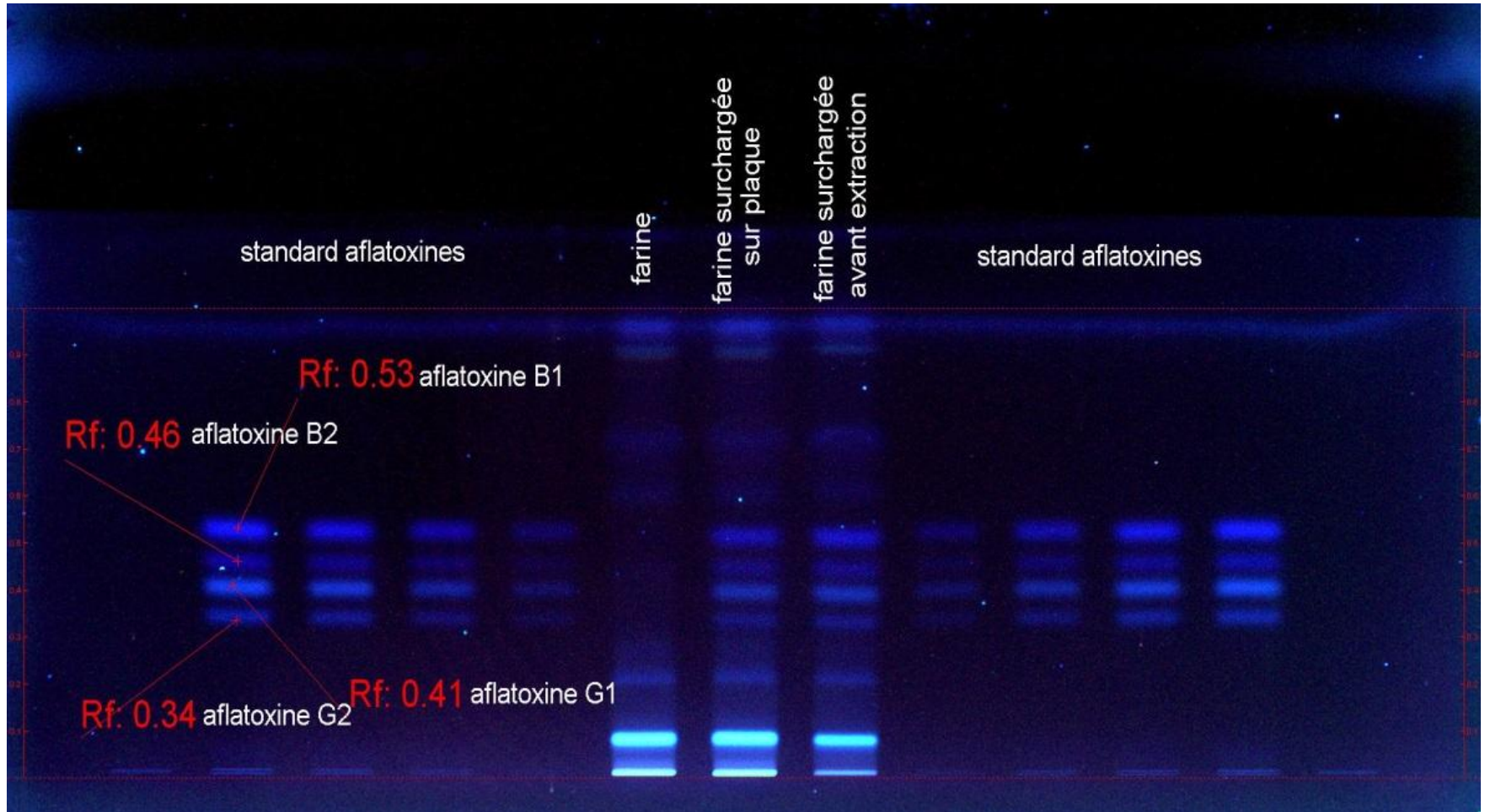


# Comparaison de plaques avec immersion dans la paraffine

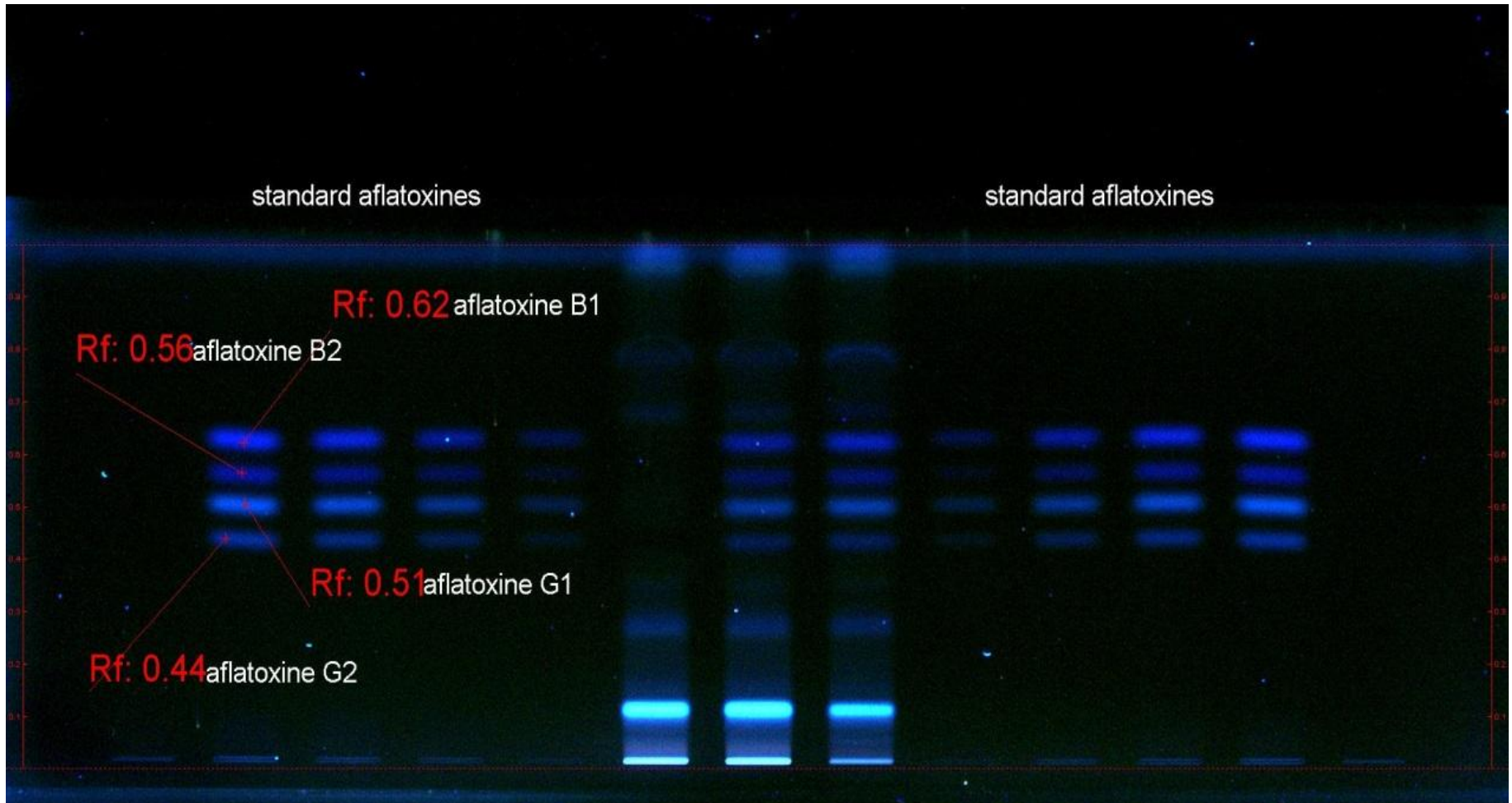
---



# Comparaison de plaques migration cuve horizontale



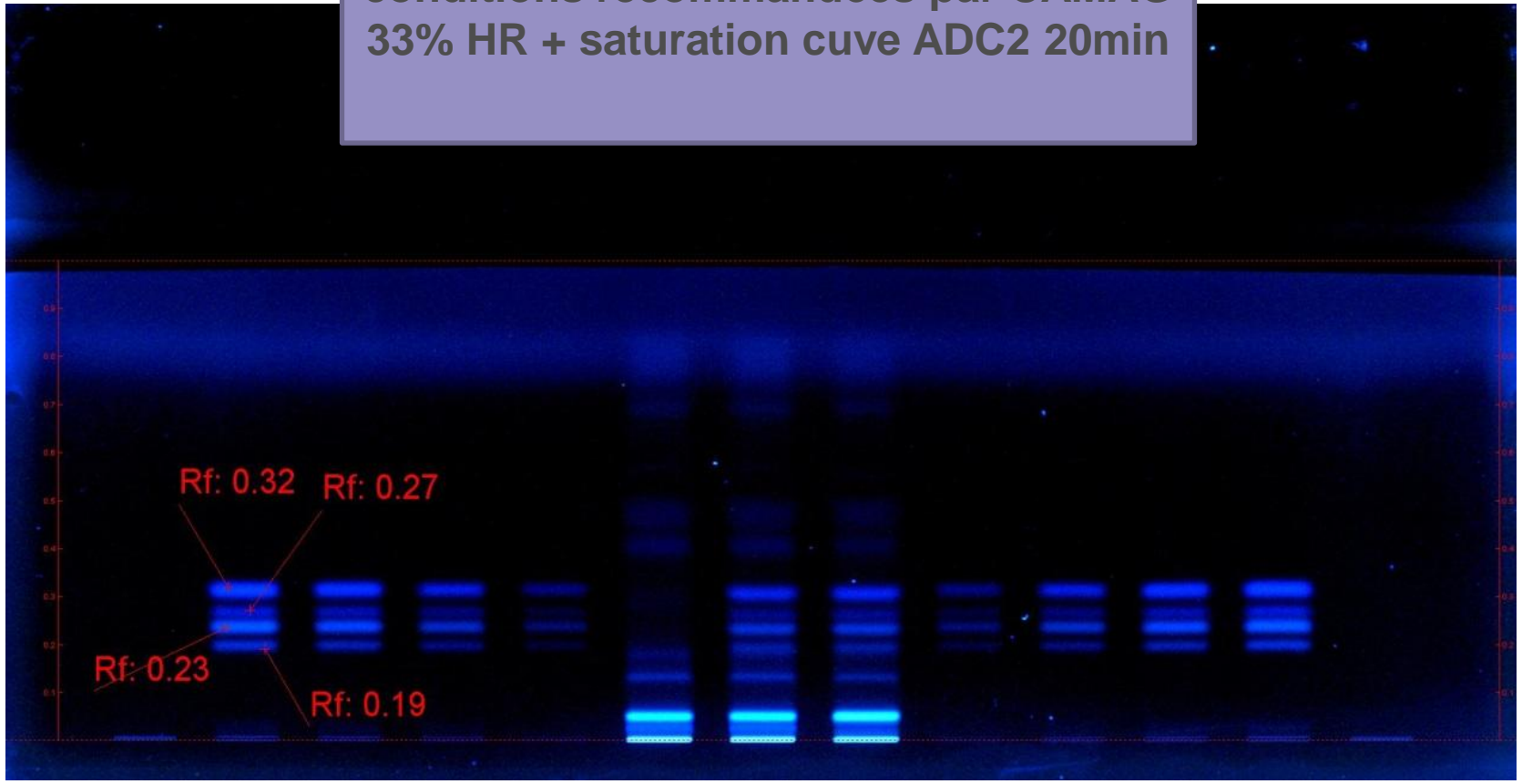
# Comparaison de plaques ADC2



# Comparaison de plaques

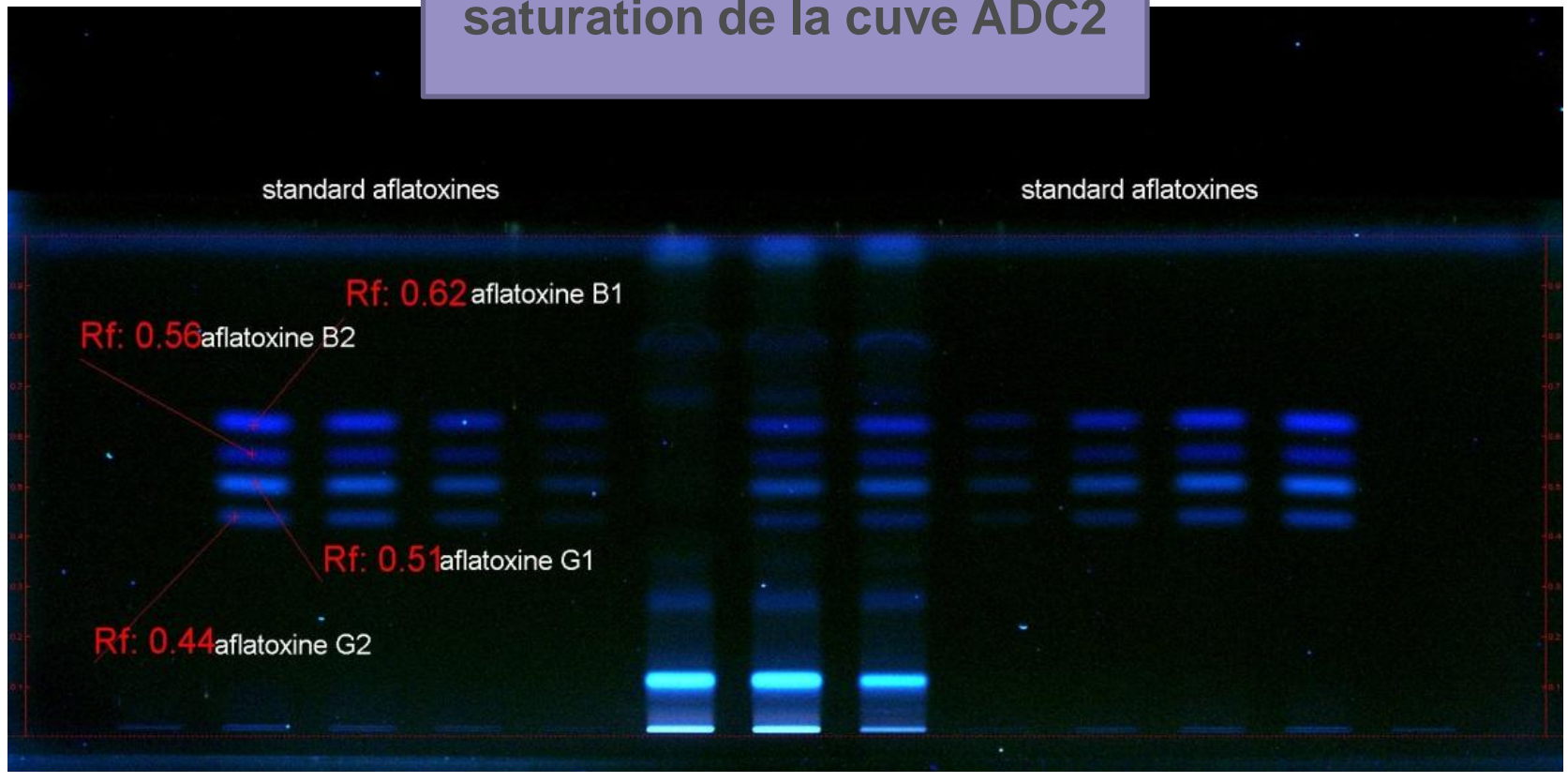
## Conditions CAMAG

conditions recommandées par CAMAG  
33% HR + saturation cuve ADC2 20min



# Comparaison de plaques notre mise au point

Nos conditions sans  
saturation de la cuve ADC2



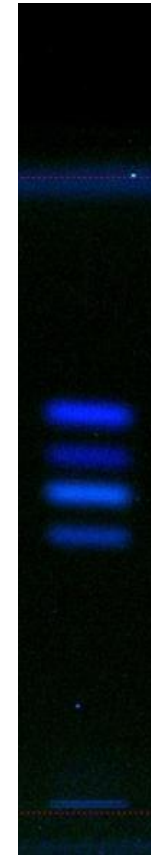


# Comparaison de pistes d'un mélange de 4 aflatoxines

Condition Camag « tomates »  
Rf 0,19/0,23/0,27/0,32

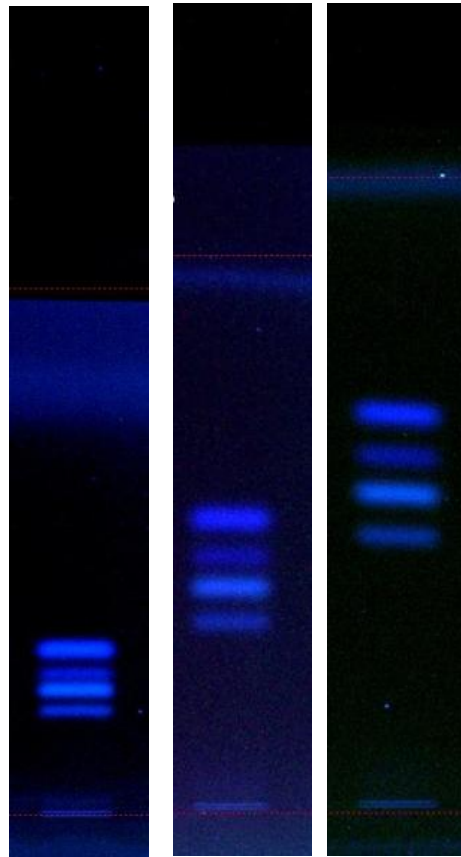
Migration cuve horizontale  
Rf 0,34/0,41/0,46/0,53

ADC2  
Rf 0,44/0,51/0,56/0,62



# Comparaison de pistes avec le logiciel Visioncats

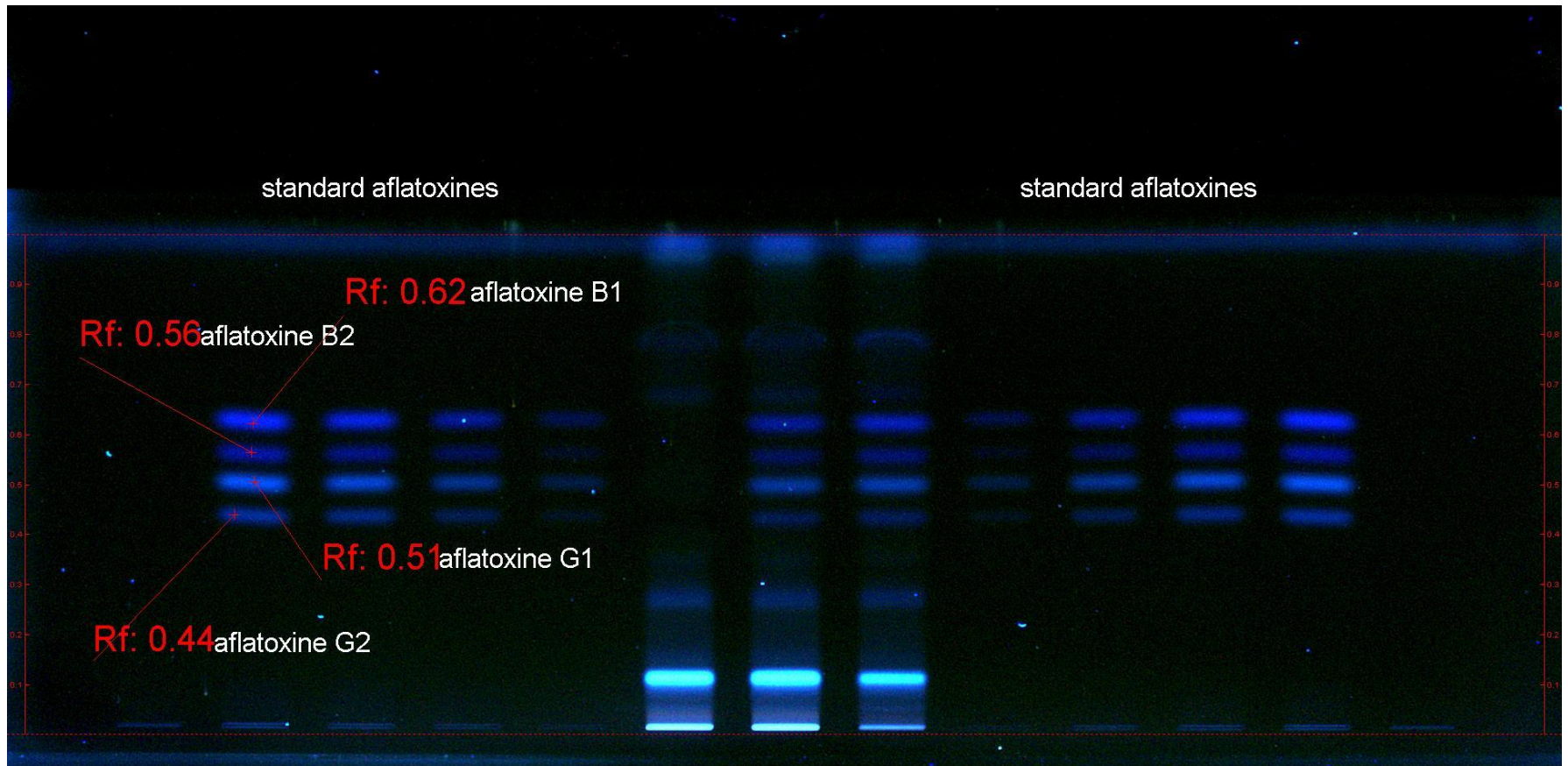
**winCATS**  
Planar Chromatography Manager



# Méthode HPTLC retenue

## Recherche des aflatoxines

- Plaque obtenue 366nm après paraffine, migration au choix ADC2 ou horizontale



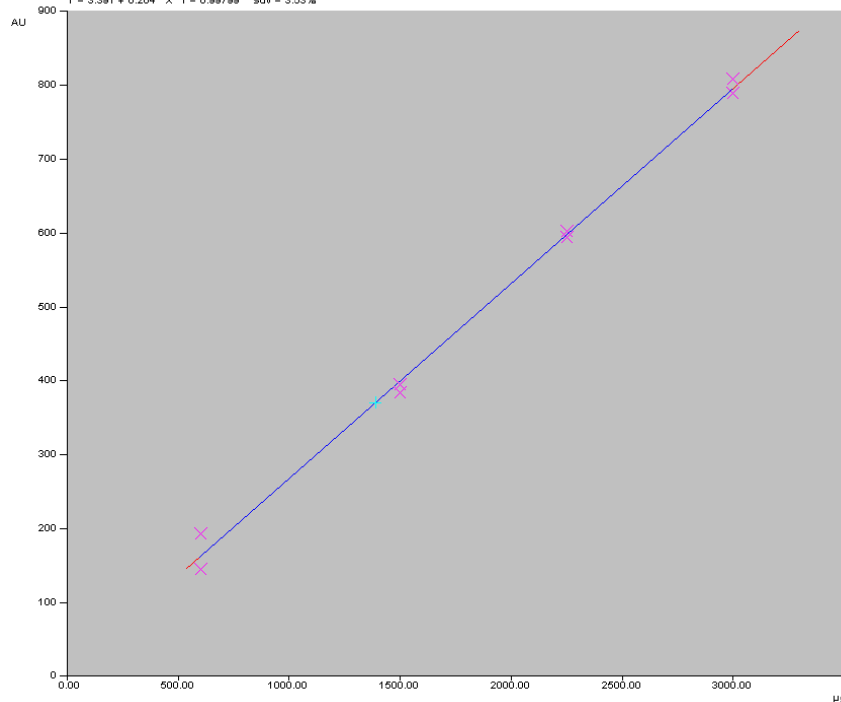
# Méthode HPTLC retenue

## Quantification des aflatoxines – scanner 3

- courbe linéaire ex: aflatoxine B2 (  $r= 0.998$  )

Substance: aflatoxine B2 @ 366 nm Regression mode: Linear

$Y = 3.391 + 0.264 * X$   $r = 0.99799$   $sdv = 3.53\%$



Substance: aflatoxine B2 @ 366 nm

Regression mode: Linear

Regression via height  $Y = 0.6992 + 0.01411 * X$

$r = 0.99832$   $sdv = 3.16\%$

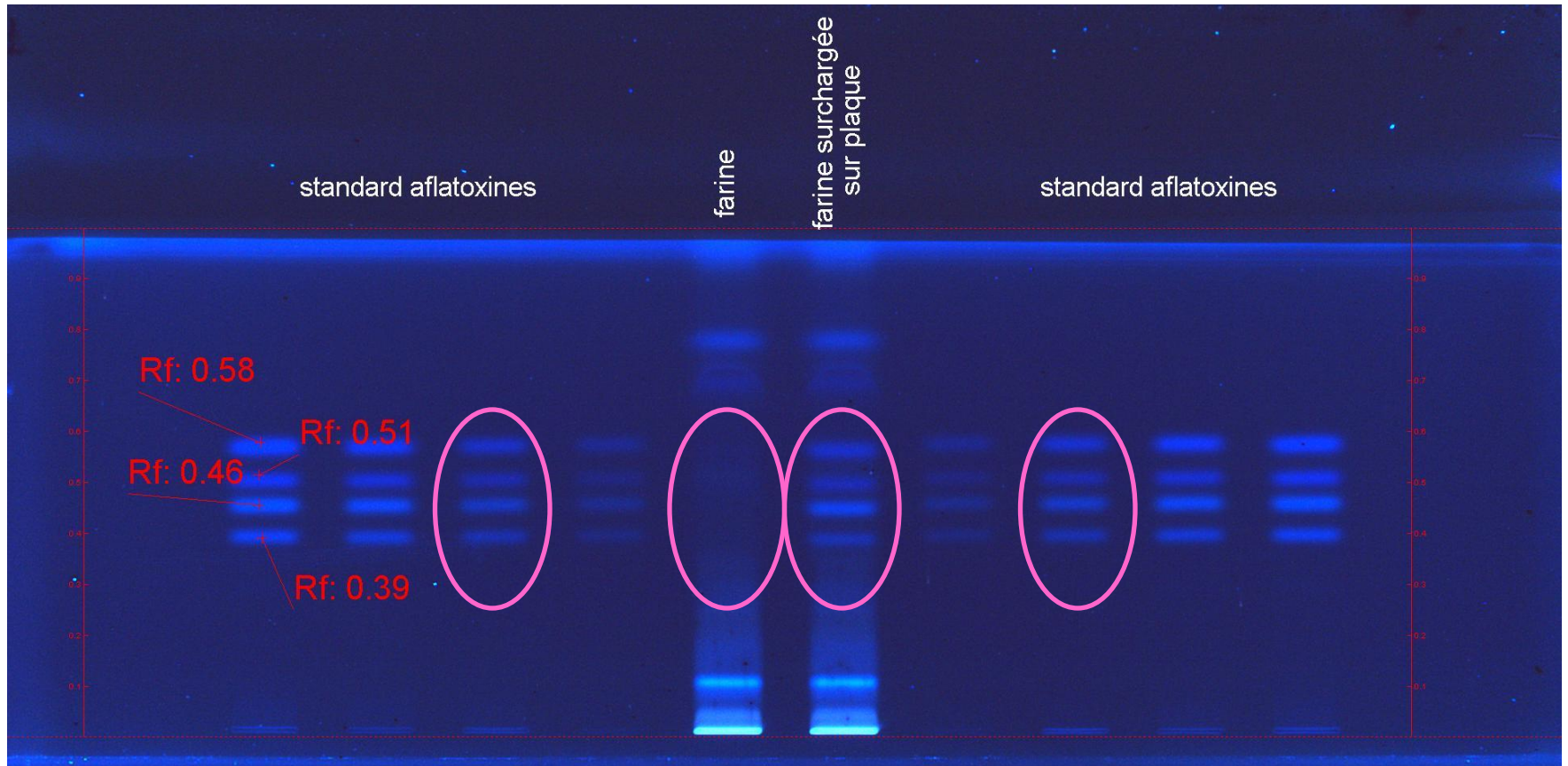
area  $Y = 3.391 + 0.2639 * X$

$r = 0.99799$   $sdv = 3.53\%$

Possibilité de quantification en aire ou hauteur => choix en aire

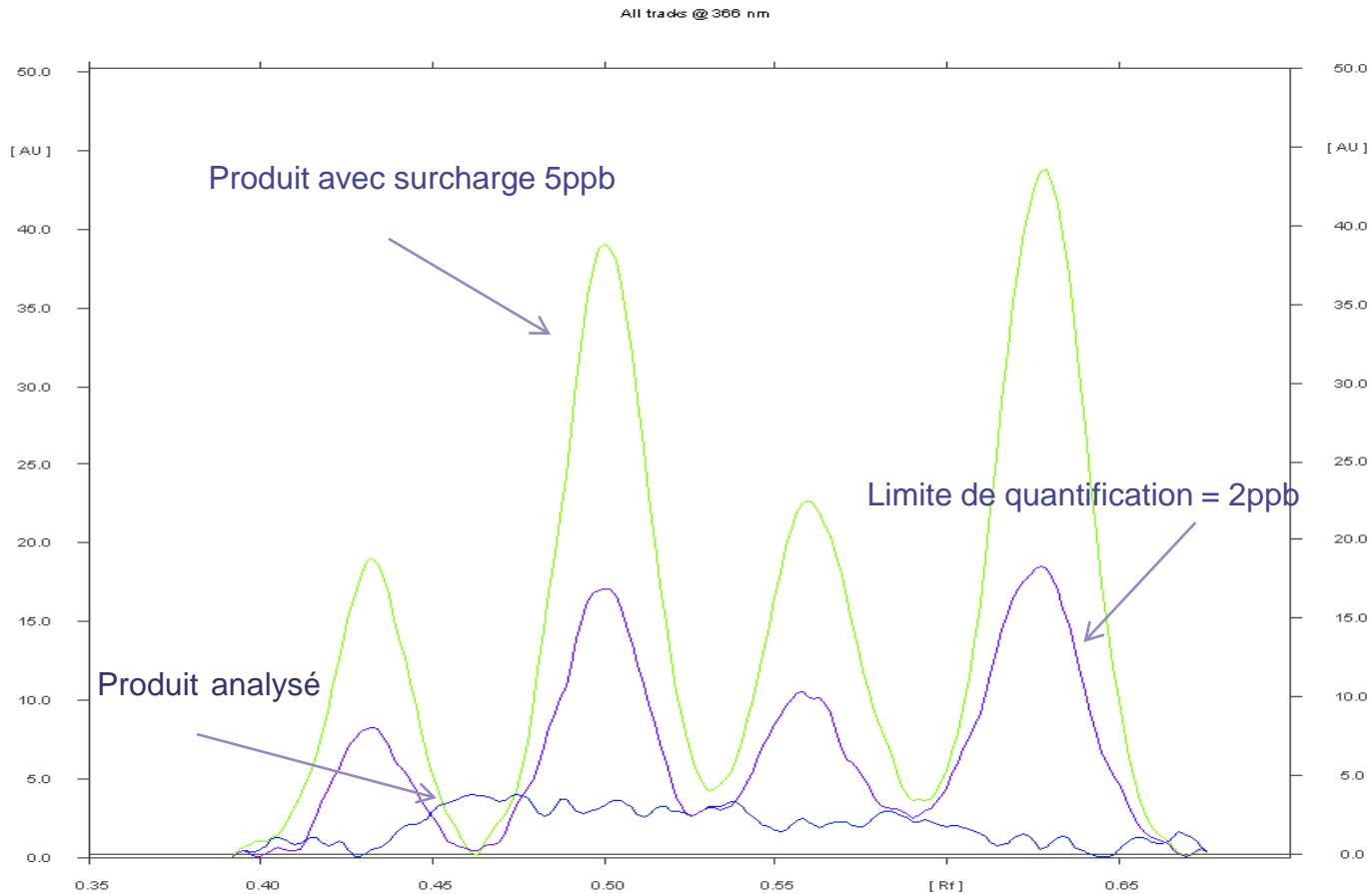
Surcharge à 5 ppb estimée à 4,7 ppb

# Résultats contrôle de libération – Avril 2016



# Résultats contrôle de libération – Avril 2016

## Quantification des aflatoxines – scanner 3



# Aflatoxine dans la farine

---

- Conclusion et perspectives
  - Pas de saturation de la cuve, celle-ci ne nous apporte pas une amélioration sur la séparation.
  - Descendre à  $< 2$  ppb en travaillant sur un dépôt en aire pour augmenter le volume déposé,
  - Pour une reproductibilité, l'HR sera fixée à environ 50%
    - Meilleure séparation observée vers 50 % HR

# Deuxième partie

---

## Recherche des Acides Gras



# Recherche des Acides Gras

---

- **Le point de départ de cette mise au point**

Procédé de transformation:

Substance naturelle → Farine → Lyophilisat

- Notre rôle sera de contrôler si les lavages organiques sont efficaces
  - ✓ élimination des acides gras
- Premier essai: pas d'acide gras détectés dans le lyophilisat (aucune idée de la limite de détection)
- Pas de norme sur les 3AG principaux qui sont les acides palmitique, linoléique et oléique.
- Analyse sur la farine car quantité disponible importante / lyophilisat.
- Extraction identique à celle utilisée pour les aflatoxines

# Recherche des Acides Gras

---

- Après beaucoup d'essais sur plusieurs types de plaques pour obtenir une « bonne séparation » des 3 acides gras,

Nous avons optés pour une analyse des acides gras en deux temps sur deux types de plaques HPTLC Silice et RP18 F<sub>254</sub>

- Sur RP18 F<sub>254</sub>, séparation des 3 acides gras, mais mauvaise détection de AP
  - Détection UV 190 nm + phosphomolydique (traçabilité visualizer)
- Sur SiO<sub>2</sub>, pas de séparation des 3 acides gras mais TOUS se détectent.
  - Détection UV-fluo 366 nm (primuline) + phosphomolydique (traçabilité visualizer)

# Analyse par HPTLC

## Recherche des Acides Gras

---

- Deux méthodes HPTLC par échantillon sont mises en œuvre
  - Une pour séparer l'acide oléique et linoléique : ADC 2
    - l'acide palmitique ne se détecte pas sur cette plaque
  - Une deuxième méthode : somme des 3 acides gras (oléique, palmitique et linoléique) : AMD
    - Vérification de l'équivalence des facteurs de réponse
    - Gamme unique en Acide Linoléique / Calibration qui a le Fr le plus défavorable (« surestimation » du résultat)

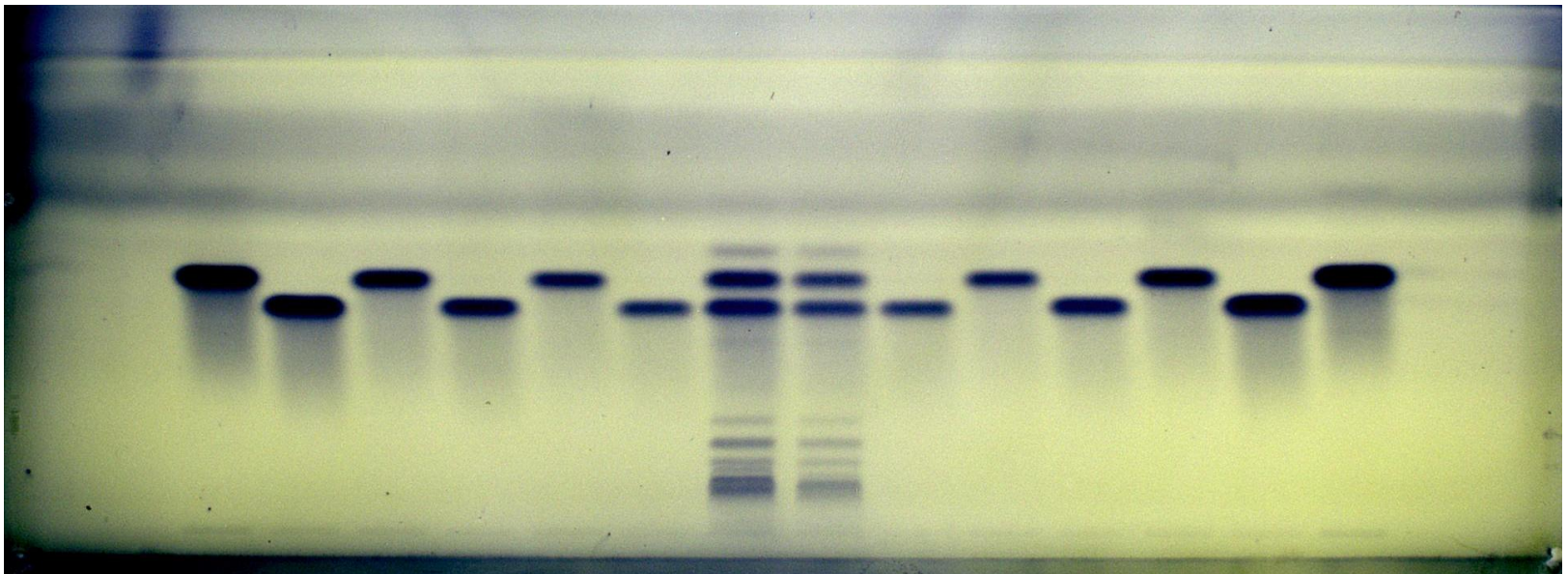
# Acide Oléique et Linoléique RP18

- Méthode : [Acide Oléique et Linoléique par HPTLC.docx](#)

Gamme AL/AO

Farine 5 et 2  $\mu$ l

Gamme AL/AO



# Acide Oléique et Linoléique RP18

---

Avant révélation à l'acide phosphomolybdique

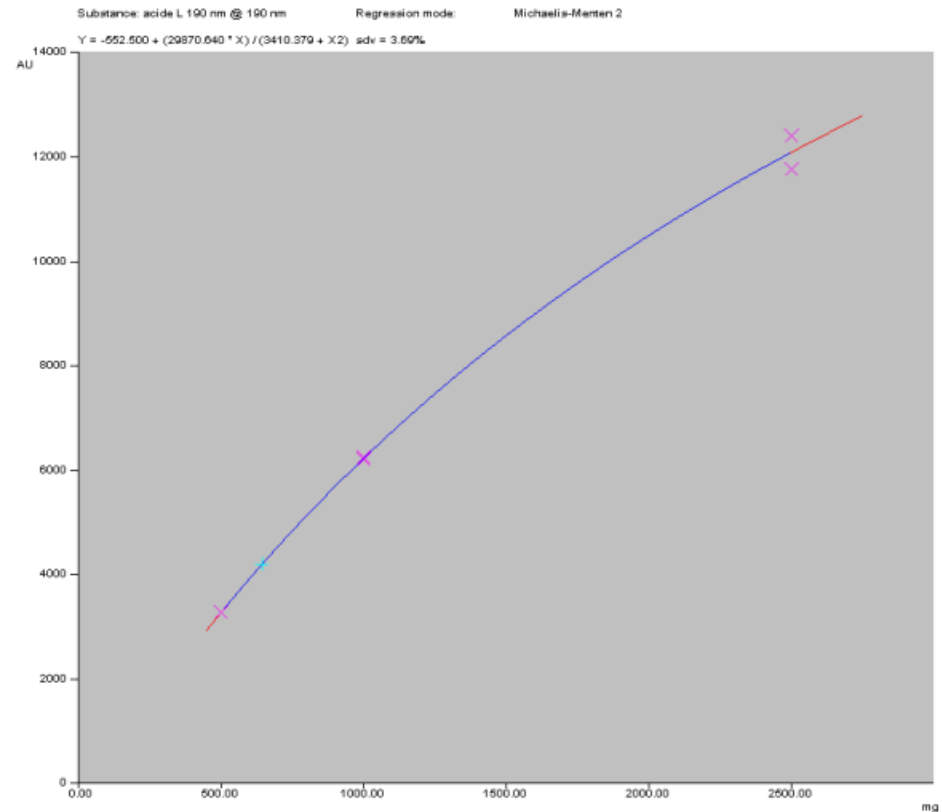
- Scanner à 190nm
- Régression de type Michaelis-Menten 2
- Résultats similaires en aire et en hauteur pour les 2 acides
  - Choix de la quantification en aire par habitude.

# Acide Linoléique

Substance: acide L 190 nm @ 190 nm      Regression mode: Michaelis-Menten 2

Regression via height     $Y = -31.01 + (835.7 * X) / (1520 + X)$       sdv = 0.45 %  
 area                       $Y = -552.5 + (2.987e+004 * X) / (3410 + X)$       sdv = 3.69 %

Track	Vial	Rf	Amount Fraction	Height	X(calc)	Area	X(calc)	Remark
1	B1							Sample acetonitrile: No peak detected or peak deleted
2	B2	0.62	2.500 g	487.08		12407.37		Std Level 1
3	B3							Std Level 1: No peak detected or peak deleted
4	B2	0.61	1.000 g	301.27		6234.06		Std Level 2
5	B3							Std Level 2: No peak detected or peak deleted
6	B2	0.61	500.00 mg	176.27		3262.81		Std Level 3
7	B3							Std Level 3: No peak detected or peak deleted
8	B4	0.61		230.32	691.71 mg	4194.26	644.34 mg	Sample solution S1
9	B4	0.61		131.86	<450.00 mg	2269.53	<450.00 mg	Sample solution S1: Out of permitted range
10	B3							Std Level 3: No peak detected or peak deleted
11	B2	0.61	500.00 mg	175.36		3271.00		Std Level 3
12	B3							Std Level 2: No peak detected or peak deleted
13	B2	0.61	1.000 g	299.88		6206.54		Std Level 2
14	B3							Std Level 1: No peak detected or peak deleted
15	B2	0.62	2.500 g	490.24		11757.28		Std Level 1
16	B1							Sample acetonitrile: No peak detected or peak deleted



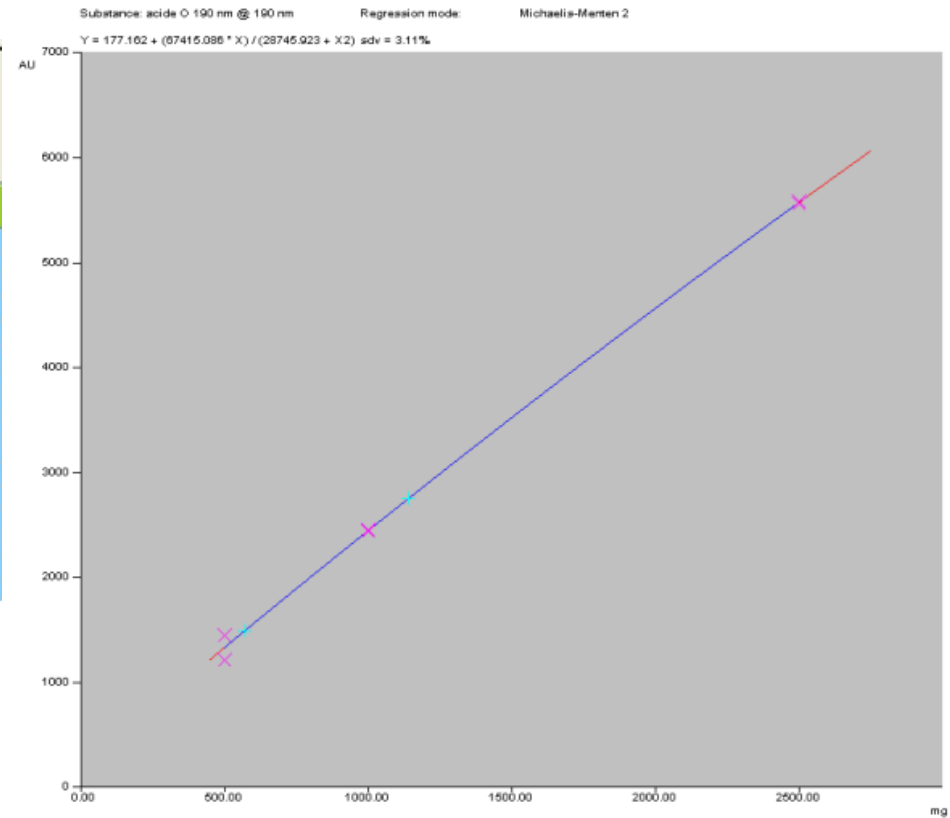
Acide linoléique : ~ 644 ppm  
 Proportionnalité des deux dépôts

# Acide Oléique

Substance: acide O 190 nm @ 190 nm      Regression mode: Michaelis-Menten 2

Regression via: height       $Y = -3.048 + (733.4 * X) / (4389 + X)$        $sdv = 1.54 \%$   
 area       $Y = 177.2 + (6.742e+004 * X) / (2.875e+004 + X)$        $sdv = 3.11 \%$

Track	Vial	Rf	Amount Fraction	Height	X(calc)	Area	X(calc)	Remark
1	B1							Sample acetonitrile: No peak detected or peak deleted
2	B2							Std Level 1: No peak detected or peak deleted
3	B3	0.55	2.500 g	263.07		5559.35		Std Level 1
4	B2							Std Level 2: No peak detected or peak deleted
5	B3	0.54	1.000 g	135.19		2439.23		Std Level 2
6	B2							Std Level 3: No peak detected or peak deleted
7	B3	0.54	500.00 mg	73.97		1447.69		Std Level 3
8	B4	0.54		142.91	1.091 g	2749.88	1.141 g	Sample solution S1
9	B4	0.54		78.36	548.01 mg	1487.06	589.61 mg	Sample solution S1
10	B3	0.54	500.00 mg	69.95		1211.75		Std Level 3
11	B2							Std Level 3: No peak detected or peak deleted
12	B3	0.54	1.000 g	130.90		2447.82		Std Level 2
13	B2							Std Level 2: No peak detected or peak deleted
14	B3	0.55	2.500 g	263.14		5582.79		Std Level 1
15	B2							Std Level 1: No peak detected or peak deleted
16	B1							Sample acetonitrile: No peak detected or peak deleted



Acide oléique: ~ 1140 ppm  
 Proportionnalité des deux dépôts

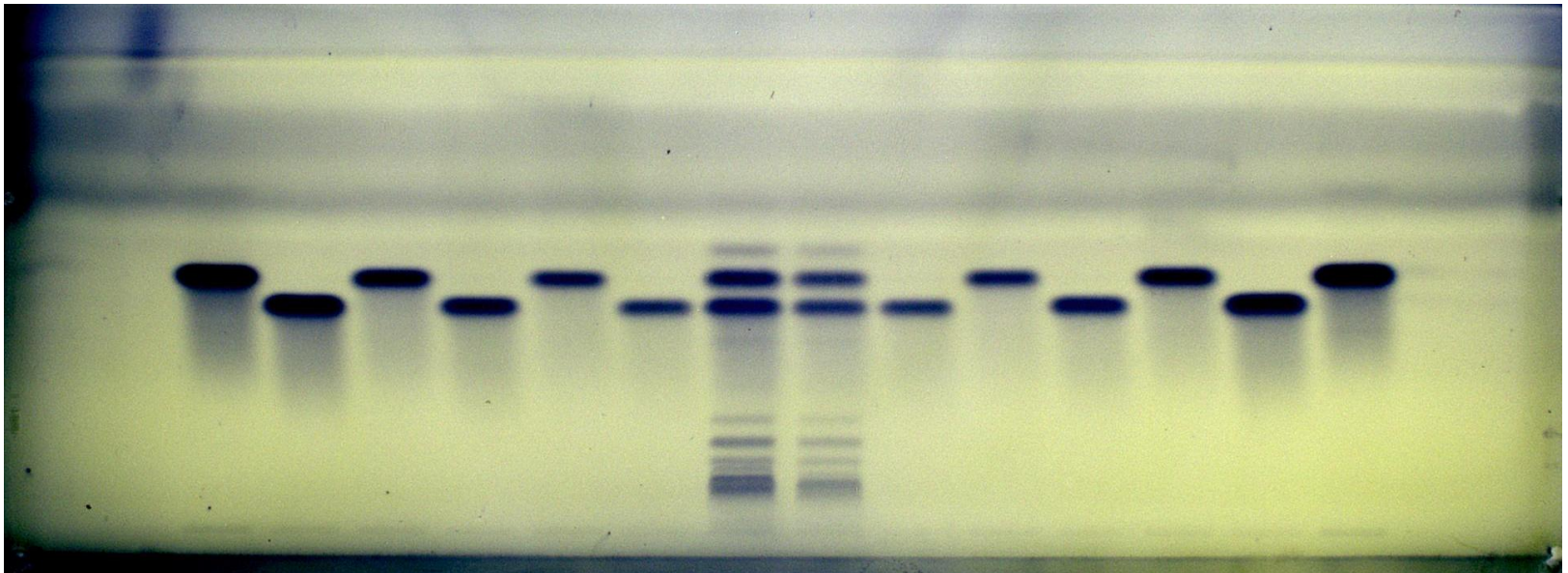
# Acide Oléique et Linoléique RP18

- Différence de réponses entre les deux acides à 190 nm
- Contrairement à l'observation de la plaque:

Gamme AL/AO

Farine 5 et 2  $\mu$ l

Gamme AL/AO

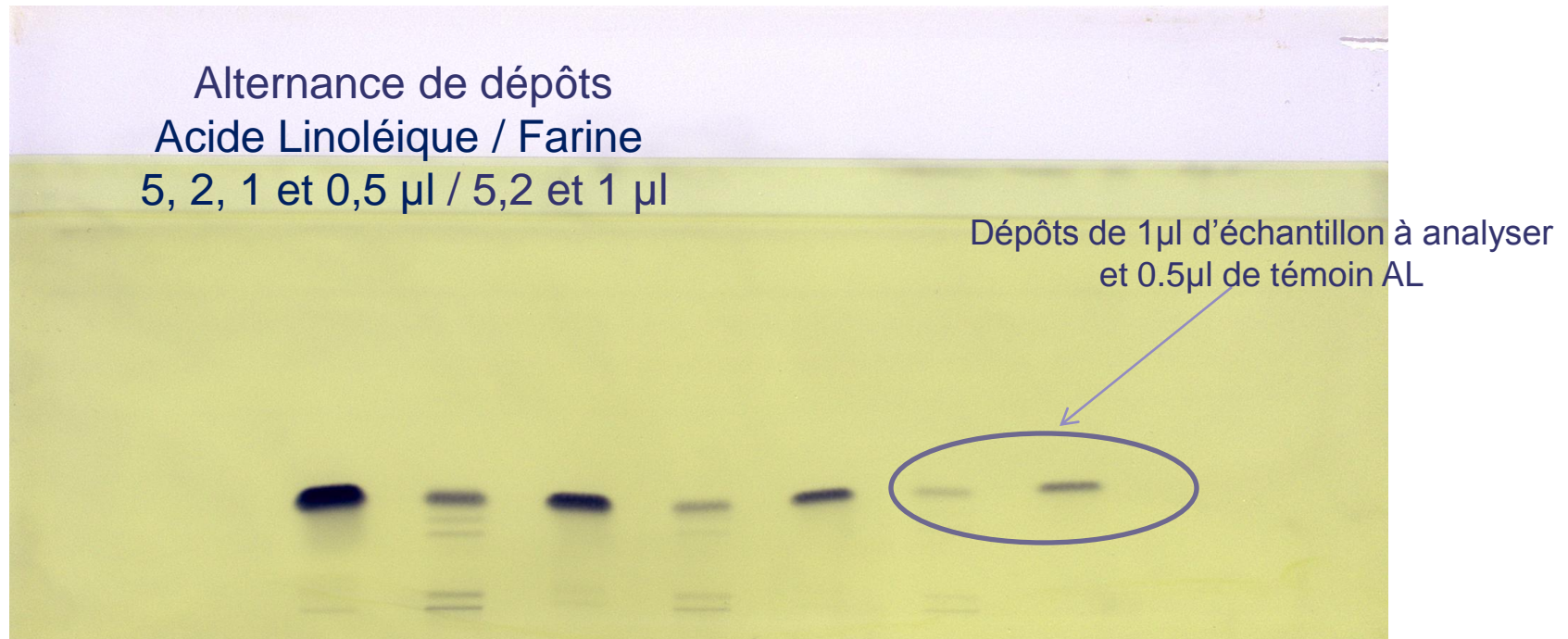




# Acides Gras Totaux SiO2

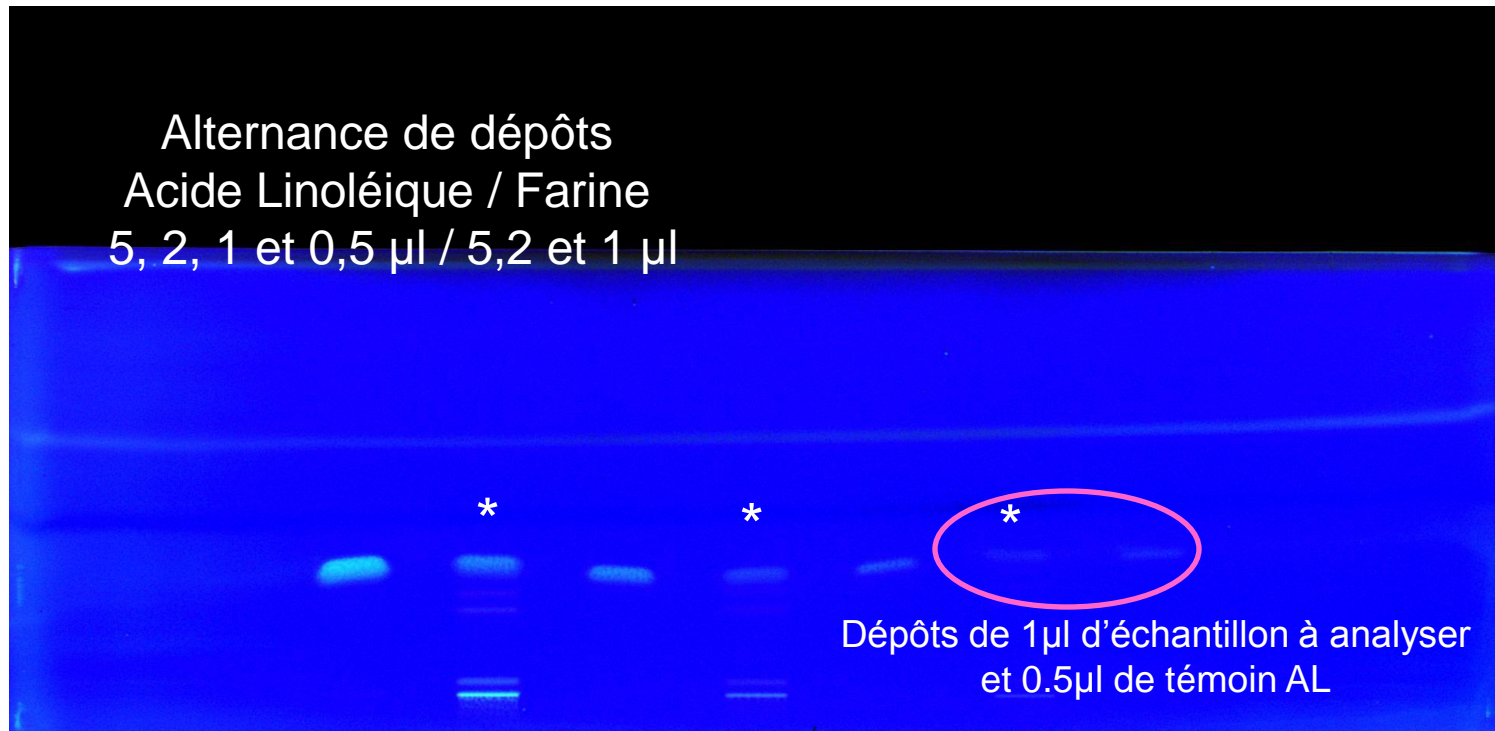
- Méthode : Acides Gras Totaux par HPTLC.docx

Plaque après immersion dans l'acide phosphomolybdique en lumière blanche

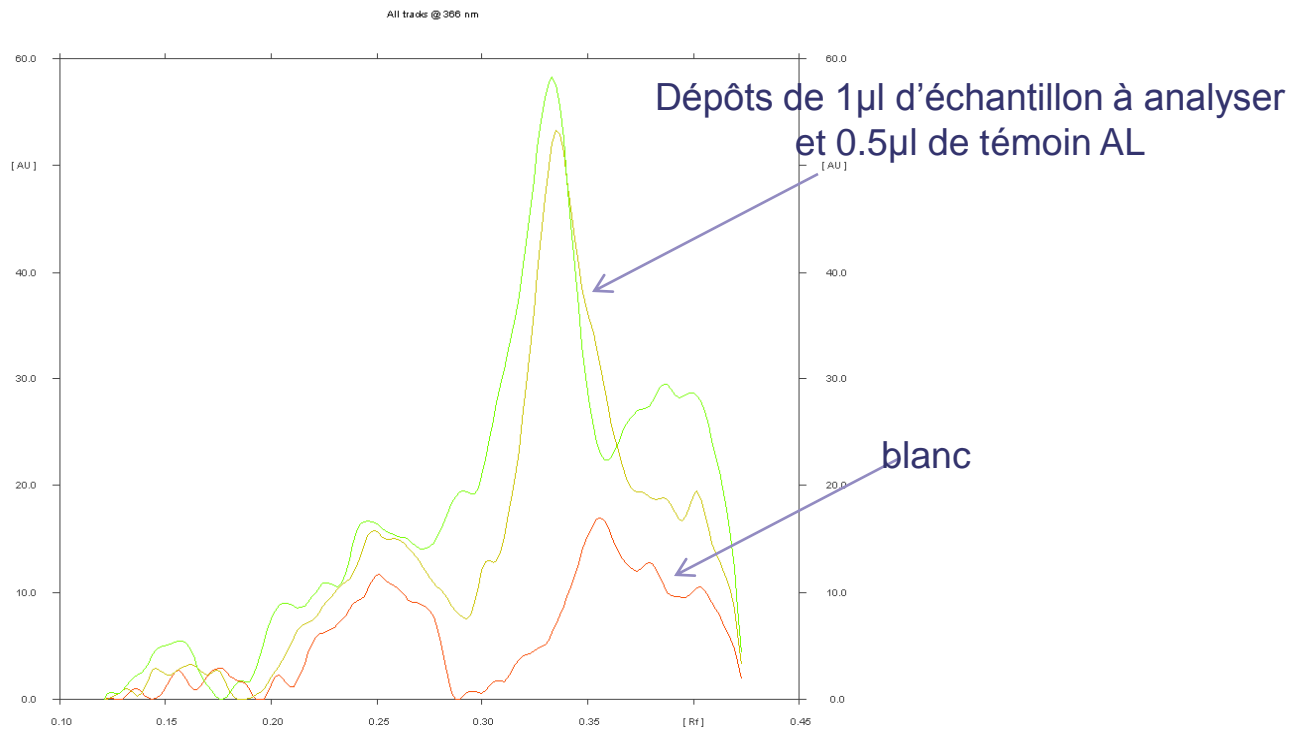


# Acides Gras Totaux SiO<sub>2</sub>

- Détection / quantification à 366 nm après immersion dans la primuline (*fluorescence*)
- Régression linéaire



# Acides Gras Totaux par HPTLC



Acides gras totaux : 2596 ppm

# Acides Gras Totaux par HPTLC

---

## RESULTATS

- Acide Linoléique + Acide Oléique  
= 644 + 1140 = 1784 ppm
- Acides gras totaux = 2596 ppm
  
- L'extraction des acides gras dans la farine est efficace

# FIN

---

- Un remerciement particulier, à Jérémy et Pierre de Chromacim pour leur prêt de l'ADC2 lors de ces mises au point → Permis l'achat de l'appareil,
- Un remerciement à Sandrine et au club pour m'avoir poussé à faire cette présentation aujourd'hui,
- Un remerciement à ses membres pour m'avoir écouté.
- QUESTIONS !!!