



INTÉRÊT DE L'UTILISATION DE RÉFÉRENCES BOTANIQUES ET DE STANDARDS ANALYTIQUES POUR L'IDENTIFICATION DE MATIÈRES PREMIÈRES VÉGÉTALES



1 – Présentation de BotaniCert

- Présentation de l'entreprise
- BotaniCert, une méthodologie particulière

2 – Pourquoi réaliser une identification ?

- Histoire
- Evolution
- Problématique

3 – L'art de l'identification

- Identification « basique »
- Utilisation de standards analytiques
- Utilisation de standards analytiques + botaniques
- Difficultés / Raccourcis à éviter

4 – Prendre du recul / conclusion



1

PRÉSENTATION DE BOTANICERT



Qui sommes-nous ?

- Une équipe de passionnés dans les domaines de la phytochimie, botanique, ethnobotanique, pharmacognosie, pharmacologie
- Motivés par le développement des produits à base de plantes
- Motivés pour le développement des connaissances sur les matières premières d'origine végétale
- Conscient que les plantes représentent un domaine très complexe analytiquement et qu'il faut pouvoir proposer des outils adaptés aux acteurs du marché

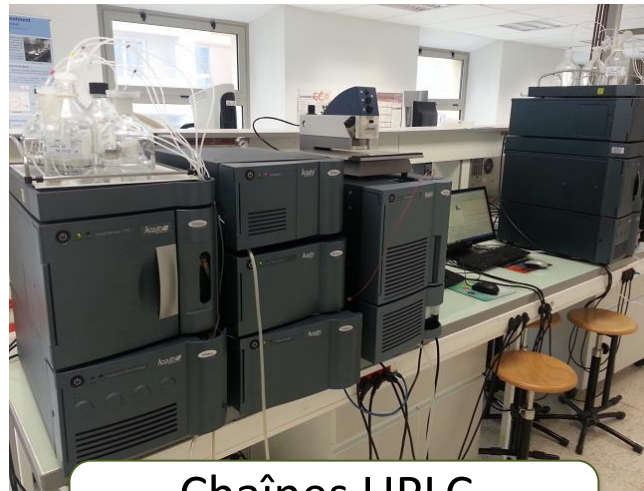


Nos équipements

Pour proposer des prestations à la hauteur de la complexité du domaine, nous sommes équipés en appareils indispensables



Chaîne HPTLC
(location à l'ICN)



Chaînes UPLC-
PDA/MS/ELSD



Microscopes

Notre méthodologie

Comme l'Homme n'a jamais fait mieux qu'imiter la nature, nous avons décidé de l'utiliser pour le développement de toutes nos méthodes au travers d'échantillon botaniques de référence.



Herbarium BotaniCert : collection d'échantillons botaniques de référence

Notre méthodologie

Pour les identifications

- Nous utilisons des étalons de la même espèce que l'échantillon à analyser (et des adultérants potentiels) pour les mettre à comparaison
- Nous généralisons nos méthodes d'identification à l'aide de nombreux lots de la même espèce (préférentiellement d'origines différentes)

Pour les dosages

- Nous utilisons les plantes pour identifier les dérivés d'une même famille afin de les rechercher dans les échantillons à analyser
- Cela nous permet de retrouver le résultat le plus proche de la réalité peu importe ce qu'il y a à doser.

2

POURQUOI RÉALISER UNE IDENTIFICATION ?



Contexte réglementaire

Pour vérifier la sécurité et la qualité des produits sur le marché, des analyses **adaptées** sont pré-requises.

- Permet de garantir que la bonne plante est utilisée

Bonne plante utilisée



Absence de toxicité



Activité revendiquée

Bonne plante utilisée



Absence de tromperie

Histoire

- De tout temps, les plantes ont été utilisées à divers fins
- L'Homme a saisi le potentiel du règne végétal ainsi, transmettre un bon usage de ces plantes est devenu primordial
- L'accès aux plantes médicinales est devenu réglementé par les apothicaires et les herboristes pour ensuite entrer dans le monopole pharmaceutique.
- En 1979, une 1^{ère} liste de 34 plantes est libérée du monopole pharmaceutique puis 148 plantes en 2008



Evolution

- Les plantes sont depuis peu utilisables dans d'autres domaines que le pharmaceutique. Développement de nouveaux types de produits (cosmétiques, compléments alimentaires, ...)
- Explosion de ces marchés et de la concurrence. Nécessité d'innover

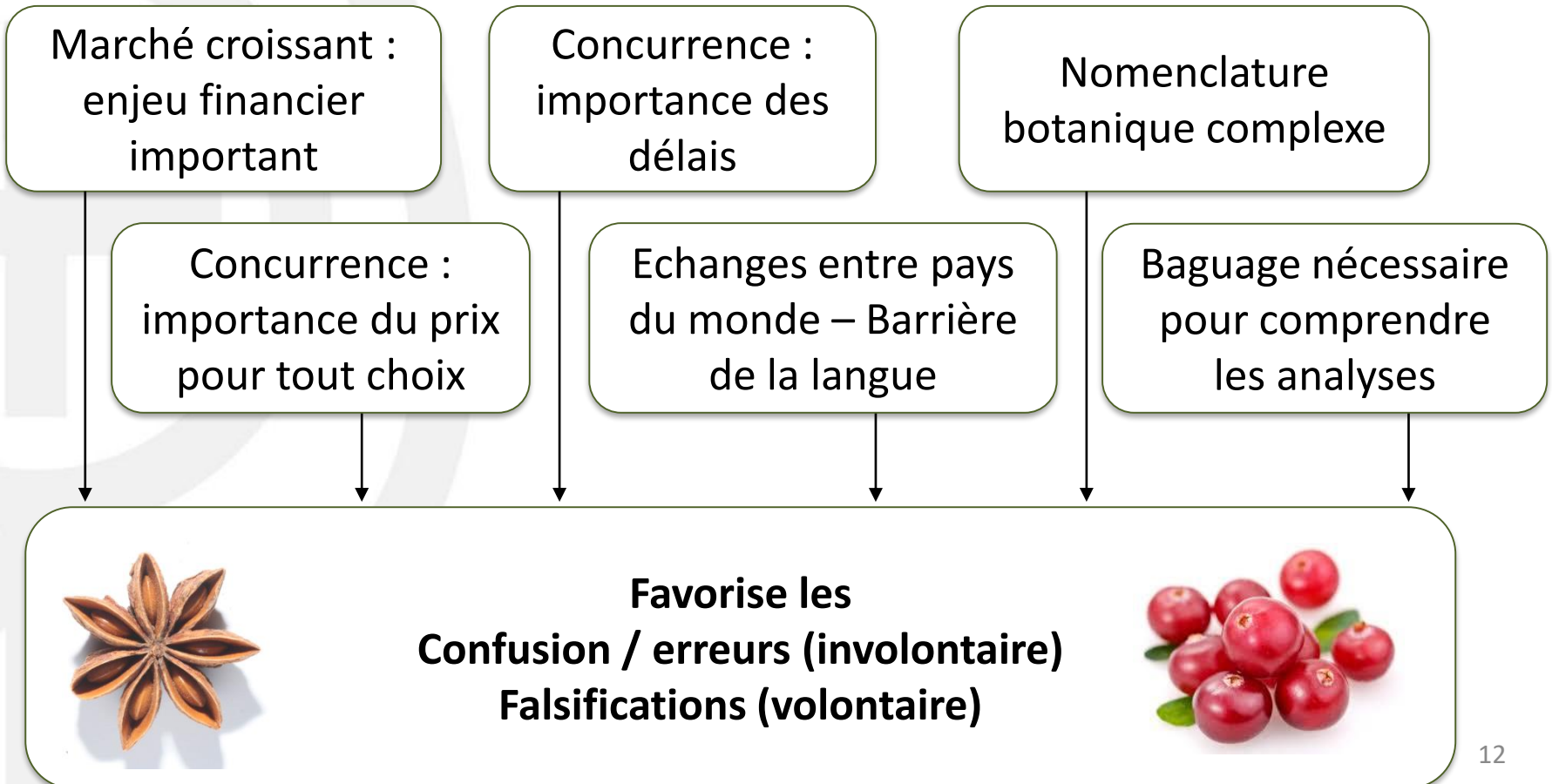
Utiliser des plantes exotiques / nouvelles

Utiliser des procédés innovants pour obtenir de nouveaux ingrédients



Problématique

- Marchés en pleine expansion



Problématique

- Marchés en pleine expansion

Trop grand nombre
d'espèces végétales à
différencier

Evolution des
équipements
analytiques

Les méthodes de contrôle n'ont pas le temps
d'évoluer (méthodes de référence)

Contrôles non adaptés / insuffisants

Conclusion

Les contrôles doivent permettre de pallier aux problématiques suivantes :

- Distinction sans ambiguïté de chaque espèce
- Distinction sans ambiguïté des parties de plante
- Détection de tous types de falsifications (volontaires comme involontaire)
- Anticiper les falsifications
- Connaître les limites de l'analyse réalisée

Les analyses doivent être adaptées aux problématiques et aux risques (santé du consommateur)

3

L'ART DE L'IDENTIFICATION



L'identification

Prouver l'identité botanique d'un échantillon au travers d'un ou plusieurs tests.

Les tests les plus connus et les plus pertinents sont les 3 suivants qui sont tout à fait complémentaires :

- Identification botanique (examens microscopique, macroscopique, organoleptique)
- Identification phytochimique (CCM, HPTLC, HPLC, GC)
- Identification génétique (PCR)

Seule l'identification phytochimique par HPTLC sera présentée ici

1. Identification « basique »

1. Les tests de référence

2. Utilisation de standards analytiques

1. Standards analytiques non spécifiques
2. Marqueurs chimiotaxonomiques

3. Utilisation de standards botaniques

1. Quelques exemples

4. Difficultés / raccourcis à éviter

1. Exemple 1 – plantes à acides hydroxycinnamiques
2. Exemple 2 – cas de l'*Echinacea angustifolia*
3. Exemple 3 – cas d'une analyse basée sur une seule famille

L'identification « basique »

Certaines méthodes ont été proposées pour répondre aux besoins du domaine pharmaceutique (Pharmacopées) ainsi qu'à d'autres domaines (normes ISO).

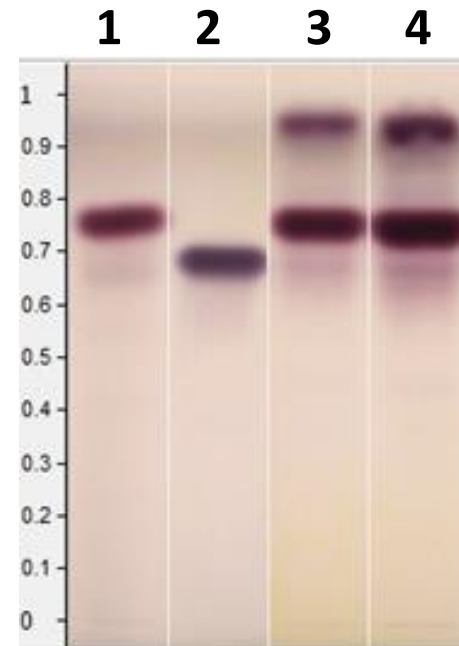
Actuellement, ces méthodes d'identification sont souvent dépassées mais ont le mérite d'exister.

Il est nécessaire de connaître leurs limites afin de pouvoir interpréter un résultat



BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

| Haut de la plaque | |
|---|--|
| | Une bande violette Plusieurs faibles bandes grises, bleues ou violettes |
| β -Sitostérol : une bande violette Acide ursolique : une bande bleue | Une bande violette (β -sitostérol) Une bande bleue (acide ursolique) Plusieurs faibles bandes grises, bleues ou violettes |
| | Une bande violette (glucoside de β -sitostérol) |
| Solution témoin | Solution à examiner |



1 : β -Sitostérol

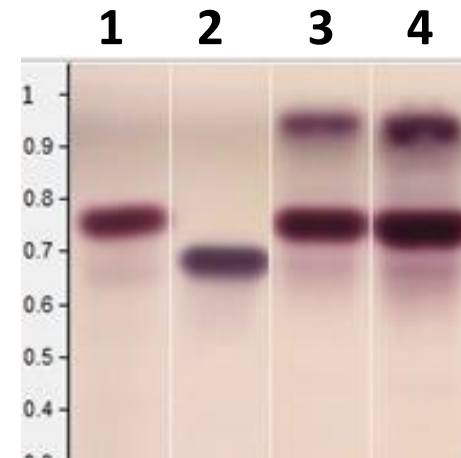
2 : Acide ursolique

3 et 4 : Echantillon commercial de *P. africana* (DCM)



BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

| Haut de la plaque | |
|---|--|
| | Une bande violette Plusieurs faibles bandes grises, bleues ou violettes |
| β -Sitostérol : une bande violette Acide ursolique : une bande bleue | Une bande violette (β -sitostérol) Une bande bleue (acide ursolique) Plusieurs faibles bandes grises, bleues ou violettes |
| | Une bande violette (glucoside de β -sitostérol) |
| Solution témoin | Solution à examiner |



Peut on réellement identifier l'échantillon commercial en l'état ???

1 : β -Sitostérol

2 : Acide ursolique

3 et 4 : Echantillon commercial de *P. africana* (DCM)

1
Ident. basique

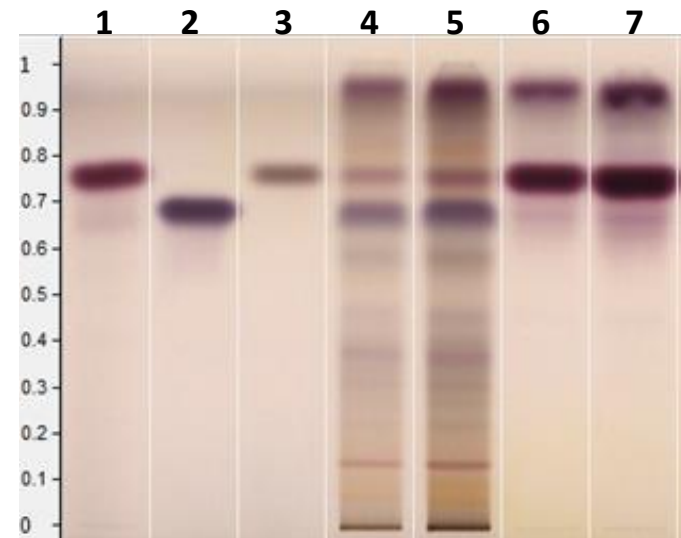
2
Stds analytiques

3
Stds botaniques

4
Difficultés

BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

| Haut de la plaque | |
|---|--|
| _____ | Une bande violette Plusieurs faibles bandes grises, bleues ou violettes |
| β -Sitostérol : une bande violette Acide ursolique : une bande bleue | Une bande violette (β -sitostérol) Une bande bleue (acide ursolique) Plusieurs faibles bandes grises, bleues ou violettes |
| _____ | Une bande violette (glucoside de β -sitostérol) |
| Solution témoin | Solution à examiner |



1 : β -Sitostérol

2 : Acide ursolique

3 : Sitgmastérol

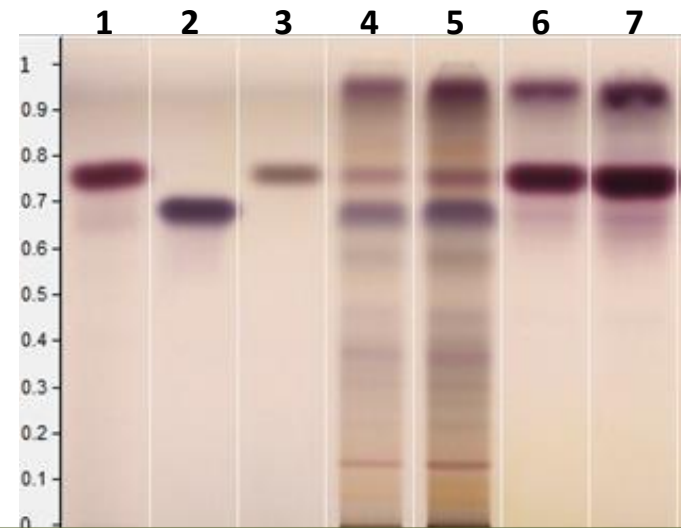
4 et 5 : Référence botanique de *P. africana* (DCM)

6 et 7 : Echantillon commercial de *P. africana* (DCM)



BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

| Haut de la plaque | |
|--|--|
| _____ | Une bande violette Plusieurs faibles bandes grises, bleues ou violettes |
| β-Sitostérol : une bande violette Acide ursolique : une bande bleue | Une bande violette (β-sitostérol) Une bande bleue (acide ursolique) Plusieurs faibles bandes grises, bleues ou violettes |
| _____ | Une bande violette (glucoside de β-sitostérol) |
| Solution témoin | Sol |



Enfin, nous voyons que l'échantillon commercial était non conforme

1 : β-Sitostérol

2 : Acide ursolique

3 : Sitgmastérol

4 et 5 : Référence botanique de *P. africana* (DCM)

6 et 7 : Echantillon commercial de *P. africana* (DCM)

1

Ident. basique

2

Stds analytiques

3

Stds botaniques

4

Difficultés

Utilisation de standards analytiques

Permet de comparer les échantillons à analyser avec un témoin attendu (ou non attendu)

Grossièrement, deux types de standards utilisés :

Les standards peu spécifiques

**Les standards chimiotaxonomiques
(les plus pertinents)**



BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

| Espèce végétale | Rutine | Acide Chlorogénique | Acide caféique | Hypéroside |
|--------------------------------------|--------|---------------------|----------------|------------|
| <i>Alchemilla vulgaris</i> | | • | • | |
| <i>Atropa belladonna</i> | • | • | | |
| <i>Ballota nigra</i> | • | • | | |
| <i>Betula pendula</i> | • | • | • | • |
| <i>Calendula officinalis</i> | • | • | • | |
| <i>Crataegus laevigata</i> | • | • | | • |
| <i>Equisetum arvense</i> | • | | • | • |
| <i>Fagopyrum esculentum</i> | • | | | • |
| <i>Fraxinus excelsior</i> | • | • | | |
| <i>Ginkgo biloba</i> | • | • | | |
| <i>Hypericum perforatum</i> | • | | | • |
| <i>Malva sylvestris</i> | | • | • | • |
| <i>Passiflora incarnata</i> | • | | | • |
| <i>Polygonum aviculare</i> | | • | • | • |
| <i>Sambucus nigra</i> | • | • | • | • |
| <i>Taraxacum officinalis</i> | • | • | | |
| <i>Tillia cordata / platyphyllos</i> | • | | • | • |
| <i>Verbascum thapsus</i> | • | | • | • |
| <i>Viola arvensis</i> | • | | • | • |



BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

Focalisons nous sur les espèces suivantes

| Espèce végétale | Rutine | Acide Chlorogénique | Acide caféique | Hypéroside |
|--------------------------------------|--------|---------------------|----------------|------------|
| <i>Crataegus laevigata</i> | • | • | | • |
| <i>Fraxinus excelsior</i> | • | • | | |
| <i>Ginkgo biloba</i> | • | • | | |
| <i>Hypericum perforatum</i> | • | | | • |
| <i>Passiflora incarnata</i> | • | | | • |
| <i>Tillia cordata / platyphyllos</i> | • | | • | • |
| <i>Verbascum thapsus</i> | • | | • | • |
| <i>Viola arvensis</i> | • | | • | • |

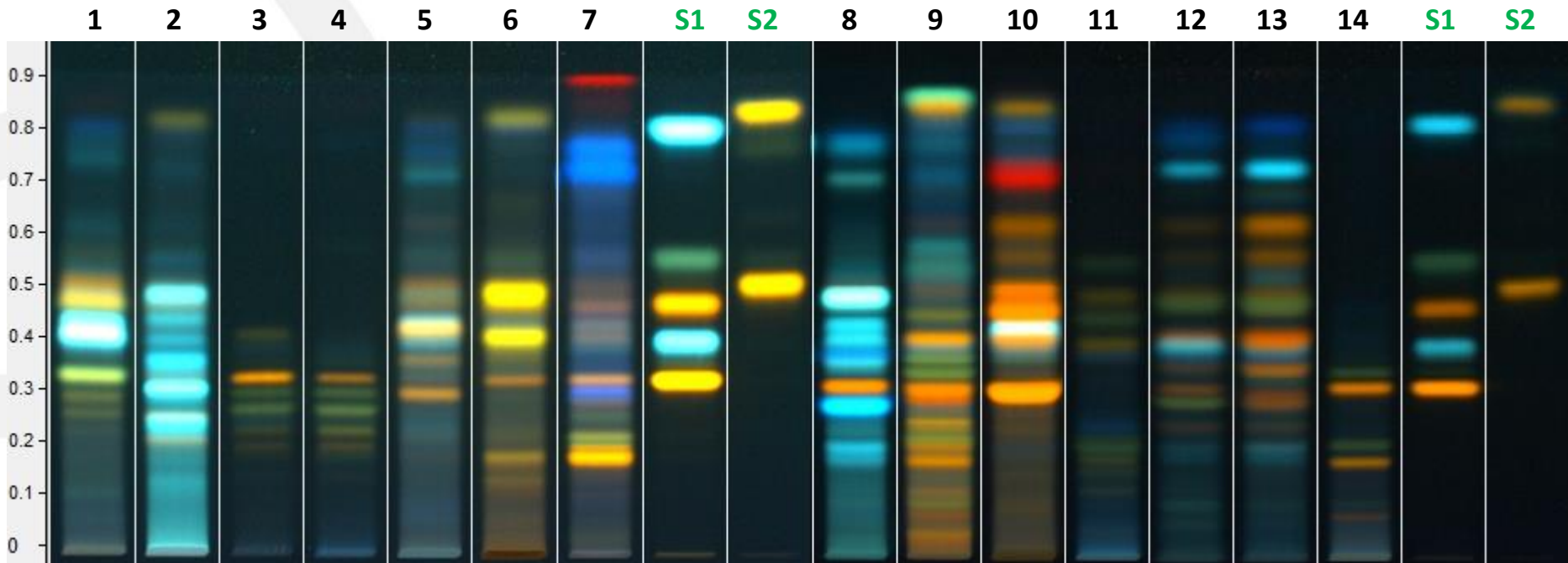
1
Ident. basique

2
Stds analytiques

3
Stds botaniques

4
Difficultés

BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal



- 1 – *Crataegus monogyna* (R – ACH – H)
- 2 – *Verbascum thapsus* (R – ACA – H)
- 3 – *Viola arvensis* (R – ACA – H)
- 4 – *Viola tricolor* (R – ACA – H)
- 5 – *Agrimonia eupatoria*
- 6 – *Aspalathus linearis*
- 7 – *Camellia sinensis*

- 8 – *Fraxinus excelsior* (R – ACH)
- 9 – *Ginkgo biloba* (R – ACA)
- 10 – *Hypericum perforatum* (R – H)
- 11 – *Passiflora incarnata* (R – H)
- 12 – *Tilia cordata* (R – ACA – H)
- 13 – *Tilia x europea*
- 14 – *Eschscholzia californica*

S1 et S2 (croissant)

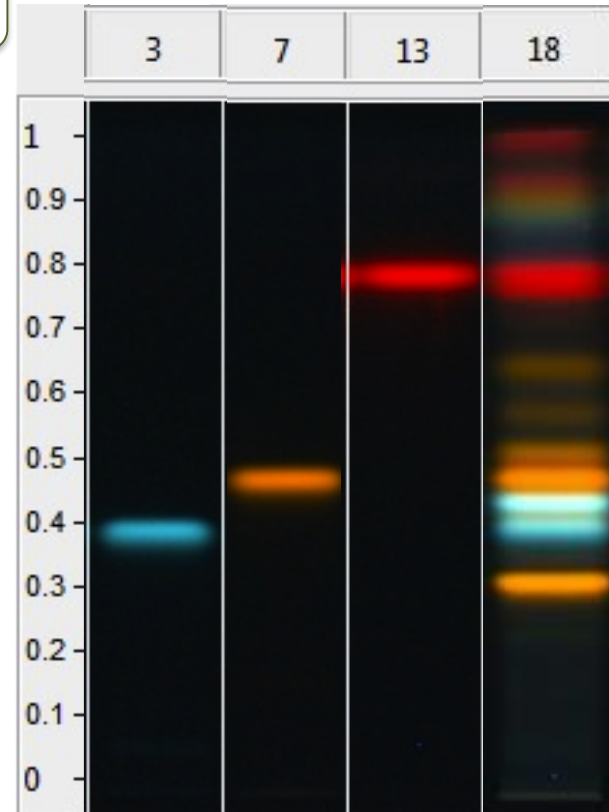
- Rutine
- Acide chloro.
- Hyperoside
- Lut-7-O-gluc
- Api-7-O-gluc
- Acide caféique
- Quercetine

BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

Avec utilisation de standards plus pertinents



3 : Acide chlorogénique
7 : Hypéroside
13 : Hypéricine
18 : *Hypericum perforatum*



1
Ident. basique

2
Stds analytiques

3
Stds botaniques

4
Difficultés

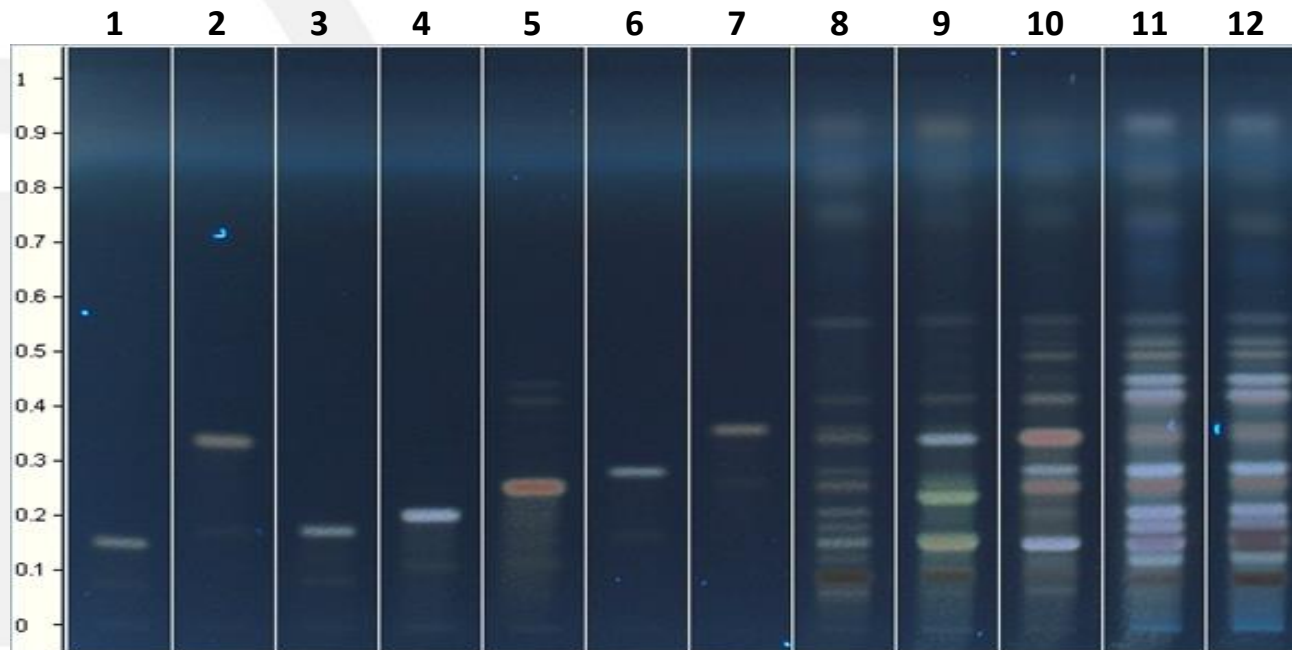
**La pertinence du standard
choisi est primordiale**



Le poids du résultat en dépend

**Mais parfois, ces substances, sont
indisponibles à la vente**

Utilisation de standards botaniques



Ginsénosides Rb1 (1), Rg1 (2), Rb2 (3), Rc (4), Re (5), Rd (6), Rf (7)
8 – Panax ginseng (racines)
9 – Panax japonicus (racines)
10 – Panax notoginseng (racines)
11-12 – Echantillons commerciaux

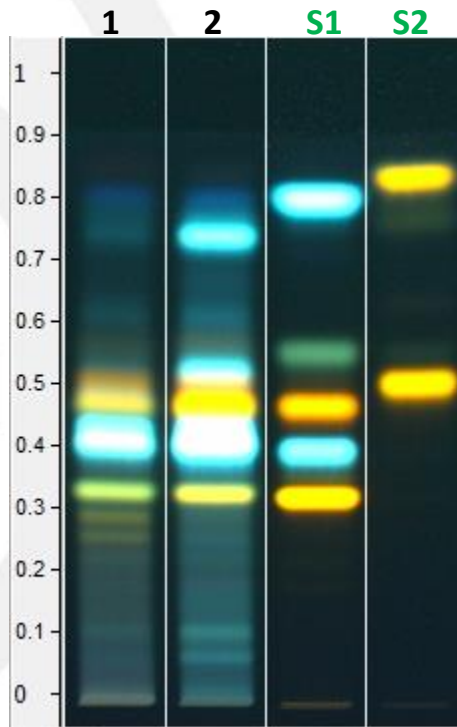
1
Ident. basique

2
Stds analytiques

3
Stds botaniques

4
Difficultés

Utilisation de standards botaniques



S1 et S2 (croissant)

Rutine
Acide chlorogénique
Hyperoside
Lutéoline-7-O-glucoside
Apigénine-7-O-glucoside
Acide caféique
Quercetine

1 – Crataegus monogyna (standard botanique)

2 – Crataegus monogyna (échantillon commercial)

1
Ident. basique

2
Stds analytiques

3
Stds botaniques

4
Difficultés

Difficultés

Même en utilisant la méthodologie la plus pertinente possible, la réalité nous rattrape vite

Nécessité de prendre du recul sur les résultats obtenus

**Exemple : Absence de chlorophylle =
suffisant pour confirmer l'absence de
feuilles dans un extrait sec de racines
de Ginseng ?**



Difficultés

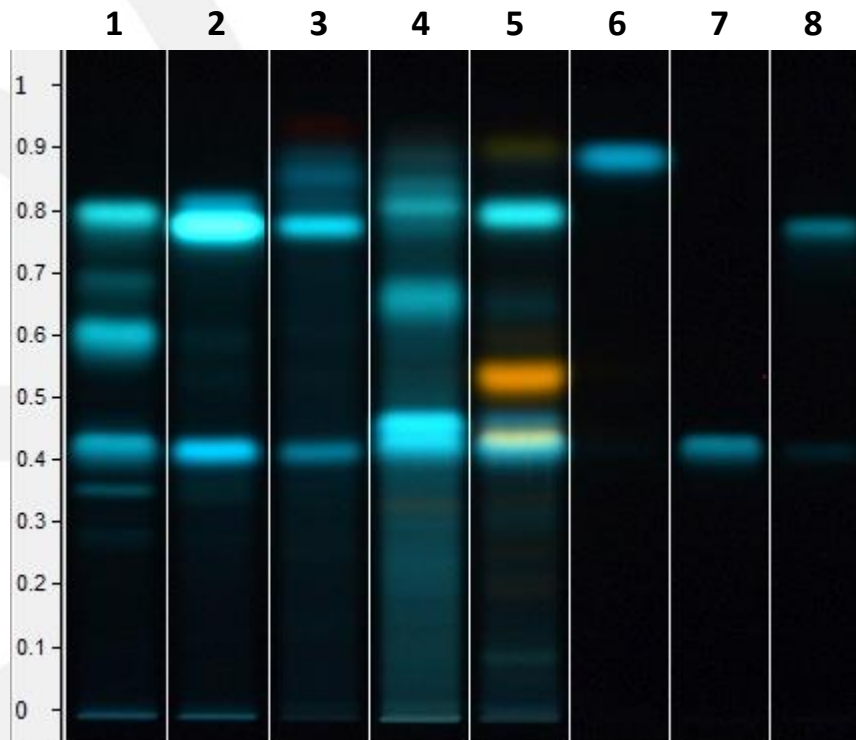
Même en utilisant la méthodologie la plus pertinente possible, la réalité nous rattrape vite

Nécessité de prendre du recul sur les résultats obtenus

**Exemple : Absence de chlorophylle =
suffisant pour l'absence de
feuilles et présence de racines
de Ginseng :**



Difficultés – exemple 1



- 1 – *Arctium lappa*
- 2 – *Echinacea purpurea*
- 3 – *Orthosiphon aristatus*
- 4 – *Ilex paraguariensis*
- 5 – *Cynara scolymus*

- 6 – Acide caféique
- 7 – Acide chlorogénique
- 8 – Acide caftarique et acide chicorique

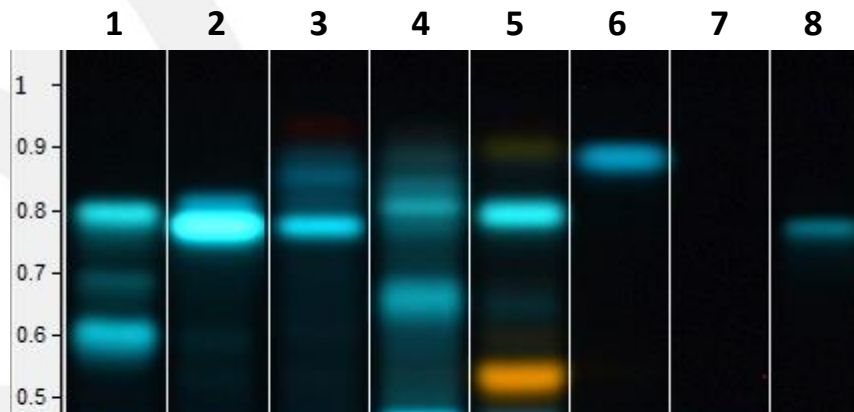
1
Ident. basique

2
Stds analytiques

3
Stds botaniques

4
Difficultés

Difficultés – exemple 1



- 1 – *Arctium lappa*
- 2 – *Echinacea purpurea*
- 3 – *Orthosiphon aristatus*
- 4 – *Ilex paraguariensis*
- 5 – *Cynara scolymus*

Toutes ces plantes, bien que très différentes, ne présentent-elles pas des points communs ?



1
Ident. basique

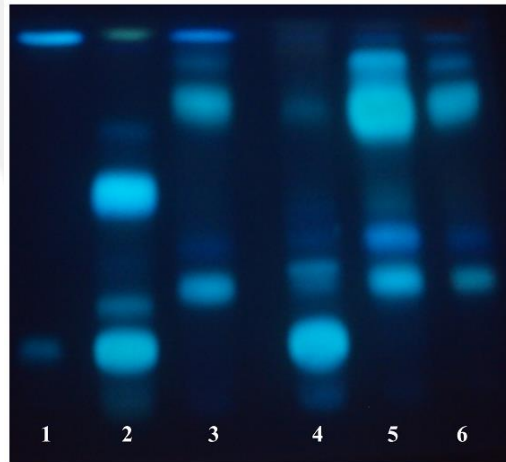
2
Stds analytiques

3
Stds botaniques

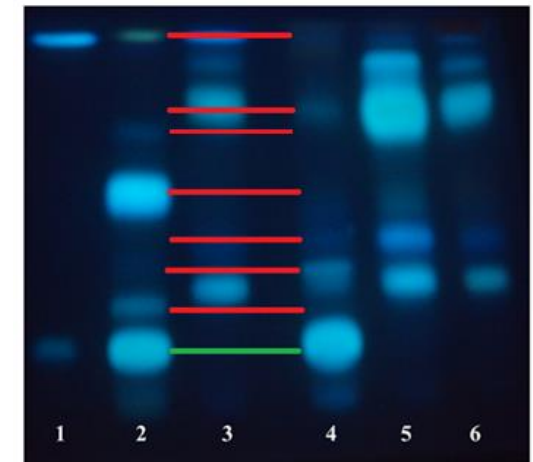
4
Difficultés

Difficultés – exemple 2

METODO EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0 – MONOGRAFIA ECHINACEA
ANGUSTIFOLIA RADICI 01/2008:1821



Avec
corrélations



- 1) RIFERIMENTI: ECHINACOSIDE 0,130 mg/ml (10 μ l) + AC.CAFFEICO 0,160 mg/ml (10 μ l),
- 2) CAMPIONE IN ESAME: ECHINACEA ANG. E.S. 4% 1400573 (25 μ l),
- 3) CAMPIONE DI RIFERIMENTO: ECHINACEA PURP. PARTI AEREE E.S. PR P1500014 (25 μ l),
- 4) DROGA DI RIFERIMENTO: ECHINACEA ANG. RADICI S1500042 (25 μ l),
- 5) DROGA DI RIFERIMENTO: ECHINACEA PURP. RADICI S1300307 (25 μ l),
- 6) DROGA DI RIFERIMENTO: ECHINACEA PURP. PARTI AEREE S1401060 (10 μ l).

A première vue, une méthodologie pertinente

1
Ident. basique

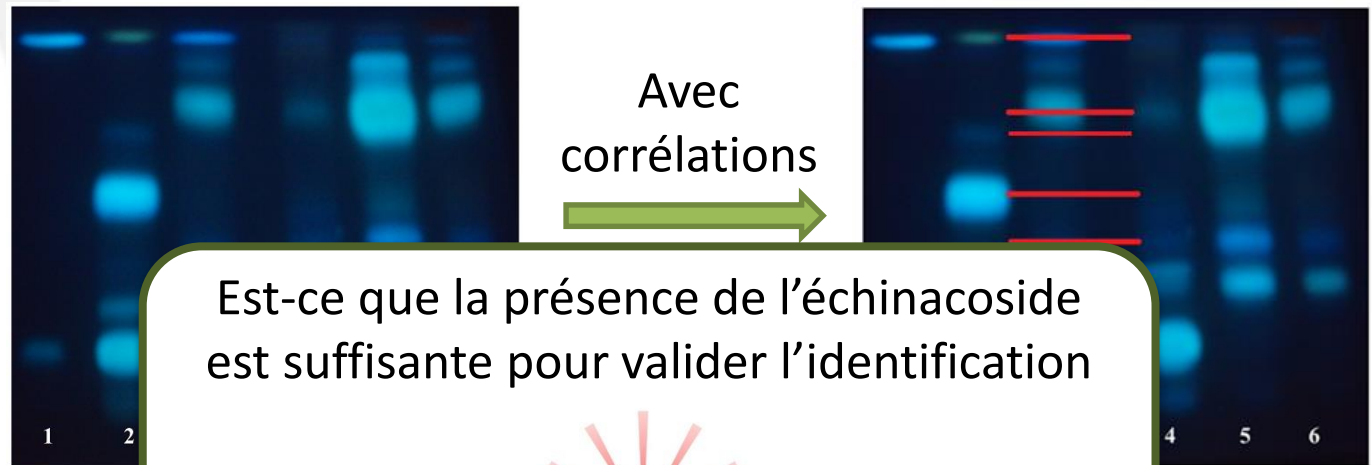
2
Stds analytiques

3
Stds botaniques

4
Difficultés

Difficultés – exemple 2

METODO EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0 – MONOGRAFIA ECHINACEA
ANGUSTIFOLIA RADICI 01/2008:1821



Est-ce que la présence de l'échinacoside
est suffisante pour valider l'identification



- 1) E
- 2) C
- 3) CAMPIONE DI RIFERIMENTO: ECHINACEA PURP. PARTI AEREE L.S. PR P1500014 (25 µl),
- 4) DROGA DI RIFERIMENTO: ECHINACEA ANG. RADICI S1500042 (25 µl),
- 5) DROGA DI RIFERIMENTO: ECHINACEA PURP. RADICI S1300307 (25 µl),
- 6) DROGA DI RIFERIMENTO: ECHINACEA PURP. PARTI AEREE S1401060 (10 µl).

1
Ident. basique

2
Stds analytiques

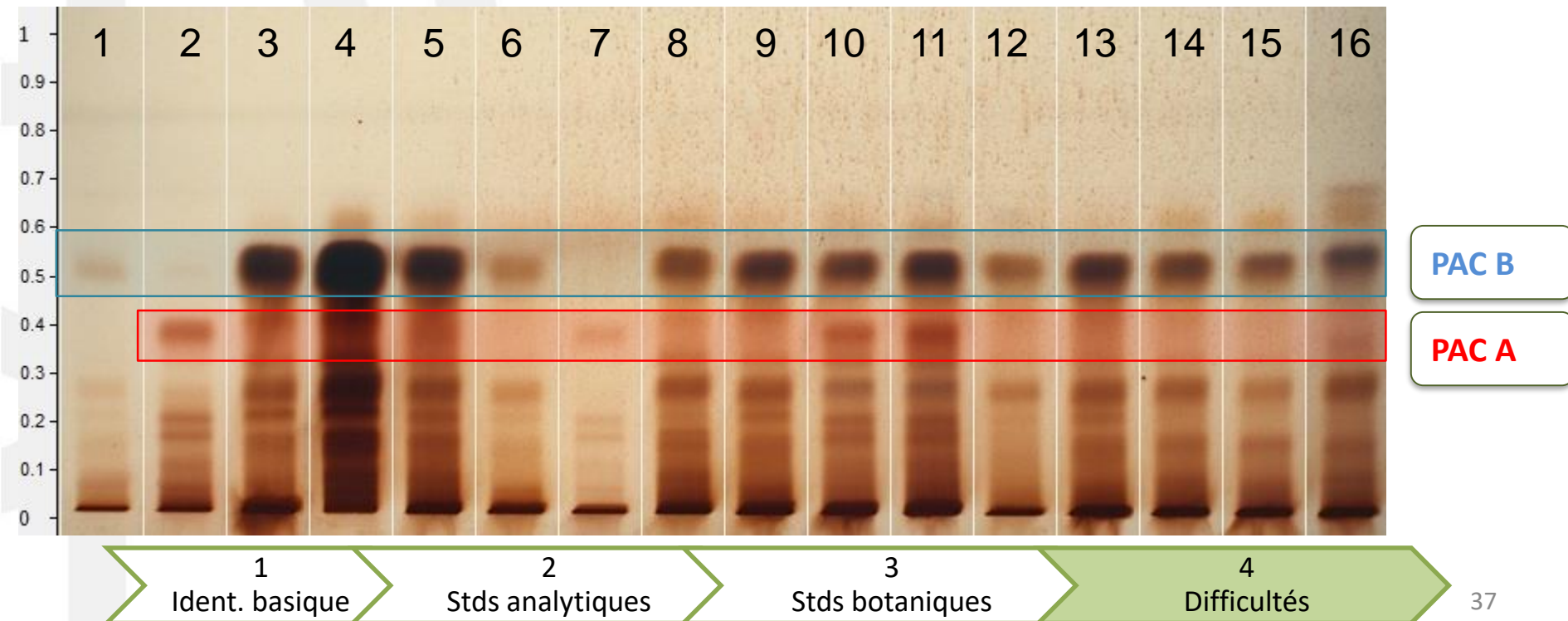
3
Stds botaniques

4
Difficultés

Difficultés – exemple 3

Cas de l'adultération de pépins de raisin par des téguments de cacahuètes

Idée : se baser sur les proanthocyanidines (PACs) pour mettre en évidence les éventuelles falsifications



Difficultés – exemple 3

Cas de l'adultération de pépins de raisin par des téguments de cacahuètes

Lorsqu'on ne se base que sur une seule famille, garder en tête qu'il est possible de passer à côté d'une falsification



1
Ident. basique

2
Stds analytiques

3
Stds botaniques

4
Difficultés



4

PRENDRE DU RECUL / CONCLUSION



Les standards botaniques et les standards analytiques sont indispensables



Point critique : intégrité des références botaniques

Qualité d'une référence botanique

Comment établir la qualité d'une référence botanique ?

| | Avantages | Inconvénients |
|---------------------|---|--|
| Analyses botaniques | Les premières classifications étaient basées sur ces critères | Impossible sur échantillons transformés |
| Analyses chimiques | Possibilité de distinguer des adultérations, de distinguer les parties de plante, les origines géographiques | Bases de données complexes à établir, données complexes à retraiter |
| Analyses génétiques | Nouvelle classification (APG) basée sur ces critères. Base de données facile à créer. Simplicité pour déterminer l'espèce | Impossibilité de différencier des parties de plantes. Complexe sur échantillons transformés. Résultat trop catégorique |

BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

De plus, pour chaque critère, il existe différents niveaux

Botanique

Organoleptique

Microscopie

Macroscopie

Phytochimie

Analyse simple

Analyse pertinente

Complémentarité
des analyses
(HPTLC, HPLC, GC)

Génétique

Extraction de l'ADN

Analyse simple
(1 marqueur)

Analyse pertinente
(3 marqueurs et +)

BotaniCert, laboratoire d'analyse du végétal

Le végétal est un domaine complexe, il est nécessaire d'utiliser les outils adaptés



Même si les outils sont pertinents, la dernière étape reste l'interprétation



Ne jamais oublier qu'il y a encore tout à découvrir et que les conclusions ne doivent pas être hâtives



MERCI POUR VOTRE ATTENTION

