

HPTLC-DENSITOMETRIE : UNE AVANCÉE SIGNIFICATIVE DANS LE CONTRÔLE QUALITÉ D'EXTRAITS DE CRANBERRY (*VACCINIUM MACROCARPON*)

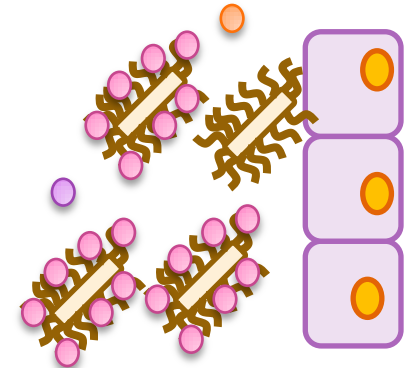
CRANBERRY OU CANNEBERGE

- *Vaccinium macrocarpon* Ait. = canneberge à gros fruits
- Utilisée depuis un siècle en Amérique du Nord en prévention des infections urinaires
- Allégation Santé accordée par l'ANSES (2004), ANSM (2008) et EMEA
 - Jus de cranberry et baies déshydratées
 - Prophylaxie non-antibiotique



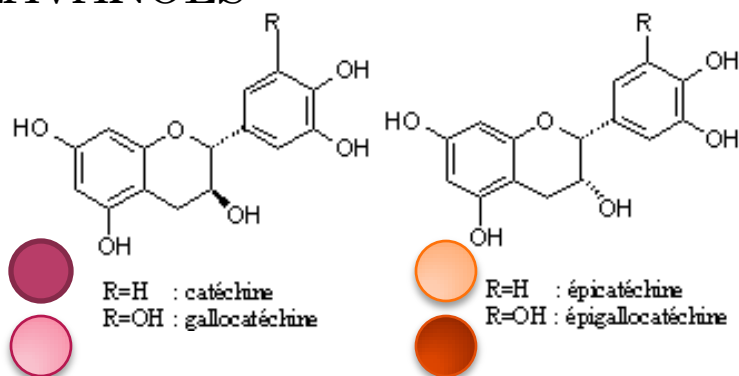
CRANBERRY : INTÉRÊT

- Inhibition de l'adhérence de bactéries pathogènes
 - *E. coli* à P fimbriae : infections urinaires
- Mécanisme d'action mécanique
 - Association avec les protéines d'adhésion
 - Pas de phénomènes de résistance
- Polyphénols = Proanthocyanidols A

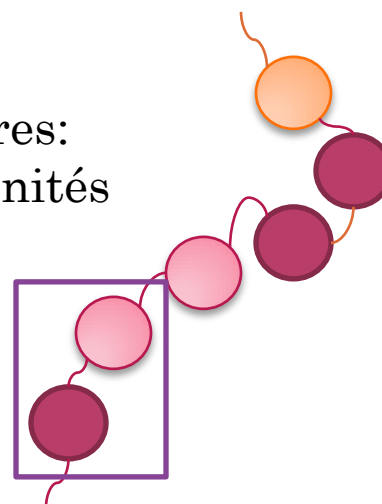


LES PROANTHOCYANIDOLS (PAC)

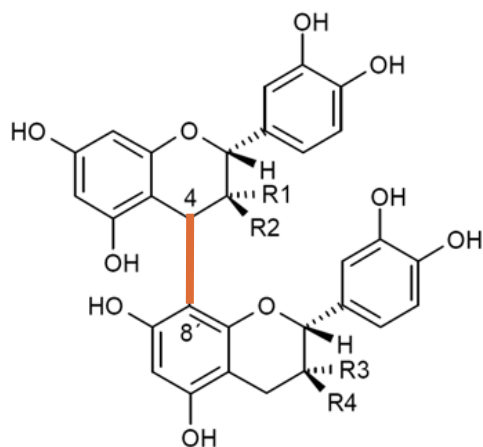
FLAVANOLS



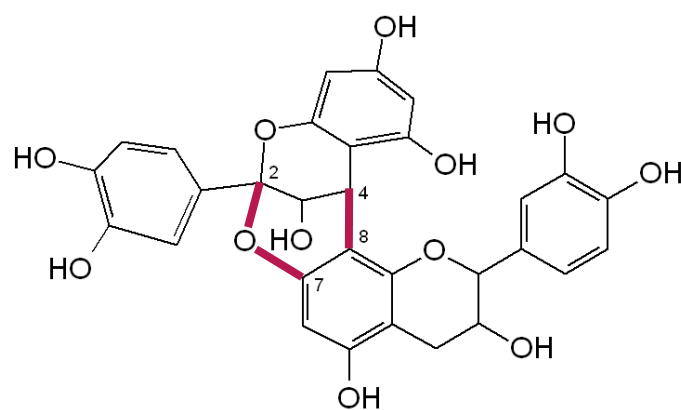
Polymères:
2 à 10 unités



Proanthocyanidols B



Proanthocyanidols A



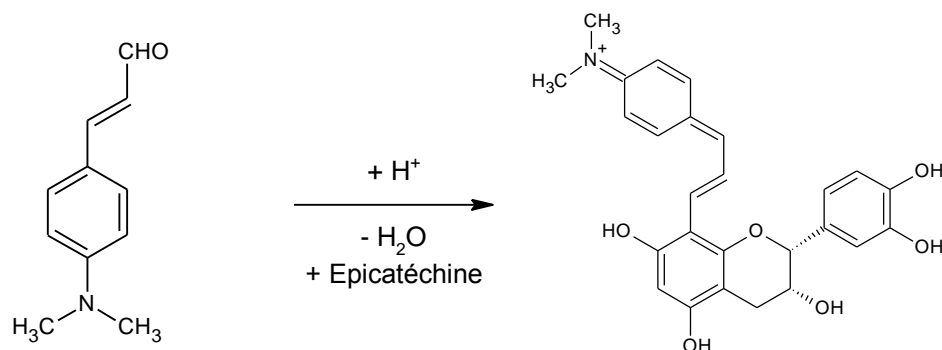
PROBLÉMATIQUE

- De plus en plus de compléments alimentaires avec allégation santé sur le marché
- Dose conseillée : 36 mg de PAC-A par jour
- Méthode de dosage reconnue : BL-DMAC
 - Dosage global

Insuffisant pour le contrôle de la
qualité des jus et extraits employés :
Existence de biais

MÉTHODE BL-DMAC

- Basée sur réaction du 4-diméthylaminocinnamaldéhyde
 - Avec noyau présentant 2 hydroxyl en méta : flavanol
 - Formation d'un dérivé vert : dosé à 630 nm



○ Avantages

- Méthode rapide, à haut débit : plaque 96 puits
- Relativement spécifique des flavonols
 - Pas d'interférence des anthocyanes

MÉTHODE BL-DMAC

- Biais possibles
 - Dosage global : monomères, PAC-A, PAC-B
 - Sans distinction
 - Facteur de réponse supérieur avec monomères
 - Utilisation d'une courbe d'étalonnage en PAC-A₂
 - Si taux important de monomères : surestimation du taux de PAC

Insuffisant seul pour avancer un taux de PAC-A

Idée : Utiliser l'HPTLC pour apporter
des informations complémentaires

APPORT DE L'HPTLC

- Méthode chromatographique
 - Permet de doser isolément différents composés
 - Adaptée au dosage de routine
- Dosage de la totalité des PAC : irréalisable
 - Mélange de complexité trop importante
 - Peu de standards commercialisés

Réalisable en choisissant des marqueurs pertinents
Première étape du développement du procédé

DÉFINITIONS DES MARQUEURS CLÉS

- Le choix des marqueurs doit permettre
 - de pallier les principaux biais
 - d'attester d'une teneur relative en PAC-A d'intérêt
- Teneur relative en PAC-A d'intérêt
 - PAC-A de bas poids moléculaires : biodisponibles
 - Standard commercial : **PAC-A₂** dimérique
- Présence importante de monomères
 - Surestimation du score DMAC
 - Signe d'une dégradation des extraits : perte d'activité?
 - Standard sélectionné : **Catéchine**

DÉFINITIONS DES MARQUEURS CLÉS

- Falsification par d'autres fruits
 - Riche en PAC-B, augmentation score DMAC
 - Standard utilisé : **PAC-B₁**
- Dosage simultané des 3 marqueurs
 - En une seule migration
 - Adapté à des contrôles en routine

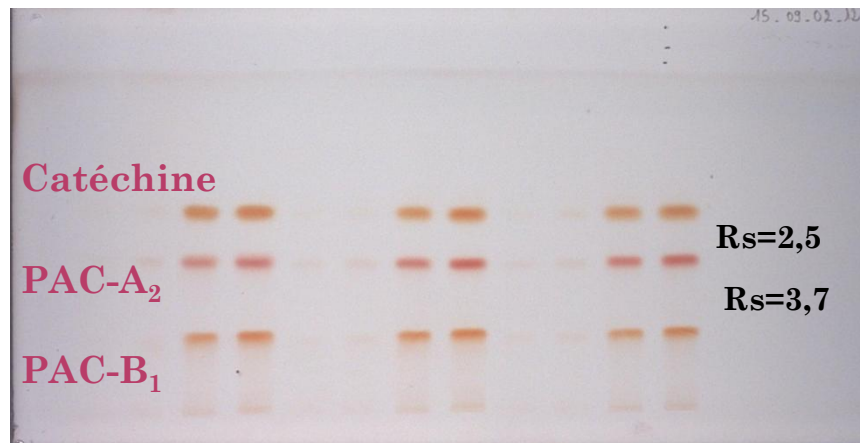
CONDITIONS OPÉRATOIRES

- Eluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{Ac formique}$ (6:10:1, v/v)

- Résolution optimale

- Révélateur

- Vanilline 1% HCl



- Régression de type polynomiale

- Limite de détection 0,5 μg ,
- limite de quantification 0,6 μg

Gamme 0,7 à 5 μg

VALIDATION : PROFILS D'EXACTITUDE

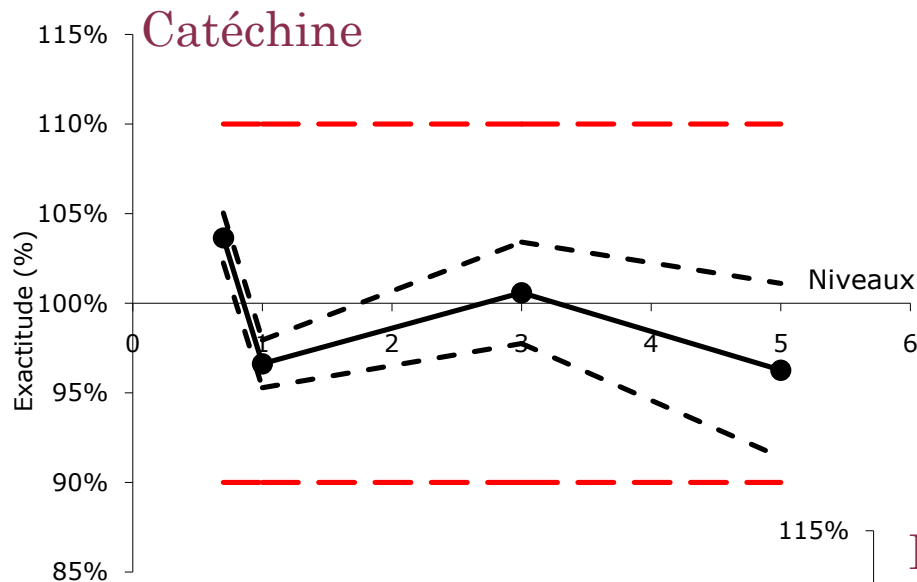
○ Concept

- Représentation graphique
- Limites de tolérance et d'acceptabilité sur un domaine

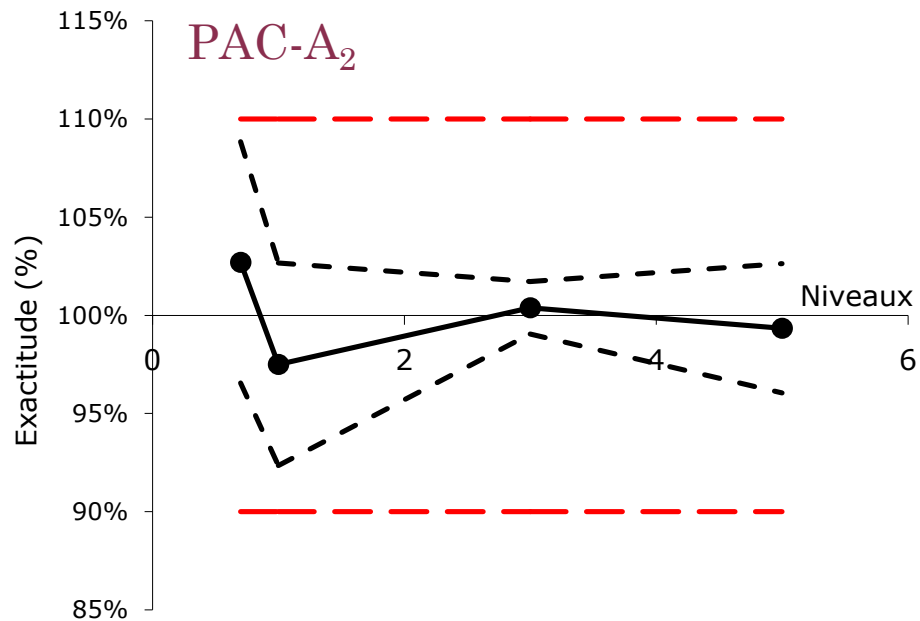
○ Définition des limites

- FDA admet pour techniques d'analyse : 15 % erreur
- HPTLC-densitométrie : souvent variation < 5%
- Ici : étape de révélation, ajoute fluctuation
- Limites d'acceptabilité retenues : 10 %

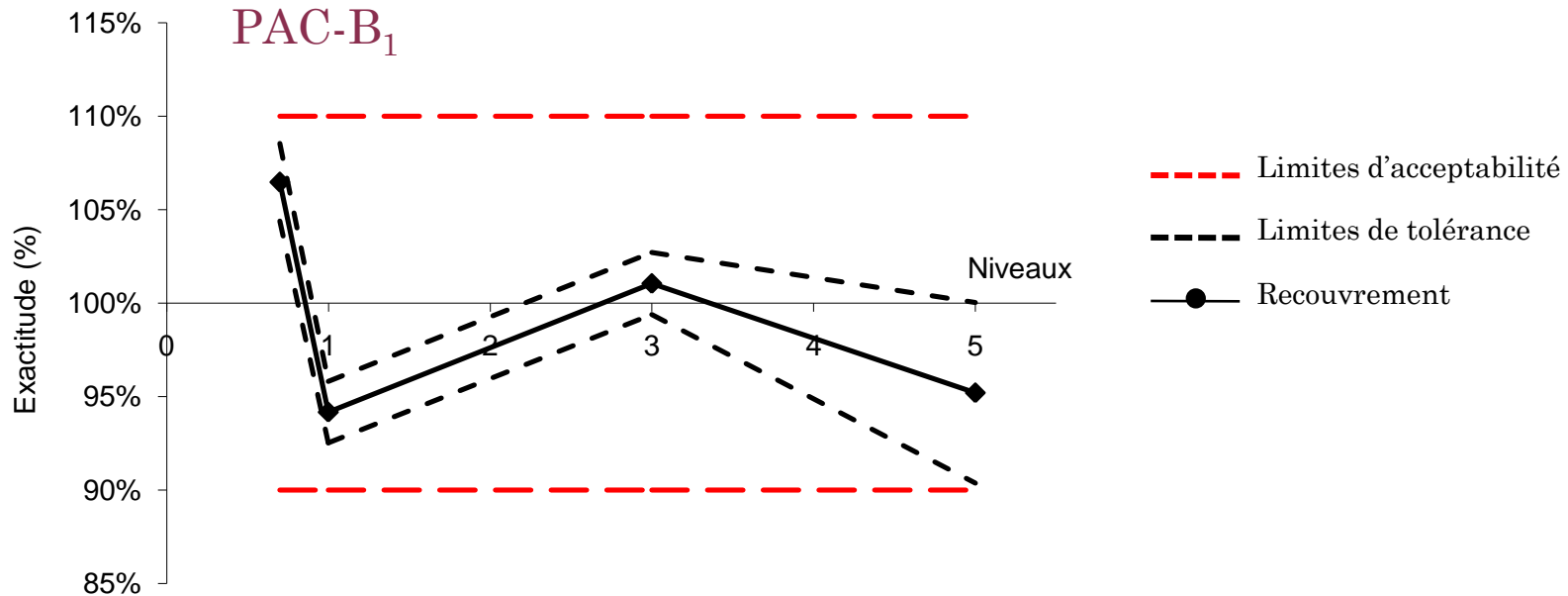
VALIDATION : PROFILS D'EXACTITUDE



--- Limites d'acceptabilité
 --- Limites de tolérance
 ● Recouvrement



VALIDATION : PROFILS D'EXACTITUDE



- Pour les 3 standards
 - Valide dans la gamme 0,7 à 5 µg

VALIDATION : PROFILS D'EXACTITUDE

Précision (n=9)						
	Catéchine		PAC-A ₂		PAC-B ₁	
Dépôt (μg)	Répétabilité (%RSD)	Précision intermédiaire (%RSD)	Répétabilité (%RSD)	Précision intermédiaire (%RSD)	Répétabilité (%RSD)	Précision intermédiaire (%RSD)
0,7	0.44	0.49	1.64	1.87	0.71	0.77
1	0.68	0.68	1.74	1.93	0.70	0.75
3	1.24	1.43	0.64	0.68	0.73	0.83
5	1.99	2.13	1.54	1.68	1.76	1.93

SPÉCIFICITÉ ET JUSTESSE

- Pour des matrices complexes
 - Vérifier l'absence d'interférence des autres composés
 - Matrice « blanche » : impossible avec extraits
- Utilisation des ajouts dosés
 - Extrait dosé ajout de 0,7, 1 et 3 μg de chaque standard
 - Evaluation de l'exactitude

SPÉCIFICITÉ ET JUSTESSE

Standard	Extrait (μg)	Ajout (μg)	Teneur totale (μg)	Mesure (μg)	Biais absolu (μg)	Biais relatif (%)	Recouvrement (%)	RSD %
Catéchine	-	0.7	0.7	0.717	0.018	2.522	102.5	1.55
	-	1	1	0.984	-0.015	-1.60	98.4	2.27
	-	3	3	2.983	-0.017	-0.570	99.4	0.76
PAC-A ₂	0.74	0.7	1.44	1.444	0.0003	0.023	100.0	0.58
	0.74	1	1.74	1.728	-0.007	-0.384	99.6	1.23
	0.74	3	3.74	3.737	0.002	0.044	100.0	0.88
PAC-B ₁	-	0.7	0.7	0.704	0.0044	0.608	100.6	2.64
	-	1	1	0.985	-0.015	-1.492	98.5	1.00
	-	3	3	2.984	-0.016	-0.546	99.4	0.76



Recouvrement > 98 %, RSD < 3 %

APPLICATION : EXTRAITS DE CRANBERRY

- Obtention des extraits enrichis en PACs
 - Broyage des baies fraîches au blender
 - Macération avec un mélange AcOEt/Eau (90 : 10, v/v)
 - Temps de contact : 24, 48 h et 7 jours
 - Filtration, concentration des extraits
 - Précipitation à l'éther de pétrole
 - Elimination du surnageant



Extraits concentrés en PAC : CPAC

APPLICATIONS EXTRAITS DE CRANBERRY

○ Dosage de la teneur en PAC totale : BL-DMAC

Echantillon	Teneur globale en PAC (mg)*	RSD%
24 h-CPAC	1.14	2.97
48 h-CPAC	2.77	3.82
7 jours-CPAC	4.45	2.88

*En mg pour 100 mg d'extrait

- Cinétique d'extraction :
temps de contact élevé favorise l'extraction des PAC

APPLICATION : EXTRAITS DE CRANBERRY

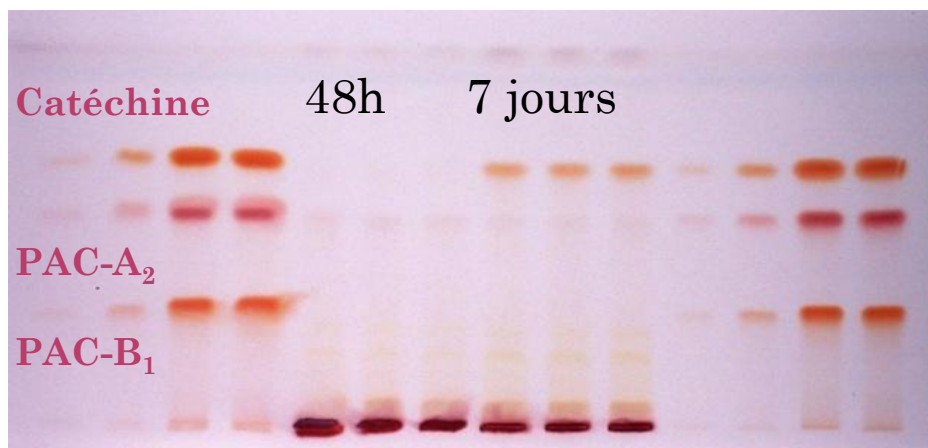
○ Analyse par HPTLC-densitométrie

Echantillon	Catéchine (μg)*	RSD%	PAC-A ₂ (μg)*	RSD%
24 h-CPAC	-	-	94.37	1.77
48 h-CPAC	-	-	105.52	0.86
7 jours -CPAC	174.80	1.35	91.27	3.06

*En mg pour 100 mg d'extrait

Dégradation des PAC dans extrait
de 7 jours

Non détecté par le dosage global



CONCLUSION

- Méthode de dosage par HPTLC-densitométrie développée
 - Validée sur gamme 0,7 à 5 μg
 - RSD < 3 %
- Analyse complémentaire du BL-DMAC
 - S'affranchir des principaux biais
 - Utilisable également en routine

REMERCIEMENTS

○ Equipe RICM

- Joëlle Dorat, IE
- Pr Cécile Gueiffier, Responsable
- Dr Jacques Pothier

○ Equipe IPVBTA

- Dr Françoise Debierre



UNIVERSITÉ
LAVAL

Pr Laurent Bazinet, Institut des
Nutraceutiques et Aliments Fonctionnels