



HAL
open science

Évaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels

Thi Kieu Tiên Do

► **To cite this version:**

Thi Kieu Tiên Do. Évaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels. Autre. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2016. Français. NNT : 2016AZUR4096 . tel-01469641

HAL Id: tel-01469641

<https://theses.hal.science/tel-01469641v1>

Submitted on 16 Feb 2017

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.

UNIVERSITE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

UFR SCIENCES

Ecole Doctorale Sciences Fondamentales et Appliquées

INSTITUT DE CHIMIE DE NICE

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur es Sciences

de L'UNIVERSITE Nice-Sophia Antipolis

Discipline : Chimie

présentée et soutenue par

Thi Kieu Tiên DO

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE
HAUTE PERFORMANCE (HPTLC) DANS L'ANALYSE (QUALITATIVE ET QUANTITATIVE) DES
METABOLITES SECONDAIRES DANS LES EXTRAITS NATURELS.

Soutenue publiquement le 15 Novembre 2016 dans la Salle du conseil de la Communauté
d'Agglomération Pays de Grasse, devant le jury composé de :

Pr. Evelyne Ollivier	Professeur Université Aix Marseille	Rapporteur
Dr. Anne-Sylvie Fabiano-Tixier	Maître de conférences, HDR Université Avignon et des pays du Vaucluse	Rapporteur
Pr. Isabelle Lefebvre- Tournier	Professeur Université Montpellier 2	Examineur
Dr. Thomas Michel	Maître de conférences Université Nice-Sophia Antipolis	Examineur
Dr. Francis Hadji- Minaglou	Docteur en pharmacie Directeur scientifique BotaniCert	Membre invité
Pr. Xavier Fernandez	Professeur Université Nice-Sophia Antipolis	Directeur de thèse
Dr. Sylvain Antoniotti	Chargé de Recherche CNRS, HDR Université Nice-Sophia Antipolis	Co-directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr. Evelyne OLLIVIER, de l'université Aix-Marseille et le Dr. Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER de l'université Avignon et des pays du Vaucluse qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également le Pr. Isabelle LEFEBVRE-TOURNIER de l'université Montpellier 2 et le Dr. Thomas MICHEL de l'Université Nice-Sophia Antipolis pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

Je remercie Francis HADJI-MINAGLOU, directeur scientifique de la société BotaniCert pour m'avoir permis de réaliser cette thèse depuis la création de la société. Par sa confiance, la transmission de sa passion, et son soutien permanent, il m'a permis de réaliser ces travaux dans des conditions extrêmement enrichissantes.

Je suis reconnaissante envers l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie pour l'obtention de la bourse CIFRE pour ce projet de thèse.

J'exprime toute ma gratitude et ma plus profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Xavier FERNANDEZ, pour m'avoir guidée et accordée sa confiance depuis toutes ces années. De par son soutien depuis mon arrivée à l'université, son goût pour la recherche et ses conseils, il m'a appris à être plus « bonne élève » et plus « autonome ». Ces années de présence, de conseils, et de travail m'ont permis de fonder un socle assez solide à mon épanouissement professionnel.

Je remercie également Sylvain ANTONIOTTI, mon co-directeur de thèse, pour ses conseils tout au long de cette thèse, qui m'ont permis d'avancer et de transformer de petits échecs en de grandes expériences. Il a su me pousser au-delà des limites que je m'étais fixées.

Je suis tout particulièrement reconnaissante envers Laurent LEGENDRE et Vincent LEBOT pour m'avoir intégrée au projet Végéculture/SYSTERRA (no ANR-10-STRA-007) financé par l'Agence Nationale pour la Recherche. Je les remercie de m'avoir offert la possibilité de me déplacer au Vanouatou et ainsi d'ajouter à cette thèse des études supplémentaires.

Je tiens sincèrement à remercier l'ensemble des personnes de la société BotaniCert qui ont participé de près ou de loin à cette thèse. Une pensée particulière pour Loïc LOFFREDO, sans qui je n'aurais pu me focaliser sur mes travaux. Merci à tous mes apprentis et stagiaires : Julien DIAZ alias le « petit fennec de l'amour », Mélissa FEUILLATRE et Laura AMATO, pour leur aide, leur compagnie et leur soutien.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'espace Jacques-Louis LIONS et la communauté d'agglomération du Pays de Grasse pour l'accueil et les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes. Mes remerciements vont particulièrement aux personnes avec qui j'ai pu partager des moments de détente et de convivialités, mais surtout toutes ces activités sportives qui m'ont permis de me ressourcer. Je remercie également toutes les sociétés présentes dans ce bâtiment que j'ai pu côtoyer pendant les déjeuners créateurs.

Je voudrais également remercier l'équipe de l'Institut de Chimie de Nice et plus particulièrement les doctorants aux côtés desquels j'ai pu évoluer : Oriane, Lise, Audrey, Emilie, Claire, Julien, Marie-Aude. Je n'oublie pas de remercier les permanents de l'ICN qui m'ont aidée pendant cette thèse. Un grand merci à Jérôme, Sébastien et Serge pour tous les agréables moments passés à vos côtés, que ce soit à l'ICN ou à l'extérieur. Votre trio a représenté, pendant ces 2 dernières années, un lieu de recueil, un havre de paix.

Cette thèse a été un énorme challenge personnel pendant lequel le doute a toujours été présent. C'est pourquoi, je peux dire aujourd'hui qu'il est le fruit du soutien et de la présence de ma famille et de mes amis, qui m'ont permis de ne jamais dévier de cet objectif final.

Un grand merci à mes parents pour m'avoir toujours laissé faire ce que je voulais. J'espère pouvoir vous rendre fiers de moi. Merci à mes frères et sœurs pour m'avoir supportée et encouragée pendant toutes ces loooooongues années d'études. Cette thèse est principalement pour vous...

*Ces remerciements ne peuvent s'achever sans une pensée pour mes fidèles amis. Que ce soit mes nouveaux amis ou de longues dates, proches ou de longues distances, vous êtes les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Merci à mes *mamans, pounes & mounes, Camou et Marie, Julie & Djé, Heidi, Pitou, Julia, Gaby & Seb, Carole & Fab, Stéphanie, Sylvie, Réminouille* et bien d'autres...*

*Je ne pouvais finir sans un paragraphe pour les personnes qui m'ont soutenu au quotidien. Merci *Alex, Claire, et Marion*.*

**Choupinou*, mon fidèle ami, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir toujours épaulée. *Fauve*, merci d'être toi-même. *Yon*, ta bonne humeur et ton éloignement vis-à-vis du milieu de la chimie m'ont fait énormément de bien.*

*Enfin, le dernier mais pas des moindres, merci à toi *Jean-Baptiste* d'être entré dans ma vie. Merci d'avoir supporté tous mes caprices et sautes d'humeur pendant ces dernières années, et surtout, merci d'accepter de les subir encore en Suisse.*

Le 25 Août 2016

Thi Kieu Thiên Do

Abréviations et symboles utilisés

ACP : Analyse en Composantes Principales, *Principal Components Analysis*

AED : *Atomic Emission Detector*, Détecteur à Emission Atomique

AFNOR : Association française de normalisation

Am : *Alocasia macrorrhiza*

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ANRT : Association Nationale de la Recherche et de la Technologie

ASE : *Accelerated Solvent Extraction*, extraction par solvant accéléré

BfArM : *Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte* (autorité sanitaire allemande)

BP : *British Pharmacopoeia*, Pharmacopée anglaise

BS : *British standard*

CC : Chromatographie sur Colonne ouverte, *open-column chromatography*

CCC : Chromatographie à Contre-Courant, *CounterCurrent Chromatography*

Ce : *Colocasia esculenta* (L.) Schott

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

CN : cyano

Co Q10 : Coenzyme Q10

CPC : Chromatographie de Partition Centrifuge, *Centrifugal Partition Chromatography*

CTRAV : Centre Technique de recherche Agronomique du Vanuatu

Da : *Dioscorea alata* L.

DAD : *Diode Array Detector*, Détecteur à Barrettes de Diodes

Db : *Dioscorea bulbifera* L.

Dc : *Dioscorea cayenensis-rotundata* (Poir.) J.Miège

Dd : *Dioscorea dumetorum* (Kunth) Pax

De : *Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill

DHK : Dihydrokavaine

DHM : Dihydrométhysticine

DMY : Déméthoxy-yangonine

Dn : *Dioscorea nummularia* Lam.

Dp : *Dioscorea pentaphylla* L.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

DSC : *Differential scanning calorimetry*, Calorimétrie différentielle à balayage

Dtra : *Dioscorea transversa* R.Br.

Dtri : *Dioscorea trifida* L. f.

ε° : force éluante

EFSA : *European Food Safety Authority*

ELDS : *Evaporative Light Scattering Detector*, Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière

FID : *Flame Ionization Detector*, Détecteur à Ionisation de Flamme

FK : Flavokavaine

FKA : Flavokavaine A

FKB : Flavokavaine B

FKC : Flavokavaine C

FT-IR : *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Infrarouge à Transformée de Fourier

GC : *Gas Chromatography*, chromatographie en phase gazeuse

GC-FID : *Gas chromatography Flame Ionization Detector*, Chromatographie en phase Gazeuse muni d'un Détecteur à Ionisation de Flamme

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*, Chromatographie en phase Liquide Haute Performance

HPTLC : *High Performance Thin Layer Chromatography*, Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance

Ib : *Ipomoea. batatas* (L.) Lam.

ID : Indonésie

IFRA : *International FRagrance Association*

IR : Infrarouge, *Infrared*

IRMS : *Isotope Ratio Mass Spectrometry*, Spectrométrie de Masse des Rapports Isotopiques

ISO : *International Standard Organization*

K : Kavaine

KL : Kavalactone

LC : *Liquid Chromatography*, Chromatographie liquide

LOD : *Limit Of Detection*, Limite de Detection

LOQ : *Limit Of Quantification*, Limite de Quantification

M : Méthysticine

MDGC : *MultiDimensional Gas Chromatography*, Chromatographie en phase Gazeuse Multidimensionnelle

Me : *Manihot esculenta* Crantz

MS : *Mass Spectrometry*, Spectrométrie de masse

MTT : chlorure de méthylthiazolytétrazolium

MY : Malaisie

NIR : *Near Infrared Reflectance*, Spectroscopie proche Infrarouge

NMR : *Nuclear Magnetic Resonance*, Résonance magnétique nucléaire

OPLC : *Overpressurized Liquid Chromatography*, Chromatographie Liquide sous Pression

P' : index de Polarité, *Polarity index*

PDE5-Is : inhibiteurs des phosphodiésterases cGMP-spécifique de type 5

Ph. Eur. : Pharmacopée Européenne, *European pharmacopoeia*

Ps : Point de Sélectivité, *Selectivity Point*

PS : *Photoacoustic spectroscopy*, Spectrométrie photoacoustique

PTLC : *Preparative Thin Layer Chromatography*, Chromatographie sur Couche Mince Préparative

R_F : Rapport Frontal

RH : *Relative Humidity*, Humidité Relative

Rs : Résolution

RSD : *Relative Standard Deviation*, Coefficient de variation

SFE : *Supercritical Fluid Extraction*, Extraction par fluide supercritique

SMa : Samoa

SNIF : *Site-specific Natural Isotopic Fractionation*, Fractionnement isotopique naturel spécifique,

SPE : *Solid Phase Extraction*, Extraction sur Phase Solide

SPME : *Solid Phase Micro-Extraction*, Micro-Extraction sur Phase Solide

TH : Thaïlande

TLC : *Thin Layer Chromatography*, Chromatographie sur Couche Mince

ToFMS : *Time of Flight Mass Spectrometer*, Spectromètre de Masse à Temps de Vol

US\$: Dollar américain

USP : *United State Pharmacopoeia*, Pharmacopée américaine

UV : Ultra-Violet

VN : Vietnam

VU : Vanouatou

Xs : *Xanthosoma. sagittifolium* Schott

Y : Yangonine

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1. LE FONCTIONNEMENT DE L'(HP)TLC	3
1.1. LES PRINCIPES CHROMATOGRAPHIQUE MIS EN JEU.....	3
1.1.1. <i>Les adsorbants les plus utilisés</i>	4
1.1.2. <i>Les mécanismes de séparation</i>	5
1.1.2.1. La chromatographie d'adsorption	6
1.1.2.2. La chromatographie de partage.....	7
1.1.2.3. La chromatographie d'échange d'ion.....	7
1.1.3. <i>Paramètres de séparation et de rétention</i>	8
1.2. LES ÉTAPES D'UNE ANALYSE PAR HPTLC ET L'INSTRUMENTATION.....	9
1.2.1. <i>Les préparations d'échantillon</i>	9
1.2.2. <i>Le dépôt</i>	10
1.2.3. <i>Le développement chromatographique</i>	11
1.2.3.1. Les cuves	12
1.2.3.2. Les modes de développement.....	14
1.2.3.3. Les particularités du développement chromatographique	17
1.2.4. <i>La détection</i>	17
1.2.4.1. La détection sans traitement chimique	17
1.2.4.2. La détection par traitement ou dérivation.....	17
1.2.5. <i>La documentation</i>	19
1.2.5.1. L'imagerie.....	19
1.2.5.2. La densitométrie	19
1.3. AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE L'HPTLC.....	21
1.4. CONCLUSION	22
2. L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ET LES DOMAINES D'APPLICATION DE L'(HP)TLC.....	24
2.1. L'(HP)TLC COMME OUTIL D'ISOLEMENT/PURIFICATION.....	24
2.2. L'(HP)TLC EN ANALYSE QUANTITATIVE	25
2.3. L'(HP)TLC EN ANALYSE QUALITATIVE	27
2.3.1. <i>Outil d'identification phytochimique</i>	27
2.3.2. <i>Outil d'identification d'activité</i>	30
2.3.3. <i>Outil de contrôle et de détection d'adultération</i>	31
2.3.3.1. Le contrôle des plantes et extraits de plante par (HP)TLC	31
2.3.3.2. Les détections d'adultération par (HP)TLC.....	32
2.3.3.3. La place de l'(HP)TLC dans la réglementation	34
2.4. CONCLUSION	37
Essential oil authenticity: a challenge for the analytical chemist.	38
3. LE DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES EN (HP)TLC	62
3.1. LA SÉLECTION DES PARAMÈTRES DE BASE	62
3.2. LA SÉLECTION DE LA PHASE MOBILE.	62
3.2.1. <i>Les caractéristiques des solvants</i>	62
3.2.2. <i>La sélection des solvants</i>	64
3.3. L'OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE	65
3.3.1. <i>Le « Prisma Model »</i>	65
3.3.2. <i>Les autres modèles théoriques</i>	67
3.3.3. <i>La méthode CAMAG (Reich)</i>	68
3.4. LA SÉLECTION DES PARAMÈTRES FINAUX.....	69
4. CONCLUSION.....	70

CHAPITRE 2 : L'HPTLC ET L'ÉTAPE DE LA PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON	71
1. INTRODUCTION	71
2. GÉNÉRALITÉS SUR L'ÉTAPE D'EXTRACTION	72
2.1. EXTRACTION D'UN ÉCHANTILLON LIQUIDE	72
2.1.1. <i>Extraction liquide-liquide</i>	72
2.1.1.1. Principes	72
2.1.1.2. Méthodologies	73
2.1.2. <i>Extraction sur phase solide</i>	74
2.1.2.1. La chromatographie sur colonne ouverte	75
2.1.2.2. Solid phase extraction (SPE)	76
2.2. EXTRACTION D'UN ÉCHANTILLON SOLIDE	76
2.2.1. <i>Extraction solide-liquide</i>	76
2.2.2. <i>Extraction assistée par ultrasons</i>	77
2.3. CONTEXTE DE L'ÉTUDE	78
2.3.1. <i>Sélection des techniques d'extraction de l'étude</i>	79
2.3.2. <i>Résultats</i>	80
2.3.3. <i>Discussion</i>	83
2.3.4. <i>Conclusion</i>	84
3. L'ISOLEMENT DE MÉTABOLITES D'INTÉRÊT	86
3.1. INTRODUCTION	86
3.2. LES TECHNIQUES SEMI-PRÉPARATIVES	87
3.3. CONTEXTE DE L'ÉTUDE	87
3.4. RÉSULTATS	88
4. CONCLUSION	90
Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography)	91
CHAPITRE 3 : L' HPTLC ET L'ANALYSE QUANTITATIVE DES EXTRAITS NATURELS	94
1. INTRODUCTION	97
2. LES PARTICULARITÉS DE L'ANALYSE QUANTITATIVE PAR HPTLC	98
2.1. QUANTIFICATION PAR ESTIMATION	98
2.2. QUANTIFICATION PAR VIDÉO-DENSITOMÉTRIE	98
2.3. QUANTIFICATION PAR DENSITOMÉTRIE	99
3. CONTEXTE DE L'ÉTUDE	100
3.1. GÉNÉRALITÉS SUR LA PLANTE	100
3.2. GÉNÉRALITÉS SUR LES SAPONINES	100
3.3. L'ANALYSE QUANTITATIVE DES SAPONINES	101
4. RÉSULTATS & DISCUSSION	102
5. CONCLUSION	103
Selection of crude <i>Solidago virgaurea</i> L. ssp extracts based on two fast and efficient chromatographic methods for quantification of total saponins	104
CHAPITRE 4 : ETUDES COMPLÉMENTAIRES	114
1. INTRODUCTION	114
2. FAISABILITÉ DE L'ARRÊTÉ PLANTE EN FRANCE : CAS DE L'IGNAME	115
2.1. INTRODUCTION	115
2.2. GÉNÉRALITÉS SUR LES PLANTES À TUBERCULES	115
2.3. ETUDES PRÉLIMINAIRES	117

2.3.1.	<i>Echantillons de l'étude préliminaire</i>	117
2.3.2.	<i>Préparation d'échantillons</i>	118
2.3.3.	<i>Développement de la méthode HPTLC</i>	119
2.3.4.	<i>Conclusion sur les premiers tests</i>	123
2.4.	RECHERCHE DE MATIÈRES PREMIÈRE AUTHENTIFIÉES	124
3.	LES PLANTES DU VANOUATOU	124
3.1.	INTRODUCTION ET CONTEXTE DES ÉTUDES	124
3.2.	PLANTES À TUBERCULES DU VANOUATOU	125
3.2.1.	<i>Généralités sur les plantes à tubercules du Vanouatou</i>	125
3.2.2.	<i>Récolte, préparation et extraction des tubercules</i>	126
3.2.2.1.	<i>Récolte des échantillons</i>	126
3.2.2.2.	<i>Préparation et extraction des échantillons</i>	127
3.2.3.	<i>Extraction des tubercules avant analyse</i>	128
3.2.4.	<i>Développement de méthodes de discrimination par HPTLC</i>	129
3.2.5.	<i>Fractionnement des échantillons contenant les zones d'intérêts</i>	135
3.2.5.1.	<i>Fractionnement de Db 6</i>	135
3.2.5.2.	<i>Fractionnement de Ce-MY 1</i>	136
3.2.6.	<i>Conclusion et perspective</i>	137
3.3.	CONTRÔLE DES QUALITÉS DES EXTRAITS DE KAVA	138
3.3.1.	<i>Généralités sur le kava</i>	138
3.3.2.	<i>Composition chimique</i>	139
3.3.3.	<i>Problématique réglementaire</i>	141
3.3.4.	<i>Développement d'une méthode de contrôle de la qualité des extraits de kava</i>	142
3.3.5.	<i>Conclusion</i>	143
	Detection of flavokavins (A, B, C) in cultivars of kava (<i>Piper methysticum</i>) using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)	144
4.	CONCLUSION	155
	CONCLUSION GÉNÉRALE	156
	CHAPITRE 5 : PARTIE EXPÉRIMENTALE	158
1.	ECHANTILLON ET PRODUITS CHIMIQUE	158
1.1.	ECHANTILLONS	158
1.1.1.	<i>Echantillons utilisé dans les études liées à la préparation d'échantillon</i>	158
1.1.2.	<i>Echantillons utilisé pour l'analyse quantitative</i>	158
1.1.3.	<i>Echantillons utilisé dans les études complémentaires</i>	159
1.2.	RÉACTIFS ET SOLVANTS	162
2.	APPAREILLAGES	163
2.1.1.	<i>HPTLC</i>	163
2.1.2.	<i>HPLC-UV-ELSD</i>	164
2.1.3.	<i>GC-MS et GC-FID</i>	164
2.1.4.	<i>CPC</i>	164
2.1.5.	<i>Chromatographie Flash</i>	164
3.	CONDITIONS OPÉRATOIRES	165
3.1.	PRÉPARATIONS D'ÉCHANTILLON	165
3.1.1.	<i>Préparation de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> L. et des extraits secs de <i>Fallopia multiflora</i> (Thunb.) Haraldson et de romarin</i>	165
3.1.2.	<i>Préparation des produits cosmétique</i>	165
3.1.3.	<i>Préparation des échantillons de solidage</i>	166
3.1.4.	<i>Préparation des plantes à tubercule</i>	166
3.1.5.	<i>Préparation des racines de kava</i>	166
3.2.	FRACTIONNEMENT	166

3.3.	ISOLEMENT DE LA CARVONE, DU RESVÉRATROL ET DE L'ACIDE ROSMARINIQUE	166
3.4.	TECHNIQUE DE DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPLC-ELSD	167
3.5.	TECHNIQUE DE DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPTLC.....	168
4.	ETUDE STATISTIQUE.....	168
4.1.	RETRAITEMENT LORS DU DOSAGE DES SAPONINES TOTALES.....	168
4.2.	RETRAITEMENT LORS DE L'ÉTUDE DES RACINES DE KAVAS.....	169
RÉFÉRENCES	170

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

« *La chimie analytique est la branche de la chimie qui a pour but l'identification, la caractérisation et la quantification des substances chimiques ainsi que le développement des méthodes nécessaires à cette analyse* » [1]. Liée à la perpétuelle amélioration des technologies, l'analyse chimique fait preuve d'innovation par la création d'instruments de plus en plus performants et par l'introduction de méthodes couplées qui apportent de nouvelles possibilités. Il existe, de nos jours, une multitude d'instruments, de détecteurs et de couplages. Parmi toutes les méthodes et techniques existantes, certaines seront choisies pour leur sensibilité, leur sélectivité, ou leur reproductibilité. D'autres seront préférées pour leur facilité d'utilisation, leur coût, ou encore leur rapidité. Toutes ces possibilités amènent l'analyste à devoir connaître les concepts de base de chacune de ces méthodes d'analyse (chromatographique, spectroscopique...) et des techniques disponibles et leur domaine d'application, pour ensuite choisir la plus adaptée.

C'est dans l'optique de déterminer les apports de l'HPTLC dans l'analyse de matrices naturelles que cette thèse, issue d'une collaboration entre la société BotaniCert et l'Institut de Chimie de Nice (UMR CNRS-UNS 7272) a été développée : « *Evaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels* ».

La chromatographie sur couche mince est une technique de chromatographie planaire connue depuis 1938. A la fin des années 1970, elle connaît une nette progression avec l'amélioration de la qualité des gels de silice et des plaques prêtes à l'emploi, et avec l'apparition des plaques de chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC). L'appareillage actuel en fait une technique robuste, rapide, sensible et automatisée, qui peut être couplée à différents détecteurs. C'est ainsi que l'HPTLC s'impose peu à peu dans les monographies réglementaires et en particulier pour l'analyse d'extraits naturels, matrices souvent très complexes.

L'objectif de cette thèse a été de déterminer de manière critique l'apport de cette technique dans l'analyse des extraits naturels, mais aussi par rapport aux techniques usuelles.

Ce manuscrit s'articule en cinq chapitres. Le premier est composé d'une étude bibliographique sur la technique et son utilisation dans différents domaines d'application. Le deuxième chapitre examine l'apport de l'HPTLC lors de l'étape de préparation d'échantillon. Le premier aspect de ce chapitre concerne le domaine des cosmétiques et l'analyse d'ingrédient actif, avec une étude ayant pour but de comparer les préparations d'échantillon utilisées avant les analyses par HPTLC et par HPLC. Le deuxième aspect concerne

l'isolement de composés d'intérêt. Les avantages et inconvénients de l'HPTLC semi-préparative sont comparés à l'HPLC semi-préparative. Le troisième chapitre présente une comparaison entre deux méthodes de quantification développées en HPLC et HPTLC pour le contrôle rapide de la teneur en actifs (saponines) d'extraits de *Solidago virgaurea* L. Le quatrième chapitre résume deux études réalisées sur des végétaux à destination alimentaire. La première partie présente une méthode HPTLC sur les plantes à tubercules, afin de vérifier la faisabilité de l'arrêté français du 24 juillet 2014 sur les plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires, et plus particulièrement pour la discrimination des différentes plantes à tubercules : les espèces *D. oppositifolia* et *D. villosa* du genre *Dioscorea*. La deuxième partie concerne le développement d'une méthode HPTLC pour le contrôle de la qualité des extraits de kava (*Piper methysticum* G.Forst.) liée à un problème de toxicité. Ces travaux ont été notamment menés au sein d'une équipe du CIRAD lors d'un déplacement au Vanouatou. Enfin le dernier chapitre présente les conditions expérimentales.

CHAPITRE 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Parmi les diverses méthodes d'analyse chimique existantes, la chromatographie occupe une place importante. Elle se présente sous différentes techniques comme la chromatographie liquide, la chromatographie gazeuse, ou encore la chromatographie sur couche mince (TLC). La TLC repose sur différents principes dépendant de la phase stationnaire et de la phase mobile utilisée, mais aussi des paramètres tels que le mode de développement ou le choix de la détection. Tous ces paramètres en font une technique intéressante à évaluer dans le domaine des extraits naturels et qui en font le sujet de cette thèse.

1. LE FONCTIONNEMENT DE L'(HP)TLC

L'apparition de la chromatographie sur couche mince remonte à 1938 [2]. A la fin des années 1940, l'incorporation d'un indicateur de fluorescence dans les phases de silice, ont fait du gel de silice l'adsorbant le plus utilisé [3]. C'est au début des années 1960, avec la publication du premier *Handbook* de E. Stahl [4], que la TLC devient une méthode d'analyse reconnue et recommandée par les ouvrages réglementaires tels que les pharmacopées. A partir de la fin des années 1970 apparait la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC), née notamment de l'amélioration des phases stationnaires et de l'automatisation des étapes de dépôt. Il s'en suivra la commercialisation de plaques prêtes à l'emploi [2]. L'évolution des technologies permet à l'HPTLC d'accéder à l'analyse quantitative avec la création d'instruments automatisés favorisant la répétabilité, la reproductibilité et la robustesse de la technique [5]. Depuis les années 2000, l'arrivée des couplages avec divers instruments d'analyse a entraîné la publication de nombreux articles sur ce sujet [2], comme par exemple l'utilisation du couplage avec la spectrométrie Raman soit à transformée de Fourier (NIR FT-Raman) [6], soit exaltée par effet de surface [7, 8]. Le couplage avec la spectrométrie de masse est lui utilisé avec différentes sources d'ionisation que ce soit par désorption directe [9], ou bien par extraction directe du composé de la plaque [10]. L'utilisation de la désorption est aussi utilisée pour l'analyse élémentaire à l'aide d'un spectromètre de masse couplé à un plasma induit par haute fréquence [11].

Afin de comprendre le fonctionnement de l'(HP)TLC, certains paramètres tels que les principes chromatographiques et les étapes d'une analyse, nécessitent d'être définis.

1.1. Les principes chromatographique mis en jeu

Les principes théoriques mis en jeu par l'(HP)TLC sont les principes de bases de la chromatographie, à savoir la séparation des composés en fonction de leur interaction avec deux phases non-miscibles (phase stationnaire et phase mobile) [2]. Dans cette partie, seuls les principaux paramètres utiles à la compréhension de l'(HP)TLC seront détaillés : les mécanismes de rétention, les paramètres de séparation et de rétention, et enfin les étapes et les particularités de la technique.

1.1.1. Les adsorbants les plus utilisés

Il existe plusieurs types d'adsorbants :

- L'oxyde d'aluminium
- La cellulose
- Le gel de silice
- Le gel de silice modifié
- ...

L'oxyde d'aluminium est un adsorbant polaire tout comme le gel de silice. Il est principalement utilisé pour la séparation des composés aromatiques. En effet, les centres Al (III) agissent comme des acides de Lewis pour les composés contenant des systèmes d'électrons π et pour les groupes nucléophiles ou basiques. De plus la présence de nombreux atomes d'oxygène à tendance basique rend possible l'interaction avec les groupes acides. Il en est de même pour les groupes AlOH qui peuvent agir comme de faibles donneurs de protons.

La phase cellulose possède, elle, une structure polymérique constituée d'unités glucopyranoses reliées entre elles par des ponts oxygène. En raison d'une profusion de groupes hydroxyles, la phase cellulose est une phase idéale pour la séparation de substances hydrophiles tels que les acides aminés, les hydrates de carbone, les ions inorganiques et les dérivés d'acides nucléiques [12].

Le gel de silice est de loin l'adsorbant le plus utilisé en TLC. L'origine synthétique du gel de silice permet un contrôle de la taille des pores, du volume poreux et de la taille des particules, commercialisé sous forme de 3 différents types de plaques : TLC, HPTLC et les plaques préparatives (PTLC) (Figure 1) [13].

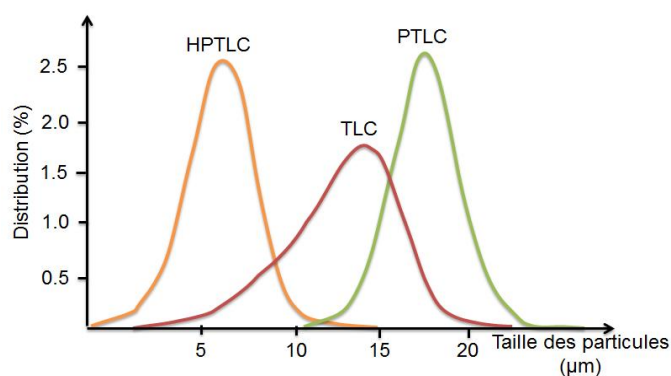


Figure 1: taille et distribution de la silice en fonction du type de plaque.

Les plaques de gel de silice sont extrêmement polyvalentes et sont utilisées pour la séparation de nombreux composés. Le gel de silice est composé d'un réseau de groupements silanols et siloxanes (Figure 2).

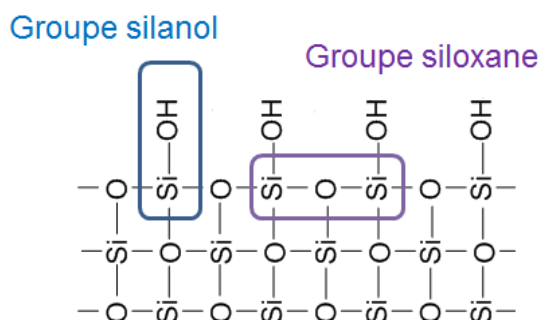


Figure 2: représentation du gel de silice [14].

En réalité, les plaques commerciales de silice ne sont pas entièrement hydroxylées. Elles se composent d'un réseau de groupes de silanols libres, de silanols géminaux, de silanols associés, et de groupes siloxanes. Une plaque classique contient environ 68 % de groupements silanols libres, et 32 % de silanols associés (Figure 3) [14].

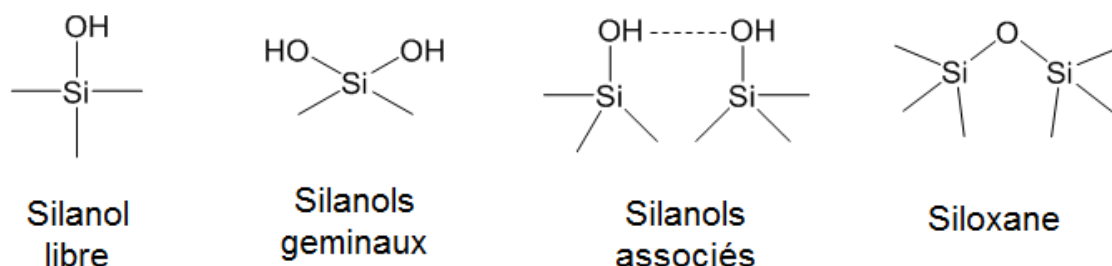


Figure 3 : représentation des groupements présents sur le gel de silice [14].

Le gel de silice est également la base pour la production de phases greffées. Les phases inverses (RP) ont l'avantage d'être utilisables avec des solvants aqueux, jusqu'à 100 % d'eau dans certains cas (par exemple RP18W). Les phases inverses sont largement utilisées dans diverses applications telles que l'identification de triglycérides. Les gels de silice modifiés *cyano* et *diol* sont très similaires en termes de polarité et sont adaptables à la fois en phase normale et inverse. Les phases aminées possèdent une bonne sélectivité pour les composés chargés.

1.1.2. Les mécanismes de séparation

La chromatographie planaire peut faire intervenir différents mécanismes de rétention [15] :

- La chromatographie de partage
- La chromatographie d'adsorption
- La chromatographie d'échangeuse d'ions
- ...

Parmi ces mécanismes de rétention, la chromatographie d'adsorption et la chromatographie de partage sont ceux principalement utilisés, alors que les autres principes de rétention interviennent dans des cas spécifiques liés aux adsorbants utilisés.

1.1.2.1. La chromatographie d'adsorption

L'adsorption est un phénomène de surface. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile qui leur sont propres. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser ce qui permet leur séparation. Les séparations sont basées sur le principe de polarité, c'est-à-dire l'existence d'un dipôle dans une structure moléculaire.

Dans le cas du gel de silice, les groupes silanols sont faiblement dipolaires et se comportent comme des acides faibles. Ils sont, de plus, fortement sujets à des liaisons hydrogène ce qui permet au gel de silice de former des interactions avec les molécules d'eau (Figure 4) [16].

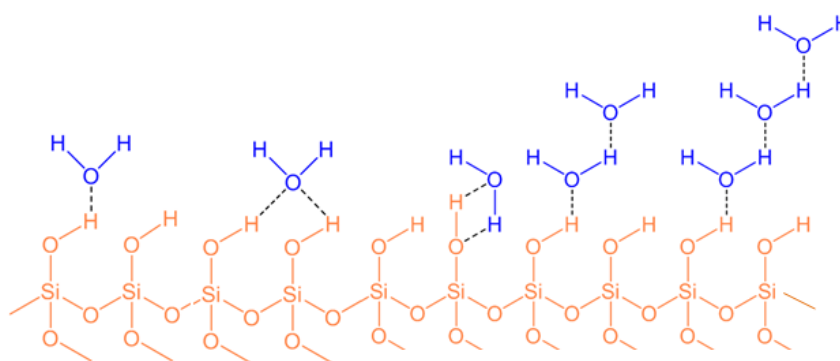


Figure 4 : représentation des interactions du gel de silice avec les molécules d'eau.

Ces interactions ont une grande influence sur la séparation des composés et d'autant plus lorsque la phase mobile contient une solution aqueuse, comme par exemple lors de la détection des flavonoïdes avec un mélange acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique et eau (100:11:11:27) (v/ v/ v/ v). En effet, dans ce cas une couche mince d'eau est formée à la surface du gel de silice et de ce fait la séparation par adsorption se transforme en chromatographie de partage (*c.f.* 1.1.2.2).

Dans le cas des gels de silice modifiés, les groupes de substitution permettent de former des interactions spécifiques. Par exemple, les groupements *cyano* (CN) peuvent former des interactions dipôle-dipôle, ou de transfert de charges (π - π) (Figure 5) [16].

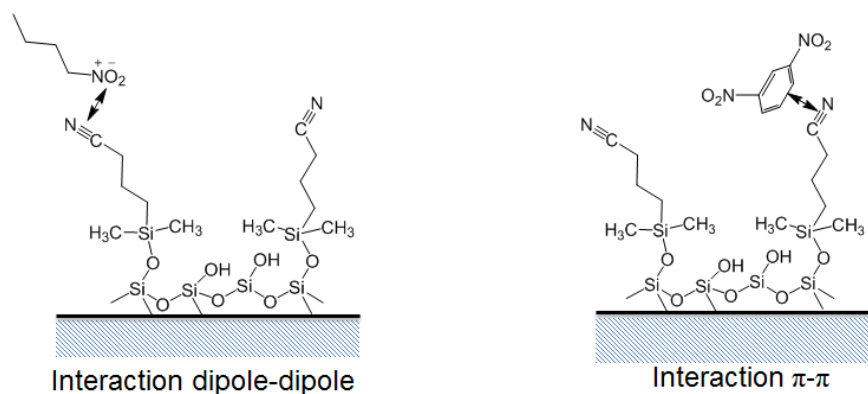


Figure 5 : exemples d'interactions avec la phase cyano.

1.1.2.2. La chromatographie de partage

La chromatographie de partage est basée sur la différence de solubilité des analytes entre deux phases liquides non miscibles. Les mécanismes de rétention sont soumis au caractère lipophile des composés (Figure 6) [2, 15, 17].

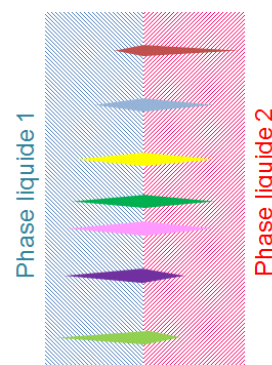


Figure 6 : schéma de la chromatographie de partage.

En phase inverse, la séparation est basée sur le caractère hydrophobe entre les molécules à séparer et la phase stationnaire (Figure 7). Ainsi, plus l'analyte est apolaire, plus il sera retenu au niveau de la phase stationnaire. A l'inverse, plus l'analyte est polaire, plus il sera entraîné par la phase mobile. Le caractère hydrophobe s'accroît avec la longueur des chaînes alkyles (de RP-2 à RP-18) et aussi par le degré de modification du gel de silice [12].

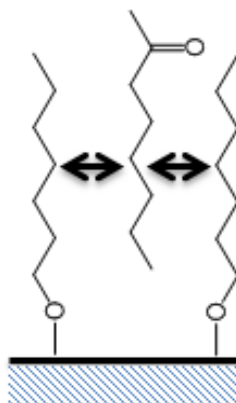


Figure 7: exemple d'interaction hydrophobe en phase inverse.

1.1.2.3. La chromatographie d'échange d'ion

La chromatographie d'échange d'ions est un procédé permettant la séparation des solutés ionisables ou ionisés. En TLC, la chromatographie échangeuse d'ions est, par exemple, utilisée dans le cas des phases de silice modifiée par des groupements amino (NH_2). Cet adsorbant est légèrement basique et est donc préféré pour la séparation des acides. Suivant le pH de la phase mobile, le groupement amine peut être neutre ou protoné et former ainsi un groupement ammonium chargé positivement $-\text{NH}_3^+$. Dans sa forme protonée, la phase se comportera comme un échangeur d'anion faible (Figure 8) [18].

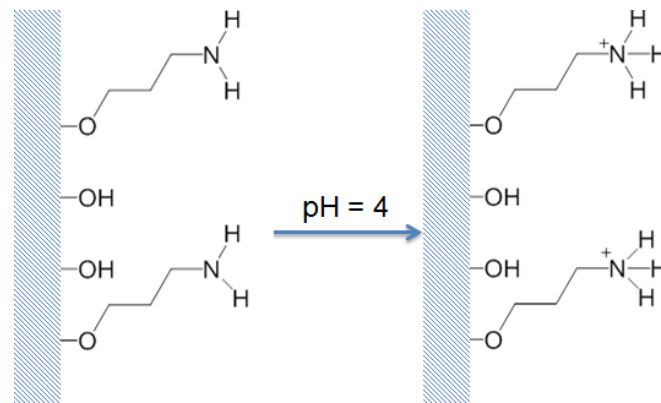


Figure 8: représentation de la silice greffée amino en échangeur d'anions faible.

1.1.3. Paramètres de séparation et de rétention

Chaque composé est défini par son rapport frontal (R_F) qui caractérise son facteur de rétention dans des conditions données (type de plaque, éluant, etc ...) (Figure 9) [15, 17, 19].

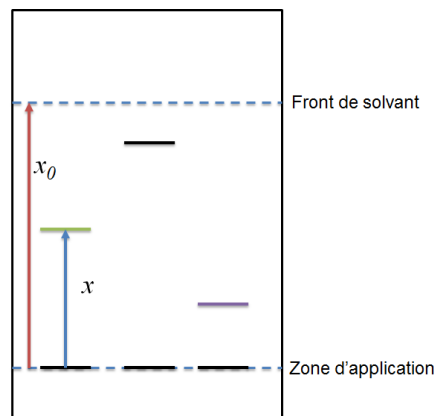


Figure 9: schéma d'une plaque développée.

Le R_F correspond au ratio de la distance parcourue par le soluté (x) par la distance parcourue par le front de solvant (x_0) (Équation 1) :

$$R_F = \frac{x}{x_0}$$

Équation 1: rapport frontal.

Le résultat chromatographique peut par la suite être traité comme une image ou comme un pseudo-chromatogramme (c.f. 1.2.5.2) contenant des pics dont les surfaces peuvent être mesurées. La résolution (R_s) représente la séparation entre 2 pics. Elle est calculée par le ratio de la différence entre les distances de migrations des deux composés (x_1 et x_2) par la moyenne arithmétique de la largeur des pics à la base (w_1 et w_2) (Figure 10, Équation 2) :

$$R_s = \frac{X_2 - X_1}{\frac{1}{2}(W_2 + W_1)}$$

Équation 2: résolution entre deux composés.

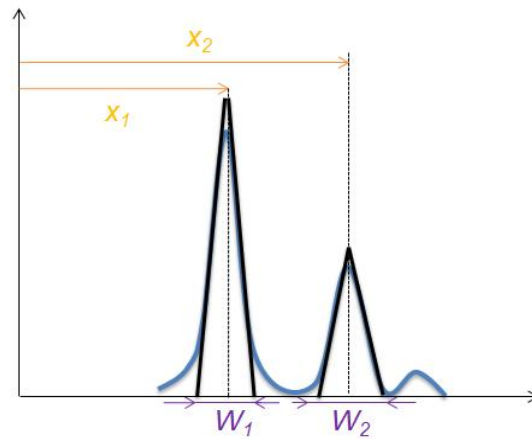


Figure 10 : caractéristiques d'un pic chromatographique.

1.2. Les étapes d'une analyse par HPTLC et l'instrumentation

L'HPTLC est une technique séquentielle qui ne peut pas s'automatiser à 100 %. Elle implique plusieurs étapes (Figure 11). Les étapes clés sont la préparation de l'échantillon, l'application, le développement chromatographique et l'interprétation des résultats (identification/quantification). Des étapes optionnelles sont possibles : le choix et le nettoyage de la phase stationnaire, le pré-conditionnement et la révélation pré/post chromatographique, et la documentation [13].

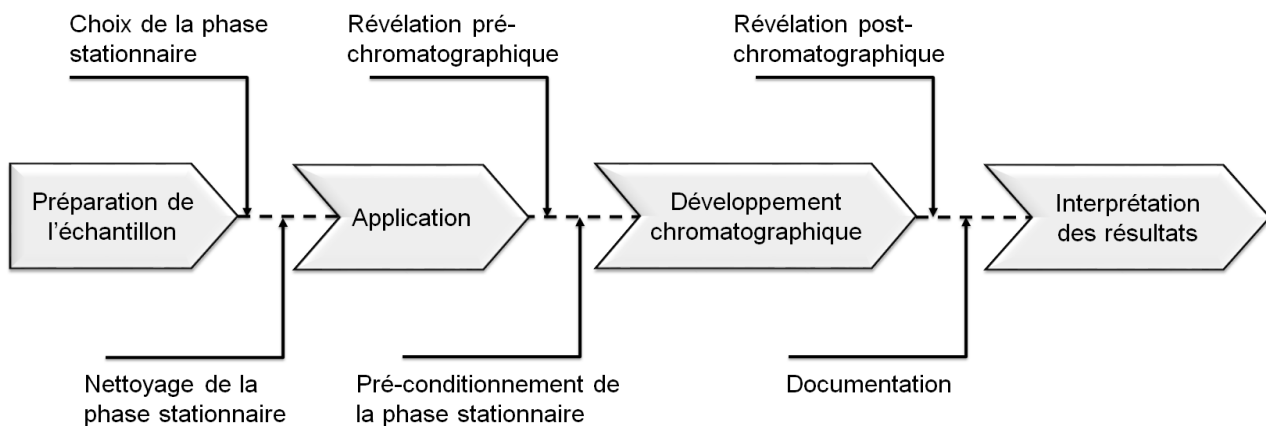


Figure 11 : étapes d'une analyse (HP)TLC.

1.2.1. Les préparations d'échantillon

L'échantillon collecté et considéré comme représentatif de l'objet de l'étude, est conservé de manière à en conserver les caractéristiques physiques et chimiques avant l'analyse. La plupart des échantillons ne sont pas directement applicables sur la plaque (HP)TLC et nécessitent donc une étape de préparation. Malgré tout, un des avantages de l'HPTLC est la robustesse de la phase stationnaire qui permet d'y appliquer des échantillons n'ayant subi que des préparations non chronophages comme par exemple : dilution, solubilisation, filtration, centrifugation ...

Dans certains cas, suivant la nature de l'échantillon et l'objectif de l'analyse, un traitement préliminaire est utile afin de séparer la matrice de l'analyte lorsque sa présence risque d'interférer avec la détection. Cette étape peut être réalisée de différentes manières suivant la nature liquide ou solide de l'échantillon. De plus, une étape de concentration est nécessaire lorsque l'analyte recherché est dilué, notamment lorsqu'un large volume de solvant est utilisé pour l'extraction. Suivant la quantité d'échantillon et le type de composés désirés, la technique de concentration sera choisie : évaporateur rotatif, concentrateur de type Kuderna-Danish (concentrateur permettant une évaporation du solvant sans conduire à la perte de la majeure partie des composés volatils), évaporation sous flux d'azote... Les techniques d'extraction et d'isolement communément employées lors de la préparation d'échantillon sont détaillées dans le chapitre suivant : L'HPTLC et l'étape de la préparation d'échantillon [20].

Dans tous les cas la procédure idéale doit être rapide, simple, répétable et reproductible, et sans conduire à la perte d'analyte(s). Le solvant choisi ne doit pas contenir ou former d'artefact, avoir une faible toxicité, être économique et facilement évaporable.

1.2.2. Le dépôt

L'application est une étape déterminante pour la qualité du résultat chromatographique et nécessite donc de la rigueur et des conditions opératoires bien définies. Elle peut se faire manuellement ou automatiquement [21].

Lors d'une application manuelle, il est recommandé d'utiliser une micro-seringue, ou un capillaire de 1-2 μL qui donnera un dépôt de 3-4 mm (Figure 12, A). Pour un meilleur résultat, il est important de ne pas endommager la phase stationnaire, si possible en évitant tout contact. Pour éviter toute dégradation, l'application peut être automatisée ou semi-automatisée : le remplissage de la micro-seringue s'effectue manuellement (Figure 12, B) ou automatiquement (Figure 12, C), puis est suivi par une application automatisée réalisée par vaporisation ou par contact (Figure 13) [22].

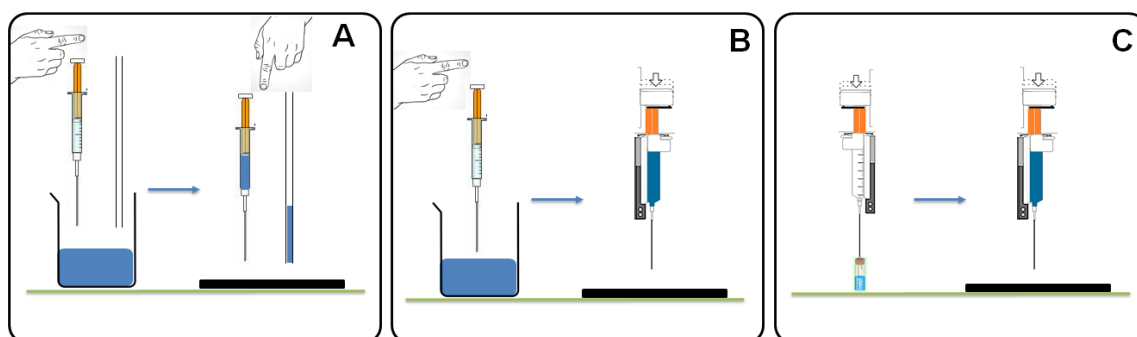


Figure 12 : schémas des différents modes d'application. A : remplissage de la seringue/capillaire et application manuels ; B : remplissage manuel et application automatisée ; C : remplissage de la seringue et application automatisés.

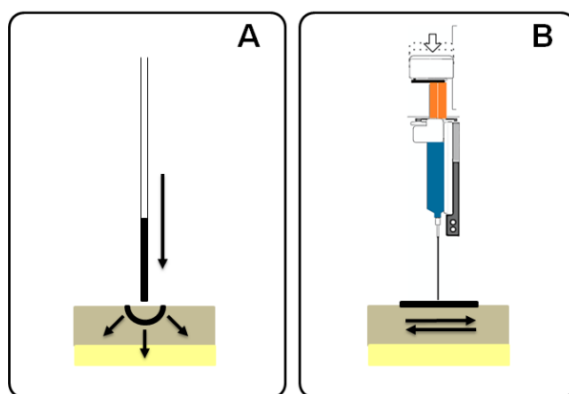


Figure 13 : schéma d'une application par contact (A) ou par vaporisation (B).

Lors de cette étape, trois paramètres sont déterminants : le volume d'application, l'état de la phase stationnaire et la zone d'application [23] :

- le volume d'application doit être optimisé pour éviter un phénomène de saturation pouvant altérer le profil chromatographique
- la phase stationnaire ne doit pas être endommagée, ce qui induit l'utilisation préférentielle d'une application par vaporisation plutôt que par contact
- l'échantillon doit être appliqué de façon à ce que la zone soit la plus fine possible afin d'éviter le phénomène de diffusion directement à la zone d'application.

Pour une analyse qualitative, aucune séquence d'application n'est recommandée, mais pour l'analyse quantitative, il est recommandé d'appliquer deux fois toutes les solutions séparées par la moitié de la longueur de la plaque (Figure 14) [24].

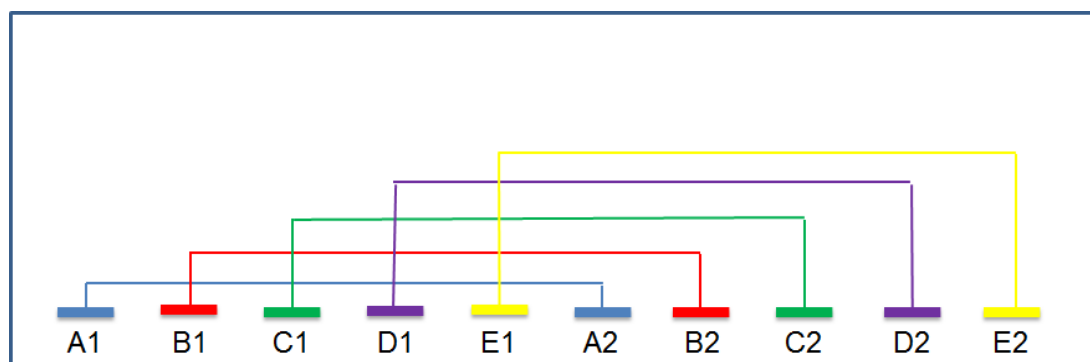


Figure 14 : exemple d'application.

1.2.3. Le développement chromatographique

Cette étape consiste en la progression d'un solvant ou mélange de solvants (phase mobile) le long de la phase stationnaire. La migration du solvant entraîne la migration des substances appliquées [13]. Il existe une multitude de cuves conçues pour contrôler les paramètres influençant le développement chromatographique.

1.2.3.1. Les cuves

Les cuves à fond plat (Figure 15) sont les chambres les plus simples. Elles sont utilisées avec ou sans saturation. Une fois la phase mobile versée au fond de la cuve, celle-ci est recouverte. Dès lors, la phase gazeuse se sature progressivement avec les vapeurs de la phase mobile. Au bout de quelques minutes, la partie inférieure de la cuve est complètement saturée, la partie médiane à 75 % et la partie supérieure beaucoup moins. Lorsque la plaque est placée à l'intérieur de la cuve, la phase stationnaire est directement mise en contact avec la phase gazeuse saturée et s'en imprègne. Simultanément, la phase mobile migre par capillarité le long de la phase stationnaire [13].

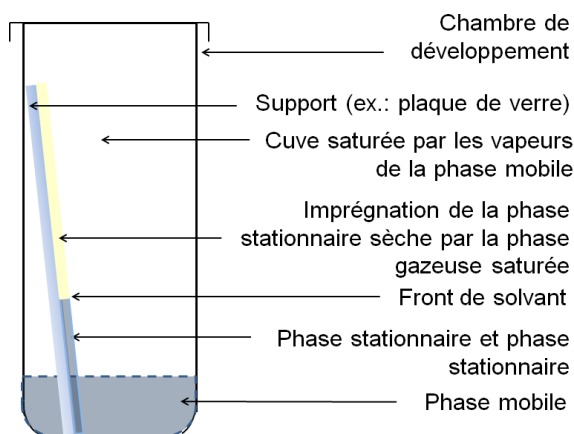


Figure 15 : présentation et fonctionnement d'une cuve à fond plat.

Il existe également des cuves à double fonds qui dérivent des cuves à fond plat par la création de deux espaces distincts. Cette modification permet d'utiliser la cuve de la même façon qu'une cuve à fond plat (Figure 16, A), mais permet également d'imprégner la phase stationnaire de vapeur de solvant (pré-conditionnement) (Figure 16, B), ou bien d'effectuer la migration dans une phase saturée de vapeur de solvant (Figure 16, C). En mode pré-conditionnement, le solvant est introduit dans un bac alors que la plaque est placée dans l'autre. La phase stationnaire est ainsi mise en contact pendant un temps défini avec les vapeurs [22]. L'utilisation d'une cuve à double fond dans les modes saturation et pré-conditionnement permet de rendre l'analyse plus reproductible.

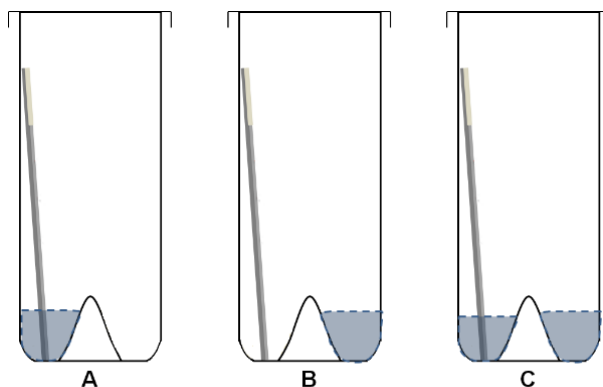


Figure 16 : exemples d'utilisation d'une cuve à double fond.

Les cuves horizontales, comme les deux cuves précédentes, peuvent s'utiliser avec ou sans saturation suivant l'utilisation d'une contre-plaque et d'un solvant placé dans le réservoir central (c.f. le mode « sandwich »). La phase stationnaire est placée face en bas, et la phase mobile est introduite dans les réservoirs. La lamelle est ensuite poussée avec la vis jusqu'à former un film capillaire le long de celle-ci. Ce film capillaire est par la suite transféré sur la couche (Figure 17). L'utilisation de cette cuve permet d'utiliser les deux cotés simultanément et ainsi doubler le nombre de dépôts (Figure 18) [16].



Figure 17 : schéma d'une cuve horizontale.

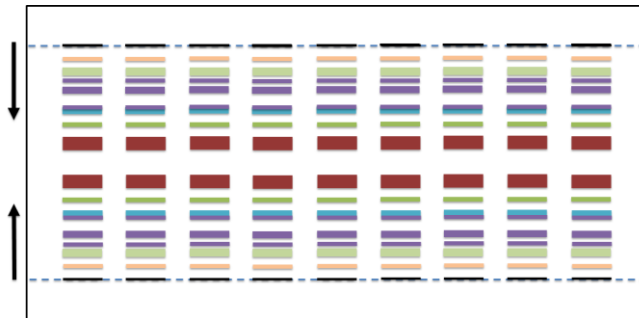


Figure 18 : résultat d'une utilisation des deux côtés d'une cuve horizontale.

Dans la lignée des cuves horizontales, il existe les cuves *Vario* conçues pour la recherche de phase mobile. Ces cuves contiennent six compartiments indépendants permettant le test simultané de six phases mobiles différentes. Si une phase de conditionnement est requise, le réservoir prévu à cet effet est alors rempli. Ensuite, la phase stationnaire est préparée pour obtenir six canaux. Le développement a lieu avec le même principe de fonctionnement que les cuves horizontales classiques (Figure 19) [22, 25].

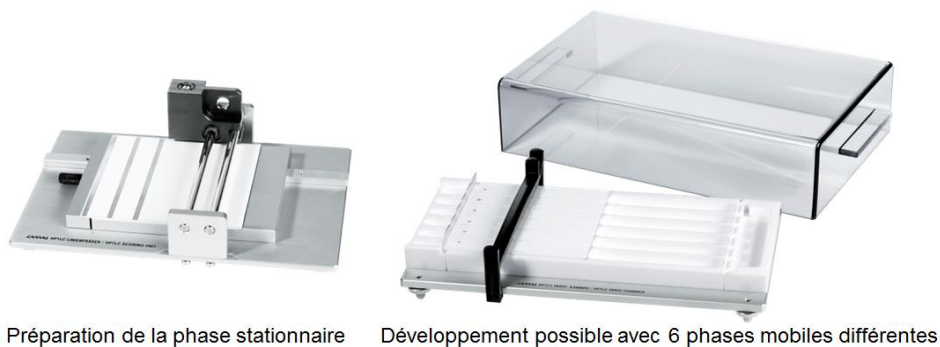


Figure 19 : photographie du système *Vario* (CAMAG).

Enfin, il existe les cuves automatiques permettant de rendre plus répétable/reproductible le développement. Dans ce cas, le niveau de migration est suivi à l'aide d'un capteur, qui lorsque la migration atteint la distance souhaitée, relève la plaque et commence le séchage. Parmi les cuves automatiques, il existe les cuves à flux forcé (*over-pressurized liquid chromatography* OPLC) avec lesquelles la phase stationnaire est placée dans une enceinte fermée sous pression. La phase mobile est ensuite introduite par flux forcé dans la phase stationnaire. L'influence de la phase gazeuse est donc ignorée [26].

En fonction du type de cuve utilisée, différents modes de développement sont possibles.

1.2.3.2. Les modes de développement

Il existe différents modes de développement : linéaire, circulaire ou anti-circulaire (Figure 20). En ce qui concerne le développement linéaire, la migration peut s'effectuer verticalement ou horizontalement suivant le type de chambre utilisée. Lors d'une migration verticale, l'échantillon est appliqué en bas de la plaque (Figure 20, A), alors que lors d'une migration horizontale l'échantillon est appliqué des deux côtés de la plaque (Figure 18). La majorité des analyses utilisent le développement linéaire avec une migration verticale. Après l'application, la plaque est immergée sur quelques millimètres, puis par capillarité, la phase mobile migre jusqu'à la distance de migration souhaitée. Les développements circulaires utilisent les forces centrifuges ou centripètes pour éluer la phase mobile à travers la phase stationnaire en faisant tourner la plaque autour d'un axe central. Les développements circulaires induisent souvent des R_f plus élevés que des développements linéaires (Figure 20, B : centrifuge, C : centripète) [27].

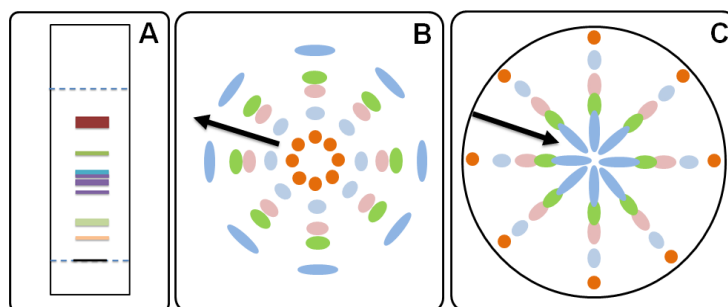


Figure 20 : schéma des différents modes de développement chromatographique. A : linéaire ; B : circulaire (centrifuge); C : circulaire (centripète).

A ces développements s'ajoutent les développements multiples et les développements multidimensionnels. Les développements multiples consistent à faire subir à la phase stationnaire des développements successifs. Pour cela, une première migration est opérée jusqu'à une distance de migration définie. La plaque est ensuite retirée et séchée, puis elle subit un deuxième développement utilisant une phase mobile identique ou différente, sur une distance de migration identique au premier développement ou différente. La Figure 21 donne des exemples d'utilisation des développements multiples. Le cas (A) est utilisé lorsque des composés apolaires doivent être

séparés. Pour cela, ils sont élués en haut de plaque à l'aide d'une première migration. Lors du deuxième développement, la distance de migration est plus courte. Dans le cas où les composés polaires doivent être éliminés (B), une première migration est opérée sur une courte distance avec un solvant très polaire. Puis une seconde migration est réalisée avec une phase mobile moins polaire. De cette façon, les composés polaires sont retenus en bas de plaque. Le cas (C), est par exemple utilisé pour augmenter la résolution entre des composés. Ce type de développement a été utilisé pour séparer les propyl-, éthyl-, et méthylparaben. Pour cela, la plaque est développée 3 fois avec la même phase mobile sur une même distance de migration [28]. Le même procédé a été utilisé pour la séparation de l'hexose et du déoxyhexose à l'aide de trois développements consécutifs avec le même solvant de développement [29].

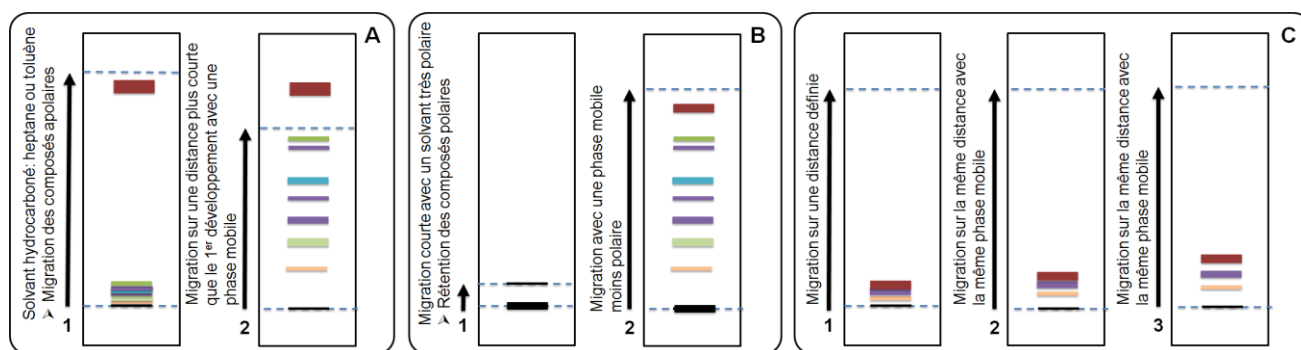


Figure 21 : exemples d'utilisation des développements multiples. A : élimination des composés apolaires à l'aide de deux migrations successives ; B : rétention des composés polaires à l'aide de deux migrations successives ; C : optimisation de la résolution entre des composés à l'aide de plusieurs migrations successives avec une phase mobile identique.

Les développements multiples peuvent être réalisés automatiquement à l'aide d'un instrument spécifique. Dans ce cas, la plaque est développée de façon répétée dans la même direction. Chaque élution utilise un solvant de migration de force éluante plus faible que celle qui lui précède, ainsi qu'une distance de migration longue. Les étapes de migration sont espacées par une étape de séchage de la plaque. Cette combinaison permet une focalisation en utilisant pas à pas un gradient d'éluant (Figure 22) [30].

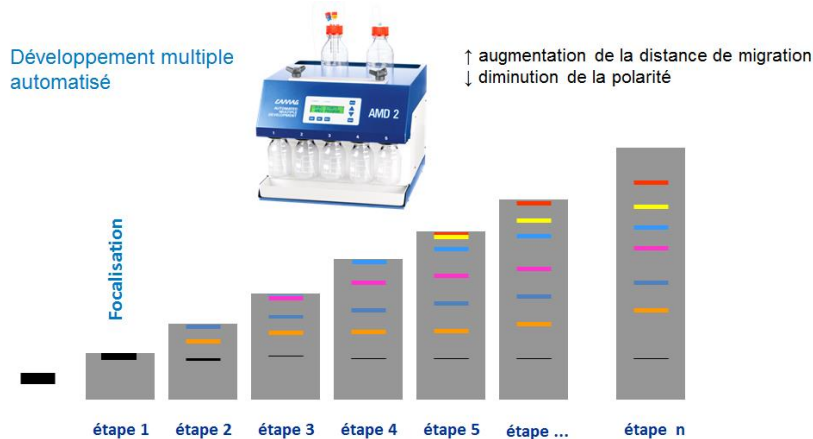


Figure 22 : fonctionnement du développement multiple automatisé (AMD).

De façon générale, lors des développements multidimensionnels, l'échantillon est appliqué sous forme d'une tache sur la phase stationnaire dans un coin inférieur de la plaque (Figure 23, A1). La phase stationnaire est ensuite développée dans une première dimension (Figure 23, A2). Ensuite, après séchage, elle est tournée de 90° et développée dans une deuxième dimension avec une deuxième phase mobile (Figure 23, A3). Le cas B de la Figure 23, un développement multidimensionnel est utilisé pour l'analyse des aflatoxines, mais cette fois en faisant pivoter la phase stationnaire de 180°, c'est-à-dire en inversant le sens de l'élution [31].

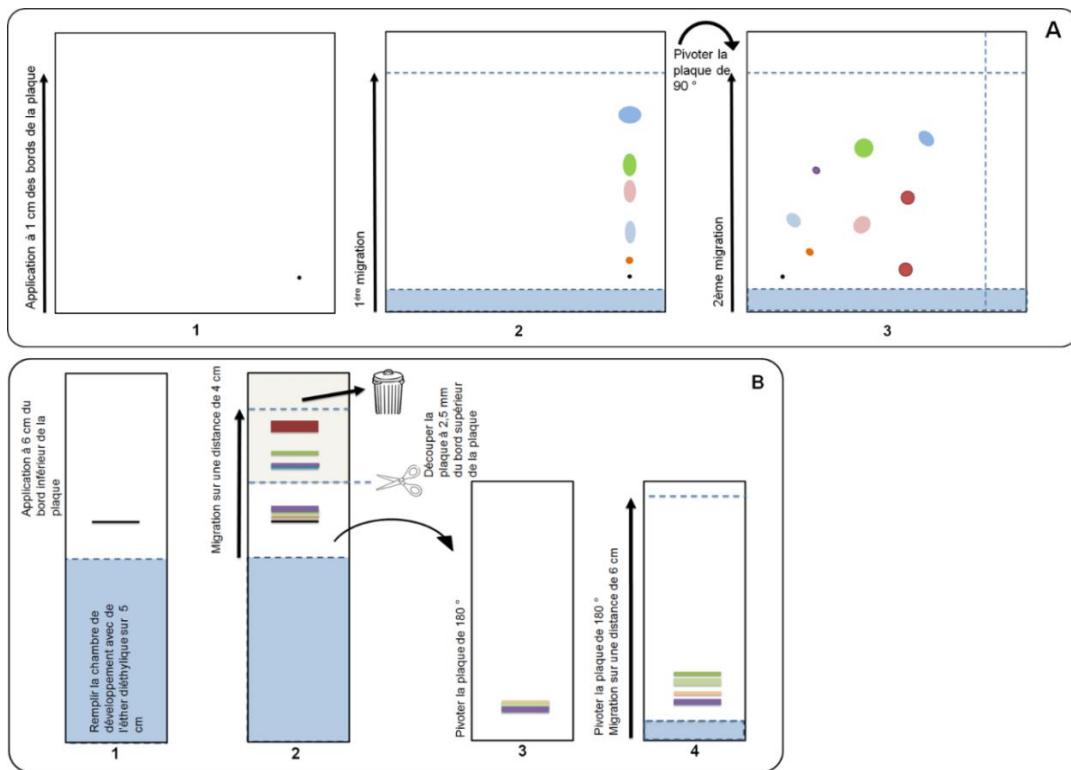


Figure 23 : schémas des développements multidimensionnels.

Le développement en mode « sandwich » est réalisé en recouvrant la phase stationnaire d'une contre plaque en verre maintenue par des pinces. De cette façon, la phase gazeuse est occultée (Figure 24) ce qui permet de ne pas tenir compte du phénomène de saturation en vapeurs de solvant dans la cuve de développement. Le mode « sandwich » peut être adapté aux cuves à fond plat, aux cuves à double fond, et aux cuves horizontales [26].



Figure 24: schéma de l'utilisation du mode « sandwich ». A : vue de profil ; B : vue de face.

1.2.3.3. Les particularités du développement chromatographique

Une des spécificités de la TLC est la présence d'une phase vapeur provenant de l'air ambiant mais aussi de l'éluant présent dans la cuve de développement. Cette phase vapeur est caractérisée par l'humidité relative (% RH). Elle correspond à la quantité d'eau dans la phase vapeur à une température donnée [32].

Le gel de silice est un adsorbant qui établit un équilibre avec l'humidité ambiante par des liaisons hydrogène (Figure 25, A). Plus l'humidité relative est grande, plus les molécules d'eau sont adsorbées à la surface de la phase stationnaire et plus les molécules d'eau forment des couches multiples à la surface de la silice ce qui la rend moins active (Figure 25, B). Cette baisse d'activité se traduit par une variation des R_F , et par une résolution moins efficace entre les pics [15]. En effet, des études sur l'influence de l'humidité relative ont été réalisées et les résultats ont montré que plus le % RH est élevé, plus les R_F sont hauts, inversement si le % RH est faible, les R_F seront bas [33].

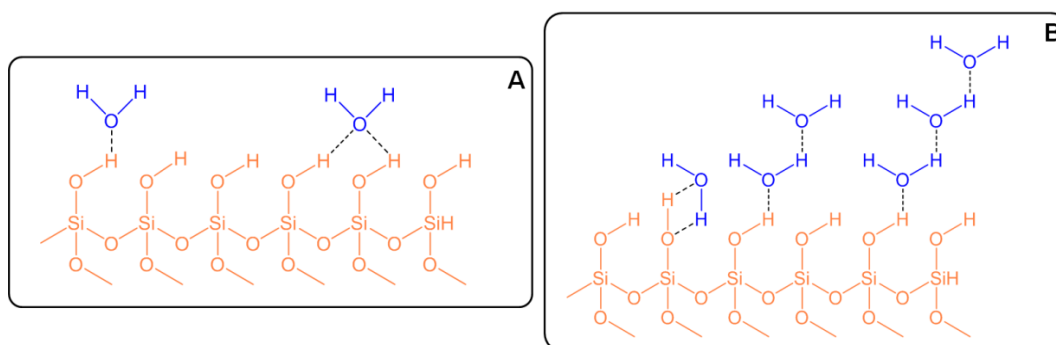


Figure 25 : adsorption des molécules d'eau à la surface du gel de silice. A : cas d'une humidité relative classique ; B : cas d'une humidité relative élevée, formation du couche multiples.

Une fois le développement chromatographique terminé, la détection des composés va être réalisée.

1.2.4. La détection

1.2.4.1. La détection sans traitement chimique

Les composés colorés ne requièrent aucun traitement de visualisation car ils sont visibles à la lumière blanche. C'est le cas des pigments naturels ou synthétiques. D'autres ne sont pas visibles à la lumière blanche, mais absorbent sous irradiation UV. Ces composés sont détectés à l'aide de lampes UV émettant à 254 et 366 nm. De nos jours, afin d'intensifier la détection sous UV, les plaques commercialisées contiennent un indicateur de fluorescence noté F_{254} ce qui permet d'observer les composés absorbant à la longueur d'onde utilisée par imagerie d'absorption [3, 34].

1.2.4.2. La détection par traitement ou dérivation

Certains composés n'absorbent ni dans le domaine du visible, ni sous lumière UV, et d'autres sont faiblement détectables. Dans ce cas, une révélation par dérivation peut être réalisée. Cette

étape consiste en une réaction chimique plus ou moins spécifique effectuée directement sur la plaque par vaporisation, par immersion, ou par exposition à des vapeurs du révélateur. Il existe une multitude de révélateurs, certains sont universels et d'autres sont spécifiques [34]. Le grand choix de révélateurs, très souvent faciles à préparer, constitue un grand avantage de l'HPTLC (Tableau 1).

Tableau 1 : exemples de révélateurs utilisés en (HP)TLC [34].

TYPE DE COMPOSE	REVELATEUR
Sucre	Anisaldéhyde-acide sulfurique ; Acide 4-aminobenzoïque ; Aniline-phthalate ; Aniline- diphénylamine- acide phosphorique.
Alcaloïde	Réactif de Dragendorff ; iodoplatinate de potassium
Composé aminé	Vanilline- hydroxyde de potassium ; Ninhydrine ; Réactif de Pauly.
Lipide	Anisaldéhyde-acide sulfurique ; Acide phosphomolybdique ; Acétate de cuivre II- acide phosphorique ; Acide sulfurique ; Vanilline- Acide sulfurique ; Vanilline- acide phosphorique ; Chlorure de fer III
Stéroïde	Pentachlorure d'antimoine ; trichlorure d'antimoine, acide phosphomolybdique
Terpénoïde	Anisaldéhyde-acide sulfurique ; Acide sulfurique ; Vanilline- Acide sulfurique ; Vanilline- acide phosphorique.
Polyphénol	Anisaldéhyde-acide sulfurique ; Vanilline- Acide sulfurique ; Sel de bleu solide ; Chlorure de fer III ; Réactif de Neu.
Hétéroside azoté	Anisaldéhyde-acide sulfurique ; Iode- iodure de potassium ; Réactif de Dragendorff

Lorsque la révélation est effectuée par vaporisation, elle est réalisée à l'aide d'un vaporisateur manuel ou automatisé (Figure 26). Afin de rendre la vaporisation homogène, elle est effectuée à une distance de 20 cm de la plaque et doit suivre un chemin de gauche à droite et de haut en bas (Figure 27) [13].



Figure 26 : photographie d'un vaporisateur manuel

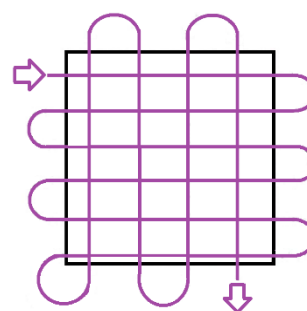


Figure 27 : chemin de vaporisation « de gauche à droite et de haut en bas »

Lorsqu'une révélation homogène, répétable et reproductible est requise, une révélation par immersion est préférée. Pour cela, l'immersion est réalisée à l'aide d'une chambre à immersion (Figure 28). La vitesse de descente de la plaque et la durée de l'immersion sont des paramètres qui peuvent être contrôlés [35].

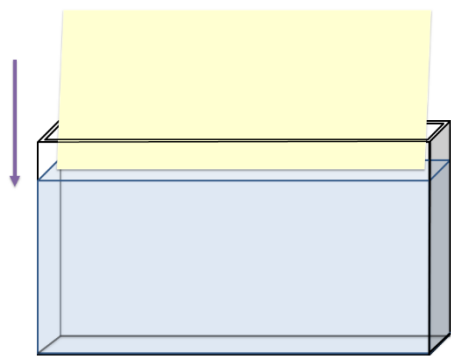


Figure 28: schéma d'une révélation par immersion.

Pour une révélation par exposition aux vapeurs du révélateur, une cuve à double fond est utilisée. Le révélateur choisi sera introduit dans un des bacs et la plaque dans l'autre (Figure 29) [13].



Figure 29 : schéma d'une révélation par exposition aux vapeurs du révélateur.

1.2.5. La documentation

1.2.5.1. L'imagerie

L'imagerie consiste à illuminer la plaque sous lumière blanche, ou sous UV à 254 ou 366 nm puis sauvegarder électroniquement l'image qui en résulte (Figure 30). De cette façon, le chromatogramme HPTLC peut être facilement archivé, édité et retraité [32].

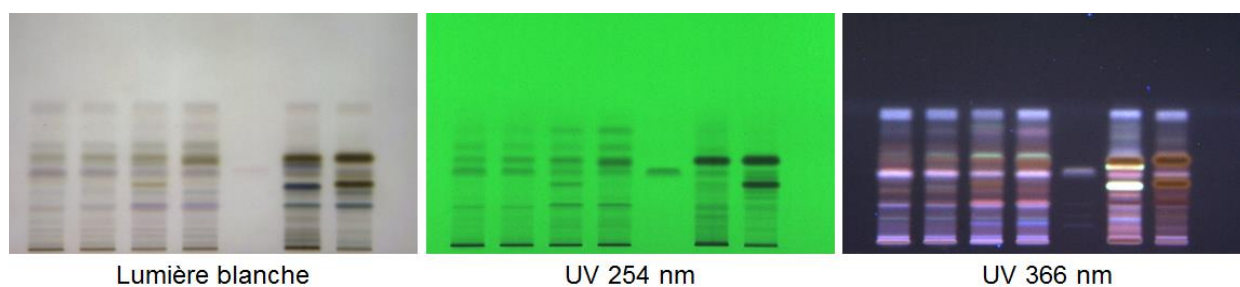


Figure 30 : exemple d'une plaque illuminée sous lumière blanche et sous lumière UV à 254 et 366 nm.

1.2.5.2. La densitométrie

A l'aide d'un instrument équipé de composants optiques, la représentation d'un profil HPTLC sous forme d'un chromatogramme affichant une série de pics équivalent à celui obtenu en HPLC est possible (Figure 31).

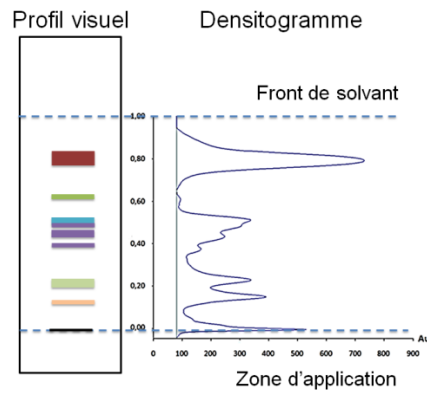


Figure 31: densitogramme obtenu à partir d'un profil visuel.

Lorsque qu'un faisceau de lumière frappe la surface d'une plaque TLC faite de particules irrégulières de silice, on peut observer des phénomènes d'absorption, de réflexion, de transmission et de diffusion.

Dans un densitomètre, le système optique permet à un faisceau de lumière de forme et de longueur d'onde (de 190 à 900 nm), définies d'être dirigé verticalement sur la plaque. Le détecteur est lui placé à un angle de 45 degrés. Placée sur un support, la plaque est déplacée piste par piste sous le faisceau lumineux. De toute la lumière dirigée sur la plaque seule une petite partie revient au détecteur et peut ainsi être réellement mesurée. Lorsque la plaque se déplace au-dessous du faisceau de lumière, le détecteur enregistre une ligne de base à partir de la position. La densitométrie peut être effectuée en deux modes : absorbance ou fluorescence. En mesure d'absorbance, la lumière réfléchiée de manière diffuse à partir de la plaque représente la ligne de base qui est réduite lorsque le faisceau lumineux frappe une zone d'absorption. Le signal est ensuite électroniquement inversé de sorte que l'absorbance soit présentée comme un pic positif dans le densitogramme. Bien que l'absorbance puisse être mesurée en réflexion ou en transmission, la réflexion aura plus d'importance car la transmission sera affectée par les irrégularités de la couche, mais aussi par le support (Figure 32) [36].

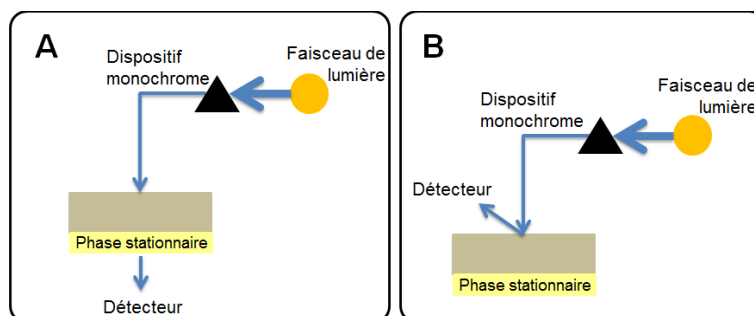


Figure 32 : schémas de mesure de l'absorbance: A : transmission; B : réflexion.

Certains composés fluorescent après excitation UV. La lumière émise a une longueur d'onde plus longue que la lumière absorbée. La mesure de la fluorescence nécessite un filtre pour éliminer efficacement la lumière utilisée pour l'excitation. La lumière fluorescente peut, elle, passer le filtre et atteindre le détecteur.

1.3. Avantages et inconvénients de l'HPTLC

L'HPTLC est une technique se rapprochant de la chromatographie liquide tout en ayant ses propres avantages et ses inconvénients (Tableau 2). Il s'agit cependant d'une technique simple de par sa mise en œuvre. De façon générale, elle est capable de séparer et d'analyser une dizaine d'échantillons complexes simultanément et ainsi avec l'aide d'une référence, il est possible procéder à de la reconnaissance de profils (*fingerprinting*) ou de comparer les échantillons pour l'identification d'analytes. Dans ces conditions, l'HPTLC est une technique rapide, peu onéreuse et peu consommatrice de solvant [2].

D'un point de vue fonctionnement, chaque étape, manuelle ou automatisée (dépôt, développement, visualisation et détection) est indépendante des autres (*off-line*). Cet aspect est un avantage lors d'analyses multiples : un dépôt peut être réalisé, pendant qu'une autre analyse est en développement. Cet avantage est également un inconvénient car l'automatisation totale n'existe pas pour le moment, ce qui nécessite la présence d'un opérateur pour passer d'une étape à l'autre, introduisant ainsi des risques d'erreurs [37]. La préparation des échantillons, adaptable à tout type d'échantillon, est moins contraignante que dans la plupart des techniques de chromatographie liquide, car la plaque est un consommable à usage unique et peut donc être facilement changée en cas de mauvais dépôt, évitant également la contamination croisée (absence d'effet mémoire). Le volume d'application (sous forme de point, de bande, ou de zone) est variable allant de 0,5 à 500 μL suivant le type de plaque utilisée. Lors de l'application de grands volumes, un début de séparation peut être observé au moment même du dépôt si celui-ci est mal paramétré. Le dépôt est une étape chronophage contrairement à une injection en chromatographie liquide [12, 15]. En ce qui concerne les phases stationnaires, un grand nombre sont commercialisées et prêtes à l'emploi. Il existe aussi un système permettant à l'analyste de fabriquer ses propres phases ce qui accroît le potentiel de spécificité et d'adaptation de l'(HP)TLC [12, 15]. Lors du développement d'analytes absorbant dans le visible, ce qui est souvent le cas en phytochimie, l'ensemble du processus chromatographique est visible en temps réel, ce qui permet la prise de décision en simultané par l'utilisateur, comme par exemple en ce qui concerne la durée de l'élution. Le profil chromatographique est quant à lui difficile à décrire et à prédire du fait que le système est un système ouvert (présence d'une phase gazeuse) [37]. D'un point de vue visualisation et détection, la totalité de l'échantillon appliqué sur la plaque est analysée. La flexibilité des systèmes de détection (transformation chimique, réaction microbiologique, couplage MS...) permet de détecter tout type de composés et notamment ceux ne possédant pas de groupement chromophore [2, 12].

Tableau 2: avantages et inconvénients de l'HPTLC.

AVANTAGES	INCONVENIENTS
<ul style="list-style-type: none"> • Technique visuelle • Analyse simultanée de plusieurs échantillons • Consommation de solvant faible • Chaque étape peut être manuelle ou automatisée • Chaque étape est indépendante des autres (<i>off-line</i>) • La préparation de l'échantillon n'est pas contraignante • La phase stationnaire est un consommable • Trois types d'applications possibles • Large gamme de volume d'injection possible (0,5 à 500 µL) • Grand nombre de phases stationnaires commercialisées • Le processus chromatographique est visible et peut être arrêté par l'opérateur en temps réel • La totalité de l'échantillon appliqué sur la plaque est analysée (pas de rétention, la zone d'application est prise en compte) • Plusieurs détections possibles (transformation chimique, réaction microbiologique, couplage analytique ...) permettant de détecter des composés non visibles (sous UV ou en lumière visible°, ou encore d'accroître la détection de certains • Absence d'effet mémoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas d'automatisation totale • Chacune des étapes a une influence sur la suivante • L'application d'un trop grand volume peut entraîner un début de séparation pendant le dépôt • Application peut prendre du temps • Le profil chromatographique est difficile à décrire et à prédire • Résolution • Limite de détection • Nombre de fournisseurs limité, prix des équipements élevé

Les avantages cités ci-dessus en font une technique applicable dans divers domaines et en particulier le domaine des substances naturelles.

1.4. Conclusion

La chromatographie sur couche mince est une technique connue de tous les chimistes / analystes. Elle fait intervenir différents mécanismes de rétention comme par exemple la chromatographie d'adsorption et la chromatographie de partage. D'autres principes de rétention interviennent dans des cas spécifiques liés à la nature des adsorbants utilisés. Parmi les adsorbants existants, le gel de silice est de loin l'adsorbant le plus utilisé en (HP)TLC. Les plaques de gel de silice sont extrêmement polyvalentes et sont utilisées pour la séparation de nombreux composés. Le gel de silice est composé d'un réseau de groupements silanols et siloxanes qui sont la base pour la production de phases greffées.

Dans sa version à haute performance, la phase stationnaire (plaque HPTLC) possède des particules de silice de taille plus petite et de distribution plus homogène que celles des plaques TLC, ce qui apporte une meilleure résolution. L'HPTLC repose sur plusieurs modules indépendants les uns des autres pouvant être gérés par le même logiciel informatique. Les étapes clés sont la préparation d'échantillon, l'application, le développement et l'interprétation des résultats. En HPTLC, la phase stationnaire possède l'avantage de permettre l'application d'un échantillon n'ayant subi que de simples préparations. L'application des échantillons, que ce soit de façon manuelle, automatisée ou semi-automatisée, est une étape déterminante pour la qualité du résultat chromatographique. Le développement chromatographique est dépendant de la cuve

utilisée, du mode de développement, de la composition de la phase gazeuse (saturée en solvant ou non) et de la phase mobile. La détection des substances est une étape dissociable de la chromatographie car elle s'effectue sur une couche débarrassée du solvant de développement, ce qui procure à l'(HP)TLC des avantages considérables. Avec ou sans traitement, la détection par imagerie ou par densitométrie apporte à l'analyste une multitude d'informations. Les systèmes révélateurs, à appliquer avant ou après développement, sont variés et reposent sur différentes méthodes, chimiques ou biologiques. Les composés biologiquement actifs peuvent être détectés par réaction immunochimique ou enzymatique. Les détections chimiques se font lorsque les substances ne sont pas visibles à la lumière blanche ou sous lumière UV. Pour ce faire, elles sont modifiées par réaction chimique.

L'avantage de la simplicité d'utilisation de la technique combiné aux nombreux modes de détection, en font une technique utilisable dans des domaines d'application variés tels que dans le domaine des produits naturels (plante, alimentaire...), médical et biologique, environnemental, ou encore pétrolier. Dans tous ces domaines, l'(HP)TLC peut intervenir à différents stades de l'analyse, que ce soit au début de l'analyse à savoir comme outil de préparation d'échantillon, ou au cours de l'étape d'analyse comme outil d'identification ou de quantification.

2. L'INTERPRETATION DES RESULTATS ET LES DOMAINES D'APPLICATION DE L'(HP)TLC

L'(HP)TLC est un outil pratique, puissant et simple d'utilisation, c'est pourquoi on le retrouve dans de nombreux laboratoires. L'évolution des instruments ainsi que les moyens de retraitement des données obtenues permettent une utilisation de l'HPTLC dans différents domaines et pour différentes applications. En effet, l'isolement des composés cibles, la détection de composés cibles, l'identification phytochimique, ou encore l'analyse quantitative sont des exemples d'applications possible par HPTLC [34].

2.1. L'(HP)TLC comme outil d'isolement/purification

Même si de nos jours la chromatographie planaire est principalement utilisée pour l'identification et la caractérisation, elle peut aussi être utilisée pour l'isolement de composés d'intérêt (Tableau 3). L'isolement en TLC a commencé avec l'apparition des plaques préparatives (PLC) en 1962 [21]. La TLC préparative (PTLC) utilise des plaques d'épaisseur variable (de 0,5 à 2 mm) selon qu'elles soient commercialisées ou directement préparées par l'analyste [38]. Les plaques préparatives sont principalement utilisées pour isoler des quantités d'analyte(s) variant de 10 mg à 1 g. C'est pour ces raisons que la PTLC est une technique d'isolement utilisée dans différents domaines. Elle est par exemple utilisée par les chimistes organiciens afin d'isoler leurs produits intermédiaires et finaux, ou bien par les chercheurs en pharmacognosie pour isoler les composés actifs d'extraits naturels, tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les phytostérols, ou encore les terpénoïdes. Lors de ces isollements, la phase stationnaire la plus fréquemment utilisée est la phase de gel de silice [21]. De plus, la TLC et la PTLC sont souvent combinées à d'autres outils comme pour la chromatographie sur colonne ouverte (CC) (*c.f.* chap. 2, 2.1.2.1) ou encore la chromatographie liquide sous vide (VLC).

Pour satisfaire la demande, un vaste choix de plaques est à présent proposé. Certaines plaques préparatives ont été spécialement développées à cet effet, à savoir les plaques dites à zone de concentration qui permettent notamment l'application d'un plus grand volume d'échantillon [21]. Ces plaques se composent de deux adsorbants distincts, avec en zone d'application une zone inerte à la plupart des composés, ce qui permet de déposer un échantillon de façon arbitraire sans tenir compte de la forme, de la taille ni de l'emplacement des taches. L'échantillon migre d'abord vers la frontière entre les deux adsorbants où il se concentre de façon linéaire, puis est séparé normalement [38]. Il existe d'autres types de plaques plus spécifiques, comme par exemple les plaques d'oxyde d'aluminium dont la sélectivité peut être modulée par variation du pH et s'appliquent par exemple aux alcaloïdes. Les plaques de cellulose s'utilisent elles pour l'isolement de certains acides aminés. Comme en HPLC, la PTLC peut également s'appliquer en phase inverse. La chromatographie sur couche mince à flux forcé (OPLC) a aussi été utilisée pour

l'isolement/purification et a notamment montré de bons résultats pour de petites quantités d'échantillon et des échantillons pré-purifiés [38-40].

Tableau 3: exemples d'isolement effectués par TLC, PTLC, et OPLC.

CIBLES	TYPE DE TECHNIQUE	REFERENCE
Flavonoïdes isolés du fruit de <i>Trigonostadium brachytaenium</i> (Boiss.) Alava.: 5-Hydroxy-4'-methoxy-8-ethoxyflavone-7-O-[(2'-acetyl) rhamnosyl (1 → 2) rhamnoside)]	CC/PTLC	[41]
Patuloside A isolé de <i>Peperomia pellucida</i>	CC/PTLC	[42]
2 phénylpropanoïdes isolés des parties aériennes du <i>Pimpinella aurea</i> : <ul style="list-style-type: none"> • Erythro-1'-(4-Methoxyphenyl)-propan-1', 2'-diol • Erythro-1'-[4-(Sec-butyl)-phenyl]-propan-1', 2'-diol 	VLC/PTLC	[43]
Saponines isolées du <i>Polyscias guilfoylei</i> F. <i>Araliaceae</i>	CC/PTLC	[44]
La rutine et la quercétine isolées des extraits d' <i>Azolla microphylla</i>	PTLC/TLC	[45]
Alcaloïdes isolés de l' <i>Aspidosperma ramiflorum</i>	PTLC	[46]
Le stigmastérol isolé des parties aériennes du <i>Spilanthes Acmella</i> Murr	VLC/PTLC	[47]
Alcaloïdes isolés des espèces du genre <i>Reseda</i>	CC/PTLC	[48]
7 composés isolés à partir des racines de <i>Glehnia littoralis</i>	OPLC	[49]
Composés antibactérien isolés à partir de la camomille	OPLC	[50]
Des isomères de stilbènes isolés du vin rouge	OPLC	[51]
Isolement des fumonisines	OPLC	[52]

L'(HP)TLC préparative permet la séparation et l'isolement de composés en quantité variable (de 10 mg à 1 g). Cependant, son utilisation requiert de prendre en compte certaines considérations comme par exemple la taille des particules et l'épaisseur de la phase stationnaire, mais aussi la quantité d'échantillon à appliquer. De nos jours, les plaques préparatives commercialement disponibles sont d'épaisseur variable allant de 0,5 à 2 mm. Sachant que sur des plaques préparatives, la résolution est optimale avec des plaques de fine épaisseur (de 0,5 à 1 mm), mais que la capacité d'application d'une plaque de 0,5 mm d'épaisseur est deux fois moins grande qu'une plaque de 2 mm, l'utilisateur de faire un choix entre résolution et quantité mise en œuvre [53].

2.2. L'(HP)TLC en analyse quantitative

Avec l'évolution technologique des instruments de chromatographie planaire et notamment avec l'apparition du densitomètre (c.f. 1.2.5.2), l'HPTLC peut être utilisée comme outil de quantification. Suite aux nombreuses publications apparues sur les analyses quantitatives, un symposium intitulé « *Quantitative Thin Layer Chromatography* » a été organisé en 1971 à

Philadelphie permettant ainsi de réaliser l'ampleur de la palette des composés pouvant être analysés quantitativement : polymères, lipides, carbohydrates, mycotoxines, acides aminés, stéroïdes [54] ...

L'HPTLC s'est révélée être très utile dans le cas de quantification / estimation d'un ordre de grandeur pour lesquels il est souhaité d'avoir recours à une technique peu exigeante en temps et en ressources (Tableau 4). Dans le domaine des extraits naturels, elle a par exemple été utilisée pour estimer la quantité d'acide gallique dans 3 extraits de plantes médicinales indiennes (*Rosa sinensis*, *Embllica officinalis*, *Syrygium aromaticum*), ou encore pour la curcumine dans différentes variété de *Curcuma longa* [55, 56]. De la même façon, l'HPTLC intervient comme outil de contrôle lors des étapes de développement lorsqu'il est utile de comparer différentes techniques d'extraction [57].

Tableau 4: exemples d'analyses quantitatives par HPTLC.

CIBLES DE L'ANALYSE QUANTITATIVE	REFERENCE
La β -amyryn dans les feuilles de différentes espèces de <i>Ficus</i>	[58]
Le <i>trans</i> -resveratrol dans du vin rouge	[59]
L'acide chlorogénique et la caféine dans des extraits de <i>Coffea arabica</i> L.	[60]
L'acide caféique, la rutine, le kaempférol, la catéchine, la quercétine, l'épicatéchine et l'eupalitine dans des extraits d' <i>Ocimum sanctum</i> L.	[61]
Le <i>trans</i> -resvératrol dans des ingrédients cosmétiques d'origine botanique	[62]
Les acides néochlorogénique, chlorogénique, cryptochlorogénique, et caféique, la rutine, l'hypérine, l'isoquercétine, la quercitrine et la quercétine dans des extraits d' <i>Houttuyniae herba</i>	[63]
Les acides élagique et gallique et le gallate de méthyle	[64]
Le lactosylcéramide, le triacylglycérol, le phosphatidylcholine, le cholestérol et le sphingomyéline dans les os et tissus mastoïdiens	[65]
Le bacoside A dans le <i>Bacopa monnieri</i>	[66]
La cucurbitacine B dans la <i>Lagenaria siceraria</i>	[67]
La trichostachine, la piperine, le 4,5-DHPL, la guineensine, la pellitorine et la sesamine dans les espèces de <i>Piper nigrum</i>	[68]
La swertiamarine dans des extraits d' <i>Enicostemma littorale</i> et de <i>Swertia chirata</i>	[69]
La bergénine dans les parties aériennes du <i>Flueggea virosa</i>	[70]
La quercétine dans les tubercules de <i>Satyrium nepalense</i>	[71]
La genistéine et la vitéxin dans les graines de <i>Vigna mungo</i>	[72]
L'hespéridine dans les racines de <i>Jasminum sambac</i>	[73]
La mangiférine et la lupéol dans les fruits de <i>Mangifera indica</i>	[74]
La pivalate de fluméthasone, la fluméthasone, et le clioquinolone	[75]
La rhéine dans la pulpe de <i>Cassia fistula</i>	[76]
Les acides cichorique et chlorogénique, et l'échinacoside dans des produits commerciaux d' <i>Echinacea</i>	[77]
11 anthocyanes dans les marcs, les jus, les vins et aliments pour animaux.	[78]

2.3. L'(HP)TLC en analyse qualitative

2.3.1. Outil d'identification phytochimique

L'identification, que ce soit d'une famille phytochimique ou d'une espèce botanique, ou d'un composé actif est un objectif récurrent en analyse phytochimique [12]. Pour cela, des révélateurs sont utilisés pour aider à la caractérisation des échantillons (Tableau 5). Il existe des révélateurs qui permettront d'accentuer le caractère fluorescent de certaines classes de composés. Le recours aux indicateurs acido-basiques (bleu de bromothymol, vert de bromocrésol) est aussi possible pour la détection des composés portant des fonctions acides ou basiques. Il existe des révélateurs dit généraux comme par exemple l'acide nitrique, l'acide sulfurique, le sulfate de cuivre (II), ou encore l'iode [34]. Il existe d'autres révélateurs spécifiques permettant de réaliser un criblage phytochimique comme le *para*-anisaldéhyde en milieu acide, le réactif de Dragendorff, la ninhydrine, l'acide phosphomolybdique ou le réactif de Neu [15, 79].

Tableau 5: exemples de révélateurs.

REVELATEUR	COMPOSES DETECTES
Fluorescéine	Lipides
Rhodamine B	Triglycérides, acides gras, gangliosides, phénols, polyphénols, flavonoïdes
Rhodamine 6G	Glycérides, acide gras, ubiquinone, gangliosides, stéroïdes, stérols, triterpènes, phospholipides
Berbérine	Stérols, lipides, acides gras
Vert de bromocrésol	Les composés acides deviendront jaunes sur un fond bleu.
Bleu de bromothymol	Les composés acides deviendront bleu-vert.
Anisaldéhyde-acide sulfurique	Terpénoïdes, saponines, stérols
Dragendorff	Alcaloïde
Ninhydrine	Composé aminé
Acide phosphomolybdique	Lipide
Réactif de Neu	Polyphénol

La révélation post-chromatographique permet de combiner les révélateurs et ainsi accroître le nombre de classes de composés détectés sur la même plaque HPTLC. Pour cela, il faut construire la séquence de révélateur de façon à ce que toutes les réactions soient maîtrisées et ainsi éviter des interactions non désirées. Ce procédé est par exemple couramment utilisé lors de la révélation des flavonoïdes par le réactif de Neu qui combine une première révélation à l'aide du diphenylborate d'aminoéthanol (*Natural product NP*), puis une seconde avec une solution de polyéthylène glycol (PEG 400). La seconde révélation permet d'accroître la sensibilité (Figure 33) [80].

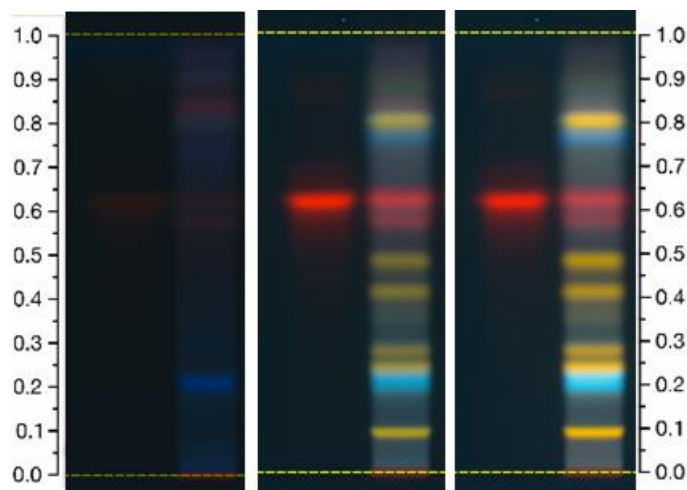


Figure 33 : Profile HPTLC d'un extrait d'*Hypericum perforatum* avant révélation (gauche), après une première révélation au NP (milieu) et après une deuxième révélation au PEG (droite).

De la même façon une séquence pour la détection de groupes fonctionnels de composés organiques contenant l'élément chimique azote a été publiée (Figure 34) [28, 81].

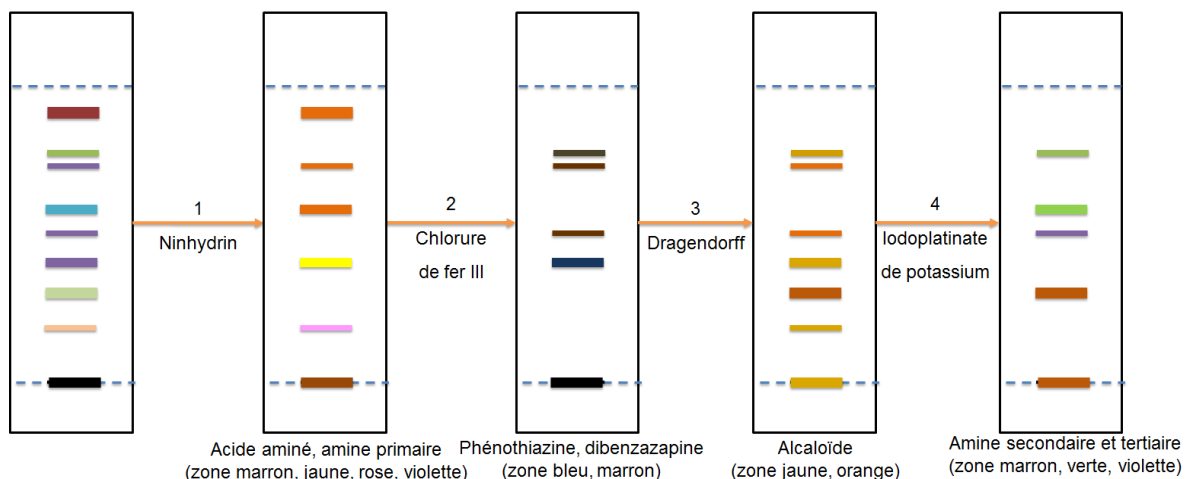


Figure 34: séquence typique pour la détection de groupes fonctionnels de composés organiques contenant l'élément chimique azote [81].

Une fois les familles chimiques identifiées, l'HPTLC permet aussi d'identifier les classes de composés. Pour cela, le système choisi comme phase mobile doit être adapté à la polarité des composés présents. Une bibliographie abondante sur l'utilisation de la TLC répertorie les différentes phases stationnaires et mobiles envisageables pour chaque classe de composés (Tableau 6) [81].

Tableau 6 : exemples de systèmes (HP)TLC en fonction des composés [81].

CLASSE DE COMPOSES	PHASE STATIONNAIRE	PHASE MOBILE	REVELATEUR
Alcaloïde	Gel de silice	Méthanol, ammoniacque concentré (200 :3)	Dragendorff
Acide aminé	Gel de silice	<i>n</i> -butanol, ac. acétique, eau (4 :1 :1)	Ninhydrine
Amine	Cellulose	<i>n</i> -butanol, ac. acétique, eau (4 :1 :1)	Ninhydrine
Anthocyanidine	Cellulose	Ac. chlorhydrique concentré, ac. acétique, eau (3 :30 :10)	Lumière blanche
Anthocyanine	Cellulose	<i>n</i> -butanol, ac. acétique, eau (4 :1 :5)	Lumière blanche
Aurone	Cellulose	<i>n</i> -butanol, ac. acétique, eau (4 :1 :5)	Lumière blanche
Caroténoïde	Cellulose	Ether de pétrole, acétone, isopropanol (90 :10 :0.45)	Lumière blanche
Chalcone	Cellulose	<i>n</i> -butanol, ac. acétique, eau (4 :1 :5)	Lumière blanche
Chlorophylle	Cellulose	Ether de pétrole, acétone, isopropanol (90 :10 :0.45)	Lumière blanche
Coumarine	Cellulose	10% ac. acétique	Lumière blanche
Diterpénoïde	Gel de silice	<i>n</i> -hexane, acétate d'éthyle (17 :3)	Ac. sulfurique
Flavanone	Cellulose	5% ac. acétique	UV
Flavone	Cellulose	Ac. acétique, ac. chlorhydrique concentré, eau (30 :3 :10)	UV
Flavonol (aglycone)	Cellulose	Ac. acétique, ac. chlorhydrique concentré, eau (30 :3 :10)	UV
Flavonol (glycoside)	Cellulose	<i>n</i> -butanol, ac. acétique, eau (4 :1 :5)	UV
Glycoflavone	Gel de silice	Acétate d'éthyle, pyridine, eau, méthanol (16 :4 :2 :1)	UV
Tannin hydrolysable	Cellulose	Isobutanol, ac. acétique, eau (14 :1 :5)	UV
Isoflavone	Gel de silice	Chloroforme, méthanol (89 :11)	Folin
Isothiocyanate	Gel de silice	Tétrachlorométhane, méthanol, eau (20 :10 :1)	Nitrate d'argent
Lignan	Gel de silice	Acétate d'éthyle, méthanol (19 :1)	Ac. sulfurique
Monosaccharide	Gel de silice	<i>n</i> -butanol, ac. acétique, éther diéthylique, eau (9 :6 :3 :1)	Aniline
Ac. Organique	Gel de silice	Méthanol, 5M ammoniacque (4 :1)	Bleu de bromothymol
Oligosaccharide	Cellulose	<i>n</i> -butanol, toluène, pyridine, eau (5 :1 :3 :3)	Aniline
Ac. phénolique	Gel de silice	Ac. Acétique, chloroforme (1 :9)	Folin
Phénylpropene	Gel de silice	Hexane, chloroforme (3 :2)	Vanilline/ac. sulfurique
Phénol	Cellulose	Benzène, méthanol, ac. acétique (45 :8 :4)	Folin
Phytostérol	Gel de silice	Hexane, acétate d'éthyle (1 :1)	Isatine/ac. sulfurique
Proanthocyanidine	Cellulose	Isobutanol, ac. acétique, eau (14 :1 :5)	UV
Antraquinone	Gel de silice	Acétate d'éthyle, méthanol, eau (100 :17 :13)	Lumière blanche
Sapogénine	Gel de silice	Chloroforme, acétone (4 :1)	Trichlorure d'antimoine / ac. chlorhydrique concentré
Saponine	Gel de silice	<i>n</i> -butanol, eau (1 :1)	Trichlorure d'antimoine /ac. chlorhydrique concentré
Sesquiterpène	Gel de silice	Benzène, chloroforme (1 :1)	Trichlorure d'antimoine /chloroforme
Sesquiterpène lactone	Gel de silice	Chloroforme, éther diéthylique (4 :1)	Vanilline / ac. sulfurique
Triterpénoïde	Gel de silice	Hexane, acétate d'éthyle	Trichlorure d'antimoine /chloroforme

2.3.2. Outil d'identification d'activité

L'évaluation d'un extrait ou d'un composé isolé peut aussi passer par des tests d'activité biologique permettant de mettre en évidence leur potentiel (Tableau 7). La chromatographie planaire possède par exemple la capacité de séparer les composés organiques et d'étudier directement sur la plaque leur effet sur des micro-organismes : la bioautographie. Ainsi, l'(HP)TLC peut contribuer à l'identification de composés antimicrobiens, antifongiques « en ligne » [82]. Ainsi, pour la détection d'une activité antifongique, après développement chromatographique, des solutions fongiques sont pulvérisées directement sur la plaque. Après incubation et révélation au chlorure de méthylthiazolytétrazolium (MTT), des zones d'inhibition apparaissent et indiquent les zones où la croissance fongique est inhibée par les composés actifs de l'extrait [83]. Pour une activité antibactérienne, après le développement chromatographique, la phase stationnaire est recouverte d'une gélose contenant le micro-organisme à étudier. Après incubation, la plaque est pulvérisée avec du chlorure de MTT. De la même façon, des zones d'inhibition apparaissent et indiquent les zones où la croissance microbienne est inhibée par les composés actifs de l'extrait [49, 84, 85]. Les propriétés anti-oxydantes sont détectables par révélation avec une solution de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ou d'un mélange de xanthine et de chlorure de MTT [86-89].

Tableau 7: exemples de révélateurs d'activité et leurs utilisations.

TYPE D'ACTIVITE	REVELATEURS	EXEMPLES
Antioxydant	Après le développement chromatographique, la plaque est révélée avec une solution de DPPH	<ul style="list-style-type: none"> • Détection de l'activité antioxydante des composés de 4 espèces de <i>Curcuma</i> [90]
	Après le développement chromatographique la plaque est immergée dans une solution d'oxydase de xanthine. Après incubation, elle est immergée dans un mélange de xanthine et de chlorure de MTT	<ul style="list-style-type: none"> • Détection de l'activité antioxydante d'un extrait de <i>Swietenia mahagoni</i> [91]
Antibactérien	Après développement chromatographique, la phase stationnaire est recouverte d'une gélose contenant le micro-organisme à étudier. Après incubation, la plaque est pulvérisée avec du chlorure de MTT	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus Aureus</i> [92] • <i>Staphylococcus epidermidis</i> [93] • <i>Pseudomonas syringae pv. Phaseolicola</i> [94] • Le système de régulation enzymatique de la <i>Salmonella typhimurium</i> [95]
Antifongique	La plaque est pulvérisée avec une solution contenant le micro-organisme à étudier. Après incubation, les zones d'inhibitions apparaissent.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Aspergillus</i> [96] • <i>Penicillium</i> [97] • <i>Cladosporium</i> [92]
	Après développement, la phase stationnaire est recouverte d'une gélose contenant le micro-organisme. Après incubation, la plaque est pulvérisée avec du chlorure de MTT	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i> (Robins) Berkhout [96]

2.3.3. Outil de contrôle et de détection d'adultération

Par définition, l'adultération fait référence à la notion de frauder, en altérant une manière de façon contraire aux dispositions légales ou réglementaires [98]. De nos jours, la demande en approvisionnement et le commerce international de plantes destinées au domaine des compléments alimentaires, de la cosmétique, de la parfumerie ou de l'agroalimentaire sont en croissance constante. Ainsi, les ventes d'ingrédients naturels tels que les huiles essentielles, les extraits de plantes, ou les poudres de plantes devraient croître de 5 % par an sur la période 2012-2017 [99]. Le marché des cosmétiques naturels et biologiques représente 3 % des ventes mondiales (9,1 milliards de dollars) soit une croissance de plus de 8 % depuis 2007. Sur le territoire français et sur la même période, cette croissance est bien plus marquée (+38 %) [100]. En phytothérapie, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le commerce mondial a été estimé, en 2008, à 83 milliards de dollar [101]. Que ce soit dans le milieu industriel, universitaire, ou gouvernemental, toutes les personnes travaillant avec des plantes ont, à un moment ou autre, été confrontés à des préoccupations concernant la qualité et l'authenticité de ces extraits.

2.3.3.1. Le contrôle des plantes et extraits de plante par (HP)TLC

L'authenticité des plantes et extraits de plantes est une notion connue en (HP)TLC. Il existe de nombreux ouvrages permettant d'aider à l'identification. Des atlas sont disponibles et regroupent des centaines de profils (HP)TLC caractéristiques de chaque extrait de plantes [79, 102]. Bien que les plantes ou extraits de plantes soient utilisés depuis longtemps dans des médecines traditionnelles, des notions de qualité et de contrôle concernant la sécurité, et l'authenticité doivent être considérées [103]. C'est en l'absence de réglementation sur la qualité des produits que des falsifications / erreurs ont été commises, comme par exemple en 1997, où plusieurs lots de *Plantago major* et de *Plantago lanceolata*. ont été adultérés avec de la digitale, ce qui a causé plusieurs cas d'arythmie cardiaque graves aux Etats-Unis [104, 105].

A l'aide de ces méthodes, il est dans certains cas possible d'identifier une espèce botanique X et de la discriminer d'une autre espèce Y. Cette détection peut se faire soit en comparant le profil chromatographique de l'échantillon à analyser avec celui d'une référence, soit en focalisant l'analyse sur des marqueurs de l'autre espèce lorsqu'ils sont connus ou suspectés. Dans le cas où les marqueurs sont inconnus, la combinaison de l'HPTLC avec la chimiométrie permet d'obtenir des empreintes significatives d'une plante [106]. Cette méthode de reconnaissance a par exemple été appliquée dans le cas d'extraits de propolis [107].

De la même façon, les origines des extraits peuvent être contrôlées, comme par exemple dans le cas des extraits de millepertuis (*Hypericum perforatum* L.) (Figure 35) [108].

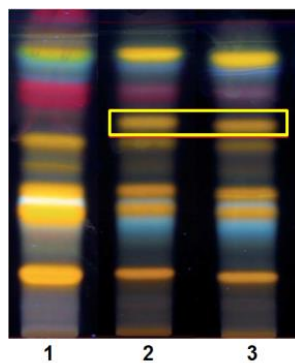


Figure 35: Profils TLC d'extraits de millepertuis de différentes origines. 1 : origine européenne ; 2-3 : origine chinoise [108].

2.3.3.2. Les détections d'adultération par (HP)TLC

Les notions d'adultération sont parfois complexes. Par définition il s'agit d'une pratique frauduleuse consistant en l'ajout d'un produit de moindre valeur à un autre produit. Suivant le domaine, les adultérations sont parfois bien connues. C'est le cas pour de nombreux produits vendus comme aphrodisiaques naturels adultérés par des produits de synthèse inhibiteurs des phosphodiesterases cGMP-spécifique de type 5 (PDE5-Is) comme par exemple sildénafil, vardénafil, tadalafil, ou leur analogues connus (hydroxyacétildénafil, homosildénafil, thiohomosildénafil, acétildénafil, acétaminotadalafil...) [109]. Ce type d'adultération a été démontré par de nombreuses techniques dont l' HPTLC (Figure 36) [110]. De la même façon, la détection de l'adultération de produit amincissant par de la sibutramine a été réalisé par HPTLC [111].

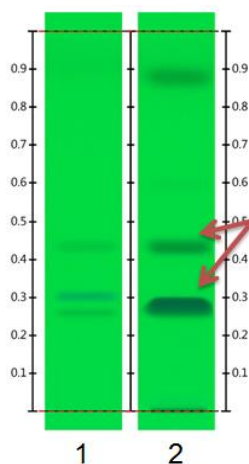


Figure 36 : profil HPTLC des capsules « *Triple Miracle Zen Platinum* » (produit rappelé par le *Food and Drug Administration*, aux Etats-Unis). 1 : sildénafil, vardénafil, tadalafil (avec des valeurs de R_F croissantes); 2: Test solution (1 capsule/10 mL) [110].

L'adultération d'un produit fini ne se résume pas seulement à l'addition d'un composé synthétique, mais peut dans certains cas être plus compliquée. Chaque domaine d'activité apporte son lot d'adultérations plus ou moins connues, et il est donc utile d'en prendre connaissance au cas par cas. Le domaine des huiles essentielles en est un exemple tout à fait significatif.

Les huiles essentielles sont largement utilisées à travers le monde dans différents domaines : parfumerie, arôme, cosmétique, phytothérapie... De par leur caractère « naturel » porteur de valeur ajoutée, leur utilisation est en constante augmentation ce qui en fait une cible privilégiée des fraudeurs [112]. Dans ce domaine, l'authenticité peut être définie comme un extrait absent de corps étranger, de matière étrangère, ou d'impuretés. Chaque huile essentielle possède ses propres caractéristiques, qui sont d'un point de vue réglementaire, établies au travers d'une certification/label de qualité assurant leur composition chimique. Afin de comprendre la problématique de l'authentification des huiles essentielles, un travail d'analyse bibliographique a été réalisé dans le cadre de cette thèse et publié sous la forme d'un article de revue (*cf.* Article 1). Cette publication présente les notions d'adultération, ainsi qu'une vue d'ensemble des techniques d'analyse qui sont, ou qui pourraient être utilisées pour leur détection dans les principales huiles essentielles utilisées industriellement. Différentes méthodes d'analyse ont été étudiées, notamment physiques, chimiques, chromatographiques, spectroscopiques et thermiques. Une synthèse générale sur les huiles essentielles et leurs différents problèmes connus d'authentification / de falsification y est présentée. Cette partie est suivie par une partie sur les techniques d'analyse utilisées pour chaque cas d'adultération. Les cas de non-conformité des huiles essentielles en raison de leur dégradation ne sont pas abordés dans cette revue. La place de l'(HP)TLC y est abordée. En effet, l'(HP)TLC est un outil simple et efficace qui a fait ses preuves dans de nombreux cas d'adultération.

L'HPTLC a par exemple permis de détecter l'ajout d'huile essentielle de fenouil et d'huile essentielle d'anis étoilé japonaise dans l'huile essentielle de badiane de Chine [12], ou encore dans le cas de l'huile essentielle de lavande susceptible d'être adultérée par de l'huile essentielle de lavandin [113]. L'adultération de l'huile essentielle d'ylang-ylang par une huile végétale est également présentée (Figure 37) [114].

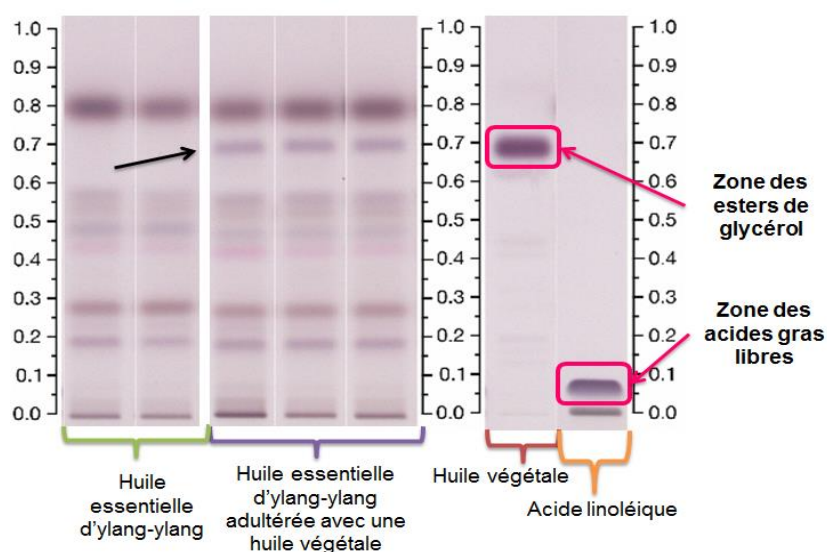


Figure 37: profils HPTLC de l'huile essentielle d'ylang-ylang et d'ylang-ylang adultérée par une huile végétale. La présence de l'adultération est marquée par la flèche noire [114].

De nos jours, les contaminations non intentionnelles et les adultérations motivées par des raisons économiques sont des questions considérées par les autorités. L'(HP)TLC s'étant montrée efficace dans ce domaine, elle a trouvé sa place dans certaines réglementations.

2.3.3.3. La place de l'(HP)TLC dans la réglementation

Les problématiques de contaminations involontaires, ou d'adultérations induites par des motivations frauduleuses nécessitent de développer de nouvelles méthodes de contrôle de la qualité des plantes et extraits naturels. Pour cela, des réglementations (pharmacopée européenne, américaine, chinoise, etc) sont en place dans certains pays, afin de gérer la sécurité, l'utilisation et l'étiquetage des plantes qui entrent dans l'industrie alimentaire, la médecine, et depuis quelques années dans le domaine des compléments alimentaires [115-117].

Regard des autorités sur l'(HP)TLC

Depuis 2015, la pharmacopée américaine a officiellement intégré l'HPTLC dans son chapitre général concernant les procédures d'identification des ingrédients d'origine botanique [118]. La procédure proposée est utilisée pour déterminer l'identité des ingrédients botaniques et les distinguer de certains autres ingrédients (adultérants). La détection d'adultérant(s) éventuel(s) peut dans certains cas être décrite. La pharmacopée américaine a également ajouté un deuxième chapitre complétant le chapitre général afin de donner les explications concernant les différents paramètres recommandés tels que : le contrôle de l'humidité, l'application par bande, la dérivation par immersion... [119].

Les autres pharmacopées n'ont pas publié de chapitres généraux officialisant l'utilisation de l'HPTLC, mais des méthodes TLC figurent dans leurs monographies*.

Méthodes (HP)TLC officiellement publiées

La plupart de ces sources comprennent des monographies qui fournissent des méthodes d'analyse pour l'identification des plantes ou extraits de plantes, notamment des méthodes TLC, ou pour certaines HPTLC (Tableau 8) [103]. Pour cela, des standards chimiques, des références botaniques et des échantillons sont analysés simultanément [120].

Tableau 8: exemples de sources fournissant des méthodes TLC ou HPTLC pour l'identification des plantes ou extraits de plantes.

SOURCES	NOMBRE DE METHODES TLC OU HPTLC
Pharmacopée européenne	196
Pharmacopée anglaise	11
Pharmacopée américaine	46
Pharmacopée chinoise	450

* Monographie : L'ensemble des critères permettant d'assurer un contrôle de la qualité optimale est regroupé et publié sous forme de monographies

Dans la pharmacopée américaine, l'utilisation de l'(HP)TLC est publié dans « *DSC dietary supplements compendium 2015* » regroupant les méthodes TLC et HPTLC utilisées pour l'identification des plantes et extraits de plantes utilisés dans le domaine des compléments alimentaires [121]. Pour chaque monographie, la méthode (HP)TLC est détaillée dans le volume 1, puis une illustration est donnée dans le volume 2 (Figure 38) [122].

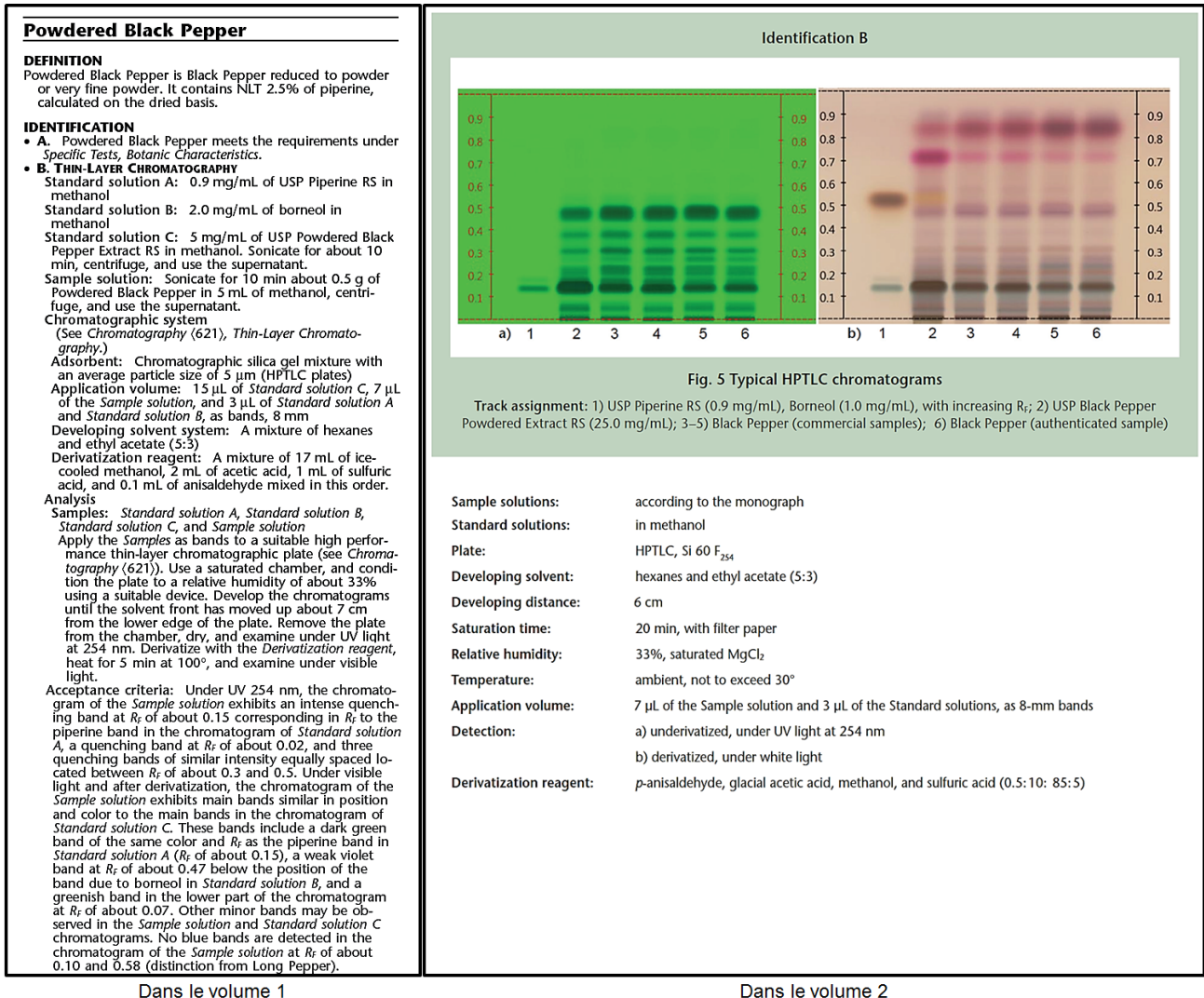


Figure 38 : exemple de monographie présente dans la pharmacopée américaine : le poivre noir [121, 122].

Contrairement à la pharmacopée américaine, les pharmacopées française et européenne ne fournissent pas d'illustration mais un descriptif de la méthode accompagné d'un tableau représentant le profil (HP)TLC à obtenir (Figure 39) [115].

Chromatographie sur couche mince (2.2.27).	
<i>Solution à examiner.</i> A 0,25 g d'extrait à examiner, ajoutez du <i>méthanol R</i> . Agitez, filtrez et complétez à 5 mL avec du <i>méthanol R</i> .	
<i>Solution témoin.</i> Dissolvez 2,0 mg d' <i>hypéroside R</i> et 2,0 mg de <i>rutine R</i> dans du <i>méthanol R</i> et complétez à 10 mL avec le même solvant.	
<i>Plaque :</i> <i>plaque au gel de silice pour CCM R</i> (5-40 µm) [ou <i>plaque au gel de silice pour CCM R</i> (2-10 µm)].	
<i>Phase mobile :</i> <i>acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R</i> (10:10:30:50 V/V/V/V).	
<i>Dépôt :</i> 10 µL [ou 5 µL] en bandes.	
<i>Développement :</i> sur un parcours de 15 cm [ou 5 cm].	
<i>Séchage :</i> à 100-105 °C.	
<i>Détection :</i> pulvérisez une solution de <i>diphénylborate d'aminoéthanol R</i> à 10 g/L dans le <i>méthanol R</i> , puis une solution de <i>macrogol 400 R</i> à 50 g/L dans le <i>méthanol R</i> . Laissez sécher la plaque à l'air pendant environ 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.	
<i>Résultats :</i> voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. D'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.	
Haut de la plaque	
_____	_____
Hypéroside : une bande de fluorescence orange-jaune	
	Une bande de fluorescence verte
	Une bande de fluorescence jaune
Rutine : une bande de fluorescence orange-jaune	
_____	_____
	Une bande de fluorescence verte
Solution témoin	Solution à examiner

Figure 39: exemple de monographie présente dans la pharmacopée européenne : la passiflore officinale [115].

2.4. Conclusion

Les améliorations réalisées dans le domaine des matériaux adsorbant, de l'instrumentation, de la quantification et des possibilités de détection ont conduit à une augmentation de l'utilisation de la chromatographie planaire et un élargissement de ses domaines d'application. Il s'agit d'une technique analytique utilisée dans l'analyse des produits pharmaceutiques, des plantes, des produits alimentaires, dans le domaine de l'environnement, ou encore pour l'analyse des échantillons cliniques. Dans tous ces domaines, l'(HP)TLC est utilisée pour des analyses qualitatives et quantitatives, mais aussi comme outil d'isolement/purification. C'est pour des analyses qualitative que l'(HP)TLC possède le plus d'applications et plus particulièrement comme outil d'identification phytochimique. Elle offre un large choix de révélateurs disponibles ce qui permet des criblages phytochimiques (alcaloïdes, flavonoïdes, lipides, composés aminés ...). De plus, la bioautographie permet d'étudier directement sur la plaque les effets de l'échantillon sur les micro-organismes (antibactérien, antifongique). Ses avantages en font également un outil de contrôle et de détection d'adultération. De nombreux contrôles d'authenticité et de qualité sont réalisés par (HP)TLC que ce soit pour les plantes ou pour les extraits de plantes. Les adultérations se faisant de plus en plus fréquentes, la place de l'(HP)TLC dans les différentes réglementations est de plus en plus discutée. Déjà officialisée dans certaines pharmacopées (européenne, américaine, chinoise ...), la technique est inscrite dans de nombreuses monographies afin de permettre de mettre en évidence des fraudes. Un exemple de domaine particulièrement touché par des contaminations involontaires, ou des adultérations induites par des motivations économiques est celui des huiles essentielles. Même si leurs analyses sont largement maîtrisées en chromatographie gazeuse il existe des méthodes développées en HPTLC permettant d'élargir les types de composés détectées, et ainsi de donner des informations supplémentaires.

L'article qui suit décrit les adultérations connues des principales huiles essentielles, ainsi qu'une description des techniques d'analyse utilisées afin de les détecter. L'intervention de l'(HP)TLC y est discutée.

Article 1

Thi Kieu Tiên Do, Francis Hadji-Minaglou, Sylvain Antoniotti, and Xavier Fernandez

Trends in Analytical Chemistry, 66, 2015, 146-157

Essential oil authenticity: a challenge for the analytical chemist.

Abstract

Essential oils are natural materials widely used in many fields all over the world and have become an integral part of everyday life. The increasing demand in essential oils, in a context where the use of natural extracts is seen as a strong marketing advantage e, and the pressure on this complex market have resulted in cases of adulteration of these highly valuable ingredients to cut costs. Authentication is thus a matter of critical importance for both consumers and chemical companies. This review presents a comprehensive overview of known adulterations in essential oils, and some analytical methodology adopted for the detection of the main adulterations encountered so far. At first, recommended tests were listed, and then common analytical techniques such as chiral GC, isotope ratio mass spectrometry, and NMR were explained and discussed. Additional techniques more or less used were also presented: (HP)TLC, vibrational spectroscopy, hyphenated and multidimensional chromatography, HPLC, and combination with chemometrics-metabolomics., This review provides a critical overview of the existing techniques, without ignoring the conventional knowledge of the art.

Keywords: Fraud, adulteration, control, quality, alteration, natural extracts, analytical chemistry.

Abbreviations: AFNOR, Association française de normalisation; AED, Atomic emission detector; ANRT, Association nationale de la recherche et de la technologie; BS, British standard; DSC, Differential scanning calorimetry; EFSA, European food safety authority; EO, Essential oil; FID, Flame ionization detector; FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy; GC, Gas chromatography; HPTLC, High performance thin layer chromatography; IFRA, International fragrance association; IR, Infrared; IRMS, Isotope ratio mass spectrometry; ISO, International standard organization; LC, Liquid chromatography; MDGC, Multidimensional gas chromatography; MS, Mass spectrometry; NIR, Near infrared reflectance; NMR, Nuclear magnetic resonance; Ph. Eur., European pharmacopoeia; PS, Photoacoustic spectroscopy; SFE, Supercritical fluid extraction; SNIF, Site-specific natural isotopic fractionation; TLC, Thin layer chromatography; TOF, Time of flight; USP, United state pharmacopoeia.

Contents

1. Introduction	2
2. Generality on essential oils	2
2.1. Definition and composition	2
2.2. Regulations	3
2.3. Characterization of essential oils	4
2.4. The problem of the authentication of essential oils	6
3. Known cases of authentication issues	6
3.1. Addition of other products: oil, solvents	6
3.2. Addition of specific compounds: synthetic, natural	6
3.3. Addition of another essential oil	7
3.4. Other cases	7
4. Techniques for the authentication	8
4.1. Tests recommended by the authorities	8
4.2. Analytical techniques commonly used for the detection of adulteration	9
4.3. Additional techniques used for authentication of essential oils	11
4.4. Emerging techniques for the detection of adulteration	12
5. Summary of main essential oils authentication problems and their recommended analytical methods	13
6. Conclusion	20

1. Introduction

Essential oils have been widely used all over the world and their use is constantly increasing because of the strong demand for pure natural ingredients in many fields [1]. Thus, large quantities of essential oil are produced worldwide to fuel the industries of flavours and fragrances, cosmetics, and the health industry with aromatherapy and phytomedicine [2, 3]. Along with the increase in the consumption of essential oils, the quantities produced around the world are variable and difficult to estimate, because sales figures from many countries are not fully available. In addition, domestic consumption in producing countries is often ignored. Some of these essential oils are produced at very large scales: for example in 2008, production of orange oils was ca. 51 000 tons, corn mint oils ca. 32 000 tons, and lemon oils ca. 9 200 tons. Essential oils of citrus, which included a great number of fruits from the genus *Citrus*, are the most popular of natural essential oils and account for the largest proportion of commercial natural flavours and fragrances [4]. Some others are produced at much smaller scale due to their rarity, but are traded at very high prices: it is the case of agar wood oil (6 000-11 000 €/kg), iris (6 200-100 000 €/kg depending on the irones concentration), or rose oil (6 000-10 000 €/kg). These prices are variable and may be related to the scarcity of the raw material, harvesting issues, climate dependence, extraction yield... Essential oil industries cumulated sales represented several billions USD in 2008 [3, 5].

The use of natural extracts is seen as a strong marketing advantage in the manufacture of many goods, but the prices for natural extracts are often much higher than those of synthetic materials, and as a result, there are many adulteration cases [6]. Authenticity can be defined as free from alteration in the sense of absence of foreign bodies or extraneous matter, but it also suggests free from impurities in the raw material itself [7]. Thus, authentication is an important subject for consumers. From the regulatory point of view, quality standards have been established through the requirement of quality labels that specify the chemical composition of each essential oil. From an economic point of view, authentication is of critical importance to avoid unfair competition that can create a destabilized market and disrupt local and even national economy of producing countries [8].

The purpose of this review is to present a comprehensive overview of analytical techniques that could be used in the detection of known adulterations. It is known that the chemical constituents in component essential oil may vary depending on harvest season, habitat, drying processes, extraction and isolation techniques used and many other factors. Thus, it seems necessary to determine a profile of the constituents of essential oil. Several regulations exist and take into account of this variability in chemical composition. By this way, the authenticity is controlled by all the quantitative values included in the monographs. In general, few compounds/markers in essential oils have been used for evaluating the quality and the authenticity of essential oils. Out of the scope of this review are the cases of non-compliance of essential oils caused by degradation. We have considered different analytical methods including physical, chemical, chromatographic, spectroscopic and thermal techniques. A general synopsis on essential oils and their different known problems of authentication/adulteration is presented, followed by the recommended analytical techniques for each case.

2. Generality on essential oils

2.1. Definition and composition

According to the "Association Française de Normalisation" (AFNOR) and to the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), an essential oil is clearly defined as a manufactured product from pure and identified raw materials of plant origin, obtained either by steam distillation, mechanical processes (e.g. EO from *Citrus*), or by "dry" distillation for some woods (Table 1). The essential oil is then separated from the aqueous phase by physical processes [9, 10].

Table 1: Differences in term of composition of lime oil with different processes of extraction, obtained by GC/FID on apolar column [49].

Hydrodistillation (SD)	Expression
Limonene (36.0-46.0%)	Limonene (38.0-44.0%)
γ -terpinene (10.0-13.0%)	β -pinene (17.0-19.0%)
α -terpineol (6.0-8.0%)	β -bisabolene (4.0-4.5%)
p-cymene (1.5-2.8%)	α -pinene (1.7-2.0%)

Essential oils can be terpene-less, sesquiterpene-less, corrected, or deprived of a substance by partial removal, such as methyleugenol in rose oil or furocoumarines in citrus oil [11]. Due to the various processes and the multiple parameters involved, essential oils are complex matrices comprising hundreds of compounds with various structures and functional groups (Table 2). These compounds are mainly derived from three biosynthetic pathways: mevalonate pathway, methyl-erythritol-pathway and shikimic acid pathway [5]. Among these components, the most common are volatiles terpenoids compounds derived from a common precursor: isopentenyl diphosphate. Once biosynthesised, terpenes are diversified through various enzymatic reactions, such as isomerisation and oxidation [2, 3, 12, 13]. This chemical diversity could also be enhanced by chemical modification occurring during the extraction process, by thermal activation of chemical reactions. For example, the distillation by dry vapour stream is known to reduce the risk of hydrolysis of esters such as linalyl acetate, flame distillation is known to promote "burnt" olfactory notes, or cohobating is known to increase the content of certain compounds such as sulphur compounds [14]. Essential oils can also be produced from different chemotypes (providing distinct chemical entity within the same botanical species), such as thyme essential oil that is known to have 7 chemotypes. The issue of authentication of chemotypes is not addressed in this review.

Table 2: Examples of compounds found in essential oils [1].

Compound	Essential oil
Menthol	Mint,
Linalool	Lavender, cardamom
Thymol	Thyme,
Eugenol	Clove
Carvone,	Caraway,
α -vetivone, β -vetivone	Vetiver
Benzoic acid,	Apple,
Cinnamic acid	Cinnamon
Citral,	Lemon,
Cinnamic aldehyde	Cinnamon
Geranyl acetate,	Geranium,
Linalyl acetate	Lavender
Limonene,	Orange, lemon
Pinene,	Geranium, star anise
Caryophyllene	Clove

2.2. Regulation

The diversity of chemical functions encountered in essential oils offers a variety of properties, and subsequently a variety of uses. Sometimes, these compounds can also have undesired properties such as allergenicity or toxicity, resulting in both safety and security concerns. For this reason,

standards and specifications have been established by national authorities and international organisations to limit and control the use of essential oils. To achieve this, monographs are set and contained specifications that define the qualitative and quantitative characteristics of a substance in order to ensure optimum quality compatible with the requirements of public health. These monographs are produced by international organizations/associations such as the International Standards Organization (ISO), the European Pharmacopoeia, the *Codex Alimentarius* commission, the Food Chemicals Codex, the flavour and Extract Manufacturers Association (FEMA), or the Research Institute for Fragrance Material (RIFM). Some other national authorities issuing recommendations are the British Standards (BS), the French AFNOR Standards, and the Essential oil association of USA, the US Pharmacopoeia (USP), the Indian Standard, the German DIN Standard, or the *Deutsch Arzneibuch* [12, 15]. The use of essential oils is also governed by specific regulations from application areas, e.g. the Cosmetics Regulation (CE 1223/2009), or the European Food Safety Authority (EFSA). There are also non-governmental organizations supported by industrial companies who study and gather chemical, technical, and toxicological information about the ingredients used in perfumery. This is the case of the International Fragrance Association (IFRA), which publishes recommended practices of use, usually followed by professionals [16].

2.3. Characterization of essential oils

Essential oils are complex matrices that need to be analysed by different techniques to ensure quality, consumer safety, and fair trade. Thus, there are a wide range of instrumental techniques available as physical, organoleptic, chemical, chromatographic, and spectroscopic analysis (Fig. 1) [15, 17-19]. The olfactory analysis could be envisaged, but is typically performed by a trained evaluator. It is often carried out by the comparison with a conform sample. Physical measurements required in most monographs are: density, refractive index and optical rotatory power. The density of an essential oil is the ratio between its volumic mass and the volumic mass of a reference compound (water). The refractive index is the ratio between the sinus of the angle of incidence and the sinus of the angle of refraction of a luminous ray of a predetermined wavelength in the essential oil maintained at a constant temperature. The optical rotation of an essential oil is the angle of rotation of the plane of polarization of light radiation at a wavelength of 589 ± 0.3 nm when it passes through a thickness of 100 mm of essential oil in well-defined temperature conditions [14,18]. Physical analysis and organoleptic analysis are simple, cheap, and fast techniques for identifying gross falsifications, but do not allow the identification of more subtle adulterations.

In regards of chemical analysis, analyses are mostly carried out by titration for the determination of the water content, the ester and the iodine values, the carbonyl index, the alcohol content and the total free alcohol content, the phenol content, or the peroxide contents [14]. These techniques are simple, fast, cheap, and allows the identification of simple problems.

The control of essential oils could also involve chromatographic techniques such as gas chromatography, and spectroscopic analysis to provide more accurate information on the chemical composition of the extract and allows for the quantification of the compounds of interest via universal or specific detectors [2, 20, 21].

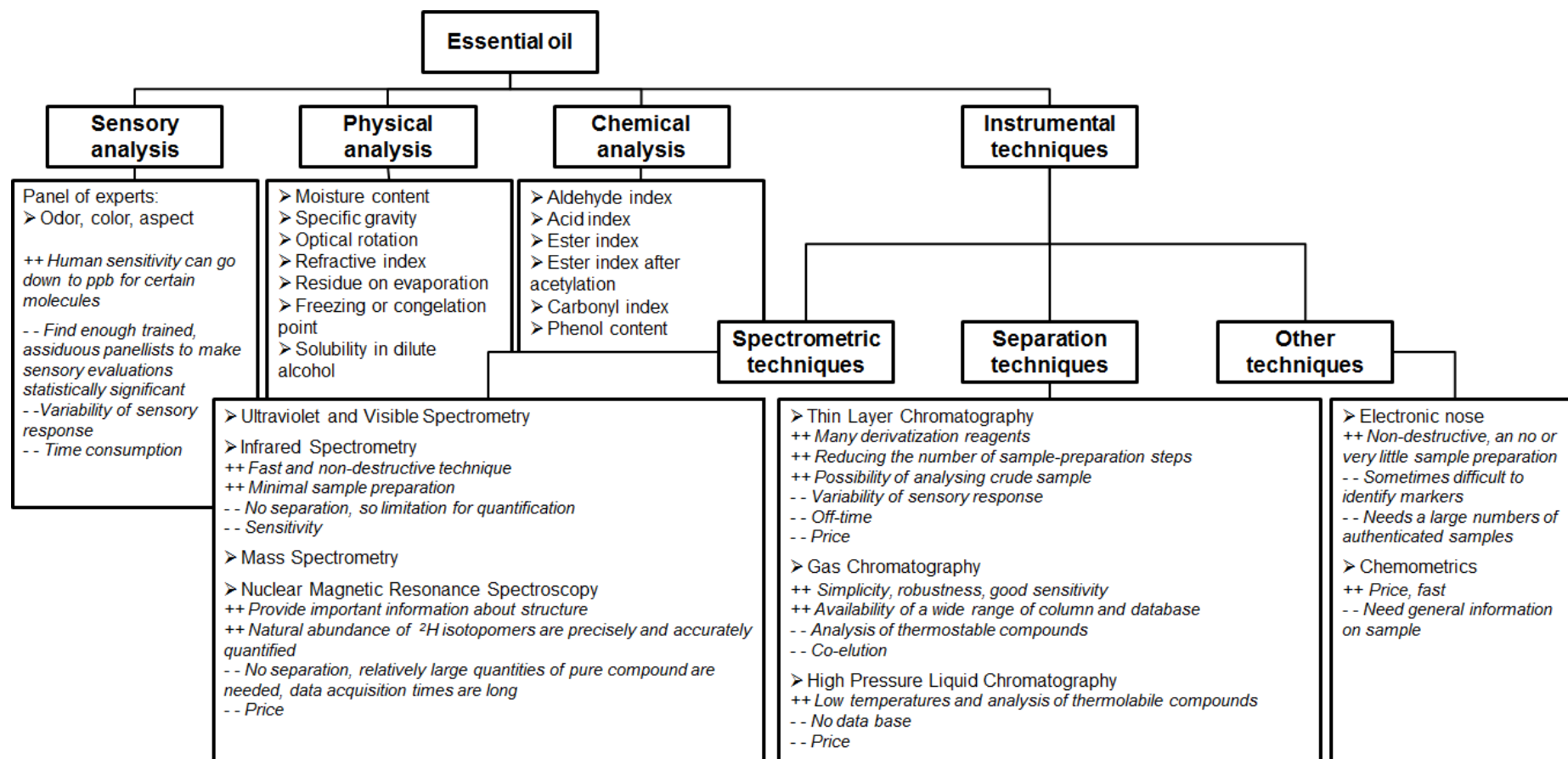


Fig.1: Advantages and disadvantages of quality assessment techniques. ++: Advantages; --: Disadvantages.

2.4. The problem of the authentication of essential oils

Essential oils are used all around the world, but the problem of adulteration can slow or jeopardise the development of international trade [22]. The prices are typically ranging from few to thousands euros and are variable from one year to another. The prices are correlated to the importance of use of essential oils, which have resulted in cases of adulterations for the dishonest optimisation of profits [23, 24]. Alteration of essential oils can be due to several factors. In some cases, falsification can be defined by the addition of cheaper synthetic material, the addition of cheap volatiles from other natural sources [23], or the addition of vegetable oils to increase the weight. The adulterations can also consist on the partial or total substitution of part of the original plant by other plants [25], or the addition of non-volatile products.

All these adulteration methods can lead to the decrease of the quality and in the case of the addition of one or more synthetic compounds, alteration can lead to unsafety issues or non-compliance with the natural grade. Consequently, authentication is an important topic regarding consumer protection and the quality of essential oil production [26]. Adulteration of the essential oils can also have an effect on the regulatory aspect, as the essential oil may no longer comply with specifications of standardization. Most of the time, adulterants are added at low level (5-8%) to avoid detection by common analytical methods [27].

3. Known cases of authentication issues

Control methods and standardization of essential oils are intended to attest their compliance with monographs or standards of quality, but in the case of non-compliance, the results do not necessarily reveal an adulteration. For example, aging, processing or storage, can induce a racemisation of chiral compounds, or terpenoids polymerisation reactions, and can make the optical activity values out of the specifications without being adulterated [28].

Some cases of alterations are already known: the addition of a non-volatile ingredient, addition of synthetic or natural compounds, or the addition of a cheaper essential oil [21].

3.1. Addition of other products: oil, solvents

Essential oils are volumes and turnovers significant, and therefore are sometimes subject to dilution by adding a non-volatile ingredient to reduce the cost. This is the case with the addition of vegetable or mineral oil because of their relatively low cost, their easy availability, their closed density, and a greasy feeling reminding that of essential oils [3, 8, 21]. This kind of alteration only results in a dilution, which reduces the scent of the essential oil [29].

A study on lemongrass oil has identified kerosene or coconut oil as adulterants [30, 31]. Another example of this kind of alteration is sandalwood oil diluted with polyethylene glycol [31]. Other solvents that could be used are triacetin, triethyl citrate or benzyl alcohol, ethyl alcohol and in the case of aromatherapy, vegetable oils such as like almond oil [32].

3.2. Addition of specific compounds: synthetic, natural

Standardization of essential oils is defined by values with low and/or high limits of selected compounds content. Commercial essential oils are required to comply with sets of such standards [15]. For this reason, cases of addition of a compound, synthetic and nature-identical or natural, can be found. By definition, natural compounds are obtained directly from natural sources by enzymatic, microbial, or physical procedures [12, 27]. Those specific types of alterations can be motivated by different reasons. One reason could be to enhance the quality of the essential oil, in term of compound contents. This kind of adulteration can be done to increase the benefit of essential oils and meet the needs of industry [33]. For example, it is the case by adding citral to lemon (*Citrus lemon* L.) essential oil [34], benzyl benzoate to balsam of Peru (*Myroxylan balsamum* (L.) Harms) [25], or synthetic irone to iris oil [35]. In this case, the price of the iris essential oil varies greatly depending on the percentage of irone. For example, the price of an iris oil containing 8% irone is 6 200 €/kg, while with 10% irone it

increases to 9 750 €/kg, and could even reach 101 000 €/kg for pure iron. The price difference can be really large, which is a good reason for the adulteration of iris oil, particularly because a mixture of isomers of synthetic α -iron and β -iron cost only around 25 €/mL. Another reason could be to improve the olfactory quality of the essential oil, as it is the case for bergamot oil (*Citrus aurantium* L. spp. *Bergamia*) or lavender oil (*Lavandula angustifolia* Mill.) for which the addition of linalyl acetate or linalool has been reported, or for vetiver oil (*Vetiveria zizanioides* (L) Nash) with the addition of a mixture of terpenyl and cyclohexanol, in order to increase the sandalwood note [21, 23]. Essential oils are sometimes used for medicinal properties [36] and therefore can be altered by the addition of other oils containing the bioactive compound(s) of interest. It is the case of chamomile oil (*Chamomilla recutita*, syn. *Matricaria chamomilla*), which is used for its content of α -bisabolol, and could be altered with synthetic bisabolol [23, 37].

3.3. Addition of another essential oil

The addition of another essential oil can be motivated by olfactory and/or economic reasons. To do this, the alteration can be made by an essential oil of lower quality but with relatively the similar olfactory notes [34, 38]. This is especially the case when there is a significant price difference between the two oils. One of the most known examples is the adulteration of essential oils from citrus by sweet orange essential oil, which is the cheapest citrus oil. Another typical example is lavender essential oil (*Lavandula angustifolia* Mill.) whose price can reach 130 €/kg, and which could be mixed with the essential oil of other species of the genus *Lavandula* whose prices are around 20 €/kg [23]. Lemon balm essential oil (*Melissa officinalis* L.), a highly valued (ca. 5 000 €/kg) raw material produced in low yields and featuring a pronounced medicinal interest, could be mixed with cheap citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) [39].

Adulteration can also occur by mixing different essential oils obtained by the extraction of different parts of the same plant. Cinnamon bark essential oil can be adulterated by leaf cinnamon essential oil to reduce the presence of allergens such as cinnamaldehyde. The leaf oil, while possessing the same olfactory notes, although less “gourmand”, has indeed less cinnamaldehyde contents. This type of fraud can reduce the allergenic effect but also increase the volume and hence, the profit [40]. Concerning all types of citrus oils, another well-known falsification is the above-mentioned addition of orange essential oil (*Citrus aurantium* var. *sinensis* L.) [41]. Another case concerning citrus oil, is neroli oil made from flowers (*Citrus aurantium* L. spp. *Amara* L. var. *pumilia*), frequently mixed with the cheaper petitgrain oil made from leaves [23].

3.4. Other cases

Another example of fraud worth mentioning is the case of wintergreen essential oil that can be completely substituted by methyl salicylate [42]. A gross case of adulteration could be the use of synthetic oil, consisting in a mixture of synthetic compounds resembling the formulae of the natural essential oil, in lieu of the valuable natural material. Additionally, bergamot oil or geranium oils can be obtained by mixing monoterpenes and distilled oils of different origins, linalyl acetate and other citrus oils [32, 43].

In summary, the diversity of the adulteration strategies is in relation with the large and diverse collection of essential oils used in the manufacture of valuable goods, making each case different from the others.

4. Techniques for the authentication

Two main approaches for the determination of alteration are possible: the monitoring of the global fingerprint of the product, or the search of one or more specific markers in the product. To carry out these controls, modern analytical techniques are typically used [8], but simple tests are also available, set up a long time ago before the advent of more powerful analytical devices. These methods proved to be useful and widely used, but have shown defects over time. For example, the use of the iodine test can be used to characterise the oxidation of the product, considered an indication of adulteration

by vegetable oils [44]. Another test can be performed by a saponification reaction with aqueous potassium hydroxide. The formation of crystals indicates a potential fraud by addition of esters [45].

4.1. Tests recommended by the authorities

The control of the conformity of an essential oil starts with the a series of tests according to the recommendations from certification and regulation authorities (ISO, pharmacopoeia...) to ensure identity, quality, safety and efficiency of the extract [46].

The first step is the sensory analysis which is by definition the examination of the organoleptic properties of a product by the sense organs. This type of analysis can be performed either by a sensory analysis panel that will evaluate the essential oil, or, as indicated by the ISO recommendations, by a group of assessors selected to form the sensory analysis panel that will be a true "measuring instrument" [47]. This necessary step has however the disadvantage of involving trained panellists in time-consuming operations [48]. There are indeed two types of experts: the "expert assessor" and "specialized expert assessor". The former is a selected assessor with a high degree of sensory sensitivity and experience of sensory methodology, able to make consistent and repeatable sensory assessments of various products. The latter is a subject who has additional experience as a specialist in the product and/or process and/or marketing, and able to perform sensory analysis of the product and to evaluate or predict effects of variations relating to raw materials, recipes, processing, storage, ageing, etc. Selection of individuals to set the panel for sensory analysis must be performed with care and requires guidelines for the selection, the training and the monitoring of assessors [47]. Once the assessors selected, a standard methodology following ISO recommendations must be applied. Sensory analysis has the advantage of avoiding costly investments for the purchase of analytical instruments, but requires time and assiduity of the assessors for both the training and the evaluation [48]. The result of the panel can be as simple as just indicating compliance or non-compliance of the essential oil, or more complicated with statistical analysis and comparison with an essential oil used as reference [47].

The second step consists in a series of physical and chemical analyses. The physico-chemical properties are determined by standardised methods such as measuring the ester, acid, or carbonyl index, or the refraction, density, optical rotation, freezing or boiling points, or by ethanol or moisture quantification, for example [49]. Quality control and assessment of essential oils can be performed based on these techniques, and possible alteration can be detected [50]. Some essential oils, such as citrus oils, which contains predominantly (+)-limonene, will have a lower specific gravity and a lower optical rotation in the case of addition of turpentine because α -pinene, its major component, has a lower boiling point and a lower optical rotation [21]. In the case of addition of synthetic anethole in star anise (*Illicium verum* L) essential oil, a change in the optical rotation could be observed and used as evidence of fraud. For the case of peppermint oil, addition of turpentine is characterized by a freezing point lower than 10.5 °C [40].

These simple and effective methods are however not sufficient in the case of more subtle adulteration. It is then necessary to use more powerful analytical techniques: separation techniques (gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC), high performance thin layer chromatography (HPTLC)) and spectroscopic techniques (vibrational techniques, nuclear magnetic resonance). Falsification with ethanol, edible oils, or liquid paraffin can be detected by thin layer chromatography (TLC), GC or infrared spectroscopy (IR spectroscopy) [40]. GC analysis is the last step recommended in some monographs, as it is a key technique in the analysis of essential oils. The analysis of qualitative and quantitative composition by GC provides a chromatogram sufficiently fine to highlight quality defects. In this regards, comparisons are made from the chromatographic profile obtained by GC equipped with a flame ionization detector (FID), FID detector providing a large range of linearity and relatively simple maintenance requirements. GC is effective for the quality control of an essential oil, by comparing the chromatogram of the product with a standard meeting the chosen specifications. The required steps are, firstly, to identify the appearance or disappearance of peaks on the chromatogram and, secondly, to compare the relative percentage area to determine whether their

differences are significant for the product analysed, although this technique gives only an approximation of the real quantity of a component present in the sample tested. Various perfumery materials were characterised qualitatively and quantitatively by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) in order to be accurately characterised and to detect alteration [51]. In the case of sandalwood oil, GC-MS analysis provides a reliable evaluation of the santalol content as a valuable marker in the detection of adulteration by the addition of synthetic material such as Sandalore® [52], Verdox®, Santaliff®, Vertofix coeur®, or Ebanol® [53].

4.2. Analytical techniques commonly used for the detection of adulteration

4.2.1. Chiral GC analysis

Chiral GC technique is practical and powerful for the authentication of essential oils and is becoming crucial for the detection of adulterants [32, 33, 54-56]. Plants produce metabolites in many instances as chiral molecules, and enantiomers can differ from one species to another within the same genus. Although presenting the same physicochemical properties, excepted the optical activity, enantiomers can exhibit divergent biological activities, one enantiomer being harmless while the other enantiomer is toxic, and thus appropriate and efficient chemical analyses are mandatory [57]. For example, (R)-limonene is responsible for the odour of oranges while (S)-limonene accounts for the odour of lemon. (S)-Carvone is the key-odorant of the essential oil of caraway (smell of cumin), and it is (R)-carvone in the essential oil of spearmint (smell of spearmint). In others cases, one or more stereoisomers could be less active or even odourless, such as (R)-linalool which presents a powerful flowery note while (S)-linalool is less intensive, or (2S,4R)-cis-rose oxide which has a powerful rosy scent while (2R,4S)-cis-rose oxide is odourless [28]. Compounds from essential oils are, in most cases when applicable, chiral compounds occurring in specific enantiomers ratios, often specific to the essential oil. It is for example the case for α -pinene, β -pinene and limonene, making these compounds good markers of the origin and subsequently of adulteration by mixing of these materials of different origins (Table 3) [47]. Chiral analysis allows detection of adulteration of natural products with synthetic substitutes, usually in the racemic form, or bulking oils from other crops, by using values of enantiomeric purity and enantiomeric excess. Those values consist by a measured ratio of detected enantiomers expressed as a percentage, and by the relative difference of the separated enantiomers also expressed as a percentage [28, 33, 47, 58]. One example is the case of rose and geranium essential oils with (-)-trans rose oxides which are a specific indicators of genuine rose oils and can discriminate rose oils from geranium oils [28]. Chiral analyses also allows for the detection of the addition of synthetic linalool and linalyl acetate in lavender oil [7, 8, 59]. Another case of chiral analysis is the analysis of limonene, which shows a high ee-value in favor of (R)-limonene for bergamote, orange, mandarine, lemon, or lime oils, and a high ee-value in favor of (S)-limonene for lemongrass or citronella oils [28].

By this way, chiral analysis plays a critical role in the field of essential oil analysis and has been among the most important analytical techniques in this field these last decades. It is a cheap and sensitive technique, but its use requires preliminary method development which can be long especially because there is no universal chiral stationary phase [60]. In the case of essential oils some non-enzymatic reactions or racemizations can occur during processing or storage, which can induce false positive responses [29].

Table 3: Enantiomeric Ratio (%) of α -pinene, β -pinene and limonene. [28]

	α -pinene		β -pinene		limonene	
	1S	1R	1S	1R	4S	4R
Oil of bergamot	72	28	94	6	14	86
Oil of bitter orange	8	92	97	3	1	99
Oil of grapefruit	-	100	34	66	tr	100
Oil of lemon	67	38	95	5	1	99
Oil of lime	76	24	97	3	2	98
Oil of orange	tr	100	46	54	tr	100
Oil of neroli	77	23	96	4	3	97
Oil of petitgrain	82	18	98	2	12	88
Oil of mandarin	43	57	3	97	tr	100
Oil of citronella	23	77	tr	tr	96	4
Oil of lemongrass	96	4	tr	tr	100	tr

tr = trace < 0.5%

4.2.2. Isotope ratio mass spectrometry

To certify the naturality of one or more components of an essential oil, another kind of analysis to be performed is isotope ratio analysis by mean of Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS), or Stable Isotope Ratio Analysis (SIRA). Plants can be discriminated by their metabolic assimilation of atmospheric CO₂ and in particular by reaction intermediates derived from carbon dioxide incorporation (molecules of 3 or 4 carbon atoms). Most plants go through 3-phosphoglycerate, an intermediate with 3 carbon atoms (C₃). The C₄ plants pass through a malate intermediate with 4 carbon atoms. Some plants are able to select either glycerate or malate pathway (CAM cycle) depending on their environment. These metabolites are not exhibiting the same isotopic fractionation, and this difference therefore allows distinguishing plants by their isotopic ratio [61, 62]. The measurement of isotopic variations in natural compounds is based on the principle that the majority of chemical elements have different stable isotopes that result in distinct molecular weights [63]. For each element, one or more isotopes are present at different levels, with a specific distribution pattern. The ratio between the stable isotope ratio of carbon, hydrogen, oxygen, or nitrogen within the metabolites can allow the detection of accidental or deliberate addition of a synthetic product (predominantly of fossil origin), or even the discrimination of different geographical or botanical origins [15, 23, 24, 33, 43, 64]. This evaluation of isotopic data has been established as the premium analysis of flavors and fragrances origin and naturality [65].

IRMS is most of time coupled with combustion/pyrolyse (C/P IRMS) for adulteration control. This technique can give a reliable differentiation of natural from synthetic for mandarin essential oil regarding the C isotope ratio measurements for terpinen-4-ol, γ -terpinene, α -terpineol, and terpinolene. The authenticity of thyme and oregano essential oils can be based on the H isotope ratio measurements for carvacrol and thymol [24, 38, 55]. IRMS also allows the detection of addition of synthetic benzaldehyde in bitter almond oil [66].

IRMS is a very powerful technique, but it requires a significant financial investment, as well as an experienced operator. In addition, its use requires databases which are relatively long to build.

4.2.3. NMR spectroscopy

NMR spectroscopy provides information for the control of authenticity by determining stable isotope ratios, affording a mean for measuring isotopic patterns within natural and synthetic molecules for differentiation purposes [8, 33, 42, 67, 68]. The investigation of site-specific natural isotope fractionation (SNIF-NMR) based on the measurement of deuterium/hydrogen (D/H) ratios at specific positions of a molecule has enable a characterization of the nature of the plant precursor [8, 69].

Quantitative deuterium NMR measures significant variations of deuterium isotopic distribution according to the origin of the molecule, and has also a discriminant potential to characterise the enantiomeric purity of compounds such as α -pinene, or methyl salicylate [42]. SNIF-NMR is also used to determine the addition of synthetic linalool in essential oils, or to detect the addition of (-)- α -bisabolol extracted from plants of the genus *Vanillosmopsis* to chamomile oil [15].

NMR is a powerful technique but its use needs the isolation of the compounds, databases, an experienced operator and a significant investment.

4.3. Additional techniques used for authentication of essential oils

4.3.1.(HP)TLC analysis

Even though GC-MS is the method of choice for the analysis of essential oils, (HP)TLC has become widely accepted by pharmacopoeias, and regulatory agencies as a well suited tool for the identification of essential oils and detection of adulteration [13, 33, 45, 70]. (HP)TLC enables the mobile phase to progress by capillarity over a plate charged with a stationary phase along with compounds from a mixture. Different lengths of migration will be observed for each compound depending on mechanisms of partition between the mobile and stationary phases and adsorption phenomenon. The most recent advances of this technique were mainly observed on the quality of stationary phases and the efficiency of detection techniques. High performance stationary phases, characterised by smaller particle sizes with narrow size distribution, were developed. This allows increasing the resolution and reproducibility of TLC analysis. Similarly, new stationary phases such as chiral phases were developed and are now commercially available. The detection systems have also been considerably improved with for example the set-up of scanners for densitography ranging from 190 nm to 900 nm [71]. TLC can be coupled with powerful detection systems: mass spectrometry, infrared and Raman spectroscopies [18]. (HP)TLC have quickly established as a method of choice for analysis and control, for example in the adulteration of ylang-ylang essential oil by sunflower oil [72]. The European Pharmacopoeia provides a few TLC methods for the identification of essential oils adulteration, such as alteration of anise oil by fennel oil, or Chinese star anise oil by Japanese star anise oil [70]. HPTLC can be automated and allows the fast analysis of numerous samples (more or less complex) simultaneously, and is considered as a greener technique by reducing the amount of waste (including volatile organic compound), of material, and of energy costs. Despite these advantages, HPTLC has some disadvantages as an off-time technique and requires initial investments for the acquisition of the equipment.

4.3.2.Vibrational spectroscopy methods

Vibrational spectroscopy is a chemical analysis technique focusing on covalent chemical bonds of molecular constituents within the sample. This technique is based on the interaction of light and matter and resulting molecular vibrations. Raman spectroscopy provides information about spectrometric diffusion from vibrational state of a molecule. Infrared spectroscopy (IR) is based on the modification of vibrational and rotational energies of chemical bonds. The infrared spectrum is ranging from microwave to visible wavelengths of the electromagnetic spectrum, or in mid-infrared regions (MID-IR). For Near Infrared Reflectance (NIR), the nominal range of wavelengths used is between 1 100 and 2 500 nm [57, 73-76]. Combined with chemometric algorithms (metabolomics), those techniques are gaining importance in the purpose of fast controls of essential oils [2, 22, 77]. For example, using spectroscopy analysis allowed discriminating different eucalyptus essential oils [78]. IR and Raman can also be used for the detection of cottonseed oil and paraffin oil in different essential oil by the presence of absorption bands characteristic of ester and unsaturated ester ($1\ 705$ - $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$), acetates ($1\ 245\ \text{cm}^{-1}$) and carbonyl group ($1\ 250$ - $1\ 170\ \text{cm}^{-1}$) for cottonseed oil, and saturated and unsaturated hydrocarbons ($3\ 000\ \text{cm}^{-1}$) for paraffin [40]. NIR spectroscopy becomes promising in quality control, since large sets or single samples can be quickly analysed in order to identify suspect samples without requiring further testing by more time-consuming and expensive methods [22].

4.3.3. Hyphenated and multidimensional chromatographic techniques

Essential oils are complex matrices and their chromatographic analyses on one dimension do not avoid coelution issues. It is under these circumstances that multidimensional chromatographic techniques can solve the problem because they offer better separation capacities. Multidimensional separation technique is defined as an orthogonal two-step separation. The sample is transferred from the separation system 1 (e.g. column 1 for gas chromatography) to the separation system 2 (column 2) [60]. Two orthogonal columns are commonly used: usually a non-polar first column and a second a polar column. Two main approaches are adopted in GC analysis of complex volatile fractions of plant matrices: the so-called heart-cut GC-GC and the two dimensional comprehensive GC (GCxGC), or more simply GCxGC [79]. Heart-cut GC-GC is a technique where analytes or individual segment eluting from a first column (1D, first dimension) are on-line and directly transferred to the second column (2D, second dimension) for further separations, using a valve or Deans switch device [80]. With a comprehensive GCxGC system, the entire sample passes through the two capillaries connected in series with a transfer device [81]. Multidimensional GC finds application in the field of environmental analysis, in the oil refining and petrochemical industry, and in the field of natural extracts [79, 82, 83]. Association of mass spectrometry with multidimensional gas-chromatography (MDGC-MS), or gas chromatography-time of flight mass spectrometry (GC-TOFMS) are analytical techniques available for the control of essential oil, but the use of TOFMS is not very affordable and requires also trained users [33, 55]. It is the case for sandalwood essential oil, where multidimensional GC instrument coupled with MS or FID enabled the high-resolution separation of santalol isomers, and provides elements of proof of the genuine sandalwood oil quality [53]. Besides the question of coelution of one or more metabolites of the sample, GCxGC gives access to more detailed and comprehensive overview of the chemical composition, thereby increasing the number of possible markers, or the reliability of fingerprinting. Multidimensional chromatographic techniques coupled or not with MS detector have greatly enhanced separation power, which have simplified the sample preparation in target analysis. GCxGC has the disadvantage to need slow temperature program rate in the first dimension, and also a detector with a high frequency. The data reprocessing is not easy and the instrument is not very affordable.

Combination of chiral analysis with multidimensional GC (enantio-MDGC) is an alternative for analysis of essential oil with a high degree of molecular complexity [33]. Enantioselective GC coupled on-line with IRMS has been recently used in origin-specific analysis of flavour and fragrances compounds. Analyses are focused on $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of the detected enantiomers [65].

4.4. Emerging techniques for the detection of adulteration

Some existing techniques are already used in the field of natural extracts but for different purposes.

4.4.1. Application of chemometrics

The fingerprint of an essential oil can be defined as a characteristic profile reflecting the complex chemical composition of the sample, and can be obtained by many analytical techniques. In essential oils, there are a lot of unknown components often present only in trace amount. Even if chromatographic instruments have shown a great improvement in term of separation over the years, selection of just few components should not be considered for evaluation the quality and the authenticity of essential oils samples. Consequently, to obtain reliable fingerprints that represent chemically characteristic components is not an easy task. Chemometrics such as multivariate analysis, chemical pattern recognition methods with principal component analysis and soft-independent modelling of class analogy are now greatly appreciated for providing reasonable characterization of essential oil. Chemometrics are defined by The International Chemometrics Society as “the chemical discipline that uses mathematical and statistical methods, (a) to design or select optimal measurement procedures and experiments; and (b) to provide maximum chemical information by analysing chemical data”. Nowadays, chemometrics are applied in many fields such as analytical chemistry including the separation methods such as chromatography (LC, GC, TLC), electrophoresis, and spectroscopic methods such as Raman, Fourier transform spectroscopy (FTIR),

NIR, MID-NIR [18, 84-87]. Indeed, reprocessing data by using chemometric allows obtaining more information about samples. Several application areas already benefit from the advantages provided by chemometrics, such as metabolomics which is a chemometric approach used for phenotyping and biomarkers research [88]. In essential oil authenticity, chemometrics are playing a role of increasing importance. Indeed, more and more articles are published on the integration of chemometric approach in essential oil study. Combination of GC-MS with chemometric tools such as multivariate curve resolution (MCR) allowed overcoming the problems of background, baseline offset and overlapping/embedded peaks [89, 90]. In the case of vibrational spectroscopy combined with chemometrics, modelling in essential oil studies, several articles mentioned that this combination could be an alternative for the quality assessment of essential oil, for example for lavender oil [91]. Another technique based on statistical model is "Electronic Nose Technology" which is defined as "an instrument including a set of electronic chemical sensors with a cross selectivity, and a fitted pattern recognition system capable of recognizing simple or complex odors" [18]. More techniques are developed in response to specific requests from regulation bodies concerning authentication of essential oils. A study on the quality control of bergamot oils has shown the efficiency of electronic nose systems with subsequent discriminant factorial analysis treatment of data [92].

This technique gives good results but requires the availability of a large number of well-defined samples to build the model, and the authenticity of the samples used must be certain.

4.4.2.HPLC

High performance liquid chromatography (HPLC) is not a widely used technique in essential oils field and it is rather a method of choice for the analysis of less or non-volatile constituents. HPLC allows highlighting non-volatile markers of an adulteration, such as synthetic compounds, or vegetable oils [87]. This technique was used to detect mixture of essential oil such as adding orange oil in lemon oil [93, 94].

4.4.3.Other techniques

Other techniques have seen their application evolves towards the field of adulteration control. For example, Differential Scanning Calorimetry (DSC) which is mainly used in the field of polymers, is by definition, "the measurement of the change of the difference in the heat flow rate to the sample and to a reference sample while they are subjected to a controlled temperature program." [95]. It is based on measuring the consequences of the application of temperature-programmed scans that can cause some structural modifications or decompositions [8]. Its use has changed and has been tested in quality control because of its applicability in assessing the purity of samples. This use has been applied to some essential oils such as orange, lemongrass and basil oils. They show predominant substances in their composition (respectively around 90% limonene, 66% citral and 84% methyl chavicol), and by this way have specific DSC profile. DSC can in these cases provide fingerprints with a relatively good degree of accuracy [96].

Authentication can also be based on thermal diffusivity such as photoacoustic spectroscopy (PS) which is mainly used for gas analysis. Since the advent of lasers, more efficient, its application areas have expanded. For example, in the field of essential oil, PS has been used for measuring the thermal diffusivity in the case of discrimination between different extractions processes for a study on concentrated citrus oils [97].

All these methods offer interesting perspectives, but there is little number of data, in the literature, on their use in the field of essential oils and their adulterations.

5. Summary of main essential oils authentication problems and their recommended analytical methods

The recent advances in the knowledge and chemical analysis of essential oils allowed establishing a summary of the main essential oils authentication problems and the recommended analytical methods (Table 4).

Table 4: Table of main essential oils authentication problem and their analytical methods associated.

Latin name	Kind of alteration	Analytical methods and target of the analysis	Ref.
Bergamot (<i>Citrus aurantium</i> L. spp. <i>Bergamia</i>)	• Addition of linalool	• Enantioselective GC (Only the <i>R</i> -enantiomer is present)	[23, 40]
	• Discrimination of natural cold-pressed bergamot oil from those deterpenated and bergapten-free	• SNIF- NMR (linalool)	[69]
	• Addition of linalyl acetate	• Electronic nose system	[92]
Buchu (<i>Agathosma betulina</i> (P.J. Bergius) Pillans)	• Addition of synthetic compounds	• HRGC-P-IRMS, or SNIF NMR (Linalyl acetate)	[40, 55, 98]
		• Enantio-MDGC ((1 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)-menthone, isomenthone, (1 <i>S</i>)-pulegone, (1 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)-cis-3-oxo-p-menthane-8-thiol, (1 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)-trans-3-oxo-p-menthane-8-thiol, (1 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)-cis-3-oxo-p-menthane-8-thiol acetate, (1 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)-trans-3-oxo-p-menthane-8-thiol acetate are specific indicators of genuine of buchu leaf oil)	[28]
Chamomile (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauscher)	• Addition of α -bisabolol from cheaper oil such as candeia oil (<i>Vanillosmopsis erythropappa</i> L.)	• Enantioselective GC (α -bisabolol is present only as a single stereoisomer, so the three other stereoisomers prove adulteration)	[23]
	• Addition of α -bisabolol from cheaper oil such as candeia oil (<i>Vanillosmopsis erythropappa</i> L.)	• SNIF-NMR ((-)- α -bisabolol)	[15]
Cinnamon (<i>Cinnamomum cassia</i> Nees ex Blume)	• Addition of cinnamaldehyde in China bark essential oil	• GC-MS (Presence of impurities such as phenyl pentadienal, benzyl alcohol and eugenol in synthetic cinnamaldehyde)	[40]
Cinnamon (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume)	• Addition of twig oil in bark essential oil	• HPLC/PLS-DA (Seven major bioactive: coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, eugenol, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde)	[99]
Citrus oil	• Addition of turpentine	• Polarimeter, densimeter (Specific gravity and optical rotation are reduced)	[21]
Clary sage (<i>Salvia sclarea</i> L.)	• Addition of sage oil (<i>Salvia officinalis</i> L.)	• HPTLC (Presence of black zone (Rf=0.47))	[100]
	• Addition of Spanish sage oil (<i>Salvia lavandulifolia</i> L.)	• HPTLC (Presence of black zone (Rf=0.19))	[100]
Coriander (<i>Coriandrum</i>)	• Addition of linalool	• HRGC-P-IRMS (Linalool)	[40, 55]

Table 4: Table of main essential oils authentication problem and their analytical methods associated.

Latin name	Kind of alteration	Analytical methods and target of the analysis	Ref.
<i>sativum</i> L.)			
Cornmint (<i>Mentha arvensis</i> L.)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of de <i>Mentha X piperita</i> L. oil 	<ul style="list-style-type: none"> Enantioselective GC ((+)-trans-sabinene: 1% in <i>M. piperita</i>, around 0% in <i>M. arvensis</i>) 	[23]
Damask rose (<i>Rosa damascena</i> Aut. Ou Mill.)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of citronellol Addition of palmarosa oil (<i>Cymbopogon martini</i> (Roxb.) Will. Watson) Addition of geraniol from <i>Cymbopogon martini</i> (Roxb.) Will. Watson, or from <i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle Addition of geranyl acetate from <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf or from <i>Cymbopogon martini</i> (Roxb.) Will. Watson Addition of linalool from <i>Ocimum basilicum</i> L. 	<ul style="list-style-type: none"> Enantioselective GC ((S)(-)-citronellol, (2S,4R)(-)-cis, (-)-trans rose oxides are specific indicators of genuine rose oils, (2S,5S)-trans linalool oxides, (2S,5R)-cis linalool, and (S)-linalyl acetate are identified as unnatural enantiomers) GC/IR/MS ($\delta^{13}\text{C}$ of geraniol) EA/IRMS, or GC/C/IRMS ($\delta^{13}\text{C}$ of geraniol) EA/IRMS, or GC/C/IRMS ($\delta^{13}\text{C}$ of geranyl acetate) EA/IRMS, or GC/C/IRMS ($\delta^{13}\text{C}$ of linalool) 	[28, 40] [27] [27, 40] [27] [27]
Eucalyptus (<i>Eucalyptus globulus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Discrimination of eucalyptus oil from Australia with Chinese eucalyptus oil 	<ul style="list-style-type: none"> FT-Raman spectra, or ATR-IR (β-citronellol, 1,8-cineole, citronellal) 	[78]
Geranium (<i>Pelargonium graveolens</i> L'Her. Ex Aiton)	<ul style="list-style-type: none"> Mixture of chemotypes Addition of Egyptian geranium oil in geranium Bourbon Addition of citronella oil from Ceylon and java (<i>Cymbopogon winterianus</i>) in Bourbon oil Addition of fraction of palmarosa oil in Bourbon oil 	<ul style="list-style-type: none"> Chemometric treatment with MIR & NIR (Citronellol, geraniol, linalool, citronellyl formate, isomenthone, geranyl formate, guaia-6,9-diene) Enantioselective-GC (Egyptian geranium oil contain 10-epi-eudesmol which is absent in geranium Bourbon) Enantioselective-GC (Citronellol, the (-) enantiomer in geranium, (+) enantiomer in citronella oil) Enantioselective-GC 	[101] [15, 32] [32] [32]

Table 4: Table of main essential oils authentication problem and their analytical methods associated.

Latin name	Kind of alteration	Analytical methods and target of the analysis	Ref.
Lavandin (<i>Lavandula angustifolia</i> P. Mill. × <i>Lavandula latifolia</i> (L.f.) Medikus) lavender (<i>Lavandula angustifolia</i> Miller)	• Addition of almond oil in Bourbon oil	• Put a drop of the sample on blotting paper, pure essential oils would evaporate completely	[32]
	• Discrimination of origin	• Chemometric treatment by MID-IR spectroscopy (The main 13 hydrocarbons and oxygenated compounds)	[85]
	• Addition of linalool	• HRGC-P-IRMS (Linalool)	[55]
Lemon (<i>Citrus limon</i> L. Burm. F.)	• Addition of synthetic linalool and linalyl acetate	• Enantioselective-GC ((R)(-)-linalol 94 %, Detection of dihydro and dehydrolinalool)	[23, 28] [23, 28]
	• Addition of lavender oil (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. X <i>L. latifolia</i> Medik.)	• Enantioselective-GC (linalool and linalyl acetate)	[28, 102]
	• Addition of grapefruit oil	• SNIF NMR (Linalool, linalyl acetate)	[98]
	• Addition of sweet orange oil (<i>Citrus aurantium</i> var. <i>sinensis</i> L.)	• HRGC-P-IRMS (Linalool, linalyl acetate)	[55]
	• Addition of other origin (Ivory coast, USA, Argentina) in Italia	• Quantitative GC analysis (Presence of high amounts of 1,8-cineol and camphor)	[55, 102]
Lemon balm (<i>Melissa officinalis</i> L.)	• Addition of synthetic (+)-(2R,4S)-cis-rose oxides, (+)-(2S,4S)-trans-rose oxides	• TLC (Auraptene)	[21, 103]
	• Addition of synthetic (-)-(S)-citronellal, (+)-(R)-citronellal, or (-)-(S)-citronellol, (+)-(R)-citronellol	• GC ultra-Fast (Présence de δ-3-carene)	[41]
	• Addition of lemon grass oil (<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf) or of citronella species oil (<i>Cymbopogon</i>)	• HPLC (Presence of oxypeucedanone, oxypeucedanone oxide, byakangelol)	[93]
	• Addition of citronellal, or citral	• Enantio-MDGC ((+)-(2R,4S)-cis-rose oxides, (+)-(2S,4S)-trans-rose oxides)	[28]
	• Addition of citronella essential oil (<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle)	• Enantio-MDGC ((-)-(S)-citronellal, (+)-(R)-citronellal, or (-)-(S)-citronellol, (+)-(R)-citronellol)	[28]
		• IRMS (Lemon balm is a C3 plant and citronella is a C4 plant and C3 plants are much more depleted in their δ ¹³ C _{PDB} levels than those from C4 source)	[28]
		• Enantioselective-GC (Citronellal or citral)	[34]
		• Enantioselective-GC (Citronellal)	[59]

Table 4: Table of main essential oils authentication problem and their analytical methods associated.

Latin name	Kind of alteration	Analytical methods and target of the analysis	Ref.
	<ul style="list-style-type: none"> Addition of coconut oil 	<ul style="list-style-type: none"> Physical analysis (Noting the changes in the physical constants and solubility in 70% alcohol) 	[30]
Lemongrass (<i>Cymbopogon citratus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of synthetic citral 	<ul style="list-style-type: none"> Enantioselective-GC & IRMS (Citral) 	[34, 40]
Lemony Litsea (<i>Litsea cubeba</i> (Lour.) Pers.)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of terpineol 	<ul style="list-style-type: none"> IRMS ($\delta^{13}\text{C}$ of terpineol) 	[40, 41]
Lime (<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of terpinolene Addition of methyl-n-methyl anthranilate 	<ul style="list-style-type: none"> IRMS ($\delta^{13}\text{C}$ of terpinolene) GC-IRMS ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ values of methyl-n-methyl anthranilate) 	[40, 41] [33, 40]
Mandarin (<i>Citrus reticulata</i> Blanco)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of sweet orange oil terpenes in cold-pressed oil 	<ul style="list-style-type: none"> GC-IRMS (The content of Δ-3-carene (present only in traces in mandarin oil), and the Δ-3-carene/camphene and Δ-3-carene/α-terpinene ratios) 	[24]
	<ul style="list-style-type: none"> Addition of distilled mandarin in cold-pressed oil 	<ul style="list-style-type: none"> GC-IRMS (Ratios between specific components, mainly terpinen-4-ol/citronellal, or terpinene-4-ol/decanal) 	[24]
	<ul style="list-style-type: none"> Addition of synthetic methyl acetate 	<ul style="list-style-type: none"> HPTLC-enantio-GC coupling (Methyl acetate) 	[28]
Mint (<i>Mentha</i> L.)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of linalool 	<ul style="list-style-type: none"> HRGC-P-IRMS (Linalool) 	[55]
Neroli (<i>Citrus aurantium</i> L. spp. <i>Amara</i> L. var. <i>pumilia</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of tea tree (<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel) 	<ul style="list-style-type: none"> HPTLC (Presence of purple zone (Rf=0.26)) 	[104]
Niaouli (<i>Melaleuca quinquenervia</i> (Cav.) S. T. Blake)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of cajeput oil (<i>Melaleuca leucadendra</i> L.) 	<ul style="list-style-type: none"> HPTLC (Presence of violet double zone (Rf=0.23, Rf=0.25)) 	[104]
	<ul style="list-style-type: none"> Addition of furanone 	<ul style="list-style-type: none"> GC-MS (Fauranone, 2-n-hexyl-5-methyl-3(^2H)furanone) 	[40]
Onion (<i>Allium cepa</i> L.)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of turpentine oil in cold-pressed oil, or in flower oil 	<ul style="list-style-type: none"> UV spectrophotometry (Maximum absorption) 	[19]
Orange (<i>Citrus sinensis</i> Osbeck)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of cottonseed in cold-pressed oil, or in flower oil 	<ul style="list-style-type: none"> UV spectrophotometry (Maximum absorption) 	[19]
	<ul style="list-style-type: none"> Addition of gurjum balsam 	<ul style="list-style-type: none"> GC-MS (The abnormal presence of α-gurjunene and alloaromadendrene) 	[15]
Patchouli (<i>Pogostemon cablin</i> Benth.)	<ul style="list-style-type: none"> Addition of <i>Mentha arvensis</i> L. essential oil 	<ul style="list-style-type: none"> Enantioselective-GC (If level of (-)-isopulegol is around 1.2 to 2.0% it's indicative of <i>M. arvensis</i> L., average of <i>M. piperita</i> L. is 0.7%) 	[23, 40]

Table 4: Table of main essential oils authentication problem and their analytical methods associated.

Latin name	Kind of alteration	Analytical methods and target of the analysis	Ref.
Pippermint (<i>Mentha X piperita</i> L.)	• Addition of racemic menthyl acetate	• Enantioselective-GC ((-)-menthyl acetate present at ~2-8%. Alteration if presence of (+)-menthyl acetate)	[23]
	• Addition of mineral oil	• Physical, and chemical techniques (Turbidity when oil is added to 60-80% ethanolic solution)	[40]
	• Addition of fraction	• Enantio-MDGC ((1S)-(-)-borneol of high enantiomeric purity (> 90%) is a reliable indicator of genuine of rosemary oils)	[28, 40]
	• Addition of synthetic borneol	• Enantio-MDGC ((1S)-(-)-borneol of high enantiomeric purity (> 90%) is a reliable indicator of genuine of rosemary oils)	[28]
Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	• Addition of synthetic linalool	• ESI-MS, or HRGC-P-IRMS (Linalool)	[55, 105]
Rosewood (<i>Aniba rosaeodora</i> Ducke)	• Addition of synthetic Sandalore®	• GC-MS (Presence of Sandalore®)	[52]
Sandalwood (<i>Santalum album</i> L.)	• Addition of castor oil or cedarwood oil	• GC-MS, GC-FID (Specification content of compounds)	[52]
	• Addition of Verdox®, Santaliff®, Vertofix coeur®, Ebanol®	• MDGC-qMS/FID (Presence of Verdox®, Santaliff®, Vertofix coeur®, Ebanol®)	[53]
	• Addition of polyethylene glycol	• TLC (Polyethylene glycol)	[31]
	• Addition of anethole	• ² H NMR spectrometry (Anethole)	[40, 106]
	• Addition of ajwain seeds oil (Trachyspermum amni L.)	• GC-IRMS ($\delta^{13}\text{H}$ of thymol)	[38]
Star anise (<i>Illicium verum</i> L.)	• Addition of linalool	• HRGC-P-IRMS (Linalool)	[55]
Thyme (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	• Addition of vegetal oil	• HPTLC (Presence of zone (Rf=0.69))	[72]

6. Conclusion

Adulteration, particularly adulteration in the field of essential oils, is a topic of growing interest. Despite this, only a few hundreds of articles refer to this major issue with economic consequences challenging the analytical chemist. Essential oils are sometimes adulterated due to their cost, their growing uses, and for some of them their scarcity which contrasts with the ever-increasing demand. Different methods are used for the detection of alteration. Apart from tests recommended by pharmacopoeia and regulation (organoleptic examination physical-chemical analyses), GC, GC-MS, enantioselective, and IRMS analyses have given the major contribution towards the detection of adulteration of essential oils. Other techniques of less frequent use to identify adulteration are vibrational techniques. The ability of (HP)TLC to provide fingerprints makes it an accepted technique by the pharmacopoeias and regulation, and is increasingly used for the detection of alteration of essential oils. Some techniques gain more and more importance in authentication of essential oil, such as the use of hyphenated techniques, or GCxGC, or the development of new phase in GC, HPLC, or HPTLC. Recent advances in analytical techniques, particularly in chromatography systems, coupled to mass spectrometry and NMR, the automatization of sample preparations, and the computerization of data systems allow considering chemometric approaches as very promising.

Along with chemical analysis progresses, the adulteration methods are also improving, and solving these problems requires a case by case approach, since there is no general method.

The ingenuity of fraudsters is a reflection of the interest on natural ingredients. The methods of adulteration, more and more technical, involve the development of appropriate methods of analysis, and thus becomes a perpetual problem for the chemical analyst.

The cost of implementation is extremely variable, from relatively cheap to be very expensive. Therefore, a balanced evaluation of the analysis performance has to take in account the cost/efficiency/speed ratio.

Acknowledgements

Authors are grateful to Elise Carenini (Albert Vieille, Vallauris, France) and Jean-Philippe Paris (Payan Bertrand, Grasse, France) for their relevant suggestions. TKTD is grateful to ANRT for a doctoral fellowship. This project was supported by the University Nice Sophia Antipolis and the CNRS.

Reference

- [1] X. Fernandez, F. Chemat, T.K.T. Do, *Les huiles essentielles. Vertus et applications*. Vuibert, Paris, 2012.
- [2] K. Hüsni, C. Başer, F. Demirci, *Chemistry of Essential Oils*, in: R. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrances*, Springer Hannover, 2007, pp. 43-86.
- [3] K.H.C. Baser, G. Buchbauer, *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, Taylor & Francis, Boca Raton, 2009.
- [4] M. Sawamura, *Citrus Essential Oils: Flavor and Fragrance*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2010.
- [5] E.R. Adlard, *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*, *Chromatographia* 72 (2010) 9-10.
- [6] G. Remaud, A.A. Debon, Y.-I. Martin, G.G. Martin, G.J. Martin, Authentication of bitter almond oil and cinnamon oil: application of the SNIF-NMR method to benzaldehyde, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4042-4048.
- [7] P.J. Marriott, R. Shellie, C. Cornwell, Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, *J. Chromatogr. A* 936 (2001) 1-22.

- [8] C. Cordella, I. Moussa, A.-C. Martel, N. Sbirrazzuoli, L. Lizzani-Cuvelier, Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1751-1764.
- [9] E. pharmacopoeia, *European Pharmacopoeia: Essential oil* (2008). 2011.
- [10] AFNOR, in: *A.f.d. normalisation* (Ed.), *Recueil de Normes Française, Huiles essentielle*. 1998.
- [11] E. pharmacopoeia, *European Pharmacopoeia: Essential oil* (2008), Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Strasbourg, 2008.
- [12] H. Surburg, J. Panten, *Common Fragrance and Flavor Materials*, 5th ed., Wiley, Weinheim, 2006.
- [13] C.M. Franz, Essential oil research: past, present and future, *Flavour Fragr. J.* 25 (2010) 112-113.
- [14] X. Fernandez, F. Chemat, *La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation*, Vuibert, Paris, 2012.
- [15] K.T.D. Silva, *A manual on the essential oil industry*, United Nations Industrial Development Organization (UNIDO). Turkey, 1996.
- [16] C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B.d.A. Zellner, R. Costa, P. Rubiolo, Quantitative analysis of essential oils: a complex task, *Flavour Fragr. J.* 23 (2008) 382-391.
- [17] H. Panda, *The Complete Technology Book on Herbal Perfumes & Cosmetics*, Asia Pacific Business Press Inc., Delhi, 2003.
- [18] K. Goodner, R. Rouseff, *Practical Analysis Of Flavor And Fragrance Materials*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2011.
- [19] G. Gjerstad, Spectrophotometric identification and evaluation of essential oils, *Planta Med.* 9 (1961) 245-250.
- [20] M.C. Lesley Braun, *Herbs and Natural Supplements: An evidence-based guide*, 3rd ed., Elsevier, Churchill Livingstone 2010.
- [21] D. McHale, Adulteration of citrus oils, *Med. Aromat. Plants--Ind. Profiles* 26 (2002) 496-517.
- [22] H.R. Juliani, J. Kapteyn, D. Jones, A.R. Koroch, M. Wang, D. Charles, J.E. Simon, Application of near-infrared spectroscopy in quality control and determination of adulteration of african essential oils, *Phytochem. Anal.* 17 (2006) 121-128.
- [23] W.A. Koenig, D.H. Hochmuth, Enantioselective gas chromatography in flavor and fragrance analysis: Strategies for the identification of known and unknown plant volatiles, *J. Chromatogr. Sci.* 42 (2004) 423-439.
- [24] L. Schipilliti, P.Q. Tranchida, D. Sciarrone, M. Russo, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, Genuineness assessment of mandarin essential oils employing gas chromatography-combustion-isotope ratio MS (GC-C-IRMS), *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 617-625.
- [25] L. Salgueiro, A.P. Martins, H. Correia, Raw materials: the importance of quality and safety. A review, *Flavour Fragr. J.* 25 (2010) 253-271.
- [26] A. Mosandl, Authenticity assessment: A permanent challenge in food flavor and essential oil analysis, *J. Chromatogr. Sci.* 42 (2004) 440-449.
- [27] F. Pellati, G. Orlandini, L.K.A. van, G. Anesin, D. Bertelli, M. Paolini, S. Benvenuti, F. Camin, Gas chromatography combined with mass spectrometry, flame ionization detection and elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry for characterizing and detecting the authenticity of commercial essential oils of *Rosa damascena* Mill, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 591-602.
- [28] A. Mosandl, Enantioselective capillary gas chromatography and stable isotope ratio mass spectrometry in the authenticity control of flavors and essential oils, *Food Rev. Int.* 11 (1995) 597-664.
- [29] B.P. Skaria, *Horticulture Science Series: Aromatic Plants*, New India Publishing, Delhi, 2007.

- [30] P. Jayasinha, Lemongrass: a literature survey, Industrial Technology Institute, Colombo, 1999.
- [31] M.D. John, T.M. Paul, P.K. Jaiswal, Detection of adulteration of polyethylene glycols in oil of sandalwood, *Indian Perfum.* 35 (1991) 186-187.
- [32] M. Lis-Balchin, Geranium and Pelargonium. The genera Geranium and Pelargonium, Taylor & Francis Ltd., London, 2002.
- [33] N.T. Thao, Enantiomeric and stable isotope analysis, in: M. Sawamura (Ed.), *Citrus Essential Oils: Flavor And Fragrance*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2010, pp. 165-200.
- [34] T.-T. Nhu-Trang, H. Casabianca, M.-F. Grenier-Loustalot, Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 2141-2152.
- [35] E. Brenna, C. Fuganti, S. Ronzani, S. Serra, Enzyme-mediated syntheses of the enantiomers of γ -irones, *Helv. Chim. Acta* 84 (2001) 3650-3666.
- [36] M. Lis-Balchin, S.G. Deans, E. Eaglesham, Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils, *Flavour Fragr. J.* 13 (1998) 98-104.
- [37] H. Schulz, R. Quilitzsch, H. Krüger, Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy, *Journal of Molecular Structure* 661–662 (2003) 299-306.
- [38] T.-T. Nhu-Trang, H. Casabianca, M.-F. Grenier-Loustalot, Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol, γ -terpinene and p-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography–pyrolysis–isotope ratio mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 219-227.
- [39] G. Acosta, S. Arce, L.D. Martínez, J. Llabot, M.R. Gomez, Monitoring of Phenolic Compounds for the Quality Control of *Melissa officinalis* Products by Capillary Electrophoresis, *Phytochem. Anal.* 23 (2012) 177-183.
- [40] K.V. Peter, *Handbook of Herbs and Spices*, CRC Cambridge, 2002.
- [41] P.Q. Tranchida, I. Bonaccorsi, P. Dugo, L. Mondello, G. Dugo, Analysis of Citrus essential oils: state of the art and future perspectives. A review, *Flavour Fragr. J.* 27 (2012) 98-123.
- [42] F. Le Grand, G. George, S. Akoka, Natural Abundance 2H -ERETIC-NMR Authentication of the Origin of Methyl Salicylate, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5125-5129.
- [43] L. Zhang, D.M. Kujawinski, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, High-temperature reversed-phase liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 2971-2980.
- [44] S. Kumar, M.T. Raj, A rapid method for detecting adulteration in essential oils, *Res. Ind.* 24 (1979) 180-182.
- [45] E. pharmacopoeia, *European Pharmacopoeia: foreign ester in essential oils*, Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Strasbourg, 2008.
- [46] V. Pieri, S. Sturm, C. Seger, C. Franz, H. Stuppner, 1H NMR-based metabolic profiling and target analysis: a combined approach for the quality control of *Thymus vulgaris*, *Metabolomics* 8 (2012) 335-346.
- [47] AFNOR, *Analyse sensorielle*, 7 ed., 2007.
- [48] R. Marsili, *Sensory-Directed Flavor Analysis*, CRC Boca Raton, 2007.
- [49] *Huiles essentielles: Recueil, normes [CD-ROM]*, AFNOR. 1998.
- [50] S.M.E. Osman, H.A. El-Obeid, S.M.H. Ayoub, Physical and chemical analysis of some imported essential oils in the Sudanese market, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 6 (2012) 1477-1481.

- [51] M.J. Prager, M.A. Miskiewicz, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis, identification, and detection of adulteration of perfumery products from bitter orange trees, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64 (1981) 131-138.
- [52] M.-J.R. Howes, M.S.J. Simmonds, G.C. Kite, Evaluation of the quality of sandalwood essential oils by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 307-312.
- [53] D. Sciarrone, R. Costa, C. Ragonese, P.Q. Tranchida, L. Tedone, L. Santi, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, Application of a multidimensional gas chromatography system with simultaneous mass spectrometric and flame ionization detection to the analysis of sandalwood oil, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 137-142.
- [54] R.J. McGorin, One Hundred Years of Progress in Food Analysis, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 8076-8088.
- [55] K. Hoer, C. Ruff, B. Weckerle, T. Koenig, P. Schreier, Flavor Authenticity Studies by 2H/1H Ratio Determination Using On-line Gas Chromatography Pyrolysis Isotope Ratio Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 21-25.
- [56] A. Mosandl, R. Braunsdorf, G. Bruche, A. Dietrich, U. Hener, V. Karl, T. Koepke, P. Kreis, D. Lehmann, B. Maas, New methods to assess authenticity of natural flavors and essential oils, in: R.L. Roussef and M.M. Leahy (Eds.), *Fruit flavors. Biogenesis, Characterization, and Authentication*, American Chemical Society, Washington, 1995, pp. 94-112.
- [57] M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*, CRC Boca Raton, 2011.
- [58] C. Barba, R.M. Martinez, M.M. Calvo, G. Santa-Maria, M. Herraiz, Chiral analysis by online coupling of reversed-phase liquid chromatography to gas chromatography and mass spectrometry, *Chirality* 24 (2012) 420-426.
- [59] W.A. König, C. Fricke, Y. Saritas, B. Momeni, G. Hohenfeld, Adulteration or natural variability? enantioselective gas chromatography in purity control of essential oils, *J. High Res. Chromatogr.* 20 (1997) 55-61.
- [60] P. Rubiolo, B. Sgorbini, E. Liberto, C. Cordero, C. Bicchi, Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review, *Flavour Fragr. J.* 25 (2010) 282-290.
- [61] M.H. O'Leary, Carbon isotope fractionation in plants, *Phytochemistry* 20 (1981) 553-567.
- [62] J. Ghashghaie, F.-W. Badeck, G. Lanigan, S. Nogues, G. Tcherkez, E. Deleens, G. Cornic, H. Griffiths, Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C3 plants, *Phytochem. Rev.* 2 (2003) 145-161.
- [63] P.W. Rundel, J.R. Ehleringer, K.A. Nagy, *Stable Isotopes in Ecological Research*, Springer New York, 1989.
- [64] L. Schipilliti, P. Dugo, I. Bonaccorsi, L. Mondello, Authenticity control on lemon essential oils employing Gas Chromatography–Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC–C-IRMS), *Food Chem.* 131 (2012) 1523-1530.
- [65] D. Juchelka, T. Beck, U. Hener, F. Dettmar, A. Mosandl, Multidimensional Gas Chromatography Coupled On-Line with Isotope Ratio Mass Spectrometry (MDGC-IRMS): Progress in the Analytical Authentication of Genuine Flavor Components, *J. High Res. Chromatogr.* 21 (1998) 145-151.
- [66] M. Butzenlechner, A. Rossmann, H.L. Schmidt, Assignment of bitter almond oil to natural and synthetic sources by stable isotope ratio analysis, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 410-412.
- [67] S. Li, X. Zhu, J. Zhang, G. Li, D. Su, Y. Shan, Authentication of Pure Camellia Oil by Using Near Infrared Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques, *J. Food Sci.* 77 (2012) C374-C380.

- [68] F.J. Hidalgo, R. Zamora, Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: recent advances and future perspectives, *Trends in Food Science & Technology* 14 (2003) 499-506.
- [69] G. Martin, G. Remaud, G.J. Martin, Isotopic methods for control of natural flavors authenticity, *Flavour Fragr. J.* 8 (1993) 97-107.
- [70] M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska, *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, CRC Boca Raton, 2008.
- [71] E. Reich, A. Schibli, *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*, Thieme, New York, 2006.
- [72] H.P.T.L.C. Association, Ylang-Ylang oil (*Canago odorata*). 29/04/2012.
- [73] D. Cozzolino, Near infrared spectroscopy in natural products analysis, *Planta Med.* 75 (2009) 746-756.
- [74] H. Schulz, M. Baranska, H.-H. Belz, P. Rösch, M.A. Strehle, J. Popp, Chemotaxonomic characterisation of essential oil plants by vibrational spectroscopy measurements, *Vibrational Spectroscopy* 35 (2004) 81-86.
- [75] M.L. McKelvy, T.R. Britt, B.L. Davis, J.K. Gillie, L.A. Lentz, A. Leugers, R.A. Nyquist, C.L. Putzig, *Infrared Spectroscopy*, *Anal. Chem.* 68 (1996) 93-160.
- [76] R.S. Das, Y.K. Agrawal, Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications, *Vibrational Spectroscopy* 57 (2011) 163-176.
- [77] T. Cserhádi, E. Forgács, Z. Deyl, I. Miksik, Chromatography in authenticity and traceability tests of vegetable oils and dairy products: a review, *Biomedical Chromatogr.* 19 (2005) 183-190.
- [78] M. Baranska, H. Schulz, A. Walter, P. Rösch, R. Quilitzsch, G. Lösing, J. Popp, Investigation of eucalyptus essential oil by using vibrational spectroscopy methods, *Vibrational Spectroscopy* 42 (2006) 341-345.
- [79] K.K. Sathish, K.N. Santhosh, K. Vijay, Two dimensional gas chromatography, *Int. J. Pharm. Technol.* 3 (2011) 1318-1332.
- [80] C. Meinert, U.J. Meierhenrich, A New Dimension in Separation Science: Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography, *Angewandte Chemie International Edition* 51 (2012) 10460-10470.
- [81] L. Mondello, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review, *Mass Spectrometry Reviews* 27 (2008) 101-124.
- [82] T. Górecki, J. Harynuk, O. Panić, The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC), *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 359-379.
- [83] J.V. Seeley, S.K. Seeley, *Multidimensional Gas Chromatography: Fundamental Advances and New Applications*, *Anal. Chem.* 85 (2013) 557-578.
- [84] J.W. Allwood, D.I. Ellis, R. Goodacre, Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions, *Physiologia Plantarum* 132 (2008) 117-135.
- [85] I. Bombarda, N. Dupuy, J.P.L.V. Da, E.M. Gaydou, Comparative chemometric analyses of geographic origins and compositions of lavandin var. Grosso essential oils by mid infrared spectroscopy and gas chromatography, *Analytica Chimica Acta* 613 (2008) 31-39.
- [86] R.D. Hall, Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic, *New Phytologist* 169 (2006) 453-468.
- [87] A. Smelcerovic, A. Djordjevic, J. Lazarevic, G. Stojanovic, Recent advances in analysis of essential oils, *Curr. Anal. Chem.* 9 (2013) 61-70.
- [88] H.A. Gad, S.H. El-Ahmady, M.I. Abou-Shoer, M.M. Al-Azizi, Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review, *Phytochem. Anal.* 24 (2013) 1-24.

- [89] M. Jalali-Heravi, R.S. Moazeni-Pourasil, H. Sereshti, Thorough analysis of Iranian spearmint essential oil: combination of chemometrics and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Methods* 6 (2014) 6753-6759.
- [90] M. Asadollahi-Baboli, A. Aghakhani, Application of polyaniline-nylon-6 nanocomposite, GC-MS and chemometrics for rapid and comprehensive analysis of *Zingiber officinale* fragrance components, *Anal. Methods* 6 (2014) 4279-4287.
- [91] S.Y. Tankeu, I. Vermaak, G.P.P. Kamatou, A.M. Viljoen, Vibrational spectroscopy and chemometric modeling: An economical and robust quality control method for lavender oil, *Industrial Crops and Products* 59 (2014) 234-240.
- [92] M. Russo, D. Serra, F. Suraci, S. Postorino, Effectiveness of electronic nose systems to detect bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) essential oil quality and genuineness, *J. Essent. Oil Res.* 24 (2012) 137-151.
- [93] C. Marin, G. Marchisio, O. Janinet, B.B. Le, HPLC control of citrus essential oils. Application to lemon essential oils, *Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol.* 93 (2000) 389-399.
- [94] I.L. Bonaccorsi, H.M. McNair, L.A. Brunner, P. Dugo, G. Dugo, Fast HPLC for the Analysis of Oxygen Heterocyclic Compounds of Citrus Essential Oils†, *J. Agric. Food Chem* 47 (1999) 4237-4239.
- [95] G.W.H. Höhne, W.F. Hemminger, H.J. Flammersheim, Introduction, *Differential Scanning Calorimetry*, Springer Heidelberg, 2003, pp. 1-7.
- [96] P. Martins, P. Sbaite, C. Benites, M. Maciel, Thermal characterization of orange, lemongrass, and basil essential oils, *Chemical Engineering* 24 (2011).
- [97] G.A. López Muñoz, J.A. Balderas López, R.F. López González, Authentication of Concentrated Orange Essential Oils Using Photoacoustic Spectroscopy, *Int. J. Thermophysics* 33 (2012) 1834-1841.
- [98] S. Hanneguelle, J.N. Thibault, N. Naulet, G.J. Martin, Authentication of essential oils containing linalool and linalyl acetate by isotopic methods, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 81-87.
- [99] Y. Ding, E.Q. Wu, C. Liang, J. Chen, M.N. Tran, C.H. Hong, Y. Jang, K.L. Park, K. Bae, Y.H. Kim, J.S. Kang, Discrimination of cinnamon bark and cinnamon twig samples sourced from various countries using HPLC-based fingerprint analysis, *Food Chem.* 127 (2011) 755-760.
- [100] H.P.T.L.C. Association, Clary sage oil (*Salvia sclarea*). 19/04/2010.
- [101] M. Sandasi, G.P.P. Kamatou, C. Gavaghan, M. Baranska, A.M. Viljoen, A quality control method for geranium oil based on vibrational spectroscopy and chemometric data analysis, *Vibrational Spectroscopy* 57 (2011) 242-247.
- [102] S. Bilke, A. Mosandl, Authenticity assessment of lavender oils using GC-P-IRMS: 2H/1H isotope ratios of linalool and linalyl acetate, *Eur. Food Res. Technol.* 214 (2002) 532-535.
- [103] B.C. Madsen, H.W. Latz, Qualitative and quantitative in situ fluorimetry of citrus oil thin-layer chromatograms, *J. Chromatogr. A* 50 (1970) 288-303.
- [104] H.P.T.L.C. Association, Niaouli oil (*Melaleuca quinquenervia*, *Melaleuca viridiflora*, *Melaleuca leucadendra*). 19/04/2012.
- [105] R.C.Z. Souza, M.M. Eiras, E.C. Cabral, L.E.S. Barata, M.N. Eberlin, R.R. Catharino, The Famous Amazonian Rosewood Essential Oil: Characterization and Adulteration Monitoring by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting, *Analytical Letters* 44 (2011) 2417-2422.
- [106] G.J. Martin, M.L. Martin, F. Mabon, J. Bricout, A new method for the identification of the origin of natural products. Quantitative deuterium NMR at the natural abundance level applied to the characterization of anetholes, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2658-2659.

3. LE DEVELOPPEMENT DE METHODES EN (HP)TLC

Le développement de méthodes en (HP)TLC est basé sur une procédure en 4 étapes : définir le but de l'analyse, sélectionner les paramètres de base de la méthode, optimiser la phase mobile et sélectionner les paramètres finaux [123].

La définition du problème en (HP)TLC est une étape clé. Elle permet d'avoir des indications sur le type de préparation d'échantillon et de détection (*c.f.* 1.2.4) à adopter. Après avoir défini l'objectif de la méthode, son développement commence par la sélection des paramètres de base.

3.1. La sélection des paramètres de base

Les paramètres de base au développement de méthodes consistent à sélectionner le mode de développement (*c.f.* 1.2.3), la phase stationnaire et la phase vapeur.

Le mode de développement et la phase vapeur sont des paramètres choisis en fonction de l'objectif de l'analyse et des instruments à disposition. Si la méthode a pour but d'être utilisée en routine, les choix cibleront en priorité la répétabilité et la robustesse par le biais d'un contrôle de l'environnement pendant le développement (contrôle d'humidité et étape de saturation). Le choix de la phase stationnaire est réalisé en fonction du type de composés à séparer. Le premier choix de phase stationnaire sera le gel de silice en raison de son excellent pouvoir de séparation et de son large éventail d'applications. Si le gel de silice ne répond pas à l'objectif de l'analyse, et que l'échantillon contient principalement des composés ioniques, le choix se portera sur une plaque d'oxyde d'aluminium. Si l'échantillon est extrêmement polaire, une plaque en phase inverse sera sélectionnée. Enfin si l'échantillon contient principalement des hydrocarbures aromatiques ou des composés isomériques, une phase inverse combinée à une phase mobile contenant un tampon aqueux sera préférée [123].

3.2. La sélection de la phase mobile.

La sélection de la phase mobile pour la séparation de matrices complexes est une étape qui peut s'avérer compliquée et nécessite dans certains cas l'application d'une méthodologie rigoureuse.

3.2.1. Les caractéristiques des solvants

Les solvants utilisés en chromatographie ont une double fonction : éluer l'échantillon et séparer les composés. Ils sont caractérisés par leur force éluante et leur sélectivité.

La force éluante (\mathcal{E}°) détermine la capacité d'un solvant à faire migrer les molécules d'analyte le long de la phase stationnaire. Une autre approche de la force éluante a été introduite par Snyder : l'index de polarité. Cet index tenant compte de l'attraction intermoléculaire entre le soluté et le solvant est d'un point de vue pratique plus utilisé en TLC (Tableau 9) [15].

Tableau 9 : force éluante (ϵ°) de certains solvants sur une phase silice.

	FORCE ELUANTE (ϵ°)	INDEX DE POLARITE (P')
n-Hexane	0,01	0,1
Cyclohexane	0,03	0,2
Toluène	0,22	2,4
Chloroforme	0,26	4,1
Dichlorométhane	0,32	3,1
Ether diéthylique	0,43	2,8
Acétate d'éthyle	0,48	4,4
Tétrahydrofurane	0,44	4,0
Acétone	0,47	5,1
Acétonitrile	0,50	5,8
Méthanol	0,70	5,1

La sélectivité d'un solvant est déterminée par sa propriété à donner des protons (X_e), ou à accepter des protons (X_d) et en fonction des interactions dipolaires (X_n) (Tableau 10) [14].

Tableau 10 : paramètres de sélectivité de certains solvants.

	X_e	X_d	X_n
Toluène	0,25	0,28	0,47
Chloroforme	0,25	0,41	0,33
Dichlorométhane	0,29	0,18	0,53
Ether diéthylique	0,53	0,13	0,34
Acétate d'éthyle	0,34	0,23	0,43
Tétrahydrofurane	0,38	0,20	0,42
Acétone	0,35	0,23	0,42
Acétonitrile	0,31	0,27	0,42
Méthanol	0,48	0,22	0,31

En phase normale, Snyder a classé plus de 80 solvants en 8 groupes (Figure 40, Tableau 11) [28].

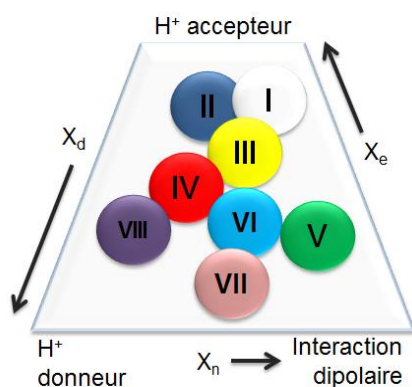


Figure 40: classification des solvants selon Snyder.

Tableau 11 : exemples de solvants en fonction des classes.

CLASSE	SOLVANTS
I	Ether diéthylique
II	Méthanol, éthanol, propanol
III	Tétrahydrofurane
IV	Acide acétique
V	Dichlorométhane
VI	Acétate d'éthyle, dioxane, acétone, Acétonitrile
VII	Toluène
VIII	Chloroforme, eau

3.2.2. La sélection des solvants

En se basant sur la classification des solvants de Snyder, Nyiredy a sélectionné parmi les 27 solvants les plus utilisés en TLC, ceux choisis pour la sélection des solvants : éther diéthylique, éthanol, tétrahydrofurane, acide acétique, dichlorométhane, acétate d'éthyle, dioxane, toluène et chloroforme [124]. Les premières expériences sont menées sur des plaques de gel de silice dans des chambres de développement non saturées (Figure 41). Après un développement sur 4 cm, les résultats chromatographiques sont évalués. Les solvants donnant des valeurs de R_F entre 0,2 et 0,8 seront sélectionnés. Les solvants produisant des valeurs de R_F trop élevées (supérieur à 0,8) seront dilués avec de l'hexane afin de réduire les valeurs de R_F . Si les valeurs de R_F sont inférieures à 0,2, les forces éluantes sont insuffisantes et devront être modifiées par l'ajout d'acide acétique ou d'eau [124].

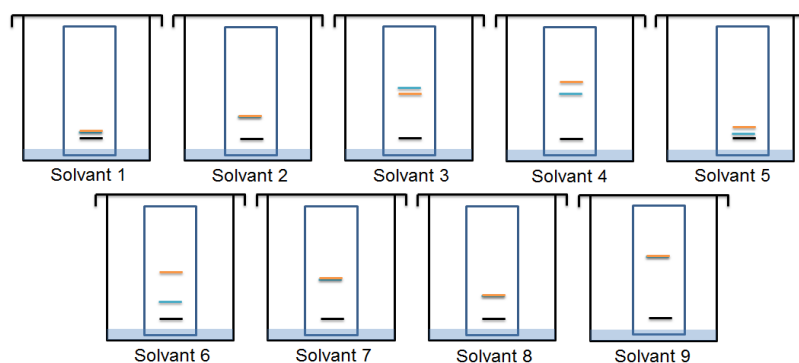


Figure 41 : schéma des tests individuels pour la sélection des solvants.

Un autre test appelé test par spot est également utilisé pour la sélection des solvants. De la même façon, les 9 solvants sélectionnés sont testés individuellement. Le test par spot consiste à appliquer sur une plaque de gel de silice environ 1 à 2 μL d'échantillon sous forme de spot. Ensuite, de placer à l'aide d'une micropipette 35 μL de solvant sur le centre de la tache, et de laisser le solvant éluer. Une série d'anneaux d'environ 1 à 1,5 cm de diamètre se formeront (Figure 42). L'évaluation des résultats s'effectue de la même façon que les tests individuels précédents. Une attention particulière est toutefois à porter sur le calcul des valeurs de R_F : $(R_F)_{\text{linéaire}} = (R_F)_{\text{circulaire}}^2$ [16].

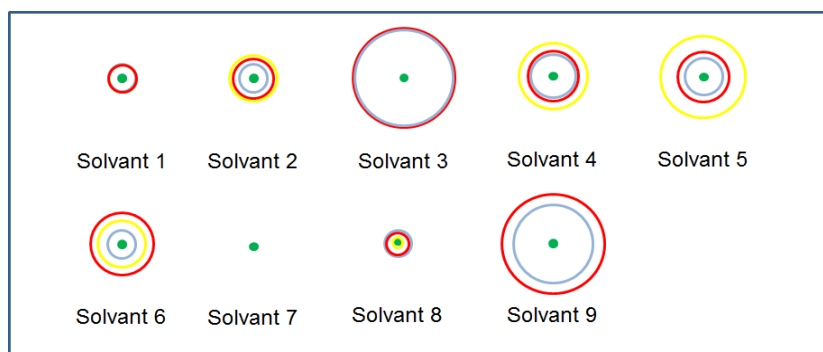


Figure 42 : schéma des tests par spot pour la sélection des solvants.

Une fois les tests réalisés, les solvants offrant les meilleures sélectivités sont sélectionnés pour la phase mobile qui sera ensuite optimisée.

3.3. L'optimisation de la phase mobile

Pour l'étape d'optimisation de la phase mobile, il existe plusieurs modèles théoriques plus ou moins complexe : « *Window Diagrams* », « *Simplex* », « *PRISMA Model* », « *Geiss's Structural Approach* » [18]. Parmi ces modèles théoriques, le « *PRISMA Model* » est largement accepté et le plus couramment utilisé.

3.3.1. Le « *Prisma Model* »

Le « *PRISMA Model* » a été introduit par Nyiredy pour l'optimisation de la phase mobile d'abord en HPLC, puis a été utilisé en TLC [124]. Il s'agit d'une approche d'essais et d'erreurs basée sur la corrélation de la force éluante avec la sélectivité des solvants. Ce modèle à trois dimensions se construit autour de la classification de solvants de Snyder (Figure 43). Les trois meilleurs solvants résultant de la sélection de solvants (A, B et C) représentent les trois sommets d'un triangle équilatéral : la base du prisme. Les longueurs des arêtes du prisme (P_A' , P_B' , P_C') correspondent aux index de polarité de A, B et C respectifs. Les arêtes du prisme sont généralement inégales car les solvants sont de polarités différentes, ce qui fait que la face supérieure du prisme n'est pas parallèle à sa base [14].

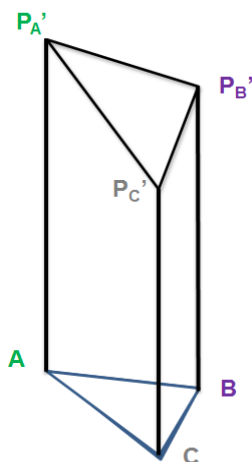


Figure 43 : schéma en 3 dimensions du "PRISMA Model". A, B, C représentant les 3 solvants sélectionnés lors des tests individuels. P_A' , P_B' , P_C' correspondant aux index de polarité de A, B et C respectif.

Le prisme peut être divisé en trois parties : la base, le prisme régulier et le prisme supérieur irrégulier (Figure 44). La base est formée par les 3 solvants sélectionnés, mais est également constituée de modificateurs généralement utilisés en faible concentration de sorte que leur influence sur la force éluante puisse être négligée. Si le prisme est coupé parallèlement à sa base à la hauteur de l'arête la plus courte (déterminée par le solvant de polarité la plus faible), la partie inférieure donne un prisme régulier, où la face supérieure et la base sont parallèles. La partie

irrégulière est utilisée pour l'optimisation de la phase mobile, en phase normale lors de la séparation des composés polaires. La partie régulière est utilisée lors de la séparation des composés apolaire et modérément polaire. Pour chaque triangle congruent à la base, tous les mélanges de solvants sont équi-éluotropiques. Cela signifie que toutes les combinaisons de solvant d'un même triangle possèdent le même index de polarité [124].

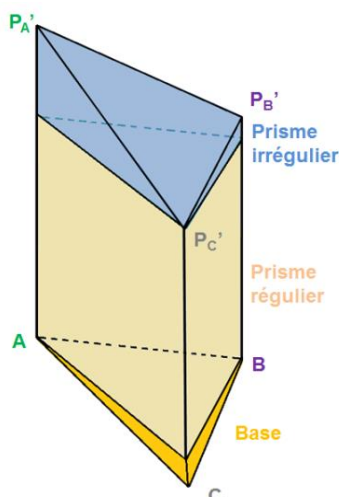


Figure 44: schéma des 3 parties du prisme.

L'index de polarité d'un mélange de solvants est calculé selon l'Équation 3 [14] :

Équation 3: calcul de l'index de polarité d'un mélange de solvants. P_X' , P_Y' sont les valeurs des index de polarité de X, et de Y, et f_X , f_Y , et représentent la proportion de X, et Y, respectivement.

$$P_{XY}' = f_X P_X' + f_Y P_Y'$$

Par exemple, pour la construction d'un prisme contenant de l'éthanol ($P_{\text{éthanol}}' = 4,3$), du chloroforme ($P_{\text{chloroforme}}' = 4,1$) et de l'éther diéthylique ($P_{\text{éther diéthylique}}' = 2,8$). L'éther diéthylique sera donc le sommet non dilué de la face supérieure du prisme régulier. L'éthanol et le chloroforme devront donc être dilué avec de l'hexane ($P_{\text{hexane}}' = 0$) afin d'obtenir un index de polarité égale à celui de l'éther diéthylique ($P_{\text{éther diéthylique}}' = 2,8$). Selon l'Équation 3 :

- $P_{\text{éthanol/hexane}}' = P_{\text{éther diéthylique}}' = f_{\text{éthanol}} \times P_{\text{éthanol}}' + f_{\text{hexane}} \times P_{\text{hexane}}'$
- Soit $f_{\text{éthanol}} = P_{\text{éther diéthylique}}' / P_{\text{éthanol}}' = 2,8 / 4,3 = 0,65$
 - Le mélange A sera donc composé de 65 % d'éthanol et de 35 % d'hexane
- De la même façon pour $f_{\text{chloroforme}} = 0,68$
 - Le mélange B sera donc composé de 68 % de chloroforme et 32 % d'hexane

On obtiendrait donc ce prisme (Figure 45) :

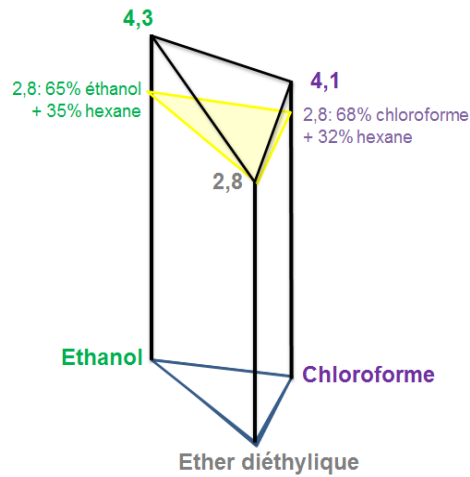


Figure 45 : exemple de construction de prisme.

La sélectivité de la phase mobile correspond à des points (P_s) décrits par trois nombres. Par exemple, pour un index de polarité P_{ABC} donné, les points sélectionnés du centre du triangle sont $P_s = 3/3/3$, et ceux à proximité des sommets du triangle sont $P_s = 8/1/1$, $1/8/1$ et $1/1/8$ (Figure 46) [124].

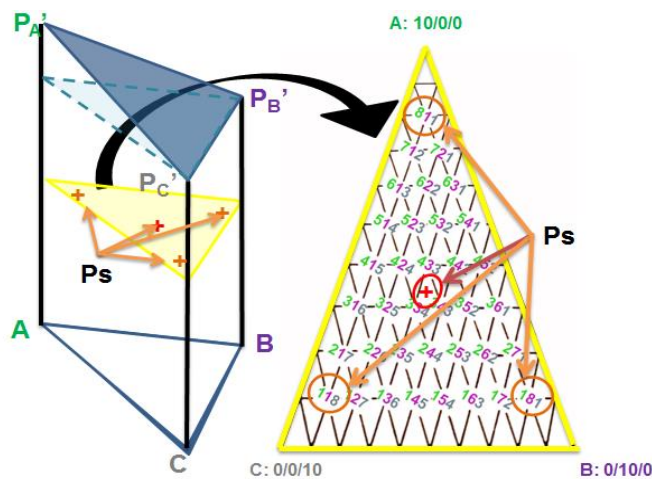


Figure 46 : représentation des points de sélectivité de la phase mobile.

Pour un index de polarité optimal, les $P_s = 8/1/1$, $1/8/1$ et $1/1/8$ seront testés. Si les résultats chromatographiques ne sont pas satisfaisants, d'autres points de sélectivité autour de la composition de solvants qui a donné la meilleure séparation seront testés jusqu'à obtenir la meilleure composition du solvant.

3.3.2. Les autres modèles théoriques

Le modèle « *Window Diagrams* » implique la détermination des plus mauvais résultats possibles. Puis, à partir de l'ensemble des plus mauvais résultats, on détermine les conditions expérimentales résultant de la valeur maximale des pires résultats. Cette valeur devient le critère de sélection des conditions expérimentales optimales. La méthode « *Simplex* » quant à elle, applique une procédure séquentielle. Le simplexe est défini par une figure géométrique composée

d'un nombre de points égal au nombre de variables à examiner, plus un. Les sommets de la figure représentent les essais de la méthode. Des règles spécifiques sont appliquées pour déterminer les prochains essais. Le pire essai est retiré, et les essais restant sont de nouveau testés avec de nouvelles combinaisons. Les règles ci-dessus sont de nouveau appliquées sur ces résultats, jusqu'à obtention de la phase mobile optimisée. Geiss lui considère la sélectivité et la force éluante comme des facteurs indépendants. L'approche utilise 3 solvants de force éluante élevée (méthyl *tert*-butyl éther, acétonitrile, méthanol), qui sont par la suite chacun dilués avec un solvant de faible force éluante (dichlorométhane) afin d'obtenir une série de solvants de force éluante avec une augmentation progressive intermédiaire de 0,05 et atteignant une valeur maximale de 0,70. De cette façon la force éluante optimale est sélectionnée. La mise au point est effectuée en mélangeant les mélanges de solvants de force éluante appropriée, mais une sélectivité différente [123].

Ces trois méthodes théoriques sont basées sur des calculs de force éluante et de polarité. Il existe une méthode développée par Reich et al. [15], ne faisant pas intervenir de calcul mais reposant uniquement sur une série de tests expérimentaux.

3.3.3. La méthode CAMAG (Reich)

Cette optimisation est généralement applicable en moins de 15 tests. Elle est constituée de 4 étapes (Figure 47). Lors de la première étape, tout comme pour la sélection des solvants (*c.f.* 3.2.2), un solvant de chaque classe est testé individuellement. Après évaluation des résultats chromatographiques, ces solvants sont divisés en 3 groupes :

- Groupe A : solvants donnant des valeurs de R_F satisfaisantes ($0,2 < R_F < 0,8$). Ces solvants seront de nouveau utilisés à l'étape 3.
- Groupe B : solvants donnant des valeurs de R_F trop élevées ($R_F > 0,8$).
- Groupe C : Solvant dont la force éluante est trop faible entraînant des valeurs de R_F inférieur à 0,2.

Ensuite, pour la deuxième étape, les forces éluantes des solvants des groupes B et C doivent être réduites ou augmentées de sorte que les substances soit réparties entre $0,2 < R_F < 0,8$. Les solvants du groupe B sont alors dilués avec de l'hexane, et les solvants du groupe C avec de l'acide acétique. Après cet ajustement, les solvants dont le résultat chromatographique est satisfaisant, sont sélectionnés pour l'étape 3. Le but de l'étape 3 consiste à combiner deux solvants de différents groupes de sélectivité choisis dans les étapes 1 et 2. Dans un premier essai, un mélange 1:1 est utilisé. Les proportions peuvent être modifiées si le résultat chromatographique n'est pas satisfaisant. Il existe également une autre étape (étape 3') qui peut être considérée comme un raccourci. Les solvants du groupe B et C (étape 1) peuvent être directement combinés en sautant l'étape 2. Les proportions appropriées sont basées sur la force éluante des solvants. Un mélange 1:1 est un bon point de départ, mais une proportion de 10 % du solvant du groupe B

dans le solvant du groupe C est souvent suffisante. Si les résultats chromatographiques sont acceptables, les mélanges de solvants sont sélectionnés pour l'étape 4. Les réglages finaux sont effectués à l'étape 4. Elle inclut des ajustements mineurs concernant la force éluante, l'addition de modificateurs pour améliorer la forme des zones, et les variations de la saturation de la chambre. Si les zones montrent des trainées, l'ajout de 0,5 à 1,0 % d'acide, d'eau ou de base est souvent un bon choix [15].

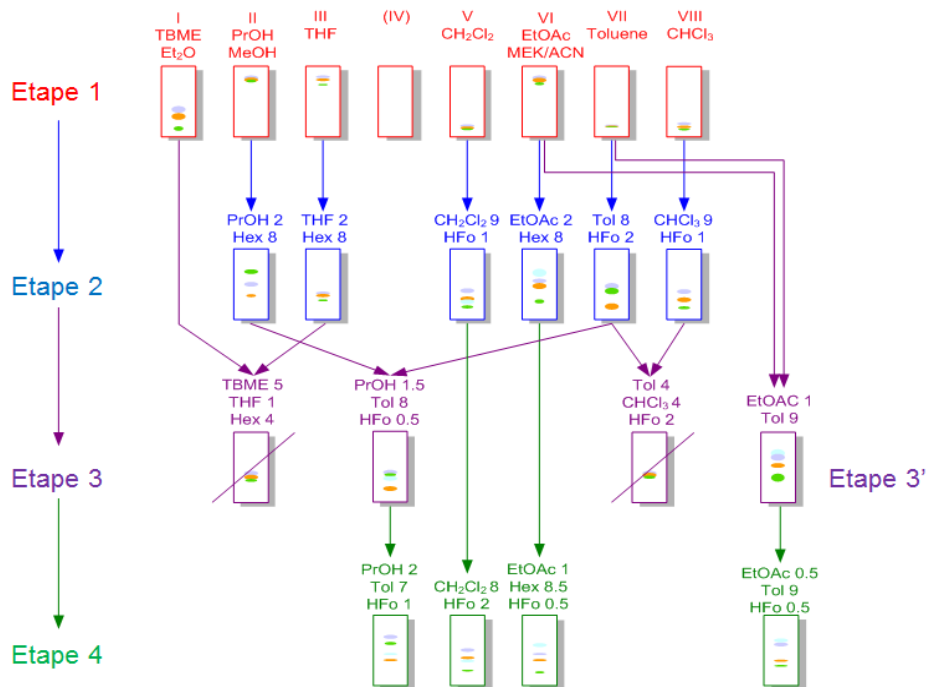


Figure 47: schéma de la méthode Reich (CAMAG).

3.4. La sélection des paramètres finaux

Après avoir sélectionné et optimisé la phase mobile, il est nécessaire de mettre au point les paramètres finaux. Pour cela, certains paramètres doivent être examinés en fonction de l'objectif de l'analyse [16] :

- Le volume d'application : pour une analyse qualitative, il est important de voir le plus de zones possible sans pour autant surcharger la phase stationnaire. Pour une analyse quantitative, il est important de rester dans une gamme de travail linéaire.
- La détection : si une révélation est utilisée, il est important d'évaluer le révélateur, à savoir tester sa reproductibilité.
- La robustesse de la méthode : il est important de tester les effets de l'humidité relative, du type de chambre de développement, de la saturation sur le résultat chromatographique.
- Les paramètres de l'évaluation densitométrique : il est important d'ajuster le mode de détection, la vitesse de mesure, et les dimensions des fentes.

4. CONCLUSION

L'(HP)TLC est une technique d'analyse qui a fait ses preuves d'un point de vue pratique. Les avantages, en particulier sa simplicité d'utilisation, sa flexibilité et sa rentabilité, lui permettent d'être mise en avant, en particulier dans les analyses qualitatives. Avec le développement de plaques commercialisées modernes et l'introduction, pour chacune de ses étapes de fonctionnement, d'équipements partiellement ou entièrement automatisés, les déterminations quantitatives très précises et reproductibles sont de nos jours possibles. Un exemple d'analyse quantitative est donné dans le chapitre 3. Afin de juger de l'apport de l'HPTLC dans l'analyse quantitative, une étude comparant les résultats obtenus à ceux obtenus par HPLC est présentée.

Les séparations chromatographiques peuvent être obtenues en sélectionnant différentes phases stationnaires combinées à divers systèmes de phases mobiles et ainsi bénéficier de mécanismes de séparation distincts : chromatographie d'adsorption, chromatographie de partage... Ces changements de principe de chromatographie provoquent des différences significatives dans la sélectivité de la séparation. Après avoir effectué une séparation optimale, les zones doivent être détectées. Si les zones ne sont pas naturellement colorées, fluorescentes, ou n'absorbent pas à 254 nm et sous lumière UV, un réactif de détection doit être appliqué. Cette révélation est principalement utilisée après développement. Très souvent, les réactifs universels sont utilisés, tels que des vapeurs d'iode ou d'acide sulfurique. Cette étape de révélation est un réel avantage qui apporte à l'HPTLC le pouvoir d'effectuer un traitement spécifique avant ou après la chromatographie (révélateur où l'on verra directement l'action sur le composé en question, bioluminescence où le composé spécifique va réagir sur la souche sélectionnée), ce qui offre de nombreuses applications.

L'(HP)TLC est utilisée dans de nombreux cas, comme par exemple lorsqu'un grand nombre d'échantillons doit être analysé simultanément, de manière rentable, et dans un laps de temps limité. Elle est également préférée dans le cas où les échantillons à analyser seraient endommagés, détériorés, ou non détectables lors d'analyses en HPLC ou en GC. L'(HP)TLC est également choisie lorsque toutes les substances présentes doivent être détectées. Cette technique est aussi utilisée lorsqu'elle est recommandée par les instances de réglementation dans le cas d'authentification et de contrôle. Ce point est abordé lors du chapitre 4 dans le cas d'un développement de méthode concernant le contrôle de la qualité des extraits de kava, et lors d'un développement de méthode pour la discrimination d'espèces dans le cas des plantes à tubercules.

L'(HP)TLC possède également l'avantage d'avoir des phases stationnaires à usage unique, ce qui permet d'éviter un problème de contamination croisée d'une analyse à l'autre, mais aussi l'application d'un échantillon n'ayant subi que de simples préparations. Ce point étant un des principaux avantages de cette technique et souvent cité, est discuté dans le chapitre 2.

CHAPITRE 2 : L'HPTLC ET L'ETAPE DE LA PREPARATION D'ECHANTILLON

1. INTRODUCTION

La préparation d'un échantillon avant son analyse débute dès son obtention et le processus implique plusieurs étapes (Figure 48). L'échantillonnage doit se faire de façon à maximiser l'exhaustivité de l'échantillon afin d'obtenir une meilleur représentativité de la population d'origine. La conservation de l'échantillon est une étape importante car le délai entre le prélèvement et l'analyse ne doit pas influencer le résultat de celle-ci pour des questions d'instabilité et garantir que ses caractéristiques physiques et chimiques soient conservées. Après cette étape, la plupart des échantillons ne sont pas analysables et doivent donc subir une ou plusieurs étapes de préparation comme par exemple : broyage, extraction, concentration, élimination d'interférents... La préparation d'échantillons est ainsi une étape importante du processus analytique. Elle représente dans certains cas une grande partie du temps de travail, mais aussi une des principales sources d'erreurs de l'analyse. La technique employée pour la préparation d'échantillon sera choisie en fonction du type de matrice à traiter (solide, liquide, ...) et de l'objectif de l'analyse (quantitatif ou qualitatif). Suivant l'objectif de l'analyse, qualitatif ou quantitatif, certains paramètres tels que l'exactitude, la précision, le coût, le temps et la difficulté de la préparation sont à prendre en compte. Pour une analyse quantitative, si une étape d'extraction est nécessaire, l'estimation du rendement de récupération et de la précision sont également des paramètres importants [20].

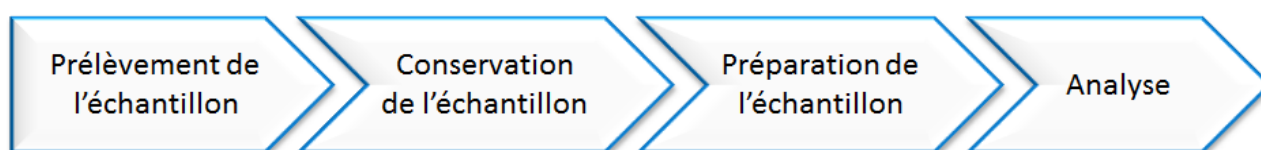


Figure 48 : étapes avant analyse.

Par le terme « préparation d'échantillon », deux objectifs sont à différencier : l'extraction de l'échantillon et l'enrichissement de l'analyte. Ces deux termes sont discutés dans ce chapitre et en particulier leurs liens avec l'HPTLC. Dans le cas de l'extraction, l'influence de la technique choisie sur la justesse de l'analyse quantitative d'un ingrédient actif dans des produits cosmétiques a été étudiée. Pour le cas de l'isolement, l'efficacité de HPTLC semi-préparative a été comparée à celle de l'HPLC semi-préparative.

2. GENERALITES SUR L'ETAPE D'EXTRACTION

Il existe une multitude de techniques d'extractions utilisées avant analyse. Elles peuvent être classées suivant la nature liquide ou solide de l'échantillon.

2.1. Extraction d'un échantillon liquide

2.1.1. Extraction liquide-liquide

2.1.1.1. Principes

Lors d'une extraction liquide-liquide, deux phases liquides A et B sont utilisées. Le choix de ces deux phases repose sur leur nécessaire immiscibilité. En pratique, l'une des phases est habituellement aqueuse et l'autre organique. Certains solvants comme par exemple le méthanol, l'acétone, l'acétonitrile, ou encore le 1,4-dioxane sont complètement miscible dans l'eau, alors que d'autres ne le sont pas du tout (Figure 49) [20].

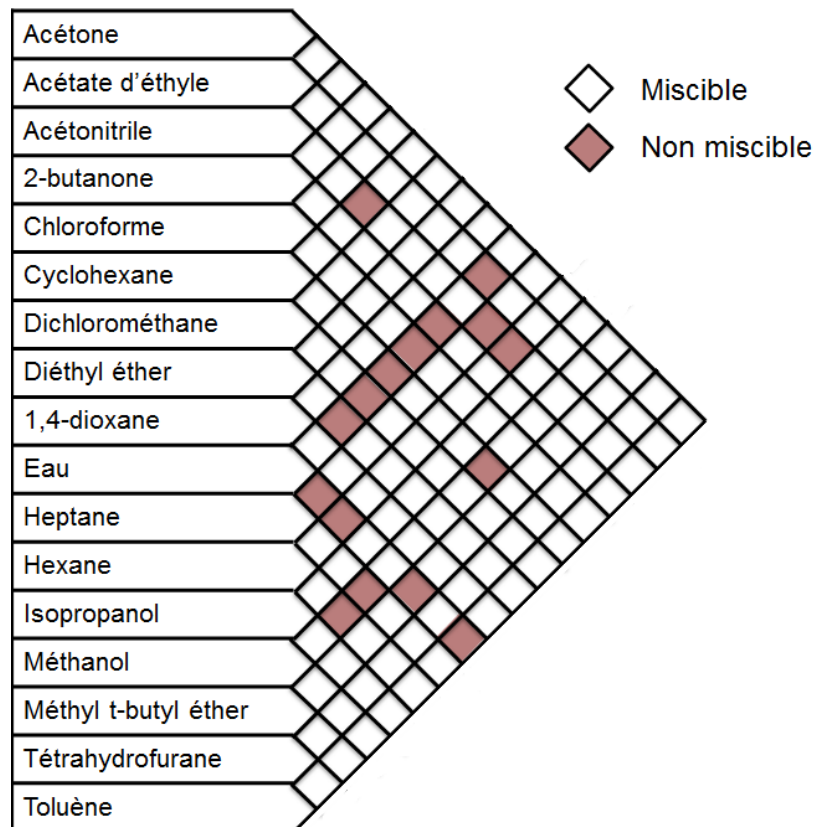


Figure 49 : miscibilité croisée de solvants usuels.

D'autres paramètres à prendre en considération sont la densité des solvants et leur solubilité. En effet, bien que de nombreux solvants puissent former visuellement deux phases distinctes, ils ne sont pas, dans la plupart des cas, totalement non-miscibles, mais mutuellement saturés. Par exemple, le dichlorométhane n'est pas totalement non-miscible dans l'eau, celle-ci étant saturée avec 1,6 % (m/m) de dichlorométhane (Tableau 12) [125].

Tableau 12 : solubilité de certains solvants, en % massique.

SOLUBILITE DES SOLVANTS DANS L'EAU (%)		SOLUBILITE DE L'EAU DANS DIFFERENT SOLVANTS (%)	
Heptane	0,0003	Heptane	0,01
Cyclohexane	0,006	Cyclohexane	0,01
Hexane	0,014	Hexane	0,01
Toluène	0,052	Toluène	0,033
Chloroforme	0,815	Chloroforme	0,056
Dichlorométhane	1,6	Dichlorométhane	0,24
Acétate d'éthyle	8,7	Acétate d'éthyle	3,3
2-Butanone	24,0	2-Butanone	10,0

2.1.1.2. Méthodologies

L'extraction liquide-liquide peut être réalisée de différentes manières. La plus simple étant de mélanger les deux phases dans une ampoule à décanter, remuer vigoureusement puis laisser décanter. Lorsque les phases sont complètement séparées, la phase inférieure est évacuée par le robinet situé dans la partie inférieure, puis la phase supérieure (Figure 50) [126].

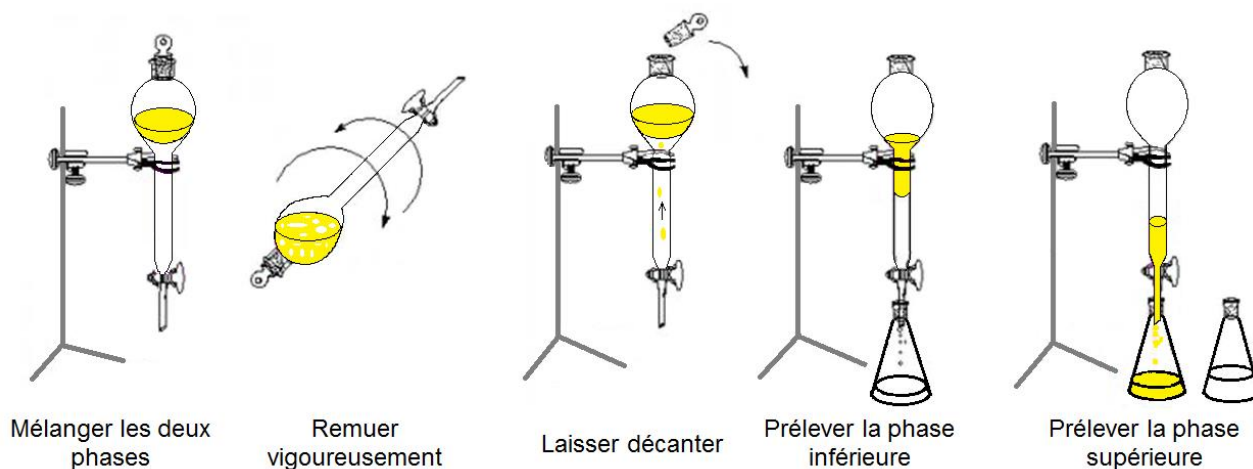


Figure 50 : extraction liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter.

Le principe de l'extraction liquide-liquide préparative peut être combiné à la force centrifuge pour obtenir la chromatographie de partition centrifuge (CPC). En effet, la CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide préparative fondée sur la différence de partage des solutés entre deux phases liquides non-miscibles (Figure 51). Pour cela, une colonne CPC est constituée d'un empilement de disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravée des cellules de partage reliée entre elles par des capillaires [127].



Figure 51: exemple de système CPC [128].

Lorsque la colonne est mise en rotation le champ de force centrifuge maintient la phase stationnaire liquide au sein de la colonne, alors que la phase dite mobile est pompée au travers de la phase stationnaire liquide. Il existe de nombreux systèmes biphasiques largement utilisés pour le fractionnement d'extraits naturels, couvrant toute la gamme de polarité, comme par exemple le système Arizona utilisant un mélange heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau [129, 130]. Ces systèmes génèrent donc deux phases (l'une plus dense que l'autre), utilisées soit comme phase stationnaire, soit comme phase mobile. En effet, lorsque la phase stationnaire utilisée est plus dense, la phase mobile est pompée en mode ascendant à contre sens du champ de force centrifuge. A l'inverse, lorsque la phase stationnaire utilisée est la plus légère, la phase mobile est pompée dans le sens du champ de force centrifuge appelé mode descendant [131].

La CPC possède l'avantage d'être une technique versatile ne dégradant peu ou pas les molécules. De plus que la CPC ne possède pas d'adsorption irréversible, ce qui génère aucune perte d'échantillon. Cependant, le nombre de plateau théorique est plus faible qu'en HPLC semi-préparative, ce qui réduit son efficacité. De plus le système nécessite une bonne étanchéité afin d'éviter les fuites pendant la rotation de la colonne [132].

2.1.2. Extraction sur phase solide

Lorsqu'un échantillon liquide est extrait par une phase solide, les analytes peuvent être soit adsorbés sur la phase solide (adsorbant), soit demeurés dans le filtrat alors que les composés interférents sont retenus (Figure 52). Les adsorbants sont le plus souvent catégorisés par la nature du mécanisme de leurs interactions primaires avec l'analyte d'intérêt : adsorption, partage, l'exclusion stérique et l'échange d'ions [133].

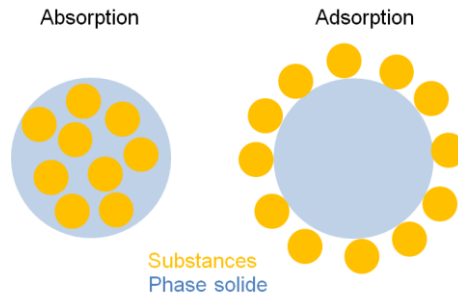


Figure 52 : représentation des processus de sorption: absorption, adsorption.

2.1.2.1. La chromatographie sur colonne ouverte

La chromatographie sur colonne ouverte est une méthode standard de purification au laboratoire. Cette forme de chromatographie est basée sur le même principe que la TLC, sauf que la phase solide (la silice est la phase la plus utilisée) est placée dans une colonne et non sur une plaque et que le solvant s'écoule au goutte-à-goutte (Figure 53). Cette technique réalisée à pression atmosphérique est peu applicable à grande échelle car elle demande une plus grande quantité de silice et de solvant [134].

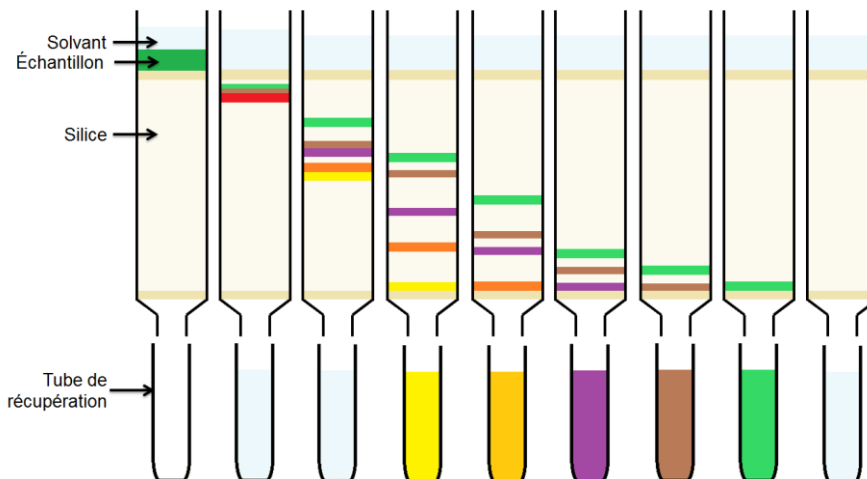


Figure 53: principe de fonctionnement de la chromatographie sur colonne ouverte.

Les avancées technologiques ont permis d'automatiser le système et de le combiner à un système de détection : la chromatographie flash qui fait également appel à des adsorbants optimisés (taille de particules, dispersion, ...) conditionnés en colonnes consommables (Figure 54). Le solvant s'écoule sous pression d'air comprimé.



Figure 54: exemple de système de chromatographie flash [135].

2.1.2.2. Solid phase extraction (SPE)

La SPE est une technique rapide et efficace dont le principe est d'adsorber les composés cibles sur une phase stationnaire contenue dans une cartouche, puis après élimination de la matrice à l'aide de lavages, les composés cibles sont récupérés lors de l'élution (Figure 55). Les avancées technologiques ont permis d'automatiser la SPE, mais aussi de la miniaturiser [133].

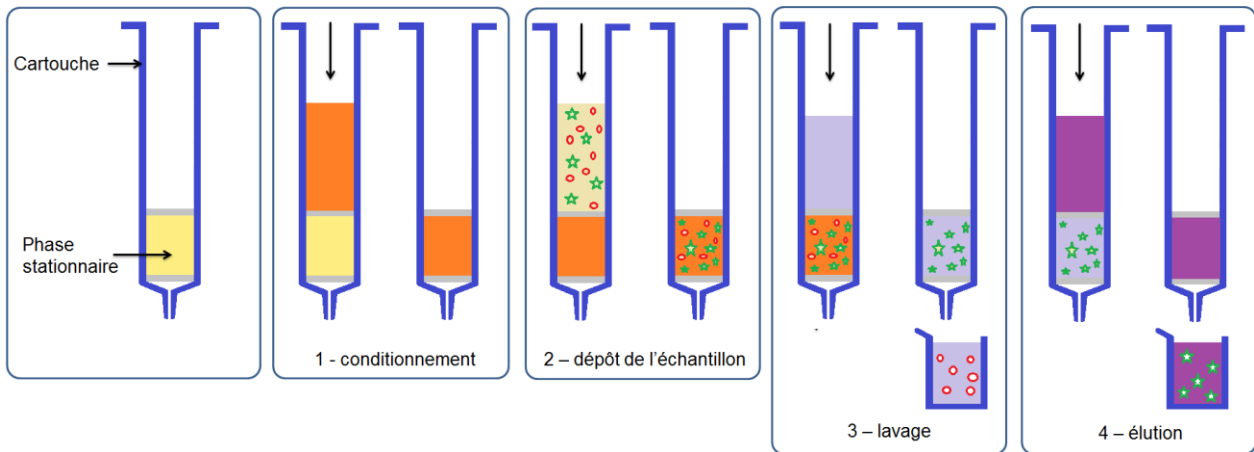


Figure 55: principe de fonctionnement de la SPE.

Il existe de nombreuses cartouches, commercialisées en fonction du type d'adsorbant : polaire, résine polymérique apolaire, résine polymérique fonctionnalisée, ou encore silice modifiée ...

2.2. Extraction d'un échantillon solide

2.2.1. Extraction solide-liquide

L'extraction de produits naturels est généralement de type solide-liquide. L'échantillon solide est mélangé avec un liquide, le solvant d'extraction. Il existe des méthodes dites traditionnelles, comme par exemple la macération, l'épuisement au moyen d'un Soxhlet, l'hydrodistillation, ou encore l'extraction par reflux. Les procédés régulièrement mentionnés lors d'une analyse HPTLC sont l'extraction par reflux, la sonication, ou encore l'utilisation du montage de Soxhlet.

L'extracteur de Soxhlet est un appareil en verre permettant d'extraire un échantillon à l'aide d'un solvant. Lors d'une extraction au Soxhlet, l'échantillon est placé à l'intérieur d'une cartouche en matériau poreux chimiquement inerte puis transféré dans le corps principal en verre de l'extracteur. Le solvant est placé dans le ballon, puis installé en dessous du corps principal, et au-dessus d'un chauffe-ballon. Au-dessus de l'extracteur se trouve un réfrigérant facilitant la condensation des vapeurs de solvant et leur recyclage. De cette façon, le cycle d'extraction se répète continuellement (Figure 56) [136].

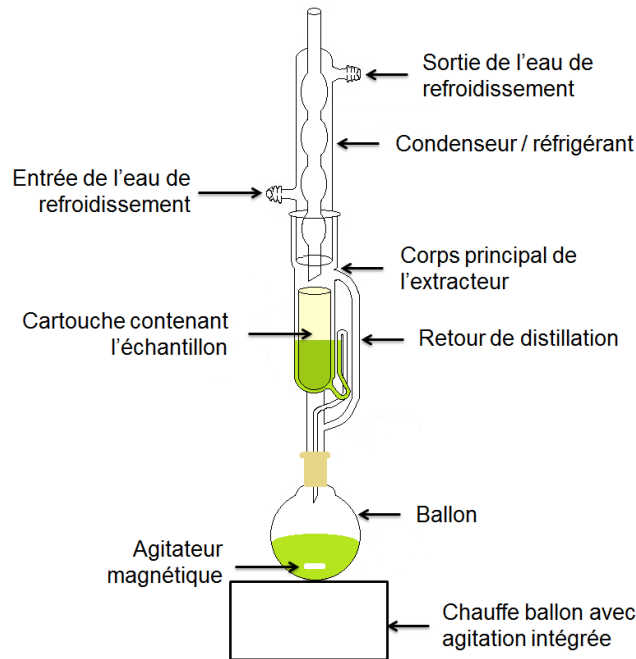


Figure 56: extracteur de Soxhlet.

Cependant, ce procédé est généralement long et nécessite de grande quantité de solvant organique. Ces dernières années, les progrès en matière de méthodes d'extraction ont eu pour principal objectif de réduire les temps d'extraction et les volumes de solvant utilisés tout en améliorant la sélectivité et en permettant l'automatisation. Des techniques d'extraction par fluides supercritiques, par fluide pressurisé, ou assistées par ultrasons, micro-ondes ont ainsi fait leur apparition.

2.2.2. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction par solvant assistée par ultrasons (sonication) est une extraction reconnue et utilisée dans certaines pharmacopées. Elle utilise les ondes vibrationnelles de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz. Ces ondes se propagent dans l'échantillon solide, liquide ou gazeux. La propagation des ondes génère des cycles de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression) qui conduisent à des mouvements moléculaires. En effet, lors de la raréfaction, la distance entre les molécules est augmentée, ce qui forme des bulles de cavitations. La répétition des cycles de compression et de raréfaction conduit à l'implosion des bulles de cavitation, ce qui libère une grande quantité d'énergie [137]. Lorsque ces implosions sont proches d'une surface solide (dans notre cas une matrice végétale), elles provoquent des jets de liquide qui vont percer les parois végétales et permettre la libération des molécules dans le milieu liquide [138].

L'extraction assistée par ultrasons est une technique pouvant être utilisée avec tout type de solvants. Au début de l'extraction assistée par ultrasons, un simple bain de lavage était utilisé mais depuis plusieurs années des systèmes optimisés pour l'extraction ont été développés [138, 139]. La sonication est relativement rapide et a par exemple démontré de bons rendements d'extraction

dans le cas des colorants naturels d'extraits de fleurs de *Bougainvillea glabra* [140], de composés phénoliques présents dans la betterave (*Beta vulgaris* L.) [141], ou encore dans le cas d'extraction de la carvone et du limonène à partir des graines de carvi (*Carum carvi* L.) [142].

2.3. Contexte de l'étude

Le but de cette étude a été d'évaluer l'HPTLC et plus particulièrement le caractère minimaliste de ses techniques de préparation dans le cas d'une analyse quantitative. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour le même type d'analyse en HPLC et par les mêmes techniques de préparation minimalistes. Pour cela, une analyse quantitative d'un ingrédient actif a été réalisée dans trois produits cosmétiques. Les produits cosmétiques sont des produits de consommation courante dont le marché est en constante évolution. L'incorporation d'ingrédients actifs synthétiques ou naturels, oblige les autorités à définir des textes afin de garantir la sécurité du consommateur. En effet, ces dernières années, la réglementation cosmétique a beaucoup changé et tend à devenir encore plus restrictive. La réglementation européenne propose dès 1976 une directive qui sera par la suite modifiée et donnera naissance au règlement cosmétique (CE 1223/2009) en vigueur sur tout le territoire européen depuis juillet 2014 [143, 144]. Aujourd'hui, il est nécessaire d'être en mesure de qualifier et de quantifier de nombreux composés dans les produits cosmétiques, à différents stades de leur fabrication [145].

L'analyse d'ingrédients actifs dans le domaine cosmétique est, la plupart du temps, précédée d'une phase de préparation d'échantillon, plus ou moins lourde suivant la complexité de la matrice [146, 147]. En effet, la multitude de produits cosmétiques présents sur le marché tels que les produits d'hygiène (savons, shampoings, gels douche), les produits de soin-visage (crèmes, masques de beauté, lotions), les produits capillaires (gels, shampoings), ou encore les produits de maquillage, contiennent des matières plus ou moins complexes tels que des polymères ou des tensioactifs. Par leur physico-chimie particulière, ces ingrédients augmentent la difficulté de l'analyse, mais peuvent aussi venir polluer l'instrument analytique. Il est de ce fait difficile de considérer une préparation d'échantillon et une méthode d'analyse universelle pour tous les cosmétiques.

L'étude a été développée pour la quantification d'un agent antioxydant : le coenzyme Q10 (CoQ10) ($C_{59}H_{90}O_4$) (Figure 57) dans trois produits cosmétiques : une crème, un gel - crème et un gel douche. La comparaison a été basée sur le taux de récupération, la consommation de solvants, la durée et le coût de la préparation et la quantification l'analyse des échantillons.

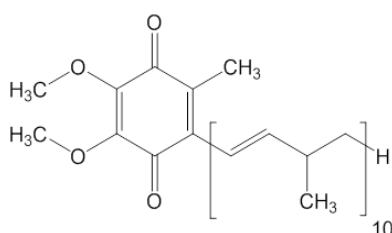


Figure 57: structure du coenzyme Q10.

Pour cette étude, les trois produits cosmétiques typiques ont été formulés (Tableau 13). Ces trois produits ont été sélectionnés car certains de leurs ingrédients rendent l'analyse plus complexe. En effet, la présence d'un tensioactif (Dehyton K COS) dans la formulation du gel douche est susceptible d'entraîner la formation d'une émulsion et donc une perte lors de la préparation d'échantillon et par conséquent un faible recouvrement [148]. Dans la formulation du gel-crème, l'utilisation d'un polymère (Aristoflex® avc), nécessite son élimination avant l'analyse par HPLC afin d'éviter toute dégradation de la colonne lors de l'analyse HPLC. Dans la formule de la crème, il s'agit de l'agent gélifiant/émulsifiant (Héliogel™) susceptible d'induire des interférences avec le composé cible. Une autre difficulté concerne la possible adsorption de l'analyte sur le tensioactif et sur le polymère qui entraînerait un faible recouvrement.

Tableau 13: formules des trois produits cosmétiques sélectionnés.

PHASES	INGREDIENTS		FOURNISSEUR	QUANTITE (%)	
	NOM COMMERCIAL	NOM INCI			
Gel-crème	A	/	Eau	/	QSP
		Aristoflex avc	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer	Clariant	0,5-1,00
	B	Lanol 1688	Cétearyl Ethylhexanoate	Seppic	6,00
		Phenonip xb	Méthylparabene, éthylparabene, propylparabene, butylparabene, Isobutylparabene, Phenoxyethanol	Clariant	0,80
		Coenzyme Q10	Ubiquinone	Cooper	0,10
Gel douche	A	/	Eau	/	QSP
		Phenonip xb	Méthylparabene, éthylparabene, propylparabene, butylparabene, Isobutylparabene, Phenoxyethanol	SCD	61,20
		Glycerin	Glycérine	AMI	0,80
		Dehyton K COS	Cocamidopropyl bétaine	AMI	3,00
		Texapon NSO IS	Sodium laureth sulfate	AMI	15,00
	B	NaCl	Sodium chloride	Seppic	20,00
C	Coenzyme Q10	Ubiquinone	Cooper	0,10	
Crème	A	/	Eau	/	78,90
		Glycerin	glycérine	AMI	3,00
	B	Heliogel	Heliogel	LMC	0,70
	C	Montanov 68	Cétearyl alcool (et) cétearyl glucoside	Seppic	4,00
		Neoderm	Caprilic/capric triglycérides	J. Bouis	5,00
		Phytosqualane	Squalane	Sophim	1,50
		Phenonip XB	Méthylparabene, éthylparabene, propylparabene, butylparabene, Isobutylparabene, Phenoxyethanol	SCD	0,80
		α-tocopherol	α-tocophérol	Laserson	0,10
		Paraffine oil	Paraffinum liquidum	Cooper	1,00
		Paraffine solid	Petrolatum	Cooper	5,00
D	Coenzyme Q10	Ubiquinone	Cooper	0,10	

2.3.1. Sélection des techniques d'extraction de l'étude

Comme dit précédemment, le choix de la technique d'extraction est dans un premier temps, réalisé en fonction du type d'échantillon à préparer, à savoir liquide ou solide. Dans notre cas, les

3 produits cosmétiques choisis étant semi-liquides, seules les techniques d'extraction pour échantillons liquides citées précédemment ont été présélectionnées (c.f.2.1). Comme extraction liquide-liquide, l'extraction à l'aide d'une simple ampoule à décanter a été testée. En ce qui concerne l'extraction sur phase solide, la chromatographie flash a été testée. De plus, afin de discuter, de façon critique, des phases stationnaires à usage unique en HPTLC souvent citée comme avantageuses pour la simplification de l'étape de préparation d'échantillon, l'analyse quantitative a été aussi réalisée par HPLC.

2.3.2. Résultats

Pour cette étude, la méthode d'analyse du Co Q10 en HPTLC inspirée de la littérature n'a nécessité aucune optimisation [149]. En HPLC, une méthode par gradient de solvants en phase inverse a été utilisée.

Les premiers tests ont été réalisés par HPTLC. Chacun des ingrédients de chaque formule a été individuellement analysé et les valeurs de R_f ont été comparées à celui obtenu pour le standard de Co Q10, (Figure 58). Les résultats ont montré que la plupart des ingrédients ne migraient pas et restaient à la zone d'application, ce qui ne montre aucune co-élution entre les divers ingrédients et le Co Q10 dont la valeur de R_f obtenue est 0,23 et une valeur d'absorption maximale $\lambda = 282$ nm. De plus, ces premiers tests ont également montré que l'HPTLC pouvait être utilisée pour vérifier la bonne marche des techniques d'extraction utilisées avant analyse HPLC.

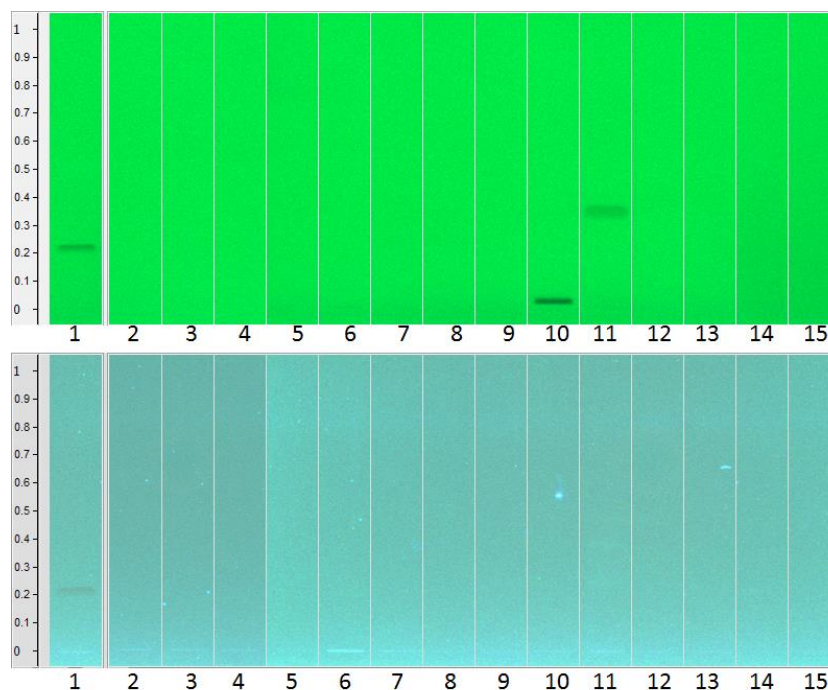


Figure 58 : profil HPTLC des ingrédients présents dans la formule du gel douche. Bande 1 : Co Q10 ; 2 : dehyton ; 3 : texapon ; 4 : NaCl ; 5 : glycérine ; 6 : Héliogel ; 7 : Montanov ; 8 : Neoderm ; 9 : Phytosqualane ; 10 : Phenonip ; 11 : Alpha-tocophérol ; 12 : paraffine liquide ; 13 : paraffine solide ; 14 : Aristoflex avc ; 15 : Lanol 1688.

Un des avantages de l'HPTLC est que la plaque est à usage unique, ce qui permet d'y appliquer des échantillons n'ayant subi que de simples préparations sans avoir d'impact sur l'instrument. En cosmétique, la majorité des produits se présentent sous forme liquide ou semi-liquide, ce qui favorise l'extraction liquide-liquide, mais elle est dans de nombreux cas associée à une ou plusieurs autres techniques de concentration/élimination. C'est pourquoi pour les analyses par HPTLC, les préparations les plus simples ont été envisagées. En ce qui concerne les valeurs de recouvrements, certains référentiels possèdent comme critère d'acceptation un recouvrement compris entre 95 et 105 % pour des tests quantitatifs majeurs, et compris entre 70 et 130% pour le dosage de faible concentration. C'est pourquoi nous avons établi notre limite d'acceptation à 80 %.

Le gel douche étant complètement soluble dans l'isopropanol, une simple solubilisation a été effectuée (1,5 g de gel douche dans 4,5 mL d'isopropanol). Le recouvrement a été testé en ajoutant du Co Q10 à deux quantités connues (0,02 et 0,1 %) dans une base de gel douche. De plus la précision de l'analyse, la répétabilité et la reproductibilité ont été déterminées. Les résultats ont montré des recouvrements aux alentours de 80 % pour les deux concentrations (Tableau 14).

Tableau 14: résultats de la quantification du Co Q10 dans le gel douche par HPTLC.

Durée de la préparation d'échantillon	5 min
Consommation de solvant de la préparation d'échantillon	4,5 mL
Recouvrement (0,1 %)	74,0 %
Recouvrement (0,02 %)	80,3 %

Pour le deuxième test en HPTLC, le gel-crème a été préparé de la même façon que le gel douche, mais lors de la préparation d'échantillon, un recouvrement de 24 % pour les deux concentrations a été obtenu. Pour surmonter ce problème, une extraction liquide-liquide a donc été envisagée. Pour cela, 1,5 g de gel-crème a été extrait avec 3 mL d'un mélange d'isopropanol et d'hexane (2:1 ; v/v). L'actif étant apolaire a donc été récupéré dans la phase contenant l'hexane puis analysée. Les analyses ont montré des résultats discutables. Pour l'échantillon de contrôle dosé à 0,1 %, les recouvrements sont de l'ordre de 79,9 % ce qui est acceptable. Par contre pour l'échantillon dosé à 0,02 %, les valeurs de recouvrement n'atteignent que 23,3 % (Tableau 15). L'hypothèse pouvant justifier ce faible taux de recouvrement serait qu'une partie de l'actif est restée enfermée dans les micelles du tensioactif.

Tableau 15: résultats de la quantification du Co Q10 dans le gel-crème par HPTLC.

Durée de la préparation d'échantillon	15 min
Consommation de solvant de la préparation d'échantillon	3,0 mL
Recouvrement (0,1 %)	79,9 %
Recouvrement (0,02 %)	23,3 %

En ce qui concerne la crème, aucun des ingrédients n'interférant avec le Co Q10, une extraction à l'aide de 2 ml d'une solution d'hexane et d'acétate d'éthyle (9:1 ; v/v) a été envisagée. La crème n'étant pas totalement soluble dans le solvant, l'extraction est suivie par une étape de centrifugation. Les valeurs de recouvrement pour les deux dosages ont montré des résultats satisfaisants. (Tableau 16).

Tableau 16: résultats de la quantification du Co Q10 dans la crème par HPTLC.

Durée de la préparation d'échantillon	10 min
Consommation de solvant de la préparation d'échantillon	2,0 mL
Recouvrement (0,1 %)	81,8 %
Recouvrement (0,02 %)	83,9 %

En ce qui concerne les analyses en HPLC, certains ingrédients peuvent s'accumuler et ainsi dégrader la colonne HPLC, ou éluer au fur et à mesure ce qui peut conduire à une augmentation du signal et donc à des faux positifs. C'est pourquoi avant toute analyse par HPLC, la préparation d'échantillon a été vérifiée par HPTLC afin d'être sûr de l'élimination des ingrédients interférant.

Pour la préparation d'échantillon du gel douche, une solubilisation semblable à celle réalisée pour l'HPTLC n'étant pas suffisante, une extraction liquide-liquide a été testée. Pour cela, 1,5 g de gel douche a été extrait avec 10 mL d'un mélange d'eau, d'isopropanol et d'hexane (7:1:2 ; v/v/v), afin de retenir le maximum d'ingrédients indésirables dans la phase aqueuse. La phase organique a été lavée à l'aide de 4 mL d'un mélange d'isopropanol et d'eau (2:2 ; v/v). Cette étape de lavage a été réalisée 3 fois afin de laver au maximum la phase organique. Les phases organiques ont été réunies puis évaporées à sec avant d'en dissoudre le résidu dans 4 mL d'isopropanol. Les valeurs de recouvrement de l'ordre de 73 % pour les deux concentrations sont en dessous de notre limite fixée à 80 % (Tableau 17). Ces faibles valeurs de recouvrement pourraient être dues aux 3 lavages.

Tableau 17 : résultats de la quantification du Co Q10 dans le gel douche par HPLC.

Durée de la préparation d'échantillon	50 min
Consommation de solvant de la préparation d'échantillon	26,0 mL
Recouvrement (0,1 %)	73,4 ± 3,2 %
Recouvrement (0,02 %)	72,9 ± 2,0 %

De même, pour l'analyse d'1,5 g de gel-crème, une extraction liquide-liquide a été effectuée avec 2 mL d'un mélange d'hexane et d'isopropanol (1:1 ; v/v). La phase contenant l'hexane a ensuite été lavée de la même façon que pour le gel douche mais avec 2 mL d'un mélange d'isopropanol et d'eau (1:1 ; v/v) afin d'éliminer toute trace du polymère (Aristoflex® avc). Les valeurs de recouvrement ont été de 66,2 % pour un gel-crème contenant 0,1 % de l'actif et 80,2 % pour un gel-crème contenant 0,02 % d'actif (Tableau 18). De la même façon, ces faibles valeurs

de recouvrement n'atteignant pas la limite fixée à 80 % laissent envisager une perte occasionnée lors de l'étape de lavage.

Tableau 18: résultats de la quantification du Co Q10 dans le gel-crème par HPLC.

Durée de la préparation d'échantillon	55 min
Consommation de solvant de la préparation d'échantillon	12,0 mL
Recouvrement (0,1 %)	66,2 %
Recouvrement (0,02 %)	80,8 %

Pour l'analyse de la crème, aucune des méthodes utilisées précédemment n'a permis une bonne extraction du CoQ10. Les recouvrements obtenus ont été de l'ordre de 20 %. Le fractionnement de l'échantillon par chromatographie flash a donc été envisagé en se basant sur la méthode HPTLC. Pour cela, 1,5 g de crème a été dissout dans un mélange d'hexane et de THF (2/1 ; v/v), puis mélangé à 4,5 g de silice. Le mélange a ensuite été évaporé à sec pour être placé dans une cartouche adaptée à l'instrument de chromatographie flash. Le fractionnement a été réalisé sur une colonne de silice (12 g, 40 µm, CV 17 mL) avec du toluène comme solvant d'élution à une vitesse de 18 mL/min. Les fractions contenant l'actif ont été récupérées, évaporées à sec, puis dissoutes dans 1 mL d'isopropanol. Les valeurs de recouvrement pour la crème dosée à 0,1 % ont été de l'ordre de 68 %. Le même protocole a été testé pour la crème dosée à 0,02 % mais n'a pas donné le résultat escompté (Tableau 19). En effet, le détecteur utilisé sur notre système de chromatographie flash n'a pas montré une sensibilité suffisante pour pouvoir détecter une petite quantité de Co Q10. Pour améliorer les résultats il faudrait travailler sur de plus grandes quantités d'échantillon supérieur à la limite de détection du détecteur ELSD/UV/UV-Vis.

Tableau 19: résultats de la quantification du Co Q10 dans la crème par HPLC.

Durée de la préparation d'échantillon	60 min
Consommation de solvant de la préparation d'échantillon	15,0 mL
Recouvrement (0,1 %)	68,4 %
Recouvrement (0,02 %)	-

2.3.3. Discussion

En comparant le temps de préparation des échantillons, et la consommation de solvant nécessaire pour le gel douche, le traitement avant analyse par HPTLC a utilisé 4,5 mL pour un temps de 5 min, alors que pour l'analyse par HPLC, le traitement a nécessité 26 mL pour 50 min. En ce qui concerne l'analyse du gel-crème, le temps de préparation par HPTLC (15 min) a été plus court que par HPLC (55 min). De la même façon, la consommation de solvant a été plus faible en HPTLC (3 mL) qu'en HPLC (12 mL). Dans le cas de la crème, ces différences ont été confirmées, pour un temps de traitement plus court (10 min par HPTLC et 60 min par HPLC), l'HPTLC a utilisé moins de solvant (2 mL) que l'HPLC (15 mL).

Concernant les valeurs de recouvrement, notre limite d'acceptation étant fixée à 80 %, les résultats obtenus sont donc discutables. Pour le gel douche, même si les valeurs obtenues par HPTLC sont sensiblement supérieures à celles obtenues par HPLC, les résultats ne révèlent pas d'avantage pour l'une ou l'autre technique. En effet, aucun des ingrédients présents dans le gel-douche ne posant un réel problème technique pour l'HPLC ou pour l'HPTLC, la préparation d'échantillon n'a pas fait intervenir de technique de préparation complexe. En ce qui concerne le gel-crème, le protocole mis en place en HPLC avait comme contrainte l'élimination du polymère (Aristoflex® avc) pouvant dégrader la colonne, l'extraction de l'actif a fait intervenir des étapes supplémentaires. Dans les deux cas de dosage, les taux de recouvrement obtenus par HPLC sont d'environ 73 %, alors que par HPTLC l'extraction n'a pas donné de résultats satisfaisants pour l'extraction de faibles concentrations (23,3 %). Le fait qu'en HPTLC le polymère ne constitue pas un problème, la technique de préparation d'échantillon choisie aura tendance à tendre vers la solubilisation ou vers de simples extractions liquide-liquide, mais ce choix ne s'avère pas toujours efficace pour un recouvrement maximum. Pour la crème, le gélifiant/émulsifiant (Héliogel™) n'étant pas problématique pour l'analyse par HPTLC, le traitement utilisé (solubilisation et centrifugation) a donné des résultats satisfaisants (82 %). En ce qui concerne l'analyse par HPLC, l'élimination du gélifiant/émulsifiant a été problématique. En effet, les tests effectués par extraction liquide-liquide n'ont pas permis son élimination. L'élimination du gélifiant/émulsifiant a donc été réalisé par chromatographie flash, et la détection de l'actif a été effectuée directement par le détecteur de l'instrument. L'extraction de l'actif a donnée des résultats en dessous de notre limite fixée à 80 % sur l'échantillon dosé à 0,1 % (68,4 %), et n'a pas permis d'extraire l'actif dans des crèmes dosées à de faibles concentrations. En effet, les faibles taux de recouvrement obtenus sont liés à la limite de détection de notre détecteur qui a été le paramètre critique. Afin de contrer ce problème, une extraction par SPE sur phase silice devrait être envisagée.

2.3.4. Conclusion

Le but de cette étude était de prospector les techniques de préparation d'échantillon sous l'angle de l'HPTLC. En effet, cette technique nécessite des techniques de préparation minimalistes que ce soit pour une analyse quantitative ou qualitative. Mais dans le cas d'une analyse quantitative, pour le même type d'analyse, est-il possible d'obtenir les mêmes résultats en HPLC sans pour autant faire appel à une préparation d'échantillon plus complexe et chronophage ?

Lors de cette étude, le but de la préparation d'échantillon a été de fournir un échantillon qui soit exempt d'interférant, qui n'endommage pas l'instrument ou la phase stationnaire, qui soit compatible avec la méthode d'analyse utilisée (HPTLC ou HPLC), tout en permettant d'obtenir des taux de recouvrement supérieurs ou égaux à 80 %.

Il a été constaté que le choix de la technique d'analyse n'est pas décisif pour la quantification de l'actif. Les deux approches (HPLC et HPTLC) ont permis le dosage de l'ingrédient actif (Co Q10) avec succès dans les différents cas étudiés.

Les résultats ont montré que d'avoir une phase stationnaire à usage unique est un réel avantage de l'HPTLC. En effet, le fait de ne pas avoir à éliminer d'ingrédients lors de la préparation d'échantillon a réduit significativement les temps et la consommation de solvant. De plus les protocoles développés (solubilisation et extraction liquide-liquide) sont peu contraignants. Cependant, la simplicité des méthodes de préparation d'échantillon utilisées en HPTLC a montré des limitations notamment dans le cas de faible concentration en actif dans le gel-crème. En effet, même si les deux protocoles mis en place ont nécessité une étape supplémentaire afin de libérer le Co Q10, celui utilisé pour l'HPTLC comprenait une étape de moins de lavage, ce qui explique le faible taux de recouvrement.

En ce qui concerne les préparations d'échantillon avant l'analyse par HPLC, la problématique de certains ingrédients affectant la colonne nécessite dans certain cas de faire intervenir des techniques de préparation plus complexes que des solubilisations et simples extractions liquide-liquide, comme ce fut le cas du dosage du Co Q10 dans la crème.

Dans certains cas, l'extraction ou l'enrichissement consistant à simplifier l'échantillon pour obtenir une meilleure séparation de l'analyte du reste de la matrice, ou bien consistant à concentrer l'échantillon et ainsi obtenir une meilleure réponse de l'analyte, ou tout simplement rendre l'échantillon compatible avec la technique d'analyse, ne sont pas recherchés. Dans ce cas la préparation d'échantillon tendra vers une étape d'isolement

3. L'ISOLEMENT DE METABOLITES D'INTERET

Il existe dans les produits naturels une grande diversité chimique qui, depuis longtemps, motive la recherche en phytochimie. La découverte de nouveaux composés passe par leur isolement, puis par des études approfondies afin de les caractériser. Les applications de ces nouveaux composés sont nombreuses. Ils sont par exemple intégrés dans des produits pharmaceutiques, cosmétiques, ou encore dans des arômes.

3.1. Introduction

Avant la conception d'un protocole d'isolement, la nature du composé cible doit être prise en compte en comparaison avec celle de sa matrice et des autres constituants. Ses caractéristiques générales telle que sa solubilité, sa polarité, sa stabilité, son pka ou encore son poids moléculaire y sont très utiles. Pour obtenir des composés d'intérêts purs dans des quantités suffisantes à partir d'extraits naturels, l'analyste procédera généralement en deux étapes. La première consiste à enrichir l'extrait pour pouvoir dans un deuxième temps isoler le composé cible [125].

Afin d'enrichir l'extrait, diverses méthodes sont utilisées comme par exemple la chromatographie sur colonne ouverte (*c.f.* 2.1.2.1) (Tableau 20). Ces méthodes présentent généralement une grande capacité de charge mais une faible résolution [125].

Tableau 20 : techniques classiquement utilisées, leurs avantages/inconvénients.

TECHNIQUES	AVANTAGES ET INCONVENIENTS	EXEMPLES
Extraction liquide-liquide	Grande consommation de solvant Simple	Séparation des saponines [125] Séparation des tannins [150]
Chromatographie sur colonne ouverte	Chronophage Grande consommation de solvant	Séparation des lipides Elimination des tannins [151]
Chromatographie de partage centrifuge	Pas d'adsorption irréversible, aucune perte d'échantillon Faible efficacité (nombre de plateau théorique) Problème d'étanchéité	Purification de produits naturels à partir de plantes [152]
Chromatographie en phase liquide sous vide	Rapide Support réutilisable	Séparation de mélanges d'alcaloïdes [153] Séparation d'une fraction de graine d' <i>Achyranthes Aspera</i> [154]

Pour améliorer la résolution, les techniques semi-préparatives peuvent être utilisées.

3.2. Les techniques semi-préparatives

Un extrait brut est généralement simplifié en fractions avant de procéder à l'isolement souvent réalisée par HPLC semi-préparative qui représente l'une des principales techniques d'isolement des produits naturels à des fins analytiques ou d'études biologiques, qui nécessitent peu de quantités [38].

Lors du précédent chapitre (Chap. 1.2), parmi les applications de la TLC a été mentionnée son utilisation pour l'enrichissement des extraits notamment par le biais de la PTLC. La PTLC se pratique avec des plaques d'épaisseurs variables suivant qu'elles soient commercialisées ou directement préparées par l'analyste et permet l'isolement de nombreux composés. Suivant la complexité de l'extrait, la PTLC ne peut être utilisée seule et doit être combinée avec une seconde méthode d'isolement plus fine [38, 125]. De nombreux exemples d'isolement avec ces plaques ont été répertoriés [43, 155]. De nouvelles plaques avec zone de concentration dans la partie inférieure ont fait leur apparition et permettent l'application d'un plus grand volume d'échantillon [38]. La chromatographie sur couche mince à flux forcé a aussi été utilisée pour l'isolement/purification et a notamment montré de bons résultats pour de petites quantités d'échantillons et des échantillons déjà partiellement purifiés [38-40]. Des isollements avec des plaques classiques de TLC ont été réalisés, mais jusqu'à présent aucun article n'a relaté d'isolement avec des plaques HPTLC [156, 157].

C'est pour cela que la première étude portera sur la comparaison entre l'HPTLC et l'HPLC semi-préparative dans les cas d'isolement de composés-cible dans 3 différents types d'extraits bruts.

3.3. Contexte de l'étude

Pour cette étude, l'objectif était de comparer la performance de l'HPLC semi-préparative avec l'HPTLC semi-préparative pour l'isolement de métabolites secondaires dans différents types d'extraits. Pour ce travail méthodologique, nous avons sélectionné des métabolites représentatifs de grandes familles phytochimiques avec des propriétés physico-chimiques bien distinctes. C'est ainsi que nous avons choisi la carvone dans l'huile essentielle de menthe verte (*Mentha spicata* L.), représentative des terpénoïdes peu polaire et volatils, le resvératrol dans un extrait sec de *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson, représentatif des dérivés phénoliques non-volatils et l'acide rosmarinique dans un extrait sec commercialisé de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), représentatif des composés polaires protiques hydrosolubles.

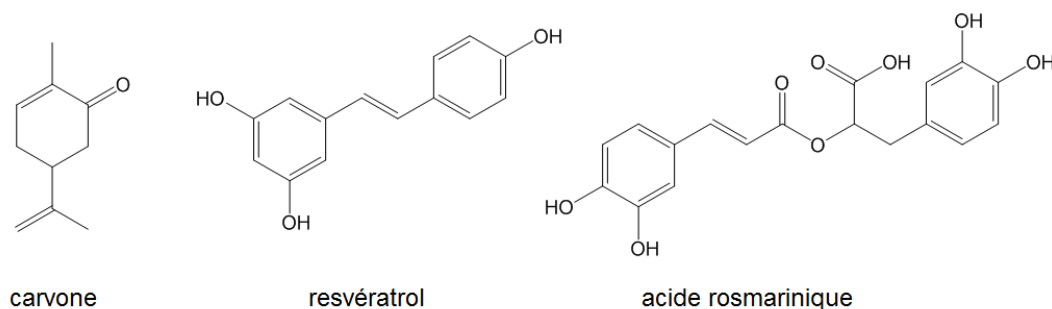


Figure 59 : structures de la carvone, du resvératrol et de l'acide rosmarinique.

La carvone est un terpénoïde se trouvant naturellement dans de nombreuses huiles essentielles comme la menthe verte (*Mentha spicata* L.), où elle se trouve avec une teneur élevée (60-70 %) [158-160]. Ce composé monoterpénique présente des propriétés antiseptiques et est généralement analysé en GC [159]. Le resvératrol est un stilbène phénolique présent par exemple dans la peau des raisins rouges et dans notre cas dans l'extrait de *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson [161, 162]. L'acide rosmarinique du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) est un acide phénolique connu pour son activité anti-oxydante [163].

La discussion de l'étude a été basée sur la comparaison entre les deux techniques de séparation chromatographique, la pureté et la quantité de composés isolés, la consommation de solvant, la durée et le coût des opérations d'isolement.

3.4. Résultats

Les résultats ont montré que les deux approches permettent l'isolement des métabolites cibles dans les trois cas étudiés (Tableau 21). L'HPTLC semi-préparative peut, dans certains cas, offrir des avantages par rapport l'HPLC semi-préparative. Pour une teneur élevée du composé cible dans l'extrait naturel et en considérant une approche de chimie analytique verte et durable visant à réduire la quantité de déchets et de coût en énergie, l'HPTLC est apparue comme la méthode de choix (cas de la carvone et du resvératrol). Pour les cas où la résolution chromatographique est plus délicate, le choix de la technique dépend de la priorité entre la pureté et le rendement de l'isolement : si une pureté élevée est visée, l'HPLC semi-préparative reste plus efficace, tandis que si un rendement élevé est souhaité, l'HPTLC sera préférée.

Tableau 21: résumé des résultats.

		HPLC	HPTLC
Carvone	Durée de traitement	17 injections: 10 h	14 plaques: 9 h (prélavage: 7 h)
	Pureté (%)	97,1 ± 0,1	94,3 ± 0,1
	Consommation de solvant/ mass de composé isolé (mL/mg)	153	27
Resveratrol	Durée de traitement	15 injections: 9 h	12 plaques: 8 h (prélavage: 6 h)
	Pureté (%)	98,1 ± 0,1	98,1 ± 0,1
	Consommation de solvant/ mass de composé isolé (mL/mg)	94	61
Acide rosmarinique	Durée de traitement	10 injections: 6 h	15 plaques: 9 h (prélavage: 7 h)
	Pureté (%)	93,2 ± 0,1	86,8 ± 0,1
	Consommation de solvant/ mass de composé isolé (mL/mg)	116	72

Cette étude a été publiée dans *Journal of Chromatography A* en Janvier 2014.

4. CONCLUSION

L'augmentation de la demande réglementaire concernant l'analyse des extraits naturels et des produits formulés requiert une perpétuelle recherche dans l'amélioration des techniques existantes et la création de nouvelles méthodologies analytiques. La chromatographie planaire à elle aussi suivit cette évolution, en particulier lors de son passage de la TLC à l'HPTLC.

Depuis ses débuts, la chromatographie planaire a principalement été utilisée pour l'identification et la caractérisation des extraits naturels. En effet, sa phase stationnaire, connue pour être robuste, permet d'analyser sans difficulté divers types d'échantillons. L'étude visant à comparer les préparations d'échantillons à mettre en place avant une analyse quantitative en HPLC et en HPTLC, a montré que l'HPTLC possédait l'avantage de pouvoir utiliser des protocoles plus simples qu'en HPLC. En effet, le fait de ne pas être obligé d'éliminer des ingrédients susceptibles d'endommager la phase stationnaire est un réel avantage.

Autre alternative à l'enrichissement lors de la préparation d'échantillon, l'isolement des composés cibles en passant par des techniques semi-préparative est souvent envisageable. En chromatographie planaire, la PTLC est d'usage courant, mais jusqu'à maintenant l'HPTLC semi-préparative n'a jamais été utilisée. Son utilisation a donc été comparée avec celle de l'HPLC semi-préparative, qui est la technique principalement utilisée pour l'isolement des composés dans le domaine des extraits naturels. Lors de cette étude, l'isolement de 3 composés cible dans 3 différents types d'extraits bruts a été réalisé. En considérant une approche de chimie verte et durable visant à réduire la quantité de déchets et de coût en énergie, l'étude a montré que suivant la teneur du composé dans l'échantillon, l'HPLC ou l'HPTLC est préférée. En effet, dans le cas où le composé cible est en teneur élevé dans l'extrait brut, l'HPTLC constitue une méthode de choix. Pour les cas difficiles, le choix de la technique dépend de la priorité entre la pureté et le rendement de l'isolement : si une pureté élevée est visée, l'HPLC semi-préparative reste plus efficace, tandis que si un rendement élevé est souhaité, l'HPTLC est préférée.

Ces deux études intervenant à différentes étapes d'une analyse d'un extrait naturel ont permis de montrer un apport parfois méconnu de l'HPTLC.

Article 2

Thi Kieu Tiên Do, Francis Hadji-Minaglou, Sylvain Antoniotti, and Xavier Fernandez

Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography).

Journal of Chromatography A, 1325 (2014) 256– 260

Abstract

Chemical investigations on secondary metabolites in natural products chemistry require efficient isolation techniques for characterization purpose as well as for the evaluation of their biological properties. In the case of phytochemical studies, the performance of the techniques is critical (resolution and yield) since the products generally present a narrow range of polarity and physicochemical properties. Several techniques are currently available, but HPLC (preparative and semipreparative) is the most widely used. To compare the performance of semipreparative HPLC and HPTLC for the isolation of secondary metabolites in different types of extracts, we have chosen carvone from spearmint essential oil (*Mentha spicata* L.), resveratrol from *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson, and rosmarinic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts. The comparison was based on the chromatographic separation, the purity and quantity of isolated compounds, the solvent consumption, the duration and the cost of the isolation operations. The results showed that semipreparative HPTLC can in some case offer some advantages over conventional semipreparative HPLC.

Keywords:

Phytochemistry, Purification, Planar chromatography (TLC, HPTLC), *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha spicata* L., *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson

1. Introduction

The chemical diversity and the large variety of biological activities of secondary metabolites from natural products have attracted the attention of chemists, biochemists, pharmacists and biologists for a long time. Applications of these compounds in pharmaceuticals, cosmetics or flavors and fragrances are numerous, but are preceded by necessary chemical and biological studies [1]. To obtain pure samples of the compounds of interest in sufficient amounts from natural extracts and allow further characterization by spectral analysis such as ^1H and ^{13}C -NMR, X-ray, or MS, efficient isolation techniques are required. The isolation of compounds from natural extracts is usually carried out in two steps. The first step is to enrich the extract by using various methods such as distillation, liquid-liquid partition, open-column chromatography (CC), and flash chromatography (FC), prior to the second step of isolation. These primary methods typically exhibit high loading capacity and low resolution. To improve the resolution, semipreparative techniques such as high pressure liquid chromatography (HPLC), counter current chromatography (CCC), overpressured layer chromatography (OPLC), and preparative thin-layer chromatography (TLC) (PTLC) can be used. OPLC has been used in many cases for the isolation of active compounds [2,3]. It has been reported to be best suited to the isolation of small amounts of partially purified samples but this technique requires a pressurized chamber [4]. HPLC however is the most frequently used [1,5,6]. The choice of an isolation procedure depends on the target product, the nature of the material source, and the concentration within the extract [7]. Most of time, HPLC is chosen for the isolation of a wide variety of compounds such as higher terpenoids, alkaloids, saponins, polyphenols... [6,8-10]. Conventional TLC has been used for the isolation of secondary metabolites such as flavonoids, phytosterols or terpenes, with preparative TLC plates, and quite often, in combination with a second isolation method [11,12]. TLC separation with TLC plates alone could also be performed on crude extracts without preliminary sample preparation [13,14] but no study has been done so far to our best knowledge to compare with high performance thin-layer

chromatography (HPTLC). HPTLC is known to allow better separations than TLC [15]. HPTLC is simple and fast, uses disposable plates, which avoid cross-contamination from the stationary phase, and many derivatization reagents and phase pre-treatment procedures are available [16].

We described here in our results on the semi-preparative isolation of three compounds with different characteristics: volatile low-molecular weight terpenoid carvone ($C_{10}H_{14}O$, 150.22 g/mol), phenolic resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$, 228.24 g/mol), and rosmarinic acid ($C_{18}H_{16}O_8$, 360.31 g/mol), present in various concentrations in different untreated natural extracts. Carvone is a terpenoid naturally found in many essential oils such as spearmint (*Mentha spicata* L.) characterized by its high carvone content (60-70%) [17-19]. This monoterpene exhibits antiseptic activity, and is usually analyzed by GC [18]. Resveratrol is a phenolic stilbene found in the skin of red grapes and in our case in *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson extract [20,21]. Rosmarinic acid is a phenolic compound known for its antioxidant activity [22]. The aim of the study was to assess the efficiency of HPTLC to isolate secondary metabolites compared to HPLC.

2. Materials and methods

2.1. Chemical, and material

Carvone (98%), resveratrol ($\geq 99\%$) and rosmarinic acid ($\geq 98\%$) standards, methanol, acetonitrile, water, toluene and chloroform (HPLC grade), formic acid ($> 98\%$) and ethyl acetate ($> 99.5\%$) were purchased from Sigma-Aldrich. *Mentha spicata* L. essential oil, *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) dry extracts were purchased from Naturex (Avignon, France).

2.2. Samples and standards preparation

Standard stock solutions were obtained by dissolution of carvone (1.7 mg), resveratrol (11.7 mg), and rosmarinic acid (3.0 mg) in 10 ml MeOH. For each standard, a calibration curve was realized with a range of 5 concentrations from 0.02 mg/mL to 0.17 mg/mL for carvone using GC, from 0.13 mg/mL to 1.17 mg/mL for resveratrol using HPLC/DAD, and from 0.01 mg/mL to 0.3 mg/mL for rosmarinic acid using HPLC/DAD. Response factors were determined by linear regression for each standard with R^2 coefficients all deemed acceptable above 0.99.

2.3. GC/FID analysis

The quantitative analysis of carvone samples was performed by GC-FID using an Agilent 6890N system equipped with a HP1 column polydimethylsiloxane (50 m x 0.2 mm i.d. and 0.33 μ m phase thickness) and operated using the following conditions: carrier gas: helium; constant flow: 1 mL/min; injected volume: 1 μ L and split ratio: 1:100, GC oven temperature was set to 100 °C and increased to 250 °C with a rate of 10°C/min and remained at 250 °C for 10 min. The conditions for FID were: detector temperature: 250 °C; hydrogen flow: 40 mL/min; air flow: 450 mL/min and make up flow N_2 45 mL/min. The characterization of carvone was performed by comparison with a standard. The quantifications were obtained using FID signal integrations according to the calibration curve. GC/FID analyses were carried out in duplicates.

2.4. HPLC analysis and isolation

HPLC analyses were performed on a HPLC Agilent 1200 series equipped with evaporative light-scattering detector (ELSD) and diode array detector (DAD) using a Phenomenex Luna C18 column (4.6 x 150 mm, 5 μ m). The column is equipped with a Phenomenex guard C18 (4.0 x 3.0 mm). The ELSD was used under the following conditions: temperature: 40 °C; nebulizing gas pressure: 3.6 bar; Gain: 3; sampling time: 100-10 Hz; Filter: 3 s. The DAD provided 3 characteristic UV wavelengths 238 nm (carvone), 307 nm (resveratrol), and 330 nm (rosmarinic acid). For quantitative analyses, a standard HPLC method was set up with water containing 0.1% formic acid (A), methanol (B) and isopropanol (C). The gradient was set as follows (with A%/B%/C%): 0-15 min, 95/5/0; 15-45 min, 95/5/0-5/95/0; 45-50 min, 5/95/0; 50-51 min; 5/95/0-0/50/50; 51-61 min, and back to the initial conditions (95/5/0) in 10 min. The flow rate was constant at 1 ml/min with an injection volume of 20 μ L.

The compound isolations were carried out by semipreparative HPLC/DAD on the same HPLC with a Phenomenex Luna C18 column (10 × 250 mm, 5 µm) operating at 20 °C with a flow rate of 2.5 ml/min. The column is equipped with a Phenomenex semiprep guard C18 (10 × 10 mm). For semipreparative isolation a standard method was set up with water containing 0.1% formic acid (A), acetonitrile containing 0.1% formic acid (B) and isopropanol (C). The gradient profile for carvone isolation was set as follows (with A%/B%/C%): 0-3 min, 30/70/0; 3-13 min, 5/95/0-15/85/0; 13-15 min, 15/85/0-0/50/50; 15-25 min, 0/50/50 and back to the initial conditions (30/70/0) in 10 min with an injection volume of 40 µL for a concentration of the solution of 20.3 mg/mL. The gradient profile for resveratrol isolation was (with A%/B%/C%): 0-10 min, 55/45/0; 10-15 min, 55/45/0-0/100/0; 15-16 min, 0/100/0-0/50/50; 16-26 min, 0/50/50 and back to the initial conditions (55/45/0) in 10 min with an injection volume of 50 µL for a concentration of the solution of 35.1 mg/mL. The gradient profile for rosmarinic acid isolation was: (with A%/B%/C%): 0-10 min, 70/30/0-55/45/0; 10-15 min, 55/45/0-0/100/0; 15-17 min, 0/100/0-0/50/50; 17-27 min, 0/50/50 and back to the initial conditions (70/30/0) in 10 min with an injection volume of 40 µL for a concentration of the solution of 75.7 mg/mL. The solvent of fraction obtained was evaporated under vacuum and analyzed by GC/FID and HPLC/DAD after solubilisation with methanol.

2.5. HPTLC analysis and isolation

HPTLC analyses were performed using Merck (0.20 mm) silica gel 60 F₂₅₄ (20 × 10 cm) glass HPTLC analytical plate, and Merck (0.20 mm) silica gel 60 F₂₅₄ (20 × 10 cm) glass HPTLC plate with concentrating zone, using a Camag (Muttens, Switzerland) HPTLC system equipped with an automatic TLC sampler (ATS 4), an automatic developing chamber ADC2 with humidity control, a visualizer and a TLC scanner 4 controlled with WinCATS software. All the plates were pre-washed by developing (80 mm) using 10 mL methanol, and then dried in oven at 120 °C for 30 min. All HPTLC analyses were developed till 70 mm from the lower edge of the plate, humidity control (33-38%), with 20 min saturation. Visual inspection and documentation of the chromatograms were carried out under 254 nm and 366 nm. Plates were scanned under the following conditions: scanning mode, reflectance mode at 238, 307, and 330 nm, D2 and W lamp, slit dimension 8.00 mm × 0.40 mm, scanning speed 20 mm/s, data resolution 100 µm/step. Pre-washing was realized simultaneously during the application of the next plate. For analytical purposes, standard and sample solutions (15 tracks per plates) were applied bandwise (band length 8 mm, 50 nL/s delivery speed, track distance 11.4 mm, distance from the left and right edges 20 mm) and for semipreparative separation, sample solutions were applied bandwise (19 tracks per plates) (band length 8 mm, 50 nL/s delivery speed, track distance 8.8 mm, distance from the edge 20 mm). Carvone isolation (23.5 mg) was carried out with 14 analytical HPTLC plates with toluene: ethyl acetate (95:5, v/v), for a processing time of 9 h. Resveratrol isolation (8.5 mg) was carried out with 12 analytical HPTLC plates with chloroform: methanol (9:1, v/v), for a processing time of 8 h. Rosmarinic acid isolation (4.1 mg) was carried out with 15 analytical HPTLC plates with toluene: ethyl acetate: formic acid (5:4:1, v/v/v), for a processing time of 9 h.

3. Results and discussion

Two semipreparative isolation chromatographic techniques (HPLC and HPTLC) have been applied and compared for the cases of carvone, resveratrol and rosmarinic acid from mint essential oil (*Mentha spicata* L.), *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts respectively (Table 1).

Carvone which is present at 65.2% in the essential oil of mint (measured by GC/FID) and resveratrol present at 50.6% in the extract (measured by HPLC/DAD) are well separated from the other analytes by analytical HPLC/DAD (resolution (Rs) = 7.9; Rs = 4.1). By analytical HPTLC, with detection at 238 and 307 nm, carvone (Ratio of flow (Rf) = 0.37) and resveratrol (Rf = 0.48) were well separated from the other analytes as well (Rs = 1.7; Rs = 2.9). Concerning rosmarinic acid, present at 22.6% in the extract, two times longer method development times was required, to optimize the separation from other compounds using both HPLC and HPTLC (Rf = 0.30) instruments (Rs = 2.2; Rs = 0.8) (Fig. 1).

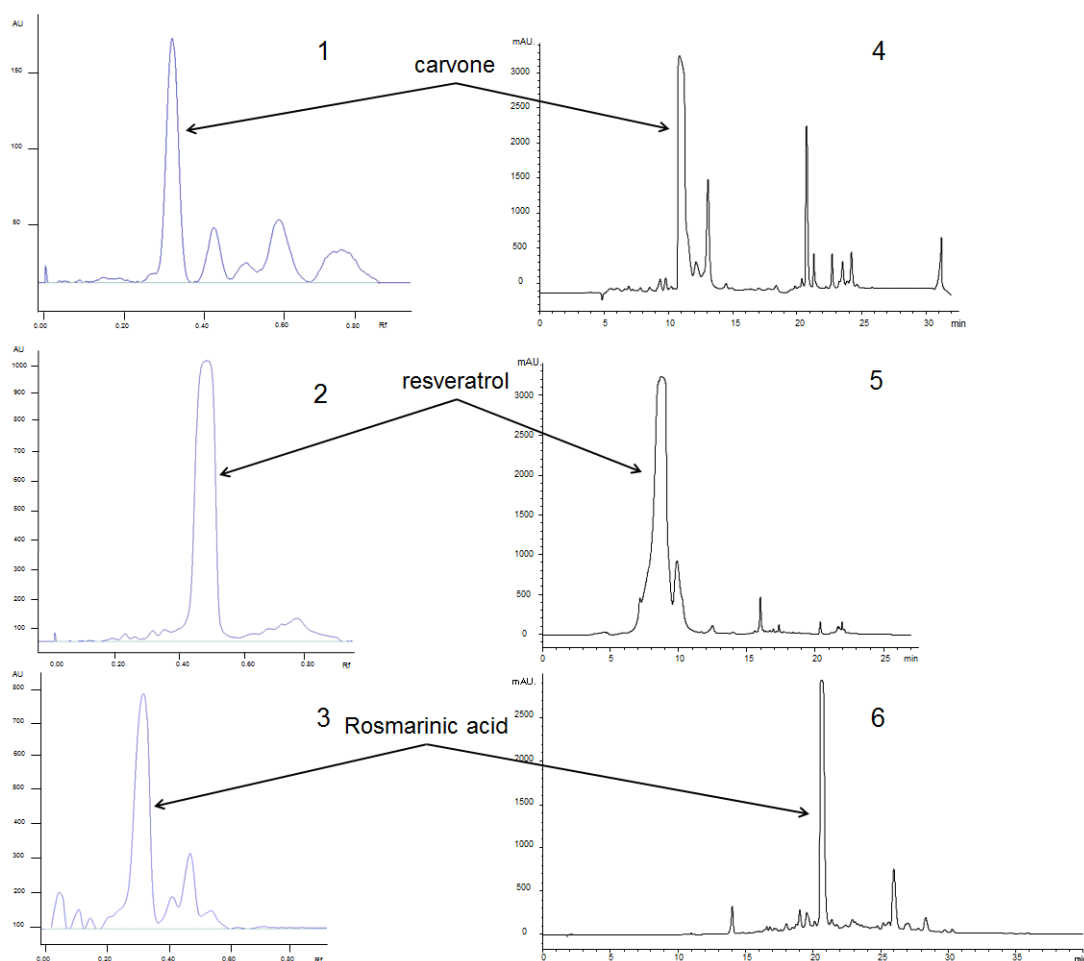


Fig 1: Chromatograms of *Mentha spicata* L essential oil, *Fallopia multiflora* (Thunb.), and *Rosmarinus officinalis* L. extracts by semipreparative HPTLC and HPLC. 1: semi preparative HPTLC densitogram of *Mentha spicata* L essential oil, detection: scan at UV 238 nm; mobile phase: toluene: ethyl acetate (95:5, v/v). 2: semipreparative HPTLC densitogram of *Fallopia multiflora* (Thunb.), detection: scan at UV 307 nm; mobile phase: chloroform: methanol (9:1, v/v). 3: semipreparative HPTLC densitogram of *Rosmarinus officinalis* L., detection: scan at UV 330 nm; mobile phase: toluene: ethyl acetate: formic acid (5:4:1, v/v/v). 4: semipreparative HPLC/DAD chromatogram of *Mentha spicata* L essential oil at UV 238 nm. 5: semipreparative HPLC/DAD chromatogram of *Fallopia multiflora* (Thunb.) at UV 307 nm. 6: semipreparative HPLC/DAD chromatogram of *Rosmarinus officinalis* L at UV 330 nm.

The method development in HPTLC involved different steps. The first attempts were performed on HPTLC plates with concentrating zone that allow larger volume application. In this case the crude extract separation was not sufficient for isolation purpose. A second series of attempts was performed with regular HPTLC plates and showed better result. For each HPTLC development method, one single type of plate was used. On each plate, one track of analytical standard and a range of 5 concentrations of the extracts were applied to select in each case the maximum concentration for the application (carvone: 69.0 mg/mL; resveratrol: 41.1 mg/mL; rosmarinic acid: 79.8 mg/mL). The methods were already known in the literature [15,23,24]. Regarding HPLC, from the processing time point of view, the method development took an average of half a day per extract. For the isolation step, the number of samples is limited by the necessary elution time for each one, since the samples are injected one at a time. In general, HPLC instrument requires a more trained user than HPTLC. Concerning the cost of the isolation procedures, in our analysis conditions, up to 400 injections of natural extract can be performed by HPLC on the same semipreparative column, with a change of precolumn every 200 analyses. Concerning HPTLC, in our analysis conditions, up to 19 tracks can be applied on a plate. By considering all these information, HPLC is 10 times more expensive than HPTLC without taking into account the solvent consumption.

The results for the isolation of carvone, which is present at 65.2% in essential oil of mint, showed that for a processing time shorter by using HPTLC (9 h) than HPLC (10 h), 2.6 times more amount of compounds was isolated by using HPTLC. Regarding the yields of the isolation, the results are similar with both methods (HPLC: $98.9 \pm 0.1\%$; HPTLC: $98.1 \pm 0.1\%$). Concerning the purity, the compound isolated was of higher purity by using HPLC than HPTLC (HPLC: $97.1 \pm 0.1\%$; HPTLC: $94.3 \pm 0.1\%$). From the solvent consumption point of view, differences were much more significant. For those range of mass of isolated compound, average of solvent consumption by using HPTLC was more than 5 times lower than using semipreparative HPLC (153 mL/mg compared to 27 mL/mg).

In the case of resveratrol, titrated at 50.6% in the current extract and well separated, the mass of isolated compound results were 12.7 ± 0.1 mg using HPLC and 8.5 ± 0.0 mg using HPTLC. The processing time was shorter by using HPTLC (8 h for 8.5 mg) than HPLC (9 h for 12.7 mg). The yield was better using HPLC ($95.8 \pm 0.1\%$) compared to HPTLC ($89.9 \pm 0.1\%$). Regarding the purity, analyses reveal no significant difference ($98.1 \pm 0.1\%$ for both methods). For this range of mass of isolated compound, average of solvent consumption by using HPTLC was ca. 30% lower than using semipreparative HPLC (94 mL/mg compared to 61 mL/mg).

In the case of rosemary extract, rosmarinic acid was present at 22.6% and not well separated by HPLC and HPTLC, and a processing time of 6 h and 9 h using HPLC and HPTLC respectively, was needed. The solvent consumption was 38% lower in the case of HPTLC (116 mL/mg vs 72 mL/mg), for an isolated mass of 5.8 ± 0.1 mg using HPLC and 9.4 ± 0.1 mg using HPTLC. With HPTLC, the compound isolated was less pure ($86.8 \pm 0.1\%$) than using HPLC ($93.2 \pm 0.1\%$) but the yield is better using HPTLC ($91.3 \pm 0.1\%$) than HPLC ($84.0 \pm 0.1\%$). With this case, it seems that for challenging extracts, with target compounds hardly separated from the other metabolites, HPTLC is not enough efficient, and preference should be given to the use of HPLC. Alternatively, an additional enrichment step should be implemented with HPTLC in the separation procedure.

Table 1: Summary of the results for the isolation of carvone, resveratrol and rosmarinic acid.

		HPLC	HPTLC
Carvone	Resolution	7.9	1.7
	Solvent consumption (mL)	1360	630
	Processing time	17 injections: 10 h	14 plates: 9 h (cleaning: 7 h)
	Purity (%)	97.1 ± 0.1	94.3 ± 0.1
	Isolated mass (mg)	$8,9 \pm 0.1$	23.5 ± 0.1
	Yield (%)	98.9 ± 0.1	$98,1 \pm 0.1$
	Solvent consumption/ Isolated mass (mL/mg)	153	27
Resveratrol	Resolution	4.1	2.9
	Solvent consumption (mL)	1200	520
	Processing time	15 injections: 9 h	12 plates: 8 h (cleaning: 6 h)
	Purity (%)	98.1 ± 0.1	98.1 ± 0.1
	Isolated mass (mg)	12.7 ± 0.1	8.5 ± 0.0
	Yield (%)	95.8 ± 0.1	89.9 ± 0.1
	Solvent consumption/ Isolated mass (mL/mg)	94	61
Rosmarinic acid	Resolution	2.1	0.8
	Solvent consumption (mL)	675	675
	Processing time	10 injections: 6 h	15 plates: 9 h (cleaning: 7 h)
	Purity (%)	93.2 ± 0.1	86.8 ± 0.1
	Isolated mass (mg)	5.8 ± 0.1	9.4 ± 0.1
	Yield (%)	84.0 ± 0.1	91.3 ± 0.1
	Solvent consumption/ Isolated mass (mL/mg)	116	72

4. Conclusion

The two approaches (semipreparative HPLC and HPTLC) allowed successful and rapid isolation of the target metabolites in the three cases studied. For a high content of the target in the natural extract, considering a green and sustainable chemistry approach aiming at reducing the amount of waste, of material, and of energy costs, HPTLC appeared as the method of choice (case of carvone and resveratrol). For challenging cases, the choice of the technique depends on the priority between purity and yield: for a high purity regardless of the amount isolated, semipreparative HPLC remains the most efficient, while for a higher yield, HPTLC should be preferred.

Acknowledgments

TKTD is grateful to "association nationale de la recherche et de la technologie" (ANRT) for a fellowship. This project was supported by the University of Nice-Sophia Antipolis and the CNRS.

References

- [1] S.D. Sarker, Z. Latif, A.I. Gray, *Natural Products Isolation*, Humana Press, New Jersey, 2005.
- [2] I. Klebovich, E. Mincsovics, J. Szunyog, K. Ludanyi, T. Karancsi, K. Ujszaszy, B.D. Kiss, K. Vekey, *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC* 11 (1998) 394.
- [3] E. Mincsovics, P.G. Ott, A. Alberti, A. Boszormenyi, E.B. Hethelyi, E. Szoke, A. Kery, E. Lemberkovics, A.M. Moricz, *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC* 26 (2013) 172.
- [4] K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, *Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation*, Springer, 1998.
- [5] M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, *High Performance Liquid Chromatography In Phytochemical Analysis*, CRC Press, Boca Raton, 2011.
- [6] F. Bucar, A. Wube, M. Schmid, *Nat. Prod. Reports* 30 (2013) 525.
- [7] L. Dinan, J. Harmatha, R. Lafont, *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 105.
- [8] X. Guo, X. Zhang, J. Feng, Z. Guo, Y. Xiao, X. Liang, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3413.
- [9] J. Gao, Q. Yue, Y. Ji, B. Cheng, X. Zhang, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 982.
- [10] L. Johnsson, R.E. Andersson, P.C. Dutta, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80 (2003) 777.
- [11] A. Shafaghat, F. Salimi, N. Aslaniyan, Z. Shoaie, *World Appl. Sci. J.* 11 (2010) 473.
- [12] M. Saleem, H.J. Kim, C.K. Han, C. Jin, Y.S. Lee, *Phytochemistry* 67 (2006) 1390.
- [13] L. Zhou, H. Zheng, Y. Tang, W. Yu, Q. Gong, *Biotechnol. Lett.* 35 (2013) 631.
- [14] Q.T. Liu, J.L. Kinderlerer, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 617.
- [15] E. Reich, A. Scchibli, *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants* Thieme Medical, New York, 2006.
- [16] A. Mohammad, A. Moheman, in M. Srivastava (Editor), *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*, Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 151.
- [17] M.-O. Loret, S. Morel, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 1800.
- [18] N. Galand, D. Ernouf, F. Montigny, J. Dollet, J. Pothier, *J. Chromatogr. Sci.* 42 (2004) 130.
- [19] J. Coll, Y. Tandron, *Phytochemistry* 65 (2004) 387.
- [20] S. Mantegna, A. Binello, L. Boffa, M. Giorgis, C. Cena, G. Cravotto, *Food Chem.* 130 (2012) 746.
- [21] L. Lv, X. Shao, L. Wang, D. Huang, C.-T. Ho, S. Sang, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 2239.
- [22] Y. Zhang, J.P. Smuts, E. Dodbiba, R. Rangarajan, J.C. Lang, D.W. Armstrong, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 9305.
- [23] T. Chen, J. Li, J.S. Cao, Q. Xu, K. Komatsu, T. Namba, *Planta Med.* 65 (1999) 56.
- [24] G. Janicsak, I. Mathe, *Chromatographia* 46 (1997) 322.

CHAPITRE 3 : L' HPTLC ET L'ANALYSE QUANTITATIVE DES
EXTRAITS NATURELS

1. INTRODUCTION

Depuis les dernières décennies, les composés provenant de sources naturelles ont gagné de l'importance en partie en raison de l'augmentation de la demande et de l'utilisation de plantes médicinales. En effet, de plus en plus de plantes différentes sont utilisées et donc les contrôles doivent évoluer. La TLC s'est alors avérée utile dans l'identification des plantes et extraits de plantes, mais aussi dans la recherche préliminaire phytochimique [32]. En effet, lors de l'analyse d'échantillons complexes, elle permet une identification rapide des classes de composés comme par exemple les alcaloïdes, les phénols, ou encore les terpènes. En ce qui concerne l'analyse quantitative, même si elle est couramment accomplie par HPLC, elle est aussi réalisable par HPTLC. En effet, les avantages liés à l'automatisation des instruments permettent à l'HPTLC d'obtenir facilement des résultats répétables et reproductibles, ce qui en fait donc un outil pour l'analyse phytochimique semi-quantitative et quantitative [164].

L'analyse quantitative par HPTLC est rendue plus facile par les récents développements dans l'instrumentation analytique, mais aussi dans les progrès récents concernant la préparation d'échantillons et notamment l'enrichissement des extraits et l'isolement des composés (*cf.* chapitre 2). Mais quelle est la place de l'HPTLC dans l'analyse d'extraits naturels bruts n'ayant pas subi au préalable une série d'étapes de préparation d'échantillon ? Le manque de résolution connue de l'HPTLC permet-il tout de même un dosage précis ? Ces questions ont été étudiées dans ce chapitre. En effet, la création prochaine d'un bain de bouche à base d'extraits de *Solidago virgaurea* a nécessité le développement d'une méthode de dosage simple et rapide permettant d'analyser un grand nombre d'échantillons. Cette méthode a eu pour objectif de permettre la sélection des lots contenant la quantité désirée en saponines, ingrédient actif du produit.

Pour cette étude, une rapide description des particularités de l'analyse quantitative par HPTLC a été réalisée. Ensuite, une rapide étude bibliographique sur la plante, les saponines et leur quantification a été effectuée. Afin de discuter sur les avantages et inconvénients d'une méthode quantitative par HPTLC dans le cas d'extraits bruts, une méthode a également été développée en HPLC-ELSD comme technique de référence. Ces deux méthodes ont été comparées sur leur performance analytique (résolution, précision, répétabilité et limites de détection et de quantification), mais aussi sur leur consommation en termes de temps et de solvant.

2. LES PARTICULARITES DE L'ANALYSE QUANTITATIVE PAR HPTLC

Afin d'utiliser l'HPTLC pour une analyse quantitative, il est essentiel de disposer d'un moyen de quantification des zones d'intérêt présentes sur la plaque. L'HPTLC étant une technique visuelle, elle permet plusieurs évaluations pour l'analyse quantitative. En effet, le dosage d'une substance peut se faire de trois façons : par estimation, par vidéo-densitométrie, ou par densitométrie.

2.1. Quantification par estimation

Une estimation de la concentration peut être simplement réalisée en appliquant sur la même plaque l'échantillon contenant le composé à quantifier, ainsi que les solutions de standards à différentes concentrations. Le résultat est alors examiné visuellement à la lumière blanche ou sous UV (Figure 60). Ce test est par exemple utilisé dans les pharmacopées où la concentration des impuretés d'un échantillon doit être inférieure ou égale à la concentration du standard appliqué. Ce test est limité car il dépend de l'œil de l'examineur qui décidera si l'intensité est inférieure ou supérieure à celle du standard [16].

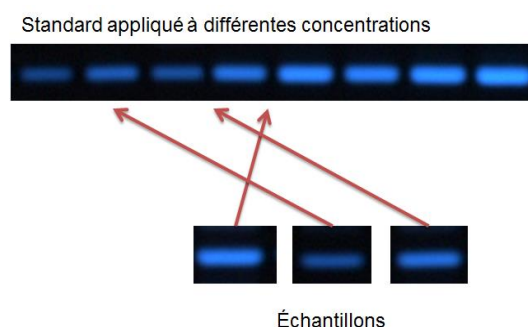


Figure 60: exemple d'évaluation quantitative par estimation.

2.2. Quantification par vidéo-densitométrie

Il est possible de transformer une image provenant de l'instrument de visualisation afin d'obtenir un chromatogramme correspondant aux bandes du profil HPTLC. Il existe des logiciels de transformation : Videoscan sous winCATS, ou la fonction « *generate profile* » sous visionCATS (CAMAG). Pour cela, l'empreinte de l'échantillon est sélectionnée de façon à ce que la largeur de la sélection corresponde à la longueur de l'application, et la longueur corresponde à la distance de migration avec 5 % de plus au-dessus et en-dessous. Une fois la zone de l'empreinte déterminée, seule une partie correspondant à 50 % de l'empreinte est sélectionnée (rectangle rouge de la Figure 61). A partir de cette sélection, chaque ligne de cette empreinte correspond à un ensemble de pixels. Chacun de ces pixels est constitué de 3 composantes *Red*, *Green*, *Blue* (RGB). A partir de ces 3 composantes RGB, le signal de luminance est calculé pour chaque pixel, puis une

moyenne est calculée pour chaque ligne. La combinaison des signaux de luminance de chaque ligne génère le profil chromatographique (Figure 61). Ce mode d'évaluation est donc limité par l'image : sa qualité d'acquisition et son mode de détection (lumière blanche, ou sous UV à 254 nm ou 366 nm) [165]. De plus, ce mode d'évaluation est un réel avantage lors de la visualisation sous lumière blanche, car le profil n'est pas restreint par la couleur (Figure 62), ce qui est le cas de la densitométrie ou une longueur d'onde doit être sélectionnée.

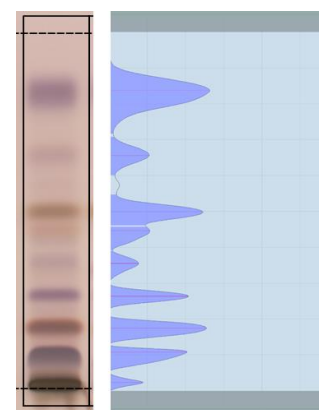
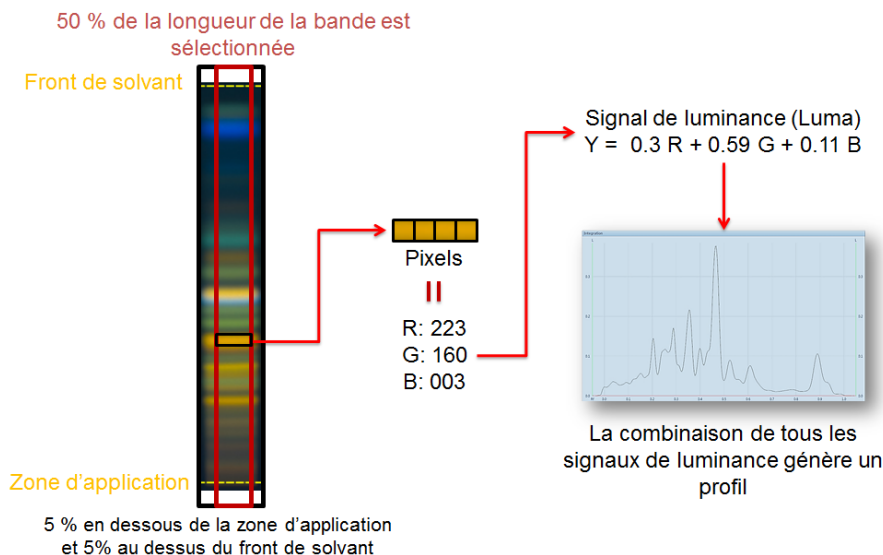


Figure 62 : exemple de profil HPTLC généré depuis une image prise sous lumière blanche.

Figure 61 : fonctionnement pour générer un profile à partir d'une image.

2.3. Quantification par densitométrie

Le principe de fonctionnement de la densitométrie décrit dans le chapitre 1 (1.2.5.2) permet d'obtenir un densitogramme de l'échantillon en fonction d'une longueur d'onde (Figure 63). Cette mesure peut être réalisée avant ou après l'étape de révélation et sur une gamme allant de 190 nm à 900 nm suivant le densitomètre utilisé. Les quantifications par densitométrie sont nettement plus précises que celles obtenues par vidéo-densitométrie [22].

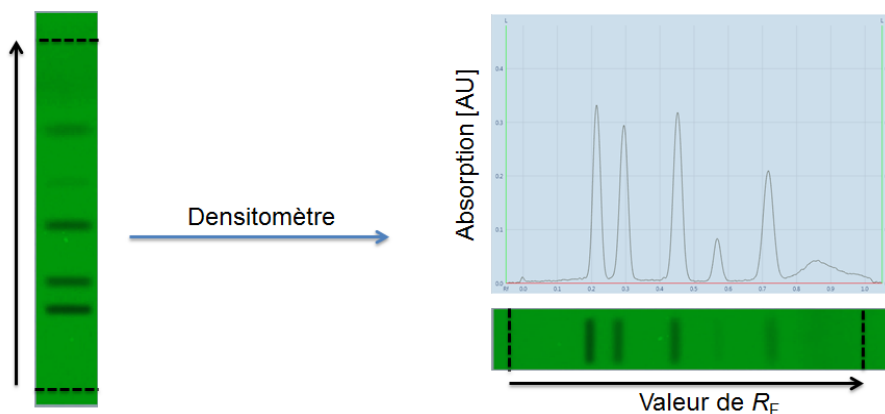


Figure 63 : exemple de densitogramme.

3. CONTEXTE DE L'ETUDE

3.1. Généralités sur la plante

Le *Solidago virgaurea*, aussi appelé solidage verge d'or, est une plante herbacée du genre *Solidago* (*Asteraceae*). Il existe de nombreuses sous-espèces, telles que le *S. virgaurea* ssp. *virgaurea* L et le *S. virgaurea* L. ssp. *alpetris* (Waldst. & Kit.) Greml, la sous-espèce alpine (Figure 64) [166].

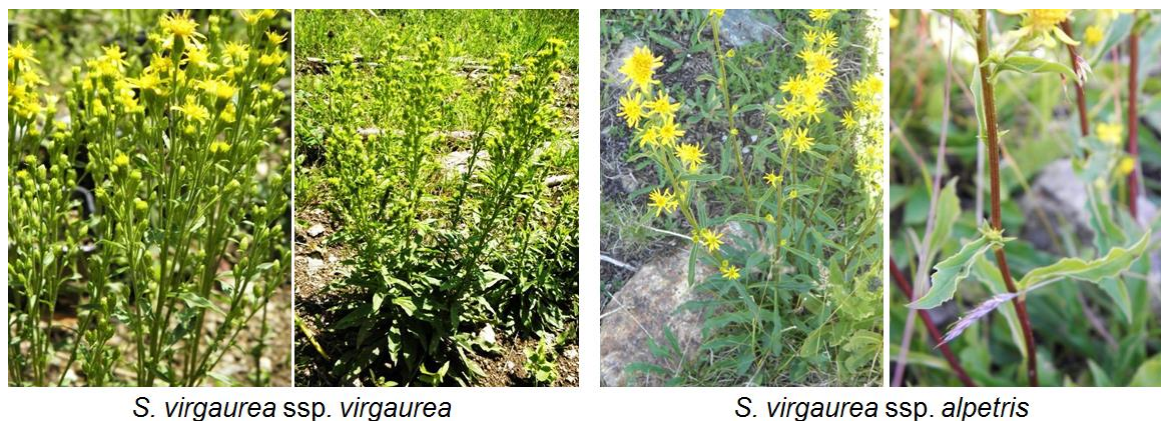


Figure 64 : photos des deux sous espèces: *S. virgaurea* ssp. *virgaurea* et *S. virgaurea* ssp. *alpetris*.

Cette plante est utilisée dans la médecine traditionnelle pour ses propriétés biologiques : antifongique [167], antioxydante [168], et cytotoxique [169]. Les extraits de solidage sont constitués de flavonoïdes [170], de type clérodane diterpènes [171], polyacétylènes [172] et glycosides triterpéniques [173-175].

Des travaux antérieurs réalisés sur *S. virgaurea* ont montré l'activité antimicrobienne contre *C. albicans* [176]. Sur cette base et les résultats d'autres études, il a été proposé que cette activité soit majoritairement induite par des composés de la famille des saponines qui sont présentes en grand nombre dans cette plante [177-179].

3.2. Généralités sur les saponines

Les saponines constituent un vaste groupe de molécules complexes présentes dans de nombreuses plantes. Elles sont structurellement composées d'un squelette porteur d'un ou de plusieurs motifs sucres. Selon la nature de la génine, aussi appelé la partie aglycone, les saponines sont classées en deux groupes : génine stéroïdique et génine triterpéniques. Les génines stéroïdiques sont généralement constitués d'un squelette à 27 atomes de carbone habituellement sous forme de cinq ou six cycles fusionnés. Les génines triterpéniques sont de loin les plus nombreuses et sont trouvées sous la forme de molécules pentacycliques. Les oses constituent la partie hydrophile des saponines. Elles peuvent être constituées d'une ou plusieurs

chaines osidiques à des positions différentes sur l'aglycone. Les principaux sucres constitutifs rencontrés dans les saponines sont décrits dans la Figure 65 [180]. La structure de la partie osidique est un facteur essentiel dans la chimiodiversité des saponines. Ce facteur cumulé avec la variabilité des génines entraîne un nombre de possibilités de structures extrêmement important ce qui implique que leur étude s'avère délicate au niveau de leur identification structurale [12].

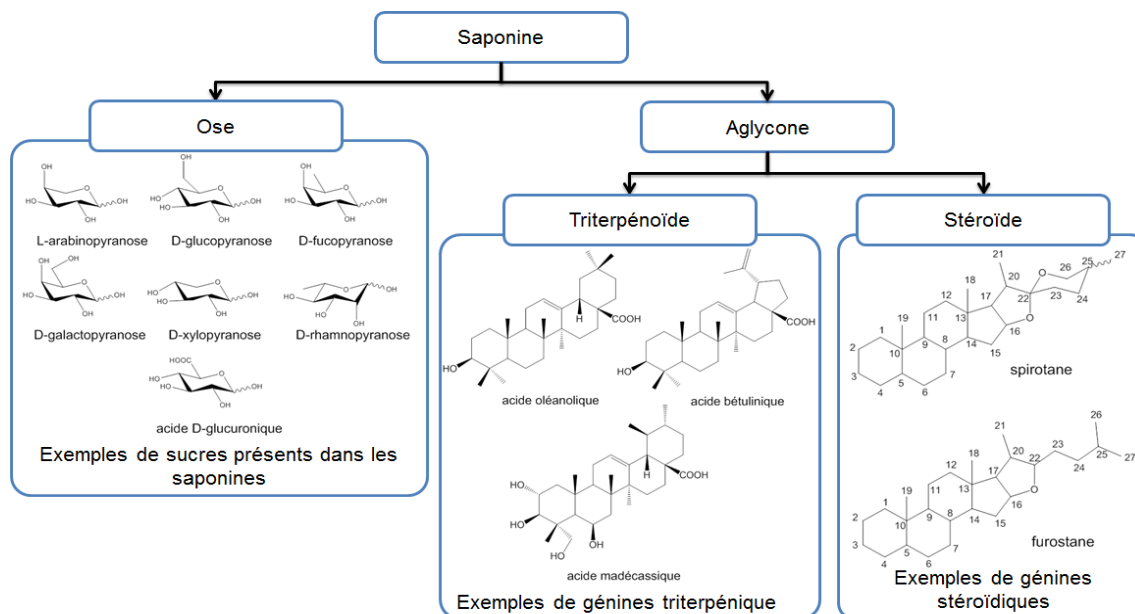


Figure 65 : exemples de structure des saponines.

3.3. L'analyse quantitative des saponines

Dans les plantes, les saponines sont présentes généralement en mélange de formes structurellement apparentées et ayant des polarités très similaires, ce qui rend leur séparation difficile [181]. De plus, l'absence de chromophore, ou la présence d'un chromophore avec une absorption à 195-220 nm (peu spécifique), empêche leur confirmation par UV et par conséquent leur quantification. La plupart du temps d'autres modes de détection sont utilisés comme par exemple la spectrométrie de masse (MS), ou le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD).

En effet, la quantification des saponines par HPLC-MS a été appliquée aux parties aériennes et souterraines de la luzerne tronquée (*Medicago truncatula* Gaertn.) [182]. La quantification des saponines par HPLC-MS est une méthode précise, mais également très spécifique et dépendante de la structure des saponines. En effet, il apparaît essentiel d'utiliser un standard pur pour chaque courbe d'étalonnage. Les standards purs de saponines sont rarement disponibles commercialement, ce qui rend l'utilisation de l'HPLC-MS pour l'analyse quantitative plus délicate. L'HPLC-ELSD a par exemple été utilisée pour l'analyse quantitative des soyasapogénol A et B dans le soja (*Glycine max* L. Merr.) (Figure 66) [183], ou encore pour les saponines de l'actée à grappes bleues (*Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx.) [184]. Lors d'analyse d'extrait naturel, les saponines apparaissent comme un mélange de composés de structure similaire et de polarité similaire, et leur séparation est rendu difficile [185].

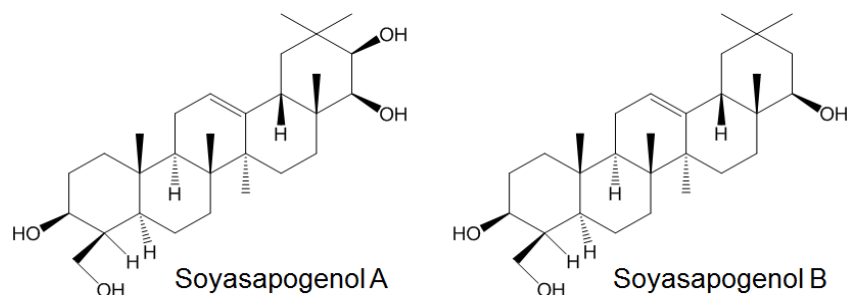


Figure 66 : structure des saponines soyasapogenol A et B.

Une des techniques alternatives à l'HPLC pour l'analyse quantitative des saponines est l'(HP)TLC. L'(HP)TLC combinée à l'utilisation de réactifs de révélation appropriés telle que le mélange anisaldéhyde-acide sulfurique peut apporter des solutions à cette absence de chromophore [181]. Certaines études réalisées par HPTLC concernent le dosage des extraits préalablement enrichis en saponines, ce qui permet de réaliser une quantification précise et relativement simple à mettre en œuvre. C'est le cas par exemple d'une étude concernant le dosage des saponines de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.) après une extraction par SPE, ou encore dans le cas de la sarsasapogenine B (Figure 67) isolées de l'asperge après hydrolyse [186]. Ces différentes manipulations peuvent s'avérer très longues et peuvent être source d'erreurs.

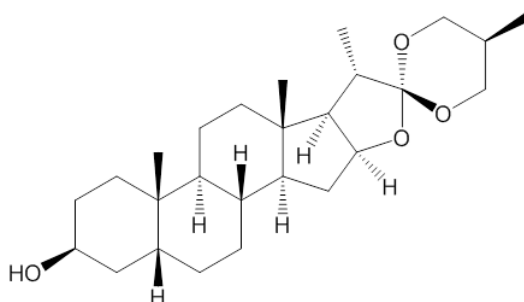


Figure 67: structure de la sarsasapogenine B.

4. RESULTATS & DISCUSSION

Le développement d'un bain de bouche constitué d'extraits de *Solidago virgaurea* a demandé le développement d'une méthode d'analyse pour en contrôler la teneur totale en saponines. Cette méthode devant permettre la quantification rapide d'un grand nombre d'extraits bruts de *S. virgaurea*, deux méthodes ont été développées. L'une en HPLC-ELSD qui est une technique d'analyse déjà couramment utilisée pour l'analyse des saponines. L'autre en HPTLC qui est connue pour être simple, rapide, visuelle et parfaitement adaptée au criblage et contrôle de matières premières.

Les deux approches (HPLC et HPTLC) ont permis le dosage des virgaureasaponines dans 150 échantillons. Elles ont aussi permis d'identifier les organes de la plante contenant le plus de saponines, mais aussi apporter des informations sur les lieux et années de récolte qui ont produit la teneur en saponine recherchée.

D'un point de vue performance, les deux courbes d'étalonnage ont montré de bonnes régressions linéaires ($R^2 > 0,99$) dans la plage de concentrations testées. Les LOD en HPLC et en HPTLC sont respectivement de 2 et 4 pg et les LOQ de 10 et 16 pg. Les variations intra- et inter-jour sont inférieures à 5,6 % en termes de RSD pour les deux techniques. Les recouvrements varient de 97,02 à 101,91 % avec une RSD allant 0,3 à 1,96 % pour l'échantillon enrichi. D'un point de vue consommation de solvant, la différence entre les deux méthodes est importante. En effet, l'HPLC a consommé 20 fois plus de solvant que l'HPTLC. L'HPTLC est donc une technique plus « verte » que l'HPLC. En termes de consommation de temps, l'HPTLC s'avère plus rapide que l'HPLC, 20-24 h contre 110 h. En effet, l'HPTLC permet d'analyser plusieurs échantillons en même temps (une quinzaine généralement) et pour chaque plaque, le temps d'analyse est relativement court.

Dans ce cas d'étude, les résultats obtenus pour le dosage par HPTLC sont légèrement minorés par rapport à l'HPLC probablement en raison d'un effet de matrice pendant l'étape d'hydrolyse in situ. Néanmoins cette différence a été répétable et n'a donc pas provoqué de différences majeures entre les deux méthodes.

5. CONCLUSION

Les questions soumises lors de l'introduction ont trouvé des réponses lors de cette étude. La faible résolution de l'HPTLC par rapport à l'HPLC, combiné au fait que les extraits analysés soient bruts, n'a pas été un réel désavantage dans ce dosage.

L'HPTLC s'est avérée être une technique avantageuse et plus particulièrement lors d'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Sa consommation sobre en temps et en solvant en fait une technique plus « verte » que l'HPLC. Néanmoins, son manque de précision ne permet pas sa sélection dans tous les cas d'analyses quantitatives. L'HPTLC est donc une technique efficace lors de l'analyse simple et rapide d'échantillons multiples.

Cette étude a été acceptée pour publication (en correction) dans *Journal of Planar Chromatography* en Août 2016.

Article 3

Lise Laurençon, Thi Kieu Tiên Do, Francis Hadji-Minaglou, Sylvain Antoniotti, and Xavier Fernandez

Selection of crude *Solidago virgaurea* L. ssp extracts based on two fast and efficient chromatographic methods for quantification of total saponins.**Abstract**

A study on *Solidago virgaurea* extracts showed an inhibiting activity of *Candida albicans* yeast-hyphal transition due to a mixture of triterpene saponins, leading to applications in the field of oral care products. Such applications require the development of an efficient, fast and simple quantification method of *S. virgaurea* total saponins. Two methods were developed; the first was based on high-performance liquid chromatography (HPLC) separation with gradient elution and evaporative light scattering detection (ELSD) detection. The second was based on high-performance thin layer chromatography (HPTLC) separation with in-situ hydrolysis followed by densitometric measurements at 366 nm.

Both calibration curves showed good linear regressions ($R^2 > 0.99$) within the range of concentrations tested. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 2-4 μg and 10-16 μg , respectively. The intra- and inter-day variations were studied and found to remain below 5.6 % in terms of relative standard deviation (RSD). The recoveries were 97.02–101.91 % with RSD of 0.3–1.96 % for spiked sample.

Both validated methods were successfully applied to the analysis of total saponins in different *S. virgaurea* samples. In particular, a harvesting study could be supported by these methods to identify the most relevant parts of the vegetal to extract, and the locations and vintage to collect to obtain the desired active saponins. HPLC is the recommended method for precise analyses, but HPTLC is the most efficient for the fast analysis of multiple samples.

1. INTRODUCTION

Solidago virgaurea belonging to the genus *Solidago* (*Asteraceae*) is composed of several subspecies, such as *S. virgaurea* ssp. *virgaurea* L., the main subspecies, and *S. virgaurea* L. ssp. *alpestris* (Waldst. & Kit.) Greml, the alpine subspecies. *S. virgaurea* is often used in folk medicine. Its biological activities and chemical composition have been thoroughly investigated, and several biological activities including antifungal [1], antioxidant [2], and cytotoxic [3] activities were found. *S. virgaurea* is known to contain a significant number of constituents, such as flavonosides [4], clerodane-type diterpenes [5], polyacetylenes [6] and triterpene glycosides [7-9]. Among all the bioactive compounds present in *S. virgaurea*, triterpene saponins are the most interesting components. They showed an inhibiting activity of *Candida albicans* yeast-hyphal transition without alteration of the oral biofilm [10-11] with an application in oral care products [12]. For the current development of a new mouthwash with *S. virgaurea virgaurea* and *S. virgaurea alpestris* aqueous extracts as active principles, the development of an efficient, fast, and simple quantification method of *S. virgaurea* total saponins appeared crucial.

Saponins are complex molecules consisting of a triterpenoid or steroid aglycones coupled to sugar chain units. Separation of individual saponins is tedious and time-consuming, due to the fact that in most of the plant species, saponins occur as a multi-component mixture of compounds of very similar polarities [13]. Moreover, the lack of chromophore hampers their detection by UV and therefore, their quantification.

Most of time, other detectors have to be used for the quantification of saponins such as mass spectrometry (MS) or evaporative light scattering detection (ELSD). Quantification by LC-MS is the most accurate approach but is also very specific and structure-dependent, and need purification of

each compound for calibration curves, commercial standards of saponins being unavailable. On the other hand, ELSD is a non-specific and sensitive detector [14-15], and was successfully applied for the quantification of saponins [16-17]. In constant analytical conditions, ELSD response is not influenced by metabolites' structure, like UV, but depending on the mobile phase or the metabolites' volatility. This particularity can be an advantage in the case of the complex saponins' family. Alternative chromatographic techniques such as high performance thin layer chromatography (HPTLC) can be used. HPTLC allows a wide choice of development, and derivatization protocols. It was used for quantification of saponins with the development of densitometer as detector [18-19].

Our objective being the development of efficient, fast, and simple quantification methods of *S. virgaurea* total saponins, HPLC-ELSD and HPTLC approaches were investigated. Using the established methods, triterpenoid saponins in different populations of *S. virgaurea* (two main subspecies) were quantified and compared for the first time, in order to illustrate the advantages and disadvantages of the HPLC and HPTLC methods.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

HPLC grade acetonitrile, methanol, chloroform and water were purchased from Sigma (St-Louis, USA). Other reagent solutions, such as acetic acid, formic acid, and hydrochloric acid were of analytical grade (Sigma, St-Louis, USA).

2.2. Plant material

Aerial parts and rhizomes of *S. virgaurea alpestris* and *S. virgaurea virgaurea* were collected from five areas in French alpine region over four consecutive years (Table 1). Samples were identified by the botanist Jean-Louis Polidori. Voucher specimens (n° C-3173 for *S. virgaurea* and n° C-3174 for *S. alpestris*) were deposited in the Botanical Garden of Nice.

Table 1 Origin of *S. virgaurea* samples

Sample No.	Subspecies (part)	Year of collect	Place of collect (altitude, geographical coordinates)
SVA1	<i>alpestris</i> (aerial part)	2011	Place 1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA2	<i>alpestris</i> (aerial part)	2010	Place 1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA3	<i>alpestris</i> (aerial part)	2009	Place 1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA4	<i>alpestris</i> (aerial part)	2008	Place 1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA5	<i>alpestris</i> (aerial part)	2011	Place 2 (1500 m, 44.284°; 6.866°)
SVA6	<i>alpestris</i> (aerial part)	2010	Place 3 (1600 m, 44.229°; 6.933°)
SVA7	<i>alpestris</i> (flowers/seeds)	2010	Place 1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA8	<i>alpestris</i> (stems)	2010	Place 1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA9	<i>alpestris</i> (leaves)	2010	Place 1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA10	<i>alpestris</i> (roots)	2008	Place 1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVV1	<i>virgaurea</i> (aerial part)	2010	Place 4 (1500 m, 44.071°; 7.223°)
SVV2	<i>virgaurea</i> (aerial part)	2008	Place 3 (1600 m, 44.229°; 6.933°)
SVV3	<i>virgaurea</i> (aerial part)	2010	Place 5 (1650 m, 44.207°; 7.112°)

2.3. Preparation of sample solutions

Samples of *S. virgaurea* were dried at room temperature in a dark and well-ventilated place. The material were grounded using a blender and 2 g of each sample were extracted with methanol/water 30:70 v/v (2 x 35 mL) using ultrasonic maceration (2 x 4 h) at 5 °C by stirring to obtain a dark brown aqueous extract. After evaporation of methanol, the extract was lyophilized. For each sample, three independent extractions were performed. Each lyophilized extract was dissolved in methanol/water 30:70 v/v to obtain an exact concentration of 100 g/L and filtered through a syringe filter (pore diameter 0.45 µm) before HPLC and HPTLC analysis.

2.4. Preparation of standard solutions

A fraction of total virgaureasaponins, characterized by MS and thorough 1H- and 13C-NMR investigations, was obtained by the described method [11], and was chosen as standard. Standard solutions were prepared in methanol/water, 1:1 to cover a concentration range of 1-20 mg/mL.

2.5. HPLC analysis

HPLC analyses were carried out on an Agilent 1200 HPLC system, equipped with a DAD detector and an Alltech 3300 ELSD. Separation was performed using a Luna C18 column (150 x 4.6 mm; 5 µm; Phenomenex, Macclesfield, UK). The mobile phase consisted of solvent A (0.1 % formic acid in acetonitrile) and solvent B (0.1 % formic acid in water). The separation was performed using gradient elution: 15 % A for 5 min, then 15 %–55 % A over 30 min, followed by a 5 min hold at 100 % A. The flow rate was 1 mL/min and the injection volume 20 µL. ELSD was set at 40 °C with 1.5 L/min of nitrogen gas and gain at 4.

2.6. HPTLC analysis

HPTLC analyses were performed on silica gel 60 F₂₅₄ glass HPTLC plates (20 x 10 cm; 0.20 mm; Merck, Darmstadt, Germany). Each sample (2 µL) was applied at a rate of 50 nL/s as band (8 mm width) using an automatic TLC sampler ATS4 (Camag, Muttenz, Switzerland). The distance between tracks was 11.4 mm, the distance from the left side of the plate was 20 mm and the distance from the lower edge of the plate was 8 mm. Hydrolysis was set for 4 h in a TLC tank saturated with hydrochloric acid vapors, and then the plates were heated at 105 °C for 30 min on TLC plate heater. Plates were developed in an automatic Developing Chamber ADC2 (Camag, Muttenz, Switzerland) with humidity control (10 min, 38 % relative humidity), previously saturated (10 min), using chloroform, acetic acid, methanol, water (60:32:12:8, v/v/v/v) as mobile phase. The development length was 70 mm and the development time approximately 25 min. After development, plates were dried and derivatization was carried out by immersion of the plate in a solution of anisaldehyde-sulfuric acid reagent, followed by heating at 105 °C during 5 min on TLC plate heater [20]. Plates were photographed immediately after derivatization, using a visualizer system (Camag, Muttenz, Switzerland), under UV at 366 nm. The data was processed by Wincats 1.4 software (Camag, Muttenz, Switzerland). Plates were scanned using a TLC scanner 4 (Camag, Muttenz, Switzerland) under the following conditions: reflectance mode at 366 nm, D2 and W lamp slit dimension 4.00 x 0.30 mm, scanning speed 20 nm/s, data resolution 100 µm/step. Peak area measurement method was used.

2.7. Methods validation

Both methods were validated in terms of linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, repeatability and recovery. Five concentrations of total saponins (1, 5, 10, 15 and 20 mg/mL) were injected in triplicate. The HPTLC calibration curve was constructed by plotting the peak areas vs. the saponins concentrations and the HPLC calibration curve was constructed by plotting the same as their logarithms. LOD and LOQ under the chromatographic conditions were evaluated at signal-to-noise ratios (S/N) of 3 and 10, respectively. Three different samples and three different standard concentrations, prepared as described above, were analyzed in triplicate in order to determine the repeatability of the analysis. The measurement of intra- and inter-day variability was used to determine the precision of both developed methods. For intra-day variability test, three

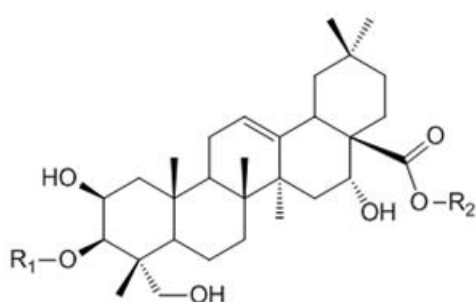
different standard solutions were analyzed in triplicates within one day. For inter-day variability test, the three standard solutions were analyzed over three consecutive days. The relative standard deviation (RSD) was taken as a measure of precision. Recovery studies were performed by the method of standard addition, to evaluate the accuracy of both developed methods. A known amount of standard solution was added to a known sample and analysis was done as described above.

3. RESULTS & DISCUSSION

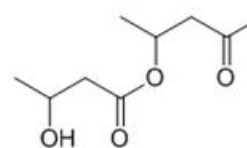
A large number of virgaureasaponins and solidago saponins were identified in *S. virgaurea* in the past [7, 21-22]. Recently, other original virgaureasaponins, presented in Fig. 1, were characterized in alpine *S. virgaurea* and showed an inhibiting activity of *C. albicans* yeast-hyphal conversion [11]. An oral care product against dry mouth being currently in development with extracts of alpine *S. virgaurea* [12], the set-up of reliable quantification methods of total virgaureasaponins appeared crucial. Indeed, during the development of a plant extract, various parameters have to be investigated, such as location of saponins within the plant, influence of climatic or geographic conditions on the metabolites formation, plant drying, storage conditions, etc.

Fig. 1: Structures of the major virgaureasaponins found in *S. virgaurea alpestris*

	Name	Molecular formula	R1	R2
1	Virgaureasaponine 1	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₇	Glc	Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha
2	Virgaureasaponine 2	C ₆₅ H ₁₀₆ O ₃₂	Glc-Glc	Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha
3	Solidagosaponine XVIII (Virgaureasaponine C)	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₁	Glc	(Fuc- ⁴ -A)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha
4	Virgaureasaponine 4	C ₇₀ H ₁₁₄ O ₃₆	Glc-Glc	Xyl- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha- ² -Fuc
5	Virgaureasaponine 5	C ₆₄ H ₁₀₄ O ₃₁	Glc	Xyl- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha- ² -Fuc
6	Virgaureasaponine 6	C ₇₄ H ₁₁₈ O ₃₆	Glc	((Fuc- ³ -Api- ⁵ -Ac)- ⁴ -A)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha



A : Dimeric Hydroxybutyrate



Glc : β -D-glucose, Xyl : β -D-xylose, Rha : α -L-rhamnose, Fuc : β -D-fucose, Api : β -D-apiose, Ac : acetate

Several efficient analytical methods using HPLC-ELSD or HPTLC have been reported for the quantification of saponins. Most of published methods used a preliminary step of sample preparation (SPE, column chromatography, hydrolysis in solution, etc.) to avoid obtaining complex and meaningless chromatograms [18, 23-26]. Although efficient, these procedures are time-consuming and too sophisticated to be implemented in rapid quality control or titration activities. Moreover, they could also result in additional sources of performance variations.

Furthermore, due to the large structural variability within the saponins family, available published methods are very specific of a given saponins, or group of saponins, and are not suited for the comprehensive analysis of *S. virgaurea* complex extracts and for the quantification of the total

virgaureasaponins content [27-29]. Fast and simple methods allowing both the separation of saponins from other compounds of the crude extract and the quantification of the whole saponins content are thus required.

In the present study, HPLC-ELSD and HPTLC approaches were developed to detect and quantify the whole virgaureasaponins contents in *S. virgaurea*. Using these methods, the quantity of virgaureasaponins in different populations of *S. virgaurea* was analyzed for the first time, showing interesting differences such as the influence of climatic conditions, for example.

Virgaureasaponins being particularly polar molecules, with an important number of sugars moieties (5-7), these compounds are usually extracted with water or hydroalcoholic solvents [9]. Thus the efficiencies of extraction with water containing different methanol ratios (0, 20, 30, 40 and 50 % v/v) were investigated, and HPLC-ELSD analyses showed that 30% aqueous methanol solution provided the highest extraction yield of virgaureasaponins. The extraction was assisted by ultrasound and performed at 5 °C in order to avoid structural modifications of saponins. For each sample, three independent extractions were performed to evaluate extraction repeatability.

For HPLC quantification of the whole virgaureasaponins of *S. virgaurea*, the chromatographic conditions were investigated. Firstly, the acetonitrile-water system showed more efficient separation ability for these saponins than the methanol-water system. Considering the complexity of the analyzed samples, gradient elution was carried out. The linear gradient started at 15 % acetonitrile to end at 55 % in 30 min. By this way, previously identified saponins [11] was separated from the other chemical families (phenolic acids, flavonoids ...) (Fig. 2). Moreover, these saponins could not be clearly detected by UV-vis detection. Unlike the UV-vis detector, ELSD is a universal and non-specific detector [14-15] and does not require the presence of a chromophore in the analyte structure. It is particularly well suited for the analysis of saponin compounds by providing the appropriate sensitivity [29]. In constant analytical conditions, ELSD response is not influenced by metabolites' structure, like UV, but depending on the mobile phase or the metabolites' volatility. It is thus necessary to use standards with similar retention times as the target compounds, regardless of their chemical structure. In this case, the best-suited standard appeared to us as being the total virgaureasaponins fraction itself.

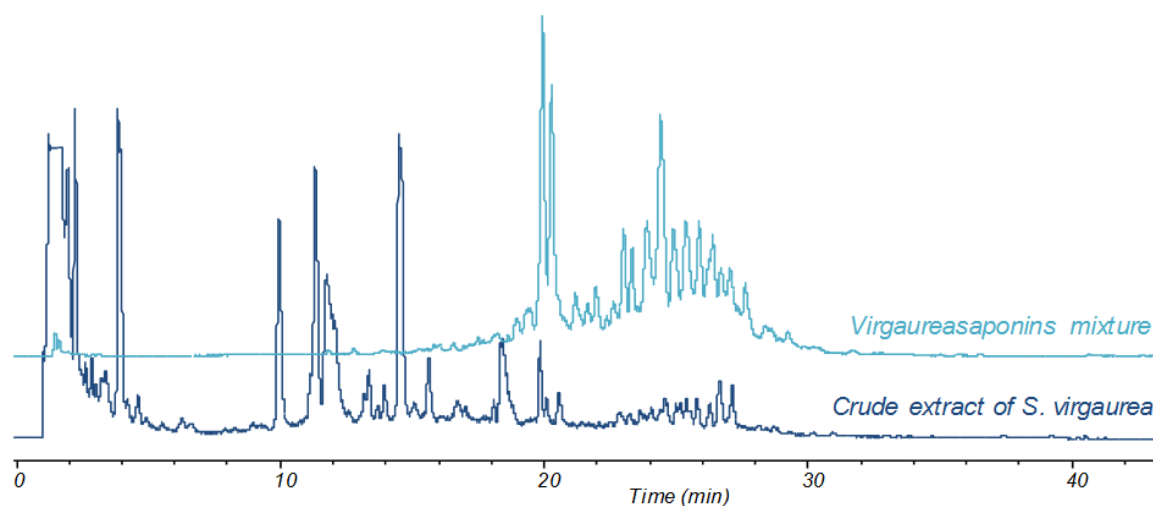


Fig. 2: HPLC-ELSD chromatograms of virgaureasaponins standard and a sample of *S. virgaurea*

Comparison between retention times and spectra (UV, MS) of the peaks ascertained the specificity of the method. As showed in the Table 2, the calibration curve was built within the 20-400 µg range and gave a correlation coefficient $R^2 > 0.99$. The ELSD response increasing exponentially, the regression equation was calculated in the form of $y = ax + b$, where y is the value of the decimal logarithm of the peak area and x the decimal logarithm of the concentration of reference saponins. The LOD ($S/N = 3$) and the LOQ ($S/N = 10$) were 4 µg and 16 µg, respectively, showing that the method was sensitive enough to detect and quantify the whole virgaureasaponins content in the samples. Intra- and inter-day variations of the analysis were determined for three concentrations of saponins standards (100,

200 and 300 µg/injection) and for samples SVA2, SVA6 and SVV1. It was performed three times on three different days and each run was done in triplicate. The overall variations were below 4.4 % (Table 3), showing acceptable precision and repeatability. To verify the accuracy, the recovery was determined by the standard addition method. A known amount of the virgaureasaponins was added into the sample SVA2, which had been previously analyzed. The mixture was analyzed using the proposed procedure, repeated three times. As shown in Table 4, the recovery was 101.91 %, with RSD 0.30 % (n = 3). It can be seen that the proposed method has an adequate degree of accuracy for the determination of virgaureasaponins.

The developed HPLC method was validated in terms of specificity, linearity, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, repeatability and accuracy. In term of solvents consumption, for the analysis of 100 samples, HPLC required ca. 5.5 L of solvents in 92 hours.

This HPLC method is efficient but is time- and solvent-consuming, a critical issue for the fast analysis of multiple samples. An HPTLC approach was thus developed in order to compare both the results and performances of these related analytical methods.

Different HPTLC conditions previously described in the literature for the separation of saponins were tested [30-31], but did not give acceptable results for the quantitative determination of virgaureasaponins content. The structural diversity and the resulting wide range of polarities are too important to allow for the detection and quantification of these saponins by HPTLC without preliminary sample treatment (Fig. 3). To narrow this chemical diversity, sugars elimination was performed by acidic hydrolysis. However, a step of hydrolysis in solution is time-consuming and introduces an additional variability factor. Thus, an *in situ* hydrolysis, on the plate, was envisaged as the most effective solution. Diverse pre-chromatographic hydrolysis methods were tested in order to obtain high resolution and repeatable peaks formation: over spraying with aqueous hydrochloric acid solution (4 µL, 2 N and 8 µL, 5 N), and hydrolysis with HCl vapor generated from an aqueous solution at 37 °C. The use of hydrochloric acid vapor provided the most effective hydrolysis and the best resolution. Various duration of HCl vapor expositions were tested (1, 2, 4, 6 h) and 4 h was found to be the most effective. The plates were then heated 30 min at 105 °C. With this pre-treatment, the best resolution was obtained using a mixture chloroform-acetic acid-methanol-water (60:32:12:8, v/v/v/v) as mobile phase on silica gel HPTLC plate [30-31]. The p-anisaldehyde reagent, commonly used to reveal saponins, was used [25, 30-31]. Sapogenins, thus obtained from the acid-catalyzed cleavage of the sugar moieties of saponins, were visually separated from other compounds families, with five bands located at $hR_F = 39, 44, 49, 57$ and 60 , grey under white light and deep red at 366 nm (Fig. 3). Thus, the scanning condition was chosen with detection at 366 nm. The densitometric scan of each extracts was therefore performed under the specified conditions and the quantification accomplished on the five bands.

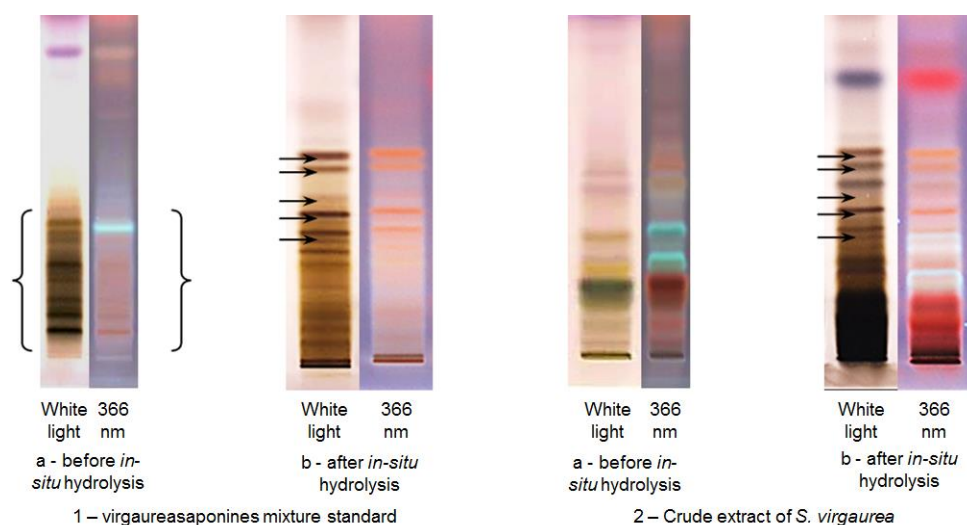


Fig. 3: HPTLC plates of virgaureasaponins standard (1) and a sample of *S. virgaurea* (2), before (a) and after (b) *in-situ* hydrolysis (white light; UV at 366 nm)

Comparison between hR_f and absorbance (visible, UV) of the spots ascertained the specificity of the method. As showed in Table 2, the calibration curve was linear in the 10-30 $\mu\text{g}/\text{spot}$ range and gave a correlation coefficient $R^2 > 0.99$. The LOD (S/N = 3) and the LOQ (S/N = 10) were 2 μg and 10 μg , respectively, showing that the method was sensitive enough to detect and quantify the whole virgaureasaponins content in the samples. As for the HPLC method, intra- and inter-day variations of the analysis were determined for three concentrations of saponins standards (100, 200 and 300 $\mu\text{g}/\text{injection}$) and for samples SVA2, SVA6 and SVV1. It was performed three times on three different days and each run was done in triplicate. The overall variations were less than 5.6 % (Table 3), showing acceptable precision and repeatability.

As showed in Table 4, with a recovery of 97.02 % and an RSD of 1.96% (n = 3), the proposed method has an adequate degree of accuracy for the quantification of virgaureasaponins.

The developed HPTLC method was validated in terms of specificity, linearity, LOD and LOQ, precision, repeatability and accuracy. In term of solvents consumption, for the analysis of 100 samples, HPTLC required ca. 0.27 L of solvents in 16-20 hours.

Table 2 HPLC and HPTLC calibration curve and characteristic parameters using total saponins fraction as external standard (n = 3)

	Curve equation	R^2	Linear Range	LOQ	LOD
HPLC	$y = 1.1084x + 4.2013^a$	0.9981	20-400 μg	16 μg	4 μg
HPTLC	$y = 457.56x + 1605.3$	0.9951	10-30 μg	10 μg	2 μg

^a $y = \log(\text{peak area})$, $x = \log(\text{concentration of standard, mg/ml})$.

Table 3 HPLC and HPTLC analytical results of intra-day and inter-day precision and repeatability (n = 3)

Analyte	Intra-day		Inter-day	
	Mean \pm SD	RSD (%) ^b	Mean \pm SD	RSD (%) ^b
HPLC				
Saponins (100 μg)	95.22 \pm 1.48	1.55	96.91 \pm 2.05	2.12
Saponins (200 μg)	202.11 \pm 3.44	1.70	202.08 \pm 3.41	1.69
Saponins (300 μg)	281.45 \pm 7.66	2.72	285.77 \pm 12.56	4.39
Sample SVA2	154.17 \pm 4.55	2.95	155.46 \pm 5.43	3.49
Sample SVA6	221.39 \pm 5.35	2.42	221.86 \pm 5.77	2.60
Sample SVV1	259.02 \pm 7.13	2.75	260.07 \pm 7.66	2.95
HPTLC				
Saponins (10 μg)	8.47 \pm 0.16	1.86	9.60 \pm 0.41	4.24
Saponins (20 μg)	21.09 \pm 0.63	2.99	20.81 \pm 0.75	3.59
Saponins (30 μg)	28.85 \pm 0.85	2.95	28.98 \pm 1.12	3.87
Sample SVA2	14.64 \pm 0.64	4.39	16.72 \pm 0.72	4.28
Sample SVA6	21.34 \pm 1.16	5.43	22.53 \pm 0.67	2.95
Sample SVV1	25.70 \pm 0.73	2.83	26.30 \pm 1.47	5.60

^bRSD (%) = (SD of amount detected/mean of amount detected) \times 100

Table 4 HPLC and HPTLC analytical results of recovery (n = 3)

	Sample	Contained (μg)	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)	RSD (%) ^b
HPLC	SVA2	170.00	38.40	212.38 \pm 0.63	101.91 \pm 0.30	0.30
HPTLC	SVA2	17.00	3.84	20.22 \pm 0.4	97.02 \pm 1.90	1.96

^bRSD (%) = (SD of amount detected/mean of amount detected) \times 100

These newly proposed methods were applied for the first time to the quantification of the virgaureasaponins family in 13 populations of *S. virgaurea*. Various samples of *S. virgaurea virgaurea* and *S. virgaurea alpestris* were collected from five locations in the French alpine region over four consecutive years. These methods were used for the control of plant materials, and to evaluate the most productive population in the perspective of applications in mouthwash products. As shown in Table 5, virgaureasaponins could not be detected in roots and stems, but only in flowers/seeds and leaves. Thus, flowering tops should be preferred during the harvest. Moreover, the total saponins contents, within the same studied population, were quite different from one year to another. For example, the population SVA4, collected in 2008 in place 1, contains ca. 70 % more than the population SVA3, collected in 2009 in the same place. Climatic conditions seemed to have more influence on total saponins content than geography or subspecies type. Both subspecies were indeed not significantly different. Thus, *alpestris* and *virgaurea* could be harvested together in all alpine regions.

Further experiments are required to assess the appropriate climatic and local conditions, and to identify influence of cultivation on total saponins content.

As mentioned above, all virgaureasaponins were shown to exhibit different activities on *C. albicans*. So, an extensive quantification of major saponins and most active saponins should be performed to shed light on possible variations of the saponins profile and select the most active saponins-rich populations.

Table 5 Virgaureasaponins contents in *S. virgaurea* samples

Samples	Total saponins content (% in dry plant) ^c	
	HPLC	HPTLC
SVA1	2.22 \pm 0.28	1.60 \pm 0.47
SVA2	2.69 \pm 0.13	2.09 \pm 0.29
SVA3	2.15 \pm 0.13	1.70 \pm 0.13
SVA4	3.55 \pm 0.29	3.04 \pm 0.09
SVA5	2.83 \pm 0.27	1.94 \pm 0.08
SVA6	2.92 \pm 0.08	1.99 \pm 0.34
SVA7	3.63 \pm 0.05	3.13 \pm 0.26
SVA8	-	-
SVA9	3.15 \pm 0.21	2.38 \pm 0.28
SVA10	-	-
SVV1	3.76 \pm 0.39	2.98 \pm 0.29
SVV2	3.33 \pm 0.22	2.76 \pm 0.08
SVV3	2.60 \pm 0.09	1.58 \pm 0.36

^c Values shown are mean \pm SD ($n = 3$)

Both of these methods present different sets of advantages and disadvantages. Firstly, HPTLC values are slightly lower than those obtained by HPLC. This could be explained by a matrix effect during the

step of hydrolysis in HPTLC. Nevertheless, this difference was repeatable, so it does not induce critical bias since samples are compared one to another or compared to a control sample.

HPLC profiles possessed better resolution and repeatability than offline HPTLC. Moreover, in contrast with HPTLC which can only quantify the total saponins content, HPLC method does not require a hydrolysis step, thus it is the recommended method for further specific analyses of active saponins.

However, HPTLC was faster than HPLC and remarkably less solvent-consuming. In this case, HPLC used about twenty times more solvent (5.5 L vs. 0.27 L) and five times more time (92 h vs. 16-20 h) than HPTLC. In addition, HPTLC method provides intense colorful image, useful for fast parallel and/or automated comparisons.

HPLC is thus the recommended method for precise analyses, but HPTLC is the most efficient in the case of control of multiple samples.

4. Conclusion

Both of these quantification methods (HPLC and HPTLC) are simple to implement, fast and accurate. In the case of HPTLC, in-situ hydrolysis avoids sample degradation and is faster and more accurate than liquid phase hydrolysis. As a result, these methods are suitable for multiple samples analysis. They could be directly applied to the control of plant material and final products in total saponins content.

Finally, they could be easily adapted to the analysis of other plants containing similar saponins, especially thanks to the use of the saponins fraction as standard, the analysis of crude extracts and the use of simple chromatographic systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Department of Alpes-Maritimes (CG 06), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Nice-Sophia Antipolis University (UNS). T.K.T. Do is grateful to Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) for a fellowship. The authors thank the Botanic Garden of Nice (Ms. Achenfab-Hermelin), the Biophyto association (J.-P. Gherardi and J.-L. Polidori), and the "Conservatoire botanique national méditerranéen" of Porquerolles (Mrs. Myriam Virevaire).

References

- [1] G. Bader, K. Binder, K. Hiller and H. Ziegler-Böhme, *Pharmazie*. 42 (1987) 140.
- [2] Y. Kiselova, D. Ivanova, T. Chervenkov, D. Gerova, B. Galunska and T. Yankova, *Phytotherapy research*. 20 (2006) 961-965.
- [3] G. Bader, B. Plohmann, K. Hiller and G. Franz, *Pharmazie*. 51 (1996) 414-417.
- [4] P. Pietta, C. Gardana, P. Mauri and L. Zecca, *Journal of Chromatography A*. 558 (1991) 296-301.
- [5] C. M. Starks, R. B. Williams, M. G. Goering, M. O'Neil Johnson, V. L. Norman, J.-F. Hu, E. Garo, G. W. Hough, S. M. Rice and G. R. Eldridge, *Phytochemistry*. 71 (2010) 104-109.
- [6] L. Jørgen, *Phytochemistry*. 10 (1971) 647-653.
- [7] Y. Inose, T. Miyase and A. Ueno, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 39 (1991) 2037-2042.
- [8] T. Miyase, Y. Inose and A. Ueno, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 42 (1994) 617-624.
- [9] G. Bader, V. Wray and K. Hiller, *Planta Medica*. 61 (1995) 158-161.
- [10] M. Chevalier, E. Medioni and I. Precheur, *Journal of Medical Microbiology*. 61 (2012) 1016-1022.
- [11] L. Laurençon, E. Sarrazin, M. Chevalier, I. Prêcheur, G. Herbette and X. Fernandez, *Phytochemistry*. 86 (2013) 103-111.

- [12] I. Madinier and M. Geribaldi, Composition containing saponins, FR08/07412,
- [13] W. Oleszek and Z. Bialy, *Journal of Chromatography A*. 1112 (2006) 78-91.
- [14] N. Adnani, C. R. Michel and T. S. Bugni, *Journal of Natural Products*. 75 (2012) 802-806.
- [15] B. T. Mathews, P. D. Higginson, R. Lyons, J. C. Mitchell, N. W. Sach, M. J. Snowden, M. R. Taylor and A. G. Wright, *Chromatographia*. 60 (2004) 625-633.
- [16] H. P. V. Rupasinghe, C.-J. C. Jackson, V. Poysa, C. Di Berardo, J. D. Bewley and J. Jenkinson, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (2003) 5888-5894.
- [17] W. Li and J. F. Fitzloff, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53 (2001) 1637-1643.
- [18] L. Wang, X. Wang, X. Yuan and B. Zhao, *Phytochemical Analysis*. 22 (2011) 14-17.
- [19] C. Chaicharoenpong and A. Petsom, *Phytochemical Analysis*. 20 (2009) 253-255.
- [20] W. A. Oleszek, *Journal of Chromatography A*. 967 (2002) 147-162.
- [21] K. Hiller, G. Bader and H.-R. Schulten, *Pharmazie*. 42 (1987) 541-543.
- [22] G. Bader, V. Wray and K. Hiller, *Phytochemistry*. 31 (1992) 621-623.
- [23] R.-t. Tian, P.-s. Xie and H.-p. Liu, *Journal of Chromatography A*. 1216 (2009) 2150-2155.
- [24] M. Liang, Z. Zheng, Y. Yuan, L. Kong, Y. Shen, R. Liu, C. Zhang and W. Zhang, *Phytochemical Analysis*. 18 (2007) 428-435.
- [25] A. Schwarzbach, M. Schreiner and D. Knorr, *European Food Research and Technology*. 222 (2006) 32-35.
- [26] E. E. Kovac and J. Grujic-Vasic, *Journal of Planar Chromatography*. 10 (1997) 305-307.
- [27] B. Avula, Y.-H. Wang, C. S. Rumalla, Z. Ali, T. J. Smillie and I. A. Khan, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 56 (2011) 895-903.
- [28] K. Y. Lee, Y. W. Cho, J. Park, D. Y. Lee, S. H. Kim, Y. C. Kim and S. H. Sung, *Phytochemical Analysis*. 21 (2010) 314-321.
- [29] F. Sun, Q. He, P. Xiao, I. Muhammad and Y. Cheng, *Phytochemical Analysis*. 19 (2008) 40-45.
- [30] E. Reich and A. Schibli, *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants*, Thieme, New York, 2007.
- [31] H. Wagner and S. Bladt, *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*, Springer, Berlin, 1996.

CHAPITRE 4 : ETUDES COMPLEMENTAIRES

1. INTRODUCTION

Ce dernier chapitre concerne deux études commencées en fin de thèse. Une des études a pu être finalisée et publiée, alors que l'autre étude ne présente que les premiers résultats ainsi que les perspectives.

Dans le cadre de la faisabilité de l'arrêté plante (ERNC1406332A) mis en place en France pour l'utilisation des plantes et extraits de plantes dans les compléments alimentaires, la société BotaniCert a voulu étudier de plus près la partie concernant les ignames (*Dioscorea*) et leur discrimination vis-à-vis des différentes plantes à tubercules. Pour cela, l'étude s'est déroulée en plusieurs étapes : recherche bibliographique sur les ignames et autres plantes à tubercules, recherche de partenariat pour l'approvisionnement de matière première, et premiers tests d'analyse par HPTLC.

Lors de la recherche pour l'approvisionnement, une collaboration s'est mise en place avec l'équipe du Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) au Vanouatou et le Pr. Laurent Legendre de l'Université de Saint-Etienne. Cette collaboration s'est concrétisée par un déplacement d'un mois au Vanouatou pendant lequel était prévue la récolte des plantes à tubercules utilisées pour l'étude de faisabilité de BotaniCert, mais aussi aider au développement de méthodes HPTLC pour le contrôle des matières premières vanuataises.

Deux études ont donc été réalisées : développement d'une méthode pour l'identification des extraits de plantes à tubercules du Vanouatou et développement d'une méthode HPTLC pour la différenciation de différentes qualités de kava. L'étude sur les racines de kava a été conduite dans le cadre de l'élaboration d'un premier document de travail pour une soumission de projet à la commission du *Codex Alimentarius*. L'étude sur les plantes à tubercule n'a pas pu être terminée lors de cette thèse, seule la préparation d'échantillon, le développement de méthode HPTLC et le fractionnement de certains extraits ont pu être réalisés.

2. FAISABILITE DE L'ARRETE PLANTE EN FRANCE : CAS DE L'IGNAME

2.1. Introduction

Comme précisé précédemment, la raison première de cette étude concernait l'étude des conséquences pour la filière de l'arrêté plante établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires, publié en France dans le journal officiel le 24 juin 2014, et plus particulièrement pour la discrimination des différentes plantes à tubercules : les espèces *D. oppositifolia* et *D. villosa* du genre *Dioscorea* [187]. Une des premières problématiques concernait la différenciation entre les plantes à tubercules lorsqu'elles se trouvent sous forme d'extrait sec. En effet, les ignames faisant parti d'un ensemble de plantes à tubercules utilisées sous forme de poudre, ils sont difficilement différenciables des autres. La deuxième problématique concerne la distinction des espèces *oppositifolia* et *villosa* par rapport aux 600 autres espèces connues au sein du genre. C'est pourquoi une étude de faisabilité a été réalisée.

2.2. Généralités sur les plantes à tubercules

Les plantes à tubercules se composent de nombreuses espèces, parmi lesquelles on retrouve les ignames, les patates douces, les maniocs et les taros. Les ignames sont des espèces du genre *Dioscorea* de la famille des dioscoréacées, récoltées pour leurs tubercules dans les zones tropicales et tempérées comme par exemple en Asie, Amérique du Sud, Amérique centrale et en Afrique (Figure 68). En 2006, leur production mondiale a atteint 51 millions de tonnes [188].

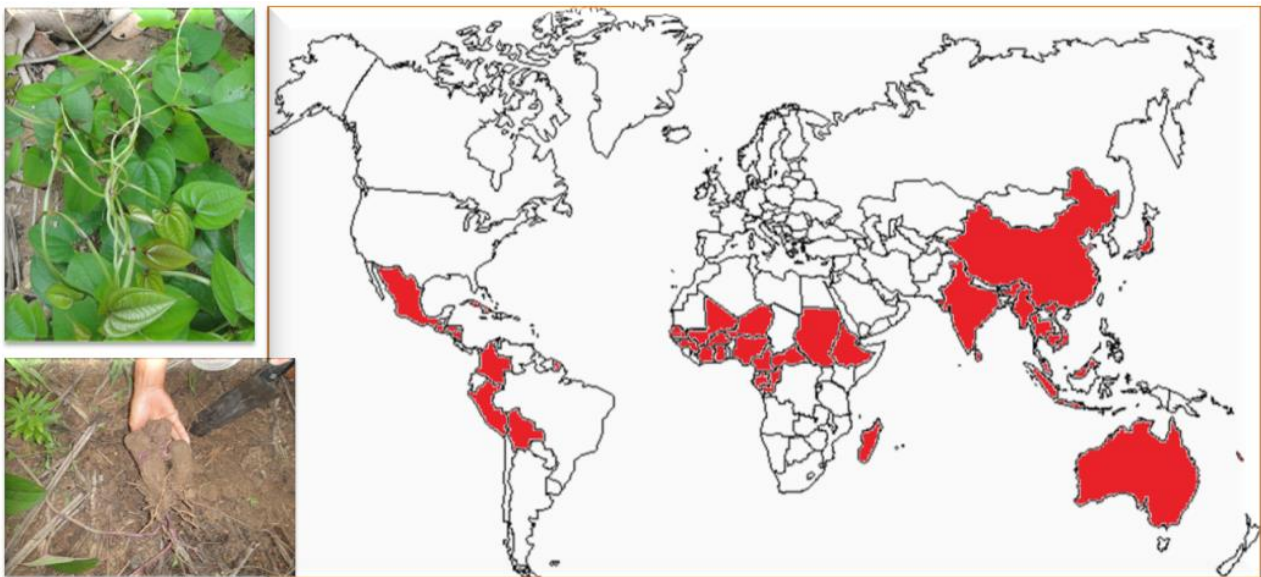


Figure 68 : feuille de *Dioscorea* (en haut à gauche) ; récolte de tubercule (en bas à gauche) ; origine des *Dioscorea*.

Les ignames sont aussi utilisés pour leur propriété thérapeutique comme par exemple dans la médecine traditionnelle chinoise (Tableau 22) [189].

Tableau 22: utilisation des ignames en médecine traditionnelle [190].

Indication	Espèce	Utilisation
Morsures d'insecte ou de serpent	<i>D. alata</i>	Pâte de feuilles fraîches (application locale)
	<i>D. cayenensis</i>	Décoction de feuilles fraîches (application locale)
	<i>D. multiflora</i>	Poudre de patate, mixée avec du piment (application locale)
Brulure	<i>D. alata</i>	Pâte de tubercules (application locale)
Abcès	<i>D. bulbifera</i>	Pâte de bulbilles (application locale)
Ulcère	<i>D. ovinala</i>	Pâte de tubercules (ingérer)

La diosgénine que l'on peut extraire des ignames peut servir de matière première pour l'hémisynthèse de stéroïdes comme la cortisone, l'estrone, l'estradiol ou la testostérone (Figure 69) [191, 192].

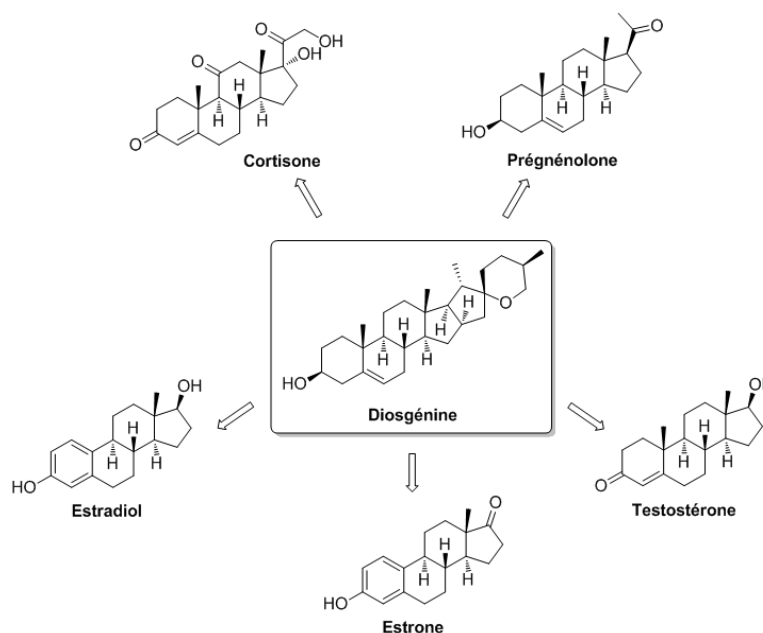


Figure 69: héli-synthèse de stéroïdes à partir de la diosgénine.

La patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), est une plante de la famille des convolvulacées, originaire d'Amérique. Sa production mondiale en 2006 s'est élevée à 124 millions de tonnes. Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est, quant à lui, un arbuste de la famille des Euphorbiacées. Originaire d'Amérique du sud, le manioc a été introduit en Afrique vers les années 1550, puis dans le Pacifique au début du XXème siècle. Depuis, la culture du manioc (226 millions de tonnes en





2006) est devenue la sixième plus importante après le blé, le riz, la pomme de terre et l'orge [188, 189]. Le taro est un rhizome de diverses aracées tropicales appartenant à différents genres : *Colocasia* (*C. esculenta* (L.) Schott), *Xanthosoma* (*X. sagittifolium* (L.) Schott), *Alocasia* et *Amorphophallus*.

2.3. Etudes préliminaires

2.3.1. Echantillons de l'étude préliminaire

Afin de pouvoir commencer les tests d'analyse par HPTLC, des tubercules d'ignames ont été achetés dans des grandes surfaces, auprès d'herboristerie, et de fournisseur d'extraits naturels (Tableau 23). Ces échantillons n'ont cependant pas été authentifiés par un botaniste.

Tableau 23: information sur les échantillons de l'étude préliminaire.

N°	INFORMATIONS	FOURNISSEUR	MASSE	COMMENTAIRES
R106	Igname tubercule <i>Dioscorea villosa</i> (poudre)	Cailleau herboristerie	250 g	 Dluo : 06/2015
R108	Igname tubercule <i>Dioscorea compositae</i>	Cailleau herboristerie	1 Kg	 Dluo : 01/2013
CS184	<i>Dioscorea</i> – igname- Ghana	Auchan St loup Marseille	1,475 Kg	
CS185	<i>Dioscorea</i> – igname- Cote d'Ivoire	Auchan Grasse	1,945 Kg	

2.3.2. Préparation d'échantillons

Les premières extractions ont été effectuées sur un échantillon (R108) acheté auprès de l'herboristerie Cailleau. Le premier test concerne le solvant d'extraction. Pour cela, la même quantité d'échantillon a été extraite au moyen d'un Soxhlet avec la même quantité de solvant, pendant la même durée. Cette procédure a été réalisée avec un solvant de chacune des classes de la classification de Snyder. Les résultats ont montré un meilleur rendement d'extraction avec du méthanol (Tableau 24).

Tableau 24: masse d'extrait sec obtenue par Soxhlet avec différents solvants d'extraction.

N° ECHANTILLON	DESCRIPTION DE LA PREPARATION	RENDEMENT
R108-01	R108 : extraction méthanolique	6,68 %
R108-02	R108 : extraction avec de l'heptane	0,45 %
R108-03	R108 : extraction avec du THF	4,69 %
R108-04	R108 : extraction avec du dichlorométhane	0,60 %
R108-05	R108 : extraction avec de l'éther diéthylique	0,84 %
R108-06	R108 : extraction acétonique	0,74 %
R108-07	R108 : extraction aqueuse	1,22 %
R108-08	R108 : extraction avec du toluène	0,07 %

Le méthanol se révélant être un bon solvant d'extraction, il a aussi été testé sur d'autres échantillons (Tableau 25). Les rendements moyens obtenus avec une extraction méthanolique à l'aide d'un Soxhlet sont de 4,52 %.

Tableau 25 : rendement d'extraction méthanolique par Soxhlet obtenu sur différents échantillons.

N° ECHANTILLON	RENDEMENT
CS184-01	2,41 %
CS185-01	4,04 %
R106-01	4,93 %
R108-01	6,68 %

Différentes techniques d'extraction ont été ensuite comparées : Soxhlet, décoction* et extraction par reflux. L'extraction par reflux a donné des rendements d'extraction supérieurs aux autres, elle a donc été sélectionnée pour la suite des tests (Tableau 26).

* Décoction : les tubercules sont placés dans le solvant d'extraction. Le mélange est porté à ébullition et maintenu à la température souhaitée.

Tableau 26: rendement d'extraction obtenu avec différentes techniques d'extraction.

N° ECHANTILLON	DESCRIPTION DE LA PREPARATION	RENDEMENT
R108-01	R108 : extraction méthanolique par Soxhlet	6,68 %
R108-09	R108 : extraction méthanolique par décoction	7,12 %
R108-10	R108 : extraction méthanolique par reflux.	9,33 %

L'extraction par reflux a ensuite été testée avec un mélange méthanol/eau (8:2, v/v) afin de comparer le rendement d'extraction obtenu avec du méthanol pur. Le mélange méthanol/eau a donné un taux de récupération supérieur (Tableau 27).

Tableau 27: rendement d'extraction obtenu par reflux avec du méthanol ou un mélange de méthanol/eau (8:2, v/v).

N° ECHANTILLON	DESCRIPTION DE LA PREPARATION	RENDEMENT
R108-10	R108 : extraction méthanolique par reflux	9,33 %
R108-11	R108 : extraction avec un mélange méthanol, eau (8:2, v/v) par reflux	14,71 %

Suite à tous ces tests d'extraction, la préparation d'échantillon par extraction par reflux avec un mélange méthanol/eau (8:2, v/v) a été préférée. Cependant, pour le développement de la méthode HPTLC, tous les échantillons préparés précédemment ont été testés.

2.3.3. Développement de la méthode HPTLC

Pour la première analyse par HPTLC, les extraits précédemment préparés de *D. compositae* (de R108-01 à R108-08 et R108-11) ont été analysés sur la même plaque afin de comparer les solvants d'extraction.

En ce qui concerne la méthode d'analyse, les ignames étant connues pour contenir de la diosgénine, une méthode trouvée dans la littérature a été testée (Tableau 28) [193].

Tableau 28: paramètre HPTLC du premier test HPTLC.

N° TEST	PARAMETRES
1	Phase stationnaire : HPTLC Si F ₂₅₄ Phase mobile : Chloroforme, acide acétique, méthanol, eau (60 : 32 : 12 : 8) (v/v/v/v) Distance de migration : 70 mm à partir du bas de la plaque Développement : 10 min de contrôle d'humidité et 20 min de saturation Révélation : Anisaldéhyde- acide sulfurique, immerger la plaque puis sécher à 100 °C pendant 3 min. Détection : après révélation sous lumière blanche et sous UV à 366 nm

Les résultats ont montré que les extractions réalisées avec le méthanol (bande 2), le THF (bande 3), et le mélange méthanol/eau (8:2, v/v) (bande 4) permettaient d'obtenir des empreintes HPTLC plus complètes (Figure 70), alors que les composés apolaires étaient plus facilement extraits avec le dichlorométhane et l'éther diéthylique (bandes 6 et 7). De plus, l'extraction à l'aide du mélange méthanol/eau possède des zones plus intenses ce qui confirme le meilleur rendement, ainsi que notre choix de solvant d'extraction.

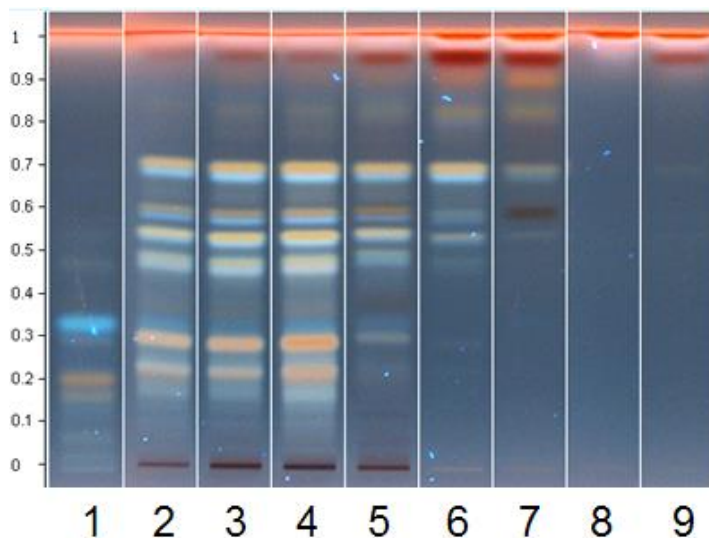


Figure 70 : profils HPTLC obtenus après révélation (anisaldéhyde-acide sulfurique), sous UV à 366 nm. 1 : R108-07 (eau), 2 : R108-02 (méthanol), 3 : R108-03 (THF), 4 : R108-11 (méthanol/eau, 8 :2 v/v), 5 : R108-06 (acétone), 6 : R108-04 (dichlorométhane), 7 : R108-05 (éther diéthylique), 8 : R108-02 (heptane), 9 : R108-08 (toluène).

En ce qui concerne la méthode HPTLC, la phase mobile testée a donné un résultat satisfaisant car l'échantillon possède des composés répartis sur l'ensemble de la distance de migration (Figure 70).

Pour la deuxième plaque HPTLC, l'échantillon de *D. villosa* (R106) a été extrait par reflux avec un mélange de méthanol/eau (8:2, v/v). De plus, un échantillon de *D. bulbifera* (CS078) a été reçu et a été préparé de la même façon que R106-02 afin d'être analysé sur la même plaque (Figure 71). Ce test montre que les échantillons R108 étiqueté *D. compositae* et l'échantillon R106 étiqueté *D. villosa* possèdent des profils HPTLC semblables (bandes 1, et 3). Cette observation nous amène à nous poser plusieurs questions :

- Existe-t-il des différences significatives concernant ces deux espèces ?
- La similarité provient-elle d'une erreur du fournisseur ?

De plus, l'empreinte HPTLC de l'échantillon de *D. bulbifera* (bande 2) est significativement différente des autres. Ceci sera à confirmer avec des échantillons authentifiés par un botaniste.

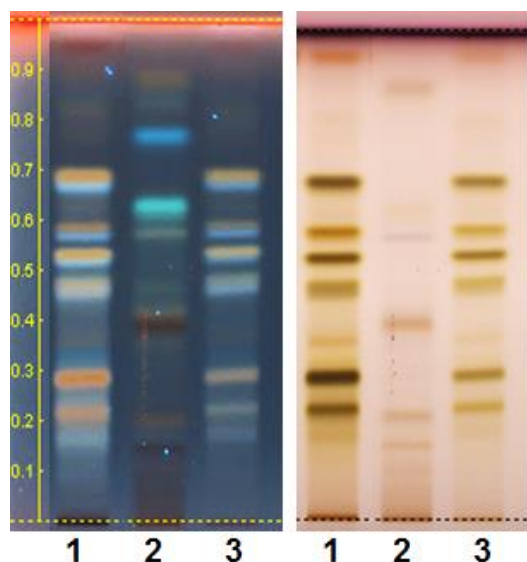


Figure 71: profils HPTLC obtenues après révélation (anisaldéhyde- acide sulfurique), sous UV à 366 nm (gauche), lumière blanche (WT) (droite). 1 : *D. compositae* (R208), 2 : *D. bulbifera* (CS078), 3 : *D. villosa* (R106).

Par la suite, une autre série d'échantillons regroupant différentes espèces ont été reçus et analysés avec la même méthode (Tableau 29).

Tableau 29 : liste des échantillons reçus pour la deuxième série de test.

N° ECHANTILLON	NOM	ORIGINE
CS079	<i>D. septemloba</i> Thunb.	Chine
CS072	<i>D. hypoglauca</i> Palibin	Shanghai - Chine
CS077	<i>D. nipponica</i> Makino	Chine - Shan yao

Les résultats ont montré que chacune des espèces présentes possédait un profil HPTLC différents des autres (Figure 72).

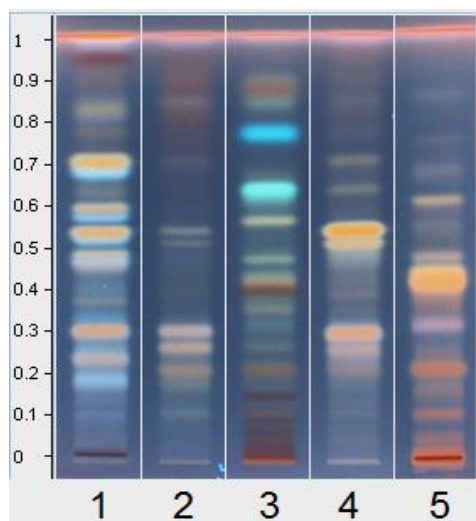


Figure 72 : profils HPTLC obtenus après révélation (anisaldéhyde- acide sulfurique), sous UV à 366 nm. 1 : *D. compositae* (R208), 2 : *D. septemloba* (CS079), 3 : *D. bulbifera* (CS078), 4 : *D. hypoglauca*, 5 : *D. nipponica*.

En regardant de plus près, chacune de ces espèces possèdent une empreinte HPTLC caractéristique. Dans le cas de l'échantillon de *D. bulbifera*, deux zones ($R_F = 0,64$ et $R_F = 0,78$) sont absentes des autres profils HPTLC (bande 3, Figure 72). Afin d'obtenir un maximum

d'informations sur ces marqueurs, d'autres tests ont été réalisés en modifiant les révélateurs (Figure 73).

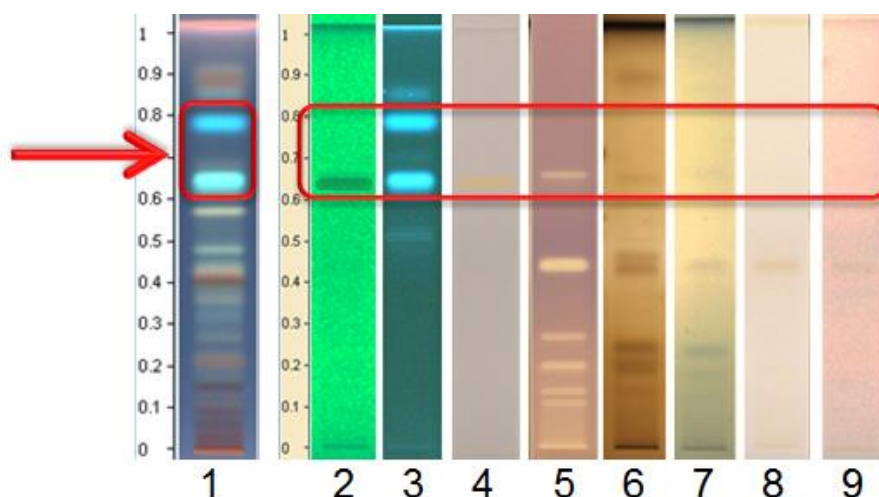


Figure 73 : *D. bulbifera* (CS078) révéillé avec différentes préparations. 1 : Anisaldéhyde- acide sulfurique, 2 : UV 254 nm avant révélation, 3 : UV 366 nm avant révélation, 4 : lumière blanche avant révélation, 5 : DPPH, 6 : sulfate de cuivre, 7 : acide phosphomolybdique, 8 : iode, 9 : ninhydrine.

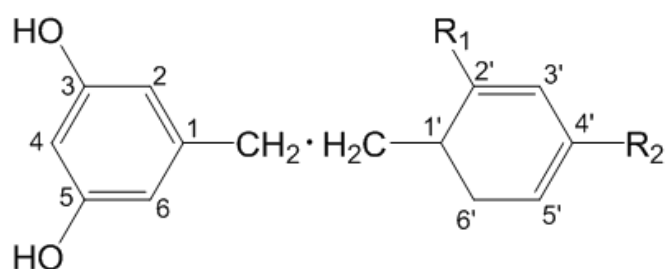
Les caractéristiques visuelles des marqueurs avant et après révélations permettent de déduire des informations sur la nature des composés. Les résultats permettent de constater que les deux marqueurs ne réagissent pas de la même façon (Tableau 30). En effet, le marqueur se situant au $R_F = 0,64$ ne réagit pas aux révélateurs testés, hormis l'Anisaldéhyde- acide sulfurique, alors que celui au $R_F = 0,78$ réagit à tous les révélateurs hormis l'iode et la ninhydrine.

Tableau 30 : résultats des tests de révélation sur les deux marqueurs sélectionnés.

N° BANDE	MODE DE DETECTION	R_F	DESCRIPTION	INFORMATIONS
1	Anisaldéhyde- acide sulfurique	0,64	Bleu (366 nm) Jaune (lumière blanche)	Mécanisme de réaction non élucidé
		0,78	Bleu (366 nm) Jaune (lumière blanche)	
2	UV 254 nm (sans révélation)	0,64	Noir	Absorption aux alentours de 254 nm.
		0,78	---	Pas d'absorption aux alentours de 254 nm.
3	UV 366 nm (sans révélation)	0,64	Bleu	La fluorescence bleue peut indiquer la présence d'un dérivé phenylpropane
		0,78	Bleu	La fluorescence bleue peut indiquer la présence d'un dérivé phenylpropane
4	Lumière blanche	0,64	---	

N° BANDE	MODE DE DETECTION	R _F	DESCRIPTION	INFORMATIONS
	(sans révélation)	0,78	Jaune (lumière blanche)	
5	DPPH	0,64	---	Pas d'activité antioxydante
		0,78	Jaune sur fond violet (lumière blanche)	Activité antioxydante
6	Sulfate de cuivre	0,64	---	Mécanisme de réaction non élucidé
		0,78	Marron sur fond orange (lumière blanche)	
7	Acide phosphomolybdique	0,64	--	Un grand nombre de substances organique peut être oxydés par l'acide phosphomolybdique, dans lequel une partie du Mo (VI) est réduit en Mo (IV) qui forme des oxydes mixtes bleu gris avec le restant de Mo (VI)
		0,78	Bleu (lumière blanche)	
8	Iodine	0,64	---	
		0,78	---	
9	Ninhydrine	0,64	---	
		0,78	---	

La fluorescence bleue de ces deux zones peut indiquer la présence d'un dérivé phenylpropane, ce qui confirmerait la présence de stibènes découverts dans des bulbilles de *D. bulbifera* : demethylbatatasin IV et dihydroresveratrol (Figure 74) [194].



Demethylbatatasin IV: R₁ = OH, R₂ = H
 Dihydroresveratrol : R₁ = H, R₂ = OH

Figure 74: structure du demethylbatatasin IV et du dihydroresveratrol.

2.3.4. Conclusion sur les premiers tests

Les premiers tests ont montré qu'une extraction par reflux avec un mélange méthanol/eau (8:2, v/v) permettait d'extraire de nombreux composés. De plus, les premiers résultats se sont avérés prometteurs et ont permis d'obtenir une méthode HPTLC permettant de différencier au

moins 5 espèces de *Dioscorea*. Pour certaines des espèces, des marqueurs semblent être caractéristiques. Cependant tous ces résultats ont été obtenus sur des échantillons achetés dans le commerce donc non authentifiés. Pour la suite de ce projet, la priorité est de trouver des échantillons authentifiés et en grande quantité afin de pouvoir vérifier que ces empreintes HPTLC sont représentatives de la population.

Ces premiers résultats, ainsi que les perspectives de ce projet ont été présentés lors du Symposium Franco-Thaïlandais à Bangkok en 2012. Suite à cette présentation, la recherche de matières premières authentifiées a commencé.

2.4. Recherche de matières première authentifiées

Le contact avec le CIRAD a été réalisé fin 2012 lors d'un échange avec le Pr. Laurent Legendre (Département de biologie biochimie de l'Université Jean Monnet, Saint-Etienne) au sujet de l'HPTLC. Après discussion avec le Pr. Laurent Legendre et le Dr. Vincent Lebot du CIRAD, la collaboration a démarré avec un déplacement au Vanouatou en Juillet 2013. Lors de ce déplacement d'un mois, l'étude sur les plantes à tubercules a consisté en la récolte des échantillons de la collection de plantes à tubercule, mais aussi au développement d'un protocole de préparation d'échantillon sur tubercules fraîches. De plus, lors de ce déplacement, d'autres méthodes HPTLC ont été développées sur une autre plante du Vanouatou : le kava.

La partie suivante sur les plantes du Vanouatou comporte donc deux aspects. La première est une présentation du contexte dans lequel l'étude a été menée, à savoir le Vanouatou et le projet « végé-culture ». La deuxième partie correspond à la suite de l'étude de faisabilité sur les plantes à tubercules. Enfin la dernière partie concerne la méthode de contrôle des extraits de kava.

3. LES PLANTES DU VANOUATOU

3.1. Introduction et contexte des études

La République du Vanouatou est un archipel volcanique de 83 îles appartenant à la Mélanésie. Elle possède une diversité de plantes à tubercules tenant une place importante que ce soit dans leur alimentation, ou bien pour les cérémonies traditionnelles. Ce pays a su conserver et enrichir cette tradition au fil de son histoire. Situées dans l'océan Pacifique, les îles subissent un climat tropical ou subtropical ce qui favorise les floraisons et les productions de graines (Figure 75). Outre le climat propice à l'agriculture des plantes à racines et à tubercules, les vanouatais pratiquent la végé-culture, c'est à dire cloner par multiplication végétative pour créer une nouvelle variété. C'est ainsi que par mutation clonale de nouvelles variétés apparaissent et participent à la diversification de ces plantes [195].



Figure 75: carte du Vanouatou [196].

Le projet « Végé-culture » de l'Agence nationale de la recherche (ANR) vise à développer une méthodologie intégrative combinant des données issues de la géographie, de l'agro-écologie, de la biochimie, de la génétique, et de la socio-économie à différentes échelles (spatiales et temporelles) pour quantifier les systèmes de culture tropicaux complexes. Le Centre technique de recherche agronomique du Vanuatu (CTRAV), partenaire du projet, est un centre technique qui a pour mission de collecter et de conserver, sur l'ensemble de l'archipel, des variétés de plantes à racines et à tubercules les plus intéressantes sur les plans agronomiques et organoleptiques [197].

L'apport de l'HPTLC rentre dans un des objectifs scientifiques du projet « Végé-culture », à savoir l'étude de la diversité chimique et le dosage des molécules d'intérêt dans les différentes variétés de manière à comprendre comment elles sont favorisées par les producteurs [198].

3.2. Plantes à tubercules du Vanouatou

3.2.1. Généralités sur les plantes à tubercules du Vanouatou

Au Vanouatou, les plantes à racines et à tubercules sont une source nutritive, un aliment de base qui permet d'assurer un apport quotidien d'énergie. Les taros et les ignames étant les espèces les plus cultivées par la population traditionnelle de la Mélanésie (Figure 76) [199].



Figure 76: champs, récolte et ventes des tubercules au Vanouatou.

3.2.2. Récolte, préparation et extraction des tubercules

3.2.2.1. Récolte des échantillons

Les échantillons ont été sélectionnés parmi différentes collections dont les semences sont toutes conservées dans les collections de ressource génétiques. Toutes les variétés ont été cultivées sur la même parcelle du CTRAV basé sur l'île d'*Espiritu Santo* afin de minimiser les variations dues à des facteurs environnementaux. Les tubercules ont été récoltés d'avril à août 2013, puis stockés au grenier à l'abri de la lumière.

Pour cette étude 64 accessions/lots de plantes à tubercules ont été sélectionnés afin de représenter un éventail complet de variations (genre, espèce et couleur) (Tableau 31 et Tableau 32).

Tableau 31: données sur les tubercules sélectionnés.

	CODE ECHANTILLON	COULEUR DE LA CHAIR FRAICHE		CODE ECHANTILLON	COULEUR DE LA CHAIR FRAICHE
1	Da 1	Blanche	33	De 1	Blanche
2	Da 2	Blanche	34	De 2	Blanche
3	Da 3	Blanche	35	De 3	Blanche
4	Da 4	Rouge	36	Dn 1	Blanche
5	Da 5	Rouge	37	Dn 2	Blanche
6	Da 6	Rouge	38	Dn 3	Blanche
7	Da 7	Blanche veinée	29	Dp 1	Blanche
8	Da 8	Blanche veinée	40	Dp 2	Blanche
9	Da 9	Blanche veinée	41	Dp 3	Blanche
10	Da 10	Blanche veinée	42	Dtra 1	Blanche
11	Da 11	Blanche veinée	43	Dtra 2	Blanche
12	Da 12	Blanche	44	Dtra 3	Blanche
13	Da 13	Orange	45	Dtri 1	Blanche
14	Da 14	Blanche	46	Dtri 2	Blanche
15	Db 1	Jaune	47	Dtri 3	Blanche
16	Db 2	Jaune	48	Ce-VU 1	Blanche
17	Db 3	Jaune	49	Ce-MY 1	Blanche
18	Db 4	Violette/rouge	50	Ce-ID 1	Blanche
19	Db 5	Violette/rouge	51	Ce-TH 1	Blanche
20	Db 6	Violette/rouge	52	Ce-VN 1	Blanche
21	Db 7	Jaune veinée	53	Ce-SM 1	Blanche
22	Db 8	Jaune veinée	54	Xs 1	Blanche
23	Dc 1	Blanche	55	Xs 2	Blanche
24	Dc 2	Blanche	56	Xs 3	Blanche
25	Dc 3	Blanche	57	Am 1	Blanche

	CODE ECHANTILLON	COULEUR DE LA CHAIR FRAICHE		CODE ECHANTILLON	COULEUR DE LA CHAIR FRAICHE
26	Dc 4	Blanche	58	Am 2	Blanche
27	Dc 5	Blanche	59	Ib 1	Blanche
28	Dc 6	Jaune	60	Ib 2	Blanche
29	Dc 7	Jaune	61	Ib 3	Blanche
30	Dc 8	Jaune	62	Me 1	Blanche
31	Dd 1	Jaune	63	Me 2	Blanche
32	Dd 2	Jaune	64	Me 3	Blanche

Da : *D. alata*, Db : *D. bulbifera*, Dc : *D. cayenensis-rotundata*, Dd : *D. dumetorum*, De : *D. esculenta*, Dn : *D. nummularia*, Dp : *D. pentaphylla*, Dtra : *D. transversa*, Dtri : *D. trifida*,
 Ce : *C. esculenta*, Xs : *X. sagittifolia*, Ib : *I. batatas*, Me : *M. esculenta*, Am : *A. macrorrhiza*.
 VU : Vanouatou, MY : Malaisie, ID : Indonésie, TH : Thaïlande, VN : Vietnam, SM : Samoa

En ce qui concerne les couleurs des tubercules, différentes nuances et d'intensité ont permis de classer les tubercules en 13 groupes (Tableau 32).

Tableau 32: classification des tubercules suivant leur couleur.

N° CLASSE	COULEUR	ECHANTILLONS
1	Gris clair → gris	Dc 6, Dc 8, Dtri 2
2	Beige → marron	Da 13, Db 5, Dn 1
3	Beige clair avec un ton jaune clair → beige avec un ton jaune	Dc 3, Dc 4, Dtri 1, Ib 1, Ib 3
4	Beige avec un ton orangé → beige	Da 12, Dn 2, Dn 3, Dp 3, Dtra 1
5	Jaune pâle → jaune clair	De 1, Dp 2, Ce-VN, Ce-ID, Ce-TH, Me 1, Me 2
6	Jaune mate → jaune	Da 1, Dc 1, Dd 1, De 3, Ce-SM, Ce-VU, Am 2, Me 1
7	Jaune mate avec un ton beige clair → jaune	Da 2, Da 3, Da 5, Da 14, Dc 2, De 2, Dp 1, D tra 3, Xs 1
8	Jaune clair → jaune	Dc 7, Dd 2, Ce-MY, Ib 2
9	Orange avec un ton jaune	Db 2
10	Jaune/beige avec un ton rosé	Da 9, Dtra 2, Dtri 3, Xs 2, Am 1
11	Orange clair → orange	Db 1, Db 3, Db 7, Db 8
12	Rose → violet	Da 4, Da 6, Da 7, Da 8, Da 10, Xs 3
13	Rouge brique pâle → Rouge brique	Da 11, Db 4, Dc 6

3.2.2.2. Préparation et extraction des échantillons

Avant analyse les échantillons ont été traités de deux façons. L'optimisation de la méthode HPTLC, se faisant en partie en France, les échantillons devaient être secs afin de pouvoir les exporter. C'est pourquoi le protocole de séchage développé s'est basé sur celui mise en place par

Champagne et *al.*, à savoir après avoir pelé et râpé les échantillons, 200 g de matières sèches sont lyophilisées (Figure 77) [200].



Figure 77: échantillons lyophilisés prêt à être exportés.

La lyophilisation étant chronophage (deux jours), un second protocole a dû être développé afin que l'équipe sur place puisse préparer un maximum d'échantillons en un temps minimum. Pour cela les échantillons ont été pelés puis râpés avant d'être congelés (Figure 78). Une fois congelés, les échantillons sont broyés à l'aide d'un broyeur puis replacés au congélateur avant leur extraction pour l'analyse.



Figure 78: échantillons râpés et congelés

3.2.3. Extraction des tubercules avant analyse

L'objectif étant de développer des méthodes d'analyse générales, il a été décidé d'extraire les tubercules avec un mélange peu sélectif vis-à-vis des métabolites présents dans nos tubercules. Lors du développement de la préparation d'échantillon effectuée en France, le mélange méthanol, eau (8: 2, v/v) avait été sélectionné. Afin d'augmenter la polarité, le mélange méthanol, eau avec comme proportion 7:3 (v/v) a été choisi. De plus, l'extraction choisie devant être la même au Vanouatou et en France, le choix a été limité aux moyens du laboratoire vanouatais, et donc l'extraction par sonication (30 min) a été choisie car la verrerie pour la l'extraction à reflux n'était pas disponible.

Pour les échantillons lyophilisés, 1 g de poudre a été placé dans un tube centrifuge et extrait avec 10 mL de la solution méthanolique à 70 %, alors que pour les échantillons broyés et congelés, 2 g ont été prélevés et extraits avec 10 mL de solution méthanolique à 70 %. Dans les deux cas, les tubes ont ensuite été placés dans un bain à ultrasons pendant 30 min, puis centrifugées pendant 10 min. Le surnageant a alors été prélevé pour l'analyse.

Les extraits obtenus ont ensuite été analysés en HPTLC pour répondre aux différents objectifs cités dans l'introduction : la discrimination inter espèces et intra espèces.

3.2.4. Développement de méthodes de discrimination par HPTLC

Les systèmes de culture du Vanouatou abritent de nombreuses variétés de plantes à tubercule : ignames, taros, patate douces, manioc. Lorsque ces plantes se présentent sous forme de poudre, il est difficile de les différencier, d'où la nécessité de développer une méthode par HPTLC.

La méthode développée précédemment dans les locaux de Grasse a donc été testée avec les échantillons du Vanouatou. Cependant les espèces d'ignames présentes au Vanouatou ne sont pas les mêmes que celles précédemment testées. En effet, en France les espèces analysées étaient : *D. compositae*, *D. villosa*, *D. septemloba*, *D. hypoglauca*, *D. nipponica* et *D. bulbifera*. Alors que les échantillons du Vanouatou correspondent à *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis-rotundata*, *D. dumetorum*, *D. esculenta*, *D. nummularia*, *D. pentaphylla*, *D. transversa*, et *D. trifida*. Seuls les échantillons de *D. bulbifera* sont communs aux deux tests.

Les résultats du test réalisé avec la même méthode, décrite dans le Tableau 28, se sont avérés différents de ceux obtenus précédemment (Figure 79). En effet, le contrôle de l'humidité n'étant pas disponible dans les locaux du CIRAD, les valeurs de R_F ne sont pas comparables. De plus, les préparations d'échantillon ont dû être modifiées (macération vs sonication) car la verrerie utilisée pour la macération à reflux n'était pas disponible. Ces changements ont pu avoir une influence sur les différences observées.

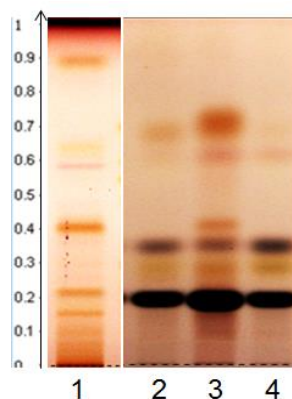


Figure 79: comparaison des profils HPTLC sous lumière blanche (WT) obtenus après révélation à l'anisaldéhyde-acide sulfurique pour les échantillons de *D. bulbifera*. 1 : ancien profil (CS078), 2 : Db1, 3 : Db4, 4 : Db7.

En regardant de plus près échantillons de *Dioscorea*, avec cette méthode, les profils HPTLC des échantillons ne semblent pas posséder de marqueurs caractéristiques propres à chaque espèce (Figure 80).

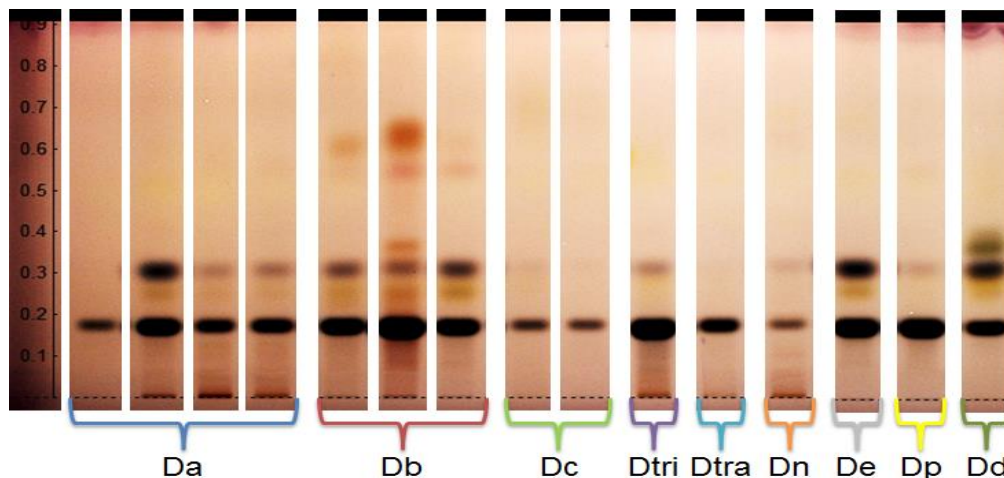


Figure 80: comparaison des profils HPTLC sous lumière blanche (WT) obtenus après révélation à l'Anisaldéhyde-acide sulfurique pour les échantillons de *Dioscorea*. Da : *D. alata*, Db : *D. bulbifera*, Dc : *D. cayenensis-rotundata*, Dd : *D. dumetorum*, De : *D. esculenta*, Dn : *D. nummularia*, Dp : *D. pentaphylla*, Dtra : *D. transversa*, Dtri : *D. Trifida*.

Suite à ce test, il a donc été décidé de changer la phase mobile et le révélateur. Avant de commencer les analyses, il est nécessaire de savoir sur quelle famille de composés l'analyse HPTLC sera focalisée. Dans le cadre du projet Végé-culture, des études déjà réalisées ont permis de mettre en évidence certains famille de composés : flavonol, flavanol, anthocyanes... [199, 200]. La première phase mobile testée cible la détection des flavonoïdes. Lors du développement de cette méthode HPTLC, la sélection des solvants a dû être réalisée en tenant compte des difficultés d'approvisionnement en solvant du pays. En effet, le Vanouatou étant éloigné de tout continent, il souffre de difficultés pour le réapprovisionnement de certains solvants. La première phase mobile testée est constituée de formate d'éthyle, méthanol, acide acétique, acide formique, eau (30 : 1 : 2 : 1 : 3) (v/ v/ v/ v/ v), suivie d'une révélation avec le réactif de Neu [15]. Les résultats ont montré que cette nouvelle phase mobile permettait d'avoir une bonne réparation des bandes, notamment en regardant le profil de l'échantillon de *D. bulbifera* dans lequel on retrouve les deux marqueurs qui lui semblaient caractéristiques (bande 2, R_f 0,59 et R_f 0,64, Figure 81). En ce qui concerne la différenciation des autres espèces, le profil de l'échantillon de *D. trifida* possède une bande de fluorescence jaune-orange (bande 4, R_f 0,32).

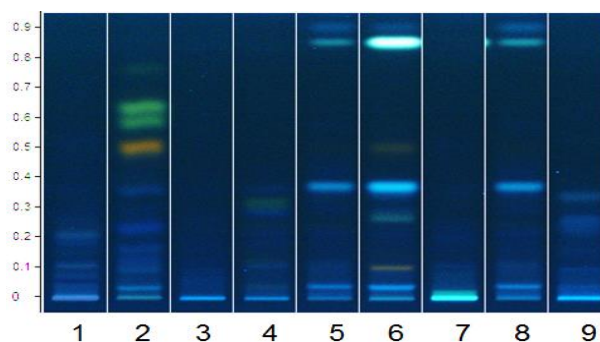


Figure 81 : comparaison des profils HPTLC sous UV à 366 nm obtenus après révélation au réactif de Neu pour les échantillons de *Dioscorea*. 1 : Da, 2 : Db, 3 : Dc, 4 : Dtri, 5 : Dtra, 6 : Dn, 7 :De, 8 : Dp, 9 : Dd.

Afin de vérifier la présence de marqueur caractéristique pour les autres espèces, la même phase mobile a été testée combinée à un autre révélateur : l'anisaldéhyde-acide sulfurique. La Figure 82 nous permet d'observer des marqueurs intéressants pour l'échantillon de *D. cayenensis-rotundata* (bande 3, R_F 0,20 et R_F 0,25), *D. dumetorum* (bande 9, R_F 0,46 et R_F 0,74).

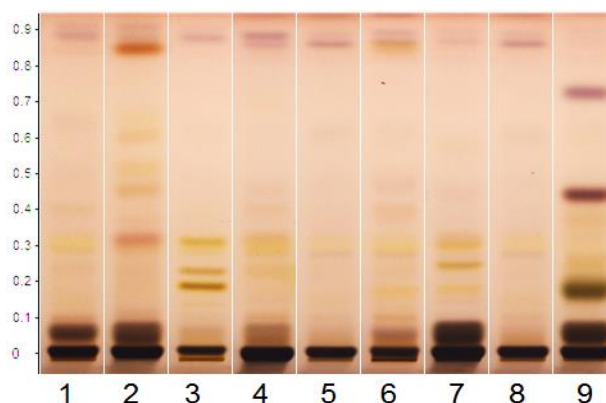


Figure 82: comparaison des profils HPTLC sous lumière blanche (WT) obtenus après révélation à l'anisaldéhyde-acide sulfurique pour les échantillons de *Dioscorea*. 1 : Da, 2 : Db, 3 : Dc, 4 : Dtri, 5 :Dtra, 6 : Dn, 7 :De, 8 : Dp, 9 : Dd.

Sur cette même plaque, un échantillon de chacun des ignames a été testé avec les échantillons de taros, de faux taros, et de patates douces. La Figure 83 nous indique que l'échantillon de patate douce possède un profil HPTLC ayant de fortes ressemblances avec le profil obtenu pour l'échantillon de *D. pentaphylla* (bandes 1 et 10). De plus, sous UV après révélation au réactif de Neu, l'échantillon de taro (bande 2) possède un profil HPTLC significativement différents des autres.

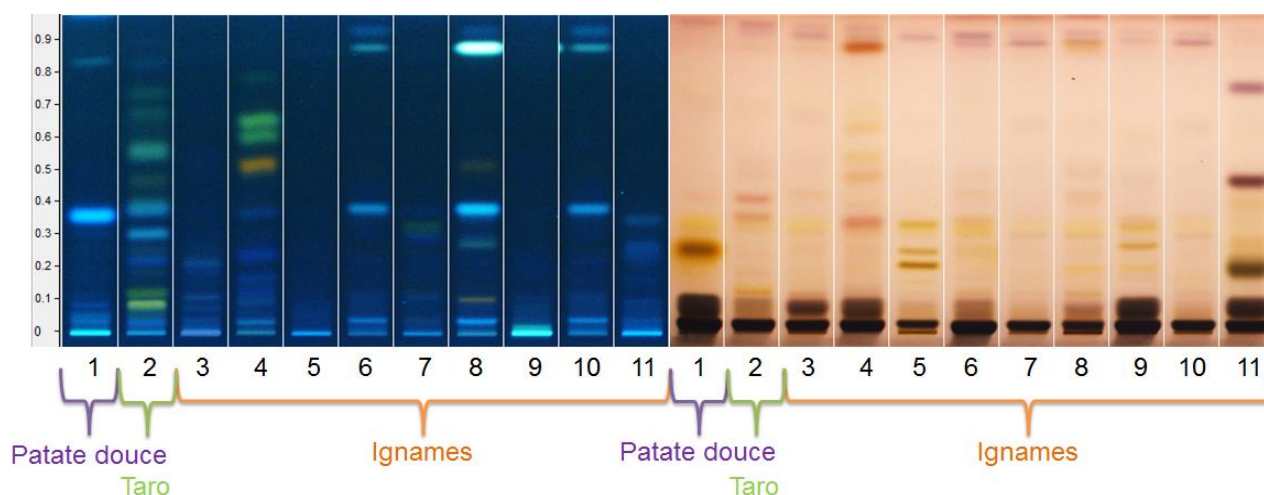


Figure 83: comparaison des profils HPTLC obtenus après révélation : au réactif de Neu sous UV à 366 nm (gauche), à l'Anisaldéhyde-acide sulfurique sous lumière blanche (WT) (droite). 1 : Ib3, 2 : Ce-MY 1, 3: Da, 4 : Db, 5 : Dc, 6 : Dtri, 7 :Dtra, 8 : Dn, 9 :De, 10 : Dp, 11 : Dd

Pour la suite des analyses, une modification dans la composition de la phase mobile a dû être effectuée. En effet, la présence du formate d'éthyle est problématique dû à la difficulté d'approvisionnement en solvant expliqué précédemment. Il a donc été décidé de le remplacer par un solvant ayant la même sélectivité : l'acétate d'éthyle. Cette nouvelle phase mobile a été testée avec les 14 échantillons de *D. alata* récoltés. Les résultats présentent des profils similaires à ceux obtenus précédemment, avec une meilleur séparation en bas de plaque dû à la différence de force éluante entre l'acétate d'éthyle et le formate d'éthyle (Figure 84).

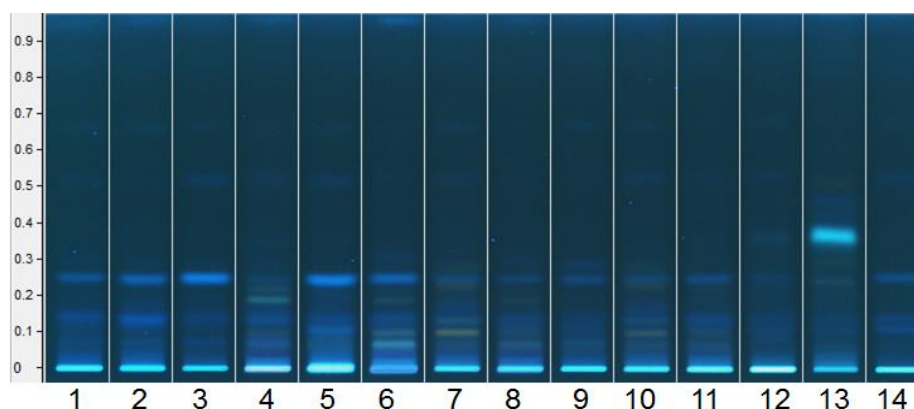


Figure 84 : comparaison des profils HPTLC obtenus après révélation au réactif de Neu sous UV à 366 nm des échantillons de *D. alata*. 1 : Da 1, 2: Da 2, 3: Da 3, 4 : Da 4, 5 : Da 5, 6 : Da 6, 7 : Da 7, 8 : Da 8, 9 : Da 9, 10 : Da 10, 11 : Da 11, 12: Da 12, 13: Da 13, 14: Da 14.

De plus, la comparaison entre tous les échantillons de *D. alata* récoltés montre la variabilité naturelle au sein d'une même espèce. En effet, comme décrit dans le Tableau 32, les 14 échantillons de *D. alata* ne possèdent pas tous la même couleur. Cette différence de couleur est également visible sur les profils HPTLC en bas de plaque (Figure 85).

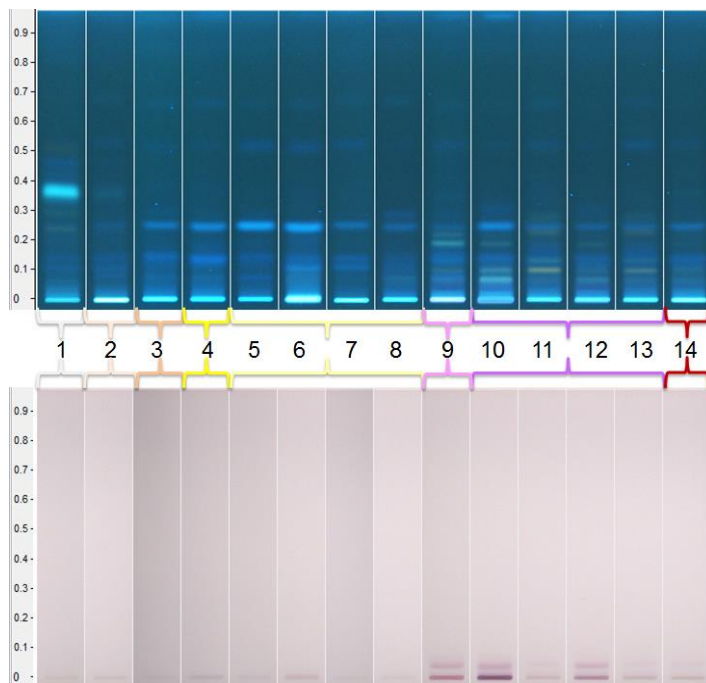


Figure 85 : comparaison des profils HPTLC des échantillons de *D. alata* classés en fonction de la couleur de leur chair. Image après révélation au réactif de Neu sous UV à 366 nm (en haut), et image avant révélation sous lumière blanche (WT) (en bas).

Bande 1 : gris clair ---> gris, 2: beige ---> marron, 3: beige avec un ton orangé, 4 : jaune mate ---> jaune, 5-8 : jaune mate avec un ton beige ---> jaune, 9 : jaune/beige avec un ton rosé, 10 : rose ---> violet, 14: rouge brique.

Suite aux premiers tests réalisés au Vanouatou, la phase mobile composée d'un mélange d'acétate d'éthyle, méthanol, acide acétique, acide formique, eau (30 : 1 : 2 : 1 : 3) (v/ v/ v/ v/ v), qui avait donné le meilleur résultat a été sélectionnée et testée en France au retour du Vanouatou. Cependant les conditions d'humidité (75 % vs 40 %) et de température (40 °C vs 25 °C) entre le Vanouatou et la France étant différentes, les résultats obtenus sur la Figure 86 le sont également. La méthode utilisée en France n'utilise également pas la même distance de migration (7 cm vs 8 cm), l'humidité est contrôlée entre 33-36 %, et une phase de saturation de 20 min avec la phase mobile est ajoutée. Toutes ces modifications permettent d'obtenir des profils HPTLC moins diffus.

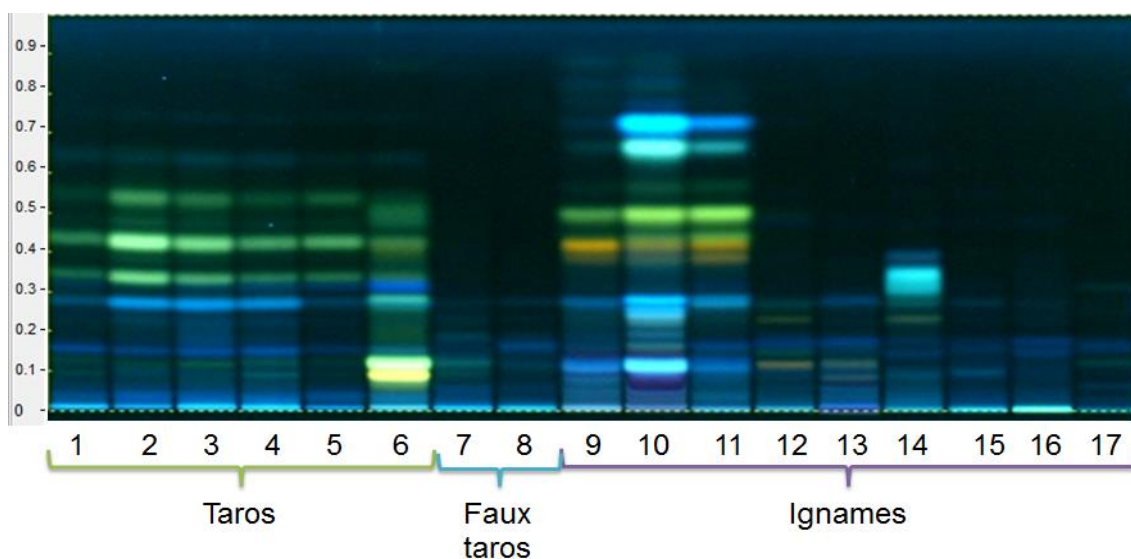


Figure 86 : profils HPTLC (UV 366 nm) des échantillons de taros, de faux-taros et d'igname après révélation au réactif de Neu. 1-6: taros ; 7-8 : faux taros ; 9-17 : ignames.

En regardant de plus près les échantillons d'ignames, les *D. bulbifera* semblent toujours se différencier des autres espèces d'ignames par la présence des 2 marqueurs déjà mis en évidence précédemment (flèches orange) (Figure 87).

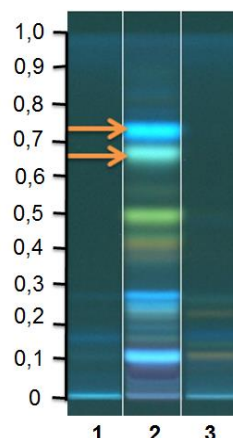


Figure 87: profils HPTLC sous UV 366 nm après révélation avec le réactif de Neu. 1 : *D. cayanensis* (Dc), 2 : *D. bulbifera* (Db), 3 : *D. alata* (Da).

Les couleurs bleues de ces deux zones avant et après révélations avec le réactif de Neu peuvent révéler la présence de dérivés polyphénoliques comme par exemple, des acides phénolique, ou encores stilbènes, ce qui soutiendrait l'hypothèse de la présence du déméthylbatatasin IV et du dihydroresveratrol déjà isolés dans des bubilles et tubercules de *D. bulbifera* et *D. dumetorum* infectés par du *Botryodiplodia theobromae* [194]. Cependant, en regardant de plus près la Figure 83, l'application n°11 qui correspond au profil HPTLC d'un échantillon de *D. dumetorum* ne possède pas ces deux marqueurs. Cette absence de marqueur remet en doute l'identification de ces deux marqueurs, ou bien induit l'hypothèse d'une infection par du *Botryodiplodia theobromae* des bubilles de nos *D. bulbifera*.

De la même façon, la méthode sélectionnée a permis de détecter la présence de marqueurs intéressants (flèches orange, Figure 88) qui semblent être caractéristique des échantillons de taros et qui permettraient donc de les discriminer des ignames. La couleur verte de ces zones après révélation au réactif de Neu indique la présence de flavones possédant un groupe OH sur le cycle B, ou bien méthoxylés.

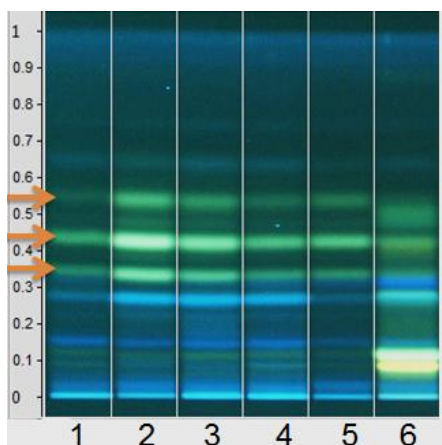


Figure 88: profils HPTLC (UV 366 nm) de 6 échantillons de taros après révélation au réactif de Neu.

Pour la suite de l'étude il a donc été décidé de fractionner un extrait de *D. bulbifera* (Db 6) et un extrait de taro (Ce-MY 1).

3.2.5. Fractionnement des échantillons contenant les zones d'intérêts

Les deux extraits ont été fractionnés par CPC en utilisant la même méthode. Le fractionnement est effectué en mode ascendant avec comme système de solvant hexane, acétate d'éthyle, méthanol, eau (1 :1 :1 :1) (v/ v/ v/ v) (ARIZONA N) utilisant la phase supérieure comme phase mobile. Pour la phase d'équilibre, un flux 10 mL/min est appliqué à la phase stationnaire pendant 12 min à une vitesse de rotation de 2000 rpm, alors que celui de la phase mobile est de 6 mL/min à 2000 rpm pendant 12 min. Pour la phase d'éluion, le débit de la phase mobile est de 6 mL/min, la vitesse de rotation de 2000 rpm et 5 ml de volume de collecte, pendant une durée de 30 min, pour finir par une extrusion avec la phase stationnaire à un débit de 10 mL/min. La détection UV est réglée à 240 et 355 nm, et le scan UV de 200 à 600 nm.

3.2.5.1. Fractionnement de Db 6

L'extrait de *D. bulbifera* (Db 6) a donné 14 fractions (DB6-CPC1-F1-14, Figure 89) qui ont été ensuite analysées par HPTLC.

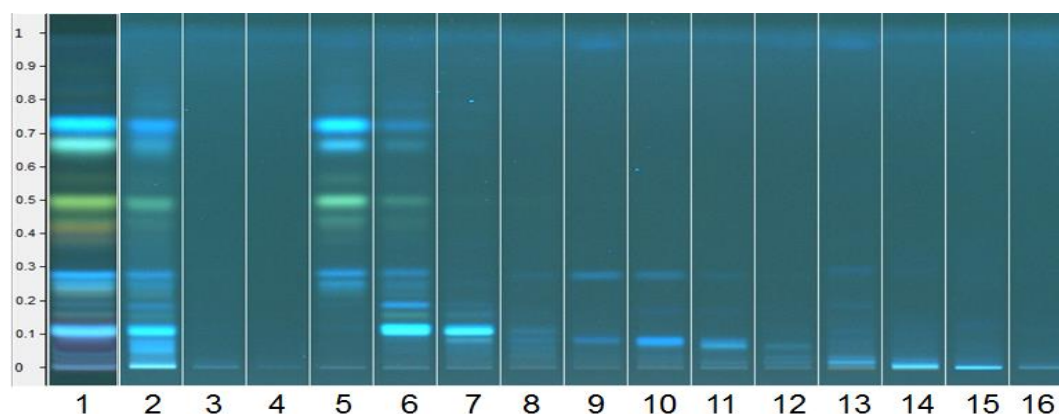


Figure 89 : profils HPTLC des 14 fractions de DB6-CPC1-F1-14 (bandes 3-16) et comparaison avec l'extrait brut après (bande 1) et avant révélation au réactif de Neu (bande 2).

La fraction DB6-CPC1-F3 (bande 5, Figure 89) a été sélectionnée et de nouveau fractionnée en 4 sous-fractions notées DB6-CPC1-F3-zone 1-4 (Figure 90). Les zones d'intérêts se trouvent dans la fraction DB6-CPC1-F3-zone 1 (bande 3).

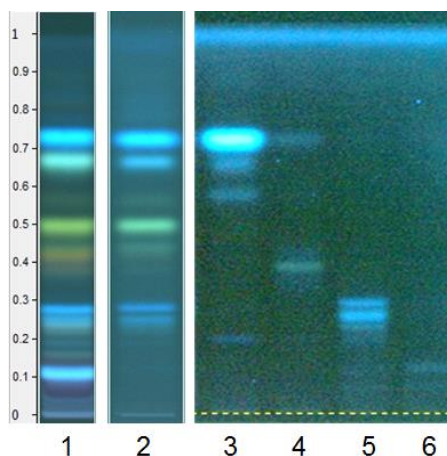


Figure 90 : profils HPTLC (UV 366 nm) des 4 sous-fractions de DB6-CPC1-F3-zone 1-4 (bandes 3-6) et comparaison avec DB6 après (bande 1) et avec DB6-CPC1-F3 avant révélation au réactif de Neu (bande 2)

3.2.5.2. Fractionnement de Ce-MY 1

L'extrait de taro *C. esculenta* (CE-MY 1) a subi le même fractionnement et a donné 14 fractions (Ce-MY 1-CPC1-F1-14, Figure 91) qui ont été ensuite analysées par HPTLC. Les zones d'intérêts se trouvent dans les fractions Ce-MY 1-CPC1-F10-F11 (bande 12-13).

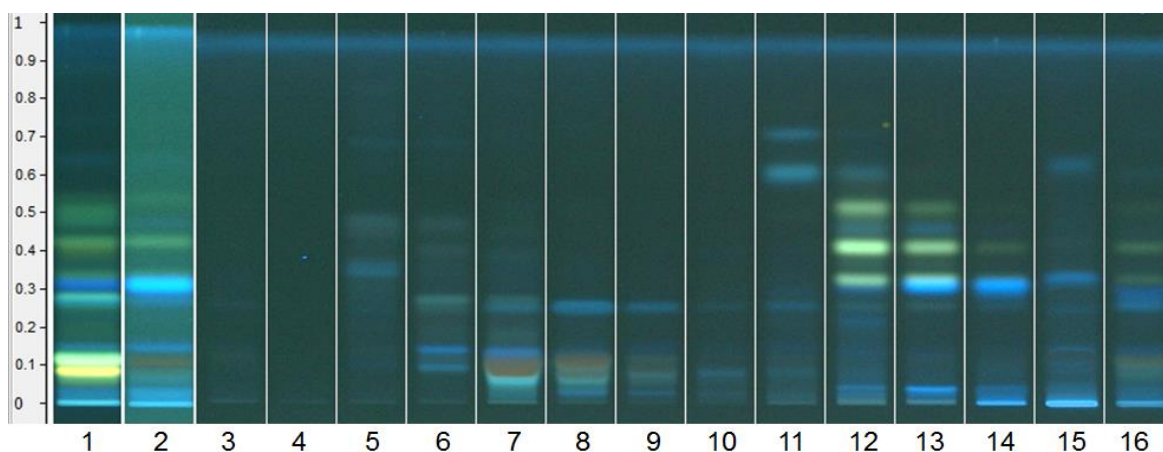


Figure 91 : profils HPTLC des 14 fractions de (Ce-MY 1-CPC1-F1-14 (bandes 3-16) et comparaison avec l'extrait brut après (bande 1) et avant révélation au réactif de Neu (bande 2).

La durée de la thèse touchant à sa fin, la suite des analyses n'a pas pu être réalisée. La confirmation des marqueurs comme marqueur caractéristique de chaque espèce n'a pas pu être confirmée, de même pour leur identification.

3.2.6. Conclusion et perspective

Le travail effectué lors de ce projet a permis de développer une méthode d'analyse HPTLC et d'en montrer l'apport dans l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. De plus, afin de répondre aux exigences de l'arrêté plantes concernant la différenciation des extraits de *Dioscorea oppositae* et *villosa*, des essais ont été réalisés sur d'autres espèces du genre car jusqu'à la fin de l'étude nous n'avons pas pu obtenir de référence botanique de ces deux espèces. Cette première difficulté nous amène à nous demander pourquoi seules ces deux espèces sont mentionnées dans l'arrêté alors que bien d'autres sont disponibles sur le marché. De plus, les premiers résultats obtenus ont démontré certaines difficultés qui ne sont pas abordées dans l'arrêté plantes. En effet, parmi les 8 espèces analysées seuls les profils HPTLC des échantillons de *D. bulbifera* ont permis de mettre en évidence la présence de deux marqueurs propre à cette espèce. Ce qui nous amène à nous demander ce qu'il en est pour toutes les espèces connues.

L'arrêté plantes mentionne de valider l'identité de ces espèces mais la distinction entre espèces du même genre semble à ce jour complexe. En ce qui concerne leur différenciation avec les autres plantes à tubercules, l'analyse HPTLC a permis de distinguer les échantillons de taros, mais pas des faux taros. En effet, les échantillons de taros se caractérisent par la présence de trois zones caractéristiques. Afin d'identifier ces 5 marqueurs, les extraits ont été fractionnés par CPC mais l'étape d'isolement et d'identification n'ont pas pu être terminées avant la fin de la thèse (Figure 92).

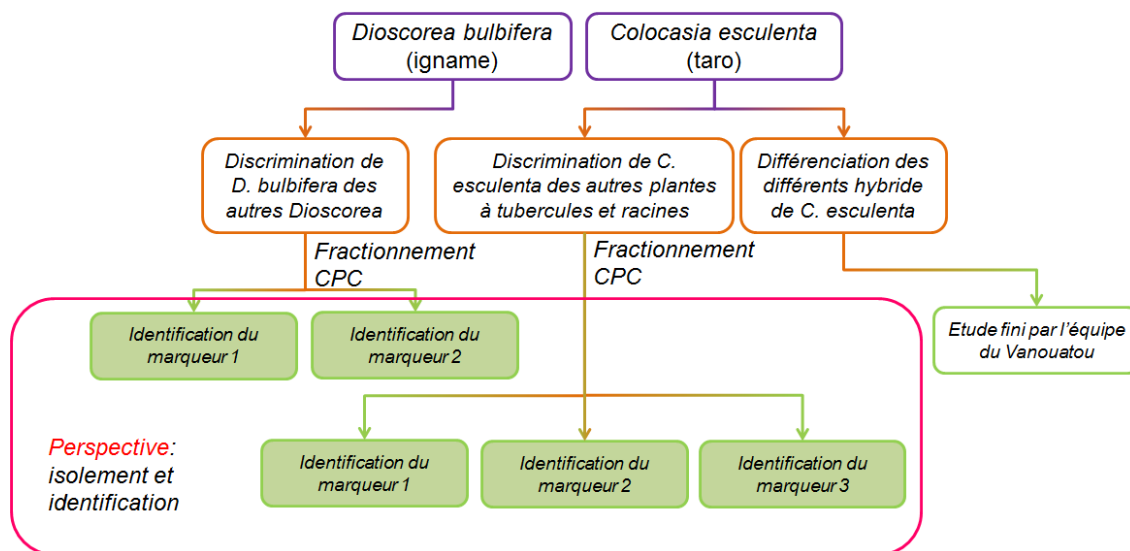


Figure 92 : résumé du travail réalisé et des perspectives.

Afin d'identifier ces marqueurs, les zones d'intérêt pourraient être isolées en HPTLC semi-préparative et les spectres UV et de masse pourraient être mesurés.

De plus, les profils HPTLC obtenus pour les échantillons de taros ont particulièrement attiré l'attention de l'équipe du Vanouatou qui a poursuivi les analyses sur 1800 échantillons de taros. Les résultats obtenus suite au screening des flavonoïdes, avec la préparation d'échantillon et la

méthode HPTLC développée pendant cette étude, ont fourni des informations intéressantes pour le programme d'amélioration génétique et ont été publiés par l'équipe du CIRAD en 2015 [201].

La deuxième partie du déplacement concernait l'étude du kava dont la qualité des extraits a été mise en doute suite à des cas d'hépatites [202]. Afin de pouvoir développer une méthode HPTLC répondant à la problématique réglementaire, une rapide étude bibliographique sur le kava et ses composés a été réalisée. Basée sur les précédentes études réalisées en HPLC, une méthode HPTLC a été développée afin de pouvoir contrôler de façon rapide et simple, des différentes qualités d'extraits disponibles.

3.3. Contrôle des qualités des extraits de kava

3.3.1. Généralités sur le kava

Le nom kava se réfère tout d'abord à la plante *Piper methysticum* Forst. (f) communément appelé poivre enivrant originaire des îles du Pacifique. Le kava renvoie également à la boisson éponyme du Pacifique, extraite à partir des racines et des souches de cette plante (Tableau 33) [202, 203]. Il s'agit d'un arbuste de la famille des Pipéracées qui peut mesurer entre un et quatre mètres de hauteur. Il possède des racines qui peuvent atteindre deux mètres de long et peser entre cinq et cinquante kilos [204]. Il existe au Vanouatou jusqu'à 80 cultivars différents, 7 sur les îles Tonga, 12 au Fidji, 5 sur Samoa et 11 à Hawaï [203]. Les racines sont récoltées en moyenne au bout 2 à 4 ans lorsque la teneur en composé actifs y est stable [203].

Tableau 33 : classification botanique du *Piper methysticum*.

Ordre	<i>Piperales</i>
Famille	<i>Piperaceae</i>
Genre	<i>Piper</i>
Espèce	<i>Piper methysticum</i>



Figure 93: racines de kava.

La méthode traditionnelle de préparation du kava consiste à récolter les racines fraîches puis elles sont débitées en petit morceaux (Figure 93), nettoyées et broyées. Le produit ainsi obtenu est malaxé avec de l'eau, puis déposé et enveloppé dans un filtre fait avec le tissu foliaire du cocotier. Le filtre est pressé et le liquide qui s'écoule est récupéré et lavé à nouveau avec un peu d'eau claire pour enfin être consommé [204, 205].

En tant que boisson, le kava est aussi bien une boisson conviviale que rituelle. En médecine traditionnelle, le kava est connu pour ses propriétés diurétiques, analgésiques, spasmolytiques en

fonction des variétés du kava. Dans l'industrie du nutraceutique, le kava est principalement utilisé pour traiter l'anxiété [206, 207].

3.3.2. Composition chimique

Les racines de kava sont constituées d'une résine qui contient les substances actives appelées kavalactones responsables de ses propriétés physiologique. 19 kavalactones 3 dihydrochalcones (flavokavaine A, B et C) et 8 autres composés de diverses familles chimiques ont aussi été identifiés dans les extraits de kava [208].

Parmi tous ces composés, 6 kavalactones représentent jusqu'à 96 % de l'extrait : déméthoxyyangonine (DMY) ; dihydrokavaine (DHK) ; yangonine (Y) ; kavaine (K) ; dihydrométhysticine (DHM) ; méthysticine (M) (Figure 94, Tableau 34) [209, 210].

Tableau 34 : composition chimique des extraits de kava [21,27].

NOMS DES COMPOSES	
7,8-Dihydrokavaine	11,12-Dimethoxydihydrokavaine
Kavaine	11-Methoxy-12-hydroxydehydrokavaine
Dihydrométhysticine	5,6-Dehydromethysticine
Desméthoxyyangonine	Flavokavaine B
5,6,7,8-Tétrahydroyangonine	Flavokavaine C
Dihydro-5,6-déhydrokavaine	Flavokavaine A
Yangonine	Cinnamate de bornyle
11-Hydroxyyangonine	Acide 8,11-Octadecadienoïque -méthyle ester
10-Methoxyyangonine	Pinostrobin chalcone
Hydroxykavaine	7-Diméthoxyflavanone-5-hydroxy-40
7,8-Dihydroyangonine	5,7-(OH) ₂ -40-one-6,8-diméthylflavanone
7,8-Dihydro-5-hydroxykavaine	5,7- Diméthoxyflavanone
5,6-Dihydroyangonine	2,5,8-Triméthyl-1-naphthol
11-Hydroxy-12-methoxydihydrokavaine	5-Méthyl-1-phenylhexen-3-yn-5-ol
11-Methoxyyangonine	Méthysticine

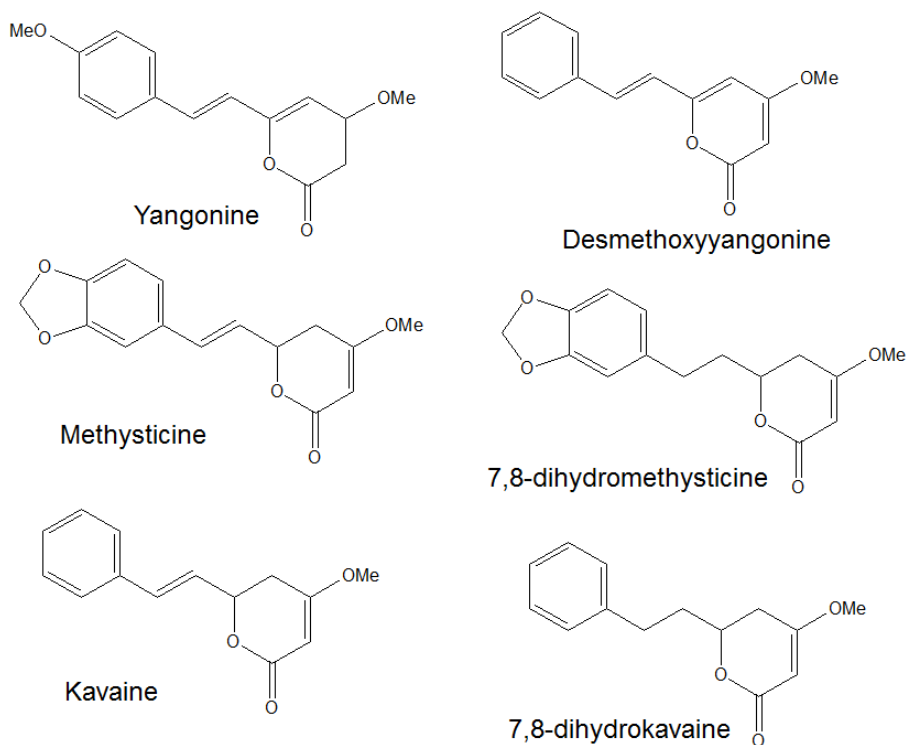


Figure 94 : structure des principales kavalactones.

A partir de ces 6 kavalactones, 6 chimiotypes ont été identifiés et codés [205, 206]. Le chimiotype le plus recherché est celui contenant une forte teneur en kavaine (K) et une faible teneur en dihydrométhysticine (DHM). Le chimiotype le moins recherché est celui possédant une forte teneur en DHM (Tableau 35) [203, 205].

Les flavokavaines ont été identifiés comme possédant des effets toxiques, et en particulier la flavokavaine B (FKB) qui est considérée comme une cause possible d'hépatotoxicité (Figure 95) [211, 212].

Tableau 35 : chimiotypes des différents kavas et leurs usages.

CHIMIOTYPE*	USAGES
2,4,6,5,3,1	Boisson conviviale consommée tous les jours
4,2,6,1,3,5	Boisson produisant un effet plaisant et ayant des effets physiologiques rapides et temporaires
2,6,4,5,3,1	Boisson à usage médicinal
2,5,6,4,3,1	Boisson ayant des effets physiologiques prononcés et pouvant durer plus de 12 heures
2,6,5,4,3,1	Boisson pour les rituels
6,4,3,2,5,1	Boisson à base de racines pas fraîches (Polynésie centrale, Fidji)

*correspondant aux teneurs relatives de chacun des composés, par ordre croissant.

1 : demethoxy-yangonine (DMY) ; 2 : Dihydrokavaine (DHK) ; 3 : yangonine (Y) ; 4 : kavaine (K) ; 5 : dihydromethysticine (DHM) ; 6 : methysticine (M)

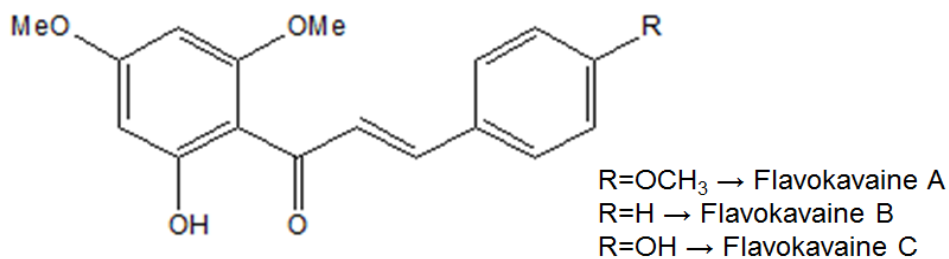


Figure 95 : structure des flavokavaines.

3.3.3. Problématique réglementaire

C'est en 1860 qu'un pharmacologue de la marine française, Georges Cuzent, révèle les propriétés anxiolytiques et relaxantes du kava. C'est ainsi qu'au début du XX^{ème} siècle le kava entre dans la pharmacopée anglaise, puis au Japon et en Finlande. Dans les années 1990, les exportations de kava en provenance des îles du pacifique Sud ont atteint leur niveau maximal, avec près de 8000 produits circulant sur le marché américain [204]. Mais en 2001, des cas d'hépatites surviennent en Allemagne. L'autorité sanitaire allemande, *Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte* (BfArM), a déclaré que des produits à base de kava de mauvaise qualité pourraient provoquer des réactions hépatotoxiques [202, 213, 214]. Suite à cela, une interdiction sur la commercialisation du kava est décrétée dans la plupart des pays européens (Allemagne, Grande-Bretagne et France) [215, 216]. Seuls les Etats-Unis et le pays de Galles autorisent la consommation de kava [204, 209]. Contrairement à la métropole, le gouvernement de la Nouvelle-Calédonie a approuvé en 2012 la réglementation des établissements organisant la consommation du kava dans les nakamals [217]. Cette interdiction a causé un préjudice estimé à environ 1,2 milliard de dollars à l'industrie européenne [218, 219]. Les restrictions commerciales actuelles ont également des répercussions économiques pour les producteurs et les commerçants dans les îles des Fidji, Samoa, Tonga et Vanouatou. L'autorité sanitaire allemande a cependant reconnu ne pas savoir si les kavalactones étaient responsables des effets indésirables, ou bien d'autres composés, ce qui explique pourquoi au Vanouatou, même si la consommation de cette boisson traditionnelle est quotidienne, et implique donc une ingestion de kavalactones qui dépasse largement la quantité quotidienne prise lors de la controverse allemande [220], ne provoque pas plus de dégâts [221-223].

En sachant qu'en fonction du cultivar, la teneur en kavalactones totale varie, le gouvernement du Vanouatou a, en 2002, identifié et classé les différents cultivars en quatre classes : cultivars dit « nobles », cultivars « médicinaux », cultivars « *tudei* » (deux jours en bichelamar†), ou « *two-day* » et les variétés « *Wichmannii* » [224]. Les cultivars dits « nobles » sont traditionnellement utilisés en tant que boisson. Les cultivars dits « médicinaux » sont connus pour leurs propriétés thérapeutiques [225]. Les cultivars appelés « deux jours » sont, eux, fortement déconseillés car

† Langue locale

leur effet dure deux ou trois jours [204]. Enfin les cultivars « *Wichmannii* », possèdent de forts effets physiologiques et ne sont jamais consommés quotidiennement [225].

Depuis cette polémique, des études s'efforcent de rétablir la crédibilité de cette plante, et c'est en 2003, qu'une étude réalisée sous l'égide de l'Union européenne démontre l'innocuité des racines de kava. Depuis 2005, des études sont menées afin de définir un label de qualité et ainsi discriminer le kava noble des autres. En 2011, Teschke et al. [225] proposent de mettre en place des spécifications standards démontrant la qualité de préparation des produits à base de kava (complément alimentaire, boissons...).

De plus, d'autres composés présents ont été identifiés et ont montrés des effets toxiques, notamment la flavokavaine B qui est considérée comme une cause possible d'hépatotoxicité [211, 212].

C'est dans le but de développer une méthode de contrôle rapide et simple qu'intervient cette partie.

3.3.4. Développement d'une méthode de contrôle de la qualité des extraits de kava

L'environnement réglementaire dans lequel se situe la consommation de produit contenant du kava, ou des extraits de kava, est un sujet qui a suscité l'attention de nombreux chercheurs depuis son interdiction en Allemagne en 2001. Depuis ce blocage commercial, les pays producteurs et exportateurs de kava ont mené des études et ont finalement montré qu'il n'y avait pas de lien entre une consommation quotidienne de kava, et une augmentation de cas d'hépatites. Malgré cela, le blocage commercial du kava ou extrait de kava reste mis en place dans la plupart des pays d'Europe. Cette étude est intervenue dans le but de compléter ces données et d'essayer de déterminer un indice de qualité du kava et ainsi sécuriser sa vente dans les pays autorisée comme par exemple aux Etats-Unis.

De nos jours, dans les méthodes d'identification, l'utilisation de marqueurs pour le contrôle qualité est une approche courante. Dans notre cas, la flavokavaine B étant déjà considérée comme une cause possible d'hépatotoxicité a été sélectionnée comme un de nos marqueurs, ainsi que les autres flavokavaines A et C. De la même façon les 6 principales kavalactones sont sélectionnées.

Les premiers tests développés ont consisté à optimiser la phase mobile afin d'obtenir une bonne séparation entre les 9 standards. Malgré tous nos essais, la visualisation sous UV à 254 nm n'a pas donnée une bonne séparation entre la kavaine et la yangonine, et entre la dihydrométhysticine et la dihydrokavaine, ce qui nous empêche d'utiliser le même codage qu'en HPLC. Néanmoins, la visualisation sous UV à 366 nm, permet une bonne séparation entre les flavokavaine A, B et C (FK) et les kavalactones yangonine et demethoxy-yangonine (KL). L'analyse de 172 échantillons de kava a permis, après un retraitement statistique, de révéler que les trois flavokavaines sont positivement et significativement corrélées entres elles. Il en est de

même pour la yangonine et demethoxy-yangonine. De plus les résultats ont montré que le ratio FK/KL permettait de distinguer les différentes qualités d'extrait de kava et plus particulièrement une distinction entre les kavas nobles et les kavas « *tudei* ».

3.3.5. Conclusion

La méthodologie développée en HPTLC a permis de créer une méthode de contrôle de la qualité des extraits de kava. Le ratio développé pourrait être utilisé comme une estimation de la qualité de l'extrait et ainsi sécuriser les exportations. De plus, cette méthode HPTLC s'adapte tout à fait aux difficultés d'approvisionnement en solvant du pays. En effet, le Vanouatou étant éloigné de tout continent, possède des difficultés pour le réapprovisionnement en solvant. C'est pourquoi la technique analytique choisie devait en être peu consommatrice, ce qui a été le cas car jusqu'à 20 échantillons ont été analysés sur une même plaque et n'ont nécessité que 10 mL pour le développement. De la même façon, le pays étant localisé dans l'hémisphère sud est soumis à de très forte chaleur combinée à un fort taux d'humidité ce qui nécessitait l'utilisation d'un matériel robuste.

Cette partie a été réalisée au Vanouatou et a fait l'objet d'une publication dans *Food Chemistry* en 2014 :

Article 4

Vincent Lebot, Thi Kieu Tiên Do, Laurent Legendre

Detection of flavokavins (A, B, C) in cultivars of kava (*Piper methysticum*) using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

Food chemistry, 151 (2014) 554– 560

Abstract

Kava (*Piper methysticum*) is used to prepare the traditional beverage of the Pacific islands. In Europe, kava-based products have been suspected to cause hepatotoxicity with flavokavin B (FKB) considered as a possible factor. The present study describes an HPTLC protocol for rapid screening of samples. The objectives are: to detect the presence of flavokavins in extracts and to compare the FKB levels in different cultivars. Overall 172 samples, originating from four cultivars groups (noble, medicinal, two- days and *wichmannii*), were analyzed (88 roots, 42 stumps and 42 basal stems). Results indicate that the ratio FKB/kavalactones is much higher in two-days (0.39) and *wichmannii* (0.32) cultivars compared to nobles (0.09) and medicinal kavas (0.10). For each cultivars group, the ratios flavokavins/kavalactones do not change significantly between roots, stumps or basal stems and among clones, indicating that these ratios are genetically controlled. This HPTLC protocol appears to have good accuracy and high sample throughput that makes it cost efficient for routine analysis. We discuss how this protocol could be used for quality control.

Keywords: Flavokavins, Kava, Kavalactones, HPTLC, Quality

1. Introduction

Kava, the traditional beverage of the Pacific Islands, is made by cold water extraction of the underground organs of the plant species *Piper methysticum* Forst. Kava is also used as raw material by western pharmaceutical and nutraceutical industries for the relaxing and anxiolytic properties of its active ingredients called kavalactones. The German health authority, BfArM, declared in 2001 that kava based preparations could cause hepatotoxic reactions (Rusmann, Lauterburg & Hebling, 2001) and these products were banned for trade in Germany, Great Britain and France (Campo, McNabb, Perel, Mazariegos, Hasegawa & Reyes, 2003). BfArM recognised, however, that it was not known whether kavalactones or other components were responsible for the adverse effects (BfArM, 2003).

In 1998, when exports from the South Pacific islands reached their highest level, kava was amongst the top-selling herbs in the U.S. It has been estimated that the ban on kava caused a damage of US\$ 1.2 billion to the European industry (Ernst, 2007). The present trade restrictions are also an economic disaster for the producers and traders in Fiji, Samoa, Tonga and Vanuatu but kava is still an important cash crop satisfying a growing local market. In the traditional beverage, the intake of kavalactones by far surpasses the daily amount ingested with German preparations (Teschke, Genthner & Wolff, 2009). Signs of liver toxicity would thus be expected to occur more frequently in the Pacific (Stevinson, Huntley & Ernst, 2002), but there is no evidence to suggest that kava is toxic in this region (Grace, 2003; Mills & Steinhoff, 2003; WHO, 2007).

The chemical composition of kava is complex and not less than 30 molecules have been identified from the roots, including nineteen kavalactones, three dihydrochalcones (flavokavins), and eight minor compounds. The two major determinants of kava quality are the chemotype and the total kavalactone content. The chemotype is determined by the relative proportion of the six major kavalactones: methysticin (M), dihydromethysticin (DHM), kavain (K), dihydrokavain (DHK), yangonin (Y) and desmethoxygangonin (DMY) (Lebot & Lévesque, 1996). The chemotype is responsible for the quality of the physiological effect, while the total kavalactones content determines its intensity. The chemotype is largely dependent on the cultivar and the organ of the plant used (roots, stumps or basal stems). The total kavalactones content also varies according to the cultivar, the organ, the age of the

plant and the environment (Siméoni & Lebot, 2002; Wang, Qu, Jun, Li & Bittenbender, 2013). In Vanuatu, noble cultivars used for daily drinking have a chemotype rich in K and its fast absorption causes a sudden relaxing effect. Cultivars rich in DHK and DHM produce nausea and are locally known as two-days (Lebot and Lévesque, 1989).

Before the European ban, processing companies applied an extraction process involving acetone that extracts kavalactones and other compounds including flavokavins A, B and C. Flavokavin A may have anticarcinogenic properties because of its growth inhibitory effect on bladder tumour cells in a mice model (Zi & Simoneau, 2005). Flavokavin B (FKB) has been considered as a possible cause for hepatotoxicity (Jhoo et al., 2006; Zhou et al., 2010). In vitro studies have shown that FKB derived from roots of the cultivar *Isa* from Papua New Guinea is cytotoxic to human hepatoma HepG2 cells with, however, effects yet to be elucidated (Jhoo et al., 2006). FKB was also present in ethanolic extracts of roots of the two-days cultivar *Palisi* from Vanuatu with a ten-fold higher amount compared to the noble cultivar *Ava La'au* from Samoa (DiSilvestro, Zhang, & DiSilvestro, 2007). In dried roots of an unknown cultivar from Vanuatu, analysis by gas-chromatography–mass spectrometry (GC–MS) showed for FKB peak areas of 0.1% and 0.5% for aqueous and acetonetic extracts respectively (Xuan et al., 2008).

In Vanuatu, the Kava Act has been passed into Parliament in December 2002 to regulate the use of the most suitable cultivars (Vanuatu Legislation., 2002). This law recognises 245 cultivars but only the 28 noble cultivars are authorised for export. The other 79 cultivars are considered as medicinal, 126 are classified as *twodays* and 12 as *wichmannii* and are unsuitable for daily consumption. It is, however, impossible to distinguish these cultivars when kava is chopped into sun dried pieces before export. Hence, quality standards are impossible to enforce without an efficient analytical method for the routine analysis of numerous samples (Teschke & Lebot, 2011). The 36th session of the *Codex Alimentarius* Commission noted the need to develop a regional standard and to address the gaps in the safety of the various products traded under the name “kava” (FAO/WHO, 2013).

Several protocols have been developed using gas chromatography (GC) or high performance liquid chromatography (HPLC) for the analysis and detection of kavalactones (Bilia, Scalise, Bergonzi, & Vincieri, 2004). Simultaneous HPLC-based detection of the six major kavalactones and the three flavokavins shows good accuracy (Meissner & Haberlein, 2005). However, because HPLC is an expensive piece of equipment that makes use of important volumes of solvents, Near Infra-Red Spectroscopy (NIRS) has been tested for routine analysis of numerous samples. Calibration equations have been developed for major kavalactones and total kavalactones content analysed by HPLC (Gaub, Roeseler, Roos, & Kovar, 2004; Gautz, Kaufusi, Jackson, Bittenbender, & Tang, 2006; Lasme, Davrieux, Montet, & Lebot, 2008) and GC (Wang, Qu, Jun, Bittenbender, & Li, 2010) but flavokavins were not quantified.

Thin layer chromatography (TLC) has been used to isolate the six major kavalactones (Young et al., 1966), to compare extracts (Loew & Franz, 2003), to concentrate the kavalactones and to reduce the amount of polymers (Schäfer & Winterhalter, 2005). Densitometry analysis was efficient to quantify kawain on silica gel plates but good results were obtained only when the solvent front attained a height of 18 cm after three hours of developing time (Janesczko et al., 2001). Hence, the technique is difficult to use for routine analysis. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) is now commonly used to screen numerous samples on a single plate for the qualitative and quantitative analysis of secondary metabolites in plant extracts (Boudesocque, Dorat, Pothier, Gueiffier & Enguehard-Gueiffier, 2013).

In the present paper, we describe an HPTLC protocol for the rapid screening of samples from different cultivars of kava. The objectives are:

- 1- to detect the presence of flavokavins in the extracts,
- 2- to compare the FK levels in different cultivars. We discuss how this protocol could be used for quality control and its practical implications for securing future markets for kava as a safe food.

2. Materials and methods

2.1. Kava cultivars

Root samples of 88 different accessions (corresponding to 72 distinct cultivars) were taken from 88 different plants grown in the germplasm collection of the Vanuatu Agricultural and Research and Technical Center (VARTC) on Santo Island (Table 1). These accessions were planted together in a common plot and were all mature plants over 5 years of age; 22 were nobles, 10 were medicinal, 47 were two-days and 9 were *wichmannii* cultivars. Eight accessions (clones) of the noble cultivar *Borogu* and eight clones of the *two-days* cultivar *Palisi*, were also analyzed to estimate intraclonal variation and confirm results between different plants. Roots, stumps, and basal stems were separated, washed, and cut into small cubic pieces of approximately 2 × 2 cm. Overall, 172 samples were prepared (88 roots, 42 stumps and 42 basal stems) and then dried at 60-80 °C until constant weight.

2.2. Samples preparation

Dry matter was ground in VARTC, Santo, using a Forplex F00 1218 hammer mill (Boulogne, France) into a kava powder with <2 mm particle size. Powder samples were then sent to Food Processing Lab (Department of Trade, Port-Vila, Vanuatu) and stored at room temperature before use. The samples were ground again using a kitchen mixer-grinder (MX-AC2105, Panasonic Corp., India) and then sieved with a 0.5 mm screen. The kava powder was weighed and dried for 24 h in an oven at 65 °C. Ten grams of powder were extracted overnight in 30 mL of acetone and sonicated for 30 min before centrifugation at 4500 rpm for 10 min. The supernatant was then transferred to 5 mL vials and stored at 4 °C in the dark.

2.3. Standards

Methysticin, dihydromethysticin, kavain, dihydrokavain, yangonin and desmethoxygangonin were purchased from Sigma Aldrich (Fluka) in France (Fig. 1A). Flavokavins A, B and C were obtained from Pr. H. Häberlein (Bonn, Germany). A second set of flavokavins were purchased from LKT Laboratories Inc. (St Paul, USA) (Fig. 1B). Standard stock solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of each compound in acetone (1.0 mg/mL). Stock solutions were stored at 4 °C in the dark and were stable for several weeks. Peak purity tests were done by comparing UV spectra of the six individual kavalactones and three flavokavins in standard and sample tracks. For the determination of the linearity curve, different amounts of stock solutions (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 µl) of the six kavalactones and three flavokavins were applied on HPTLC plates that were developed and scanned at 254 and 366 nm. The calibration plots of peak areas versus concentrations were linear for all standards. Response factors were determined for each standard with R^2 coefficients all deemed acceptable above 0.99 (Table 2).

2.4. High-performance thin layer chromatography

Solvents (acetone, dioxane, hexane and methanol) were from Sigma Aldrich. Analyses were performed with Merck (Darmstadt, Germany) silica gel 60 F254 plates (20 x 10 cm), using a Camag (Muttenz, Switzerland) HPTLC system equipped with an automatic TLC sampler (ATS 4), an automatic developing chamber (ADC 2), a visualizer and a TLC scanner 4 controlled with winCATS software. Standards and sample solutions were applied band wise (band length of 8 mm, 250 nL/s delivery speed, track distance 8.0 mm and distance from the edge of 15 mm). Plates were developed with hexane:dioxane (8 : 2; v/v) as the mobile phase (migration distance of 85 mm) at room temperature after 30 sec plate predrying with 10 mL of mobile phase but no tank saturation. Visual inspection and documentation of the chromatograms were carried out at 254 nm and 366 nm. Plates were scanned under the following conditions: scanning mode, reflectance mode at 366 nm, D2 and W lamp slit dimension 8.00 mm x 0.20 mm, scanning speed 20 mm/s, data resolution 100 µm/step. Peak area measurement was used.

2.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using XLStat software (Microsoft) for linearity curves, principal components analysis (PCA) and descriptive statistics on analysed samples.

Table 1: List of accessions analysed by HPTLC for detection of flavokavins in kava roots.

Noble		Medicinal		Two-days		Wichmannii	
No	Cultivar	No	Cultivar	No	Cultivar	No	Cultivar
001	<i>Borogu</i>	013	<i>Bagavia-1</i>	002	<i>Palisi</i>	006	<i>Sini bo</i>
008	<i>Puariki</i>	025	<i>Bagavia-2</i>	003	<i>Malogro</i>	037	<i>Maewo</i>
012	<i>Pade</i>	045	<i>Malogvelab</i>	004	<i>Tudei</i>	040	<i>Vambu</i>
015	<i>Kelai</i>	161	<i>Borogoru temit</i>	010	<i>Sentender</i>	123	<i>Mele liap</i>
017	<i>Nikawa pia</i>	197	<i>Borogu memea</i>	011	<i>Rongrongwul</i>	155	<i>Wichmanni</i>
019	<i>Ahouia</i>	198	<i>Borogoru memea</i>	018	<i>Fabukhai</i>	155	<i>Kau</i>
041	<i>Yevoet</i>	203	<i>Raimelomelo</i>	020	<i>Birfock</i>	175	<i>Maewo</i>
042	<i>Urukara</i>	213	<i>Tafandai</i>	021	<i>Mage</i>	200	<i>Malogu buara</i>
064	<i>Borogu</i>	217	<i>Maloglilab</i>	022	<i>Rogorogopula</i>	207	<i>Vambu</i>
071	<i>Borogu</i>	218	<i>Malogvelab</i>	023	<i>Tarivarus</i>		
074	<i>Borogu</i>			024	<i>Malovoke</i>		
080	<i>Borogu</i>			030	<i>Isa</i>		
111	<i>Seselaralara</i>			031	<i>Abogae</i>		
113	<i>Borogoru</i>			034	<i>Gelav</i>		
115	<i>Melomelo</i>			043	<i>Ranapapa</i>		
121	<i>Kerakra</i>			066	<i>Palisi</i>		
137	<i>Palarasul</i>			068	<i>Palisi</i>		
138	<i>Palasa</i>			069	<i>Palisi</i>		
142	<i>Poivota</i>			075	<i>Palisi</i>		
160	<i>Borogu</i>			077	<i>Palisi</i>		
202	<i>Borogu</i>			103	<i>Fabukhai</i>		
212	<i>Silese</i>			104	<i>Fabularalara</i>		
				110	<i>Sese</i>		
				112	<i>Tarivarusi</i>		
				116	<i>Taritamaewo</i>		
				117	<i>Tarivoravora</i>		
				120	<i>Gorogor entepal</i>		
				122	<i>Laklak</i>		
				124	<i>Tarivarus</i>		
				126	<i>Birfock</i>		
				130	<i>Palavoke</i>		
				136	<i>Makuku</i>		
				139	<i>Palisi long han</i>		
				140	<i>Palisi smol han</i>		
				141	<i>Pirimerei</i>		
				145	<i>Tudei</i>		
				147	<i>Vakorokoro</i>		
				156	<i>Isa</i>		
				158	<i>Abogae</i>		
				159	<i>Abogae tabal</i>		
				171	<i>Tarivarus</i>		
				207	<i>Raimelmelo</i>		
				209	<i>Nemleu</i>		
				210	<i>Poua</i>		
				214	<i>Ranapapa</i>		
				215	<i>Malogro smolhan</i>		
				216	<i>Malogro bighan</i>		

Table 2: Ratios between flavokavins (FK A, B, C) and kavalactones (KL, Y= yangonin, DMY= desmethoxyyangonin)

Cultivars Groups:	Roots					Stumps		B. stems	
	No. Acc.		FKA/Y+DMY	FKB/Y+DMY	FKC/Y+DMY	FK/KL	No. Acc.	FK/KL	FK/KL
noble	n=22	Mean	0.10	0.09	0.10	0.29	n=8	0.26	0.27
		SD	0.04	0.04	0.04	0.10		0.08	0.07
medicinal	n=10	Mean	0.14	0.10	0.13	0.41	n=4	0.32	0.30
		SD	0.03	0.05	0.03	0.08		0.08	0.10
two-days	n=47	Mean	0.39	0.39	0.24	1.02	n=11	1.02	0.93
		SD	0.10	0.12	0.07	0.28		0.26	0.29
wichmannii	n=9	Mean	0.22	0.32	0.22	0.75	n=3	0.71	0.74
		SD	0.06	0.05	0.05	0.15		0.18	0.17
Clones:									
<i>Borogu</i>	n=8	Mean	0.09	0.07	0.08	0.24	n=8	0.23	0.27
		SD	0.04	0.03	0.03	0.08		0.05	0.06
<i>Palisi</i>	n=8	Mean	0.39	0.38	0.26	1.03	n=8	1.01	0.89
		SD	0.06	0.12	0.05	0.22		0.16	0.09

3. Results

Pure standards applied on silica gel plates allowed the determination of Rf values for the nine molecules of interest (Fig. 1) as well as their UV spectra (Fig. 2). Accessions belonging to the two-days (track 1) and *wichmannii* (track 2) groups of cultivars displayed chromatograms clearly distinct from the noble cultivars (tracks 3, 4 & 5). However, despite our efforts (tests with different plates, different mobile phases and development parameters), overlaps between K and Y and between DHM and K did not allow good separation of Gaussian type peaks at 254 nm. We could not obtain the complete separation of all six major kavalactones to confirm cultivars chemotypes according to the coding system previously developed with HPLC (Lebot and Lévesque, 1996).

Nevertheless, the observation of the plates at 366 nm allowed the clear visualisation of fully separated FKA, B and C. These molecules were easily visible in all two-days and *wichmannii* samples while barely detectable in the nobles and medicinal samples. The heating of the plates at 105 °C for 5 min led to a sharpening of the bands and better visualisation. This technique was handy for plate image storage but was not used for compound identification. UV spectra (Fig. 2) indicate that FKA, B and C, as well as the two kavalactones (Y and DMY), have maximum absorbance at 366 nm while other substances (M, DHM, K and DHK) have very weak or no absorption at this wavelength. Quantification of Y, DMY, FKA, FKB and FKC was therefore unaffected by other substances at 366 nm (Fig. 3) So that this wavelength was used for scanning plates with all samples corresponding to different accessions and cultivars (Table 1).

For the five pure standards scanned at 366 nm, the calibration plot of peak area versus concentration was polynomial. R² coefficients were very high for Y (0.9977, Y = -5080.5x² + 17784x + 949.51), DMY (0.9999, Y = -33.325x² + 1023.7x + 196.28), FKA (0.9986, Y = -6371.5x² + 18248x +

192.53), FKB (0.9996, $(Y = 1964.8x^2 + 6264.1x + 139.46)$ and FKC (0.9993, $Y = -3216.x^2 + 10984.x + 466.08$). Previous HPLC analyses have shown that yangonin (Y) is significantly correlated (at 1% level) with kavain (0.79), methysticin (0.55) and total kavalactones content (0.82) while desmethoxyyangonin (DMY) is significantly correlated with dihydromethysticin (0.60) (Lasme et al., 2008). The sum of these two kavalactones (Y + DMY) is, therefore, assumed to be proportionate to the total kavalactones content in a sample. The results of the ratios between individual flavokavins (FKA, B, C) and the sum of yangonin (Y) and desmethoxyyangonin (DMY) are presented in Table 2 (FK/KL).

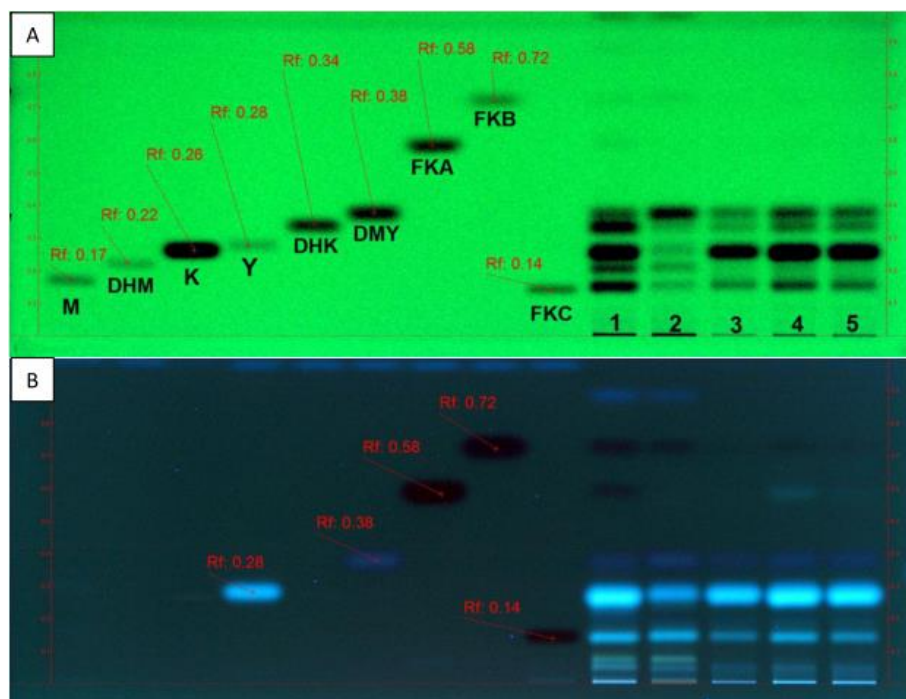


Fig. 1 (A). HPTLC Silica gel 60F254 (20 x 10 cm plate) at 254 nm indicating the Rf values of the pure standards (M, DHM, K, Y, DHK, DMY, FKA, FKB, FKC). The chromatograms of kava samples correspond to: Track 1: two-days cultivar *Isa*, Track 2: *wichmannii* cultivar *Sini Bo*, Track 3: noble cultivar *Borogu*, Track 4: noble cultivar *Ni Kawa Pia*, Track 5: noble cultivar *Kelai*. (B). HPTLC Silica gel 60F₂₅₄ (20x10 cm plate) at 366 nm revealing the absorbance of Y (0.28), DMY (0.38), FKA (0.58), FKB (0.72) and FKC (0.14). Noble cultivars display low levels of flavokavins.

Overall, 140 kava extracts (88 roots, 26 stumps and 26 basal stems samples) were analysed by HPTLC. Multivariate analysis (PCA) of the data matrix of 88 root samples x 5 peak areas (FKC, Y, DMY, FKA, FKB) revealed that the three flavokavins are positively and significantly correlated (*Pearson coefficient*) to each other ($FKA \times FKB = 0.955$, $FKA \times FKC = 0.942$, $FKB \times FKC = 0.939$) and so are the two kavalactones ($Y \times DMY = 0.677$). Results presented in Table 2 indicate that levels of $FKB/Y + DMY$ are much higher in two-days (0.39) and *wichmannii* (0.32) cultivars compared to nobles (0.09) and medicinal kavas (0.10). For each group of cultivars, the ratios FK/KL do not appear to change significantly when analysed in the stumps or the basal stems of the same accession.

The ratios are similar among the eight different clones of noble cultivar *Borogu* or two-days cultivar *Palisi* (Table 2). This indicates that these ratios (FK/KL) are controlled genetically. These results confirm previous studies conducted with HPLC on FKB. We have analysed cultivar *Isa* from Papua New Guinea and confirm results obtained by Jhoo et al. (2006). With a ratio FKB/KL of 0.41, the FKB content of *Isa* can be considered as very high. FKB was also detected in ethanolic extracts of roots of *Palisi* from Vanuatu with a ten-fold higher amount compared to the cultivar *Ava La'au* from Samoa (DiSilvestro et al., 2007). We could not analyse *Ava La'au* but our HPTLC data indicate that *Palisi* has a FKB/KL ratio (0.38) more than five times higher than *Borogu* (0.07), a noble cultivar (Table 2).

Fig. 2 (a). UV spectra of FKA, FKB and FKC. **(b).** UV spectra of Y and DMY. **(c).** UV spectra of M and DHM. **(d).** UV spectra of K and DHK

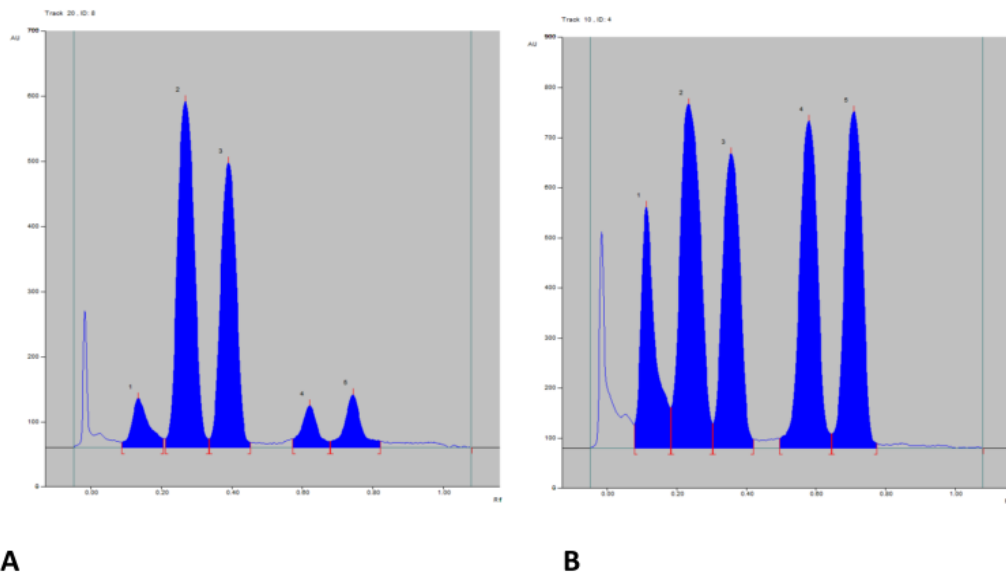
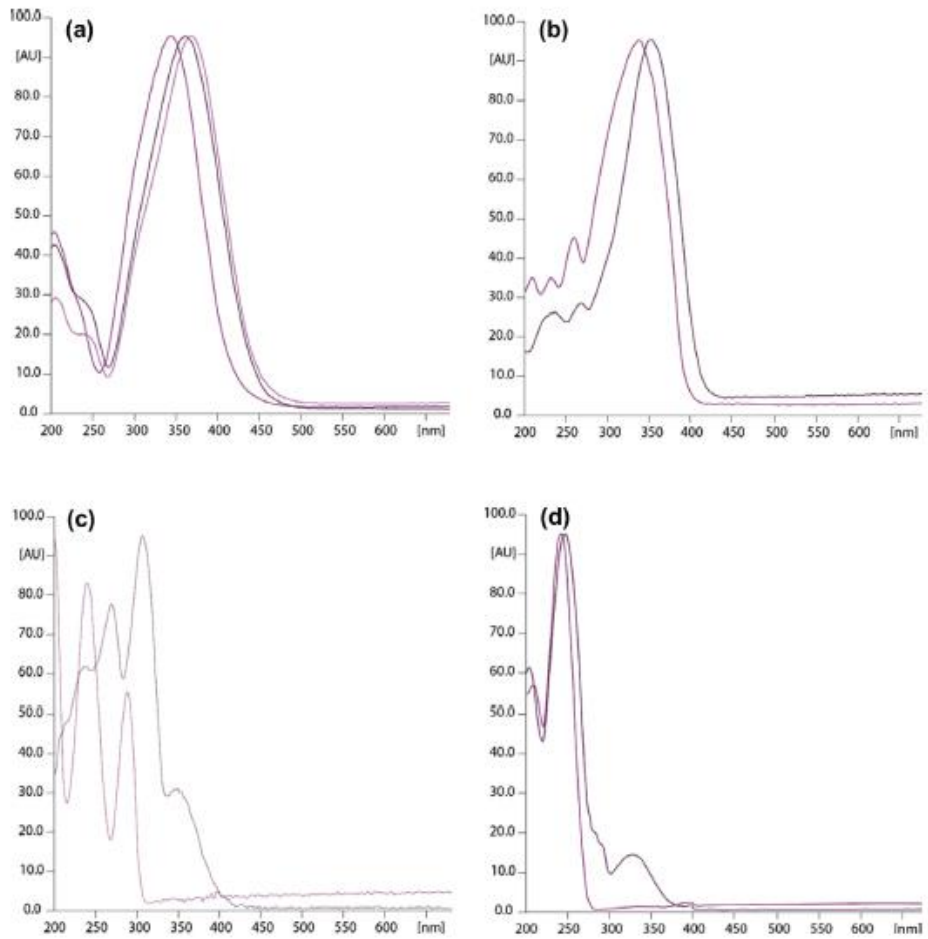


Fig. 3 (a). HPTLC chromatogram of the noble cultivar *Borogu*. From left to right, peaks correspond respectively to FKC (1), Y (2), DMY (3), FKA (4) and FKB (5) scanned at 366 nm. **(b).** HPTLC chromatogram of the *two-days* cultivar *Palisi*. From left to right, peaks correspond respectively to FKC (1), Y (2), DMY (3), FKA (4) and FKB (5) scanned at 366 nm.

4. Discussion

Like most cultivated tropical root crops, kava chemical composition is made of major compounds (starch, proteins, minerals, sugars, cellulose), useful secondary metabolites (kavalactones) and antinutritional factors. These toxic molecules are usually produced by the plant to protect itself against predators. They are usually down-selected during species domestication so that their levels are usually lower in domesticated crops than in their wild relatives. In the present case, it is obvious that flavokavins levels have been considerably diminished from *wichmannii* or two-days cultivars to medicinal and noble cultivars. The latter corresponding to the most improved cultivars suitable for daily drinking. In the case of kava, the determination of suitable qualities is reflected by the secular experience in the Pacific. In this region, experience tells that noble cultivars are safe and deliver the appropriate physiological effects with no hang-over. However, experience with two-days cultivars, indicates that they might possibly be connected with observations of liver toxicity. HPLC analyses (Siméoni & Lebot, 2002; Wang et al., 2013) have shown that noble cultivars have a high percentage of kavain over methysticin and dihydromethysticin. Our HPTLC results reveal that these suitable effects may also be due to the associated very low levels of flavokavins. Likewise, in HPLC studies the side effects of two-days cultivars were thought to be due to high levels of dihydromethysticin (Lebot & Lévesque, 1996). The present HPTLC results indicate that these side effects could also be due to high levels of flavokavins. In other words, the detection of low levels of flavokavins is indirectly contributing to the identification of suitable chemotypes.

Before the ban in Europe, there was a lack of standardization of kava to be used as raw material for the pharmaceutical and nutraceutical industries, with no reference to molecules other than kavalactones in the extract. In Germany for example, quality specifications were developed a few years before the ban and were compiled by the regulatory agency but the requirements were rather succinct. The extracts ingredients had to be derived from peeled and dried stump so that the presence of toxins extracted from the bark could be avoided. Aerial parts such as stems, bark of the stumps exposed to light and leaves include an alkaloid known as pipermethystine (Dragull et al., 2003). It has been suggested that peelings may have been bought by European companies instead of the usual roots (SPC, 2001; WHO, 2007). Kavalactones were then extracted using organic solvents but alkaloids were most likely extracted too and so probably were flavokavins (Teschke et al., 2009). Lack of routine analyses might have caused problems to European companies. It has been suggested that flavokavins or alkaloids may be responsible for the cases of liver toxicity observed in Europe, provided this toxicity is accepted and established (Schmidt, 2003). Toxicological data on kavalactones does not allow attributing a potential health hazard to this fraction (Olsen, Frillo, & Skonberg, 2011).

Prior to the ban, the situation was similar in the Pacific for the traditional beverage and this represented a concern clearly expressed, as early as 2001, by the Secretariat of the Pacific Community in its producer's guide (SPC, 2001). In response to this concern, the Vanuatu parliament passed the Kava Act (Vanuatu Legislation, 2002) establishing that only noble cultivars should be traded, locally and for export markets. The rationale was that because these cultivars are consumed on a daily basis, it is likely that they do not present a danger for human health. Kava was not banned in the US where it is still sold as a dietary supplement. However, in 2002 the US Food and Drug Administration advised consumers on a potential hepatotoxicity (Teschke & Lebot, 2011).

In food and pharmaceutical sciences the use of marker substances for quality control is a somewhat frequent approach. The complete chemical composition of products is often quite complex and does not let itself to simple analysis for routine control. As FKB has been related to potential liver toxicity (Jhoo et al., 2006; Zhou et al., 2010), it is prudent to use it as a new marker for kava quality control, along with other flavokavins. Further investigation into these constituents is, however, warranted. FKB has also been reported to have potential usefulness for prevention and treatment of prostate cancer as well as significant anti-tumour effects on several carcinoma cell lines both in vitro and in vivo (Tang et al., 2010). Its efficacy profile suggests that FKB could be a promising novel chemotherapeutic agent (Ji et al., 2013). Until such examinations are available and complete, limit test for flavokavins may be advisable.

5. Conclusion

The present study demonstrates that the FK/KL ratio permits an unambiguous identification of noble kavas and exclusion of two- days kavas in exported material. We propose that this ratio could be used as an estimate of extract quality to guaranty the safety of kava. The HPTLC methodology described here offers a cost efficient technique (20 tracks per plate with only 10mL of solvent) to screen numerous samples for rapid and efficient routine analysis of kava to be used for the preparation of the traditional beverage in the Pacific but also as raw material for western pharmaceutical and nutraceutical industries.

Acknowledgments

This research was financially supported by the ANR SYSTERRA program under the project "Vegeculture" (no ANR-10-STRA-007). We thank Pr. H. Häberlein, University of Bonn, Germany, for providing pure standards of flavokavins A, B and C. We also thank R. Amos and B. Nishai for laboratory assistance in preparing samples and extracts. T.K.T. Do is grateful to ANRT for a fellowship.

References

- BfArM. (2003). <http://www.bfarm.de/de_ver/arzneimittel/amirisiken/stufenplan/Besch-Kava-Final.pdf>.
- Bilia, A. R., Scalise, L., Bergonzi, M. C., & Vincieri, F. F. (2004). Analysis of kavalactones from *Piper methysticum* (kava-kava). *Journal of Chromatography B*, 812, 203–214.
- Boudesocque, L., Dorat, J., Pothier, J., Gueiffier, A., & Enguehard-Gueiffier, C. (2013). High performance thin layer chromatography-densitometry: A step further for quality control of cranberry extracts. *Food Chemistry*, 139, 866–871.
- Campo, J. V., McNabb, J., Perel, J. M., Mazariegos, G. V., Hasegawa, S. L., & Reyes, J. (2003). Kava induced fulminant hepatic failure. *Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 41, 631–632.
- DiSilvestro, R. A., Zhang, W., & DiSilvestro, D. J. (2007). Kava feeding in rats does not cause liver injury nor enhance galactosamine-induced hepatitis. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1293–1300.
- Dragull, K., Yoshida, W. Y., & Tang, C. S. (2003). Piperidine alkaloids from *Piper methysticum*. *Phytochemistry*, 63, 193–198.
- Ernst, E. (2007). A re-evaluation of kava (*Piper methysticum*). *British Journal of Clinical Pharmacology*, 64, 415–417.
- FAO/WHO. (2013). Report of the 12th Session of the FAO/WHO coordinating committee for North America and the South West Pacific. Joint FAO/WHO Food Standard Programme. *Codex Alimentarius Commission*. REP13/NASWP. Rome, Italy, p. 26.
- Gaub, M., Roeseler, Ch., Roos, G., & Kovar, K. A. (2004). Analysis of plant extracts by NIRS: Simultaneous determination of kavapyrones and water in dry extracts of *Piper methysticum* Forst. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 859–864.
- Gautz, L., Kaufusi, P., Jackson, M. C., Bittenbender, H. C., & Tang, C. S. (2006). Determination of kavalactones in dried kava (*Piper methysticum*) powder using near-infrared reflectance spectroscopy and partial least-squares regressions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6147–6152.
- Grace, R. F. (2003). Kava drinking in Vanuatu – a hospital based survey. *Pacific Health Dialog*, 10(2), 41–44.
- Janeczko, Z., Krzek, J., Pilewski, N., & Walusiak, D. (2001). Densitometric analysis of kawain in kava-kava root extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 58(6), 463–468.

Jhoo, J. W., Freeman, J. P., Heinze, T. M., Moody, J. D., Schnackenberg, L. K., Beger, R. D., et al. (2006). In vitro cytotoxicity of nonpolar constituents from different parts of kava plant (*Piper methysticum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3157–3162.

Ji, T., Lin, C., Krill, L. S., Eskander, R., Guo, Y., Zi, X., et al. (2013). Flavokawain B, a kava chalcone, inhibits growth of human osteosarcoma cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Molecular Cancer*, 12(55), 3479–3486.

Lasme, P., Davrieux, F., Montet, D., & Lebot, V. (2008). Quantification of kavalactones and determination of kava (*Piper methysticum*) chemotypes using near-infrared reflectance spectroscopy for quality control in Vanuatu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4976–4981.

Lebot, V., & Lévesque, J. (1989). The origin and distribution of kava (*Piper methysticum* Forst. f. Piperaceae): A phytochemical approach. *Allertonia*, 5(2), 223–380.

Lebot, V., & Lévesque, J. (1996). Genetic control of kavalactone chemotypes in *Piper methysticum* cultivars. *Phytochemistry*, 43(2), 397–403.

Loew, D., & Franz, G. (2003). Quality aspects of traditional and industrial kava extracts. *Phytomedicine*, 10, 610–612.

Meissner, O., & Haberlein, H. (2005). HPLC analysis of flavokavins and kavapyrones from *Piper methysticum* Forst. *Journal of Chromatography B*, 826, 46–49.

Mills, S. Y., & Steinhoff, B. (2003). Kava-kava: A lesson for the phytomedicine community. *Phytomedicine, ESCOP Section*, 10, 261–261.

Olsen, L. R., Frillo, M. P., & Skonberg, C. (2011). Constituents in kava extracts potentially involved in hepatotoxicity: A review. *Chemical Research in Toxicology*, 24, 992–1002.

Russmann, S., Lauterburg, B. H., & Hebling, A. (2001). Kava hepatotoxicity. *Annals of Internal Medicine*, 135, 68–69.

Schäfer, K., & Winterhalter, P. (2005). Application of high speed countercurrent chromatography (HSCCC) to the isolation of kavalactones. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 1703–1716.

Schmidt, M. (2003). Are kavalactones the hepatotoxic principle of kava extracts? The pitfalls of the glutathione theory. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9, 183–187.

Siméoni, P., & Lebot, V. (2002). Identification of factors determining kavalactones content and chemotype in kava (*Piper methysticum* Forst. f.). *Biochemical*

Systematics and Ecology, 30, 413–424. SPC (2001). Pacific kava: A producer's guide. Suva, Fiji: Secretariat of the Pacific Community, SPC Regional Office. 59p.

Stevinson, C., Huntley, A., & Ernst, E. (2002). A systematic review of the safety of kava extract in the treatment of anxiety. *Drug Safety*, 25(4), 251–261.

Tang, Y., Li, X., Liu, Z., Simoneau, A. R., Xie, J., & Zi, X. (2010). Flavokawain B, a kava chalcone, induces apoptosis via up-regulation of death-receptor 5 and Bim expression in androgen receptor negative, hormonal refractory prostate cancer cell lines and reduces tumor growth. *International Journal of Cancer*, 127, 1758–1768.

Teschke, R., Genthner, A., & Wolff, A. (2009). Kava hepatotoxicity: Comparison of aqueous, ethanolic, acetonetic kava extracts and kava-herbs mixtures. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 378–38.

Teschke, R., & Lebot, V. (2011). Proposal for a kava quality standard code. *Chemical Research in Toxicology. Invited Review*, 49, 2503–2516.

Vanuatu Legislation. (2002). Kava Act. Available at: <http://www.paclii.org/vu/legis/num_act/toc-K.html> Accessed 20.06.13.

Wang, J., Qu, W., Jun, S., Bittenbender, H. C., & Li, Q. X. (2010). Rapid determination of six kavalactones in kava root and rhizome samples using fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis in comparison with gas chromatography. *Analytical Methods*, 2, 492–498.

Wang, J., Qu, W., Jun, S., Li, Q. X., & Bittenbender, H. C. (2013). Kavalactone content and chemotype of kava beverages prepared from roots and rhizomes of *Isa* and *Mahakea* varieties and extraction efficiency of kavalactones using different solvents. *Journal of Food Science and Technology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-013-1047-2>.

WHO (World Health Organization) (2007). Assessments of the risk of hepatotoxicity with kava products. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services, p. 82.

Xuan, T. D., Fukuta, A. A., Wie, A. C., Elzaawely, A. A., Khanh, T. D., & Tawata, S. (2008). Efficacy of extracting solvents to chemical compounds of kava (*Piper methysticum*) root. *Journal of Natural Medicine*, 62, 188–194.

Young, R. L., Hyltin, J. W., Pluckenett, D. L., Kawano, Y., & Nakayama, T. (1966). Analysis for kava pyrones in extracts of *Piper methysticum*. *Phytochemistry*, 5(4), 795–798.

Zhou, P., Gross, S., Liu, J. H., Yu, B. Y., Feng, L. L., Nolte, J., et al. (2010). Flavokawain B, the hepatotoxic constituent from kava root, induces GSH-sensitive oxidative stress through modulation of IKK/NF- κ B and MAPK signaling pathways. *The FASEB Journal*, 24(12), 4722–4732.

Zi, X., & Simoneau, A. R. (2005). Flavokawain A, a novel chalcone from kava extract, induces apoptosis in bladder cancer cells by involvement of bax proteindependent and mitochondria-dependent apoptotic pathway and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Research*, 65(8), 3479–3486.

4. CONCLUSION

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis de présenter les avantages de l'HPTLC dans l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. En effet, la première étude concernant les plantes à tubercules montrent l'aptitude de l'HPTLC à être utilisé pour classer les échantillons par profil en fonction de leur ressemblance. Cette capacité a permis de discriminer les échantillons de taros de ceux des ignames par la présence de trois marqueurs. Cependant, la discrimination des espèces de *Dioscorea* n'a pas été possible. Seul les *D. bulbifera* ont montré des profils différents des autres.

La seconde étude portant sur les échantillons de kava a rendu possible le développement d'une méthode de discrimination des différentes qualités de kava au sein d'une même espèce. En effet, l'espèce *Piper methysticum* possède un bon nombre de sous espèces utilisées à des fins médicinales, ou encore alimentaires. De plus, certaines de ces sous-espèces sont connues pour leur caractère toxique. Cette méthode a été la première méthode HPTLC développée permettant la discrimination des sous-espèces toxiques et s'avère utile pour commencer le dossier d'acceptation au *Codex alimentarius*, ce qui permettrait à long terme d'envisager une demande d'autorisation pour l'importation du kava en Europe.

Lors de ce déplacement, les deux études ont de plus montré la simplicité d'utilisation ainsi que l'adaptabilité de l'instrument à un environnement parfois difficile à gérer. En effet, le Vanouatou est un pays reculé se trouvant au milieu du pacifique sud. Il connaît certaines difficultés en termes d'approvisionnement en solvant mais aussi de difficultés environnementales comme par exemple un haut taux d'humidité, ce qui rend difficile l'utilisation d'instruments.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

La chromatographie sur couche mince est une technique connue qui a fait ses preuves du point de vue pratique. Sa simplicité d'utilisation, sa flexibilité puis les améliorations technologiques dont elle a bénéficié ont conduit à une renaissance de la chromatographie planaire et de ses domaines d'application. En effet, l'HPTLC est de nos jours utilisée dans de nombreux domaines que ce soit comme outil de contrôle lors d'analyse de routine, ou comme outil de recherche. L'HPTLC est une technique reconnue pour l'identification botanique dans les pharmacopées américaine, européenne, ou encore française, mais aussi pour la détection d'adultération. Malgré sa simplicité, la chromatographie sur couche mince est une technique d'analyse complexe dont la détermination des conditions optimales nécessite une optimisation au cas par cas.

Lors de cette thèse, plusieurs questions se posaient sur les performances de l'HPTLC et notamment sur son apport dans l'analyse des extraits naturels en dehors de son utilisation pour l'identification. L'HPTLC peut-elle être utilisée pour l'isolement de quantités de métabolites suffisant pour leur analyse structurale ou l'évaluation de leurs propriétés biologiques ? L'avantage d'utiliser une phase stationnaire considérée comme un consommable est-il réellement utile pour l'analyse d'extraits naturels ? L'analyse quantitative par HPTLC d'un composé dans une matrice complexe permet-elle d'obtenir des résultats équivalents à ceux obtenus par HPLC ? Qu'en est-il de l'analyse et du retraitement d'un grand nombre d'échantillons ? L'HPTLC se démarque-t-elle des autres techniques ?

La question de l'utilisation de l'HPTLC dans l'étape de préparation d'échantillon a été étudiée, notamment comme outil d'isolement. Cette étude a montré un avantage en termes de temps et de consommation de solvant à l'utilisation de l'HPTLC semi-préparative lorsque la quantité est préférée à la pureté du composé isolé. De plus, suivant le but de l'analyse, l'utilisation d'une phase stationnaire robuste et considérée comme un consommable est un réel avantage. En effet, le fait de ne pas devoir porter une grande attention à la compatibilité de la matrice avec la phase stationnaire, permet une préparation minimaliste des échantillons. Les observations réalisées lors de ce chapitre nous donnent à réfléchir sur les différentes possibilités amenées par l'HPTLC après l'étape de développement, tout en gardant à l'esprit la notion de réduction de consommation de solvant et de temps. En effet, les zones d'intérêt peuvent être récupérées et ainsi éliminer les matrices interférentes, isolées avant une analyse pour identification, ou encore récupérées avant une seconde chromatographie

Lors d'une analyse quantitative, l'HPTLC permet dans certains cas, d'obtenir des résultats équivalents à ceux obtenus par d'autres techniques telles que l'HPLC, néanmoins, son manque de résolution et de précision ne lui permet pas d'attendre les exigences parfois demandées. Pour ces raisons, elle ne sera pas préférée lorsque des résultats précis sont attendus. En analyse

quantitative, elle se distingue des autres techniques par sa capacité à traiter un grand nombre d'échantillons par analyse. En effet, cette capacité est un réel avantage, par exemple lors de la pré-sélection d'échantillons, ou lorsqu'une simple estimation est requise.

Les dernières études concernaient le retraitement des données, et plus particulièrement les différentes informations pouvant s'en dégager. Lors de l'étude des plantes à tubercules, le retraitement des données par simple comparaison visuelle des profils HPTLC a permis de différencier les taros des autres plantes à tubercules, ainsi que la discrimination des *D. bulbifera* des autres espèces de *Dioscorea*. Le retraitement statistique des données a été lui utilisé dans le cas des extraits de kava et a permis de classer les qualités de kava en fonction du ratio de leur teneur en kavalactones et en flavokavaines. Cette façon de retraiter les données HPTLC ouvre la porte à l'utilisation de l'HPTLC et l'aspect métabolomique. De plus, ces deux dernières études réalisées dans un pays en voie de développement ont pointé du doigt la flexibilité de l'instrument et sa capacité à s'adapter à tout type d'environnement.

Cette thèse a permis de démontrer que dans le domaine des extraits naturels, l'HPTLC est souvent utilisée pour sa simplicité d'emploi que ce soit pour de la préparation d'échantillon, pour une identification, ou bien pour de la quantification. Ses qualités en font, dans certains cas, une technique préférée à d'autres, ou bien dans d'autres cas, un outil complémentaire aux autres techniques.

CHAPITRE 5 : PARTIE EXPERIMENTALE

1. ECHANTILLON ET PRODUITS CHIMIQUE

1.1. Echantillons

1.1.1. Echantillons utilisé dans les études liées à la préparation d'échantillon

Les ingrédients utilisés pour la formulation des produits cosmétiques ont été achetés auprès des fournisseurs cités dans le Tableau 36.

Tableau 36 : informations sur les ingrédients utilisés dans les produits cosmétiques.

	INGREDIENTS NOM COMMERCIAL	NOM INCI	FOURNISSEUR
Gel-crème	/	Eau	/
	Aristoflex avc	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer	Clariant
	Lanol 1688	Cetearyl Ethylhexanoate	Seppic
	Phenonip xb	Methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, Isobutylparaben, Phenoxyethanol	Clariant
	Coenzyme Q10	Ubiquinone	Cooper
Gel douche	/	Eau	/
	Phenonip xb	Methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, Isobutylparaben, Phenoxyethanol	SCD
	Glycerin	Glycerin	AMI
	Dehyton K COS	Cocamidopropyl betaine	AMI
	Texapon NSO IS	Sodium laureth sulfate	AMI
	NaCl	Sodium chloride	Seppic
	Coenzyme Q10	Ubiquinone	Cooper
Crème	/	Eau	/
	Glycerin	glycerin	AMI
	Heliogel	Heliogel	LMC
	Montanov 68	Cetearyl alcohol (and) cetearyl glucoside	Seppic
	Neoderm	Caprylic/capric triglycerides	J. Bouis
	Phytosqualane	Squalane	Sophim
	Phenonip XB	Methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, Isobutylparaben, Phenoxyethanol	SCD
	α -tocopherol	α -tocopherol	Laserson
	Paraffine oil	Paraffinum liquidum	Cooper
	Paraffine solid	Petrolatum	Cooper
	Coenzyme Q10	Ubiquinone	Cooper

L'huile essentielle de *Mentha spicata* L., et les extraits sec de *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson et de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) proviennent de chez Naturex (Avignon, France). Les standards de carvone (98 %), de resvératrol (≥ 99 %) et d'acide rosmarinique (≥ 98 %) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

1.1.2. Echantillons utilisé pour l'analyse quantitative

Les parties aériennes et les racines de *S. virgaurea alpestris* et *S. virgaurea virgaurea* ont été collectées sur différentes localisation de la région des alpes sur 4 années consécutives. Les

échantillons ont été authentifiés par le botaniste Jean-Louis Polidori et déposés au jardin botanique de Nice (Tableau 37).

Tableau 37: information sur les échantillons de solidages.

ECHANTILLONS	SOUS ESPECE (ORGANE)	ANNEE DE RECOLTE	LOCALISATION (ALTITUDE, COORDONNEES GEOGRAPHIQUE)
SVA1	<i>alpestris</i> (partie aérienne)	2011	Localisation°1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA2	<i>alpestris</i> (partie aérienne)	2010	Localisation°1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA3	<i>alpestris</i> (partie aérienne)	2009	Localisation°1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA4	<i>alpestris</i> (partie aérienne)	2008	Localisation°1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA5	<i>alpestris</i> (partie aérienne)	2011	Localisation°2 (1500 m, 44.284°; 6.866°)
SVA6	<i>alpestris</i> (partie aérienne)	2010	Localisation°3 (1600 m, 44.229°; 6.933°)
SVA7	<i>alpestris</i> (fleurs/graines)	2010	Localisation°1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA8	<i>alpestris</i> (tiges)	2010	Localisation°1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA9	<i>alpestris</i> (feuilles)	2010	Localisation°1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVA10	<i>alpestris</i> (racine)	2008	Localisation°1 (2200 m, 44.170°; 7.166°)
SVV1	<i>virgaurea</i> (partie aérienne)	2010	Localisation°4 (1500 m, 44.071°; 7.223°)
SVV2	<i>virgaurea</i> (partie aérienne)	2008	Localisation°3 (1600 m, 44.229°; 6.933°)
SVV3	<i>virgaurea</i> (partie aérienne)	2010	Localisation°5 (1650 m, 44.207°; 7.112°)

1.1.3. Echantillons utilisé dans les études complémentaires

Les tubercules d'ignames, de taros, de patates douces et de manioc de cette étude proviennent du centre de Recherche Agronomique du Vanuatu (CTRAV), et plus particulièrement des collections du CTRAV-CIRAD. Les collections analysées proviennent de la même parcelle qui se situe au CTRAV de Luganville, sur l'île d'*Espiritu Santo* à 300 km au nord d'Efaté (15° 23' S, 166° 51' E). Un ensemble de 64 accessions a été assemblé afin de représenter une gamme de variation des tubercules récoltés. Dans l'ensemble, les tubercules de 14 *D. alata* cvs (cultivar), de 8 *D. bulbifera* cvs, de 8 *D. cayenensis-rotundata* cvs, de 3 *D. esculenta* cvs, de 3 *D. pentaphylla* cvs, 3 *D. transversa* cvs, de 3 *D. trifida* cvs, de 3 *D. nummularia*, de 2 *D. dumetorum* cvs, de 3 *X. sagittifolium* cvs, de 3 *I. batatas* cvs, de 3 *M. esculenta* cvs, de 6 *C. esculenta* cvs, et de 2 *A. esculenta* cvs ont été sélectionnés. Les données d'identification caractérisant chaque accession sont présentées dans le Tableau 38.

Tableau 38 : informations sur les tubercules sélectionnées.

	ESPECE	NOM COMMUN	CODE ECHANTILLON	CODE ACC.	COULEUR DE LA CHAIR
1	<i>D. alata</i>	Igname	Da 1	30	Blanche
2	<i>D. alata</i>	Igname	Da 2	422	Blanche
3	<i>D. alata</i>	Igname	Da 3	491	Blanche
4	<i>D. alata</i>	Igname	Da 4	26	Rouge

	ESPECE	NOM COMMUN	CODE ECHANTILLON	CODE ACC.	COULEUR DE LA CHAIR
5	<i>D. alata</i>	Igname	Da 5	615	Rouge
6	<i>D. alata</i>	Igname	Da 6	1335	Rouge
7	<i>D. alata</i>	Igname	Da 7	66	Blanche veinée
8	<i>D. alata</i>	Igname	Da 8	407	Blanche veinée
9	<i>D. alata</i>	Igname	Da 9	448	Blanche veinée
10	<i>D. alata</i>	Igname	Da 10	461	Blanche veinée
11	<i>D. alata</i>	Igname	Da 11	1505	Blanche veinée
12	<i>D. alata</i> (indien)	Igname	Da 12	68	Blanche/jaune
13	<i>D. alata</i> (indien)	Igname	Da 13	81x7	Blanche/jaune
14	<i>D. alata</i> (indien)	Igname	Da 14	125	Blanche/jaune
15	<i>D. bulbifera</i>	Igname	Db 1	1290	Jaune
16	<i>D. bulbifera</i>	Igname	Db 2	1300	Jaune
17	<i>D. bulbifera</i>	Igname	Db 3	1528	Jaune
18	<i>D. bulbifera</i>	Igname	Db 4	685	Violette/rouge
19	<i>D. bulbifera</i>	Igname	Db 5	1010	Violette/rouge
20	<i>D. bulbifera</i>	Igname	Db 6	1487	Violette/rouge
21	<i>D. bulbifera</i>	Igname	Db 7	675	Jaune veinée
22	<i>D. bulbifera</i>	Igname	Db 8	1009	Jaune veinée
23	<i>D. esculenta</i>	Igname	De 1	631	Blanche
24	<i>D. esculenta</i>	Igname	De 2	640	Blanche
25	<i>D. esculenta</i>	Igname	De 3	665	Blanche
26	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Igname	Dc 1	2	Blanche
27	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Igname	Dc 2	3	Blanche
28	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Igname	Dc 3	4	Blanche
29	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Igname	Dc 4	6	Blanche
30	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Igname	Dc 5	1015	Blanche
31	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Igname	Dc 6	749	Jaune
32	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Igname	Dc 7	1037	Jaune
33	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Igname	Dc 8	1385	Jaune
34	<i>D. transversa</i>	Igname	Dtra 1	621	Blanche
35	<i>D. transversa</i>	Igname	Dtra 2	1033	Blanche
36	<i>D. transversa</i>	Igname	Dtra 3	1047	Blanche
37	<i>D. pentaphylla</i>	Igname	Dp 1	1436	Blanche
38	<i>D. pentaphylla</i>	Igname	Dp 2	1437	Blanche
39	<i>D. pentaphylla</i>	Igname	Dp 3	2010	Blanche
40	<i>D. nummularia</i>	Igname	Dn 1	1432	Blanche
41	<i>D. nummularia</i>	Igname	Dn 2	1464	Blanche
42	<i>D. nummularia</i>	Igname	Dn 3	1581	Blanche-jaune pâle
43	<i>D. trifida</i>	Igname	Dtri 1	800	Blanche
44	<i>D. trifida</i>	Igname	Dtri 2	1630	Blanche
45	<i>D. trifida</i>	Igname	Dtri 3	1987	Blanche
46	<i>D. dumetorum</i>	Igname	Dd 1	Dm1	Jaune -verte
47	<i>D. dumetorum</i>	Igname	Dd 2	Dm2	Jaune -verte
48	<i>C. esculenta</i>	Taro	Ce-VU 1	1999	Blanche
49	<i>C. esculenta</i>	Taro	Ce-MY 1	142	Blanche
50	<i>C. esculenta</i>	Taro	Ce-ID 1	280	Blanche
51	<i>C. esculenta</i>	Taro	Ce-TH 1	1	Blanche
52	<i>C. esculenta</i>	Taro	Ce-VN 1	134	Blanche
53	<i>C. esculenta</i>	Taro	Ce-SM 1	BUSM151	Blanche

	ESPECE	NOM COMMUN	CODE ECHANTILLON	CODE ACC.	COULEUR DE LA CHAIR
54	<i>X. sagittifolium</i>	Taro	Xs 1	23	Blanche
55	<i>X. sagittifolium</i>	Taro	Xs 2	141	Blanche
56	<i>X. sagittifolium</i>	Taro	Xs 3	151	Blanche
57	<i>A. macrorrhiza</i>	Taro	Am 1	Navia Ambae	Blanche
58	<i>A. macrorrhiza</i>	Taro	Am 2	Sikras	Blanche
59	<i>I. batatas</i>	Patate douce	Ib 1	PNG 2	Blanche
60	<i>I. batatas</i>	Patate douce	Ib 2	SI 226	Blanche
61	<i>I. batatas</i>	Patate douce	Ib 3	Sallili	Blanche
62	<i>M. esculenta</i>	Manioc	Me 1	1	Blanche
63	<i>M. esculenta</i>	Manioc	Me 2	1613	Blanche
64	<i>M. esculenta</i>	Manioc	Me 3	s 66	Blanche

Les racines de kavas proviennent du centre de Recherche Agronomique du Vanouatou (CTRAV), et plus particulièrement des collections du CTRAV-CIRAD. Les collections analysées proviennent de la même parcelle qui se situe au CTRAV de Luganville, sur l'île d'*Espiritu Santo* à 300 km au nord d'Efaté (15° 23' S, 166° 51' E) (Tableau 39).

Tableau 39 : informations sur les échantillons de kava.

NOBLES		MEDICINAUX		DEUX-JOURS		WICHMANNII	
N° Acc	Nom du cultivar	N° Acc	Nom du cultivar	N° Acc	Nom du cultivar	N° Acc	Nom du cultivar
001	<i>Borogu</i>	013	<i>Bagavia-1</i>	002	<i>Palisi</i>	006	<i>Sini bo</i>
008	<i>Puariki</i>	025	<i>Bagavia-2</i>	003	<i>Malogro</i>	037	<i>Maewo</i>
012	<i>Pade</i>	045	<i>Malogvelab</i>	004	<i>Tudei</i>	040	<i>Vambu</i>
015	<i>Kelai</i>	161	<i>Borogoru temit</i>	010	<i>Sentender</i>	123	<i>Mele liap</i>
017	<i>Nikawa pia</i>	197	<i>Borogu memea</i>	011	<i>Rongrongwul</i>	155	<i>Wichmanni</i>
019	<i>Ahouia</i>	198	<i>Borogoru memea</i>	018	<i>Fabukhai</i>	155	<i>Kau</i>
041	<i>Yevoet</i>	203	<i>Raimelomelo</i>	020	<i>Birfock</i>	175	<i>Maewo</i>
042	<i>Urukara</i>	213	<i>Tafandai</i>	021	<i>Mage</i>	200	<i>Malogu buara</i>
064	<i>Borogu</i>	217	<i>Maloglilab</i>	022	<i>Rogorogopula</i>	207	<i>Vambu</i>
071	<i>Borogu</i>	218	<i>Malogvelab</i>	023	<i>Tarivarus</i>		
074	<i>Borogu</i>			024	<i>Malovoke</i>		
080	<i>Borogu</i>			030	<i>Isa</i>		
111	<i>Seselalarara</i>			031	<i>Abogae</i>		
113	<i>Borogoru</i>			034	<i>Gelav</i>		
115	<i>Melomelo</i>			043	<i>Ranapapa</i>		
121	<i>Kerakra</i>			066	<i>Palisi</i>		
137	<i>Palarasul</i>			068	<i>Palisi</i>		
138	<i>Palasa</i>			069	<i>Palisi</i>		
142	<i>Poivota</i>			075	<i>Palisi</i>		
160	<i>Borogu</i>			077	<i>Palisi</i>		
202	<i>Borogu</i>			103	<i>Fabukhai</i>		
212	<i>Silese</i>			104	<i>Fabularalara</i>		
				110	<i>Sese</i>		
				112	<i>Tarivarusi</i>		
				116	<i>Taritamaewo</i>		
				117	<i>Tarivoravora</i>		
				120	<i>Gorogor</i>		

NOBLES		MEDICINAUX		DEUX-JOURS		WICHMANNII	
N° Acc	Nom du cultivar	N° Acc	Nom du cultivar	N° Acc	Nom du cultivar	N° Acc	Nom du cultivar
					<i>entepal</i>		
				122	<i>Laklak</i>		
				124	<i>Tarivarus</i>		
				126	<i>Birfock</i>		
				130	<i>Palavoke</i>		
				136	<i>Makuku</i>		
				139	<i>Palisi long han</i>		
				140	<i>Palisi smol han</i>		
				141	<i>Pirimerei</i>		
				145	<i>Tudei</i>		
				147	<i>Vakorokoro</i>		
				156	<i>Isa</i>		
				158	<i>Abogae</i>		
				159	<i>Abogae tabal</i>		
				171	<i>Tarivarus</i>		
				207	<i>Raimelmelo</i>		
				209	<i>Nemleu</i>		
				210	<i>Poua</i>		
				214	<i>Ranapapa</i>		
				215	<i>Malogro</i>		
					<i>smolhan</i>		
				216	<i>Malogro bighan</i>		

1.2. Réactifs et solvants

Les produits chimiques et solvants ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), VWR Prolabo (Fontenay-sous-bois, France) ou Eurisotop (Saint Aubin, France). Les solvants utilisés pour l'HPLC et l'HPTLC sont des solvants de grade HPLC.

Les préparations des révélateurs utilisés pour l'étape de révélation en HPTLC sont décrites dans le Tableau 40 :

Tableau 40 : préparation et protocole d'utilisation des révélateurs utilisés.

REVELATEUR	PREPARATION ET UTILISATION
Acide sulfurique	20 mL d'acide sulfurique sont ajoutés à 180 mL de méthanol. La plaque est immergée dans le révélateur puis chauffée à 100 °C pendant 3 min.
Anisaldéhyde-acide sulfurique	10 mL d'acide sulfurique sont délicatement ajoutés à un mélange froid de 170 mL de méthanol et 20 mL d'acide acétique. A cette solution est ajouté 1 mL d'anisaldéhyde. La plate est immergée dans le révélateur puis chauffée à 100 °C pendant 3 min.

REVELATEUR	PREPARATION ET UTILISATION
Réactif de Neu	<p>Solution de NP : 1 g de 2-aminoethyl diphenylborinate est dissout dans 200 mL d'acétate d'éthyle. La plaque chauffée à 100°C pendant 3 min puis immergée, encore chaude, dans le révélateur.</p> <p>Solution de PEG : 10 g de PEG 400 sont dissouts dans 200 mL de dichlorométhane. La plate est immergée dans le révélateur puis séchée sous un flux d'air froid.</p>
Sulfate de cuivre	2 g de sulfate de cuivre sont dissouts dans 10 mL d'eau puis 190 mL d'éthanol (96 %) sont ajoutés. La plaque est immergée dans le révélateur puis chauffée à 110 °C pendant 10 min.
Acide phosphomolybdique	10 g d'acide phosphomolybdique sont dissouts dans 200 mL d'éthanol (96%). La plaque est immergée dans le révélateur puis chauffée à 120°C pendant 10 min.
Ninhydrine	0,6 g de ninhydrin sont dissouts dans 190 mL d'isopropanol, puis 10 mL d'acide acétique y sont ajoutés. La plaque est immergée dans le révélateur puis chauffée à 105 °C pendant 3 min.
DPPH	10 mg de DPPH dans 200 mL de méthanol. La plaque est immergée 1 s dans le révélateur, puis chauffée à 100 °C pendant 10 s et placée dans le noir pendant 30 min avant la visualisation.
Vapeur d'acide chlorhydrique	Dans une cuve de développement à double fond, 25 ml d'HCl concentré sont placés d'un côté, puis la plaque de l'autre et laisser exposer 4 heures.
Vapeur d'iode	Dans une cuve de développement à double fond, placé l'iode d'un côté puis la plaque de l'autre et laisser exposer 30 min.

2. APPAREILLAGES

2.1.1. HPTLC

Les analyses HPTLC ont été réalisées avec un système HPTLC CAMAG (Muttentz, Suisse), équipé d'un applicateur d'échantillons automatique (ATS 4), d'une chambre de développement automatique ADC 2 avec contrôle d'humidité, d'un visualiseur et d'un scanner (Scanner 4), le tout contrôlé par le logiciel Wincats.

Les plaques utilisées sont des plaques HPTLC en verre recouvertes d'une couche de 0,20 mm de gel de silice 60 F₂₅₄, 20×10 cm (Merck, Allemagne).

2.1.2. HPLC-UV-ELSD

Les analyses HPLC et les purifications (HPLC semi-preparative) ont été réalisées avec un système Agilent 1200 équipé d'un détecteur UV DAD et d'un ELSD Alltech 3300. Deux colonnes analytiques Luna C18 (Phenomenex, 250 x 4,6 mm ; 5 µm et 150 x 4,6 mm ; 5 µm), une colonne analytique Synergi Fusion-RP (Phenomenex 250 x 4,6 mm ; 4 µm) et une colonne semi-préparative Luna C18 (Phenomenex, 250 x 10 mm ; 5 µm) ont été utilisées.

L'acétonitrile, l'eau et l'isopropanol, de grade HPLC (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), ont été acidifiés par 0,1 % d'acide formique.

L'ELSD est paramétré dans les conditions suivantes :

- Température : 40 °C
- Débit gazeux : 1,5 L/min
- Gain : 1 (sauf mention contraire)

2.1.3. GC-MS et GC-FID

Les analyses GC-MS ont été réalisées sur un chromatographe Agilent 6890N équipé d'un spectromètre de masse Agilent 5973N sur colonne capillaire HP5-MS (polydiméthylsiloxane, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Agilent).

Les analyses GC-FID ont été réalisées sur un chromatographe Agilent 6890N muni d'un détecteur FID et d'une colonne capillaire apolaire HP1 (polydiméthylsiloxane, 50 m x 0,2 mm x 0,33 µm ; Interchim, Montluçon, France). Gaz vecteur hélium ; débit constant 1 mL/min; température des injecteurs et des détecteurs 250 °C; débit d'hydrogène: 40 mL/min; débit d'air: 450 mL/min ; N₂ 45 mL/min ; split ratio 1:100; volume d'injection 1 µL ; programmation de température 100 °C à 250 °C à 10 °C/min puis palier de 10 min à 250 °C.

2.1.4. CPC

L'ensemble des fractionnements CPC a été réalisé avec un appareil CPC (Armen instrument, Saint-Avé, France) équipé d'une colonne de 50 mL. Une pompe HPLC (Armen Instruments) délivre les solvants jusqu'à la colonne.

2.1.5. Chromatographie Flash

Le fractionnement a été réalisé sur une chromatographie flash (Grace, Reveleris, USA) sur une colonne de silice (Reveleris, Grace) (12 g, 40 µm, CV 17 mL) avec du toluène comme solvant d'élution à une vitesse de 18 mL/min.

3. CONDITIONS OPERATOIRES

3.1. Préparations d'échantillon

3.1.1. Préparation de l'huile essentielle de *Mentha spicata* L. et des extraits secs de *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson et de romarin

L'extrait de *Fallopia multiflora* est préparé à une concentration de 41,1 mg/mL dans du méthanol, alors que celui de romarin à 79,8 mg/mL également dans du méthanol. En ce qui concerne l'huile essentielle de *Mentha spicata* est diluée avec du méthanol afin d'obtenir une concentration de 69,0 mg/mL.

3.1.2. Préparation des produits cosmétique

Pour l'analyse HPTLC, 1,5 g de gel douche ont été solubilisé dans 4,5 mL d'isopropanol, 1,5 g de gel-crème ont été extrait avec 3 mL d'un mélange d'isopropanol et d'hexane (2:1 ; v/v). La phase contenant l'hexane a été récupérée puis analysée. En ce qui concerne la crème, 1,5 g ont été extraits à l'aide de 2 ml d'une solution d'hexane et d'acétate d'éthyle (9:1 ; v/v). La crème n'étant pas totalement soluble dans le solvant, l'extraction est suivie par une étape de centrifugation.

Pour les analyses en HPLC, la préparation d'échantillon du gel douche, est différente de celle pour l'analyse par HPTLC, pour cela, 1,5 g de gel douche a été extrait avec 10 mL d'un mélange d'eau, d'isopropanol et d'hexane (7:1:2 ; v/v/v). La phase organique a été lavée à l'aide de 4 mL d'un mélange d'isopropanol et d'eau (2:2 ; v/v). Cette étape de lavage a été réalisée 3 fois. Les phases organiques ont été réunies puis évaporées à sec avant d'en dissoudre le résidu dans 4 mL d'isopropanol. De même, pour l'analyse d'1,5 g de gel-crème, une extraction liquide-liquide a été effectuée avec 2 mL d'un mélange d'hexane et d'isopropanol (1:1 ; v/v). La phase contenant l'hexane a ensuite été lavée de la même façon que pour le gel douche mais avec 2 mL d'un mélange d'isopropanol et d'eau (1:1 ; v/v).

Pour l'analyse de la crème, le fractionnement de l'échantillon par chromatographie flash en se basant sur la méthode HPTLC a été réalisé. Pour cela, 1,5 g de crème a été dissout dans un mélange d'hexane et de THF (2/1 ; v/v), puis mélangé à 4,5 g de silice. Le mélange a ensuite été évaporé à sec pour être placé dans une cartouche adaptée à l'instrument de chromatographie flash. Le fractionnement a été réalisé sur une colonne de silice (12 g, 40 µm, CV 17 mL) avec du toluène comme solvant d'élution à une vitesse de 18 mL/min. Les fractions contenant l'actif ont été récupérées, évaporées à sec, puis dissoutes dans 1 mL d'isopropanol

3.1.3. Préparation des échantillons de solidage

Les échantillons de solidage ont été séchés dans une pièce ventilée, à température ambiante et dans le noir. Ensuite 2 g de plante sèche ont été broyés et extrait 2 fois à l'aide d'un bain à ultrasons avec un mélange méthanol/eau 30 :70 (v/v) (2 x 35 mL) pendant 2 x 4 h à une température de 5 °C. Après l'évaporation du méthanol, les extraits ont été lyophilisés. Pour l'analyse, chaque extrait a été solubilisé dans un mélange méthanol/eau 30 :70 (v/v) à une concentration de 100 g/L.

3.1.4. Préparation des plantes à tubercule

Pour chaque échantillon, les tubercules sont lavés, pelés et coupés longitudinalement et transversalement en deux parties égales. Les tubercules sont ensuite râpés à la main avec une râpe à fromage, puis congelés (à - 20 °C), et lyophilisés pendant deux jours. La matière sèche est conservée dans des sacs en papier scellés dans des sacs en polyéthylène. Pour l'extraction, 0,5 g de poudre de tubercules secs est prélevé dans un tube de centrifugation, puis solubilisé et extrait par 3 x 5 ml de méthanol (70 %) à l'aide d'un bain ultrasons pendant 30 min. La solution est centrifugée pendant 10 min (4000 rpm). Le surnageant est récupéré pour analyse.

3.1.5. Préparation des racines de kava

Les solutions de kava sont produites à partir des racines sèches. Pour cela, 10 g de poudre de racine finement tamisée sont mis à macérer toute la nuit dans un tube à centrifugeuse de 50 ml avec 30 ml d'acétone. Les tubes sont passés aux ultrasons pendant 30 min puis centrifugés à 4500 rpm. Le surnageant est récupéré pour analyse.

3.2. Fractionnement

Le fractionnement des deux extraits (DB6 et Ce-MY) a été effectué en mode ascendant avec comme système de solvant hexane, acétate d'éthyle, méthanol, eau (1 :1 :1 :1) (v/ v/ v/ v) (ARIZONA N) utilisant la phase supérieure comme phase mobile. Pour la phase d'équilibre, un flux 10 mL/min est appliqué à la phase stationnaire pendant 12 min à une vitesse de rotation de 2000 rpm, alors que celui de la phase mobile est de 6 mL/min à 2000 rpm pendant 12 min. Pour la phase d'élution, le débit de la phase mobile est de 6 mL/min, la vitesse de rotation de 2000 rpm et 5 ml de volume de collecte, pendant une durée de 30 min, pour finir par une extrusion avec la phase stationnaire à un débit de 10 mL/min. La détection UV est réglée à 240 et 355 nm, et le scan UV de 200 à 600 nm.

3.3. Isolement de la carvone, du resvératrol et de l'acide rosmarinique

HPLC semi-preparative

Les isollements ont été réalisés en phase inverse sur une colonne semi-préparative. LUNA C18 (250 mm x 10 mm x 5 µm) avec une pré-colonne LUNA C18 (Phenomenex, Le Pecq, France),

un débit constant 2,5 ml/min. Le détecteur DAD-UV est réglé avec trois longueurs d'onde de travail (237, 307; 330 nm).

L'éluant est composé de (A) eau + 0,1 % acide formique, (B) acétonitrile (0,1 % acide formique), (C) isopropanol et les gradients sont décrits dans le Tableau 41.

Tableau 41 : gradient d'éluant des méthodes d'isolement.

Méthode 1				Méthode 2				Méthode 3			
Temps (min)	A %	B %	C %	Temps (min)	A %	B %	C %	Temps (min)	A %	B %	C %
0	30	70	0	0	55	45	0	0	70	30	0
3	30	70	0	10	55	45	0	10	70	30	0
13	15	85	0	15	0	100	0	15	55	45	0
15	0	50	50	16	0	50	50	17	0	50	50
25	0	50	50	26	0	50	50	27	0	50	50
35	30	70	0	36	55	45	0	37	70	30	0

HPTLC semi-préparative

Les isolements ont été réalisés sur des plaques analytiques de silice HPTLC (Si 60 F₂₅₄) ayant subi au préalable un nettoyage avec du méthanol suivi d'un séchage à 120 °C pendant 30 min à l'étuve. Les paramètres de ces méthodes sont détaillés dans le Tableau 42.

Tableau 42 : paramètres des méthodes d'isolements.

	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3
Phase stationnaire	Plaque de silice HPTLC(Si60F ₂₅₄)		
Nombre de plaques	14	12	15
Application	Bande: 8 mm, vitesse application: 50 nL/s, distance entre les bandes: 8,8 mm, distance du bord: 20 mm		
Phase mobile	Toluène ; acétate d'éthyle (95 :5 ; v/v)	Chloroforme ; méthanol (9 :1 ; v/v)	Toluène ; acétate d'éthyle ; acide formique (5 :4 :1 ; v/v/v)
Développement	Chambre automatisé (20 min de saturation, 10 min de contrôle d'humidité)		
Visualisation			
• Lampe	UV $\lambda = 254$ nm	UV $\lambda = 366$ nm	UV $\lambda = 366$ nm
• scanner	$\lambda = 237$ nm	$\lambda = 307$ nm	$\lambda = 330$ nm

3.4. Technique de dosage des saponines totales par HPLC-ELSD

Les extraits bruts et la gamme étalon ont été analysés par HPLC avec la méthode suivante :

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)
Débit 1 mL/min

Volume d'injection	20 μ l
Gradient	0-5 min 15 % B et 85 % A ; 5-35 min 15-55 % B ; 35-40 min 55-100 % B ; 40-41 min 100 % B ; 41-42 min 100-40 % B et 0-60 % C ; 42-47 min 60 % C ; 47-50 min 60-0 % C, 40-15 % B et 0-85 % A
Gain ELSD	4

3.5. Technique de dosage des saponines totales par HPTLC

Les mêmes extraits que dans le paragraphe précédent ont été déposés à la vitesse de 50 nl/s (2 μ l déposés), sous forme de bandes de 8 mm de long, espacées des bords de 20 mm et espacées entre elles de 3,4 mm. Ainsi, 15 échantillons ont été déposés sur une même plaque. Les bandes ont été déposées à 8 mm du bord inférieur et ont migré sur 62 mm.

Après le dépôt des échantillons, la plaque a été placée pendant 4 h dans une cuve double fermée contenant 25 ml d'HCl concentré (cuve saturée en vapeurs), en ayant pris soin de ne jamais mettre en contact la plaque et le liquide. La plaque HPTLC a ensuite été chauffée pendant 20 min à 105 °C sur la plaque chauffante.

Après cette phase de pré-dérivation, la cuve nettoyée a été saturée pendant 20 min avec la phase mobile, constituée du système de solvants quaternaire : chloroforme/acide acétique/méthanol/eau (60:32:12:8). Le contrôle de l'humidité a été assuré pendant les 10 premières minutes à 33-38 % d'humidité, grâce à une solution à 33 % de MgCl₂. La plaque a ensuite été développée avec la phase mobile puis séchée pendant 5 min.

Enfin la plaque a été révélée par immersion pendant 1 s dans une solution d'anisaldéhyde sulfurique puis par chauffage à 105 °C pendant 5 min sur la plaque chauffante.

Les clichés ont été réalisés avant et immédiatement après révélation, à 366 nm et en lumière visible, dans le visualiseur. Les spectres UV ont été obtenus grâce au scanner. Les densitogrammes ont été effectués à 366 nm.

4. ETUDE STATISTIQUE

4.1. Retraitement lors du dosage des saponines totales

L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft).

L'Analyse de la variance a été calculée avec un test de Fisher (LSD). Deux échantillons sont considérés comme significativement différents avec $p < 0,05$.

La CAH et l'ACP ont été calculés à partir des valeurs obtenues avec l'ANOVA.

4.2. Retraitement lors de l'étude des racines de kavas

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel XLStat (Microsoft) pour les courbes de linéarité, analyse en composantes principales (ACP) et des statistiques descriptives sur les échantillons analysés.

REFERENCES

- [1] Définition de la chimie analytique. <http://www.universalis.fr/encyclopedie/chimie-analytique/> (23.02.2016),
- [2] Striegel, M.; Hill, J., *Thin-layer Chromatography for Binding Media Analysis*. The Getty Conservation Institute: Los Angeles, **1996**.
- [3] Sease, J. W., The Use of a Fluorescent Adsorbent for the Chromatography of Colorless Compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, **1947**, 2242-2244.
- [4] Stahl, E., History of the Development of Thin-Layer Chromatography. In *Thin-Layer Chromatography*, Stahl, E., Ed. Springer Berlin Heidelberg: **1965**; pp 1-4.
- [5] Wollish, E. G.; Schmall, M.; Hawrylyshyn, M., Thin-Layer Chromatography. Recent Developments in Equipment and Applications. *Anal. Chem.*, **33**, **1961**, 1138-1142.
- [6] Petty, C.; Cahoon, N., Applications of fourier transform Raman spectroscopy\3-IIIThe analysis of thin layer chromatography plates by near-infrared FT-Raman. *Spectrochim. Acta, Part A*, **49**, **1993**, 645-655.
- [7] Caudin, J. P.; Beljebbar, A.; Sockalingum, G. D.; Angiboust, J. F.; Manfait, M., Coupling FT Raman and FT SERS microscopy with TLC plates for in situ identification of chemical compounds. *Spectrochim. Acta, Part A*, **51**, **1995**, 1977-1983.
- [8] Koglin, E., Combining surface enhanced Raman scattering (SERS) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). *J. Mol. Struct.*, **173**, **1988**, 369-376.
- [9] Morlock, G.; Schwack, W., Coupling of planar chromatography to mass spectrometry. *Trends Analyt. Chem.*, **29**, **2010**, 1157-1171.
- [10] Morlock, G.; Brett, N., Correct assignment of lipophilic dye mixtures? A case study for high-performance thin-layer chromatography-mass spectrometry and performance data for the TLC-MS Interface. *J. Chromatogr. A*, **1390**, **2015**, 103-11.
- [11] Vorapalawut, N.; Martinez Labrador, M.; Pohl, P.; Caetano, M.; Chirinos, J.; Arnaudguilhem, C.; Bouyssiere, B.; Shiowatana, J.; Lobinski, R., Application of TLC and LA ICP SF MS for speciation of S, Ni and V in petroleum samples. *Talanta*, **97**, **2012**, 574-578.
- [12] Waksmundzka-Hajnos, M.; Sherma, J.; Kowalska, T., *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Taylor & Francis: Boca Raton, **2008**.
- [13] Bauer, K.; Gros, L.; Sauer, W., *Thin Layer Chromatography: An Introduction*. EM Science: Heidelberg, **1991**.
- [14] Poole, C. F.; Poole, S. K., *Chromatography Today*. Elsevier Science: Amsterdam, **2012**.
- [15] Reich, E.; Schibli, A., *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants* Thieme Medical: New York, **2006**.
- [16] Spangenberg, B.; Poole, C. F.; Weins, C., *Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey*. Springer: Berlin, **2011**.
- [17] Rouessac, F.; Rouessac, A.; Cruché, D., *Analyse chimique - 6ème édition - Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod: **2004**.

- [18] Sherma, J.; Fried, B., *Handbook of thin layer chromatography*. Marcel Dekker: New-York, **1996**.
- [19] Chantal, D.; Dominique, P., *Chromatographie planaire. Partie 1. Techniques de l'ingénieur* **2002**.
- [20] Mitra, S., *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. John Wiley & Sons: Hoboken, **2004**.
- [21] Kowalska, T.; Sherma, J., *Preparative Layer Chromatography*. Taylor & Francis: Boca Raton, **2006**.
- [22] Hahn-Deinstrop, E., *Applied Thin-Layer Chromatography*. Wiley: Weinheim, **2007**.
- [23] Fried, B.; Sherma, J., *Practical Thin-Layer Chromatography: A Multidisciplinary Approach*. Taylor & Francis: Boca Raton, **1996**.
- [24] Bethke, H.; Santi, W.; Frei, R. W., Data-Pair Technique, a New Approach to Quantitative Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, **1974**, 392-397.
- [25] Illustration et fonctionnement du système de cuve Vario (CAMAG). http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/products/chromatogram_development/hptlc_vario_system.cfm (22.02.2016),
- [26] Jaiswal, P. K., *High-performance Thin-layer Chromatography in Food Analysis: HPTLC*. CBS Publ. & Distributors Pvt.: New Delhi, **2010**.
- [27] Bernard-Savary, P.; Poole, C. F., Instrument platforms for thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1421**, **2015**, 184-202.
- [28] Wall, P. E.; Chemistry, R. S. o., *Thin-layer Chromatography: A Modern Practical Approach*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2005**.
- [29] Chaplin, M. F., *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. IRL Press: **1986**.
- [30] Fonctionnement de l'AMD. http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/products/chromatogram_development/automated_multiple_development_amd2.cfm (04.10.2015),
- [31] Camag note d'application: Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in foodstuffs. http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/camag_laboratory/methods.cfm (04.10.2015),
- [32] Srivastava, M. M., *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*. Springer Heidelberg, **2010**.
- [33] Halpaap, H.; Ripphahn, J., Performance, data and results with various chromatographic systems and various detection patterns in high-performance thin-layer chromatography. *Chromatographia*, **10**, **1977**, 613-23.
- [34] Jork, H.; Funk, W.; Fischer, W. R.; Wimmer, H., *Thin-Layer Chromatography, Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods: Volume 1a: Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents I*. Wiley: Weinheim, **1989**.
- [35] Touchstone, J. C., *Practice of Thin Layer Chromatography*. Wiley: New-York, **1992**.
- [36] Geiss, F., *Fundamentals of thin layer chromatography (planar chromatography)*. Hüthig: Heidelberg, **1987**.

- [37] Fried, B.; Sherma, J., *Thin-Layer Chromatography, Revised And Expanded*. Taylor & Francis: New-York, **1999**.
- [38] Hostettmann, K.; Marston, A.; Hostettmann, M., *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*. Springer: Heidelberg, **1998**.
- [39] Mincsovcics, E.; Ott, P. G.; Alberti, A.; Boszormenyi, A.; Hethelyi, E. B.; Szoke, E.; Kery, A.; Lemberkovics, E.; Moricz, A. M., In-situ clean-up and OPLC fractionation of chamomile flower extract to search active components by bioautography. *JPC - J. Planar Chromat.*, **26**, **2013**, 172-179.
- [40] Klebovich, I.; Mincsovcics, E.; Szunyog, J.; Ludanyi, K.; Karancsi, T.; Ujszaszy, K.; Kiss, B. D.; Vekey, K., Isolation and identification of metabolites of 3H- and 14C-deramciclone by OPLC-digital autoradiography online sample collection and mass spectrometry. *JPC - J. Planar Chromat.*, **11**, **1998**, 394-399.
- [41] Akhavan, M.; Jahangiri, S.; Shafaghat, A., Studies on the antioxidant and antimicrobial activity and flavonoid derivatives from the fruit of *Trigonostadium brachytaenium* (Boiss.) Alava. *Industrial Crops and Products*, **63**, **2015**, 114-118.
- [42] Khan, A.; Rahman, M.; Islam, M. S., Isolation and Bioactivity of a Xanthone Glycoside from *Peperomia pellucida*. *Life Sci. Med. Res*, **2010**, **2010**.
- [43] Delazar, A.; Biglari, F.; Esnaashari, S.; Nazemiyeh, H.; Talebpour, A.-H.; Nahar, L.; Sarker, S. D., GC-MS analysis of the essential oils, and the isolation of phenylpropanoid derivatives from the aerial parts of *Pimpinella aurea*. *Phytochemistry*, **67**, **2006**, 2176-2181.
- [44] Elgindi, M. R.; Abd Alkhalik, S. M.; Melek, F. R.; Hassan, M. A.; Abdelazie, H. S., Saponins isolated from *Polyscias guilfoylei* F. Araliaceae. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **6**, **2015**, 545-549.
- [45] Selvaraj, K.; Chowdhury, R.; Bhattacharjee, C., Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern *Azolla microphylla* and evaluation of free radical scavenging activity. *Int. J. Pharm. Sci.*, **5**, **2013**, 743-9.
- [46] Chierrito, T. P. C.; de Castro Cunha, A.; de Oliveira, A. J. B.; Koike, L.; Gonçalves, R. A. C., *Use of associated chromatographic techniques in bio-monitored isolation of bioactive monoterpene indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum**. INTECH Open Access Publisher: **2012**.
- [47] Yinusa, I.; NDUKWE, I.; AMUPITAN, J. O., Isolation of stigmasterol from aerial plant part of *Spilanthes Acmella* Murr. *World Journal of Life Sciences and Medical Research*, **2**, **2012**, 77.
- [48] Emam, S. S., Comparative Study of the Alkaloidal and Tannin Contents of Some *Reseda* species. *J. appl. sci. res.*, **6**, **2010**, 888-896.
- [49] Su, X.; Li, X.; Tao, H.; Zhou, J.; Wu, T.; Chou, G.; Cheng, Z., Simultaneous isolation of seven compounds from *Glehnia littoralis* roots by off-line overpressured layer chromatography guided by a TLC antioxidant autographic assay. *J. Sep. Sci.*, **36**, **2013**, 3644-3650.
- [50] Moricz, A. M.; Szarka, S.; Ott, P. G.; Hethelyi, E. B.; Szoke, E.; Tyihak, E., Separation and identification of antibacterial chamomile components using OPLC, bioautography and GC-MS. *Medicinal chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))*, **8**, **2012**, 85-94.

- [51] Király-Véghely, Z.; Kátay, G.; Tyihák, E.; Merillon, J.-M., Separation of stilbene isomers from red wine by overpressured-layer chromatography. *JPC - J. Planar Chromat.*, **17**, **2004**, 4-8.
- [52] KATAY, G.; SZECSEI, A.; TYIHAK, E., Separation of fumonisins by OPLC. *JPC - J. Planar Chromat.*, **14**, **2001**, 53-56.
- [53] Nyiredy, S., *Planar Chromatography: A Retrospective View for the Third Millennium*. Springer Scientific Publisher: Debrecen, **2001**.
- [54] Touchstone, J. C., *Quantitative Thin Layer Chromatography*. Wiley: Californie, **1973**.
- [55] Mehrotra, S.; Kirar, V.; Misra, K.; Paul, N. S., Quantitative estimation of gallic acid in *Rosa sinensis*, *Embllica officinalis* and *Syzygium aromaticum* by HPTLC. *IRJP*, **4**, **2013**, 87-89, 3 pp.
- [56] Kandasamy, J.; Moscow, S., Validated method for estimation of curcumin from different varieties of *Curcuma longa*. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, **4**, **2013**, 1004-1010.
- [57] Rajopadhye, A. A.; Namjoshi, T. P.; Upadhye, A. S., Rapid validated HPTLC method for estimation of piperine and piperlongumine in root of *Piper longum* extract and its commercial formulation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **22**, **2012**, 1355-1361.
- [58] Basudan, O. A.; Alam, P.; Siddiqui, N. A.; Alajmi, M. F.; Alrehaily, A. J.; Alqasoumi, S. I.; Abdel-Kader, M. S.; Alam, P.; Donia, A. E. R. M., Development and validation of a high-performance thin-layer chromatographic method for the determination of biomarker β -amyryn in the leaves of different *Ficus* species. *JPC - J. Planar Chromat.*, **28**, **2015**, 223-228.
- [59] Lotz, A.; Milz, B.; Spangenberg, B., A New and Sensitive TLC Method to Measure Trans-Resveratrol in Red Wine. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, **38**, **2015**, 1104-1108.
- [60] Gałan, A.; Jesionek, W.; Majer-Dziedzic, B.; Lubicki, Ł.; Choma, I., Investigation of different extraction methods on the content and biological activity of the main components in *Coffea arabica* L. extracts. *JPC - J. Planar Chromat.*, **28**, **2015**, 178-183.
- [61] U, K. I.; Katare, D. P.; Aeri, V., Densitometric Validation and Optimisation of Polyphenols in *Ocimum sanctum* Linn by High Performance Thin-layer Chromatography. *Phytochem. Anal.*, **26**, **2015**, 237-46.
- [62] Skorek, M.; Kozik, V.; Kowalska, T.; Sajewicz, M., Thin-layer chromatographic quantification of trans-resveratrol in cosmetic raw materials of botanic origin. *JPC - J. Planar Chromat.*, **28**, **2015**, 167-172.
- [63] Dai, W.; Hu, L.; Ji, L.; Li, J.; Bi, K.; Li, Q., A Comprehensive Method for Quality Evaluation of *Houttuyniae Herba* by a Single Standard to Determine Multi-components, Fingerprint and HPTLC Method. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, **31**, **2015**, 535-41.
- [64] Ou, L.; He, Q.; Ji, Z.; Li, K.; Tian, S., Quantitative High-Performance Thin-Layer Chromatographic Analysis of Three Active Compounds in Gall of *Quercus infectoria* Olivier (Fagaceae) and Use of Thin-Layer Chromatography–2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl to Screen Antioxidant Component. *JPC - J. Planar Chromat.*, **28**, **2015**, 300-306.
- [65] Fazlollahi, F.; Kongmanas, K.; Tanphaichitr, N.; Suh, J.; Faull, K.; Gopen, Q., Lipidomic Profiling of Mastoid Bone and Tissue from Patients with Chronic Otomastoiditis. *Int. Arch. Otorhinolaryngol.*, **19**, **2015**, 141-150.

- [66] Ahmed, A.; Ahmad, S.; Ur-Rahman, M.; Tajuddin, T. E.; Verma, R.; Afzal, M.; Mehra, P. S., Quantitative Analysis of Bacoside A from *Bacopa monnieri*, Collected from Different Geographic Regions of India, by High-Performance Thin-Layer Chromatography–Densitometry. *JPC - J. Planar Chromat.*, **28**, **2015**, 287-293.
- [67] Kumbhalkar, B.; Tamhankar, S.; Upadhye, A., Development of a High-Performance Thin-Layer Chromatographic Method for Quantification of Cucurbitacin B in Bottle Gourd (*Lagenaria siceraria*) for Quality Control. *JPC - J. Planar Chromat.*, **28**, **2015**, 294-299.
- [68] Ramesh, B.; Sarma, V. U. M.; Kumar, K.; Babu, K. S.; Devi, P. S., Simultaneous Determination of Six Marker Compounds in *Piper nigrum* L. and Species Comparison Study Using High-Performance Thin-Layer Chromatography–Mass Spectrometry. *JPC - J. Planar Chromat.*, **28**, **2015**, 280-286.
- [69] Ahamad, J.; Hassan, N.; Amin, S.; Mir, S., Development and validation of a high-performance thin-layer chromatographic-densitometric method for the quantification of swertiamarin in traditional bitters and formulations. *JPC - J. Planar Chromat.*, **28**, **2015**, 61-66.
- [70] Alam, P.; Al-Rehaily, A.; Siddiqui, N.; Al-Sheddi, E.; Shakeel, F., A stability-indicating assay of biomarker bergenin in the aerial parts of *Flueggea virosa* by a validated high-performance thin-layer chromatographic-densitometric method. *JPC - J. Planar Chromat.*, **28**, **2015**, 54-60.
- [71] Mishra, A.; Saklani, S.; Parcha, V.; Milella, L., A developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method for the quantitative determination of quercetin in *Satyrion nepalense* tubers. *JPC - J. Planar Chromat.*, **27**, **2014**, 444-448.
- [72] Patel, D.; Vora, A., Development and validation of a high-performance thin-layer chromatographic method for the simultaneous determination of genistein and vitexin in seeds of *Vigna mungo*. *JPC - J. Planar Chromat.*, **27**, **2014**, 472-476.
- [73] Sengar, N.; Joshi, A.; Prasad, S. K.; Hemalatha, S., Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activities of standardized root extract of *Jasminum sambac*. *J. Ethnopharmacol.*, **160**, **2015**, 140-8.
- [74] Jyotshna; Srivastava, P.; Killadi, B.; Shanker, K., Uni-dimensional double development HPTLC-densitometry method for simultaneous analysis of mangiferin and lupeol content in mango (*Mangifera indica*) pulp and peel during storage. *Food Chem.*, **176**, **2015**, 91-98.
- [75] Sayed, N.; Hegazy, M.; Abdel-Aleem, E.; Abdelkawy, M.; Abdelfatah, R., Two validated liquid chromatographic methods for the simultaneous determination of flumethasone pivalate, its related substance (flumethasone), and clioquinol. *JPC - J. Planar Chromat.*, **27**, **2014**, 466-471.
- [76] Chewchinda, S.; Ruangwises, N.; Gritsanapan, W., Comparative Analysis of Rhein Content in *Cassia fistula* Pod Extract by Thin-Layer Chromatographic-Densitometric and TLC Image Methods. *JPC - J. Planar Chromat.*, **27**, **2014**, 29-32.
- [77] Agatonovic-Kustrin, S.; Grace, P.; Morton, D., Evaluation of high-performance thin-layer chromatography for the quantification of phenylpropanoids in commercial Echinacea products. *JPC - J. Planar Chromat.*, **27**, **2014**, 260-266.
- [78] Krüger, S.; Urmann, O.; Morlock, G. E., Development of a planar chromatographic method for quantitation of anthocyanes in pomace, feed, juice and wine. *J. Chromatogr. A*, **1289**, **2013**, 105-118.

- [79] Wagner, H.; Bladt, S., *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer: Heidelberg, **1996**.
- [80] Brassuer, T.; Angenot, L., Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol—PEG 400. *J. Chromatogr. A*, **351**, **1986**, 351-355.
- [81] Harborne, J. B., *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Springer: London, **1998**.
- [82] Bimal, N.; Sekhon, B. S., High Performance Thin layer Chromatography: Application in Pharmaceutical Science. *PharmTechMedica*, **2**, **2013**, 323-333.
- [83] Hostettmann, K.; Wolfender, J.-L., The search for biologically active secondary metabolites. *Pestic. Sci.*, **51**, **1997**, 471-482.
- [84] Nostro, A.; Germanò, M. P.; D'Angelo, V.; Marino, A.; Cannatelli, M. A., Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**, **2000**, 379-384.
- [85] Salazar, M. O.; Viarengo, G.; Sciara, M. I.; Kieffer, P. M.; Garcia Vescovi, E.; Furlan, R. L. E., A Thin-layer Chromatography Autographic Method for the Detection of Inhibitors of the Salmonella PhoP–PhoQ Regulatory System. *Phytochem. Anal.*, **2013**, n/a-n/a.
- [86] Horváth, G.; Jám bor, N.; Végh, A.; Böszörményi, A.; Lemberkovics, É.; Héthelyi, É.; Kovács, K.; Kocsis, B., Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC–bioautography. *Flavour Fragr. J.*, **25**, **2010**, 178-182.
- [87] Wang, J.; Yue, Y. D.; Tang, F.; Sun, J., TLC screening for antioxidant activity of extracts from fifteen bamboo species and identification of antioxidant flavone glycosides from leaves of *Bambusa. textilis* McClure. *Molecules*, **17**, **2012**, 12297-311.
- [88] Saha, J.; Mukherjee, S.; Gupta, K.; Gupta, B., High-performance thin-layer chromatographic analysis of antioxidants present in different parts of *Saraca asoca* (Roxb.) de Wilde. *J. Pharm. Res.*, **7**, **2013**, 798-803.
- [89] Sahgal, G.; Ramanathan, S.; Sasidharan, S.; Mordi, M. N.; Ismail, S.; Mansor, S. M., In vitro antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swietenia mahagoni* seed extracts. *Molecules*, **14**, **2009**, 4476-4485.
- [90] Zhao, J.; Zhang, J.-s.; Yang, B.; Lv, G.-P.; Li, S.-P., Free Radical Scavenging Activity and Characterization of Sesquiterpenoids in Four Species of *Curcuma* Using a TLC Bioautography Assay and GC-MS Analysis. *Molecules*, **15**, **2010**, 7547.
- [91] Sahgal, G.; Ramanathan, S.; Sasidharan, S.; Mordi, M. N.; Ismail, S.; Mansor, S. M., In Vitro antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swietenia mahagoni* seed extracts. *Molecules*, **14**, **2009**, 4476-85.
- [92] Marston, A., Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *J. Chromatogr. A*, **1218**, **2011**, 2676-2683.
- [93] Horvath, G.; Jambor, N.; Kocsis, E.; Boszormenyi, A.; Lemberkovics, E.; Hethelyi, E.; Kovacs, K.; Kocsis, B., Role of direct bioautographic method for detection of antistaphylococcal activity of essential oils. *Nat. Prod. Commun.*, **6**, **2011**, 1379-84.
- [94] Choma, I. M.; Jesionek, W., TLC-direct bioautography as a high throughput method for detection of antimicrobials in plants. *Chromatography*, **2**, **2015**, 225-238.

- [95] Naveed, R.; Hussain, I.; Tawab, A.; Tariq, M.; Rahman, M.; Hameed, S.; Mahmood, M. S.; Siddique, A. B.; Iqbal, M., Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against Salmonella and other multi-drug resistant bacteria. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, **2013**, 265.
- [96] Suleimana, M. M.; McGaw, L. J.; Naidoo, V.; Eloff, J. N., Detection of Antimicrobial Compounds by Bioautography of Different Extracts of Leaves of Selected South African Tree Species. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 7, **2010**, 64-78.
- [97] Dewanjee, S.; Gangopadhyay, M.; Bhattacharya, N.; Khanra, R.; Dua, T. K., Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *J. Pharm. Anal.*, 5, **2015**, 75-84.
- [98] Définition d'adultérer. <http://www.cnrtl.fr/definition/adult%C3%A9rer> (28.02.2016),
- [99] Report : Global fragrances, perfumes market to reach \$45.6B by 2018
http://www.perfumerflavorist.com/fragrance/trends/Report-Global-Perfume-Market-To-Reach-About-456B-by-2018-208332331.html?utm_source=Related+Items&utm_medium=website&utm_campaign=Related+Items (04.10.2015),
- [100] Le communiqué de presse de COSMEBIO du 31 janvier 2012.
<http://www.cosmebio.org/fr/info-presse-professionnels.php?page=8> (04.10.2015),
- [101] Booker, A.; Frommenwiler, D.; Johnston, D.; Umealajekwu, C.; Reich, E.; Heinrich, M., Chemical variability along the value chains of turmeric (*Curcuma longa*): a comparison of nuclear magnetic resonance spectroscopy and high performance thin layer chromatography. *J. Ethnopharmacol.*, 152, **2014**, 292-301.
- [102] Wagner, H.; Bauer, R.; Melchart, D.; Xiao, P. G.; Staudinger, A., *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines: Thin-layer and High Performance Liquid Chromatography of Chinese Drugs*. Springer: Vienna, **2011**.
- [103] Reynertson, K.; Mahmood, K., *Botanicals: Methods and Techniques for Quality & Authenticity*. CRC Press: Boca Raton, **2014**.
- [104] Blumenthal, M., Industry alert: Plantain adulterated with digitalis. *HerbalGram*, **1997**.
- [105] Conséquence de substitution d'une plante par une autre.
<http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2004/np3/fr/> (03.10.2015),
- [106] Cheng, Y.; Chen, M.; Tong, W., An Approach to Comparative Analysis of Chromatographic Fingerprints for Assuring the Quality of Botanical Drugs. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, 43, **2003**, 1068-1076.
- [107] Ristivojević, P.; Andrić, F. L.; Trifković, J. Đ.; Vovk, I.; Stanisavljević, L. Ž.; Tešić, Ž. L.; Milojković-Opsenica, D. M., Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts. *J. Chemom.*, **2014**, n/a-n/a.
- [108] Huck-Pezzei, V. A.; Bittner, L. K.; Pallua, J. D.; Sonderegger, H.; Abel, G.; Popp, M.; Bonn, G. K.; Huck, C. W., A chromatographic and spectroscopic analytical platform for the characterization of St John's wort extract adulterations. *Anal. Methods*, 5, **2013**, 616-628.
- [109] Singh, S.; Prasad, B.; Savaliya, A. A.; Shah, R. P.; Gohil, V. M.; Kaur, A., Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs. *Trends Analyt. Chem.*, 28, **2009**, 13-28.

- [110] Do, T. K. T.; Theocharis, G.; Reich, E., Simultaneous detection of 3 PDE5-Inhibitors and their 8 analogs in lifestyle products and screening for adulterants by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *J. AOAC Int.*, **2015**.
- [111] Mathon, C.; Ankli, A.; Reich, E.; Bieri, S.; Christen, P., Screening and determination of sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPTLC-UV densitometry. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, *31*, **2014**, 15-20.
- [112] Fernandez, X.; Chemat, F.; Do, T. K. T., *Les huiles essentielles: Vertus et applications*. Vuibert: Paris, **2012**.
- [113] Association, H. P. T. L. C. *Lavender oil (Lavandula angustifolia)*; **29/04/2012**.
- [114] Association, H. P. T. L. C. *Ylang-Ylang oil (Cananga odorata)*; **29/04/2012**.
- [115] EDQM, *European Pharmacopoeia, 7th edition*. Strasbourg, **2013**.
- [116] *British Pharmacopoeia, Volume III. The Stationary Office, Medicine and Healthcare products Regulatory Agency*. London, **2009**.
- [117] *United States Pharmacopoeia, 31st edition—The National Formulary, 26th edition. The United States Pharmacopoeial Convention*. Rockville, **2008**.
- [118] USP <203> High-performance thin layer chromatography procedure for identification of articles of botanical origin https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/GC_pdf_USP38/c203_1SUSP38.pdf (01.11.2015),
- [119] USP <1064> Identification of articles of botanical origin by high-performance thin layer chromatography procedure. https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/GC_pdf_USP38/c1064_1SUSP38.pdf (01.11.2015),
- [120] Pharmacopoeia, E. Ph. Eur. Reference Standards. <http://www.edqm.eu/en/ph-eur-reference-standards-627.html> (11/05/2015),
- [121] USP, *USP dietary supplements compendium - Volume 1*. USP: Rockville, **2015**.
- [122] USP, *USP dietary supplements compendium - Volume 2*. USP: Rockville, **2015**.
- [123] Shewiyo, D. H.; Kaale, E.; Risha, P. G.; Dejaegher, B.; Smeyers-Verbeke, J.; Vander Heyden, Y., HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: a review of the method development and validation steps. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *66*, **2012**, 11-23.
- [124] Nyiredy, S., Planar chromatographic method development using the PRISMA optimization system and flow charts. *J. Chromatogr. Sci.*, *40*, **2002**, 553-63.
- [125] Sarker, S. D.; Latif, Z.; Gray, A. I., *Natural Products Isolation*. Humana Press: New Jersey, **2005**.
- [126] Jean Leybros, G. C., *Extraction Liquide-Liquide. Techniques de l'ingénieur* **1970**.
- [127] Marchal, L.; Legrand, J.; Foucault, A., Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. *Chemical record (New York, N.Y.)*, *3*, **2003**, 133-43.
- [128] Photo d'un système CPC. <http://www.gazettelabo.fr/archives/201/page%2018.pdf> (12.03.2016),

- [129] Berthod, A.; Hassoun, M.; Ruiz-Angel, M. J., Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 383, **2005**, 327-340.
- [130] Foucault, A. P., *Centrifugal Partition Chromatography*. Taylor & Francis: New York, **1994**.
- [131] Toribio, A. Développement de nouvelles approches méthodologiques en Chromatographie de Partage Centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt. Reims, **2007**.
- [132] Meurant, G., *Fundamentals and Techniques*. Elsevier Science: Amsterdam, **1991**.
- [133] Simpson, N. J. K., *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. CRC Press: New-York, **2000**.
- [134] Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A., Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, 43, **1978**, 2923-2925.
- [135] Système de chromatographie flash. <https://grace.com/pharma-and-biotech/en-us/flash-chromatography> (13.03.2016),
- [136] Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S.; Duke, J. A.; Brielmann, H. L., *Natural Products from Plants, Second Edition*. CRC Press: Boca Raton, **2006**.
- [137] Pétrier, C.; Gondrexon, N.; Boldo, P., Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur*, **2008**.
- [138] Wang, L.; Weller, C. L., Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, **2006**, 300-312.
- [139] Vinatoru, M.; Toma, M.; Radu, O.; Filip, P. I.; Lazurca, D.; Mason, T. J., The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4, **1997**, 135-139.
- [140] Maran, J. P.; Priya, B.; Nivetha, C. V., Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from *Bougainvillea glabra* flowers. *Industrial Crops and Products*, 63, **2015**, 182-189.
- [141] Chen, M.; Zhao, Y.; Yu, S., Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172, **2015**, 543-550.
- [142] Chemat, S.; Lagha, A.; AitAmar, H.; Bartels, P. V.; Chemat, F., Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, **2004**, 188-195.
- [143] Regulation, C., Amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. In 358/2014, Official Journal of the European Union: **2014**.
- [144] Michel, T.; Fernandez, X.; Kerdudo, A., Analyse des principes actifs et substances réglementées en cosmétique. *Techniques de l'ingénieur* **2015**.
- [145] Salvador, A.; Chisvert, A., *Analysis of Cosmetic Products*. Elsevier Science: **2011**.
- [146] Cabaleiro, N.; de la Calle, I.; Bendicho, C.; Lavilla, I., An overview of sample preparation for the determination of parabens in cosmetics. *Trends Analyt. Chem.*, 57, **2014**, 34-46.

- [147] Pathak, Y. V., *Handbook of Nutraceuticals: Ingredients, Formulations, and Applications*. Taylor & Francis: **2011**.
- [148] Cabaleiro, N.; De La Calle, I.; Bendicho, C.; Lavilla, I., Current trends in liquid–liquid and solid–liquid extraction for cosmetic analysis: a review. *Anal. Methods*, **5**, **2013**, 323-340.
- [149] Camag note d'application: Rapid content uniformity test of 6 batches of Coenzyme Q10 in soft gel capsules by HPTLC
http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/camag_laboratory/methods.cfm?ao=-1 (24.01.2016),
- [150] Wall, M. E.; Wani, M. C.; Brown, D. M.; Fullas, F.; Olwald, J. B.; Josephson, F. F.; Thornton, N. M.; Pezzuto, J. M.; Beecher, C. W. W.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Kinghorn, A. D., Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *Phytomedicine*, **3**, **1996**, 281-285.
- [151] Wall, M. E.; Taylor, H.; Ambrosio, L.; Davis, K., Plant antitumor agents III: A convenient separation of tannins from other plant constituents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **58**, **1969**, 839-841.
- [152] Yoon, K. D.; Chin, Y.-W.; Kim, J., Centrifugal partition chromatography:: Application to natural products in 1994-2009. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, **33**, **2010**, 1208-1254.
- [153] Pelletier, S. W.; Chokshi, H. P.; Desai, H. K., Separation of Diterpenoid Alkaloid Mixtures Using Vacuum Liquid Chromatography. *Journal of Natural Products*, **49**, **1986**, 892-900.
- [154] Qadir, M. I.; Khan, T. J.; Abbas, G.; Ahmad, B.; Janbaz, K. H.; Ali, M., Antibacterial activity of Vacuum liquid chromatography (VLC) isolated fractions of chloroform extracts of seeds of *Achyranthes aspera*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, **34**, **2012**.
- [155] Seo, Y.; Hoch, J.; Abdel-Kader, M.; Malone, S.; Derveld, I.; Adams, H.; Werkhoven, M. C. M.; Wisse, J. H.; Mamber, S. W.; Dalton, J. M.; Kingston, D. G. I., Bioactive Saponins from *Acacia tenuifolia* from the Suriname Rainforest¹. *J. Nat. Prod.*, **65**, **2002**, 170-174.
- [156] Liu, Q. T.; Kinderlerer, J. L., Preparative thin-layer chromatographic separation and subsequent gas chromatographic-mass spectrometric analysis of monoacylglycerols derived from butter oil by fungal degradation. *J. Chromatogr. A*, **855**, **1999**, 617-624.
- [157] Zhou, L.; Zheng, H.; Tang, Y.; Yu, W.; Gong, Q., Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnology Letters*, **35**, **2013**, 631-7.
- [158] Loret, M.-O.; Morel, S., Isolation and Structural Characterization of Two New Metabolites from *Monascus*. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, **2010**, 1800-1803.
- [159] Galand, N.; Ernouf, D.; Montigny, F.; Dollet, J.; Pothier, J., Separation and Identification of Cannabis Components by Different Planar Chromatography Techniques (TLC, AMD, OPLC). *J. Chromatogr. Sci.*, **42**, **2004**, 130-134.
- [160] Coll, J.; Tandron, Y., Neo-clerodane diterpenes from *Teucrium fruticans*. *Phytochemistry*, **65**, **2004**, 387-392.
- [161] Mantegna, S.; Binello, A.; Boffa, L.; Giorgis, M.; Cena, C.; Cravotto, G., A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chem.*, **130**, **2012**, 746-750.
- [162] Shao, Y.; He, K.; Zheng, B.; Zheng, Q., Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for quantitative analysis of the six major kavalactones in *Piper methysticum*. *J. Chromatogr. A*, **825**, **1998**, 1-8.

- [163] Zhang, Y.; Smuts, J. P.; Dodbiba, E.; Rangarajan, R.; Lang, J. C.; Armstrong, D. W., Degradation Study of Carnosic Acid, Carnosol, Rosmarinic Acid, and Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis* L.) Assessed Using HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **60**, **2012**, 9305-9314.
- [164] Ahmad, I.; Aqil, F.; Owais, M., *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*. Wiley: **2006**.
- [165] Dominique, P.; Michel, S. A.; Chantal, D., *Chromatographie planaire. Partie 2. Techniques de l'ingénieur, base documentaire : TIB385DUO*, **2007**.
- [166] Laurençon, L. Contribution à l'étude phytochimique de *Solidago virgaurea* : application dans le domaine bucco-dentaire et étude de la variabilité phytochimique pour la création d'une filière. . Université de Nice Sophia Antipolis, **2013**.
- [167] Bader, G.; Seibold, M.; Tintelnot, K.; Hiller, K., Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 2: Relationships between the structures of glycosides of polygalacic acid and their activities against pathogenic *Candida* species. *Die Pharmazie*, **55**, **2000**, 72-74.
- [168] Kiselova, Y.; Ivanova, D.; Chervenkov, T.; Gerova, D.; Galunska, B.; Yankova, T., Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytotherapy research*, **20**, **2006**, 961-965.
- [169] Bader, G.; Plohmann, B.; Hiller, K.; Franz, G., Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. *Die Pharmazie*, **51**, **1996**, 414-417.
- [170] Pietta, P.; Gardana, C.; Mauri, P.; Zecca, L., High-performance liquid chromatographic analysis of flavonol glycosides of *Solidago virgaurea*. *J. Chromatogr. A*, **558**, **1991**, 296-301.
- [171] Starks, C. M.; Williams, R. B.; Goering, M. G.; O'Neil-Johnson, M.; Norman, V. L.; Hu, J.-F.; Garo, E.; Hough, G. W.; Rice, S. M.; Eldridge, G. R., Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). *Phytochemistry*, **71**, **2010**, 104-109.
- [172] Lam, J., Polyacetylenes of *Solidago virgaurea*: Their seasonal variation and NMR long-range spin coupling constants. *Phytochemistry*, **10**, **1971**, 647-653.
- [173] Bader, G.; Wray, V.; Hiller, K., The main saponins from the aerial parts and the roots of *Solidago virgaurea* subsp. *virgaurea*. *Planta Med.*, **61**, **1995**, 158-161.
- [174] Chevalier, M.; Medioni, E.; Prêcheur, I., Inhibition of *Candida albicans* yeast-hyphal transition and biofilm formation by *Solidago virgaurea* water extracts. *J. Med. Microbiol.*, **61**, **2012**, 1016-1022.
- [175] Laurençon, L.; Sarrazin, E.; Chevalier, M.; Prêcheur, I.; Herbette, G.; Fernandez, X., Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Solidago virgaurea alpestris* with inhibiting activity of *Candida albicans* yeast-hyphal conversion. *Phytochemistry*, **86**, **2013**, 103-111.
- [176] Madinier, I.; Geribaldi, M. Composition containing saponins. FR08/07412, WO2010072923A1, **2008**.
- [177] Miyase, T.; Inose, Y.; Ueno, A., Studies on the constituents of *Solidago virgaurea* L. III. Structures of solidagosaponins XXI-XXIX. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, **1994**, 617-24.
- [178] Inose, Y.; Miyase, T.; Ueno, A., Studies on the Constituents of *Solidago virgaurea* L. II. Structures of Solidagosaponins X-XX. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, **1992**, 946-953.

- [179] Inose, Y.; Miyase, T.; Ueno, A., Studies on the constituents of *Solidago virga-aurea* L. I. Structural elucidation of saponins in the herb. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, **1991**, 2037-42.
- [180] Bruneton, J., *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants (2e ed. - retirage broch)*. Lavoisier: Paris, **2008**.
- [181] Oleszek, W.; Bialy, Z., Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002–2005). *J. Chromatogr. A*, **1112**, **2006**, 78-91.
- [182] Huhman, D. V.; Berhow, M. A.; Sumner, L. W., Quantification of saponins in aerial and subterranean tissues of *Medicago truncatula*. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, **2005**, 1914-20.
- [183] Rupasinghe, H. P.; Jackson, C. J.; Poysa, V.; Di Berardo, C.; Bewley, J. D.; Jenkinson, J., Soyasapogenol A and B distribution in soybean (*Glycine max* L. Merr.) in relation to seed physiology, genetic variability, and growing location. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, **2003**, 5888-94.
- [184] Avula, B.; Wang, Y.-H.; Rumalla, C. S.; Ali, Z.; Smillie, T. J.; Khan, I. A., Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx. Using UPLC, HPLC and HPTLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **56**, **2011**, 895-903.
- [185] Majinda, R. R., Extraction and isolation of saponins. *Methods Mol. Biol.*, **864**, **2012**, 415-26.
- [186] Wang, L.; Wang, X.; Yuan, X.; Zhao, B., Simultaneous analysis of diosgenin and sarsasapogenin in *Asparagus officinalis* byproduct by thin-layer chromatography. *Phytochem. Anal.*, **22**, **2011**, 14-7.
- [187] Arrêté français du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi (30/01/2015),
- [188] Lebot, V., *Tropical Root and Tuber Crops: Cassava, Sweet Potato, Yams and Aroids*. CABI: **2009**.
- [189] Sautour, M.; Mitaine-Offer, A.-C.; Lacaille-Dubois, M.-A., The *Dioscorea* genus: a review of bioactive steroid saponins. *J Nat Med*, **61**, **2007**, 91-101.
- [190] Rakotobe - Randriamoelivony, L. Etudes chimiques et toxicologiques de deux plantes toxiques malgaches *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. (Dioscoreaceae) et *Rhodocodon madagascariensis* Baker (Hyacinthaceae). Université d'Antananarivo **2009**.
- [191] Djerassi, C., Steroid research at Syntex: "the pill" and cortisone. *Steroids*, **57**, **1992**, 631-41.
- [192] Oomah, B. D., *Herbs, Botanicals and Teas*. Taylor & Francis: Boca Raton, **2000**.
- [193] Bonfill, M.; Mangas, S.; Cusido, R. M.; Osuna, L.; Pinol, M. T.; Palazon, J., Identification of triterpenoid compounds of *Centella asiatica* by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, **20**, **2006**, 151-3.
- [194] Adesanya, S. A.; Ogundana, S. K.; Roberts, M. F., Dihydrostilbene phytoalexins from *Dioscorea bulbifera* and *D. dumentorum*. *Phytochemistry*, **28**, **1989**, 773-774.
- [195] Siméoni, P., *Atlas du Vanouatou (Vanuatu)*. Editions Geo-consulte: **2009**.
- [196] Carte du Vanouatou. <http://www.diplomatie.gouv.fr/fr/dossiers-pays/vanuatu/> (11/07/2013),

- [197] Description du projet Végé-culture. <http://www.vegeculture.fr/> (11/07/2013),
- [198] Description de l'objectif 4 du projet Végé-culture. <http://www.vegeculture.fr/pages/les-axes-du-projet/etude-de-la-diversite-chimique.html> (11/07/2013),
- [199] Champagne, A.; Hilbert, G.; Legendre, L.; Lebot, V., Diversity of anthocyanins and other phenolic compounds among tropical root crops from Vanuatu, South Pacific. *J. Food Comp. Anal.*, **24**, **2011**, 315-325.
- [200] Champagne, A.; Bernillon, S.; Moing, A.; Rolin, D.; Legendre, L.; Lebot, V., Carotenoid profiling of tropical root crop chemotypes from Vanuatu, South Pacific. *J. Food Comp. Anal.*, **23**, **2010**, 763-771.
- [201] Lebot, V.; Legendre, L., HPTLC screening of taro hybrids (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) with high flavonoids and antioxidants contents. *Plant Breeding*, **134**, **2015**, 129-134.
- [202] Teschke, R.; Sarris, J.; Lebot, V., Kava hepatotoxicity solution: A six-point plan for new kava standardization. *Phytomedicine*, **18**, **2011**, 96-103.
- [203] Siméoni, P.; Lebot, V., Identification of factors determining kavalactone content and chemotype in Kava (*Piper methysticum* Forst. f.). *Biochem. Syst. Ecol.*, **30**, **2002**, 413-424.
- [204] Mozziconacci, C., *Kava, plante du Pacifique*. Grain Sable 98: Noumea, **2007**.
- [205] Lebot, V.; Levesque, J., Evidence for conspecificity of *Piper methysticum* forst. f. and *Piper wichmannii* C. DC. *Biochem. Syst. Ecol.*, **24**, **1996**, 775-782.
- [206] Lebot, V.; Levesque, J., Genetic control of kavalactone chemotypes in *Piper methysticum* cultivars. *Phytochemistry*, **43**, **1996**, 397-403.
- [207] Israili, Z. H.; Smisman, E. E., Synthesis of kavain, dihydrokavain, and analogs. *J. Org. Chem.*, **41**, **1976**, 4070-4074.
- [208] Singh, Y. N., Kava: an overview. *J. Ethnopharmacol.*, **37**, **1992**, 13-45.
- [209] Olsen, L. R.; Grillo, M. P.; Skonberg, C., Constituents in Kava Extracts Potentially Involved in Hepatotoxicity: A Review. *Chem. Res. Toxicol.*, **24**, **2011**, 992-1002.
- [210] Bilia, A. R.; Scalise, L.; Bergonzi, M. C.; Vincieri, F. F., Analysis of kavalactones from *Piper methysticum* (kava-kava). *J. Chromatogr. B*, **812**, **2004**, 203-214.
- [211] Jhoo, J.-W.; Freeman, J. P.; Heinze, T. M.; Moody, J. D.; Schnackenberg, L. K.; Beger, R. D.; Dragull, K.; Tang, C.-S.; Ang, C. Y. W., In Vitro Cytotoxicity of Nonpolar Constituents from Different Parts of Kava Plant (*Piper methysticum*). *J. Agric. Food Chem.*, **54**, **2006**, 3157-3162.
- [212] Zhou, P.; Gross, S.; Liu, J.-H.; Yu, B.-Y.; Feng, L.-L.; Nolte, J.; Sharma, V.; Piwnicka-Worms, D.; Qiu, S. X., Flavokawain B, the hepatotoxic constituent from kava root, induces GSH-sensitive oxidative stress through modulation of IKK/NF- κ B and MAPK signaling pathways. *FASEB J.*, **24**, **2010**, 4722-4732, 10.1096/fj.10-163311.
- [213] Russmann, S.; Lauterburg, B. H.; Helbling, A., Kava hepatotoxicity. *Ann. Intern. Med.*, **135**, **2001**, 68-9.
- [214] Strahl, S.; Ehret, V.; Dahm, H. H.; Maier, K. P., Necrotizing hepatitis after taking herbal remedies. *Dtsch Med Wochenschr*, **123**, **1998**, 1410-4.

- [215] Campo, J. V.; McNabb, J.; Perel, J. M.; Mazariegos, G. V.; Hasegawa, S. L.; Reyes, J., Kava-induced fulminant hepatic failure. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 41, **2002**, 631-2.
- [216] Gow, P. J.; Connelly, N. J.; Hill, R. L.; Crowley, P.; Angus, P. W., Fatal fulminant hepatic failure induced by a natural therapy containing kava. *Med. J. Aust.*, 178, **2003**, 442-3.
- [217] Communiqué du gouvernement de la Nouvelle-Calédonie du 22 mai 2012. <http://www.gouv.nc/portal/pls/portal/docs/1/19684003.PDF> (29.02.2016),
- [218] Gruenwald, J. Eurotrends: Welcome Back Kava? . [http://www.nutraceuticalsworld.com/issues/2006-04/view_columns/eurotrends-welcome-back-kava-/](http://www.nutraceuticalsworld.com/issues/2006-04/view_columns/eurotrends-welcome-back-kava/) (25.01.2016),
- [219] Ernst, E., A re-evaluation of kava (Piper methysticum). *Br J Clin Pharmacol*, 64, **2007**, 415-7.
- [220] Teschke, R.; Genthner, A.; Wolff, A., Kava hepatotoxicity: Comparison of aqueous, ethanolic, acetonetic kava extracts and kava-herbs mixtures. *J. Ethnopharmacol.*, 123, **2009**, 378-384.
- [221] Grace, R. F., Kava drinking in Vanuatu--a hospital based survey. *Pac Health Dialog*, 10, **2003**, 41-4.
- [222] Mills, S. Y.; Steinhoff, B., Kava-kava: a lesson for the phytomedicine community. *Phytomedicine*, 10, **2003**, 261-2.
- [223] Organization, W. H., *Assessment of the Risk of Hepatotoxicity with Kava Products*. World Health Organization: **2007**.
- [224] Vanuatu, R. o., Kava Act 2002. In *NO. 7 OF 2002*, **2002**.
- [225] Teschke, R.; Lebot, V., Proposal for a Kava Quality Standardization Code. *Food Chem. Tox.*, 49, **2011**, 2503-2516.

Thi Kieu Tiên DO

Evaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels.

Résumé:

L'analyse des extraits naturels est de nos jours réalisée à l'aide de nombreuses techniques d'analyse plus ou moins complexes. Parmi ces techniques, l'HPTLC est bien connue en tant qu'outil d'identification phytochimique. Le but de cette thèse a été d'étudier l'apport de cette technique dans l'analyse des extraits naturels en dehors de son aspect « identification ».

Ce travail a conduit à différentes études permettant de mettre en évidence des applications peu connues de l'HPTLC comme par exemple son utilisation comme technique semi-preparative. De plus, sa capacité à avoir une phase stationnaire résistante à différentes matrices a été testée. Il a ainsi pu être démontré que cette caractéristique lui donnait l'avantage de procéder à des préparations d'échantillon plus minimaliste que les autres techniques de chromatographie. L'aspect quantitatif a été évalué et comparé à l'HPLC et a ainsi pu démontrer que des résultats équivalents sont obtenus, néanmoins, le manque de résolution et de précision ne permettent pas à l'HPTLC d'attendre les exigences parfois demandées. Enfin, l'analyse d'un grand nombre d'échantillon a permis de montrer un des avantages de l'HPTLC dans le retraitement de données, que ce soit par regroupement visuel des profils obtenus ou par retraitement statistique.

Mots clés : développement de méthode, isolement, adultération, discrimination.

Evaluation of the performance of the High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) in the analysis (qualitative and quantitative) of secondary metabolites in natural extracts.

Summary:

The analysis of natural extracts is nowadays performed with numerous techniques more or less complex. Among these techniques, the HPTLC is well known as a tool for phytochemical identification. The aim of this thesis was to study the contribution of this technique in the analysis of natural extracts outside its "identification" appearance.

This work led to various studies to highlight little known applications of HPTLC such as its use as a semi-preparative technique. In addition, its ability to have a robust stationary phase to different matrices was tested. It has been demonstrated that this characteristic gave the advantage of proceeding more minimalist sample preparation than other chromatographic techniques. The quantitative aspect was evaluated and compared with HPLC and was able to demonstrate that similar results are obtained, however, the lack of resolution and accuracy do not allow the HPTLC has to wait sometimes requested requirements. Finally, the analysis of a large number of samples has allowed to show an advantage of the HPTLC in the data reprocessing, whether by visual grouping or obtained by statistical retreatment profiles.

Key words: method development, isolation, adulteration, discrimination.