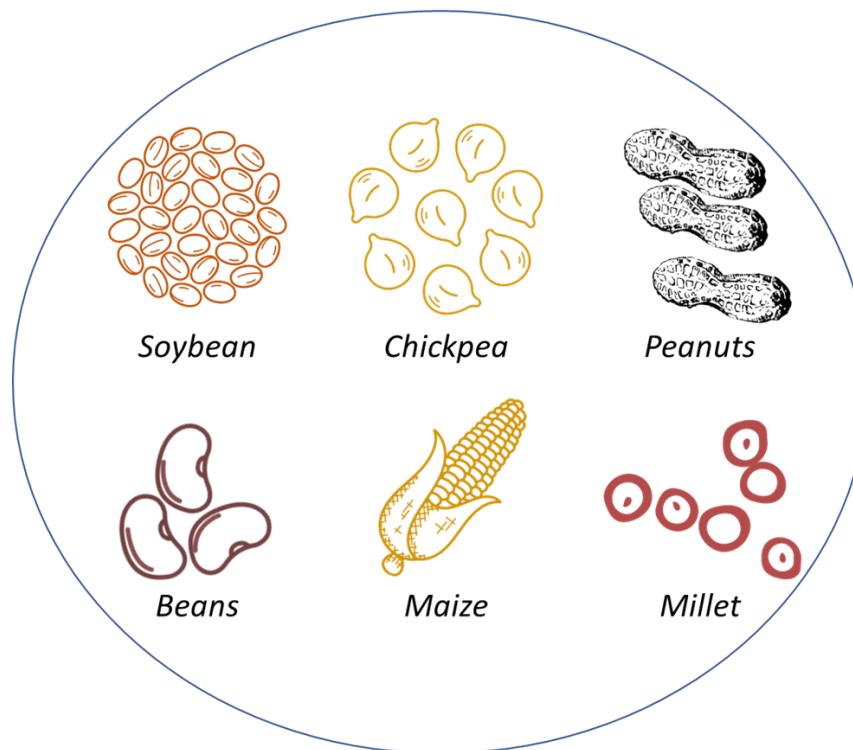


# *Restitution des travaux de recherche : Facteurs antinutritionnels (FAN)*



## Facteurs antinutritionnels : Quels composés et sources

Facteurs antinutritionnels (FAN)	Sources
<b>Composés phénoliques</b>	<b>Légumineuses</b> (Soja, lentilles, pois chiche, arachide, haricots)
1. Tannins	
2. Isoflavones	
<b>Protéines</b>	<b>Céréales</b> (Blé, Orge, avoine, mil, maïs, sorgho)
3. Inhibiteur de trypsine	
4. Lectines	
5. Inhibiteur d'alpha-amylase,	<b>Pseudo-céréales</b> (quinoa, teff, amarante)
6. Index uréase	
<b>Glycosides</b>	<b>Noix</b> ( Amandes, Cajou, pistache,
7. Saponines	
8. Alpha-galactosides	<b>Graines oléagineuses</b> (sésame, tournesol, lin, courge)
<b>Autres molécules</b>	<b>Tubercules</b> (patate douce, manioc, igname...)
9. Phytates	
10. Cyanide	<b>Solanacées</b> (tomate, pomme de terre, piment, aubergine)
11. Oxalates	
12. Goitrigènes	



## FAN prioritaires - NUTRISET

### ① Priorité établie par UNICEF

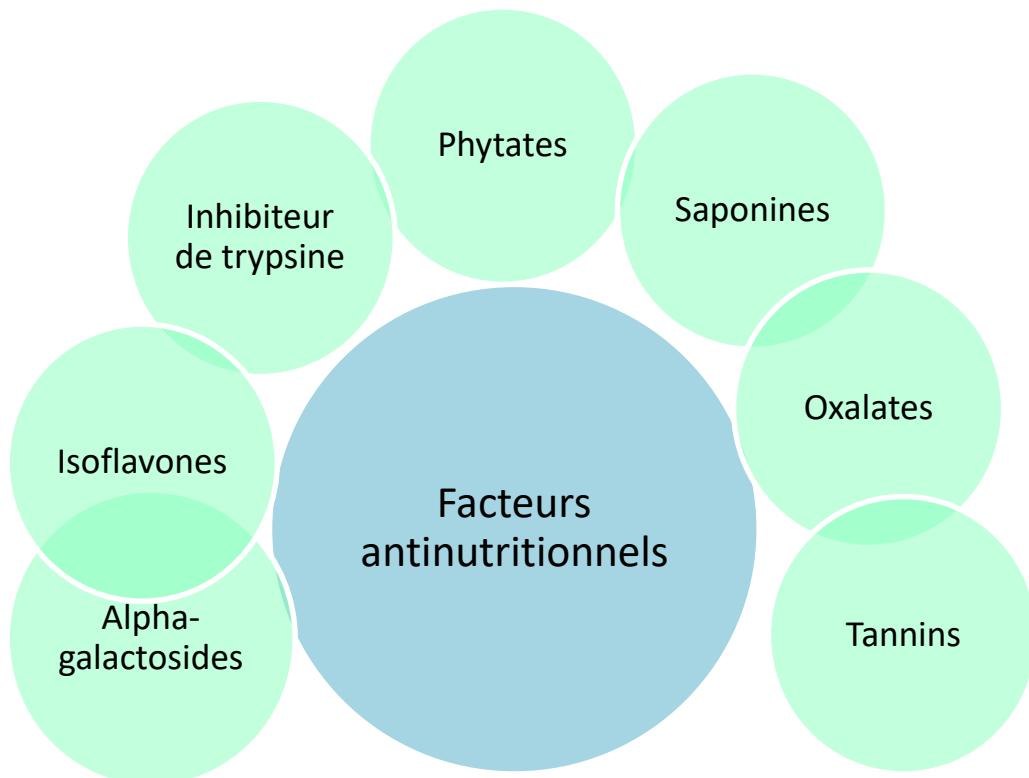
PRIORITÉ  
N°1

- Facteurs anti-trypsiques
- Saponines
- Phytates
- Tanins
- ~~Glucosides cyanogènes~~
- Oxalates
- ~~Index uréase~~
- Isoflavones
- **Alpha-galactosides**

PRIORITÉ  
N°2

- Lectines
- Inhibiteurs de l'α-amylase
- ~~Alpha-galactosides~~
- Goitrigènes
- **Glucosides cyanogènes**

### ③ Liste des FAN prioritaires retenus (7 FANs)



### ② Réorientation de l'ordre de priorité de certains FAN (R&D NUTRISET)

- Glucosides cyanogènes** : non retrouvés dans le soja et les arachides
- Alpha-galactosides** : manque d'information teneurs, seuils maximum et impact procédé
- Index uréase** : pas un FAN mais indicateur de l'intensité d'un traitement thermique

## Facteurs antinutritionnels : Impact physiologique

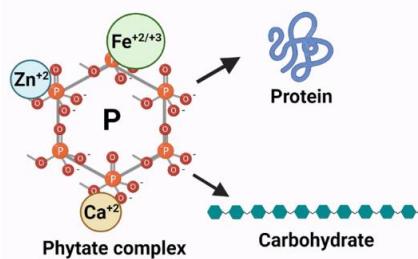
Reduction de la biodisponibilité des minéraux

Phytates

Lectines

Oxalates

Tanins



Réduction de la digestion des protéines

Facteurs antitrypsine

Phytates

Tannins

Réduction de la digestion des sucres

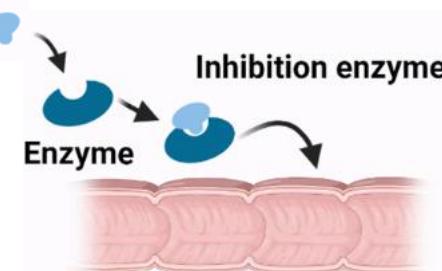
Inhibiteur de l'α-amylase

Saponines

Tannins

Altération de l'intégrité de la muqueuse intestinale

Lectines



## Problématique de recherche

Résultats fournis par différents laboratoires : Exemple phytates

Echantillons	Phytates*	Méthode	Laboratoire
<b>Mil (Gambie)</b>	150	Enzymatic kit (total phytates)	NUTRISET (intern lab)
	509	Ferric precipitation (total phytates)	Victor Raboy
<b>Mil (Niger)</b>	56	HPLC-MS (IP6)	Murcia University (Spain)
	467 ± 90	Enzymatic kit (total phytates)	NUTRISET (intern lab)
<b>SQ-LNS + phytase</b>	487	HPIC (IP6)	JFRL (Japan)
	125	HPIC (IP6)	JFRL (Japan)
	262	Ferric precipitation (total phytates)	Victor Raboy

\*mg/100g MS

① *Problème de fiabilité des méthodes d'analyses*

Seuils de consommation sans effet nocif

FAN	Seuil
<b>Phytates</b>	Ratio molaire : Phy/Fe < 1 Phy/Zn < 5 Phy/Ca < 0,17
<b>Autres FANs</b>	Seuil fixé par des études cliniques (Problème de consensus)

② *Manque d'information sur les seuils maximums de consommation*

## Problématique de recherche

### □ Stratégies de réduction des facteurs antinutritionnels

#### Décorticage

- Tannins

#### Toastage

- Inhibiteur de trypsine
- Glycosides cyanogènes
- Oxalates
- Lectines
- Alpha-galactosides

#### Autoclavage

- Inhibiteur de trypsine
- Lectines

#### Trempage

- Phytates
- Oxalates
- Isoflavones
- Lectines

#### Germination

- Phytates
- Alpha-galactosides

#### Fermentation

- Phytates
- Tannins
- Glycosides cyanogènes
- Lectines
- Alpha-galactosides

#### Hydrolyse enzymatique

- Phytates
- Alpha-galactosides

#### Cuisson - Ebullition

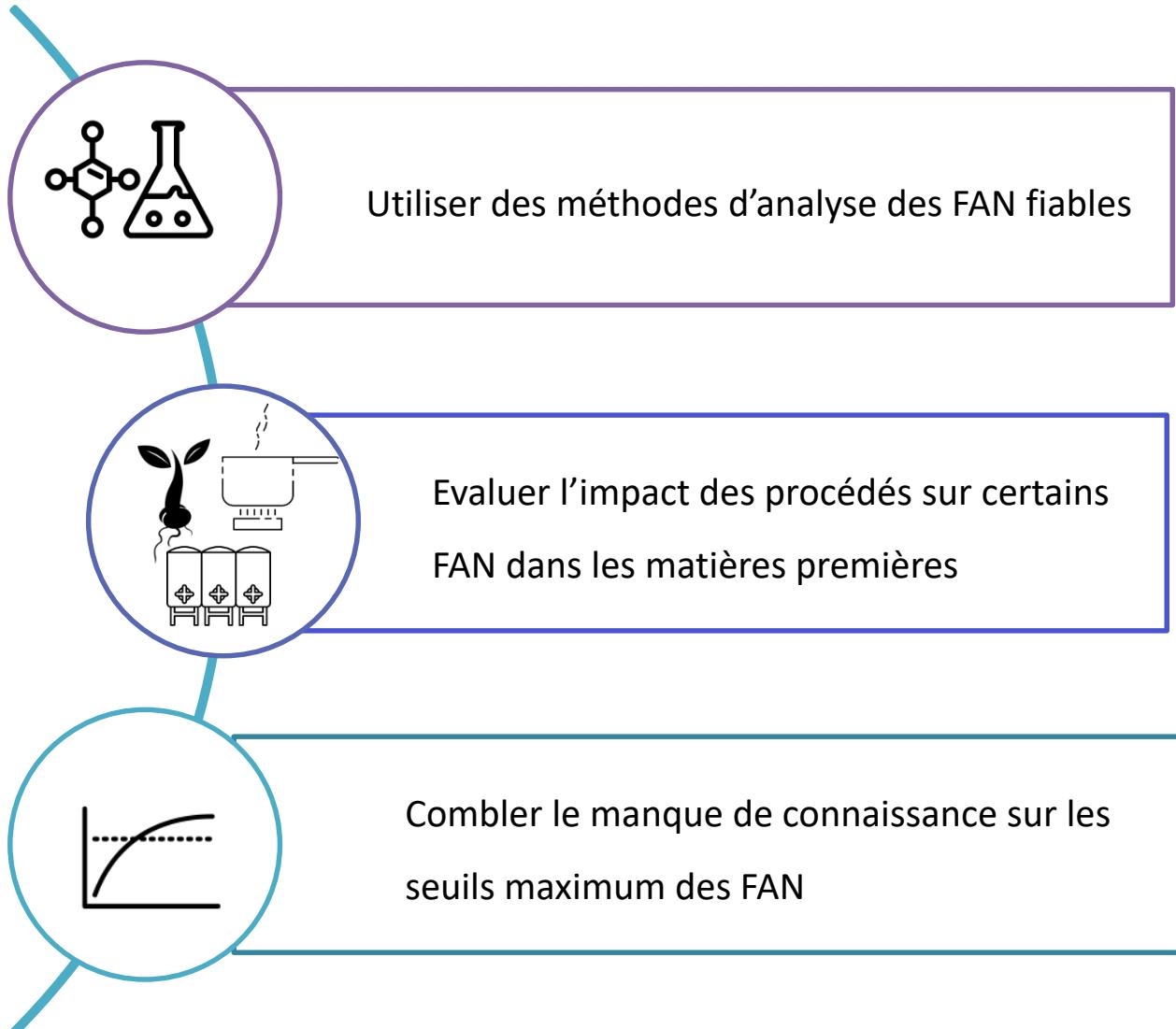
- Inhibiteur de trypsine
- Oxalates
- Isoflavones
- Lectines
- Alpha-galactosides

#### Cuisson à vapeur

- Oxalates

③ Quelle est l'efficacité des procédés

## Axes de recherche sur les FAN



# Historique des travaux : NUTRISET



## Proposition de collaboration avec GAIN et l'université de Copenhague

Evaluation des teneurs en FAN : Aliments consommés (Afrique et Asie), RUF et céréales infantiles

*Projet non démarré*

2010

2011-2014

2015-2018

## Projet Marguerite :

**Etude de l'impact de ≠ procédés pour réduire les FAN\***  
**(soja, mil, maïs, riz, lentilles corail) :**

- ① : Hydrolyse enzymatique
- ② : Extrusion,
- ③ : Couplage hydrolyse / extrusion
- ④ : Couplage hydrolyse / détente instantanée contrôlée.

\**phytates, inhibiteur de protéase ...*

## Projet LNS phytase

Reduction des phytates dans le SQ-LNS et dans l'aliment de complément (bouillie de mil) par ajout phytase pour améliorer l'absorption du zinc.

**Note technique d'un comité d'experts initié par UNICEF en 2019**

Demande aux producteurs de RUTF de quantifier des FAN – Utilisation de ses valeurs comme seuils à ne pas dépasser

2020

**Etude de l'impact des l'extrusion ou du toastage :**

Intérêt porté sur les **phytates et les facteurs anti-trypsiques**. Autres analyses marginales réalisées pour quantifier les **isoflavones et les α-galactosides**.

# Historique des travaux : Collaboration CIRAD-NUTRISET

**Proposition de collaboration avec GAIN et l'université de Copenhague**

Analyse des FANs dans les matières premières d'intérêts de NUTRISET

Projet non démarré

**2010**

**2011-2014**

**2015-2018**

**Projet Marguerite :**

Etude de l'impact de ≠ procédés pour réduire les FAN (soja, mil, maïs, riz, lentilles corail) :

- ① : Hydrolyse enzymatique
- ② : Extrusion,
- ③ : Couplage hydrolyse / extrusion
- ④ : Couplage hydrolyse / détente instantanée contrôlée

**Etude de l'impact des l'extrusion ou du toastage :**

Intérêt porté sur les phytates et les facteurs anti-trypsiques. Autres analyses marginales réalisées pour quantifier les isoflavones et les  $\alpha$ -galactosides.

**Note technique d'un comité d'experts initié par UNICEF en 2019**

Demande aux producteurs de RUTF de quantifier des FAN – Utilisation de ses valeurs comme seuils à ne pas dépasser

**2020**

**2020-2021**

**2022-2024**

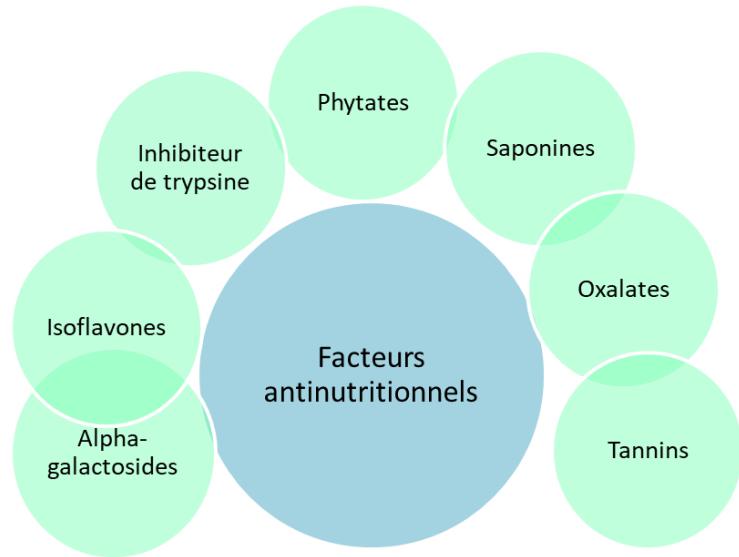
**Poursuite des travaux du projet Phytates et intégration d'autres FAN**

**Projet FAN en collaboration avec l'UMR QUALISUD**

**Projet Phytates en collaboration avec l'UMR QUALISUD**

**Développement d'analyse des phytates.**

## Activités des projets PHYTATES et FAN



*Soja*



*Arachide*

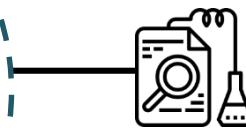


*Maïs*

*Mise au point de méthodes  
de caractérisation des FAN  
prioritaires*



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)



# *Méthode d'analyse des phytates dans les matières premières et produits finis*

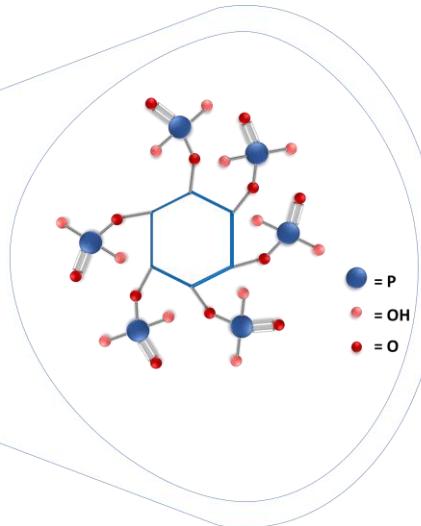
*Lorène Akissoe<sup>1,2</sup>, Adrien Servent<sup>1,2</sup>, Christian Mertz<sup>1,2</sup>,  
Pascale de Saint Priest<sup>3</sup>, Maxime Bohin<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Qualisud, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier SupAgro, Université d'Avignon, Université de La Réunion, Montpellier, France.

<sup>2</sup> CIRAD, UMR QualiSud, F-34398 Montpellier, France

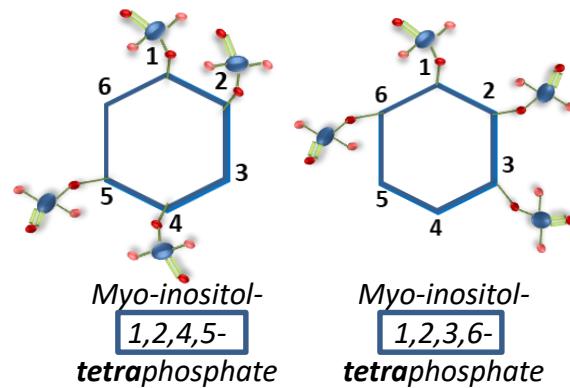
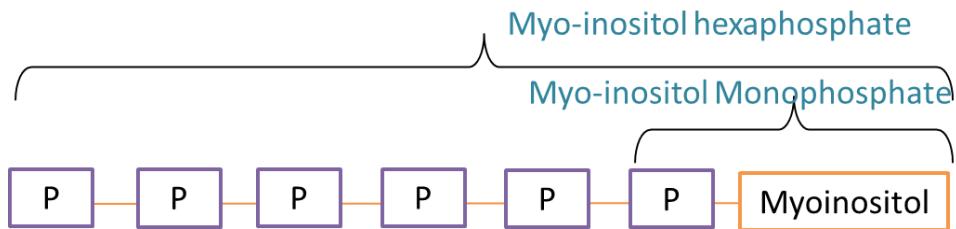
<sup>3</sup> Nutriset S.A.S., Malaunay, France

## Structure et types de phytates



- 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))

Phytates : 60–80% des phosphates totaux



# Méthodes analytiques des phytates : littérature

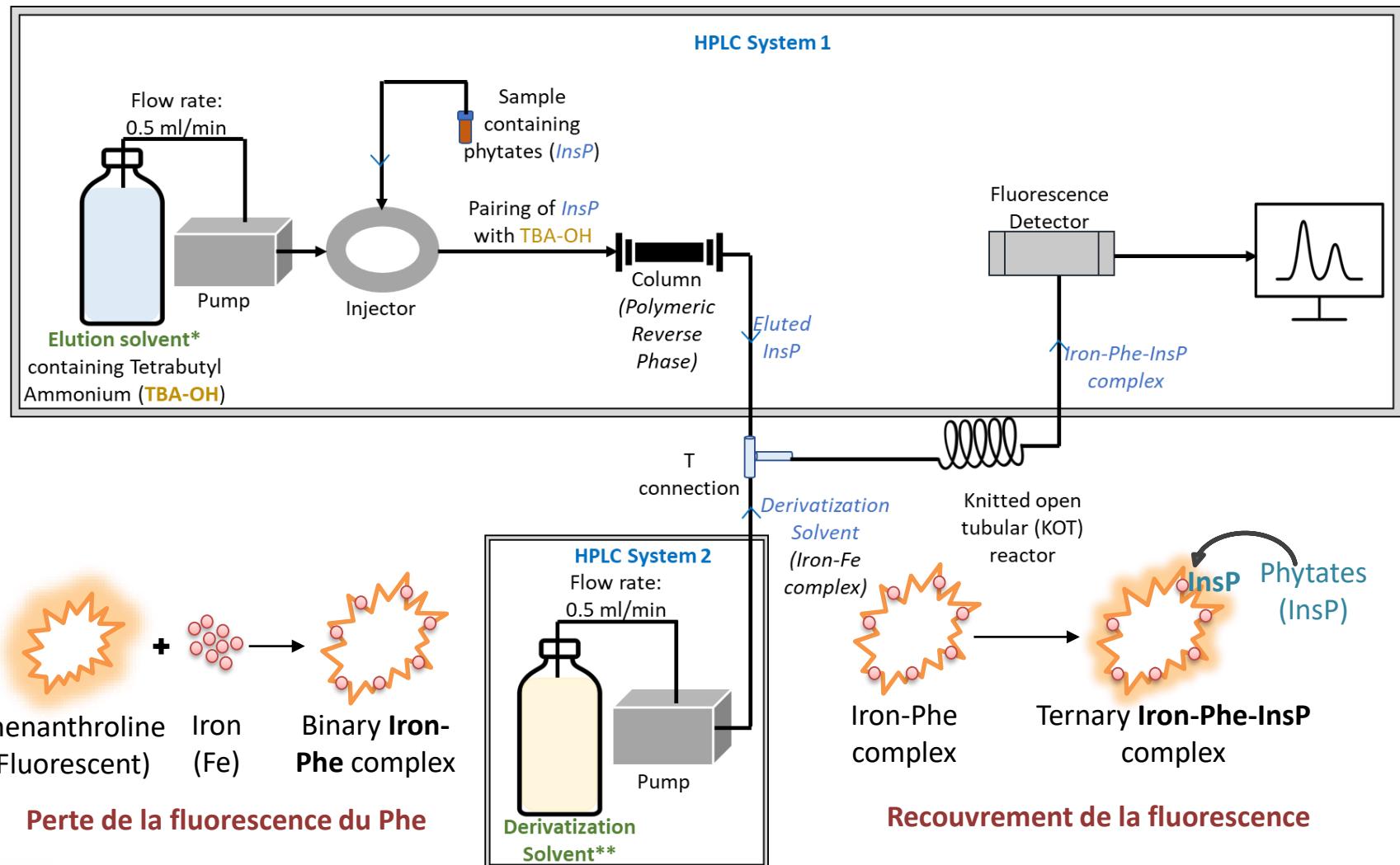
## 16 méthodes HPLC recensées dans la littérature et testées

Méthodes	Phases Mobile	Détecteur	Température colonne (°C)	Débit (mL · min <sup>-1</sup> )	Volume d'injection (μL)	Référence
Méthode avec colonne C18	0.05M CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : MeOH (49: 51) + 1.5% TBA-OH pH 4.3 adjusted with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 9M	UV (220 nm, 280 et 360 nm)	30	0.7	20	(Fredlund et al., 1997; Sandberg & Ahderinne, 1986)
	0.012M CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : MeOH (48.5: 51.5) + 0.8% TBA-OH pH 4.3 adjusted with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 9M		45	0.7	20	(Burbano et al., 1995; Centeno et al., 2001)
	H <sub>2</sub> O : ACN (90: 10) + 0.1% TBA-OH pH 4.3 adjusted with CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		45	0.7	20	
	H <sub>2</sub> O : MeOH (49: 51) + 0.1% TBA-OH pH 4 adjusted with CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		45	0.7	20	
	0.02M CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : ACN (53: 47) + 0.4% TBA-OH pH 4.3 adjusted with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		25	1	20	(Lehrfeld, 1994)
	(A) ACN (B) H <sub>2</sub> O + TBA-OH 2% pH 5.4 (C) H <sub>2</sub> O + TBA-OH 0.5% pH 5.5 (D) H <sub>2</sub> O + TBA-OH 0.01% pH 4.4		25	1	20	
	(A) H <sub>2</sub> O and (B) ACN		25	0.7	10 or 2	(Patel et al., 2016)
HILIC	(A) H <sub>2</sub> O pH 4 adjusted with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 9M and (B) ACN	UV ( 220 nm, 280 et 360 nm)	25	0.7	10 and 2	
	(A) ACN and (B) H <sub>2</sub> O		25	0.4	10 and 2	
	(A) H <sub>2</sub> O and (B) ACN		25	0.4	10	
	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.2% (A) et ACN (B)		25	0.4	10	
	(A) H <sub>2</sub> O + TBA-OH 10 Mm + 0.5% CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (B) H <sub>2</sub> O:ACN (30:70) + TBA-OH 10 Mm + 0.5% CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		25	0.4	10	
	(A) Tampon carbonate de sodium pH 9 à 0.015 M (B) MeOH:H <sub>2</sub> O (5:95)	Réfractométrie (RID)	25	0.4	10	(Lee & Mitchell, 2019)
	(A) Tampon carbonate de sodium pH 9 à 0.2 M (B) MeOH:H <sub>2</sub> O (5:95)		25	0.4	10	
par échange d'anions	0.035M CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : ACN (57: 43) + 0.4% TBA-OH pH 4.3 adjusted with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Réfractométrie (RID)	25	0.6	20	(Lehrfeld, 1994)
	0.035M CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : MeOH (44: 56) + 0.4% TBA-OH pH 4.3 adjusted with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 72%		40	0.6 et 0.7	20	(Lehrfeld, 1994)
par appariement d'ions		Réfractométrie (RID)				Méthode choisie



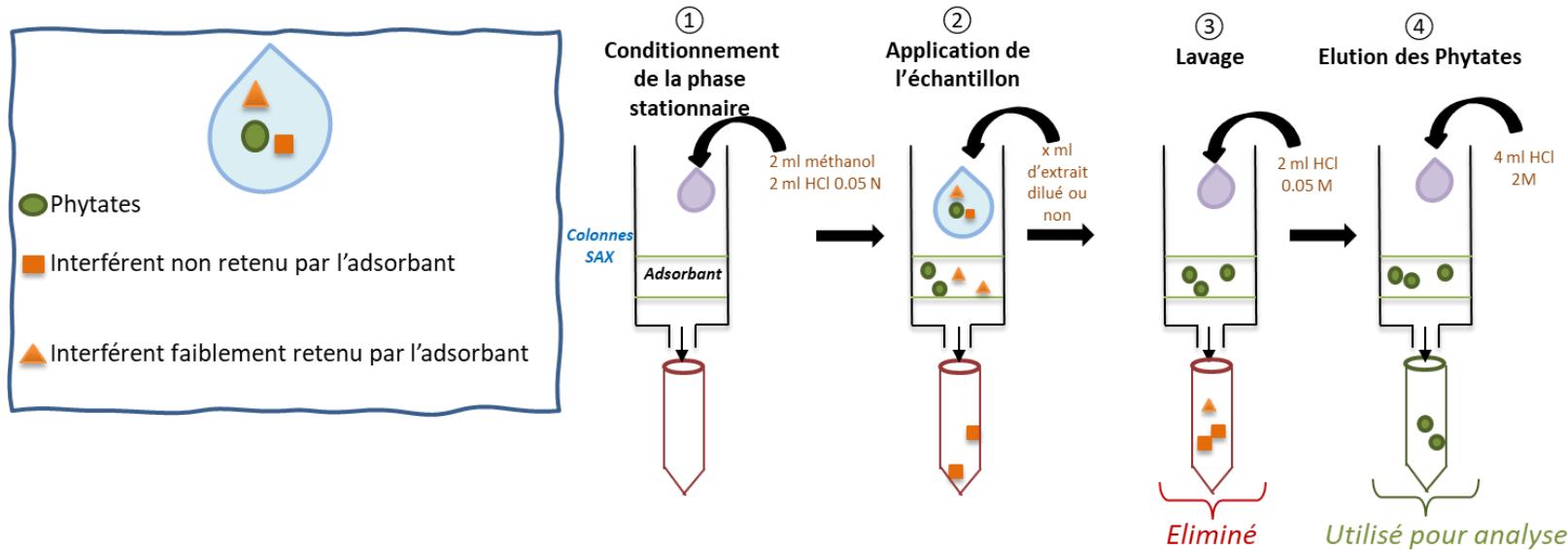
## Chromatographie par appariement d'ions- Dérivatisation post-colonne (Détection par Fluorescence, HPLC-FLD)

Modification de la méthode spectrophotométrique avec le complexe **Fer-Phenanthroline (Fe-Phe)** Chen et al. (2009)



# Analyse échantillons

## □ Analyse échantillons : Extraction acide + Nécessité de purification sur cartouche SAX



## □ Analyse des phytates par d'autres méthodes existantes : Comparaison

### HPLC-RID (Chromatographie par appariement d'ions)

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

### HPIC (Chromatographie ionique)

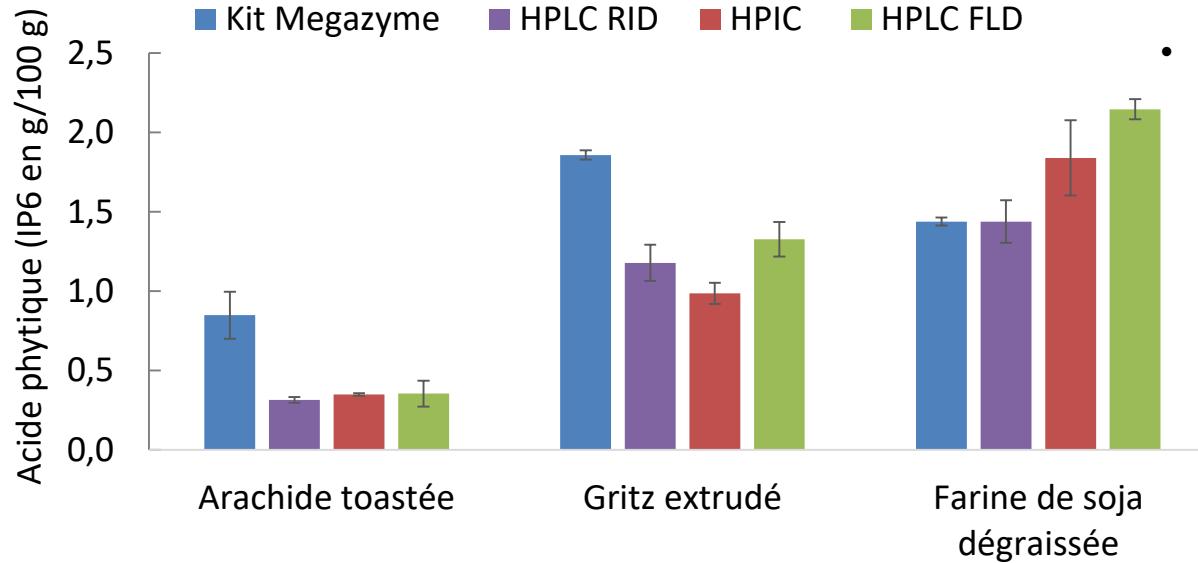
- Chromatographie ionique
- Détection par conductimétrie

### Kit MEGAZYME (méthode spectrophotométrique)

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

## Résultats : Comparaison entre les différentes méthodes

### □ Teneurs en acide phytique (IP6) déterminées par toutes les méthodes



- Sur/sous-estimation kit vs méthodes HC  
=> Même procédé d'extraction mais étape de purification de l'échantillon supplémentaire pour méthodes HC,
- Méthodes HC plus spécifiques

- Résultats significativement corrélés entre les méthodes chromatographiques (**HPLC-FLD** vs **HPLC-RID** + **HPLC-FLD** vs **HPIC**)

- Faible corrélation entre les données obtenues avec la méthode spectrophotométrique et la nouvelle méthode (**HPLC-FLD** vs kit **Megazyme**)

## Avantages et limites des méthodes



### Kit MEGAZYME

Données reproductibles

- Durée d'analyse
- **Non spécifique :** Dégradation de tous les phytates en phosphate
- **Risque de sur/sous estimation**

### HPIC

- Résolution du pic d'IP6
- Sensibilité

- Séparation d'autres composés

- Identification des isomères de IP1 à IP5

- Forte variabilité avec échantillons non purifiés

### HPLC-RID

Simple et rapide

- Présence de pics parasites (Ex Sucres)

- Pics négatifs

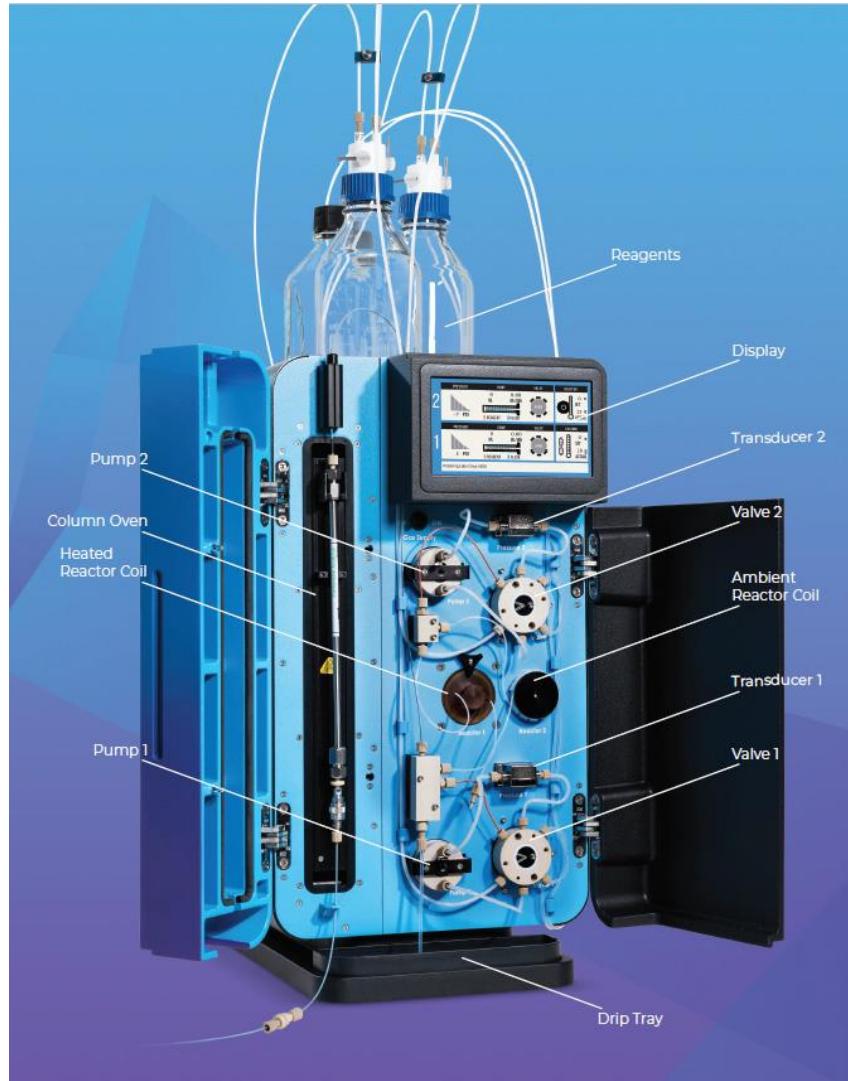
- Limite de détection élevée par rapport au HPLC-FLD

### HPLC-FLD

- Spécifique aux phytates
- Pas de pics parasites

Système interne nécessitant un contrôle pendant l'analyse

## Système de dérivatisation commercialisé



<https://www.pickeringlabs.com/products/analysis-products/post-column-instruments/>

Système de dérivatisation automatique  
type Pickering (entre 5 et 10 K€)

## Données tous les échantillons (nouvelle méthode HPLC-FLD)

Type échantillon	Echantillons	IP6* obtenu	IP6 théorique*
<b>Matières premières</b>	Arachide toastée – fournisseur 1	0,35 ± 0,08	
	Arachide toastée – fournisseur 2	0,35 ± 0,08	
	Arachide toastée – fournisseur 3	0,39 ± 0,01	
	Farine de soja dégraissée - 13/11/2018	2,00 ± 0,10	
	Farine de soja dégraissée – fournisseur 1	1,63 ± 0,05	
	Farine de soja dégraissée – fournisseur 2	2,15 ± 0,06	
	Farine de soja dégraissée – fournisseur 3	2,09 ± 0,54	
<b>Produits finis (RUTF)</b>	ENB+	ND	0,07
	Plumpy'Mum (MISAME)	0,04 ± 0,01	0,453
	Plumpy Nut	0,03 ± 0,0	0,08
<b>Produits non extrudés</b>	Gritz de soja – 17/11/22	1,38 ± 0,16	
	Mix Soja/maïs	1,25 ± 0,02	
<b>Produits extrudés</b>	Gritz extrudé – 31/01/23	1,06 ± 0,16	
	Mix Soja/maïs extrudé	1,21 ± 0,03	

\* : IP6, g/100 g

*Valeurs obtenues ne seraient pas adéquation avec valeurs théoriques*

- Phytates dégradés au cours du procédé industriel ? *Bilan matière : Suivi de teneurs en phytates*
- Influence du premix sur la méthode d'analyse ? *Analyse RUTF avec/sans premix prévu*

## Suite projet -Identification de composés à analyser

FAN	Echantillons	Mérieux	Up Sciences	Phytocontrol	Eurofins FR	CIRAD
<b>Inhibiteur de trypsine TIU/g</b>	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	600 3400 11100 1000	500 3200 12300 1500	< 1000 < 1200 X	X
<b>Saponines en mg/g</b>	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	X	1,5 6,5 4,3 4,2	1,6 ± 0,3 4,6 ± 0,6 3,4 ± 0,03 3,3 ± 0,3	X
<b>Tanins en mg/kg</b>	Arachides Soja Pois chiches Maïs	1160 ± 120 2090 ± 210 721 ± 72 345 ± 35	X	1220 2180 1110 383	2810 ± 661 3960 ± 916 1880 ± 451 1740 ± 420	X
<b>Oxalates en mg/kg</b>	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	1003 ± 201 373 ± 75 71 ± 14 219 ± 44	X	856 ± 171 300 <200 200	X
<b>Isoflavones</b>	Arachides Soja Pois chiches Maïs	0,451 1823,6 ± 141,6	< 0,5 3020,69	ND 0,112 ND ND	106 2930 32,3 38	X
<b>Alpha-galactosides raffinose (en %)</b>	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	< 0,1 1,39 ± 0,11 0,4 0,13 ± 0,01	0,084 1,79 0,46 0,164	0,06 1,39 0,35 0,1	X
<b>Alpha-galactosides stachyose (en %)</b>	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	0,56 4,38 ± 0,35 1,67 < 0,10	0,583 6,1 1,78 < 0,001	0,62 5,2 1,86 < 0,05	X
<b>Phytates en g/100g MS</b>	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	X	X		0,35 1,55

## Activités réalisées chez NUTRISET

- ❑ Revue de littérature méthodes analytiques : Oxalates
- ❑ Revue de littérature méthodes analytiques : Tannins
- ❑ Rédaction article scientifique : Méthode analytique phytates
- ❑ Recensement données FANs : Tableau de scoring des matières premières - NUTRISET

Scoring MP 2023.xlsx - Excel

Rechercher

Lorene AKISSE

	B1	AS	AT	AU	AV	AW	
1	Type de MP	Matière première	NUT - FAN - Facteurs anti-trypsiques (UTI/g)	NUT - FAN - alphagalactosides (raffinose + stachyose, en g/100g)	NUT - FAN - Phytates (totaux, en g/100g)	NUT - FAN - Lectines (HU/mg)	NUT - FAN - Saponines (mg/g)
16	Végétal	Soja entier (graine, sèche, dry seed)	8570-83700	3.35	0,478-2,01	692.82	43
17	Végétal	Soja dégraissé (farine, flour)	3300	5.77	1.72	1600-3200	5.55
18	Végétal	Soja farine grasse (ou flocons or flakes)			1.84		
19	Végétal	Soja, isolat PROD2020 (ALLIX)			1.62		
20	Végétal	Haricot mungo/mungbean (graine sèche)		4,5-8,89	0,69		28.48
25	Végétal	Pois jaunes (graine sèche)	3160	4.75	0.993	5.64	
26	Végétal	Pois carre (graine sèche)	19640		0.303		
27	Végétal	Pois commun (graine sèche)	800-8400	2,26-6,34	0,28-0,71		
31	Végétal	Niébé	1113	4,417	0,979	2.4E-07	27,5-35,7
35	Végétal	Féverole	2240-4470	1,35-3,27	0,112-1,281	49.3	4.3
38	Végétal	Blé (grain entier)	31,48-40,28	0.34	1.346		
39	Végétal	Blé (farine type 405/45)			0.0306		
40	Végétal	Blé (farine type 812/150-160)					
41	Végétal	Avoine (grain entier déglumé)		0.25	0.9		
42	Végétal	Avoine (flocos)/ rolled oats					
43	Végétal	Avoine (farine)/ oat meal			0,89-2,4		
44	Végétal	Sorgho		0,1-0,39	0,57		7.08
45	Végétal	Orge (déglumé grain entier)	5440	0.49	1.01		
47	Végétal	Mil/millet (grain décortiqué)			0.85		
48	Végétal	Millet (farine)	7810		0.96		
51	Végétal	Sesame (graine sèche)			3.15		
52	Végétal	Sesame (graine décortiquée)			0.03	nd	
53	Cecile6+C	Pois Chiche (graine sèche)	10430	2,4-4,8	0.338	2.73	
54	Végétal	Pois Chiche (farine)					
55	Végétal	Riz (naturel)		nd	0.89		

## Suite du projet : Analyse des Oxalates et Tannins

### Travaux à réaliser

Tester en laboratoire les méthodes recensées

Faire une analyse critique des méthodes d'analyse des oxalates et tannins (identification des verrous analytiques)

Identifier pour chacun des deux FAN la méthode adéquate

### Valorisation travaux

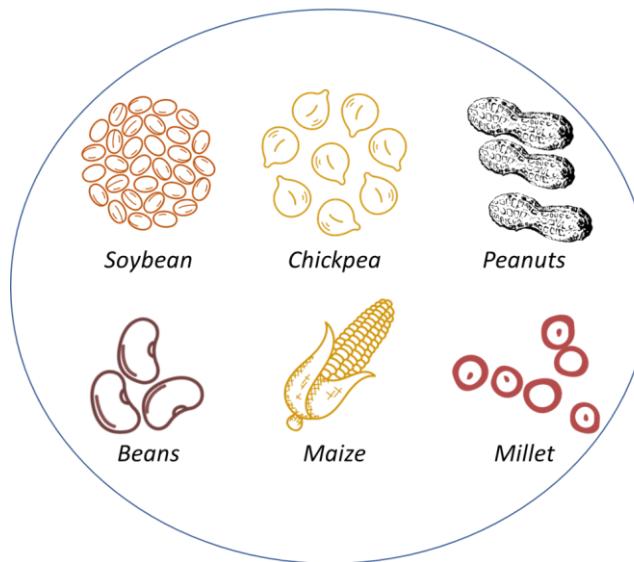
- Poster réalisé lors du congrès ICEF 14 ( Nantes, Juin 203)
- Correction de l'article « méthode analytique phytates » + Soumission
- Valorisation de la méthode analytique phytates avec l'ITERG



Merci!

## *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

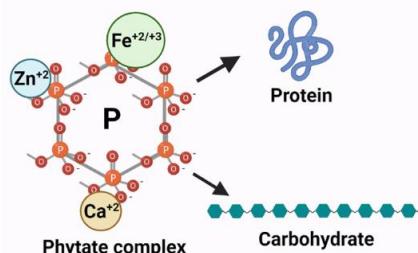
Reduction de la biodisponibilité des minéraux

Phytates

Lectines

Oxalates

Tanins



Réduction de la digestion des protéines

Facteurs antitrypsine

Phytates

Tannins

Réduction de la digestion des sucres

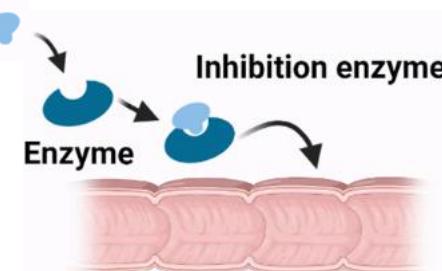
Inhibiteur de l'α-amylase

Saponines

Tannins

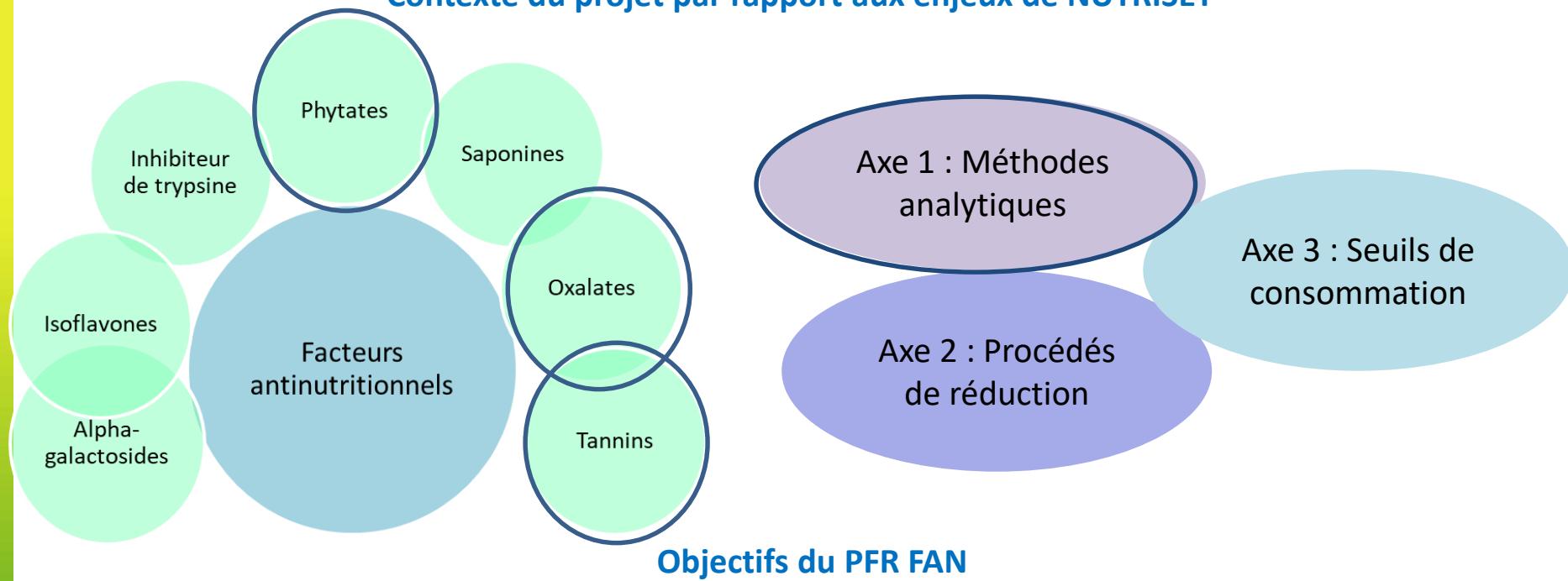
Altération de l'intégrité de la muqueuse intestinale

Lectines



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

## Contexte du projet par rapport aux enjeux de NUTRISET



### Objectifs du PFR FAN



Recenser dans la littérature des **méthodes existantes**

*Mise au point de méthodes  
de caractérisation des FAN  
prioritaires*



Développer de **nouvelles stratégies analytiques**

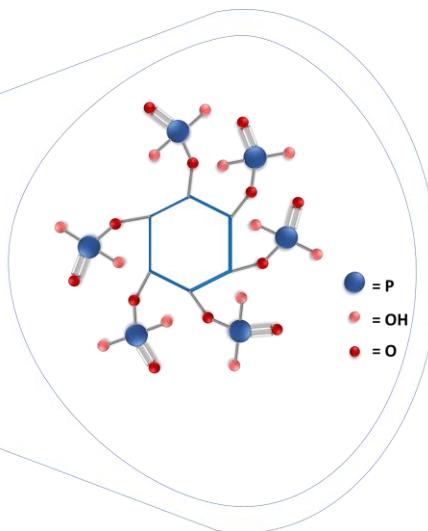
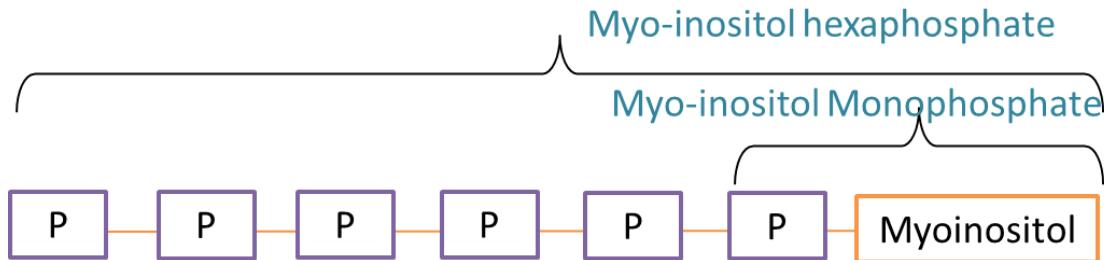


Adapter certaines techniques à des voies de quantification **plus « low-tech »** pour les laboratoires peu équipés (pays du Sud)

# *Phytates*

## Structure et types de phytates

**Phytates : 60–80%**  
des phosphates totaux



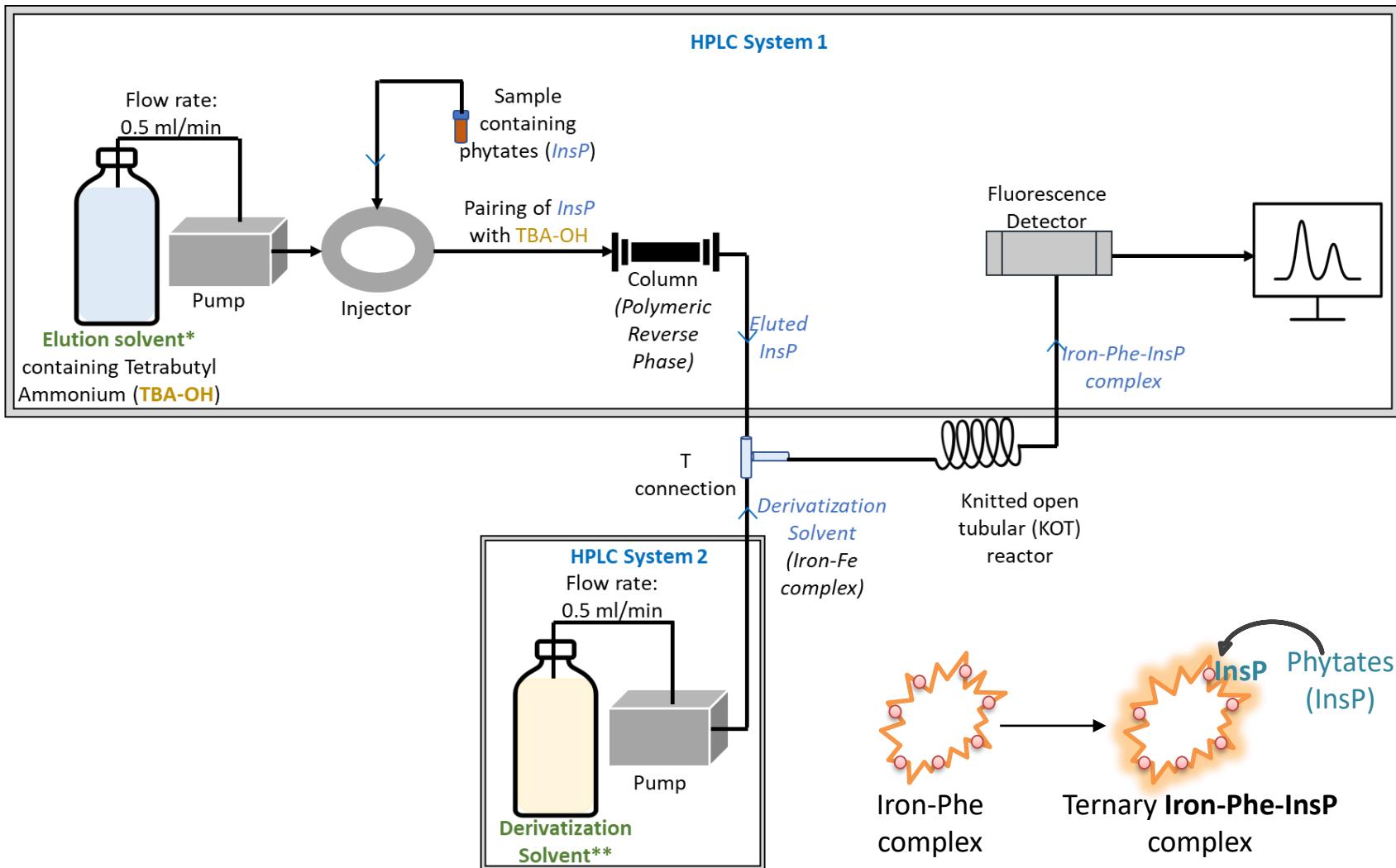
- **Myo-inositol hexaphosphate (IP6) : Acide phytique**
- **Myo-inositol mono à pentaphosphate (IP1 à IP5)**
- **IP1 à IP5 : plusieurs isomères, 63 au total (Chen and Li, 2003))**



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

# Rappel : Restitution précédente - Année 2023

## 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



## Rappel : Restitution précédente - Année 2023

### Analyse des phytates par d'autres méthodes existantes :

#### **HPLC-RID** (Chromatographie par appariement d'ions)

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

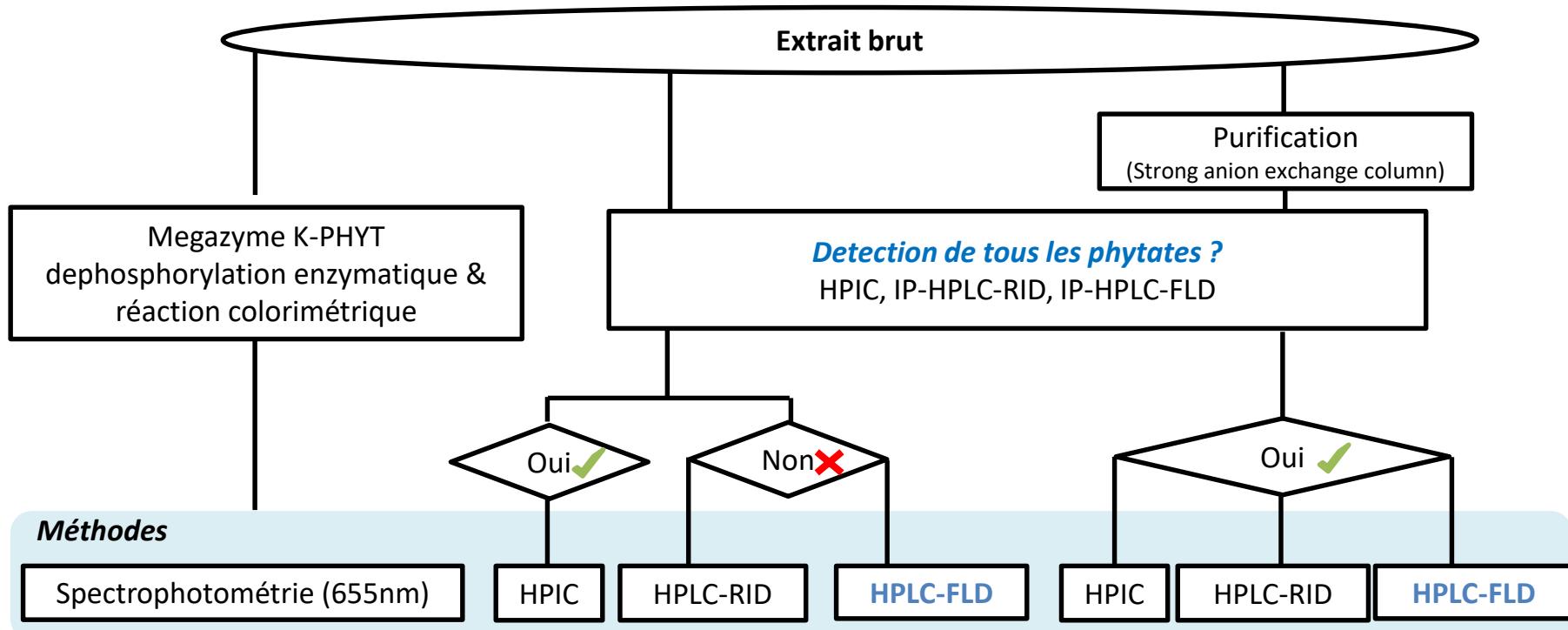
#### **HPIC** (Chromatographie ionique)

- Chromatographie ionique
- Détection par conductimétrie

#### **Kit MEGAZYME** (méthode spectrophotométrique)

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

## Rappel : Restitution précédente - Année 2023



- **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



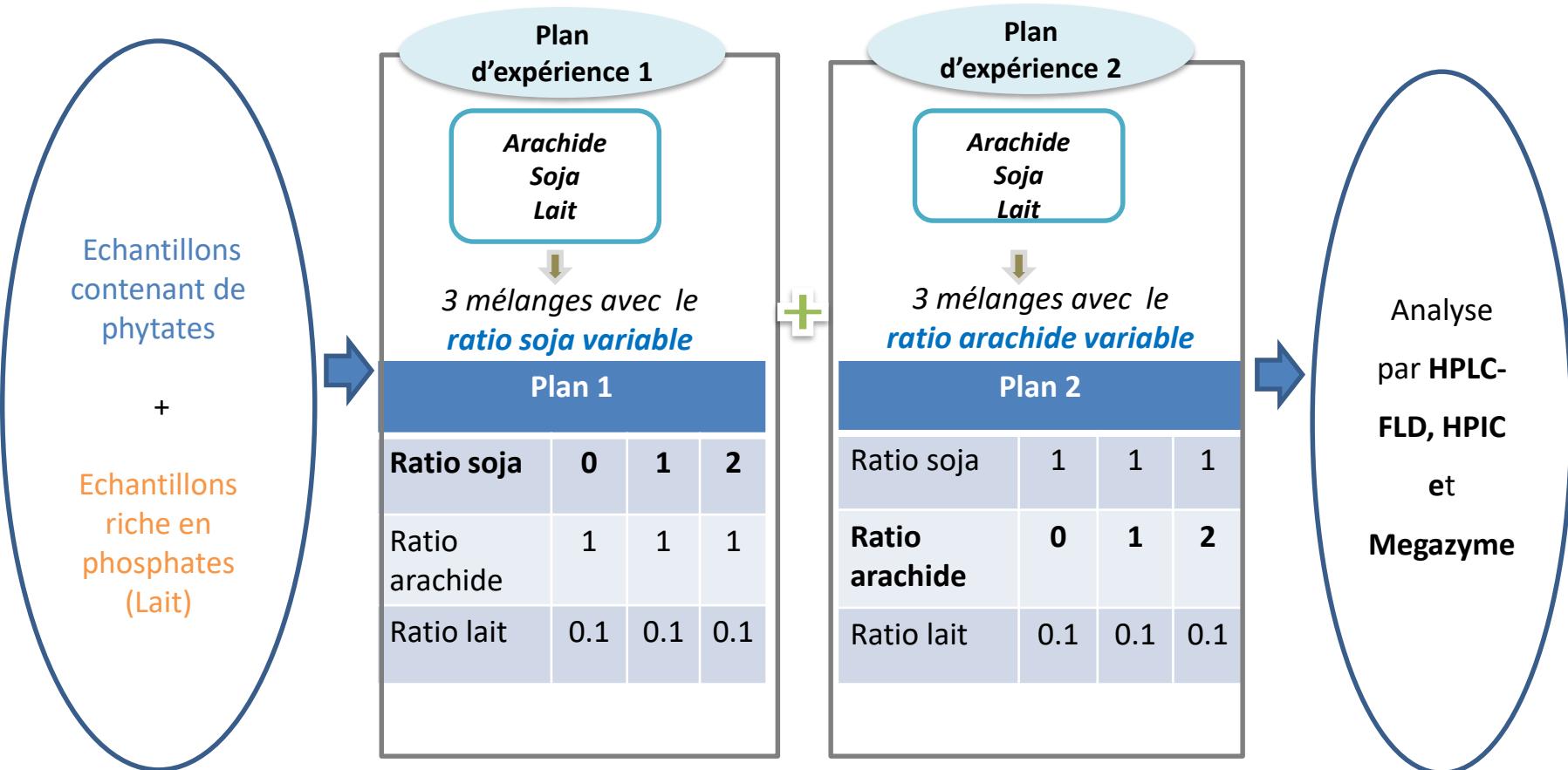
- Analyse non poursuivie sur HPLC-RID : performances analytiques faibles (sensibilité, problèmes de pics parasites)
- Travaux réalisés sur l'acide phytique uniquement (IP6)



## Exactitude de la mesure

### Contexte :

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



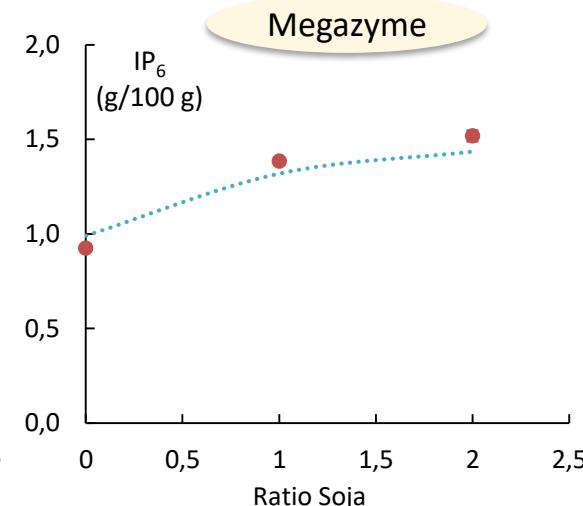
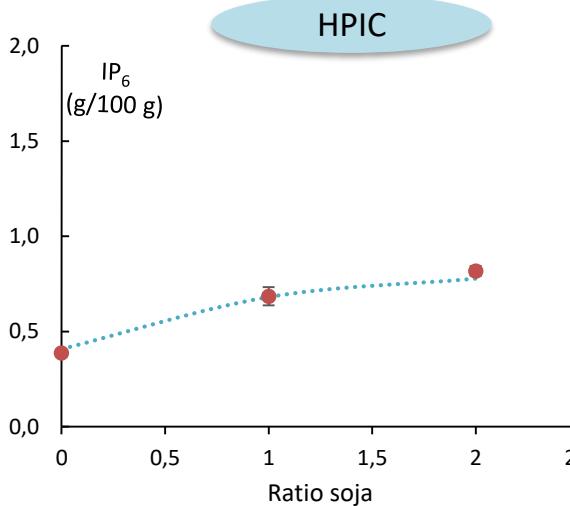
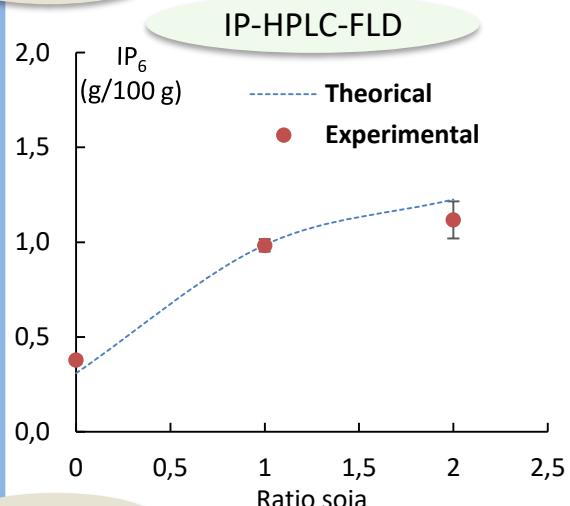
Mélange MP  
sans ajout de  
standard

Spiking  
ingrédients  
sans phytates

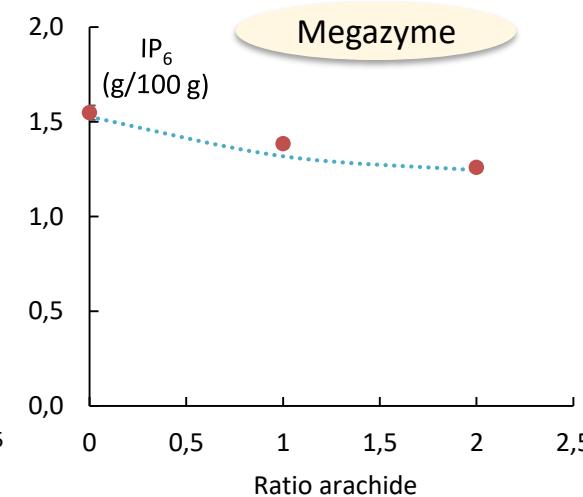
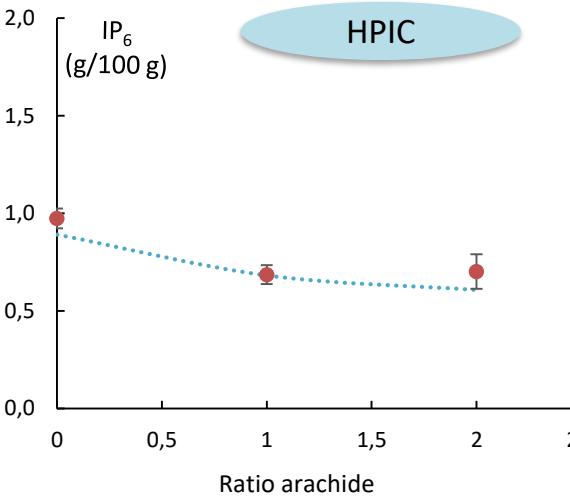
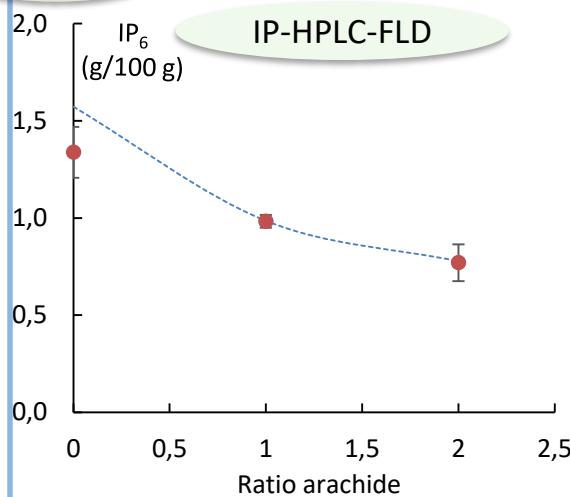
Comparaison  
de résultats  
inter-  
laboratoires

## Exactitude de la mesure

**Plan 1**



**Plan 2**



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

Mélange sans Spiking

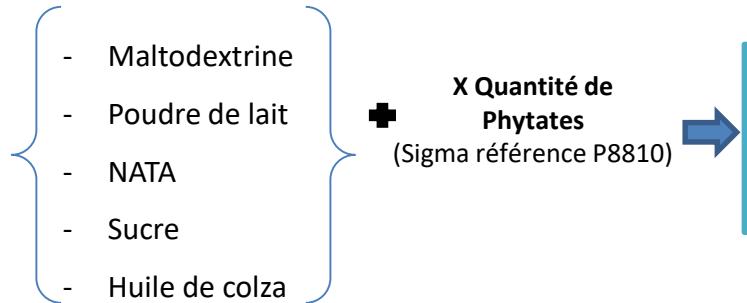
Spiking ingrédients sans phytates

Comparaison de résultats inter-laboratoires

## Exactitude de la mesure

### Contexte :

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



#### Deux concentrations visées :

- Echantillon de teneur en IP6 faible : **0.25 g/100 g (ICM\* IP6 0.25%)**
- Echantillon de teneur en IP6 élevée : **2 g/100 g (ICM\* IP6 2%)**

\*: Internal Control Material

### 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 NUTRISCIENCES	IMPROVE SAS
Megazyme	Purification Anion- Exchange + colorimétrie	

IP6 en g/100 g	Méthodes internes		Méthodes externes				Moyenne
	HPLC-FLD	HPIC	Megazyme	AGROBIO	MERIEUX	IMPROVE	
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	<b>0.78 ± 0.06</b>	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)

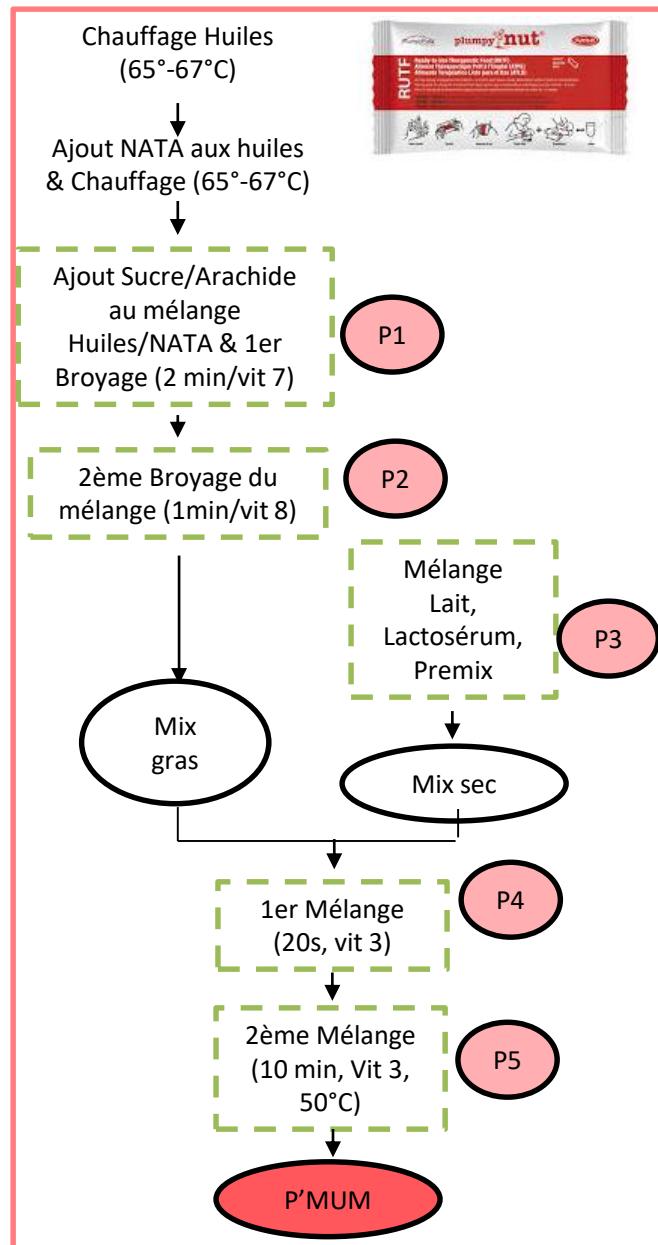


- Matières premières : IP6 méthodes chromatographique < Megazyme et moyenne des laboratoires externes
- Echantillon de référence (IP6 0.75%) : Valeur obtenue par HPLC-FLD et Laboratoires externes proches

Réalisation bilan matière

Comparaison de résultats inter-laboratoires

## Impact du Premix



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

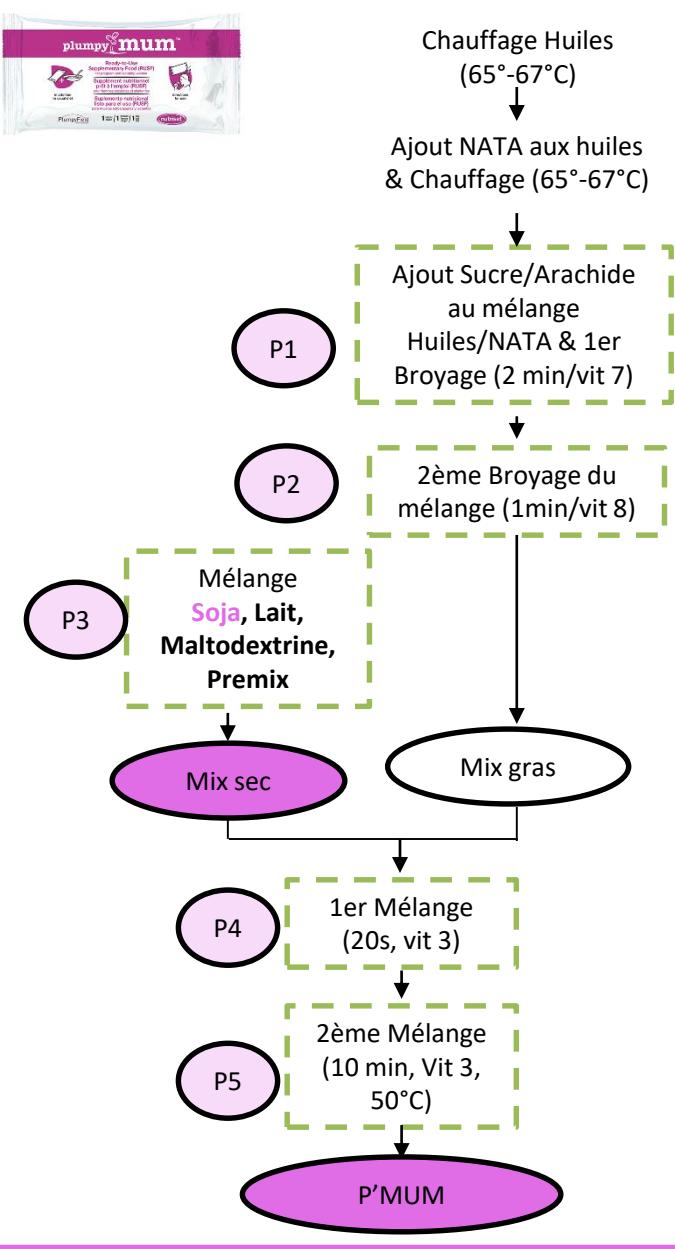


Mélange P3: IP6 non détecté par FLD et HPIC Mais IP6 quantifié par Megazyme

Réalisation bilan matière

Comparaison de résultats inter-laboratoires

## Impact du Premix



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	0.05	0.18
P2	0.05	0.05	0.05	0.18
P3	0.35	0.32	0.32	0.63
P4	0.19	0.18	0.18	0.39
P5	0.19	0.18	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	0.12 ± 0.03
P2	0.03 ± 0.0	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01
P3	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.39 ± 0.01
P4	0.03 ± 0.0	0.06 ± 0.0	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01
P5	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.0	0.34 ± 0.03	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

## Conclusion

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*

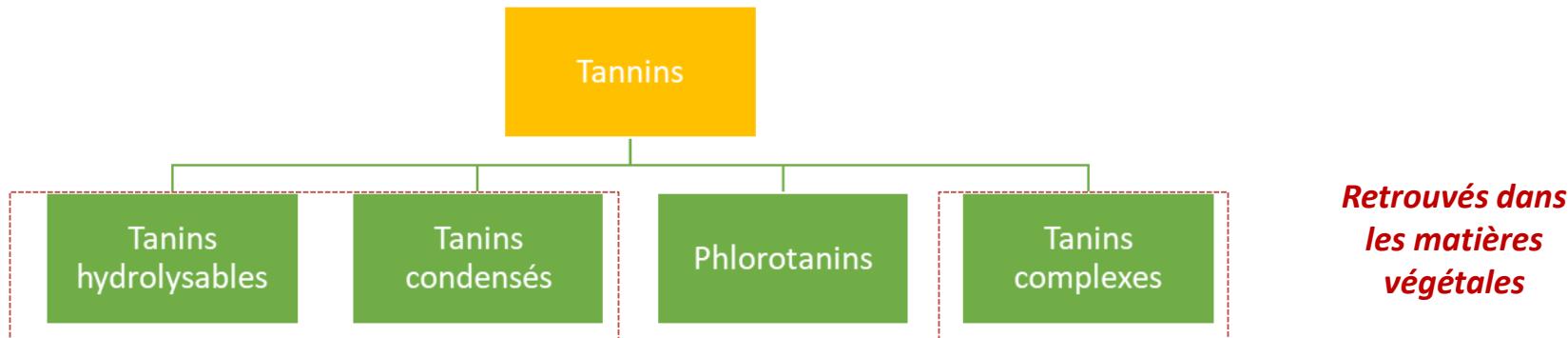
#### Données à inclure :

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

*Tanins*

## Tanins : Classification et impact physiologique

### ➤ 4 différentes classes :

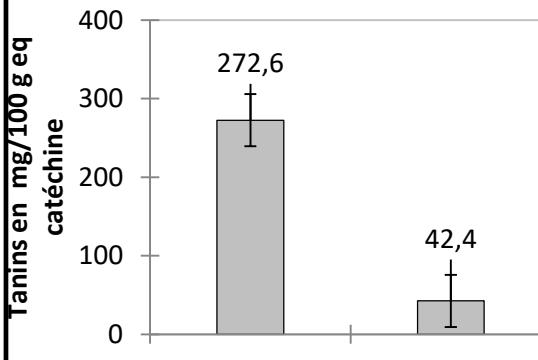


- ***Tanins hydrolysables*** : Ce sont des dérivés de l'acide gallique (gallotanins et les ellagitanins)
- ***Tanins condensés (Proanthocyanidines)*** : polymères de flavan-3-ols ou de flavanols
- ***Tanins complexes*** : Composé d'une unité de gallotanins ou d'ellagitanins et d'une unité de catéchine.

### ➤ 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<sup>e</sup> gravimétrique

Méthodes	Type de tanins	Rappel principe des méthode	Réponse obtenue sur le Soja et autre échantillons						
Méthode colorimétrique avec le <b>butanol-HCl</b>	Tanins condensés	Dépolymérisation des tanins par hydrolyse en milieu acide → Génération d'anthocyanidines de couleur rouge	Coloration marron après hydrolyse						
Méthode colorimétrique avec <b>DMCA*</b>	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 <b>Vanilline-HCl</b>	Tanins condensés	La vanilline (milieu acide) + tanins condensés/flavan-3-ols → Complexe rouge	 <p>Bar chart showing Catechins content in mg/100 g eq for Niébé and Soja dégraissée. The y-axis ranges from 0 to 400. Niébé has a value of 272,6 and Soja dégraissée has a value of 42,4.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Échantillon</th> <th>Catechines (mg/100 g eq)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Niébé</td> <td>272,6</td> </tr> <tr> <td>Soja dégraissée</td> <td>42,4</td> </tr> </tbody> </table>	Échantillon	Catechines (mg/100 g eq)	Niébé	272,6	Soja dégraissée	42,4
Échantillon	Catechines (mg/100 g eq)								
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 polyvinylpolypyrrrolidone (PVPP)	<p>Soja dégraissé ≈ 2000 mg/100 g</p> <p><i>Méthodes non spécifiques car d'autres composés phénoliques peuvent se fixer au PVPP</i></p>						

## Comparaison analyse CIRAD et laboratoires externes

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

## Oxalates : Structures et Formes

- ❑ Acide oxalique :  $(COOH)^2$
- ❑ **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 (HCl 2N) : Oxalates totaux
- ❑ Différentes méthodes de quantification :
  - Chromatographie ( HPLC, HPIC)
  - Spectrophotométrie

## Conditions d'extraction :

- Oxalates totaux (HCl 2N) et Oxalates solubles (H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O ultrapure
- Supresseur 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  
prestashopaires  
NUTRISET

### Up Sciences

- Extraction acide oxalique
- Dosage par chromatographie ionique;

### Eurofins

- Tests VNACO + 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

## Comparaison analyse CIRAD et laboratoires externes

### 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*