

IDENTIFICATION, PURIFICATION ET QUANTIFICATION DE DEUX TRITERPENES BIO-ACTIFS PAR CCMHP DANS *MITRACARPUS SCABER*.

F. Gbaguidi^{1,2}, G. Accrombessi², J. Gbenou², M. Moudachirou^{2*}, J. Quetin-Leclercq¹

¹ *Laboratoire de pharmacognosie. Av Mounier 72, Université Catholique de Louvain (UCL)
72 30-CHAM, B-1200 Bruxelles*

² *Laboratoire de pharmacognosie et huiles essentielles Faculté des Sciences de la Santé.
École de pharmacie Université d'Abomey Calavi. 01 BP 188 Cotonou Bénin;
moudmans@yahoo.fr*

(Reçu le 25/04/2004 – Accepté après révision le 26/04/2006)

Summary: In this work, we identified, isolated and quantified by densitometry oleanolic and ursolic acid, two bio-active acids from *Mitracarpus scaber* (RUBIACEAE).

A rapid, low cost and easier than HPLC quantification method was developed by using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). The mobile phase was a mixture of toluene/ethyl acetate/methanol (80/18/2, v/v/v) and the stationary phase was HP silicagel. The plate was evaluated after eluting at 215 nm by scanning densitometry. The developed method was precise with relative standard deviations less than 5% (intra-day) and 3% (inter-day) for the concentrations used. The recovery was ca 98% for the two compounds. Limits of detection and quantification were respectively 100 µg/mL (1 µg deposit) and 300 µg/mL (3 µg deposit).

Key words: oleanolic acid, ursolic acid, *Mitracarpus scaber*, HPTLC, HPLC, densitometry.

Résumé : Ce travail, relate l'identification, l'isolement et la quantification densitométrique de l'acide oléanolique et de l'acide ursolique, deux acides bio-actifs dans le *Mitracarpus scaber* (RUBIACEAE).

Une méthode de Chromatographie sur Couche Mince à Haute Performance (CCMHP) rapide, moins coûteuse que la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) et facile à réaliser, a été développée et validée pour quantifier ces deux molécules dans *Mitracarpus scaber*. Nous avons utilisé une phase mobile composé d'un mélange toluène/acétate d'éthyle/méthanol (80/18/2, v/v/v) et une phase stationnaire de silicagel HP. La lecture densitométrique des plaques après développement a été faite à 215 nm. Le coefficient de variation (CV) de la méthode développée pour la calibration des standards était inférieur à 5% (intra-jour) et à 3% (inter-jour) pour toutes les concentrations de 0,5 mg/mL à 5 mg/mL. Le taux de récupération des deux acides de la plante par la méthode d'extraction était d'environ 98% pour les deux molécules. Les limites de détection et de quantification ont été déterminées pour respectivement 100 µg/mL (soit 1 µg) et 300 µg/mL (soit 3 µg).

Mots clés : acide oléanolique, acide ursolique, *Mitracarpus scaber*, CCMHP, CLHP, quantification densitométrique.

I. INTRODUCTION

Au Bénin et dans la sous région ouest africaine, le *Mitracarpus scaber* Zucc. And ex Schult + Scult. F. (RUBIACEAE) est souvent utilisé en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies de la peau comme l'eczéma^[1] et la teigne^[2]. Des études sur l'activité anti-bactérienne des

extraits aqueux et alcoolique des parties aériennes de *Senna alata*, *Lantana camara* et de *Mitracarpus scaber in vitro* sur le *Dermatophilus congolensis*, ont montré que l'extrait alcoolique de *Mitracarpus scaber* était plus actif^[3]. Récemment il a été montré que des pommades à base d'extrait alcoolique de *Mitracarpus scaber*

étaient actives *in vivo* sur la dermatophilose bovine [4]. Des études phytochimiques ont indiqué la présence dans la partie aérienne de la plante d'azaanthraquinone [5], d'acide gallique, d'acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque, de 4-méthoxyacétophénone et de la 3,4,5-triméthoxyacétophénone [6]. Nous avons identifié et isolé pour la première fois de l'extrait alcoolique de cette plante deux acides triterpéniques bio-actifs : l'acide oléanolique (AO) et l'acide ursolique (AU) (figure 1)

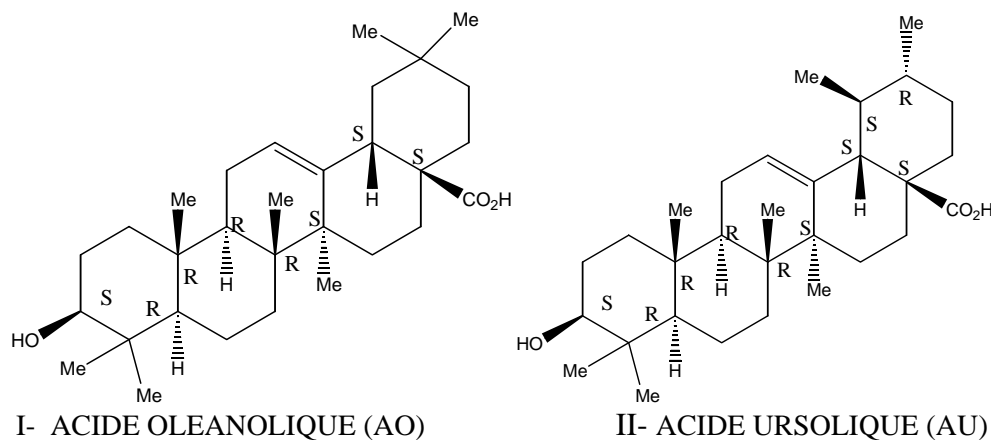


Figure 1 : Structure chimique des acides oléanolique et ursolique

par une chromatographie liquide à pression moyenne (CLPM) sur gel de silice. L'identification a été faite par comparaison en chromatographie sur couche mince avec les témoins de AO et AU avant et après dérivatisation [7] et confirmée par une analyse CLHP/UV, CLHP/MS (chromatographie liquide à haute performance / spectre de masse) [8,9] et RMN du ¹³C [10].

Les deux acides sont connus pour avoir plusieurs activités biologiques: anti-inflammatoire [11,12,13], anti- protozoaire [14], anti-microbienne sur certaines bactéries gram+ [15,16,17,18] et cytotoxiques pour les cellules cancéreuses [19]. L'acide oléanolique est également hépatoprotecteur [20] et anti-ulcéreux [21].

Nous avons alors développé et validé une méthode de quantification par

Chromatographie sur Couche Mince à Haute performance (CCMHP) avec une évaluation densimétrique à 215 nm au scanner.

II. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériels

2.1.1 Matériel végétal

La partie aérienne de la plante a été collectée dans les environs de Cotonou et d'Abomey - Calavi et a été identifiée à l'herbier National d'Abomey - Calavi de

l'Université d'Abomey -Calavi de la République du Bénin comme authentique, où un spécimen a été déposé (N°: AA.6272/HNB). La plante a été d'abord séchée pendant cinq jours à la température ambiante dans une chambre à l'abri de la lumière et retournée tous les jours, puis 48 heures dans une étuve à 50°C. La plante séchée a été ensuite soigneusement réduite en poudre par un broyeur et stockée à température ambiante [22].

2.1.2 Matériels analytiques

- Le système CLHP/SM (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) est composé d'une pompe MERCK-HITACHI L6200, un injecteur manuel Rheodyne 7725i, un détecteur LCQ avantage

S/NLAD00293. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne SPHERISORB[®] ODC, 25 cm x 4,6 mm, 5 micron : taille des particules. Les spectres de masse ont été réalisés par un 'LCQ mass spectrometer', équipé d'une source d'ionisation 'APCI positive'. Les données ont été acquises et analysées par le logiciel Xcalibur.

- Le système CLPM est équipé d'une pompe de type Gilson SC, d'une colonne préparative de gel de Silice (Lichroprep Si 60 Merck, omnifit colonne en verre OM 6427 15 x 750 mm) et d'un collecteur de fractions de type Gilson SC.
- Le système CCMHP était composé d'un Scanner III Camag et les chromatographies ont été réalisées sur plaques HPTLC (Silicagel 60F254S, 10x20 cm).
- Le spectre RMN du ¹³C a été pris avec un Bruker 75 HMZ dans DMSO/CDCl₃ deutériés.

2.1.3 Solvants

Tous les solvants fournis par Merck étaient de grade analytique pour les extractions, de grade HPLC pour les analyses HPLC/MS et HPTLC.

2.2. Méthodes

2.2.1 Méthode de purification.

Dix grammes de l'extrait alcoolique ont été dissouts dans 100 mL de NaOH 1N pendant 30 min et extraits avec trois fois 100 mL d'hexane (Merck). La phase aqueuse a été acidifiée avec de l'acide sulfurique 1N et extraite trois fois avec 100 mL de dichlorométhane. Après évaporation du dichlorométhane, le résidu a été dissout dans 5 mL de toluène et fractionné par une chromatographie liquide à pression moyenne (CLPM) sur une colonne préparative de gel de silice. L'élution a été faite à un débit constant de 1mL/min par successivement 140 mL de toluène, 120 mL de mélange toluène/acétate d'éthyle

(90/10, v/v) et 600 mL du mélange toluène/acétate d'éthyle/méthanol (80/18/2, v/v/v). Le dernier éluant a été collecté en des fractions de 6 mL. Les fractions ont été regroupées par analyse CCM en comparaison avec les R_f des témoins puis les fractions (40 – 65) contenant les spots au mêmes R_f que les témoins ont été rassemblées et concentrées.

2.2.2 Méthode de préparation d'extraits

- Préparation d'extraits bruts

Cinq cent grammes de cette poudre ont été macérés dans 4 litres d'éthanol 95° pendant 72 heures sous agitation constante, puis filtrés et concentrés par évaporation au rotavapor à faible pression.

- Préparation d'extraits d'analyse CCMHP

Quatre vingt grammes de poudre obtenus comme décrit précédemment, ont été macérés sous agitation dans 400mL de dichlorométhane pendant 24 heures après une prise du poids du mélange. Après réajustement du poids, 200 mL du surnageant ont été filtrés sur un filtre hydrophobe PTFE FLUOROPOR[®]. L'extrait total obtenu après évaporation a été repris puis traité comme précédemment cité (alcalinisation puis acidification) et la phase dichlorométhane après évaporation a été reprise dans 1 mL de la phase mobile pour le dépôt sur plaque.

2.2.3 Méthode d'analyse de CCMHP

Dix microlitres de standard ou d'extrait dans la phase mobile, prise manuellement à l'aide de micro pipettes (BLAUBRAND[®] intra Mark), ont été déposés en bandes de 5 mm espacés de 10 mm. Les premiers et derniers dépôts étaient à 15 cm de chaque bord. Sur chaque plaque étaient appliqués 10 dépôts d'échantillons et ou de standard. La plaque a été ensuite séchée 10 min à l'air libre et développée sur 80 mm dans une phase mobile composé du mélange toluène/acétate d'éthyle/méthanol (80/18/2, v/v) contenu dans une cuve de CCM (Chambre, 20x10 cm, DESAGA). Ensuite,

la plaque a été séchée à température ambiante pendant 20 min et lue par le Scanner III à 215 nm et les données sont acquises et traitées par le logiciel Win cats 1.2.4. La fente de lecture est de 4,0 X 0,30 mm

2.2.4 Procédure d'identification

La présence des deux acides a été confirmée par le test de Keith ^[7], par la spectrométrie UV entre 190-300 nm des spots correspondant au scanner, la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP/SM) et la comparaison du spectre RMN du ¹³C ^[10].

2.2.5 Procédure de validation et quantification

- Courbes de calibration

Une série de dilutions de solutions standard de OA et UA à 5 mg/mL de phase mobile ont été préparées pour obtenir des concentrations de 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 et 5 mg/mL.

- Limite de détection

La limite de détection est la concentration donnant un pic de hauteur égal à trois fois le bruit de fond

- Limite de quantification

La limite de quantification est la concentration donnant un pic de hauteur égal à 10 fois le bruit de fond

- La répétabilité

La fidélité intra-jour et inter-jour a été déterminée pour les cinq concentrations de 0,5 à 5 mg/mL de témoin, 5 fois de suite le même jour pour la fidélité intra-jour et 5 fois pendant 5 jours différents pour la fidélité inter-jour (n = 5)

- Taux de récupération

A quatre vingt grammes de plante, ont été ajoutés respectivement 6 mg de AO et de AU et le mélange a été extrait comme dans la partie « Préparation d'extraits d'analyse CCMHP ». Quatre vingt grammes de la même poudre sans ajout de ces acides ont aussi été extraits de la même manière. Le taux de récupération a été calculé par :
Taux de récupération (%) = [(a- b)/c].100

où :

- a est la quantité de AO ou AU extraite du mélange poudre de la plante avec ajout des deux acides,
- b est la quantité des acides dans poudre de la plante sans ajout des deux acides
- c est la quantité de AO ou AU ajoutée.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les deux acides oléanolique (AO) et ursolique (AU) ont été isolés de l'extrait alcoolique de *M. scaber* par une partition à l'aide d'une CLPM et identifiés par analyse CCM par co-élution avec les témoins. La présence des acides a été confirmée par traitement au brome ^[7], par comparaison des spectres UV des témoins et des spots correspondants aux acides au scanner III camag (figure 2),

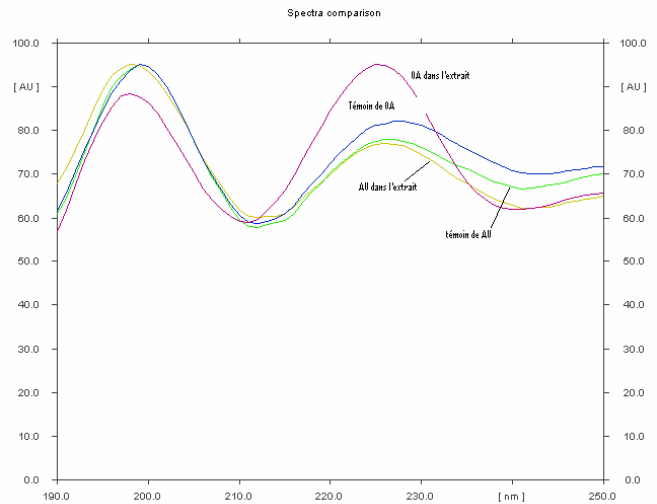


Figure 4 : Spectres UV des témoins des deux acides et des spots correspondants pris au scanner III

par l'analyse des spectres CLHP/UV, CLHP/SM et le MS² (Figure 3a et 3b) de certains fragments : $m/z = 457, 439, 411, 393$ caractéristiques des deux acides ^[8,9] et par comparaison du spectre RMN du ¹³C avec des témoins traités dans les mêmes conditions. Le spectre RMN du carbone ¹³C a donné les mêmes déplacements chimiques avec un léger shift par rapport à la référence ^[10] due au solvant.

Une méthode de CCMHP a été développée pour quantifier les deux acides dans la

plante selon la méthode SFSTP (1997) [23].
Un chromatogramme illustrant la

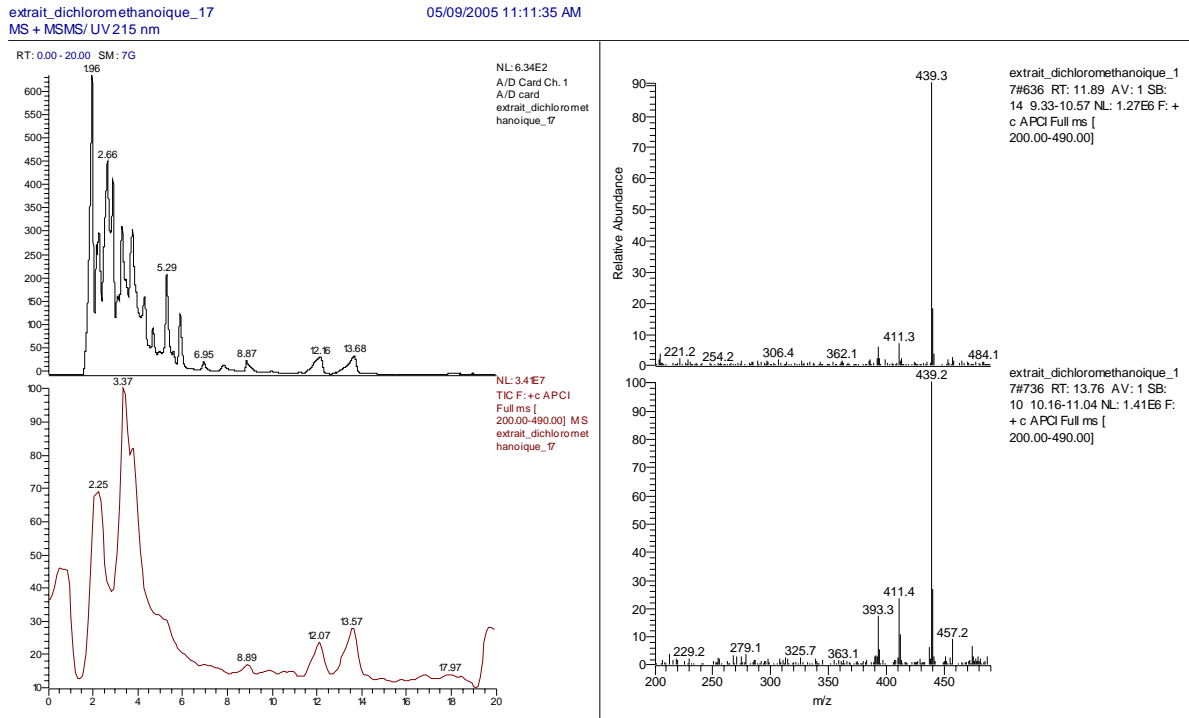


Figure 3a : chromatogrammes types de la CLHP/UV (215 nm) , CLHP/SM (TIC) du mélange des témoins de AO et de AU et le spectre SM (m/z 200-490) des pics de AO et de AU .

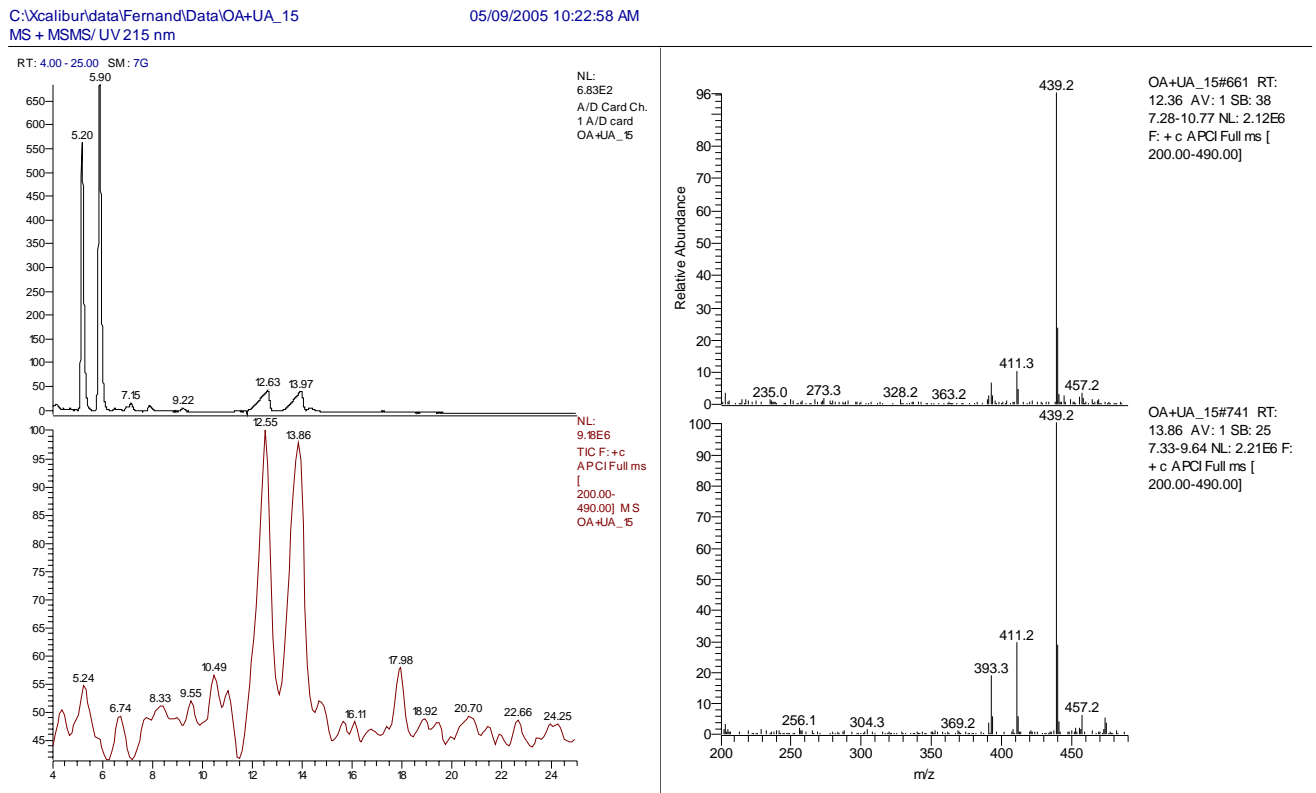


Figure 3b: chromatogrammes types de la CLHP/UV (215 nm) , CLHP/SM (TIC) de AO et de AU dans l'extrait de plante et le spectre SM (m/z 200-490) des pics de AO et de AU .

séparation des deux acides sur la plaque CCMHP est montré dans la figure 4. Les plaques ont été scannées à 215nm, longueur d'onde d'absorbance optimale dans cette phase mobile et à l'analyse CLHP/SM. La conformité des spectres UV des spots correspondant de l'extrait et des témoins confirme la pureté des spots considérés (figure 4). 100 µg/ml ont été déterminés comme la limite de détection (considérer comme 3 fois la hauteur du bruit de fond) et 300 µg/ml comme la limite de quantification (considérer comme 10 fois la hauteur du bruit de fond) pour les deux acides.

Les courbes de calibration ont été établies pour une série de concentrations de 0,5 à 5mg/mL pour les deux molécules. La méthode a montré une bonne relation linéaire entre les surfaces sous courbes des pics et la série des concentrations de AO et AU entre 0,5 à 5 mg/mL. Les équations des courbes de calibrations de l'analyse de 5 différents jours ont été respectivement : $y = 2067,8x + 3474,7$ avec $R^2 = 0,94$ et un biais de 95% pour AO et $y = 2505,8x + 1727,4$ avec $R^2 = 0,96$ et un

biais de 95% pour AU. Les coefficients de variations (CV) intra-jour (n = 5) et inter-jours (n = 5) pour l'analyse des deux acides ont été inférieurs à 5% pour toute la série des concentrations analysées (Tableau I).

Le taux de récupération des deux acides AO et AU de la plante par la méthode a été respectivement 98%+/-0,36% (n = 5) et 98,66%+/-0,25% (n = 5). La quantité de AO et AU estimée par la méthode en suivant les corrélations et différentes dilutions, a été respectivement de (2,60+/-0,06) mg (n = 5) et de (4,90+/-0,11) mg (n = 5) dans 80 g de plante. Ceci correspondait à 0,00325% de AO à 0,006125% de AU

IV. CONCLUSION

Deux acides triterpéniques connus pour leurs activités biologiques ont été identifiés, purifiés et quantifiés dans l'espèce béninoise de *Mitracarpus scaber*. La méthode développée a été validée selon la méthode SFSTP (1997). Elle est précise

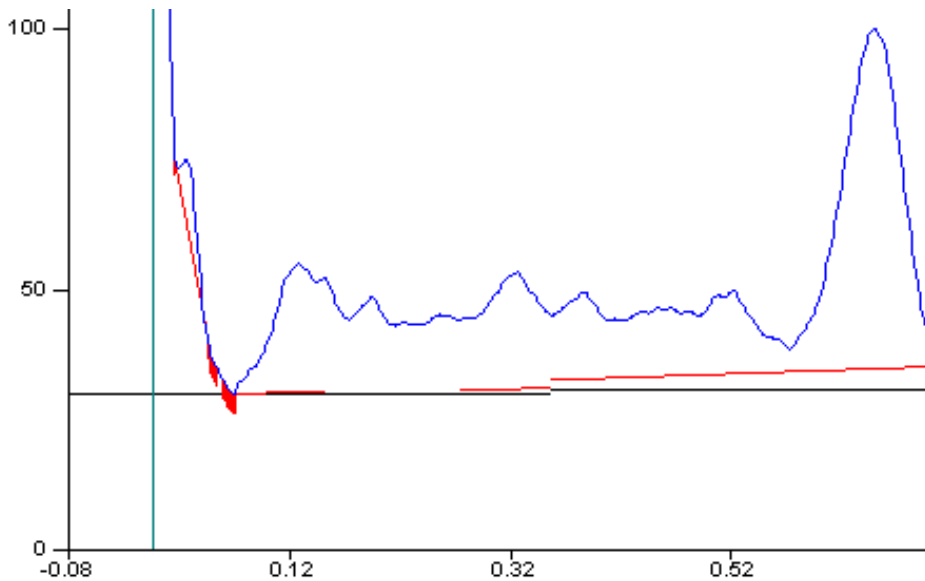


Figure 4 : Chromatogramme CCMHP type montrant les pics les deux acides

pour des coefficients de variations inférieures à 5%. La validation de cette méthode CCMHP donne un moyen d'analyse rapide, simple et moins cher que la CLHP de ces deux isomères de position difficiles à séparer par une simple chromatographie sur couche mince. La connaissance de la quantité des ces deux acides qui possèdent différentes activités biologiques aussi reconnues à la plante en médecine traditionnelle, fournira des éléments à la standardisation de l'usage de cette plante.

Tableau I : Coefficients des variations sur les analyses intra-jour et inter-jours

Standard	Concentration (mg/ml)	CV (%)	
		Intra-jour (n = 5)	Inter-jours (n = 5)
AO	0,5	4,60	0,32
	1	0,72	0,13
	2	0,65	0,10
	3	0,49	1,27
	5	0,10	2,45
AU	0,5	1,89	0,15
	1	2,21	0,45
	2	0,25	0,11
	3	1,13	0,15
	5	2,45	0,092

BIBLIOGRAPHIE

[1] Adjanonhoun, E.J., La médecine traditionnelle au Bénin: recensement des savoir-faire traditionnels. *Revue Méd. Pharm. Afri.* (2001) 15, 103-111 ;

[2] Ependu, T.O., Akah, P.A., Adesomaju, A.A., Okogun, J.I. Antiinflammatory and antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extracts. *Int J. Pharmacognosy.* (1994) 32, 91-196 ;

[3] Ali N., Moudachirou M., Akakpo J.A., Quetin-Leclercq J. Activités *in vitro* de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* sur le dermatophilus congolensis isolé au Bénin. *Revue Elev. Med. Vet. Pays Trop.* (2002) 55, P. 183-187 ;

[4] Ali N., Moudachirou M., Akakpo J.A., Quetin-Leclercq J. Treatment of bovine dermatophilosis with *Cenna alata*, *Lantana*

camara et *Mitracarpus scaber*. *J Ethnopharmacol.* (2003) 86, 167-171;

[5] Okunade, Adewole L., Clark, Alice M., Hufford, Charles D., Oguntimein, Babajide O. An antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. *Planta Med.* (1999) 65, 447-448;

[6] Bisignano G., Sanogo R., Marino A., Aquino R., D'Angelo V., Germano M.P., De Pasquale R., Pizza C.. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Lett. Appl. Microbiol.* (2000) 30, 105-108;

[7] Keith G. L. and David J. Tucker The separation of substituted olean-12-en-28-oic acide isomers. *Aust. J. Chem.* (1983) 36, 2297-305;

[8] Martinet A., Ndjoko K., Terreaux C., Marston A., Hostettmann K. and Schutz Y. NMR and LC-MSⁿ caractérisation of two Minor Saponins from *Ilex paraguariensis*. *Phytochem. Anal.* (2001) 12, 48-52;

[9] Van der Doelen G.A., Van den Berg K.J., Boon J.J., Shibayama N., De la Rie E.R. , Genuit W.J.L. Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by HPLC-APCI-MS(/MS). *J. of Chromatogr. A.* (1998) 809, 21-37;

[10] Charlwood B.V., Banthorpe D.V. *Methods in Plant Biochemistry (Terpenoids)*. 7 San Diego, New York, 1991;

[11] Nadinic E., Gorzalczany Rojo S. A., Baren C.V., Debenedetti S., Aceveb C. Topical anti-inflammatory activity of *Gentianella achalensis*. *Fitoterapia.* (1999) 70, 166-171;

[12] Alvarez E., Rotelli A.E., Pelzer L.E., Saad J.R., Giordano O. . Phytochemical study and anti-inflammatory properties of *Lampaya hieronymi* Schum.ex Moldenke. *Farmaco.* (2000) 55, 502-505.

[13] Diaz A.M., Abad M. J., Fernandez L., Recuero C., Villaescusa L., Silvan A., Bermejo P. *In vitro* anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea latifolia* L. *Biol Pharm Bull.* (2000) 23, 1307-1313;

[14] Cunha, W. R., Camila M., Ferreira, da Silva D., Crotti, A.Miller E., Lopes N. P., Albuquerque S.. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Med.* . (2003) 69, 470- 472;

[15] Woldemichael G. M., Singh M. P., Maiese W. M., Timmermann B. N. Constituents of antimicrobial extract of *Caesalpinia paraguariensis* Burk. *J Biosci.*

- (2003) 58, 70-75;
- [16] Shim J.-S., Park K.-M., Chung J.-Y., Hwang J.-K. (2002). Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Physalis angulata* against oral pathogens. *Nutraceuticals and Food*. 7, 215-218;
- [17] Braghiroli L., Mazzanti G., Manganaro M., Mascellino M. T., Vespertilli T. Antimicrobial activity of *Calluna vulgaris*. *Phytotherapy Research*. (1996) 10, S86-S88.
- [18] Richards, R. M. E., Durham, D. G., Liu, X. Antimicrobial activity of compounds from *Rubus pinfaensis*. *Planta Med.* (1994) 60, 471-3;
- [19] Chiang L.C., Chiang W., Chang M.Y., Ng Lean-Teik, Lin C.C. Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan. *Am J Chin Med.* (2003) 31, 37-46;
- [20] Jeong H.G. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Toxicol. Lett.* (1999) 105, 215- 222;
- [21] Farina C., Pinza M., Pifferi G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *Farmaco.* (1998) 53, 22-32;
- [22] European Pharmacopeia; *European Council*, 2002 Strasbourg;
- [23] Chapuzet E., Mercier N. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologique : stratégie de validation. *S.T.P. Pharma Pratiques* (1997) 7, 169-194.