



SYMPOSIUM « BioMad 2009 »
Biodiversité / Valorisation des Substances Naturelles
13 -14 -15 octobre 2009

Simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (APIACEAE)

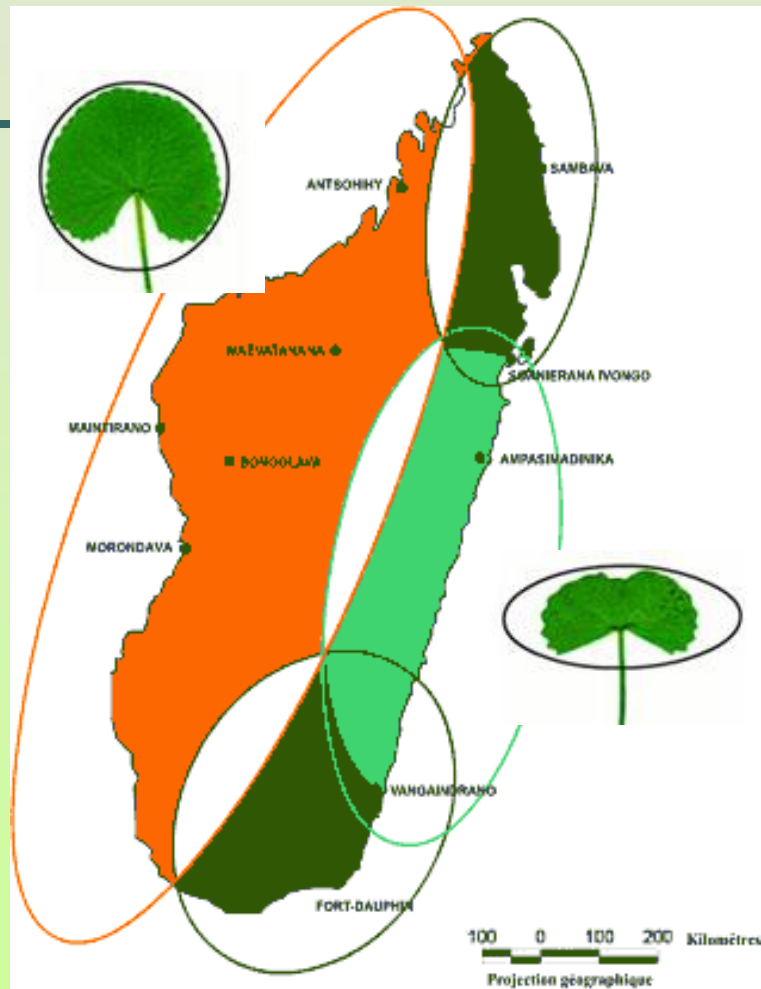
M.H. Rafamantanana, E. Rozet, G.E. Raoelison, D.Randriamampionona, K. Cheuk, S.U. Ratsimamanga, Ph. Hubert, J. Quetin-Leclercq

Laboratoire de Phytochimie et de Standardisation – IMRA – Itaosy
Laboratoire de Pharmacognosie – Unité CHAM- UCL 7230 - Bruxelles (Belgique)
Laboratoire de Chimie Analytique – Ulg – Liège (Belgique)

Centella asiatica Urb.
(APIACEAE)

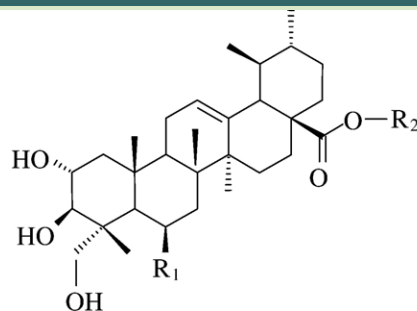


Répartition géographique



Carte : Répartition de *Cissampelos asiatica* à Madagascar Source: CIRAD

Utilisations et principes actifs



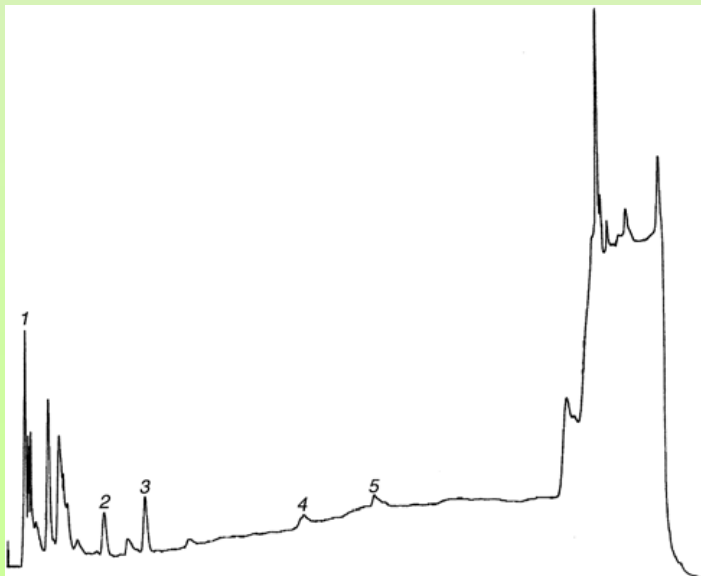
Asiatic acid	$R_1 = H$	$R_2 = H$
Madecassic acid	$R_1 = OH$	$R_2 = H$
Asiaticoside	$R_1 = H$	$R_2 = \text{Glu-Glu-Rha}$
Madecassoside	$R_1 = OH$	$R_2 = \text{Glu-Glu-Rha}$

- Cicatrisant: traitement de la lèpre et des varices
- Antirhumatismal, antioxydant
- hypertension artérielle
- Entre dans la préparation de médicaments (madecassol, TECA...)
- produits cosmétiques
- Deuxième plante médicinale exportée à Madagascar (120t, 2007)

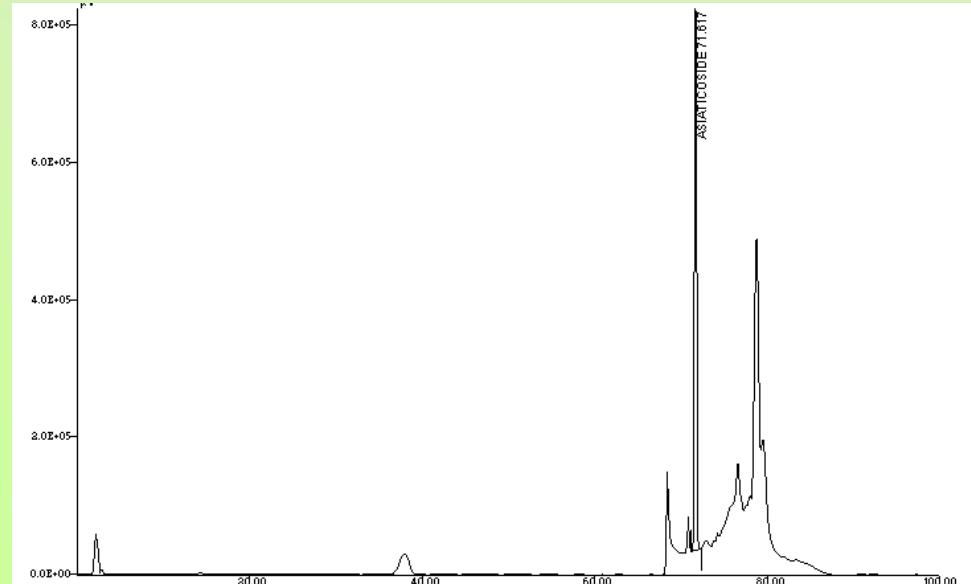


Problématiques

- ❖ Méthodes existantes
 - ne dosent pas les 4 molécules actives
 - ne sont pas validées
- ❖ Méthode de la Pharmacopée Européenne



Chromatogramme d'extrait de feuilles défini

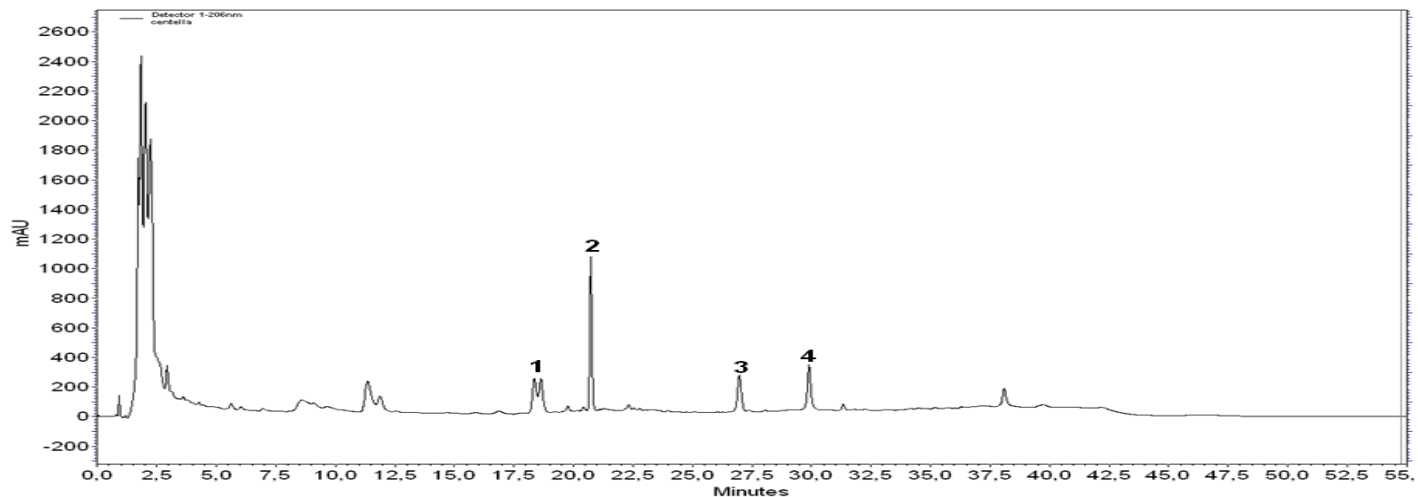


Chromatogramme obtenu

Chromatographie



- ❖ Colonne RP-18
- ❖ Gradient: acétonitrile/eau (1 ml/mn)
- ❖ UV 206 nm



Chromatogramme d'un extrait méthanolique de feuilles de *C.a.*

Validation de la méthode



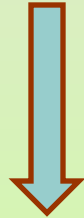
Critères

- ❖ Rendement d'extraction
- ❖ Sélectivité
- ❖ LD et LQ
- ❖ Fonction de réponse
- ❖ Linéarité
- ❖ Fidélité
- ❖ Justesse
- ❖ Exactitude = fidélité + justesse

Extraction



1g de poudre de feuilles



**Extraction au Soxhlet
(100ml méthanol)**

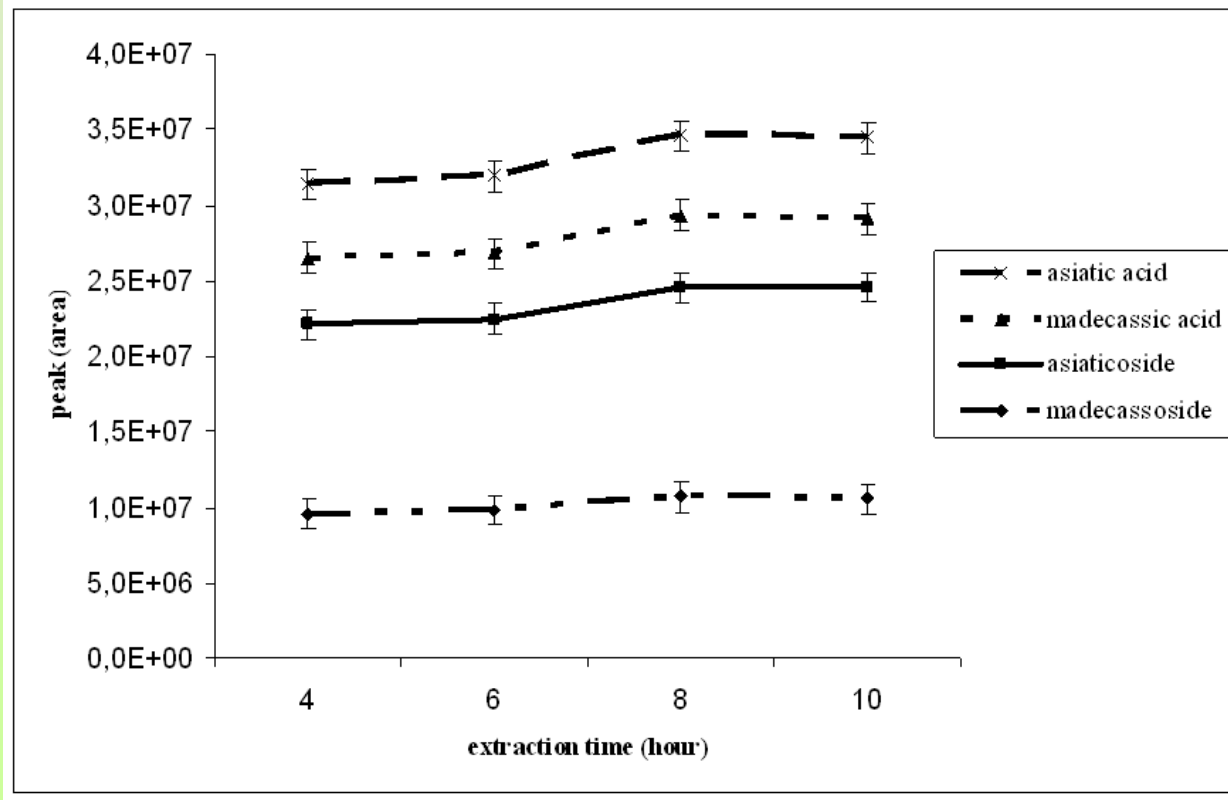
Extrait méthanolique



Evaporation

Dilution dans 10 ml de méthanol

Rendement d'extraction



Facteurs de réponse (%)



Madecassoside	99±0.5
Asiaticoside	100±0.2
Acide madecassique	210±1.3
Acide asiatique	210±1.3

Standards



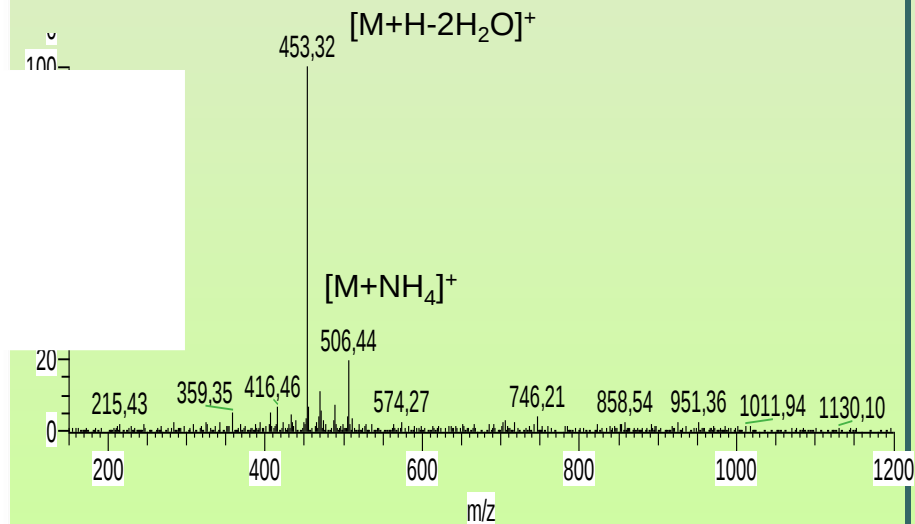
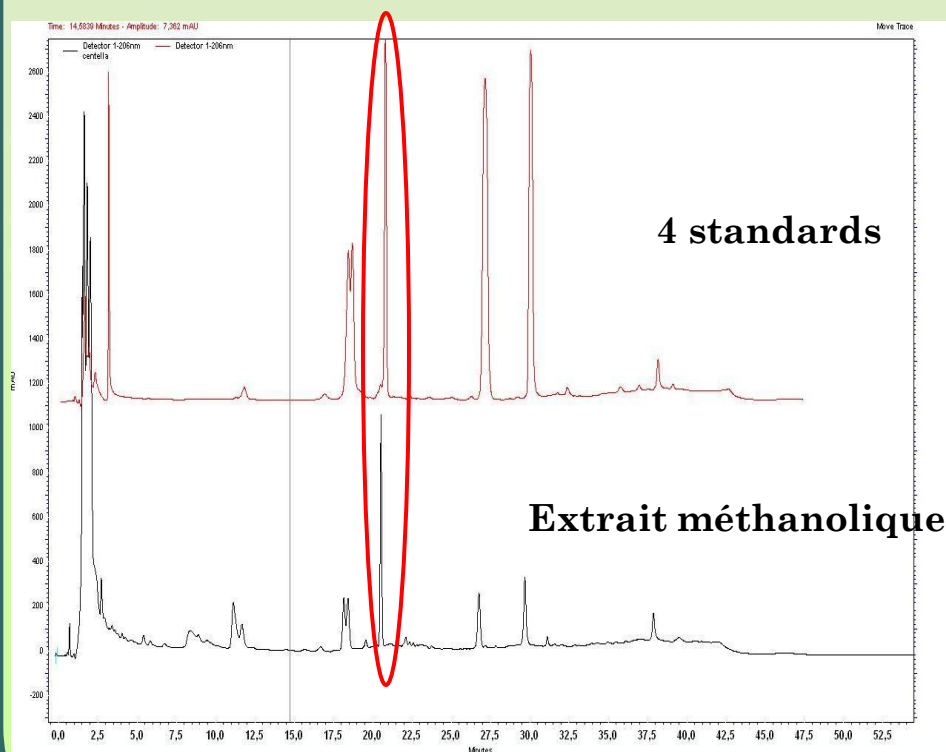
❖ Standards de calibration ($n = 3$, $m = 2$)

- Asiaticoside 5 mg/ml
- Acide asiatique 2.5 mg/ml

❖ Standards de validation ($n = 3$, $m = 3$)

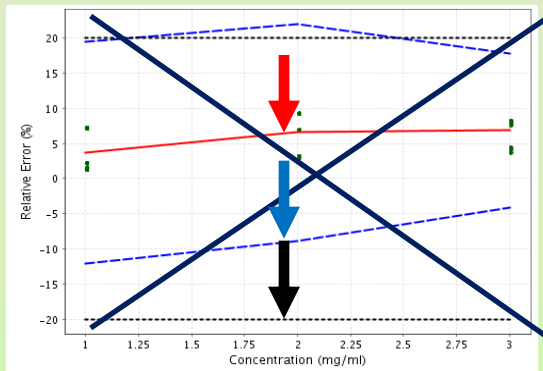
- Extrait dilué (1/5 v/v) dopé avec des concentrations connues d'asiaticoside et d'acide asiatique

Sélectivité

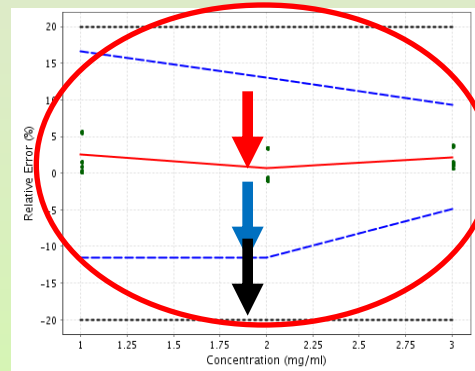


Spectre de masse de l'asiaticoside

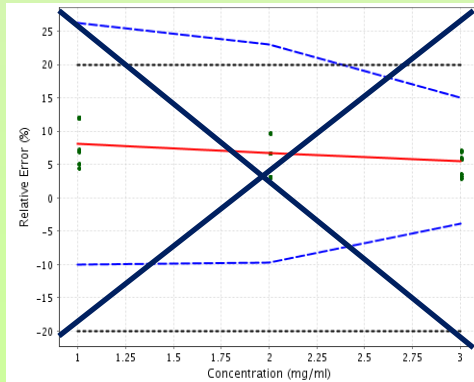
Fonction de réponse : asiaticoside



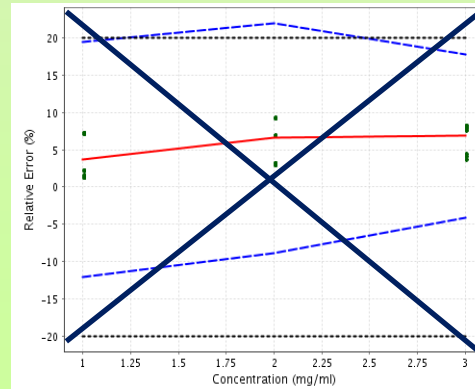
Un niveau de concentration



Régression quadratique

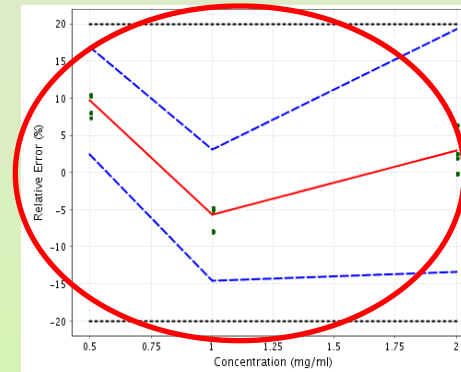
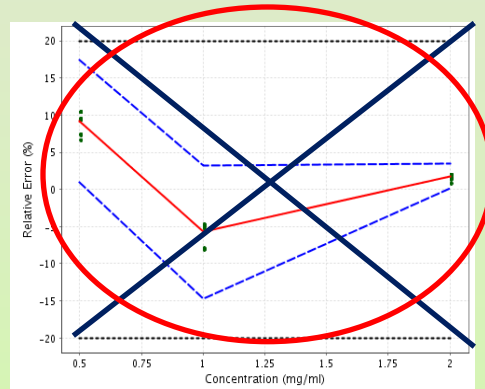


Transformation logarithmique



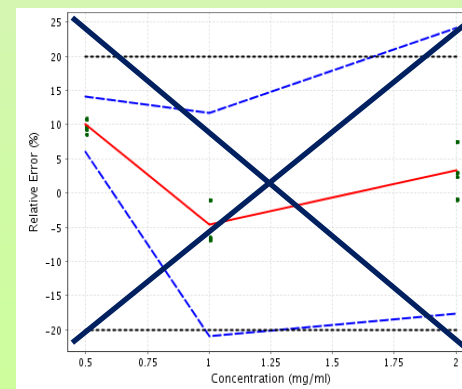
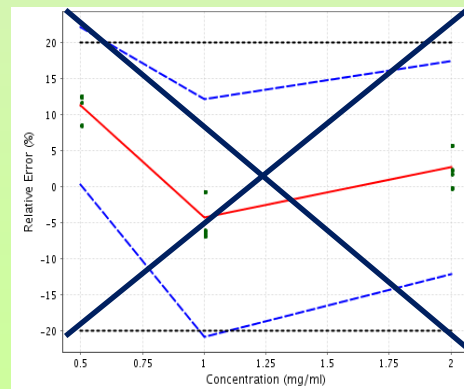
Régression linéaire

Fonction de réponse: acide asiatique



Un niveau de concentration

Régression quadratique



Transformation logarithmique

Régression linéaire

Justesse



ASIATICOSIDE

ACIDE ASIATIQUE

Concentration

Bias
relatif (%)

1 mg/ml

2.6

2 mg/ml

0.7

3 mg/ml

2.2

Concentration

Bias
relatif (%)

0.5 mg/ml

9.7

1 mg/ml

-5.8

2 mg/ml

3

Fidélité



ASIATICOSIDE

ASIATIC ACID

Répétabilité
(SD mg/ml)

Fidélité
intermédiaire
(RDS %)

0.2313

2.9

0.0987

2.5

0.252

1.5

Répétabilité
(SD mg/ml)

Fidélité
intermédiaire
(RDS %)

0.2421

1.5

0.1427

1.8

0.1997

3.3

LD et LQ

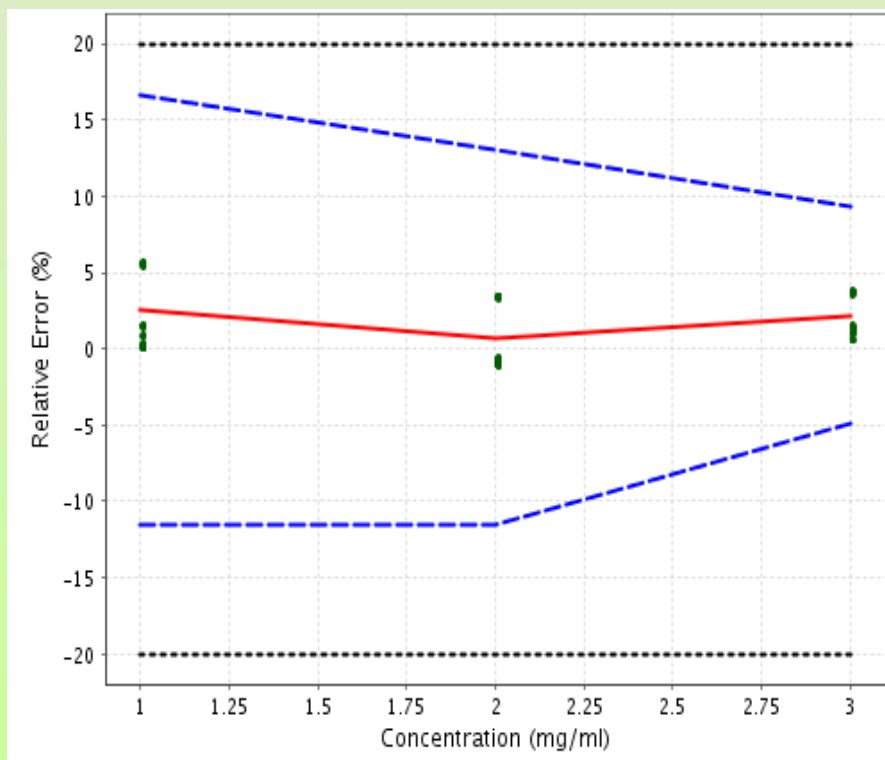


	ASIATICOSIDE	ACIDE ASIATIQUE
LOD (mg/ml)	0.011	0.002
LOQ (mg/ml)	1	0.5

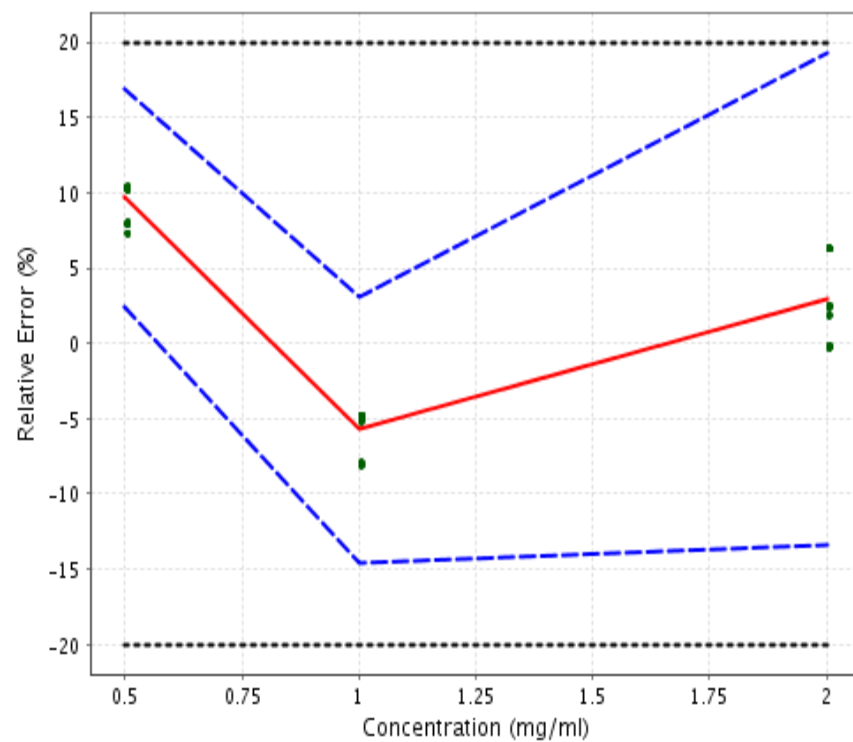
Exactitude



Asiaticoside



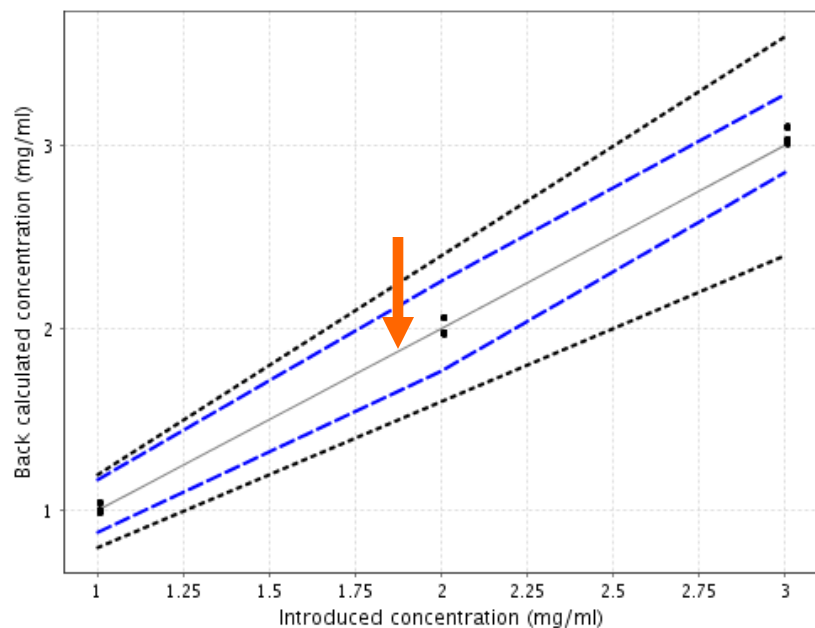
Acide asiatique



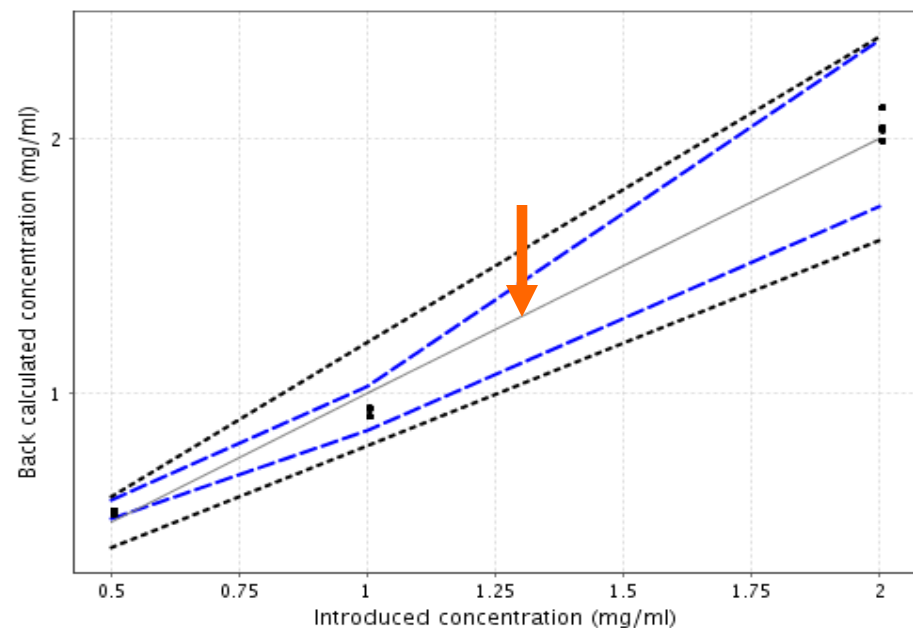
Linéarité



Asiaticoside



Acide asiatique





Dosage d'échantillons de feuilles de *Centella asiatica* (n = 3)

Echantillon	Madecassoside	Asiaticoside	Acide madecassique	Acide asiatique
S1	1.7± 0.04 ^a	2.01 ± 0.02	0.95 ±0.39	0.98 ± 0.03
S2	1.27 ± 0.13	1.63 ± 0.04	<<LD	<<LD
S3	1.64 ±0.02	1.75 ±0.016	0.72 0.02	0.72 ± 0.08

(%) ± DSR

CONCLUSION



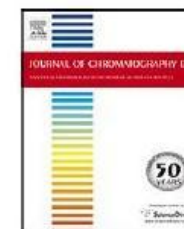
Journal of Chromatography B, 877 (2009) 2396–2402



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb



An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (APIACEAE)[☆]

M.H. Rafamantanana^{a,b,*}, E. Rozet^c, G.E. Raelison^a, K. Cheuk^a, S.U. Ratsimamanga^a,
Ph. Hubert^c, J. Quetin-Leclercq^b

^a IMRA (Institut Malgache de Recherches Appliquées), BP 3833, 101 Antananarivo, Madagascar

^b Laboratoire de Pharmacognosie, Unité CHAM, LDRI (Louvain Drug Research Institute), UCL (Université catholique de Louvain), Av. E. Mounier 72, 1200 Bruxelles, Belgium

^c Laboratoire de Chimie Analytique, Département de Pharmacie, CIRM, ULg (Université de Liège), CHU, B36, B-4000 Liège, Belgium

Remerciements



- ❖ **Coopération Universitaire pour le Développement (CUD)**
- ❖ **Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA)**

- ❖ **Pr Joëlle Quetin-Leclercq (UCL)**
- ❖ **Pr Phillipe Hubert (Ulg)**
- ❖ **Dr Eric Rozet**
- ❖ **Dr Guy Raoelison**
- ❖ **Mr Denis Randriamampionona**
- ❖ **Les équipes de l'Unité CHAM de l'UCL (Belgique)**