



HAL
open science

Développement de méthodologies analytiques innovantes dans le domaine des compléments alimentaires à base de plantes : séparation, purification et caractérisation de marqueurs spécifiques

Mélissa Clément Chami

► To cite this version:

Mélissa Clément Chami. Développement de méthodologies analytiques innovantes dans le domaine des compléments alimentaires à base de plantes : séparation, purification et caractérisation de marqueurs spécifiques. Chimie analytique. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR4113 . tel-02888832

HAL Id: tel-02888832

<https://theses.hal.science/tel-02888832>

Submitted on 3 Jul 2020

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Développement de méthodologies analytiques
innovantes dans le domaine des compléments
alimentaires à base de plantes

Séparation, purification et caractérisation de marqueurs
spécifiques

Mélissa CLÉMENT CHAMI

Laboratoire Métabolome et Valorisation de la Biodiversité Végétale
(MVBV)

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en CHIMIE
d'Université Côte d'Azur
Dirigée par :** Xavier Fernandez
Soutenue le : 19.12.2019

Devant le jury, composé de :

Serge Antonczak, Professeur, Université Côte d'Azur
Béatrice Baghdikian, Maître de conférences,
Université Aix-Marseille
Pierre Champy, Professeur, Université Paris Sud
Karine Faure, Chargée de recherche, CNRS - ISA
Francis Hadji-Minaglou, Docteur en pharmacie,
Directeur scientifique Botanicert
Thomas Michel, Maître de conférences, Université
Côte d'Azur

Développement de méthodologies analytiques innovantes
dans le domaine des compléments alimentaires à base de
plantes : séparation, purification et caractérisation de
marqueurs spécifiques

Jury :

Président du jury

Serge Antonczak, Professeur, Université Côte d'Azur

Rapporteurs

Pierre Champy, Professeur, Université Paris Sud

Karine Faure, Chargée de recherche, CNRS – ISA Lyon

Examineurs

Béatrice Baghdikian, Maître de conférences, Université Aix-Marseille

Thomas Michel, Maître de conférences, Université Côte d'Azur

Invités

Francis Hadji-Minaglou, Docteur en pharmacie, Directeur scientifique
Botanicert

Titre :

Développement de méthodologies analytiques innovantes dans le domaine des compléments alimentaires à base de plantes : séparation, purification et caractérisation de marqueurs spécifiques

Résumé

L'une des principales contraintes dans l'analyse de produits naturels est l'accès au standard analytique de molécules considérées comme marqueurs d'une plante ou faisant l'objet de restrictions car potentiellement dangereuses. Les problématiques qui en découlent ont tissé le fil conducteur de l'ensemble des travaux de cette thèse.

Le premier objectif a été d'étudier les performances qu'offre le couplage entre l'HPTLC et la spectrométrie de masse via l'Interface MS 2 dans le domaine de l'identification de marqueurs de plantes employées dans les compléments alimentaires. Il apparaît que dans le cadre de contrôle de routine, ce couplage a toute sa place car les informations obtenues pourraient permettre l'identification de plantes selon des monographies issues de la pharmacopée européenne. Cependant, dans le cadre de la recherche de nouveaux composés, les résultats obtenus restent malgré tout aléatoires.

Le deuxième objectif a été d'étudier la CPC dans le cadre de l'isolement de marqueurs à l'échelle préparative. Pour cela, les valépotriates, molécules soumises à diverses réglementations à travers le monde et dont l'accès au standard analytique est difficile ont été choisies comme analytes modèles. Après un développement de méthode à l'échelle analytique, un transfert d'échelle non linéaire se basant sur le concept de l'« espace libre entre les pics » a été évalué. Pour la première fois ce modèle a été utilisé pour isoler non pas une, mais deux molécules qui en plus, coéluent. La CPC a permis d'isoler en une étape, deux molécules structurellement proches à un niveau de pureté supérieur à 95% et avec un taux de recouvrement de 90%. De plus, cette étude a permis de confirmer la structure du 7-homovaltrate qui faisait, jusqu'alors, l'objet de discussion.

Le troisième et dernier objectif de cette thèse a été d'évaluer l'apport de l'HRMS pour la caractérisation et le dosage de familles de composés. Pour illustrer cette étude, les alcaloïdes pyrrolizidiniques (AP), qui sont des molécules responsables de dizaines de milliers d'intoxications à travers le monde, ont été sélectionnés. L'emploi d'une HRMS a permis de mettre en perspective la pertinence des résultats issus d'un dosage des seuls AP dont le standard analytique est disponible car elle a permis d'identifier d'autres AP dans une mauvaise herbe fréquemment incriminée dans la contamination de denrées alimentaires.

Mots clés : HPTLC, HPTLC-MS, CPC, LC-HRMS, identification, isolement, transfert d'échelle, dosage, valépotriates, alcaloïdes pyrrolizidiniques, complément alimentaire

Title :

Development of innovative analytical methodologies in the field of plants based dietary supplements : separation, isolation, identification of characteristics markers

Summary

Principal limitation to natural product analysis is the access to the analytical standards of molecules considered as markers or potentially dangerous. Their emerging issues are the common thread of this doctoral work.

The first objective was to study the performances of HPTLC-MS coupling *via* Interface MS 2 in the field of plants markers identifications that are commonly used in dietary supplements elaboration. It seems that this coupling is really useful for routine control, because resulting mass spectrometric informations may permit plants identifications in accordance with pharmacopoeias monographs. But, in case of structural elucidation of new active compounds, the obtained results are extremely uncertain.

The second objective was to evaluate CPC performances in the field of markers isolation at an industrial scale. To illustrate this study, valepotriates have been chosen. These secondary metabolites are regulated all over the world but the access to their analytical standards remains problematic. After a chromatographic method development at an analytical scale, a non lineary scale up based on the « free space between peak » concept has been performed. For the first time, this concept has been applied to two molecules which, in addition, are co-eluting. CPC allowed a one step isolation of two structurally close molecules at over 95% purity and with 90% recovery. More over, this study permitted to confirm the structure of 7-homovaltrate which was ambiguous.

The third and last objectif was to evaluate HRMS for the characterization and the quantification of family of compounds. To illustrate this study, pyrrolizidine alkaloids family (PA) has been selected. These molecules are responsible of tens of thousands deaths around the world. HRMS afforded identification of AP which analytical standard is not available in weed commonly incriminated in food contamination. This put into perspective the relevance of the results obtained through a method that only quantifies available analytical standards of AP. Furthermore, HRMS informations allowed to discriminate a molecule wich had the same fragment ions as the AP but which wasn't an AP.

Keywords : HPTLC, HPTLC-MS, CPC, LC-HRMS, identification, isolation, scale up, dosage, valepotriates, pyrrolizidine alkaloids, dietary supplement

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Xavier Fernandez.

J'ai pu partager avec toi tous les moments difficiles (et heureux !) de cette thèse...et il y en a eu ! Tu es un exemple d'humanité et de professionnalisme pour bon nombre de tes doctorants. Merci pour tes conseils, toujours sages et mesurés et ta disponibilité, toujours entière. Et plus simplement, merci pour avoir rendu tout plus facile.

Je tiens ensuite à remercier Thomas Michel, examinateur de cette thèse. Bien que tu n'aies pas été co-directeur de cette thèse, tu as agi tout comme. Tu as toujours démontré de l'intérêt pour ce que je faisais et tes conseils avisés ont permis la réalisation de ces travaux. Merci de m'avoir accueillie à l'ICN pour me former à la CPC et pour tes corrections que tu réalises plus vite que ton ombre (après, c'est facile de tout mettre en rouge =).

Je remercie Francis Hadji-Minaglou et Loïc Loffredo, directeurs scientifique et technique de l'entreprise Botanicert à travers laquelle j'ai pu bénéficier d'une bourse CIFRE. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre entreprise et pour la confiance que vous avez su m'accorder. Nos débuts furent laborieux, mais nous avons su tirer profits de nos ambitions communes. Merci pour cette leçon de vie professionnelle.

Je souhaite également remercier mon jury de thèse, Monsieur Pierre Champy et Madame Karine Faure pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit, Madame Béatrice Baghdikian et Monsieur Thomas Michel pour avoir consenti à examiner mes travaux ainsi que Monsieur Serge Antonczak pour avoir accepté de présider ce jury.

Je tiens aussi à remercier les entreprises avec lesquelles j'ai collaborées au cours de cette thèse. Merci à Pierre Bernard Savary et Jérémy Mercier de Chromacim, Tiên Do de Camag, et Freddy Delsenne de Waters pour les supports techniques qu'ils m'ont offerts. Merci à Céline Lequemener et Grégoire Audo de Gilson pour leur aide et leur gentillesse. Merci à François Gray d'Erini pour l'aide apportée et la belle personne que tu es. Merci à Élodie Bouju et René de Vaumas d'Extrasynthèse pour notre jolie collaboration et le savoir que vous m'avez transmis.

Je remercie aussi Lionel Massi, Marc Gaysinski et Nicolas Baldovini de l'ICN pour leur aide, leurs conseils et leurs encouragements.

Je remercie mes collègues de Galderma et Novartis qui ont marqué à jamais mon début de carrière. Vous m'avez transmis la passion de la chimie et le courage de me lancer dans un doctorat.

Je remercie mes collègues de travail : Laura, Julien, Axel *aka* Jojo l'asticot, Émilie, Bénédicte, Anne-Sophie et Florence. Merci pour votre bonne humeur.

Hortense Plainfossé et Mélissa Feuillatre, merci pour votre oreille attentive, vos rires et les moments que nous avons partagés dans la joie, la bonne et la mauvaise humeur

Valentin Hilaire, mon collègue et mon ami, j'ai été heureuse de voir ta vieille tête tous les matins. Tu m'as fait rêver tous les jours, tu es bien plus qu'une diva du morning, de l'afternoon et de la night. Merci copain.

Camille Scotto et Pauline Burger comment vous dire merci ? C'est compliqué de le faire en quelques lignes... ce qui est sûr c'est que vous n'êtes pas des copines de bonbons ! Vous avez toujours été là, même à 4h du matin... vous avez été d'un soutien indéfectible et des tatas d'enfer ! Merci ma team. Je vous aime tellement.

Mon tonton et sa femme. Merci pour avoir été là dans les moments où j'avais le plus besoin de vous. Merci pour nos mercredis soir qui m'étaient si précieux. Vous avez contribué à rendre tout ce travail possible.

Ma maman, mon papa, ma sœur et ma Nonna. J'en suis là grâce à vous et à votre amour.

Mon mari, mon lion, mon partenaire. Tu m'as encouragé à faire cette thèse et tu as su faire ressortir le meilleur de moi-même. Nous avons relevé tous les défis que la vie nous a réservés durant ces quatre années et la rétrospective est belle. Bhebak.

Aya, ma fille. Tu as illuminé chaque jour de ce doctorat.

Je tiens aussi à remercier deux personnes qui me sont chères et que j'ai perdu au cours de cette thèse :

Anne Blaevoet, mon amie bienveillante. Tu m'as toujours encouragée et soutenue et ce, jusqu'à ton dernier souffle. Tu me manques. Tu manques à tous.

Mon grand-père. Nonno, je n'arrive pas à écrire au passé quand il s'agit de toi. Tu es ma force et la pierre angulaire de tous mes principes. Je te dois tant. J'arrive à vivre ton absence car je sais que tu es parti en sachant tout l'amour que je te porte.

Anne, Nonno, cette thèse vous est dédiée.

Préambule

Le domaine de la chimie pharmaceutique a mis au point de nombreux médicaments d'origine synthétique, et malgré un encadrement réglementaire très strict, des incidents ayant eu des répercussions à l'échelle mondiale ont été à déplorer. Parmi eux, le scandale du Distilbène® : ce médicament supposé prévenir les fausses couches a largement été prescrit à travers le monde dès les années 1940. Or, de nombreuses pathologies affectant les organes sexuels des enfants exposés *in utero* ont été décelés¹. L'exemple du Vioxx®, médicament anti-inflammatoire prescrit dans les années 1990, peut aussi être pris. Il est lié à un nombre anormalement élevé d'infarctus du myocarde, si bien qu'une étude *post* commercialisation sur près de 7000 personnes a dû être stoppée car le nombre de décès avait doublé dans le panel prenant ce médicament par rapport au panel où le placebo était administré².

Ces scandales ont conduit de nombreux consommateurs à désavouer les produits issus de la chimie préférant se tourner vers l'utilisation de produits naturels dont les effets et l'utilisation sont établis depuis des siècles... voire des millénaires !

L'analogie la plus remarquable a été soulignée par les découvertes dévoilant que certains Hommes préhistoriques utilisaient déjà des plantes à des fins médicinales³. En effet, alors que le goût amer et l'absence d'apport nutritif de l'achillée millefeuille (*Achillea millefolium*) rendent cette plante peu attractive, des composés chimiques caractéristiques de cette plante (dérivés d'azulènes et coumariniques) ont été mis en évidence dans du tartre dentaire d'un squelette néandertalien, laissant ainsi penser qu'ils l'utilisaient dorénavant et déjà pour ses propriétés hémostatiques⁴.

Infime est donc la frontière entre l'usage actuel des plantes et celui d'autrefois. Mais au fil des siècles, l'Homme a promptement saisi le potentiel du règne végétal à travers sa large gamme de domaines d'applications pouvant contribuer à l'amélioration de sa qualité de vie. C'est pourquoi, un rapport plus rationalisé s'est développé : la transmission du savoir et son bon usage sont devenues primordiales. Du Papyrus d'Ebers (16 000 ans av. J.C) où les prescriptions de 150 plantes médicinales ont été décrites, en passant par le traité *De materia medica* de Dioscoride (60 ans ap. J.C.) exposant l'usage de 600 plantes à des fins médicales, jusqu'aux dernières publications des actuelles pharmacopées, les sociétés ont évolué jusqu'à aboutir à un accès réglementé aux plantes ayant des vertus médicinales.

Mais de nos jours, qu'en est 'il ? Les plantes ont longtemps fait l'objet d'un monopôle pharmaceutique censé être le garant de leur bonne utilisation...jusqu'à ce que certaines d'entre elles n'en soient libérées.

Alors que les dérives déjà observées dans le secteur très réglementé de la pharmacie sont ahurissantes quand sera-t-il de l'usage de plantes dites médicinales pouvant être commercialisées et produites par tous ?

Liste des abréviations	19
------------------------	----

Introduction générale	22
-----------------------	----

Chapitre 1 : Bibliographie

1	Contexte commercial et réglementaire du complément alimentaire	30
1.1	Le secteur du complément alimentaire : une importante disparité	30
1.1.1	En France	30
1.1.1.1	Les professionnels	30
1.1.1.2	Circuits de distributions	31
1.1.1.3	Segments de marché	32
1.1.2	Un autre regard : cas de l'Allemagne, du Canada et des Etats Unis	33
1.2	Vers une rationalisation de l'usage des plantes : la réglementation du complément alimentaire à base de plantes	34
1.2.1	Filiation de la réglementation française	34
1.2.2	Contexte réglementaire : des incidents sanitaires	35
1.2.3	La réglementation du complément alimentaire à base de plantes	38
1.2.3.1	Principe de reconnaissance mutuelle	38
1.2.3.2	Etiquetage	39
1.2.3.2.1	Mentions obligatoires	39
1.2.3.2.2	Allégations de santé	42
1.2.3.3	Procédure d'enregistrement	43
1.2.3.3.1	Principe de reconnaissance mutuelle	43
1.2.3.3.2	Première mise sur le marché	43
1.2.3.4	Description de l'arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi	45
2	Etat de l'art : l'analyse du complément alimentaire à base de plantes	48
2.1	La phytochimie au service de la botanique	48
2.1.1	Les classifications	48
2.1.2	Perspectives	49
2.2	Phytochimie des plantes	50
2.3	Classification des composés	51
2.3.1	Métabolisme primaire	51
2.3.2	Métabolisme secondaire ou spécialisé	52
2.3.3	Cartographie du métabolisme des organismes végétaux	52
2.4	Les différents outils d'analyses phytochimiques	56
2.4.1	Préparation d'échantillon	56
2.4.1.1	Analyse microscopique	57
2.4.1.2	Analyse par chromatographie et/ou spectroscopie	58
2.4.2	Techniques d'analyses	62
2.4.2.1	Techniques chromatographiques	62
2.4.2.2	Techniques spectroscopiques	64
2.4.3	La métabolomique	66
2.5	Disparités des méthodes d'analyse employées par les industriels pour contrôler les matières premières	67
2.5.1	Discussion sur quelques cas pratiques	67
2.5.1.1	Cas du dosage par spectrophotométrie UV	68
2.5.1.1.1	Dosage des composés d'intérêt du safran selon ISO 3632-2	69
2.5.1.1.2	Dosage des polyphénols totaux dans le thé ⁷⁹	69
2.5.1.2	Cas du dosage par HPLC-UV	70
2.5.2	Cas des pharmacopées	71
2.5.2.1	Principe des pharmacopées	71
2.5.2.2	Pharmacopées disponibles	72
3	Conclusion	84

Chapitre 2 : Résultats et discussion

Partie 1: Le couplage de la chromatographie planaire haute performances à la spectrométrie de masse basse résolution : une nouvelle approche pour l'identification rapide de métabolites marqueurs ?

1	Introduction	92
2	Rappels bibliographiques sur l'HPTLC	93
2.1	Le dépôt	94
2.2	Le choix de la phase stationnaire	95
2.2.1	Les différentes natures de phase stationnaire	95
2.2.2	Les principaux mécanismes de rétention chromatographique	96
2.2.2.1	La chromatographie d'adsorption	96
2.2.2.2	La chromatographie de partage	97
2.3	La phase mobile	97
2.3.1	Classification des solvants selon Snyder	97
2.3.2	La sélection des solvants	99
2.3.3	Système d'optimisation « PRISMA »	100
2.4	Les différents modes de développement	101
2.4.1	Développement vertical automatisé	101
2.4.2	D'autres modes de développement	102
2.5	La détection des composés	104
2.5.1	La détection directe	104
2.5.2	La dérivation	105
2.5.3	Analyse des résultats obtenus par imagerie	107
2.5.3.1	Imagerie simple	107
2.5.3.2	Densitomètre	107
2.6	Le couplage HPTLC-MS	108
2.6.1	Description de l'Interface MS 2 Camag®	109
2.6.2	Le spectromètre de masse utilisé dans le cadre de l'étude (ESI-SQD)	110
2.6.2.1	La source d'ionisation par électrospray	110
2.6.2.2	L'analyseur simple quadripôle	111
3	Plantes et standards analytiques étudiés	112
3.1	Importance du choix de la phase stationnaire pour la détection de marqueurs par HPTLC-IMS2-SQD	115
3.1.1	Résultats	116
3.1.2	Conclusion	118
3.2	Étude de la nature du bruit de fond	118
3.2.1	Silice de grade HPTLC	118
3.2.2	Silice de grade MS	120
3.2.3	Phase inverse RP18	120
3.2.4	Conclusion sur la nature du bruit de fond	121
3.3	Étude du pouvoir d'extraction de différents solvants via le couplage HPTLC-IMS2	122
3.4	Performances du couplage HPTLC-IMS2-SQD en conditions réelles	125
3.4.1	Les standards détectés après migration dans une phase mobile	125
3.4.1.1	Stratégie et résultats	125
3.4.1.2	Conclusion sur l'effet de la migration sur la détection des composés	127
3.4.2	Les composés détectés dans des plantes après migration	128
3.4.2.1	Stratégie et résultats	128
3.4.2.2	Conclusion sur les composés détectés dans les plantes étudiées	132
4	Conclusion	133

Partie 2: La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

1	Introduction	138
2	La Valeriana officinalis dans les compléments alimentaires : contexte réglementaire et analytique	141
2.1	Usages et activités de V. officinalis	141

2.2	Molécules actives de <i>V. officinalis</i> : les acides valérieniques et les valépotriates	141
3	La <i>Valeriana officinalis</i> et les problématiques posées par une monographie issue de la pharmacopée européenne	143
3.1	Identification de <i>Valeriana officinalis</i> selon Ph. Eur.	143
3.2	Dosage des constituants de <i>Valeriana officinalis</i> proposé par la Ph. Eur.	144
4	Les valépotriates : quelles approches pour leur dosage ?	145
4.1	Phytochimie des valépotriates	145
4.2	Le dosage des valépotriates totaux	152
5	La chromatographie de partage centrifuge	154
5.1	Principes et fonctionnement de la CPC	154
5.1.1	Le coefficient de partage	154
5.1.2	La sélectivité	156
5.1.3	Choix de la phase mobile et sens de pompage	156
5.1.4	Le débit de la phase mobile et la vitesse de rotation du rotor	158
5.1.4.1	Le taux de rétention de phase stationnaire	158
5.1.4.2	Les différents types d'écoulement	159
6	Développement d'une méthode d'isolement de valépotriates par chromatographie de partage centrifuge à l'échelle analytique et préparative	159
6.1	Préparation d'échantillon : source végétale et extraction des valépotriates	160
6.1.1	Choix de la source végétale	160
6.1.2	Étude phytochimique de <i>C. ruber</i>	161
6.1.3	Optimisation de l'extraction des valépotriates	162
6.1.3.1	Choix du solvant d'extraction	163
6.1.3.2	Apport d'un broyeur à billes à usage professionnel	164
6.1.3.3	Choix de la méthode d'activation	165
6.1.3.4	Étude de l'épuisement de la plante par extractions successives	167
6.1.3.5	Conclusion sur l'optimisation de l'extraction des valépotriates	168
6.2	Développement d'une méthode de séparation des valépotriates de <i>C. ruber</i> à l'échelle analytique et préparative.	168
6.2.1	Description du concept de l'« Espace libre entre les pics »	169
6.2.2	Résultats et discussions	171
6.2.2.1	Recherche d'un système biphasique de solvants	171
6.2.2.2	Développement de la méthode chromatographique à l'échelle du laboratoire	173
6.2.2.2.1	Optimisation de la vitesse de rotation sur une SCPC-50	173
6.2.2.2.2	Optimisation du débit de la phase mobile sur une SCPC-50	175
6.2.2.2.3	Optimisation de la taille du rotor : séparation sur une SCPC-100	177
6.2.2.3	Transfert d'échelle d'une SCPC-100 à une SCPC-1000	178
6.2.2.4	Elucidation structurale des composés isolés par RMN	180
7	Conclusion	182

Partie 3: Le couplage LC-HRMS : une technique indispensable à l'analyse des compléments alimentaires à base de plantes ?

1	Introduction	188
2	Les alcaloïdes pyrrolizidiniques : toxicité, réglementation et analyse	189
2.1	Contexte phytosanitaire	189
2.2	Contexte réglementaire	190
2.3	Phytochimie	191
2.3.1	Leur diversité structurale	191
2.3.2	Leur voie de biosynthèse	195
2.4	Les méthodes d'analyse des alcaloïdes pyrrolizidiniques	196
2.4.1	Leur évolution	196
2.4.2	De nos jours	196
3	Résultats et discussion	197
3.1	Développement de la méthode LC-HRMS	197
3.1.1	Optimisation des paramètres chromatographiques	197
3.1.2	Optimisation des tensions de capillaire et de cône	200
3.2	Étude des fragments caractéristiques des AP	202
3.3	Étude exhaustive et dosage des AP de <i>Senecio vulgaris</i>	203

3.3.1	Identification des AP	204
3.3.2	Dosage des AP totaux	206
3.4	Etude d'un extrait commercial d'Urtica dioica (ortie)	207
4	Conclusion	209

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

1	Partie expérimentale de l'étude sur le couplage TLC-MS	214
1.1	Solvants utilisés	214
1.2	Standards analytiques et botaniques	214
1.3	Préparation des échantillons	214
1.4	Les analyses UPLC-PDA-ESI-SQD	214
1.5	Le couplage TLC-MS	215
1.6	Application via l'ATS4	215
1.7	Essais de restitution	215
1.8	Droites de calibration externe	216
2	Partie expérimentale de l'étude sur la CPC	216
2.1	Solvants utilisés	216
2.2	Plante étudiée et procédé d'extraction	216
2.3	Analyses UPLC-PDA-ESI-HRMS	217
2.4	Droite de calibration externe	217
2.5	Les instruments CPC	217
2.6	Sélection du système biphasique de solvants	218
2.7	Méthode de séparation par CPC	218
3	Partie expérimentale de l'étude sur l'apport de la LC-HRMS	219
3.1	Solvants utilisés	219
3.2	Standards analytiques et botaniques	219
3.3	Préparation des échantillons	219
3.4	Droite de calibration externe	219
3.5	Analyses UPLC-PDA-ESI-HRMS	220

	Conclusion générale et perspectives	222
--	--	------------

	Bibliographie	228
--	----------------------	------------

	Annexes	250
--	----------------	------------

Annexe 1 : Droites de calibration externe

Annexe 2 : Spectres RMN

Annexe 3 : Certificats d'analyses des standards botaniques étudiés

Annexe 4 : Rapport d'analyses d'un dosage des alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux

Annexe 5 : Lettres de lancement rédigées à des fins commerciales pour l'entreprise Botanicert

Liste des abréviations

μ	Masse volumique
α	Sélectivité
σ	Largeur à mi-hauteur
2-MeTHF	2-méthyltetrahydrofurane
ACN	Acétonitrile
ADC2	Chambre de développement de chez Camag
ADN	Acide désoxyribonucléique
AESA	Autorité européenne de sécurité des aliments
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AP	Alcaloïde pyrrolizidinique
ASAP	Sonde d'analyse des solides a pression atmosphérique
ASE	Extraction par solvant accélérée
ATS4	Déposeur automatique d'échantillon de chez Camag
BEH	Bridged ethyl siloxane/silica hybrid
BfArm	Institut fédéral allemand des médicaments et des dispositifs médicaux
BfR	Institut fédéral allemand d'évaluation des risques
CCC	Chromatographie à contre courant
CH₂	Méthylène
CMC	Carbonate de diméthyle
CN	3-cyanopropyl
CO₂	Dioxyde de carbone
COSY	Correlation spectroscopy
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
Cr10HGO	10-hydroxygéraniol déhydrogénase
CrG10H	Géraniol 10-hydroxylase
CrGDS	Géranyl diphosphate synthase
CrGS	Géraniol synthase
CrIDS	Iridoïde synthase
CV	Tension de cône
DART	Analyse directe en temps réel
DCINB	Diester cyclique insaturé n-base
DCINOx	Diester cyclique insaturé n-oxyde
DCIO	Diester cyclique insaturé otonécine
DCM	Dichlorométhane
DEDL	Détecteur évaporatif a diffusion de lumière
DESI	Désorption-ionisation par électronébulisation
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DINB	Diester insaturé n-base
DINOx	Diester insaturé n-oxyde
Diol	Propanediol
DMAPP	Diméthylallyl-pyrophosphate

DNP	2,4-dinitrophénylhydrazine
DSPE	Extraction sur phase solide dispersive
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EEE	Espace économique européen
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
ELSD	Détecteur évaporatif a diffusion de lumière
ESI	Electrospray
EtOH	Éthanol
FDA	Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments
FID	Détecteur à ionisation de flamme
Fsu	Facteur de transfert d'échelle
FTIR	Spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier
GABAa	Acide γ -aminobutyrique a
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GDP	Géranyl-diphosphate
GMS	Grandes et moyennes surfaces
H₂O	Eau
HCOONa	Acétate de sodium
HMBC	Heteronuclear multi-bond connectivity
HPLC	Chromatographie liquide hautes performances
HPTLC	Chromatographie planaire hautes performances
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
HS	Espace de tête
HSSE	Extraction par sorption dans l'espace de tête
HSSE	High strength silica
ICH	Conférence internationale sur l'harmonisation
IMS 2	Interface ms 2 de chez Camag
IPA	Isopropanol
IPP	Isopentényl-pyrophosphate
IRMS	Spectrométrie de masse a rapport isotopique
IRTF	Spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier
ISO	Organisation internationale d'harmonisation
ITEX	Extraction dans l'aiguille
Kd	Coefficient de distribution
KEGG	Encyclopédie de Kyoto des gènes et génomes
LLE	Extraction liquide-liquide
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MeOH	Méthanol
MgCl₂	Chlorure de magnésium
MINB	Monoester insaturé n-base
MINOx	Monoester insaturé n-oxyde
MRM	Suivi de réactions multiples
MS	Spectrométrie de masse

NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NINB	Noyau insaturé n-base
NIR	Spectroscopie dans l'infrarouge proche
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
NP/PEG	Produit naturel et polyéthylène glycol ou réactif de neu
ODC	Ornithine décarboxylase
OMS	Organisation mondiale de la santé
P	Index de polarité
PDA	Détecteur a barrette d'iode
PEG	Polyéthylèneglycol
Ph. Eur	Pharmacopée européenne
PLE	Extraction par liquide pressurisé
Qmaxinj	Quantité maximale injectée
Q-TOF	Spectrométrie de masse en tandem quadripôle-temps de vol
r	Rayon
RC	Cellulose réticulée
R_f	Rapport frontal
RMN 1D	Résonance magnétique nucléaire a une dimension
RMN 2D	Résonance magnétique nucléaire a deux dimensions
RP	Phase inverse
RX	Rayons x
S_f	Pourcentage de rétention de phase stationnaire
SFC	Chromatographie en phase supercritique
Si(CH₃)₂O	Siloxane
SLE	Extraction solide-liquide
SNIF-NMR	Fractionnement isotopique naturel spécifique par résonance magnétique nucléaire
SPDE	Extraction dynamique sur phase solide
SPE	Extraction sur phase solide
SPME	Microextraction sur phase solide
SQD	Simple quadripôle
S_{spé}	Surface spécifique
THC	Tétrahydrocannabiol
TLC	Chromatographie sur couche mince
U	Tension continue
UE	Union européenne
UHPLC	Chromatographie liquide ultra hautes performances
URSS	Union des républiques socialistes soviétiques
USE	Extraction par ultrasons
UV	Ultraviolet
V	Tension alternative
VAD	Vente à distance
V_m	Volume mort
V_r	Volume de rétention
V_s	Volume de phase stationnaire

Introduction générale

L'industrie agroalimentaire a connu une évolution sans précédent au cours du siècle dernier *via* la mise au point de nouveaux procédés de fabrication toujours plus performants. Cela a eu pour conséquence la mise sur le marché d'un nombre croissant de produits raffinés. Dépourvus de nutriments naturellement présents dans les aliments bruts de départ, ces produits transformés de grande consommation ont engendré de nombreux cas de déséquilibres alimentaires⁵⁻⁷. Citons par exemple le sel, qui une fois raffiné, ne contient plus de minéraux tels que le magnésium ou le calcium, ou les céréales, qui privées de leur enveloppe et de leur germe, perdent leur apport naturel en fibres, vitamine B ou encore vitamine E. C'est dans ce contexte, qu'un nouveau produit à succès a émergé sur le marché : le **complément alimentaire**.

Selon le décret n°2006-352 du 20 mars 2006, on entend par compléments alimentaires « les denrées alimentaires [...] ayant un effet nutritionnel ou **physiologique** seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les **gélules**, les **pastilles**, les **comprimés**, les **pilules** et autres formes similaires, ainsi que les **sachets de poudre**, les **ampoules** de liquide, les flacons munis d'un **compte-gouttes** [...] destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité ». Cette définition rend la frontière entre aliment et médicament floue pour le consommateur car elle élargit l'usage du complément alimentaire, qui passe d'une denrée censée compléter des carences nutritionnelles à un produit pouvant avoir des effets physiologiques, le tout en reprenant les codes de présentation galénique utilisés par les médicaments. Et la confusion peut être d'autant plus grande que la sortie progressive de **plantes médicinales** du monopôle pharmaceutique français a conduit à l'émergence d'un produit d'un genre nouveau : le **complément alimentaire à base de plantes**.

Afin de prémunir les consommateurs d'éventuelles dérives, le législateur se devait d'encadrer au plus près ce nouveau produit qui associe une présentation proche de celle des médicaments et l'emploi de plantes ayant des effets reconnus sur la santé. Et cela, tant au niveau des indications d'usage destinées aux consommateurs, qu'aux précautions particulières à prendre par les fabricants. C'est ainsi qu'est né l'arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi.

Le domaine de l'analyse des plantes employées dans les compléments alimentaires est en pleine mutation car certaines problématiques posées par ces nouvelles exigences réglementaires se posent : dans le cadre d'**identification botanique**, est-il possible d'identifier des **marqueurs** de plantes rapidement et sans ambiguïté, même lorsqu'aucun **standard analytique** n'est disponible ? Des techniques peu onéreuses, rapides et à haut rendement peuvent-elles être envisagées afin d'**isoler** à grande échelle des actifs de plantes ? Est-il possible de réaliser le **dosage** de familles de molécules aux structures chimiques différentes ? Tant de questions auxquelles nous avons souhaité apporter des réponses au travers ces travaux de thèse :

Le premier chapitre propose une **étude bibliographique** du secteur des compléments alimentaires : le marché financier qu'il constitue, les risques sanitaires qui lui sont associés, la réglementation le régissant ainsi que les méthodes analytiques couramment employées lors de leurs analyses y sont discutés. Afin d'illustrer le contexte des travaux, des notions essentielles de botanique et de phytochimie sont également abordées.

Le second chapitre, « Résultats et discussions », est divisé en trois parties : La première s'articule autour des enjeux que représente l'**identification botanique**. Pour cela, les performances offertes par le couplage de deux techniques largement employées dans le domaine de la phytochimie y sont étudiées : celui de la **chromatographie sur couche mince haute performance** associée à la **spectrométrie de masse basse résolution**. Afin d'établir les avantages et les limites de ce couplage, différents métabolites secondaires et des extraits de plantes ont été analysés. L'influence des conditions chromatographiques et spectrométriques sur les limites de détection des composés est détaillée tout comme différents essais ayant pour but d'étudier l'origine des limites de ce couplage.

La deuxième partie décrit le potentiel qu'offre la **chromatographie de partage centrifuge** en tant que méthode préparative dans le domaine de l'**isolement d'actifs**. Cela, tant au niveau des puretés et des rendements pouvant être atteints qu'au **transfert d'échelle** pouvant être mis en place. Pour illustrer ces propos le cas de la *Valeriana officinalis* L. a été étudié. Les racines de cette plante synthétisent des iridoïdes, dits **valépotriates**, réputés toxiques. C'est pourquoi, bien qu'elle soit autorisée à entrer dans la composition de compléments alimentaires, elle doit faire

l'objet d'un dosage prouvant l'absence de ces molécules indésirables. Or, aucun standard analytique de ces valépotriates n'est commercialisé.

La troisième partie est une ouverture sur l'apport de la **spectrométrie de masse haute résolution** à l'**identification** et au **dosage** de familles de composés. Dans le domaine des substances naturelles, il n'est pas rare de devoir suivre non pas une molécule, mais une famille entière pouvant regrouper des centaines de représentants. Or, il est à l'heure actuelle impossible de mettre à la disposition des analystes les standards analytiques de tous les métabolites du règne végétal. C'est pourquoi, des stratégies cohérentes de dosage doivent être mises en place afin de doser des familles de molécules en équivalence d'un standard judicieusement choisi. Le cas des **alcaloïdes pyrrolizidiniques** a été étudié. Ces molécules font l'objet de restrictions et d'une attention croissante de la part des autorités sanitaires car elles sont associées à des milliers de décès à travers le monde. Les techniques d'analyse actuellement employées reposent essentiellement sur la spectrométrie de masse basse résolution et sur l'utilisation de la trentaine de standards analytiques disponibles pour réaliser des dosages en équivalence. Or cette approche peut présenter des défauts tant au niveau de l'identification des potentiels alcaloïdes pyrrolizidiniques que du choix du standard pour réaliser le dosage en équivalence.

Enfin, les conditions expérimentales sont détaillées dans le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit.

Chapitre 1

Bibliographie

1 Contexte commercial et réglementaire du complément alimentaire

1.1 Le secteur du complément alimentaire : une importante disparité

Qu'il soit à base de vitamines, minéraux ou encore de plantes, le marché du complément alimentaire est extrêmement diversifié par la variété de ses domaines d'application. Les compléments alimentaires peuvent en effet être utilisés à des fins de compléter des carences, mais aussi être consommé pour anticiper des besoins ou encore aider au bon fonctionnement du système physiologique⁸.

1.1.1 En France

Avec un chiffre d'affaire moyen dépassant le milliard d'euros au cours de ces 5 dernières années, le marché français du complément alimentaire maintient sa place parmi les premiers pays européens consommateur de ces produits⁹. Ce succès national est largement associé à la grande variété de circuits de fabrication, de distributions et de domaines d'application.

1.1.1.1 Les professionnels

Les premiers succès signés par des entreprises familiales telles que *Oenobiol* au milieu des années 1980, ont suscité l'intérêt de grands groupes. Aujourd'hui le secteur des fabricants de compléments alimentaires regroupe plusieurs centaines d'entreprises, variées tant par leur nature que par leur taille. De la grande industrie (pharmaceutique, cosmétique ou agroalimentaire) à la très petite entreprise (1 à 9 salariés) en passant par les petites et moyennes (20 à 250 salariés), la typologie des acteurs du secteur est hétérogène, induisant des méthodes de travail différentes :

Les grands groupes diversifiés

Ces grands groupes (tels que *Merck*, *Nestlé* ou *L'Oréal*) sont impliqués dans la fabrication de compléments alimentaires dans le but de diversifier leur portefeuille de produits. Ils bénéficient de moyens financiers importants et d'une réputation leur permettant de se positionner facilement sur le marché¹⁰.

Les entreprises spécialisées

Ces structures (telles que *Juva Santé*, *Arkopharma* ou *Oenobiol*) sont devenues des références dans le domaine du complément alimentaire en étant parmi les premières à populariser cette denrée au sein des foyers. Certaines, telles qu'*Oenobiol* ont été

rachetées par de grands groupes et d'autres, comme *Arkopharma*, prospèrent en ayant réussi à devenir leader du marché dans leur domaine^{11,12}.

Les marques de distributeur

Représentés par des groupements de pharmaciens (*Giphar* et sa ligne Giphactive) ou des enseignes de la grande distribution (*Casino* et sa ligne Casino bien pour vous), ces fabricants ont fait le choix de commercialiser leur propre gamme de compléments alimentaires. Ces derniers sont proposés à la vente dans leur chaîne commerciale à des prix moins élevés que leur concurrent spécialisé car moins investit dans l'innovation et le marketing¹³.

Les acteurs de « niches »

Même s'ils ne représentent qu'une part mineure de marché (tels que *Actidiet* ou *Jaminex*), ils ont réussi à s'inscrire dans la chaîne de fabrication du complément alimentaire en proposant des produits à façon et en répondant à des demandes spécifiques^{14,15}. Ils peuvent exercer en nom propre ou sous-traiter une partie de la fabrication d'un complément alimentaire et couvrir un large éventail de domaines tels que l'agriculture biologique, le packaging, ou la formulation. Cette polyvalence leur permet de s'adapter aux fluctuations du marché, mais un durcissement de la réglementation peut déstabiliser leur équilibre financier.

1.1.1.2 Circuits de distributions

Une des singularités du marché du complément alimentaire réside dans l'hétérogénéité de ses canaux de commercialisation. Etant donné que ces produits ne relèvent d'aucun monopôle, ils se trouvent tant dans des officines de pharmacie que dans des parapharmacies, des grandes ou moyennes surfaces (GMS), des magasins spécialisés (bio/diététique) ou dans la vente à distance (VAD).

Les données acquises au cours de ces 5 dernières années démontrent que le circuit d'achat dans les pharmacies réalise de loin le plus gros chiffre d'affaire suivi de la VAD, des magasins spécialisés, des GMS et des parapharmacies (Figure 1).

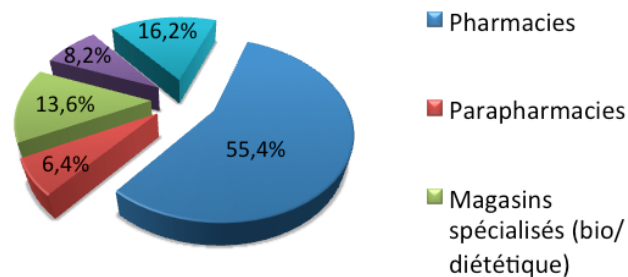


Figure 1 - Répartition des ventes de compléments alimentaires par circuits de distributions entre 2012 et 2017 (source : www.synadiet.com)

Malgré la pluralité des canaux de distribution, la répartition des parts de marché est relativement stable ces dernières années. Le secteur qui devrait voir ses activités sensiblement augmenter ces prochaines années est celui de la vente par internet.

1.1.1.3 Segments de marché

L'offre en compléments alimentaires couvre une grande variété de spécialités (Tableau 1), permettant de répondre aux demandes d'un large panel de consommateurs. Les différents axes présentés dans le Tableau 1 sont proposés dans tous les circuits de distribution mais pour l'ensemble d'entre eux la grande majorité du chiffre d'affaire est réalisée dans les segments de la minceur et des toniques.

Tableau 1 - Liste des principaux segments de ventes tous circuits de distribution confondus (source : www.synadiet.com)

Principaux segments de ventes	
Minceur/Drainage	Transit/Digestion
Tonus/Vitalité	Reminéralisant Osseux
Défenses immunitaires	Grossesse
Beauté	Génito- urinaire
Sommeil/Stress	Voies respiratoires
Ophthalmologie	Troubles lipido-cardiovasculaires
Sénior/Ménopause	Circulation
Solaire	

Pour le reste des spécialités, les parts de marché sont liées au circuit de vente : dans les grandes et moyennes surfaces ce sont les compléments alimentaires spécialisés dans la digestion qui représentent le troisième secteur de vente, dans les parapharmacies c'est le segment de la beauté tandis que dans les pharmacies se sont ceux bénéficiant d'un effet santé/bien-être.

Or si dans le cas du circuit des pharmacies, le consommateur a à sa disposition les services d'un professionnel de santé, dans les autres il peut faire face à des difficultés vu les larges gammes qui lui sont proposées.

1.1.2 Un autre regard : cas de l'Allemagne, du Canada et des Etats Unis

L'Allemagne est le second consommateur de compléments alimentaires, dits « *Nahrungsergänzungsmittel* », en Europe derrière l'Italie. Tout comme en France, le principal circuit de distribution est représenté par les pharmacies dites « *Apotheke* » où près des trois quarts du chiffre d'affaire annuel du marché du complément alimentaire y est réalisé¹⁶. La spécificité du marché allemand tient en l'absence du concept de parapharmacie, qui est là-bas remplacé par celui de droguerie. Ce circuit (représenté par des chaînes telles que *DM*, *Schlecker* ou *Müller*), pratiquent des prix bas et leur omniprésence leur confère une grande accessibilité : près de 2000 points de vente (chiffre de 2018) pour la seule enseigne *DM*. Afin de conserver une grande compétitivité tarifaire elles sont habilitées à servir de plateforme logistique : s'il est moins cher, un complément alimentaire ou un médicament délivré sans ordonnance peut être commandé à l'étranger *via* leur plateforme et être récupéré par le consommateur en magasin¹⁷. Les autres canaux de distribution sont représentés par les *GMS* et la *VAD*. Les principaux segments de marché sont tournés vers les vitamines et minéraux avec plus d'un quart du marché détenu par les spécialités à base de magnésium suivi ensuite par le segment de la grossesse.

Au Canada, les compléments alimentaires sont dénommés « *Natural Health Products* », et ils incluent les produits contenant des probiotiques, des acides aminés et des acides gras essentiels. Ce sont les segments des vitamines et des minéraux qui dominent les parts de marché des compléments alimentaires. Les circuits de distribution sont quant à eux différents de ceux de la France. Les officines, représentées par de grandes franchises telles que *Jean Coutu* au Québec et *Shoppers Drug Mart* pour le Canada, ne détiennent pas les plus gros chiffres d'affaires : ce sont les canaux des *GMS* qui réalisent les meilleures ventes. Dans ce pays où les frais médicaux sont très onéreux, les consommateurs se tournent alors régulièrement vers les compléments alimentaires¹⁸.

Derrière la Chine et l'Inde, les Etats Unis en sont les troisièmes plus gros consommateurs et le chiffre d'affaire annuel de ce secteur y est le plus important au monde. Le concept de pharmacie est, comme au Canada, loin de l'image des officines françaises. Elles sont le plus souvent rattachées à des grandes chaînes de distribution telles que *Walgreens* ou *CVS Corporation*. Les compléments alimentaires ; dits « dietary supplements », ne sont que peu commercialisées dans les pharmacies : le plus gros chiffre d'affaire est réalisé dans des GMS suivis de la VAD. Les vitamines et minéraux, qui pour certains sont conditionnés dans des bidons d'un kilogramme, sont les produits les plus sollicités par les consommateurs, suivis des compléments alimentaires à base de plantes^{19,20}. Cette surconsommation n'est pas sans conséquence : chaque année 23 000 consultations en urgence seraient directement liées au mauvais usage de ces produits (données recueillies entre 2004 et 2013)²¹.

Ainsi, le rapport au complément alimentaire est différent selon les pays car largement associé à la réglementation en vigueur et aux politiques nationales de soins. Si certains ne sont utilisés qu'à des fins de supplémentation face à des carences, d'autres s'engagent dans des segments tels que la prévention de troubles médicaux. Ce double emploi témoigne de la complexité à dissocier le complément alimentaire d'un médicament, qui est défini selon le code de la santé publique (article L.5111-1) comme : « *toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique.* ».

C'est pourquoi, afin de garantir la sécurité des consommateurs et d'éviter tout amalgame, la réglementation du complément alimentaire évolue en France, mais aussi à l'échelle mondiale.

1.2 Vers une rationalisation de l'usage des plantes : la réglementation du complément alimentaire à base de plantes

1.2.1 Filiation de la réglementation française

En France, afin de lutter contre le charlatanisme grandissant, le diplôme d'apothicaire est officiellement reconnu en 1258 par Louis IX et l'activité des épiciers se disant

apothicaire a été définitivement restreinte par une ordonnance de Jean Le Bon datant de 1352. En effet, les abus étaient tels que dans un souci de transparence les apothicaires préparaient leurs remèdes en public, sous les yeux de médecins et autres officiels du royaume²².

Dans le domaine de la délivrance de plantes médicinales, aussi dites « simples », les apothicaires détenaient le monopôle à une exception faite : le statut d'herboriste reconnu en 1312, permettait lui aussi de délivrer des plantes médicinales. Cette situation a mené à de nombreuses dissensions entre les deux professions, et s'est conclu en 1941 sous le régime de Vichy avec la suppression de la reconnaissance par l'Etat français du diplôme d'herboriste²³.

Il a fallu attendre le décret n° 79-480 du 15 juin 1979²⁴ pour libérer du monopole pharmaceutique une première liste de 34 plantes telles que la camomille ou la lavande et le décret n° 2008-841 du 22 août 2008²⁵ pour libérer une seconde liste portant ce nombre à 148. Dans le domaine du complément alimentaire, c'est à travers l'Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi que l'Etat français autorise l'utilisation de 546 plantes⁸. Ce nombre est à voir à la hausse *via* l'article 16 du décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires²⁶. Ce dernier autorise le principe de reconnaissance mutuel entre les pays : une plante employée dans un complément alimentaire légalement commercialisé dans un pays de l'Union Européenne (UE) peut être employée dans le même dessein en France.

1.2.2 Contexte réglementaire : des incidents sanitaires

La législation régissant la commercialisation des plantes médicinales s'est étoffée au rythme des incidents sanitaires provoqués par leurs mésusages. Ces derniers sont souvent liés au fait que le marché des matières premières naturelles ne permet presque plus aux fabricants d'élaborer les compléments alimentaires à partir de plantes entières. Le plus souvent, des poudres ou des extraits fabriqués dans des pays étrangers, tels que l'Inde et la Chine^{27,28}, sont employés, ce qui rend l'identification de la plante en amont de la fabrication difficilement réalisable. De plus, ces préparations sont souvent le résultat d'extractions par des solvants, amenant parfois à l'exclusion de composés d'intérêts, ou dans les cas les plus critiques, à concentrer sensiblement la teneur en substances dangereuses. Ce n'est qu'après leur commercialisation que

les instituts de veille sanitaire sont alertés des effets indésirables provoqués (Tableau 2).

Tableau 2 - Exemple d'incidents sanitaires notables et leurs conséquences²⁹

Plante	Composé impliqué	Effets indésirables	Mesures règlementaires
<i>Camellia sinensis</i>	épigallocatechine gallate	toxicité hépatique	mesures particulières à respecter lors de son utilisation dans les compléments alimentaires en France
<i>Aristolochia fangchi/Stephania tetandra</i>	acide aristolochique	toxicité rénale - cancer	plante interdite en France
<i>Symphytum officinalis</i>	alcaloïdes pyrrolizidinique	toxicité hépatique	- seule la voie locale est autorisée en France - usage interdit en Belgique
<i>Borago officinalis</i>	alcaloïdes pyrrolizidinique	toxicité hépatique	- mesures particulières à respecter lors de son utilisation dans les compléments alimentaires - interdite en Belgique
<i>Teucrium chamaedrys</i>	diterpène	toxicité hépatique	interdite en France
<i>Piper methysticum</i>	composé non identifié	toxicité hépatique	interdite en France
<i>Citrus aurantium</i>	synéphrine	cardiotoxique	- interdite en France dans les préparations magistrales et officinales - mesures particulières à respecter lors de son utilisation dans les compléments alimentaires en France
<i>Hedeoma pulegioides</i>	Pulégone	toxicité hépatique	autorisée dans les compléments alimentaires en France sans mesures particulières

Détaillons par exemple le cas du thé vert et du fang-ji. Le *Camellia sinensis*, dit théier ou thé vert, commercialisé sous la spécialité pharmaceutique Exolyse® en 1999 a été retiré du marché 4 ans plus tard à la suite de sa mise en cause dans 13 atteintes hépatiques aiguës. Pourtant, l'autorisation de mise sur le marché de ce complément amaigrissant délivré sans ordonnance a été accordée sur la base d'un large recul sur son emploi traditionnel. Ce recul s'était fait sur l'utilisation de la plante sous forme de tisane or la spécialité était commercialisée sous la forme d'un extrait hydro-alcoolique. Cette forme galénique étant bien plus concentrée en épigallocatechine gallate, elle augmenta considérablement l'hépatotoxicité des doses absorbées.

Le cas du *Stephania tetandra*, dit fang-ji, a eu des conséquences bien plus désastreuses. Dans les années 90, une confusion lors de l'identification de la plante a conduit à l'emploi accidentel d'*Aristolochia fangchi* dans des préparations utilisées à des fins amaigrissantes, causant une centaine de cas d'insuffisances rénales terminales.

Suite à cela le gouvernement français de l'époque a publié le décret n°98-397 du 20 mai 1998³⁰ relatifs aux interdictions concernant les plantes dénommées *Stephania tetrandra* et *Aristolochia fangchi*, où il est clairement explicité qu'« *il est interdit de produire, d'importer, d'exporter, d'offrir, de vendre, de distribuer à titre gratuit, de détenir les plantes dénommées Stephania tetrandra, Aristolochia fangchi, les extraits de ces plantes et les produits en contenant* ». Ce décret a été consolidé et élargit en 2003 à toute la famille des *Aristolochiaceae*, aux plantes contenant des actifs similaires (aristolactames et acides aristolochiques) ainsi qu'aux plantes présentant un risque de confusion.

Ces deux exemples mettent l'accent sur l'importance de l'identification de la plante et de son mode de préparation. Ces étapes sont les garants de l'innocuité du produit final et ces deux incidents, sont les témoins des dangers que peuvent représenter un manque de connaissances en botanique et en galénique d'un professionnel amené à entrer dans le processus de fabrication ou de commercialisation d'une denrée à base de plantes. C'est pourquoi, un contrôle qualité documenté et rigoureux ce doit d'être mis en place.

1.2.3 La réglementation du complément alimentaire à base de plantes

La législation du complément alimentaire était, jusqu'en 2002, associée aux réglementations régissant les aliments. Ce n'est qu'avec la directive 2002/46/CE du Parlement européen et du Conseil du 10 juin 2002³¹ qu'un cadre légal propre a été défini en lui donnant une définition, une liste d'ingrédients autorisés à entrer dans sa composition et des indications quant à son étiquetage.

La directive européenne 2002/46/CE a été transposée au droit français par le décret n°2006-352 du 20 mars 2006²⁶ (modifié par le décret n°2011-329 du 25 mars 2011³²). Ce texte fondateur a permis d'encadrer au niveau national la fabrication et la commercialisation de cette nouvelle denrée.

1.2.3.1 Principe de reconnaissance mutuelle

La liste des ingrédients autorisés à entrer dans la composition des compléments alimentaires est fixée par le décret n°2006-352 du 20 mars 2006 et est représentée par les trois catégories suivantes : les vitamines, les minéraux et les plantes ou préparations à base de plantes. Ce décret détaille précisément chacune de ces catégories. Cependant, au travers l'article 16 de ce décret, le principe de

reconnaissance mutuelle entre pays membres de l'Union européenne ou de l'espace économique européen est possible. Ainsi, si un ingrédient non cité dans le décret n°2006-352 du 20 mars 2006 est légalement commercialisé dans un pays de l'UE, alors il peut aussi l'être sur le territoire français.

1.2.3.2 Etiquetage

On entend par étiquetage « les mentions, indications, marques de fabrique ou de commerce, images ou signes se rapportant à une denrée alimentaire et figurant sur tout emballage, document, écriteau, étiquette, bague ou collerette accompagnant ou se référant à cette denrée alimentaire » selon l'article R.112-1 du code de la consommation. Dans le but de pouvoir guider au mieux le consommateur, l'étiquetage des compléments alimentaires est encadré par le décret n°2006-352 du 20 mars 2006 (transposition de la directive 2002/46/CE du Parlement européen et du Conseil du 10 juin 2002) et par les règlements CE n°1924/2006 du 20 décembre 2006³³ et n°1169/2011 section 1 et 2³⁴.

1.2.3.2.1 Mentions obligatoires

Etant donné que le complément alimentaire est destiné à l'alimentation humaine, son étiquetage doit respecter les articles R. 112-1 à R.112-31 du code de la consommation.

Le produit doit obligatoirement être désigné sous la dénomination de « **complément alimentaire** » et des informations telles que la portion journalière recommandée ou encore, un avertissement rappelant que ce produit doit être tenu hors de la portée des enfants doivent être mentionnés (Tableau 3).

Tableau 3 – Mentions obligatoires devant figurer sur l'étiquetage des compléments alimentaires

Indications obligatoires	Indications obligatoires spécifiques	Avertissements obligatoires	Mentions interdites
<p>Sous forme numérique et pour la portion journalière, la quantité de chaque : vitamine, minéral, substance à but nutritionnel ou physiologique, plante ou préparation de plantes présentes</p>	<p>Si emploi d'édulcorants, de caféine, de substances allergène ou d'ingrédients se présentant sous forme de nanomatériaux manufacturés</p>	<p>Déconseiller l'utilisation des compléments alimentaires comme substituts d'une alimentation équilibrée</p>	<p>Affirmation ou suggestion attribuant à ces produits des propriétés de prévention, de traitement ou de guérison d'une maladie humaine, ou évoquant ces propriétés</p>
<p>La quantité nette de denrée alimentaire : en unités de volume pour les produits liquides et en unités de masse pour les autres produits</p>	<p>Le pays d'origine ou le lieu de provenance du produit final si son omission serait susceptible d'induire le consommateur en erreur</p>	<p>Déconseiller le dépassement de la dose journalière recommandée</p>	<p>Affirmation ou suggestion soutenant qu'un régime alimentaire varié ne constitue pas une source suffisante de nutriments en général</p>
<p>La catégorie de nutriments ou substances employée(s) ou une indication sur leur nature</p>	<p>Les conditions particulières de conservation et/ou d'utilisation</p>	<p>Rappeler que le produit doit être tenu hors de la portée des enfants</p>	
<p>Le nom ou la raison sociale et l'adresse de l'exploitant</p>	<p>Si le complément alimentaire se veut issu de la production biologique</p>		
<p>La dénomination "complément alimentaire"</p>			
<p>La portion journalière recommandée</p>			
<p>La liste des ingrédients</p>			
<p>La date limite de consommation</p>			
<p>La présentation galénique</p>			
<p>Le lot de fabrication</p>			

Concernant les vitamines et minéraux, les quantités représentant la portion journalière recommandée par le fabricant doivent aussi être reportées en pourcentage des apports journaliers recommandés décrits dans l'annexe de l'arrêté du 3 décembre 1993 portant application du décret n° 93-1130 du 27 septembre 1993 concernant l'étiquetage relatif aux qualités nutritionnelles des denrées alimentaires.

La mise en forme de ces mentions doit respecter une typographie spécifique. Il convient de mentionner la quantité nette de produit et de faire figurer la dénomination « complément alimentaire » dans le même champ visuel hormis pour les surfaces inférieures à 10 cm². En effet, pour les emballages ou récipients dont la surface est inférieure à 10 cm², seules sont obligatoires les mentions : dénomination « complément alimentaire », la quantité nette de denrée alimentaire, la date limite de consommation et les allergènes.

Dans le cas où l'emballage a une surface supérieure ou égale à 80 cm², les mentions obligatoires doivent être rédigées dans un corps de caractère dont la hauteur x est supérieure ou égale à 1,2 mm, sinon la hauteur x doit être supérieure ou égale 0,9 mm (Figure 2).

Caractère 

Figure 2 - Corps de caractère de hauteur x

L'étiquetage des compléments alimentaires issus de l'agriculture biologique est régi par les règlements CE n° 834/2007 du conseil du 28 juin 2007³⁵ et n° 889/2008 de la commission du 5 septembre 2008³⁶. Il y est notamment décrit les conditions d'emploi du logo communautaire faisant référence à l'agriculture biologique (Figure 3) ainsi que les mentions obligatoires concernant les lieux de production des denrées issues de l'agriculture biologique.



Figure 3 - Logo communautaire faisant référence à l'agriculture biologique

1.2.3.2.2 Allégations de santé

Afin de protéger au mieux les consommateurs, les indications, autres que les mentions obligatoires citées plus haut, figurant sur l'emballage des compléments alimentaires ne doivent en aucun cas être trompeuses.

Selon règlement (CE) n° 1924/2006 du parlement européen et du conseil du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires on entend par allégation « *tout message ou toute représentation, non obligatoire en vertu de la législation communautaire ou nationale, y compris une représentation sous la forme d'images, d'éléments graphiques ou de symboles, quelle qu'en soit la forme, qui affirme, suggère ou implique qu'une denrée alimentaire possède des caractéristiques particulières* ».

Il en existe 2 grandes classes : les allégations dites nutritionnelles et celles dites de santé.

- L'allégation nutritionnelle est définie comme « toute allégation qui affirme, suggère ou implique qu'une denrée alimentaire possède des propriétés nutritionnelles bénéfiques particulières par l'énergie (valeur calorique) qu'elle fournit, fournit à un degré moindre ou plus élevé, ou ne fournit pas, et/ou les nutriments ou autres substances qu'elle contient ou contient en proportion moindre ou plus élevée, ou ne contient pas ».
- L'allégation de santé est associée à « toute allégation qui affirme, suggère ou implique l'existence d'une relation entre, d'une part, une catégorie de denrées alimentaires, une denrée alimentaire ou l'un de ses composants et, d'autre part, la santé ».

Avant la mise sur le marché d'un complément alimentaire, toute allégation à destination du consommateur doit faire l'objet d'une évaluation préalable par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESAs, ou en anglais European Food Safety Authority, EFSA).

La liste des allégations nutritionnelles autorisées figure en annexe du règlement (CE) n° 1924/2006, les allégations de santé autorisées sont quant à elles listées dans le règlement (UE) 432/2013⁷², ainsi que dans le registre communautaire de la commission européenne des allégations nutritionnelles et de santé pour les aliments.

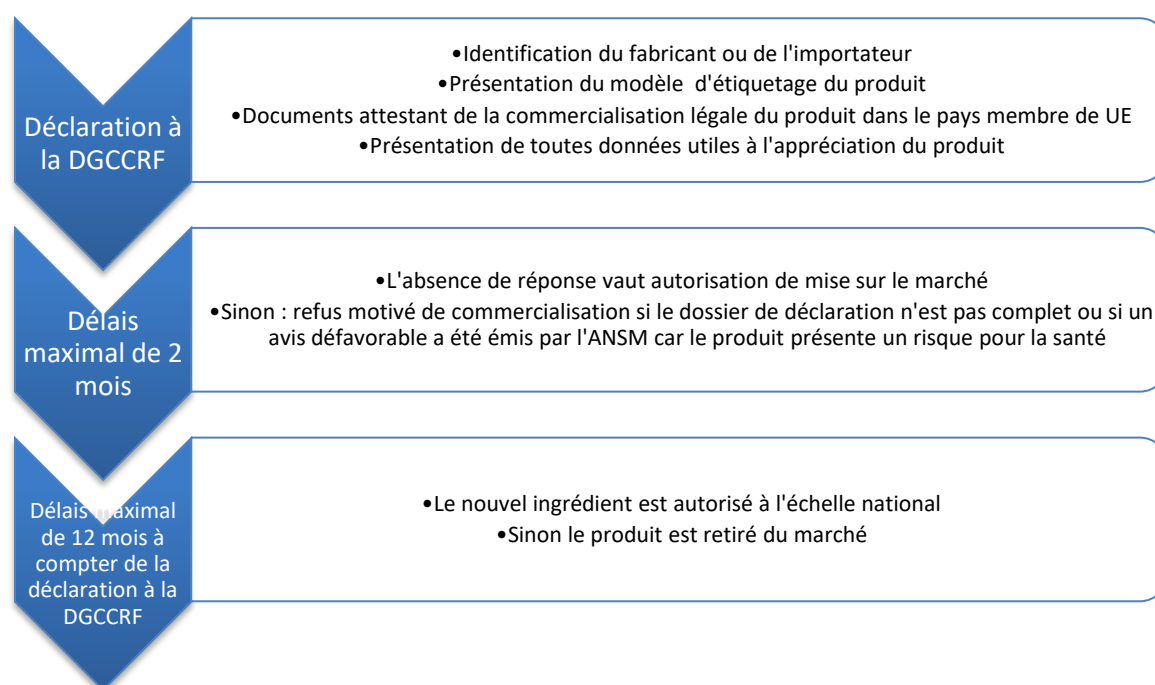
Les allégations de santé dites « en attente », concernent essentiellement les plantes et leur emploi est toléré.

1.2.3.3 Procédure d'enregistrement

1.2.3.3.1 *Principe de reconnaissance mutuelle*

L'importateur ou le fabricant de complément alimentaire élaboré à partir d'une substance autorisée dans un état membre de l'Espace Économique Européen (EEE) mais non citée dans le décret n°2006-352 du 20 mars 2006 doit suivre la démarche décrite à l'article 16 afin de procéder à l'enregistrement de son produit (Tableau 4).

Tableau 4 – Procédure de reconnaissance mutuelle



1.2.3.3.2 *Première mise sur le marché*

Lors d'une première commercialisation d'un complément alimentaire, sa procédure de mise sur le marché relève de l'article 15 du décret n°2006-352 du 20 mars 2006. Sa déclaration auprès de la Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) est obligatoire et peut être effectuée au moment de sa commercialisation. Les modalités à respecter sont décrites dans l'arrêté du 14 juin 2006 modifié relatif aux modalités de transmission des déclarations de première mise sur le marché : un modèle d'étiquetage ainsi qu'un courrier précisant si

la déclaration de mise sur le marché s'effectue au titre de l'article 15 ou de l'article 16, doit être transmis à la DGCCRF avec accusé de réception.

1.2.3.4 Description de l'arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi

L'arrêté du 24 juin 2014 a pour objet de fixer une liste de plantes pouvant être employées dans les compléments alimentaires ainsi que les différents éléments concernant la préparation devant être communiqués aux autorités. Il y est détaillé les parties de plantes pouvant être employées, les substances contenues dans ces dernières devant faire l'objet d'un suivi particulier et les restrictions auxquelles elles peuvent être soumises (étiquetage spécifique, teneurs maximales admises). S'ajoute à cela deux annexes (Tableau 5 et 6) énumérant les données à fournir aux autorités dans les cas où la plante utilisée fait l'objet d'un usage traditionnel ou non.

Tableau 5 – Données énumérées en annexe II et devant être fournies aux autorités dans le cas d'un usage traditionnel

Plante	MATIERE PREMIERE VEGETALE	PROCEDE DE FABRICATION DE LA PREPARATION A BASE DE PLANTE	PREPARATION DE PLANTE ET PRODUIT FINI
Nom scientifique	Spécifications en accord avec un standard de référence (pharmacopées, standard interne...) incluant des critères d'identification ainsi que le dosage des marqueurs pertinents (constituants responsables des effets physiologiques, autres marqueurs éventuels) et, le cas échéant, des constituants responsables d'effets indésirables.	Etapas de la fabrication et taille des lots.	Critères de standardisation : marqueurs pertinents (ratio plante / extrait, constituants responsables des effets physiologiques, autres marqueurs), constituants responsables d'effets indésirables.
Nom vernaculaire		Description des procédés de fabrication (incluant des informations sur les solvants et substances entrant dans les procédés, sur le ratio entre la plante et l'extrait).	Spécifications (niveaux quantitatifs par portion journalière recommandée, pour les marqueurs et les constituants responsables d'effets indésirables).
Partie utilisée		Précautions spéciales (lumière, température...).	Critères de pureté (microbiologie, métaux lourds, solvants résiduels, autres contaminants).
Origine géographique (continent, pays, région)		Procédés d'élimination des constituants à risque.	Matériaux de conditionnement utilisés et conditions de stockage.
Conditions de culture et de récolte, procédés agricoles			Surveillance après commercialisation du complément alimentaire.
			Étude de stabilité.

Tableau 6 – Données énumérées en annexe III et devant être fournies aux autorités dans le cas d'un usage non traditionnel

Niveau d'exposition	DONNEES TOXICOLOGIQUES	DONNEES TOXICOLOGIQUES ADDITIONNELLES SI DES RISQUES SPECIFIQUES ONT ETE IDENTIFIES
<p>Consommation prévisionnelle de la plante et de la préparation de plante, incluant la quantité (exposition maximale et moyenne), fréquence et durée.</p>	<p>Constituants responsables d'effets indésirables (identification, dosage).</p>	<p>Si les données de chimiotaxonomie ou d'analyse chimique mettent en évidence l'existence d'un risque spécifique lié notamment à la présence de substances chimiques identifiées, la réalisation d'études toxicologiques s'avère nécessaire selon les cas : toxicocinétique, génotoxicité, toxicité subchronique, autres études en fonction des informations disponibles (reproduction, développement, système nerveux, immunologie, carcinogénicité...).</p>
<p>Consommation potentielle de la plante et de la préparation de plante par le biais d'autres sources alimentaires.</p>	<p>Données de toxicologie provenant de la bibliographie pour la préparation de plante et des préparations similaires (limites de sécurité ou doses tolérables en substances actives ou en traceurs, limites en métabolites secondaires potentiellement toxiques).</p>	
<p>Modalités d'utilisation de la préparation de plante.</p>	<p>Evolutions dans le procédé de fabrication, notamment par rapport à l'usage traditionnel et conséquence présumée et/ou objectives sur la composition.</p>	
<p>Données connues de consommation de la plante et de la préparation de plante</p>	<p>Analyse des risques démontrant l'innocuité dans les conditions proposées (cible, portion journalière recommandée...).</p>	
	<p>Informations recueillies dans le cadre de la surveillance de la survenue d'incidents au niveau mondial. Ces informations concernent également une actualisation des données bibliographiques sur de nouveaux composants identifiés dans la plante et dans les espèces voisines ainsi que sur leurs effets toxiques.</p>	
	<p>Contre-indications éventuelles, notamment pour certaines populations (femmes enceintes, femmes allaitantes, enfants...).</p>	
	<p>Interactions moléculaires connues et supposées.</p>	

Ainsi, tout fabricant doit pouvoir fournir un dossier contenant les éléments énumérés dans l'annexe II et si besoin est, communiquer les informations citées dans l'annexe III. Ces nouvelles dispositions permettent d'encadrer de façon stricte la fabrication des compléments alimentaires et le rehaussement du niveau d'exigences réclamé par les autorités implique des moyens financiers supplémentaires pour les fabricants.

2 Etat de l'art : l'analyse du complément alimentaire à base de plantes

2.1 La phytochimie au service de la botanique

L'identité d'une plante entrant dans la composition d'un complément alimentaire doit pouvoir être garantie. Pour cela, des recherches bibliographiques sont souvent nécessaires et celles-ci nécessitent un certain nombre de connaissances essentielles en botanique et en phytochimie

2.1.1 Les classifications

Pour décrire un individu ou un organisme, il est nécessaire de lui donner un nom. Si l'échantillon d'individus est limité, un nom simple et unique peut suffire. Mais si l'échantillon d'individus est important, comme c'est le cas dans le règne végétal (découverte de nouvelles espèces et sélection d'espèces variétales)³⁸, des confusions peuvent naître. C'est notamment le cas lorsque des noms communs sont utilisés alors qu'ils peuvent faire référence à différentes plantes : par exemple, le nom commun « camomille » qui peut faire référence à *Chamaemelum nobile* (camomille romaine), à *Matricaria recutita* (petite camomille) ou à *Tanacetum parthenium* (grande camomille). Or ces trois plantes ne sont pas indiquées pour les mêmes usages.

C'est en partant de ce constat que l'identification précise de chaque plante doit être facilitée. C'est pour cela que la **nomenclature binomiale** introduite par Carl von Linné (1707-1778) est utilisée³⁹. Elle est basée sur la classification dite systématique, de différents taxons de plus en plus discriminants et est souvent hiérarchisée comme décrit dans la Figure 4. Elle permet de nommer tout organisme vivant à l'aide de deux termes distincts : le « genre » et l'« espèce ». Ce binôme est toujours écrit en italique avec seule, la première lettre du genre en majuscule. Il doit être suivi du nom du découvreur ou son initiale qui lui, n'est pas en italique.

Règne ► Embranchement ► Classe ► Ordre ► Famille ► Genre ► Espèce

Figure 4 - Hiérarchie des différents taxons

Or, malgré ces précautions, de nombreuses plantes présentes des synonymes. Citons l'exemple du genre *Citrus* qui comprend de nombreuses espèces dont certaines présentent un nombre important de synonymes^{40,41} (Tableau 7).

Tableau 7 – exemples de deux espèces issues du genre *Citrus*

Nom latin	Synonymes
<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>Aurantium decumana</i> (L.) Mill. ; <i>Aurantium maximum</i> Burm. ; <i>Citrus x aurantium</i> var. <i>decumana</i> L. [Illegitimate] ; <i>Citrus aurantium</i> subsp. <i>decumana</i> (L.) Tanaka ; <i>Citrus x aurantium</i> var. <i>grandis</i> L. ; <i>Citrus x aurantium</i> f. <i>grandis</i> (L.) M.Hiroe ; <i>Citrus aurantium</i> f. <i>grandis</i> (L.) Hiroë ; <i>Citrus costata</i> Raf. ; <i>Citrus decumana</i> L. [Illegitimate] ; <i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck ; <i>Citrus grandis</i> f. <i>buntan</i> Hayata ; <i>Citrus grandis</i> var. <i>sabon</i> (Siebold) Karaya ; <i>Citrus grandis</i> var. <i>sabon</i> (Siebold ex Hayata) Hayata ; <i>Citrus grandis</i> var. <i>yamabuki</i> (Tanaka) Karaya ; <i>Citrus obovoidea</i> Yu.Tanaka ; <i>Citrus pomellos</i> Risso ; <i>Citrus sabon</i> Siebold ex Hayata ; <i>Citrus yamabuki</i> Yu.Tanaka
<i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck	<i>Citrus x aurantium</i> subsp. <i>bergamia</i> (Risso & Poit.) Engl. ; <i>Citrus aurantium</i> subsp. <i>bergamia</i> (Risso) Wight & Arn. ; <i>Citrus aurantium</i> var. <i>bergamia</i> (Risso) Brandis ; <i>Citrus x aurantium</i> var. <i>mellarosa</i> (Risso) Engl. ; <i>Citrus x bergamia</i> Risso & Poit. ; <i>Citrus x bergamia</i> subsp. <i>mellarosa</i> (Risso) D.Rivera & al. ; <i>Citrus x bergamota</i> Raf. ; <i>Citrus x limodulcis</i> D.Rivera, Obón & F.Méndez ; <i>Citrus x limonelloides</i> Hayata ; <i>Citrus x limonia</i> Osbeck ; <i>Citrus x limonia</i> var. <i>digitata</i> Risso ; <i>Citrus x limonum</i> Risso ; <i>Citrus medica</i> var. <i>limon</i> L. ; <i>Citrus medica</i> f. <i>limon</i> (L.) M. Hiroe ; <i>Citrus medica</i> subsp. <i>limonia</i> (Risso) Hook. f. ; <i>Citrus x medica</i> var. <i>limonum</i> (Risso) Brandis ; <i>Citrus x medica</i> subsp. <i>limonum</i> (Risso) Engl. ; <i>Citrus medica</i> var. <i>limonum</i> (Risso) Brandis ; <i>Citrus x mellarosa</i> Risso ; <i>Citrus x meyeri</i> Yu.Tanaka ; <i>Citrus x vulgaris</i> Ferrarius ex Mill. ; <i>Limon x vulgaris</i> Ferrarius ex Miller

Ces classifications ont évolué grâce à l'essor de nouvelles techniques. La génétique a permis la mise en évidence de séquences d'ADN spécifiques à certaines familles, genres ou même espèce. Et la chimie a contribué à l'identification de marqueurs caractéristiques permettant parfois d'affilier des entités à des taxons différents. Les deux classifications des végétaux qui de nos jours sont les plus utilisées sont celles d'Arthur Cronquist, basées sur les caractéristiques morphologiques et chimiques des angiospermes, et l'Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV), qui s'appuie sur des critères génétiques.

2.1.2 Perspectives

L'essor des classifications existantes n'a pu se faire sans l'essor des outils technologiques. Ils ont permis de mettre en évidence de nouveaux critères discriminants qui ont affiné l'affiliation de chaque espèce. C'est pour cela que la classification actuelle APG IV qui n'utilise pas l'ensemble des critères botanique, chimique et génétique, est amenée à évoluer dans le futur. Et la phytochimie qui est

un domaine en plein essor (développement des techniques de séparation de substances naturelles, d'isolement et d'élucidation structurale) va permettre de gagner une nouvelle dimension dans les futures classifications.

2.2 Phytochimie des plantes

La **phytochimie** représente l'étude de l'ensemble des composés chimiques participant à la structure, à la croissance et au bon fonctionnement du végétal (métabolisme). Cette science s'applique également aux techniques d'analyse employées ainsi qu'à l'isolement des substances d'intérêt (appelées aussi métabolites)⁴².

La phytochimie est un domaine de la chimie qui a été considérablement exploré, notamment depuis le développement de la chromatographie au début du XX^{ème} siècle. Elle a permis l'isolement de certains actifs aujourd'hui largement utilisés dans le domaine médical et présentant des activités importantes et variées. La chimie a également contribué à l'essor des substances thérapeutiques en synthétisant des dérivés de ces actifs naturels afin de modifier ou d'accentuer les activités biologiques souhaitées. Parmi ces molécules d'intérêt, il est important de citer l'acide acétylsalicylique (aspirine) hémi-synthétisé à partir de l'acide salicylique dont le précurseur est retrouvé en grande quantité dans certains saules (*Salix sp.*). Citons également, le taxotère, composé cytotoxique hémi-synthétisé à partir d'alcaloïdes de l'If commun (*Taxus baccata L.*) qui a largement contribué à l'essor des traitements anticancéreux. Pour terminer, citons l'artémisinine, isolée d'une espèce d'Armoise (*Artemisia annua L.*) qui a servi de base pour développer des médicaments antipaludiques⁴³.

Les activités liées aux substances végétales sont indéniables mais avec l'évolution du domaine pharmaceutique d'aujourd'hui, les preuves d'activité et d'innocuité (notion de bénéfique/risque) doivent être apportées pour considérer une substance comme thérapeutique (médicamenteuse). Ainsi, l'activité d'une thérapie est, aujourd'hui, principalement basée sur l'action d'une unique molécule agissant sur une cible unique. Il est alors complexe de prouver et déterminer l'activité liée à une plante étant donné le nombre de constituants d'une espèce végétale⁴⁴. Il y a donc deux grandes possibilités :

- Soit la plante renferme une molécule en quantité prépondérante (ou un ensemble de molécules présentant une structure et une activité similaire) : il est alors facile d'identifier une activité directement liée à la présence d'un métabolite ; Il est aussi plus aisé d'isoler l'actif afin d'en tester l'efficacité et l'innocuité.
- Soit la plante ne renferme pas spécifiquement une molécule en grande quantité : dans ce cas, il est extrêmement difficile voire impossible d'identifier et d'isoler toutes les molécules sans distinction. L'industrie pharmaceutique passe donc souvent à côté de trésors inestimables, ce qui n'est pas le cas de la phytothérapie, concentrée non pas sur un métabolite mais sur un ensemble (*totum*).

2.3 Classification des composés

Les constituants du métabolome des végétaux ont été classés en deux catégories de métabolites en fonction de leur rôle au sein de l'organisme : les métabolites primaires et les métabolites secondaires²⁹. Afin de les catégoriser, les principales questions qui se posent sont les suivantes : assurent-ils les fonctions vitales de base de la plante ? Sont-ils directement ou indirectement impliqués dans le développement ou dans la reproduction ? Ont-ils un rôle de défense face aux agressions ?

2.3.1 Métabolisme primaire

Le métabolisme primaire comprend tous les constituants du végétal qui sont indispensables à sa reproduction, à son développement et à son bon état de fonctionnement (métabolisme général). Parmi ces métabolites primaires, nous retrouvons majoritairement les familles présentées dans le Tableau 8.

Tableau 8 - liste des principales familles de métabolites primaires

Famille de métabolites	Exemples de composés
Lipides	Acides gras, phospholipides, glycérides
Saccharides	Monosaccharides, oligosaccharides et polysaccharides
Dérivés aminés	Acides aminés libres, peptides, protéines
Vitamines	Vitamines A, B1, C, D3, K

Il est important de noter que ce n'est pas parce que ces molécules sont des métabolites assurant les fonctions de base de la plante qu'elles ne présentent pas d'intérêt ou d'originalité dans leurs activités. On peut relever les β -glucanes, des polysaccharides que l'on retrouve dans l'avoine cultivé (*Avena sativa* L.) ainsi que dans

le champignon lentin du chêne (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) et qui présentent des activités immunostimulantes ou anticancéreuses⁴⁵.

2.3.2 Métabolisme secondaire ou spécialisé

Il s'agit de tous les éléments chimiques de l'organisme qui peuvent être nécessaires à sa survie sur le long terme. Pour illustrer ces propos on peut citer les molécules odorantes qui attirent les insectes pollinisateurs et participent ainsi, non pas au processus de reproduction, mais à augmenter ses chances de se reproduire. Ou encore, les composés qui assure la défense de la plante et donc sa survie sur le long terme. Parmi ces métabolites secondaires, nous retrouvons majoritairement les familles présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9 - liste des principales familles de métabolites secondaires

Famille de métabolites	Exemple de composés
Polyphénols	Flavonoïdes, Anthraquinones, Acides cinnamiques, ...
Terpénoïdes	Monoterpènes, Iridoïdes, Diterpènes, Triterpènes, Saponosides, ...
Composés soufrés	Thiosulfates, Glucosinolates, Sulfoxides, ...
Alcaloïdes	Isoquinoléines, Pyrrolizidines, Indoliques, Bases puriques, ...
Polyphénols	Coumarines, Xanthones, Lignanes, Phenylpropènes

Les métabolites secondaires peuvent être constitutifs ou spécialement créés afin d'agir tel un système immunitaire⁴⁶ (stress biotique ou abiotique). Par exemple, les glucosinolates synthétisés par les plantes de la famille des *Brassicaceae* : ce n'est que lorsque la structure végétale est endommagée que l'enzyme myrosinase entre en contact avec le substrat glucosinolate permettant la libération d'isothiocyanates et nitriles, tous deux toxiques pour certains parasites.

2.3.3 Cartographie du métabolisme des organismes végétaux

Les voies de synthèses des différents métabolites secondaires sont si complexes qu'elles ne sont que très peu décrites sous la forme d'un schéma. Pour preuve, la cartographie disponible dans la base de données de l'Encyclopédie de Kyoto des Gènes et Génomes (KEGG) en Figure 5 peut poser des soucis de compréhension. C'est pourquoi, par soucis de clarté, il a été décidé de ne les présenter que de façon simplifiée. La Figure 6 expose les voies de synthèses les plus communes en présentant les principaux précurseurs⁴⁷. Il est à noter que ce schéma n'est qu'une

version simpliste des multiples voies de biosynthèses existantes : les phénylpropanes sont souvent considérés comme des polyphénols et les stilbènes et flavonoïdes peuvent être issus d'une voie mixte entre les voies de l'acétate et du shikimate.

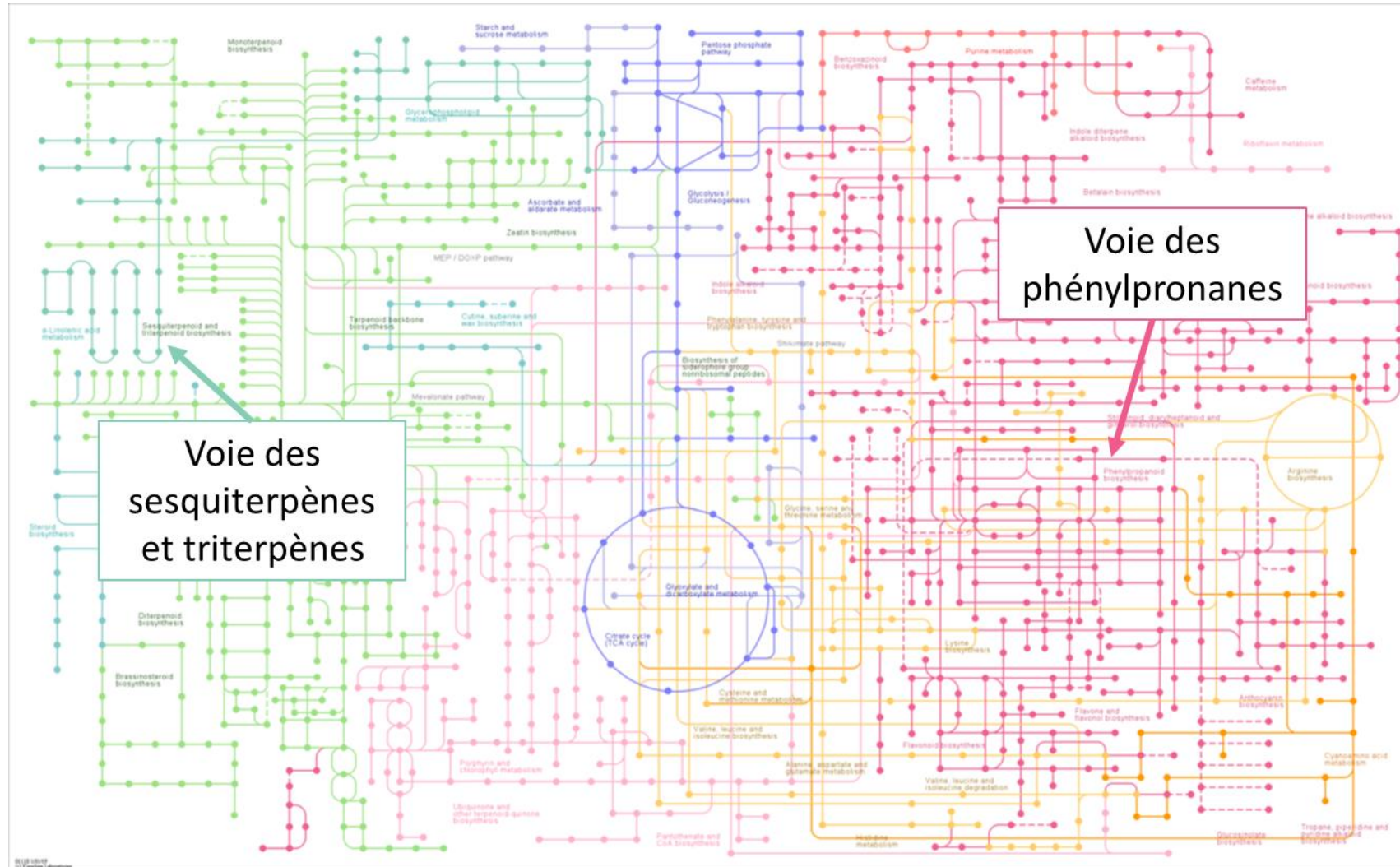


Figure 5 - Cartographie des voies de synthèses des métabolites secondaires issue de KEGG

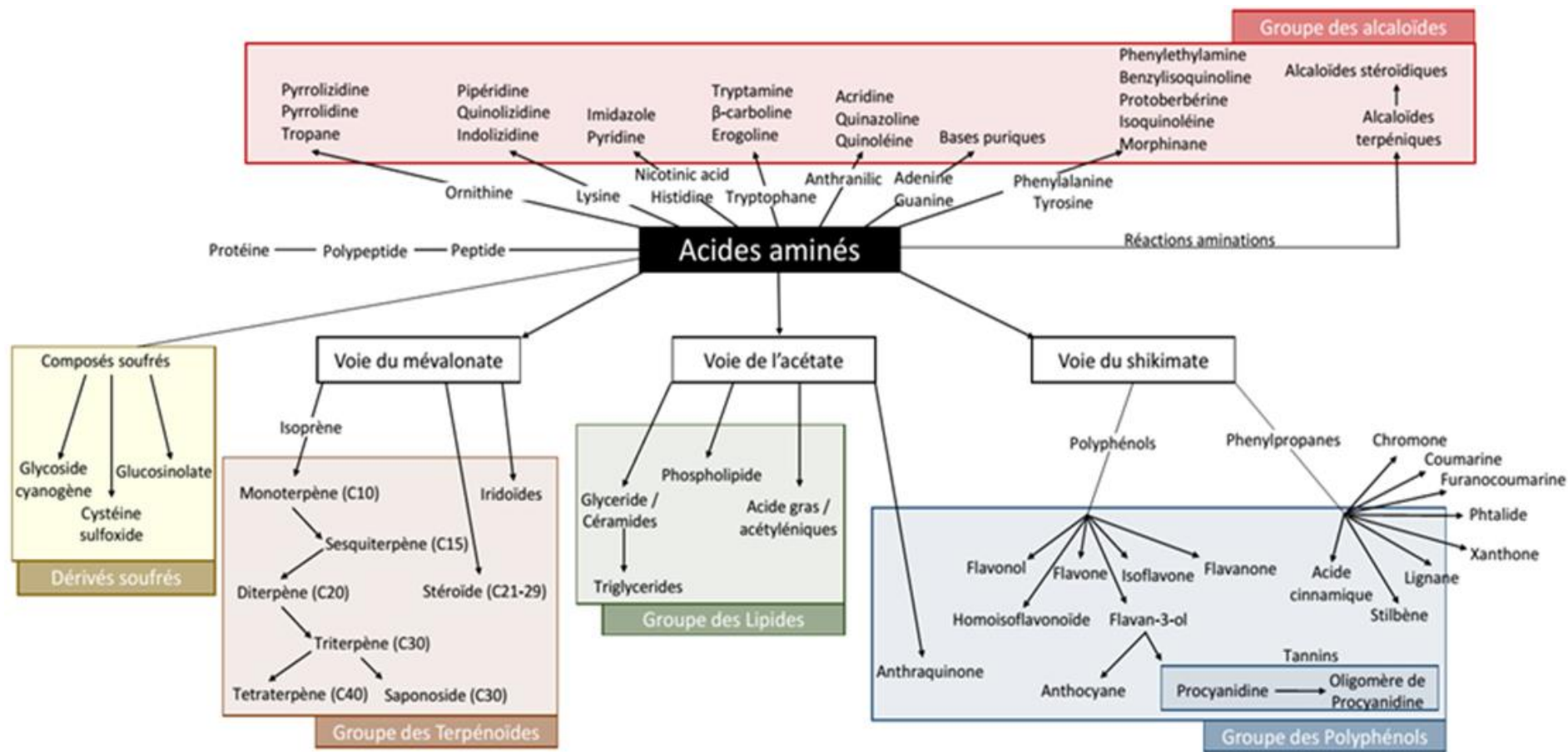


Figure 6 - Métabolites secondaires et primaires classés selon leur voie de synthèse la plus commune

2.4 Les différents outils d'analyses phytochimiques

L'analyse de plantes, mélanges de plantes, extraits végétaux et formulations à base de plantes constitue très souvent un exercice délicat, véritable défi pour l'analyste et le phytochimiste. L'objectif est très souvent l'identification botanique de la ou des plante(s) utilisée(s) et/ou la mise en évidence d'adultération ou encore l'identification et la quantification de molécules d'intérêts (substances actives) ou de substances réglementées (limitées) pour leur toxicité.

2.4.1 Préparation d'échantillon

Selon la nature du produit et le but de l'analyse, plusieurs stratégies peuvent se présenter. Dans le cadre d'une identification botanique, si le produit est sous la forme de plante ou de poudre de plante, il peut être caractérisé par analyse macroscopique (aspect, couleur, odeur, goût) ou microscopique. Cependant, si le but de l'analyse est l'identification et la quantification de marqueurs précis à partir d'une plante qui est sous forme entière, de poudre ou d'extrait alors seules des techniques chromatographiques et spectroscopiques pourront être utilisées (Figure 7)

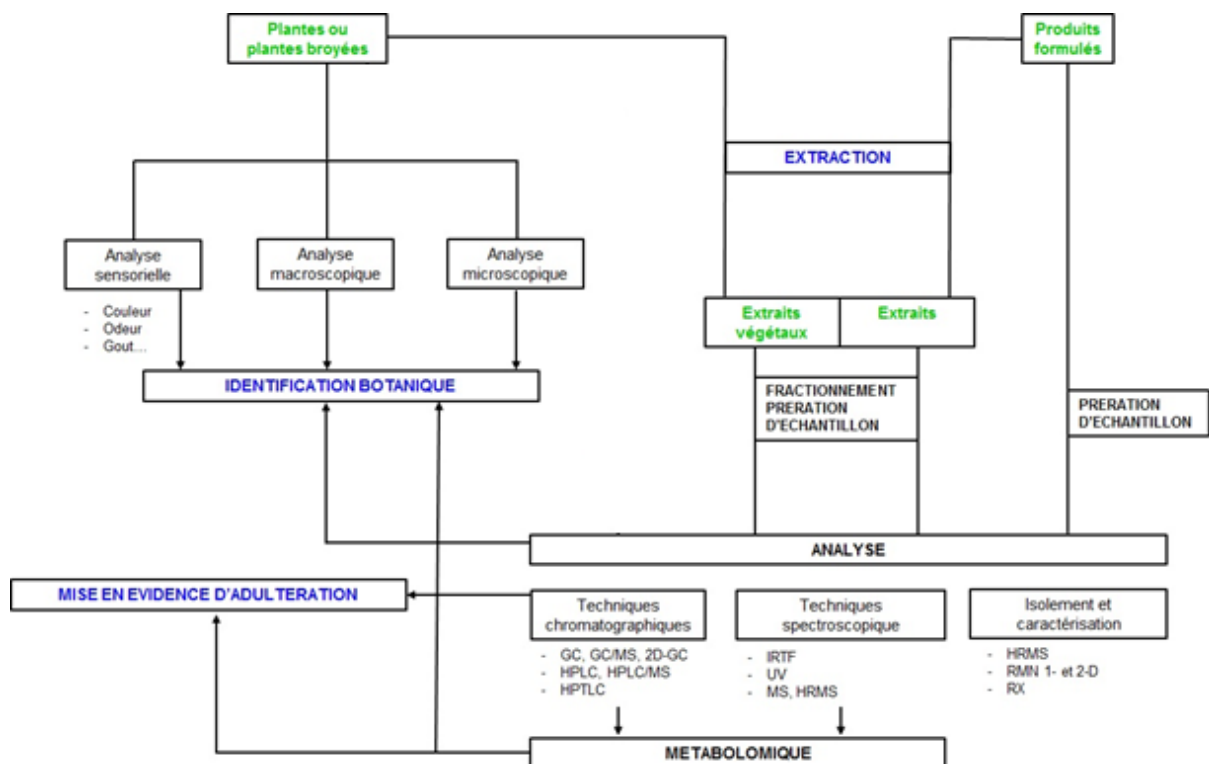


Figure 7 - Méthodologies analytiques des compléments alimentaires à base de plantes

2.4.1.1 Analyse microscopique

Si l'analyse macroscopique très dépendante de la nature de l'échantillon est de plus en plus délaissée, l'analyse microscopique peut se montrer très précieuse. Elle consiste en l'analyse de débris végétaux par microscopie optique avec une identification basée sur l'observation des caractéristiques anatomiques des cellules épidermiques. Sous réserve de posséder les bonnes bases de données, catalogues, un opérateur expérimenté peut identifier précisément une plante (Figure 8). Ces bases de données renferment des fragments provenant de différentes parties de la plante (feuilles, fleurs, tiges....) car les caractéristiques structurelles peuvent varier d'un organe à l'autre⁴⁸.

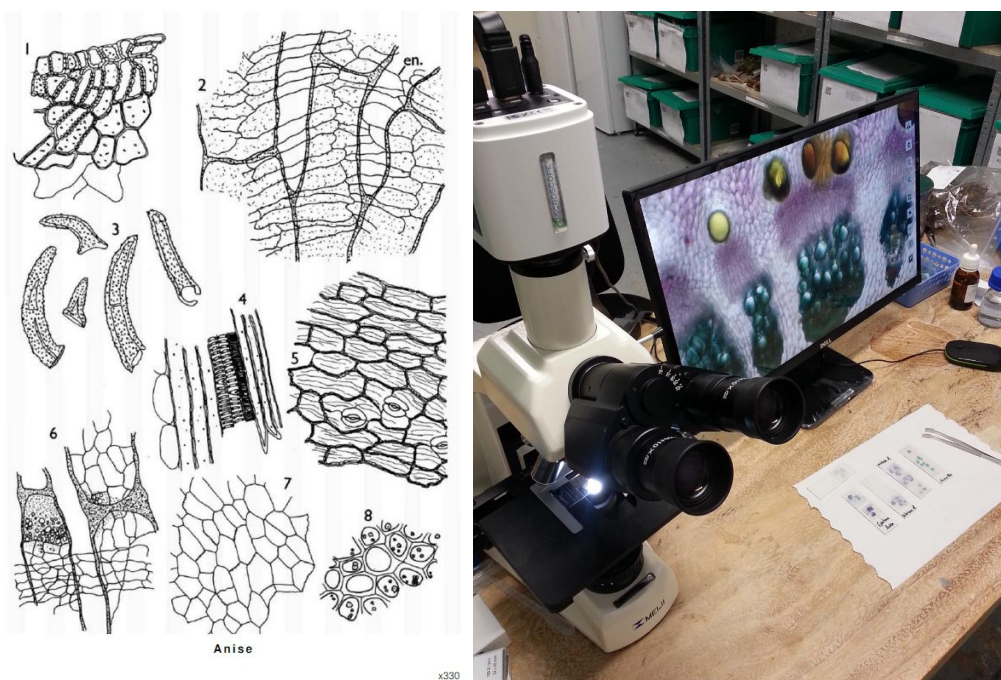


Figure 8 - Identification de plantes par microscopie avec, à gauche, les éléments caractéristiques de l'espèce *Pimpinella anisum* L.⁴⁹ et, à droite, un espace de travail avec un microscope

L'étude histologique et anatomique des organes végétaux peut se réaliser selon différentes méthodes. La méthode la plus simple a été développée par Metcalfe et Chalke, elle consiste à mettre l'échantillon végétal sur une lame de verre sur laquelle on ajoute quelques gouttes d'eau de javel⁵⁰. Le tissu conjonctif est alors gratté à l'aide d'un scalpel (ou d'une lame de rasoir) à l'œil nu puis sous lampe binoculaire et enfin rincé à l'eau. Les fragments d'épiderme ainsi obtenus sont alors placés dans une

goutte d'eau entre lame et lamelle puis observés au microscope optique muni d'un appareil photo.

Néanmoins, cette méthode nécessite un opérateur expérimenté et peut atteindre ses limites lorsqu'on est confronté à un mélange de plantes. Il est alors souvent nécessaire de réaliser une analyse chimique.

2.4.1.2 Analyse par chromatographie et/ou spectroscopie

Les compléments alimentaires à base de plantes peuvent également se retrouver sous des formes d'extraits secs ou de produits formulés (sous formes solide, liquide ou pâteuse). Pour ces derniers, il est souvent nécessaire de réaliser une extraction, le plus souvent à l'aide d'un solvant adapté.

Pour les liquides, on parle d'Extraction Liquide-Liquide (LLE) basée sur le principe de partition alors que pour les solides, il s'agit d'Extraction Solide-Liquide (SLE) basée sur la solubilité⁵¹. Le choix du solvant ou mélange de solvants est une phase capitale qui dépend des objectifs de l'analyse. Si l'on souhaite identifier de façon la plus exhaustive possible l'ensemble des métabolites présents dans le produit, il est nécessaire de choisir un solvant ou mélange de solvant peu sélectif comme le méthanol ou les mélanges méthanol-eau. En revanche, si le but est d'extraire un composé (ou une famille de composés) bien spécifique, le choix d'un solvant permettant l'extraction sélective du (ou des) composé(s) ciblé(s) est à privilégier. Cependant, la complexité des matrices à extraire permet rarement une extraction sélective et les extraits obtenus contiennent bien souvent d'autres métabolites co-extraits mais également des composés matriciels qui peuvent perturber la suite de l'analyse. En plus de ces critères de performances d'autres paramètres sont également à prendre en compte comme la température d'ébullition (car il peut être nécessaire d'éliminer le solvant par distillation), l'inertie chimique, la toxicité, l'écotoxicité, la facilité à le purifier avant l'extraction ou encore la compatibilité avec les méthodes d'analyse utilisée⁵².

Les solvants organiques les plus utilisés sont l'hexane, le dichlorométhane, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et le méthanol. L'extraction peut se réaliser à froid, température ambiante ou à chaud selon la stabilité thermique des analytes cibles et la difficulté à les extraire (durée d'extraction). Différents méthodes/montages

peuvent être réalisés mais il s'agit le plus souvent de la macération (à froid ou chaud) ou l'utilisation du montage de soxhlet.

Depuis quelques années, les sciences analytiques comme toute la chimie sont en pleine mutation. Poussées par les contraintes réglementaires et les enjeux environnementaux la « *chimie verte* » se développe. Dans le domaine de l'analyse des extraits végétaux, cela se traduit par une volonté de diminuer la consommation d'énergie (diminution du temps d'extraction) et réduire la consommation de solvants fossiles et si possible de les remplacer.

Pour diminuer la consommation énergétique plusieurs méthodes d'activation (pression, ultrasons, microondes...) se sont développées. Dans le cas de la diminution des volumes de solvants fossiles, il s'agit de miniaturiser les dispositifs d'extraction et/ou d'utiliser des solvants verts. Dans ces cas, on parle **d'éco-extraction**.

Le Tableau 10 présente les principales méthodes d'activation ainsi que les solvants verts de plus en plus utilisés dans le domaine des compléments alimentaires à base de plantes.

Tableau 10 - Principales méthodes d'activation ainsi que les solvants verts utilisés dans le domaine des compléments alimentaires à base de plantes.

Méthodes d'activation	Principe	Avantages	Inconvénients
Extraction par solvant sous pression (ASE, PLE) ^{53,54}	Solvant sous pression à température élevée. La diminution de la viscosité du solvant par l'augmentation de la température augmente la solubilité des analytes et diminue les interactions analytes-matrice.	<ul style="list-style-type: none"> - Gain de temps - Diminution du rapport matière première/solvant - Automatisation - Possibilité de faire des gradients de solvant 	<ul style="list-style-type: none"> - Prix de l'équipement et des consommables - temps de transposition des méthodes
Extraction par Ultrasons (USE)	Mise en contact du produit à extraire et du solvant sous ultrasons. Formation de bulles de cavitation dont l'explosion très énergétique génère un microenvironnement de haute température et haute pression qui va rompre les barrières naturelles de la matrice et les interactions matricielles.	<ul style="list-style-type: none"> - Gain de temps - Diminution du rapport matière première/solvant - minimise les réactions de dégradation des composés les plus fragiles - Prix 	<ul style="list-style-type: none"> - Miniaturisation difficile - Pas d'automatisation - Bruit
Extraction assistée par micro-ondes ⁵⁵	Agitation des composés présentant un moment dipolaire non nul. Chauffage très rapide « au cœur » de la matière permettant de rompre les barrières naturelles de la matrice et les interactions matricielles.	<ul style="list-style-type: none"> - Gain de temps - Diminution du rapport matière première/solvant - Possibilité de réaliser plusieurs extractions en même temps - Automatisation possible 	<ul style="list-style-type: none"> - Prix de l'équipement
Solvants verts	Source	Avantages	Inconvénients
CO ₂ supercritique ⁵⁶	Environnemental	<ul style="list-style-type: none"> - Grande diffusivité due à l'état supercritique - Température modérée (31,1 °C) - Non toxique - Elimination par retour à pression atmosphérique - inerte dans les conditions d'utilisation 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipements coûteux - Faible polarité du CO₂ (elle peut être augmentée par l'ajout d'un co-solvant (MeOH ou EtOH) mais qui lui n'est pas à l'état supercritique
Terpènes (alpha-pinène, limonène, <i>p</i> -cymène...)	Isolé d'huiles essentielles ou fractions d'huiles essentielles	<ul style="list-style-type: none"> - Abondants - Bons substituts à l'hexane 	<ul style="list-style-type: none"> - Visqueux et dense - Températures d'ébullition élevée
2-méthyl tétrahydrofurane (2-MeTHF)	Biomasse non comestible (maïs, paille de riz, bagasse de canne à sucre...)	<ul style="list-style-type: none"> - Biodégradable et recyclable - Peu toxique - Bonne alternative à l'utilisation du THF et du Chloroforme 	<ul style="list-style-type: none"> - Température d'ébullition élevée (80 °C) - Prix
Bioéthanol	Matières premières renouvelable (cannes et betteraves à sucre, amidon de maïs, blé...)	<ul style="list-style-type: none"> - Biodégradable et peu toxique - Alimentaire - Très utilisé 	<ul style="list-style-type: none"> - Non inerte - Difficile à éliminer (formation d'azéotrope avec l'eau)
Carbonate de diméthyle (CMC)	Issu de procédés de la chimie verte : transestérification du carbonate de propylène ou réaction du monoxyde de carbone, du méthanol et de l'oxygène	<ul style="list-style-type: none"> - Biodégradable et peu toxique - Ininflammable 	<ul style="list-style-type: none"> - température d'ébullition élevée (90 °C)

Les extraits de produits formulés ou de plantes sont des matrices très complexes contenant de nombreux métabolites et composés interférents. Selon l'objectif de l'analyse, il peut être nécessaire de simplifier l'échantillon ou de concentrer certains analytes. C'est souvent le cas pour les analyses quantitatives de composés présents en faibles concentrations ou co-analysés avec un composé plus abondant.

Les techniques de fractionnement permettent de séparer les composés de l'extrait selon leurs propriétés physico-chimiques (volatilité, polarité, pH, charge...). Pendant longtemps ces techniques étaient consommatrices de temps, de solvant et génératrices d'artéfacts (lavage acido-basique, partition par solvants, fractionnement sur colonne ouverte...). Les techniques utilisées actuellement se sont miniaturisées, automatisées et les volumes de solvant se sont réduits.

L'extraction sur phase solide (SPE) s'est depuis plusieurs années imposée comme une technique de choix largement utilisée pour fractionner les extraits, purifier certaines familles de métabolites et peut même aller jusqu'à leur isolement⁵⁷.

L'échantillon à traiter est mis à percoler à travers une petite cartouche polymérique contenant un adsorbant pouvant retenir les composés d'intérêt par des interactions faibles à fortes. Si la phase est bien choisie, les composés interférents n'auront que peu d'affinité avec cette dernière et pourront être éliminés par élution avec un solvant (ou mélange de solvants) ayant une faible force éluante sur cette phase. L'augmentation de la force éluante permet ensuite de récupérer les métabolites cibles avec une faible quantité de solvant.

Les phases stationnaires de natures très variées peuvent répondre à de très nombreuses problématiques et même présenter de très grandes sélectivités (immunoabsorbants, et polymères à empreinte moléculaire).

Comme c'est le cas pour l'extraction, les techniques de préparation d'échantillon ont beaucoup progressé des dernières années et plusieurs nouvelles méthodologies sont maintenant disponibles. Les progrès ont essentiellement porté sur la sélectivité, la miniaturisation, l'automatisation, la simplification et la limitation des quantités de solvant. Le Tableau 11 présente les techniques les plus utilisées ou prometteuses pour l'analyse de compléments alimentaires à base de plantes.

Tableau 11 – principales méthodes de préparation d'échantillon utilisées pour l'analyse de compléments alimentaires à base de plantes.

Nom	Principe	Avantages	Inconvénients
Chromatographie - Flash	chromatographie sur colonne sous pression et automatisée	granulométrie de la phase stationnaire plus faible, efficacité augmentée par rapport aux colonnes « ouvertes » grand choix de phases automatisation simplicité	consommation en solvant relativement élevée
D-SPE (<i>Dispersive Solid-Phase Extraction</i>) plus connue sur le nom de QuEChERS	après une première étape d'extraction, l'échantillon est mélangé à une phase adsorbant pour une purification accrue	extraction et concentration réalisées en même temps grand facteur de concentration, élimination des interférents	temps de manipulation. nombreuses interventions de l'analyste.
Techniques d'extraction des composés volatils par enrichissement à l'aide d'une phase stationnaire (HS-SPME, HSSE, SPDE, ITEX...)	extraction de l'espace de tête par enrichissement sur/dans une phase stationnaire de façon passive ou dynamique	sélectivité pour les composés volatils sensibilité grand nombre de phase simplicité	uniquement pour les composés volatils ou semi-volatils quantification délicate prix
Chromatographie de partage Centrifuge (CPC)	chromatographie liquide-liquide préparative	Capacité d'automatisation Versatilité	Développement de méthode pouvant s'avérer long et consommatrice de solvant

2.4.2 Techniques d'analyses

Comme cela l'a été présenté, les compléments alimentaires à base de plantes sont caractérisés par une très grande complexité chimique et une diversité de métabolites. Leurs analyses nécessitent donc souvent des techniques analytiques puissantes pour s'assurer de leurs conformités. Les plus utilisées sont les techniques chromatographiques car elles permettent aujourd'hui d'associer grand pouvoir de séparation et sensibilité importante.

2.4.2.1 Techniques chromatographiques

Grâce au couplage avec la spectrométrie de masse, les techniques chromatographiques se sont imposées dans l'analyse des extraits végétaux. Elles reposent toutes sur la séparation des composés selon leur différence d'affinité entre une phase stationnaire fixe et une phase mobile (liquide ou gazeuse). La plus utilisée est la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC, High performance Liquid

Chromatography). Elle regroupe différents modes de séparation selon la nature de la phase stationnaire :

- Chromatographie de partage,
- Chromatographie d'adsorption,
- Chromatographie d'échange d'ions,
- Chromatographie d'affinité,
- Chromatographie d'exclusion stérique.

De toutes ces méthodes, c'est la chromatographie de partage qui présente le plus d'intérêt : en mode normal (phase stationnaire polaire et phase mobile apolaire) et en mode inverse (polarité des phases inversées)⁵⁸.

Les détecteurs les plus utilisés sont le spectrophotomètre UV-Visible, le Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière (DEDL), le détecteur Corona, le détecteur de masse⁵⁹.

Depuis une vingtaine d'année des instruments capables de fonctionner à de hautes pressions permettent l'utilisation de support de très faibles granulométries permettant une réduction de tailles de colonnes, des volumes de solvants et du temps d'analyse. Il s'agit de la chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC).

Ces dernières années ont également vu le développement de la chromatographie en phase supercritique (SFC, Supercritical Fluid Chromatography) qui utilise comme phase mobile un fluide ou mélange de fluide à l'état supercritique. Cet état particulier lui confère un coefficient de diffusion plus élevé et une viscosité plus faible qu'un liquide. L'efficacité chromatographique est ainsi améliorée, ce qui permet d'utiliser des colonnes plus longues ou de monter plusieurs colonnes en série. La phase mobile la plus utilisée est le CO₂, ce qui représente un avantage supplémentaire. La SFC a ainsi été employée pour l'analyse de 16 furocoumarines dans une huile essentielle de citron (phase stationnaire : pentafluorophényle, phase mobile : CO₂ supercritique/EtOH)^{60,61}. La chromatographie gazeuse (GC) est une technique très répandue pour l'analyse des composés volatils thermostables, comme les constituants des huiles essentielles^{62,63}. La variété de ces systèmes d'injection (direct, à espace de tête, thermodésorption), et détecteurs (à ionisation de flamme, spectromètre de masse, azote/phosphore..), mais surtout le grand pouvoir de séparation des colonnes capillaires en font une technique de choix⁶⁴.

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) de par ses limites de détection, son grand domaine de linéarité, sa simplicité, son prix est le plus utilisé pour les analyses quantitatives.

Le couplage avec la spectrométrie de masse est très répandu pour la caractérisation structurale. Cela est permis grâce aux bibliothèques de spectre en ionisation électronique qui peuvent contenir plusieurs centaines de milliers de spectres.

Ces dernières années ont vu le développement de nouvelles innovations très utiles pour l'analyse des mélanges complexes. Il s'agit principalement des techniques de chromatographie à deux dimensions (GC-GC et GCxGC) et des détecteurs de masse à haute résolution⁶⁵.

La chromatographie sur couche mince (TLC, Thin Layer Chromatography) est une technique d'une grande utilité pour l'analyse d'extraits issus de produits à base de plantes. Elle fait intervenir une phase stationnaire fixée sur un support solide plat en aluminium ou en verre et une phase mobile constituée d'un solvant ou mélange de solvants. Aujourd'hui elle tend à être remplacée par la chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC, High Performance Thin Layer Chromatography) qui présente une granulométrie plus faible et homogène permettant un gain de résolution. L'automatisation des dépôts, l'utilisation de la détection densitométrique et l'existence de nombreux révélateurs de spécificités variables présentent de nombreux avantages pour l'analyse d'extraits végétaux⁶⁶.

- Possibilité d'analyser plusieurs échantillons simultanément,
- Plaques à usage unique permettant une simplification de la préparation d'échantillon,
- Quantités de solvants réduites...

De plus, par l'existence de révélateurs spécifiques, l'HPTLC permet de caractériser très rapidement les différentes familles de métabolites présents dans un extrait (acides aminés, sucres, terpènes, saponines, alcaloïdes...).

2.4.2.2 Techniques spectroscopiques

Bien que moins utilisés que les techniques chromatographiques, les techniques spectroscopiques peuvent se révéler utiles.

La spectroscopie UV-Visible se montre intéressante pour certaines analyses quantitatives. Elle repose sur la propriété de certaines molécules d'absorber des radiations de longueurs d'onde comprises entre 180 et 900 nm. Cette technique est particulièrement adaptée à l'analyse de molécules portant des chromophores comme les polyphénols.

Il en va de même pour la spectroscopie infrarouge essentiellement représentée par la FTIR^{67,68} (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) et la NIR^{69,70} (Near Infrared Spectroscopy) pouvant être associées à l'analyse de plantes à des fins d'identification ou de dosage.

Si la caractérisation des composés volatils, sous réserve qu'ils soient connus, est relativement aisé (utilisation du couplage GC/MS), cela est beaucoup plus délicat pour les composés non volatils. En effet, contrairement aux composés volatils, peu de banques de données de spectres de masse existent (pas de standardisation des conditions d'ionisation). Dans ces cas les analyseurs de masse haute résolution peuvent se révéler très utiles : ils permettent d'obtenir la masse exacte de l'analyte ionisé et associé à son profil isotopique, en déduisent sa formule brute⁷¹. L'étude de la fragmentation permet également d'obtenir des informations structurales.

Si la littérature ne fournit pas d'informations suffisantes à corréliser aux données spectrales pour identifier le composé, il est alors nécessaire de l'isoler pour caractériser sa structure. De très nombreuses techniques d'isolement (flash chromatography, SPE, CPC, HPLC-semipréparative) sont aujourd'hui disponibles en phytochimie pour isoler les quelques mg de composé nécessaire à la caractérisation structurale. Elle est généralement réalisée à l'aide de techniques spectroscopiques comme la spectrométrie de masse, l'infrarouge et surtout la RMN mono et bidimensionnel du proton et du carbone 13.

Dans le domaine des ingrédients naturels utilisés pour la formulation de compléments alimentaires, il peut être nécessaire de s'assurer de l'authenticité des matières premières (variété botanique, origine géographique, mise en évidence d'**adultération**...). Pour cela plusieurs techniques peuvent être utilisées comme la chromatographie chirale, très utile pour l'étude d'origine (naturelle, botanique, géographique...). Mais les techniques spectroscopiques sont aujourd'hui les plus performantes. La SNIF-NMR⁷² (Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance) est basée sur la spectroscopie RMN ²H, plus précisément la

mesure des rapports $^2\text{H}/^1\text{H}$ qui permet la caractérisation de l'origine naturelle et dans certains cas l'origine géographique. Le comptage par scintillation liquide du ^{14}C permet d'étudier la naturalité des extraits⁷³. Enfin l'IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry) permet de mesurer les rapports des isotopes stables permettant de caractériser l'origine naturelle, voire géographique d'un produit⁷⁴.

2.4.3 La métabolomique

Toutes les techniques analytiques classiques n'étudient que de façon partielle les échantillons. Une approche plus globale se développe depuis plusieurs années, la **métabolomique**.

La métabolomique a pour objectif l'analyse non sélective du plus grand nombre de métabolites d'un système donné dans des conditions définies. Il s'agit de réaliser de nombreuses analyses pour un grand nombre d'échantillons dans les mêmes conditions et de traiter l'ensemble des données par des méthodes de traitement statistiques adaptées. Deux grandes approches peuvent être utilisées :

- L'approche globale : étude non ciblée du métabolome (notion d'empreinte) sans caractérisation et quantification. L'ensemble des métabolites est analysé pour ensuite identifier ceux responsables des différences (non-conformité, adultérations...). Le profilage métabolomique peut être considéré comme une variante, il a pour principe l'étude quantitative d'un groupe de métabolites d'une même famille ou d'une même origine⁷⁵.
- L'approche ciblée permet d'étudier des métabolites cibles (résultats de données bibliographiques, réglementaires, résultats d'études, souvent menées selon l'approche globale).

Les techniques analytiques pouvant être utilisées en métabolomique sont nombreuses. Elles doivent associer un temps de préparation des échantillons restreint et des analyses automatisées, répétables et robustes. Il s'agit le plus souvent de techniques chromatographiques ou spectroscopiques (RMN, FTIR, NIR).

2.5 Disparités des méthodes d'analyse employées par les industriels pour contrôler les matières premières

La chimie analytique est un outil puissant dans le domaine des compléments alimentaires. Elle permet de tracer les composés d'intérêt et de les doser pour en évaluer la qualité ou bien pour en suivre la stabilité. Afin de répondre aux besoins des analystes, des autorités ou consommateurs, des organismes ont mis en place des méthodes de référence (Pharmacopées, normes) mais l'explosion du secteur est telle que de nombreuses espèces végétales utilisées ne possèdent pas toujours de cahier des charges relatifs à leurs contrôles.

Ainsi, de nombreux laboratoires d'analyse indépendants proposent leurs services afin que les industriels et les consommateurs (à travers les associations de défense) puissent suivre la qualité des matières tout au long de leur approvisionnement et de leur production. Cependant, étant donné qu'aucune ligne directrice concernant les méthodes d'analyses exactes à employer n'est énoncée dans l'Arrêté Plantes, les résultats obtenus seront variables et fonction de :

- leur coût : la qualité des méthodes analytiques employées sont souvent tributaires des moyens financiers à la disposition des fabricants.
- le délai : nécessité de libérer des lots parfois dans des délais impartis courts alors que les méthodes d'analyse nécessitent parfois de long développement

De plus, même si certaines techniques ou méthodes sont référencées dans la littérature, du recul doit être pris par rapport à leur pertinence comme le démontre les exemples détaillés ci-après.

2.5.1 Discussion sur quelques cas pratiques

Les principales techniques utilisées pour doser des molécules ou des familles de molécules issues des référentiels usuels comme les pharmacopées et les normes sont la gravimétrie, la spectrométrie UV et les chromatographies HPTLC-HPLC/UV et GC/FID. Même si les critères de linéarité, répétabilité, reproductibilité et robustesse des méthodes sont remplis, leur spécificité et leur mode de dosage peuvent être discutés. D'après l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)⁷⁶, la spécificité est la capacité d'une méthode d'établir sans ambiguïté l'existence de la substance à analyser dans un échantillon

susceptible de contenir d'autres molécules. Ainsi, une procédure d'analyse quantitative est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser et en aucun cas des substances interférentes. Le manque de séparation préalable à l'analyse soulève des questions quant à la spécificité de l'analyse d'un échantillon par spectrophotométrie UV. Tout comme celle des méthodes colorimétriques impliquant une réaction chimique préalable à la mesure par spectrophotométrie UV. Dans ce dernier cas, la réaction chimique peut très bien faire réagir d'autres composés que ceux ciblés.

2.5.1.1 Cas du dosage par spectrophotométrie UV

Considérons un échantillon contenant de l'orange amère (*Citrus aurantium* L.) et de la rhubarbe (*Rheum officinalis* L.). Les composés d'intérêt sont les flavanones (pour l'orange) et les anthraquinones (pour la rhubarbe). De manière générale, les anthraquinones sont dosées à leurs longueurs d'onde d'absorption maximale à 420 nm et les flavanones à 280 nm⁷⁷. Dans l'exemple du mélange (Figure 9), en se basant à 420 nm (ligne bleue), il est possible de voir que les flavanones n'interfèrent pas sur le résultat. Dans ce cas, l'analyse est spécifique. En revanche, en se fixant à 280 nm pour doser les flavanones (ligne rouge), les anthraquinones interféreront car elles présentent également un signal important à cette longueur d'onde. Le résultat de la teneur en flavanones sera éloigné de la réalité. Dans ce cas, l'analyse est non spécifique. Avec la multitude de composés présents dans les organismes végétaux, il est facile d'imaginer que pour toutes les longueurs d'onde, il y aura des interférences qui aura pour effet de surévaluer les résultats.

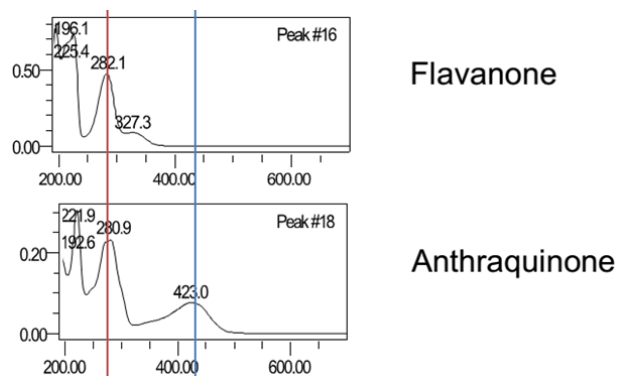


Figure 9- Spectre UV des flavanones de *C. aurantium* et des anthraquinones de *R. officinalis*

Cela soulève donc la question de la spécificité de toutes les méthodes employant la spectrophotométrie UV comme seule et unique technique employée pour un dosage ou une identification.

2.5.1.1.1 Dosage des composés d'intérêt du safran selon ISO 3632-2

La méthode ISO 3632-2⁷⁸ proposant le dosage des substances d'intérêt du Safran par spectrophotométrie UV. Il s'agit-là de doser les trois composés principaux qui caractérisent le safran, le safranal pour ses propriétés olfactives, la picrocrocine pour ses propriétés gustatives et la crocine pour son pouvoir colorant. Or, comme décrit avec l'exemple à la Figure 9, rien ne peut garantir que seuls les composés étudiés absorbent aux longueurs d'ondes étudiés.

2.5.1.1.2 Dosage des polyphénols totaux dans le thé⁷⁹

Il en va de même pour le dosage des polyphénols du thé. Les polyphénols, composés antioxydants, sont des substances particulièrement suivies dans le domaine des compléments alimentaires. La grande majorité des organismes végétaux, comme le thé vert, en contiennent en quantité ce qui donne l'opportunité aux industriels de pouvoir revendiquer des activités liées à ces substances. La méthode dite de Folin Ciocalteu est une ancienne méthode utilisant la spectrométrie UV en se basant sur une longueur d'onde d'absorption peu caractéristique (280 nm) mais à laquelle tous les polyphénols et de nombreux autres composés⁸⁰ (tels que l'acide ascorbique, le fructose, ou le glucose) absorbent sans distinction influant ainsi sur le résultat en le majorant. De nombreux laboratoires proposent des méthodes différentes pour le dosage des polyphénols et le .

Tableau 12 en compare quelques-unes applicables pour le thé vert.

Tableau 12 – comparaison de quelques méthodes de dosage de polyphénols sur des échantillons de thé vert

Méthode	Technique	Standard	Teneur	Cible
ISO 14502-1 (Folin)	Spectro UV	Acide gallique	Significativement sur-évaluée	Polyphénols
ISO 14502-2	HPLC-UV	5 catéchines (intégration 5 dérivés)	Exacte sur les composés ciblés	Flavan-3-ol
AOAC HPLC ⁸¹	HPLC-UV	7 catéchines (intégration 7 dérivés)	Exacte sur les composés ciblés	Flavan-3-ol

USP	HPLC-UV	EGCG (intégration 7 dérivés)	Légèrement sous/sur-évaluée	Flavan-3-ol
-----	---------	---------------------------------	--------------------------------	-------------

Aucun lien ne lie la méthode ISO 14502-1 (Méthode de Folin) aux trois autres méthodes. Les résultats ne seront pas comparables et la méthode ISO 14502-1 présentera des résultats significativement supérieurs aux trois autres méthodes car beaucoup moins spécifique.

2.5.1.2 Cas du dosage par HPLC-UV

Avec une séparation préalable à la détection, l'analyse gagne en spécificité. En considérant que tous les constituants de l'échantillon sont entièrement séparés, il est possible de sélectionner le composé d'intérêt pour le doser de la manière la plus exacte possible. C'est le cas d'un dosage par HPLC-UV. Or pour être mise en œuvre, cette analyse nécessite d'employer des standards analytiques qui auront des facteurs de réponse fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques⁸². Dans le domaine des substances naturelles, les standards analytiques sont souvent problématiques car ces derniers sont onéreux et parfois non disponibles. Les isoler soi-même requiert souvent des techniques de pointe, un savoir-faire particulier et un temps considérable. Pour pallier ces problématiques, il est possible d'utiliser le standard analytique d'une substance pour en doser une autre.

- Pour le dosage d'une molécule : en utilisant un standard analytique d'une structure chimique très proche (utiliser la quercétine pour doser le kaempférol)
- Pour le dosage d'un ensemble de molécules : il peut être réalisé à l'aide d'un standard d'une molécule présentant une structure la plus proche possible de l'ensemble des molécules. Cette approche se nomme le dosage en « équivalence ». Il sera alors dosé un ensemble de molécules en équivalence du standard analytique choisi. Par exemple les flavanones de l'orange douce sont souvent dosés à l'aide du standard analytique de l'hespéridine.

Ainsi, il existe certaines solutions alternatives mais des précautions sont à prendre car certains cas sont complexes. Prenons l'exemple de l'analyse de flavonoïdes par HPLC-UV. Ces derniers sont souvent présents dans la nature sous forme d'hétérosides et leurs facteurs de réponse en UV dépendent grandement du

chromophore et de la masse molaire de la molécule. Il existe donc souvent de très nombreux représentants de cette famille laissant comme choix :

- L'analyse précise : doser chacun de ces composés avec son standard analytique respectif. Cette solution est difficilement réalisable économiquement car les composés à doser sont souvent nombreux (et parfois même inconnus)
- L'estimation : doser tous les composés en équivalence du représentant majoritaire. Dans ce cas, le résultat ne sera pas exact (les facteurs de réponse de toutes les molécules sont différents) mais se rapprochera de la réalité.

Le Tableau 13 met en évidence les facteurs de réponse de deux flavonoïdes à 356 nm en fonction de leur masse molaire⁸³.

Tableau 13 – facteurs de réponse de la rutine par rapport à la quercétine par UV à 356 nm

Molécule	Masse molaire	Nombre de sucres	Facteur de réponse
Quercétine	302 g.mol ⁻¹	0	1,00
Rutine	610 g.mol ⁻¹	2	0,57

Si la rutine est dosée en équivalence quercétine, la teneur en sera sous-évaluée de près d'un facteur 2 et inversement. Ainsi, il est, à ce stade, difficile de doser de manière juste un ensemble de molécules car le résultat en sera sur- ou sous-évalué (de plus, il sera impossible d'en déterminer la tendance).

2.5.2 Cas des pharmacopées

Afin de satisfaire au contrôle qualité imposé par l'arrêté plantes du 24 juin 2014, les fabricants de compléments alimentaires à base de plantes ont à leur disposition plusieurs référentiels. En matière de plantes, les ouvrages faisant autorité sont les pharmacopées, mais toutes plantes mentionnées dans l'arrêté n'y sont pas décrites.

2.5.2.1 Principe des pharmacopées

Historiquement, les pharmacopées sont des ouvrages décrivant des plantes médicinales, leurs mélanges ainsi que leurs propriétés thérapeutiques. De nos jours, les pharmacopées ont évolué vers de véritables encyclopédies réglementaires du médicament. Y sont définis : les critères de pureté des matières premières ainsi que les méthodes d'analyses à utiliser pour en assurer le contrôle. L'ensemble de ces

descriptions est publié sous forme de monographies et ses dernières font autorité dans le pays où elle est rédigée.

2.5.2.2 Pharmacopées disponibles

Il existe un grand nombre de pharmacopées dans le monde : citons par exemple les pharmacopées mexicaine, iranienne ou pakistanaise. Mais dans un souci d'allègement des procédures d'enregistrement des produits contenant des substances médicamenteuses, une harmonisation des monographies nommée Conférence internationale sur l'harmonisation (ICH) a été initiée entre trois importantes pharmacopées : la pharmacopée européenne, la pharmacopée américaine et la pharmacopée japonaise. Ce programme trilatéral débuté en 1990 porte depuis 2015 le nom de Conseil internationale sur l'harmonisation. Ces trois pharmacopées étant les principales références mondiales, elles ont été sélectionnées afin d'établir un tableau récapitulatif des plantes citées dans l'arrêté plantes du 24 juin 2014 comme possédant des substances à surveiller et possédant ou non une monographie les concernant dans l'un de ces trois référentiels (Tableau 14).

Tableau 14 – Plantes possédant des substances à surveiller et monographie associée

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Pharmacopée européenne	Pharmacopée japonaise	Pharmacopée américaine
<i>Abies alba</i> Mill.	Sapin pectiné, Sapin blanc, Sapin argenté			
<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.	Sapin baumier			
<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	Sapin de Sibérie			
<i>Acacia senegal</i> (L.) Willd.	Acacia, Gommier blanc			
<i>Achillea millefolium</i> L.	Achillée millefeuille	x		
<i>Achyranthes bidentata</i> Blume			x	
<i>Actaea racemosa</i> L.	Actée à grappes, Cimicaire à grappes	x		
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Marronnier d'Inde			
<i>Aframomum angustifolium</i> (Sonn.) K.Schum.	Maniguette fine			
<i>Albizia julibrissin</i> Durazz.	Acacia de Constantinople, Arbre de soie			
<i>Aloe ferox</i> Mill.	Aloès	x	x	
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	Aloès	x		
<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	Grand galanga			
<i>Ammi visnaga</i> (L.) Lam.	Petit ammi, Herbe aux cure-dents, Khella			
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill	Ananas			
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge			x	
<i>Anethum graveolens</i> L.	Aneth, Fenouil bâtard			x
<i>Angelica archangelica</i> L.	Angélique vraie			x

<i>Angelica dahurica</i> (Hoffm.) Benth. & Hook.f. ex Franch. & Sav.	Bai zhi			
<i>Angelica pubescens</i> Maxim.	Shishiudo, Du Huo			
<i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels	Angélique chinoise, Dong quai			
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> Ralfs ex Bornet & Flahault	Algue bleue-vert du lac Klamath, AFA			
<i>Aralia elata</i> (Miq.) Seem.	Angélique en arbre du Japon			
<i>Artemisia dracuncululus</i> L.	Estragon			x
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Armoise commune			
<i>Ballota nigra</i> L.	Ballote fétide, Ballote noire	x		
<i>Betula alleghaniensis</i> Britton	Bouleau jaune			
<i>Betula pendula</i> Roth	Bouleau verruqueux, Bouleau blanc			
<i>Betula pubescens</i> Ehrh.	Bouleau pubescent, Bouleau des marais, Bouleau blanc			
<i>Borago officinalis</i> L.	Bourrache	x		
<i>Boswellia serrata</i> Roxb. ex Colebr.	Encens	x		
<i>Brassica nigra</i> (L.) K.Koch	Moutarde noire			x
<i>Brassica oleracea</i> L.	Chou			
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Théier			
<i>Capsicum annuum</i> L.	Piment		x	
<i>Carum carvi</i> L.	Carvi, Cumin des prés	x		
<i>Cassia fistula</i> L.	Canéficier, Cassier			
<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	Cognassier de Chine			
<i>Cinchona pubescens</i> Vahl	Quinquina rouge			
<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl	Camphrier, Laurier du Japon	x		

<i>Cinnamomum cassia</i> (Nees & T.Nees) J.Presl	Cannelier de Chine		x	x
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl	Cannelier, Cannelier de Ceylan	x		x
<i>Citrus aurantium</i> L.	Oranger amer, Bigaradier, Oranger de Curaçao	x		x
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	Citronnier, Limon	x		x
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Mandarinier	x		x
<i>Citrus paradisi</i> Macfad.	Pamplemoussier, pomelo			x
<i>Codonopsis pilosula</i> (Franch.) Nannf.	Codonopsis			
<i>Coffea arabica</i> L.	Caféier			
<i>Coffea canephora</i> Pierre ex A.Froehner	Caféier robusta			
<i>Cola acuminata</i> (P.Beauv.) Schott et Endl.	Noix de cola, Colatier			
<i>Cola ballayi</i> Cornu ex Heckel	Noix de cola, Colatier			
<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott et Endl.	Noix de cola, Colatier			
<i>Combretum micranthum</i> G.Don	Kinkéliba			
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Coriandre	x		x
<i>Crataegus laevigata</i> (Poir.) DC.	Aubépine à deux styles, Epine blanche	x		
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	Aubépine à un style, Epine blanche	x		
<i>Cucurbita pepo</i> L.	Courge, Pépon, Citrouille			
<i>Cuminum cyminum</i> L.	Cumin officinal			x
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Cyprès provençal			
<i>Cyclanthera pedata</i> (L.) Schrad.	Cyclanthere à feuilles digitées			
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Citronelle, Lemongrass de l'Amerique Centrale			
<i>Dioscorea oppositifolia</i> L.	Igname, yam chinois			
<i>Dioscorea villosa</i> L.	kaki			

<i>Echinacea angustifolia</i> DC.	Échinacée à feuilles étroites	x		
<i>Echinacea pallida</i> (Nutt.) Nutt.	Echinacée pâle	x		
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	Echinacée pourpre	x		
<i>Elettaria cardamomum</i> (L.) Maton.	Cardamome			
<i>Elymus repens</i> (L.) Gould	Chiendent commun, Chiendent rampant (petit)	x		
<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.	Néflier du Japon, Bilbassier		x	
<i>Eryngium campestre</i> L.	Panicaut champêtre, Chardon roulant			
<i>Eschscholzia californica</i> Cham.	Eschscholzia de Californie, Pavot jaune de Californie			
<i>Eucalyptus dives</i> Schauer	Eucalyptus mentholé			
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Eucalyptus globuleux, Gommier bleu	x		x
<i>Eucalyptus radiata</i> A.Cunn. ex DC.	Eucalyptus radié	x		
<i>Eucalyptus smithii</i> F.Muell. ex R.T.Baker				
<i>Ferula assa-foetida</i> L.	Ase fétide			
<i>Ficus carica</i> L.	Figuier comestible			
<i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.	Reine des prés, Spirée ulmaire, Barbe de bouc	x		
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Fenouil	x	x	x
<i>Frangula dodonei</i> Ard.	Bourdaine	x		
<i>Frangula purshiana</i> Cooper	Cascara, Écorce sacrée	x		
<i>Galium odoratum</i> (L.) Scop.	Aspérule odorante, Gaillet odorant			
<i>Gentiana lutea</i> L.	Grande gentiane, Gentiane jaune	x	x	
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgo, Arbre des pagodes, Arbre aux quarante écus	x		
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Réglisse	x	x	
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	Réglisse de l'Oural, Réglisse de Sibérie, Gancao		x	
<i>Hamamelis virginiana</i> L.	Hamamélis de Virginie	x		

<i>Harpagophytum procumbens</i> (Burch.) DC.	Harpagophyton, Griffes du diable	x		
<i>Harpagophytum zeyheri</i> Decne.	Harpagophyton, Griffes du diable	x		
<i>Hedeoma pulegioides</i> (L.) Pers.	Hédéome			
<i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench	Immortelle des sables			
<i>Herniaria glabra</i> L.	Herniaire glabre			
<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.			x	
<i>Huperzia serrata</i> (Thunb.) Rothm.				
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Hysope			
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	Maté, Thé du Paraguay, Yerba maté			
<i>Illicium verum</i> Hook.f.	Anis étoilé de Chine, Badianier de Chine	x		
<i>Justicia adhatoda</i> L.	Noix de Malabar, Noyer des Indes			
<i>Laurus nobilis</i> L.	Laurier-sauce, Laurier commun, Laurier noble			x
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Lavande, Lavande vraie	x		x
<i>Lavandula latifolia</i> Medik	Lavande aspic	x		x
<i>Ledum palustre</i> L.	Lédon, Lédum des marais			
<i>Leonurus cardiaca</i> L.	Agripaume cardiaque	x		
<i>Lepidium meyenii</i> Walp.	Maca			
<i>Levisticum officinale</i> W.D.J. Koch	Céleri perpétuel, Livèche, Herbe-à-Maggi			x
<i>Lindera aggregata</i> (Sims) Kosterm.				
<i>Linum usitatissimum</i> L.	Lin cultivé	x		x
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Lotier corniculé, Pied-de-poule			
<i>Lotus corniculatus subsp. corniculatus</i> L.	Lotier corniculé, Pied-de-poule			
<i>Lycium barbarum</i> L.	Lyciet, Lyciet commun, Goji	x	x	

<i>Lycium chinense</i> Mill.	Lyciet de chine, Goji		x	
<i>Lycopodium clavatum</i> L.	Lycopode en massue			
<i>Lycopus europaeus</i> L.	Lycope, Lycope d'Europe, Chanvre d'eau			
<i>Magnolia officinalis</i> Rehder & E.H.Wilson	Magnolia officinal	x	x	
<i>Marrubium vulgare</i> L.	Marrube	x		
<i>Marsdenia cundurango</i> Rchb.f.	Condurango			
<i>Marsdenia sylvestris</i> (Retz.) P.I.Forst.				
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Matricaire, Matricaire camomille, Camomille vulgaire, Camomille allemande	x		x
<i>Medicago sativa</i> L.	Luzerne commune, Alfalfa			
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel	Melaleuca, Arbre à thé, Mélaleuque			
<i>Melaleuca cajuputi</i> Powell	Cajepulier			
<i>Melaleuca leucadendra</i> (L.) L.	Cajepulier			
<i>Melaleuca quinquenervia</i> (Cav.) S.T. Blake	Niaouli			
<i>Melaleuca viridiflora</i> Sol. ex Gaertn.	Niaouli	x		
<i>Melilotus altissimus</i> Thuill.	Mélilot élevé, Grand mélilot			
<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	Mélilot officinal	x		
<i>Melissa officinalis</i> L.	Mélisse, Mélisse officinale	x		
<i>Mentha arvensis</i> L.	Menthe des champs		x	
<i>Mentha spicata</i> L.	Menthe verte, Menthe en grappe, Menthe romaine, Menthe crépue			x
<i>Mentha x piperita</i> L.	Menthe poivrée	x		x

<i>Menyanthes trifoliata</i> L.	Trèfle d'eau, Trèfle des marais, Ményanthe	x		
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.	Ficoïde glaciale			
<i>Morinda citrifolia</i> L.	Nono, Pomme-chien, Noni			
<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	Muscadier aromatique	x		x
<i>Myrtus communis</i> L.	Myrte			
<i>Nardostachys jatamansi</i> (D. Don) DC.	Jatamansi, Nard indien, Valériane rouge			
<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	Lotus, Lotus des Indes, Lotus sacré		x	
<i>Nepeta cataria</i> L.	Herbe aux chats			
<i>Nigella sativa</i> L.	Cumin noir, Poivrete			
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Basilic, Basilic commun			x
<i>Ophiopogon japonicus</i> (Thunb.) Ker Gawl.	Barbe de serpent, Muguet du Japon		x	
<i>Origanum compactum</i> Benth.	Origan compact			x
<i>Origanum majorana</i> L.	Marjolaine, Marjolaine à coquilles, Marjolaine des jardins, Marjolaine cultivée	x		x
<i>Origanum vulgare</i> L.	Origan, Origan vulgaire, Marjolaine sauvage	x		x
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passiflore	x		
<i>Paullinia cupana</i> Kunth	Guarana			
<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton	Perilla		x	
<i>Persea americana</i> Mill.	Avocatier			
<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nyman ex A.W. Hill	Persil cultivé			x
<i>Peumus boldus</i> Molina	Boldo	x		
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Haricot commun			
<i>Phellodendron amurense</i> Rupr.	Phellodendron de l'Amour, Arbre au liège		x	

<i>Physalis alkekengi</i> L.	Coqueret, Alkékonge coqueret, Lanterne chinoise			
<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	Poivrier de la Jamaïque, Piment de la Jamaïque, Quatre épices			x
<i>Pimenta racemosa</i> (Mill.) J.W.Moore	Piment couronné, Bois d'Inde, Bay St Thomas			x
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Anis	x		
<i>Pimpinella major</i> (L.) Huds.	Grand boucage			
<i>Pimpinella saxifraga</i> L.	Petit boucage			
<i>Piper aduncum</i> L.	Matico			
<i>Piper longum</i> L.	Poivre long	x		
<i>Piper nigrum</i> L.	Poivrier noir, Poivrier blanc	x		
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Lentisque, Pistachier lentisque			
<i>Plectranthus barbatus</i> Andrews				
<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.	Patchouli			
<i>Prunus armeniaca</i> L.	Abricotier			
<i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i> (Willd.) Sanjappa & Pradeep	Kudzu		x	
<i>Punica granatum</i> L.	Grenadier			
<i>Rhamnus cathartica</i> L.	Nerprun purgatif			
<i>Rheum officinale</i> Baill.	Rhubarbe officinale	x	x	
<i>Rheum palmatum</i> L.	Rhubarbe palmée, Rhubarbe de Chine	x	x	
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Romarin	x		x
<i>Rumex acetosa</i> L.	Grande oseille, Oseille sauvage, Oseille des prés, Oseille, Rumex oseille, Surette, Oseille commune			
<i>Rumex crispus</i> L.	Patience crépue, Oseille aux feuilles frisée, Oseille crépue, Churelle, Herbe britannique, Parielle, Rhubarbe sauvage			

<i>Salix alba</i> L.	Saule blanc, Osier blanc	x		
<i>Salix fragilis</i> L.	Saule fragile, Saule cassant			
<i>Salix pentandra</i> L.	Saule laurier, Saule à cinq étamines			
<i>Salix purpurea</i> L.	Osier rouge, Saule pourpre			
<i>Salvia officinalis</i> L.	Sauge officinale	x		x
<i>Salvia officinalis</i> subsp. <i>lavandulifolia</i> (Vahl) Gams	Sauge d'Espagne, Sauge à feuilles de lavande			
<i>Salvia sclarea</i> L.	Sauge sclarée, Sclarée, Toute-bonne			
<i>Sanicula elata</i> Buch.-Ham. ex D. Don	Sanicle, Sanicle d'Europe			
<i>Satureja montana</i> L.	Sarriette des montagnes, Sarriette vivace			
<i>Saussurea costus</i> (Falc.) Lipsch.	Costus		x	x
<i>Senna alexandrina</i> Mill.	Séné d'Alexandrie	x	x	
<i>Senna obtusifolia</i> (L.) H.S.Irwin & Barneby				
<i>Serenoa repens</i> (W.Bartram) Small	Sabal, Palmier de Floride, Chou palmiste, Palmier de l'Amerique du Nord	x		
<i>Smilax officinalis</i> Kunth	Salsepareille			
<i>Solanum melongena</i> L.	Aubergine			
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Pomme de terre	x		
<i>Stemmacantha carthamoides</i> (Willd.) Dittrich	Rhapontique des Alpes, Racine de maral			
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry	Girofle, Giroflier, Géroflier	x		x
<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch.Bip.	Grande camomille	x		
<i>Theobroma cacao</i> L.	Cacaoyer			

<i>Thymus serpyllum</i> L.	Serpolet à feuilles étroites, Thym serpolet, Piolet, Thym sauvage	x		
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Thym commun, Thym vrai, Pouilleux, Frigouille	x		x
<i>Thymus zygis</i> L.	Thym d'Espagne, Thym rouge			x
<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	Concombre chinois		x	
<i>Tropaeolum majus</i> L.	Grande capucine			
<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.	Damiana			
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Schult.) DC.	Griffe de chat			
<i>Valeriana jatamansi</i> Jones	Valériane d'Inde			
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Valériane officinale	x		
<i>Vigna angularis</i> (Willd.) Ohwi & H. Ohashi	Haricot azuki			
<i>Vinca major</i> L.	Grande pervenche			
<i>Vinca minor</i> L.	Petite pervenche			
<i>Viola arvensis</i> Murray	Pensée des champs			
<i>Viola palustris</i> L.	Violette des marais			
<i>Viola tricolor</i> L.	Pensée sauvage, Violette tricolore des jardins, Pensée tricolore	x		
<i>Vitex agnus-castus</i> L.	Gatillier, Agneau-chaste			
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Gingembre	x	x	x

Afin de visualiser au mieux le challenge scientifique que représente l'arrêté plantes, le diagramme présenté à la Figure 10 récapitule de façon succincte le nombre de monographies de plantes disponibles dans trois pharmacopées majeures.

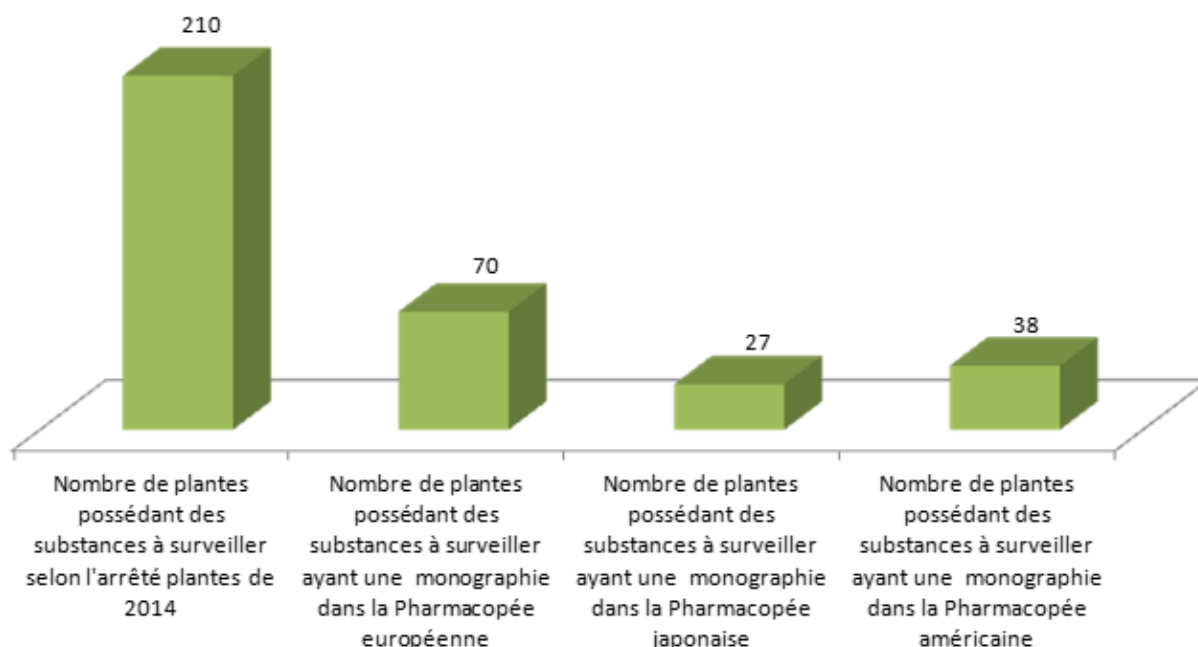


Figure 10 - Diagramme récapitulant le nombre de plantes possédant des substances à surveiller et le nombres de monographies disponibles dans trois pharmacopées

Ainsi, de nombreuses plantes ne possèdent pas de monographies dans aucun des trois référentiels les plus utilisés de nos jours. C'est pourquoi, dans de nombreuses situations, les professionnels du complément alimentaire à base de plantes devront se tourner vers des publications scientifiques, vers des normes issues du système d'harmonisation ISO ou bien vers des méthodes d'analyses publiées par certains fabricants de matériels analytiques dans le but de promouvoir leurs innovations instrumentales, comme c'est le cas notamment pour l'HPTLC Association (The International Association for the Advancement of High Performance Thin Layer Chromatography).

3 Conclusion

Les compléments alimentaires à base de plantes étant, au fil des années, devenus des denrées faisant parties du quotidien des consommateurs, les autorités sanitaires se devaient d'encadrer au mieux leur commercialisation. Les différents articles de loi publiés depuis 2002 ont été complétés par l'Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi. Ce nouvel arrêté fixe désormais les lignes directrices d'un contrôle qualité qui se doit d'être approfondi et pertinent afin de garantir la sécurité des consommateurs. Ces nouveaux paramètres représentent souvent des obstacles pour les petites structures qui n'avaient, jusqu'à ce nouvel arrêté, que peu de contraintes. Or elles se doivent désormais de s'étoffer des connaissances nécessaires dans les domaines de la chimie analytique, de la phytochimie, et de la botanique. Et que ce soit au travers des ressources humaines ou de la sous-traitance, les frais supplémentaires engendrés peuvent mettre à mal l'équilibre financier de ces entreprises. Les délais dont disposent les professionnels des compléments alimentaires à base de plantes en amont de la commercialisation, se doivent de prendre en compte toutes les phases de recherche et développement nécessaires au bon respect des nouvelles exigences édictées dans l'arrêté plantes. Ainsi, les premières recherches bibliographiques (étendues aux synonymes de la plante) au travers des méthodes référencées telles que des méthodes ISO ou des monographies issues de pharmacopées, doivent être complétées par une analyse approfondie des publications scientifiques les plus récentes afin d'être mise au profit d'une qualité accrue du produit final. Les acteurs du secteur pourront ensuite choisir les instruments analytiques nécessaires et représentant le compromis le plus favorable entre les moyens financiers de l'entreprise, les aménagements nécessaires garantissant la sécurité des opérateurs et la pertinence des résultats analytiques obtenus.

Le secteur du complément alimentaire étant encore en plein essor, les réglementations en vigueur seront d'ici les prochaines années encore amenées à évoluer jusqu'à peut-être un jour, proposer des méthodes standardisées et réactualisées propres à chaque plante employée.

En attendant, il est nécessaire de proposer des nouvelles stratégies afin de garantir l'innocuité des compléments alimentaires à base de plantes commercialisés. Car bien que certaines méthodes d'analyse standardisées aient su proposer des solutions

d'appoint aux professionnels utilisant des plantes, il est désormais essentiel de démocratiser l'utilisation de nouvelles techniques analytiques plus pertinentes et aisément déployables au sein des laboratoires de contrôle qualité. Cette étude bibliographique a pu mettre en évidence que l'un des principaux freins du domaine de l'analyse des plantes concernait l'accès aux standards analytiques de molécules qui peuvent être considérées comme marqueur d'une plante ou qui font l'objet d'une restriction car potentiellement dangereuses. C'est partant de ce constat que ces travaux ont vu le jour avec pour objectif d'apporter des réponses aux problématiques qui peuvent en découler.

Le premier objectif a été d'évaluer les performances qu'offre un nouvel équipement permettant le couplage de l'analyse par l'HPTLC-MS dans le domaine de l'identification de marqueurs potentiels de plantes citées dans l'arrêté plantes.

Le deuxième domaine étudié a été celui de l'isolement de substances naturelles à l'échelle préparative par chromatographie de partage centrifuge avec pour cadre la purification de valépotriates. Ces derniers sont des substances réglementées d'après l'Arrêté plantes or aucun standard n'est commercialisé.

Le troisième sujet étudié a été celui de l'apport de l'HRMS à la caractérisation de familles de composés réglementés d'après l'arrêté plantes : les alcaloïdes pyrrolizidiniques.

Chapitre 2

Résultats et discussion

Partie 1

Le couplage de la chromatographie planaire haute performances à la spectrométrie de masse basse résolution : une nouvelle approche pour l'identification rapide de métabolites marqueurs ?

Partie 1 : Le couplage de la chromatographie planaire haute performances à la spectrométrie de masse basse résolution : une nouvelle approche pour l'identification rapide de métabolites marqueurs ?

1 Introduction

La chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) fait partie des techniques chromatographiques de référence dans le domaine de l'analyse de plantes⁸⁴. Elle permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons, facilitant ainsi l'interprétation des résultats. Cette technique d'analyse peut être utilisée tant pour des identifications botaniques⁸⁵ (monographies issues de pharmacopées) ou des mises en évidence d'adultération⁸⁶, que pour la recherche de nouveaux ingrédients⁵² (comme c'est le cas en bioautographie) ou encore pour la quantification de composés⁸⁷. Cette technique possède l'avantage d'être particulièrement visuelle, ce qui facilite la comparaison d'échantillons. De plus, le fait que la plaque de phase stationnaire soit à usage unique permet de s'affranchir des effets mémoires ou des adsorptions irréversibles⁸⁸ avec celle-ci dans le cas d'analyses de matrices complexes. Le couplage de l'HPTLC à la spectrométrie de masse ouvre la voie d'une seconde dimension⁸⁹ pouvant mener, grâce à une approche par déréplication⁹⁰ (recoupement de données telles que : rapport frontal, couleur après révélation, spectres de masse...) soit à l'identification de composés référencés, soit à suggérer des hypothèses d'identification de nouveaux composés.

L'intérêt porté à l'interface TLC-MS 2® (*Camag, Muttenz*), dite IMS2, réside dans le fait que cet équipement permet un couplage direct, sans réglages particuliers, de l'analyse par HPTLC à la spectrométrie de masse, contrairement à d'autres techniques de couplage faisant appel à des appareillages spécifiques tels que les sources de type DART (Direct Analysis in Real Time)^{91,92,93}, DESI (Desorption Electrospray Ionisation)⁹⁴, MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)⁹⁵ ou encore ASAP (Atmospheric Solids Analysis Probe)⁸⁹ (Tableau 15).

Tableau 15 - Spécificités des principales techniques utilisées lors du couplage de la HPTLC à la MS

Source d'ionisation	Spécificités
DART	Nécessite de choisir un gaz adapté, ainsi que d'optimiser l'angle et la distance de la source et de la plaque par rapport à l'analyseur
DESI	Nécessite d'optimiser l'angle et la distance de la source et de la plaque par rapport à l'analyseur
MALDI	Nécessite de préparer la plaque par l'application d'un gel
ASAP	Nécessite de prélever manuellement par grattage les spots à analyser

C'est dans ce contexte et en collaboration avec la société CAMAG qu'il a été décidé d'évaluer les performances qu'offre le couplage HPTLC-IMS2-ESI-SQD dans le cadre d'identifications botaniques basées sur l'identification rapide et sans ambiguïté de composés marqueurs de plantes pouvant être présents en faibles quantités, ainsi que d'évaluer les informations structurales pouvant être obtenues lors de l'étude de composés inconnus. Étant donné l'importance de l'HPTLC en phytochimie et la simplicité de cette interface, il nous a semblé particulièrement intéressant d'évaluer son apport pour l'identification de plantes utilisées dans les compléments alimentaires. Le contexte de l'étude prend pour référentiel les standards de la Pharmacopée Européenne. Les monographies de plantes issues de la Ph. Eur. fournissent des spécifications devant être respectées afin que la plante étudiée puisse être identifiées : aspects microscopiques, présence de marqueurs ou encore teneur minimale en composés d'intérêt. À ces fins, les analyses HPTLC qui y sont décrites sont destinées à l'identification des plantes (aspect qualitatif) au travers des marqueurs spécifiques tandis que les dosages de ces derniers sont réalisés par HPLC (aspect quantitatif). Or les teneurs minimales de référence utilisées pour les analyses HPLC peuvent aussi s'appliquer aux analyses HPTLC. Le but de l'étude, est de déterminer si, dans le cadre d'un contrôle qualité, le couplage HPTLC-IMS2-SQD permet de détecter de très faibles quantités de marqueurs afin de confirmer l'identité d'une plante et ce, sans que le recours à l'utilisation de standard analytique ne soit nécessaire.

2 Rappels bibliographiques sur l'HPTLC

Deux points particuliers permettent de distinguer l'HPTLC de la TLC. Premièrement, l'emploi de plaques dont la granulométrie et l'épaisseur sont plus fines confère à l'HPTLC un pouvoir de séparation plus important et deuxièmement, l'utilisation d'un équipement semi automatisé et contrôlé par un logiciel permet d'obtenir des résultats répétables, reproductibles et, si nécessaires, quantitatifs.

Les différentes étapes d'une analyse par HPTLC sont le prélavage de la plaque HPTLC, le dépôt des échantillons, le développement de la plaque dans un système de solvants (phase mobile), et la détection des composés permettant l'interprétation chromatographique. Dans le cadre du développement d'une méthode d'analyse, les points tels que la sélection de la phase stationnaire, la composition de la phase mobile,

le choix du mode de développement et la technique de mise en évidence des composés séparés sont à définir.

Contrairement à d'autres techniques d'analyses chromatographiques, l'HPTLC est dite « *offline* » par le fait qu'elle ne soit pas entièrement automatisée et que les différents modules ne soient pas connectés les uns aux autres. Cet aspect, bien que contraignant, offre à l'opérateur l'opportunité d'intervenir à chaque étape de l'analyse, tant pour en suivre ou en modifier son déroulement que pour identifier d'éventuelles sources d'erreurs ou d'origines de pannes. Elle se déroule généralement en trois étapes : le dépôt de l'échantillon sur la plaque de phase stationnaire, le développement automatisé de la plaque dans la phase mobile et la détection des composés grâce à de l'imagerie.

2.1 Le dépôt

L'étape du dépôt est essentielle pour l'obtention de résultats chromatographiques interprétables et son automatisation garantit leur qualité car les points critiques suivant peuvent être contrôlés :

- La vaporisation de l'échantillon sous flux d'azote permet d'appliquer l'échantillon sans exercer de forces mécaniques pouvant altérer la phase stationnaire.
- L'application en bande fine permet de minimiser les phénomènes de diffusion pouvant affecter la résolution chromatographique.
- Le volume d'application est entièrement maîtrisé évitant ainsi de possibles surcharges pouvant impacter la séparation.

L'instrument *Automatic TLC Sampler 4* dit *ATS4* (Camag, Muttenz, Suisse) permet de contrôler ces trois paramètres en fonction de l'échantillon étudié (Figure 11).



Figure 11 - Déposeur ATS4® Camag

Ainsi il est possible de modifier la vitesse d'application d'un échantillon en fonction du solvant dans lequel il se trouve. C'est notamment le cas des échantillons aqueux qui peuvent ne pas s'évaporer pas assez vite. Dans de telles situations, la vitesse d'application peut être diminuée afin de permettre au solvant de s'évaporer et de minimiser ainsi les phénomènes de diffusion. Le volume d'application peut aussi être varié cependant, il est conseillé de ne pas appliquer plus de 10 μL sur des plaques de grade HPTLC (épaisseur de la phase stationnaire de 150 à 200 μm) et pas plus de 2 μL sur des plaques HPTLC de grade MS (épaisseur de la phase stationnaire de 80 à 120 μm) afin d'éviter toute surcharge ou dégradation de la phase stationnaire.

2.2 Le choix de la phase stationnaire

2.2.1 Les différentes natures de phase stationnaire

La large gamme de plaques HPTLC aujourd'hui disponible offre la possibilité de séparer des composés d'un mélange complexe en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Les principales phases stationnaires peuvent être constituées de silice, cellulose ou silice greffée : diméthyl (RP 2), octyl (RP8), octadecyl (RP18), 3-aminopropyl (NH_2), 3-cyanopropyl (CN), propanediol (Diol). Bien qu'autrefois répandu, l'oxyde d'aluminium n'est pas cité car sa granulométrie ne permet pas l'élaboration de plaque ultra haute performance. Désormais les plaques de silice sont employées dans près de 90 % des méthodes décrites en HPTLC⁹⁶. La majorité des séparations est donc réalisée en phase normale où les groupes hydroxyles confèrent le caractère polaire à la phase. Les phases de silices greffées peuvent opérer en phase inverse et normale pour les CN et Diol, en phase normale pour les NH_2 et phase inverse pour les RP.

2.2.2 Les principaux mécanismes de rétention chromatographique

Les deux principaux mécanismes de rétention pouvant être mis en jeu lors de séparation en HPTLC sont la chromatographie d'adsorption et la chromatographie de partage.

2.2.2.1 La chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption est souvent décrite comme une chromatographie de déplacement où les interactions entre le solvant, le soluté et la phase stationnaire entrent en compétition. Les deux principaux phénomènes régissant ce mode de séparations ont été décrits par Snyder⁹⁷ et Soczewinski⁹⁸ pour le modèle dit de « compétition » et par Scott et Kucera⁹⁹ pour le modèle dit d' « interaction avec le solvant ». Le premier décrit la rétention comme suit : les molécules de solvant ayant établi des interactions dipôle-dipôle avec la phase stationnaire sont « déplacées » par des molécules de solutés qui elles aussi vont établir de nouvelles interactions dipôle-dipôle avec la phase stationnaire. Le second explique que le solvant forme une couche superficielle sur la phase stationnaire et que ce sont les interactions entre le solvant et les solutés qui permettent la séparation des composés. Ces deux théories se complètent et se rejoignent sur le fait que ce type de séparation repose sur la capacité de chaque composant à former des interactions type liaisons hydrogènes et forces de Van der Waals. La plupart des chromatographies en phase normale repose sur ce principe, c'est pourquoi quelques précautions d'emploi lors de l'utilisation de plaques de silice sont à respecter. En effet, le pouvoir de séparation aussi nommé « activité » de la plaque de silice est dû au groupes hydroxyles qu'elle porte, or ces derniers peuvent former des liaisons hydrogènes avec des molécules d'eau (Figure 12). Ces interactions inactivent les sites sinalols et l'activité de la plaque s'en retrouve diminuée. C'est pourquoi, les conditions de stockage et d'utilisation de ce type de plaques implique de contrôler le taux d'humidité auquel il est exposé.

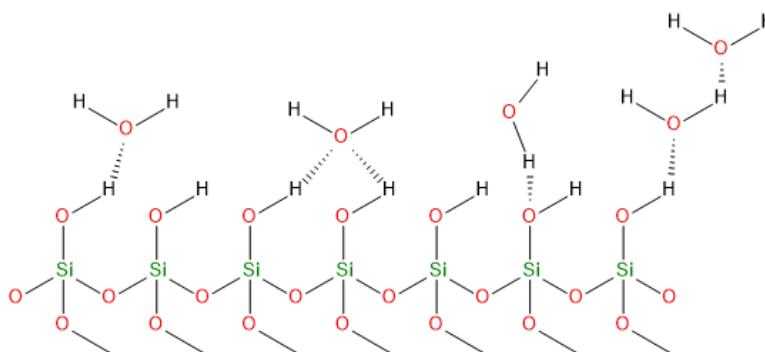


Figure 12- Liaisons hydrogène formées par des molécules d'eau en surface du gel de silice

2.2.2.2 La chromatographie de partage

Les principes de la chromatographie de partage sont souvent observés en phase inverse (aussi dite chromatographie de partage à polarité de phase inversée). Elle repose sur le coefficient de partage¹⁰⁰ d'un soluté entre deux phases liquides. Bien que l'HPTLC soit constituée d'une phase stationnaire solide et d'une phase mobile liquide, il est considéré que les chaînes alkyles greffées sont assimilables à une phase liquide. Le mécanisme de rétention est ici associé au caractère hydrophobe de la phase stationnaire et des solutés. Cependant, les principes de chromatographie de partage peuvent aussi être appliqués en polarité de phase normale comme c'est notamment le cas avec les phases stationnaires à base de cellulose¹⁰¹.

2.3 La phase mobile

L'étape clé d'un développement chromatographique réussi réside dans la sélection d'une phase mobile adaptée. Dans le cas de matrices complexes, cela peut se révéler fastidieux. Cependant, il existe des méthodologies adaptées à la mise au point de phase mobile notamment celles de Snyder¹⁰² et de Nyiredy⁹⁶ qui ont largement contribué à leur développement.

2.3.1 Classification des solvants selon Snyder

En chromatographie d'adsorption, les solvants sont fréquemment caractérisés par leur force éluante ϵ° et leur sélectivité¹⁰². La force éluante est défini comme l'énergie d'adsorption d'un solvant par unité d'adsorbant. Elle évalue la capacité qu'a un solvant à désorber des analytes de la phase stationnaire. La sélectivité d'un solvant caractérise sa capacité à avoir une affinité sensiblement différente pour un analyte

plutôt qu'un autre dans le cas où leur polarité est semblable. Les paramètres définissant la sélectivité d'un solvant tiennent compte de ses propriétés en tant qu'accepteur de proton (x_e), donneur de proton (x_d) ainsi que de son moment dipolaire (x_n) (Figure 13).

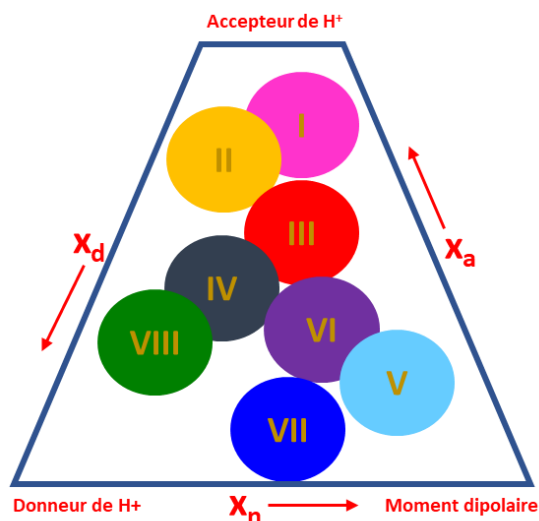


Figure 13- Triangle des sélectivités selon Snyder

Cependant, la force éluante d'un mélange de solvants ne peut être prédite empiriquement, c'est pourquoi une autre approche que la force éluante (largement décrite par Rohrschneider¹⁰³) a été proposée par Snyder, celle de l'index de polarité P' (Tableau 16).

Tableau 16- Force éluante et index de polarité de quelques solvant sur gel de silice

Solvant	Force éluant (ϵ°)	Index de polarité (P')	Sélectivité		
			X_E	X_D	X_N
Hexane	0,00-0,01	0,1	n/a	n/a	n/a
Toluène	0,22	2,4	0,25	0,28	0,47
Chloroforme	0,26	4,1	0,25	0,41	0,33
Dichlorométhane	0,32	3,1	0,29	0,18	0,53
Ether diéthylique	0,38-0,43	2,8	0,53	0,13	0,34
Acétate d'éthyle	0,38-0,48	4,4	0,34	0,23	0,43
Acétone	0,47-0,53	5,1	0,35	0,23	0,42
Acétonitrile	0,50-0,52	5,8	0,31	0,27	0,42
Tétrahydrofurane	0,44-0,53	4,0	0,38	0,20	0,42
Méthanol	0,70-0,73	5,1	0,48	0,22	0,31

Ce dernier, en tenant compte des interactions intermoléculaires entre l'analyte et le solvant, permet d'établir une relation de proportionnalité pour évaluer l'index de polarité d'un mélange de solvants¹⁰⁴.

$$P'_{xy} = f_x P_x + f_y P_y$$

Équation 1- Index de polarité d'un mélange de deux solvant X et Y. P' : index de polarité du mélange, f : pourcentage de solvant

Snyder a proposé de classer 81 solvants en 8 catégories¹⁰² en fonction de leur index de polarité et de leur sélectivité dans le cas d'une application en phase normale (Tableau 17).

Tableau 17- Exemple de classe de solvant selon Snyder

Classe	Famille de solvant
I	Ethers aliphatiques
II	Alcools aliphatiques
III	Tétrahydrofurane
IV	Glycols ; acide acétique
V	Dichlorométhane
VI	Cétones et esters aliphatiques, nitriles
VII	Hydrocarbures aromatiques
VIII	Chloroforme, eau

2.3.2 La sélection des solvants

Afin de déterminer les solvants pouvant être employés dans l'élaboration de la phase mobile, il est nécessaire d'effectuer des tests préalables. Pour cela, une approche fréquemment employée est celle décrite par Nyiredy⁹⁶ où certains solvants appartenant au 8 catégories établit par Snyder sont testés. Le plus souvent, les solvants suivants sont évalués : éther diéthylique (I), éthanol (II), tétrahydrofurane (III), acide acétique (IV), dichlorométhane (V), acétate d'éthyle (VI), dioxane (VI), toluène (VII) et le chloroforme (VIII). Pour cela, l'échantillon à séparer est déposé sur une plaque de gel de silice et l'ensemble est placé dans une cuve de développement non saturée contenant le solvant à tester. Une fois la migration réalisée, la zone de répartition des composés séparés est jugée satisfaisante si elle présente un rapport frontal ou R_f (Figure 14) compris entre 0,2 et 0,8.

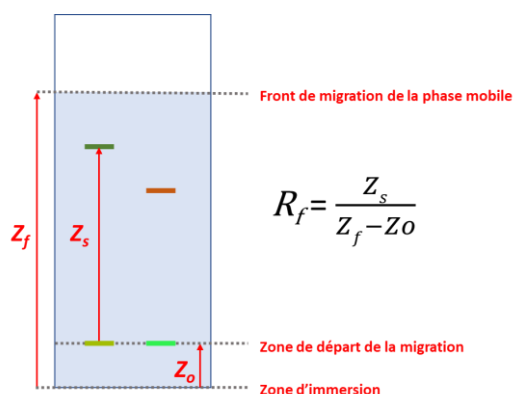


Figure 14– Illustration décrivant le rapport frontal R_f

Dans le cas où le R_f est trop haut, le solvant est dilué avec de l'hexane dont l'index de polarité est quasi nul. Au contraire, si le R_f est trop bas, le solvant est dilué avec de l'acide acétique ou de l'eau afin d'augmenter l'index de polarité et de manière intrinsèque, les R_f . C'est une fois ces tests réalisés que les solvants séparant le plus grand nombre de composés et dont les index polarités permettent l'obtention de R_f jugés satisfaisants que ces derniers sont retenus.

2.3.3 Système d'optimisation « PRISMA »

Afin d'optimiser les proportions de chaque solvant constituant la phase mobile, le modèle PRISMA décrit par Nyiredy est communément employé^{96,105}. Comme son nom l'indique, un prisme est construit sur les bases des propriétés des meilleurs solvants sélectionnés (cf.2.3.2). En général, 3 solvants sont choisis et le prisme obtenu permet de définir les rapports en volume de chaque solvant en fonction de la polarité des analytes à séparer. Pour cela, les 3 solvants sont reportés sur le plan horizontal afin de former un triangle équilatéral. Les arêtes verticales sont de la longueur de l'index de polarité de chaque solvant. Etant donné que les index de polarité diffèrent d'un solvant à un autre, les arêtes n'ont pas la même longueur et la partie supérieure du prisme obtenu forme un triangle qui n'est ni parallèle ni congruent au triangle de base. Il s'en distingue 3 parties : la base du prisme, la partie régulière en son centre, et la partie supérieure irrégulière.

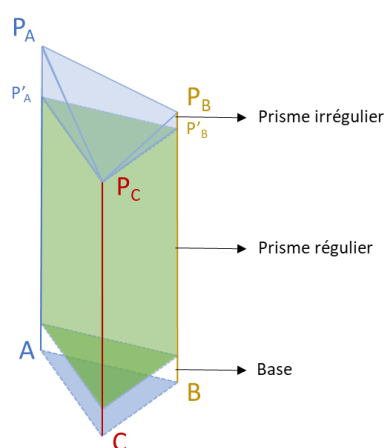


Figure 15- Prisme obtenu pour le mélange de trois solvants

En phase normale, la partie supérieure irrégulière du prisme est utilisée pour optimiser les phases mobiles séparant les composés polaires tandis que la partie régulière du prisme est étudiée pour optimiser les phases mobiles séparant les composés apolaires. Dans la Figure 15, les points P'_A et P'_B du prisme régulier sont obtenus en

utilisant de l'hexane dont l'index de polarité est quasi nul dans les proportions calculées avec l'Équation 1. Les rapports de solvants d'un triangle congruent à la base contenu dans le prisme régulier peuvent ensuite être testés (Figure 16).

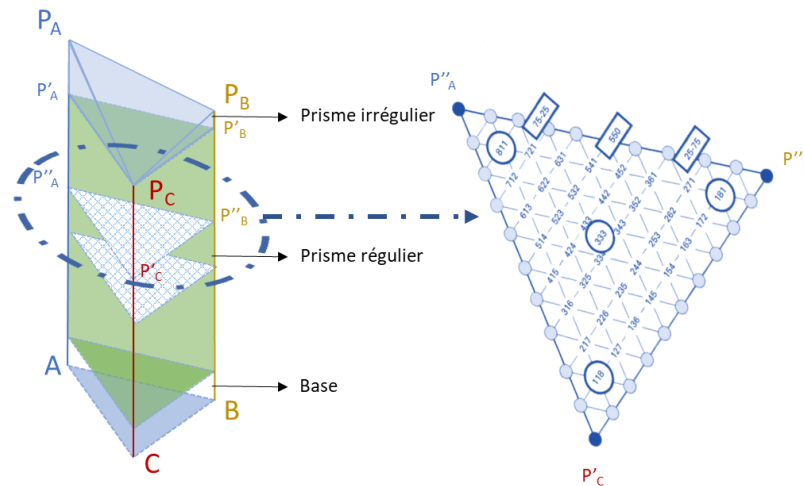


Figure 16- Triangle des sélectivités proposé par Nyiredy pour tous triangles congruents à la base formés par les index de polarité

Lors des tests expérimentaux, si les rapports frontaux ne sont pas satisfaisants, l'étude d'un triangle à un index de polarité différent est à privilégier. Cependant, si les sélectivités étaient satisfaisantes, alors le même rapport de solvant constituant la phase mobile peut être employé car la sélectivité ne change pas pour un même rapport de solvant. On peut en déduire que chaque triangle équilatéral congruent à la base représente un seul et unique index de polarité tandis que les rapports de volume de chaque solvant, calculé avec ce triangle, représente une sélectivité différente.

2.4 Les différents modes de développement

La flexibilité de l'HPTLC réside aussi dans les nombreux modes de développement qu'elle offre : développement vertical, horizontal, circulaire, anti-circulaire et les développements multiples.

2.4.1 Développement vertical automatisé

Cette étape se caractérise par la migration par capillarité d'une phase mobile, constituée d'un ou plusieurs solvants, au travers la phase stationnaire entraînant ainsi les composés déposés. L'instrument *Automatic Development Chamber 2* dit *ADC2* permet le développement vertical de plaque de 20x10 cm dans une cuve à double fond (Figure 17).



Figure 17- Chambre de développement ADC2® Camag

Comme vu précédemment, il est nécessaire de travailler dans une atmosphère dont l'humidité est contrôlée car l'eau inactive les sites de silice en s'adsorbant *via* des liaisons hydrogène. La baisse d'activité de la phase stationnaire influe sur la résolution, les distances de migrations et la répétabilité des analyses. Pour cela, l'ADC2, peut réaliser un ajustement de l'humidité avant le début de la saturation et du développement chromatographique. À cette fin, la plaque est placée dans un circuit fermé où un flux d'air traverse, durant un temps déterminé, une solution saline saturée de $MgCl_2$ qui a la propriété de maintenir une humidité relative de 33 % lorsque la température est comprise entre 20 et 25 °C. Aussi, l'ADC2 permet de saturer la cuve de développement en vapeurs de solvants durant un temps fixe. À cette fin, une cuve à double fond est placée à l'intérieur de l'ADC2 : un compartiment permet de contenir de la phase mobile afin que celle-ci sature la cuve et, une fois la saturation atteinte, le second compartiment accueille le reste de phase mobile afin de permettre le développement chromatographique. Dès lors, la plaque est placée dans un volume fixe de 10 ml de phase mobile et la distance de migration du solvant est suivie par laser. Dès l'instant où le front de migration du solvant atteint la distance prédéterminée, la plaque est retirée de la phase mobile et séchée au sein de l'équipement.

2.4.2 D'autres modes de développement

Bien que la technique la plus connue soit celle du développement vertical, il existe d'autres techniques telles que le développement horizontal qui, d'un point de vue théorique, ne présente aucune différence avec le développement vertical.

Le développement horizontal permet cependant d'améliorer considérablement la répétabilité des analyses lorsque celles-ci s'opèrent sans saturation préalable car à aucun moment la plaque n'est en contact avec une phase de vapeur de solvant ce qui réduit considérablement la variabilité de cette étape. Aussi, il est intéressant de souligner que ce mode de développement permet de faire migrer des échantillons des deux côtés de la plaque, augmentant ainsi les rendements d'analyses car, en plus de multiplier le nombre d'échantillons par deux, elle permet de développer chaque côté de la plaque avec des phases mobiles différentes.

Le développement circulaire est réalisé en faisant migrer la phase mobile à partir du centre du cercle de phase stationnaire. Ce mode de développement permet d'augmenter jusqu'à 4 à 5 fois la résolution des composés dont les R_f sont normalement bas en développement vertical. Pour que cela soit vérifié, l'échantillon doit être appliqué aussi proche que possible de la zone d'introduction de la phase mobile.^{105,106}

Inversement, le développement anti-circulaire¹⁰⁷ est utilisé pour améliorer la résolution des composés dont les R_f sont hauts en développement vertical. Ce mode est le plus rapide car la vitesse du solvant est constante alors qu'en développement vertical, horizontal et circulaire la vitesse du solvant décroît en fonction du temps et de la distance parcourue. En effet, lors d'un développement anti-circulaire le solvant est dirigé vers le centre du cercle de phase stationnaire ce qui a pour effet de créer une pression croissante au sein de la phase mobile au fur et à mesure que la surface à parcourir diminue. De cette manière la pression exercée compense la perte de vitesse du solvant ce qui permet de maintenir une vitesse constante et d'augmenter la résolution des molécules dont les R_f sont hauts.

Les développements multiples sont de différentes natures dont les uniques variables sont la composition de la phase mobile et les distances de migration. Il en résulte un grand nombre de modes de développement multiple tels que l'unidimensionnel, par incrémentation, par gradient, par gradient variable ou encore multidimensionnel. Par exemple, dans le cas d'un développement multiple unidimensionnel, la migration des composés est réalisée plusieurs fois (n) avec la même phase mobile sur la même distance de migration¹⁰⁸. Ce mode est employé pour augmenter les R_f des composés

dont les R_f sont normalement bas afin d'améliorer leur résolution. La valeur des rapports frontaux obtenus avec cette méthode peut être prédite grâce à l'Équation 2.

$$R_{f_{final}} = 1 - (1 - R_{f_{initial}})^n$$

Équation 2- Prédiction des R_f lors d'un développement multiple unidimensionnel

Dans le cas d'un développement multiple par incrémentation, la même phase mobile est utilisée mais les distances de migration varient de façon croissante. Ce mode permet d'améliorer la résolution des composés dont les R_f sont centraux. Tandis que le développement multiple par gradient emploie différentes phases mobiles et la même distance de migration.

2.5 La détection des composés

Une des singularités de l'HPTLC réside dans le fait que l'interprétation des résultats chromatographiques, en plus de pouvoir être effectuée *via* un chromatogramme, peut aussi être réalisée à l'œil nu. Pour cela, les composés doivent pouvoir être mis en évidence et deux approches sont communément employées : la détection directe et la détection après un traitement chimique dite dérivation.

2.5.1 La détection directe

Si les composés étudiés absorbent entre l'UV proche et le visible (de 254 nm à 800 nm), la plaque développée peut être observée à la lumière du jour (dite lumière blanche) ou à des longueurs d'ondes spécifiques, le plus souvent à 366 nm (UV lointain) et 254 nm (UV proche). Sous réserve d'être présents à des quantités supérieures à leur limite de détection, les composés absorbant à ses longueurs d'onde seront mis en évidence. Afin d'améliorer le seuil de détection des composés absorbant à 254 nm, les plaques chromatographiques peuvent contenir un indicateur de fluorescence (dit F_{254}). Ce dernier permet d'intensifier le contraste entre les zones sombres où se trouvent un composé et les zones sans composé qui fluorescent. La fluorescence est soit de couleur verte si l'agent fluorescent est du silicate de zinc, soit bleue si c'est du tungstate de magnésium. Sur le même principe, des indicateurs F_{366} sont aussi disponibles. Ils emploient des azurants optiques à base de rhodamine ou fluorescéine.

2.5.2 La dérivation

Il est courant que certains composés tels que les alcaloïdes, les terpènes, ou les stéroïdes n'absorbent pas dans le visible, ne permettant pas leur observation en détection directe. Pour pallier cela, des techniques de dérivation ont été développées. Ces dernières permettent soit de révéler des composés soit de diminuer leur limite de détection en intensifiant leur absorption. Le Tableau 18 résume les agents de dérivation les plus utilisés dans l'analyse de plantes⁸⁴.

Tableau 18 - Principaux agents de dérivation associés aux familles phytochimiques ciblées

Révéléateur	Mode de détection	Familles de composés cibles
2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)	lumière blanche	cétones, aldéhydes, alcaloïdes, flavolignanes
Acide acétique /acide sulfurique	lumière blanche	stéroïls, terpénoïdes
Acide acétique anhydre	254 nm - 366 nm	gingkolides (lactones terpéniques)
Acide chlorhydrique/acide acétique	lumière blanche ou 366 nm	valépotriates (iridoïdes)
Acide nitrique	254 nm - 366 nm	sennosides (anthraquinone), ajmaline, brucine, éphédrine (alcaloïdes)
Acide phosphomolybdique	lumière blanche	stéroïdes, morphine (alcaloïdes), rhaponticosides (stillbènes)
Acide sulfurique	lumière blanche ou 366 nm	universel
Acide trichloracétique/hexacyanoferrate de potassium/chlorure de fer (iii)	lumière blanche	sinalbine, sinigrine (glucosinolates)
Aniline/diphénylamine/acide phosphorique	lumière blanche	sucre
Anisaldéhyde/acide sulfurique	lumière blanche ou 366 nm	terpénoïdes, saponines, stéroïls, iridoïdes
Anisaldéhyde/acide sulfurique	lumière blanche	pétasine, isopétasine (sesquiterpènes)
Benzidine	lumière blanche	aucubine (iridoïde glycosilé)
Bleu de Berlin	lumière blanche	arbutine (phénol)
Chloramine/acide trichloracétique	366 nm	glycosides cardiotoniques
Chlorure de palladium (II)	lumière blanche	composés d' <i>Allium sp.</i>
Chlorure d'étain/acide chlorhydrique	366 nm	acides aristolochiques
Chlorure d'aluminium	366 nm	flavonoïdes, anthraquinones
Chlorure de fer (iii)	lumière blanche	phénol, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, hypéricines (anthraquinone)
DNPH/acide acétique/acide chlorhydrique	lumière blanche	valépotriates (iridoïdes)
Hydroxyde de potassium	lumière blanche ou 366 nm	anthraquinone, anthrone, coumarines, flavonoïdes
Iode	lumière blanche ou 366 nm	doubles liaison conjuguées, alcaloïdes, bases puriques, lipides, caroténoïdes
Iode/acide chlorhydrique	lumière blanche ou 254 nm	bases puriques

Partie 1 : Le couplage de la chromatographie planaire haute performances à la spectrométrie de masse basse résolution : une nouvelle approche pour l'identification rapide de métabolites marqueurs ?

Iode/chloroforme	lumière blanche ou 366 nm	alcaloïdes
Iode-amidon	lumière blanche	doubles liaison conjuguées, alcaloïdes, bases puriques, lipides, caroténoïdes
Iodoplatinate	lumière blanche	composés azotés
Ninhydrine	lumière blanche	acides aminés, éphédrine (alcaloïdes)
Nitrosodiméthylaniline	lumière blanche	anthrone
Permanganate de potassium/acide sulfurique	lumière blanche	fenchone (terpènes)
Phénylènediamine	lumière blanche ou 366 nm	acide fumarprotocetrarique (acides phénoliques)
Réactif de Barton	lumière blanche	gingérols (composé phénolique)
Réactif de Carr-Price	lumière blanche ou 366 nm	caroténoïdes insaturés, stérols, saponines, flavonoïdes, glycosides cardiotoniques
Réactif de Dragendorff	lumière blanche	alcaloïdes, hétérocycle azotés
Réactif de Gibbs	lumière blanche	arbutine (phénols), phénols, coumarines, thiols, thiones, capsaïcine (alcaloïdes), amines aliphatiques et aromatiques
Réactif de Kedde	lumière blanche	cardénolides (stéroïdes)
Réactif de Komarowsky	lumière blanche	saponines
Réactif de Liebermann-Burchard	366 nm	triterpènes, stéroïdes
Réactif de marquis	lumière blanche	opiacés (alcaloïdes)
Réactif de million	lumière blanche	arbutine (phénols), phénolglycosides
Réactif de neu (NP/PEG)	366 nm	flavonoïdes, anthocyanines
Réactif de Van Urk	lumière blanche	alcaloïdes
Réactif de Zimmermann	lumière blanche	sesquiterpènes
Réactif d'Ehrlich	lumière blanche	iridoïdes, proazulène (sesquiterpènes)
Sel fast blue b	lumière blanche ou 366 nm	phénols, tanins (polyphénols), cannabinoïdes
Sel fast red b	lumière blanche	amarogentine (sécoiridoïdes)
Sulfate de cuivre (ii)	lumière blanche	universel
Vanilline/acide acétique	lumière blanche	salicyline (composés phénoliques glucosylés)
Vanilline/acide chlorhydrique	lumière blanche	composés de <i>Commiphora sp.</i>
Vanilline/acide phosphorique	lumière blanche ou 366 nm	terpènes, lignanes, curcubitacines (stéroïdes)
Vanilline/acide sulfurique	lumière blanche ou 366 nm	terpénoïdes, phénylpronaoïdes, stérols, salicyline (composés phénoliques glucosylés)
Vapeurs d'ammoniaque	lumière blanche ou 366 nm	opiacés (alcaloïdes)

Dans le cas d'une analyse utilisant un standard analytique, la dérivation peut permettre de confirmer la présence d'une substance (association de données telle que les R_f et la couleur des spots). Cependant, ce mode de détection, même s'il permet de fournir une première indication sur la nature des composés présents dans l'échantillon, ne

saurait établir avec certitude la nature exacte des analytes étudiés. La mise en évidence d'alcaloïdes par le réactif de Dragendorff en est l'illustration : de faux négatifs sont générés notamment en présence des fonctions aldéhydes, cétones, éthers, esters, époxydes et peroxydes dont le carbone en β présente une double liaison¹⁰⁹.

2.5.3 Analyse des résultats obtenus par imagerie

Après les étapes décrites, deux choix s'offrent à l'opérateur souhaitant retraiter les résultats obtenus par imagerie : soit une photographie est prise sous différents éclairage afin d'être retraitée informatiquement, soit un densitomètre UV-visible retranscrit les zones d'élution en chromatogramme.

2.5.3.1 Imagerie simple

Le *TLC Visualizer 2* réalise des photographies des plaques développées, et si nécessaire révélée, en les éclairant à différentes longueurs d'ondes : lumière blanche, 254 nm et 366 nm. Une fois la photographie réalisée, le logiciel *visionCATS* permet de visualiser la plaque et réaliser des ajustements d'exposition afin d'interpréter les résultats chromatographiques obtenus.

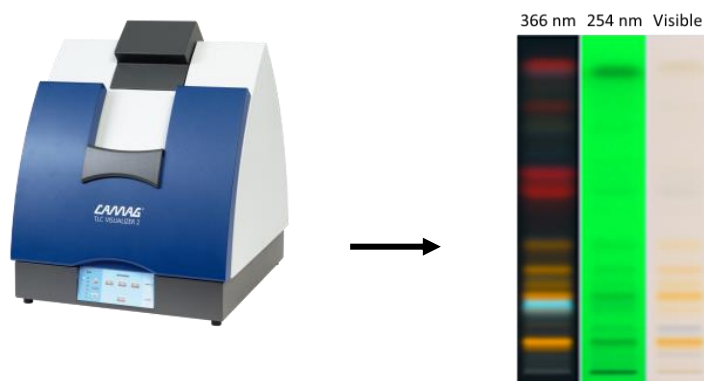


Figure 18 - Visualisation de la plaque à différentes longueurs d'ondes par le *TLC Visualizer 2*® Camag

2.5.3.2 Densitomètre

Le densitomètre est un instrument de mesure spectrale, qui, dans le cas de l'HPTLC, permet de balayer chaque bande d'élution à une ou plusieurs longueurs d'onde comprise entre 190 nm et 900 nm. Cet équipement permet de traduire les bandes d'élution en chromatogramme (Figure 19)⁸⁴.

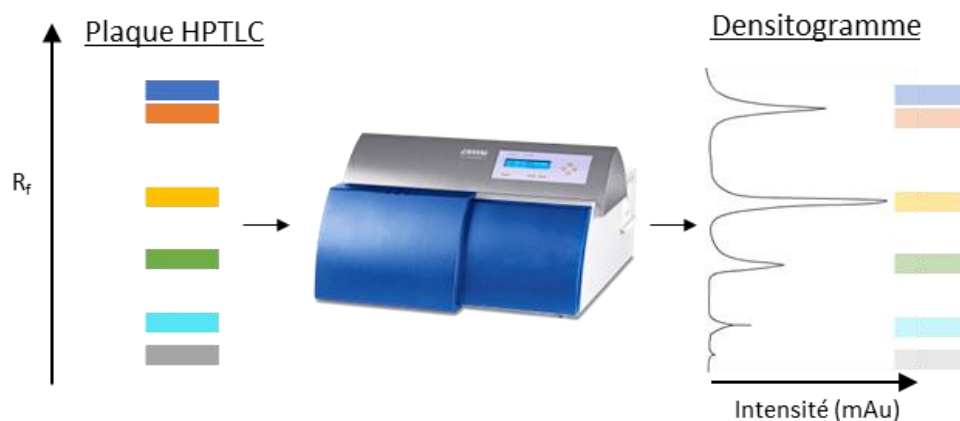


Figure 19 – Densitomètre *TLC Scanner 4@* Camag

2.6 Le couplage HPTLC-MS

Depuis plusieurs années différentes formes de couplage sont venues compléter les chaînes HPTLC classiques. De nombreux articles à ce sujet tels que le couplage HPTLC à la spectroscopie FTIR permettant l'obtention de résultats qualitatifs et quantitatifs ont été décrits dans la littérature notamment pour le dosage de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) dans l'eau ainsi que pour le dosage de dérivé du cannabinoïde tétrahydrocannabinol (THC) dans les urines¹¹⁰. Cependant, le couplage le plus répandu reste celui de l'HPTLC à la spectrométrie de masse. Jusqu'à présent cette technique spectroscopique nécessitait l'utilisation de sources d'ionisation dont la géométrie permettait l'extraction des composés de la plaque HPTLC telles la source DART⁹¹⁻⁹³, la source DESI⁹⁴, la source MALDI⁹⁵ ou encore la sonde ASAP⁸⁹. Cependant, dans le cadre d'un usage en analyse de routine, l'utilisation de ce type de source d'ionisation n'est pas adaptée du fait de l'investissement financier et la technicité qu'elles nécessitent, il s'agit principalement d'instruments développés pour la recherche.

L'option de prélever manuellement par grattage des zones d'intérêt peut être envisagée mais cette technique dégrade souvent la phase stationnaire en périphérie ce qui réduit le nombre de zones pouvant être analysées¹¹¹. De plus, l'étape d'extraction des composés d'intérêt de la silice grattée augmente la difficulté de mise en œuvre car un minimum de solvant doit être utilisé afin d'obtenir un signal de qualité en injection directe en source¹¹². C'est pourquoi, un appareillage facile d'accès permettant de créer un lien direct entre l'HPTLC et une source d'ionisation usuelle a été développé : l'*Interface MS (IMS)*. Cet équipement a été développée pour la

première fois en 2009¹¹³ et malgré le potentiel offert, moins d'une dizaine de publications dans le domaine des extraits naturels le mentionnent (Tableau 19).

Tableau 19 - Publications mentionnant l'emploi d'une IMS dans le domaine du végétal.

Date	Spectromètre de masse	Analytes ciblés	Source
2017	Trappe d'ions	polyphénols	[114]
2018	Triple quadripôle	gingérols	[115]
2018	Trappe d'ions	flavonoïdes	[116]
2019	Simple quadripôle	bases nucléiques	[117]

2.6.1 Description de l'*Interface MS 2* Camag®

L'équipement étudié permet le prélèvement semi-automatique de composés sur la plaque HPTLC (Figure 20). Pour cela, un laser cible la zone d'intérêt puis, un piston actionne la descente de la tête de prélèvement qui forme un cerclage étanche de 4 mm autour du spot étudié. Ensuite, le solvant ou le mélange de solvant d'extraction est dirigé à l'intérieur de ce cerclage afin de dissoudre les analytes et les extraire de la phase stationnaire. Par effet de contre pression, le résultat de l'extraction est orienté vers l'analyseur.

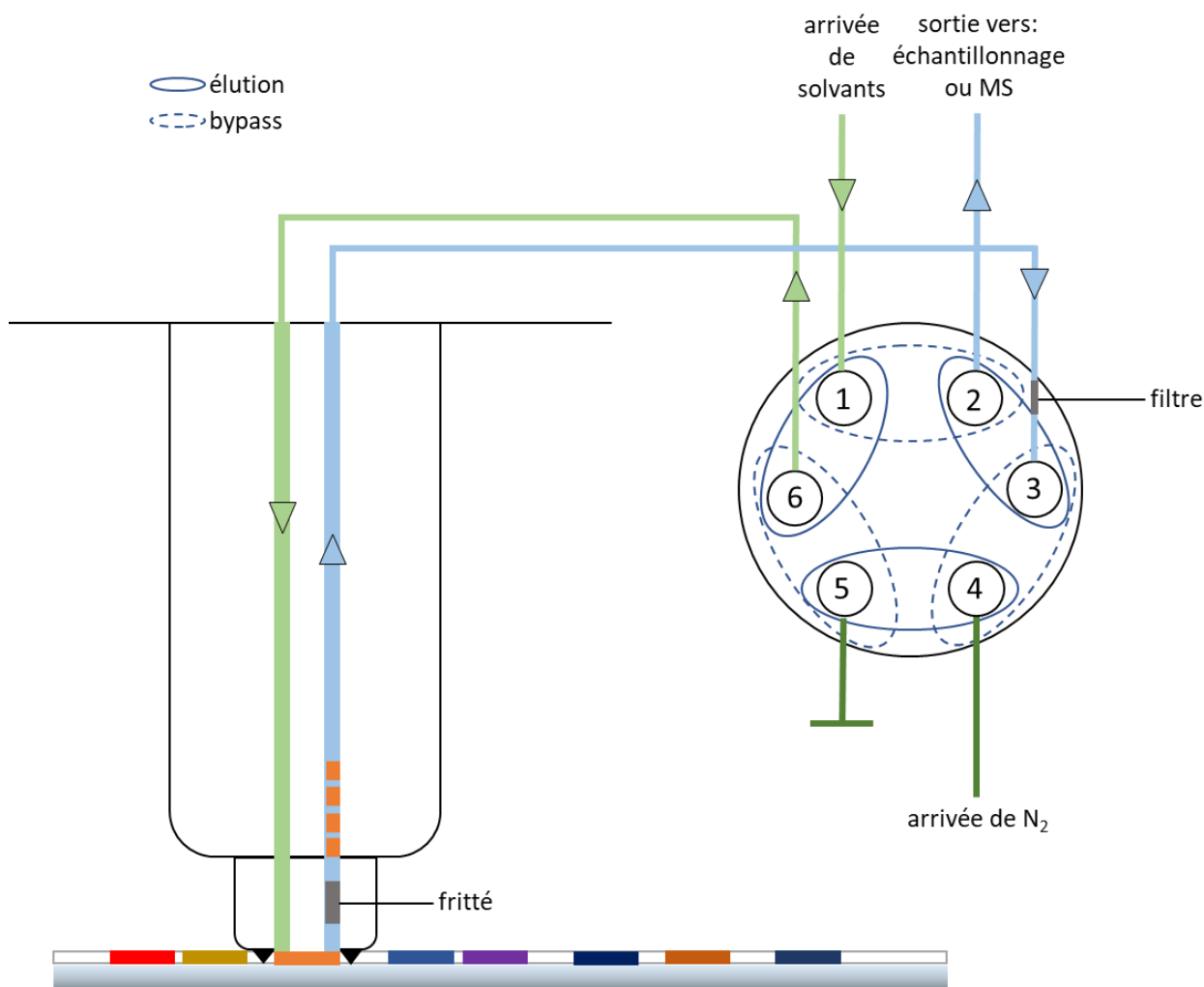


Figure 20- Schématisation du fonctionnement de l'Interface MS 2

2.6.2 Le spectromètre de masse utilisé dans le cadre de l'étude (ESI-SQD)

Le spectromètre de masse associe une source d'ionisation par électrospray (aussi dite électrospray) et un analyseur simple quadripôle. Cet instrument basse résolution est amené à être plus largement répandu dans les laboratoires d'analyses, notamment ceux destinés au contrôle qualité¹¹⁸. Il a donc été sélectionné afin d'étudier les performances du couplage HPTLC-IMS2-ESI-SQD.

2.6.2.1 La source d'ionisation par électrospray

Pour que les composés étudiés puissent se déplacer à l'intérieur de l'analyseur, ils doivent être chargés. Pour cela, un gradient de pressions et de tensions charge et dirige les analytes vers l'analyseur. À cette fin, les analytes contenus en phase liquide pénètrent un capillaire maintenu à un fort potentiel qui peut être soit positif (de 0,5 à 3,2 kV) soit négatif (de 0,5 à 2,6 kV). Le liquide ressort de ce capillaire chargé en

formant un cône de Taylor-Gilbert¹¹⁹. À l'extrémité de ce dernier, de fines gouttelettes chargées contenant les analytes se forment et leur diamètre réduit grâce à l'association de deux phénomènes : l'évaporation du solvant sous l'effet de la température d'entrée de source (entre 60 °C et 120 °C, en fonction du solvant employé) et à l'explosion coulombienne qui survient lorsque l'énergie accumulée par la gouttelette est supérieure à sa tension de surface (aussi dit limite de Rayleigh). En parallèle, deux flux d'azote facilitent ce phénomène. Le premier en se déplaçant le long du capillaire jusqu'à sa sortie aide à la nébulisation du liquide ionisé, le second, en étant chauffé (à une température dite de désolvatation comprise entre 150 °C et 650 °C) participe à l'évaporation du solvant jusqu'à ce que la molécule chargée soit libérée à l'état gazeux. Les ions désolvatés sont ensuite dirigés vers le cône d'échantillonnage sous tension (à des valeurs généralement comprises entre 10 V et 40 V) pour ensuite pénétrer à l'intérieur de l'analyseur *via* le cône d'extraction (soumis à une tension comprise entre 1 V et 5 V). Cette source étant à pression atmosphérique, un vide graduel est appliqué jusqu'à l'entrée de l'analyseur. L'ionisation par électrospray forme essentiellement des ions $[M+H]^+$ ou $[M+Adduit]^+$ tels que $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$ en ionisation positive et des ions $[M-H]^-$ en ionisation négative¹²⁰.

2.6.2.2 L'analyseur simple quadripôle

Les ions chargés pénètrent dans un hexapôle permettant de focaliser les ions vers l'analyseur quadripolaire (Figure 21). Ce dernier est constitué de 4 barres parallèles de molybdène. Les barres ont une section transversale circulaire dont elles sont équidistantes. Une combinaison de tensions continues (U) et de tensions alternatives (V) haute fréquence (ω) appliquée simultanément sur les quatre barres génèrent des polarités opposées qui provoquent l'oscillation des analytes chargés. Ces oscillations sont régies par les équations de Mathieu qui mettent en évidence que pour certaines valeurs de U et de V, seuls les ions d'une certaine masse auront une trajectoire leur permettant de traverser le quadripôle et atteindre le détecteur. Cependant, une large gamme de masse peut être étudiée si, tout en gardant leur ratio identique, les valeurs de U et de V sont modulées au cours du temps (mode full scan)^{121,122}.

Partie 1 : Le couplage de la chromatographie planaire haute performances à la spectrométrie de masse basse résolution : une nouvelle approche pour l'identification rapide de métabolites marqueurs ?

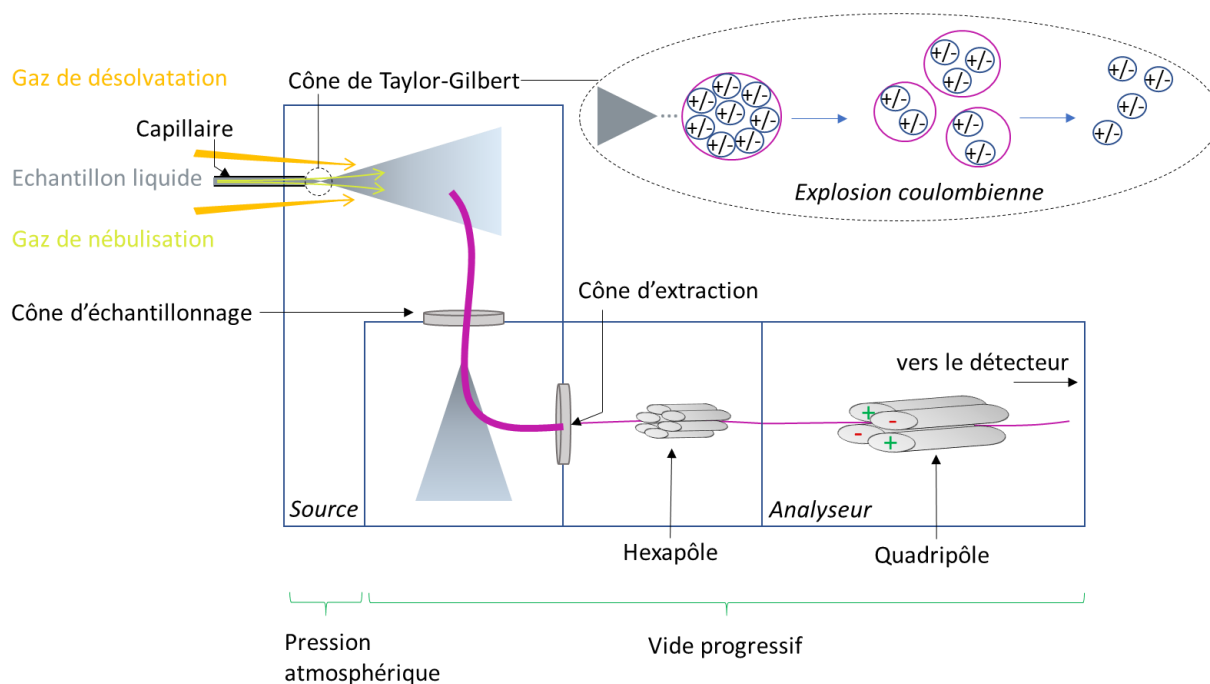


Figure 21- Schéma d'une source électrospray associée à un analyseur simple quadripôle

3 Plantes et standards analytiques étudiés

Les performances de l'IMS 2 ont été évaluées sur 9 standards analytiques et 4 plantes (Tableau 20). Les standards analytiques ont été choisis en fonction de leur potentialité en tant que marqueur de ladite plante, tandis que les plantes ont été choisies par rapport à leurs fréquences au sein des demandes d'analyses recensées par le laboratoire Botanicert.

Tableau 20- Standards analytiques et standards botaniques étudiés

Standard analytique	Nature phytochimique	Millepertuis - <i>Hypericum perforatum</i> - sommité fleuris ^{85,123}	Valériane - <i>Valeriana officinalis</i> - racines ¹²⁴	Harpagophytum - <i>Harpagophytum procumbens</i> - racines ¹²⁵	Thé - <i>Camellia sinensis</i> - feuilles ¹²⁶⁻¹²⁸
théophylline	alcaloïde				✓
caféine	alcaloïde				✓
hypéroside	flavonol	✓			
acide chlorogénique	acide hydroxycinnamique	✓	✓	✓	✓
acide valérénique	sesquiterpène		✓		
rutine	flavonol	✓			
harpagoside	iridoïde			✓	
hypéricine	anthraquinone	✓			
valtrate	iridoïde		✓		

Pour illustrer les enjeux du couplage HPTLC-IMS2-SQD, le cas de *V. officinalis* peut être pris comme exemple : d'après la Ph. Eur la plante doit contenir au minimum 0,1% (m/m) d'acides valéréniques afin d'être identifiée comme telle. La solution de plante analysée par HPTLC a une concentration de 0,1 g/mL et les conditions opératoires indiquent que 5 µL de cette solution doivent être déposées par bande de 8 mm sur la plaque HPTLC, ce qui représente 500 µg d'extrait de plante. Si au minimum 0,1% d'acide valérénique doit être présent pour que la plante soit identifiée comme telle alors il faut que la bande appliquée contiennent au moins 500 ng d'acide valérénique. Le couplage HPTLC-IMS2-SQD permettant le prélèvement de bande de 4 mm sur plaque HPLTC, ce couplage devra pouvoir permettre l'identification de l'acide valérénique à partir de 250 ng de ce dernier.

Partie 1 : Le couplage de la chromatographie planaire haute performances à la spectrométrie de masse basse résolution : une nouvelle approche pour l'identification rapide de métabolites marqueurs ?

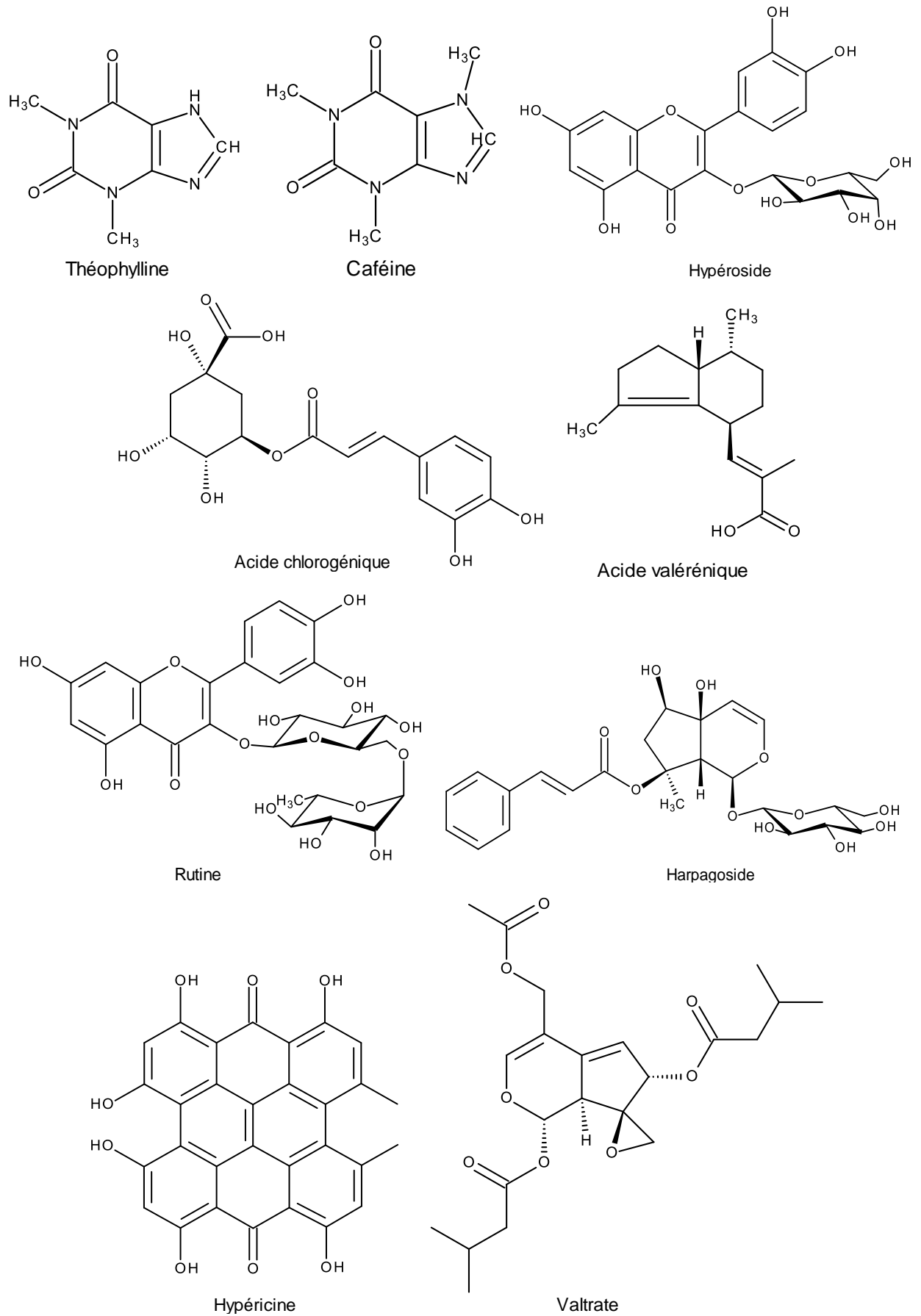


Figure 22 - Structure semi-développée des marqueurs étudiés

Afin d'optimiser le nombre d'essais, les solutions de standards analytiques ont fait l'objet d'une analyse par LC-PDA-ESI-MS en ionisation positive et négative afin de déterminer laquelle des deux permet d'ioniser l'ensemble des marqueurs étudiés. Il s'avère que la caféine n'est pas détectée en mode négatif et que l'ionisation positive permet d'ioniser quantitativement l'ensemble des standards (Tableau 21). De ce fait, les essais ont été conduits en ionisation positive à deux tensions de cônes : 10 volts (CV10) et 40 volts (CV40). Ces deux tensions de cônes ont été choisies car elles englobent une large gamme d'énergie pouvant ainsi fragmenter la majorité des composés étudiés.

Tableau 21- Aires obtenues en ionisation positive et négative pour les standards étudiés à 200 ppm

	ESI+			ESI-		
	m/z	Aire CV10	Aire CV40	m/z	Aire CV10	Aire CV40
théophylline	181,04	45.10 ⁶	93.10⁶	178,86	15.10 ⁶	64.10 ⁶
caféine	195,05	50.10 ⁶	116.10⁶	n.d.	n.d.	n.d.
hypéroside	465,14	13.10 ⁶	57.10 ⁶	463,05	14.10 ⁶	85.10⁶
acide chlorogénique	355,11	10.10 ⁶	39.10 ⁶	352,97	16.10 ⁶	45.10⁶
acide valérénique	217,13	34.10⁶	24.10 ⁶	233,01	8.10 ⁶	23.10 ⁶
rutine	611,22	14.10 ⁶	62.10 ⁶	609,10	18.10 ⁶	120.10⁶
harpagoside	517,11	1,4.10 ⁶	16.10 ⁶	539,12	40.10⁶	21.10 ⁶
hypéricine	505,14	2,1.10 ⁶	86.10 ⁶	502,98	290.10 ⁶	1,6.10⁹
valtrate	445,18	8,3.10 ⁶	25.10⁶	337,05	1,6.10 ⁶	7,4.10 ⁶

Afin de pouvoir être comparées, les expériences ont été menées dans les mêmes conditions. Ainsi, le volume d'application est resté fixé à 2 µL car c'est le volume maximal pouvant être appliqué sur les plaques HPTLC de grade MS. Aussi, il est important de préciser que l'IMS2 permet le prélèvement de bande de 4 mm maximum. C'est ainsi que pour les études portant sur les solutions de standards analytiques, 300 ng de composés sont déposés par bande de 4 mm et prélevés sur chaque plaque. Tandis que les extraits de plantes sont appliqués par bandes de 8 mm afin de ne pas les surcharger et d'obtenir des zones résolues après migration dans la phase mobile.

3.1 Importance du choix de la phase stationnaire pour la détection de marqueurs par HPTLC-IMS2-SQD

Afin d'évaluer l'apport de l'HPTLC-MS à l'identification de composés d'origine naturelle, les performances offertes par différents types de plaques ont tout d'abord été étudiées (Tableau 22).

Tableau 22 - Caractéristiques techniques des plaques étudiées

Nature	Grade	Support	Greffage	Épaisseur (µm)	Prix par unité (€)
Silice	HPTLC	Verre	Si-OH	200	10 à 15
Silice	HPTLC-MS	Verre	Si-OH	100	10 à 20
RP-18	HPTLC	Aluminium	Si-O-R	150	12 à 30 (verre)

Lors de ces essais, même si aucune migration dans une phase mobile n'a été réalisée, cela n'est pas censé impacter la qualité de la détection car les solutions sont supposées contenir uniquement le standard analytique étudié. Pour cela, trois types de phases stationnaires ont été étudiées :

- les plaques de silice de grade HPTLC (support en verre) car elles représentent la majorité des plaques utilisées en laboratoire
- les plaques de silice de grade HPTLC-MS (support en verre) qui sont constituées d'une couche très fine de silice mais qui ne sont pas fréquemment utilisées car leur prix est supérieur aux plaques de silice de grade HPTLC. Et étant donné la fine épaisseur de phase stationnaire, les volumes d'application doivent être réduits ce qui impact directement la sensibilité des méthodes.
- les plaques RP18 de grade HPTLC (support en aluminium) qui sont constituées d'une phase greffée de chaînes alcanes dont l'étude peut fournir des indications quant à la nature des différents bruits de fond observés

3.1.1 Résultats

Les critères d'évaluation se sont basés sur : le nombre de composés détectés majoritairement, le nombre de composés détectés minoritairement, le nombre de composés non détectés, la nature du bruit de fond et l'effet de deux tensions de cône sur la détection des composés. Les résultats sont récapitulés dans le Tableau 23.

Tableau 23 - Étude des composés détectés sur différentes phase stationnaires, en ionisation positive et à différentes tensions de cône

	Silice grade HPTLC		Silice grade MS		RP18	
	CV10	CV40	CV10	CV40	CV10	CV40
théophylline	ndM	ndM	ndM	ndM	ND	ND
caféine	ndM	ndM	ndM	ndM	ND	ND
hypéroside	ndM	ndM	m/z 487 [M+Na] ⁺	m/z 487 [M+Na] ⁺	ndM	m/z 487 [M+Na] ⁺
acide chlorogénique	ndM	ndM	ndM	ndM	ndM	ndM
acide valérénique	ndM	m/z 279 [M-H+Na+Na] ⁺	m/z 279 [M-H+Na+Na] ⁺	m/z 279 [M-H+Na+Na] ⁺	ndM	m/z 279 [M-H+Na+Na] ⁺
rutine	ndM	ndM	ndM	m/z 633 [M+Na] ⁺	ndM	m/z 633 [M+Na] ⁺
harpagoside	m/z 517 [M+Na] ⁺	m/z 517 [M+Na] ⁺ m/z 369 [M-acide cinnamique+Na] ⁺	m/z 517 [M+Na] ⁺	m/z 517 [M+Na] ⁺ m/z 369 [M-acide cinnamique+Na] ⁺	ndM	m/z 517 [M+Na] ⁺ m/z 369 [M-acide cinnamique+Na] ⁺
hypéricine	ndM	ndM	ndM	ndM	ND	ND
valtrate	ND	ND	m/z 445 [M+Na] ⁺	m/z 445 [M+Na] ⁺	ndM	ndM
Total détecté majoritairement	2	2	4	5	3	4
Total détecté minoritairement	6	6	5	4	3	2
Total non détecté	1	1	0	0	3	3

ndM : non détecté majoritairement, ND : non détecté, en vert : les composés détectés majoritairement

Comme indiqué dans le Tableau 23, dans le cas de la phase stationnaire de **silice de grade HPTLC**, seul l'harpagoside et l'acide valérénique donnent des ions majoritaires et la tension de cône la plus énergétique (CV40) permet de fournir des informations structurales (la perte de l'acide cinnamique de l'harpagoside). Six autres molécules sont détectées mais le bruit de fond est trop important pour qu'ils forment des ions majoritaires et les recherches menées à l'aide du logiciel de retraitement n'ont pas permis de déceler le valtrate.

Par rapport aux plaques de silice de grade HPTLC, les plaques de **silice de grade MS** ont permis d'identifier majoritairement quatre molécules : l'hypéroside, l'acide valérénique, l'harpagoside et le valtrate. Comme précédemment la tension de cône CV40 a permis d'obtenir des informations structurales pour l'harpagoside. De plus, bien que les cinq autres composés ne soient pas détectés majoritairement, tous ont pu être détecté contrairement au valtrate dans le cas des plaques de silice de grade HPTLC.

La phase stationnaire constituée d'un greffage **RP18** a permis d'identifier majoritairement quatre composés : l'hypéroside, l'acide valérénique, la rutine et l'harpagoside. Il y a la même proportion de composés identifiés majoritairement qu'avec une plaque HPTLC Silice grade MS, cependant il y a plus de composés qui ne sont pas

détectés. De plus une tension de cône de 10 V n'est pas suffisante pour obtenir des ions majoritaires des composés recherchés, une tension de 40 V est nécessaire.

3.1.2 Conclusion

L'étude des performances offertes par des plaques de silice de grade HPTLC atteste de leur faible adaptabilité au couplage HPTLC-IMS2-SQD par rapport à des plaques de silice de grade MS car peu de composés sont détectés majoritairement. Il en va de même pour la phase stationnaire RP18 où là de nombreux composés ne sont simplement pas détectés. Les deux hypothèses pouvant expliquer ces résultats peuvent trouver leurs origines dans un important bruit de fond généré par la phase stationnaire qui a pour effet de noyer les signaux des composés d'intérêt et/ou dans les interactions qui se créent entre la phase stationnaire et les composés rendant leur extraction et leur détection difficiles (cas du valtrate pour les plaques de silice de grade HPTLC et de la caféine, de la théophylline et de l'hypéricine pour les plaques RP18). Les problèmes liés au bruit de fond généré par les plaques de phase stationnaire ont fait l'objet d'une étude en 2014 sur des plaques de grade HPTLC qui avait conclu sur la nécessité de soustraire des blancs de bruit de fond grâce au logiciel de spectrométrie de masse et d'utiliser des tensions de cône élevées¹¹². Cependant cette étude n'a pas mis en évidence le potentiel des plaques de grade MS ni émis l'hypothèse d'adsorption irréversible avec les phases stationnaires. C'est pourquoi, l'étude de la nature du bruit de fond de chaque plaque ainsi que celle du pouvoir d'extraction de différents solvants ont été mises en œuvre.

3.2 Étude de la nature du bruit de fond

3.2.1 Silice de grade HPTLC

Pour déterminer la nature du bruit de fond, des blancs de la plaque de silice grade HPTLC ont été étudiés. Ces derniers contiennent des motifs m/z 44 pouvant correspondre à des polyéthylènes glycols (PEG) (Figure 23). Ces PEG peuvent provenir des colles utilisées afin de maintenir la silice sur la plaque en verre. Aussi, des clusters de formiate de sodium m/z 68 (HCOONa) dû à l'acidification de la phase mobile par de l'acide formique sont observés (Figure 24). Le même bruit est retrouvé dans les spots de standards ainsi que des motifs m/z +74 qui peuvent correspondre à des clusters siloxanes [Si(CH₃)₂O] (Figure 25) et dont l'origine peut être trouvée l'élaboration des phases stationnaires à base de silice¹²⁹. Les ions à m/z 318 et m/z 195 peuvent

Partie 1 : Le couplage de la chromatographie planaire haute performances à la spectrométrie de masse basse résolution : une nouvelle approche pour l'identification rapide de métabolites marqueurs ?

correspondre à des adduits dérivés du phtalate tels que déjà observés et décrits dans la littérature¹¹².

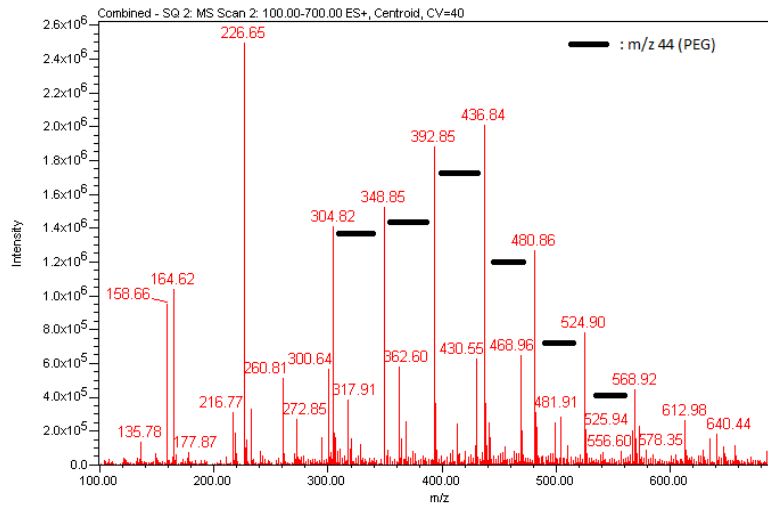


Figure 23– Motif PEG dans blanc et échantillon de silice de grade HPTLC

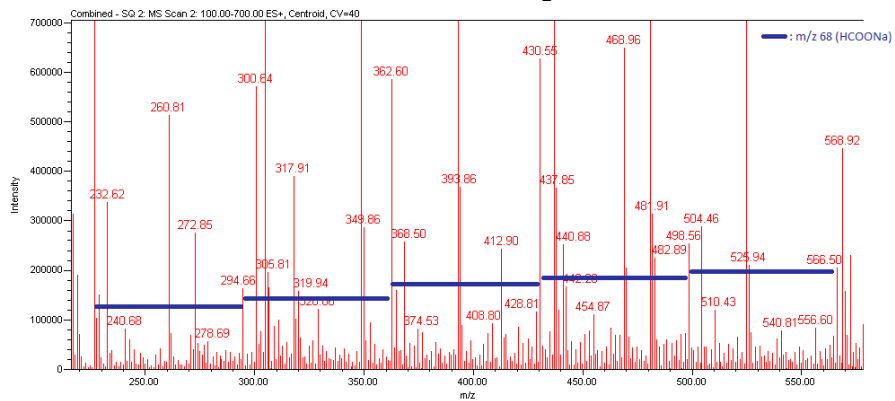


Figure 24– Motif formiate de sodium dans blanc de silice de grade HPTLC

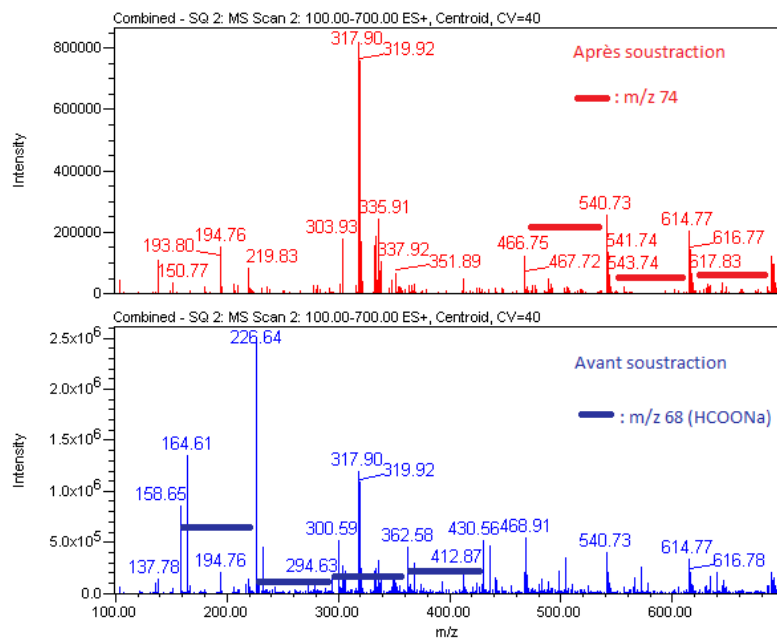


Figure 25 – Motifs m/z 74 correspondant au cluster $[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]$ dans un spot après soustraction du blanc sur plaque de grade HPTLC

De plus, lors d'emploi de plaques de silice de grade HPTLC, il semble que la tension de cône de 40 V soit la plus à même de permettre la détection des composés étudiés. Cela peut être dû au fait que la silice, présente en grande quantité, et les composés étudiés forment des complexes nécessitant des tensions élevées afin d'être dissociés et ionisés.

3.2.2 Silice de grade MS

Les plaques de silice de grade MS ont permis d'identifier deux fois plus de composés que les plaques de silice de grade HPTLC malgré la présence du bruit de fond généré par les adduits formiates de sodium. Une explication peut résider dans le fait que les plaques de grade MS possèdent moins de phase stationnaire ce qui peut induire la baisse du nombre de composés piégés dans la silice. Ainsi, plus de composés sont ionisés et détectés majoritairement.

Lors d'emploi de plaques de silice de grade MS, la tension de cône de 10 V permet d'obtenir les mêmes ions majoritaires qu'avec une tension de cône de 40 V. Cela peut aussi être dû au fait que la quantité de silice est moins importantes sur les plaques de silice de grade MS que sur celles de grade HPTLC, et donc les composés forment moins de complexes nécessitant des tensions de cône élevées pour être majoritairement ionisés.

3.2.3 Phase inverse RP18

Les plaques RP18 ont permis de détecter la même proportion de composés que lors de l'utilisation des plaques de silice de grade MS. Dès lors, il se peut que le greffage de chaînes carbonées permette d'atténuer certaines adsorptions irréversibles sur la phase stationnaire. Ainsi, plus de composés sont ionisés et détectés majoritairement. Cependant, les mêmes clusters siloxanes ont été observés et des motifs m/z 14 ont été détectés pouvant correspondre à des chaînes alcanes (Figure 26).

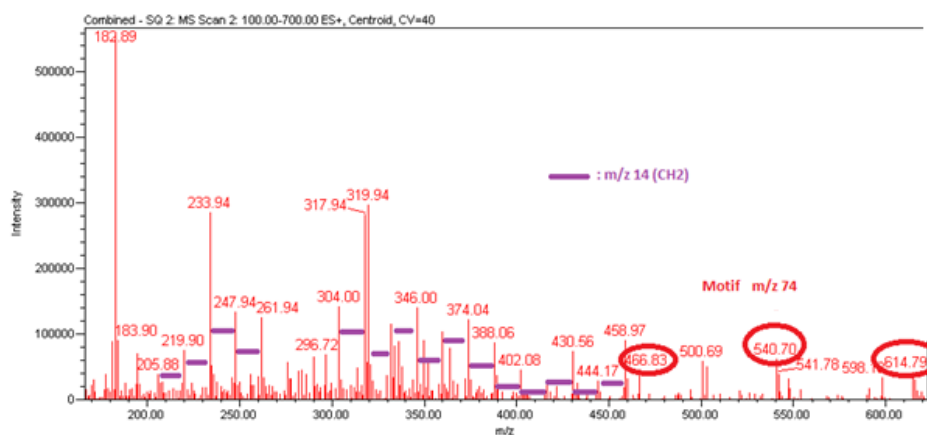


Figure 26– présence des clusters alcane et siloxane dans l'échantillon

Lors d'emploi de plaques HPTLC RP18, la tension de cône de 10 V ne permet pas d'obtenir les mêmes ions majoritaires qu'avec une tension de cône de 40 V. Cela peut aussi être dû au fait que la quantité de phase stationnaire est plus importante que sur les plaques de grade MS, et donc les composés forment des complexes avec la phase stationnaire nécessitant des énergies d'ionisation élevées afin d'être dissociés.

3.2.4 Conclusion sur la nature du bruit de fond

Le bruit de fond trouve son origine dans les différents composants de la phase stationnaire et dans les conditions chromatographiques (Tableau 24).

Le bruit de fond ayant pour unique origine la nature de la plaque employée concerne l'ensemble des plaques étudiés. Les plaques de silice de grade HPTLC génèrent de nombreux **clusters de PEG** (m/z 44) qui sont inhérents aux procédés de fabrication de la phase stationnaire. Ce type de clusters n'est pas observé avec les plaques de silice de grade MS et celles en phase inverse laissant à penser que les liants utilisés ne sont pas les mêmes pour les RP18 et que la faible épaisseur de celles de grade MS diminue considérablement la présence de PEG. Le deuxième bruit de fond ayant pour unique origine la nature de la phase stationnaire concerne les phase stationnaire RP18 où de nombreux **clusters de méthylène** (m/z 14) sont observés. Ces derniers proviennent certainement du greffage de la silice par des chaînes alcanes. Cependant, malgré plusieurs requêtes, de plus amples informations quant aux procédés de fabrication n'ont pas été communiqués par le fabricant (Merck). Il en est de même pour les **clusters de siloxanes** (m/z 74) qui sont identifiés dans tous les spots de standards analytiques étudiés. **Ces trois types de clusters n'ont pas été décrits dans la littérature.**

Le bruit de fond ayant pour origine les conditions chromatographiques est observé au travers les nombreux motifs de formiate de sodium lors de l'emploi des plaques de silice

de grade HPTLC et MS. Ces dernières ont comme support une plaque en verre qui, au contact de la phase mobile contenant de l'acide formique, relargue des clusters de formiate de sodium. Cette hypothèse est confirmée par l'absence de ce type de clusters pour les plaques RP18 qui emploient un support en aluminium. La solution serait de s'affranchir de l'utilisation de phase mobile acidifiée afin de générer moins de bruit de fond et donc de diminuer la limite de détection des composés. Or, l'ajout d'acide favorise l'ionisation et donc la détection des composés en spectrométrie de masse, c'est pourquoi cette solution paraît contre-productive. Ces mêmes observations ont été décrites dans différentes publications^{112,116,130,131}.

Tableau 24 – Récapitulatif des composés identifiés dans le bruit de fond des blancs et des échantillons (STD) dans les différentes phases stationnaires étudiées

m/z	Composé	Nom	Silice grade HPTLC		Silice grade MS		RP18		Origine
			blanc	STD	blanc	STD	blanc	STD	
44	C ₂ H ₄ O	polyéthylène glycol	✓	✓	×	×	×	×	fabrication phase stationnaire
68	HCOONa	formiate de sodium	✓	✓	✓	✓	×	×	acide formique de la phase mobile - sodium bouteille en verre phase mobile et/ou support en verre phase stationnaire
74	Si(CH ₃) ₂ O	siloxane	×	✓	×	✓	×	✓	Constituant de la phase stationnaire
14	CH ₂	méthylène	×	×	×	×	✓	✓	greffage RP18 de la phase stationnaire

En tenant compte des résultats des performances offertes par les différentes phases stationnaires (Tableau 23) et ceux de la nature du bruit de fond généré par les plaques (Tableau 24), ce sont les plaques de silice de grade MS qui fournissent les meilleurs résultats : l'ensemble des composés sont détectés, le plus grand nombre de composés sont détectés majoritairement et le motif PEG n'y est pas retrouvé. Cependant, afin d'établir si les composés détectés minoritairement le sont du fait unique de la présence d'ions formiate de sodium ou du fait de l'adsorption des composés sur la phase stationnaire, des essais permettant d'évaluer le pourcentage d'extraction des composés de la plaque de silice de grade MS ont été menés.

3.3 Étude du pouvoir d'extraction de différents solvants *via* le couplage HPTLC-IMS2

Afin de vérifier si l'hypothèse de l'adsorption irréversible peut être avancée pour expliquer le fait que certains ions ne peuvent pas être détectés, de façon majoritaire ou

non, une étude sur le pouvoir extractif du couplage HPTLC-IMS2 a été menée. Pour cela chaque solution de standard analytique a été appliquée sur une plaque de silice de grade MS et chaque dépôt a été prélevé par l'IMS 2. Le résultat de ce prélèvement a été placé dans un vial en sortie d'IMS2 jusqu'à l'obtention de solutions de standards reconstituées dans la phase mobile. Ce test a été réalisé en triplicat avec deux solvants d'extraction préconisés par le constructeur : ACN et ACN/H₂O (50/50). Les échantillons reconstitués ont été analysés par LC/UV et les aires obtenues en UV ont été comparées aux aires obtenues avec des solutions préparées manuellement aux mêmes concentrations (Figure 27).

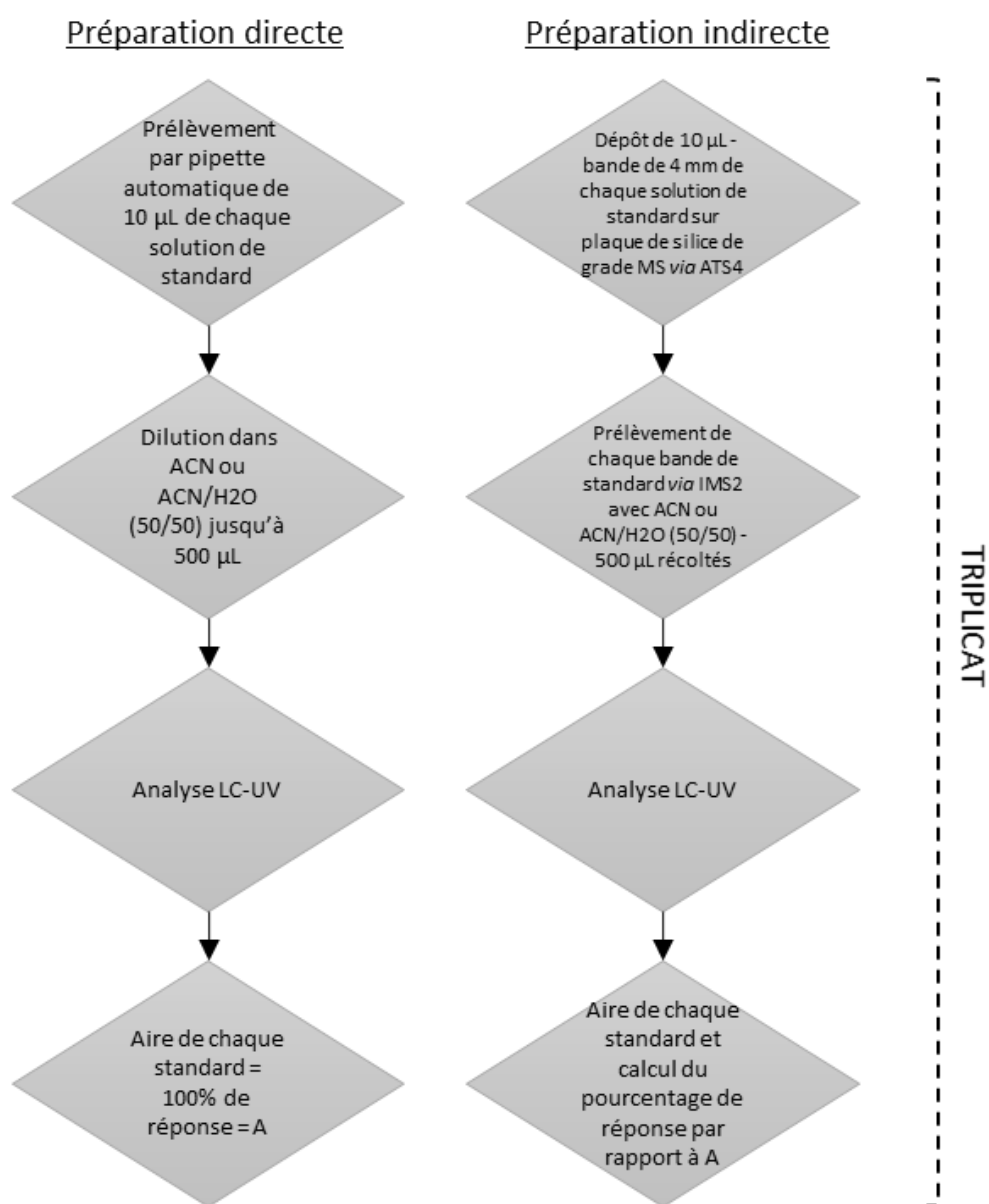


Figure 27 - Logigramme détaillant le protocole destiné à estimer le pouvoir d'extraction de chaque standard via l'IMS2

Le diagramme présenté dans la Figure 28 résume les pourcentages de réponse obtenus pour les solutions préparées indirectement *via* l'IMS2 par rapport aux réponses obtenues pour les solutions préparées directement (il est considéré que 100 % de réponse est obtenu avec les solutions préparées directement).

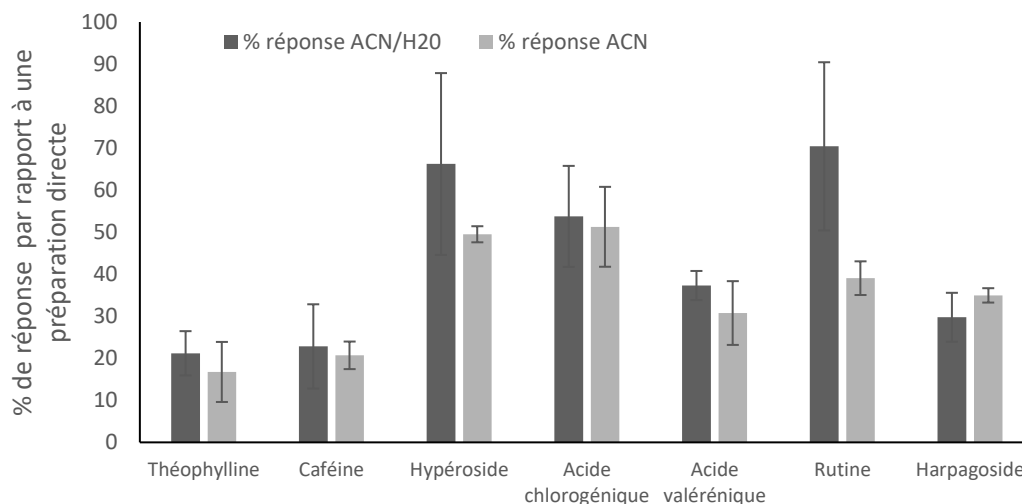


Figure 28 - Réponses obtenues pour les solutions préparées indirectement par l'IMS2, exprimée en pourcentage de la réponse obtenue par rapport aux solutions préparées directement

Le couplage HPTLC-IMS2-PDA met clairement en évidence que les composés appliqués sur la plaque de silice de grade MS ne sont pas complètement restitués avec des rapports allant de 1,4 à près de 6 fois moins de composés restitués et ce, malgré l'utilisation de solvants couvrant une large gamme de polarité. D'après le diagramme à la Figure 28, c'est le solvant composé de ACN/H₂O (50/50) qui permet d'extraire au mieux la majorité des composés étudiés.

Il semble donc que la phase stationnaire adsorbe certains composés qui ne pas sont extraits avec les solvants préconisés par le fabricant, ce qui peut expliquer l'absence de détection lors des précédents essais.

Afin d'optimiser la durée de chacun de ces essais, l'ensemble de ces résultats ont été obtenus sans qu'une migration dans une phase mobile n'ait été réalisée. Or, afin d'évaluer les résultats en conditions réelles, les effets de cette étape sur la détection des composés ont été étudiés.

3.4 Performances du couplage HPTLC-IMS2-SQD en conditions réelles

3.4.1 Les standards détectés après migration dans une phase mobile

3.4.1.1 Stratégie et résultats

Afin d'étudier l'impact du développement d'une plaque de silice de grade MS dans une phase mobile impliquant des solvants communément employés (cf. 992.3.2), l'étude s'est poursuivie en prélevant des zones de standards analytiques après qu'ils aient migrés dans une phase mobile composée d'acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/26). Le choix d'employer des acides dans la phase mobile s'explique par leur fréquence d'emploi (Tableau 25) dans l'analyse de substances naturelles par HPTLC car ces derniers augmentent la force éluante des solvants¹⁰⁵.

Tableau 25 - Différentes phases mobiles décrites dans la littérature pour l'analyse des plantes étudiés

	Phases mobiles issues de la littérature (v/v)
<i>Hypericum perforatum</i>	acétate d'éthyle/dichlorométhane/eau/ acide formique/acide acétique (100/25/11/10/10) ^{132,133} acétate d'éthyle/eau/ acide formique (90/9/6) ^{85,134} dichlorométhane/toluène (20/80) ¹²³
<i>Valeriana officinalis</i>	acétate d'éthyle/cyclohexane/ acide acétique (38/60/2) ¹³⁵ acétate d'éthyle/hexane/ acide acétique (20/80/0,5) ¹³⁶
<i>Harpagophytum procumbens</i>	acétate d'éthyle/méthanol/eau (77/15/8) ^{137,138} dichlorométhane/méthanol/ acide acétique (79/20/1) ¹³⁹
<i>Camellia sinensis</i>	toluène/acétone/ acide formique (45/45/10) ¹⁴⁰ toluène/acétone/ acide formique (50/40/10) ¹⁴¹ toluène/acétate d'éthyle/ acide formique /méthanol (30/30/8/2) ¹⁴¹

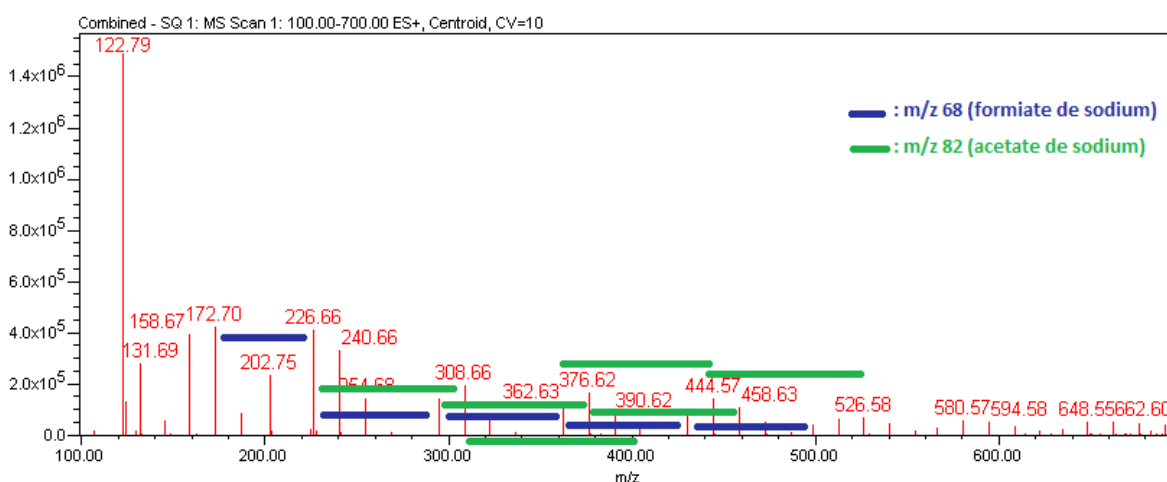
Lors de ce test, l'ionisation positive et négative ont été testées afin de favoriser la détection de tous les composés étudiés. Les résultats sont représentés dans le Tableau 26.

Tableau 26 - Composés détectés sur plaque de silice de grade MS migrée versus non migrée

	Silice grade MS après migration				Silice grade MS avant migration (cf. Tableau 23)	
	ES ⁻		ES ⁺		ES ⁺	
	CV10	CV40	CV10	CV40	CV10	CV40
théophylline	ndM	179 m/z [M-H] ⁻	ndM	ndM	ndM	ndM
caféine	ND	ND	ndM	ndM	ndM	ndM
hypéroside	ndM	ndM	ndM	m/z 487 [M+Na] ⁺	m/z 487 [M+Na] ⁺	m/z 487 [M+Na] ⁺
acide chlorogénique	ndM	375 m/z [M-2H+Na] ⁻	ndM	ndM	ndM	ndM
acide valérénique	ndM	ndM	ndM	ndM	m/z 279 [M-H+Na+Na] ⁺	m/z 279 [M-H+Na+Na] ⁺
rutine	ndM	ndM	ndM	m/z 633 [M+Na] ⁺	ndM	m/z 633 [M+Na] ⁺
harpagoside	ndM	ndM	m/z 517 [M+Na] ⁺	m/z 517 [M+Na] ⁺ m/z 369 [M-acide cinnamique+Na] ⁺	m/z 517 [M+Na] ⁺	m/z 517 [M+Na] ⁺ m/z 369 [M-acide cinnamique+Na] ⁺
hypéricine	503 m/z [M-H] ⁻	503 m/z [M-H] ⁻	ND	ND	ndM	ndM
Total détecté majoritairement	1	3	1	3	3	3
Total détecté minoritairement	6	4	6	4	5	5
Total non détecté	1	1	1	1	0	0

ndM : non détecté majoritairement, ND : non détecté, en vert : les composés détectés majoritairement

En mode positif, moins de composés sont détectés par rapport à la même plaque sans migration (cf. Tableau 26) et les motifs m/z 68 (formiate de sodium) et m/z 82 (acétate de sodium) sont très importants (Figure 29).



En mode négatif, seuls les adduits formiates de sodium sont observés (Figure 30) ce qui a empêché d'observer les ions majoritaires des composés recherchés à l'exception faite de l'hypéricine (m/z 503) à CV10 et CV40, de l'acide chlorogénique (m/z 375) et de la théophylline à CV 40 (m/z 179).

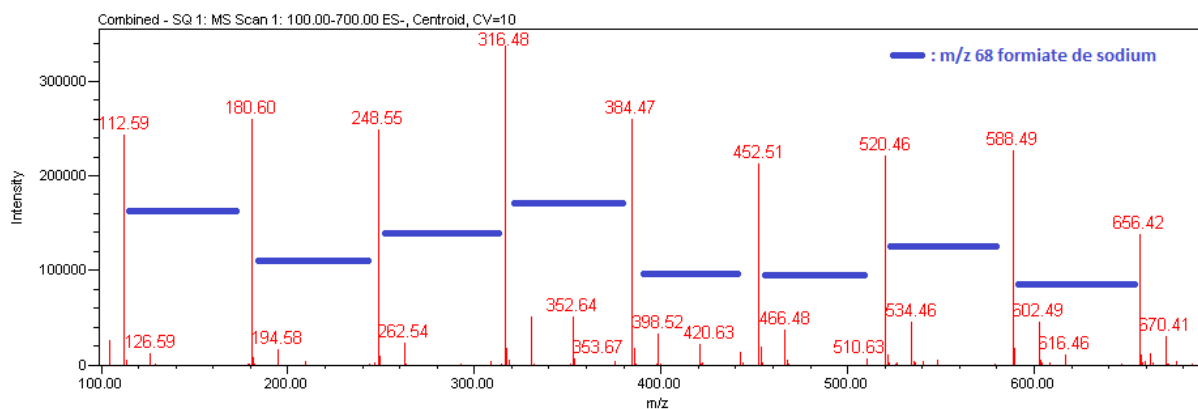


Figure 30 – bruit du motif formiates de sodium en ionisation négative

3.4.1.2 Conclusion sur l'effet de la migration sur la détection des composés

Etant donné que moins de composés sont détectés que lors du même test sans migration, il se peut que la migration ait un effet « défocalisant » induisant de ce fait, un moins bon cerclage du prélèvement par l'IMS2. C'est pourquoi, moins de composés sont extraits et introduits dans le spectromètre de masse.

Le motif m/z 74 n'est plus visible ce qui laisse penser qu'il s'agissait bien d'un contaminant qui a pu être séparé du standard analytique grâce à la migration des composés dans la phase mobile.

L'important bruit de fond généré par les adduits formiates et acétates de sodium peut être dû à la présence d'acide formique et d'acide acétique dans la phase mobile. Or bien qu'ils engendrent un bruit de fond assez important pour impacter la détection de composés d'intérêt, son utilisation ne peut être écartée car en plus d'améliorer les conditions chromatographiques, ils permettent de faciliter l'ionisation des composés lors de leur entrée dans la source du spectromètre de masse. C'est pourquoi, l'idée de supprimer les acides afin de diminuer le bruit de fond engendrerait aussi une baisse de sensibilité du spectromètre de masse. Afin d'étudier ces résultats d'un point de vue quantitatif, on peut conclure qu'à l'exception de la caféine et du valtrate, l'ensemble des composés étudiés sont détectés majoritairement dès lors que 300 ng sont présents et prélevés sur la plaque, **ce qui représente une teneur finale de 0,3% (m/m) dans le cas de l'étude d'un extrait de plante à 0,1 mg/mL appliqué sur une bande de 8 mm.** L'étude s'est donc poursuivie sur des extraits de plantes dans les mêmes conditions chromatographiques en adaptant cependant les conditions d'ionisation pour la théophylline, l'acide chlorogénique et l'hypéricine pour qui l'ionisation négative favorise leur détection.

3.4.2 Les composés détectés dans des plantes après migration

3.4.2.1 Stratégie et résultats

Les 4 extraits de plantes et les 9 standards décrits en 3 ont été appliqués sur une plaque de silice de grade MS et développés dans la phase mobile acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/26). Différentes zones ont été prélevées via l'IMS2 (Figure 31 et Figure 32) avec comme solvant d'extraction ACN/H₂O (50/50). Celles-ci englobent tant des zones supposées contenir un marqueur de la plante car le spot apparaît à un R_f caractéristique (zones colorées non numérotées), que des zones dont l'identité est inconnue mais dont l'intensité les rendent intéressantes (zones rouges numérotées de 1 à 6). Les zones inconnues ont été analysées en mode positif et négatif tandis que les zones supposées contenir un marqueur précédemment étudié ont été analysées dans les conditions d'ionisation optimisées en 3.4.1.

Cette étude a été complétée par des analyses LC-PDA-SQD des 4 extraits de plantes dans le but de déterminer les teneurs de chacun des marqueurs étudiés ainsi que pour comparer les résultats obtenus par HPTLC-IMS2-SQD pour les zones dont l'identité des composés est inconnue. En effet, les essais menés jusqu'ici démontrent clairement que le bruit de fond peut être très important ce qui peut induire en erreur la corrélation entre les ions majoritaires observés et leur présence effective dans la plante étudiée. C'est pourquoi, les ions majoritaires issus de l'étude des composés dont l'identité est inconnue se doivent de faire l'objet d'une analyse supplémentaire avec une autre technique chromatographique afin d'être confirmés. Le choix s'est porté ici sur des analyses par LC-PDA-SQD car une méthode d'analyse a d'ores et déjà été développée pour les 9 marqueurs étudiés (cf. 3 et 3.3). Dès lors, si le même composé est observé, alors il pourra être corrélé à la plante et faire l'objet d'une étude approfondie. Cependant, si ce dernier n'est pas identifié dans les analyses menées par LC-PDA-SQD alors sa présence dans la plante ne pourra être confirmée. Les résultats sont résumés dans le Tableau 27.

Partie 1 : Le couplage de la chromatographie planaire haute performances à la spectrométrie de masse basse résolution : une nouvelle approche pour l'identification rapide de métabolites marqueurs ?

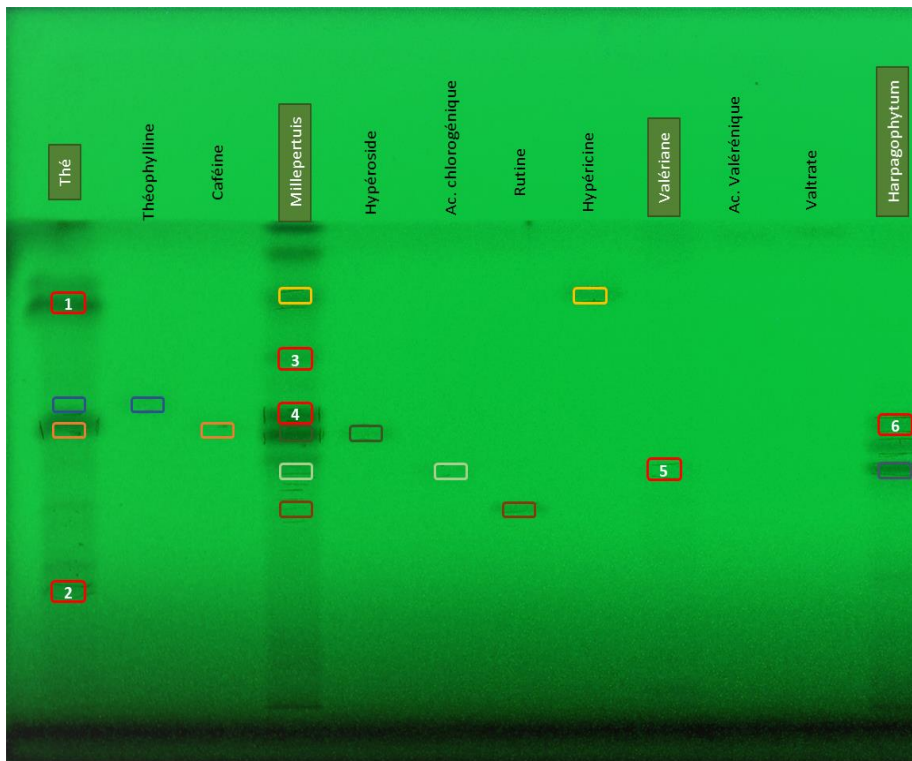


Figure 31– zone prélevée via IMS2 – 254 nm

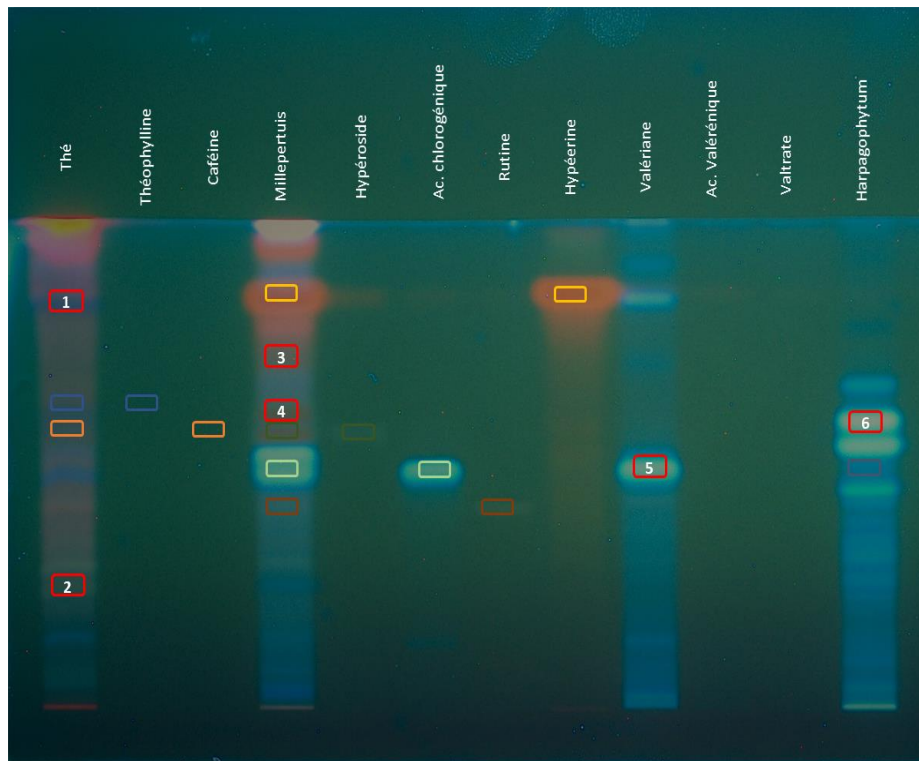


Figure 32– zone prélevée via IMS2 – 366 nm

Partie 1 : Le couplage de la chromatographie planaire haute performances à la spectrométrie de masse basse résolution : une nouvelle approche pour l'identification rapide de métabolites marqueurs ?

Tableau 27- Composés identifiés dans les extraits de plantes

Thé	Ions détectés	Teneur plante sèche (m/m)	Quantité théorique prélevée	Observations	Identification
1	<i>ES+</i> : CV 10 et CV 40: m/z 481 ; 503 ; 401	NA	NA	L'analyse LC-PDA-SQD met en évidence la présence d'un ion à m/z 481, mais aucun m/z 503 et 401 n'est retrouvé	✗
	<i>ES-</i> : CV 10 m/z 457 ; 289 CV 40 m/z: 457 ; 305			Les ions sont retrouvés dans l'analyse par LC-PDA-SQD mais aucun n'appartient au même composé	
Théophylline	<i>ES-</i> : nd	0,08%	80 ng		✗
Caféine	<i>ES+</i> : CV 10 et CV 40: 195 [M+H] ⁺	2,22%	2220 ng		✓
2	<i>ES+</i> et <i>ES-</i> : nd	NA	NA	seul du bruit de fond est observé (adduit m/z 68 : acétate de sodium)	✗
Millepertuis	Ions détectés	Teneur plante sèche (m/m)	Quantité théorique prélevée	Observations	Identification
Hypéricine	<i>ES-</i> : CV 10 et CV 40 : 503 [M-H] ⁻ , 519 [M-H] ⁻ < - pseudohypéricine	0,42%	420 ng	coélution de l'hypéricine et de la pseudohypéricine	✓
3	<i>ES+</i> : CV 10 m/z 471 = [448+Na] ⁺ CV 40 m/z 471 , 325 (- m/z 146: rhamnose)	0,27%	270 ng	Suggestion : Quercitrine et retrouvé dans analyses LC-PDA-SQD	✓
	<i>ES-</i> : CV 10: m/z 447 = [448-H] ⁻ , CV 40: 447 ; 301 (- m/z 146 : rhamnose)				
4	<i>ES+</i> : CV 10 et CV 40 m/z 487 = [464+Na] ⁺	1,66%	1660 ng	Suggestion : Isoquercitrine et retrouvé dans analyses LC-PDA-SQD	✓
	<i>ES-</i> : CV 10 : m/z 463 = [464-H] ⁻ ; CV 40: 463 ; 301 (- m/z 162: glucose ou galactose)				
Hypéroside	<i>ES+</i> : CV 10 et CV 40 : 487 [M+Na] ⁺	1,70%	1700 ng	CV 40 permet d'obtenir des informations structurales	✓
	<i>ES-</i> : CV 10: 463 [M-H] ⁻ , CV 40 : 463 [M-H] ⁻ , 301 [M-galactose] ⁻				
Acide chlorogénique	<i>ES-</i> : CV 10: minoritaire, CV 40 : 353 [M-H] ⁻ , 375 [M-2H+Na] ⁻	0,24%	240 ng	CV 40 permet l'obtention d'un ion majoritaire	✓
Rutine	<i>ES+</i> : nd	0,07%	70 ng		✗

Partie 1 : Le couplage de la chromatographie planaire haute performances à la spectrométrie de masse basse résolution : une nouvelle approche pour l'identification rapide de métabolites marqueurs ?

Tableau 27- Composés identifiés dans les extraits de plantes (*suite*)

Valériane	Ions détectés	Teneur plante sèche (m/m)	Quantité théorique prélevée	Observations	Identification
5	ES+ : m/z 268, 469	NA	NA	L'analyse par LC-PDA-SQD de l'échantillon confirme la présence d'un ion m/z 268, le spectre UV est caractéristique des acides hydroxycinnamiques. Cependant la distance de migration est caractéristique de l'acide chlorogénique et la plante en contient près de 0,25%	X
	ES- : m/z 375			Aucun ion m/z 375 n'est retrouvé par analyse LC-PDA-MS	
Harpagophytum	Ions détectés	Teneur plante sèche (m/m)	Quantité théorique prélevée	Observations	Identification
6	ES+ : CV 10 m/z 647 [M+Na] ⁺ ; 515 (- m/z 132 : xylose ou arabinose), CV 40 m/z 515 ; 537 ; 647	0,32%	320 ng	Suggestion : Verbascoside et retrouvé dans les analyses LC-PDA-SQD	✓
	ES- : 623 [M-H]; 491 (- m/z 132: xylose ou arabinose); 311				
Harpagoside	ES+ : CV 10 : 517 [M+Na] ⁺ ; 585 [M+Na+HCOONa] ⁺ , CV 40: 517 [M+Na] ⁺ , 369 [M-acide cinnamique+Na] ⁺	1,41%	1410 ng	CV 40 permet de s'affranchir de l'adduit formiate de sodium	✓

Sur les 13 zones étudiées, 8 ont pu être caractérisées : 5 marqueurs sur les 8 étudiés et 3 composés inconnus sur les 6 entourés. Les marqueurs dont les teneurs sont inférieures à 0,1% (m/m) ne sont pas détectés malgré des recherches menées à l'aide du logiciel de retraitement. Pour les composés inconnus, près de la moitié n'ont pas été identifiés bien que pour certains, le bruit de fond n'a pas empêché l'obtention d'ions majoritaires (zone 1 et 5). Les analyses par LC-PDA-SQD n'ont pas permis de confirmer leur présence dans les plantes étudiées tandis qu'elles ont permis d'établir la présence de quercitrine et d'isoquercitrine dans le millepertuis et de verbascoside dans l'harpagophytum. C'est aussi avec la tension de cône la plus élevée (CV40) que, pour certains composés, des informations structurales ont pu aider à leur identification : perte de certains sucres pour les zones 3, 5, 6 et l'hypéroside ou de l'acide cinnamique pour l'harpagoside.

3.4.2.2 Conclusion sur les composés détectés dans les plantes étudiées

En ce qui concerne la détection des marqueurs des plantes analysées, les résultats obtenus sont en adéquation avec les conclusions tirées précédemment. **En effet, les essais réalisés en 3.4.1.1 sur les solutions de standards ont permis d'obtenir des résultats positifs pour 300 ng de composés ce qui correspond à une teneur finale de 0,3% dans la plante.** Il en va de même pour les extraits de plantes analysés, où les **marqueurs étudiés sont bien détectés pour des teneurs supérieures à 0,3%.** Cependant, les analyses menées par LC-PDA-SQD ont mis en évidence que certains ions majoritaires détectés dans les zones des composés inconnus, ne correspondent à aucun composé. Cela peut être dû aux effets de matrice engendrés par la phase stationnaire, encore au pouvoir d'extraction du solvant ACN/H₂O qui ne permet pas d'extraire quantitativement le composé en question ou encore à la coélution de plusieurs composés au sein d'une même zone. Toujours est-il que **les zones dont les composés sont inconnus ne peuvent faire l'objet d'une identification** sur la seule base de l'obtention d'un ion majoritaire. C'est pourquoi, même si un spectromètre de masse haute résolution est couplé à l'IMS2, les résultats obtenus ne peuvent être considérés comme une identification formelle du composé. Une étude complémentaire telle qu'une analyse RMN doit impérativement être associée afin d'éviter toute confusion.

4 Conclusion

Dans le cadre du contrôle qualité de plantes indifféremment employées dans les compléments alimentaires ou les médicaments, intégrer la dimension de la spectrométrie de masse permet d'augmenter le niveau d'assurance qualité. Or pour que cette technique puisse être transposable, une étude de faisabilité se devait d'être initiée.

Il a pu être démontré que la qualité de la phase stationnaire était primordiale pour obtenir les seuils de détections les plus bas possibles. C'est pourquoi **les plaques HPTLC de grade MS doivent être privilégiées**. Cependant, même si ce type de plaque permet de diminuer les limites de détection, elles obligent aussi d'utiliser des volumes d'application ne pouvant dépasser 2 μ L. Ce dernier paramètre peut être **limitant** si les composés recherchés sont présents à **des teneurs inférieures à 0,3%** dans la plante sèche. Et ceci d'autant plus **si la phase mobile contient des acides pouvant former des clusters de sodium**¹³¹ et entraîner la production d'un bruit de fond important. Pour pallier à ce dernier point, une solution a été proposée : le pré-développement de la plaque où une première phase mobile contenant de l'acide suivie d'une seconde phase mobile entraînant l'acide en haut de la plaque^{116,130} sont employées. Étant donné que les étapes de pré-développement sont rarement rencontrées dans les méthodes HPTLC, ceci implique le développement de méthodes spécifiques et non standardisées augmentant le niveau de complexité pour l'utilisateur. La qualité de détection en masse étant corrélée aux capacités propres à chaque composé étudié de s'ioniser, il est normal que malgré des teneurs parfois faibles, certains composés soient détectés et que d'autres au contraire ne soient détectés malgré des concentrations élevées.

Ainsi, il est indispensable de **tester différentes conditions d'ionisation** ce qui implique le développement de plusieurs bandes du même extrait.

Le dernier point devant être souligné concerne celui de l'utilisation de l'interface TLC-MS dans le cadre de l'identification de composés d'intérêt inconnus pour la mise en évidence de nouveaux marqueurs (si aucune méthode HPTLC n'a été développée) ou de nouveaux composés d'intérêt pharmacologique (en bioautographie notamment). Étant donné la pluralité des résultats pouvant être obtenus à cause des effets de matrice ou des conditions chromatographiques, corréler une zone d'intérêt à un ion

majoritaire obtenu par le couplage HPTLC-MS ne peut constituer un résultat définitif. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour établir qu'aucun composé ne coélue et que le composé étudié appartient bien à la plante. Pour cela des analyses HPLC-MS peuvent aisément être mises en œuvre, or dans de nombreux exemples tirés de la littérature^{142,143}, cette double vérification n'est pas menée. Ceci peut mener soit à l'attribution erronée d'activités biologiques à des composés qui n'en ont pas soit à stipuler la présence de nouveaux marqueurs qui sont en réalité induits par les conditions opératoires. L'importance de ce dernier point a pu être mis en évidence par les analyses UHPLC-SQD venue compléter l'identification de zone d'élution contenant des composés inconnus lors de l'analyse du thé, du millepertuis, de la valériane et de l'harpagophytum.

C'est pourquoi, afin d'améliorer la qualité des spectres de masse obtenus et augmenter la sensibilité et la sélectivité de ce couplage, différents axes peuvent être suggérés :

- extraction par gradient des spots afin d'augmenter le pouvoir d'extraction de la phase éluante
- chauffage de l'IMS2 afin d'extraire les composés adsorbés sur la silice
- améliorer la qualité du verre employé comme support pour les plaques HPTLC Silice afin de diminuer les adduits formés par les ions sodium
- Proposer des paramètres de réglage de soustraction du bruit de fond par le logiciel de retraitement en réalisant la soustraction tous les pics présents dans le blanc quelle que soit leur intensité au lieu de soustraire une moyenne de pics

Avancées scientifiques

- identification de nouveaux clusters à l'origine du bruit de fond des plaques de silice de grade HPTLC, de grade MS et RP18 : m/z 44 pour les PEG, m/z 14 pour les chaînes alcanes et m/z 74 pour les siloxanes.
- la confirmation des performances des plaques HPTLC de grade MS par rapport aux plaques standards dans le cas du couplage HPTLC-MS
- l'IMS 2 ne permet pas d'extraire quantitativement les composés de la phase stationnaire
- la capacité du couplage HPTLC-MS à être utilisée dans le cadre d'identification de composés majoritaires à condition qu'ils soient décrits dans la littérature

Partie 2

La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative?

1 Introduction

Les techniques d'isolement de produits naturels sont des procédés complexes tant la matrice étudiée est unique ! La grande variété de structures chimiques, la présence de nombreuses petites molécules (< 2000 Da) ainsi que leurs activités physiologiques, font de l'isolement de molécules issues du végétal un domaine où de nombreuses problématiques se côtoient. Cependant, cette complexité ne peut constituer un frein à la recherche de nouveaux actifs car leur potentiel est inestimable¹⁴⁴. La mise au point de l'acide acétylsalicylique, plus connu sous le nom commercial d'Aspirine, à partir d'écorce de saule (*Salix spp.*) en est un illustre exemple : bien que déjà employée durant l'Antiquité (IV^{ème} millénaire avant notre ère) pour soigner la fièvre, la substance active à l'origine de l'effet antipyrétique et anti-inflammatoire du saule, la salicyline, n'est isolée pour la première fois qu'en 1828 par Johann Andreas Buchner¹⁴⁵. Le procédé d'extraction et d'isolement mis en place consistait en une série d'extractions¹⁴⁶ complexes : l'écorce était placée dans une solution d'ammoniaque afin de dissoudre et éliminer les tanins, puis l'écorce était extraite par une solution d'acide sulfurique. L'excès d'acide sulfurique et les pigments étaient éliminés en les faisant précipiter avec une solution d'acétate de plomb. Ensuite, l'excès de plomb était séparé par l'ajout de sulfure d'hydrogène. Le liquide obtenu, une fois traité avec du blanc d'œuf et du charbon animal (afin d'entraîner le restant de matières colorées), était porté à ébullition dans de l'ammoniaque jusqu'à l'obtention de cristaux jaunâtre : la salicyline. Ce fut le point de départ de la synthèse de l'acide acétylsalicylique par Félix Hoffmann près d'un demi-siècle plus tard (1897). De nombreux autres exemples peuvent illustrer le potentiel du règne végétal et les difficultés associées à l'isolement de ses principes actifs : la quinine¹⁴⁷ issue de *Cinchona spp.*, qui est encore utilisée de nos jours dans les traitements antipaludiques, a été isolée en 1820 selon des procédés tout aussi complexes que pour l'aspirine ou encore le paclitaxel¹⁴⁸ issu de *Taxus brevifolia*. Cette molécule communément employée en chimiothérapie, a été isolée en 1971 par des chromatographies solide-liquide successives avec des phases stationnaires de différentes natures. Ces découvertes ont eu un tel impact sanitaire que ces trois molécules sont citées dans la liste des médicaments dits essentiels selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cependant ces découvertes majeures sont le fruit d'un travail de purification long et fastidieux. C'est pourquoi, afin que le

domaine de l'isolement de molécules issues du végétal puisse être pleinement et sereinement exploré, la recherche de nouvelles techniques adaptées à ses problématiques se doit d'être poursuivie.

Pour cela, de nombreuses évolutions dans le domaine des sciences séparatives ont vu le jour et ont été mises au service de l'isolement de molécules naturelles à l'échelle préparative¹⁴⁹. C'est notamment le cas de celles concernant les chromatographies impliquant une phase stationnaire solide comme la chromatographie liquide préparative haute performance (HPLC) ou la chromatographie par fluide supercritique (SFC) qui ont fait l'objet d'élaboration de phases solides sophistiquées et de développement d'équipements faisant intervenir des conditions de pression et de températures contrôlées⁵². Cependant de nombreuses contraintes liées à l'isolement de produits naturels ne peuvent trouver toutes leurs réponses dans ce type de chromatographies. En effet, les extraits naturels peuvent contenir des centaines de molécules de natures variées et l'emploi d'une phase stationnaire solide peut impliquer la formation d'adsorptions irréversibles sur celle-ci ce qui la rendra inutilisable. Aussi, si les composés à isoler sont présents en faible quantité dans l'extrait, les quantités injectées seront tributaires de la présence d'un support solide qui diminue la capacité d'injection. C'est pourquoi, les techniques préparatives classiques (chromatographie flash, HPLC, SFC, TLC...), seront limitées soit par leur capacité d'injection soit par leur coût dans le cas où la phase stationnaire venait à être dégradée.

Une réponse à ses contraintes réside dans le développement de technologies impliquant les principes de la chromatographie liquide-liquide : l'absence de phase stationnaire solide permet d'éviter les adsorptions irréversibles, la flexibilité de la composition du système biphasique de solvants permet de l'adapter aux propriétés physico-chimiques des composés étudiés et l'absence de support offre la possibilité d'injecter des quantités importantes d'extraits naturels¹⁵⁰.

À ces fins plusieurs équipements employant ce principe ont été développés. Ils sont regroupés sous le terme de chromatographie à contrecourant (CCC) dont deux variantes existent : l'hydrostatique et l'hydrodynamique¹⁵¹. La dernière étant plus largement décrite que la première, il a été décidé d'étudier les performances qu'offre la chromatographie à contrecourant hydrostatique (ou CPC pour chromatographie de

partage centrifuge) dans le cadre de l'isolement, à petite et grande échelle, de molécules aux propriétés physicochimiques proches et dont la purification a un intérêt pour les compléments alimentaires à base de plantes.

En collaboration avec Extrasynthèse, société spécialisée dans la vente de standards analytiques d'origine végétale, notre choix s'est porté sur les valépotriates, synthétisés par les plantes du genre *Valeriana*. Leurs potentielles activités cytotoxiques et mutagènes les rendent indésirables dans des produits de grande consommation tels que les compléments alimentaires^{152,153}. De plus, très peu de standards analytiques de cette famille de molécules étaient commercialisées avant 2018 et aucune étude concernant leur isolement par chromatographie à contrecourant n'avait été décrite dans la littérature.

2 La *Valeriana officinalis* dans les compléments alimentaires : contexte réglementaire et analytique

2.1 Usages et activités de *V. officinalis*

Déjà décrite par Hippocrate au V^{ème} siècle avant J.C, la valériane fut utilisée à travers les siècles pour traiter diverses pathologies : les insomnies, les palpitations cardiaques ou encore les troubles épileptiques^{154,155} mineurs. Si bien qu'au Moyen-Âge, on la surnomma « guérit-tout ».

La valériane la plus connue en Europe est la *Valeriana officinalis* L. (Figure 33), et nombreuses sont les préparations commercialisées à base de cette plante.



Figure 33 - *Valeriana officinalis* (source: Köhler's Medizinal-Pflanzen)

En effet, que ce soit sous la forme de médicaments ou de compléments alimentaires, les produits la contenant sont commercialisés par des entreprises telles que les laboratoires Arkopharma, Boiron, Vitarmony ou Bayer afin de corriger les troubles mineurs du sommeil ou de l'anxiété.

2.2 Molécules actives de *V. officinalis* : les acides valéréniques et les valépotriates

De nombreuses études ont été menées, tant dans le but de confirmer les propriétés relaxantes de *V. officinalis*, que pour identifier les composés responsables de ses activités sédatives. Pour cela des études randomisées, en double aveugle et avec placebo ont mis en évidence l'efficacité de la valériane lors de troubles du sommeil et de l'anxiété¹⁵⁶. Aussi, les études souhaitant identifier les composés responsables de ces effets ont mis en exergue les actions pharmacologiques¹⁵⁷ des sesquiterpènes, regroupés sous le nom d'acides valéréniques, qu'elle contient (Figure 34).

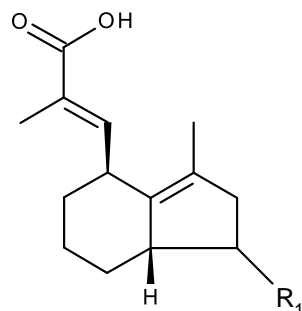


Figure 34 – Structure type des acides valérieniques (R1 : H, OH, COOH)

Au même titre que les barbituriques, l'alcool, les benzodiazépines ou encore les anesthésiques généraux, ces sesquiterpènes sont agonistes des récepteurs GABA_A ce qui leurs confèrent des effets dépresseurs du système nerveux central ayant pour résultante la sédation de la personne qui en ingère¹⁵⁸.

Cependant, une autre famille de molécule a elle aussi été mise en évidence dans *V. officinalis* : les iridoïdes non hétérosidiques dits valépotriates. Leur dénomination provient de la contraction de **valériana-époxy-triester** (Figure 35).

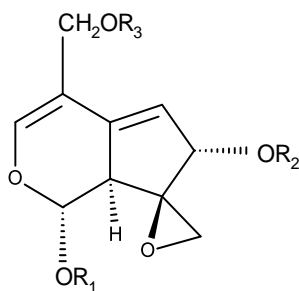


Figure 35 – Structure type des valépotriates (R1, R2 et R3 : H ou chaîne carbonée)

Des études *in vitro* ont démontré leurs activités mutagènes et cytotoxiques dont la principale origine provient de la fonction époxyde qu'ils possèdent et qui leur confère des propriétés alkylantes¹⁵⁹.

Etant donné les activités pharmacologiques des valépotriates sur l'organisme, la législation de pays comme la France ou la Belgique, impose l'absence totale de cette famille de molécules dans les compléments alimentaires contenant de la *V. officinalis* ou une autre plante susceptible d'en synthétiser⁸. C'est pourquoi il est désormais obligatoire de prouver, au travers un rapport d'analyse, l'identité de la plante employée ainsi que l'absence totale de valépotriates lors de l'emploi de plantes pouvant en contenir, telles que *Centranthus ruber* L., *Valeriana fauriei* Briq., *Valeriana jatamansi*

Jones ou encore *Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC^{153,160-162}. Les professionnels du secteur seront alors tentés de se référencer aux pharmacopées afin d'y trouver une méthode d'analyse standardisée or ce raccourci peut se révéler inadéquat.

3 La *Valeriana officinalis* et les problématiques posées par une monographie issue de la pharmacopée européenne

Depuis le 01 janvier 2015, les professionnels de santé souhaitant employer une plante dans des compléments alimentaires sont tenus de satisfaire à l'Arrêté du 24 juin 2014. Il y est précisément mentionné que l'utilisation de *V. officinalis* implique de pouvoir surveiller le taux d'acides valéréniques présents ainsi que de prouver l'absence de valépotriates par un rapport d'analyse. La teneur des acides valéréniques est à surveiller car ces acides sesquiterpéniques sont à l'origine de l'activité sédatrice de la *V. officinalis* tandis que l'absence des valépotriates est à vérifier car il a été démontré que ce type d'iridoïdes pouvait avoir des propriétés génotoxiques, mutagènes et cytotoxiques. De plus, la simple authentification macro et microscopique ne pouvant être réalisée sur des matières premières telles que les extraits secs, le dosage de marqueurs pertinents est spécifiquement cité dans ce nouvel arrêté.

Comme suggéré dans l'arrêté plantes, l'industriel dispose de méthodes décrites dans les pharmacopées qui, par leur nature, peuvent être directement appliquées en laboratoire sans qu'aucune étape de validation ou de transfert de méthode ne soit nécessaire. La pharmacopée européenne propose deux monographies correspondantes aux matières premières régulièrement utilisées par les industriels : les extraits hydroalcooliques secs et les extraits aqueux secs. Ces deux monographies décrivent des méthodes d'identification de la plante et de dosage de ses composés. Or dans le cas de la *V. officinalis*, même si des monographies existent, elles restent incomplètes.

3.1 Identification de *Valeriana officinalis* selon Ph. Eur

L'identification de la *V. officinalis* dans la Ph. Eur. repose sur la mise en évidence par chromatographie sur couche mince de deux marqueurs : l'acide valérénique et l'acide acétoxyvalérénique. La problématique suivante doit être mise en avant : l'acide valérénique et l'acide acétoxyvalérénique sont-ils des marqueurs spécifiques de *Valeriana officinalis* ?

Le genre *Valeriana* regroupe environ 200 espèces¹⁶³ et les acides valéréniques ayant à ce jour été mis en évidence sont l'acide valérénique, l'acide acétoxyvalérénique et l'acide hydroxyvalérénique¹⁶⁴ (Figure 36).

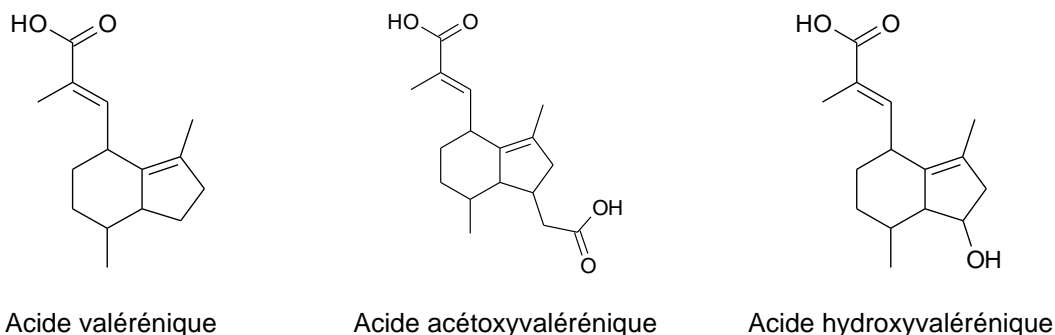


Figure 36 - Les différents acides valéréniques

Or de nombreuses plantes telles que *V. jatamansi*^{153,158}, *V. faurieri*¹⁶¹, *V. edulis*¹⁵⁷, *Nardostachys jatamansi*¹⁵³ ou encore *Selinum vaginatum*¹⁵³ peuvent aussi contenir ces acides valéréniques.

C'est pourquoi, l'identification se basant uniquement sur la présence d'acides valéréniques ne peut suffire à garantir l'identification sans équivoque de *V. officinalis*. Ceci d'autant plus que, sur des extraits secs, l'identification ne peut être complétée par une identification microscopique.

3.2 Dosage des constituants de *Valeriana officinalis* proposé par la Ph. Eur.

Une méthode de dosage par chromatographie liquide des acides valéréniques exprimée en équivalence d'acide valérénique décrite dans la pharmacopée européenne permet de surveiller le taux d'acide valérénique et d'acide acétoxyvalérénique. Or, bien qu'identifié à l'aide du chromatogramme d'extrait sec de valériane de référence de la pharmacopée européenne, il n'est pas suggéré de doser le taux d'acide hydroxyvalérénique *via* cette méthode. Il convient donc pour les professionnels d'effectuer des recherches supplémentaires afin de pouvoir quantifier ce dernier acide connu.

Enfin, dans le cas des valépotriates, bien qu'ils aient été identifiés comme des composés dangereux, la pharmacopée européenne ne propose pas de méthode permettant de les doser.

4 Les valépotriates : quelles approches pour leur dosage ?

Les valépotriates forment une famille de molécules de nature très variée et en matière de dosage, deux approches sont possibles : le dosage d'une famille de molécules en équivalence d'un standard analytique ou le dosage de chaque molécule d'après l'utilisation de son standard analytique. Le premier choix donne une idée de la teneur totale avec un biais difficilement mesurable tandis que le second fournit la réponse la plus juste pour le composé étudié uniquement. Le cas du dosage des valépotriates peut être abordé par ces deux approches.

4.1 Phytochimie des valépotriates

Les valépotriates appartiennent à la famille des iridoïdes : ce sont des monoterpénoïdes constitués d'un cyclopentane associé à un cycle à 6 atomes dont un oxygène. Les iridoïdes sont produits par la voie du mévalonate et l'une des hypothèses concernant leur synthèse est la suivante¹⁶⁵ : sous l'action de la géranyl diphosphate synthase (CrGDS), une unité diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) et une unité isopentényl-pyrophosphate (IPP) forment le géranyl-diphosphate (GDP). Ce dernier est hydrolysé par la géraniol synthase (CrGS) pour former le géraniol qui est ensuite hydroxylé en C10 par la géraniol 10-hydroxylase (CrG10H) pour former le 10-hydroxygéraniol. Ce dernier est oxydé par la 10-hydroxygéraniol déhydrogénase (Cr10HGO) en 10-oxogéraniol et cyclisé sous l'action d'une iridoïde synthase (CrIDS) pour former le noyau iridoïde népétalactol (Figure 37).

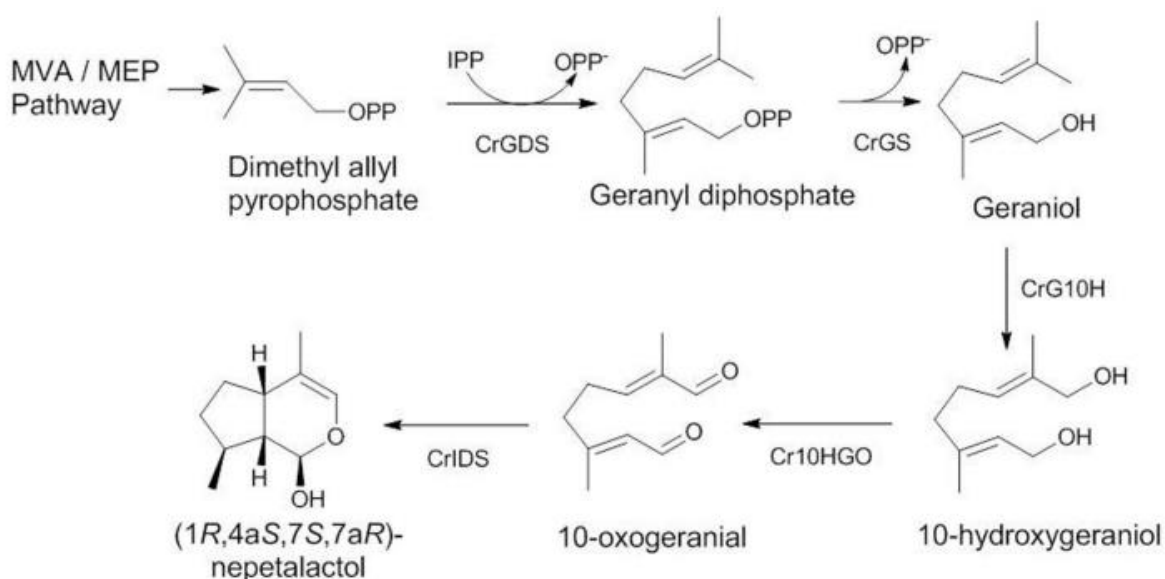
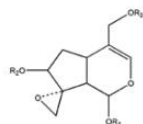


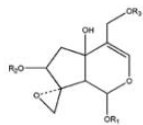
Figure 37 - Voie de biosynthèse des valépotriates

La structure du népétalactol pourrait ensuite être substituée par divers mécanismes au sein du métabolisme de la plante au travers des réactions de substitution et d'oxydation menant à la formation de valépotriates de différentes natures : monoène, diène, oxydé en alcool, en aldéhyde, en ester en une, deux ou trois positions ou encore halogénés *etc.* Il en résulte une grande variété de valépotriates dont certaines structures ont été décrites dans la littérature (Figure 38).

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?



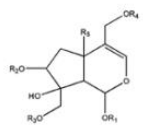
	R ₁	R ₂	R ₃
39 AHD-valtrate	AC	V	AIV
64 Isodidrovaltrate	IV	IV	AC
65 Didrovaltrate	IV	AC	IV



	R ₁	R ₂	R ₃
19 IVHD-valtrate	IV	AC	LIV
54 11-Homohydroxyldihydrovaltrate	IV	AC	MIV
60 5-Hydroxydidrovaltrate	IV	AC	IV
32 Jatamanvaltrate L	IV	H	LIV
79 Jatamanvaltrate M	IV	AC	ET

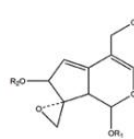
Epoxy monoene type iridoids

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
31 8-methylvalepotriate	IV	Y	Me	AC	H
38 Didrovaltrate acetoxy hydrin	IV	AC	AC	IV	H
9 Jatamanvaltrate F	IV	AC	Me	LIV	H
56 Jatamanvaltrate G	IV	AC	ABV	IV	H
57 Jatamanvaltrate H	IV	AC	H	IV	H
2 Jatamanvaltrate A	IV	AC	ABV	LIV	OH
5 Jatamanvaltrate B	IV	AC	IV	LIV	OH
8 Jatamanvaltrate C	IV	AC	AC	LIV	OH
4 Jatamanvaltrate D	IV	AC	X	LIV	OH
13 Jatamanvaltrate E	IV	AC	Me	LIV	OH
1 Valeriotetrate A/Valeriotetrate C	IV/AC	AC/IV	LIV	LIV	OH
15 Valeriotriate B	IV	OH	AC	LIV	OH
26 volvatrate C	IV	OH	OH	LIV	OH
27 volvatrate D	IV	OH	OH	LIV	OH



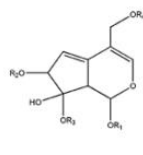
Non epoxy monoene type iridoids

Monoene type iridoids



	R ₁	R ₂	R ₃
67 Valtrate	IV	IV	AC
68 Isovaltrate	IV	AC	IV
44 Acevaltrate	IV	AIV	AC
45 1-Acevaltrate	AIV	IV	AC
43 11-Acevaltrate	IV	AC	AIV
80 Desacetyl isovaltrate/ Divaltrate	IV	H	IV
62 1-Homovaltrate/ 7-Homovaltrate	IV	AC	AC

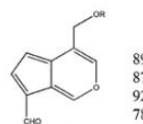
Epoxy dienes type iridoids



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
10 Sorbifolivaltrate C	HIV	IV	IV	IV
21 Sorbifolivaltrate D	Cr	MV	IV	AC
24 Valtrate hydrine B1	IV	IV	IV	AC
40 Valtrate hydrine B2	IV	IV	AC	AC
18 Valtrate hydrine B3	HIV	IV	IV	AC
23 Valtrate hydrine B4	IV	IV	AC	IV
16 Valtrate hydrine B5 (a)	IV	IV	MIV	AC
17 Valtrate hydrine B5 (b)	IV	MIV	IV	AC
33 Valtrate hydrine B6 (a)	IV	MIV	AC	AC

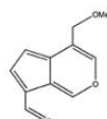
Deoxidation dienes type iridoids

Dienes type iridoids



Valepotriate aldehyde

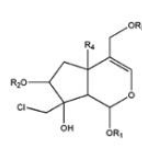
	R
89 Baldrinal	AC
87 Homobaldrinal	IV
92 Deacylbaldrinal	H
78 Isovaltral	



Valepotriate ketone

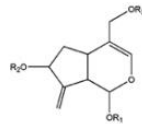
91 11-Methoxyburtinal	
-----------------------	--

Tetraterpene type iridoids

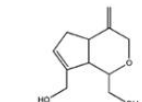


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
47 chlorovaltrate F	IV	AC	IV	OH
77 chlorovaltrate G	IV	AC	H	OH
76 chlorovaltrate H	IV	AC	Me	OH
71 chlorovaltrate I	IV	AC	Et	OH
72 chlorovaltrate J	IV	H	IV	H
50 chlorovaltrate K	IV	AC	IV	H

Chloro monoene type iridoids

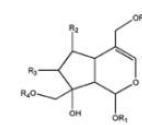


	R ₁	R ₂	R ₃
74 8,11-desoxydidrovaltrate	IV	AC	IV
66 8,11-desoxyhomodidrovaltrate	MIV	AC	IV

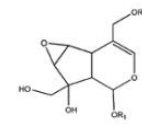


90 jatamanin K	
----------------	--

Deoxidation monoene type iridoids

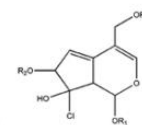


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
7 Kanokoside D	IV	H	OH	2Glc	H
49 Valeriosidatum	IV	H	OH	Glc	Me
78 dihydrocormin	Glc	OH	H	Me	AC

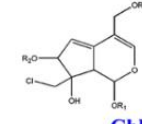


	R ₁	R ₂
46 Kanokoside A	IV	Glc
6 Kanokoside C	IV	2Glc

Iridoid glycosides

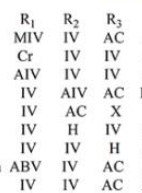


	R ₁	R ₂	R ₃
49 chlorovaltrate	IV	IV	AC
81 Valerianoid	AIV	OH	IV
29 Valerianoid	BIV	LIV	AC



	R ₁	R ₂	R ₃
28 chlorovaltrate L	IV	IV	HIV
30 chlorovaltrate M	IV	ABV	AC
48 chlorovaltrate N	IV	MV	AC
73 chlorovaltrate O	IV	IV	H
52 rupesin B	IV	AC	IV

Chloro dienes type iridoids



34 Valtrate hydrine B6	MIV	IV	AC	AC
25 Valtrate hydrine B7	Cr	IV	IV	AC
11 Valtrate hydrine B8	AIV	IV	IV	AC
3 Valeriotetrate B	IV	AIV	AC	LIV
14 Jatamanvaltrate I	IV	AC	X	IV
58 Jatamanvaltrate J	IV	H	IV	AC
59 Jatamanvaltrate K	IV	IV	H	AC
20 10-Acetoxy-1-acevaltrate hydrin	ABV	IV	AC	AC
41 10-acetoxyvaltrathyrin	IV	IV	AC	AC

Figure 38- Valépotriates identifiés dans la littérature d'après Wang, C. *et al.* Flexible and powerful strategy for qualitative and quantitative analysis of valepotriates in *Valeriana jatamansi* Jones using high-performance liquid chromatography with linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **40**, 1906–1919 (2017)

Cependant, la grande diversité de cette famille de molécules associée à leur faible teneur dans les plantes rend leur caractérisation parfois délicate : en témoigne la

Figure 38 qui est issue d'une publication datant de 2017¹⁶⁶. En effet, malgré le fait qu'elle soit récente, des erreurs de structures et de formules brutes sont présentes. Il en est de même pour une méta-analyse de référence¹⁶⁷, qui, bien qu'elle soit citée plus d'une cinquantaine de fois, contient aussi des erreurs relatives aux structures et formules brutes de certains composés. Ces erreurs sont reprises dans le Tableau 28 et ont été relevées en comparant les noms des molécules aux bases de données disponibles telles que PubChem et Scifinder.

Tableau 28 – Récapitulatif des erreurs relevées dans deux publications traitant des valépotriates

Publication : Bos, R., Woerdenbag, H. J. & Pras, N. Determination of valepotriates. <i>J. Chromatogr. A</i> 967 , 131–146 (2002).	
Pages	Erreurs détectées
132	La figure 3 représente une structure monoène alors que c'est un diène
132	La figure 5 mentionne la valechlorine comme étant un monoène alors que c'est un diène
137	Le tableau 2 mentionne le diavaltrate avec une formule brute $C_{19}H_{24}O_{10}$ alors que c'est $C_{19}H_{24}O_8$
137	Le tableau 2 mentionne l'homoacevaltrate avec une formule brute $C_{24}H_{32}O_{10}$ alors que c'est $C_{25}H_{34}O_{10}$
137	Le tableau 2 mentionne le 1-homovaltrate avec une formule brute $C_{23}H_{36}O_8$ alors que c'est $C_{23}H_{32}O_8$
137	Le tableau 2 mentionne le 11-acévaltrate mais il n'est pas référencé dans la littérature et la structure indiquée ayant pour formule brute $C_{24}H_{32}O_{10}$ n'est pas retrouvée non plus
137	Le nom de molécule désacétylisovaltrate n'existe pas : le nom correct est le deacetylisovaltrate.
137	Le tableau 2 mentionne l'IVHD-valtrate une formule brute $C_{27}H_{40}O_9$ alors que c'est $C_{27}H_{40}O_{11}$
137	Le tableau 2 mentionne l'AHD-valtrate une formule brute $C_{24}H_{34}O_{10}$ alors que c'est $C_{24}H_{34}O_{11}$
137	Le tableau 2 mentionne le 8,11-désoxididrovaltrate mais cette molécule n'existe pas l'orthographe exacte est désoxidodidrovaltrate et sa formule brute est $C_{22}H_{32}O_7$
137	Le tableau 2 mentionne le 8,11-désoxihomodidrovaltrate mais il n'est pas référencé dans la littérature et la structure indiquée ayant pour formule brute $C_{23}H_{34}O_6$ n'est pas retrouvée non plus
137	Le tableau 2 mentionne le valerodisate mais l'orthographe exacte de cette molécule est le valerოსidate
Publication : Wang, C. <i>et al.</i> Flexible and powerful strategy for qualitative and quantitative analysis of valepotriates in <i>Valeriana jatamansi</i> Jones using high-performance liquid chromatography with linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. <i>J. Sep. Sci.</i> 40 , 1906–1919 (2017).	
Pages	Erreurs détectées
1909	La figure 2 mentionne le 8-méthylvalépotriate avec une formule brute $C_{28}H_{36}O_{11}$ alors que c'est $C_{27}H_{34}O_9$
1909	La figure 2 mentionne le jatamanvaltrate F avec une formule brute $C_{28}H_{44}O_{11}$ alors que c'est $C_{29}H_{44}O_{12}$
1909	La figure 2 mentionne le jatamanvaltrate G avec une formule brute $C_{29}H_{44}O_6$ alors que c'est $C_{22}H_{34}O_9$
1909	La figure 2 mentionne le jatamanvaltrate D avec une formule brute $C_{44}H_{46}O_{14}$ alors que c'est $C_{34}H_{46}O_{14}$
1909	La figure 2 mentionne le valeriotriate A avec une formule brute $C_{37}H_{58}O_{15}$ alors que c'est $C_{29}H_{46}O_{12}$
1909	La figure 2 mentionne le valeriotriate B avec une formule brute $C_{27}H_{32}O_{13}$ alors que c'est $C_{29}H_{46}O_{12}$

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

1909	La figure 2 mentionne le kanokoside A avec une formule brute $C_{21}H_{32}O_{13}$ alors que c'est $C_{21}H_{32}O_{12}$
1909	La figure 2 mentionne le kanokoside C avec une formule brute $C_{27}H_{42}O_{19}$ alors que c'est $C_{27}H_{42}O_{17}$
1909	La figure 2 mentionne le 1- β -acévaltrate avec une formule brute $C_{26}H_{34}O_{12}$ alors que c'est $C_{24}H_{32}O_{10}$
1909	La figure 2 mentionne le sorbifolivaltrate C avec une formule brute $C_{29}H_{44}O_{11}$ alors que c'est $C_{30}H_{46}O_{11}$
1909	La figure 2 mentionne le sorbifolivaltrate D avec une formule brute $C_{27}H_{38}O_{10}$ alors que c'est $C_{28}H_{40}O_{10}$
1909	La figure 2 mentionne le valtrate hydrine B1 avec une formule brute $C_{26}H_{38}O_{10}$ alors que c'est $C_{27}H_{42}O_{10}$
1909	La figure 2 mentionne le valtrate hydrine B3 avec une formule brute $C_{26}H_{38}O_{10}$ alors que c'est $C_{27}H_{40}O_{11}$
1909	La figure 2 mentionne le valtrate hydrine B7 avec une formule brute $C_{26}H_{34}O_{10}$ alors que c'est $C_{27}H_{38}O_{10}$
1909	La figure 2 mentionne le valtrate hydrine B8 avec une formule brute $C_{28}H_{40}O_{12}$ alors que c'est $C_{29}H_{42}O_{12}$
1909	La figure 2 mentionne le valeriotetrate B avec une formule brute $C_{33}H_{48}O_{14}$ alors que c'est $C_{34}H_{50}O_{14}$
1909	La figure 2 mentionne le jatamanvaltrate I avec une formule brute $C_{28}H_{34}O_{11}$ alors que c'est $C_{29}H_{36}O_{11}$
1909	La figure 2 mentionne le jatamanvaltrate J avec une formule brute $C_{21}H_{30}O_9$ alors que c'est $C_{22}H_{32}O_9$
1909	La figure 2 mentionne le jatamanvaltrate K avec une formule brute $C_{21}H_{30}O_9$ alors que c'est $C_{22}H_{32}O_9$
1909	La figure 2 mentionne le 10-acétoxy-1-acévaltrate hydrin avec une formule brute $C_{25}H_{34}O_{12}$ alors que c'est $C_{28}H_{22}O_{12}$
1909	La figure 2 mentionne le 10-acéoxyvaltrathyrin avec une formule brute $C_{23}H_{32}O_{10}$ alors que c'est $C_{24}H_{34}O_{16}$
1909	La figure 2 mentionne le chlorovaltrate L avec une formule brute $C_{25}H_{37}ClO_8$ alors que c'est $C_{25}H_{37}ClO_9$
1909	La figure 2 mentionne le chlorovaltrate O avec une formule brute $C_{25}H_{37}ClO_8$ alors que c'est $C_{20}H_{29}ClO_7$
1909	La figure 2 mentionne le rupesin B/Isovaltrate chlorohyrin avec une formule brute $C_{22}H_{32}ClO_8$ alors que c'est $C_{22}H_{31}ClO_8$
1909	La figure 2 mentionne le chlorovaltrate/valechlorine/valtrate chlorohyrin avec une formule brute $C_{21}H_{29}O_8Cl$ alors que c'est $C_{22}H_{31}ClO_8$
1909	La figure 2 mentionne le valerianoïde J avec une formule brute $C_{21}H_{29}O_{10}Cl$ alors que c'est $C_{32}H_{48}O_{12}$

Ces erreurs sont le plus souvent corrélées à des références datées, où les technologies d'élucidation structurales n'étaient pas encore assez puissantes et malheureusement certaines approximations ont été reprises durant plusieurs décennies. C'est pourquoi, afin d'établir une base de données fiables, les formules brutes de chaque valépotriate ont été recherchées dans les bases de données citées précédemment et les données nécessaires à leur étude lors d'analyses par spectrométrie de masse haute résolution ont été intégrées dans le Tableau 29.

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

Tableau 29- Valépotriates référencés dans la littérature et masses à rechercher lors d'études par HPLC-HRMS en ionisation positive

Nom	Formule brute	Mass exacte (u)	M/z	
			[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
1,5-dihydroxy-3,8-époxyvalechlorine A	C ₁₂ H ₁₅ ClO ₆	290,055718	291,063543	313,045488
10-acétoxy-1-acévaltrate hydrine	C ₂₈ H ₂₂ O ₁₂	550,111130	551,118955	573,100900
10-acétoxyvaltrathyrine	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₆	578,184690	579,192515	601,174460
11-homohydroxydihydrovaltrate	C ₂₃ H ₃₄ O ₉	454,220285	455,228110	477,210055
1-acévaltrate	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₀	480,199550	481,207375	503,189320
1-homoacévaltrate	C ₂₅ H ₃₄ O ₁₀	494,215200	495,223025	517,204970
1-homoisoacévaltrate	C ₂₅ H ₃₄ O ₁₀	494,215200	495,223025	517,204970
1-homovaltrate	C ₂₃ H ₃₂ O ₈	436,209720	437,217545	459,199490
1-β-acévaltrate	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₀	480,199550	481,207375	503,189320
5-hydroxydidrovaltrate	C ₂₂ H ₃₂ O ₉	440,204635	441,212460	463,194405
7-homovaltrate	C ₂₃ H ₃₂ O ₈	436,209720	437,217545	459,199490
8-méthylvalepotriate	C ₂₇ H ₃₄ O ₉	502,220285	503,228110	525,210055
Acévaltrate	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₀	480,199550	481,207375	503,189320
AHD valtrate	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₁	498,210115	499,217940	521,199885
Chlorovaltrate A/Jatamanin O/Valjatrate/Valjatrate B	C ₁₇ H ₂₃ Cl O ₇	374,113233	375,121058	397,103003
Chlorovaltrate B	C ₁₈ H ₂₇ ClO ₈	406,139448	407,147273	429,129218
Chlorovaltrate C	C ₁₉ H ₂₉ Cl O ₈	420,155098	421,162923	443,144868
Chlorovaltrate D	C ₁₆ H ₂₅ ClO ₇	364,128883	365,136708	387,118653
Chlorovaltrate E	C ₂₅ H ₃₉ ClO ₁₀	534,223178	535,231003	557,212948
Chlorovaltrate F	C ₂₂ H ₃₃ ClO ₉	476,181313	477,189138	499,171083
Chlorovaltrate G	C ₁₇ H ₂₅ ClO ₈	392,123798	393,131623	415,113568
Chlorovaltrate H	C ₁₈ H ₂₇ ClO ₈	406,139448	407,147273	429,129218
Chlorovaltrate I	C ₁₉ H ₂₉ ClO ₈	420,155098	421,162923	443,144868
Chlorovaltrate J	C ₂₀ H ₃₁ ClO ₇	418,175833	419,183658	441,165603
Chlorovaltrate K	C ₂₂ H ₃₃ ClO ₈	460,186398	461,194223	483,176168
Chlorovaltrate L	C ₂₅ H ₃₇ ClO ₉	516,212613	517,220438	539,202383
Chlorovaltrate M/valeriandoid B	C ₂₄ H ₃₃ ClO ₁₀	516,176228	517,184053	539,165998
Chlorovaltrate N	C ₂₃ H ₃₃ ClO ₈	472,186398	473,194223	495,176168
Chlorovaltrate O	C ₂₀ H ₂₉ ClO ₇	416,160183	417,168008	439,149953
Chlorovaltrate/Valechlorine/Valtrate chlorohydrin	C ₂₂ H ₃₁ ClO ₈	458,170748	459,178573	481,160518
Diavaltrate	C ₁₉ H ₂₄ O ₈	380,147120	381,154945	403,136890

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

Didrovaltrate	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424,209720	425,217545	447,199490
Didrovaltrate acétoxy hydrin	C ₂₄ H ₃₆ O ₁₀	484,230850	485,238675	507,220620
Dihydrocornin	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	390,152600	391,160425	413,142370
Homodidrovaltrate	C ₂₃ H ₃₄ O ₈	438,225370	439,233195	461,215140
Isodidrovaltrate	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424,209720	425,217545	447,199490
Isovaleroxy-Valtrathydric	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₆	620,231640	621,239465	643,221410
Isovaltrate	C ₂₂ H ₃₀ O ₈	422,194070	423,201895	445,183840
IVHD-valtrate	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₁	540,257065	541,264890	563,246835
Jatamanin K	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	182,094295	183,102120	205,084065
Jatamanvaltrate A	C ₃₄ H ₅₂ O ₁₅	700,330625	701,338450	723,320395
Jatamanvaltrate B	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642,325145	643,332970	665,314915
Jatamanvaltrate C	C ₂₉ H ₄₄ O ₁₃	600,278195	601,286020	623,267965
Jatamanvaltrate D	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₄	678,288760	679,296585	701,278530
Jatamanvaltrate E	C ₂₈ H ₄₄ O ₁₂	572,283280	573,291105	595,273050
Jatamanvaltrate F	C ₂₉ H ₄₄ O ₁₂	584,283280	585,291105	607,273050
Jatamanvaltrate G	C ₂₂ H ₃₄ O ₉	442,220285	443,228110	465,210055
Jatamanvaltrate H	C ₂₂ H ₃₄ O ₉	442,220285	443,228110	465,210055
Jatamanvaltrate I	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₁	560,225765	561,233590	583,215535
Jatamanvaltrate J	C ₂₂ H ₃₂ O ₉	440,204635	441,212460	463,194405
Jatamanvaltrate K	C ₂₂ H ₃₂ O ₉	440,204635	441,212460	463,194405
Jatamanvaltrate L	C ₂₅ H ₃₈ O ₁₀	498,246500	499,254325	521,236270
Jatamanvaltrate M	C ₁₉ H ₂₈ O ₈	384,178420	385,186245	407,168190
Kanokoside A	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₂	476,189380	477,197205	499,179150
Kanokoside C	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₇	638,242205	639,250030	661,231975
Kanokoside D	C ₂₇ H ₄₄ O ₁₆	624,262940	625,270765	647,252710
Rupésin B/Isovaltrate chlorohydric	C ₂₂ H ₃₁ ClO ₈	458,170748	459,178573	481,160518
Seneciovaltrate	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	420,178420	421,186245	443,168190
Sorbifolivaltrate A	C ₂₅ H ₃₄ O ₈	462,225370	463,233195	485,215140
Sorbifolivaltrate B	C ₂₃ H ₃₀ O ₈	434,194070	435,201895	457,183840
Sorbifolivaltrate C	C ₃₀ H ₄₆ O ₁₁	582,304015	583,311840	605,293785
Sorbifolivaltrate D	C ₂₈ H ₄₀ O ₁₀	536,262150	537,269975	559,251920
Valeriandoid A	C ₁₇ H ₂₃ ClO ₇	374,113233	375,121058	397,103003
Valeriandoid C	C ₁₇ H ₂₄ O ₈	356,147120	357,154945	379,136890
Valeriandoid J	C ₃₂ H ₄₈ O ₁₂	624,314580	625,322405	647,304350
Valeriotétrate A/C	C ₃₇ H ₅₈ O ₁₅	742,377575	743,385400	765,367345
Valeriotétrate B	C ₃₄ H ₅₀ O ₁₄	682,320060	683,327885	705,309830
Valeriotriate A	C ₂₉ H ₄₆ O ₁₂	586,298930	587,306755	609,288700

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

Valeriotriate B	C ₂₉ H ₄₆ O ₁₂	586,298930	587,306755	609,288700
Valerosidatum	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₁	462,210115	463,217940	485,199885
Valtrate	C ₂₂ H ₃₀ O ₈	422,194070	423,201895	445,183840
Valtrate hydrine B1	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₀	526,277800	527,285625	549,267570
Valtrate hydrine B2	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₀	468,199550	469,207375	491,189320
Valtrate hydrine B3	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₁	540,257065	541,264890	563,246835
Valtrate hydrine B4	C ₂₆ H ₃₈ O ₁₀	510,246500	511,254325	533,236270
Valtrate hydrine B5 (a)	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₀	524,262150	525,269975	547,251920
Valtrate hydrine B5 (b)	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₀	524,262150	525,269975	547,251920
Valtrate hydrine B6	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₀	482,215200	483,223025	505,204970
Valtrate hydrine B6 (a)	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₀	482,215200	483,223025	505,204970
Valtrate hydrine B7	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₀	522,246500	523,254325	545,236270
Valtrate hydrine B8	C ₂₉ H ₄₂ O ₁₂	582,267630	583,275455	605,257400
Volvaltrate C	C ₂₅ H ₄₀ O ₁₁	516,257065	517,264890	539,246835
Volvaltrate D	C ₂₅ H ₄₀ O ₁₁	516,257065	517,264890	539,246835
1,5-dihydroxy-3,8-epoxyvalchlorine A	C ₁₂ H ₁₅ ClO ₆	290,055718	291,063543	313,045488
10-acétoxy-1-acévaltrate hydrin	C ₂₈ H ₂₂ O ₁₂	550,111130	551,118955	573,100900
10-acétoxyvaltrathyrin	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₆	578,184690	579,192515	601,174460

4.2 Le dosage des valépotriates totaux

Plusieurs méthodes d'identification et de quantification des valépotriates totaux ont été développées et complétées ces dernières années. Elles sont basées sur l'étude de la fragmentation des valépotriates en LC-MS/MS^{168,169}. En effet, en fonction de l'énergie de collision appliquée, des fragments caractéristiques récapitulés dans la Figure 39 sont observables.

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

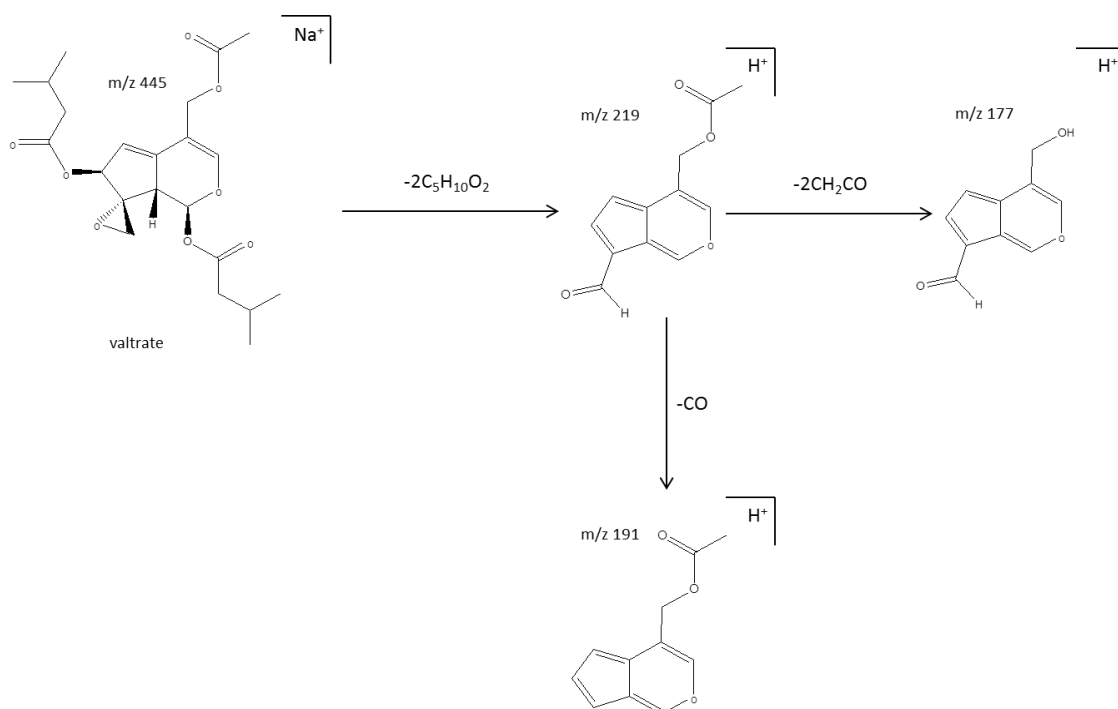


Figure 39 - Fragmentation typique du valtrate en spectrométrie de masse

Une fois les potentiels valépotriates identifiés, leur dosage peut ensuite être réalisé en équivalence d'un standard analytique soit par spectroscopie UV, soit par spectrométrie de masse. Cependant, les différents facteurs de réponses peuvent varier considérablement : en plus de ne pas absorber à la même longueur d'onde dans le cas d'un dosage par spectroscopie UV (254 nm pour les diènes et 210 nm pour les monoènes), leur ionisation peut être supprimée en fonction de la matrice étudiée dans le cas d'un dosage par spectrométrie de masse avec une source par électronébulisation¹⁷⁰.

Une autre approche peut être le dosage de chaque valépotriates en fonction de son standard analytique. La problématique posée par cette approche réside dans la disponibilité commerciale des standards analytiques. Une recherche simple auprès d'importants fournisseurs tels que Sigma Aldrich, LGC standard ou PhytoLab (catalogue 2017) confirme l'absence totale d'un quelconque représentant de cette famille. Tandis que la plupart des publications scientifiques traitant du sujet des valépotriates indiquent que les chercheurs ont été contraints d'isoler et caractériser eux même les molécules de différentes espèces de valérianes, en mettant en œuvre plusieurs étapes de purification, avant de pouvoir les étudier^{171,172}.

Etant donné la difficulté d'accès des standards analytiques de valépotriates, il est évident qu'un dosage strict de chaque molécule de valépotriates identifiés grâce son

standard analytique ne pourra être réalisé. C'est pourquoi, la méthode qui, à ce jour, est la plus rigoureuse, est celle d'identifier les valépotriates lors d'une étude de leur fragments obtenus par spectrométrie de masse afin de les doser par la suite à l'aide d'un standard analytique de leur famille. Ici, l'enjeu critique consiste à isoler un valépotriate à l'échelle industrielle afin de le commercialiser. C'est pour cela que l'isolement de valépotriates par chromatographie de partage centrifuge a été étudié.

5 La chromatographie de partage centrifuge

Pour commencer, il est essentiel de préciser qu'une confusion peut naître avec l'appellation chromatographie à contrecourant (CCC) car elle désigne à la fois le concept général de la chromatographie liquide-liquide et les appareils hydrodynamiques développés par Ito¹⁵¹. Dans ces travaux seule la CCC hydrostatique, développée par Nunogaki¹⁷³ et aussi dénommée chromatographie de partage centrifuge (CPC), sera décrite.

5.1 Principes et fonctionnement de la CPC

La chromatographie de partage centrifuge est une technique basée sur le partage d'un soluté dans deux mélanges de liquides non miscibles dont l'un constitue la phase stationnaire et l'autre la phase mobile du système chromatographique¹⁷⁴. La phase stationnaire est maintenue dans le système par la force centrifugeuse créée par l'action d'un rotor et un système de pompe permet à la phase mobile de traverser la phase stationnaire liquide. La séparation des analytes s'effectue en fonction de leur affinité pour les deux phases.

5.1.1 Le coefficient de partage

Aussi symbolisé par l'acronyme K_d , le coefficient de partage d'une molécule entre deux phases liquides non miscibles est une grandeur thermodynamique. Elle est la résultante du rapport de sa concentration dans ces deux phases.

$$K_d = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s : concentration de l'analyte dans la phase stationnaire

C_m : concentration de l'analyte dans la phase mobile

Équation 3 – Détermination du coefficient de partage

Dans le cadre d'un développement de méthode par CPC, il est essentiel que les composés à isoler aient des K_d proches de 1^{151,175}. En effet, si leur K_d en est trop éloigné cela signifiera qu'ils ont une affinité particulière pour l'une des deux phases ce qui se traduira soit par la rétention des composés dans la phase stationnaire, soit par l'élution quasi instantanée dans la phase mobile invalidant ainsi le processus de séparation de l'extrait injecté.

Afin de déterminer si un système biphasique de solvants permet l'obtention de K_d adaptés, l'approche la plus communément employée est celle dite du « shake flask »¹⁷⁴. Pour cela, le système biphasique de solvants testé est préparé dans une ampoule à décanter, puis le même volume de phase supérieure et inférieure est prélevé et placé dans un tube à essai. Ensuite l'extrait contenant les composés à isoler y est dissout, le tube à essai est agité et après décantation, les deux phases sont analysées afin de déterminer la concentration en composés à isoler dans chacune des phases. C'est pourquoi, il est d'usage d'assimiler les concentrations aux aires obtenues à l'aide d'un détecteur UV ou ELSD. Aussi, dans le cas d'une analyse par HPLC, il est primordial de vérifier la compatibilité des phases analysées avec les conditions chromatographiques (solubilité du solvant dans la phase mobile, compatibilité du solvant avec les composants de l'équipement, etc.) et le cas échéant, procéder à l'évaporation des solvants et à la dilution de l'extrait sec dans un solvant compatible avec l'analyse chromatographique.

Il est aussi possible de déterminer expérimentalement¹⁷⁶ le K_d d'un composé en utilisant les valeurs de son volume de rétention (V_r), du volume mort (V_m) et du volume de phase stationnaire (V_s) à l'aide de l'Équation 4.

$$V_r = V_m + K_d \cdot V_s$$

Équation 4 – Modèle de rétention en chromatographie de partage

Il est à noter que la terminologie « coefficient de distribution » peut aussi être rencontrée. Elle sera cependant préférentiellement employée dans le cas de l'étude de composés pouvant être présents sous plusieurs formes tels que les composés ionisables^{174,177}.

5.1.2 La sélectivité

Dans le cas de l'isolement d'un composé, la question de la sélectivité du système biphasique de solvants pour la molécule ciblée se pose. En effet, même si le K_d prédit est proche de 1, l'isolement sera réussi à la condition que les K_d des autres molécules soient assez différents pour ne pas éluer au même moment. Pour cela, la sélectivité aussi dit « facteur de séparation » (symbolisée par la lettre α) est calculée en faisant le rapport des K_d de chaque composé selon l'Équation 5.

$$\alpha = \frac{K_{d_2}}{K_{d_1}} \text{ où } K_{d_2} > K_{d_1}$$

Équation 5 – Calcul de la sélectivité d'un système de solvants biphasiques pour deux analytes

Ainsi, plus les coefficients de sélectivité seront élevés plus la probabilité de séparer distinctement les composés sera élevée¹⁵¹.

Cependant, cette valeur reste avant tout dépendante des conditions expérimentales employées car une faible sélectivité théorique peut être compensée par l'amélioration de l'efficacité du système chromatographique en augmentant, par exemple, le volume du rotor¹⁷⁸.

5.1.3 Choix de la phase mobile et sens de pompage

Lorsqu'un système biphasique de solvants adéquat a été mis au point, déterminer le rôle de chaque phase et le sens de pompage de la phase mobile sont deux points essentiels au bon déroulement de la chromatographie.

Afin de déterminer quelle phase constituera la phase mobile les principales questions qui se posent sont les suivantes : quelle phase sera la plus simple à évaporer afin de récupérer les composés isolés ? Et de quelle façon le coefficient de partage a-t-il été calculé ? Si nous prenons le cas d'un système biphasique de solvant basés sur l'hexane, le méthanol et l'eau il sera plus facile d'évaporer les fractions si elles sont récoltées dans le mélange contenant majoritairement de l'hexane que celle contenant majoritairement le méthanol et l'eau (et ce d'autant plus si les composés sont thermolabiles). Ensuite, d'après l'Équation 3 le numérateur représente la concentration de l'analyte étudié dans la phase stationnaire et le dénominateur celle dans la phase mobile. Il en découle que le calcul du K_d peut aussi être inversé (amélioration de la rétention si, par exemple, un K_d de 5 est utilisé au lieu de son inverse 0,2).

Pour cela, la CPC offre le choix du sens de pompage de la phase mobile, en proposant deux modes de travail : ascendant et descendant (Figure 40).

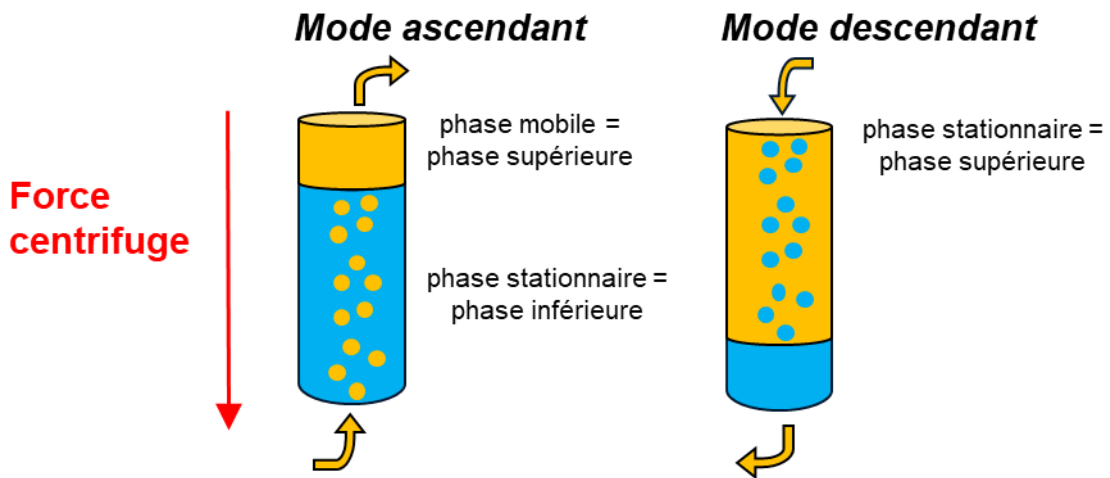


Figure 40- Illustration des modes opératoires ascendant et descendant en CPC

Dans le cas de l'utilisation de la phase inférieure comme phase stationnaire, la phase supérieure constituant la phase mobile se doit d'être pompée de façon ascendante afin de se diriger naturellement « au-dessus » de la phase stationnaire. À l'inverse, dans le cas où la phase supérieure constitue la phase stationnaire, la phase inférieure devra être pompée dans le même sens que le champ de force centrifuge afin de se diriger naturellement « au-dessous » de la phase stationnaire (mode descendant) comme décrit dans la Figure 41.

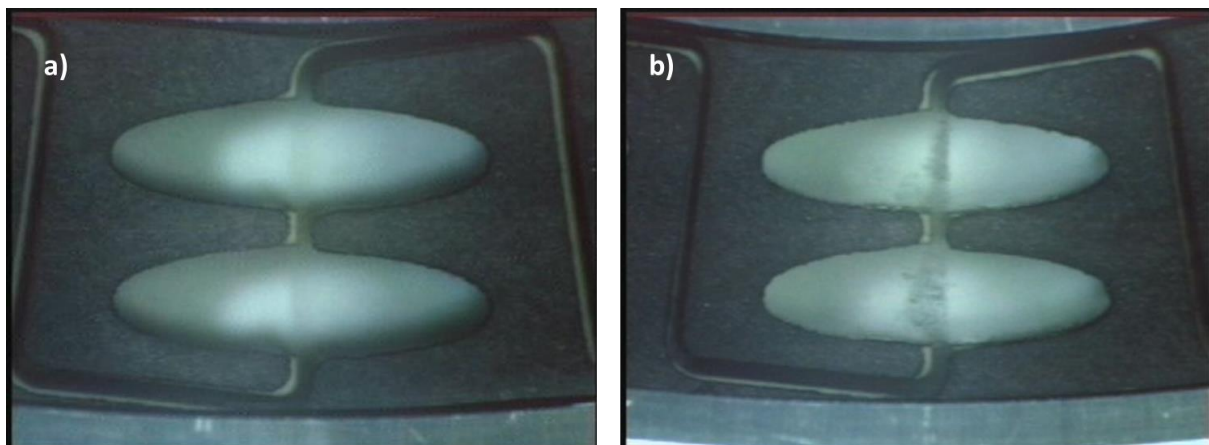


Figure 41- Observation du flux de phase mobile en mode ascendant (a) et en mode descendant (b) (1000 rpm, 500 mL/min, butanol/eau)

5.1.4 Le débit de la phase mobile et la vitesse de rotation du rotor

Afin d'obtenir une séparation optimale entre les composés, le transfert de masse entre la phase mobile et la phase stationnaire doit être maximal. Ce dernier repose essentiellement sur le taux de phase stationnaire et le mode d'écoulement de la phase mobile dans les cellules.

5.1.4.1 Le taux de rétention de phase stationnaire

Lors d'une séparation par CPC la phase stationnaire est soumise à trois contraintes distinctes : la force centrifuge créée par l'action du rotor qui la maintient dans la colonne, les frottements de la phase mobile lorsqu'elle la traverse et la pression de l'extrait lors de son injection¹⁷⁹. Ces paramètres ont une influence sur la quantité de phase stationnaire dans la colonne, et donc sur la qualité de la séparation chromatographique. En effet, à vitesse de rotation constante, l'augmentation du débit de la phase mobile a pour effet de diminuer le taux de phase stationnaire. De même, à débit constant, une augmentation de la vitesse de rotation a pour conséquence l'augmentation de la force centrifuge et du taux de rétention de phase stationnaire. Aussi, l'injection d'un échantillon peut déstabiliser l'équilibre entre la phase mobile et stationnaire et provoquer une perte de phase stationnaire en cours de chromatographie. C'est notamment le cas lors de l'injection d'un extrait ayant une densité différente de la phase stationnaire ou des propriétés tensioactives. Lors du développement d'une méthode par CPC, il est d'usage de recommander un taux (S_f) de rétention de la phase stationnaire de l'ordre de 70 % lorsque les K_d théoriques sont compris entre 0,5 et 1¹⁵¹. Cependant ce taux peut être varié en fonction des propriétés des composés étudiés. Par exemple, si un composé a un K_d élevé cela signifie qu'il a une forte affinité pour la phase stationnaire laissant prédire un volume de rétention élevé. Dans ce cas, le volume de rétention peut être diminué en diminuant le taux de rétention de phase stationnaire en baissant la vitesse de rotation ou en augmentant le débit de la phase mobile. Aussi, il est fréquemment rappelé que le volume d'injection ne doit pas dépasser 1 % (v/v) de la capacité de la colonne afin de ne pas perturber l'équilibre entre les phases stationnaires et mobiles. Cependant, dans le cas où l'échantillon présente, par exemple, une viscosité particulière, l'injecter dans un plus grand volume de phase mobile peut représenter une solution pertinente afin que moins de phase stationnaire ne soit expulsée sous l'effet de la pression.

5.1.4.2 Les différents types d'écoulement

D'après les travaux de Foucault *et al.*, l'écoulement de la phase mobile au travers la phase stationnaire peut être assimilé à des gouttelettes suivant le modèle décrit par les équations Stokes¹⁸⁰. Il a ainsi pu démontrer que l'efficacité d'une méthode de séparation par CPC était moins dépendante d'un fort taux de rétention de phase stationnaire que d'une vitesse de rotation élevée. Cette dernière permet en effet une meilleure dispersion de la phase mobile dans la phase stationnaire grâce à une diminution du rayon des gouttelettes sous l'effet de la force centrifuge. Ces travaux ont été repris par Van Buel *et al.* qui ont pu établir, grâce à l'observation parallèle à l'axe de rotation des cellules en cours d'analyse, que 4 types d'écoulement pouvait être observés en fonction de la vitesse de rotation et du débit : des gouttelettes larges, des jets fins le long des parois, des jets discontinus et des jets atomisés. Ces observations ont été complétées récemment par Marchal *et al.* qui ont étudié l'écoulement de la phase mobile avec un angle d'observation perpendiculaire à l'axe de rotation du rotor¹⁸¹. Ils ont mis en évidence que la force de Coriolis s'exerçant sur la phase mobile impliquent que les 4 types d'écoulement décrit par Van Buel *et al.* pouvaient être linéaires, sinueux, variqueux, et curvilignes. Et parmi ces derniers, les meilleurs résultats chromatographiques sont obtenus lorsque les jets sont sinueux variqueux et discontinus à condition que la coalescence de la phase mobile se fasse rapidement afin de diminuer la perte de phase stationnaire. C'est pourquoi, en plus de fournir un coefficient de partage et une sélectivité intéressante, le système biphasique de solvants doit pouvoir coalescer rapidement lors du test du « shake flask ». Il est à noter que, pour un même système biphasique de solvants, travailler en mode ascendant ou descendant ne fournira pas les mêmes résultats et ce, même si le K_d est égal à 1. Cela peut trouver une explication dans le fait que la viscosité et la densité de chaque phase étant différentes, les forces permettant un transfert de masse efficace entre les deux phases ne seront pas identiques

6 Développement d'une méthode d'isolement de valépotriates par chromatographie de partage centrifuge à l'échelle analytique et préparative

Comme vu précédemment, les valépotriates sont des molécules connues scientifiquement mais peu répandue commercialement. Ce dernier point constitue un

verrou technologique limitant leur étude. C'est pourquoi, l'isolement de molécules appartenant à cette famille à l'échelle préparative a été étudié et le choix du développement d'une méthode d'isolement des valépotriates par CCC hydrostatique a été motivé par les interrogations suivantes : malgré un principe de séparation relativement simple basé sur le coefficient de partage, pourquoi la CPC reste-t-elle une technique confidentielle ? La CPC peut-elle sortir de son cadre de technique de fractionnement et devenir une technique de purification à elle seule ? Si un transfert d'échelle est réalisable, quelles en sont les limites ?

Afin de permettre l'isolement de valépotriates, le choix de la source végétale en contenant et l'optimisation de leur extraction est primordial pour garantir l'efficacité des rendements finaux. Aussi, étant donné que le développement de la méthode chromatographique en CPC implique de « construire » un système de solvants qui soit adapté aux molécules que l'on souhaite isoler ainsi que de déterminer les conditions opératoires permettant leur séparation, la séparation ne peut être directement réalisée à grande échelle. En effet, afin de diminuer les durées d'analyse et les quantités de solvants utilisés, la méthode chromatographique doit tout d'abord être optimisée à l'échelle analytique avant d'être transférée à l'échelle industrielle.

6.1 Préparation d'échantillon : source végétale et extraction des valépotriates

6.1.1 Choix de la source végétale

Avant de pouvoir isoler des valépotriates, les choix de la source végétale et de leur mode d'extraction sont essentiels. En effet, bien que de nombreuses espèces de *Valeriana* sont connues pour contenir des valépotriates, leur teneur en composés d'intérêt ainsi que leur disponibilité commerciale peuvent représenter des difficultés. Dans le cas de la *V. officinalis*, espèce la plus communément vendue en Europe, la teneur en valépotriates se situe aux alentours de 0,7% et les valépotriates qu'elle contient sont essentiellement le valtrate et l'isovaltrate, deux isomères de positions¹⁶⁷. Étant donné les difficultés posées par la faible teneur en valépotriates et l'isomérisation de ses composés majoritaires, l'isolement quantitatif de ces molécules n'a pas été envisagé à partir de *V. officinalis*.

Les recherches bibliographiques ont mis en avant que la *Centranthus ruber* L., dite Centranthe rouge, était réputée pour sa haute teneur en valépotriates^{182,183} (aux alentours de 3 %, le valtrate étant majoritaire). De plus, celle-ci est largement distribuée dans tout le bassin méditerranéen ce qui facilite sa récolte en milieu naturel étant donné le lieu d'étude. Ces critères ont permis de faire le choix de la *C. ruber* comme source végétale permettant l'isolement de valépotriates à l'échelle analytique et industrielle (Figure 42).



Figure 42 - Massif de *C. ruber* fleuries

6.1.2 Étude phytochimique de *C. ruber*

Une approche par déréplication a été entreprise afin d'identifier les valépotriates présents dans la *C. ruber*. Pour cela un extrait méthanolique a été préparé et étudié par UHPLC/UV-HRMS en phase inverse et ionisation positive. Le chromatogramme observé est représenté en Figure 43.

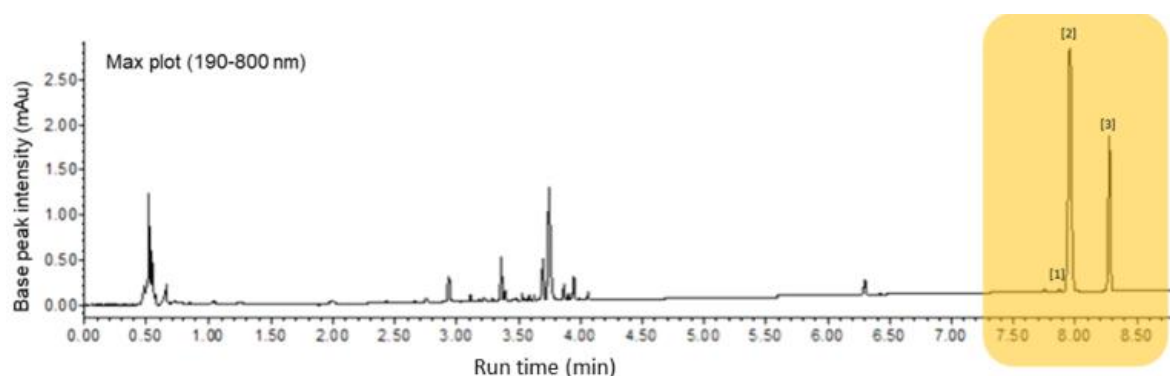


Figure 43 - Chromatogramme UV d'un extrait méthanolique de *C. ruber* - la zone orangée représente les potentiels valépotriates (colonne C18-gradient eau/ACN-Max plot)

Les masses exactes et compositions élémentaires suggérées par le logiciel sont indiquées dans le Tableau 30.

Tableau 30 – Valépotriates identifiés par déréplication : données obtenues par UV et HRMS mode positif

Composé	Temps de rétention (min)	Max absorption UV (nm)	Ion pseudo-moléculaire (m/z)	Formule donnée	Fragment (m/z)	Composé possible
[1]	7,88	254	445,1839	C ₂₂ H ₃₀ O ₈ Na	177,0557, 261,1134	Isovaltrate
[2]	7,93	254	445,1840	C ₂₂ H ₃₀ O ₈ Na	177,0557, 219,0663	Valtrate
[3]	8,29	254	459,1992	C ₂₃ H ₃₂ O ₈ Na	177,0557, 219,0663	1- ou 7-Homovaltrate

Les fragments et le maximum d'absorption sont caractéristiques de la famille des valépotriates (cf. 4.2 - Figure 39). D'après le tableau récapitulatif des valépotriates référencés dans la littérature (Tableau 29), les composés peuvent correspondre à l'isovaltrate [1], au valtrate [2] et soit au 1-homovaltrate [3], soit au 7-homovaltrate [3]. L'isolement par CPC concernera ces trois composés et pour un souci de clarté le composé [3] sera dénommé homovaltrate jusqu'à ce que sa structure puisse être confirmée par RMN.

6.1.3 Optimisation de l'extraction des valépotriates

Afin de produire le maximum de valépotriates purifiés, il est essentiel d'optimiser leur extraction en amont. Pour cela, plusieurs étapes de la préparation d'échantillon ont été étudiés. Le premier concerne le choix du solvant d'extraction : celui-ci doit pouvoir extraire sélectivement et quantitativement les valépotriates étudiés afin que la suite de l'étude portant sur le choix du système de solvants utilisé en CPC ne soit compliquée par la présence de composés indésirables. Le second paramètre porte sur le mode de broyage de la plante séchée car étant donné l'investissement financier que représente l'achat d'un broyeur permettant la pulvérisation voire la micronisation de plantes séchées, l'apport d'un tel équipement à l'amélioration de l'extraction de composés d'intérêt a été comparé à un mixeur à usage domestique. Le troisième choix se rapporte au mode d'extraction des valépotriates : les valépotriates étant des molécules thermolabiles¹⁶⁷, l'agitation magnétique a été comparée à l'extraction assistée par ultrasons. Et enfin, le dernier paramètre étudié est celui du nombre d'extractions nécessaires à l'épuisement de la matière première végétale.

6.1.3.1 Choix du solvant d'extraction

Le solvant d'extraction se doit de réunir les conditions suivantes : extraire sélectivement et quantitativement les valépotriates, ainsi d'avoir un bas point d'ébullition afin de ne pas dénaturer les valépotriates lors de son évaporation. Pour cela, des solvants de différentes polarités ayant tous en commun un point d'ébullition inférieur à 80 °C ont été testés (afin de pouvoir l'évaporer dès 35 °C sous une pression réduite de 200 mbar). Les essais se sont portés sur le méthanol (MeOH), l'éthanol (EtOH), le dichlorométhane (DCM), l'hexane, le cyclohexane, le pentane, l'acétone, l'acétonitrile (ACN) et l'isopropanol (IPA) et tous ont été testés en triplicat. En l'absence de standard, le taux de valépotriates extraits a pu être estimé en sommant les aires de l'isovaltrate, du valtrate et de l'homovaltrate obtenues *via* le détecteur UV lors de l'analyse par UHPLC/PDA/ELSD/MS (Figure 44).

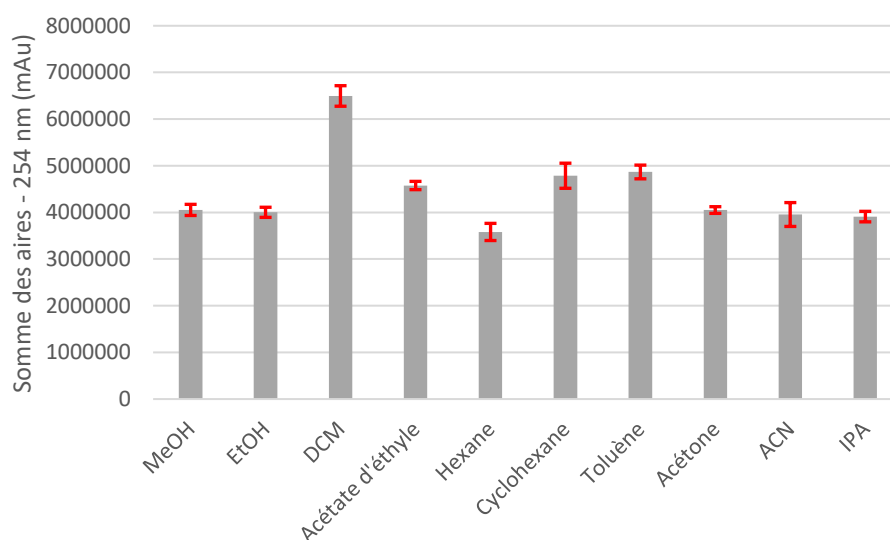


Figure 44 – Histogramme représentant la somme des valépotriates 1, 2 et 3 extraits par différents solvants

Tous les extraits une fois évaporés étant repris dans la même quantité de solvant d'analyse, leurs aires peuvent être assimilées au pouvoir d'extraction du solvant. Il apparaît sur l'histogramme présenté que le dichlorométhane extrait significativement les valépotriates. Afin d'estimer si ce dernier extrait aussi sélectivement les valépotriates, seule une estimation peut être réalisée étant donné l'absence de standard analytique. Pour cela l'étude de la présence ou non d'autres composés lors de l'analyse des chromatogrammes acquis par le PDA, l'ESLD et le SQD permet de fournir une première indication (Tableau 31).

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

Tableau 31 - Données brutes de la somme de aires des valépotriates et de la présence de composés indésirables

Solvants	Rendement (%)	RSD (%)	Composés indésirables
MeOH	18,9	1,7	+++
EtOH	11,9	2,3	+++
Dichlorométhane	3,0	1,1	n.o.
Acétate d'éthyle	3,9	1,9	+
Hexane	3,4	1,8	n.o.
Cyclohexane	4,3	1,6	n.o.
Toluène	2,6	2,4	n.o.
Acétone	4,0	2,4	+++
ACN	3,1	1,2	++
IPA	6,8	2,8	+++

n.o : non observé, +/+/+++ : estimation visuelle du niveau de présence croissant des contaminants

La non-observation de composés considérés comme indésirables conforte le choix du dichlorométhane comme solvant d'extraction. La suite de l'étude portant sur l'apport d'un broyeur à billes de laboratoire aux rendements d'extraction ainsi que celle portant sur le mode d'extraction a donc été réalisée avec le dichlorométhane comme solvant d'extraction.

6.1.3.2 Apport d'un broyeur à billes à usage professionnel

La matière première végétale étudiée étant une racine de plante entière, la question de sa division en vue de son extraction se pose. En effet, elle peut soit être découpée manuellement, soit être concassée à l'aide d'un hachoir à usage domestique soit encore être finement réduite en poudre en utilisant un broyeur à usage professionnel. Cependant, ce dernier équipement avoisine les 6000 €, ce qui représente un investissement 300 fois supérieur à celui d'un hachoir à usage domestique. C'est pourquoi, la question de sa contribution à l'amélioration de l'extraction se pose. Pour cela la *C. ruber* séchée a été divisée de trois manières distinctes :

- en section de 1 cm à l'aide d'un sécateur
- au hachoir à usage domestique (granulométrie de 1 mm à 5 mm)
- au broyeur à billes à usage professionnel (granulométrie de 0,1 mm à 5 µm)

Les essais ont été réalisés en triplicat et les résultats sont représentés dans la Figure 45.

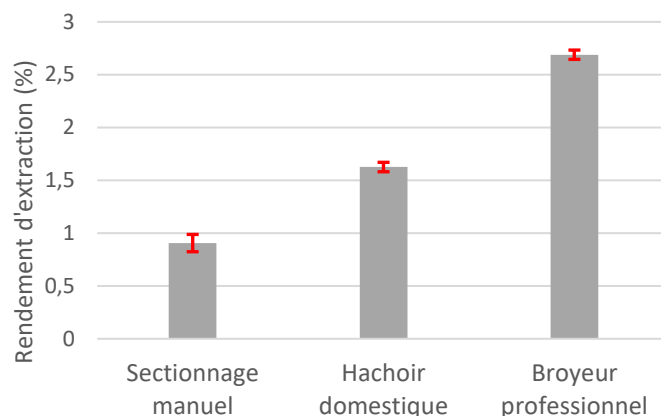


Figure 45- Rendements d'extraction en fonction du mode de fractionnement utilisé

La technique de broyage fournissant les meilleurs rendements d'extraction est celle du broyeur à billes de laboratoire. Il permet d'augmenter les rendements d'environ 200 % par rapport à la division manuelle et de 50 % par rapport au concassage obtenu avec un hachoir à couteaux à usage domestique. Cela tient essentiellement au fait que la surface spécifique de matières premières végétales est inversement proportionnelle à la taille des grains qu'elle contient (Équation 6).

$$S_{spé} = \frac{3}{\mu \times r}$$

Équation 6- Calcul de la surface spécifique avec la masse volumique (μ) et le rayon d'un grain (r)

Ce qui, dans le cas de l'extraction d'une matière première micronisée se traduit par des rendements d'extraction plus élevés qu'avec des matières premières concassées.

6.1.3.3 Choix de la méthode d'activation

En laboratoire, les deux approches les plus communes sont l'extraction par agitation et l'extraction assistée par ultrasons. L'agitation peut se faire soit par mouvement circulaire comme c'est le cas des agitateur orbitales soit grâce à un barreau aimanté dans le cas des agitateurs magnétiques. Ce mode d'extraction est réalisé en solubilisant les composés d'intérêt par mise en contact répétée avec le solvant d'extraction. Dans le cas des ultrasons, la solubilisation des composés d'intérêt est rendue possible par la rupture des barrières naturelles de la matrice *via* l'explosion de bulles de cavitations très énergétiques générant localement des conditions de hautes températures et de pression¹⁸⁴. Or les valépotriates étant des molécules thermosensibles, la question de leur mode d'extraction est donc cruciale. Pour y

répondre, les techniques d'agitation magnétique et d'activation par ultrasons ont été comparées en triplicat. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 46.

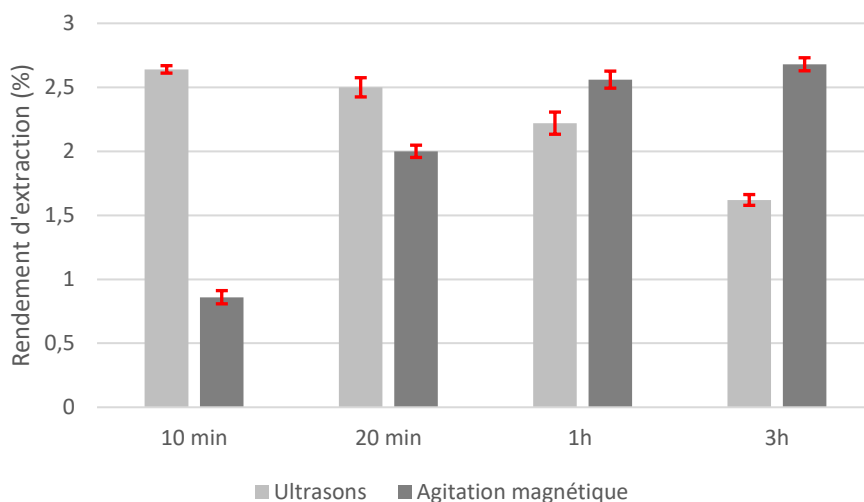


Figure 46- Quantité de valépotriates extraits en fonction de la technique d'extraction utilisée et du temps d'extraction.

L'histogramme met en comparaison les deux techniques d'extraction et indique nettement que le maximum de valépotriates extrait se fait dès les premières 10 minutes à l'aide des ultrasons tandis que près de 60 minutes sont nécessaires pour atteindre le même résultat avec un agitateur magnétique. Cependant, dans le cas des valépotriates, la technique d'extraction assistée par ultrasons montre aussi des limites lors d'une utilisation prolongée. En effet, malgré un changement d'eau du bain à ultrasons réalisé toutes les 30 minutes afin de diminuer la température de celui-ci, la quantité de valépotriates extraite diminue dans le temps. La formation de produits de dégradation tels que le baldrinal et l'homobaldrinal sont d'ailleurs observables à 420 nm pour l'échantillon à t+3h (Figure 47).

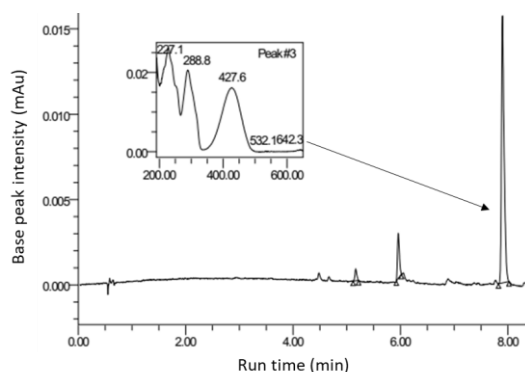


Figure 47 - Observation des produits de dégradation à 420 nm (colonne C18-gradient eau/ACN)

6.1.3.4 Étude de l'épuisement de la plante par extractions successives

Afin d'exploiter de façon efficiente la matière première végétale, le maximum de valépotriates doit pouvoir être extrait. Pour cela, se pose la question du nombre d'extractions nécessaires à l'épuisement complet de cette ressource. Les essais ont été menés en triplicat selon les conditions opératoires précédemment établies, à savoir : extraction aux ultrasons durant 10 minutes par du dichlorométhane sur des racines de *C. ruber* broyée au broyeur à billes. Les rendements obtenus sont décrits dans l'histogramme ci-dessous (Figure 48).

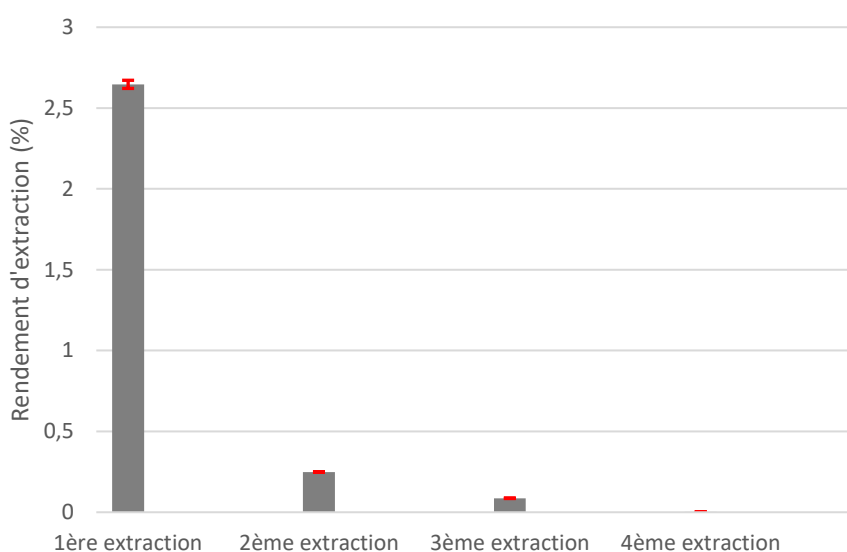


Figure 48 - Rendements d'extraction obtenu avec 4 extractions successives

La Figure 48 illustre clairement que la majorité des composés sont extraits dès la première extraction au dichlorométhane. Cependant, dans le but d'exploiter la totalité du potentiel qu'offre la *C. ruber*, 3 extractions successives permettent d'extraire quantitativement les valépotriates qu'elle contient jusqu'à obtenir un rendement total d'extraction de 3,1% avec un coefficient de variation de 1,1%. Bien que peu visible sur la Figure 48, la quatrième extraction ne fournit plus que 0,0015% de rendement avec un coefficient de variation de près de 35%. C'est pourquoi, celle-ci est écartée et que seul 3 extractions successives sont jugées nécessaires pour l'extraction quantitative des valépotriates

6.1.3.5 Conclusion sur l'optimisation de l'extraction des valépotriates

Les différents essais menés afin d'optimiser l'extraction des valépotriates ont pu mettre en évidence que chaque étape de la préparation d'échantillon (de la granulométrie de la matière première jusqu'à la technique d'extraction en passant par le type de solvant utilisé) conditionne la qualité des résultats obtenus. Ainsi, la sélection du dichlorométhane comme solvant d'extraction permet de favoriser la solubilisation des valépotriates plutôt que d'autres composés indésirables, et ce avec un rendement de 3,1% après trois extractions successives. Ce résultat rejoint les teneurs décrites dans la littérature pour *C. ruber*. Aussi, la technique d'extraction assistée par ultrasons a fourni les meilleurs rendements et ce, au bout de 10 minutes seulement alors qu'une agitation par barreau aimanté avait besoin de 60 minutes pour le même résultat. Cette dernière étude a par ailleurs mis en évidence qu'une exposition prolongée à une température supérieure à 40°C dégradait les valépotriates ce qui limite l'utilisation de la technique de l'extraction assistée par ultrasons pour ces composés thermolabiles.

6.2 Développement d'une méthode de séparation des valépotriates de *C. ruber* à l'échelle analytique et préparative.

Avant de développer une méthode chromatographique par CPC, le but de cette dernière doit être clairement défini. En effet, les conditions opératoires peuvent différer si les contraintes de durée d'analyses sont plus importantes que la résolution entre les composés étudiés ou encore si la méthode développée l'est à des fins de fractionnement plutôt qu'à l'obtention de molécules pures. Ici, le propos de l'étude menée est l'isolement, en une seule étape, de valépotriates issus de racines de *C. ruber* à un niveau de pureté permettant leur commercialisation en tant que standard analytique. Dans un premier temps, la méthode chromatographique a été développée à l'échelle du laboratoire pour être, dans un second temps, transférée à l'échelle industrielle. Pour cela, un concept développé par l'équipe de Faure K. et nommé « Espace libre entre les pics » a été employé¹⁷⁸. Bien que basé sur un concept d'ores et déjà décrit dans la littérature, les travaux menés ici ont l'originalité de porter sur l'isolement de plusieurs molécules d'intérêts ayant en plus la particularité d'avoir des structures très proches l'une de l'autre. Ce dernier point représente, en termes de résolution, un challenge pour une technique préparative ayant pour seules modularités

le débit de la phase mobile, la vitesse de rotation de la phase stationnaire et la composition du système de solvants biphasiques.

6.2.1 Description du concept de l'« Espace libre entre les pics »

Les transferts d'échelles linéaires en CPC sous-estiment souvent les capacités de chargement des CPC ayant de larges volumes. La méthode dite de l'« espace libre entre les pics » décrite par Bouju *et al.* propose de calculer un facteur de transfert d'échelle (F_{su}) qui, une fois appliqué sur la quantité maximale pouvant être séparée par un petit rotor ($Q_{\max.inj1}$), permet d'obtenir la quantité maximale pouvant être séparée par un gros rotor ($Q_{\max.inj2}$). Cette méthode possède la particularité d'être indépendante de l'instrumentation utilisée. Ainsi, les conditions chromatographiques employées à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industrielle ne représentent pas une contrainte lors de ce transfert d'échelle où finalement, seule la quantité maximale pouvant être séparée par un grand rotor est estimée.

Le F_{su} est calculé en réalisant le rapport des volumes libres disponibles entre les pics étudiés lors d'injections de faible quantité de produit sur l'équipement de laboratoire (ΔV_1) et l'équipement industriel (ΔV_2).

$$F_{su} = \frac{\Delta V_2}{\Delta V_1}$$

Équation 7 - Calcul du facteur de transfert F_{su}

Pour cela, deux injections sont tout d'abord réalisées sur le petit rotor : une injection de faible quantité dite « injection analytique » qui permet de calculer ΔV_1 (Équation 8, Équation 9, Figure 49) et une injection chargée dite « injection préparative » qui doit constituer la quantité maximale pouvant être séparée par le petit rotor ($Q_{\max.inj1}$).

$$\Delta V_1 = \Delta V_{r1} - 2\sigma_{A1} - 2\sigma_{B1}$$

Équation 8 - Calcul du volume libre sur le petit rotor (ΔV_1)

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

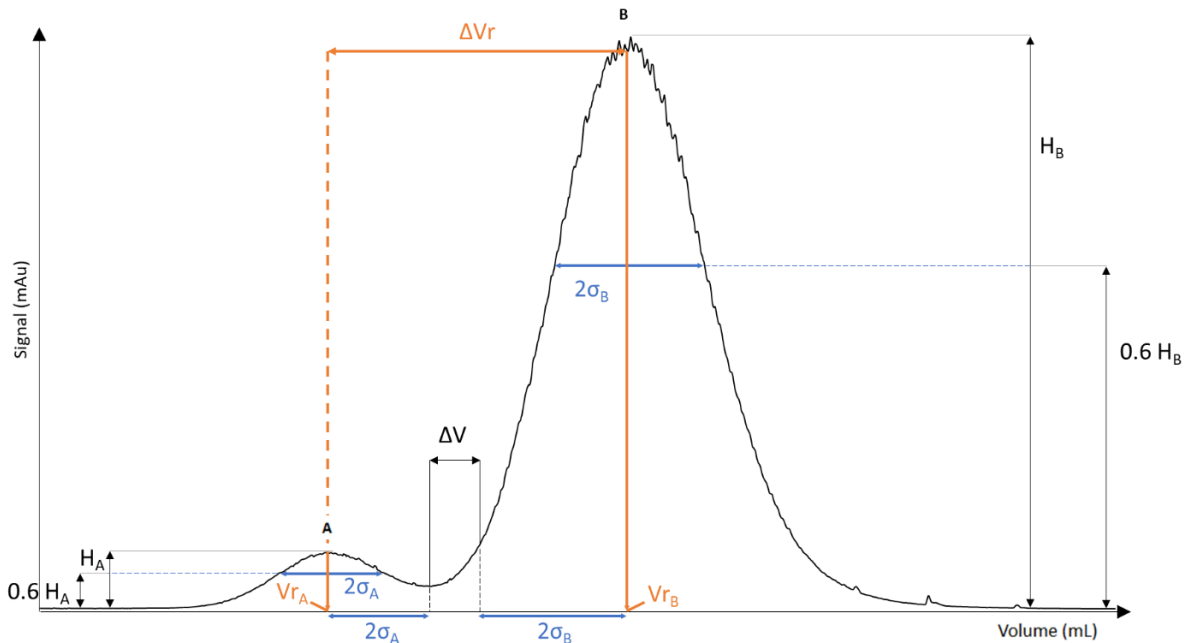


Figure 49 - Données nécessaires au calcul de ΔV_1 ou ΔV_2

Puis une injection analytique est réalisée sur le rotor industriel afin de calculer ΔV_2 .

$$\Delta V_2 = \Delta V_{r2} - 2\sigma_{A2} - 2\sigma_{B2}$$

Équation 9 - Calcul du volume libre sur le petit rotor (ΔV_2)

Une fois les valeurs ΔV_1 et ΔV_2 déterminées, le F_{su} peut être calculé (Équation 7) et appliqué à $Q_{max.inj1}$ afin de déterminer la quantité maximale pouvant être séparée par le rotor à large volume ($Q_{max.inj2}$) (Équation 10).

$$Q_{max.inj2} = F_{su} \times Q_{max.inj1}$$

Équation 10 - Calcul de la quantité maximale injectée sur le grand rotor ($Q_{max.inj1}$)

Le résultat de la séparation de $Q_{max.inj2}$ sur le grand rotor doit pouvoir fournir la même résolution que celle observée lors de l'injection de $Q_{max.inj1}$ sur le petit rotor.

Cependant cette méthode présente une contrainte liée à l'efficacité du système chromatographique utilisé : la résolution entre les pics étudiés doit toujours être strictement supérieure à 1 lors des injections analytiques.

En effet, comme démontré dans les Équation 11 et Équation 12, si la résolution est inférieure ou égale à 1, alors le volume libre est inférieur ou égal à 0 et dans ce cas le F_{su} ne pourra être calculé.

$$R_S = \frac{\Delta V_r}{2(\sigma_A + \sigma_B)}$$

Équation 11 - Calcul de la résolution entre les deux pics

$$\Delta V = \Delta V_r - 2\sigma_A - 2\sigma_B = 2(\sigma_A + \sigma_B)(R_S - 1)$$

Équation 12 – Impact de la résolution d'après les Équation 8 Équation 9 et Équation 11

Cet impératif lié à la résolution est d'autant plus problématique que, dans le cas des valépotriates de *C. ruber*, le valtrate et l'homovaltrate présentent des structures très proches l'une de l'autre. C'est pourquoi, la recherche d'un système biphasique de solvants et la mise au point des conditions de débit de phase mobile et de vitesse de rotation de la phase stationnaire seront les étapes clés conditionnant la faisabilité d'un transfert d'échelle utilisant le concept de l'« espace libre entre les pics ».

6.2.2 Résultats et discussions

6.2.2.1 Recherche d'un système biphasique de solvants

Comme décrit en 5.1, les critères de sélection d'un système biphasique de solvants adéquat sont un coefficient de partage proche de 1 associé à une sélectivité avoisinant 1,5 pour les molécules cibles. Le Tableau 32 résume les résultats obtenus pour quelques-uns des systèmes testés. Le K_d a été calculé d'après l'Équation 3 (en considérant la fraction méthanolique comme la phase stationnaire, et la fraction hexanique comme la phase mobile). Le coefficient de partage et la sélectivité ont été étudiés en ciblant les trois molécules suivantes : l'isovaltrate, le valtrate et l'homovaltrate (bien que l'isolement de l'isovaltrate ne soit pas le but de ces travaux, le fait qu'il soit isomère de position du valtrate le lie de façon intrinsèque à ce dernier et sa coélution peut s'avérer bloquant pour obtenir un haut niveau de pureté du valtrate). Un compromis doit donc être trouvé pour satisfaire à des K_d proche de 1 et à des sélectivités élevées pour ces trois molécules.

Les systèmes n° 3-6, n° 8,9,11,12 et 15, dont les K_d sont surlignés en jaune, offrent des valeurs de coefficient de partage intéressants car proche de 1. Les autres systèmes n'ont pas été retenus car les hautes valeurs de K_d présagent de longues

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

Tableau 32- Coefficients de partage (K_d) et sélectivités (α) obtenues lors de l'étude des systèmes de solvants biphasiques pour l'isovaltrate [1], le valtrate [2] et l'homovaltrate [3]

Système n°	Systèmes biphasiques de solvants testés (mL)					K_d			α		
	<i>n</i> -Hexane	ACN	MeOH	H ₂ O	DCM	[1]	[2]	[3]	[1]/[2]	[1]/[3]	[2]/[3]
1	5	5				18,87	17,95	18,73	1,05	1,01	0,96
2	5		5	0,2		5,08	3,24	3,89	1,57	1,31	0,83
3	5		5	0,5		3,20	2,50	2,53	1,28	1,26	0,99
4	5		5	0,8		2,30	1,85	1,45	1,24	1,59	1,28
5	5		5	1		1,33	1,28	1,05	1,04	1,27	1,22
6	5		5	1.5		0,39	0,37	0,33	1,05	1,18	1,12
7	7		5			5,34	4,97	4,12	1,07	1,30	1,21
8	6		5	1		1,71	1,56	1,24	1,10	1,38	1,26
9	7		5	1		1,67	1,54	1,27	1,08	1,31	1,21
10	5		6			5,36	4,99	4,28	1,07	1,25	1,17
11	5		6	1		2,16	1,99	1,52	1,09	1,42	1,31
12	5		7	1		2,56	2,36	1,84	1,08	1,39	1,28
13	5		5	0,2		4,97	4,78	3,75	1,04	1,33	1,27
14	6		5	0,2		5,13	5,18	4,13	0,99	1,24	1,25
15	5		5	0,5	0,5	2,65	2,73	2,09	0,97	1,27	1,31
16	5		5	0,2	0,2	5,00	4,60	3,42	1,09	1,46	1,35

durées d'analyses. Le système n°6 est écarté car pour que ses valeurs soient pertinentes, il faut étudier leur inverse ce qui revient, en pratique, à intervertir la phase stationnaire et la phase mobile. Or, les valépotriates étant thermolabiles, l'évaporation de fractions contenant du méthanol et de l'eau nécessite l'application d'une température élevée ce qui est contre-productif. Le système n°3 n'est pas non plus retenu car sa sélectivité pour le valtrate et l'homovaltrate est trop basse, tandis que les systèmes n° 8,9,11,12 et 15 ne seront pas étudiés car leur sélectivité pour le valtrate et l'isovaltrate est trop faible aussi. C'est donc le système n°4, composé de *n*-Hexane/MeOH/H₂O (5:5:0,8), qui est retenu pour l'isolement du valtrate et de l'homovaltrate.

6.2.2.2 Développement de la méthode chromatographique à l'échelle du laboratoire

Le système de solvants biphasique ayant été sélectionné, les deux principaux paramètres à mettre au point dans le cadre du développement d'une méthode de séparation par chromatographie de partage centrifuge sont la vitesse de rotation et le débit de la phase mobile. Ces deux paramètres ont été établis en étudiant une variable à la fois et en maintenant la même quantité d'extrait à séparer (50 mg).

Le but principal de cette mise au point est l'obtention d'une résolution supérieure ou égale à 1 entre le valtrate et l'homovaltrate et ce, afin de pouvoir réaliser un transfert d'échelle d'après le concept de l'« espace libre entre les pics ».

Afin d'étudier les limites de ce concept, il est souhaitable que le transfert d'échelle implique un rapport de volume entre le petit rotor et le grand rotor qui soit le plus important possible. C'est pourquoi, la méthode chromatographique a été développée dans un premier temps sur un rotor de laboratoire de 50 mL (SCPC-50) avant de passer sur un rotor de grande capacité de 1000 mL (SCPC-1000).

6.2.2.2.1 Optimisation de la vitesse de rotation sur une SCPC-50

La vitesse de rotation a été étudiée de 1000 rpm à 2500 rpm à un débit constant de 5 mL. Des vitesses de rotation supérieures n'ont pu être étudiées car elles induisent des pressions proches de la limite d'utilisation de l'équipement fixée à 50 bars. La principale difficulté rencontrée a été le retraitement des chromatogrammes générés par le détecteur UV associé à la SCPC-50. En effet, en fonction de la formule utilisée

(Équation 13), la résolution peut soit être déterminée en utilisant la largeur à mi-hauteur, soit la largeur à 60 % de la hauteur du pic.

$$R_S = \frac{\Delta V_r}{2(\sigma_A + \sigma_B)} = 1,18 \times \left(\frac{t_B - t_A}{\omega_A + \omega_B} \right)$$

Équation 13 – Deux formules permettant de calculer la résolution où A et B sont les deux molécules étudiées, t représente le temps de rétention et ω la largeur à mi-hauteur du pic (voir Équation 11)

Or les chromatogrammes générés en sortie de SCPC-50 ne permettent pas de déterminer ces largeurs de pics car ils coéluent (Figure 50).

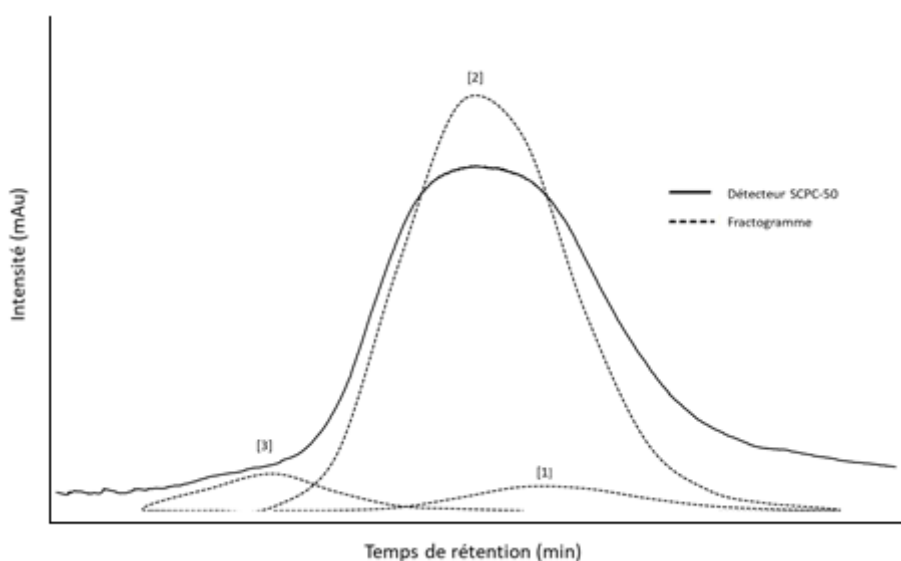


Figure 50 – Apport du fractogramme par rapport au chromatogramme obtenu par UV pour le suivi de l'élution des trois composés étudiés (2500 rpm – 5 mL/min)

C'est pourquoi, chaque fraction récoltée a été évaporée et reprise dans un même volume de méthanol afin de faire l'objet d'une analyse par UHPLC-UV en phase inverse. Les aires relevées pour chaque fraction ont permis de tracer un fractogramme pour chacun des trois composés étudiés.

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

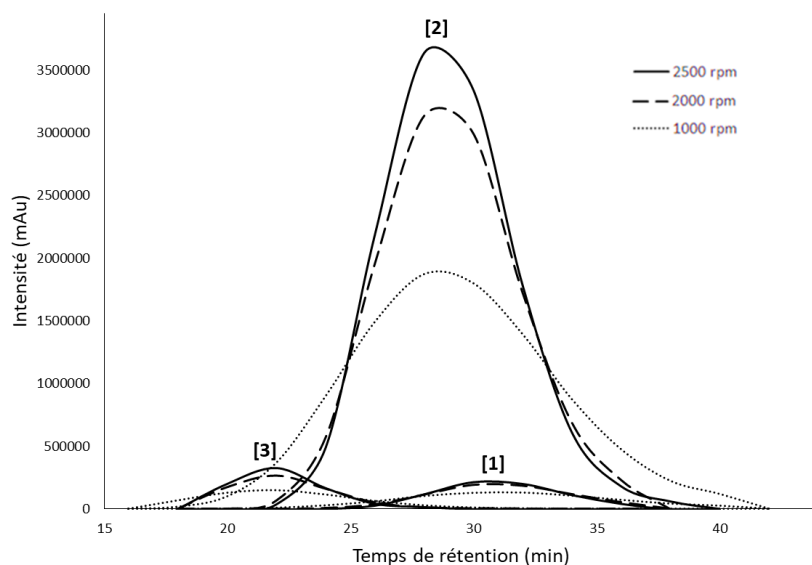


Figure 51 – Fractogrammes obtenus pour des vitesses de rotation de 1000 rpm, 2000 rpm et 2500 rpm à 5 mL/min - [1] : isovaltrate ; [2] : valtrate ; [3] : homovaltrate

Comme représenté sur la Figure 51, la variation de la vitesse de rotation n'a pas permis d'initier la séparation de 1 et 2. De plus, même si une augmentation de 1000 rpm à 2500 rpm permet d'augmenter la résolution entre les pics 2 et 3, celle-ci n'a pu atteindre la limite fixée à 1 (Tableau 33).

Tableau 33 – Résolution entre le valtrate [2] et l'homovaltrate [3] à 5 mL/min et différentes vitesses de rotation

Vitesse de rotation de la phase mobile	$R_{s[2]/[3]}$	Pression	Sf
1000 rpm	0,44	22 bars	41%
2000 rpm	0,66	30 bars	53%
2500 rpm	0,69	34 bars	74%

C'est donc en travaillant proche des limites de pression de l'équipement (50 bars), que la meilleure résolution est obtenue. Même si cette dernière n'est pas suffisante au regard des prérequis imposés pour le transfert d'échelle, c'est la vitesse de rotation de 2500 rpm qui est retenue.

6.2.2.2.2 Optimisation du débit de la phase mobile sur une SCPC-50

Afin d'améliorer la résolution entre le valtrate et l'homovaltrate, des conditions de débit allant de 3 mL/min à 20 mL/min ont été testées à 2500 rpm. Ensuite, les fractogrammes réalisés ont permis de calculer les résolutions entre les deux composés étudiés Tableau 34.

Tableau 34 – Résolution entre le valtrate [2] et l'homovaltrate [3] à différentes vitesses de rotation

Débit phase mobile	$R_{s[2]/[3]}$	Pression	Sf
3 mL/min	0,71	28 bars	76%
5 mL/min	0,70	34 bars	74%
8 mL/min	0,69	44 bars	70%
12 mL/min	0,60	47 bars	64%
20 mL /min	0,52	48 bars	58%

La résolution entre le valtrate et l'homovaltrate n'a pu être nettement améliorée, passant de 0,69 à 0,71, en diminuant le débit de la phase mobile de 8 mL/min à 3 mL/min. Tandis que pour des débits supérieurs à 8 mL/min, la résolution entre ces deux composés décroît rapidement passant de 0,69 à 0,60 à 12 mL/min et 0,52 à 20 mL/min. Ceci peut être dû à la perte de phase stationnaire croissante dès que le débit de phase mobile augmente (Figure 52) tout comme cela a été décrit en 5.1.4.

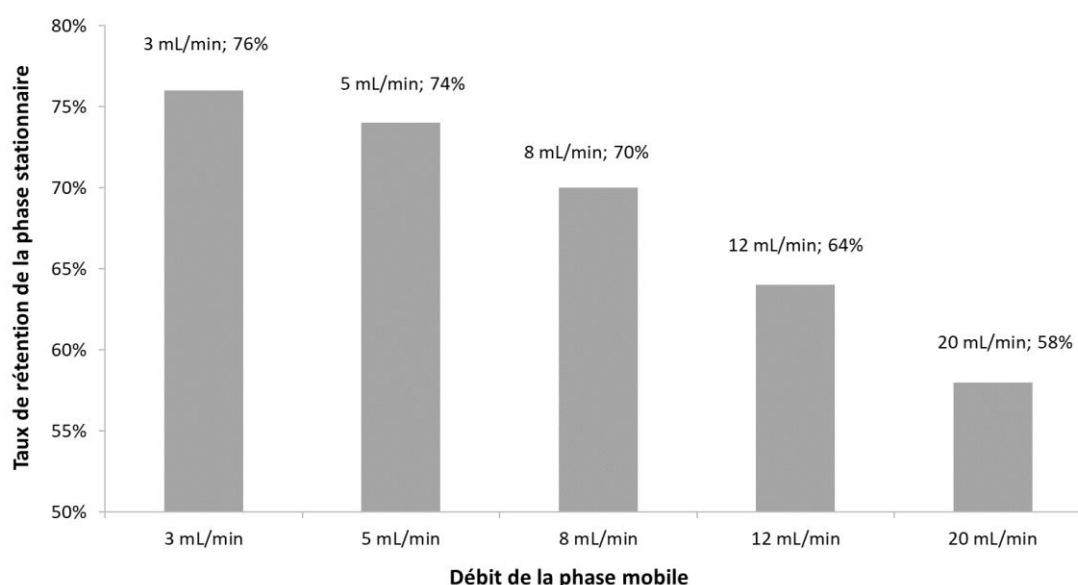


Figure 52 – Evolution du taux de rétention de phase stationnaire en fonction du débit de la phase mobile

Le débit de phase mobile optimale pour la séparation du valtrate et de l'homovaltrate est donc celui de 8 mL/min. En effet, il permet de conserver une résolution importante entre les deux pics tout en offrant une durée de séparation réduite à 20 minutes (tandis qu'un débit de 3 mL/min sépare les composés en 70 minutes sans amélioration significative de leur résolution). Des débits supérieurs à 8 mL/min n'ont pas été retenus car ils génèrent d'importantes pertes de phase stationnaire ce qui résulte en la perte

de résolution entre les composés. Les meilleures performances chromatographiques ne peuvent donc uniquement être déterminées en considérant qu'elles sont obtenues en travaillant proche des limites de pression de l'équipement : il faut aussi que le taux de rétention de phase stationnaire soit supérieur ou égal à 70 %.

Cependant, malgré une optimisation de la vitesse de rotation de la phase stationnaire et du débit de la phase mobile, la SCPC-50 utilisée ne permet pas de séparer le valtrate et l'homovaltrate de telle sorte à obtenir une résolution supérieure à 1. Cela peut être expliqué par un nombre insuffisant de cellules dans le rotor (celles-ci sont souvent assimilées au nombre de plateaux théoriques). Donc plus il y a de cellules dans un rotor, plus l'efficacité de ce dernier augmente.

6.2.2.2.3 Optimisation de la taille du rotor : séparation sur une SCPC-100

Afin d'obtenir une résolution supérieure à 1 entre le valtrate et l'homovaltrate, la méthode chromatographique optimisée sur la SCPC-50 a été testée sur une SCPC-100. La séparation de ces deux composés a été étudiée à un débit de 8 mL/min et à une vitesse de rotation de 2500 rpm. Les chromatogrammes obtenus ont permis de s'affranchir de la réalisation de fractogrammes car la coélution des pics et le bruit de fond généré par le détecteur ELSD étaient amoindries. La résolution a donc pu être calculée directement à partir des chromatogrammes obtenus et celle-ci a atteint la valeur de 1,1 là où la SCPC-50 ne permettait d'obtenir qu'une résolution de 0,69 entre les deux composés (Figure 53).

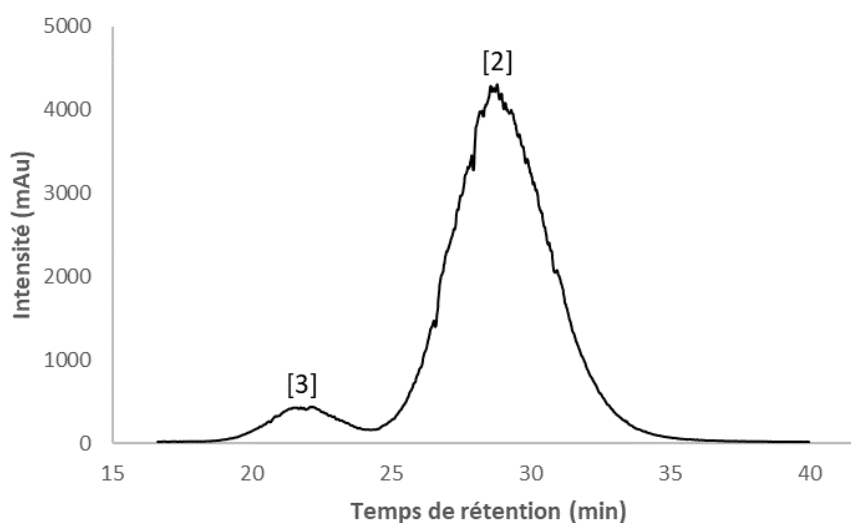


Figure 53 – Chromatogramme ELSD obtenu à 8 mL/min et 2500 rpm sur la SCPC-100 – [2] : valtrate ; [3] : homovaltrate

Dès lors le concept de l' « espace libre entre les pics » peut être appliqué.

6.2.2.3 Transfert d'échelle d'une SCPC-100 à une SCPC-1000

Comme décrit en 6.2.1, la première étape du transfert d'échelle utilisant le concept de l' « espace libre entre les pics » consiste à déterminer la quantité maximale pouvant être séparée sur le petit rotor ($Q_{\max.inj1}$). Pour cela, 50 mg, 100 mg et 200 mg d'extrait ont été injectés à 8 mL/min et 2500 rpm dans la SCPC-100. Les chromatogrammes ELSD obtenus sont présentés dans la Figure 54

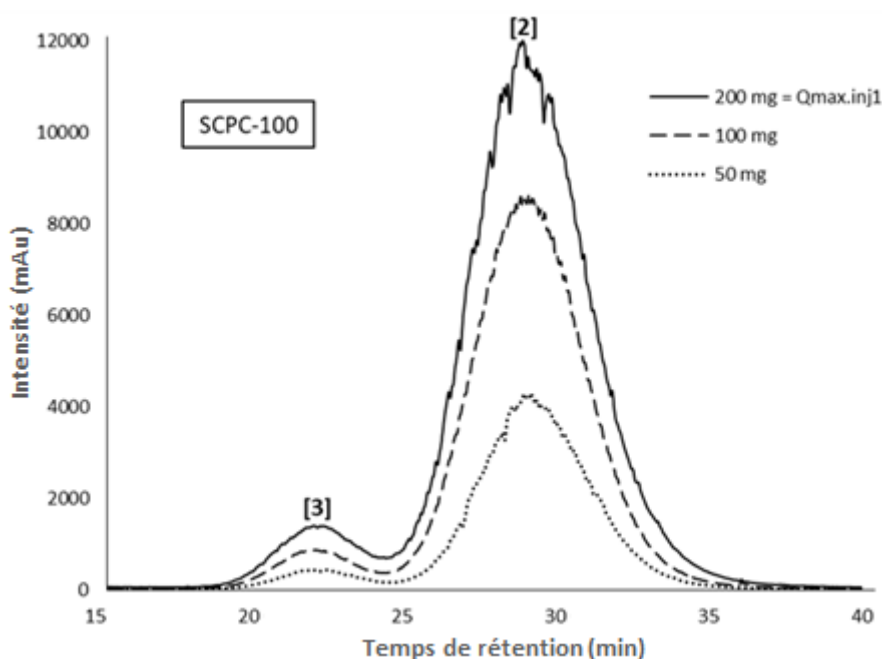


Figure 54 – Chromatogrammes ELSD obtenu à 8 mL/min et 2500 rpm sur la SCPC-100 pour différentes quantités d'extrait injectées - [2] : valtrate ; [3] : homovaltrate

Pour l'injection de 200 mg, les conditions de pression ont évolué de 67 bars à 75 bars (la limite d'utilisation de la SCPC-100 est fixée à 80 bars) et le taux de rétention de phase stationnaire est passé de 71 % à 68 %. Des quantités injectées supérieures auraient dégradées la qualité de la séparation chromatographique par l'augmentation de la perte de phase stationnaire. C'est pourquoi l'injection de 50 mg est considérée comme l'injection analytique, permettant de calculer l'espace libre entre les pics (ΔV_1) et l'injection de 200 mg comme l'injection préparative symbolisée par $Q_{\max.inj1}$.

Puis une petite quantité d'extrait (500 mg) a été injectée sur la SCPC-1000 afin de déterminer l'espace libre entre les pics (ΔV_2) Lors de cette étape, les conditions chromatographiques n'ont pas été optimisées car les volumes de solvants utilisés

Partie 2 : La chromatographie de partage centrifuge : une réponse à l'isolement de composés naturels à l'échelle analytique et préparative ?

auraient été trop importants. C'est pourquoi, des conditions opératoires standardisées fournies par le constructeur ont été employées : 30 mL/min à 1200 rpm. Grâce à l'augmentation de la taille du rotor, la résolution entre le valtrate et l'homovaltrate a pu atteindre la valeur de 1,4 (là où la résolution avec une SPC50 atteignait de 0,69 et de 1,1 avec une SCPC-100). Dès lors le facteur de transfert F_{su} a pu être calculé (Tableau 35).

Tableau 35 - Calcul du F_{su} en utilisant les paramètres du concept de l'« espace libre entre les pics »

	Analytical scale (SCPC-100)	Preparative scale (SCPC-1000)
Tr [3]	22,18 min	47,62 min
Tr [2]	28,8 min	60,68 min
2σ [3]	2,55 min = 20,4 mL	4,73 min = 141,9 mL
2σ [2]	3,31 min = 26,48 mL	5,03 min = 150,9 mL
V_r [3]	177,44 mL	1428,6 mL
V_r [2]	230,40 mL	1820,4 mL
ΔV_r	52,96 mL	391,8 mL
ΔV_1 et ΔV_2	$\Delta V_1 = 52,96 - 20,4 - 26,48 = 6,08$ mL	$\Delta V_2 = 391,8 - 141,9 - 150,9 = 99$ mL
$F_{su} = \Delta V_2 / \Delta V_1$		16,3

Le concept de l'espace libre entre les pics prédit que, dans le cadre de cette étude, il est possible de séparer 16,3 fois plus d'extrait sur la SCPC-1000 par rapport à la quantité maximale pouvant être injectée sur la SCPC-100. Cela vient soutenir le fait qu'un transfert d'échelle linéaire en CPC sous-estimerait les capacités des grands rotors. Ainsi, 3,26 g d'extrait ($Q_{max.inj2}$) ont été injectés dans la SCPC-1000 (Figure 55).

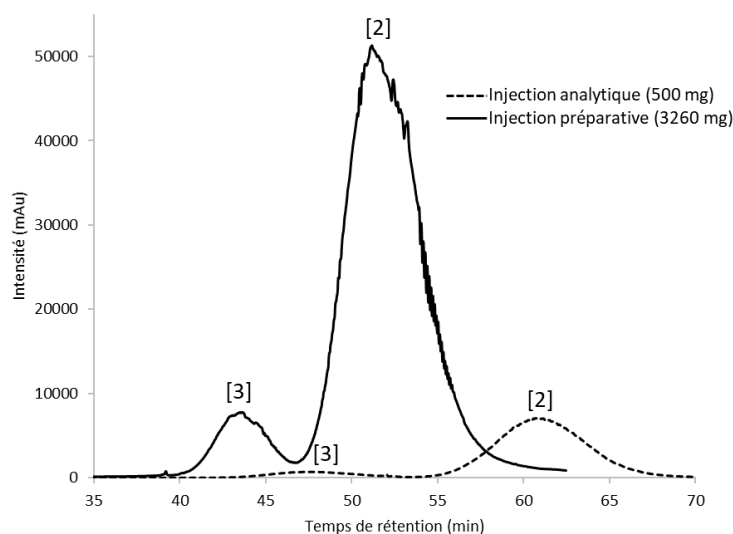


Figure 55 - Superposition des chromatogrammes ELSD obtenus lors des injections analytique et préparative sur le SCPC-1000 - [2] : valtrate ; [3] : homovaltrate

Même si la taille du rotor a augmenté, un gain en résolution pour l'injection préparative n'est pas attendu : le transfert d'échelle vise ici à obtenir la même qualité de séparation que lors de l'injection préparative au laboratoire ($Q_{max.inj1}$). C'est pourquoi le retour à la ligne de base du pic [3] n'est pas observé lors de l'injection préparative. Le décalage des temps de rétention observé lors des deux injections est dû à l'importante perte de phase stationnaire provoquée par l'effet de charge de l'injection préparative. En effet, le taux de rétention de phase stationnaire est passé de 70 % à 50 % entre l'injection analytique et l'injection préparative. Ce dernier point semble confirmer que les capacités maximales qu'offre la SCPC-1000 ont été atteintes et que l'injection d'une quantité supérieure à celle calculée via le F_{su} aurait impliqué d'importantes pertes de phase stationnaire ce qui auraient eu pour effet d'impacter significativement la qualité de la séparation des deux composés.

Tableau 36 - Analyse quantitative des composés isolés avec la SCPC-100 et la SCPC-1000

	Valtrate [2]		Homovaltrate [3]		F_{su}
	Quantité isolée – pureté > 95%	Quantité isolée – pureté maximale	Quantité isolée – pureté > 95%	Quantité isolée – pureté maximale	
SCPC-100; 50 mg	26,3 mg	6,4 mg – 98%	2,9 mg	0,7 mg – 97%	↪
SCPC-100; 200 mg	108 mg	23 mg – 98%	12,4 mg	2,6 mg – 97%	
SCPC-1000; 500 mg	283 mg	174,1 mg – 99 %	30,5 mg	28 mg – 98%	
SCPC-1000; 3260 mg	1726 mg	371 mg – 98%	196 mg	42 mg – 97%	

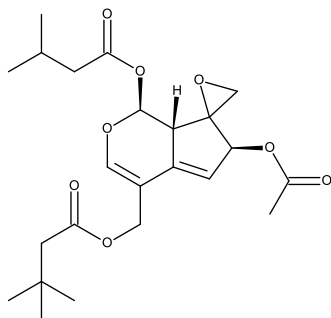
Afin d'illustrer les performances qu'offre la CPC, le Tableau 36 décrit les quantités de produits isolés ainsi que leur pureté, déterminée par RMN, à l'échelle analytique et préparative. Afin de considérer la molécule comme purifiée, le minimum de pureté a été fixée à 95 % (ce qui correspond au seuil de référence pour l'étude de l'activité biologique d'un composé). Pour information, les quantités récoltées des fractions les plus pures sont aussi indiquées. Le transfert d'échelle utilisant le concept de l'espace libre entre les pics a permis d'isoler, à l'échelle préparative, des quantités respectant le facteur de transfert calculé (F_{su} indiqué dans le Tableau 36). C'est ainsi que pour une injection de 3260 mg d'extrait, 1726 mg de valtrate [2] et 196 mg d'homovaltrate [3] ont pu être isolés, ce qui représente un taux de recouvrement de 90 % pour ces deux composés.

6.2.2.4 Elucidation structurale des composés isolés par RMN

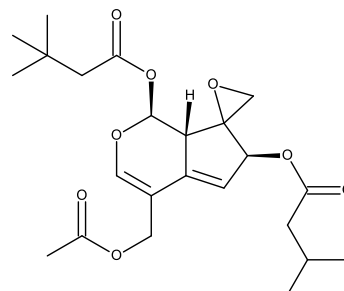
Les structures du valtrate et de l'homovaltrate ont été déterminées en réalisant une étude par RMN ainsi qu'en comparant les spectres obtenus avec ceux observés dans

la littérature. Bien que la structure du valtrate ait largement été décrite dans plusieurs publications, celle de l'homovaltrate fait l'objet de discussions car plusieurs structures sont proposées (Figure 56 et Tableau 28).

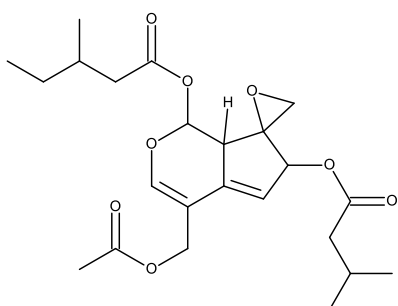
a



b



c



d

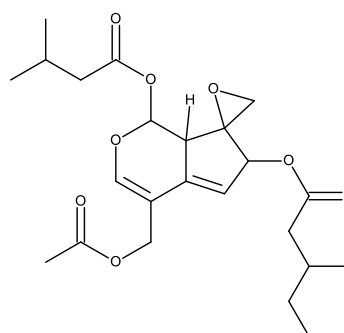


Figure 56 - **a**^{166,167} et **c**¹⁸⁵ : structures suggérées pour le 1-homovaltrate – **b**^{166,167} et **d**¹⁸² : structures suggérées pour le 7-homovaltrate

Comme démontré par les analyses RMN réalisées, la molécule isolée est le 7-homovaltrate (structure **d** de la Figure 56 et la Figure 57).

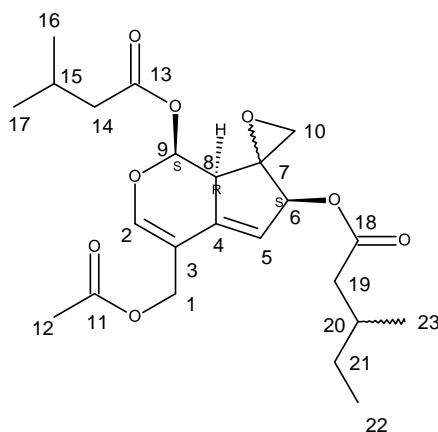


Figure 57 - Structure et conformation partielle du 7-homovaltrate

Sa structure a été confirmée par l'absence du doublet à δ 0,92 ppm sur le spectre RMN- ^1H ce qui indique que le groupement isovaleryl (C-13 à C-17) est positionné sur le C-9 et non sur le C-6. Aussi, les expériences RMN COSY ^1H - ^1H et HMBC ^1H - ^{13}C ont confirmé le positionnement du groupement β -methylvaleryl (C-18 à C-23) sur le C-6. La conformation spatiale partielle est quant à elle suggérée par le spectre RMN NOESY ^1H - ^1H .

7 Conclusion

Après avoir choisi la source végétale fournissant les valépotriates, optimisé leur extraction en étudiant le solvant, le mode et la durée d'extraction et enfin, mesuré l'impact de la granulométrie de la matière première végétale, une méthode utilisant la chromatographie de partage centrifuge a été développée afin de purifier les deux principaux valépotriates contenus. Pour cela, un nouveau système de solvants biphasiques a été mis au point et le développement de méthode chromatographique à l'échelle du laboratoire a été réalisé en tenant compte des contraintes liés au transfert d'échelle utilisant le concept de l'espace libre entre les pics. En ce sens, la méthode chromatographique a été développée en premier lieu sur un rotor de 50 mL où des difficultés liées à la sensibilité du détecteur et à la résolution entre les deux composés ont donné lieu à la réalisation de fractogrammes afin d'étudier au mieux leur séparation. Malgré une optimisation des paramètres de vitesse de rotation et de débit, le rotor de 50 mL n'a pu offrir une résolution entre les deux composés qui soit supérieure à 1 ($R_s = 0,69$) ce qui a empêché *de facto* le transfert d'échelle utilisant le concept de l'espace libre entre les pics. C'est pourquoi, le développement d'une méthode à l'échelle du laboratoire s'est poursuivi sur un rotor de 100 mL. Ce dernier a permis, en utilisant les conditions chromatographiques optimisées sur le rotor de 50 mL, la séparation des deux valépotriates avec une résolution supérieure à 1 ($R_s = 1,1$). Dès lors le transfert d'échelle sur un rotor de 1000 mL a pu être mené. C'est ainsi que 3260 mg d'extrait ont pu être séparé en environ une heure, soit 16,3 fois plus que la quantité maximale pouvant être séparée par un rotor de 100 mL qui est 10 fois plus petit. Ce rapport non proportionnel atteste que le transfert d'échelle en CPC est non linéaire. Cette étude a aussi permis l'élucidation structurale du 7-homovaltrate dont la structure pouvait faire l'objet de contradictions grâce la mise en œuvre d'analyses RMN à une et deux dimensions.

La CPC a permis l'isolement, en une seule étape, d'une importante quantité de deux valépotriates. Cette technique s'est révélée être adaptée à la purification à grande échelle d'extrait végétal. En effet, si une séparation par HPLC préparative avait été envisagée, l'importante turbidité de l'extrait étudié aurait nécessité une étape de fractionnement préalable afin de minimiser les adsorptions irréversibles avec la phase stationnaire. De plus, à la suite de la publication de ces travaux, différentes sociétés spécialisées dans la vente de standards analytiques proposent désormais ces valépotriates dans leur catalogue (Extrasynthèse et Phytolab).

Avancées scientifiques

- Mise à jour de la base de données des valépotriates recensés dans la littérature
- Développement d'un nouveau système de solvants biphasiques adapté aux iridoïdes aglycones dans le cadre d'un isolement par CPC
- Première description d'un isolement à l'échelle préparative de valépotriates
- Validité de du concept de « l'espace libre entre les pics » pour une résolution entre les composés comprise entre 1 et 1,5
- Levée de l'ambiguïté de la structure du 7-homovaltrate

Partie 3

Le couplage LC-HRMS : une technique indispensable à l'analyse des compléments alimentaires à base de plantes ?

Partie 3 : Le couplage LC-HRMS : une technique indispensable à l'analyse des compléments alimentaires à base de plantes ?

1 Introduction

Cette dernière partie consacrée aux méthodes de dosage devant être déployées pour satisfaire aux exigences de l'arrêté plantes met en avant les problématiques pouvant être résolues, ou partiellement résolues, grâce à la spectrométrie de masse haute résolution.

Les enjeux soulevés par la quantification de substances d'origine naturelle concernent autant la disponibilité des standards analytiques, que la possession d'une base de données recensant les représentants de la famille étudiée et la sensibilité des instruments de mesure utilisés.

Or, si tous les standards analytiques des molécules étudiées ne sont pas disponibles, la question de l'identification des composés ciblés se pose, avant même de débiter leur quantification.

De plus, si la famille de molécules étudiée n'a pas fait l'objet d'une récente étude recensant l'ensemble de ces représentants, il incombe à l'analyste de réaliser une bibliographie détaillée. Et même si un recensement a d'ores et déjà été établi, une vérification doit être réalisée car des erreurs peuvent avoir été reprises (cf. Tableau 28, Chapitre 3).

Et enfin, dans le cas où des composés sont dit « à surveiller » sans qu'aucune concentration maximale ne soit indiquée, il revient à l'analyste d'établir les limites de sa recherche : doit-il rechercher des composés mineurs (entre 100 ppm et 10000 ppm) des traces (entre 100 ppm et 1 ppm) ou des ultra-traces (en dessous de 1 ppm) ?

Afin d'illustrer ces défis un cas précis de molécules dites « à surveiller » citées dans l'Arrêté plantes ont été sélectionnées : les alcaloïdes pyrrolizidiniques, qui ne doivent pas être présent à plus de 1 ppb dans les produits finis. Après une description des enjeux phytosanitaires qu'entourent cette famille de molécule et un recensement des méthodologies analytiques proposées dans la littérature pour leur dosage, une discussion sur les questions que soulèvent leur restriction et les solutions pouvant être proposées par la spectrométrie de masse haute résolution seront décrites.

2 Les alcaloïdes pyrrolizidiniques : toxicité, réglementation et analyse

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (AP) sont une famille de molécules biosynthétisée par plus de 6000 plantes ce qui représente environ 1,5% des Angiospermes¹⁸⁶. On les retrouve tout particulièrement dans les Astéracées, les Boraginacées et les Fabacées¹⁸⁷. Du fait de leur toxicité hépatique, ces métabolites secondaires font l'objet de restrictions dans de nombreux pays. Cependant les teneurs maximales admises dans les produits finis font l'objet de nombreuses discussions et les méthodes analytiques employées pour les détecter et les quantifier seront débattues dans ce chapitre.

2.1 Contexte phytosanitaire

Avant d'avoir pu identifier et alerter sur la dangerosité des AP, les intoxications humaines et animales ont été nombreuses. Même si les premiers isollements d'AP datent de la fin du XIX^{ème} siècle (en 1895, des chercheurs français ont isolé deux AP de *Jacobea vulgaris*¹⁸⁸ (anciennement *Senecio jacobea*)), leurs effets n'étaient pas encore connus. Ce n'est qu'en 1903 qu'une première étude incrimine *Jacobea vulgaris* et les AP dans le cadre d'atteintes hépatiques chroniques observés chez certains bétails^{189,190}. D'autres études suivirent, incriminant cette fois d'autres Astéracées du genre *Senecio spp.* et des Fabacées du genre *Crotalaria spp*¹⁹¹. Par la suite, d'autres atteintes hépatiques dûes à ces familles ont aussi été rapportées chez l'humain. En 1918, des études ont permis de corrélérer des dizaines de décès par cirrhose du foie avec la consommation de céréales fréquemment utilisées dans la cuisine sud-africaine par des plantes du genre *Senecio spp*¹⁹². Bien que reportés en 1920, ces cas étaient observés depuis plus d'une dizaine d'années dans cette région d'Afrique du Sud et présentaient les mêmes symptômes que d'autres sujets étudiés à des dizaines de milliers de kilomètres (Nouvelle-Écosse ou encore Nouvelle-Zélande). De même, des maladies hépatiques endémiques observées en ex-URSS durant les années 1930 ont été corrélées à la consommation de pain dont la farine était contaminée par *Heliotropium lasiocarpum* de la famille des Boraginacées¹⁹³. Mais ce n'est qu'en 1950 que les AP ont été corrélés aux intoxications observées jusqu'alors. Et ce n'est pas pour autant que les intoxications cessèrent ! Dans les années 1980, les plantes du

genre *Heliotropium spp* ont été à l'origine d'une contamination du blé cultivé et ont provoqué plusieurs milliers de décès en Asie¹⁹⁴.

Cela sans compter que la consommation d'AP chez l'Homme ne se fait pas que par le biais de contamination de diverses céréales. En effet, d'autres produits peuvent en contenir : miel, lait, œufs ainsi que certaines préparations à base de plantes médicinales. La contamination du miel se fait par l'intermédiaire des abeilles qui butinent des fleurs de plantes synthétisant des AP¹⁹⁵ ; celle du lait et des œufs se fait soit par le biais d'un pâturage de mauvaise qualité des animaux producteurs, soit par les préparations céréalières les nourrissant¹⁹⁶. La contamination de plantes médicinales survient lors de leur récolte : en effet, si des plantes à AP se développent dans le même biotope que la plante médicinale alors une contamination croisée peut survenir si ces adventices ne sont pas écartées¹⁹⁷.

Étant donné la dangerosité des AP et la pluralité de leurs voies d'ingestion, la législation se devait d'encadrer leur exposition.

2.2 Contexte réglementaire

Dès 1989, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a alerté sur la dangerosité des AP et a suggéré la mise en place de procédures de récolte écartant les contaminations croisées afin d'éviter, ou au moins minimiser, l'exposition aux AP¹⁹⁸. Étant donné le peu d'informations disponibles quant à leurs seuils de toxicité, plusieurs pays ont mis en place certaines mesures de précautions. En 1992, l'Allemagne a fixé un taux d'exposition maximum de 1 µg pour les préparations à base de plantes à AP si l'exposition était inférieure à 6 semaines et 0,1 µg pour des expositions plus longues¹⁹⁹. L'Autriche est allée plus loin en 1994, en imposant l'absence d'AP dans tous les produits à base de plantes pouvant en contenir²⁰⁰, tandis qu'en 2000, la Belgique a tout simplement interdit la commercialisation de plantes médicinales à AP²⁰¹. L'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA : Food and Drug Administration) a suggéré en 2001, le retrait pur et simple du marché de l'ensemble des préparations susceptibles de contenir de AP²⁰². Les divergences d'opinion entre les institutions ont été clairement exposées en 2011 lorsque l'EFSA et l'Institut fédéral allemand d'évaluation des risques (BfR : Bundesinstitut für Risikobewertung) ont conclu à la toxicité des AP à des seuils diamétralement opposés²⁰³. En effet, l'EFSA a basé son étude en estimant les AP

toxiques à partir d'un taux d'exposition maximal de 70 µg/kg/jour tandis que la BfR a fixé ce taux 0,007 µg/kg/jour.

À l'heure actuelle, les états européens ont pour la plupart revus leur position. L'Allemagne, l'Angleterre et l'Autriche se sont accordés en 2016 à fixer transitoirement le taux d'exposition maximal à 0,02 µg/kg/jour et qui est passé en 2019 à 0,007 µg/kg/jour²⁰⁴. En France, la seule restriction concernant les AP est celle décrite dans l'arrêté plantes et elle s'applique à une plante à AP, *Borago officinalis* (bourrache) dont le produit final ne doit pas contenir plus d'1 ppb d'AP⁸. Et malgré des nombreuses alertes, aucune autre plante connue pour avoir des risques de contaminations croisées élevé²⁰⁵ (*Camellia sinensis*, *Foeniculum vulgare*, *Melissa officinalis*, *Mentha spp.* ou encore *Urtica spp.*), ne fait l'objet d'une attention particulière. Or de nombreuses études récentes ont démontrées que des produits tels que les infusions et les thés pouvait accidentellement en contenir. Une étude a pu démontrer que sur 70 produits issus du marché suisse, 24 contenaient des AP et que sur 274 échantillons de plantes médicinales, la majorité contenaient des AP²⁰⁶.

2.3 Phytochimie

Pour comprendre l'enjeu que représente la mise en place d'une méthode de dosage de l'ensemble des AP, il est important de rappeler leur richesse en termes de structures et de voies de biosynthèse.

2.3.1 Leur diversité structurale

Les AP sont constitués de deux entités chimiques : une nécine, qui est un amino alcool dérivé de la pyrrolizidine, et un ou plusieurs acides néciques fixés sur la nécine par estérification de sa ou ses fonctions alcools²⁰⁷ (Figure 58).

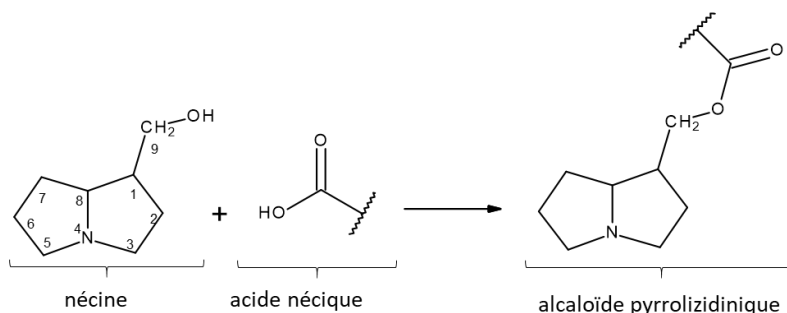


Figure 58 - Structure de base d'un AP

Les nécines sont constituées de 2 cycles à 5 atomes accolés par un azote en position 4 et un hydroxyméthyl en position 1. Elles peuvent présenter plusieurs sites hydroxylés notamment en position 7 et plus rarement en position 2 ou 6 ainsi qu'une insaturation en position 1,²⁹. Deux autres variantes sont aussi rencontrées : la première dite « N-oxyde » où la nécine est sous la forme d'un sel, et la seconde dite « otonécine » où les deux cycles à 5 atomes ne sont pas accolés mais sous la forme d'un 1-méthylazocan-5-one (Figure 59).

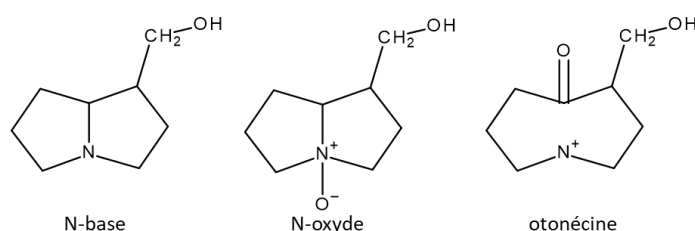


Figure 59 – Les différentes nécines

Les acides néciques ont des structures très diverses (Figure 65) allant du simple acide acétique à des acides à 14 carbones avec de multiples substitutions : hydroxyls, alkoxy, époxy, carboxy, chaînes carbones saturées ou poly-insaturées¹⁹⁶.

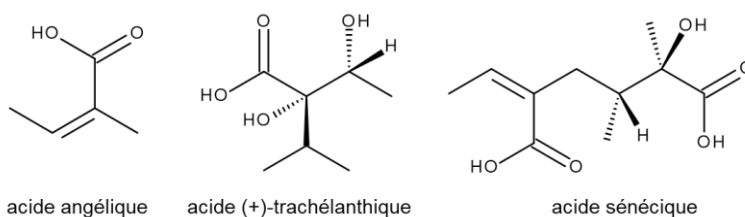


Figure 60 – Exemples d'acides néciques

La combinaison de ces deux entités mène à la formation de monoesters et diesters pour les monoacides ou diestercycliques pour les diacides. La Figure 61 résume les différentes familles d'AP pouvant être rencontrées.

Partie 3 : Le couplage LC-HRMS : une technique indispensable à l'analyse des compléments alimentaires à base de plantes ?

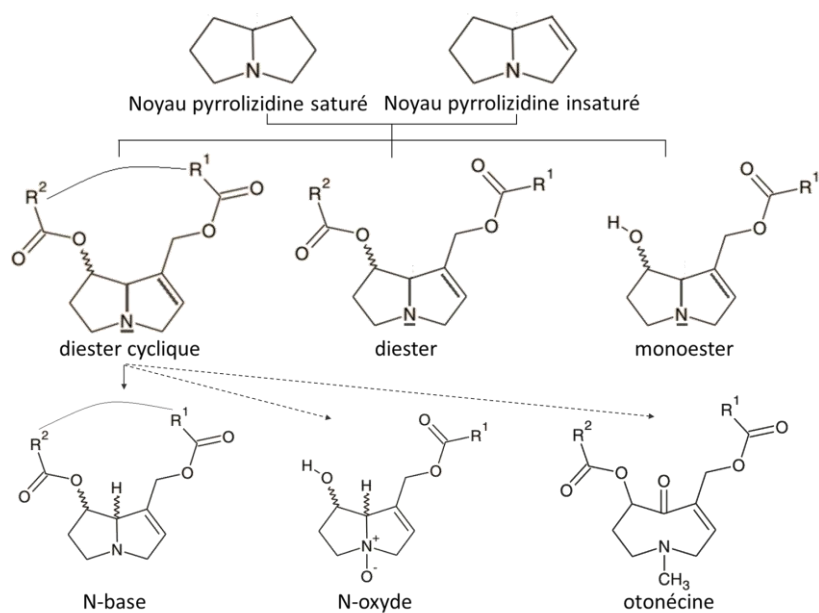


Figure 61 – Récapitulatif des différentes familles d'AP

Cela ramène donc à 18, le nombre de structures de base possible chez les AP. Du fait de cette grande possibilité de combinaisons, la famille des AP compte près de 660 représentants²⁰⁴ et, à ce jour, aucun recensement exhaustif n'est décrit dans la littérature et seuls quelques-uns d'entre eux sont commercialement disponibles (Tableau 37).

Partie 3 : Le couplage LC-HRMS : une technique indispensable à l'analyse des compléments alimentaires à base de plantes ?

Tableau 37 - Liste des standards analytiques d'AP commercialisés et famille correspondante

Standard analytique d'AP commercialisés	Famille d'AP	Formule brute	Masse exacte
7 acétyl intermédiaire	DINB	C ₁₇ H ₂₇ NO ₆	341,18384
7 acétyl intermédiaire N-oxyde	DINOx	C ₁₇ H ₂₇ NO ₇	357,17875
7 acétyl lycopsamine	DINB	C ₁₇ H ₂₇ NO ₆	341,18384
7 acétyl lycopsamine N-oxyde	DINOx	C ₁₇ H ₂₇ NO ₇	357,17875
échimidine	DINB	C ₂₀ H ₃₁ NO ₇	397,21005
échimidine N-oxyde	DINOx	C ₂₀ H ₃₁ NO ₈	413,20497
échinatine	MINB	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299,17327
échinatine N-oxyde	MINOx	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	315,16819
érucifoline	DCINB	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆	349,15254
érucifoline N-oxyde	DCINOx	C ₁₈ H ₂₃ NO ₇	365,14745
europine hydrochloride	MINB	C ₁₆ H ₂₇ NO ₆ .HCl	365,16056
europine N-oxyde	MINOx	C ₁₆ H ₂₇ NO ₇	345,17875
héliotrine	MINB	C ₁₆ H ₂₇ NO ₅	313,18892
héliotrine N-oxyde	MINOx	C ₁₆ H ₂₇ NO ₆	329,18384
indicine hydrochloride	MINB	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅ .HCl	335,15000
indicine N-oxyde	MINOx	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	315,16819
intermédiaire	MINB	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299,17327
intermédiaire N-oxyde	MINOx	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	315,16819
jacobine	DCINB	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	351,16819
jacobine N-oxyde	DCINOx	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	367,16310
lasiocarpine	DINB	C ₂₁ H ₃₃ NO ₇	411,22570
lasiocarpine N-oxyde	DINOx	C ₂₁ H ₃₃ NO ₈	427,22062
lycopsamine	MINB	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299,17327
lycopsamine N-oxyde	MINOx	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	315,16819
monocrotalline	DCINB	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	325,15254
monocrotalline N-oxyde	DCINOx	C ₁₆ H ₂₃ NO ₇	341,14745
rétronécine	NINB	C ₈ H ₁₃ NO ₂	155,09463
rétrorsine	DCINB	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	351,16819
rétrorsine N-oxyde	DCINOx	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	367,16310
sénécionine	DCINB	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	335,17327
sénécionine N-oxyde	DCINOx	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	351,16819
sénéciophylline	DCINB	C ₁₈ H ₂₃ NO ₅	333,15762
sénéciophylline N-oxyde	DCINOx	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆	349,15254
sénécivernine	DCINB	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	335,17327
sénécivernine N-oxyde	DCINOx	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	351,16819
senkirkin	DCIO	C ₁₉ H ₂₇ NO ₆	365,18384
trichodesmine	DCINB	C ₁₈ H ₂₇ NO ₆	353,18384

DINB : Diester insaturé N-base ; **DINOx** : Diester insaturé N-oxyde ; **MINB** : Monoester insaturé N-base ; **MINOx** : Monoester insaturé N-oxyde ; **DCINB** : Diester cyclique insaturé N-base ; **DCINOx** : Diester cyclique insaturé N-oxyde ; **NINB** : noyau insaturé N-base ; **DCIO** : Diester cyclique insaturé otônécine

2.3.2 Leur voie de biosynthèse

Le métabolisme des AP se fait essentiellement à partir de l'acide aminé L-ornithine qui forme la putrescine *via* l'ornithine décarboxylase (ODC)^{196,208,209}. La putrescine, *via* une réaction NAD dépendante catalysée par l'homospermidine synthase, forme l'homospermidine. Cette dernière forme la trachelanthamide en passant par l'intermédiaire 1-(4-aminobutyl)-3,4-dihydro-2H-pyrrolium (Figure 62).

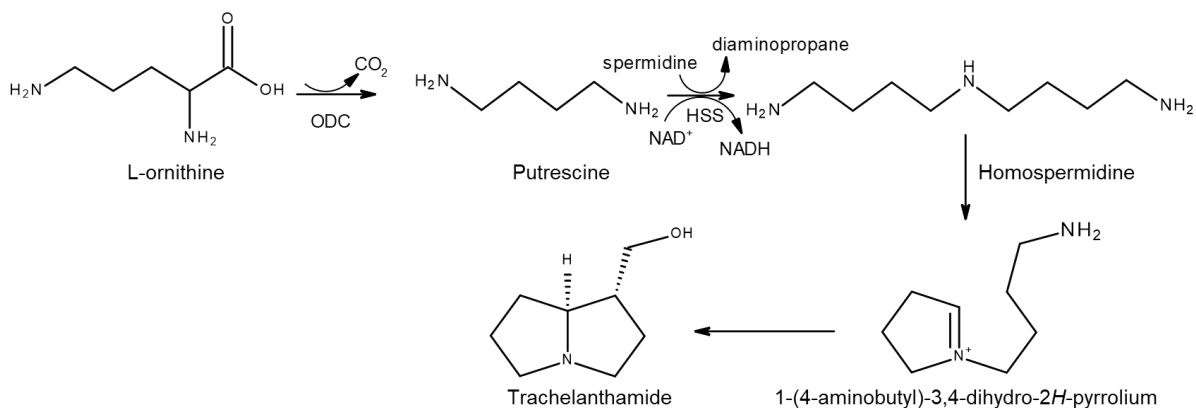


Figure 62 - Voie de biosynthèse des nécines

C'est à partir du précurseur trachelanthamide que l'estérification par divers acides néciques se poursuit jusqu'à l'obtention d'AP.

Les voies de formation des acides néciques^{196,208} n'ont été que très peu étudiées par rapport à celles des nécines. Il a cependant été prouvé que les acides aminés L-isoleucine, L-thréonine, L-leucine et L-valine étaient des composants essentiels à la biosynthèse de certains d'entre eux. Par exemple pour les acides néciques en C₅, tel que l'acide angélique, leur formation se fait à partir de l'isoleucine (Figure 63).

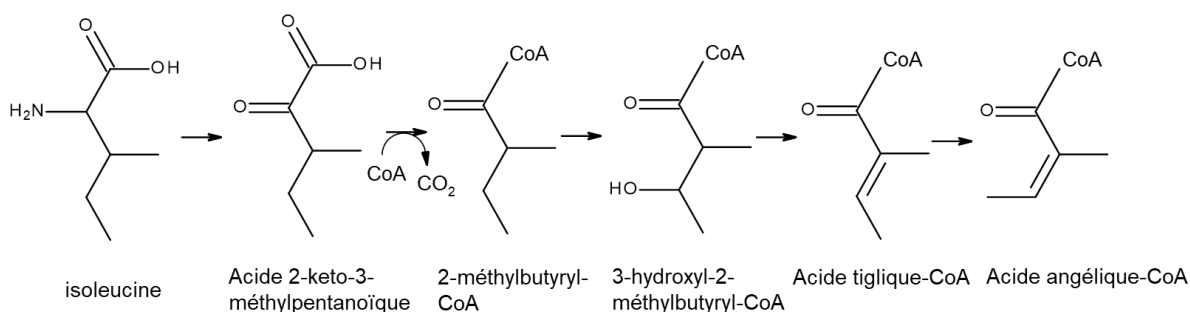


Figure 63 - Voie de biosynthèse des acides néciques

2.4 Les méthodes d'analyse des alcaloïdes pyrrolizidiniques

2.4.1 Leur évolution

Après la mise en évidence de la toxicité des AP, les premières méthodes d'analyses développées étaient essentiellement qualitatives afin d'évaluer le potentiel toxique de différentes plantes. Pour cela des techniques spectrophotométriques ont été proposées : après une réaction d'oxydation et de déshydrogénation les AP forment des noyaux pyrroles réagissant avec le réactif d'Ehrlich (4-diméthylaminobenzaldehyde)²¹⁰. Les solutions colorées étaient ensuite analysées à l'aide d'un spectrophotomètre et comparées à des standards. Bien que ce réactif réagisse uniquement avec les noyaux pyrroles possédant un atome d'hydrogène en position α , d'autres composés présents en solutions peuvent réagir ce qui la rend peu spécifique. Puis d'autres méthodes telles que la chromatographie sur papier²¹¹ utilisant aussi le réactif d'Ehrlich ont été suggérées mais encore une fois leur spécificité étaient discutées²¹². À partir des années 1980, des méthodes de dosage plus précises ce sont développées impliquant principalement la chromatographie en phase gazeuse qui, associées à un détecteur FID, permettait la détection d'AP²¹³⁻²¹⁶. La chromatographie liquide a, à cette période, moins été employée car les détecteurs UV associés ne détectaient pas les AP qui n'ont pas de chromophores. Cependant, la GC impliquait une étape de dérivation par acétylation ou silylation des AP sous la forme N-oxyde afin de les rendre volatils ce qui avait comme inconvénient de dénaturer certains d'entre eux. C'est par l'évolution des techniques de couplage (et des phases stationnaires) que l'HPLC est devenue une technique de choix par rapport à la GC, notamment grâce aux informations générées par son association à la spectrométrie de masse et à l'affranchissement de dérivation^{217,218}.

2.4.2 De nos jours

Les analyses par LC-MS des AP ont évoluées jusqu'à aboutir à des méthodes plus sensibles telles que la LC-MS/MS^{219,220} et la LC-HRMS. À l'heure actuelle, une seule institution propose une méthode réglementaire²²¹ de dosage des AP : la germanique BfR. Cette méthode utilise la LC-MS/MS et propose de doser 28 AP grâce au recours à des standards analytiques commercialement disponibles (Tableau 37) auprès de quelques fournisseurs (PhytoLab, Oskar Tropitzsch, Fluka ...). Malgré l'utilisation de

standards analytiques et du mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), les limites de quantification, bien que basses, n'atteignent pas les prérequis de l'arrêté plantes (1 ppb maximum) car elles sont toutes supérieures à 1,7 ppb.

Les différentes études publiées à ce jour ont traité du sujet de la teneur en AP dans les compléments alimentaires à base de plantes en dosant exclusivement les AP commercialement disponibles par LC-MS/MS. Il est intéressant de relever que seuls les AP 1,2 insaturés y sont étudiés alors que la réglementation ne fait aucune différence entre les AP 1,2 insaturés et saturés. Cette prise de partie est dûe au fait que des études largement reprises datant de 1911 et 1957 ont conclu à leur absence d'activité hépatotoxique^{222,223}. Or, ces résultats n'étaient que préliminaires et exclusivement axés sur la toxicité hépatique. Une autre étude a conclu à la toxicité des AP 1,2 saturés, notamment la platyphylle qui a une DL50 inférieure à celle de la lasiocarpine N-oxyde qui est un AP 1,2 insaturé²²⁴.

Ces approximations n'ont pourtant pas leur place au vu du danger phytosanitaire que représente cette classe de molécules. Des principes de précautions sont à prendre et l'exploration de nouvelles approches plus exhaustives doivent être entreprises. C'est dans ce contexte que l'apport de l'HRMS à l'analyse et au dosage des AP a été étudié.

3 Résultats et discussion

3.1 Développement de la méthode LC-HRMS

3.1.1 Optimisation des paramètres chromatographiques

Afin d'étudier les AP totaux par LC-HRMS, une méthode de séparation chromatographique a tout d'abord été développée. L'enjeu de celle-ci repose essentiellement sur le choix de la phase stationnaire du fait du caractère très polaire de certains AP. Pour cela, des colonnes capables de séparer une large gamme de composés tout en supportant l'emploi de phase mobile 100% aqueuse sans détérioration de la phase stationnaire ont été sélectionnées. Le choix s'est porté sur les colonnes BEH C18 (Bridged Ethyl siloxane/silica Hybrid) et HSS T3 (High Strength Silica). Ces deux types de colonnes sont compatibles avec des phases 100 % aqueuses et ont d'ores et déjà été employées pour l'analyse d'AP^{205,225-227}. Cependant, reste à déterminer laquelle des deux est la plus à même à être employée

pour un criblage exhaustif des AP afin de minimiser les risques de non-rétention des AP les plus polaires. Pour cela les deux principaux critères de sélection sont la capacité à retenir les AP (temps de rétention élevés) tout en permettant leur bonne séparation (résolution). Les deux phases stationnaires ont tout d'abord été testée en mode gradient à 0,5 mL/min avec un départ 100 % aqueux sur un mélange à 1 ppm de standards analytiques sélectionnés sur la base de leur prix et de telle sorte à ce que toutes les familles d'AP commercialement disponible soit représentées. Les capacités de rétention de chaque colonne sont résumées dans le Tableau 38.

Tableau 38 - Temps de rétention de 12 standards analytiques d'AP sur BEH C18 et HSST 3

Composé	Tr (min) BEH C18	Tr (min) HSS T3	Gain de Tr avec HSS T3 (%)
Monocrotaline	1,27	3,29	+61%
Monocrotaline N-oxyde	2,22	3,82	+42%
Lycopsamine	2,31	3,85	+40%
Rétrorsine	3,17	4,65	+32%
Rétrorsine N-oxyde	3,25	4,76	+32%
Héliotrine	3,27	4,82	+32%
Héliotrine N-oxyde	3,44	4,99	+31%
Sénéciophylline	3,42	4,99	+32%
Séneccionine	3,93	5,55	+29%
Senkirkine	4,05	5,87	+31%
Lasiocarpine	4,85	6,65	+27%
Lasiocarpine N-oxyde	5,12	6,99	+27%

Vus les résultats présentés dans le Tableau 38, c'est la colonne HSST 3 qui permet la rétention la plus importante des AP. Cependant, afin d'améliorer la résolution entre la monocrotaline N-oxyde et la lycopsamine ainsi que celle entre la rétrorsine N-Oxyde et l'héliotrine, le débit a été diminué de 0,5 mL/min à 0,4 mL/min et la température a été augmentée de 35°C à 40°C. Comme présenté sur la Figure 64, la résolution entre ces deux composés a pu évoluer favorablement et malgré l'élévation de température, les temps de rétention des composés sont tout de même supérieurs à ceux observés à 0,5 mL/min.

Partie 3 : Le couplage LC-HRMS : une technique indispensable à l'analyse des compléments alimentaires à base de plantes ?

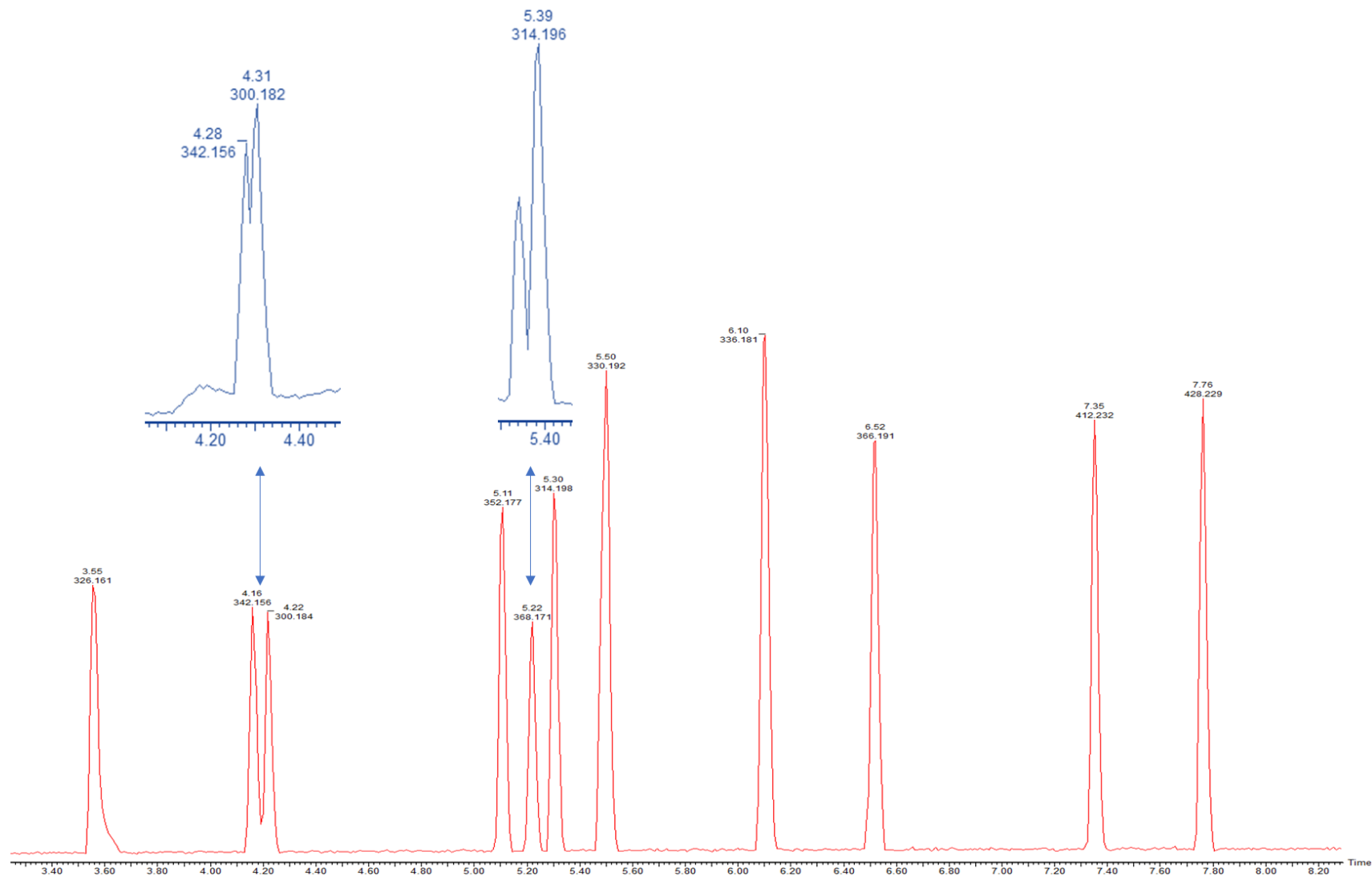


Figure 64 - Effet de l'augmentation de la température sur la résolution des composés à 0,4 mL/min – en bleu à 35°C et en rouge à 40°C

3.1.2 Optimisation des tensions de capillaire et de cône

La méthode spectrométrique doit pouvoir fournir le plus de signal possible afin d'obtenir les limites de quantification les plus basses. Dans le cadre d'une recherche étendue des AP, le spectromètre de masse Q-TOF devra permettre l'ionisation quantitative de tous les AP. Pour cela, le plus grand nombre d'AP doivent pouvoir être quantitativement ionisés lors de l'étape d'ionisation. C'est pourquoi, différentes tensions de capillaire et tensions de cône ont été testées en faisant varier une variable à la fois et le signal de chaque ion pseudo-moléculaire a été relevé. Premièrement, une solution contenant les 12 AP a été analysée à une tension de cône fixée à 20 V mais à différentes tensions de capillaire (Figure 65).

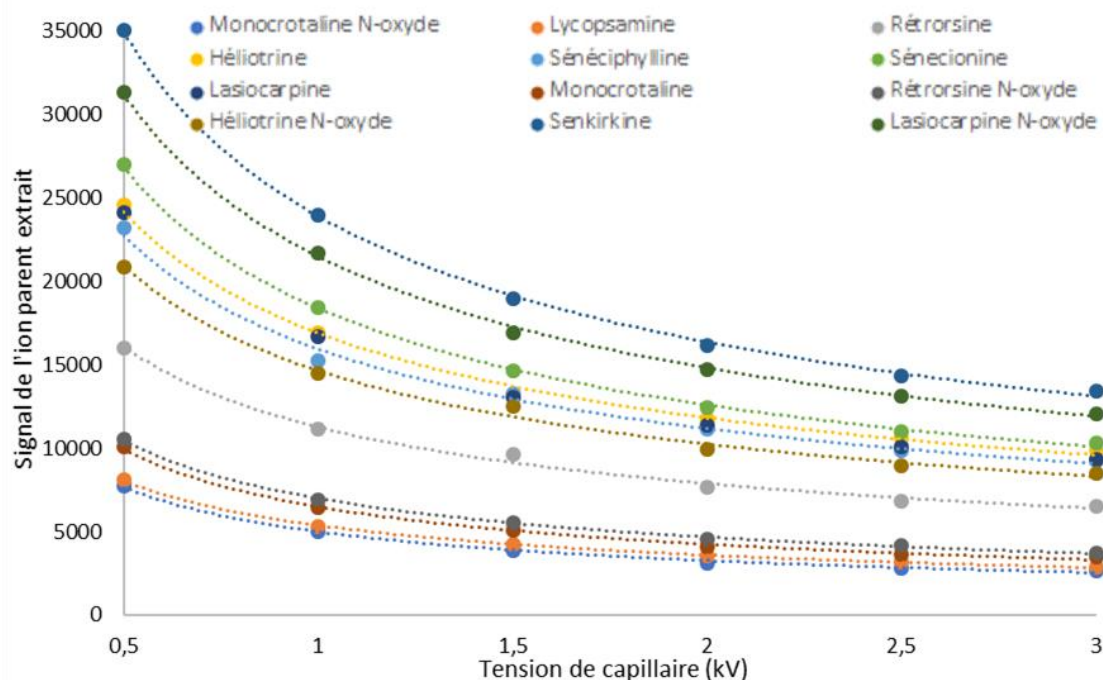


Figure 65 - Évolution de la réponse des AP en fonction de la tension de capillaire à une tension de cône fixée à 20 CV

C'est la tension de capillaire la moins énergétique, 0,5 kV, qui permet la détection du plus grand nombre d'ions parents. La tension de cône fournissant les plus importants signaux a donc été déterminée avec une tension de capillaire de 0,5 kV (Figure 66). Pour la majorité des AP, le maximum d'ionisation est atteint avec une tension de cône de 30 V c'est pourquoi les conditions d'ionisation ont été fixées à 0,5 kV pour la tension de capillaire et 30 V pour la tension de cône.

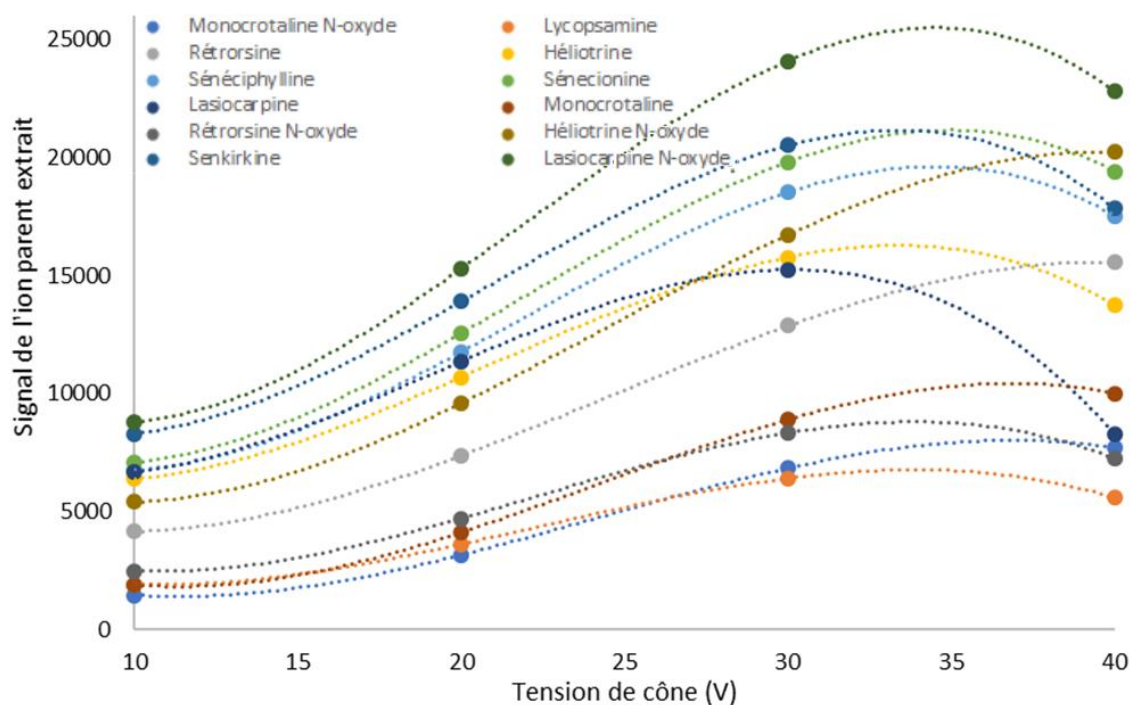


Figure 66 - Évolution des aires des ions pseudo-moléculaire de chaque AP en fonction de la tension de cône à une tension de capillaire fixée à 0,5 kV

Étant donné que le spectromètre de masse Q-ToF utilisé emploie la technologie MS^E, l'étude des énergies de collision à appliquer pour l'obtention de fragments caractéristiques n'a pas été menée. En effet, cette approche permet d'obtenir des spectres de masses avec et sans énergies de collision *via* l'application d'une rampe d'énergie de collision qui permet de ne pas « perdre » l'ion parent facilitant ainsi l'étude des fragments caractéristiques des AP.

Cette étude sur l'ionisation des AP a permis de mettre en évidence la diversité des réponses obtenues même au sein d'une même famille. Par exemple, l'héliotrine et la lycopsamine qui sont toutes deux des AP du type monoester insaturé N-base, présentent des réponses très différentes. Il en va de même pour la rétorsine et la sénécionine qui sont toutes deux du type diester cyclique insaturé N-base mais qui ne présentent pas des réponses semblables. C'est pourquoi, un dosage en équivalence d'un représentant de la même famille doit être réalisé avec prudence au risque de sous-estimer considérablement la concentration en AP. Or c'est ce qui est proposé dans une publication de la BfArm²¹⁹. Par précaution il conviendrait donc de doser les AP dont les standards analytiques ne sont pas disponibles, en équivalence de l'AP

répondant le moins afin de surestimer sa concentration. Il s'agirait ici de la lycopsamine.

3.2 Etude des fragments caractéristiques des AP

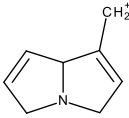
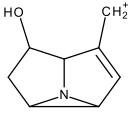
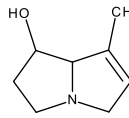
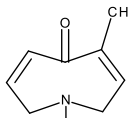
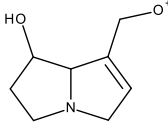
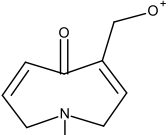
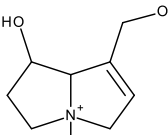
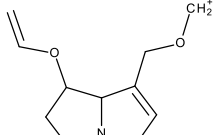
Avant de pouvoir quantifier la famille des AP en spectrométrie de masse, il convient tout d'abord de pouvoir les identifier *via* leur fragmentation (pour ceux dont le standard analytique n'est pas disponible). Pour la recherche exhaustive d'ions fragments avec des méthodes employant le mode MRM et des équipements basses résolution, il est primordial de souligner que pour un même fragment issu de différentes molécules, différentes énergies de collision peuvent être nécessaires. Par exemple, dans la méthode décrite par la BfArm²²¹, un des fragments caractéristiques de plusieurs familles d'AP est l'ion fragments m/z 120. Alors que pour l'échimidine une énergie de collision de 23 V suffit, il est nécessaire, pour la monocrotaline N-oxyde, d'appliquer une énergie de collision de 37 V. C'est pourquoi, le mode MS^E, qui permet, lui, d'appliquer une rampe d'énergie de collision, a été privilégié. Le Tableau 39 détaille les 2 ions fragments majoritaires observés lors de leur étude par LC-HRMS et leur grande variété même au sein d'une même famille d'AP.

Tableau 39 - Fragments majoritaires observés pour les 12 AP étudiés

AP	Ion Parent [M+H] ⁺	Fragments	Formule brute ($\Delta < 5$ ppm)	Famille
Héliotrine	314,1961	156,1025	C ₈ H ₁₄ NO ₂	MINB
		138,0917	C ₈ H ₁₂ NO	
Héliotrine N-oxyde	330,1925	172,0977	C ₈ H ₁₄ NO ₃	MINOx
		138,0910	C ₈ H ₁₂ NO	
Lasiocarpine	412,2338	138,0917	C ₈ H ₁₂ NO	DINB
		120,0811	C ₈ H ₁₀ N	
Lasiocarpine N-oxyde	428,2294	138,0914	C ₈ H ₁₂ NO	DINOx
		120,0810	C ₈ H ₁₀ N	
Lycopsamine	300,1834	156,1038	C ₈ H ₁₄ NO ₂	MINB
		120,0821	C ₈ H ₁₀ N	
Monocrotaline	326,1607	194,1182	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	DCINB
		120,0809	C ₈ H ₁₀ N	
Monocrotaline N-oxyde	342,1564	138,0910	C ₈ H ₁₂ NO	DCINOx
		120,0811	C ₈ H ₁₀ N	
Rétorsine	352,1763	138,0919	C ₈ H ₁₂ NO	DCINB
		120,0817	C ₈ H ₁₀ N	
Rétorsine N-oxyde	368,1718	136,0756	C ₈ H ₁₀ NO	DCINOx
		120,0809	C ₈ H ₁₀ N	
Séneconine	336,1811	138,0918	C ₈ H ₁₂ NO	DCINB
		120,0810	C ₈ H ₁₀ N	
Sénéciphylline	334,1662	138,0910	C ₈ H ₁₂ NO	DCINB
		120,0810	C ₈ H ₁₀ N	
Senkirine	366,1906	168,1016	C ₉ H ₁₄ NO ₂	DCIO
		150,0911	C ₉ H ₁₂ NO	

Il peut donc se révéler difficile de corrélérer un AP inconnu à une famille d'AP surtout s'il présente uniquement les ions fragments 120 et 138. Et ce d'autant plus que la corrélation à une famille précise ne saurait satisfaire à un dosage en équivalence pertinent vues les écarts de réponses décrits en 3.1.2. Les fragments observés, associés aux formules brutes suggérées par l'HRMS ont permis de proposer les structures des ions fragments représentées dans le Tableau 40 et qui ont pour certaines jamais été décrites (masse exacte souligné dans le Tableau 40).

Tableau 40 - Formules semi développées des fragments caractéristiques des AP

Fragment	120,0810	136,0756	138,0910	<u>150,0911</u>
Formule brute	C ₈ H ₁₀ N	C ₈ H ₁₀ NO	C ₈ H ₁₂ NO	C ₉ H ₁₂ NO
Structure possible				
Fragment	156,1025	168,1016	172,0977	<u>194,1182</u>
Formule brute	C ₈ H ₁₄ NO ₂	C ₉ H ₁₄ NO ₂	C ₉ H ₁₄ NO ₃	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂
Structure possible				

3.3 Étude exhaustive et dosage des AP de *Senecio vulgaris*

Afin de mettre en évidence l'occurrence des AP dont les standards ne sont pas commercialisés dans les plantes communément incriminées lors de contamination croisées, un extrait de *Senecio vulgaris* a été étudié (Figure 67). Cette plante invasive à AP, présente dans toutes les régions tempérées du globe, est une « mauvaise herbe » fréquemment rencontrée²²⁷.



Figure 67 - *Senecio vulgaris* L. en fleurs

3.3.1 Identification des AP

L'extrait méthanolique de cette plante a été analysé par LC-HRMS avec les méthodes chromatographique et spectrométrique décrites en 3.1. Le chromatogramme obtenu présente de nombreux ions dont la masse est dans la gamme de masse des AP (cf. Tableau 37) et dont la parité les rend susceptibles de contenir un azote (Figure 68).

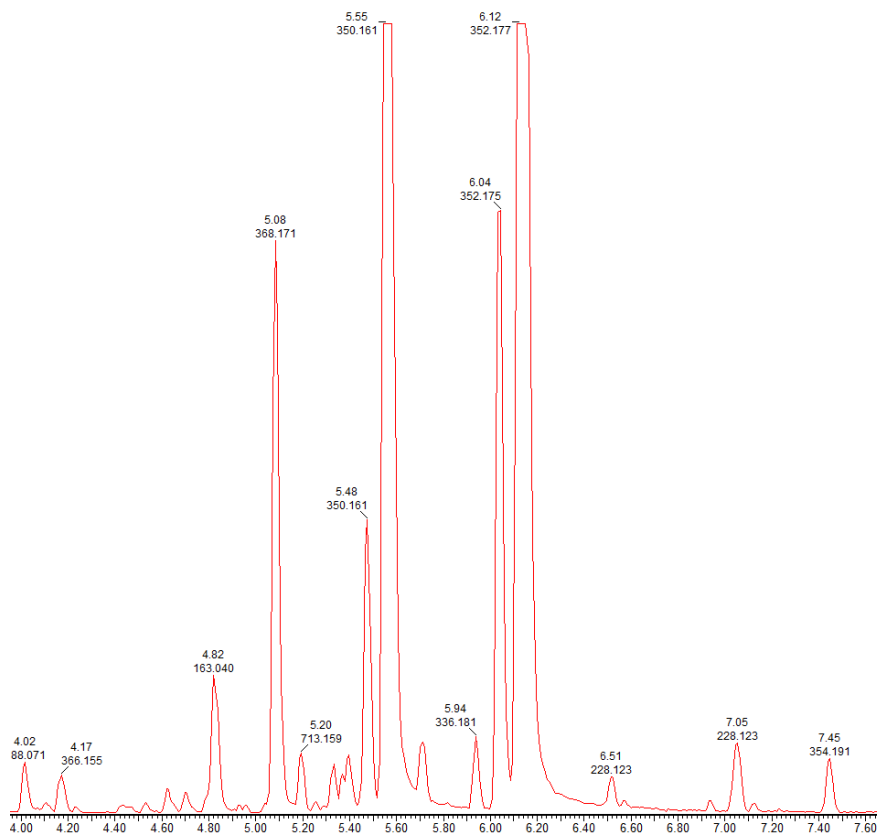


Figure 68 - Chromatogramme de l'extrait méthanolique de *S. vulgaris* obtenu par LC-HRMS

L'identification des AP potentiels a été réalisée en recherchant leurs fragments caractéristiques décrits dans les Tableaux 39-40 et est résumée dans le Tableau 41.

Tableau 41 - Potentiels AP détectés dans *S. vulgaris* et leur identification

Tr (min)	Masse exacte	Ions fragments	Formule brute suggérée ($\Delta < 5$ ppm)	AP potentiel	Remarques
4,16	366,1554	120, 136	C ₁₈ H ₂₄ NO ₇	Erucifoline N-oxyde	Fragments caractéristiques des DCINOx
4,62	366,1551	118, 138	C ₁₈ H ₂₄ NO ₇	Erucifoline N-oxyde	Fragments non caractéristiques des DCINOx
4,8	368,1713	136, 120	C ₁₈ H ₂₆ NO ₇	Jacobine N-oxyde ou Rétrorsine N-oxyde	Fragments caractéristiques des DCINOx et Tr rétrorsine N-oxyde correspond
5,37	368,1718	138, 172	C ₁₈ H ₂₆ NO ₇	Jacobine N-oxyde ou Rétrorsine N-oxyde	Fragments non caractéristiques des DCINOx
5,47	350,1613	120, 136	C ₁₈ H ₂₄ NO ₆	Erucifoline ou Sénéciphylline N-oxyde	Fragments caractéristiques des DCINOx et DCINB
5,56	350,1615	120, 136	C ₁₈ H ₂₄ NO ₆	Erucifoline ou Sénéciphylline N-oxyde	Fragments caractéristiques des DCINOx et DCINB
5,67	336,1844	120, 138	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	Sénécionine	Fragments caractéristiques des DCINB et Tr correspond à la sénécionine
6,04	352,1755	120, 136	C ₁₈ H ₂₆ NO ₆	Sénécionine N-oxyde ou sénécivernine N-oxyde ou jacobine	Fragments caractéristiques des DCINOx donc soit sénécionine N-oxyde soit sénécivernine N-oxyde
6,14	352,1757	118, 136	C ₁₈ H ₂₆ NO ₆	Sénécionine N-oxyde ou sénécivernine N-oxyde ou jacobine	Fragments non caractéristiques des DCINOx
7,44	354,1919	122, 138	C ₁₈ H ₂₈ NO ₆	Inconnu	Fragments non caractéristiques des AP insaturés mais pourrait être un AP saturé du type diester cyclique saturé N-oxyde

Le Tableau 41 permet de mettre en évidence la complexité de l'identification de potentiels AP dans un extrait végétal et le cas de l'érucifoline N-oxyde illustre la problématique posée par le manque de standard analytique. En effet, deux molécules ayant des masses exactes proches (m/z 366,1554 et m/z 366,1551) éluant à des temps de rétention différents (4,16 min et 4,62 min) et ne présentant pas la même fragmentation ne peuvent être toutes deux l'érucifoline N-oxyde (DCINOx). D'autant plus que seule celle éluant à 4,16 min présente bien la fragmentation caractéristique des DCINOx. C'est ainsi que la molécule éluant à 4,62 min risque de ne pas être prise en compte alors que les recherches bibliographiques attestent de la présence d'AP ayant ce type de fragmentation²²⁷. De plus l'HRMS suggère la formule brute C₁₈H₂₄N de l'ion fragment m/z 118,0657 ce qui permet de suggérer la formation d'un fragment avec une insaturation supplémentaire tel que présenté dans la Figure 69.

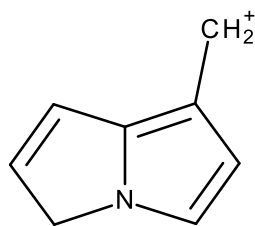


Figure 69 - Structure possible de l'ion fragment m/z 118

Il en va de même pour le composé inconnu éluant à 7,44 minutes qui malgré les recherches bibliographiques n'est décrit dans aucune plante de cette espèce mais qui, en plus d'avoir un ion fragment m/z 138,0917 présente un ion fragment tout à fait caractéristique des AP saturés²¹⁹, l'ion fragment m/z 122,0966 de formule brute $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}$ (Figure 70).

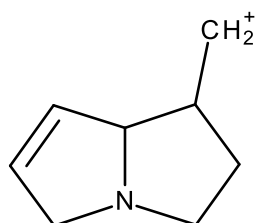


Figure 70 - Structure possible de l'ion fragment m/z 122

Le cas de *S. vulgaris* illustre donc bien le challenge que représente le dosage des AP totaux : le dosage des seuls standards analytiques disponibles ne peut suffire à couvrir toute la gamme des AP rencontrés tandis qu'une recherche de l'ensemble des fragments caractéristiques des AP en utilisant le mode MS^E , permet d'approfondir la recherche des AP dans un échantillon. Cependant cette approche est à réserver avec l'emploi d'une HRMS car la suggestion de formule brute permet d'éviter des confusions comme celles décrites dans la partie suivante.

3.3.2 Dosage des AP totaux

Vues les différentes réponses obtenues au sein d'une même famille d'AP (cf. 3.1.2), le dosage des AP totaux de cette plante a été réalisé en équivalence de la lycopsamine car il est l'AP, dont le standard analytique est disponible, répondant le moins (cf. 3.1.2). En partant de ce principe, un dosage par calibration externe (Figure 71) permet d'établir que les spécimens de *S. vulgaris* étudiés contiennent au maximum 830 ppm d'AP en équivalence de lycopsamine.

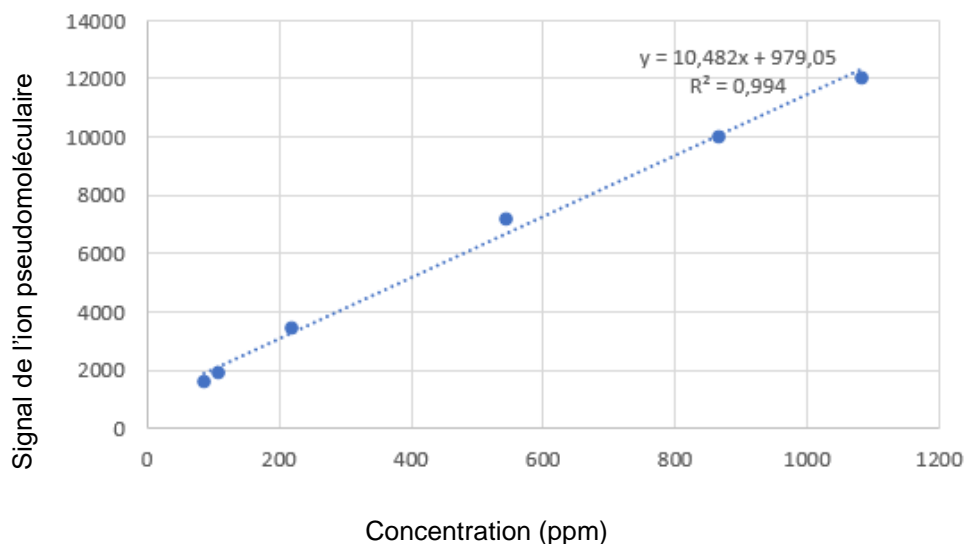


Figure 71 - Droite de calibration externe de lycopsamine

En pratique, si l'on veut satisfaire à l'arrêté plantes préconisant 1 ppb d'AP maximum, cela signifie que pour une récolte de 10 kg de plantes, il conviendrait de s'assurer que moins de 12 mg de *S. vulgaris* soient présents c'est-à-dire un niveau de contamination inférieur à 0,00012 % !

3.4 Etude d'un extrait commercial d'*Urtica dioica* (ortie)

L'ortie fait partie des plantes dont les récoltes ont déjà été contaminées par des plantes à AP²²⁸. C'est pourquoi, un extrait sec commercial a été étudié avec pour but la mise en évidence d'une contamination par des AP. L'extrait méthanolique a été analysé par LC-HRMS grâce à la méthode développée et décrite en 3.1. La recherche de fragments caractéristiques a mis en évidence que l'ion parent m/z 308,2226 produit les ions fragments m/z 122,0603 et m/z 136,0752 (Figure 72) précédemment décrits et observés dans *S. vulgaris* (Tableau 40 et Tableau 41) ce qui permet de suggérer qu'il est un AP.

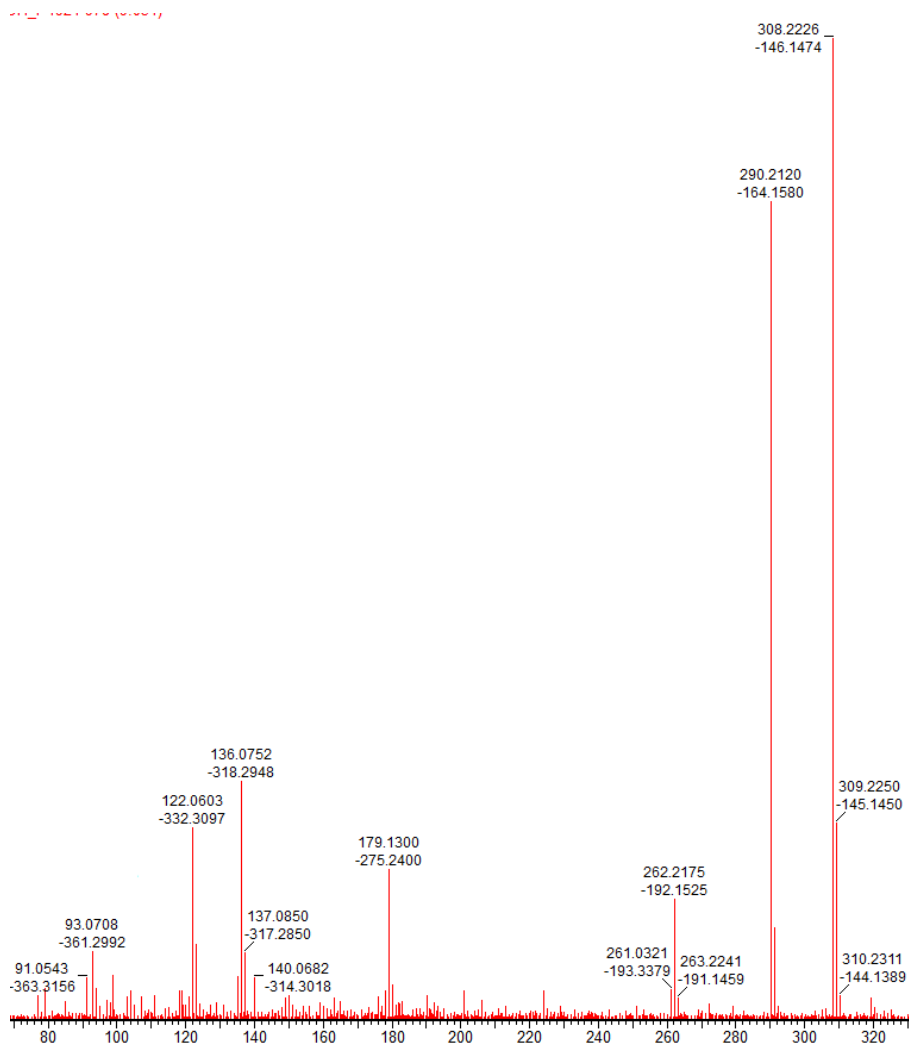


Figure 72 - Spectre de masse obtenu en mode MS^E pour l'ion m/z 308,2226

L'étude des formules brutes suggérées par l'HRMS met en évidence que l'ion m/z 308,2226 a une formule brute C₁₈H₃₀NO₃ ($\Delta < 5$ ppm) ce qui peut soutenir l'hypothèse que c'est un AP. Cependant les formules brutes des fragments ne sont pas les mêmes : bien que l'ion fragment m/z 136 soit associé à la formule brute C₈H₁₀NO, le fragment m/z 122 est associé à la formule brute C₇H₈NO ($\Delta < 5$ ppm) et non C₈H₁₂N comme observé jusqu'alors (Tableau 40). Ceci représente un frein à l'identification de l'ion m/z 308 en tant qu'AP. De plus, l'analyse d'un standard botanique entier d'*U. dioica* commercialisé par l'entreprise Botanicert a mis en évidence que cette molécule est présente naturellement dans cette espèce confirmant bien que l'extrait commercial n'est pas contaminé par une plante à AP. Cette étude n'aurait pu être menée à bien sans les informations structurales apportées par la spectrométrie de masse haute résolution. Avec une analyse par spectrométrie de masse basse résolution, l'extrait commercial aurait sans doute été, à tort, déclaré comme contaminé par un AP.

4 Conclusion

La contamination de denrées alimentaires par les AP est un problème de santé public majeur et les dizaines de milliers d'intoxications reportées à travers le monde attestent de l'ampleur de ce phénomène. Les voies d'intoxication étant multiples (par consommation directe de plantes à AP se développant dans le même biotope que la plante d'intérêt ou consommation indirecte d'AP *via* des produits d'origine animale contaminés), la garantie d'absence de contamination ne peut se faire que sur la base d'analyses physico-chimiques.

Dans le cas des plantes médicinales, le suivi de la qualité des matières premières est d'autant plus important que celles-ci sont générées à des volumes industriels et bien souvent à des milliers de kilomètres du territoire français (la France importe près de 20 000 tonnes de plantes par an). Et comme démontré (*cf.* 3.3.2), il suffit qu'1/1000000^e de plante à AP soit présent dans la récolte pour que le seuil d'1 ppb soit dépassé !

Pour cela, de nombreuses méthodes d'analyses ont été développées au cours du siècle dernier et c'est désormais la chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse qui fait consensus.

Cependant, bien que de nombreuses études au sujet des AP aient été décrites, encore aucune ne traite de l'analyse des AP totaux dans des compléments alimentaires à base de plante (analyse désormais proposée par l'entreprise Botanicert à ses clients) sur la base de la recherche de fragments caractéristiques et du dosage en équivalence d'un AP dont le standard analytique est disponible (*cf* Rapport d'analyse en annexe). Et surtout, aucune étude n'a pour l'heure mis en perspective les exigences réglementaires en vigueur et les verrous technologiques et scientifiques devant encore être levés : limites de détection de méthodes accréditées supérieures aux limites de l'arrêté plantes méthodes accréditées ne proposant que le dosage de certains AP alors que la réglementation exige un dosage de tous les AP, recherche des AP saturés écartée alors que les études sur leur toxicité est contradictoire (*cf.* 2.4.2).

C'est pourquoi, pour répondre à la problématique du manque de standards analytiques, l'approche basée sur l'étude des fragments obtenus par LC-MS/MS est cohérente et largement décrite. Cependant, une fois un potentiel AP détecté, les données fournies par une HRMS sont essentielles afin d'éviter toute confusion (*cf.* 3.4).

Chapitre 3

Matériels et méthodes

1 Partie expérimentale de l'étude sur le couplage TLC-MS

1.1 Solvants utilisés

Le méthanol, l'acétonitrile, l'eau, l'acétate d'éthyle, acide acétique et l'acide formique utilisés pour l'extraction des plantes étudiées ainsi que pour l'élaboration des phases mobiles étaient tous de grade analytique (Carlo Erba, Milan, Italie).

1.2 Standards analytiques et botaniques

Les standards analytiques de théophylline, caféine, hypéroside, acide chlorogénique, acide valérénique, rutine, harpagoside, hypéricine, et valtrate étaient à des puretés supérieures à 99 % (Extrasynthèse, Genay, France)

Les standards botaniques de *Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Harpagophytum procumbens*, et de *Camellia sinensis* ont été identifiés et fournis par l'entreprise Botanicert (certificat d'analyse en annexes).

1.3 Préparation des échantillons

Les solutions de standards analytiques ont été préparés dans des fioles jaugées de 20,0 mL de la façon suivante : 3 mg de standard ont été pesés dans la fiole jaugée puis complétée jusqu'au trait de jauge avec du méthanol et placée 5 minutes dans un bain à ultrasons.

Les solutions de standards botaniques ont été préparés dans des fioles jaugées de 10,0 mL de la façon suivante : 1 g de standard a été pesé dans la fiole jaugée puis complétée jusqu'au trait de jauge avec du méthanol et placée 5 minutes dans un bain à ultrasons

1.4 Les analyses UPLC-PDA-ESI-SQD

Les échantillons ont été analysés sur un système UPLC Acquity couplé à un détecteur à barrettes d'iode PDA e-Acquity et un simple quadripôle SQD (Waters, Milfor, Massachusetts, États-Unis d'Amérique). La séparation des composés a été réalisée sur une colonne Kinetex® C18 (Phenomenex, 2.6 µm C18 100 Å, 150 mm × 2.1 mm i.d.) à 25 °C et un débit de 0,6 mL/min. Le volume d'injection a été fixé à 1 µL. La phase mobile était composée d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B) et tous les deux étaient acidifiés à 0,05 % en acide formique. Le gradient d'élution a été fixé de la façon suivante : 0–1 min, 5% B; 1–9 min, 5–40% B; 9–15 min, 40–100% B, 15–17 min, 100%

B; étape isocratique durant 2 minutes à 5% de B. Les échantillons étaient maintenus à 15 °C. La source à électronébulisation était paramétrée de la façon suivante : température de source 150 °C, température de désolvatation 500 °C, tension du capillaire 3 kV et tension de cône 10 V. L'azote a été utilisé comme gaz de cône (10 L/h) et gaz de désolvatation (1000 L/h).

1.5 Le couplage TLC-MS

La pompe servant à délivrer les solvants d'extraction est une pompe binaire de chez Waters (Quaternary Solvent Manager, Acquity UPLC H-Class, Waters). Le spectromètre de masse est un simple quadripôle de chez Waters (SQ Detector, Waters) possédant une source d'ionisation par électronébulisation dont la tension de capillaire est de 3kv. Le couplage entre ces deux systèmes est permis grâce à une interface de chez Camag (Interface MS 2, Camag) munie d'une tête de prélèvement dont le cerclage permet l'extraction de bande de 4 mm. Le solvant d'extraction est composé à 50% d'eau et à 80% d'acétonitrile et le débit est de 0,2 mL/min.

1.6 Application via l'ATS4

Dans le cas des standards analytiques, 2 µL de solution méthanolique à 150 µg/mL ont été déposées sur des bandes de 4 mm, ce qui représente 300 ng de composés. Pour ce qui est des standards botaniques, des conditions standards d'application ont été utilisées : 2µL de solution méthanolique à 100 mg/mL sur des bandes de 8 mm, ce qui représente 200 µg d'extrait méthanolique.

Étant donné que la bouche de prélèvement permet l'analyse de spot faisant au maximum 4 mm, il est considéré que pour l'analyse de bande de 8 mm, le bouche de prélèvement extrait la moitié du produit.

1.7 Essais de restitution

10 µL de chaque solution de standard analytique ont été appliqués sur une plaque HPTLC Silice MS grade, ce qui représente environ 3 µg de composé. Chaque dépôt a ensuite été prélevé *via* l'IMS 2 et restitué dans 0,5 mL de solvant d'élution, ce qui représente des solutions à environ 6 ppm. Ce test a été réalisé en triplicat avec deux solvants d'extraction préconisés par le constructeur : ACN et ACN/H₂O (50/50).

Les échantillons reconstitués ont été analysés par LC/UV et les aires obtenues en UV ont été comparées aux aires obtenues avec des solutions des mêmes solutions préparées manuellement où 10 µL de chaque standard a été placé dans 490 µL de solvant.

1.8 Droites de calibration externe

Les droites de calibration externe réalisées pour le dosage des marqueurs de chaque plante ont été réalisées en préparant des solutions de 10, 50, 200, 500 et 1000 ppm dans du méthanol et analysées en duplicat par UPLC-PDA (*cf.* 1.4). Elles figurent en annexe.

2 Partie expérimentale de l'étude sur la CPC

2.1 Solvants utilisés

Le dichlorométhane, le méthanol, l'acétonitrile le n-hexane l'acétone, l'eau et l'acide formique utilisés pour l'extraction des plantes étudiées ainsi que pour l'élaboration des phases mobiles étaient tous de grade analytique (Biosolve, Dieuze, France).

2.2 Plante étudiée et procédé d'extraction

Les spécimens récoltés de *Centranthus ruber* L. à Grasse ont tous été identifiés par le Dr. Francis Hadji-Minaglou, pharmacien spécialisé en ethnobotanique des plantes médicinales et l'un d'entre eux a été déposé au Muséum d'Histoire Naturelle de Nice sous le numéro NICE-D-4386. Les racine de *C. ruber* fraîches (2kg) ont été séchées à température ambiante durant 3 jours et réduite en poudre par un broyeur à billes MM 400 (Retsch, Haan, Allemagne). L'extraction assistée par ultrasons de la poudre (250 g) a été menée durant 10 min avec 2000 mL de DCM. La préparation a ensuite été centrifugée durant 4 min à 914 g avec un Digitor 21 équipé d'un rotor RT 191 (Ortho Alresa, Madrid, Espagne). Le surnageant a été filtré au travers des filtres à membrane de cellulose réticulée (RC) de 0,2 µm (Phenomenex, Torrance, Californie, États-Unis d'Amérique) et évaporé sous pression réduite afin de constituer un extrait sec de 12 g utilisé pour la séparation par CPC.

Plusieurs solvants d'extraction ont été testés afin d'obtenir l'extrait le plus concentré en valépotriates. Les solvants ont été comparés en triplicat de la façon suivante : 15 mL de solvant était ajouté à 100 mg de poudre de *C. ruber* et placé 10 min dans un

bain à ultrasons. Les surnageants étaient filtrés dans les filtres RC de 0,2 µm puis évaporés sous flux d'azote. Les rendements étaient calculés avant dilution dans le MeOH. Tous les échantillons ont été analysés selon la méthode décrite en 2.3 et leur concentration ajustée jusqu'à ce que les aires des pics du valtrate et du 7-homovaltrate soit dans la gamme de la droite de calibration externe.

2.3 Analyses UPLC-PDA-ESI-HRMS

Les échantillons ont été analysés sur un système UPLC Acquity couplé à un détecteur à barrettes d'iode PDA e-Acquity et un XEVOG2-QTOF (Waters, Milfor, Massachusetts, États-Unis d'Amérique). La séparation des composés a été réalisée sur une colonne Acquity UPLC C18 (Waters, 1.7 µm, 100 mm × 2.1 mm) à 25 °C et un débit de 0,5 mL/min. Le volume d'injection a été fixé à 1 µL. La phase mobile était composée d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B) et tous les deux étaient acidifiés à 0,1 % en acide formique. Le gradient d'élution a été fixé de la façon suivante : 0 min, 40% B; 5 min, 60% B; 10 min, 95% B; et une étape finale isocratique de 2 min à 95% B. Les échantillons étaient maintenus à 15 °C. Les données HRMS ont été étudiées sur une gamme de 100 à 1500 m/z. La source à électronébulisation était paramétrée de la façon suivante : température de source 150 °C, température de désolvatation 500 °C, tension du capillaire 3 kV et tension de cône 20 V. L'azote a été utilisé comme gaz de cône (35 L/h) et gaz de désolvatation (1000 L/h). Le débit du lockspray a été fixé à 20 µL/min et sa tension de capillaire à 2,5 kV.

2.4 Droite de calibration externe

Afin de quantifier les valépotriates isolés, des droites de calibration du valtrate et du 7-homovaltrate ont été réalisées. Pour cela, des « standards analytiques » de chaque molécule ont été isolés durant les étapes de développement de la méthode de séparation à l'échelle analytique sur la SCPC-100. Des solutions à 37,5, 75, 200, 400 et 600 ppm ont été préparées dans du méthanol et analysées en triplicat par UPLC-PDA selon la méthode décrite en 2.3.

2.5 Les instruments CPC

Les séparations par CPC à l'échelle analytique et préparative ont été conduites sur des instruments Armen (Armen Instrument, Saint Avé, France) : une SCPC-50 (colonne de 50 mL) équipée d'une pompe binaire, un système Spot CPC, un collecteur

de fraction LS 5600 couplé à un détecteur UV/vis Flash 065 DAD balayant des longueurs d'ondes comprises entre 200 et 600 nm et une SCPC-100+1000 (colonnes de 100 mL et de 1000 mL) couplée à un système Spot Prep II et un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD). Les deux instruments étaient pilotés par le logiciel Armen Glider.

2.6 Sélection du système biphasique de solvants

Les K_d et les α ont été déterminés de la façon suivante : les systèmes biphasiques de solvants ont été préparés dans des tubes à centrifugation de 50 mL. Chaque tube a été agité et reposé jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Si le temps d'équilibrage dépassait 30 s, le système n'était pas retenu. Sinon, 2 mL de chaque de chaque phase ont été prélevées et placées dans des tubes à centrifugation de 10 mL et 2 mg d'extrait sec y était ajouté. Les tubes ont ensuite été agités et reposés afin de se rééquilibrer. Les phases supérieures et inférieures de chaque tube ont été analysées par UPLC-PDA avec la méthode décrite en 2.3. Le rapport des aires du valtrate et du 7-homovaltrate de chaque phase a été calculé afin d'obtenir les K_d . Les rapports de K_d de chaque composé ont été calculés afin de déterminer les α de chaque système de solvant.

2.7 Méthode de séparation par CPC

Le système de solvants MeOH : *n*-Hex : H₂O (5 :5 :0,8 ; v/v/v) a été placé dans une ampoule a décanté, vigoureusement agité avant de le laisser reposer afin qu'il atteigne l'équilibre. Les phases supérieures et inférieures ont été récoltées séparément afin de constituer les phases mobile et stationnaire et l'extrait de *C. ruber* a été dissout dans la phase supérieure avant d'être injecté. Les séparations par CPC ont été réalisées en mode ascendant. La phase inférieure a tout d'abord été chargée dans la colonne CPC afin de constituer la phase stationnaire. Cette dernière a été maintenue en place grâce à la force centrifuge générée par le rotor (2500 rpm ;3-30 mL/min pour la SCPC-50/100 et 1200 rpm ;30 mL/min pour la SCPC-1000). Puis la phase supérieure a été pompée à travers la phase stationnaire jusqu'à ce que le système ait atteint le point d'équilibre. Ce dernier est observé lorsque la pression du système chromatographique se stabilise et que la phase supérieure est collectée dans l'éprouvette graduée servant à calculer le pourcentage de rétention de la phase stationnaire (S_f).

3 Partie expérimentale de l'étude sur l'apport de la LC-HRMS

3.1 Solvants utilisés

Le méthanol, l'acétonitrile, l'eau et l'acide formique utilisés pour l'élaboration des échantillons et de la phase mobile étaient tous de grade analytique (Biosolve, Dieuze, France).

3.2 Standards analytiques et botaniques

Les standards analytiques de monocrotaline, monocrotaline N-oxyde, lycopsamine, rétrorsine, rétrorsine N-oxyde, héliotrine, héliotrine N-oxyde, sénéciphylline, sénecionine, senkirine, lasiocarpine et de lasiocarpine N-oxyde étaient à des puretés supérieures à 99 % (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Allemagne).

Les standards botaniques de *Senecio vulgaris* L. et de *Urtica dioica* L. ont été identifiés et fournis par l'entreprise Botanicert (certificat d'analyse en annexes).

3.3 Préparation des échantillons

Les solutions mères de standards analytiques ont été préparées à 200 ppm en pesant 2 mg de standard dans une fiole jaugée de 10,0 mL, en la complétant avec du méthanol et en la plaçant 10 min dans un bain à ultrasons. Puis une solution contenant l'ensemble des AP à 1 ppm a été préparée en plaçant 100 µL de chaque solution mère de standard dans une fiole jaugée de 20,0 mL complétée par du méthanol. Cette dernière a été utilisée pour l'optimisation des paramètres de tension de cône et pour l'élaboration de la droite de calibration de lycopsamine.

Les solutions de standard botanique et d'extrait commercial ont été préparées en pesant 1 g de poudre dans une fiole jaugée de 10,0 mL et complétée avec du méthanol avant extraction au bain à ultrasons durant 10 min.

3.4 Droite de calibration externe

Afin de pouvoir doser les AP totaux de *S. vulgaris*, une droite de calibration externe de la lycopsamine a été élaborée à partir de la solution à 1 ppm décrite en 3.3. Des solutions à 2, 5, 20, 50, 100, 500 ppb ont été réalisées et analysées par UPLC-QTOF.

3.5 Analyses UPLC-PDA-ESI-HRMS

Les échantillons ont été analysés sur un système UPLC Acquity couplé à un détecteur à barrettes d'iode PDA e-Acquity et un XEVOG2-QTOF (Waters, Milfor, Massachusetts, États-Unis d'Amérique). La séparation des composés a été réalisée sur une colonne Acquity HSST3 (Waters, 1,8 μm , 100 mm \times 2.1 mm) ainsi que sur une colonne Acquity BEH C18 (Waters, 1,7 μm , 100 mm \times 2.1 mm) à 40 °C et un débit de 0,4 mL/min. Le volume d'injection a été fixé à 1 μL . La phase mobile était composée d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B) et tous les deux étaient acidifiés à 0,1 % en acide formique. Le gradient d'élution a été fixé de la façon suivante : 0-1 min, 0 % B; 10 min, 40% B; 10,1-13 min, 95% B; et une étape finale isocratique de 3 min à 0 % B. Les échantillons étaient maintenus à 5 °C. Les données HRMS ont été étudiées sur une gamme de 100 à 1500 m/z. La source à électronébulisation était paramétrée de la façon suivante : température de source 150 °C, température de désolvatation 500 °C, tension du capillaire 0,5 kV et tension de cône 30 V. L'azote a été utilisé comme gaz de cône (35 L/h) et gaz de désolvatation (1000 L/h). Le débit du lockspray a été fixé à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ et sa tension de capillaire à 2,5 kV.

Conclusion générale et perspectives

Il a été démontré que l'une des principales contraintes dans l'analyse de produits naturels est l'accès au standard analytique de molécules considérées comme marqueurs d'une plante ou faisant l'objet de restrictions car potentiellement dangereuses. Les problématiques qui en découlent ont tissé le fil conducteur de l'ensemble des travaux de cette thèse. C'est ainsi que des solutions analytiques pertinentes et aisément déployables aux seins des laboratoires de contrôle qualité des compléments alimentaires à base de plantes ont été évaluées.

Le premier objectif a été d'étudier les performances qu'offre le couplage HPTLC-IMS2-SQD dans le domaine de l'identification de marqueurs de plantes employées dans les compléments alimentaires. L'HPTLC est très largement répandue dans le domaine de la phytochimie car cette technique visuelle permet d'obtenir une empreinte d'une plante pouvant ainsi être facilement comparée. Cependant, les méthodes HPTLC régulièrement décrites dans les pharmacopées ne se base que sur quelques standards analytiques dont le caractère de « marqueur » est discutable (le cas de l'acide chlorogénique est frappant : il est considéré comme marqueur dans l'ensemble des plantes étudiées !). C'est pourquoi, cet équipement a été étudié sous deux angles : permet-il d'identifier les marqueurs établis par la pharmacopée européenne et si oui, à quelle concentration ? Permet-il aussi d'identifier d'autres molécules dans le cadre de la recherche de nouveaux composés ? Il a ainsi pu être mis en évidence que le maximum d'informations étaient obtenus lorsque les conditions suivantes étaient réunies : emploi de plaques HPTLC de grade MS, concentration du composé étudié supérieure à 0,3%, absence d'acide dans les phases mobiles HPTLC, et étude de différentes conditions d'ionisation en MS. Il apparaît que dans le cadre de contrôle de routine, cet équipement a toute sa place car, une fois la méthode chromatographique et spectrométrique validées, les informations obtenues pourraient permettre l'identification de plantes selon des monographies issues de la pharmacopée européenne. Cependant, dans le cadre de la recherche de nouveaux composés, les résultats obtenus restent malgré tout aléatoires car la phase stationnaire interfère avec les composés d'intérêt en créant des interactions avec ces derniers ainsi qu'en générant un important bruit de fond en spectrométrie de masse. Ce sont ces raisons qui poussent finalement à considérer cet équipement comme intéressant en amont d'études visant à identifier de nouveaux marqueurs ou de nouvelles activités biologiques (cas de la bioautographie). C'est pourquoi, à moins d'évolutions

techniques telles que l'élaboration de phases stationnaires HPTLC sans additifs ne répondant pas en spectrométrie de masse et le développement de logiciel de retraitement incluant un logarithme de soustraction des blancs plus adapté, l'IMS2 restera impactée par les faiblesses des deux techniques qu'elle couple.

Cependant des études comparatives avec des techniques de couplage faisant intervenir des sources d'ionisation spécifiques (MALDI, DART, DESI...) et l'association de l'IMS2 à un spectromètre de masse haute résolution pourraient permettre d'affiner le positionnement et les performances offerts par cet équipement.

Le deuxième objectif a été d'étudier la CPC dans le cadre de l'isolement à l'échelle préparative de valépotriates, molécules soumises à diverses réglementations à travers le monde et dont l'accès au standard analytique est difficile. La mise en place d'une méthode d'isolement rapide et à haut rendement est souvent compliquée par les caractéristiques physico-chimiques des extraits naturels. C'est pourquoi, une alternative à l'HPLC préparative a été étudiée. La CPC offre la possibilité de s'affranchir des problèmes associés aux adsorption irréversibles et aux capacités de charge. Cela constitue deux atouts essentiels pour la mise en place d'une méthode permettant la purification, en une seule étape, d'une grande quantité de standards.

Les travaux ont pu s'appuyer sur une ressource végétale facile d'accès et dont la teneur en composés d'intérêt était élevée. Cependant, les principales difficultés résidaient en l'apolarité des molécules cibles ainsi qu'en leur similarité structurale ce qui a conduit à la recherche minutieuse d'un nouveau système de solvants biphasique qui présente à la fois des K_d et des sélectivités intéressantes. Après un développement de méthode à l'échelle analytique, un transfert d'échelle non linéaire se basant sur le concept de l'« espace libre entre les pics » a été évalué. Pour la première fois ce modèle a été utilisé pour isoler non pas une, mais deux molécules qui en plus, coéluent. C'est ainsi que 3260 mg d'extrait ont pu être purifiés en environ une heure, soit 16,3 fois plus que la quantité maximale pouvant être séparée par un rotor 10 fois plus petit.

Les différentes étapes de recherche et développement d'une méthode d'isolement ont ici été décrites de façon à permettre à tout utilisateur d'appréhender une purification par CPC à l'échelle du laboratoire ainsi qu'à l'échelle industrielle. Ces travaux ont donné lieu à de nombreuses communications et ont fait l'objet d'une publication :

Clément Chami, M. *et al.* Purification of two valepotriates from *Centranthus ruber* by centrifugal partition chromatography: From analytical to preparative scale. *J. Chromatogr. A* **1580**, (2018). Il est intéressant de relever que depuis, en plus d'Extrasynthèse, le laboratoire Phytolab propose le valtrate dans son catalogue de standard analytique. Ce dernier point représente l'accomplissement de ces travaux de recherche destinés à proposer des solutions permettant de sécuriser le marché du complément alimentaire à base de plantes.

En plus d'avoir permis d'isoler deux molécules structurellement proches à un niveau de pureté supérieur à 95% avec un taux de recouvrement de 90% ainsi que d'avoir rendu possible l'élucidation structurale du 7-homovaltrate, cette étude atteste que la CPC est une technique d'isolement parfaitement adaptée au domaine des substances naturelles.

Cependant, des perspectives peuvent être envisagées : la recherche d'un système de solvants biphasique étant primordial, travailler dans un environnement thermostaté avec des équipements automatisés pourrait permettre d'accélérer le développement chromatographique. Aussi, dans un contexte sécuritaire et environnemental, développer l'utilisation de solvants inoffensifs, tels que les systèmes aqueux biphasiques, pourrait permettre de démocratiser la CPC dans le domaine de la purification de substances naturels.

Le troisième et dernier objectif de cette thèse a été d'évaluer l'apport de l'HRMS pour la caractérisation et le dosage de familles de composés. Pour illustrer cette étude les AP ont été sélectionnés. Cette famille de molécules est considérée comme dangereuse car elle est responsable de dizaines de milliers d'intoxications à travers le monde. Or même si les principales plantes à AP ont parfaitement été identifiées, elles continuent de provoquer décès, fausses couches et atteintes hépatiques chroniques. Afin de garantir au mieux l'innocuité des produits susceptibles de contenir des AP, de nombreuses méthodes d'analyses ont été développées et c'est désormais celles employant la chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse qui fait consensus.

Premièrement, cette étude a mis en perspective la pertinence des résultats issus d'un dosage des AP à l'aide de quelques standards analytiques face au grand nombre d'AP pouvant être biosynthétisés par les plantes. En effet, il a pu être mis en évidence la

présence d'AP dont les standards analytiques ne sont pas disponibles dans *Senecio vulgaris*. Or cette espèce est fréquemment impliquée dans la contamination de denrées et il a pu être démontré qu'un niveau de contamination de 1/1000000^e suffit à dépasser les limites d'exposition fixée par la réglementation française.

Puis, les données fournies par l'HRMS, ont permis d'écarter la présence d'AP dans un extrait sec d'*Urtica dioica* employé dans les compléments alimentaires. Or si cette dernière étude avait été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse tandem basse résolution, les fragments observés auraient certainement été considérés comme caractéristiques des AP menant à la destruction du lot analysé.

C'est pourquoi, l'emploi d'une HRMS se révèle essentielle dans le dosage de famille de molécules dont les enjeux phytosanitaires associent des risques aussi élevés pour la santé publique et par la même, d'importants risques financiers. Désormais le laboratoire Botanicert propose une méthode jusqu'alors jamais décrite : celle du dosage des AP totaux par HRMS dans les compléments alimentaires à base de plantes dont un rapport d'analyse figure en annexe.

Cependant, cette étude a aussi permis de mettre en avant les perspectives suivantes : l'HRMS apporte une dimension essentielle pour le dosage de familles de composés mais dans le cas des AP, ses performances en termes de limites de détection peuvent-elles suffirent à satisfaire les exigences actuelles ? Si non, une étape de préparation d'échantillon par SPE pourrait-elle palier à cela ? Et plus généralement concernant cette fois ci les AP : étant donnés les exigences réglementaires imposant une concentration maximale de 1 ppb d'AP, est-il pertinent de soumettre uniquement les produits à base de bourrache à des contrôles quand on sait que d'autres plantes telles que la camomille, la mélisse, le fenouil ou d'autres matières premières telles que le lait et les œufs peuvent être contaminées ?

Bibliographie

1. Herbst, A. L., Ulfelder, H. & Poskanzer, D. C. Adenocarcinoma of the Vagina. *N. Engl. J. Med.* **284**, 878–881 (1971).
2. Bresalier, R. S. *et al.* Cardiovascular Events Associated with Rofecoxib in a Colorectal Adenoma Chemoprevention Trial. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1092–1102 (2005).
3. Fleurentin, J., Pelt, J.-M. & Mazars, G. *Des sources du savoir aux médicaments du futur.* (IRD Éditions, 2002).
4. Hardy, K. *et al.* Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften* **99**, 617–626 (2012).
5. O’Keefe, E. L., DiNicolantonio, J. J., Patil, H., Helzberg, J. H. & Lavie, C. J. Lifestyle Choices Fuel Epidemics of Diabetes and Cardiovascular Disease Among Asian Indians. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **58**, 505–513 (2016).
6. DiNicolantonio, J. J., O’Keefe, J. H. & Wilson, W. Subclinical magnesium deficiency: A principal driver of cardiovascular disease and a public health crisis. *Open Hear.* **5**, (2018).
7. Paul Dupont. *Les oligo-éléments: équilibre vital* (Diffusion Rosicrucienne, 2004)
8. *Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi.* Journal Officiel de la République Française (2014).
9. Synadiet. Chiffres clés 2017 du marché des compléments alimentaires en France. in *Conférence de presse du 28 mars 2018* (2018).
10. Cynober, L. & Fricker, J. *Tout sur les compléments alimentaires: Les bons et les moins bons.* (Odile Jacob, 2017).
11. <https://www.capital.fr/entreprises-marches/medicaments-comment-urgo-gagne-gros-avec-vos-bobos-1322987>. page internet consultée le 13.07.2018

12. https://lentreprise.lexpress.fr/creation-entreprise/etapes-creation/34-oenobiol-plus-qu-un-groupe-une-philosophie-34_1515055.html. page internet consultée le 13.07.2018
13. Dioux, J. *Merchandising management: Fondamenteux, E-commerce, E-marketing*. (De Boeck, 2013).
14. <https://jaminex.com/>. page internet consultée le 22.07.2018
15. <http://www.actidiet.fr/>. page internet consultée le 22.07.2018
16. L'actualité des ingrédients fonctionnels et santé. *Actif's* 46 (2015).
17. <https://www.bll.de/de/verband/organisation/arbeitskreise/arbeitskreis-nahrungsergaenzungsmittel-ak-nem/20181029-zahlen-nahrungsergaenzungsmittel-markt-2018>. page internet consultée le 01.03.2019
18. Minister of Agriculture and Agri-Food Canada. Opportunities and Challenges Facing the Canadian Functional Foods and Natural Health Products Sector. (2014).
19. Bales, C. W., Locher, J. L. & Saltzman, E. *Handbook of clinical nutrition and aging*.
20. Maffei, M. *Dietary supplements of plant origin : a nutrition and health approach*. (Taylor & Francis, 2003).
21. Geller, A. I. *et al.* Emergency Department Visits for Adverse Events Related to Dietary Supplements. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1531–1540 (2015).
22. Irissou, L. La pharmacie à Montpellier avant les statuts de 1572 (suite). *Rev. Hist. Pharm. (Paris)*. **22**, 265–305 (1934).
23. Chemin Laure-Marine. L'évolution du rôle du pharmacien d'officine français en tant qu'acteur de santé. (Sciences pharmaceutiques, 2014).
24. Décret n°79-480 du 15 juin 1979 relatif à la vente au public des plantes médicinales inscrites à la Pharmacopée.

25. Décret n° 2008-841 du 22 août 2008 relatif à la vente au public des plantes médicinales inscrites à la Pharmacopée et modifiant l'article D. 4211-11 du code de la santé publique.
26. Décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires.
27. Chatterjee, S. K. Cultivation of medicinal and aromatic plants in India - A commercial approach. *Acta Hortic.* **576**, 191–202 (2002).
28. Lange, D. Medicinal and aromatic plants: trade, production, and management of botanical resources. *Acta Hortic.* 177–197 (2004).
29. Bruneton, J. *Pharmacognosie.* (2016).
30. Décret no 98-397 du 20 mai 1998 relatif aux interdictions concernant les plantes dénommées *Stephania tetrandra* et *Aristolochia fangchi*.
31. DIRECTIVE 2002/46/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 10 juin 2002 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les compléments alimentaires.
32. Décret n° 2011-329 du 25 mars 2011 modifiant le décret n° 2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires.
33. Règlement (CE) No 1924/2006 du parlement européen et du conseil du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires. *J. Off. l'Union Eur.*
34. Règlement (UE) No 1169/2011 du parlement européen et du conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, modifiant les règlements (CE) no 1924/2006 et (CE) no 1925/2006 du Parlement européen et du Conseil. *J. Off. l'Union Eur.*
35. Règlement (CE) No 834/2007 du conseil du 28 juin 2007 relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques et abrogeant le règlement (CEE) no 2092/91.
36. Règlement (CE) No 889/2008 de la commission du 5 septembre 2008 portant

modalités d'application du règlement (CE) no 834/2007 du Conseil relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques en ce qui concerne la production biologique.

37. Règlement (UE) No 432/2012 de la commission du 16 mai 2012 établissant une liste des allégations de santé autorisées portant sur les denrées alimentaires, autres que celles faisant référence à la réduction du risque de maladie ainsi qu'au développement et.
38. Upton, R. *American Herbal Pharmacopoeia: botanical pharmacognosy--microscopic characterization of botanical medicines*. (American Herbal Pharmacopoeia/CRC Press, 2011).
39. Linné, C. von. *Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*. (Impensis Direct. Laurentii Salvii, 1762).
40. Citrus limon (L.) Osbeck. Available at: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/tro-28101295>. (Accessed: 13th March 2019)
41. Citrus maxima (Burm.) Merr. Available at: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2724206>. (Accessed: 13th March 2019)
42. Arnason, J.T., Mata R. & Romeo, J.T., *Phytochemistry of Medicinal Plants*. (Springer US, 1995)
43. Kar, A. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. (New Age International (P) Ltd, 2007).
44. McIntyre, A. *Le guide complet de la phytothérapie : un manuel structuré pour un savoir-faire professionnel*. (Le Courrier du livre, 2011).
45. Chan, G., Chan, W. & Sze, D. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* **2**, 25 (2009).

46. Mithöfer, A. & Boland, W. Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**, 431–450 (2012).
47. Dewick, P. M. *Medicinal natural products : a biosynthetic approach*.
48. Martin, D. J. Features on Plant Cuticle. *Trans. Bot. Soc. Edinburgh* **36**, 278–288 (1955).
49. Jackson Betty, S. D. W. Atlas of microscopy of medicinal plants, culinary herbs and spices. *Flavour Fragr. J.* **8**, 340–341 (1993).
50. Metcalfe C.R., C. L. *Anatomy Of The Dicotyledons*. (1957).
51. Dean, J. A. (John A. & Wiley InterScience (Online service). *Extraction techniques in analytical sciences*. (Wiley, 2009).
52. James B. McAlpine and Patrick Morris. *Natural Products Isolation*. (Springer, 1998).
53. Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P. & Hernández-Méndez, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A* **1089**, 1–17 (2005).
54. Fisher Scientific Inc, T. *Fast Determination of Acrylamide in Food Samples Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Ion Chromatography with UV or MS Detection*.
55. Lucchesi, M. E., Chemat, F. & Smadja, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A* **1043**, 323–7 (2004).
56. Zougagh, M., Valc, M. & Ríos, A. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *TrAC* **23**, 5, 399-405 (2004)
57. Penton, Z. E. Sample preparation for gas chromatography with solid-phase extraction and solid-phase microextraction. *Adv. Chromatogr.* **37**, 205–36 (1997).
58. Belajová, E. & Suhaj, M. Determination of phenolic constituents in citrus juices:

- Method of high performance liquid chromatography. *Food Chem.* **86**, 339–343 (2004).
59. Bicchi, C. *et al.* HPLC-UV and HPLC-positive-ESI-MS analysis of the diterpenoid fraction from caper spurge (*Euphorbia lathyris*) seed oil. *Phytochem. Anal.* **12**, 255–262 (2001).
 60. Desmorteux, C., Rothaupt, M., West, C. & Lesellier, E. Improved separation of furocoumarins of essential oils by supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1216**, 7088–7095 (2009).
 61. Dugo, P. *et al.* Rapid Analysis of Polymethoxylated Flavones from Citrus Oils by Supercritical Fluid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3900–3905 (1996).
 62. Lockwood, G. . Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. *J. Chromatogr. A* **936**, 23–31 (2001).
 63. Marriot, P. J., Shellie, R. & Cornwell, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatogr. A* **936**, 1–22 (2001).
 64. Tranchant, J. & Arpino, P. *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. (Masson, 1995).
 65. Dugo, G. *et al.* Advanced and innovative chromatographic techniques for the study of citrus essential oils. *Flavour Fragr. J.* **20**, 249–264 (2005).
 66. Lobo, R. *et al.* A HPTLC densitometric method for the determination of aloeverose in Aloe vera gel. *Fitoterapia* **81**, 231–233 (2010).
 67. Musingarabwi, D. M., Nieuwoudt, H. H., Young, P. R., Eyéghè-Bickong, H. A. & Vivier, M. A. A rapid qualitative and quantitative evaluation of grape berries at various stages of development using Fourier-transform infrared spectroscopy and multivariate data analysis. *Food Chem.* **190**, 253–262 (2016).
 68. Petrakis, E. A., Kimbaris, A. C., Pappas, C. S., Tarantilis, P. A. & Polissiou, M. G. Quantitative determination of pulegone in pennyroyal oil by FT-IR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10044–10048 (2009).

69. Batten, G. D. Plant analysis using near infrared reflectance spectroscopy: The potential and the limitations. *Aust. J. Exp. Agric.* **38**, 697–706 (1998).
70. Türker-Kaya, S. & Huck, C. W. A review of mid-infrared and near-infrared imaging: Principles, concepts and applications in plant tissue analysis. *Molecules* **22**, (2017).
71. Kind, T. & Fiehn, O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* **8**, 105 (2007).
72. Martin, G. J. Tracing back the origin of vanillin by SNIF-NMR. *Ind. Chem. Libr.* **8**, 506–527 (1996).
73. Chapon, A., Pigrée, G., Putmans, V. & Rogel, G. Optimization of liquid scintillation measurements applied to smears and aqueous samples collected in industrial environments. *Results Phys.* **6**, 50–58 (2016).
74. Schipilliti, L., Dugo, G., Santi, L., Dugo, P. & Mondello, L. Authentication of bergamot essential oil by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometer (gc-c-irms). *J. Essent. Oil Res.* **23**, 60–71 (2011).
75. Hu, C. & Xu, G. Metabolomics and traditional Chinese medicine. *TrAC Trends Anal. Chem.* **61**, 207–214 (2014).
76. Anses. *Guide de validation des méthodes d'analyses*. (2015).
77. Jean-Jacques Macheix, Annie Fleuriet, C. J.-A. *Les composés phénoliques des végétaux*. (2005).
78. *ISO 3632-2:2010 - Épices -- Safran (Crocus sativus L.) -- Partie 2: Méthodes d'essai. 2010*
79. *ISO 14502-1:2005 - Détermination des substances caractéristiques du thé vert et du thé noir -- Partie 1: Dosage des polyphénols totaux dans le thé -- Méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. (2005).*
80. Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L. &

- Jacobo-Velázquez, D. A. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **5**, 5990–5999 (2013).
81. Roman, M. C., Hildreth, J. & Bannister, S. Determination of catechins and caffeine in camillia sinensis raw materials, extracts, and dietary supplements by HPLC-uv: single-laboratory validation. *J. AOAC Int.* **96**, 933–41 (2013).
 82. Waksmundzka-Hajnos, M. & Sherma, J. *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. (CRC Press, 2011).
 83. Naveen, P., Lingaraju, H., Anitha & Prasad, Ks. Simultaneous determination of rutin, isoquercetin, and quercetin flavonoids in Nelumbo nucifera by high-performance liquid chromatography method. *Int. J. Pharm. Investig.* **7**, 94 (2017).
 84. Reich, E. & Schibli, A. *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants*. (Thieme, 2007).
 85. Anonymous. Hyperici herba extractum siccum. *Pharmacopée Eur.* **13**, 226 (2001).
 86. Meier, B. Modern HPTLC-A Perfect Tool for Quality Control of Herbals and Their Preparations. (2014).
 87. Aranda, M. & Morlock, G. Simultaneous Determination of Caffeine , Ergotamine , and Metamizol in Solid Pharmaceutical Formulation by HPTLC – UV-FLD with Mass Confirmation by Online HPTLC – ESI-MS. **45**, 251–255 (2007).
 88. Wright, B. W. & Wright, C. W. New method for evaluating irreversible adsorption and stationary phase bleed in gas chromatographic capillary columns. *J. Chromatogr. A* **1261**, 142–150 (2012).
 89. Morlock, G. & Schwack, W. Coupling of planar chromatography to mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* **29**, 1157–1171 (2010).
 90. Hubert, J., Nuzillard, J. M. & Renault, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochem. Rev.* **16**, 55–95 (2017).

91. Häbe, T. T., Jamshidi-Aidji, M., Macho, J. & Morlock, G. E. Direct bioautography hyphenated to direct analysis in real time mass spectrometry: Chromatographic separation, bioassay and mass spectra, all in the same sample run. *J. Chrom. A*. **1568**, 188-196 (2018).
92. Gross, J. H. Direct analysis in real time-a critical review on DART-MS. *Anal Bioanal Chem*. **406**, 63-80 (2014)
93. Morlock, G. & Ueda, Y. New coupling of planar chromatography with direct analysis in real time mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1143**, 243–251 (2007).
94. Morlock, G. & Schwack, W. Hyphenations in planar chromatography. *J. Chromatogr. A* **1217**, 6600–6609 (2010).
95. Fougère, L., Da Silva, D., Destandau, E. & Elfakir, C. TLC-MALDI-TOF-MS-based identification of flavonoid compounds using an inorganic matrix. *Phytochem. Anal.* **30**, 218–225 (2019).
96. Nyiredy, S. Essential Guides To Method Development in Thin-Layer (Planar). *Strategy* 4652–4666 (1997).
97. Snyder, L. R. Principles of adsorption chromatography. The Separation of Nonionic Organic Compounds. Vol. 3, Chromatographic Science Series. VonL. R. Snyder. 424 S. Marcel Dekker, Inc., New York 1968. Preis: \$ 17.50. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **302**, 475–475 (1969).
98. Soczewinski, E. Solvent Composition Effects in Thin-Layer Chromatography Systems of the Type Silica Gel-Electron Donor Solvent. *Anal. Chem.* **41**, 179–182 (1969).
99. Scott, R. P. W. & Kucera, P. Solute-solvent interactions on the surface of silica gel. *J. Chromatogr. A* **149**, 93–110 (1978).
100. Spangenberg, B., Poole, C. F. & Weins, C. *Quantitative thin-layer chromatography: A practical survey. Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey* (2011).

101. Touchstone, J. C. *Practice of Thin Layer Chromatography*. (1992).
102. Snyder, L. R. Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chromatogr. Sci.* **16**, 223–234 (1978).
103. Rohrschneider, L. Solvent Characterization by Gas-Liquid Partition Coefficients of Selected Solutes. *Anal. Chem.* **45**, 1241–1247 (1973).
104. Eike Reich, A. S. *igh-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. (Thieme Medical Publishers, 2007).
105. Nyiredy, S. Planar chromatographic method development using the PRISMA optimization system and flow charts. *J. Chromatogr. Sci.* **40**, 553–563 (2002).
106. Kirchert, S., Kaiser, R. E. & Morlock, G. E. In-process quality control of wine by planar chromatography versus micro planar chromatography. *J. Chromatogr. A* **1588**, 137–149 (2019).
107. Kaiser, R. E. Anticircular high performance thin-layer chromatography. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1**, 164–168 (1978).
108. Sherma, J. Planar chromatography. *Anal. Chem.* **62**, 371R–81R (1990).
109. Habib, A. M. False-positive alkaloid reactions. *J. Pharm. Sci.* **69**, 37–43 (1980).
110. Srivastava, M. *High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)*. (Springer, 2011).
111. Bhole, R. P. & Tamboli, F. R. Development and Validation of Stability Indicating HPTLC-MS Method for Estimation of Empagliflozin in Pharmaceutical Dosage Form. **7928**, (2018).
112. Morlock, G. E. Background mass signals in tlc/hptlc-esi-ms and practical advices for use of the tlc-ms interface. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **37**, 2892–2914 (2014).
113. Loppacher, M. & Rolli, R. The new TLC-MS interface. *Camag Bibliogr. Serv.* 2–3 (2009).

114. Hage, S. & Morlock, G. E. Bioprofiling of Salicaceae bud extracts through high-performance thin-layer chromatography hyphenated to biochemical , microbiological and chemical detections. *J. Chromatogr. A* **1490**, 201–211 (2017).
115. Krüger, S., Bergin, A. & Morlock, G. E. E ff ect-directed analysis of ginger (*Zingiber o ffi cinale*) and its food products , and quanti fi cation of bioactive compounds via high-performance thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Food Chem.* **243**, 258–268 (2018).
116. Jug, U., Glavnik, V., Kranjc, E. & Vovk, I. HPTLC – densitometric and HPTLC – MS methods for analysis of flavonoids. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **41**, 329–341 (2018).
117. Mishra, J., Bhardwaj, A., Pal, M., Rajput, R. & Misra, K. High performance thin layer chromatography hyphenated with electrospray mass spectrometry for evaluation of nucleobases in two traditional Chinese medicinal mushrooms : A metabolomic approach. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **41**, 910–918 (2019).
118. D'Hondt, M., Gevaert, B., Wynendaele, E. & De Spiegeleer, B. Implementation of a single quad MS detector in routine QC analysis of peptide drugs. *J. Pharm. Anal.* **6**, 24–31 (2016).
119. Orloff, J., Utlaut, M. & Swanson, L. *High Resolution Focused Ion Beams: FIB and its Applications : the Physics of Liquid Metal Ion Sources and Ion Optics and Their Application to Focused Ion Beam Technology.* (Springer US, 2003).
120. Gaskell, S. J. SPECIAL FEATURE : Electrospray : Principles and Practice. *J. mass Spectrom.* **32**, 677–688 (1997).
121. Mellon, F. A. Mass spectrometry | Principles and Instrumentation. *Encycl. Food Sci. Nutr.* 3739–3749 (2003).
122. Dunn, W. B. Mass Spectrometry in Systems Biology: An Introduction. *Methods Enzymol.* **500**, 15–35 (2011).
123. Toniolo, C. *et al.* HPTLC determination of chemical composition variability in raw

- materials used in botanicals. *Natural Product Research* **28**, 119–126 (2014).
124. Wang, P. C. *et al.* Iridoids and sesquiterpenoids from the roots of *Valeriana officinalis*. *J. Nat. Prod.* **72**, 1682–1685 (2009).
 125. Germani, R. *et al.* Use of Innovative (Micro)Extraction Techniques to Characterise *Harpagophytum procumbens* Root and its Commercial Food Supplements. *Phytochem. Anal.* **29**, 233–241 (2017).
 126. Fujimori, N., Suzuki, T. & Ashihara, H. Seasonal variations in biosynthetic capacity for the synthesis of caffeine in tea leaves. *Phytochemistry* **30**, 2245–2248 (1991).
 127. Ito, E., Crozier, A. & Ashihara, H. Theophylline metabolism in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1336**, 323–330 (1997).
 128. Marques, V. & Farah, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chem.* **113**, 1370–1376 (2009).
 129. Do, T. K. T. 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. (Université Côte d'Azur, 2016).
 130. Physalis, L., Kranjc, E., Albreht, A., Vovk, I. & Glavnik, V. High performance thin-layer chromatography – mass spectrometry enables reliable analysis of physalins in different plant parts of. *J. Chromatogr. A* **1526**, 137–150 (2017).
 131. Vovk, I., Popović, G., Simonovska, B., Albreht, A. & Agbaba, D. Ultra-thin-layer chromatography mass spectrometry and thin-layer chromatography mass spectrometry of single peptides of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Chromatogr. A* **1218**, 3089–3094 (2011).
 132. USP40-NF35. *Hypericum perforatum* – flowering top. www.hptlc-association.org
 133. USP Dietary Supplements Compendium 2009-2010. St. John's wort herb (*Hypericum perforatum*). www.hptlc-association.org

134. Raclariu, A. C. *et al.* Comparative authentication of *Hypericum perforatum* herbal products using DNA metabarcoding , TLC and HPLC-MS. *Scientific reports* **7**, 1291 (2017).
135. 37, M. from U. Valerian root (*Valeriana officinalis*). www.hptlc-association.org
136. Singh, N., Gupta, A. P., Singh, B. & Kaul, V. K. Quantification of Valerenic Acid in *Valeriana jatamansi* and *Valeriana officinalis* by HPTLC. *Chromatographia* **63**, 209–213 (2006).
137. Modified from Ph.Eur. 6.7. Devil's claw root (*Harpagophytum procumbens* and/or *Harpagophytum zeyheri*). www.hptlc-association.org
138. Günther M, P. C. S. Comparison between HPLC and HPTLC-densitometry for the determination of harpagoside from *Harpagophytum procumbens* CO₂-extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**, 817–821 (2005).
139. Reich, E., Merfort, I., Wagner, S. & Ure, A. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Validated HPTLC methods for the determination of salicin in *Salix sp.* and of harpagoside in *Harpagophytum procumbens*. **48**, 587–591 (2008).
140. Camag. Green Tea leaf (*Camellia sinensis*). www.hptlc-association.org 1–2
141. Khan, I., Sangwan, P. & Tasduq, A. Ten marker compounds-based comparative study of green tea and guava leaf by HPTLC densitometry methods : Antioxidant activity profiling. *J. Sep. Sci.* 749–760 (2011).
142. Móricz, Á. M., Häbe, T. T., Böszörményi, A., Ott, P. G. & Morlock, G. E. Tracking and identification of antibacterial components in the essential oil of *Tanacetum vulgare* L. by the combination of high-performance thin-layer chromatography with direct bioautography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1422**, 310–317 (2015).
143. Teh, S. & Morlock, G. E. Analysis of Bioactive Components of Oilseed Cakes by High-Performance Thin-Layer Chromatography-(Bio)assay Combined with Mass Spectrometry. 125–140 (2015)

144. Dias, D. A., Urban, S. & Roessner, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* **2**, 303–36 (2012).
145. Bergmann, K.-C. & Ring, J. *History of allergy*.
146. Hooker, W. J. *et al. Medical botany: containing systematic and general descriptions, with plates of all the medicinal plants, comprehended in the catalogues of the materia medica, as published by the Royal Colleges of Physicians of London, Edinburgh, and Dublin, together with the principal medicinal plants not included in those pharmacopoeias, accompanied with a circumstantial detail of their medicinal effects, and of the diseases in which they have been most successfully employed /by William Woodville.* (J. Bohn, 1832).
147. Pelletier, C. Journal de pharmacie et des sciences accessoires. *J. Pharm. des Sci. accessoires* **7**, (1821).
148. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. & Mcphail, A. T. Plant Antitumor Agents.VI.The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325–2327 (1971).
149. Sticher, O. Natural product isolation. *Nat. Prod. Rep.* **25**, 517–554 (2008).
150. Michel, T., Destandau, E. & Elfakir, C. On-line hyphenation of centrifugal partition chromatography and high pressure liquid chromatography for the fractionation of flavonoids from *hippophae rhamnoides* l. berries. *J. Chromatogr. A* **1218**, 6173–6178 (2011).
151. Ito, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **1065**, 145–168 (2005).
152. Lin, S. *et al.* Three minor valepotriate isomers from *Valeriana jatamansi* and their cytotoxicity. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **19**, 15–21 (2017).
153. Srivastava, A., Tiwari, S. S., Srivastava, S. & Rawat, A. K. S. HPTLC method for quantification of valerenic acid in ayurvedic drug *Jatamansi* and its substitutes. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **33**, 1679–1688 (2010).

154. Mineo, L. *et al.* Valeriana officinalis Root Extract Modulates Cortical Excitatory Circuits in Humans. *Neuropsychobiology* **75**, 46–51 (2017).
155. Toolika, E., Bhat, N. & Shetty, S. A comparative clinical study on the effect of Tagara (*Valeriana wallichii* DC.) and Jatamansi (*Nardostachys jatamansi* DC.) in the management of Anidra (primary insomnia). *AYU (An Int. Q. J. Res. Ayurveda)* **36**, 46 (2015).
156. Kniebel, R. & Burchard, J. Zur Therapie depressiver Verstimmung in der Praxis. Multizentrischer Doppelblindvergleich des Baldrian-Johanniskraut-Konzentrats mit dem Standard-Antidepressivum Amitriptylin. *Z Allg Med* **64**, 689–696 (1988).
157. Estrada-Soto, S. *et al.* Vasorelaxant effect of *Valeriana edulis* ssp. *procera* (Valerianaceae) and its mode of action as calcium channel blocker. *J. Pharm. Pharmacol.* **62**, 1167–1174 (2010).
158. Vishwakarma, S., Goyal, R., Gupta, V. & Dhar, K. L. GABAergic effect of valeric acid from *Valeriana wallichii* in amelioration of ICV STZ induced dementia in rats. *Rev. Bras. Farmacogn.* **26**, 484–489 (2016).
159. Zhang, B. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of valepotriate derivatives as novel antitumor agents. *RSC Advances.* **51**, 31899-31906 (2017).
160. Gränicher, F., Christen, P. & Kapétanidis, I. Production of valepotriates by hairy root cultures of *Centranthus ruber* DC. *Plant Cell Rep.* **14**, 294–298 (1995).
161. Park, Y. J. *et al.* Transcriptome and metabolome analysis in shoot and root of *Valeriana fauriei*. *BMC Genomics.* **17**, 303 (2016).
162. Lin, S. *et al.* Three decomposition products of valepotriates from *Valeriana jatamansi* and their cytotoxic activity. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **17**, 455–461 (2015).
163. Houghton, P. J. *Valerian, the genus Valeriana.* (CRC Press Book, 1997)
164. Navarrete, A., Avula, B., Choi, Y. W. & Khan, I. A. Chemical fingerprinting of valeriana species: Simultaneous determination of valerenic acids, flavonoids, and phenylpropanoids using liquid chromatography with ultraviolet detection. *J.*

- AOAC Int.* **89**, 8–15 (2006).
165. Krithika, R. *et al.* Characterization of 10-Hydroxygeraniol Dehydrogenase from *Catharanthus roseus* Reveals Cascaded Enzymatic Activity in Iridoid Biosynthesis. *Scientific Reports.* **5**, 8258 (2015)
 166. Wang, C. *et al.* Flexible and powerful strategy for qualitative and quantitative analysis of valepotriates in *Valeriana jatamansi* Jones using high-performance liquid chromatography with linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **40**, 1906–1919 (2017).
 167. Bos, R., Woerdenbag, H. J. & Pras, N. Determination of valepotriates. *J. Chromatogr. A* **967**, 131–146 (2002).
 168. Fuzzati, N. *et al.* Isolation of antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the search for valepotriates in crude valerianaceae extracts. *Phytochem. Anal.* **7**, 76–85 (1996).
 169. Lin, S. *et al.* Mass spectrometric profiling of valepotriates possessing various acyloxy groups from *Valeriana jatamansi*. *J. Mass Spectrom.* **50**, 1294–1304 (2015).
 170. Ho, C. S. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin. Biochem.* **24**, 3–12 (2003).
 171. Lin, S. *et al.* Minor valepotriates from *Valeriana jatamansi* and their cytotoxicity against metastatic prostate cancer cells. *Planta Med.* **81**, 56–61 (2015).
 172. Wang, R. *et al.* Minor iridoids from the roots of *Valeriana wallichii*. *J. Nat. Prod.* **71**, 1254–1257 (2008).
 173. Murayama, W. *et al.* A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *J. Chromatogr. A* **239**, 643–649 (1982).
 174. Faure, K. Chromatographie de partage centrifuge - Principes et applications. *Tech. l'ingénieur* **33**, (2016).
 175. TORIBIO, A. Developpement De Nouvelles Approches Methodologiques En

Chromatographie De Partage Centrifuge En Vue De La Purification De Molecules D ' Interet. 234 (2007).

176. Berthod, A. & Armstrong, D. W. Centrifugal partition chromatography. I. General features. *J. Liq. Chromatogr.* **11**, 547–566 (1988).
177. Sangster, J. Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **18**,3 (1989).
178. Bouju, E., Berthod, A. & Faure, K. Scale-up in centrifugal partition chromatography: The 'free-space between peaks' method. *J. Chromatogr. A* **1409**, 70–78 (2015).
179. Fumat, N., Berthod, A. & Faure, K. Effect of operating parameters on a centrifugal partition chromatography separation. *J. Chromatogr. A* **1474**, 47–58 (2016).
180. Foucault, A. P., Frias, E. C., Bordier, C. G. & Le Goffic, F. Model Based on Stokes' Law as a Simple Way To Describe the Flow Pattern of the Mobile Phase in Centrifugal Partition Chromatography. *ACS Symposium Series* **593**, 62–75 (1995).
181. Marchal, L., Foucault, A., Patissier, G., Rosant, J. M. & Legrand, J. Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* **869**, 339–352 (2000).
182. Franfois Gränicher, Philippe Christen, and I. K. Production of valepotriates by hairy root cultures of *Centranthus ruber* DC. *Plant Cell Rep.* **14**, 294–298 (1995).
183. Doyle, A. M. *et al.* Nature's Sedative: Isolation and Structural Elucidation of Valtrate from *Centranthus ruber*. *J. Chem. Educ.* **81**, 1486 (2004).
184. Noltingk, B. E. & Neppiras, E. A. Cavitation produced by Ultrasonics. *Proc. Phys. Soc. Sect. B* **63**, 674–685 (1950).
185. Yuping Tang, Xin Liu, and B. Y. Iridoids from the Rhizomes and Roots of *Valeriana jatamansi*. *J. Nat. Prod.* **65**, 1949–1952 (2002).

186. Martinello, M., Cristofoli, C., Gallina, A. & Mutinelli, F. Easy and rapid method for the quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids in honey by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry: An evaluation in commercial honey. *Food Control* **37**, 146–152 (2014).
187. Avula, B. *et al.* Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. *Food Chem.* **178**, 136–148 (2015).
188. Grandval, A. & Lajoux, H. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **120**, 1–2325 (1895).
189. Gilruth, J. A. Hepatic cirrhosis affecting horses and cattle (so-called 'Winton disease'). *New Zeal. Dep. Agric.* 228–279 (1903).
190. Gilruth, J. A. Hepatic cirrhosis due to ragwort (*Senecio jacobaea*). *New Zeal. Dep. Agric.* (1904).
191. Watt, H. E. The alkaloids of *Senecio latifolius*. *J. Chem. Soc. Trans.* 466–477 (1906).
192. Willmot, F. & Robertson, G. *Senecio* disease, or cirrhosis of the liver due to *Senecio* poisoning. 848–849 (1920).
193. Bourkser, G. V. On the question of the aetiology and pathogenesis of toxic hepatitis with ascites (heliotrope toxicosis). *Hyg Sanit* **6**, 24–26 (1947).
194. CHAUVIN, P. Heliotrope poisoning in Tadjikistan. *Lancet* **341**, 1663 (1993).
195. Dübecke, A., Beckh, G. & Lüllmann, C. Pyrrolizidine alkaloids in honey and bee pollen. *Food Additives & Contaminants : Part A* **28**, 348-358 (2011).
196. Schramm, S., Köhler, N. & Rozhon, W. Pyrrolizidine Alkaloids: Biosynthesis, Biological Activities and Occurrence in Crop Plants. *Molecules* **24**, 498 (2019).
197. Bodi, D. *et al.* Determination of pyrrolizidine alkaloids in tea , herbal drugs and honey. *Food Additives & Contaminants : Part A* **3**,1886-1895 (2014)
198. Pyrrolizidine alkaloids health and safety guide. *World Heal. Organ.* 23 (1989).

199. Bundesgesundheitsamt. Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln. *Bundesgesundheitsamt* (1992).
200. Verordnung des Bundesministers für Gesundheit und öffentlicher Dienst von 5. Mai 1989 betreffend Arzneimittel, die nicht in Verkehr gebracht werden dürfen. *Bundesgesetzblatt* (1994).
201. Arrêt n° 81/2000 du 21 juin 2000. *Monit. Belge* 25044–25168 (2000).
202. FDA advises dietary supplement manufacturers to remove comfrey products from the market. *Food Drugs Adm.* (2001).
203. Panel, E. & Chain, F. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed 1. *Eur. Food Saf. Auth.* **9**, 1–134 (2011).
204. Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic , unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic , unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) Table of conten. *Eur. Med. Agency* **44**, (2014).
205. Mulder, P. P. J. *et al.* Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal- and plant-derived food: results of a survey across Europe. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **35**, 118–133 (2018).
206. Mathon, C., Edder, P. & Bieri, S. Survey of pyrrolizidine alkaloids in teas and herbal teas on the Swiss market using HPLC-MS / MS. *Anal Bioanal Chem.* **406**, 7345-7354 (2014)
207. Moreira, R., Pereira, D., Valentão, P. & Andrade, P. Pyrrolizidine Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Food Safety. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1668 (2018).
208. Robins, D. J., Bale, N. M. & Crout, D. H. G. Pyrrolizidine alkaloids. Biosynthesis of monocrotalic acid, the necic acid component of monocrotaline. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2082** (1974).
209. Langel, D., Ober, D. & Pelsler, P. B. The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the Senecioneae. *Phytochem. Rev.* **10**, 3–74

- (2011).
210. Mattocks, A. R. Spectrophotometric Determination of Unsaturated Pyrrolizidine Alkaloids. **39**, 443–447 (1967).
 211. Dann, A. T. Detection N-oxides of the pyrrolizidine alkaloids. *Nature* 1051 (1960).
 212. Mattocks, A. R. Detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.* **27**, 505–508 (1967).
 213. Wiedenfeld, H., Pastewka, U., Stengl, P. & Röder, E. Zur gaschromatographischen Bestimmung der Pyrrolizidinalkaloide aus einigen Senecioarten. *Planta Med.* **41**, 124–128 (2007).
 214. Betz, J. M., Eppley, R. M., Taylor, W. C. & Andrzejewski, D. Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial comfrey products (*Symphytum* sp.). *J. Pharm. Sci.* **83**, 649–653 (1994).
 215. Huizing, H. J., De Boer, F. & Malingré, T. M. Preparative ion-pair high-performance liquid chromatography and gas chromatography of pyrrolizidine alkaloids from comfrey. *J. Chromatogr. A* **214**, 257–262 (1981).
 216. Stelljes, M. E., Kelley, R. B., Molyneux, R. J. & Seiber, J. N. Gc-ms Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Four Senecio Species. *J. Nat. Prod.* **54**, 759–773 (1991).
 217. Wuilloud, J. C. A. *et al.* Simultaneous analysis of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and N -oxides in comfrey root by LC-ion trap mass spectrometry. 150–156 (2004).
 218. Li, S. *et al.* Identification of five hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in a commonly used traditional Chinese medicinal herb , Herba Senecionis scandentis (Qianliguang) *Herbal materials.* 591–602 (2008).
 219. These, A., Bodi, D., Ronczka, S., Lahrssen-wiederholt, M. & Preiss-weigert, A. Structural screening by multiple reaction monitoring as a new approach for tandem mass spectrometry : presented for the determination of pyrrolizidine alkaloids in plants. 9375–9383 (2013).

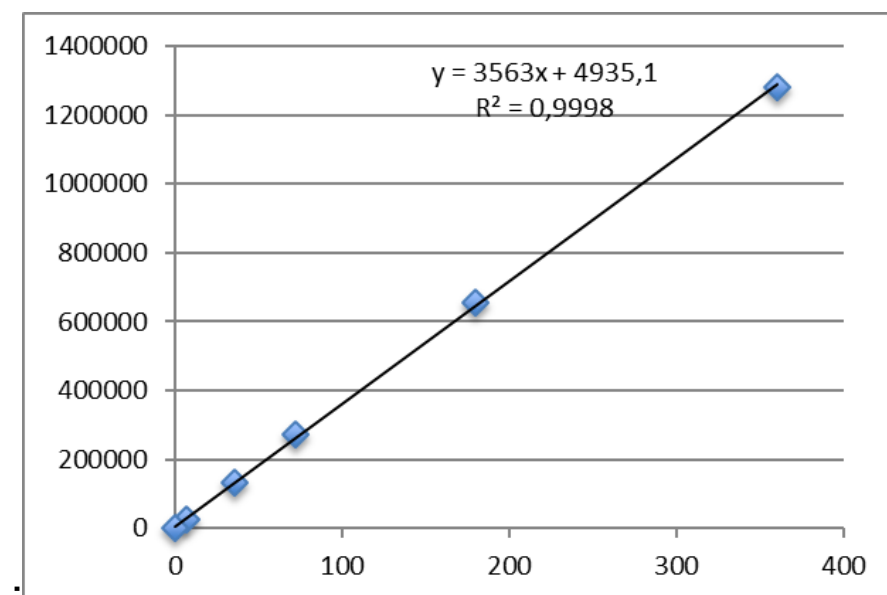
220. Wang, T. *et al.* Pyrrolizidine alkaloids in honey : Quantification with and without standards. *Food Control* **98**, 227–237 (2019).
221. Determination of pyrrolizidine alkaloids (PA) in plant material by SPE-LC-MS / MS Method Protocol. *Bundesinstitut für Arzneim. und Medizinprodukte* (2014).
222. Schoental, R. Hepatotoxic action of pyrrolizidine (Senecio) alkaloids in relation to their structure. *Nature* (1957).
223. Cushny, A. R. On the Action of Senecio Alkaloids and the Causation of Hepatic Cirrhosis in Cattle (Preliminary Note.). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **84**, 188–190 (1911).
224. Jago, M. V. A method for the assessment of the chronic hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **48**, 93–103 (1970).
225. Avula, B., Wang, Y. H., Wang, M., Smillie, T. J. & Khan, I. A. Simultaneous determination of sesquiterpenes and pyrrolizidine alkaloids from the rhizomes of *Petasites hybridus* (L.) G.M. et Sch. and dietary supplements using UPLC-UV and HPLC-TOF-MS methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **70**, 53–63 (2012).
226. Xiong, A. *et al.* UPLC-MS based metabolomics study on *Senecio scandens* and *S. vulgaris* : an approach for the differentiation of two *Senecio* herbs with similar morphology but different toxicity. *Metabolomics* **4**, 614–623 (2012).
227. Cheng, D., Nguyen, V.-T., Ndiokubwayo, N., Ge, J. & Mulder, P. P. J. Pyrrolizidine alkaloid variation in *Senecio vulgaris* populations from native and invasive ranges . *PeerJ* **5**, e3686 (2017).
228. Letsyo, E., Jerz, G., Winterhalter, P., Lindigkeit, R. & Beuerle, T. Incidence of Pyrrolizidine Alkaloids in Herbal Medicines from German Retail Markets: Risk Assessments and Implications to Consumers. *Phyther. Res.* **31**, 1903–1909 (2017).

Annexes

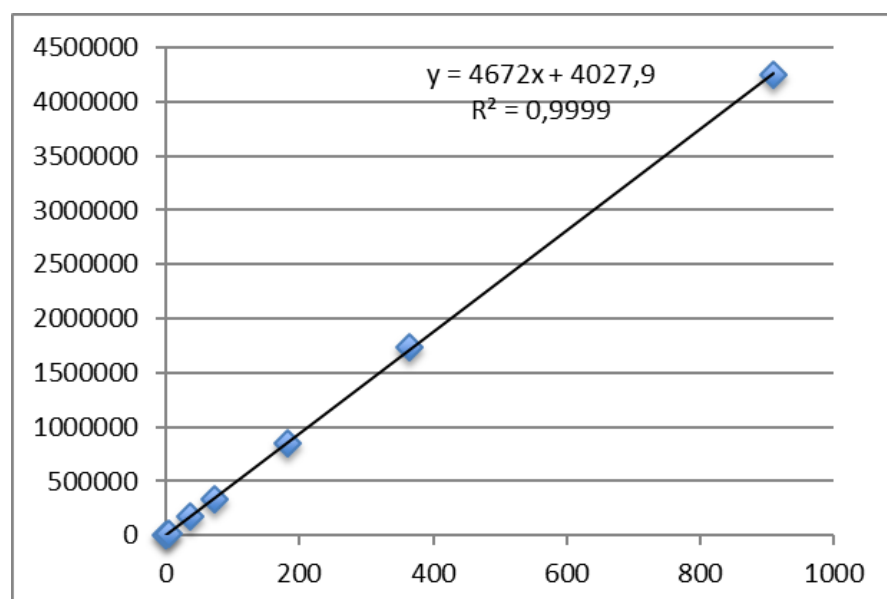
ANNEXE 1

Droites de calibration externe utilisées

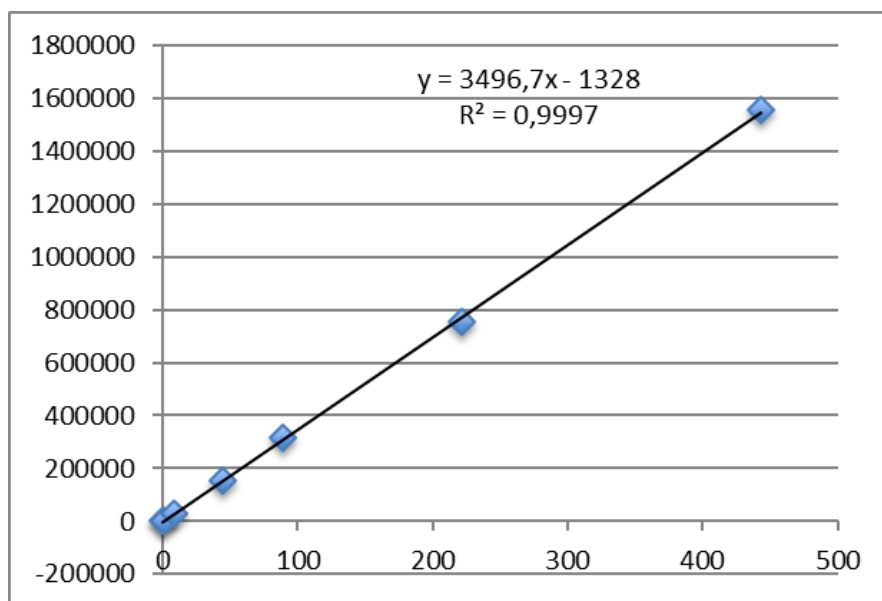
Aire en fonction de la quantité d'acide chlorogénique (ppm) à 325 nm :



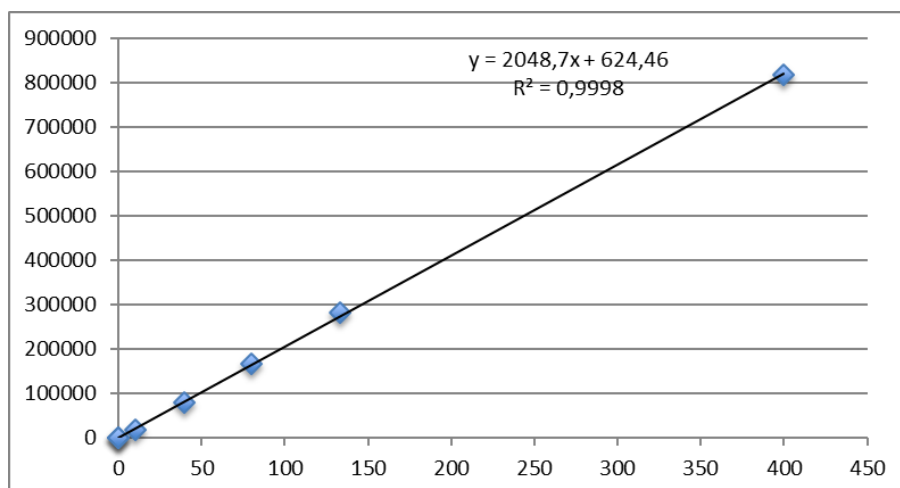
Aire en fonction de la quantité de caféine (ppm) à 272 nm :



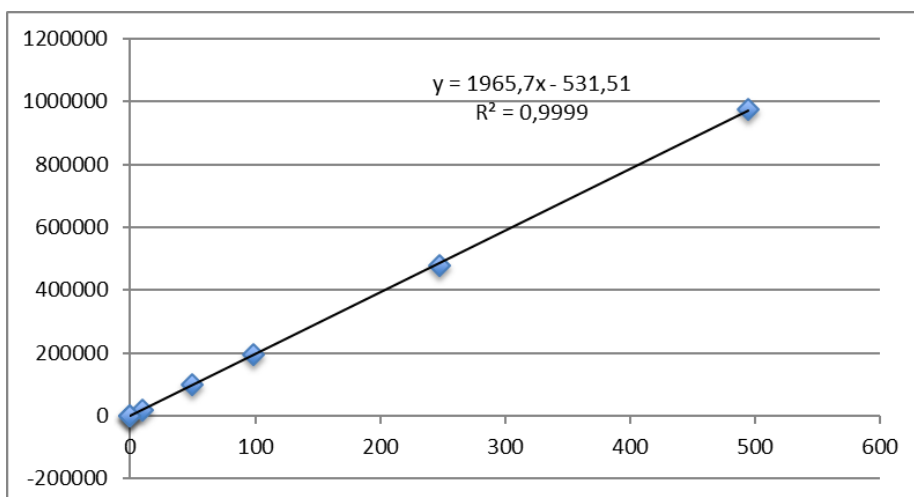
Aire en fonction de la quantité de Harpagoside (ppm) à 280 nm :



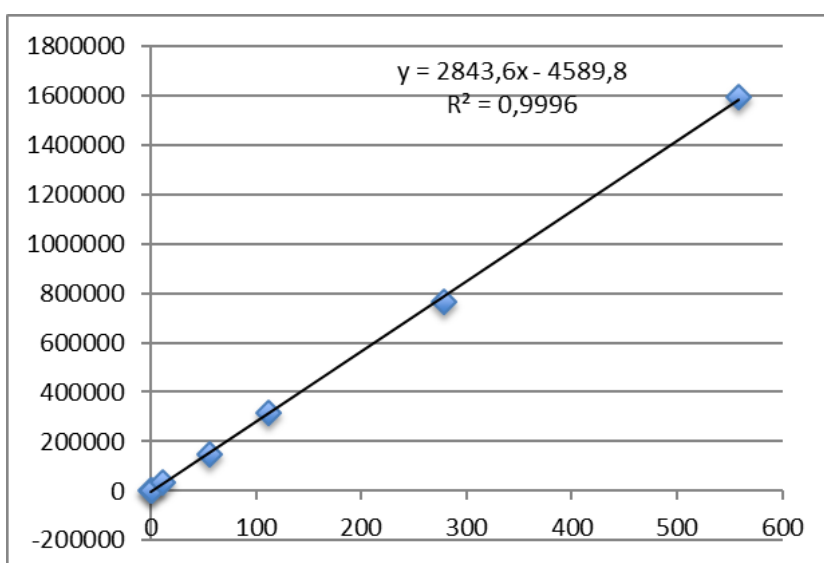
Aire en fonction de la quantité d'isoquercitrine (ppm) à 354 nm :



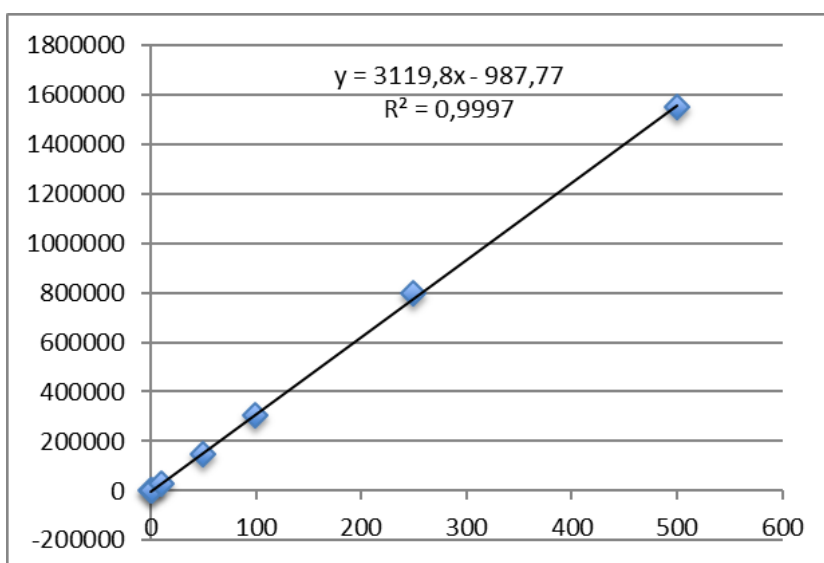
Aire en fonction de la quantité de Rutine (ppm) à 353 nm :



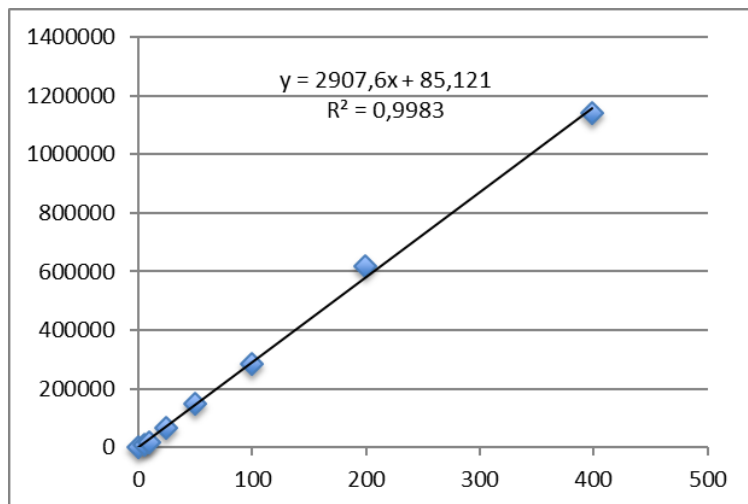
Aire en fonction de la quantité de Theophylline (ppm) à 272 nm :



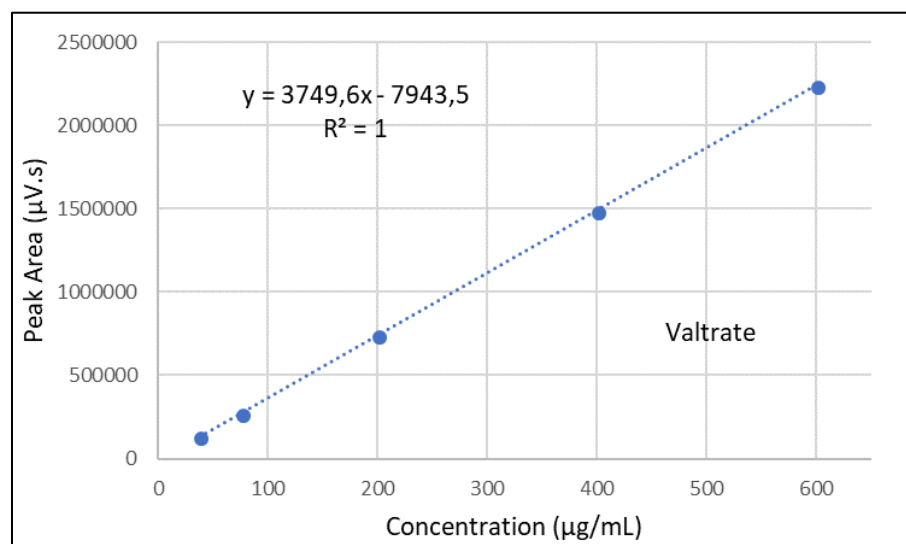
Aire en fonction de la quantité de Verbascoide (ppm) à 330 nm :



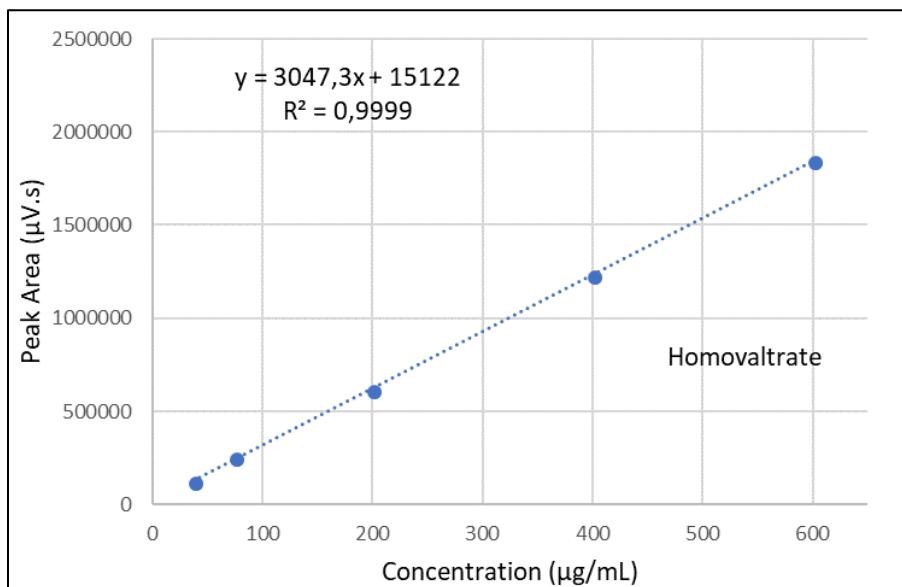
Aire en fonction de la quantité d'hypericine (ppm) à 580 nm



Aire en fonction de la quantité de valtrate (ppm) à 254 nm :

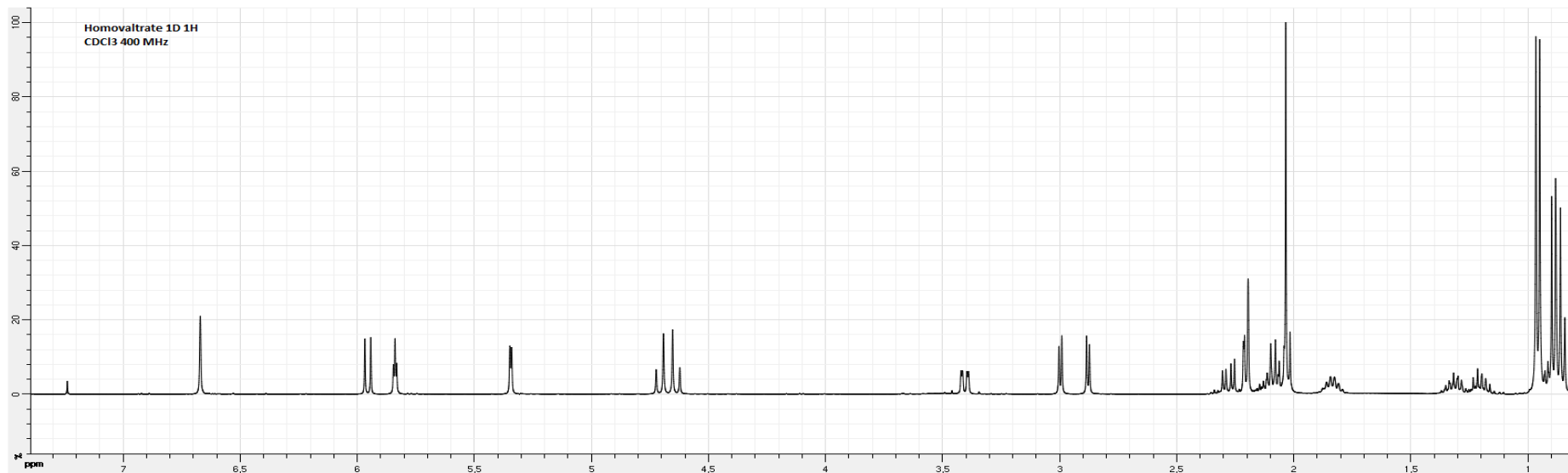


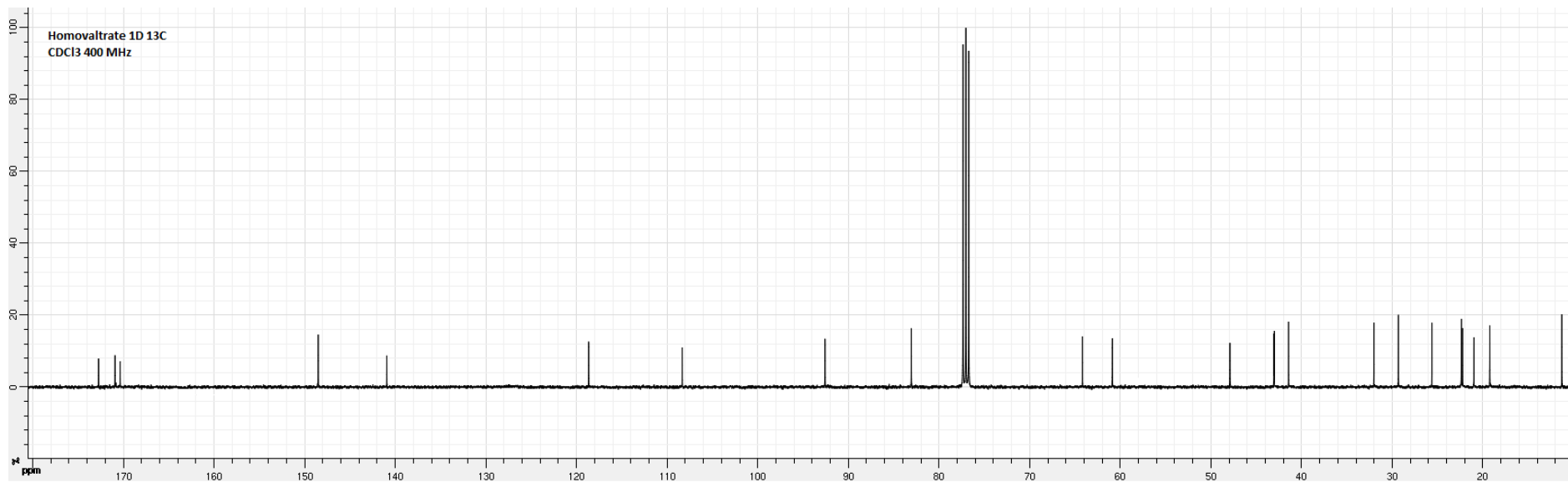
Aire en fonction de la quantité de 7-homovaltrate (ppm) à 254 nm :

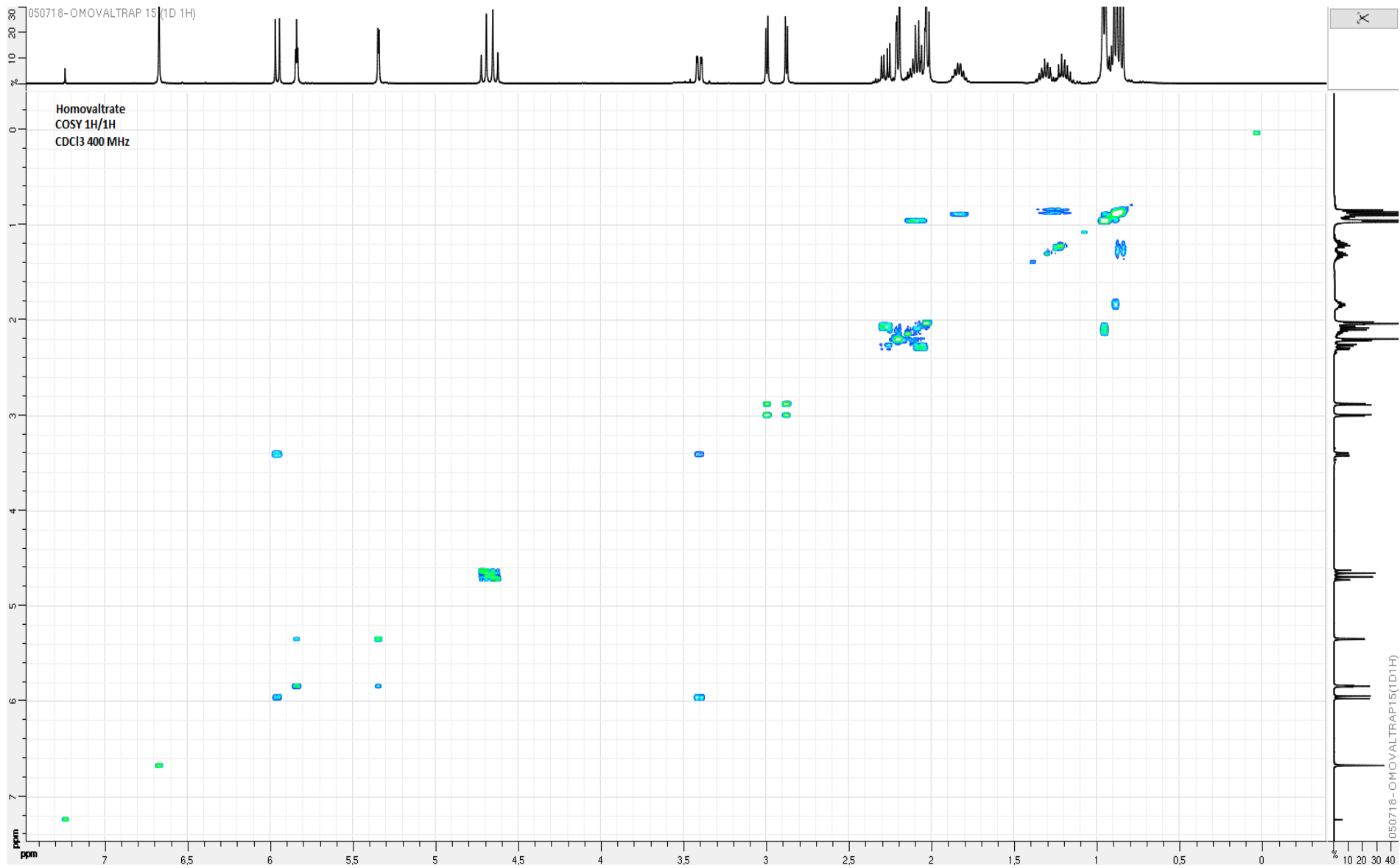


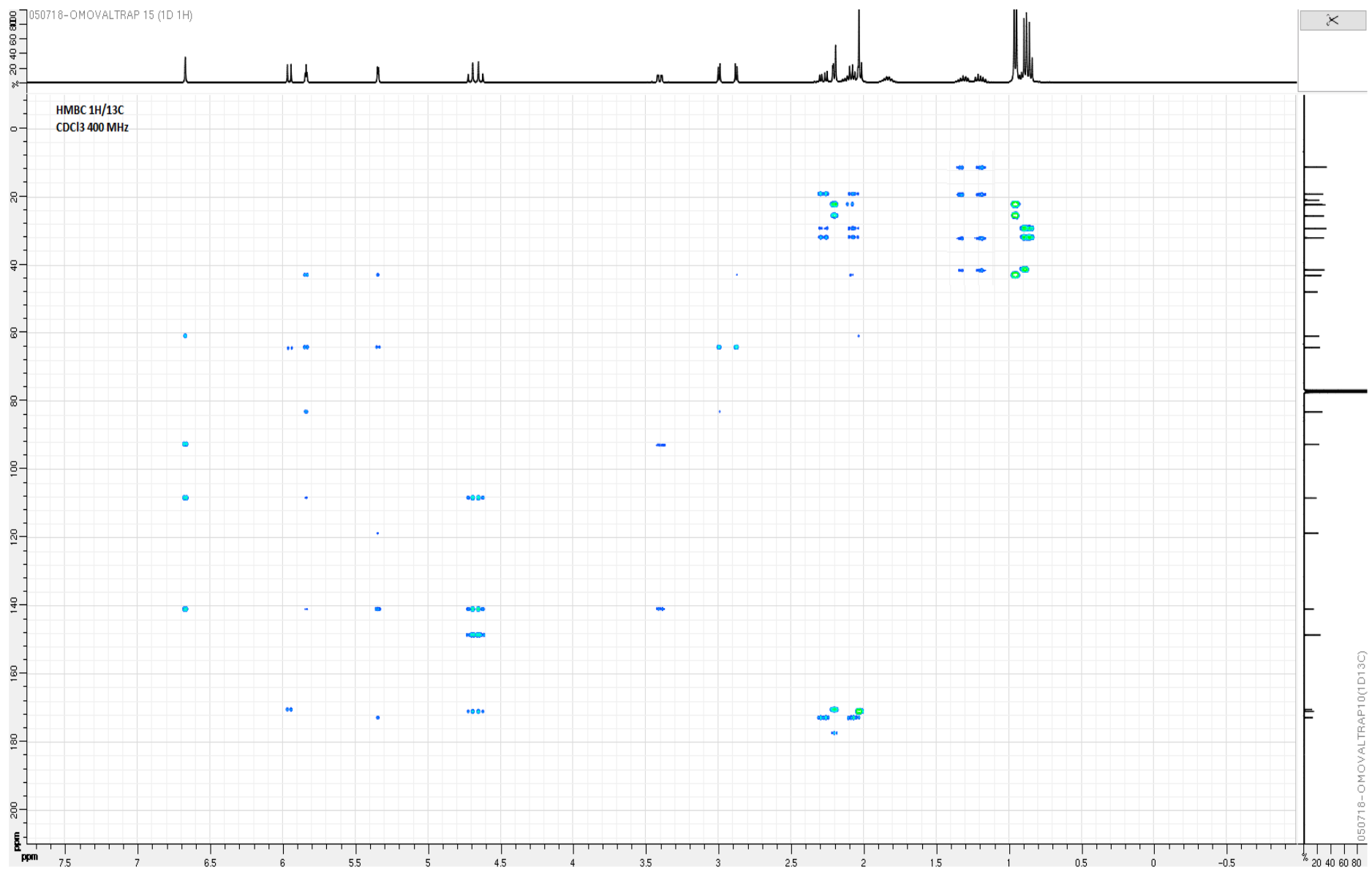
ANNEXE 2

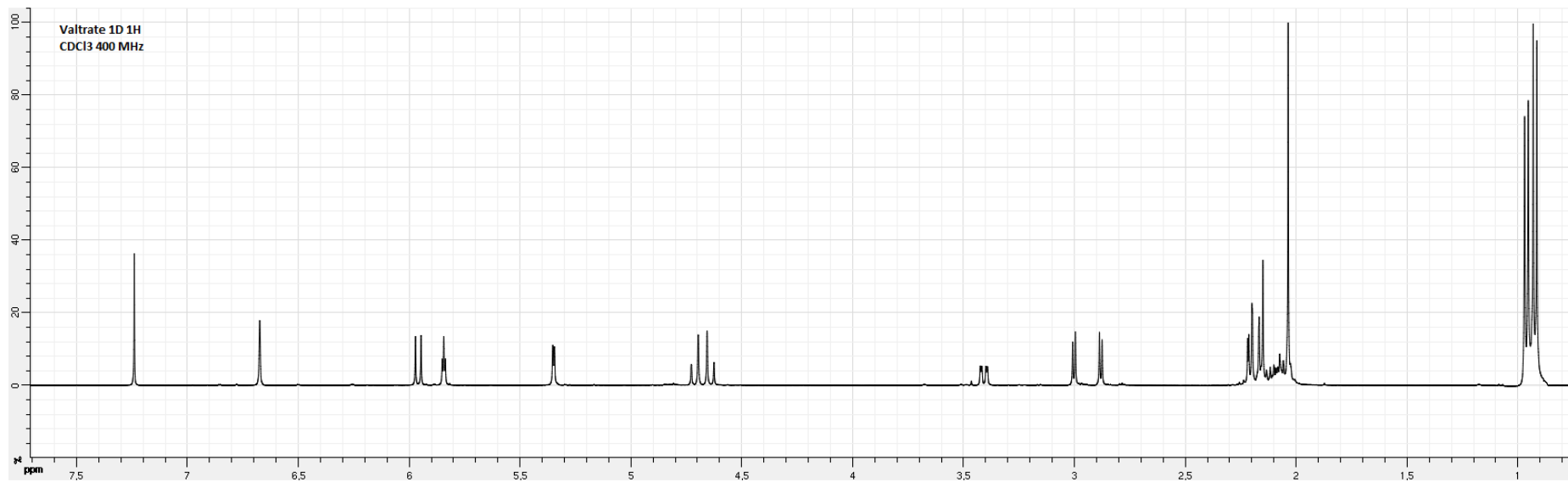
Spectres RMN

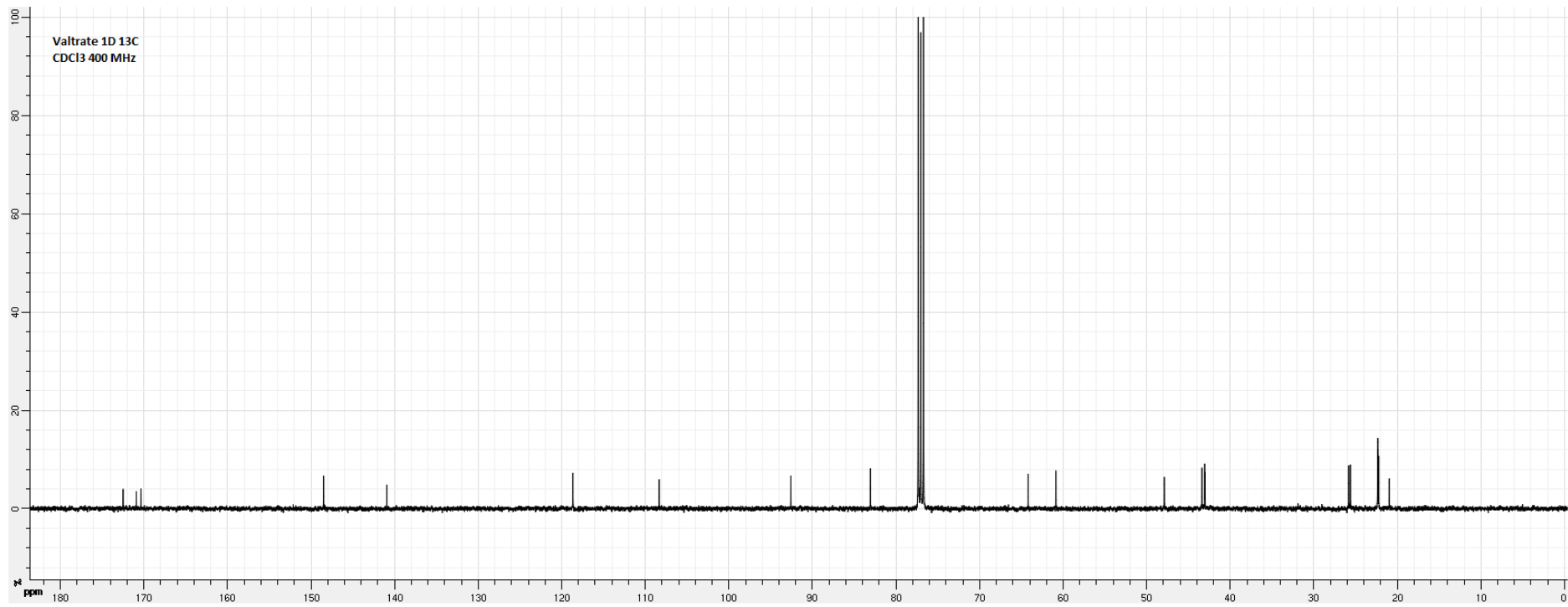












ANNEXE 3

Certificats d'analyses des standards analytiques étudiés

Latin name	<i>Hypericum perforatum</i> L.		
Family	Hypericaceae		
Part used	Aerial parts		
Origin (if confirmed)	-		
Batch number	BS1216	Reference	B0145
Validation date	12.jan.2018	Expiration date	Dec.2021
Storage condition	Protected from light, Keep below 25°C		



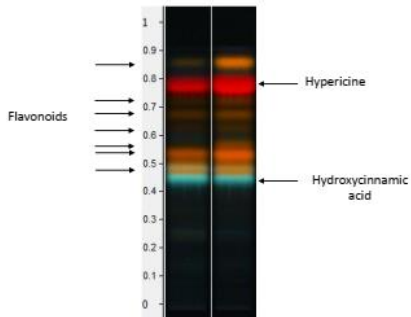
CONCLUSION OF STUDIES

ACCEPTATION CRITERIA	SPECIFIC MARKERS	PROFILE
ORGANOLEPTIC	Taste and odour slightly sweet, bitter, and astringent	Compliant
MICROSCOPY / MACROSCOPY	3-sided pollen grain (1), Top of an anther with hypericin idioblast (2), Hypericin idioblast on the leaf margin (3), Transverse section of the lamina with an excretory gland in the mesophyll (4)	Compliant
CCM / HPTLC	Hypericine, Hydroxycinnamic and Flavonoids	Compliant
HPLC / UHPLC	Flavonols (Hyperoside, Quercetin-rhamn, Quercetin), Flavanols (Epicatechin), Flavones (Biflavones), Hydroxycinnamic acids (Caffeoylquinic acid), Naphtodianthrones (Hypericin, Pseudohypericin), Prenylated phloroglucinol (Hyperforin, Adhyperforin)	Compliant

Compiled by : Technical Director Signature :	Released by : Scientific Director Signature :	GENERAL CONCLUSION COMPLIANT
BOTANICERT Certification botanique et Phyto-chimique Espace Jacques-Louis Lions 4, Traversée Dupont 06130 Grasse - France Tél : +33 (0)4 89 85 80 27 Email : contact@botanicert.com		

CCM / HPTLC STUDY

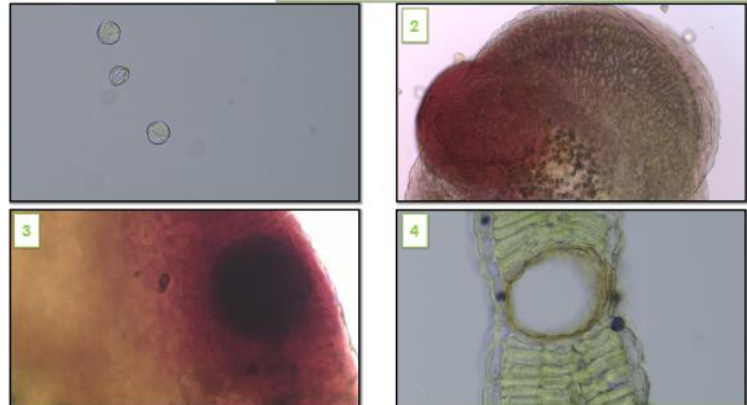
HPTLC (CAMAG)
Under 366 nm after derivatization



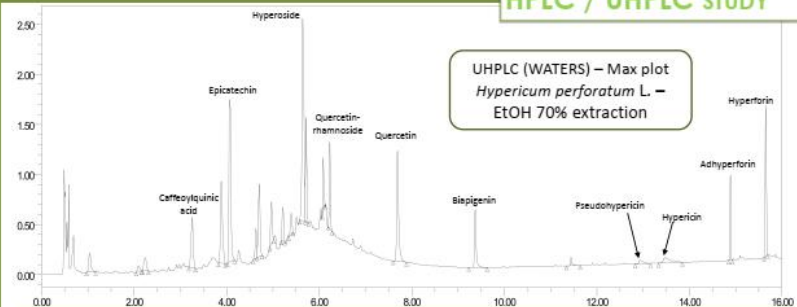
1: *Hypericum perforatum* L. – H₂O extraction
2: *Hypericum perforatum* L. – EtOH 70% extraction

CHROMATOGRAPHIC CONDITION	
PLATE	SiOH
MOBILE PHASE	AcOEt / Form. Ac. / Acetic. Ac. / H ₂ O (100/11/11/26)
DERIVATIZATION	NP-PEG
DETECTION	Under 366 nm after derivatization
SAMPLE'S PREPARATION	1 g into 10 g of solvent – sonicate during 10 minutes
VOLUME APPLICATION	2 µL
MARKERS	Hypericine, Hydroxycinnamic and Flavonoids
COMMENTS	All expected compounds are found

MICROSCOPY / MACROSCOPY STUDY



HPLC / UHPLC STUDY



CHROMATOGRAPHIC CONDITION	
COLUMN	C18 or equivalent
MOBILE PHASE	H ₂ O / MeOH or H ₂ O / ACN
DETECTION	Max plot: Flavonols, Flavanol, Hydroxycinnamic acids, Naphtodianthrones, Prenylated phloroglucinol
SAMPLE'S PREPARATION	1 g into 10 g of solvent – sonicate during 10 minutes
VOLUME	1 µL (UHPLC) or 10 µL (HPLC)
MARKERS	Flavonols (Hyperoside, Quercetin-rhamn, Quercetin), Flavanols (Epicatechin), Flavones (Biflavones), Hydroxycinnamic acids (Caffeoylquinic acid), Naphtodianthrones (Hypericin, Pseudohypericin), Prenylated phloroglucinol (Hyperforin, Adhyperforin)
COMMENTS	All expected compounds are found

Latin name	Valeriana officinalis L.		
Family	Caprifoliaceae		
Part used	Roots and rhizome		
Origin (if confirmed)	-		
Batch number	BS429	Reference	B0047
Validation date	12.jan.2018	Expiration date	Dec.2021
Storage condition	Protected from light, Keep below 25°C		



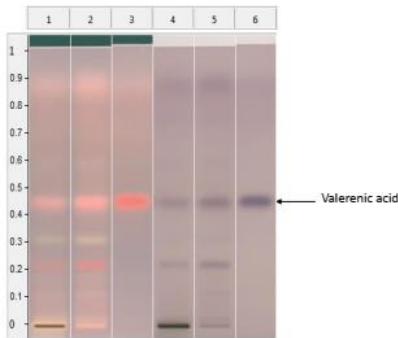
CONCLUSION OF STUDIES

ACCEPTATION CRITERIA	SPECIFIC MARKERS	PROFILE
ORGANOLEPTIC	Characteristic odour, sweetish, spicy and bitter taste	Compliant
MICROSCOPY / MACROSCOPY	Cells containing a pale brown resin and droplet of essential oil (1), lignified reticulately-thickened vessels (2), Group of rectangular sclereids (3), Starch granules (4)	Compliant
CCM / HPTLC	Valerenic acid	Compliant
HPLC / UHPLC	Chlorogenic acid, Pinosresinol-4,4'-di-O-beta-D-glucoside, Hydroxyvalerenic acid, Valerenic acid, Valtrate, Isovaltrate	Compliant

Compiled by : Technical Director Signature :	Released by : Scientific Director Signature :	GENERAL CONCLUSION COMPLIANT
BOTANICERT Certification botanique et phyto-chimique Espace Jacques-Louis Lions 4, Traversée Dupont 06130 Grasse - France Tél : +33 (0)4 89 95 80 27 Email : contact@botanicert.com		

CCM / HPTLC STUDY

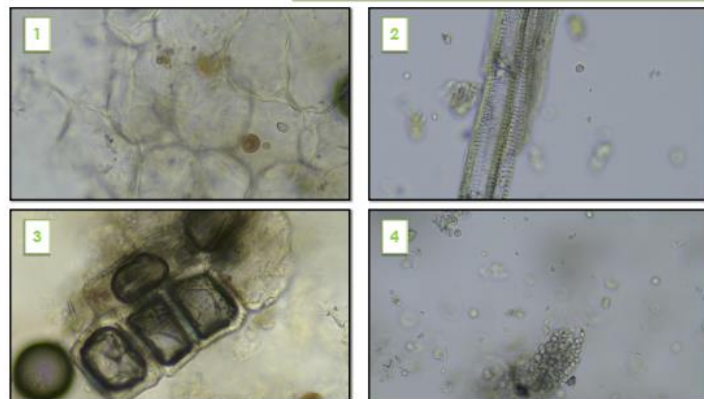
HPTLC (CAMAG)
Under 366nm and visible light after derivatization



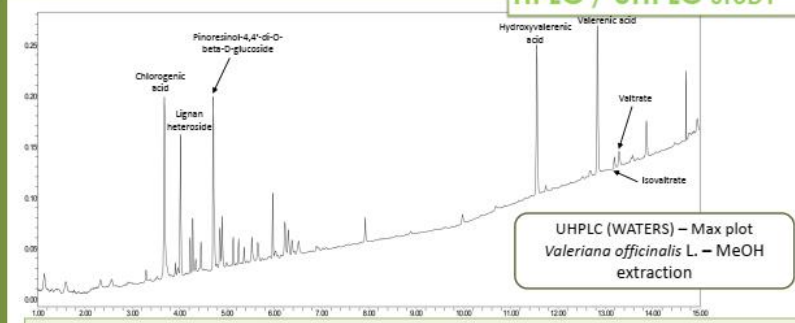
1,4: *Valeriana officinalis* L. – MeOH extraction
 2,5: *Valeriana officinalis* L. – Toluene extraction
 3,6: Valerenic acid (Analytical standard)

CHROMATOGRAPHIC CONDITION	
PLATE	SiOH
MOBILE PHASE	Hexane/Ethyl Acetate/Acetic Acid (65/35/0,5)
DERIVATIZATION	Anisaldehyde
DETECTION	Under 366 nm and visible light after derivatization
SAMPLE'S PREPARATION	1 g into 10 g of solvent – sonicate during 10 minutes
VOLUME APPLICATION	2 µL
MARKERS	Valerenic acid
COMMENTS	All expected compounds are found

MICROSCOPY / MACROSCOPY STUDY



HPLC / UHPLC STUDY



UHPLC (WATERS) – Max plot
Valeriana officinalis L. – MeOH extraction

CHROMATOGRAPHIC CONDITION	
COLUMN	C18 or equivalent
MOBILE PHASE	H2O / MeOH or H2O / ACN
DETECTION	Max plot: Valerenic acids, Lignans, Hydroxycinnamic acids, Valpotriates
SAMPLE'S PREPARATION	1 g into 10 g of solvent – sonicate during 10 minutes
VOLUME	1 µL (UHPLC) or 10 µL (HPLC)
MARKERS	Chlorogenic acid, Pinosresinol-4,4'-di-O-beta-D-glucoside, Hydroxyvalerenic acid, Valerenic acid, Valtrate, Isovaltrate
COMMENTS	All expected compounds are found

Latin name	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze		
Family	Theaceae		
Part used	Leaves		
Origin (if confirmed)	-		
Batch number	BS855	Reference	B0043
Validation date	12.jan.2018	Expiration date	Dec.2021
Storage condition	Protected from light, Keep below 25°C		

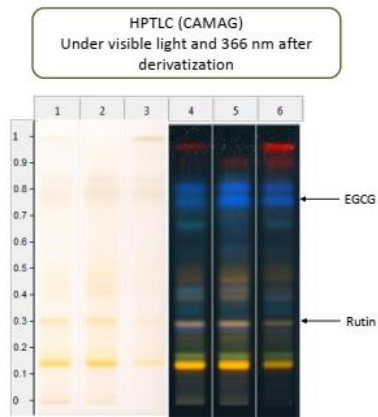


CONCLUSION OF STUDIES

ACCEPTATION CRITERIA	SPECIFIC MARKERS	PROFILE
ORGANOLEPTIC	Brown reddish colour, odourless	Compliant
MICROSCOPY / MACROSCOPY	Unicellular thick walled trichomes of the epidermis (1), branched idioblasts of the mesophyll (2), clusters of calcium oxalate (3), Stomata (4)	Compliant
CCM / HPTLC	Rutin, EGCG	Compliant
HPLC / UHPLC	Flavan-3-ol (EGCG, EGC, EC, ECG, GC, C), Phenolic acid (Gallic acid), Flavonoids	Compliant

Compiled by : Technical Director Signature :	Released by : Scientific Director Signature :	GENERAL CONCLUSION COMPLIANT
BOTANICERT Certification botanique et Phytotechnique Espace Jacques-Louis Lions 4, Traverse Dupont 06130 Grasse - France Tél : +33 (0)4 89 85 60 27 email : contact@botanicert.com		

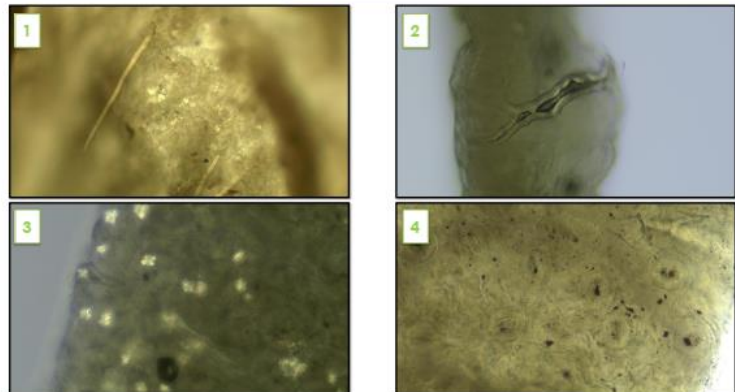
CCM / HPTLC STUDY



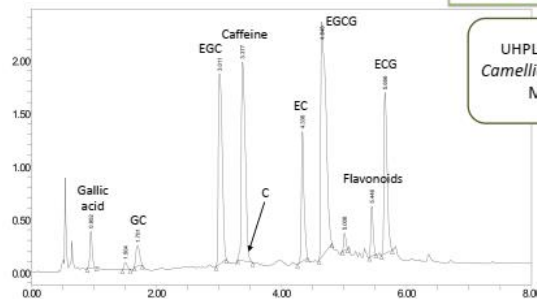
1,4: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze – H₂O extraction
 2,5: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze – EtOH 50% extraction
 3,6: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze – MeOH extraction

CHROMATOGRAPHIC CONDITION	
PLATE	SiOH
MOBILE PHASE	AcOEt / Form. Ac. / Acetic. Ac. / H ₂ O (100/11/11/26)
DERIVATIZATION	NP-PEG
DETECTION	Under 366 nm and visible light after derivatization
SAMPLE'S PREPARATION	1 g into 10 g of solvent – sonicate during 10 minutes
VOLUME APPLICATION	2 µL
MARKERS	Rutin
COMMENTS	All expected compounds are found

MICROSCOPY / MACROSCOPY STUDY



HPLC / UHPLC STUDY



CHROMATOGRAPHIC CONDITION	
COLUMN	C18 or equivalent
MOBILE PHASE	H ₂ O / MeOH or H ₂ O / ACN
DETECTION	270nm : Flavan-3-ol derivatives and Flavonoids
SAMPLE'S PREPARATION	1 g into 10 g of solvent – sonicate during 10 minutes
VOLUME	1 µL (UHPLC) or 10 µL (HPLC)
MARKERS	Flavan-3-ol (EGCG, EGC, EC, ECG, GC, C), Phenolic acid (Gallic acid), Flavonoids
COMMENTS	All expected compounds are found

Latin name	<i>Urtica dioica</i> L.		
Family	Urticaceae		
Part used	Root and Rhizome		
Origin (if confirmed)	-		
Batch number	BS1366	Reference	B0160
Validation date	15.June.2018	Expiration date	June. 2021
Storage condition	Protected from light, Keep below 25°C		



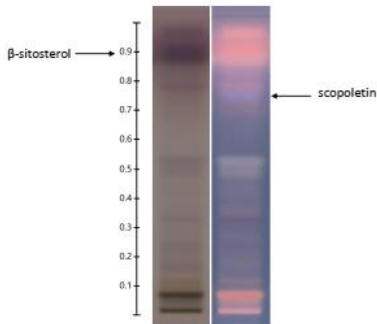
CONCLUSION OF STUDIES

ACCEPTATION CRITERIA	SPECIFIC MARKERS	PROFILE
ORGANOLEPTIC	Faint odour	Compliant
MICROSCOPY / MACROSCOPY	General organisation of the rhizome in transverse section (1), Cork with brown thin walled elongated cells and fibers in the cortical parenchyma (2), Calcium oxalate druses in the parenchyma (3), Big xylem vessels in transverse section (4)	Compliant
TLC / HPTLC	β -sitosterol and scopoletin	Compliant
HPLC / UHPLC	Hydroxycinnamic acids (p-coumaric acid, Ferulic acid), Lignans	Compliant

Compiled by : Technical Director Signature :	Released by : Scientific Director Signature :	GENERAL CONCLUSION COMPLIANT
BOTANICERT Certification botanique et Phyto-chimique Espace Jacques-Louis Lions 4, Traverse Dupont 06130 Grasse - France Tel : +33 (0)4 89 95 60 27 email : contact@botanicert.com		

TLC / HPTLC STUDY

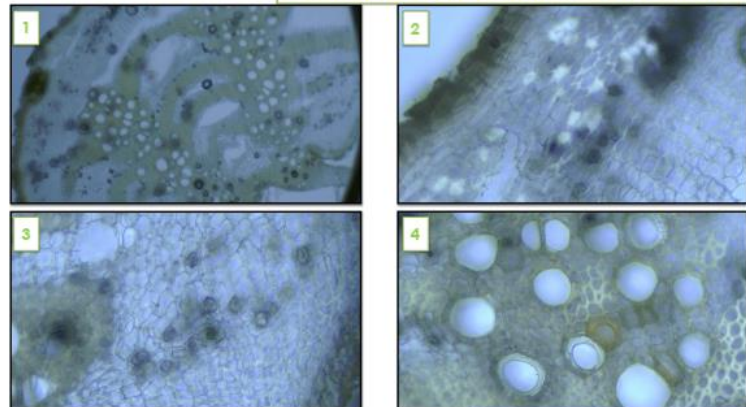
HPTLC (CAMAG)
Under visible light and 366 nm after derivatization



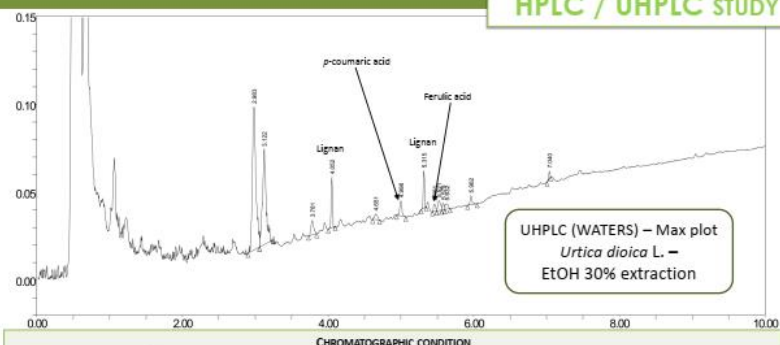
Urtica dioica L. – MeOH extraction

CHROMATOGRAPHIC CONDITION	
PLATE	SiOH
MOBILE PHASE	Formic Acid / MeOH / H ₂ O / AcOEt (2,5/4/4/50) (v/v/v/v)
DERIVATIZATION	Anisaldehyde
DETECTION	Under 366 nm after derivatization
SAMPLE'S PREPARATION	1 g into 10 g of solvent – sonicate during 10 minutes
VOLUME APPLICATION	2 μ l
MARKERS	β -sitosterol and scopoletin
COMMENTS	All expected compounds are found

MICROSCOPY / MACROSCOPY STUDY



HPLC / UHPLC STUDY



CHROMATOGRAPHIC CONDITION	
COLUMN	C ₁₈ or equivalent
MOBILE PHASE	H ₂ O / MeOH or H ₂ O / ACN
DETECTION	Max plot: Hydroxycinnamic acids, Lignans
SAMPLE'S PREPARATION	1 g into 5 g of solvent – sonicate during 10 minutes
VOLUME	1 μ l (UHPLC) or 10 μ l (HPLC)
MARKERS	Hydroxycinnamic acids (p-coumaric acid, Ferulic acid), Lignans
COMMENTS	All expected compounds are found

Latin name	Harpagophytum procumbens (Burch.) DC. ex Meisn.		
Family	Pedaliaceae		
Part used	Root		
Origin (if confirmed)	-		
Batch number	BS057	Reference	B0015
Validation date	12.jan.2018	Expiration date	Dec.2021
Storage condition	Protected from light, Keep below 25°C		



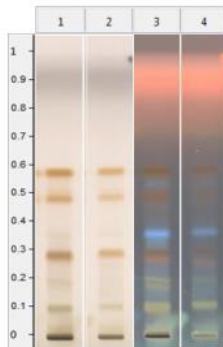
CONCLUSION OF STUDIES

ACCEPTATION CRITERIA	SPECIFIC MARKERS	PROFILE
ORGANOLEPTIC	Greyish-brown or dark brown colour, very bitter taste	Compliant
MICROSCOPY / MACROSCOPY	fragment of the cork (1), cortical parenchyma (2), reticulated vessel (3), polygonal sclereid (4)	Compliant
CCM / HPTLC	Iridoids	Compliant
HPLC / UHPLC	Iridoids (Harpagoside, Harpagide) and Hydroxycinnamic acids	Compliant

Compiled by : Technical Director Signature :	Released by : Scientific Director Signature :	GENERAL CONCLUSION COMPLIANT
BOTANICERT Certification botanique et Phyto-chimique Espace Jacques-Louis Lions 4, Traverse Dupont 06130 Grasse - France Tél : +33 (0)4-89-85 60 27 email : contact@botanicert.com		

CCM / HPTLC STUDY

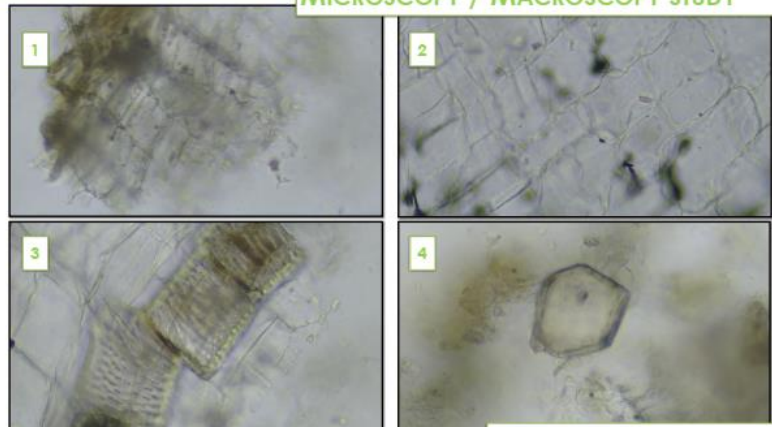
HPTLC (CAMAG)
Under visible light and 366 nm after derivatization



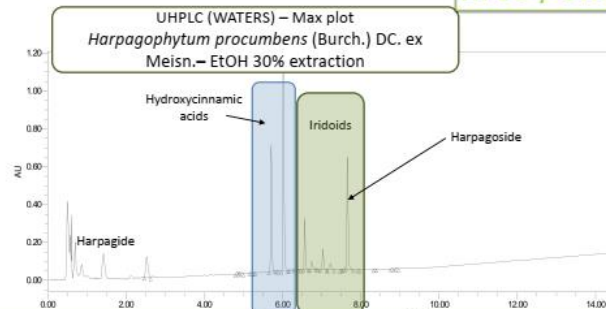
1,3: *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn. – EtOH 30% extraction
 2,4: *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn. – MeOH extraction

CHROMATOGRAPHIC CONDITION	
PLATE	SiOH
MOBILE PHASE	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (60/35/5)
DERIVATIZATION	Anisaldehyde
DETECTION	Under 366 nm and visible light after derivatization
SAMPLE'S PREPARATION	1 g into 10 g of solvent – sonicate during 10 minutes
VOLUME APPLICATION	2 µL
MARKERS	Iridoids
COMMENTS	All expected compounds are found

MICROSCOPY / MACROSCOPY STUDY



HPLC / UHPLC STUDY



CHROMATOGRAPHIC CONDITION	
COLUMN	C18 or equivalent
MOBILE PHASE	H ₂ O / MeOH or H ₂ O / ACN
DETECTION	280 nm: Iridoids
SAMPLE'S PREPARATION	1 g into 5 g of solvent – sonicate during 10 minutes
VOLUME	1 µL (UHPLC) or 10 µL (HPLC)
MARKERS	Iridoids, Harpagoside
COMMENTS	All expected compounds are found

ANNEXE 4

Rapport d'analyses d'un dosage des alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux

Espace Jacques Louis Lions
4 traverse Dupont
06130 Grasse
France
contact@botanicert.com



Bulletin d'analyse – P4221

PROJET	4221
CODE CLIENT	C013
OBJECTIF DU PROJET	<ul style="list-style-type: none">• UHPLC/HRMS : dosage des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans un échantillon de ES Mélisse F.
METHODE D'ANALYSE	Méthode interne 2 résultats : 1 - Avec recherche des 16 alcaloïdes suivants : Intermedine, lycopsamine, heliotrine, heliotrine-N-oxide, echimidine, lasiocarpine, lasiocarpine-N-oxide, monocrotaline, monocrotaline-N-oxide, retrorsine, retrorsine-N-oxide, trichodesmine, seneciophylline, seneciophylline-N-oxide, senecionine, senecionine-N-oxide, senkirkine 2 – Avec recherche exhaustive des alcaloïdes pyrrolizidiniques
LABORATOIRE	BOTANICERT
ANALYSTE	MCC, JD
DATE DE RECEPTION	2017.08.11

DATE : 22.08.2017
ANALYSTE: Loïc Loffredo

DATE : 22.08.2017
APPROUVE: M. Hadji-Minaglou

BOTANICERT
Certification botanique
et Phyto-chimique
Espace Jacques-Louis Lions
4, Traverse Dupont
06130 Grasse - France
Tél : +33 (0)4 89 85 60 27
email : contact@botanicert.com

Les Déclarations et les interprétations fournies dans ce rapport est l'opinion de Laboratoire BOTANICERT. Les résultats d'essai correspondent aux échantillons énumérés seulement et ne peuvent pas être généralisés. Ce rapport ou n'importe quelle partie de cela ne seront pas copiés sans permission écrite de Laboratoire BOTANICERT.

Authentification botanique et phytochimique

SAS au capital de 71000 Euros, **NFA** : 7112B ; **RCS** : 529.468.134 Grasse ; **Siret** : 529.468.13400018

N° TVA intracommunautaire : FR23529468134

Page 1 de 6

SOMMAIRE

1. Analyse par HPLC	3
1.1. Echantillons et standards.....	3
1.2. Equipements	3
1.3. Préparation des échantillons	3
1.4. Mode de détection	4
1.5. Standards analytiques utilisés	5
1.6. Chromatogramme de l'échantillon CLIENT	5
2. Conclusion Générale	6

1. ANALYSE PAR HPLC

1.1. Echantillons et standards

NUMERO	DESCRIPTION	LOT
CS5831	ES Melisse F.	246201
AS440	Heliotrine	Standard analytique
AS444	Heliotrine N-oxide	Standard analytique
AS443	Lasiocarpine	Standard analytique
AS301	Lycopsamine	Standard analytique
AS292	Monocrotaline	Standard analytique
AS439	Monocrotaline N-oxide	Standard analytique
AS438	Retrorsine	Standard analytique
AS437	Retrorsine N-oxide	Standard analytique
AS436	Senecionine	Standard analytique
AS445	Seneciphylline	Standard analytique

1.2. Equipements

NOM, ARTICLE	FOURNISSEUR
UHPLC Acquity H-Class, Xevo G2 QTOF, PDA, ELSD,	WATERS
Bain Ultrason	VWR
Balance analytique	OHAUS-Pioneer

1.3. Préparation des échantillons

NUMERO D'ECHANTILLON	DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON
S21061	490,1 mg de CS5831 dans 5,0173 g de MeOH

1.4. Mode de détection

- Détecteur : HRMS, ESI+ à CV=30V

Le premier résultat se base sur le dosage des 17 alcaloïdes pyrrolizidiniques devant faire l'objet d'un contrôle selon le BfR (Institut fédéral allemand d'évaluation des risques). Le second résultat est un dosage des alcaloïdes totaux basé sur une liste étendue (BfR + alcaloïdes pyrrolizidiniques référencés dans la littérature).

Composés recherchés	
1- Dosage de 17 alcaloïdes	echimidine*
	heliotrine
	heliotrine n oxyde
	intermedine*
	lasiocarpine
	lasiocarpine n oxyde*
	lycopsamine
	lycopsamine n oxyde
	monocrotalline
	monocrotalline n oxyde
	retrorsine
	retrorsine noxyde
	senecionine
	senecionine n oxyde*
	seneciphylline
	seneciphylline n oxyde*
	senkirkin*
trichodesmine*	

Composés recherchés	
2- Alcaloïdes complémentaires (littérature)	7 acetyl intermedine
	7 acetyl intermedine n oxyde
	7 acetyl lycopsamine
	echimidine n oxyde
	erucifoline
	erucifoline n oxyde
	europine n oxyde
	indicine n oxyde
	intermedine n oxyde
	jacobine
	jacobine n oxyde
	retronecine
	senecivernine
	senecivernine n oxyde
	senkirkin
trichodesmine	

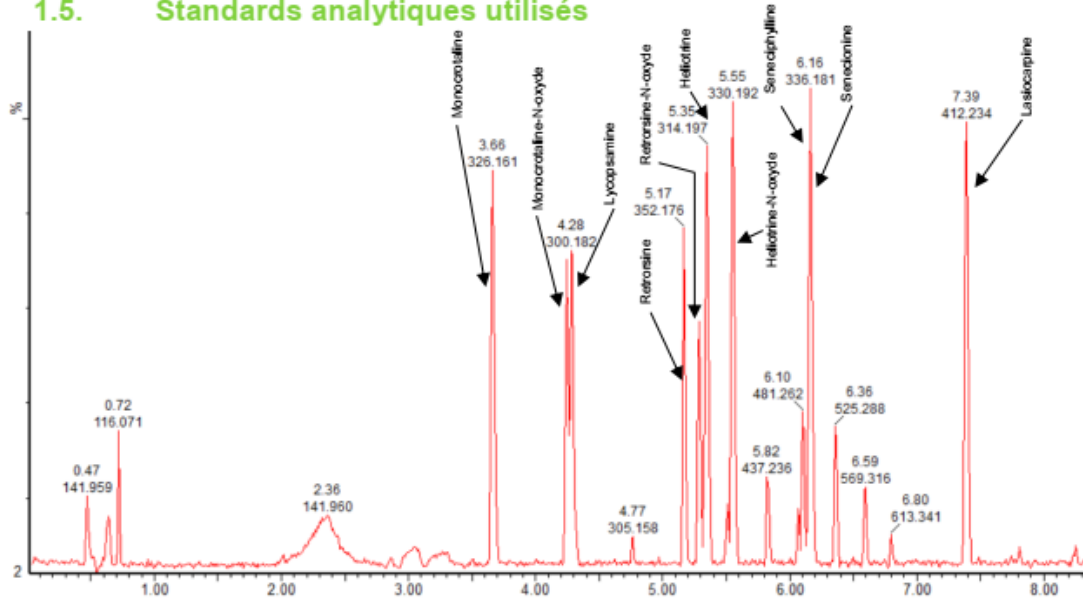
* Dosé en équivalence d'un standard analytique de la même famille

Authentification botanique et phytochimique

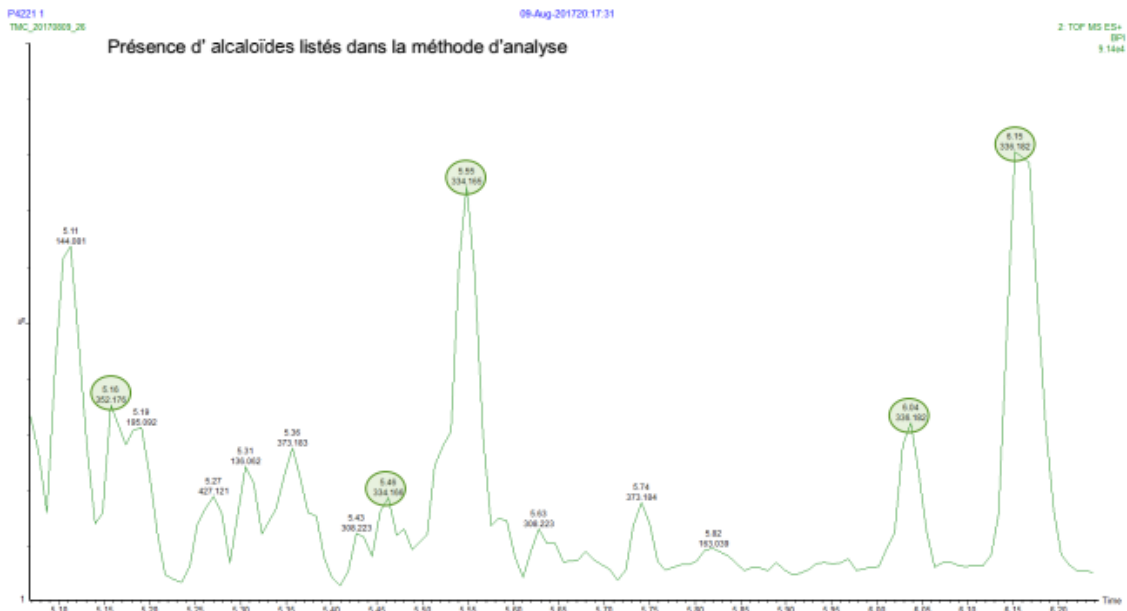
SAS au capital de 71000 Euros, NFA : 7112B ; RCS : 529.468.134 Grasse ; Siret : 529.468.13400018

N° TVA intracommunautaire : FR23529468134

1.5. Standards analytiques utilisés



1.6. Chromatogramme de l'échantillon CLIENT



Des alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été identifiés et quantifiés : la sénécionine, la sénéciphylline, la rétroisine, un dérivé de la sénécionine ainsi qu'un dérivé de la sénéciphylline.

Authentification botanique et phytochimique

SAS au capital de 71000 Euros, NFA : 7112B ; RCS : 529.468.134 Grasse ; Siret : 529.468.13400018

N° TVA intracommunautaire : FR23529468134

Page 5 de 6

2. CONCLUSION GENERALE

Les analyses UHPLC couplée à l'HRMS ont démontrées la présence de 5 alcaloïdes pyrrolizidiniques.

ECHANTILLON	LOT INTERNE	LOT CLIENT	SUBSTANCE A SURVEILLER	TENEURS	LOD
ES Mélisse F	CS5831	246201	Intermedine	Nd	2 ppb
			Echimidine	Nd	2 ppb
			Heliotrine	Nd	2 ppb
			Heliotrine-N-oxide	Nd	2 ppb
			Lasiocarpine	Nd	2 ppb
			Lasiocarpine-N-oxide	Nd	2 ppb
			Lycopsamine	Nd	2 ppb
			Monocrotaline	Nd	2 ppb
			Monocrotaline-N-oxide	Nd	2 ppb
			Retrorsine	2,93 ppm	2 ppb
			Retrorsine-N-oxide	Nd	2 ppb
			Senecionine	6,94 ppm	2 ppb
			Senecionine-N-oxide	Nd	2 ppb
			Seneciphylline	7,75 ppm	2 ppb
			Seneciphylline-N-oxide	Nd	2 ppb
			Senkirkine	Nd	2 ppb
			Trichodesmine	Nd	2 ppb
Dosage des alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux			20,24 ppm	2 ppb	

ANNEXE 5

Lettres de lancement rédigées à des fins commerciales pour l'entreprise Botanicert



NEWSLETTERS – VALÉRIANE, IDENTIFICATION ET DOSAGE DES VALEPOTRIATES

INTRODUCTION

Depuis le 1er janvier 2015, l'emploi de plantes dans les compléments alimentaires doit satisfaire aux exigences de l'Arrêté du 24 juin 2014. Ce texte établit une liste de plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires ; il précise également certaines conditions d'utilisation. Par exemple pour la *Valeriana officinalis* et la *Valeriana jatamansi* il est nécessaire de :

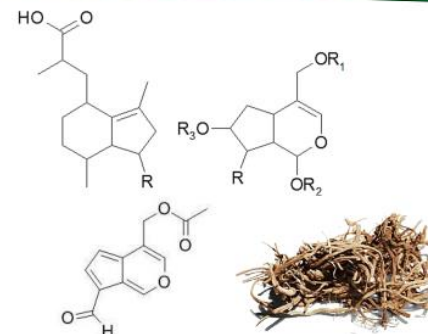
- prouver l'absence de **valépotriates** (avec une limite de détection)
- surveiller le taux d'**acides valérieniques**
- identifier ces plantes via la présence de **marqueurs pertinents**

Pour garantir l'innocuité des produits commercialisés, une des grandes difficultés est de proposer des méthodes fiables permettant l'identification de marqueurs spécifiques (avec différenciation inter-espèces) et le dosage de molécules appartenant à la famille des valépotriates.

ETUDE

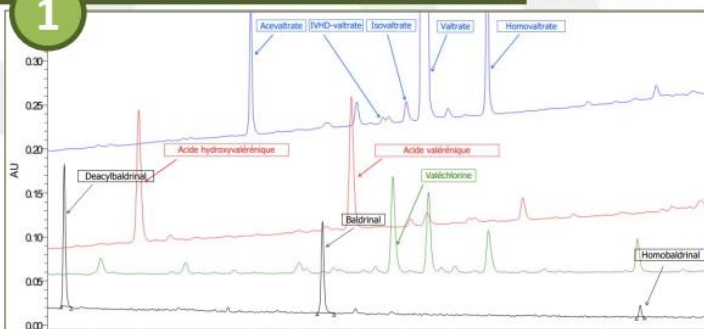
BOTANICERT a mis en place des protocoles d'études spécifiques sur la problématique de la Valériane :

- Une méthode de screening avec des marqueurs chimiotaxonomiques spécifiques et pertinents
- Une méthode développée pour la qualification et le dosage des valépotriates
- Une méthode pour permettre l'identification fiable des marqueurs spécifiques au genre *Valeriana* sp



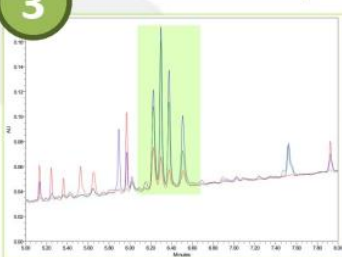
En haut à gauche, structure de base d'un acide valérienique, en haut à droite, structure de base d'un valépotriate et en bas, structure du baldrinol (produit de dégradation des valépotriates)

1 Méthode de screening via marqueurs chimiotaxonomiques de l'espèce



Identification des **marqueurs chimiotaxonomiques** suivants : Valtrate, Isovaltrate, Acévaltrate, IVHD-valtrate, Valéchlorine, Homovaltrate, Baldrinol, Deacylbaldrinol, Homobaldrinol, Acide Valérienique, Acide Hydroxyvalérienique

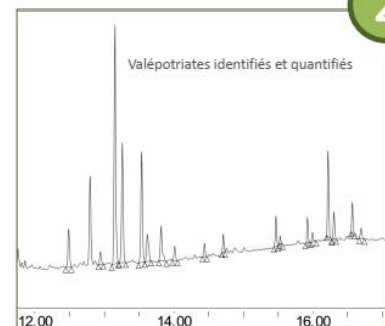
3 Marqueurs du genre *Valeriana* sp.



Un motif de 4 substances caractéristiques a été identifié dans différentes espèces du genre *Valeriana*. Ce motif, noté VAL601, n'a pas été retrouvé dans d'autres espèces apparentées du genre *Valeriana*.

En plus des ratios valtrate / isovaltrate, présence d'acides valérieniques et de valépotriates, ce motif permet d'ajouter un critère de différenciation sur les fingerprints du genre *Valeriana*.

Méthode de dosage des valépotriates



Identification de la famille des valépotriates sur un échantillon témoin. Cet échantillon témoin est ensuite utilisé pour doser les valépotriates en équivalent valtrate.

CONCLUSION

Comment s'assurer de la qualité de vos matières premières d'origine végétale ?

Contrôler l'identité de la matière première (identification botanique et phytochimique) ainsi que sa qualité (dosage de marqueurs d'intérêt / chimiotaxonomiques).

Pour l'exemple de la valériane :

- Identification **botanique** (microscopie)
- Identification **phytochimique** (HPTLC/UHPLC)
- Dosage **pertinent** de marqueurs d'intérêt (valépotriates / acides valérieniques)
- Vente d'un **échantillon témoin** de Valériane



NEWSLETTERS 13 – VACCINIUM MACROCARPON AITON. – UTILISATION D'UNE MÉTHODE ADAPTÉE POUR LA CARACTÉRISATION DE L'ESPÈCE

INTRODUCTION

Originaire d'Amérique du Nord, les fruits de la canneberge, aussi appelés « cranberries », ont été utilisés depuis des siècles pour traiter ou prévenir divers maux tels que le scorbut ou soigner les plaies.

L'usage traditionnel de ces fruits leur confère aussi des propriétés bactériostatiques qui les rendent très populaires pour leur action préventive contre les infections urinaires et de nombreuses études scientifiques ont associé cette action aux proanthocyanidines (PACS) qu'ils contiennent.

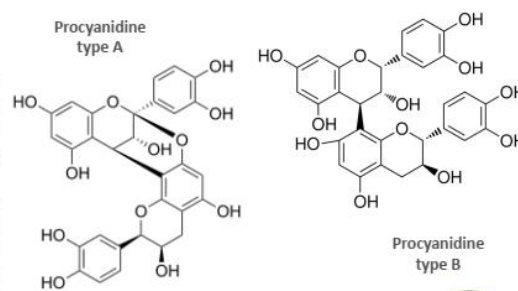
Le nombre de produits à base de cranberries ayant sensiblement augmenté et afin d'en garantir le bon usage, les autorités ont publiées les avis n° 2003-SA-0056 et n° 2003-SA-0352 qui soulignent que seuls les produits fournissant 36 mg de PACS par jour pouvaient revendiquer l'allégation « contribue à diminuer la fixation de certaines bactérie *Escherichia coli* sur les parois des voies urinaires ». De plus, l'essentiel de la production de canneberge est réalisée au Canada et aux Etats Unis, et s'effectue selon des critères climatologiques et environnementaux précis. Ces facteurs nécessitent l'utilisation de différentes variétés de *Vaccinium macrocarpon* L., plus ou moins résistantes, dont les compositions phytochimiques varient. C'est pourquoi, il est essentiel pour les acteurs du secteur de pouvoir doser de façon fiable et reproductible ces PACS.

1

Etat de l'art et enjeux

Les fruits de la canneberge sont riches en acides, en flavonoïdes, et en PACS. Les PACS, aussi appelés tanins condensés, sont des oligomères de flavan-3-ol liés soit de façon simple : PACS de type B, soit de façon double : PACS de type A. Ces derniers empêcheraient la fixation de bactéries uropathogènes de type *Escherichia coli* sur les parois urothéliales en inhibant la synthèse des adhésines P-fimbriae et en déformant le corps cellulaire de la bactérie.

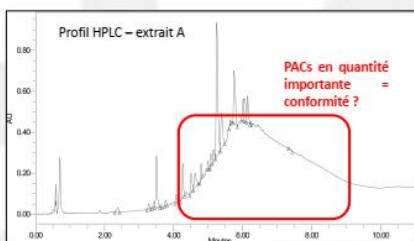
Bien qu'il existe de nombreuses méthodes pour doser les PACS, celle qui a su démontrer une répétabilité interlaboratoire satisfaisante est la méthode colorimétrique BL-DMAC. Même si la méthode BL-DMAC constitue une bonne première approche du dosage des PACS, elle ne saurait mettre en évidence des cas d'adultération. Il est, de ce fait, important de compléter le dosage des PACS par des techniques complémentaires, telle que l'HPTLC ou l'HPLC, afin de s'assurer de la non adultération des matières premières de *Vaccinium macrocarpon* L. .



2

Identification : raccourcis à éviter

Pour la caractérisation de l'espèce, se focaliser sur une seule famille de composés n'est pas suffisant. Cela laisse le champ libre à tous types de fraudes qui n'auront qu'à se soucier de trouver une autre source naturelle présentant les composés d'intérêt afin de tromper les acteurs.



En se focalisant uniquement sur les PACS, l'extrait A sera considéré conforme alors qu'en réalité, il ne s'agit pas de la même espèce.

NON CONFORME

CONCLUSION

Réaliser un contrôle non adapté peut se révéler être bien plus pénalisant que de ne pas faire de contrôle.

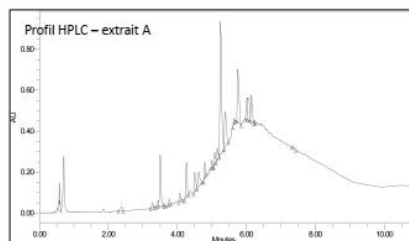
Comment s'assurer de la qualité de vos échantillons de Cranberry ?

Prouver l'absence d'adultération par une **identification adaptée** et la qualité par un **dosage des proanthocyanidines (PACS)** par la méthode BL-DMAC.

Identification : utiliser une méthode adaptée

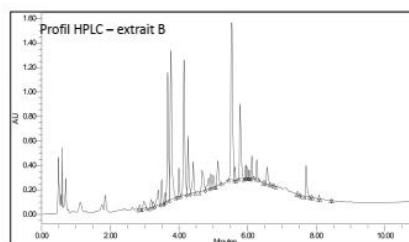
3

En vérifiant la présence d'un nombre de marqueurs plus important, de nombreuses adultérations peuvent être évitées.



Marqueurs Cranberry	Présence
PACS	Oui
Acides phénols	Oui
Flavonols aglycone	Oui
Flavonols monomères	Oui
Flavonols hétérosides	Non
Anthocyanes	Non
Iridoïdes	Non

NON CONFORME



Marqueurs Cranberry	Présence
PACS	Oui
Acides phénols	Oui
Flavonols aglycone	Oui
Flavonols monomères	Oui
Flavonols hétérosides	Oui
Anthocyanes	Oui
Iridoïdes	Oui

CONFORME

Finalement, l'extrait A est non conforme et le B est conforme.

NEWSLETTER 19 – DOSAGE OF PYRROLIZIDINE ALKALOIDS

INTRODUCTION

Because of their hepatotoxic and carcinogenic effects, authorities set limits for plants preparations that may contain pyrrolizidine alkaloids (PA) such as *Borago officinalis* L. According to the « Plants decree » (2014, June 24th) they should not contain more than 1 ppb of PA. However, numerous weeds like *Echium vulgare* L. or *Senecio vulgaris* L. synthesise this type of alkaloids, and cross contaminations that may occur during harvests are frequent and inevitable. This is why health authorities, notably Swissmedic, strongly advise to extend the PA quantification assay to all the plants growing in the same biotope as these weeds.

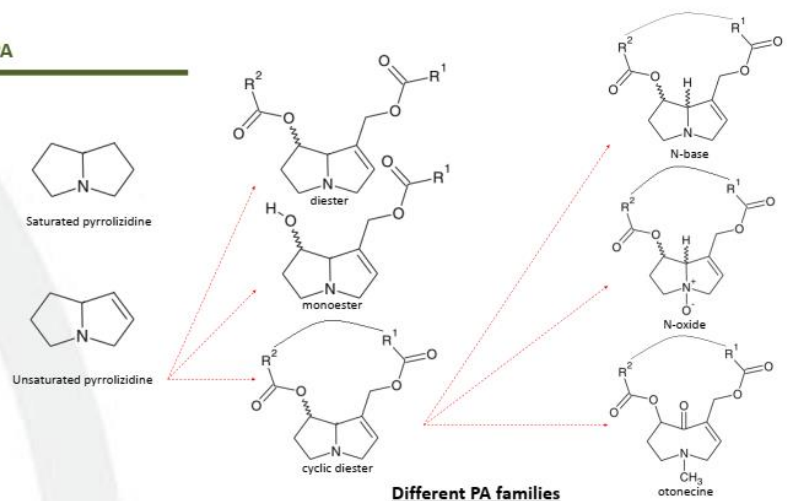
Considering the phytosanitary issues that may induce PA ingestion and the hundreds of PA referenced in the literature, it seems paradoxical to evaluate the PA content of commercial preparations according to a short list of commercially available analytical standards that would certainly lead to false negatives. These are the reasons why Botanicert wanted to develop an extensive method for the dosage of PA by HRMS.

STUDY

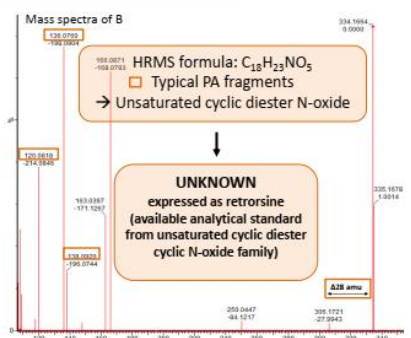
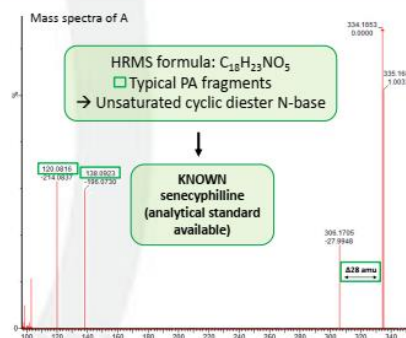
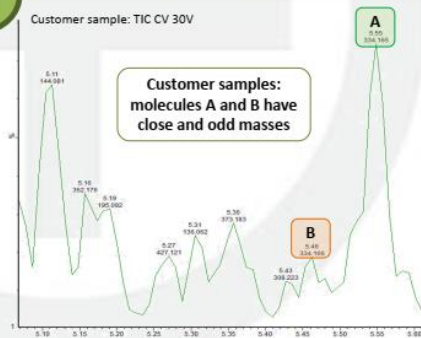
1

Method development for the dosage of total PA

Our study is based on the fact that PA could exist under two forms: saturated or unsaturated. Each form can be of 3 classes (monoester, diester and cyclic diester) and each class may be present under 3 different types (N-base, N-oxide and otonecine). It results in 18 configurations to which correspond 18 families with particular fragmentation. The analytical process involves the screening of a large PA mass range in HRMS. The second step is the study of the fragmentation of suspected PA to identify their family. To be as relevant as possible, the PA content will be expressed as a PA belonging to the same family and commercially available as an analytical standard.


2

Customer samples analysis



- **Mass spectrum of A:** the combination of these fragments is specific to the **unsaturated cyclic diester N-base PA family**. In addition, the molecular formula suggested by HRMS corresponds to a known molecule : **seneciphylline** (analytical standard available). **A** could be identified and quantified as seneciphylline.
- **Mass spectrum of B:** the combination of these fragments is specific to the **unsaturated cyclic diester N-oxide PA family**, but the molecular formula suggested by HRMS doesn't correspond to a commercialised analytical standard. However, **retrorsine** (analytical standard available) belongs to the same family. This unknown PA could be quantified and expressed as **retrorsine**.

CONCLUSION

How to guarantee the safety of plants based preparations that may contain pyrrolizidine alkaloids ?

Thanks to its extensive PA study and LOD of 1 ppb, the UHPLC/HRMS method dedicated to PA identification and quantification developed by Botanicert meets the regulatory requirements.

However, contaminations are frequent and inevitable. This is why, PA monitoring may be completed by a toxicity threshold study in order to justify the safety of plants based preparations.

BOTANICERT, ANALYTICAL LABORATORY EXPERT IN THE PLANT FIELD, contact@botanicert.com – 04.89.85.60.27



NEWSLETTER 14 – UNCARIA TOMENTOSA (WILLD. EX ROEM. ET SCHULT) DC – DOSAGE DES ALCALOÏDES OXINDOLIQUES, DISTINCTION DES POA / TOA

INTRODUCTION

Originaire d'Amazonie, l'*Uncaria tomentosa* est une plante largement répandue dans les pays traversés par la Cordillère des Andes. Le genre *Uncaria* englobe une quarantaine d'espèces de lianes tropicales provenant tant d'Asie que d'Afrique ou d'Amérique du Sud. Les plus connues sont l'*Uncaria gambir* dite gambir, cachou ou arbre catechu; l'*Uncaria rhynchophylla* dite Gou teng; ou l'*Uncaria tomentosa*, aussi appelée liane du Pérou ou griffe de chat. Fréquemment utilisée dans les compléments alimentaires pour ses propriétés immunostimulantes, l'engouement pour l'*Uncaria tomentosa* est tel que dans un souci de préservation de l'espèce, seule l'écorce de tige et non l'écorce de racine est utilisée. Selon l'Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste de plantes autre que les champignons pouvant entrer dans leur composition, toutes les trois peuvent être employées dans des compléments alimentaires mais seul l'emploi d'*Uncaria tomentosa* implique de surveiller le taux d'alcaloïdes présent.

Les alcaloïdes représentent une famille de composés riche et diversifiée aux activités biologiques diverses et à la possible toxicité. Il est donc essentiel de pouvoir les identifier et les quantifier avec précision, or aucune monographie de cette plante n'est disponible dans les pharmacopées française, européenne, américaine et japonaise. C'est pourquoi, Botanicert a développé une méthode permettant d'extraire et de doser sélectivement les alcaloïdes de l'*Uncaria tomentosa*.

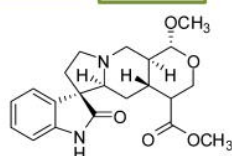
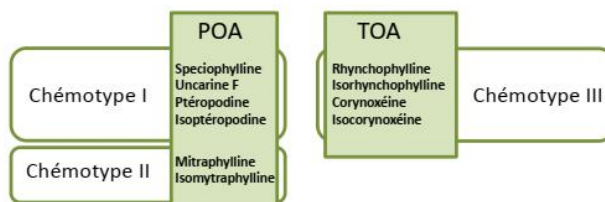
ETUDE

1

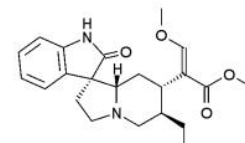
Composition

Riche en alcaloïdes, l'*Uncaria tomentosa* existe sous trois chémotypes différents: deux types à alcaloïdes oxindoliques pentacycliques majoritaires (POA), différenciés par leur isomérisation cis/trans tels que l'uncarine D (spéciophylline) et un type à alcaloïdes oxindoliques tetracycliques majoritaires (TOA) tels que la rhynchophylline. L'identification du chémotype est basée sur la structure alcaloïdique prépondérante.

De récentes études mettent en évidence l'importance de l'identification du chémotype en démontrant la toxicité accrue des chémotypes I et III vis-à-vis des cellules humaines saines.



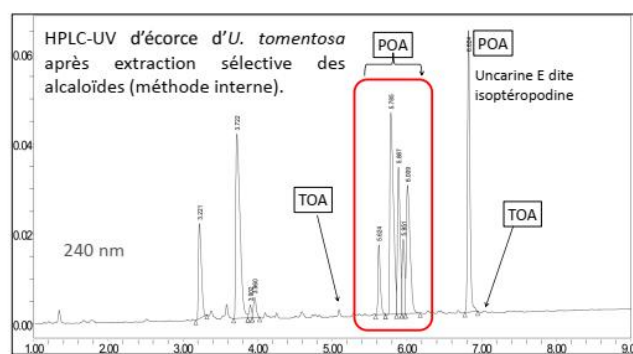
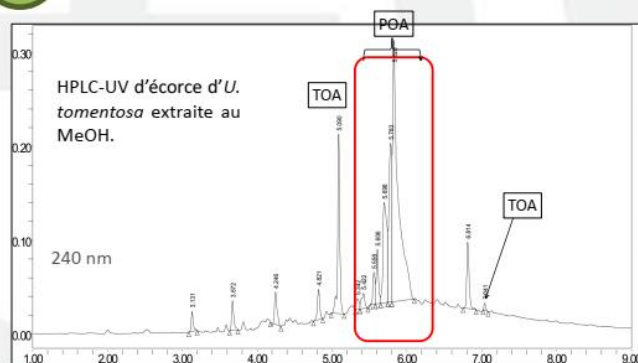
Uncarine C dite ptéropodine
alcaloïde oxindolique pentacyclique



Rhynchophylline
alcaloïde oxindolique tetracyclique

2

Analyse HPLC



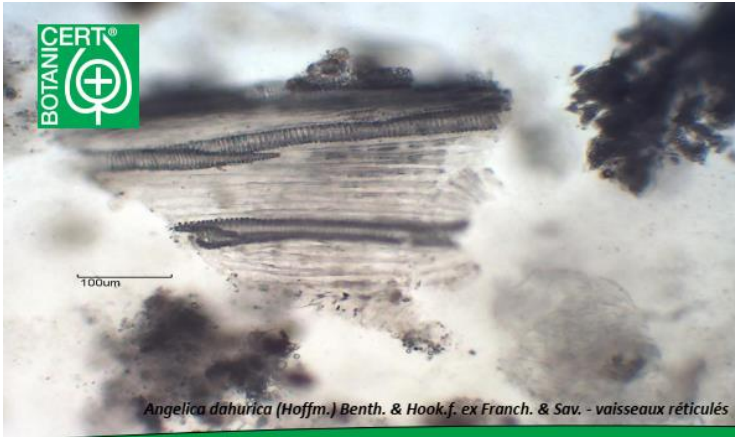
Le pic majoritaire étant l'isoptéropodine, la référence botanique *Uncaria tomentosa* analysée présente le **chémotype I**. Les alcaloïdes présents dans l'*Uncaria tomentosa* étant des diastéréoisomères, Botanicert a développé cette méthode d'extraction sélective en utilisant des techniques ne favorisant pas leur isomérisation. Les différents types d'alcaloïdes oxindoliques pouvant être différenciés rapidement, il sera possible de les doser de manière précise pour répondre à l'Arrêté plantes Français mais également pour évaluer la qualité de l'échantillon

CONCLUSION

Afin d'évaluer vos produits ou bien de satisfaire aux réglementations en vigueur, Botanicert vous accompagne dans le dosage précis des alcaloïdes présents dans vos produits contenant l'*Uncaria tomentosa*. Notre laboratoire vous propose aussi d'identifier cette plante ainsi que les autres espèces appartenant au genre *Uncaria*, à travers des marqueurs chimiotaxonomiques et botaniques spécifiques. De plus, dans le cadre d'études de toxicité approfondies, Botanicert saura vous renseigner sur son chémotype précis.

Comment s'assurer de la qualité de vos échantillons de *Uncaria tomentosa* ?

Procéder à une caractérisation de l'espèce à l'aide d'une identification adaptée et évaluer la qualité en dosant les alcaloïdes oxindoliques par HPLC.


Angelica dahurica (Hoffm.) Benth. & Hook.f. ex Franch. & Sav. - vaisseaux réticulés

Jacobaea maritima (L.) Pêlser & Meijden

NEWSLETTER 15 – TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR SUR LES COMPLÉMENTS ALIMENTAIRES PARTIE 1 : ÉVOLUTIONS RÉGLEMENTAIRES

1

Une expertise reconnue

Fort de son expertise dans le domaine du végétal, Botanicert a été sollicité par les éditions *Techniques de l'ingénieur*.

Cette première collaboration a donné lieu à la publication: « Compléments alimentaires à base de plantes – Evolutions réglementaires ».

Ce dossier expose:

- des notions essentielles de botaniques
- un état des lieux du marché du complément alimentaire en France et ailleurs dans le monde
- le détail de la réglementation en vigueur (étiquetage, procédure d'enregistrement, description de l'Arrêté plantes du 24 juin 2014
- un tableau recensant l'ensemble des 211 plantes possédant des substances à surveiller et la disponibilité de leur monographies dans 3 pharmacopées majeures

2

Un réseau d'experts confirmés

De par ces investissements en recherche et développement à travers des thèses CIFRE et son partenariat universitaire avec l'université de Nice-Sophia Antipolis, Botanicert a su s'entourer d'un réseau de spécialistes confirmés du végétal et de sa législation.

Cet article constitue une approche approfondie et pertinente pour les professionnels du secteur du complément alimentaire concernés par la rentrée en vigueur de l'Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi.

CONCLUSION

Au sein de ce document, nous mettons en évidence le contexte économique afin d'identifier les enjeux et les conséquences d'un contrôle dans le domaine du végétal. Il s'agit d'un domaine complexe où tout est encore à découvrir ainsi, il est important de pouvoir proposer des analyses adaptées et pertinentes.

Comment s'assurer de la pertinence des contrôles à réaliser ?

La réponse n'est pas toujours évidente mais il est nécessaire de s'entourer d'experts du végétal qui pourront aiguiller les acteurs en fonction de leurs besoins.


**TECHNIQUES
DE L'INGÉNIEUR**

Réf. : PHA3063 V1

 Date de publication :
10 septembre 2016

Compléments alimentaires à base de plantes - Évolutions réglementaires

 par **Xavier FERNANDEZ**

Docteur en sciences, HDR
Professeur des universités
Directeur du Master 2 professionnel chimie formulation, analyse et qualité (FOQUAL)
Institut de chimie de Nice, Université de Nice-Sophia Antipolis, UMR CNRS 7272,
Nice, France

Mélissa CLÉMENT CHAMI

Doctorante en sciences
Institut de chimie de Nice, Université de Nice-Sophia Antipolis, UMR CNRS 7272,
Nice, France

 et **Loïc LOFFREDO**

Master 2 professionnel chimie formulation, analyse et qualité (FOQUAL),
Université Nice-Sophia Antipolis, France
Directeur technique, Botanicert, Grasse, France

Mots-clés
réglementation
agroalimentaire,
pharmaceutique, cosmétique |
compléments alimentaires

Résumé La sortie progressive des plantes médicinales du monopole pharmaceutique français a offert la possibilité à des professionnels de commercialiser des compléments alimentaires à base de plantes. Afin de garantir la sécurité des consommateurs, la réglementation française s'est étoffée en publiant au journal officiel l'arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi, texte entré en vigueur le 1^{er} janvier 2015. Dans cet article, un état des lieux de la profession, des marchés et des réglementations en vigueur est exposé et des notions essentielles de botanique sont abordées.

Keywords
food, pharmaceutical, cosmetic
regulation | dietary
supplements

Abstract The gradual liberation of medicinal plants from the pharmaceutical monopoly gave professionals the opportunity to market herbal supplements in order to guarantee consumer safety, French authorities published in the Official Journal an order dated June 24nd 2014. In this article, professions, markets and regulations disparities will be described, as well as basic botanical concepts.

Pour toute question :
Service Relation clientèle
Techniques de l'Ingénieur
Immeuble Pleyad 1
39, boulevard Ornano
93288 Saint-Denis Cedex

Par mail :
infos.clients@teching.com
Par téléphone :
00 33 (0)1 53 35 20 20

Document téléchargé le : 06/10/2016

Pour le compte : 7200030276 - universite de rouen // 195.220.135.36

© Techniques de l'Ingénieur | tous droits réservés



NEWSLETTER 16 – TECHNIQUES DE L'INGENIEUR SUR LES COMPLÉMENTS ALIMENTAIRES PARTIE 2 : APPROCHE ANALYTIQUE

1

Une expertise reconnue

Fort de son expertise dans le domaine du végétal, Botanicert a été sollicité par les éditions *Techniques de l'ingénieur*.

Cette seconde collaboration a donné lieu à la publication: « Compléments alimentaires à base de plantes – Approche analytique ».

Ce dossier expose:

- des notions essentielles de botaniques
- les différents outils d' analyses phytochimiques à la disposition des industriels
- les disparités des méthodes d'analyse utilisées par les industriels pour contrôler les matières premières
- Une étude de cas concernant la Valeriana officinalis L.

2

Un réseau d'experts confirmés

De par ces investissements en recherche et développement à travers des thèses CIFRE et son partenariat universitaire avec l'université de Nice-Sophia Antipolis, Botanicert a su s'entourer d'un réseau de spécialistes confirmés du végétal et de sa législation.

Cet article constitue une approche approfondie et pertinente pour les professionnels du secteur du complément alimentaire concernés par la rentrée en vigueur de l'Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi.



TECHNIQUES
DE L'INGÉNIEUR

Réf. : PHA3064 V1

Date de publication :
10 novembre 2016

Compléments alimentaires à base de plantes - Approche analytique

par **Xavier FERNANDEZ**

Docteur en sciences, HDR
Professeur des universités
Directeur du Master 2 professionnel chimie formulation, analyse et qualité (FOQUAL)
Institut de chimie de Nice, Université de Nice-Sophia Antipolis, UMR CNRS 7272,
Nice, France

Mélissa CLÉMENT CHAMI

Doctorante en sciences
Institut de chimie de Nice, Université de Nice-Sophia Antipolis, UMR CNRS 7272,
Nice, France
Ingénieur chimiste, Botanicert, Grasse, France

et **Loïc LOFFREDO**

Master 2 professionnel chimie formulation, analyse et qualité (FOQUAL),
Université Nice-Sophia Antipolis, France
Directeur technique, Botanicert, Grasse, France

Mots-clés
chimie analytique |
Pharmaceutique |
Agroalimentaire | compléments
alimentaires | extraction |
cosmétique

Résumé Afin de garantir la sécurité des consommateurs, la réglementation française s'est étoffée en publiant au journal officiel l'arrêté du 24 juin 2014, entré en vigueur le 1^{er} janvier 2015, établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi. Dans cet article, des notions essentielles de botanique sont abordées et une étude comparative des différents référentiels et outils analytiques, permettant de satisfaire à l'arrêté cité est détaillée.

Keywords
analytical chemistry |
pharmaceutical | food
industries | dietary
supplements | extraction | food
supplement

Abstract In order to guarantee consumer safety, French regulation has been expanded since French authorities published in the Official Journal an order dated June 24nd 2014 establishing the list of plants allowed in dietary supplements and their way of use. This order has entered into force on January 1st 2015. In this article basic botanical concepts and a comparative study of various analytical frames of reference and tools stakeholders may have at their disposal will be developed.

Pour toute question :
Service Relation clientèle
Techniques de l'Ingénieur
Immeuble Pleyad 1
39, boulevard Ornano
93288 Saint-Denis Cedex

Par mail :
infos.clients@teching.com
Par téléphone :
00 33 101 53 35 20 20

Document téléchargé le : 05/12/2016
Pour le compte : 7200097598 - éditions ti // nc AUTEURS // 195-25-183-153

© Techniques de l'Ingénieur | tous droits réservés

CONCLUSION

Au sein de ce document, nous mettons en évidence le contexte économique afin d'identifier les enjeux et les conséquences d'un contrôle dans le domaine du végétal. Il s'agit d'un domaine complexe où tout est encore à découvrir ainsi, il est important de pouvoir proposer des analyses adaptées et pertinentes.

Comment s'assurer de la pertinence des contrôles à réaliser ?

La réponse n'est pas toujours évidente mais il est nécessaire de s'entourer d'experts du végétal qui pourront aiguiller les acteurs en fonction de leurs besoins.

