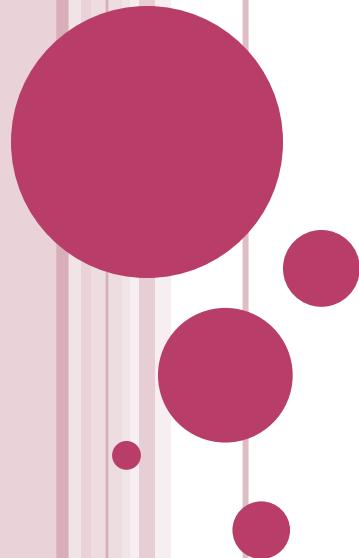


HPTLC-DENSITOMETRIE : UNE AVANCÉE SIGNIFICATIVE DANS LE CONTRÔLE QUALITÉ D'EXTRAITS DE CRANBERRY (*VACCINIUM MACROCARPON*)



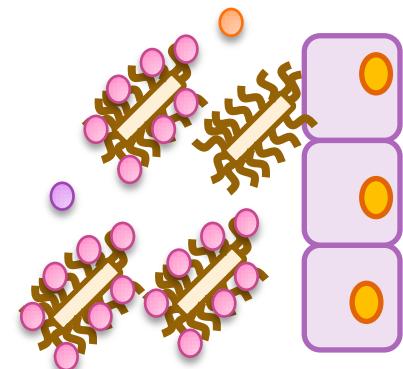
CRANBERRY OU CANNEBERGE

- *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



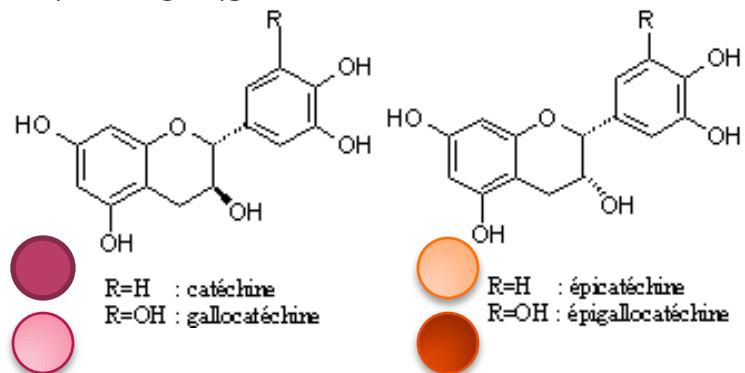
CRANBERRY : INTÉRÊT

- 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

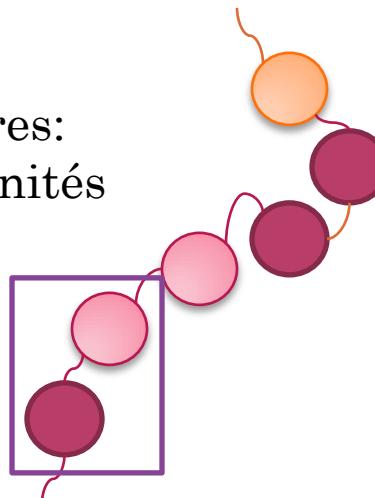


LES PROANTHOCYANIDOLS (PAC)

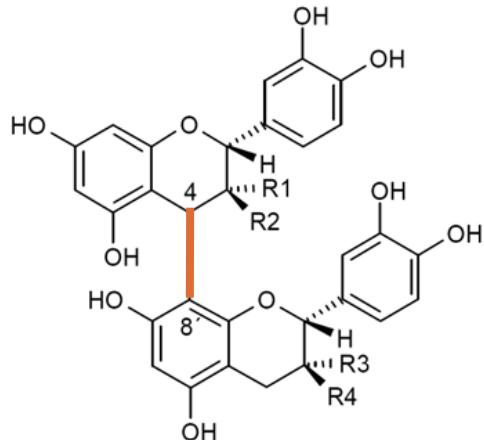
FLAVANOLS



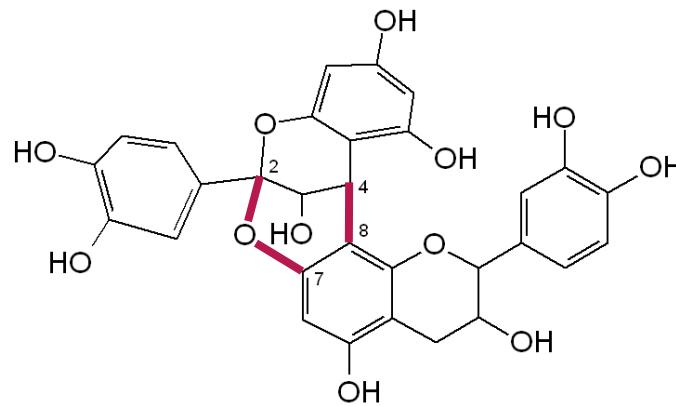
Polymères:
2 à 10 unités



Proanthocyanidols B



Proanthocyanidols A



PROBLÉMATIQUE

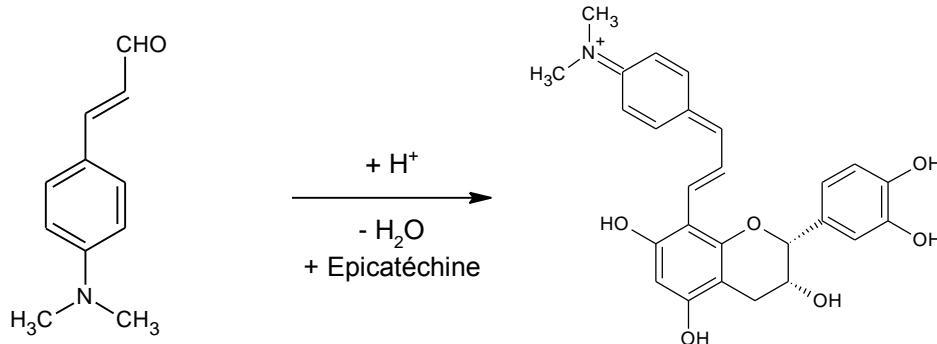
- De plus en plus de compléments alimentaires avec allégation santé sur le marché
- Dose conseillée : 36 mg de PAC-A par jour
- Méthode de dosage reconnue : BL-DMAC
 - Dosage global

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 trous
- 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-A_2
 - 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

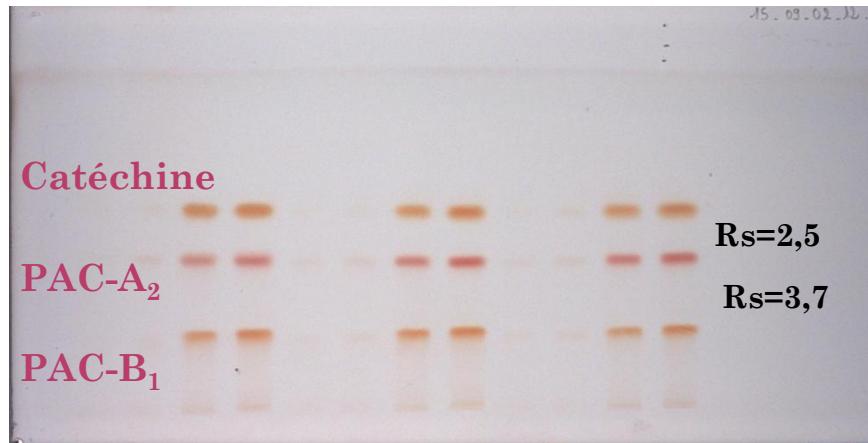
- Le choix des marqueurs doit permettre
 - de pallier les principaux biais
 - d'attester d'une teneur relative en PAC-A d'intérêt
- Teneur relative en PAC-A d'intérêt
 - PAC-A de bas poids moléculaires : biodisponibles
 - Standard commercial : **PAC-A₂** dimérique
- Présence importante de monomères
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

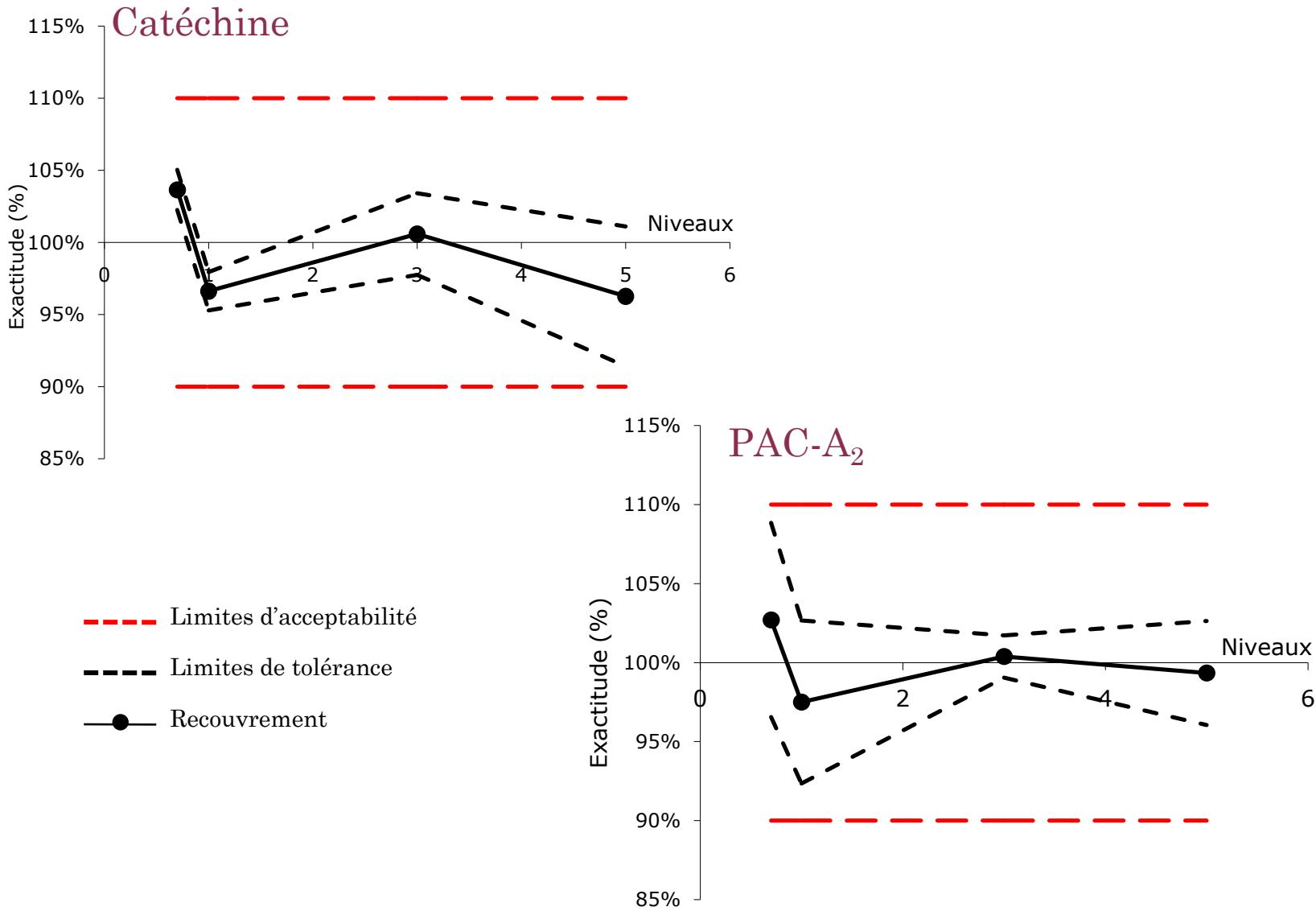
○ Concept

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

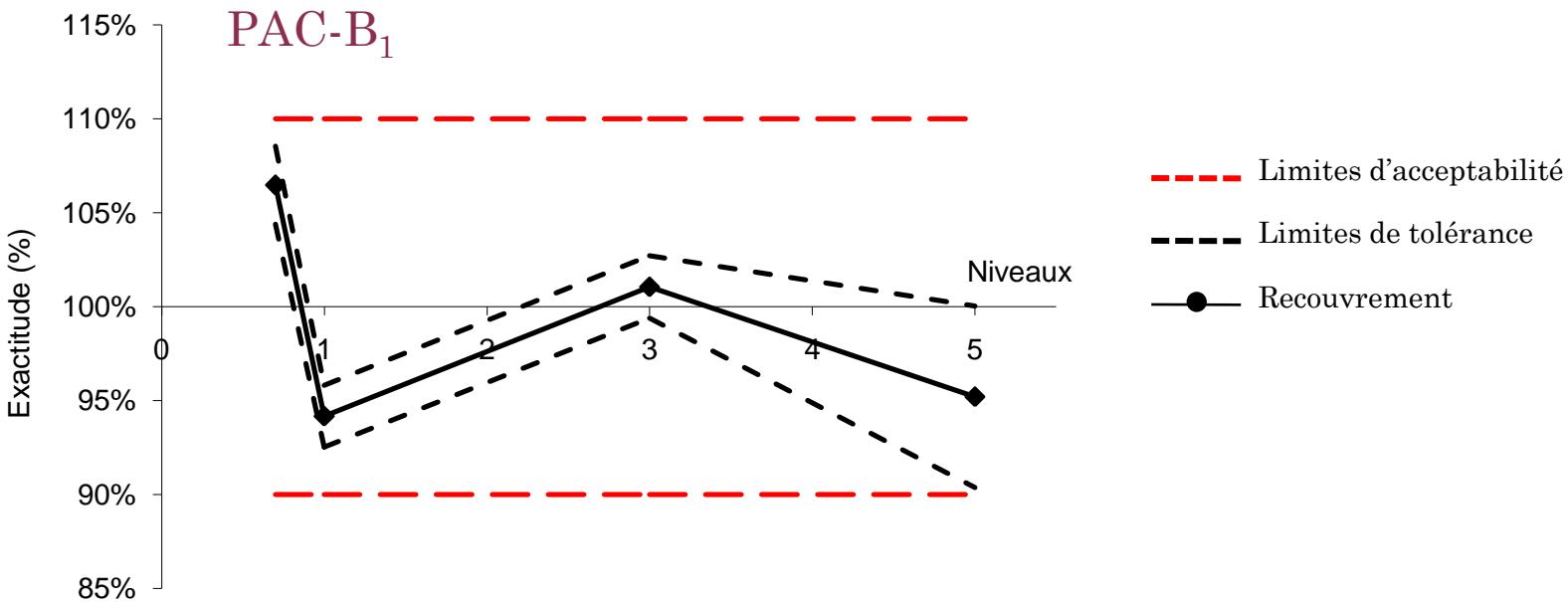
○ Définition des limites

- 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



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 (μ g) | Ajout (μ g) | Teneur totale (μ g) | Mesure (μ g) | Biais absolu (μ g) | 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

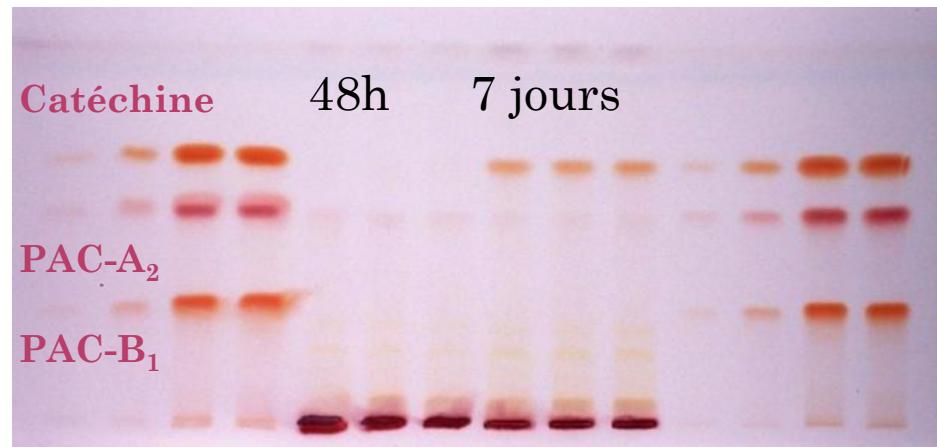
- Analyse par HPTLC-densitométrie

| Echantillon | Catéchine (μ g)* | RSD% | PAC-A ₂ (μ g)* | 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 IPVBT**
 - Dr Françoise Debierre



UNIVERSITÉ
Laval

Pr Laurent Bazinet, Institut des
Nutraceutiques et Aliments Fonctionnels