



HAL
open science

HTPLC-densitométrie : une avancée significative dans le contrôle qualité d'extraits de Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*)

Leslie Boudesocque, Joëlle Dorat, Jacques Pothier, Cécile Enguehard-Gueiffier

► To cite this version:

Leslie Boudesocque, Joëlle Dorat, Jacques Pothier, Cécile Enguehard-Gueiffier. HTPLC-densitométrie : une avancée significative dans le contrôle qualité d'extraits de Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). Journée du Club de CCM, Université François Rabelais (Tours). UFR des Sciences Pharmaceutiques, Tours, FRA., Jul 2012, Tours, France. 22 diapositives. hal-02808938

HAL Id: hal-02808938

<https://hal.inrae.fr/hal-02808938v1>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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



**Leslie Boudesocque
Equipe RICM
UMR INRA 1282 ISP**

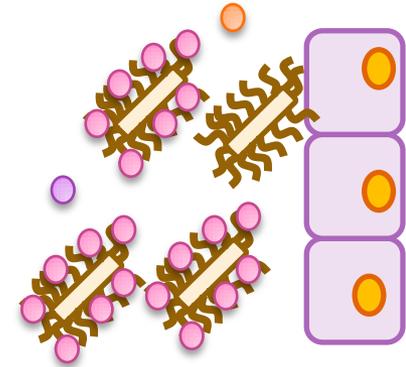
CRANBERRY OU CANNEBERGE

- *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



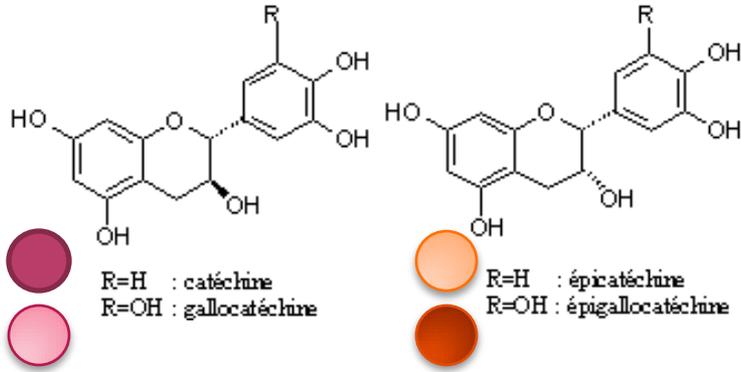
CRANBERRY : INTÉRÊT

- 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

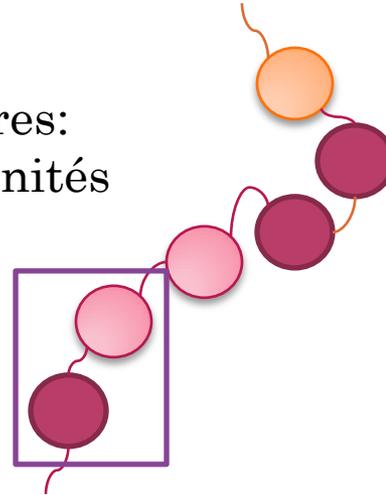


LES PROANTHOCYANIDOLS (PAC)

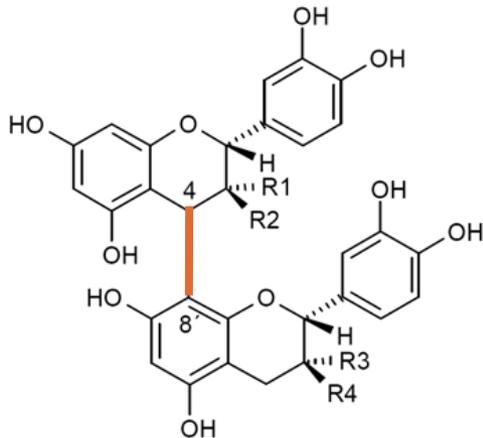
FLAVANOLS



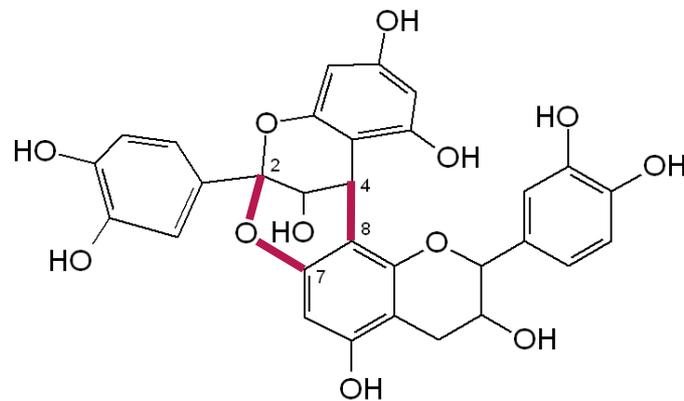
Polymères:
2 à 10 unités



Proanthocyanidols B



Proanthocyanidols A



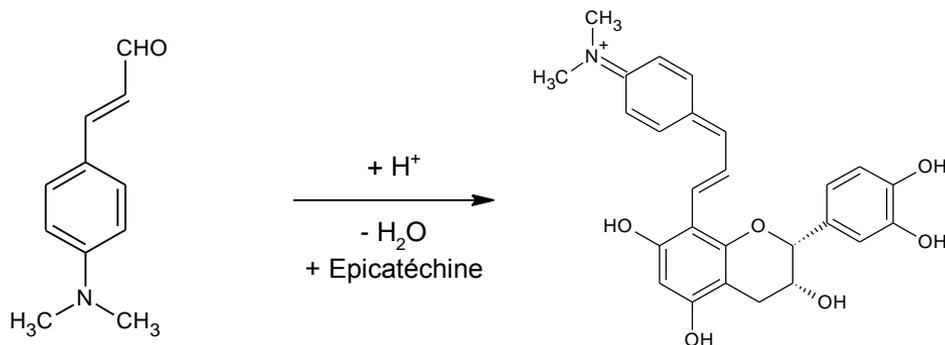
PROBLÉMATIQUE

- 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

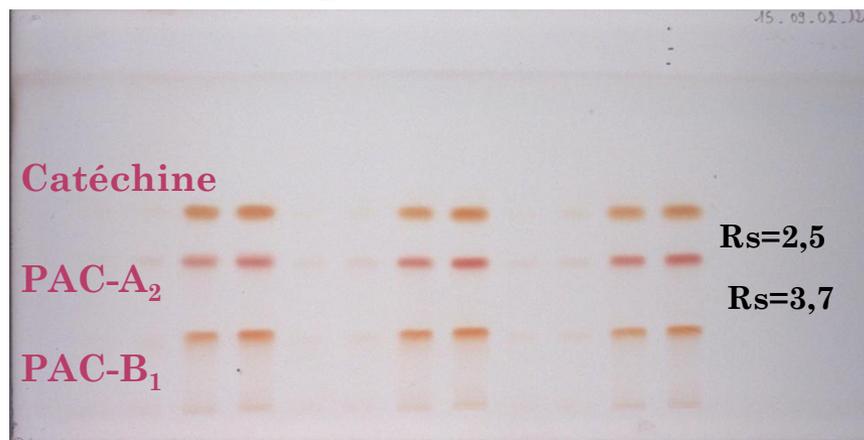
CONDITIONS OPÉRATOIRES

- Eluant : CH₂Cl₂/AcOEt/Ac formique (6:10:1, v/v)

- Résolution optimale

- Révélateur

- Vanilline 1% HCl



- Régression de type polynomiale

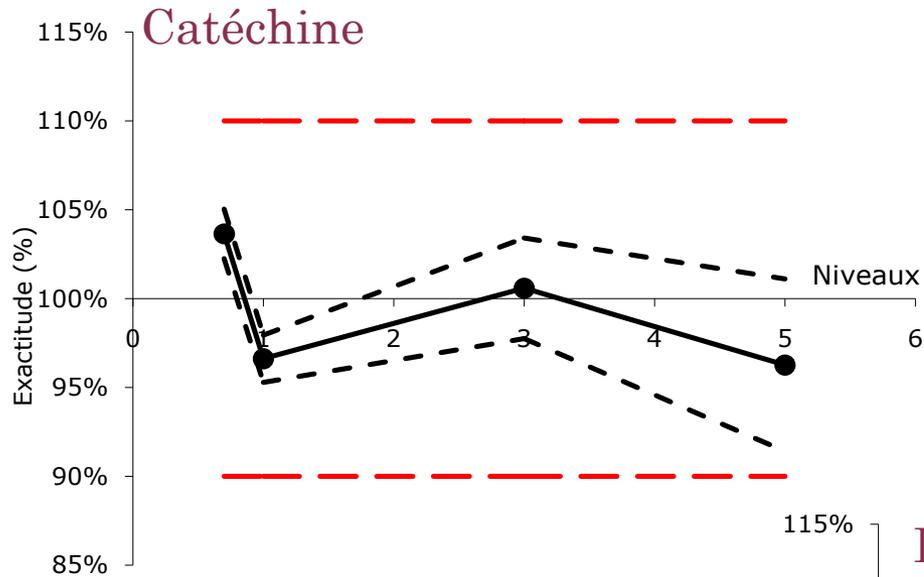
- Limite de détection 0,5 µg,
- limite de quantification 0,6 µg

Gamme 0,7 à 5µg

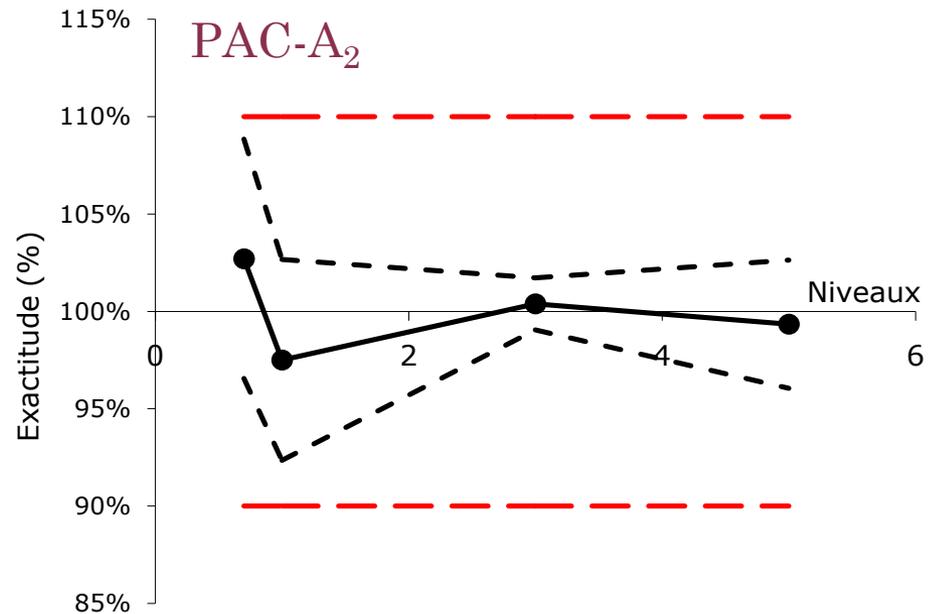
VALIDATION : PROFILS D'EXACTITUDE

- 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 %

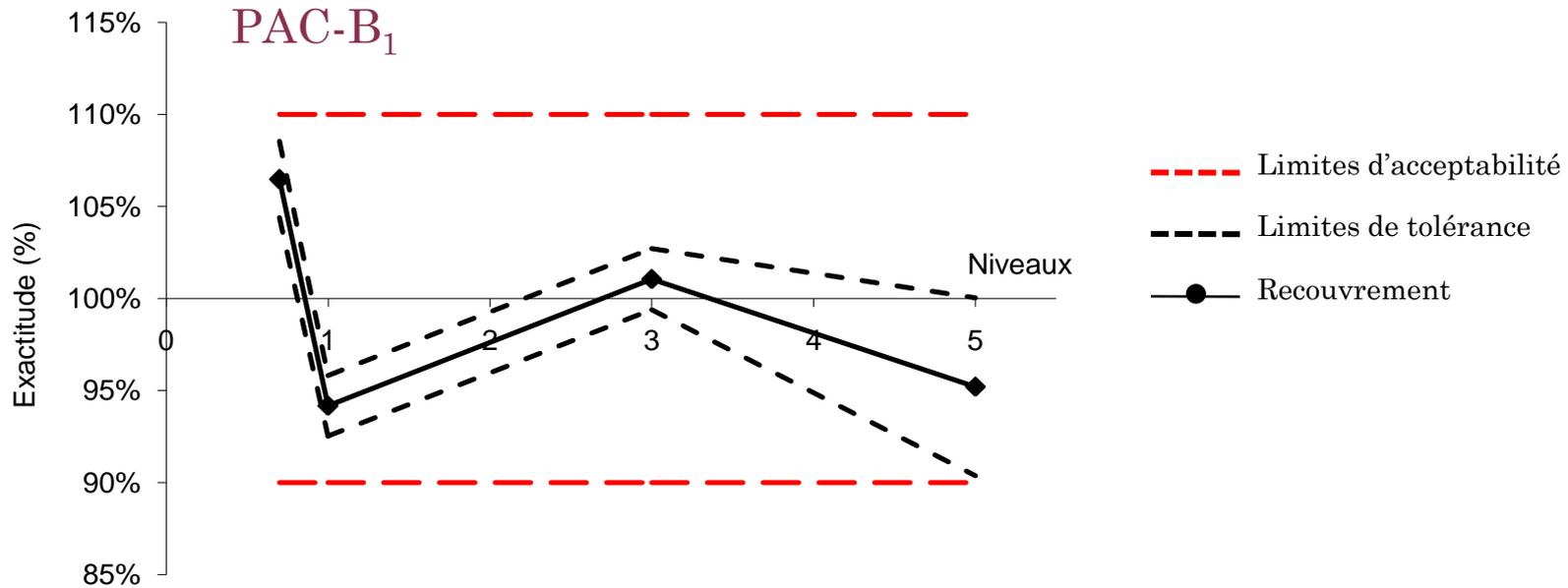
VALIDATION : PROFILS D'EXACTITUDE



- 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

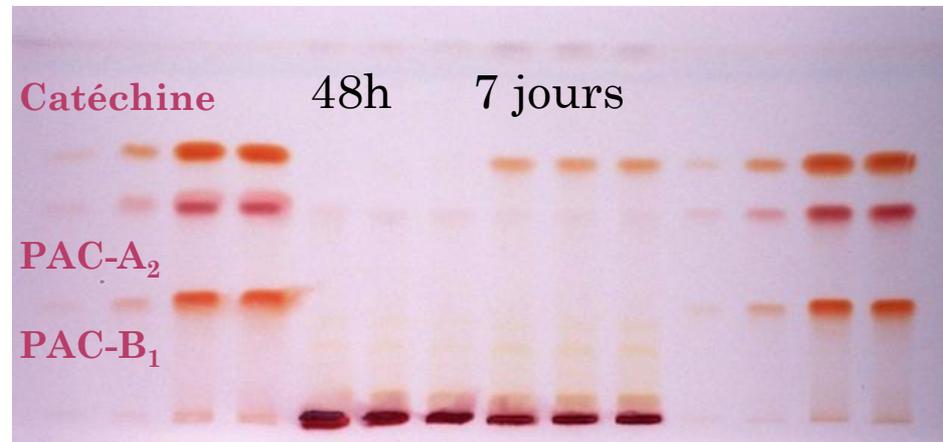
○ Analyse par HPTLC-densitométrie

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