



# Exemples d'applications de l'HPTLC au service Développement Ingrédients



*Présentation Club CCM 28 juin 2018*

Anaïs Escalon, PiLeJe Industrie - Saint-Bonnet De Rochefort  
Lucile Berthomier, SIGMA Clermont - Aubière

# Sommaire

Présentation du groupe PiLeJe et de Sigma Clermont

Caractérisation phytochimique de plantes

Caractérisation d'extraits

→ *Cas des ipowder®*, *Cas d'extraits de la gamme Phytoprevent*

Etude d'extraits secs du marché

Développements en cours sur l'HPTLC



# Qui sommes-nous?

## Groupe PiLeJe

### Un engagement pour la Santé



#### Notre vocation

Améliorer durablement la santé des patients.

#### Nos missions

Proposer des solutions santé :

- Prescrits par des professionnels de santé pour un conseil individualisé
- Complémentaires aux médicaments
- Qui améliorent la **qualité et l'espérance de vie en bonne santé** des patients présentant des troubles fonctionnels, des facteurs de risques ou des maladies chroniques.



Une grande école d'ingénieurs née de la fusion de l'ENSCCF et de l'IFMA pour répondre aux défis industriels actuels et futurs de la chimie et de la mécanique



Ecole

Formations

Recherche

Fondation

Relations industrielles

International

Vie étudiante

- Triptyque « Formation – Recherche – Entreprise »
  - former des ingénieurs experts et responsables en mécanique avancée et en génie industriel capables d'évoluer dans des environnements multiculturels
  - affirmer une politique de recherche ambitieuse et internationale basée sur l'excellence et l'innovation
  - entretenir des relations étroites entre les milieux socio-économiques et l'école

Ecole

Formations

Recherche

Fondation

Relations industrielles

International

Vie étudiante

- Une recherche en chimie et génie chimique, en interaction forte avec les milieux socio-économiques dans les domaines de la santé, de l'énergie et des matériaux
- Les enseignants chercheurs de SIGMA Clermont sont membres d'un laboratoire de recherche
- Quatre orientations scientifiques
  - chimie des antalgiques
  - durabilité des matériaux polymères
  - génie des systèmes polyphasiques
  - matériaux multifonctionnels par chimie douce



# Groupe PiLeJe : un groupe unissant fabrication et distribution

## INDUSTRIE

Extraction  
ingrédients

Développement et  
fabrication  
produits finis

- Extraits de plantes fraîches et sèches
- Probiotiques
- Ingrédients fonctionnels
- Compléments alimentaires
- Matières premières à usage pharmaceutique
- Produits avec AMM



Met la sécurité des patients au cœur de son organisation validée par norme ISO 22 000.

## DISTRIBUTION

Création et diffusion  
de solutions de santé



Recherche / Créé / Formule /  
Fabrique / Diffuse des solutions  
santé validées, à destination des  
professionnels de la santé

## MÉCÉNAT

Fondation PiLeJe sous égide de  
la Fondation de France



Forme / Informe / Sensibilise / Eduque :  
forme les Professionnels de Santé,  
communique et éduque aux gestes  
Santé, sensibilise au travers des médias.

# Les chiffres-clés

## FABRICATION



N°1 des Fabricants de compléments alimentaires en France



**30 ans**  
d'expertise du végétale



**25 ans**  
d'expertise des probiotiques

**219 personnes**



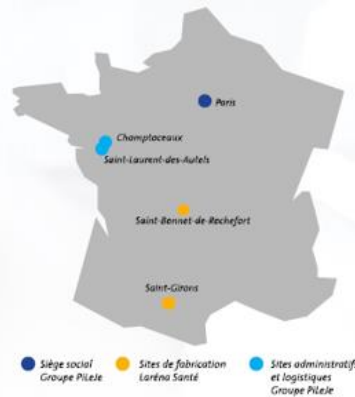
**7 Pôles d'expertises**

Expertise végétale  
Expertise probiotiques  
Développement ingrédients  
Développement produits  
Transposition industrielle  
Prestations analytiques  
Fabrication & conditionnement

**39 millions d'€**  
de CA en 2017



**19% du CA**  
réalisé à l'étranger



**642 salariés**  
répartis sur 5 sites en France

## PRODUCTION



N°2\* sur le marché des compléments alimentaires en France

Plus forte croissance depuis 3 ans :

- Lactibiane ref : N°1 des compléments en pharmacie (valeur)
- 318 références de produits disponibles
- Présence dans 33 pays dont 5 filiales
- 103 millions d'€ de CA en 2017
- 17,6% à l'international

*\*Données sell-out en pharmacie. Source Celtipharm*



# Un service R&D intégré

## POLE INNOVER

### Service scientifique

**Etudes** sur les **effets biologiques** des **ingrédients**.

**Veille** scientifique.

**Développement** de formules en interne tenant compte du **respect de la physiologie** et des **besoins spécifiques des patients**.

### Développement ingrédients

**Sourcing** des plantes : recherche, sélection et traçabilité.

**Caractérisation** du végétal pour une qualité optimale avec la maîtrise de techniques analytiques.

**Extraction** grâce à de nombreux procédés et technologies adaptés, jusqu'à la transposition sur nos sites industriels.

### Développement produits

Formulations clés en main.

**Développement** de **galéniques spécifiques** efficaces et protégées.

### Principaux domaines de recherche



Sphère  
digestive



Système  
cardio-vasculaire



Troubles cognitifs  
Humeur



Pathologies liées  
au vieillissement

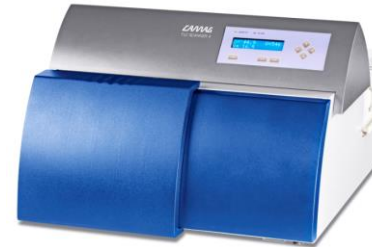


Obésité et  
comorbidités





# Équipement au laboratoire Développement Ingrédient



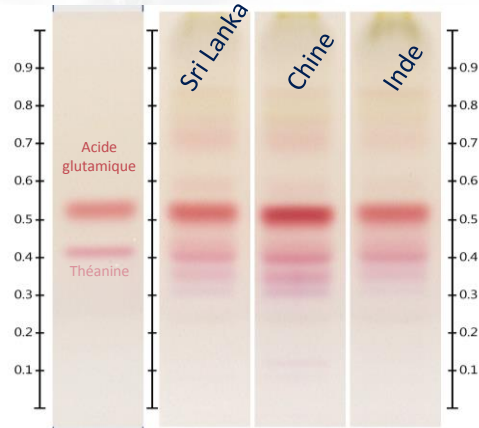


# Caractérisation phytochimique de plantes



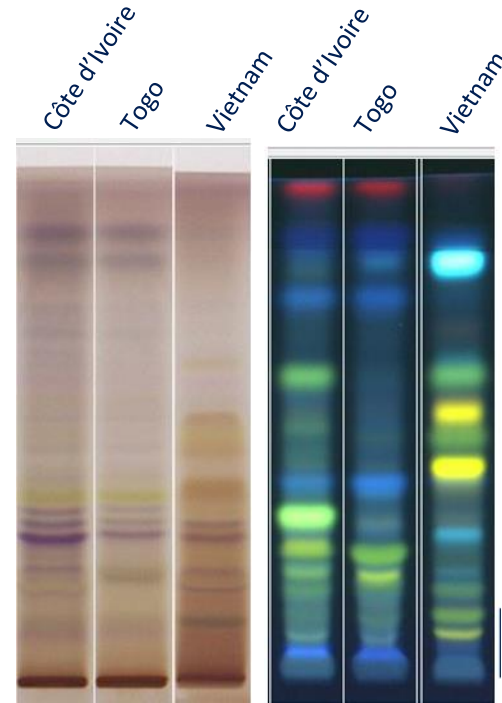
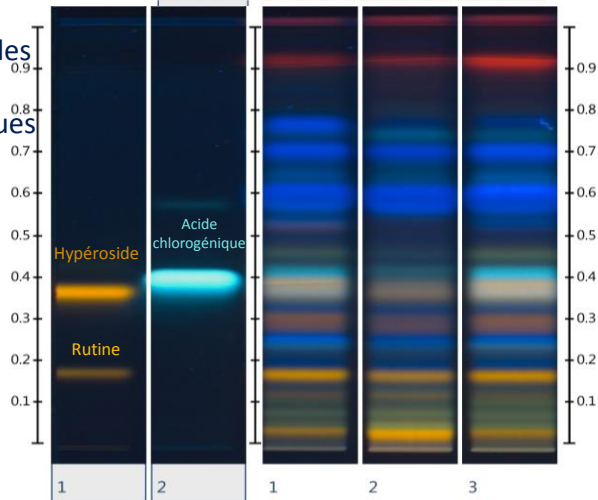
# Variabilité liée à l'origine géographique de la plante

Acides aminés



L'origine Chine présente un profil plus intense en acides aminés et avec un profil un peu différent en intensité sur les flavonoïdes.

Flavonoïdes et acides phénoliques



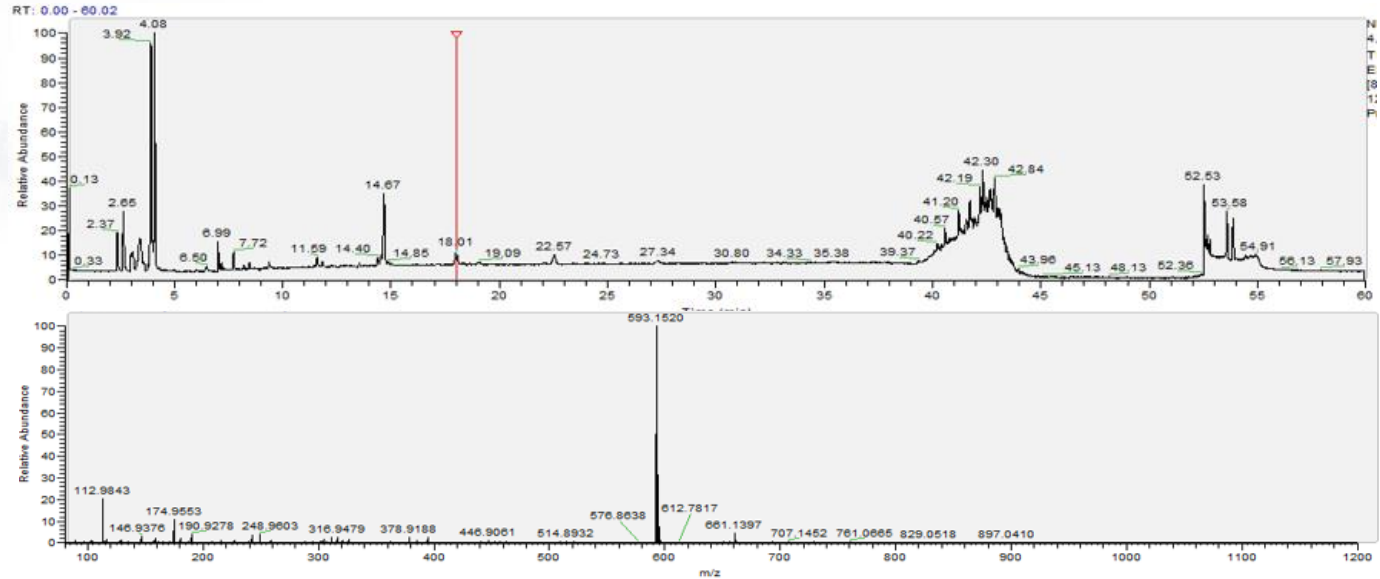
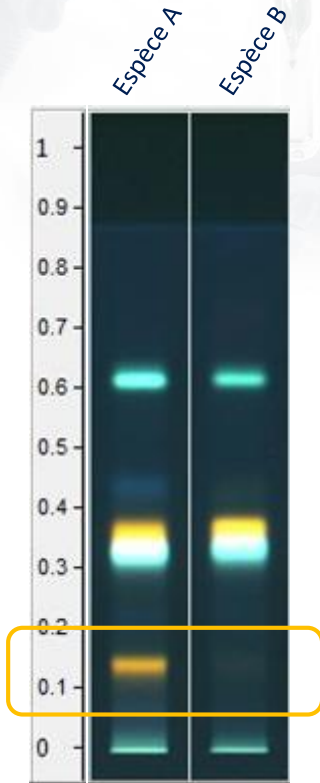
Différences beaucoup plus significatives sur les profils des flavonoïdes que sur celui des saponines

Saponines

Flavonoïdes et acides phénoliques

**PiLeJe**  
INDUSTRIE

# Variabilité liée à l'espèce



- Identification du spot orange à Rf = 0,15 grâce à l'interface MS  
=> confirmation par l'achat du standard



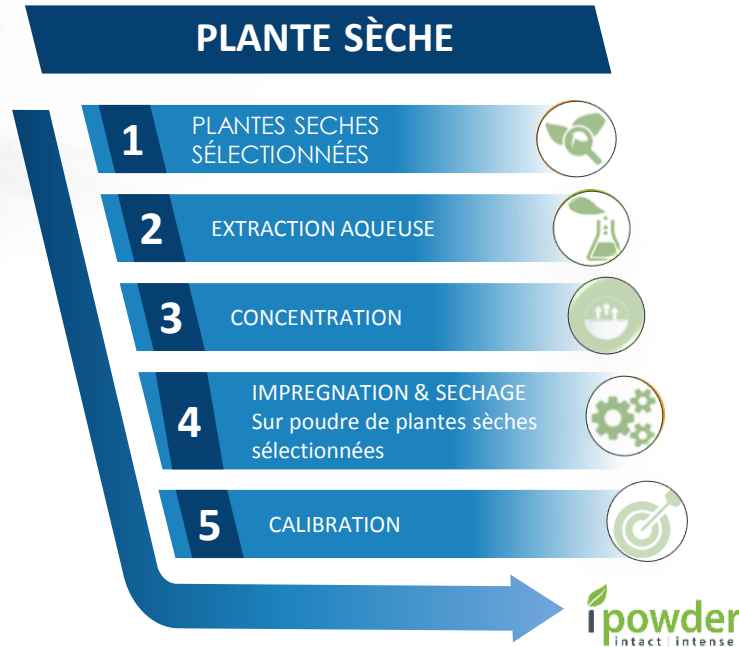


# Caractérisation d'un extrait de plante

Cas de Mélisse ipowder®

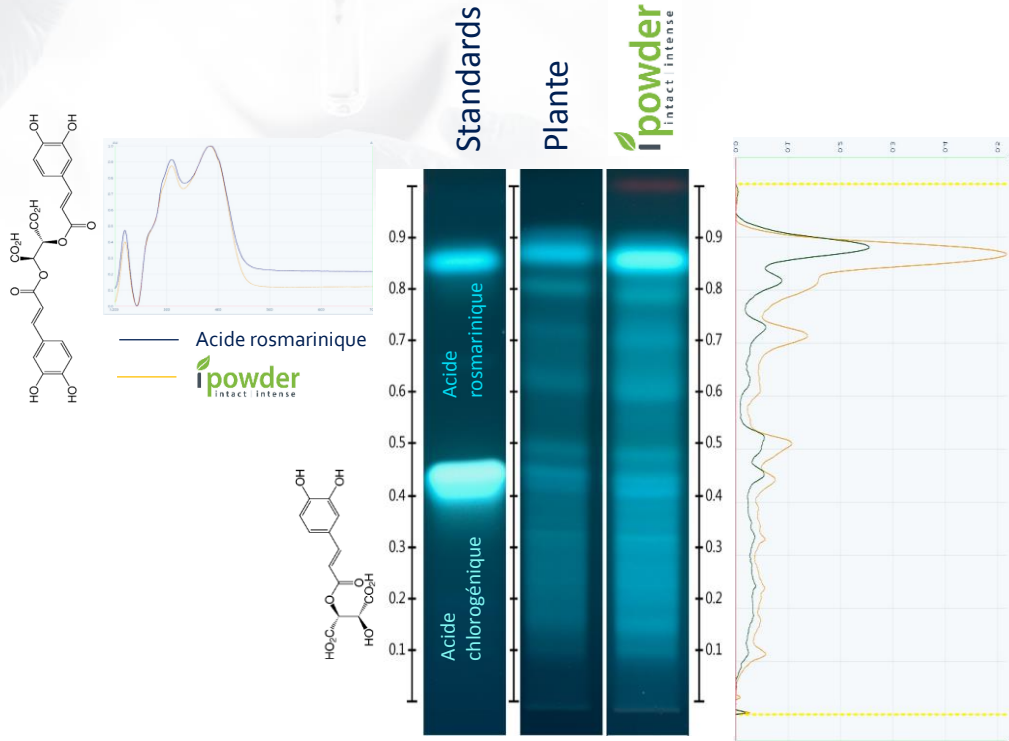


# ipowder® : procédé unique et breveté



**PiLeJe**  
INDUSTRIE

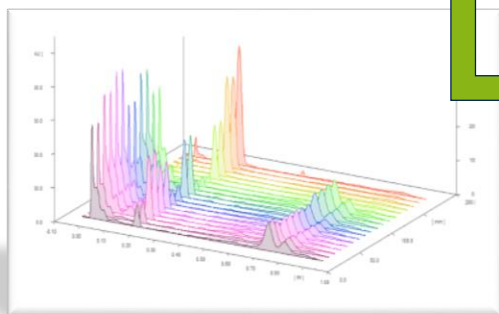
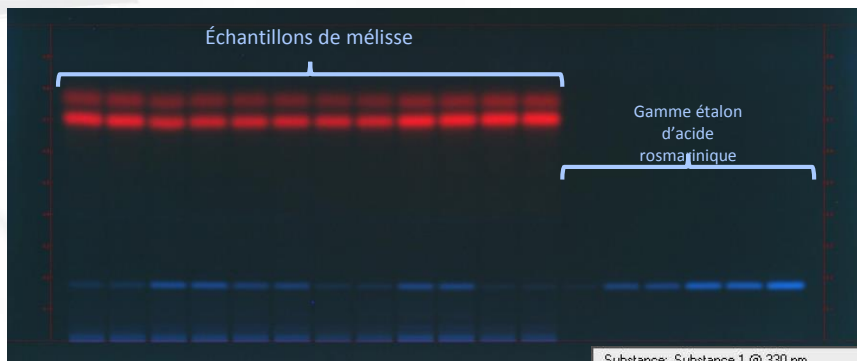
# Empreinte phytochimique



Observation du profil de la plante et de l'ipowder® associé.  
Photo de la plaque et profil quantitatif à 366 nm.

- Profil phytochimique de la plante retrouvé
- Enrichissement du profil
- Préserve l'intégrité et l'intégralité des composés de la plante d'origine

# Quantification de l'acide rosmarinique



Détection de l'acide rosmarinique à 330 nm  
et quantification selon une gamme de  
standards

Substance: Substance 1 @ 330 nm      Regression mode: Michaelis-Menten 2

Regression via height     $Y = -45.22 + (746.4 * X) / (511.7 + X)$       sdv = 2.16 %  
 area                       $Y = -550.8 + (1.865e+004 * X) / (1050 + X)$       sdv = 2.11 %

Track	Vial	Rf	Amount Fraction	Height	X(calc)	Area	X(calc)	
1	C1	0.18		64.99	88.64 ng	915.19	89.56 ng	Sample congelé broyé congelé congelé (+2 semaines) 1
2	C1	0.18		65.55	89.16 ng	900.41	88.58 ng	Sample congelé broyé congelé congelé (+2 semaines) 1
3	C2	0.18		189.23	234.31 ng	2899.74	238.32 ng	Sample congelé broyé congelé (+1 semaine) 1
4	C2	0.18		196.29	244.74 ng	2980.62	245.21 ng	Sample congelé broyé congelé (+1 semaine) 1
5	C3	0.18		135.62	163.60 ng	1946.83	162.33 ng	Sample congelé broyé 1
6	C3	0.18		137.85	166.27 ng	1977.71	164.65 ng	Sample congelé broyé 1
7	C4	0.17		44.80	70.17 ng	609.77	69.66 ng	Sample congelé broyé, congelé congelé (+2 semaines) 2
8	C4	0.17		45.54	70.83 ng	595.04	68.72 ng	Sample congelé broyé, congelé congelé (+2 semaines) 2
9	C5	0.17		169.98	207.27 ng	2450.60	201.35 ng	Sample congelé broyé, congelé (+1 semaine) 2
10	C5	0.17		172.74	211.03 ng	2493.99	204.83 ng	Sample congelé broyé, congelé (+1 semaine) 2
11	C6	0.17		29.47	56.89 ng	376.04	54.90 ng	Sample congelé broyé 2
12	C6	0.17		30.97	58.16 ng	413.59	57.25 ng	Sample congelé broyé 2
13	C9	0.17	49.50 ng		21.20	296.18		Std Level 1
14	C9	0.17	196.00 ng		159.89	2407.38		Std Level 2
15	C9	0.17	196.00 ng		160.95	2337.18		Std Level 2
16	C9	0.18	392.00 ng		285.17	4610.21		Std Level 3
17	C9	0.18	392.00 ng		275.03	4455.22		Std Level 3
18	C9	0.18	588.00 ng		352.46	6134.85		Std Level 4



# Communication scientifique

## Lemon balm <sup>Intact | Intense</sup> powder : phytochemical analysis and antioxidant activity

Groupe PiLeJe

Michel Dubourdeaux<sup>1</sup>, Isabelle Guinobert<sup>1</sup>, Anaïs Escalon<sup>1</sup>, Valérie Bardot<sup>1</sup>, Isabelle Ripoche<sup>2</sup>, Pierre Chalard<sup>2</sup>, César Cotte<sup>1</sup>, Lucile Berthomier<sup>2</sup>, Martin Lerebourse<sup>2</sup>



<sup>1</sup>Groupe Pileje, Paris, France, [i.guinobert@pileje.com](mailto:i.guinobert@pileje.com)

<sup>2</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Clermont-Ferrand, France

### INTRODUCTION

*Melissa officinalis* L. is a perennial herbaceous plant belonging to the family of Lamiaceae, well-known for its efficiency in anxi-depressive states such as stress and for its gastro-intestinal protective activity [1]. Lemon balm ipowder<sup>®</sup> is a plant infusion concentrated on plant totum, an exclusive 100% plant product developed by PiLeJe Industrie, from dried *Melissa officinalis* L. according to a patented process [2].

**The aim of the study was to demonstrate that the extraction process, ipowder<sup>®</sup> technology, increases the concentration of markers in the extract while preserving both the plant totum and antioxidative properties.**



#### BOTANICAL

Common names: lemon balm, melissa

Latin name: *Melissa officinalis* L.

Family: Lamiaceae

Plant part used: leaf

### MATERIAL & METHODS

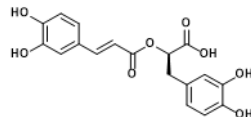
#### Plant collection, identification and extraction



- **Plant:** *Melissa officinalis* L. with the voucher specimen number CLF106452 [3]
- **Lemon balm ipowder<sup>®</sup>** is a powder composed of an aqueous extraction of two parts of plant followed by concentration, vacuum fixation and drying of the active components of the extract on one part of plant totum
- **Extract 3/1** is an aqueous extract with a Drug Extract Ratio 3/1 [4]

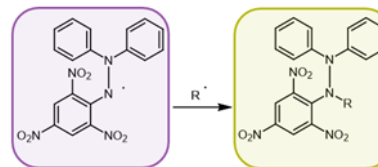
#### Analyses

- Selection of analytical extraction solvent to target a large range of metabolites
- Determination of **rosmarinic acid** by HPTLC, LC/MS and HPLC



#### Evaluation

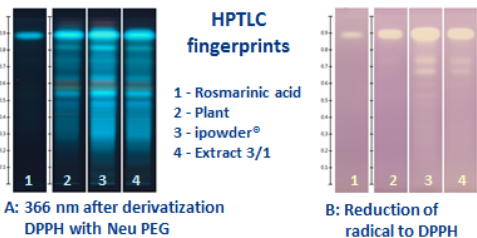
Scavenging activity using the DPPH test (ability of plant extracts to donate a hydrogen atom or electron to the stable radical DPPH).



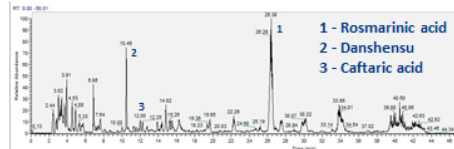
# Communication scientifique

## RESULTS

### Phytochemical qualitative analyses



The HPTLC and LC/MS analyses showed that the ipowder® technology preserves the native plant fingerprint and its biological properties.

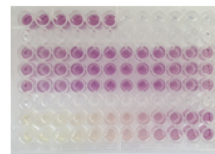
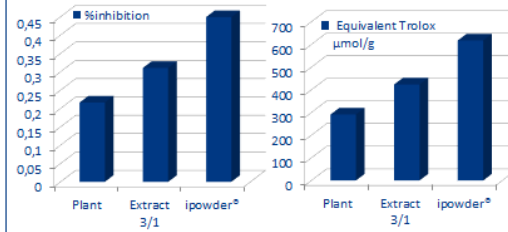


### Quantification of rosmarinic acid by HPTLC and HPLC analyses



- Both methods gave similar quantity of rosmarinic acid
- Rosmarinic acid concentration in the ipowder® was higher than that in the native plant
- Its concentration in the ipowder® was equivalent to that in the extract 3/1

### Scavenging activity



- The assay evaluates the capacity of plant extracts to scavenge free radicals in solution.
- Trolox equivalent antioxidant capacity of our extracts was also investigated.
- We showed that the ipowder® exhibits higher scavenging activity than the native plant and confirmed the ratio of ipowder® equivalent.

## CONCLUSION

The **ipowder** technology allows to concentrate the markers of *Melissa officinalis* L. in the extract while maintaining native plant fingerprint and preserving its biological properties. The scavenging activity of the Lemon balm ipowder® was higher than that of the native plant. Therefore, with the ipowder® technology, patients could take less capsules or tablets for the same effects (1 dose of ipowder® = 3 doses of native plant).



Advantages

This exclusive and patented process **insures**:



1 dose = 3 doses

A true concentration



More satisfied and healthy customers



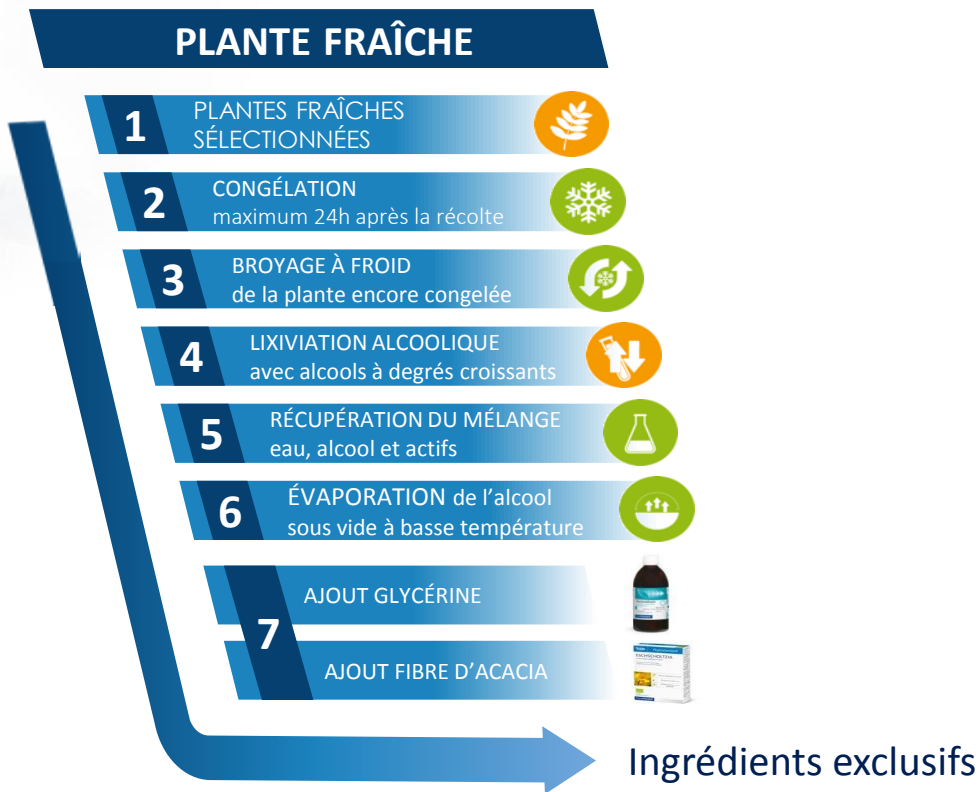


# Caractérisation d'un extrait de plante

Gamme **PhytoPrevent**

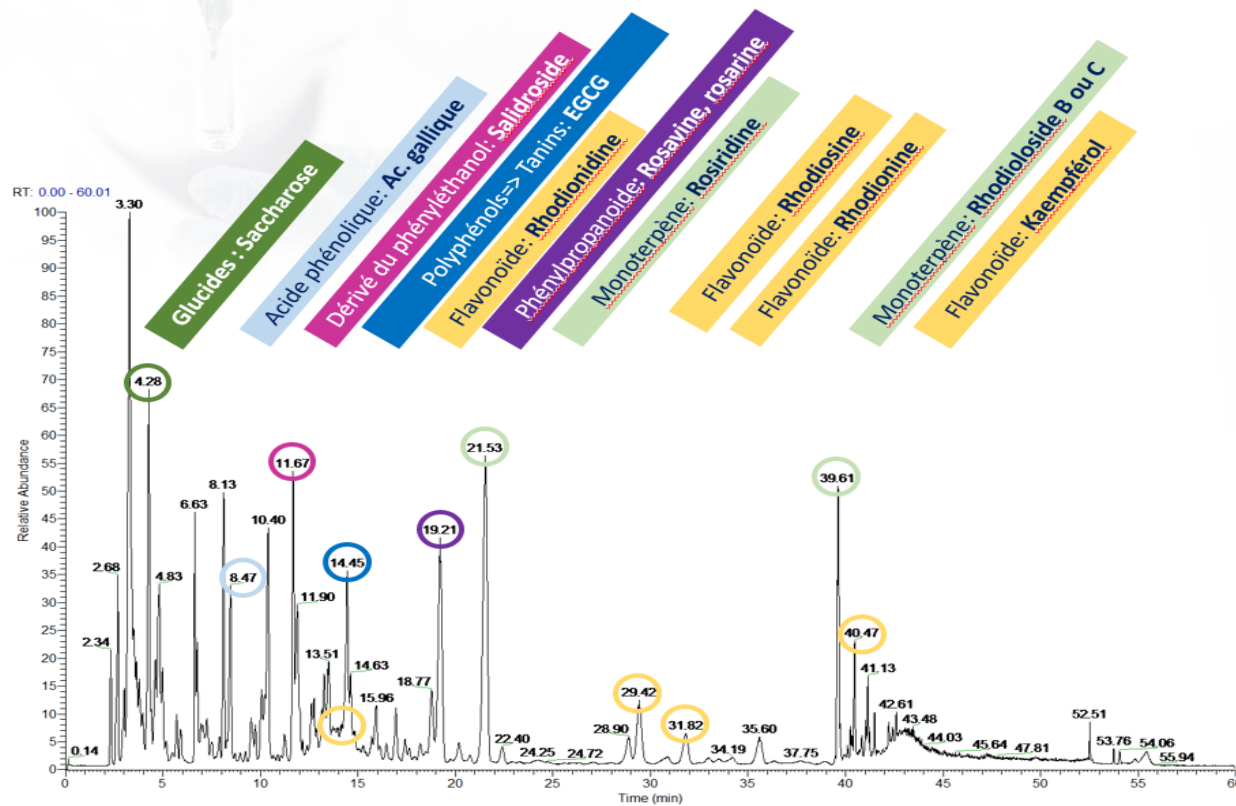


# L'expertise plantes : procédé unique et breveté



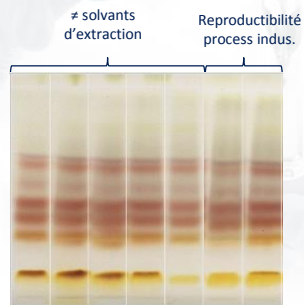
# Caractérisation extrait

Cartographie de l'ingrédient par LC-MS

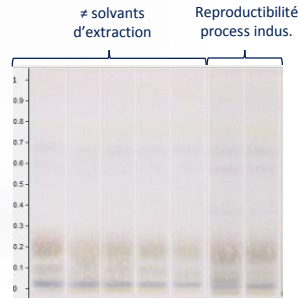


# Caractérisation extrait

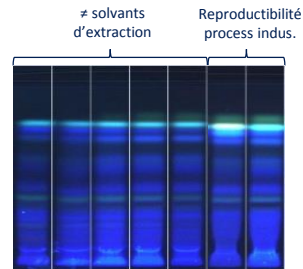
Cartographie de l'ingrédient par HPTLC



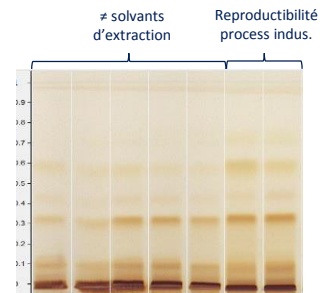
Acides aminés



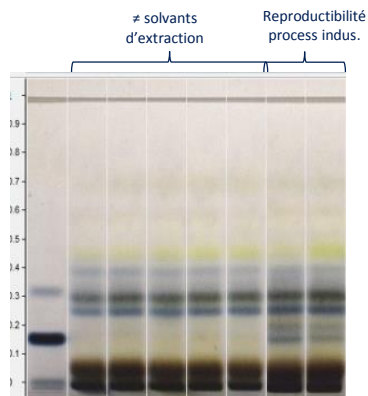
Sucres, glycosides



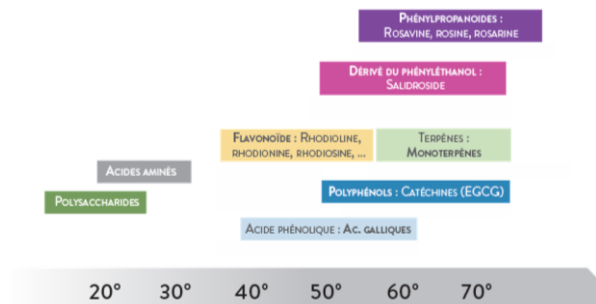
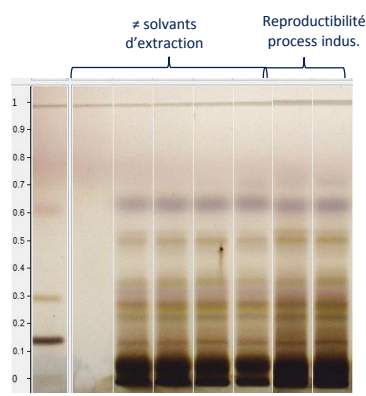
Flavonoïdes et acides phénoliques



Tanins



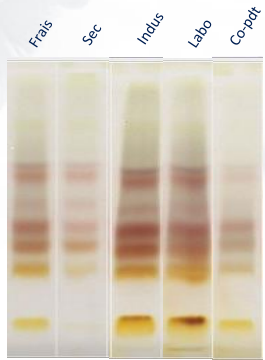
Phénylpropanoïdes



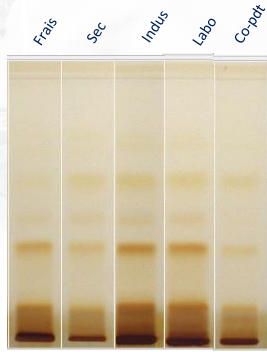


# Caractérisation d'extraits

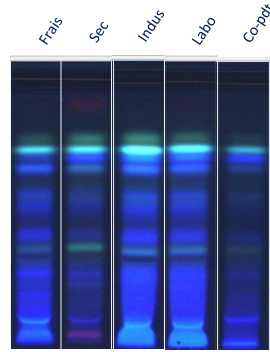
Valorisation du procédé



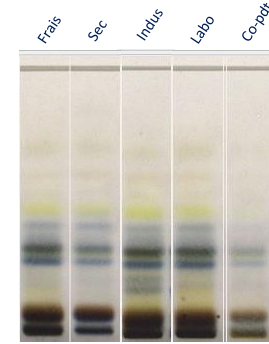
Acides aminés



Tanins



Flavonoïdes et acides phénoliques



Phénylpropanoïdes (Rosavines, salidroside, etc.)

	Acides aminés	Tanins	Flavonoïdes, ...	Phénylpropanoïdes
Efficacité procédé	√√	√√√	√√	√√
	Acides aminés	Tanins	Flavonoïdes, ...	Phénylpropanoïdes
Intérêt du frais vs sec	++	+	+	+



# Communication scientifique

## ADMINISTRATION OF A STANDARDIZED EXTRACT OF *RHODIOLA ROSEA* L. IN MICE REDUCED ACUTE MILD STRESS-INDUCED CORTICOSTERONE RELEASE AND ALTERED STRESS-RESPONSIVE GENE EXPRESSION

Isabelle Guinobert<sup>1</sup>, Anne-Laure Dinel<sup>2</sup>, Corinne Joffre<sup>2</sup>, Véronique Pallet<sup>2</sup>, Valérie Bardot<sup>1</sup>, Lucile Berthomier<sup>3</sup>, Isabelle Ripoche<sup>3</sup>, Angèle Guilbot<sup>1</sup>

Groupe PiLeJe



<sup>1</sup>Groupe Pileje, Paris, France

<sup>2</sup>NutriBrain structure, NutriNeuro UMR 1286 INRA Université Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>3</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Clermont-Ferrand, France



### INTRODUCTION

*Rhodiola rosea* L. is an adaptogenic plant recommended to increase body's resistance to chronic stress but only scarce data exist in acute stress and on underlying mechanisms. **The aim of this study was to assess the effect of a standardized hydroethanolic extract of *R. rosea* fresh roots (HRE; marketed under name EPS Rhodiole, PiLeJe Laboratoire) on the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) response to acute mild stress and to identify the underlying mechanisms.**

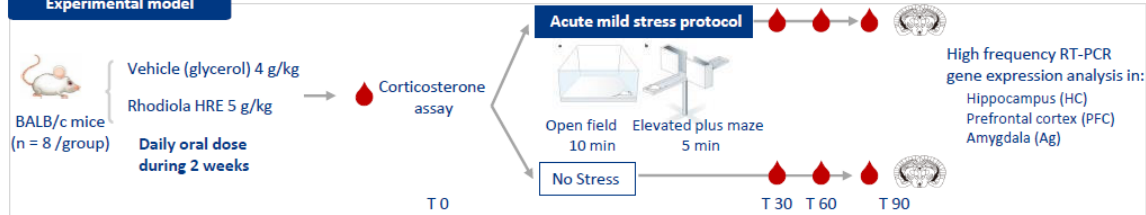


### MATERIAL & METHODS

#### Phytochemical composition

- *R. rosea* fresh roots are extracted with ethanol using the patented process Phytostandard®. The HRE is then concentrated to be standardized in salidroside (EPS Rhodiole).
- High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) was performed with a CAMAG equipment and suitable methods with universal derivatization reagent allowing detection of both phenylpropanoids and phenolic compounds.
- Ultra-High Performance Layer Chromatography-Mass Spectrometry (UHPLC-MS) was performed with a C18 Uptisphere Strategy column connected to an Orbitrap mass spectrometer. Data were processed using Xcalibur software. Compounds were identified according to their retention times and mass spectral data, and compared with standards or published data.

#### Experimental model



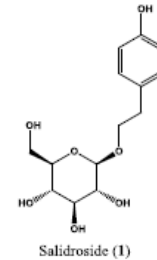
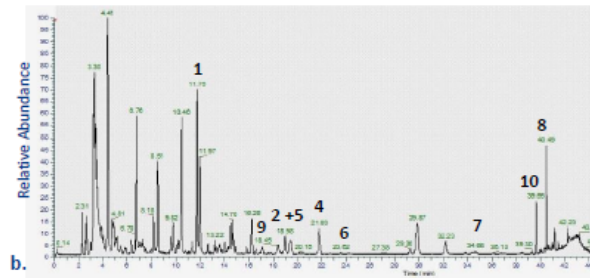
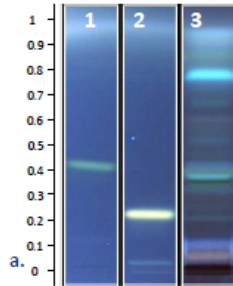


# Communication scientifique

## RESULTS

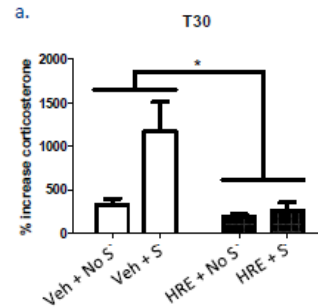
### Phytochemical composition

- a. HPTLC analysis showed the presence of salidroside (1) and rosavin (2) in the HRE (3)
- b. UHPLC-MC analysis allowed the identification of salidroside [1], rosavin [2] and 24 other compounds: monoterpene glycosides (rhodiolides [9 and 10], rosiridin [4]), phenylpropane derivatives (rosarin [5], rosin [6]) and flavonoids (rhodaline [7], kaempferol [8]).

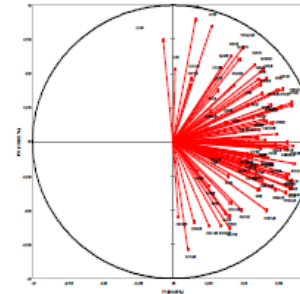


### Stress response

- a. The HRE decreased corticosterone secretion. At T30, HRE rescued corticosterone secretion to a basal level after acute mild stress.
- b. HRE modulated a pool of stress-responsive genes differentially in HC, PFC and Ag. Most of the genes modulated are involved :
- in neuronal structure (NEFL, LIMK1..) and could impact synaptic transmission and plasticity,
  - in the glucocorticoid signaling regulation pathway (LIS1) playing a potential role in the feedback of the HPA axis,
  - in the circadian rhythm (PER1) and could impact circadian clock driven processes.

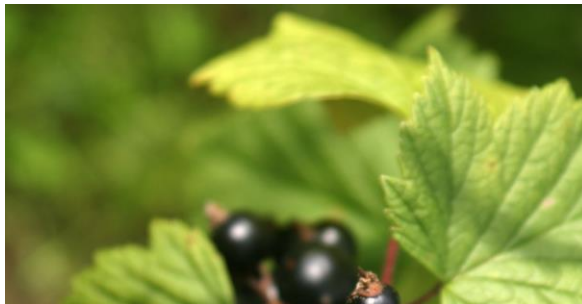


### b. Principal Component Analysis in HC



## CONCLUSION

In an acute mild stress model in mice, the standardized hydroethanolic root extract of *R. rosea* tested reduced the corticosterone levels and modulated the expression of some stress-responsive genes depending on brain structures. The extract could be an interesting option for stress management.



Etudes d'extraits  
secs du marché  
par la réalisation  
de profils  
phytochimiques



# Etudes HPTLC

Acides aminés

Acides phénoliques

Terpènes

Extraction à l'eau

Extraction à l'éthanol 60% (EtOH60)

Extraction au méthanol (MeOH)

Extraction des molécules hydrosolubles

Extraction des molécules liposolubles

Plante sèche

ES:EtOH/H2O  
8-10/1

ES:EtOH30  
4-6/1

ES:EtOH60  
3-4,5/1

ES:Eau  
10/1

ES:EtOH60  
4-7/1

ES:EtOH60  
5-9/1

ES:Eau  
8-10/1

ES:Eau  
10/1

**i**powder  
Intact Intense

Acides aminés

Acides phénoliques

Terpènes

Réalisation d'analyses HPTLC de 3 familles de molécules de solubilités différentes via une extraction analytique dans 3 solvants différents des échantillons

Eau, EtOH60, MeOH

**PiLeJe**  
INDUSTRIE

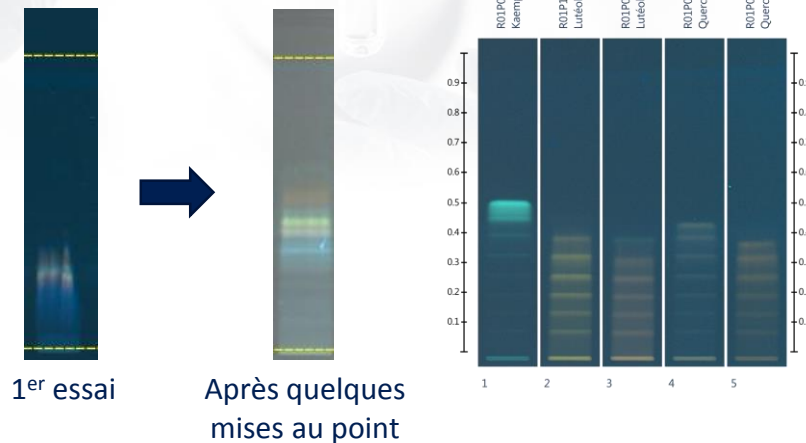




# Développements en cours sur l'HPTLC



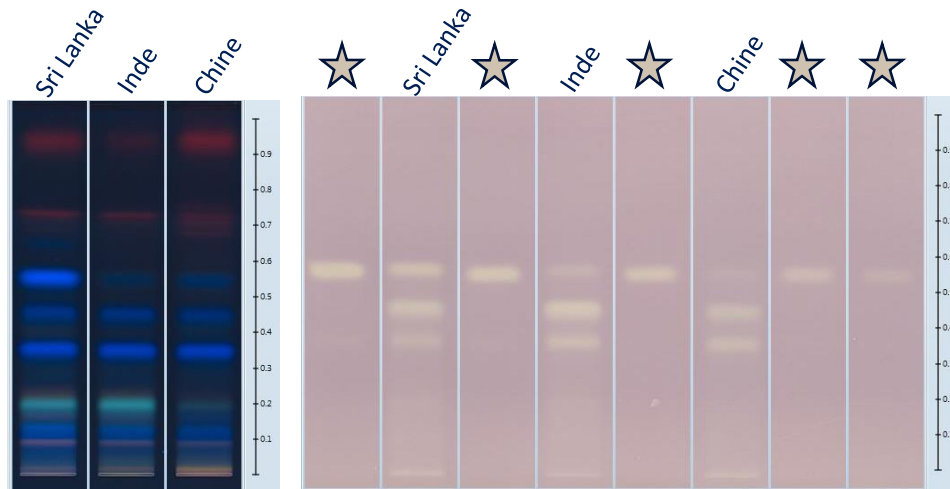
## AMD 2



Problème de dégradation de standards (flavonoïdes) :

→ en attente d'essais sur des phases stationnaires différentes

## Quantification de l'activité anti-oxydante



★ Gamme d'étalonnage avec l'acide gallique

**PiLeJe**  
INDUSTRIE

Merci pour votre attention  
*Avez-vous des questions?*

**Vous méritez l'excellence industrielle**

A.ESCALON@pileje-industrie.com

lucile.berthomier@sigma-clermont.fr



NATUROPOLE NUTRITION SANTÉ – LES TIOLANS – 03800 SAINT-BONNET DE ROCHEFORT

TÉL : 33 (0)4 70 90 61 61 – FAX : 33 (0)4 70 58 51 26

web : [www.pileje-industrie.com](http://www.pileje-industrie.com)