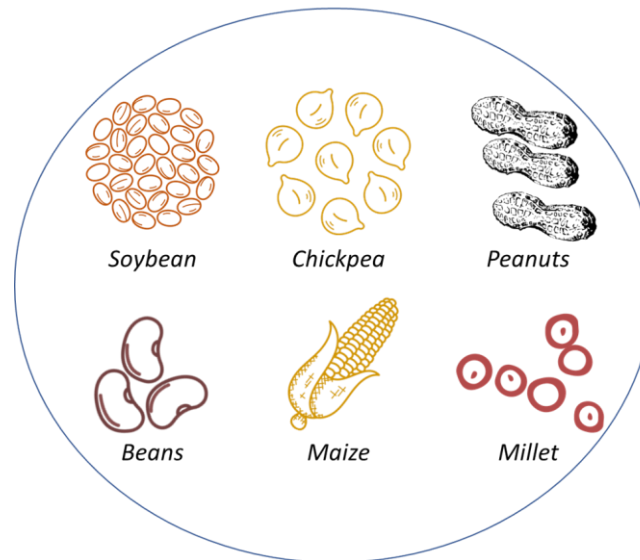


Restitution des travaux de recherche :

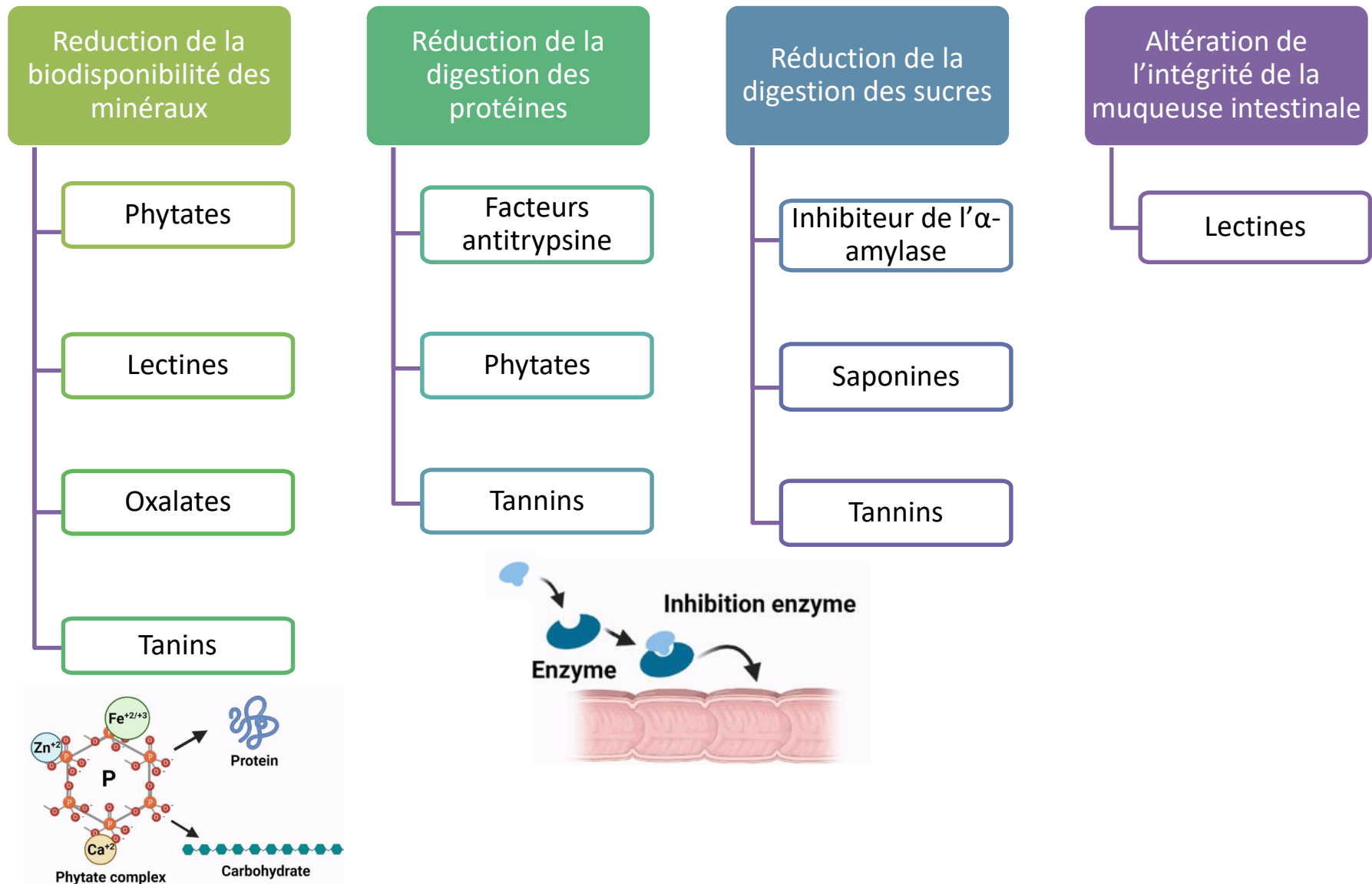
Projet Facteurs antinutritionnels



*Lorène Akissoe, Adrien Servent, Christian Mertz, Pascale de Saint Priest,
Maxime Bohin*

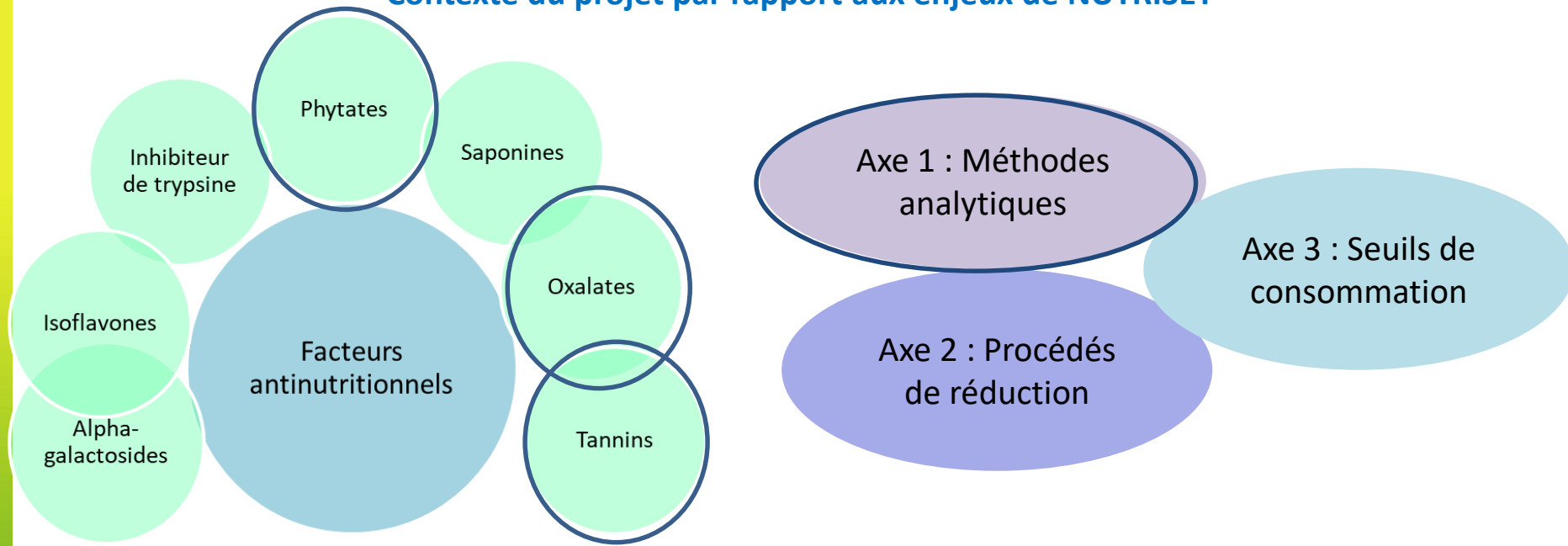
Projet France Relance : 2022 - 2024

Contexte du projet par rapport aux enjeux de NUTRISET

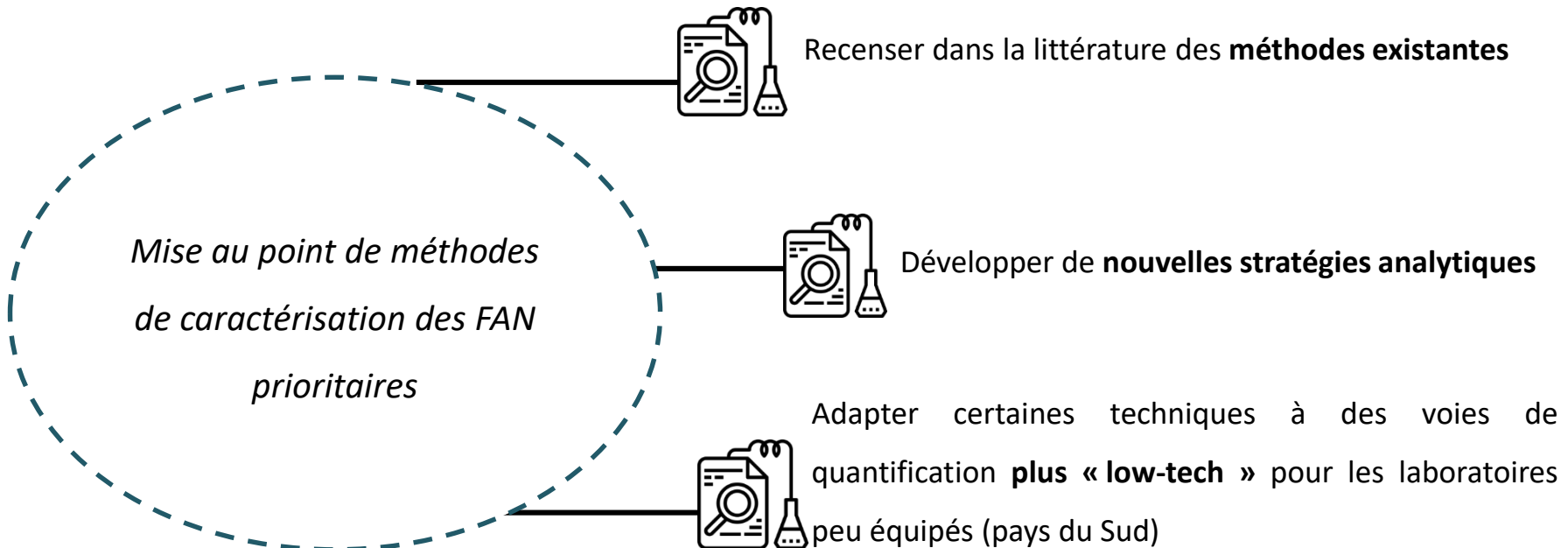


(López-Moreno et al., 2022;
Rodríguez-España et al., 2022)

Contexte du projet par rapport aux enjeux de NUTRISET



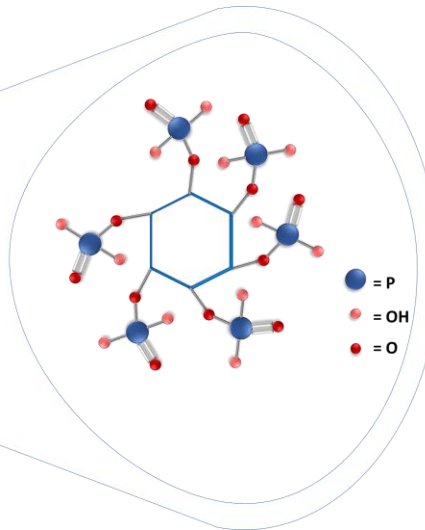
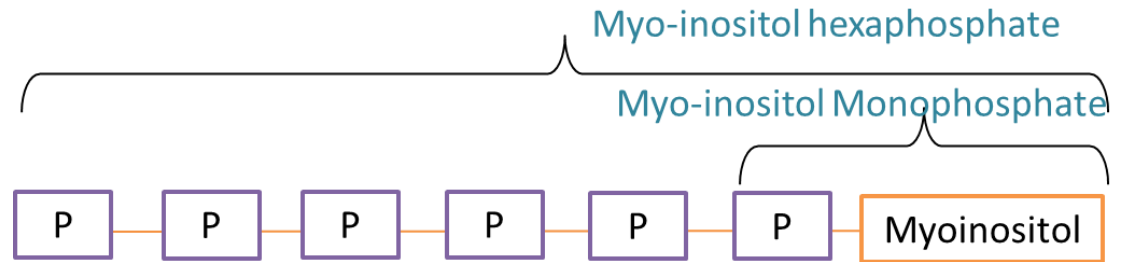
Objectifs du PFR FAN



Phytates

Structure et types de phytates

Phytates : 60–80%
des phosphates
totaux

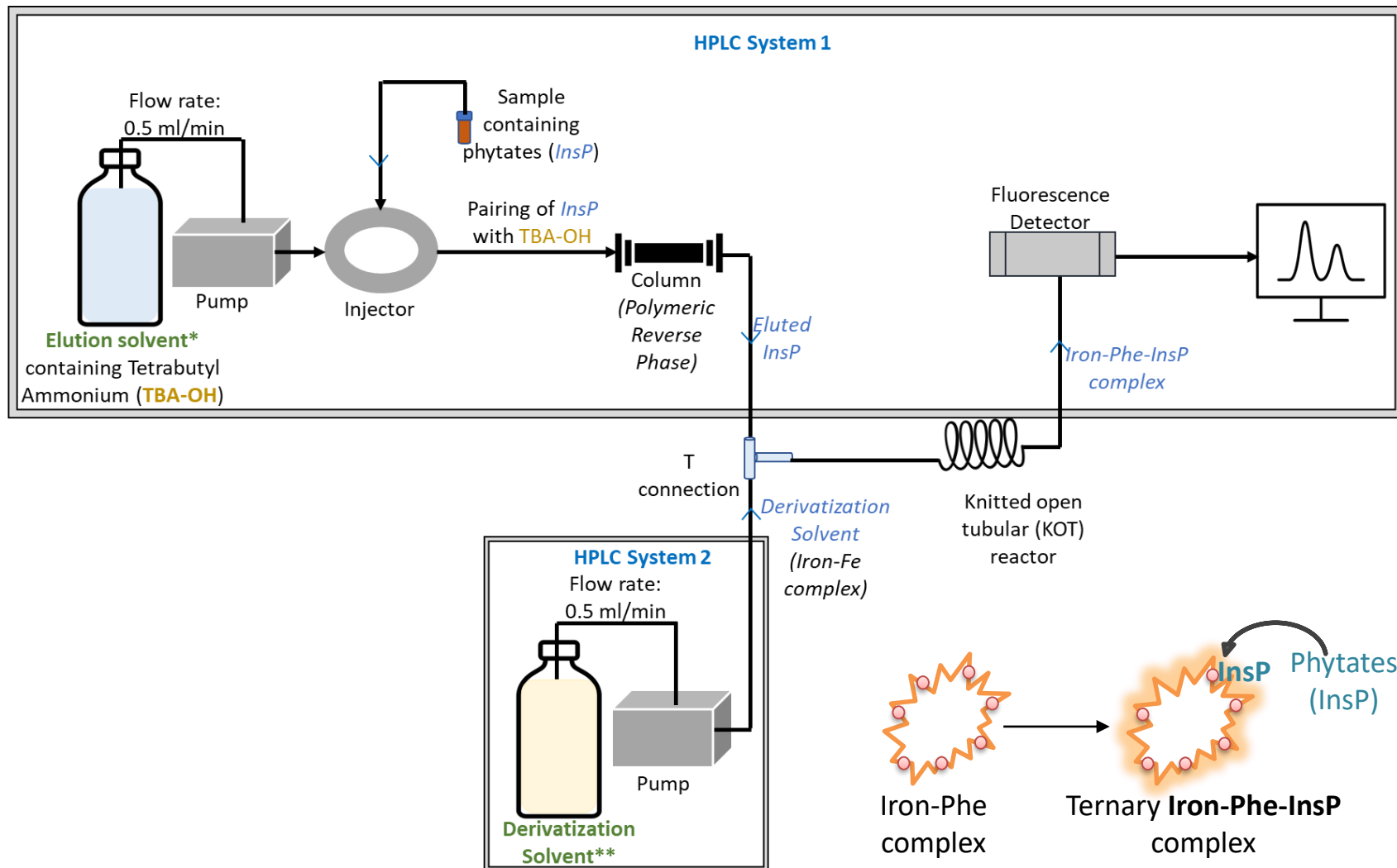


- **Myo-inositol hexaphosphate (IP6) : Acide phytique**
- **Myo-inositol mono à pentaphosphate (IP1 à IP5)**
- **IP1 à IP5 : plusieurs isomères, 63 au total (Chen and Li, 2003))**



Acide phytique (IP6) plus antinutritionnel : L'effet antinutritionnel augmente avec le nombre de phosphate

Développement méthode HPLC par appariement d'ions avec une détection par fluorescence : HPLC - FLD



- IP3 à IP6 : Meilleure séparation chromatographique
- IP1 à IP2 : Co-élution

☐ Analyse des phytates par d'autres méthodes existantes :

HPLC-RID (Chromatographie par appariement d'ions)

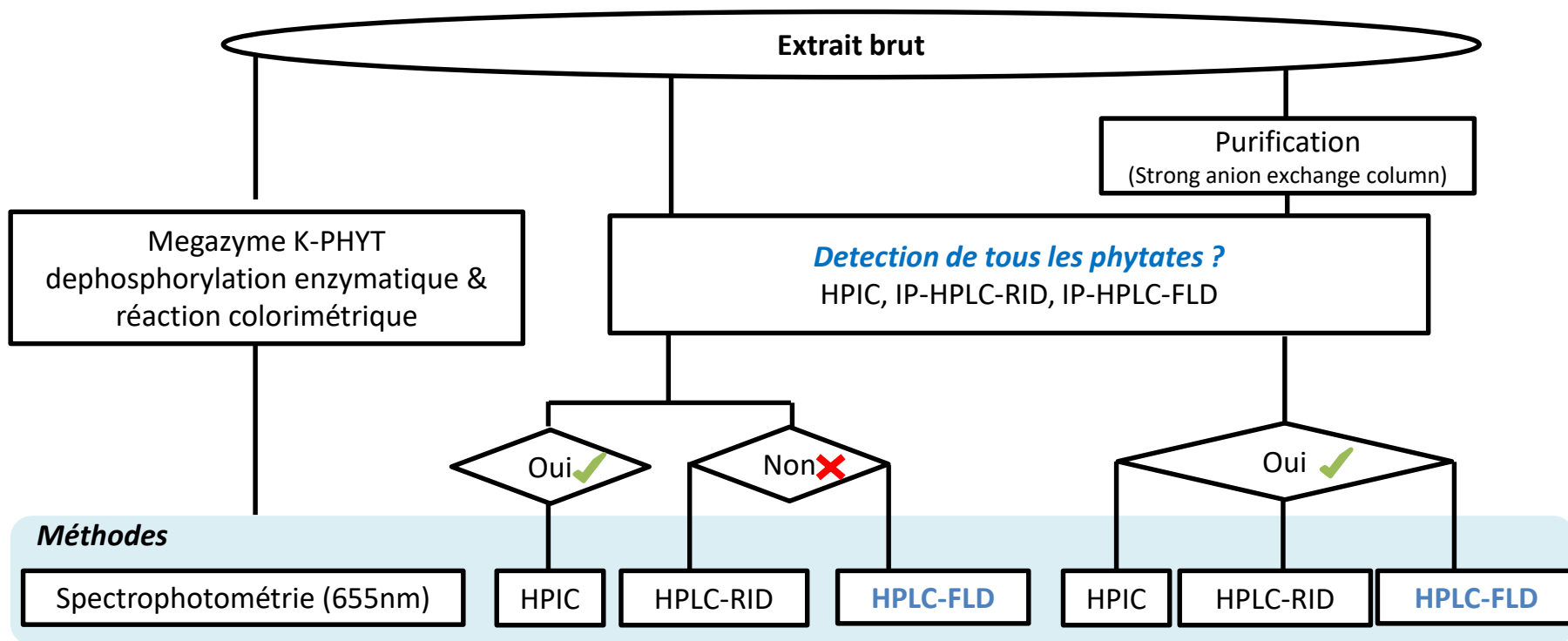
- Chromatographie liquide par appariement d'ions
- Détection par réfractométrie

HPIC (Chromatographie ionique)

- Chromatographie ionique
- Détection par conductimétrie

Kit MEGAZYME (méthode spectrophotométrique)

- Dégradation enzymatique des phytates en phosphates
- Réaction colorimétrique à 655 nm



- **Comparaison des méthodes** : Corrélation entre méthodes chromatographiques mais non avec la méthode Mégazyme
- **Kit Mégazyme** : Surestime ou sous-estime les valeurs de phytates (non spécifique) comparé aux méthodes chromatographiques.
- **Purification extrait** : Indispensable pour l'analyse par chromatographie
- **HPLC-FLD** : Pas de problèmes d'isomères de IP1-IP5 (rencontrés avec HPIC) et d'interférences (HPLC-RID)

Rappel : Restitution précédente - Année 2023

Development of a specific fluorescence post-column derivatization method coupled with ion-pair chromatography for phytate analysis in food.

Soumission
article

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	AKISSOE, Lorène; CIRAD Centre de Montpellier, PERSYST UMR QUALISUD DE SAINT PRIEST, Pascale; Nutriset SAS Mertz, Christian ; CIRAD Centre de Montpellier, PERSYST UMR QUALISUD MOREL, Gilles; CIRAD Centre de Montpellier, PERSYST UMR QUALISUD BOHIN, Maxime; Nutriset SAS Avallone, Sylvie; Montpellier SupAgro SERVENT, Adrien; CIRAD Centre de Montpellier, PERSYST UMR QUALISUD

Limites de l'étude

- **Inexistence d'échantillons de référence** : Vérifier l'exactitude de mesure des méthodes
- **Produits finis** : Valeurs retrouvées par HPLC-FLD inférieures aux valeurs théoriques → Hypothèse : Impact du prémix (Cf étude *Brooks and Lampi, 2001 sur Farines infantiles*)

Problématique issue des précédents résultats

Exactitude de mesure des méthodes

- Mélange matières premières sans ajout de standard
- Echantillon de référence interne : Spiking ingrédients sans phytates
- Comparaison de résultats inter-laboratoires (matières premières)

Données produits finis : Impact du premix ?

- Réalisation bilan matière
- Comparaison de résultats inter-laboratoires (produits intermédiaires et produits finis)

Méthodes testées : Année 2

HPLC-FLD

~~HPLC-RID~~

HPIC

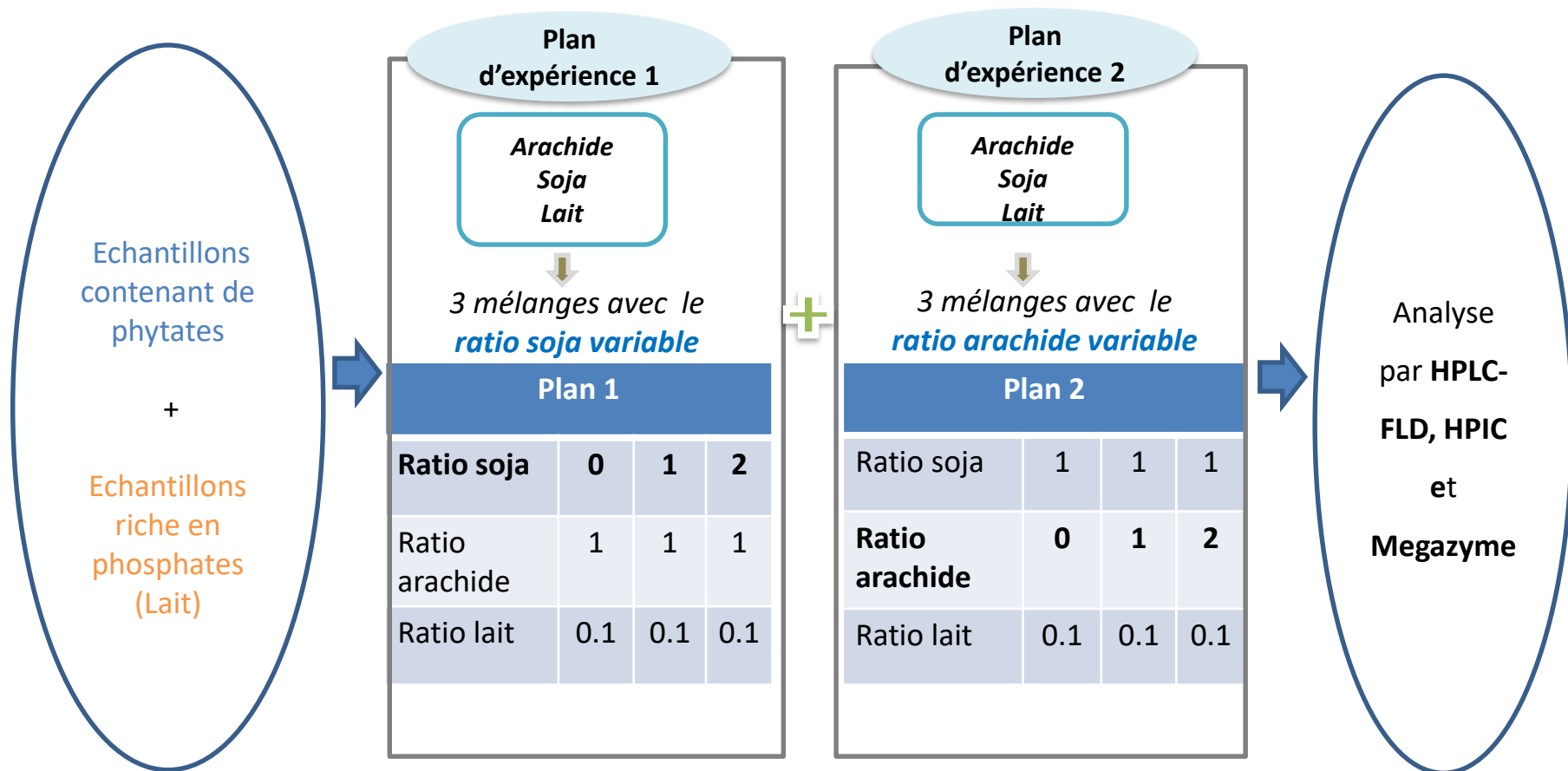
Megazyme



- **Analyse non poursuivie sur HPLC-RID** : performances analytiques faibles (sensibilité, problèmes de pics parasites)
- Travaux réalisés **sur l'acide phytique uniquement (IP6)**

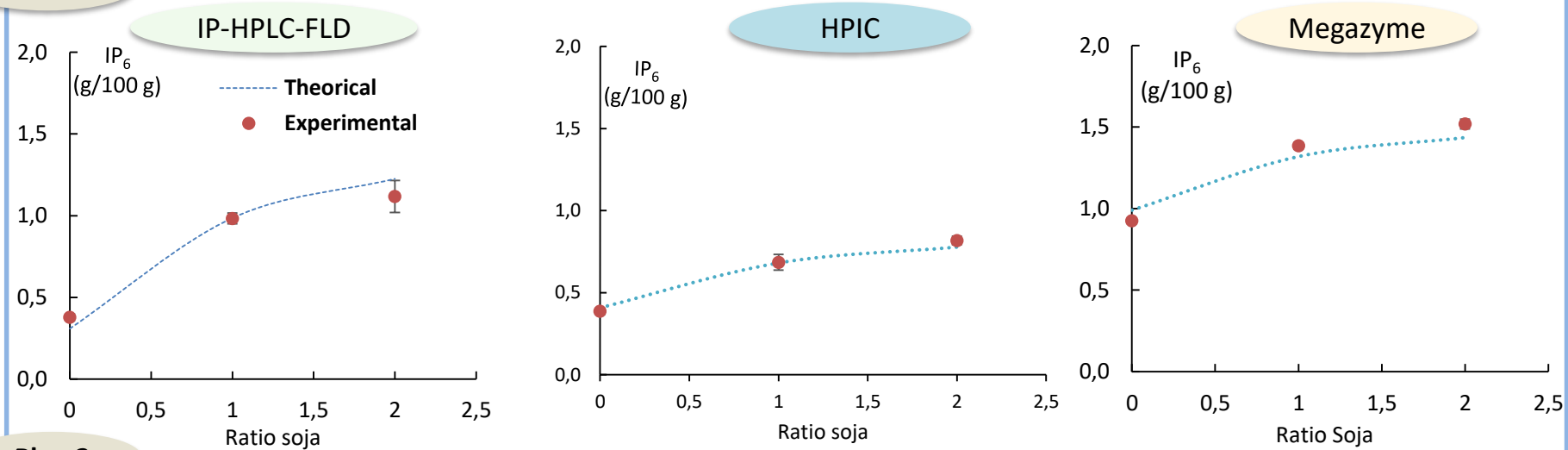
Contexte :

- Concentrer naturellement un échantillon composé de plusieurs matières premières
- Limite de l'ajout d'un standard serait la facilité de l'extraire → Biais

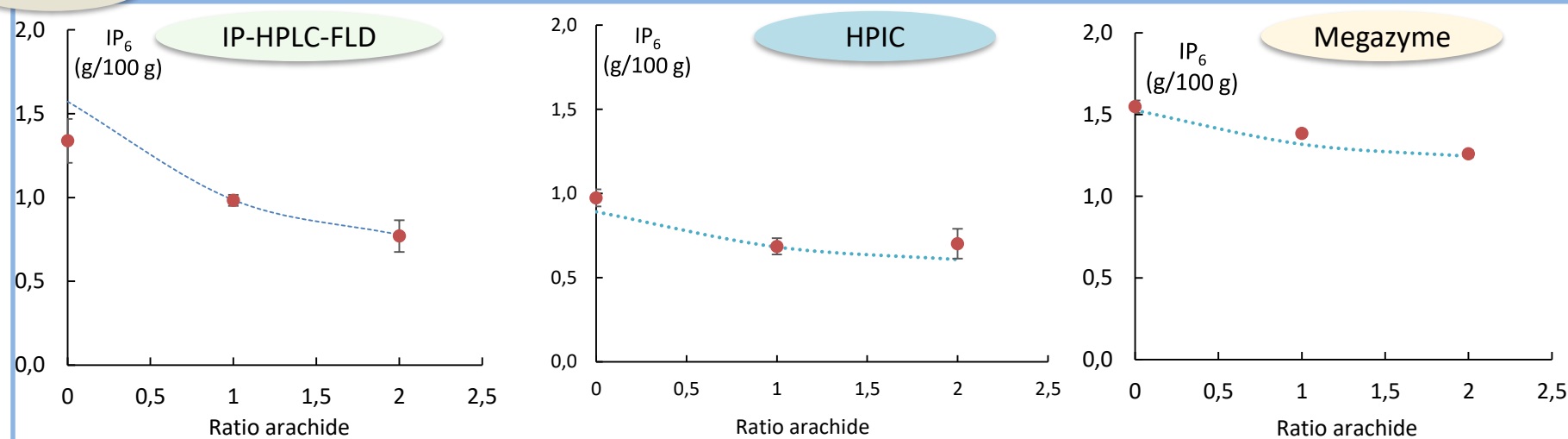


Plan 1

$n=3$



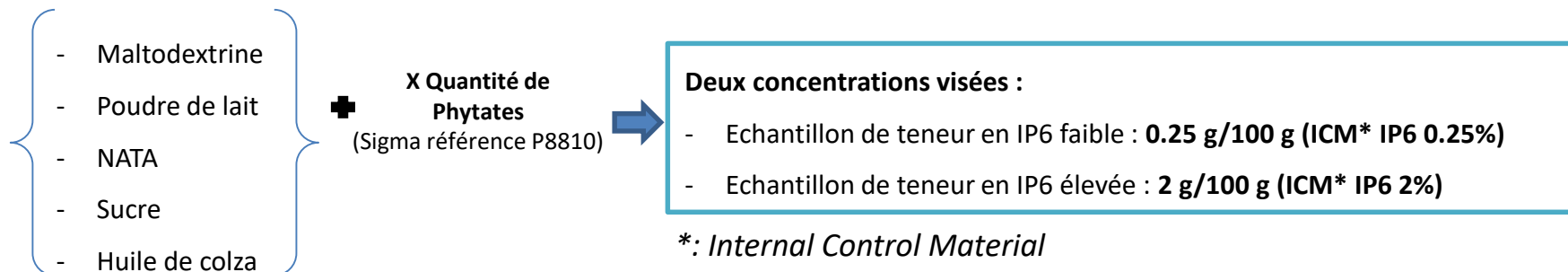
Plan 2



- Plans d'expériences non adaptés pour vérifier l'exactitude des méthodes
- Théorique \approx Expérimentale quelle que soit la méthode

Contexte :

Formuler un échantillon modèle similaire aux produits finis (riche en matière grasse) avec une quantité de phytates connue

**Teneur en IP6 obtenue par HPLC-FLD et Megazyme**

Echantillons (n=3)	IP6 (g/100 g)		
	HPLC-FLD	HPIC	Megazyme
ICM IP6 0.25%	0.2 ± 0.02	0.32 ± 0.13	0.43 ± 0.06
ICM IP6 2%	2.14 ± 0.03	1.72 ± 0.10	3.02 ± 0.10



- **Echantillons modèles** : Surestimation par la méthode Megazyme
- **Méthode HPLC-FLD** : Données théoriques ≈ Expérimentales quelle soit la concentration

Mélange
complexe sans
ajout de
standard

Spiking
ingrédients
sans phytates

Comparaison
de résultats
inter-
laboratoires

Exactitude de la mesure

❑ *Echantillons : Matières premières et échantillon de référence interne*

- Soja extrudé
- Arachide
- ICM 0.75% IP6

❑ *Laboratoires externes (méthodes colorimétriques)*

AGROBIO	MERIEUX NUTRSCIENCES	IMPROVE SAS
Megazyme	Purification Anion- Exchange + colorimétrie	

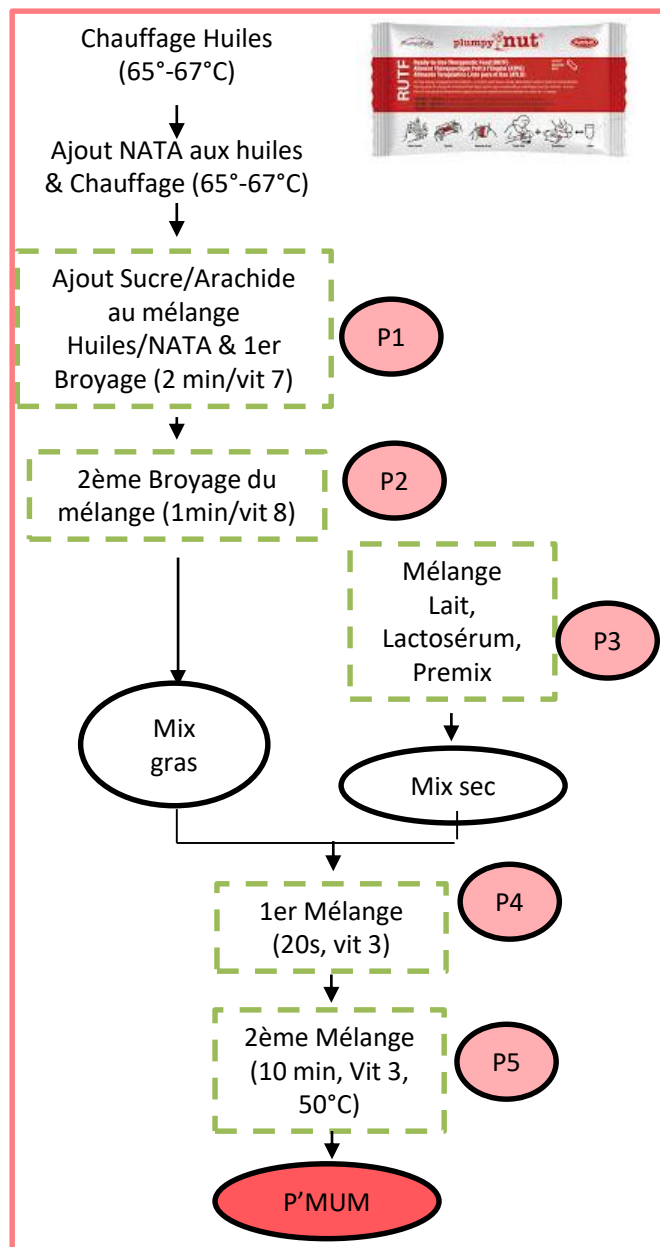
IP6 en g/100 g	Méthodes internes			Méthodes externes			
	HPLC-FLD	HPIC	Megazyme	AGROBIO	MERIEUX	IMPROVE	Moyenne
Soja extrudé	1.03 ± 0.13	1.05 ± 0.01	2.06 ± 0.16	1.29	1.43	1.70	1.47 ± 0.21
Arachide toastée	0.31 ± 0.03	0.24 ± 0.02	1.01 ± 0.04	0.55	0.81	1.00	0.79 ± 0.23
ICM IP6 0.75% IP6	0.78 ± 0.06	0.52 ± 0.02	1.06 ± 0.01	0.77	0.85	0.80	0.81 ± 0.04

Méthodes internes (n=3)

Méthodes externes (n=1)



- Matières premières : IP6 méthodes chromatographique < Megazyme et moyenne des laboratoires externes
- Echantillon de référence (IP6 0.75%) : Valeur obtenue par HPLC-FLD et Laboratoires externes proches



En considérant :

Teneur en IP6 des MP (g/100 g)

Valeurs expérimentales	Matière première	IP6 HPLC-FLD	HPIC	IP6 Kit Megazyme
	Arachide	0.27 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.88 ± 0.05



Quantités de tous les ingrédients



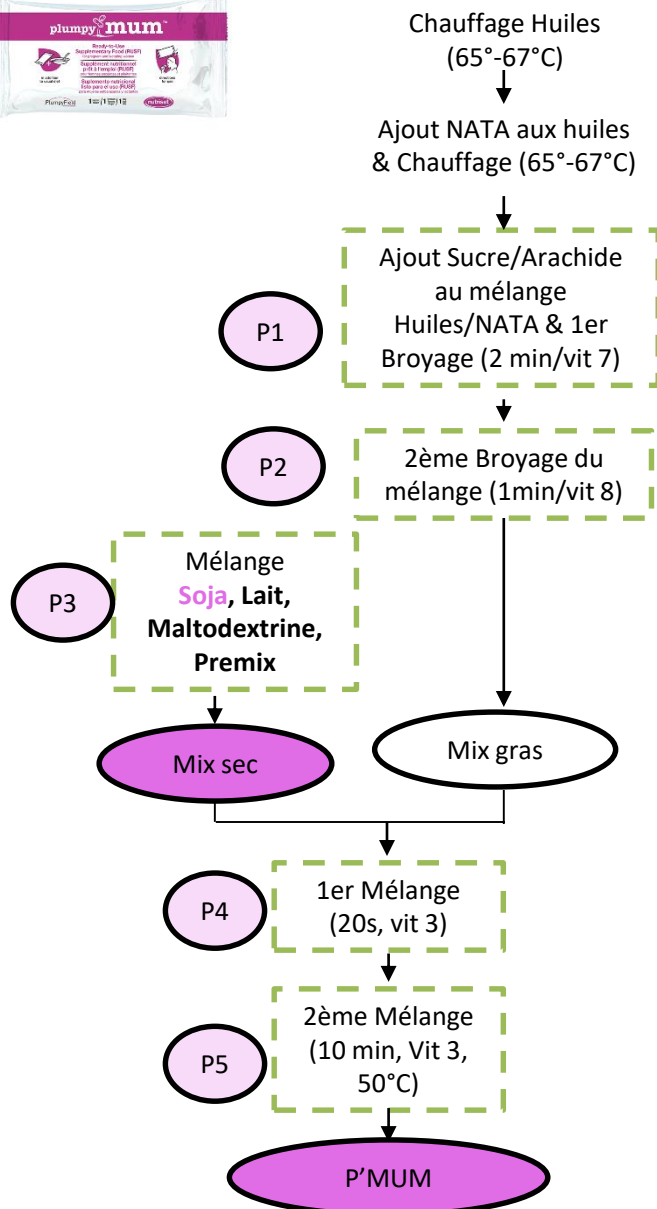
Valeurs théoriques (IP6 en g/100 g)	Prélèvements	IP6 HPLC-FLD	HPIC	IP6 Megazyme
	P1	0.094	0.082	0.309
	P2	0.094	0.082	0.309
	P3	0	0	0
	P4	0.06	0.05	0.19
	P5	0.06	0.05	0.19

Valeurs expérimentales (IP6 en g/100 g)	Prélèvements	IP6 HPLC-FLD	HPIC	IP6 Megazyme
	P1	0.07 ± 0.0	0.14 ± 0.01	0.32 ± 0.0
	P2	0.06 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.30 ± 0.02
	P3	0	0	0.12 ± 0.01
	P4	0.04 ± 0.0	0.06 ± 0.01	0.31 ± 0.05
	P5	0.03 ± 0.0	0.08 ± 0.02	0.31 ± 0.02

Lignes avec couleur (en valeurs théorique et expérimentale) correspondent au même échantillon



Mélange P3: IP6 non détecté par FLD et HPIC Mais IP6 quantifié par Megazyme



En considérant :

Teneur en IP6 des MP (g/100 g)

Echantillons	IP6 HPLC-FLD	HPIC	IP6 Kit Megazyme
FDS extrudée 17/10/23 BCTL42	0.95 ± 0.19	0.87 ± 0.04	1.72 ± 0.08
Arachide	0.27 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.88 ± 0.05



Quantités de tous les ingrédients



Valeurs théoriques (IP6 en g/100 g)	Prélèvements	IP6 HPLC-FLD	HPIC	IP6 Megazyme
	P1	0.05	0.05	0.18
	P2	0.05	0.05	0.18
	P3	0.35	0.32	0.63
	P4	0.19	0.18	0.39
	P5	0.19	0.18	0.39

Valeurs expérimentales (IP6 en g/100 g)	Prélèvements	IP6 HPLC-FLD	HPIC	IP6 Megazyme
	P1	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.12 ± 0.03
	P2	0.03 ± 0.0	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.01
	P3	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.39 ± 0.01
	P4	0.03 ± 0.0	0.06 ± 0.0	0.30 ± 0.01
	P5	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.0	0.34 ± 0.03

Lignes avec couleur (en valeurs théorique et expérimentale) correspondent au même échantillon



IP6 expérimental du P3 ≈ 50% inférieur à IP6 théorique du P3

❑ **Méthodes internes (n=3)**

IP6 en g/100 g	IP-HPLC-FLD		HPIC		Megazyme Kit	
	T	E	T	E	T	E
Mélange poudres du P'MUM	0.38	0.09 ± 0.01	0.39	0.19 ± 0.06	0.76	0.42 ± 0.01
Plumpy Mum	0.21	0.08 ± 0.01	0.21	0.10 ± 0.01	0.47	0.31 ± 0.05
P'MUM spiké 0.75% IP6 -1	0.75	0.42 ± 0.01	0.75	0.54 ± 0.05	1.02	1.04 ± 0.01
P'MUM spiké 0.75% IP6 -2	0.75	0.38 ± 0.01	0.75	0.54 ± 0.05	1.02	1.02 ± 0.04
Plumpy Nut	0.07	0.07 ± 0.01	0.05	0.11 ± 0.01	0.22	0.28 ± 0.00

T : Théorique
E : Expérimentale

Données théoriques
calculées avec la valeur
en IP6 dans les matières
premières déterminées
par chaque méthode

❑ **Laboratoires externes (méthodes colorimétriques, n=1)**

IP6 en g/100 g	AGROBIO		MERIEUX		IMPROVE SAS	
	T	E	T	E	T	E
Mélange poudres du P'MUM	0.48	0.65	0.53	0.52	0.63	0.50
Plumpy Mum	0.28	0.49	0.34	0.32	0.40	0.30
P'MUM spiké -1	0.75	1.11	0.75	1.34	0.75	1.30
P'MUM spiké -2	0.75	1.19	0.75	1.20	0.75	1.20
Plumpy Nut	0.12	0.25	0.18	0.24	0.18	0.30



- **Echantillons produits intermédiaire et finis** : Valeurs théoriques > Valeurs expérimentales (Toutes les méthodes internes)
- **Plumpy Mum spiké** (Méthodes chromatographiques internes) : Valeurs théoriques > Valeurs expérimentales
- **Plumpy Mum spiké** (Megazyme et laboratoires externes) : Valeurs théoriques < Valeurs expérimentales

Exactitude de la mesure ?

Mélange de matière premières : Valeurs attendues ≈
Valeurs quantifiées

Echantillons spikés : Surestimation par la méthode
Megazyme et méthodes des laboratoires externes

Produits finis : Impact du Premix ?

100% de l'IP6 non quantifié par toutes méthodes
→ Importante complexation (composition du
premix)

Valorisation scientifique : Short communication (en cours de rédaction)

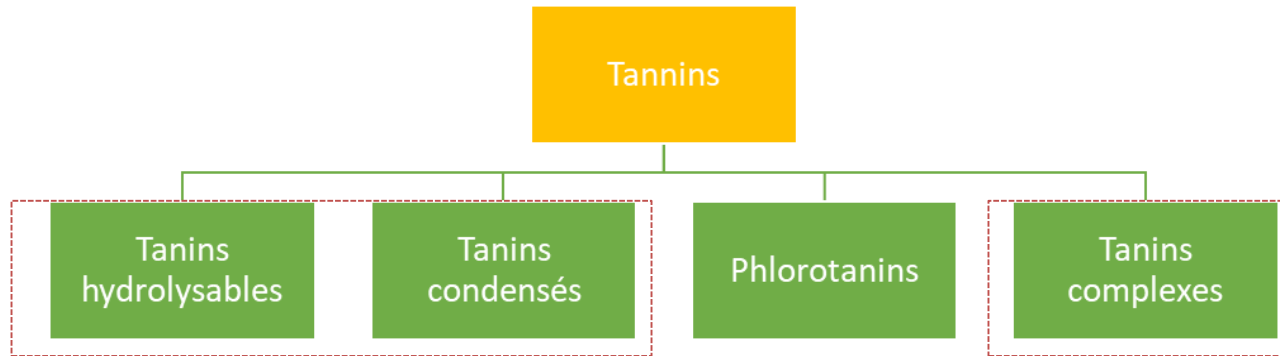
***Titre prévisionnel** : Composition of Ready-to-use therapeutic or supplementary foods impacts the accuracy of phytic acid content determination*

Données à inclure :

- Bilan matière P'Mum et du P'Nut
- Analyse inter-laboratoire

Tanins

➤ 4 différentes classes :



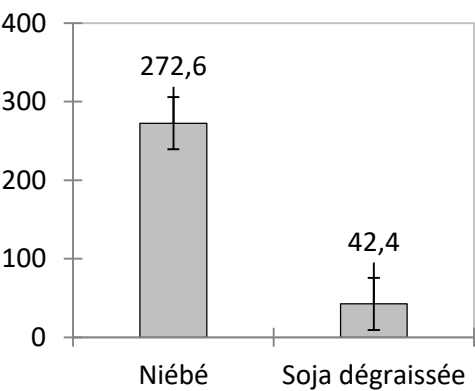
*Retrouvés dans
les matières
végétales*

- ***Tanins hydrolysables*** : Ce sont des dérivés de l'acide gallique (gallotanins et les ellagitanins)
- ***Tanins condensés (Proanthocyanidines)*** : polymères de flavan-3-ols ou de flavanols
- ***Tanins complexes*** : Composé d'une unité de gallotanins ou d'ellagitanins et d'une unité de catéchine.

➤ Effet antinutritionnel souvent associé aux tanins condensés (Smeriglio et al., 2017)

Effets	Type de tannins
Inhibition des enzymes gastrointestinales	Proanthocyanidines
Reduction de l'absorption des minéraux (Fe, Cu, Cr)	Proanthocyanidines
Modulation des maladies inflammatoires chronique du bol digestif	Procyanidine B3

Méthodes testées : 3 Colorimétriques et 1^e gravimétrique

Méthodes	Type de tanins	Rappel principe des méthode	Réponse obtenue sur le Soja et autre échantillons						
Méthode colorimétrique avec le butanol-HCl	Tanins condensés	Dépolymérisation des tanins par hydrolyse en milieu acide→ Génération d’anthocyanidines de couleur rouge	Coloration marron après hydrolyse						
Méthode colorimétrique avec DMCA*	Tanins condensés	Le DMACA donne en milieu acide, avec des tanins condensés, des complexes bleus dont l’absorbance est maximale à 640nm	Pas de réaction						
Méthode colorimétrique avec le Vanilline-HCl	Tanins condensés	La vanilline (milieu acide) + tanins condensés/flavan-3-ols → Complexe rouge	<div><div>Tanins en mg/100 g catechine</div><table><tr><th>Échantillon</th><th>Tanins en mg/100 g catechine</th></tr><tr><td>Niébé</td><td>272,6</td></tr><tr><td>Soja dégraissée</td><td>42,4</td></tr></table></div>	Échantillon	Tanins en mg/100 g catechine	Niébé	272,6	Soja dégraissée	42,4
Échantillon	Tanins en mg/100 g catechine								
Niébé	272,6								
Soja dégraissée	42,4								
Méthode gravimétrique après complexation des tannins par le PVPP	Tanins totaux	Différence de poids entre l'extrait sec avant et après traitement avec de la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	Soja dégraissé ≈2000 mg/100 g <i>Méthodes non spécifiques car d'autres composés phénoliques peuvent se fixer au PVPP</i>						

Comparaison analyse CIRAD et laboratoires externes

		Mérieux		Phytocontrol		Eurofins	
		Résultats	info méthode	Résultats	info méthode	Résultats	info méthode
Tanins	arachides	1160 ± 120	LoQ : 10mg/kg (en pyrogallol)	1220	dosage	2810 ± 661	polyphénols calculés en équivalent ac. tannique test ID849
en mg/kg	soja	2090 ± 210		2180	spectro	3960 ± 916	
	pois chiches	721 ± 72		1110	sous	1880 ± 451	
	maïs	345 ± 35		383	forme de pyrogallol	1740 ± 420	

CIRAD : Méthode vanilline HCl :

Tannins Farine de Soja dégraissé : 42.4 (mg/100 g eq catéchine)



- Méthode vanilline HCl adaptée pour la quantification des tanins condensés dans les matières premières de NUTRISET
- Teneur en tannins faibles dans le soja

Oxalates

- ❑ Acide oxalique : $(\text{COOH})_2$
- ❑ **2 formes retrouvées** dans les matières végétales : **Solubles et Insolubles**
- ❑ Oxalates solubles et totaux généralement analysés :
 - Insolubles : Détermination par différence entre totaux et solubles
- ❑ Oxalates totaux et solubles extraits avec deux différents solvants :
 - Extraction à l'eau : Oxalates solubles
 - Extraction à l'acide ($\text{HCl } 2\text{N}$) : Oxalates totaux
- ❑ Différentes méthodes de quantification :
 - Chromatographie (HPLC, HPIC)
 - Spectrophotométrie

Conditions d'extraction :

- Oxalates totaux (HCl 2N) et Oxalates solubles (H₂O distillée)
- Sonication (3 durées testées) : 15/30/60 min

Conditions chromatographique :

- Débit : 0.8 mL/min
- Volume d'injection : 10 µl
- Gradient généré automatiquement : KOH et H₂O ultrapure
- Suppresseur d'ions : AERS 4 mm
- Colonne : Ion Pac AS11-169 AC anion exchange column (4 x 250 mm) + colonne de garde IonPac AG11-HC (4 x 170 x 50 mm) for separation.
- Température colonne : 30°C
- **Détection : conductimétrie**

Laboratoire
externes
prestataires
NUTRISET

Up Sciences

- Extraction acide oxalique
- Dosage par chromatographie ionique;

Eurofins

- Tests VNAC0 + VNACA (chromatographie ionique + conductimétrie)

Résultats oxalates totaux et solubles

Oxalates totaux (mg/100 g)	Sonication 15 min	Sonication 30 min	Sonication 60 min
Soja Extrudé (BCTL42)	326.8 ± 23.7	291.8 ± 9.7	539.2 ± 15.6
Soja Extrudé 5/12/2023 15H10 BB2 S49	154.6 ± 39.6	208.4 ± 4.0	262.8 ± 9.2
Soja Extrudé 20/03/2024 8H45 BB2 Z2 Lot 24129999	171.0 ± 28.8	245.3 ± 17.9	344.5 ± 2.7
Gritz (Lot 23435215)	147.6 ± 5.0	279.1 ± 5.8	334 ± 12.7
Gritz (Lot 23461072)	140.3 ± 47.6	226.6 ± 10.8	232.2 ± 4.5
Mix poudre P'Mum Prod date 04.04.2024 - Lot 12032024	130.6 ± 8.3	154.8 ± 0.4	212.5 ± 22.2
Arachide toastée	62.0 ± 19.4	97.5 ± 11.6	104.9 ± 8.5
P'MUM Prod date 04.04.2024 - Lot 12032024	77.1 ± 36.9	99.0 ± 32.1	134.5 ± 4.0
P'NUT Prod date 04.04.2024 - Lot 12032024	10.1 ± 5.5	18.4 ± 3.1	26.7 ± 0.4



Sonication 60 min :
Faible variabilité des données et optimisation extraction

Oxalates solubles (mg/100 g)	Sonication 15 min	Sonication 30 min	Sonication 60 min
Soja Extrudé (BCTL42)	25.7 ± 8.3	25.1 ± 0.4	49.1 ± 10.6
Soja Extrudé 5/12/2023 15H10 BB2 S49	11.7 ± 3.4	<LOD	<LOD
Soja Extrudé 20/03/2024 8H45 BB2 Z2 Lot 24129999	22.8 ± 9.3	<LOD	<LOD
Gritz (Lot 23435215)	55.3 ± 10.5	<LOD	<LOD
Gritz (Lot 23461072)	<LOD	<LOD	<LOD
Mix poudre P'Mum Prod date 04.04.2024 - Lot 12032024	<LOD	<LOD	<LOD
Arachide toastée	<LOD	<LOD	<LOD
P'MUM Prod date 04.04.2024 - Lot 12032024	75.0 ± 0.9	79.0 ± 6.2	131.4 ± 18.9
P'NUT Prod date 04.04.2024 - Lot 12032024	<LOD	<LOD	<LOD



Teneurs en oxalates solubles <LOD dans les échantillons analysés

Résultats CIRAD

Oxalates totaux (mg/100 g)		Sonication 60 min
Soja	Gritz*	334 ± 12.7
	Extrudé**	262.8 ± 9.2
Arachide toastée		104.9 ± 8.5

* : Lot 23435215)

** : Soja Extrudé 5/12/2023 15H10 BB2 S49

Résultats des laboratoires externes

Oxalates (mg/100 g)	Up Sciences	Eurofins
Soja	37.3 ± 7.5	30.0
Arachide	100.3 ± 20.1	85.6 ± 17.1

Analyse réalisée en 2021

Oxalates produits finis : théorique vs expérimental

Plumpy Mum (Oxalates totaux ; mg/100 g)

Théorique	Expérimental
105.42	134.5 ± 4.0

Plumpy Nut (Oxalates totaux ; mg/100 g)

Théorique	Expérimental
23.13	26.7 ± 0.4



- Extraction par sonication 60 min recommandée
- Méthode permettant de doser les oxalates totaux dans les échantillons sélectionnés (coefficient de variation < 10%)
- Teneur en oxalates totaux produits finis : Données expérimentales ≈ Données théoriques



Recenser dans la littérature des **méthodes existantes**



Développer de **nouvelles stratégies analytiques**



Adapter certaines techniques à des voies de quantification **plus**
« low-tech » pour les laboratoires peu équipés (pays du Sud)

- **3 facteurs antinutritionnels** : Phytates , Tanins, Oxalates
- **Phytates** : Proposition d'une nouvelle méthode + Validation (2 valorisations scientifiques)
- **Tanins** : Utilisation de différentes méthodes colorimétriques très appliquées dans la littérature
(Données révélées faibles teneurs dans le soja par méthode vanilline HCl)
- **Oxalates** : Utilisation d'une méthode de chromatographie ionique

***Merci de votre
attention***