
Mise au point et validation de méthodes analytiques pour le contrôle de qualité de plantes médicinales malgaches et la mise en place de cultures locales



Mamy Harisoa Rafamantanana



Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en
Sciences Pharmaceutiques et Biomédicales

Promoteur : Professeur Joëlle Quetin-Leclercq

Année Académique 2011-2012

En mémoire de mon père, à ma mère.
« Ny hazo no vanon-ko lakana, ny tany naniriany no tsara »

Remerciements

Ce travail est le fruit de la collaboration de plusieurs personnes et laboratoires que je tiens à remercier sincèrement.

Tout d'abord, je remercie infiniment le Professeur Joëlle Quetin-Leclercq (Unité de Recherches en Pharmacognosie, GNOS, LDRJ, UCL) de m'avoir engagée dans son projet au sein de l'IMRA- Madagascar, de m'avoir fait confiance et de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse.

Merci pour votre encadrement, vos conseils très efficaces et rigoureux, et surtout votre disponibilité permanente malgré toutes vos occupations.

Un grand merci pour tout ce que vous avez entrepris pour le bon déroulement de cette thèse.

Merci à l'UCL-ADRI d'avoir financé ces travaux de recherche et pour la bourse d'études

Je remercie également :

Le Professeur Suzanne Ratsimamanga (Institut Malgache de Recherches Appliquées) de m'avoir engagée parmi les chercheurs de l'IMRA et d'avoir financé mes différentes escapades dans la nature pour collecter les plantes.

Le Docteur Guy Raoelison (Laboratoire de Phytochimie, de contrôle et de standardisation, IMRA) de m'avoir acceptée dans son laboratoire; pour tous les conseils, le partage de connaissances et le soutien moral.

Le Docteur Eric Rozet (Laboratoire de Chimie Analytique, Ulg) pour sa disponibilité, pour son aide à la réalisation des analyses statistiques et pour la formation en validation de méthodes.

Le Docteur Benjamin Debrus (Laboratoire de Chimie Analytique, Ulg) pour sa contribution majeure à la réalisation des plans d'expériences, pour les formations et pour sa disponibilité.

Le Professeur Nicole Morel (Institute of Neuroscience, UCL), le Professeur Adolphe Randriantoa, Monsieur René Razafindrazaka (Laboratoire de Pharmacodynamie, IMRA) d'avoir réalisé la partie pharmacologique de cette thèse.

Le Professeur Philippe Hubert (Laboratoire de Chimie Analytique, Ulg), pour toutes les discussions et les conseils précieux,

Merci à tous les membres du comité d'encadrement :

Au Professeur Véronique Prétat (Unité de Pharmacie Galénique, LDRJ, UCL) d'avoir accepté de présider tous les comités d'encadrement de thèse et pour ses conseils avisés.

Au Professeur Giulio Muccioli (BPBL, LDRJ, UCL) pour tous les conseils utiles et constructifs lors des comités d'encadrement.

Au Professeur Sandra Apers (Université d'Anvers) et au Professeur Jean Luc Wolfender (Université de Genève) d'avoir accepté de lire et de juger ce travail.

Un grand merci à toute l'équipe de GNOS avec qui j'ai vécu des moments inoubliables. Les 4 ans passés avec vous resteront gravés à jamais dans ma mémoire, même si c'était dur de vous quitter et repartir à Madagascar chaque année.

À Françoise qui m'a accueillie le jour de mon arrivée à Bruxelles et qui m'a aidée pour toutes les démarches administratives. Merci de ta gentillesse et ton efficacité et surtout de ta disponibilité.

À Marie Christine, Jean Paul et Ramazan pour toutes les techniques que vous m'avez apprises et pour toutes les expériences réalisées tout au long de cette thèse.

À Marie France pour les analyses par spectrométrie de masse.

À Jo la Grande, qui m'a beaucoup soutenue, surtout pendant la rédaction et les journées prolongées jusqu'à tard le soir.

À Gabrielle pour toutes les astuces et cours de chimie que tu m'as offerts.

À Emilie qui m'a aidée à finaliser mon manuscrit.

A Salim pour toutes les explications en pharmacologie.

À toute l'équipe GNOS et les anciens: Aécio, Emmanuelle, Alphonse, Marie-Yvonne, Claire, Julia, Julien, Mireille, Magali, Francisco, Claire, Habib, Achille, Van, Nadège, Adam, Aubert, Chiara, pour tout ce qu'on a partagé durant ces 4 ans.

À tous les doctorants que j'ai côtoyés : Nicolas, Marion, Coco, Laurie, Evelyne.

À Aubin pour toutes les aides techniques.

À toute l'équipe de terrain de l'IMRA : Denis, Honoré, Ernest, Mr Benja.

À tous les gens de l'IMRA avec qui j'ai travaillé dans une bonne ambiance quand je retournais à Madagascar.

Je ne peux terminer sans remercier :

La famille Hauquier (ma petite famille belge) : Michel, Françoise, Garance, Robin, Alban pour votre hospitalité chaque fois quand je n'avais pas de logement, votre aide, pour toute l'ambiance chaleureuse et ces bons moments passés ensemble.

À ma famille : ma mère qui m'a beaucoup soutenue malgré la distance, mon frère, mes sœurs et mes beaux-frères : Rija, Sosoa, Rina, Vola, Gervais et mes petits neveux et nièces.

À Christian qui est arrivé à la dernière année de cette thèse et avec qui je vais partager le reste de la vie et fonder une famille ! Merci pour ton soutien, ta patience, ta gentillesse, ton aide (les stats !!!) et pour tout ce que tu as fait.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la finalisation de ce travail.

Misaotra betsaka

TABLES DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. Introduction générale et objectifs du travail	6
2. Les plans d'expériences	8
2.1. Concepts généraux	8
2.2. Définitions	9
2.3. Objectif	10
2.4. Stratégies de la planification expérimentale	10
2.5. Le Design Space (DS) et prédiction.	13
2.6. Application à la chromatographie liquide	14
2.6.1. Sélection de la réponse	14
2.6.2. Modélisation, optimisation et prédiction	15
3. Validation de méthodes analytiques	16
3.1. Objectifs de la validation	17
3.2. Les critères de validation : définitions	18
3.2.1. La spécificité	18
3.2.2. La fonction de réponse	19
3.2.3. La linéarité	20
3.2.4. La fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	21
3.2.5. La justesse	23
3.2.6. L'exactitude	24
3.2.7. La limite de détection (LD)	27
3.2.8. La limite de quantification (LQ)	28
3.2.9. L'intervalle de dosage	28
3.2.10. La robustesse	28
4. La méthode de comparaison de Bland et Altman	28
4.1. Définition et objectif	28
4.2. Concept de base	28
4.3. Représentation graphique	30
5. Les saponosides	31
5.1. Structure des saponosides	31
5.2. Propriétés pharmacologiques	32
5.3. Analyses qualitatives et quantitatives des saponosides	32
5.3.1. Les méthodes biologiques	32
5.3.2. Les méthodes non biologiques	33
5.3.3. La chromatographie sur couche mince (CCM)	33
5.3.4. La chromatographie en phase gazeuse (GC)	33
5.3.5. L'électrophorèse capillaire (CE)	34
5.3.6. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	34
5.3.6.1. Les phases mobiles	34
5.3.6.2. Les phases stationnaires	34
5.3.6.3. La détection	35

6. Généralités sur les plantes étudiées	36
6.1. <i>Spirospermum penduliflorum</i> Thouars (Menispermaceae)	36
6.1.1. Généralités sur la famille des Menispermaceae	36
6.1.2. Description botanique de <i>Spirospermum penduliflorum</i> Thouars	39
6.2. <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban (Apiaceae)	40
6.2.1. Description botanique	41
6.2.2. Répartition géographique dans le monde et à Madagascar	42
6.2.3. Contexte général et importance économique de <i>Centella asiatica</i>	42
6.2.4. Utilisations et composition chimique	43
6.2.5. Dosage des principes actifs	48
6.2.5.1. Dosages par CLHP	48
6.2.5.2. Dosages par CCMHP	51

Chapitre 1: Isolation and identification of vasorelaxant molecules from leaves of *Spirospermum penduliflorum* thouars (MENISPERMACEAE)

1. Introduction	68
2. Material and methods	68
2.1. Plant material	68
2.2. Chemical compound and apparatus	68
2.3. Extraction	69
2.4. Pharmacological experiments	69
2.5. Bioguided fractionation	70
2.6. Identification method	71
2.7. Statistical analysis	72
3. Results	72
3.1. Identification of the active fraction	72
3.2. Identification of active compounds	72
3.3. Effect of dicentrine on the vasoconstriction induced by phenylephrine	73
4. Discussion and Conclusion	74

Chapitre 2: Development of a HPLC-UV method for the quantification of dicentrine in leaves of *Spirospermum penduliflorum* thouars: application of design of experiments (DOE)

1. Introduction	80
2. Material and methods	81
2.1. Chemicals and reagents	81
2.2. Plant material	81
2.3. Apparatus	82
2.4. Plant extraction	82
2.5. Preliminary assay	82
2.6. Experimental design	83
2.7. Design of experiments and design space methodology	84
2.8. Chromatographic conditions	85

2.9.	Determination of extraction efficiency	86
2.10.	Method validation	86
2.10.1.	Calibration standards	87
2.10.2.	Validation standards	87
3.	Results and discussion	87
3.1.	Preliminary tests	87
3.2.	Experimental design	89
3.3.	Extraction efficiency	92
3.4.	Method validation	93
3.4.1.	Selectivity	93
3.4.2.	Response function	94
3.4.3.	Trueness	96
3.4.4.	Precision	96
3.4.5.	Accuracy	96
3.4.6.	Linearity	97
3.5.	Sample analyses	98
4.	Conclusion	99

Chapitre 3: Quantitative determination of triterpenic glycosides and their aglycones in leaves of *Centella asiatica* Urb. (APIACEAE) by HPLC-UV 103

1.	Introduction	106
2.	Materials and methods	107
2.1.	Chemicals and plant material	107
2.2.	Apparatus	108
2.3.	Standards solutions	108
2.4.	Evaluation of the extraction	109
2.5.	Validation of the method	109
3.	Results and discussions	110
3.1.	Chromatographic separation	110
3.2.	Optimization of the extraction	111
3.3.	Method validation	111
3.3.1.	Selectivity and peak purity	111
3.3.2.	Response function	112
3.3.3.	Trueness and precision	115
3.3.4.	Accuracy, LOD and LOQ	115
3.3.5.	Uncertainty of the measurement	116
3.3.6.	The linearity	116
3.3.7.	Application to samples of <i>C. asiatica</i>	118

Chapitre 4: A HPTLC method for separation and quantification of four triterpenes in *Centella asiatica* (L.) Urb; (APIACEAE) 123

1.	Introduction	125
-----------	---------------------	------------

2. Materials and methods	126
2.1. Plant material	126
2.2. Reagents and chemicals	126
2.3. Apparatus	126
2.4. Sample preparation	127
2.5. Preparation of standard solutions	127
2.6. Chromatography	127
2.6.1. Stationary phase	127
2.6.2. Sample application	128
2.6.3. Chromatography	128
2.6.4. Derivatisation and detection	128
2.7. Evaluation of the extraction efficiency	128
2.8. Method validation	129
2.8.1. Stability on the plate	129
2.8.2. LOD and LOQ	129
2.8.3. Selectivity	130
2.8.4. Response function, repeatability, trueness and accuracy	130
2.8.5. Statistics	130
3. Results and discussion	131
3.1. Chromatographic separation	131
3.2. Stability on the plate	131
3.3. Wavelength determination	132
3.4. Determination of the extraction efficiency	133
3.5. Method validation	134
3.6. Sample analysis	141
DISCUSSION GENERALE	145
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	155
ANNEXE	159

INTRODUCTION

1. Introduction générale et objectifs du travail

La pratique de la médecine traditionnelle est toujours d'actualité à Madagascar dont la majorité de la population n'a pas accès aux médicaments essentiels pour des raisons financières. De plus, la médecine traditionnelle jouit d'un fort attrait culturel. Depuis plusieurs siècles, les malgaches trouvent dans la nature de quoi soigner leurs maux ou apaiser leurs douleurs. Cette pratique ancienne est surtout basée sur l'utilisation des plantes médicinales. Il faut noter aussi que Madagascar est riche de 12000 à 14000 espèces floristiques (1) dont 80% sont endémiques et dont beaucoup possèdent des vertus thérapeutiques.

Actuellement, les instituts, les herboristeries ou les centres de bien être qui traitent les maladies par les plantes et leurs dérivés sont en pleine expansion. A côté, se multiplient les petits marchands de plantes médicinales ou de parties de plantes ou « mpivarotra tapa-kazo ». Les tradipraticiens ou guérisseurs traditionnels tiennent également leur place dans la société, leurs connaissances empiriques se sont transmises de génération en génération.

L'importance de la médecine traditionnelle (MTR) a incité l'Etat malgache à la valoriser en l'insérant dans le système de soins de santé national (regroupement des tradipraticiens au sein d'une association reconnue par l'Etat, vente des médicaments à base de plantes dans les centres de soin de santé de base, réglementations de la vente de médicaments à base de plantes,...). Ceci entre dans le cadre de la stratégie de l'OMS sur la promotion de la médecine traditionnelle ainsi que la médecine complémentaire et parallèle. La médecine traditionnelle a été donc intégrée au sein d'une direction du Ministère de la santé (DGILMT). Cette entité a pour mission de formuler et de coordonner le suivi et l'évaluation d'une politique nationale de la MTR et d'élaborer un cadre juridique et réglementaire régissant la pratique de cette MTR. Cette entité, par l'élaboration de la pharmacopée malgache, participe également au recensement des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle. Parmi les pharmacopées malgaches, citons, la pharmacopée de Madagascar (2), la pharmacopée de l'Alaotra (3), la pharmacopée de l'Ambongo et du Boina (4), et la plus récente : vers une pharmacopée malagasy : monographies d'usage (5). Elles ne contiennent cependant que des monographies reprenant les usages de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle. Dans ces monographies sont détaillées, pour chaque plante : la description botanique, les indications thérapeutiques en médecine traditionnelle et des posologies globales à l'exception de la dernière où quelques références bibliographiques sur des études scientifiques sont mentionnées.

Vu le peu de données disponibles concernant la plupart des plantes utilisées en médecine traditionnelle, il est important d'entreprendre des études pour vérifier l'activité de ces plantes, en identifier et quantifier des principes actifs et ainsi standardiser les traitements.

Les médicaments traditionnels à Madagascar sont classés en 4 catégories. Dans la catégorie 1 se trouvent les médicaments préparés par les tradipraticiens de façon traditionnelle. Dans la catégorie 2, les médicaments dont les propriétés thérapeutiques et la formulation sont bien connues par la population locale et largement employés en automédication. Les médicaments classés dans la catégorie 3 sont issus de la recherche appliquée, leurs usages thérapeutiques et dosages sont bien établis par des scientifiques. La catégorie 4 regroupe les médicaments importés de l'étranger et doivent être enregistrés dans le pays d'origine. Les différences se situent au niveau de la préparation, des preuves d'efficacité et d'innocuité, de la vente et de l'entité qui les commercialise.

La vente des médicaments de la catégorie 3 est sujette à une autorisation de mise sur le marché (AMM). L'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA) fabrique environ 70 préparations à base de plantes dont 4 ont une AMM. Des conventions ont été signées entre le Ministère de la Santé et l'IMRA pour la vente de ces médicaments autorisés à base de plantes dans les centres de soins de santé primaires (CSB et hôpitaux). Pour le moment, le Ministère considère que l'usage traditionnel est une garantie de l'innocuité, de l'efficacité et de la non toxicité de ces plantes et donc que le contrôle de qualité basé uniquement sur l'identification botanique des matières premières est suffisant. Afin de compléter ce système de contrôle de qualité botanique avec un contrôle de qualité basé sur la chimie (identification et dosage des principes actifs) et pour assurer une standardisation des soins, un laboratoire de contrôle et de standardisation de médicaments à base de plantes a été créé au sein de l'IMRA. Par ailleurs, la plupart de ces plantes médicinales sont collectées à l'état sauvage (aucune culture n'est signalée à ce jour) et donc les matières premières proviennent de différents lieux géographiques et sont collectées à des saisons variables. Par conséquent, les teneurs en principes actifs de ces plantes peuvent varier de manière non négligeable, ce qui renforce la nécessité d'un contrôle analytique en plus du contrôle botanique.

L'objectif principal de ce travail est de contribuer à la mise en place d'un système de contrôle et de standardisation chimique de médicaments à base de plantes par l'isolement et l'identification des principes actifs puis leur dosage. Ce travail a également pour but d'identifier des plantes riches qui pourront servir de sources de matériel pour de futures cultures et/ou d'évaluer la variation des conditions de récolte et de culture. Deux plantes ont

été sélectionnées : *Centella asiatica* et *Spirospermum penduliflorum*. Les méthodes utilisées pour les quantifications sont des méthodes chromatographiques : chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et chromatographie sur couche mince à haute performance (CCMHP).

2. Les plans d'expériences

2.1. Concepts généraux

La séparation et l'identification des composés dans les plantes constituent un grand challenge à cause du nombre important de constituants présents dans un extrait. La chromatographie liquide reste la méthode la plus utilisée pour résoudre ces problèmes (6), mais le développement d'une méthode chromatographique prend beaucoup de temps, vu les différents paramètres qui affectent la séparation (pH de la phase aqueuse, temps de gradient, température, % en phase organique, % d'agent d'appariement d'ions,...). De plus les paramètres physico-chimiques des composés à séparer (pKa, LogP, polarité,...) peuvent leur conférer un comportement chromatographique très similaire ou très différent. Par exemple, la séparation d'isomères de position ayant des comportements très proches et de classes chimiques relativement différentes, tous présents dans le même extrait est une tâche délicate. Habituellement, l'analyste fait varier un facteur à la fois ; ce qui rallonge encore plus le temps de mise au point d'une méthode car le nombre d'expériences à réaliser peut augmenter rapidement. De plus cela ne permet pas de voir l'effet combiné de la modification de plusieurs facteurs.

Par contre, il existe des approches structurées qui permettent d'étudier l'effet des modifications de différents facteurs sur la séparation. Citons d'abord les méthodes univariées qui consistent à tester les effets des facteurs indépendamment. Des logiciels sont disponibles pour ces méthodes, ainsi par exemple le Drylab[®], utilisé tant en chromatographie liquide que gazeuse. Ce logiciel permet de faire varier des facteurs prédéfinis (variation du pH, température, temps de gradient, phase stationnaire) mais d'un intérêt limité car il ne permet que de faire varier un seul facteur ou au maximum deux en même temps.(7).

A l'opposé des méthodes univariées, les scientifiques disposent également des méthodes multivariées qui consistent à faire varier plusieurs facteurs simultanément. Ces méthodes permettent de mettre en évidence les effets des facteurs étudiés et les interactions existantes entre ces facteurs. De plus, les résultats fournis par ces méthodes peuvent être obtenus avec

une incertitude bien définie. Lors de ce travail, nous avons choisi d'utiliser le plan d'expérience.

2.2. Définitions

Un plan d'expérience est une méthode structurée et organisée dans le but de déterminer les relations existantes entre une ou plusieurs réponses et les différents facteurs affectant un processus.

On appelle réponse une grandeur mesurée à l'aide d'expériences (c'est la grandeur d'intérêt). Un facteur est une variable qui affecte le processus et qui possède un effet sur la réponse. L'étude de l'effet de ce facteur se fait par sa variation, la valeur donnée à un facteur pour un essai est appelé niveau (k_i , $i = 1$ à n), l'ensemble de ces niveaux constitue le domaine du facteur.

Si plusieurs facteurs ont un effet sur le processus, l'ensemble de tous les niveaux de ces facteurs constitue le domaine expérimental (Fig. 1). Une expérience réalisée avec un niveau k_1 du facteur 1 et k_2 du facteur 2 est un point expérimental du domaine.

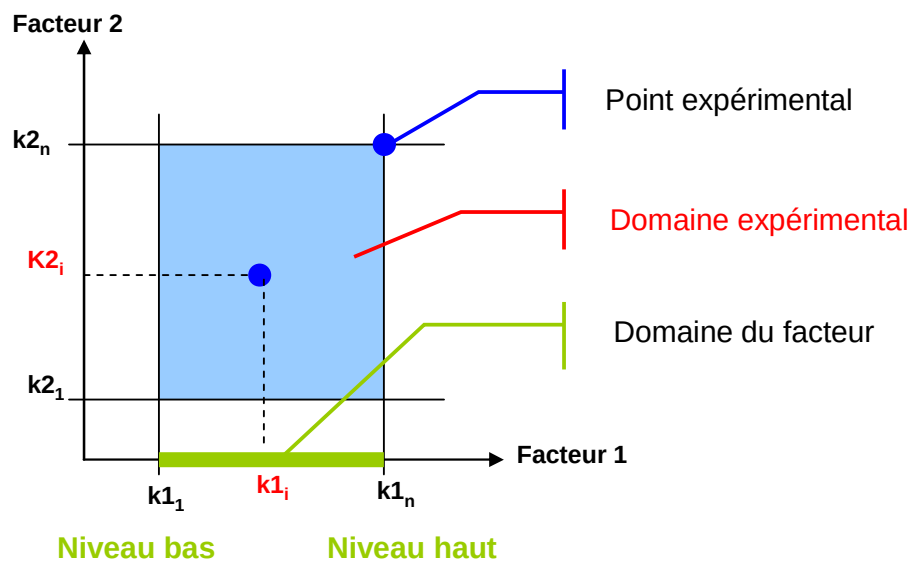


Figure 1 : Représentation schématisée des composants d'un domaine expérimental.

2.3. Objectif

La théorie des plans d'expériences et les statistiques qui y sont utilisées permettent d'identifier le nombre d'expériences minimal à réaliser afin de tirer le maximum d'informations concernant un processus donné. Une ou plusieurs réponses seront ensuite modélisées par une équation mathématique qui servira par la suite à prédire ces réponses dans un domaine expérimental afin de les maximiser ou de les minimiser.

2.4. Stratégies de la planification expérimentale

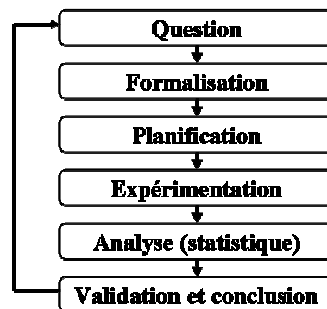


Figure 2 : Schéma d'un cycle expérimental.

Il faut donc dans un premier temps se poser les bonnes questions. Quel est le but de l'expérience ? Quelle est l'étendue des connaissances disponibles concernant le problème étudié ? Quels facteurs est-il pertinent d'examiner ? Quelle réponse sera mesurée et modélisée ? Quels sont les contraintes expérimentales ?

Après avoir identifié le problème et avoir défini l'objectif de l'expérience, on sélectionne une réponse qui est reliée à l'objectif. Ensuite, la modélisation de cette réponse permet d'acquérir de l'information sur le processus étudié. On détermine ensuite les facteurs qui sont liés directement à la réponse avec leurs différents niveaux afin d'établir un plan d'expérience. Les facteurs choisis sont ceux qui ont le plus d'effets sur la réponse. Si plus de 4 facteurs ont été sélectionnés, il est préférable de procéder à un plan de criblage qui consiste à classer les différents facteurs en fonction des effets sur la réponse. Dans le cas contraire (nombre de facteurs ≤ 3), on peut tout de suite établir un plan expérimental dont le choix est basé sur les objectifs, les contraintes du processus. Plusieurs types de plans sont proposés :

- Les plans factoriels complets : les conditions opératoires sont obtenues par toutes les combinaisons des différents niveaux et des différents facteurs (exemple : 4 facteurs à 2 niveaux = $2^4 = 16$ conditions opératoires) (Fig. 3a).

- Les plans factoriels fractionnaires résultent du fractionnement d'un plan factoriel complet. Ils permettent d'étudier tous les facteurs mais le nombre de conditions opératoires est divisé par 2 ou par 4 fois ou par 2^q (exemple : plan factoriel complet à 4 facteurs à 2 niveaux : $2^4 = 16$ conditions opératoires et un plan factoriel fractionnaire $2^{4-1} = 8$ conditions opératoires) (8). Néanmoins, ces plans fractionnaires ne permettent pas d'étudier les effets d'ordre supérieur (X^2 , X^3 ,...) et les interactions d'ordre supérieur.
- plans pour le criblage de facteurs : ce sont des fractions du plan factoriel complet permettant de classer les facteurs en fonction des effets sur les réponses. Il existe également des plans spécifiques tels que les plans de Plackett et Burman (9).
- plans pour l'estimation des surfaces de réponses (plans factoriels complets à 3 niveaux, plans composites centrés, plans de Doehlert (Fig. 3b), plans de Box Benkhen): estiment l'amplitude et la forme des effets des différents facteurs sur les réponses (10–12). Ces plans présentent l'avantage de permettre l'estimation des effets de second ordre (X^2).
- Les plans optimaux ou plans sur mesure, dont les plus utilisés sont les plans D-optimaux (Fig. 3c): utilisés en cas de contraintes (budget limité, domaine expérimental contraint,...). La répartition des points expérimentaux dans le domaine expérimental est définie par un logiciel en précisant leur nombre. Le choix des essais est fait en minimisant la covariance des paramètres estimés d'un modèle donné (13,14).
- Les plans de mélanges (plans simplex centroïde, plans lattice simplex, plans optimaux) (Fig. 3d) conçus surtout pour des mélanges de constituants. Ces constituants ne sont pas indépendants les uns des autres. Leur somme doit être toujours égale à 100% ou à l'unité. Les réponses sont fonction de la proportion de chaque constituant (15).

Les schémas suivants représentent quelques exemples de plans expérimentaux.

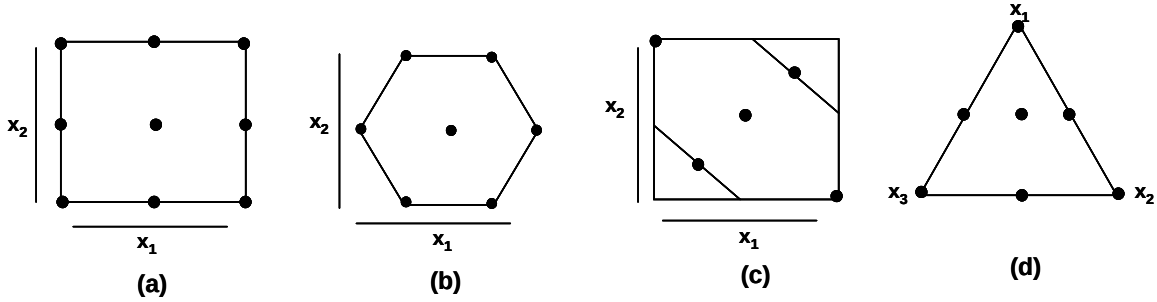


Figure 3 : Exemples de plans expérimentaux avec k facteurs : a : plan factoriel complet (2 facteurs à 3 niveaux, $3^2 = 9$ conditions opératoires), b : plan de Doehlert (répartition uniforme des points expérimentaux dans le domaine expérimental, 2 facteurs et 7 points expérimentaux dont un au centre, les 6 points sont à la même distance du centre du domaine), c : plan D-optimal à 5 points expérimentaux, d : plan simplex centroïde (exemple de plan pour un mélange de trois constituants : conditions opératoires = 7, les mélange binaires sont représentés par les côtés du triangle (3), les produits purs sont au sommet (3) et le point au centre représente un mélange des 3 constituants).

Après avoir défini le plan qui sera adopté, les expériences seront réalisées en encodant les réponses avec le maximum de précision possible. Des répétitions au centre du plan expérimental sont nécessaires afin de déterminer la variabilité des réponses et de pouvoir estimer les intervalles de confiance (16). Les réponses seront modélisées par des équations linéaires multiples. Par exemple, pour un plan factoriel complet à deux facteurs X_1 et X_2 comportant 3 niveaux chacun, une réponse Y peut être modélisée par l'équation :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times X_1 + \beta_2 \times X_1^2 + \beta_3 \times X_2 + \beta_4 \times X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2 + \varepsilon \quad (\text{Eq. 1})$$

Cette équation explique que la réponse Y est fonction des paramètres β à calculer pour le modèle et les X_1 et X_2 représentent les facteurs choisis, avec une erreur ε qui est l'erreur du modèle.

Cette modélisation permet l'estimation des paramètres du modèle par la méthode des moindres carrés (6). Le modèle obtenu permettra de prédire d'abord les réponses dans tout le domaine expérimental et également de déterminer les conditions optimales permettant d'atteindre les objectifs du processus qui ont été fixés initialement. Le bon ajustement du modèle peut être évalué en comparant la variance des réponses prédites et la variance observée expérimentalement (6) et en vérifiant la distribution Gaussienne des résidus.

Le modèle sera validé et on procèdera à la vérification de la concordance des réponses prédites et obtenues expérimentalement.

2.5. Le Design Space (DS) et prédiction.

Comme il a été mentionné plus haut, l'équation du modèle choisi permettra de prédire les réponses. Dans cette prédiction, l'erreur n'est pas prise en compte, elle sera donc calculée sur la base de l'écart entre les prédictions et les observations. La méthode de simulation de Monte Carlo permet de propager l'erreur du modèle jusqu'à la réponse.

La modélisation mathématique conduit à la détermination du « Design Space » (DS) que l'on peut traduire par « espace de conception ». Par définition, le DS est la combinaison multidimensionnelle ou l'interaction des différents facteurs du processus qui ont permis d'atteindre l'objectif de la méthode défini au départ. En d'autres termes, c'est un sous espace du domaine expérimental à l'intérieur duquel les objectifs du processus définis à l'avance sont atteints en considérant l'incertitude (l'erreur) du processus étudié. Toutes les conditions opératoires définies dans ce DS permettent donc de garantir l'obtention de la même réponse qui correspond à l'objectif attendu du processus.

De plus, le DS représente la robustesse du processus car selon l'ICH Q8(R2) (17), travailler dans cette zone n'est pas considéré comme un changement important. Ceci représente un autre avantage du plan d'expérience qui permet d'évaluer la robustesse pendant la mise au point de la méthode.

L'estimation de l'erreur de prédiction peut être limitée par les intervalles de tolérance avec un niveau de confiance défini ou « β expectation ». Si β est fixé à 95%, cela signifie qu'au moins 95% des futurs résultats seront compris entre les limites supérieure et inférieure de l'intervalle de tolérance (IT) (Eq. 2).

$$IT = \text{Biais}(\%) \pm kCV_{FI}(\%) \quad (\text{Eq. 2}) \text{ (cfr validation)}$$

La prédiction sera traduite par l'équation suivante :

$$E(P[L \leq x_i \leq U]) = \beta \quad (\text{Eq. 3})$$

La probabilité d'avoir une future réponse (x_i) qui correspond à l'objectif fixé comprise à l'intérieur des limites de tolérance L (Lower/basse) et U (Upper/haute) est estimée à β %. Où E et P représentent respectivement les opérateurs d'estimation de l'espérance mathématique et de la probabilité.

2.6. Application à la chromatographie liquide

2.6.1. Sélection de la réponse

La chromatographie liquide est une méthode de séparation des composés d'un mélange. L'objectif de la méthode est donc d'avoir une séparation des différents composés de ce mélange. Habituellement, la résolution entre 2 pics adjacents (Eq. 4) est le critère permettant de caractériser la séparation entre des pics en chromatographie liquide. Le critère étant défini comme une grandeur qui permet de juger si la séparation est bonne ou non. Dans ce cas, le temps de rétention ainsi que la largeur des pics à mi-hauteur sont les réponses enregistrés pour chaque pic.

La résolution se calcule de la manière suivante (18) :

$$R_s = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (\text{Eq. 4})$$

où t_{R2} et t_{R1} sont les temps de rétention de 2 pics adjacents avec $t_{R2} < t_{R1}$

et w_{h1} et w_{h2} sont les largeurs à mi-hauteur de chaque pic.

La résolution entre 2 pics adjacents est bonne si $R_s \geq 1,5$. Il est à noter également que cette résolution R_s n'est pas toujours continue car il se peut qu'en changeant un facteur (pH de la phase mobile par exemple), l'ordre d'élution des pics soit inversé. Cela peut poser problème car pour la planification expérimentale, il est obligatoire d'avoir un critère qui évolue d'une manière continue. C'est pour cela qu'on a introduit le critère S . Le critère S est défini comme étant la séparation entre 2 pics adjacents (Fig. 4). C'est la différence entre le temps de rétention au début du deuxième pic (t_{RB2}) et le temps de rétention à la fin du premier pic (t_{RE1}) selon la formule suivante : $S = t_{RB2} - t_{RE1}$ (Eq. 5) (19).

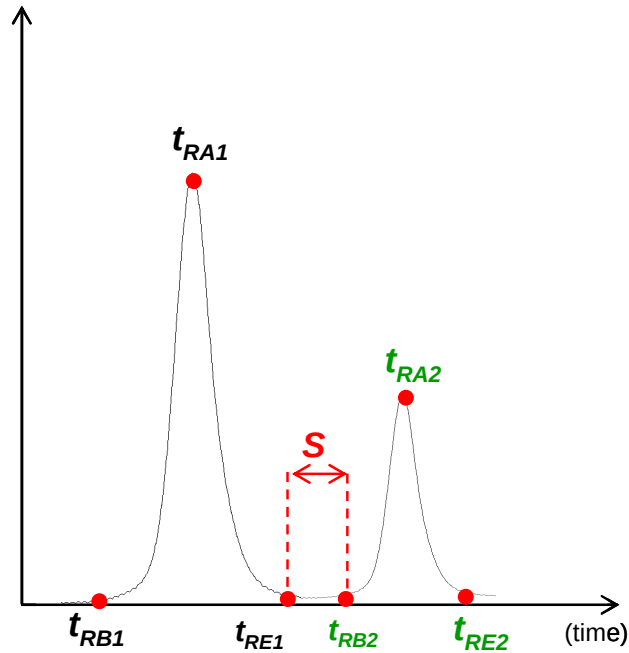


Figure 4 : Représentation schématique d'un pic avec les différents temps de rétention (t_{RB} : temps de rétention au début du pic, t_{RA} : temps de rétention à l'apex et t_{RE} : temps de rétention à la fin, S : séparation).

L'avantage d'utiliser S à la place de la résolution R_s est que S évolue de façon continue, car ce critère ne dépend pas de l'ordre d'élution des pics. S qui fait intervenir une différence présente également un avantage lors de la propagation de l'erreur par rapport à l'utilisation de R_s . L'erreur étant plus faible sur une différence que sur un rapport. S constitue dès lors le critère adéquat pour la planification expérimentale. Deux pics adjacents sont séparés si $S \geq 0$. Donc, l'objectif de la planification expérimentale est ici d'atteindre $S \geq 0$.

2.6.2. Modélisation, optimisation et prédiction

Les trois temps de rétention : au début (t_{RB}), au milieu (t_{RA}) et à la fin (t_{RE}) seront alors mesurés et les facteurs de rétention k sont calculés pour chaque pic. Les réponses modélisées seront les logarithmes de ces facteurs de rétention k , $\log(kt_{Ri})$ avec $kt_{Ri} = (t_{Ri} - t_0)/t_0$ (t_0 est le temps mort ou temps de rétention pour un composé non retenu sur la colonne). Trois équations seront donc obtenues, l'une modélisant les $\log(kt_{Ri})$ ($kt_{Ri} = kt_{RAi}$) et les deux autres modélisant les logarithmes des demi-largeurs à gauche : $\log(w_l)$ avec $w_l = kt_{Ri} - kt_{RBi}$ et à droite

$\log(w_r)$ avec $w_r = kt_{REi} - kt_{Ri}$. Pour trois facteurs à trois niveaux, l'équation suivante peut être utilisée :

$$\log(kt_{Ri}) = \beta_0 + \beta_1 \cdot X + \beta_2 \cdot X^2 + \beta_3 \cdot Y + \beta_4 \cdot Y^2 + \beta_5 \cdot Z + \beta_6 \cdot Z^2 + \beta_7 \cdot X \cdot Y + \beta_8 \cdot X \cdot Z + \beta_9 \cdot Y \cdot Z + \beta_{10} \cdot X \cdot Y \cdot Z + \varepsilon \quad (\text{Eq. 6})$$

où $\log(kt_{Ri})$ est le logarithme du facteur de rétention du pic i , β_0 est l'ordonnée à l'origine et $\beta_1 \dots \beta_{10}$ sont les paramètres du modèle mathématique. X, Y, Z , sont les facteurs et ε l'erreur résiduelle.

Dans notre cas, comme l'objectif est d'avoir $S \geq 0$, le DS est donc défini comme la zone où le critère de séparation sera supérieur à 0 avec une probabilité donnée.

Comme dans la modélisation, on peut également évaluer l'erreur du modèle tant sur les réponses que sur le critère avec un niveau de qualité connu, le DS est donc défini par l'équation :

$$DS = \{x_0 \in \mathcal{X} | E_\theta [P(S > \lambda) | \theta] \geq \pi\} \quad \text{Eq. 7}$$

où x_0 est un point du domaine expérimental $\mathcal{X}$, θ représente l'ensemble des paramètres du modèle, E_θ est l'espérance mathématique, P , la probabilité et λ est le seuil sélectionné à 0 comme expliqué précédemment, du critère de séparation S . π est le niveau de qualité, c'est-à-dire la probabilité avec laquelle DS sera défini. Par exemple, DS représentera une zone dans laquelle $P(S > 0) > 95\%$ montrant ainsi une bonne qualité de la prédiction.

3. Validation de méthodes analytiques

La validation d'une méthode analytique est une étape nécessaire et recommandée internationalement avant son application en routine (ISO/IEC 17025). Elle entre dans le cadre de la mise en place des systèmes d'assurance qualité dans les laboratoires. Il a été défini récemment que toute méthode analytique mise au point dans un laboratoire ou améliorée sur base de la littérature doit être complètement validée en accord avec les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) (20). Depuis 1990, de nombreux guides et documents normatifs ont été publiés par des organismes de normalisation et des groupes d'experts définissant les démarches à suivre pour la validation d'une méthode : ICH (21), FDA (22–24), EURACHEM (25), IUPAC (26), AOAC (27), EMA (28), NF ISO 5725 (27).

Dans ces guides sont définis les différents types de procédures analytiques qui doivent être validées ainsi que les différents critères de validation recommandés (Table 1).

Table 1 : Les différents critères de validation à définir pour chaque type de test.

Type de tests caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bioanalyse
		Quantitatif	Essais limites		
Exactitude	√	√	√		√
Fidélité (répétabilité)	√	√	√		√
Fidélité (fidélité intermédiaire)	√	√	√		√
Spécificité/Sélectivité	√	√	√	√	√
Limite de détection			√		√
Limite de quantification			√		√
Linéarité	√	√	√		Fonction de réponse
Intervalle de mesure	√	√	√		√
Robustesse		√	√		

Malgré les consensus établis, beaucoup de confusions ont été observées concernant la terminologie, les définitions et les évaluations des critères de validation dans ces guides et normes (29).

La commission SFSTP (Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques) a élaboré un guide sur les définitions des terminologies, les règles de diagnostic et les règles de prise de décision de la validation (30–32).

Dans ce travail, nous utiliserons le concept de profil d'exactitude ; une approche qui permet d'évaluer l'efficacité de la méthode utilisée et de montrer la fiabilité des futurs résultats, ce qui n'est pas le cas dans les autres guides dont les approches se focalisent uniquement sur les performances de la méthode (21,33) et non sur les résultats qui seront obtenus avec cette méthode.

3.1. Objectifs de la validation

Le but de la validation d'une méthode est d'établir que la méthode correspond à l'usage pour lequel elle est prévue et de prouver la fiabilité des résultats obtenus dans des limites bien définies. Plus précisément c'est de garantir que la plupart de futures mesures seront proches de la « vraie valeur » et également dans les limites d'acceptation donc que la différence entre

la valeur obtenue x avec la méthode et la vraie valeur μ_T doit être suffisamment faible et inférieure à des valeurs limites $\pm \lambda$ acceptées par l'analyste (Eq. 8).

$$-\lambda < x - \mu_T < \lambda \Leftrightarrow |x - \mu_T| < \lambda \quad (\text{Eq. 8})$$

où x est le résultat obtenu par la méthode, μ_T la vraie valeur et $\pm \lambda$ les limites d'acceptation fixées à l'avance par l'analyste et qui peut être variable selon les exigences et le but de la procédure d'analyse (par exemple : 1 à 2% sur les matières premières, 5% sur les spécialités pharmaceutiques, 15% en bioanalyse, jusqu'à 30% en analyse de matrices complexes comme les plantes,...).

3.2. Les critères de validation : définitions

Les principaux critères de validations les plus recommandés [EURACHEM, ICH, FDA] sont :

- La spécificité
- La fonction de réponse
- La fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)
- La justesse (biais)
- L'exactitude
- La limite de détection (LOD)
- La limite de quantification (LOQ)
- L'intervalle de dosage
- La robustesse

3.2.1. La spécificité

La spécificité est la capacité de la procédure analytique à garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser.

3.2.2. La fonction de réponse

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée «courbe d'étalonnage».

La fonction de réponse est déterminée à l'aide des standards d'étalonnage et traduit par une fonction Y (Eq. 9).

$$Y = f(x) + \varepsilon \quad (\text{Eq. 9})$$

où ε est l'erreur associée à la fonction de réponse $f(x)$, ce qui implique un ajustement de cette fonction de réponse afin de minimiser l'erreur ε .

Pour cela, plusieurs fonctions peuvent être envisagées (Table 2). La fonction la plus utilisée est la droite mais il est souvent nécessaire de tester plusieurs modèles de régression : droite passant par l'origine, fonction quadratique, fonction logistique à 4 paramètres,...(30,31) (Fig. 5). Une fonction sera ensuite sélectionnée sur base du profil d'exactitude (cf 1.2.6).

Table 2 : Principaux types de fonctions utilisées pour l'établissement de la courbe d'étalonnage et les équations correspondantes.

Type de fonction	Equation
Droite passant par l'origine	$Y = ax$ (Eq. 10)
Droite	$Y = ax + b$ (Eq. 11)
Fonction quadratique	$Y = ax^2 + bx + c$ (Eq. 12)
Michaelis Menten 1	$Y = \frac{ax}{b + x}$ (Eq. 13)
Michaelis Menten 2	$Y = \frac{ax}{b + x} + c$ (Eq. 14)
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = a + \frac{d - a}{1 + \left(\frac{c}{x}\right)^b}$ (Eq. 15)

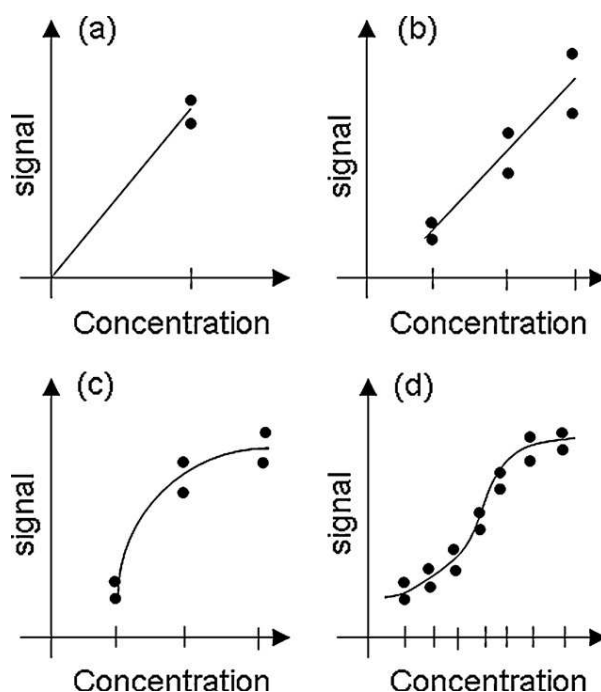


Figure 5 : Représentation graphique de quelques exemples de modèles de régression pour la fonction de réponse. (a) régression linéaire simple utilisant un seul niveau de concentration passant par 0, (b) régression linéaire simple, (c) régression quadratique, (d) régression logistique (34).

3.2.3. La linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage à obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon. On a tendance à la confondre avec la fonction de réponse.

La linéarité d'une méthode est démontrée en comparant les concentrations introduites dans les standards de validation (cfr paragraphe suivant) considérées comme les vraies valeurs et des résultats de ces mêmes standards de validation calculés avec la méthode (Fig. 6).

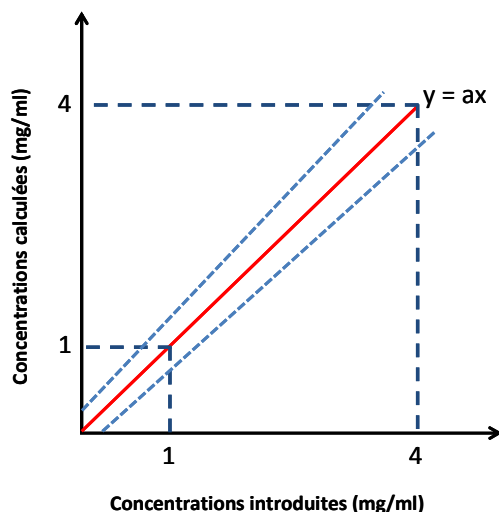


Figure 6 : Représentation graphique de la linéarité : la ligne continue rouge représente la relation entre les concentrations introduites et les concentrations calculées (standards de validation) ; les lignes discontinues bleues représentent les limites d'acceptation.

3.2.4. La fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. La fidélité peut être évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire (intralaboratoire). La fidélité représente l'erreur aléatoire exprimée en écart type relatif ou coefficient de variation.

- Répétabilité : conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (intra-jour).
- Fidélité intermédiaire : conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et/ou utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné (inter-jour).

Afin de faciliter la compréhension des formules, les notations suivantes seront utilisées :

- i indice de série (i variant de 1 à I)
- j indice de concentrations (j variant de 1 à J)

- k indice de répétitions (k variant de 1 à K).

La répétabilité et la fidélité intermédiaire sont évaluées par analyse de variance (ANOVA) des résultats des standards de validation calculés pour chaque niveau de concentration j , soit x_{ik} à partir des standards de calibration. Si toutes les séries contiennent le même nombre de répétitions, on parle de plan équilibré.

Pour chaque niveau de concentration j :

- $\bar{x}_i$ correspond à la moyenne des concentrations calculées de k répétitions pour une série i (moyenne intra-série)

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_{k=1}^K x_{ik}}{K} \quad (\text{Eq. 16})$$

- $\bar{x}_{ik}$ correspond à la moyenne générale des concentrations calculées des I séries et K répétitions d'un niveau

$$\bar{x}_{ik} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^K x_{ik}}{I \times K} \quad (\text{Eq. 17})$$

- S^2_{intra} correspond à l'estimateur de la variance intra-série (intra-jour)

$$S^2_{\text{intra}} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^K (x_{ik} - \bar{x}_i)^2}{I(K-1)} \quad (\text{Eq. 18})$$

où x_{ik} correspond à la concentration calculée pour la i -ème série et k -ème répétition.

I : nombre total de séries

K : nombre total de répétitions

- S^2_{inter} correspond à l'estimateur de la variance inter-séries (inter-jour)

$$S^2_{\text{inter}} = \frac{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^I (\bar{x}_i - \bar{x}_{ik})^2}{K-1} - S^2_{\text{intra}} \quad (\text{Eq. 19})$$

Si $S^2_{\text{inter}} \leq 0$, alors cet estimateur doit être égal à 0.

En conclusion, l'estimateur de la variance intra-série S^2_{intra} donne une estimation de la variance de répétabilité. La répétabilité est exprimée en écart type, symbolisé par S_{intra} :

$$S_{\text{intra}} = \sqrt{S^2_{\text{intra}}} \quad (\text{Eq. 20})$$

tandis que la somme des estimateurs des variances intra et inter-séries donne l'estimation de la fidélité intermédiaire notée S^2_{FI}

$$S^2_{FI} = S^2_{\text{intra}} + S^2_{\text{inter}} \quad (\text{Eq. 21})$$

La fidélité intermédiaire est généralement exprimée en écart type

$$S_{FI} = \sqrt{S^2_{\text{intra}} + S^2_{\text{inter}}} \quad (\text{Eq. 22})$$

ou en coefficient de variation

$$CV_{FI} = \frac{S_{FI}}{\bar{x}_{ik}} \times 100 \quad (\text{Eq. 23})$$

3.2.5. La justesse

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. En d'autres termes, c'est la différence entre la moyenne des mesures de séries et répétitions et la valeur conventionnellement considérée comme la vraie valeur qui représente l'erreur systématique. La définition de la justesse n'est pas toujours claire dans les guides et une confusion avec l'exactitude a été observée (29).

La justesse est estimée par le biais ou le pourcentage de recouvrement.

Pour chaque niveau de concentration j :

- $\bar{x}_{ik}$ correspond à la moyenne des concentrations calculées pour I séries et K répétitions
- $\bar{\mu}_T$ correspond à la moyenne des concentrations introduites qui sont conventionnellement considérées comme les vraies valeurs.

$$\text{Biais absolu} = \bar{x}_{ik} - \bar{\mu}_T \quad (\text{Eq. 24})$$

Le biais est souvent exprimé en biais relatif :

$$\text{Biais relatif} = 100 \times \left(\frac{\bar{x}_{ik} - \bar{\mu}_T}{\bar{\mu}_T} \right) \quad (\text{Eq. 25})$$

ou également en taux de recouvrement

$$\text{Recouvrement (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x}_i}{\bar{\mu}_T} \quad (\text{Eq. 26})$$

La règle de décision de la fidélité et de la justesse repose sur le profil d'exactitude (cfr paragraphe suivant).

3.2.6. L'exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'un essai et la valeur conventionnellement considérée comme la vraie valeur. L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

Pour une concentration inconnue X obtenue avec la méthode,

$X = \mu_T + \text{biais} + \text{fidélité}$ où μ_T correspond la valeur conventionnellement considérée comme la vraie valeur

$$X - \mu_T = \text{biais} + \text{fidélité}$$

$$X - \mu_T = \text{Exactitude}$$

(C'est la différence entre la valeur obtenue avec la méthode et la valeur considérée comme vraie valeur) (Fig. 7).

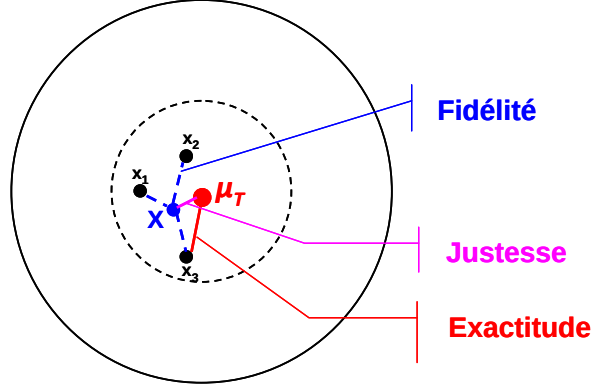


Figure 7 : Représentation schématique de la fidélité, de la justesse et de l'exactitude (3 répétitions).

Le profil d'exactitude constitue l'outil de décision pour décider si une méthode est valide ou non.

Les valeurs suivantes sont nécessaires pour l'établissement d'un profil d'exactitude :

- Le biais qui exprime la justesse
- Le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire : CV_{FI}
- L'intervalle de tolérance d'espérance β ou intervalle de prédiction qui est un intervalle dans lequel les futurs résultats seront compris. Cet intervalle caractérise également la dispersion des résultats obtenus ; β représente la proportion des futurs résultats qui seront compris dans l'intervalle de tolérance.

$$E_{\bar{\mu}, S} \{P[|x_i - \mu_T| < \lambda]\} \geq \beta \quad (\text{Eq. 27})$$

L'équation 25 exprime le fait que pour les futurs résultats E, la probabilité P d'avoir des résultats x_i différents de moins de λ de la vraie valeur μ_T , donc $x_i - \mu_T$ inférieur à λ (qui est la limites d'acceptation fixée), est supérieure ou égale à $\beta\%$. β est fixé à une valeur la plus grande possible (généralement entre 80 et 95%). L'intervalle de tolérance IT est un intervalle symétrique (qui est la somme ou la différence du biais et du coefficient de variation de la fidélité intermédiaire (CV_{FI}) multiplié par un facteur k (Eq. 27)). IT est calculée selon l'équation 26 proposée par Mee R. Mee (35).

$$IT = \text{Biais}(\%) \pm kCV_{FI}(\%) \quad (\text{Eq. 28})$$

où k est un facteur de couverture de l'intervalle de tolérance calculé comme suit :

$$k = Q_t\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{IS^2_{inter} + S^2_{intra}}{I \times K(S^2_{inter} + S^2_{intra})}} \quad (\text{Eq. 29})$$

S^2_{intra} et S^2_{inter} sont les variances de répétabilité et de fidélité intermédiaire respectivement

$Q_t\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right)$ est le quantile de la distribution de t de Student pour ν degrés de liberté (donné dans les tables avec une espérance β). Le ν (nombre de degré de liberté) est calculé selon la formule

$$\nu = \frac{(R+1)^2}{R + \frac{1}{I} + \frac{1}{K-1} + \frac{1}{KI}} \quad (\text{Eq. 30})$$

où R est le rapport entre les variances inter-séries et intra-série qui traduit l'importance relative de l'effet de la série.

$$R = \frac{S^2_{inter}}{S^2_{intra}} \quad (\text{Eq. 31})$$

Un autre terme B a été introduit afin de simplifier les formules et $B = \sqrt{\frac{R+1}{K \times R+1}}$ (Eq. 32)

Comme l'intervalle de tolérance IT est symétrique, les limites de l'intervalle sont donc :

$$IT_{inférieur} = \text{biais}(\%) - Q_t\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{IKB^2}} CV_{FI} \quad (\text{Eq. 33})$$

$$IT_{supérieur} = \text{biais}(\%) + Q_t\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{IKB^2}} CV_{FI} \quad (\text{Eq. 34})$$

En résumé, l'intervalle de tolérance IT est donc la somme ou la différence du biais (justesse) et de la fidélité intermédiaire multipliée par un facteur proportionnel à Q_t , une raison pour laquelle cet intervalle peut être considéré comme l'expression de l'exactitude.

Les limites d'acceptation $\pm \lambda$ ou l'erreur totale acceptée délimitent un intervalle autour de la valeur vraie. Elles sont fixées en fonction de l'analyste, de la finalité et des exigences de la

procédure analytique. Il est souhaité que les valeurs de ces limites sont les plus petites possibles. Dans le cas d'une matrice complexe comme les plantes, les limites d'acceptations maximales admises sont de 30% avec une espérance $\beta\%$ de 80% au minimum (32).

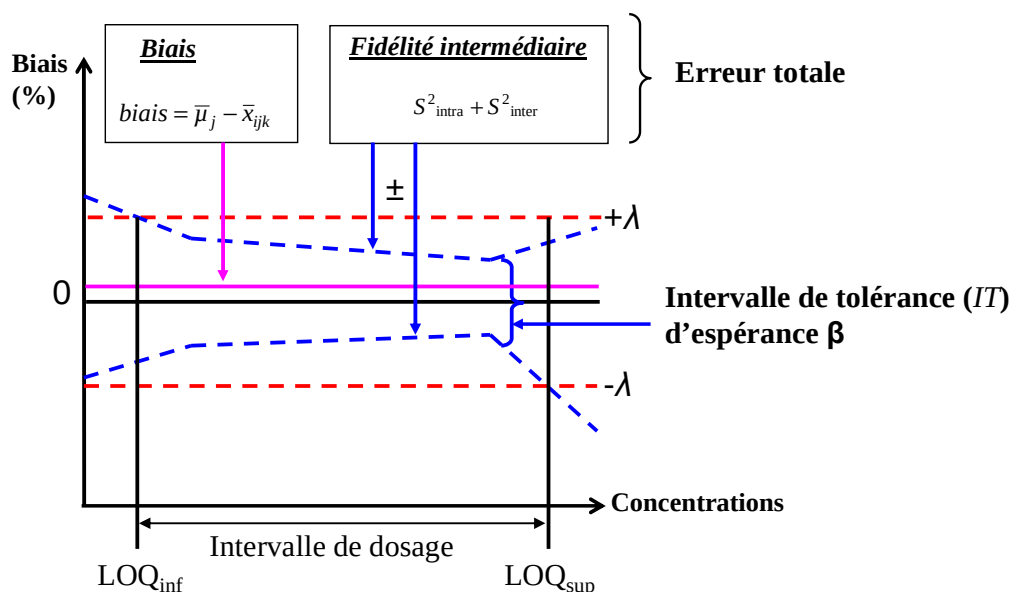


Figure 8 : Représentation schématique du profil d'exactitude (La ligne continue rose représente le biais, les lignes discontinues bleues représentent l'intervalle de tolérance d'espérance β , les lignes discontinues rouges représentent les limites d'acceptation $\pm \lambda$, LOQ_{inf} : limite de quantification inférieure, LOQ_{sup} : limite de quantification supérieure).

Interprétation du profil d'exactitude :

Si l'intervalle de tolérance d'espérance β est complètement compris dans les limites d'acceptation $\pm \lambda$, alors la méthode est considérée comme valide c'est-à-dire qu'au moins $\beta\%$ (80 à 95%) des futurs résultats seront compris dans l'intervalle de tolérance (Fig. 8).

3.2.7. La limite de détection (LD)

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

3.2.8. La limite de quantification (LQ)

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.

3.2.9. L'intervalle de dosage

L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse + fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite.

3.2.10. La robustesse

La robustesse d'une procédure d'analyse est l'aptitude à fournir de faibles variations du résultat lorsqu'on effectue de faibles modifications des paramètres associés à la procédure (exemple : gradient de solvant, température...).

4. La méthode de comparaison de Bland et Altman

4.1. Définition et objectif

Lorsque l'on veut remplacer une méthode de référence par une nouvelle, il est souvent nécessaire de savoir si cette nouvelle méthode donne des résultats en accord avec la méthode de référence. Souvent ces études de comparaison sont effectuées inadéquatement, notamment en se basant sur le coefficient de corrélation. Une technique simple, visuelle et adéquate est proposée par Bland et Altman. La méthode de Bland et Altman est une méthode graphique qui permet de comparer deux méthodes dont l'une est considérée comme étant la méthode de référence. L'objectif est de montrer si la nouvelle méthode peut être utilisée à la place de la méthode de référence ou si les deux peuvent être utilisées de manière interchangeable (36–38).

4.2. Concept de base

La méthode de Bland et Altman est basée sur le concept de : « Limits of agreement (LoA) » qui définit le degré d'accord entre les 2 méthodes.

La première étape consiste à faire une représentation graphique des résultats obtenus avec la première méthode en fonction de la deuxième méthode et de dessiner la droite d'identité

$y = x$ où devraient se trouver tous les résultats si les deux méthodes donnaient exactement les mêmes résultats à chaque analyse. Ce graphique permet de jauger rapidement le degré d'accord entre les deux méthodes.

La seconde étape consiste à déterminer le coefficient de corrélation r . Ce coefficient mesure la linéarité de la relation entre les deux méthodes, ($-1 \leq r \leq 1$). Plus r tend vers 1 plus la relation entre les résultats des deux méthodes est linéaire. Toutefois, une bonne corrélation n'implique pas que les deux méthodes sont en accord : la valeur de r dépend de la gamme de la vraie concentration dans les échantillons : si cette gamme est large, le coefficient de corrélation sera plus élevé que si elle est étroite.

Par contre, il est improbable que les différentes méthodes soient parfaitement en accord en donnant exactement le même résultat pour chaque échantillon analysé vu les variations inhérentes à chaque méthode. Notre objectif est de montrer de combien la nouvelle méthode va s'écarter de l'ancienne. Si cette différence est acceptable, l'ancienne méthode pourra être remplacée par la nouvelle ou les deux méthodes pourront être employées de manière interchangeable.

Il est nécessaire de fixer à l'avance les limites d'acceptation pour pouvoir par la suite accepter ou rejeter la nouvelle méthode. Ces limites d'acceptation dépendent de l'objectif des méthodes et de l'analyste. Pour les matrices complexes ; de larges limites d'acceptation de $\pm 30\%$ sont employées.

4.3. Représentation graphique

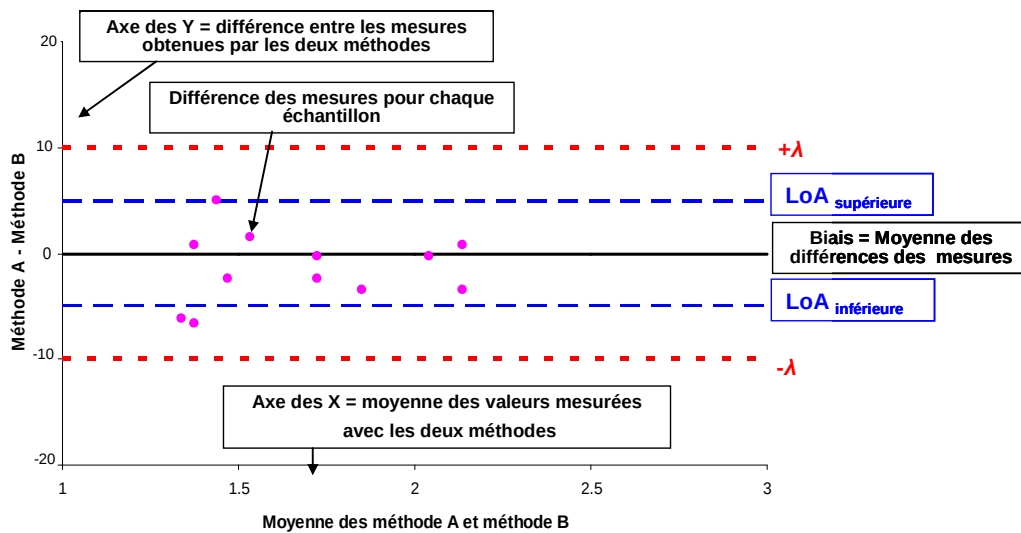


Figure 9 : Structure du graphique de Bland et Altman avec les explications des différents éléments (39).

Pour l'établissement du graphique de Bland et Altman, considérons que y est le résultat obtenu par la méthode A (nouvelle méthode) et z par la méthode B (méthode de référence) sur le même échantillon et n le nombre d'échantillons analysés.

- L'axe des abscisses est constitué par la moyenne des résultats obtenus avec les deux méthodes $(y + z) / 2$
- L'axe des ordonnées représente la différence entre les résultats des deux méthodes soit $d = y - z$
- Ensuite on calcule la moyenne de toutes les différences obtenues des n échantillons, soit $\bar{d}$ (Eq. 33), qui est reportée sur le graphique (Fig. 9) et l'écart-type de ces différences s_d (Eq. 34). Dès lors, en supposant que les différences se distribuent selon une loi normale, on peut s'attendre à ce que 95% des différences soient incluses entre les limites $\bar{d} - 1.96s_d$ et $\bar{d} + 1.96s_d$. Ces limites représentent les limites of agreement (LoA) et sont reportées sur le graphique (Fig. 9).

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n} \quad (\text{Eq. 35})$$

$$s_d = \sqrt{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2} \quad (\text{Eq. 36})$$

d. Les limites d'acceptation $\pm \lambda$ sont reportées sur le graphique

Interprétations du graphique de Bland et Altman :

Si les LoA sont incluses dans les limites d'acceptation, les deux méthodes peuvent être considérées comme comparables. La nouvelle méthode peut donc remplacer l'ancienne ou elles peuvent être utilisées toutes les deux. Les LoA garantissent qu'au moins 95% de la différence des futurs résultats obtenus avec les 2 méthodes seront comprises dans les limites d'acceptation.

5. Les saponosides

Les saponines ou saponosides constituent un groupe d'hétérosides largement répandus chez les végétaux (40). Le terme saponine vient du latin « sapo » qui veut dire savon ; ceci à cause de la propriété moussante des saponines dissouts dans l'eau (41).

5.1. Structure des saponosides

Du point de vue structural, les saponosides sont constitués de sucre(s) (glucose, rhamnose, arabinose, xylose, fucose, acide glucuronique,...) lié(s) à une génine qui peut être un stéroïde ou un triterpène (41).

- Les saponosides triterpéniques : peuvent avoir un squelette pentacyclique ou tétracyclique à 30 atomes de carbone et sont présents surtout chez les Dicotylédones.
- Les saponosides stéroïdiques : avec un squelette à 27 atomes de carbone, ils sont exclusivement présents chez le Monocotylédones (Fig. 10).

Le(s) sucre(s) est (sont) lié(s) à la génine en position C-3 (monodesmosides) mais quelques saponosides présentent une deuxième chaîne de sucre(s) liée à leurs génines soit en position C-28 pour les saponines triterpéniques soit en position C-26 pour les saponines stéroïdiques (bidesmosides) (42). Les monodesmosides sont les plus abondants dans la nature (41).

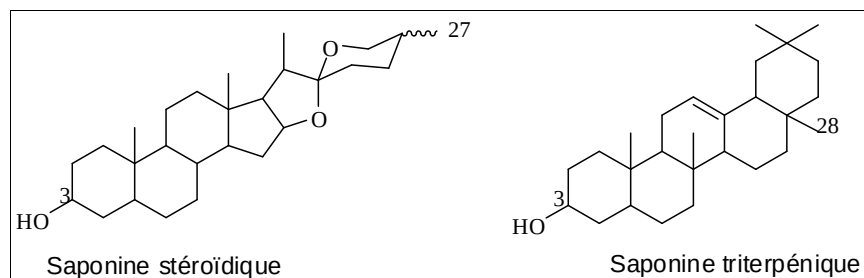


Figure 10 : Structure des squelettes des génines des saponines.

Les saponines sont largement répandues dans les plantes. Si l'on fait la liste du nombre d'espèces et de familles de plantes dans lesquelles des saponines ont été isolées et identifiées de 1998 à 2004, on observe que des saponines ont été isolées de 53 familles, 11 familles possédant des saponines stéroïdiques et 43 des saponines triterpéniques. Les principales familles représentées sont les Liliaceae, Agavaceae, Alliaceae, Solanaceae (saponines stéroïdiques) et les Leguminosae, Araliaceae, Rubiaceae, Caryophyllaceae (saponines triterpéniques) (43). Des saponines triterpéniques ont également été isolées dans quelques espèces d'animaux marins (44,45).

5.2. Propriétés pharmacologiques

Les saponines possèdent une large gamme de propriétés pharmacologiques à cause de la diversité de leurs structures (43,46). Des activités molluscicide, anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antiparasitaire, anticancéreuse, antivirale, aphrodisiaque, cicatrisante, antioxydante, hépatoprotectrice, immunostimulante et/ou immunomodulatrice ont été démontrées dans la littérature (43,46–49). De plus beaucoup possèdent des propriétés hémolytiques (50).

5.3. Analyses qualitatives et quantitatives des saponosides

Plusieurs techniques sont utilisées pour les analyses qualitatives et quantitatives des saponines (51,52).

5.3.1. Les méthodes biologiques

Les méthodes biologiques sont des méthodes semi-quantitatives basées

- sur la détermination de l'indice d'hémolyse indiquant l'activité hémolytique d'un extrait à saponines (53).

- sur l'évaluation de l'effet d'un extrait sur la croissance de colonies de champignons : *Trichoderma viride*, *Tribolium castaneum* (52).
- sur la germination des graines de laitue (52).

Une méthode semi-biologique qu'on peut appeler « bioautographie » consiste à séparer les composants d'un extrait par chromatographie sur couche mince puis à évaluer l'activité hémolytique de chaque tache obtenue en recouvrant la plaque avec une solution de sang préparée dans de la gélatine. Après 4 heures, les taches non colorées révèlent la présence de saponines (54).

Ces différentes méthodes permettent uniquement d'évaluer approximativement la teneur en saponines totales présentes dans un extrait.

5.3.2. Les méthodes non biologiques

Les méthodes non biologiques sont principalement chromatographiques ou électrophorétiques. Parmi celles-ci citons la chromatographie sur couche mince (CCM) densitométrique ou colorimétrique, la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec différents types de détecteurs et l'électrophorèse capillaire (CE). Ces méthodes permettent la séparation, l'identification et la quantification des saponines d'un extrait.

5.3.3. La chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour la CCM, les plaques de silice sont les plus utilisées avec comme phase mobile un mélange de chloroforme-méthanol-eau ou *n*-butanol-acide acétique-eau pour la séparation des saponines et de benzène-acétone pour les génines. Comme les saponines n'absorbent en général pas ou peu aux UV, l'utilisation d'un révélateur est nécessaire. Les réactifs de Carr-Price, Liebermann-Burchard, acide phosphotungstique, anisaldéhyde sulfurique à 0.5%, la vanilline sulfurique à 8% sont les plus fréquemment utilisés pour visualiser les spots et/ou réaliser des quantifications. La CCM densitométrique permet d'obtenir des résultats comparables à la CLHP (51,52).

5.3.4. La chromatographie en phase gazeuse (GC)

Les saponines sont des molécules non volatiles, donc il est impossible de les quantifier par GC. Il est donc nécessaire de réaliser une hydrolyse ou des dérivatisations des saponines avant l'analyse. Par exemple, l'hydrolyse des saponines dans des espèces de *Glycine* et du

Medicago sativa, ont conduit à la formation de génines et de plusieurs artéfacts (lactones). Des variations significatives des teneurs en génines ont été observées et sont dues aux influences des conditions de l'hydrolyse (durée et réactifs utilisés). La formation de ces artéfacts implique une difficulté de l'analyse en GC ; de plus elle nécessite plusieurs étapes préliminaires qui prennent beaucoup de temps et dont les résultats obtenus ne sont pas exacts (51,52).

5.3.5. L'électrophorèse capillaire (CE)

L'électrophorèse capillaire (CE) est une méthode de séparation et de quantification efficace. Elle permet une séparation rapide (1-30 min) d'un petit volume d'échantillon (de l'ordre de nl). Par contre, on observe une moindre sensibilité de détection qu'en CLHP. Quelques saponines du *Ginseng* et de *Medicago sativa* ont été séparées et quantifiées par CE (55,56).

5.3.6. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La chromatographie liquide à haute performance reste la méthode la plus performante et de référence pour le dosage des saponines. Elle est largement utilisée et permet de séparer les saponines et également leurs génines.

Les différents paramètres influençant une séparation en CLHP sont les solvants (phases mobiles), la phase stationnaire et la détection.

5.3.6.1. Les phases mobiles

Les saponines sont séparées en CLHP en utilisant un gradient d'une phase organique composée d'ACN ou de MeOH avec une phase aqueuse acidifiée avec de l'acide phosphorique, de l'acide acétique, de l'acide formique ou du TFA ou parfois une phase aqueuse tamponnée avec du tampon phosphate d'ammonium.

5.3.6.2. Les phases stationnaires

Un extrait de plante contient habituellement plusieurs saponines dont les polarités sont souvent similaires rendant leur séparation compliquée. La colonne C18 est largement utilisée pour tous les types de saponines et permet d'obtenir une bonne séparation. On observe quelques rares utilisations de silices modifiées. Une colonne DIOL a été utilisée pour séparer 7 saponines du *Ginseng* à une température de 14°C, permettant une réduction de la durée

d'analyse de 20 à 15 minutes. Une colonne HILIC a permis de séparer 3 saponines de *Radix Dipsaci* (57).

5.3.6.3. La détection

C'est la partie la plus délicate pour l'analyse quantitative des saponines. L'absence fréquente de chromophore et de liaisons insaturées conjuguées dans leurs structures les rend difficilement détectables aux UV et oblige l'analyste de travailler avec une gamme de longueurs d'ondes non spécifiques entre 200 à 210 nm. Seules les soyasaponines conjuguées avec du 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-méthyl-4-pyrone (DDMHP) absorbent à 295 nm.

Malgré la faible sensibilité de la détection UV, elle est largement utilisée pour l'évaluation quantitative des saponines. Une CLHP-UV d'un extrait de Ginseng a permis de quantifier 12 saponines dont le notoginsenoside R1 et les ginsenosides Rg1, Re, Rh1, Rg2, 20 R-Rg2, Rb1, Rc(8), Rb2, Rb3, Rd and Rg3. Les déterminations quantitatives des saponines dans d'autres espèces par CLHP-UV sont également mises au point.

D'autres modes de détections ont été utilisés afin d'améliorer la détection. Citons la détection par mesure de la lumière diffusée par les résidus d'évaporation (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) et la détection d'aérosols chargés (charge aerosol detection, CAD). Le couplage CLHP-spectrométrie de masse a également facilité la détection des composés.

Le détecteur ELSD, apparu dans les années 1980, connaît un essor depuis les années 2000 (58). Ce mode de détection consiste en un passage de l'effluent de la colonne dans un nébuliseur où il est transformé en fin brouillard par un flux d'azote ou d'air. Les gouttelettes sont transportées dans un tube, dont la température est contrôlée, où se produit une évaporation de la phase mobile conduisant à la formation de fines particules d'analyte. Un rayon laser traverse l'aérosol ainsi formé. Une photodiode au silicium détecte la lumière diffusée à angle droit par rapport à l'écoulement (59,60). Cette technique de détection a permis de quantifier les saponines stéroïdiques des genres *Paris* et *Trillium* (61). Onze saponines triterpéniques de Ginseng : le notoginsenoside R1, les ginsenosides Rg1, Re, Rf, Rb1, Rg2, Rc, Rb2, Rb3, Rd et Rg3 ont été quantifiés après séparation sur une colonne C₁₈ avec un détecteur ELSD (62). D'autres méthodes validées utilisant le détecteur ELSD pour la quantification des saponines de plusieurs espèces végétales et marines ont été également mises au point.

La CAD (détection d'aérosols chargés) est une technologie issue de la détection ELSD, mise au point en 2004. Au niveau du détecteur CAD, l'éluant de colonne CLHP est d'abord nébulisé par un flux d'azote ; les gouttelettes sont ensuite séchées afin d'évacuer la phase mobile, produisant ainsi des particules d'analytes. Un flux d'azote secondaire se charge positivement en traversant un fil de platine (Corona) sous haute tension. Cette charge est transférée au flux opposé de particules d'analyte. Les particules chargées sont acheminées vers un collecteur où la charge est mesurée par un électromètre à haute sensibilité, générant un signal directement proportionnel à la quantité d'analyte présente (63). Une comparaison entre la détection en ELSD et CAD pour la quantification de 10 saikosaponines de *Bupleurum falcatum* (Apiaceae) a montré que la détection CAD est 6 fois plus sensible que la détection ELSD c'est-à-dire que les limites de détection diminuent de 1.5 à 4.5 µg/ml en ELSD à 0.25 à 0.75 µg/ml en CAD (64).

La spectrométrie de masse est également utilisée dans beaucoup de cas d'analyses quantitatives des saponines. Cette technique a une sensibilité supérieure et est plus sélective par rapport aux autres techniques de détection. Elle reste limitée au niveau de la complexité de l'ionisation qui affecte la robustesse et du coût élevé de l'appareillage.

Un tableau résumant des exemples de dosages par CLHP des saponines avec différents types de détecteur se trouve en annexe 1.

L'émergence de ces nouvelles techniques de détection qui sont des techniques plus sensibles et ne nécessitent qu'une petite quantité de composé à analyser (de l'ordre de ng) a permis d'améliorer la quantification des saponines. Néanmoins, ces techniques restent encore coûteuses et ne sont pas adéquates pour les pays en voie de développement pour des analyses de routine. La détection UV semble toujours la méthode la plus prisee et la plus simple.

6. Généralités sur les plantes étudiées

6.1. *Spirospermum penduliflorum* Thouars (Menispermaceae)

6.1.1. Généralités sur la famille des Menispermaceae

La famille des Menispermaceae compte 75 genres et 520 espèces répartis dans 8 tribus (165). Ce sont généralement des arbustes ou lianes. C'est une famille connue surtout pour la production d'alcaloïdes. La (S)-norcoclaurine (Fig. 11), une benzyltétraisoquinoléine est la principale molécule intermédiaire à l'origine de la synthèse de la majorité des alcaloïdes de la

famille (166). Barbosa-Filho *et al.* ont proposé un schéma de biosynthèse des différents groupes d'alcaloïdes. Les isoquinoléines, les phenéthylcinnamides et les autres alcaloïdes sont classés à part (Fig. 12).

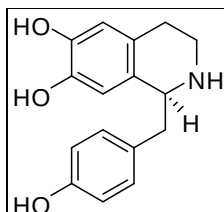


Figure 11 : Structure de la (S)-Norcoclaurine

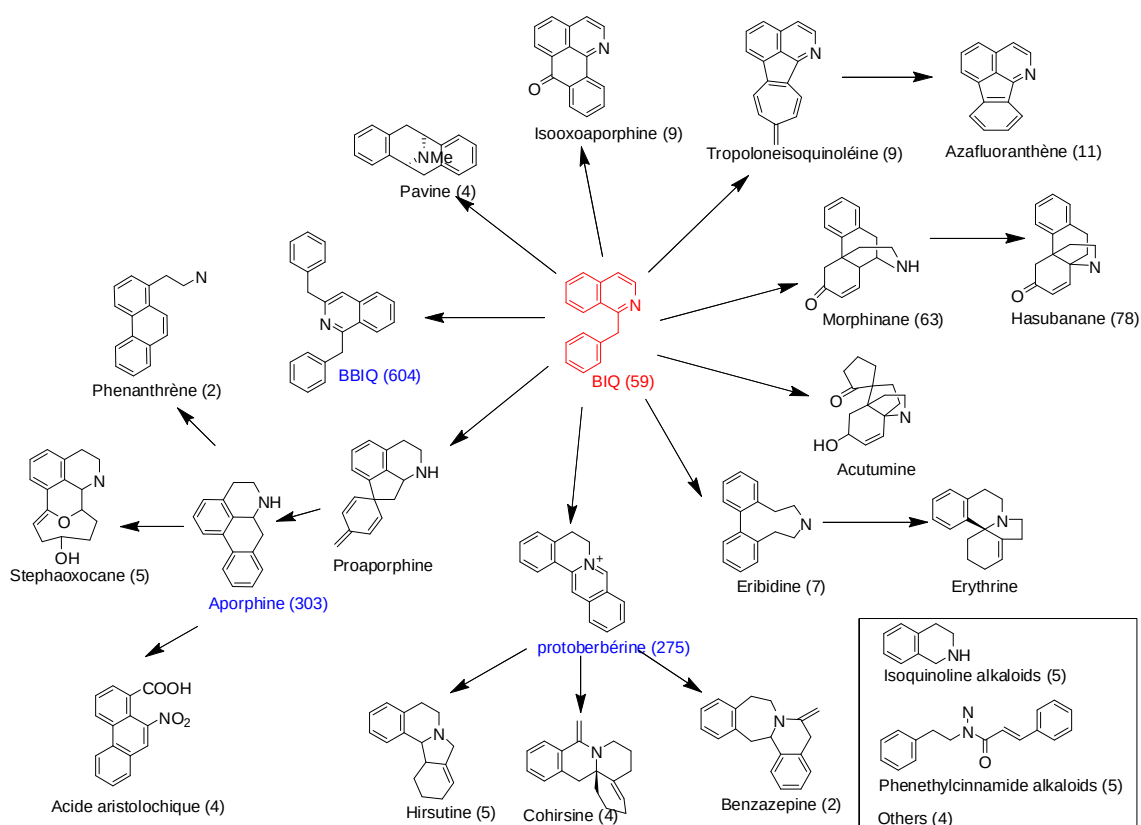


Figure 12 : Relations biosynthétiques proposées entre les différents alcaloïdes de la famille des Menispermaceae (nombre de composés isolés pour chaque groupe) (166).

La famille des Menispermaceae compte 23 types d'alcaloïdes différents. Fin 1996, 1858 alcaloïdes avaient été isolés et identifiés de 244 plantes (167). La figure 13 nous montre les différents groupes d'alcaloïdes retrouvés dans la famille des Menispermaceae. Les bisbenzylisoquinoléines sont les plus abondants et viennent après les alcaloïdes aporphiniques puis les protoberbérines. Ces 3 groupes d'alcaloïdes sont les groupes caractéristiques qui

peuvent être considérés comme des marqueurs chimiques de la famille. Les benzyloquinoléines (BIQ), les proaporphines, les morphinanes, les hasubananes et les erythrines représentent 2 à 4% des groupes totaux. Les 15 autres sont peu abondants et les eribidines et acutumines sont propres à la famille des Menispermaceae (167).

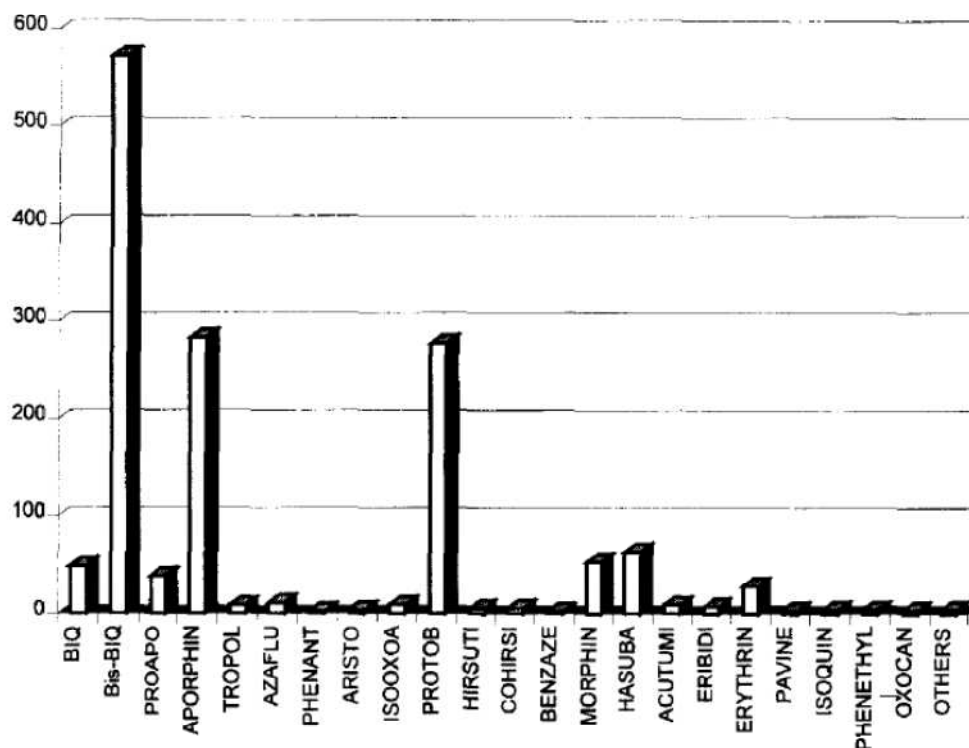


Figure 13 : Profil chimique de la famille de Menispermaceae (source : Barbosa-Filho *et al.* (166)).

Barbosa-Filho *et al.* ont observé une relation entre les différents types d'alcaloïdes isolés des genres de la même tribu et proposent une classification chimiotaxonomique de ces tribus.

Le genre *Spirospermum* appartient à la tribu des Cocculeae subdivisée en 3 sous-tribus : les Cocculineae, les Stephaniinae et les Cissampelinae. La sous-tribu des Stephaniinae est représentée par le seul genre : *Stephania*, dans la sous-tribu des Cissampelinae sont regroupés les genres *Cissampelos*, *Antizoma* et *Cyclea* et dans la sous-tribu des Cocculineae se trouvent les genres *Spirospermum*, *Limacia*, *Menispermum*, *Sinomenium*, *Diploclesia*, *Legnephora*, *Limaciopsis*, *Pachygone*, *Sarcopetalum* et *Strychnopsis*. Les bisbenzyloquinoléines et les aporphines sont les alcaloïdes les plus abondants et communs à tous les genres de cette tribu.

6.1.2. Description botanique de *Spirospermum penduliflorum* Thouars

Spirospermum penduliflorum (*S. penduliflorum.*) est un petit arbre de la famille des Menispermacées. Les feuilles sont simples, penninerves à pétiole portant près de l'apex un pulvinus distinct. Les fleurs sont groupées en panicules, longues pendantes, vert jaune à blanchâtres. Le fruit est un méricarpe ou groupe de 2-9 méricarpes drupacés, comprimés latéralement, circulaires, contenant des graines courbées en fer à cheval (Fig. 14).

<u>Classification classique</u>	
Règne :	Plantae
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Ranunculales
Famille :	Menispermaceae
Genre :	<i>Spirospermum</i>
Tribu :	Cocculineae
Sous-tribu :	Cocculae
Espèce :	<i>Penduliflorum</i> Thouars

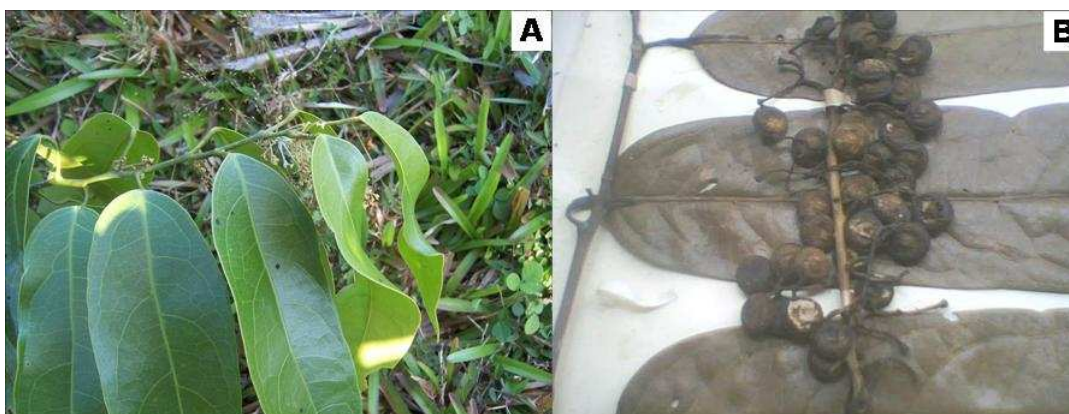


Figure 14 : *S. penduliflorum* (A : pied en fleurs, B : photo d'herbier avec les fruits).

Cette plante est endémique de Madagascar et répartie dans les forêts humides à basse altitude (<500 m d'altitude). Elle pousse sur toute la partie Est jusqu'au Nord et au Sud-Ouest de l'île (168).

La décoction de feuilles de *S. penduliflorum* a été utilisée pendant l'époque monarchique à Madagascar comme vasorelaxante. Plus tard, on l'a utilisée pour le traitement de la malaria comme adjuvant à la chloroquine. Les feuilles séchées sont fumées pour atténuer la

tuberculose pulmonaire. La décoction de la racine est prise comme cholagogue, tonique et pour les troubles hépatiques (169).

Les racines et les feuilles de *S. penduliflorum* ont fait l'objet d'études scientifiques. Rasoanaivo *et al.* n'ont pas détecté d'alcaloïdes dans les feuilles d'un échantillon collecté à l'Ouest de Madagascar (170). Un fractionnement bioguidé de l'extrait de racine a conduit à l'isolement de la limacine (alcaloïde bisbenzylisoquinoléique) (Fig. 15) qui a montré une activité antimalarique (171). Frappier *et al.* ont mis en évidence l'activité modulatrice de la limacine sur la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine (172). Ces différentes études confirment l'usage traditionnel de l'extrait de la plante comme adjuvant à la chloroquine. D'autres études menées sur des échantillons collectés dans une autre région ont permis d'isoler la columbine (diterpénoïde de type clérodane) et la palmatine (alcaloïde quaternaire de type protoberbérine) (Fig. 15) (170,173).

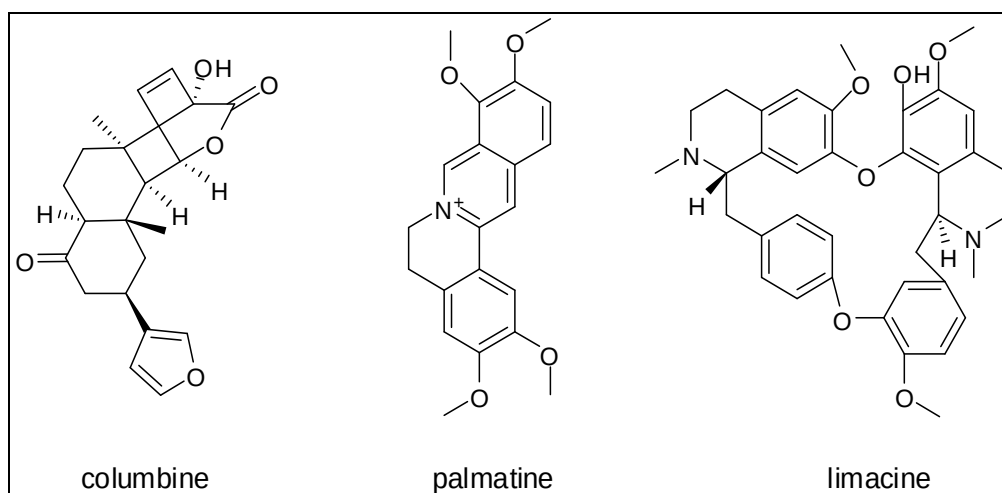


Figure 15 : Structure de la columbine, palmatine et limacine.

6.2. *Centella asiatica* (L.) Urban (Apiaceae)

Centella asiatica (*C. asiatica*), une plante appartenant à la famille des Apiaceae est originaire de l'Inde et a été largement utilisée par la médecine ayurvédique d'abord puis dans de nombreux pays, y compris l'Europe. *C. asiatica* est très utilisée par l'industrie pharmaceutique, cosmétique et comme complément alimentaire et est reprise dans les pharmacopées européenne et chinoise. Une monographie de l'OMS existe également (65,66).

6.2.1. Description botanique

Classification classique	
Règne :	Plantae
Sousrègne :	Tracheobionta
Superdivision :	Spermatophyta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Apiales
Famille :	Apiaceae
Genre :	<i>Centella</i>
Espèce :	<i>asiatica</i> (L.) Urban



Figure 16 : Variétés de *C. asiatica* Urb. (A : variété à feuille orbiculaire, B : feuilles des 2 variétés, C : variété à feuille réniforme).

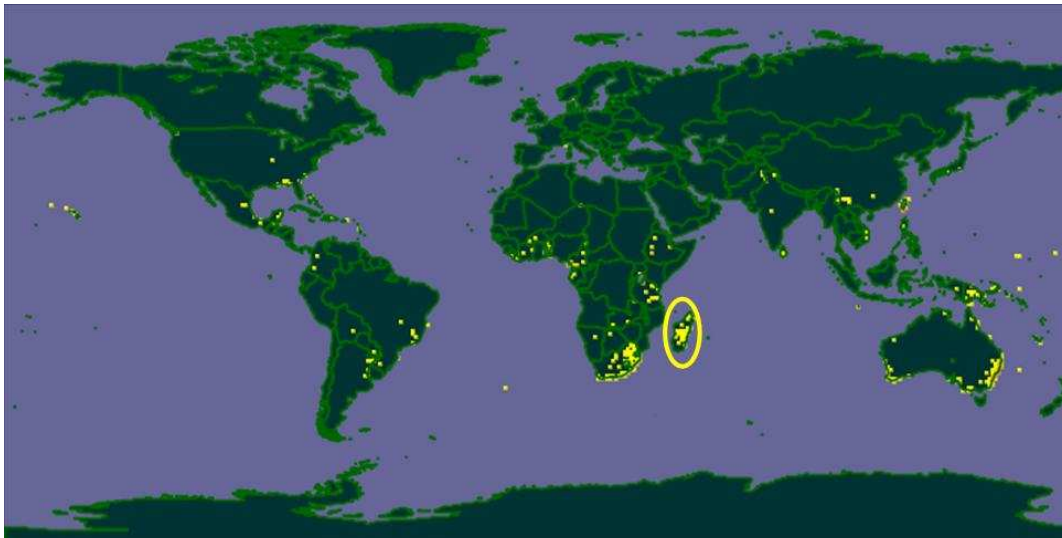


Figure 17 : Répartition géographique de *C. asiatica* dans le monde (67).

C. asiatica (L.) Urban plus connue sous le nom de «talapetraka» est une plante vivace, herbacée, rampante, stolonifère poussant dans les milieux humides. Les feuilles réniformes ou orbiculaires à bords crénelés ou ondulés sont disposées en rosette et portées par un long pétiole. Lorsqu'elle colonise des emplacements dénudés, elle est très rasante avec des feuilles

à pétiole court ; par contre, lorsqu'elle croit parmi d'autres herbes les pétioles peuvent atteindre jusqu'à 20 cm. Les fleurs sont petites, sessiles, de couleur blanche, bisexuées. Les fruits secs et indéhiscent (akènes) se séparent en deux à maturité (Fig. 16).

6.2.2. Répartition géographique dans le monde et à Madagascar

C. asiatica est originaire de l'Inde. Elle pousse spontanément dans les régions subtropicales : Chine, Malaisie, Australie, Sri Lanka, Nouvelle Guinée, Afrique (Fig. 17). Elle est largement répandue dans tout Madagascar. Des variations phénotypiques ont été observées selon l'endroit où pousse la plante. Il existe en effet 2 variétés de *C. asiatica* selon la forme des feuilles : la forme réniforme ; présente surtout à l'Est et la forme orbiculaire à l'Ouest. La variété à feuilles réniformes serait d'origine indienne et celle à feuilles orbiculaires, africaine.

6.2.3. Contexte général et importance économique de *Centella asiatica*

C. asiatica tient la seconde place après *Catharanthus roseus* parmi les plantes médicinales exportées par Madagascar. Les feuilles séchées représentent environ 1/4 des plantes médicinales exportées. Les pays destinataires sont la France, l'Allemagne, l'Italie, l'Inde, l'Espagne et la Corée (Ministère de l'Economie, des Finances et du Budget 2008) (68). Cette demande internationale a diminué en 2007 mais a repris par la suite et n'a cessé d'augmenter jusqu'en 2009 puis est restée stable jusqu'au premier trimestre de l'année 2011 (Fig. 18).

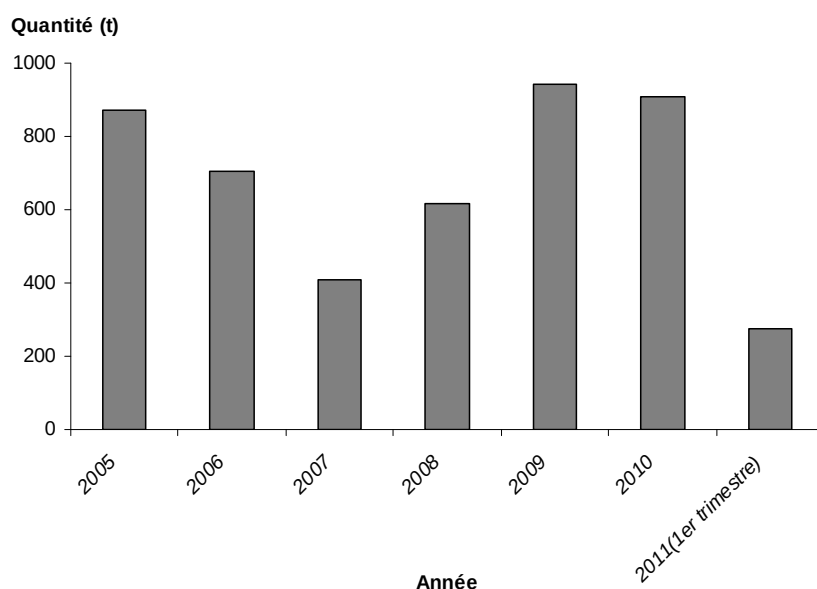


Figure 18 : Evolution de l'exportation de plantes médicinales à Madagascar (source : INSTAT, 2011 (69)).

6.2.4. Utilisations et composition chimique

C. asiatica a été largement utilisée dans la médecine ayurvédique pour le traitement de la lèpre, des brûlures gastriques, de l'arthrose, des varices, de l'hypertension artérielle, comme cicatrisante des blessures et des brûlures, et pour l'amélioration de la mémoire (1,2).

Elle est surtout connue par la présence de triterpènes, molécules majoritaires dont la molécule la plus étudiée est l'asiaticoside (70). Les premières études sur la plante ont mené à l'isolement de cette molécule dans les feuilles (71). Le madécassoside, l'acide asiatique et l'acide madécassique ont été isolés par la suite (72–74). L'asiaticoside B (terminoloside) et sa génine (l'acide terminolique) qui est un isomère du madécassoside et l'asiaticoside A ont été également identifiés dans les feuilles (Fig. 19) (75). Jiang *et al.* ont isolé et identifié l'asiaticoside C, D, E et F en utilisant toutes les parties de la plante (Fig. 20) (76).

Des études plus récentes ont conduit à l'isolement d'autres familles de molécules dont des alcaloïdes, des flavonoïdes glycosidiques, des oligosaccharides, des polyacétylènes, des monoterpènes, des caroténoïdes (70,77,78). Une huile essentielle composée surtout de mono, di et sesquiterpènes a été extraite des feuilles, des racines et des stolons (70,79).

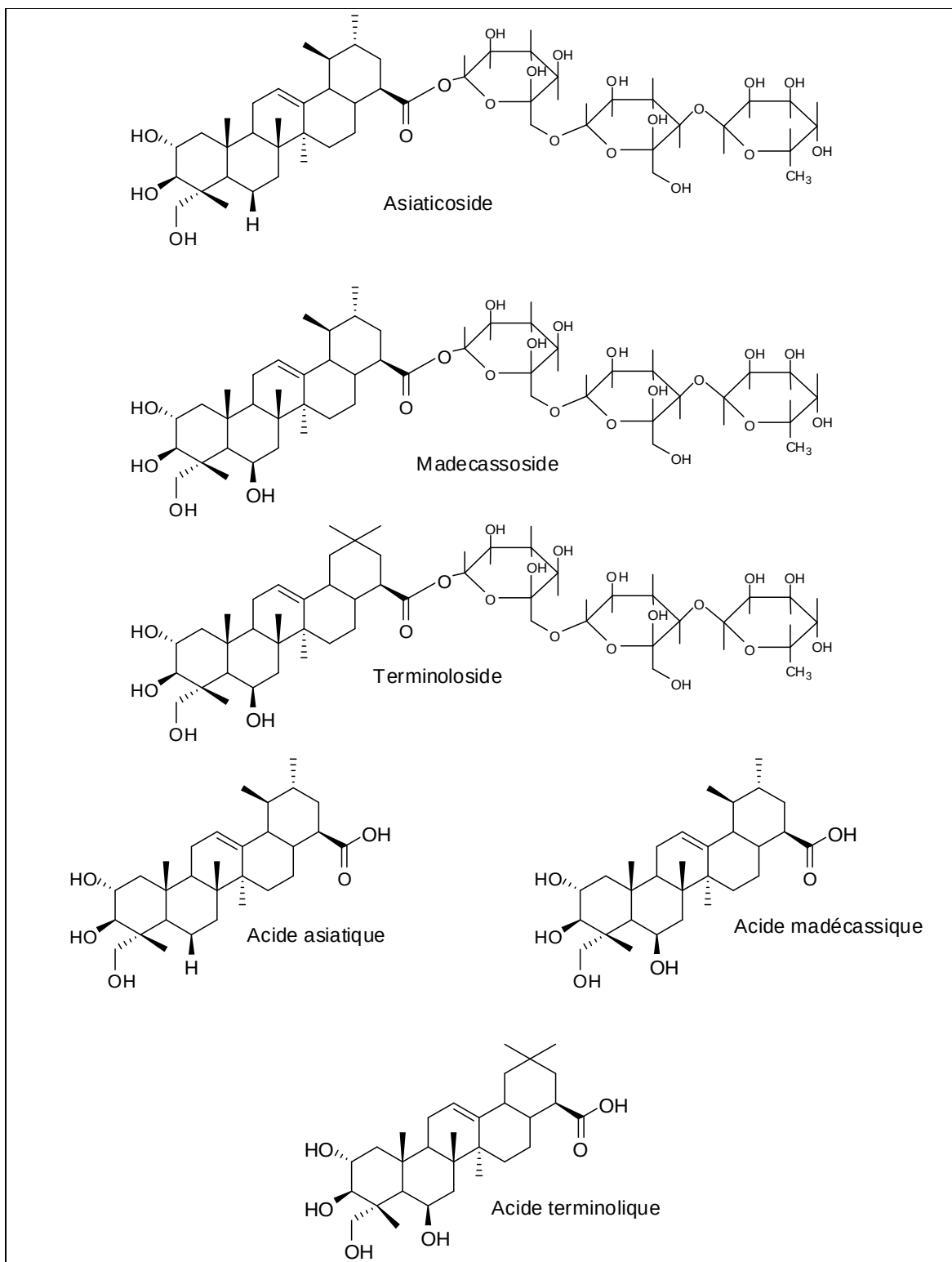


Figure 19: Structure des triterpènes majoritaires de *Centella asiatica*.

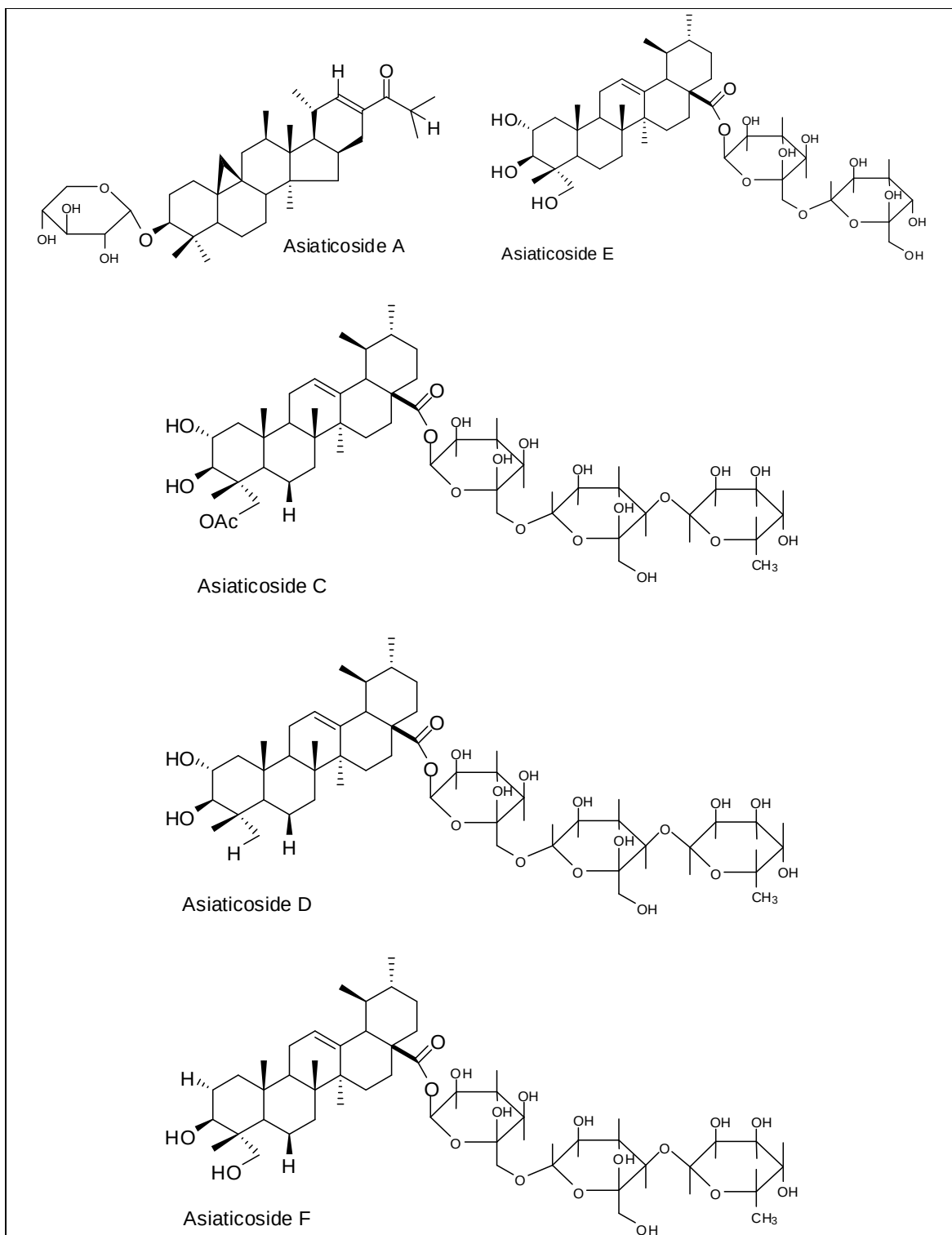


Figure 20: Structures de triterpènes également identifiés dans la plante

La majorité des études concernant les activités pharmacologiques de *C. asiatica* est focalisée sur l'extrait brut des feuilles, sur l'asiaticoside, le madécassoside, l'acide asiatique et l'acide madécassique.

Des études *in vitro* et *in vivo* ont conduit à démontrer l'activité cicatrisante, qui est la plus connue. L'extrait de *C. asiatica* favorise l'angiogenèse et empêche l'inhibition de la réplication de l'ADN en cas de vieillissement cellulaire induit dans les fibroblastes par le dioxyde de dihydrogène (H_2O_2) (80–82). L'extrait présente une activité antioxydante. Cette activité a été montrée par des tests chimiques et également *in vivo*. *In vivo*, l'extrait de *C. asiatica* diminue les taux de malondialdéhyde, des espèces oxydantes radicalaires (ROS) et des peroxydes qui induisent en cas de stress le vieillissement des cellules. L'extrait restaure également la synthèse des enzymes antioxydantes (83–90). *C. asiatica* inhibe *in vitro* la prolifération des cellules cancéreuses de l'adénome gastrique humain, de l'utérus humain (HeLa) et des mélanomes murins (91). L'extrait renforce les parois des veines en cas d'hypertension chronique en stimulant la synthèse de collagène et a un effet modulateur sur la prolifération des fibroblastes au niveau de la paroi veineuse (92). Il a un effet anticonvulsif en agissant sur le système cholinergique (93), et améliore la mémoire d'une manière impliquant ses propriétés antioxydantes (85). L'extrait aqueux des feuilles protège la peau contre les effets des rayons UV en réduisant l'expression de l'hyaluronidase et des collagénases (MMP-1) (94). Des effets contraceptifs sur des rats mâles ont été également observés. Les rats traités avec de l'extrait *C. asiatica* présentent une dégénération des cellules de la spermatogenèse induisant une réduction des spermatozoïdes et une diminution du taux de testostérone (95).

L'asiaticoside est la molécule la plus souvent citée comme responsable des principales activités pharmacologiques de la plante. Des études *in vitro* ont confirmé son activité cicatrisante. Il induit la synthèse des collagènes I et III et la prolifération des fibroblastes améliorant ainsi la cicatrisation (96–102). Cependant, dans une étude effectuée sur les chéloïdes (hyperprolifération des fibroblastes dermiques), l'asiaticoside a l'effet inverse, diminuant la synthèse des collagènes I et III et la prolifération des fibroblastes (103). L'asiaticoside pourrait donc avoir un effet régulateur sur la cicatrisation. Ces différents effets de l'asiaticoside ont été également montrés par des essais *in vivo* en administration orale ou par application cutanée (97,101,102,104–107).

Des études *in vivo* ont été rapportées sur le madécassoside qui possède aussi une activité cicatrisante faisant intervenir plusieurs mécanismes d'action, comme l'activité antioxydante, la synthèse de collagène I et l'angiogenèse. Il présente également des effets antirhumatismaux

en protégeant les articulations dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène-II ; on observe une diminution de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires (108–110). Cette molécule a un effet protecteur du myocarde (ischémie) par l'effet antioxydant en inhibant la peroxydation des lipides et également en inhibant le facteur de nécrose tumorale α induit par les liposaccharides (111,112). L'acide asiatique améliore les fonctions cognitives (mémoire) en régulant le taux d'acétylcholine au niveau de l'hippocampe (113,114) et a un rôle protecteur des neurones (effets antioxydants) (115–119). Il stimule également la fonction érectile dont le mécanisme n'est pas encore connu (120). *In vivo*, des activités anticancéreuses sur des lignées de cellules malignes du colon et de mélanome ont été démontrées ; l'acide asiatique stimule la synthèse de caspase-3, clivant les membranes des mitochondries et entraînant l'apoptose. (121,122). Seule une étude *in vitro* a été réalisée sur l'acide madécassique montrant son activité anti-inflammatoire en inhibant la synthèse de médiateurs inflammatoires(123).

L'usage le plus ancien connu de *C. asiatica* dans la médecine traditionnelle est son utilisation comme cicatrisante. La majorité des études cliniques réalisées sur *C. asiatica* ont été faites sur l'extrait brut ou un extrait titré en triterpènes : TECA (titrated in asiaticoside, madecassoside, asiatic acid and madecassic acid extract of *C. asiatica*). À Madagascar, la propriété cicatrisante a été mise en évidence en 1936 dans un centre de traitement de la lèpre où des extraits de feuilles ont été testés sur des malades (124). Elle a été même démontrée chez des patients diabétiques (125). En application cutanée, l'extrait peut être utilisé dans le traitement des eczémas et a un pouvoir raffermissant et hydratant (126–130). L'extrait brut par voie orale présente des effets tonique, antioxydant, antianxiété (131,132) et améliore la mémoire aussi bien chez les personnes âgées que chez les enfants (133,134). Chez des malades atteints du virus VIH, l'extrait de *C. asiatica* joue un rôle immunomodulateur (135). L'efficacité du TECA a été démontré en cas d'insuffisance veineuse (136,137), sur le traitement des ulcères gastriques et des désordres hépatiques (138)(139).

A côté de leurs propriétés citées ci-dessus, les feuilles de *C. asiatica* sont actuellement très utilisées dans l'industrie cosmétique comme cicatrisantes (140), « antiâges », hydratantes, raffermissantes et antirides (141).

Une surexploitation de la plante est observée étant donné que les collectes se font à l'état sauvage. Dès lors, une équipe de chercheurs a mis au point une méthode de multiplication *in vitro* de *C. asiatica* (142) dont l'objectif principal est d'avoir des matériels végétaux disponibles à tout moment. La sélection du matériel de départ est basée sur la teneur en

triterpènes des feuilles car il a été montré que des variations significatives de la teneur en triterpènes sont observées selon la date et la période de collecte des feuilles. De plus, les variétés de *C. asiatica* de Madagascar sont plus riches en triterpènes que celles de l'Inde (143).

6.2.5. Dosage des principes actifs

Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature pour séparer, identifier et quantifier les triterpènes de *C. asiatica*. Les méthodes les plus classiques sont les chromatographies liquide et sur couche mince.

6.2.5.1. Dosages par CLHP

La CLHP est la plus utilisée pour la séparation, l'identification et la détermination quantitative des triterpènes de *C. asiatica*. Le tableau suivant (Table 3) résume les méthodes mises au point décrites dans la littérature, les différentes conditions chromatographiques, les limites de détections, et indique si ces méthodes ont été validées ou non.

Table 3 : Méthodes de dosage des triterpènes de feuilles de *C. asiatica* par CLHP.

Principes actifs dosés	Conditions chromatographiques	LOD	Validation	Réf
Madécassoside	CLC ODS, C18, (150 × 6 mm i.d., 5 µm) MS/ESI ⁺	< 0.11x10 ⁻³ µg/ml	Validée	(144)
Asiaticoside, madécassoside	Isocratique : H ₂ O (Ac formique 0.1%):ACN (60:40, v/v), Kinetex, C18, (100 × 2.1 mm i.d., 2.6 µm) Décteur ampérométrique pulse (DAP) Isocratique : H ₂ O:ACN 25%	0,005 µg/ml 0,004 µg/ml	Validée	(145)
Asiaticoside, madécassoside, acide asiatique	Lichrospher®100 ; C18 (5 µm) UV 210 nm Gradient : H ₂ O (acide orthophosphorique):ACN	Non définies	Validée	(146)
Asiaticoside, acide asiatique	Agilent XDB, C-18, (25 × 4.6 mm i.d., 4.6 µm) ELSD Gradient/H ₂ O (acide formique 0.1%):ACN	1,02, 1,04 µg/ml	Non validée	(147)
Acide asiatique	Diamonsil TM, C18, (250 × 4.6 mm i.d., 5 µm) UV 248 nm Gradient: H ₂ O:ACN	2.5x10 ⁻³ µg/ml	Validée	(148)
Asiaticoside, madécassoside, asiaticoside B	Cosmosil5, C18-MS-II ELSD Gradient ACN (0.01% TFA, 1% TBME):H ₂ O (TFA 0.01%)	1.2x10 ⁻³ , 10 ⁻³ , 10 ⁻³ µg/ml	validée	(149)
Asiaticoside, madecassoside, acide asiatique, acide madécassique	Zorbax, C18, (250 × 4.6 mm i.d.) 205 nm Gradient H ₂ O:ACN	1,8, 1,8, 1,5, 1 et 1 µg/ml	Non validée	(150)
Acide madécassique, acide terminolique	Agilent Zorbax SB-C18 (150 × 4.6 mm i.d., 5 µm) 204 nm Isocratique : H ₂ O:MeOH (65:35, v/v) 4 mM β-CD	Non définies	Non validées	(151)
Madécassoside, asiaticoside B, acide madécassique, acide terminolique	Agilent Zorbax SB, C18, (150 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm), 204 nm Isocratique : H ₂ O:MeOH (50:50, v/v) H ₂ O:MeOH (65/35 : v/v), 4mM β-CD	Non définies	Non validée	(152)
Principes actifs dosés	Conditions chromatographiques	LOD	Validation	Réf

Asiaticoside, madécassoside, acide asiatique, acide madécassique	Symmetry 300™, C18, (150 × 3.9 mm i.d., 5 µm) UV 206 nm Gradient: H ₂ O:ACN	Non définies	Non validée	(142)
Asiaticoside, madécassoside, asiaticoside B, acide madécassique, acide asiatique, acide terminolique	Phenomenex Aqua, 5µ C18 (200 Å) 206 nm Gradient: ACN (0.1%TFA):H ₂ O(0.1%TFA):TBME (0.1%TFA)	0.01 µg/ml	Non validée	(153)
Asiaticoside	CLC-ODS (M), (250 × 4.6 mm i.d., 5 µm) UV 220 nm Isocratique : H ₂ O (1% TFA):MeOH (30:70, v/v)	Non définies	Non validée	(154)
Asiaticoside, madécassoside, acide madécassique, acide asiatique	LiChrospher 100, C18, (125 × 4 mm i.d., 5 µm) UV 205 nm Gradient H ₂ O (0.05% H ₃ PO ₄):ACN (0.05% H ₃ PO ₄)	< 1 µg/ml	Non validée	(155)
Asiaticoside, madécassoside, acide madécassique, acide asiatique	Bondapak, C18 (300 × 0.39 mm i.d., 10 µm) 220 nm Gradient: H ₂ O:ACN	3, 3, 2,5, 2,5 µg/ml	Non validée	(156)
Asiaticoside, madécassoside, acide madécassique, acide asiatique	C 18, (250 × 4 mm i.d, 5 µm) 200 nm Gradient : H ₂ O:ACN	Non définies	Validée	(157)

Dans toutes ces méthodes, un seul type de colonne a été utilisée : les colonnes en phase inverse C18. Les différences se situent au niveau de la taille de la colonne (variant de 120 à 250 mm x 4.6 mm) et de la taille des particules (de 2.6 μm à 5 μm). Les triterpènes sont en majorité détectés sous UV (entre 205 et 220 nm). Par contre, d'autres modes de détection plus sensibles ont été également proposés dont la détection ELSD (147,149), MS (144) et PAD (145). Ces modes de détection présentent des limites de détection faibles de l'ordre de 11 ng (144) à 120 ng (147) contre 1 μg (150) à 3 μg (156) pour la détection en UV. Malgré cette amélioration de la sensibilité, ces méthodes ne dosent que les osides (144,145,149) ou l'acide asiatique (147). D'un autre côté, la détection UV reste encore la plus utilisée étant donné sa meilleure reproductibilité et son accessibilité plus facile.

Si on considère les seules méthodes validées (les autres ne pouvant être considérées comme valides selon les critères actuels), les méthodes mises au point ne séparent pas les 4 triterpènes mais soit les osides (144,145,149,154) soit uniquement les acides (147,148,151) soit des acides et des osides mais pas les 4 molécules majoritaires (146,152). Signalons également que le madécassoside et l'acide madécassique possèdent des isomères qui peuvent être séparés en rajoutant des β -cyclodextrines dans la phase mobile (152,153). Aucune méthode complètement validée ne permet donc de quantifier les deux acides et les deux osides sauf si on considère la méthode de la Pharmacopée Européenne. Cependant, les essais pour reproduire la séparation se sont avérés infructueux et la méthode a été révisée tout récemment à cause d'un problème au niveau de la séparation. Malgré tout cela, la durée de l'analyse proposée reste toujours longue (53).

6.2.5.2. Dosages par CCMHP

Cette technique présente les avantages d'être moins coûteuse que la CLHP, d'être rapide et de permettre le dosage simultané de plusieurs échantillons.

Table 4 : Méthodes de séparation et de quantification des triterpènes de *C. asiatica* par CCMHP.

Principes actifs	Conditions chromatographiques	Rf	LOD	Réf.
Asiaticoside, madecassoside, acide asiatique, acide madecassique	Silica gel 60G 250 µm Chloroforme-acide acétique glacial-MeOH-H ₂ O (60:32:12:8, v/v) anisaldéhyde sulfurique, 100°C, λ non définie	0,45 0,55 0,94 0,97	0,72 µg 0,3 µg	(158)
Asiaticoside	Silica gel 60F ₂₅₄ Acétate d'éthyle-MeOH-H ₂ O (100:25:10, v/v/v) Anisaldéhyde sulfurique, 100°C ; 600 nm		0,317, 1,05 µg	(159)
Asiaticoside, madécassoside	Silica gel 60F ₂₅₄ Butanol-acétate d'éthyle-H ₂ O (4:1:5, v/v/v) Sulfate cérique, 110°C, 570 nm	0,34 0,42	0,096 µg 0,773 µg	(160)
asiaticoside	Toluène-acétone-MeOH-acide formique (3:2:2:0.05, v/v/v/v) 10% acide sulfurique dans MeOH, 530 nm	0,26		(161)
Asiaticoside, madécassoside, acide asiatique	Acétate d'éthyle-MeOH-H ₂ O (8:2:1, v/v/v). Pas de révélation, UV 365 nm	0,35 0,45 0,59	Non définie	(162)
Asiaticoside, madécassoside, acide asiatique, acide madécassique	Silica gel 60F ₂₅₄ Acétate d'éthyle-MeOH (60:40, v/v) Anisaldéhyde sulfurique ; 100-105°C, lumière visible	0,37 0,35 0,90 0,80	Non définie	(163)
Asiaticoside	Silica gel 60F ₂₅₄ Acétate d'éthyle-MeOH-H ₂ O (60:12:8, v/v/v) Vanilline-acide sulfurique, 110°C, 620 nm	0,52	Non définie	(164)

La séparation par CCMHP des triterpènes de *C. asiatica* est réalisée sur des plaques de silice normales dans tous les cas. Une dérivation est nécessaire pour pouvoir effectuer la quantification car les triterpènes absorbent peu aux UV, uniquement à une faible longueur d'onde. Habituellement, les plaques sont révélées à l'anisaldéhyde sulfurique puis chauffées au four pendant 5 à 10 minutes à 100°C ; les bandes correspondantes aux triterpènes sont colorées en vert ou bleu violacé. Les plaques sont ensuite scannées à des longueurs d'onde comprises entre 530 et 620 nm pour la quantification (Table 4).

Souvent, plusieurs triterpènes sont présents dans un extrait avec un comportement chromatographique presque identique, d'où la difficulté de leur séparation sur une même plaque. La plupart de ces études ne permettent ou ne décrivent que la quantification de certains triterpènes : l'asiaticoside seul (161), l'asiaticoside et le madécassoside (160) ou les osides et l'acide asiatique (162). Seules deux études décrivent la séparation des 4 composés d'intérêt : Bonfill *et al.* (163) et récemment, Jacinda *et al.* (158). Les R_f des triterpènes sont respectivement de 0,45, 0,55, 0,94, 0,97, ce qui indique pour ce dernier spot une migration trop proche du front de solvant, ce qui pourrait éventuellement entraîner une erreur de dosage.

Bibliographie

- (1) Schatz, G. E. *Flore générique des arbres de Madagascars*; Illustrée.; Royal Botanical Gardens, Kew & Missouri Botanical Garden, 2001.
- (2) Pernet, R.; Meyer, G. *Pharmacopée de Madagascar*; Institut de recherche scientifique, 1657.
- (3) Zafera Rabesa, A. *Pharmacopée de l'Alaotra*; Antananarivo, 1986.
- (4) Rakotobe, E. A.; Rasolomanana, C. J. .; Randrianasolo, S. S. *Pharmacopée de l'Ambongo et du Boina*; CIDST.; Antananarivo, 1993.
- (5) Ministère de la Santé et du PLanning Familial, SPMT *Vers une Pharmacopée malagasy: monographie d'usage*; Antananarivo, 2009.
- (6) Debrus, B. Nouvelle méthodologie pour le développement de méthodes chromatographiques, Ulg, 2011.
- (7) Imre, M. Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software. *Journal of Chromatography A* **2002**, 965, 175–194.
- (8) Debrus, B.; Lebrun, P.; Kindenge, J. M.; Lecomte, F.; Ceccato, A.; Caliaro, G.; Mbay, J. M. T.; Boulanger, B.; Marini, R. D.; Rozet, E.; Hubert, P. Innovative high-performance liquid chromatography method development for the screening of 19 antimalarial drugs based on a generic approach, using design of experiments, independent component analysis and design space. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 5205–5215.
- (9) Zhou, J.; Yu, X.; Ding, C.; Wang, Z.; Zhou, Q.; Pao, H.; Cai, W. Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Journal of Environmental Sciences* **2011**, 23, 22–30.
- (10) Wsól, V.; Fell, A. F. Central composite design as a powerful optimisation technique for enantioresolution of the rac-11-dihydrooracin—the principal metabolite of the potential cytostatic drug oracin. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2002**, 54, 377–390.
- (11) Nechar, M.; Molina, M. F. M.; Rodriguez, L. C.; Sendra, J. M. B. The application of Doehlert designs in the optimization of experimental variables in solid phase spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* **1995**, 316, 185–193.
- (12) Ray, S.; Lalman, J. A. Using the Box–Benkhen design (BBD) to minimize the diameter of electrospun titanium dioxide nanofibers. *Chemical Engineering Journal* **2011**, 169, 116–125.
- (13) Mannarswamy, A.; Munson-McGee, S. H.; Steiner, R.; Andersen, P. K. D-optimal experimental designs for Freundlich and Langmuir adsorption isotherms. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2009**, 97, 146–151.
- (14) Das, R. N.; Lin, D. K. J. On D-optimal robust designs for lifetime improvement experiments. *Journal of Statistical Planning and Inference* **2011**, 141, 3753–3759.
- (15) Karaman, S.; Yilmaz, M. T.; Kayacier, A. Simplex lattice mixture design approach on the rheological behavior of glucomannan based salep-honey drink mixtures: An optimization study based on the sensory properties. *Food Hydrocolloids* **2011**, 25, 1319–1326.
- (16) Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Thelin, B.; Nyström, Å.; Pettersen, J.; Bergman, R. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1998**, 42, 3–40.
- (17) ICH Pharmaceutical development Q8 (R2) **2009**.
- (18) *Pharmacopée européenne*; 4è éd.; 2002.
- (19) Lebrun, P.; Govaerts, B.; Debrus, B.; Ceccato, A.; Caliaro, G.; Hubert, P.; Boulanger, B. Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2008**, 91, 4–16.

- (20) Blume, H.; Brendel, E.; Brudny-Klöppel, M.; Grebe, S.; Lausecker, B.; Rohde, G.; Siethoff, C. Workshop/conference report on EMA draft guideline on validation of bioanalytical methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, *42*, 300–305.
- (21) ICH Q2 (R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and methodology*; 2005.
- (22) Food and Drug Administration, International Conference on Harmonization Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology. *Federal Register* **1997**, *62*, 27463–27467.
- (23) Food and Drug Administration, International Conference on Harmonization Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology. *Federal Register* **1995**, *60*, 11260–11262.
- (24) Food and Drug Administration, Guidance for Industry Bioanalytical Methods Validation for Human Studies, Draft guidance. US Department of Health and Human Services. **1998**.
- (25) EURACHEM The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. *1st Edition* **1998**.
- (26) International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835–855.
- (27) Association of Official Analytical Chemists (AOAC) *Official Methods of Analysis*; AOAC; 15^e éd.; Arlington, VA, 1990; Vol. 1.
- (28) EMEA, Committee for medicinal products for human use (CHMP) Guideline on bioanalytical method validation. **2009**.
- (29) Rozet, E.; Ceccato, A.; Hubert, C.; Ziemons, E.; Oprean, R.; Rudaz, S.; Boulanger, B.; Hubert, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1158*, 111–125.
- (30) Commission SFSTP, P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat Validation des procédures analytiques quantitatives: harmonisation des démarches Partie II - Statistiques. *STP PHARMA PRATIQUES* **2006**, *16*.
- (31) Commission SFSTP, P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat Validation des procédures analytiques quantitatives: harmonisation des démarches Partie III - Exemples d'application. *STP PHARMA PRATIQUES* **2006**, *16*.
- (32) Commission SFSTP, P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat Validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches. *STP PHARMA PRATIQUES* **2003**, *13*, 101–138.
- (33) *Pharmacopée Européenne*; 2^e éd.; 2002.
- (34) Rozet, E.; Marini, R. D.; Ziemons, E.; Boulanger, B.; Hubert, P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *55*, 848–858.
- (35) Mee, M. R. Beta-expectation and beta-content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model. *Technometrics* **1984**, *26*, 251–254.
- (36) Bland, J. M.; Altman, D. G. Agreed Statistics: Measurement Method Comparison. *Anesthesiology* **2012**, *116*, 182–185.
- (37) Bland, J. M.; Altman, D. G. Agreement between methods of measurement with multiple observations per individual. *Journal of Biopharmaceutical Statistics* **2007**, *17*, 571–582.
- (38) Bland, J. M.; Altman, D. G. Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research* **1999**, *8*, 135–160.
- (39) Hanneman, S. K. Design, analysis, and interpretation of method-comparison studies. *AACN Advanced Critical Care* **2008**, *19*, 223–234.
- (40) Vincken, J.-P.; Heng, L.; de Groot, A.; Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 275–297.

- (41) Bruneton, J. *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales*; Lavoisier; 4^e éd.; Tec & Doc: 11, rue Lavoisier 75008 Paris, 2009.
- (42) Nyberg, N. T.; Kenne, L.; Rönnberg, B.; Sundquist, B. G. Separation and structural analysis of some saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydrate Research* **2000**, 323, 87–97.
- (43) Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, 94, 219–243.
- (44) Tachibana, K.; Sakaitanai, M.; Nakanishi, K. Pavoninins: Shark-Repelling Ichthyotoxins from the Defense Secretion of the Pacific Sole. *Science* **1984**, 226, 703–705.
- (45) Bordbar, S.; Anwar, F.; Saari, N. High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods. A Review *Mainer Drugs* **2011**, 9, 1761–1805.
- (46) Man, S.; Gao, W.; Zhang, Y.; Huang, L.; Liu, C. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* **2010**, 81, 703–714.
- (47) Lacaille-Dubois, M. A.; Wagner, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* **1996**, 2, 363–386.
- (48) Lacaille-Dubois, M. A.; Wagner, H. Bioactive saponins from plants: An update. Dans *Bioactive Natural Products (Part B)*; Elsevier, 2000; Vol. Volume 21, Part B, p. 633–687.
- (49) Rao, A. V.; Gurfinkel, D. M. The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug Metabolism and Drug Interactions* **2000**, 17, 211–235.
- (50) Bruneton, J. *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales*; Tec & Doc Lavoisier, 2009.
- (51) Oleszek, W.A.; Bialy, Z. Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002–2005). *Journal of Chromatography A* **2006**, 1112, 78–91.
- (52) Oleszek, W.A. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A* **2002**, 967, 147–162.
- (53) European Pharmacopoeia **2011**.
- (54) Wagner, H.; Bladt, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*; Springer, 1996.
- (55) Iwagami, S.; Sawabe, Y.; Nakagawa, T. Micellar electrokinetic chromatography for the analysis of crude drugs (III). Separation of ginsenosides in *Ginseng Radix*. *Japanese Journal of Pharmacognosy* **1992**, 46, 339–347.
- (56) Oleszek, W.; Marston, A. *Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants*; Springer, 2000.
- (57) Liu, J.; Guo, B.; Huang, W.; Xiao, P.; Song, H.; Wang, C. Determination of saponins in *Dipsaci Radix* by HILIC-HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2011**, 36, 2367–2371.
- (58) light scattering detector.
- (59) Skoog, D. A.; Holler, J. F.; Nieman, T. A. *Principes d'analyse instrumentale*; 1^{ère} éd.; de boeck, 2003.
- (60) Kohler, M.; Haerdi, W.; Christen, P.; Veuthey, J.-L. The evaporative light scattering detector: some applications in pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1997**, 16, 475–484.
- (61) Man, S.; Gao, W.; Zhang, Y.; Wang, J.; Zhao, W.; Huang, L.; Liu, C. Qualitative and quantitative determination of major saponins in *Paris* and *Trillium* by HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2010**, 878, 2943–2948.
- (62) Wan, J.-B.; Li, P.; Li, S.; Wang, Y.; Dong, T. T.-X.; Tsim, K. W.-K. Simultaneous determination of 11 saponins in *Panax notoginseng* using HPLC-ELSD and pressurized liquid extraction. *Journal of Separation Science* **2006**, 29, 2190–2196.
- (63) Détection d'aérosols chargés Corona (CAD) d'ESA. Présentation de CAD.
- (64) Eom, H. Y.; Park, S.-Y.; Kim, M. K.; Suh, J. H.; Yeom, H.; Min, J. W.; Kim, U.; Lee, J.; Youm, J.-R.; Han, S. B. Comparison between evaporative light scattering detection and charged aerosol detection for the analysis of saikosaponins. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 4347–4354.

- (65) WHO Monographs on selected medicinal plants. 1999; Vol. 1.
- (66) Alorge, L. *Plantes médicinales de Madagascar*.
- (67) www.globalspecies.org .
- (68) Ministère des Finances et du Budget -Madagascar 2008 .
- (69) www.instat.mg .
- (70) Chong, N.; Aziz, Z. A systematic review on the chemical constituents of *Centella asiatica*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **2011**, 2, 445–459.
- (71) Bontems, J. E. A new heteroside, asiaticoside, isolated from *Hydrocotyle asiatica* L. (Umbelliferae). *Bulletin of Science Pharmacology* **1941**, 49, 186–191.
- (72) Pinhas, H.; Bondiou, J. C. Chemical constitution of the glycosyl part of madecassoside. *Bulletin de la Société Chimique de France* **1967**, 6, 1888–90.
- (73) Dutta T. Terpenoids. V. Isolation and identification of asiatic acid from *Centella asiatica*. *Indian Journal of Chemistry* **1967**, 5, 586–587.
- (74) Boiteau P.; Chanez M. Isolation of madecassic acid, a new triterpene acid from Madagascar *Centella asiatica*. *Sciences Naturelles* **264**, 407–410.
- (75) Sahu, N. P.; Roy, S. K.; Mahato, S. B. Spectroscopic determination of structures of triterpenoid trisaccharides from *Centella asiatica*. *Phytochemistry* **1989**, 28, 2852–2854.
- (76) Jiang, Z.; Zhang, X.; Zhou, J.; Chen, J. New Triterpenoid Glycosides from *Centella asiatica*. *Helvetica Chimica Acta* **2005**, 88, 297–303.
- (77) Food0952pw_ch.
- (78) Jamil, S. S.; Nizami, Q.; Salam, M. *Centella asiatica* (Linn.) Urban A Review. *Natural Product Radiance* **2007**, 6, 158–170.
- (79) Oyedeji, O. A.; Afolayan, A. J. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Centella asiatica*. Growing in South Africa. *Pharmaceutical Biology* **2005**, 43, 249–252.
- (80) Cheng, C. L.; Guo, J. S.; Luk, J.; Koo, M. W. L. The healing effects of *Centella* extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats. *Life Sciences* **2004**, 74, 2237–2249.
- (81) Kim, Y. J.; Cha, H. J.; Nam, K. H.; Yoon, Y.; Lee, H.; An, S. *Centella asiatica* extracts modulate hydrogen peroxide-induced senescence in human dermal fibroblasts. *Experimental Dermatology* **2011**, 20, 998–1003.
- (82) Ruszymah, B. H. I.; Chowdhury, S. R.; Manan, N. A. B. A.; Fong, O. S.; Adenan, M. I.; Saim, A. B. Aqueous extract of *Centella asiatica* promotes corneal epithelium wound healing *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*.
- (83) Hamid, A. A.; Shah, Z. M.; Muse, R.; Mohamed, S. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. *Food Chemistry* **2002**, 77, 465–469.
- (84) Shinomol, G. K.; Muralidhara Effect of *Centella asiatica* leaf powder on oxidative markers in brain regions of prepubertal mice *in vivo* and its *in vitro* efficacy to ameliorate 3-NPA-induced oxidative stress in mitochondria. *Phytomedicine* **2008**.
- (85) Veerendra Kumar, M. H.; Gupta, Y. K. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, 79, 253–260.
- (86) Subathra, M.; Shila, S.; Devi, M. A.; Panneerselvam, C. Emerging role of *Centella asiatica* in improving age-related neurological antioxidant status. *Experimental Gerontology* **40**, 707–715.
- (87) Hussin, M.; Abdul-Hamid, A.; Mohamad, S.; Saari, N.; Ismail, M.; Bejo, M. H. Protective effect of *Centella asiatica* extract and powder on oxidative stress in rats. *Food Chemistry* **2007**, 100, 535–541.

- (88) Gnanapragasam, A.; Ebenezar, K. K.; Sathish, V.; Govindaraju, P.; Devaki, T. Protective effect of *Centella asiatica* on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. *Life Sciences* **2004**, *76*, 585–597.
- (89) Sainath, S. B.; Meena, R.; Supriya, C.; Reddy, K. P.; Reddy, P. S. Protective role of *Centella asiatica* on lead-induced oxidative stress and suppressed reproductive health in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2011**, *32*, 146–154.
- (90) Hashim, P.; Sidek, H.; Helan, M. H. M.; Sabery, A.; Palanisamy, U. D.; Ilham, M. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules* **2011**, *16*, 1310–1322.
- (91) Yoshida, M.; Fuchigami, M.; Nagao, T.; Okabe, H.; Matsunaga, K.; Takata, J.; Karube, Y.; Tsuchihashi, R.; Kinjo, J.; Mihashi, K.; Fujioka, T. Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2005**, *28*, 173–175.
- (92) Incandela, L.; Cesarone, M. R.; Cacchio, M.; De Sanctis, M. T.; Santavenere, C.; D'Auro, M. G.; Bucci, M.; Belcaro, G. Total triterpenic fraction of *Centella asiatica* in chronic venous insufficiency and in high-perfusion microangiopathy. *Angiology* **2001**, *52 Suppl 2*, S9–13.
- (93) Visweswari, G.; Prasad, K. S.; Chetan, P. S.; Lokanatha, V.; Rajendra, W. Evaluation of the anticonvulsant effect of *Centella asiatica* (gotu kola) in pentylenetetrazol-induced seizures with respect to cholinergic neurotransmission. *Epilepsy and Behavior* **2010**, *17*, 332–335.
- (94) Kwon, M. C.; Choi, W. Y.; Seo, Y. C.; Kim, J. S.; Yoon, C. S.; Lim, H. W.; Kim, H. S.; Ahn, J. hee; Lee, H. Y. Enhancement of the Skin-Protective Activities of *Centella asiatica* L. Urban by a Nano-encapsulation Process. *Journal of Biotechnology* **2012**, *157*, 100–106.
- (95) Yunianto, I.; Das, S.; Mat Noor, M. Antispermato-genic and antifertility effect of Pegaga (*Centella asiatica* L) on the testis of male Sprague-Dawley rats. *La Clinica Terapeutica* **2010**, *161*, 235–239.
- (96) Coldren, C. D.; Hashim, P.; Ali, J. M.; Oh, S.-K.; Sinskey, A. J.; Rha, C. Gene expression changes in the human fibroblast induced by *Centella asiatica* triterpenoids. *Planta Medica* **2003**, *69*, 725–732.
- (97) Lee, J.; Jung, E.; Kim, Y.; Park, J.; Park, J.; Hong, S.; Kim, J.; Hyun, C.; Kim, Y. S.; Park, D. Asiaticoside induces human collagen I synthesis through TGFbeta receptor I kinase (TbetaRI kinase)-independent Smad signaling. *Planta Medica* **2006**, *72*, 324–328.
- (98) Lu, L.; Ying, K.; Wei, S.; Fang, Y.; Liu, Y.; Lin, H.; Ma, L.; Mao, Y. Asiaticoside induction for cell-cycle progression, proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. *International Journal of Dermatology* **2004**, *43*, 801–807.
- (99) Hashim, P.; Sidek, H.; Helan, M. H. M.; Sabery, A.; Palanisamy, U. D.; Ilham, M. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules* **2011**, *16*, 1310–1322.
- (100) Thiers, H.; Fayolle, J.; Boiteau, P.; Ratsimamanga, A. R. [Asiaticoside; active constituent of *Centella asiatica*, initiating agent of the new growth in the early stage of cicatrization of skin ulcers]. *Lyon Médicale* **1957**, *89*, 389–395.
- (101) Kimura, Y.; Sumiyoshi, M.; Samukawa, K.; Satake, N.; Sakanaka, M. Facilitating action of asiaticoside at low doses on burn wound repair and its mechanism. *European Journal of Pharmacology* **2008**, *584*, 415–423.
- (102) Shukla, A.; Rasik, A. M.; Jain, G. K.; Shankar, R.; Kulshrestha, D. K.; Dhawan, B. N. *In vitro* and *in vivo* wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology* **1999**, *65*, 1–11.
- (103) Tang, B.; Zhu, B.; Liang, Y.; Bi, L.; Hu, Z.; Chen, B.; Zhang, K.; Zhu, J. Asiaticoside suppresses collagen expression and TGF-β/Smad signaling through inducing Smad7 and inhibiting TGF-βRI and TGF-βRII in keloid fibroblasts. *Archives of Dermatological Research* **2011**, *303*, 563–572.
- (104) Asiaticoside in Leprosy. *The Lancet* **1948**, *252*, 697.

- (105) Anne, M. The effect of asiaticoside on pig skin in organ culture. *European Journal of Pharmacology* **1968**, *4*, 331–339.
- (106) J.C., L. The morphological and pharmacological effects of asiaticoside upon skin *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Pharmacology* **1967**, *1*, 414–424.
- (107) Sikareepaisan, P.; Ruktanonchai, U.; Supaphol, P. Preparation and characterization of asiaticoside-loaded alginate films and their potential for use as effectual wound dressings. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *83*, 1457–1469.
- (108) Liu, M.; Dai, Y.; Yao, X.; Li, Y.; Luo, Y.; Xia, Y.; Gong, Z. Anti-rheumatoid arthritic effect of madecassoside on type II collagen-induced arthritis in mice. *International Immunopharmacology* **2008**, *8*, 1561–1566.
- (109) Li, H.; Gong, X.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Luo, F.; Zhou, Q.; Chen, J.; Wan, J. Madecassoside attenuates inflammatory response on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 538–546.
- (110) Liu, M.; Dai, Y.; Li, Y.; Luo, Y.; Huang, F.; Gong, Z.; Meng, Q. Madecassoside isolated from *Centella asiatica* herbs facilitates burn wound healing in mice. *Planta Medica* **2008**, *74*, 809–815.
- (111) Li, H.; Gong, X.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Luo, F.; Zhou, Q.; Chen, J.; Wan, J. Madecassoside attenuates inflammatory response on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 538–546.
- (112) Cao, W.; Li, X.-Q.; Zhang, X.-N.; Hou, Y.; Zeng, A.-G.; Xie, Y.; Wang, S.-W. Madecassoside suppresses LPS-induced TNF- α production in cardiomyocytes through inhibition of ERK, p38, and NF- κ B activity. *International Immunopharmacology* **2010**, *10*, 723–729.
- (113) Nasir, M. N.; Habsah, M.; Zamzuri, I.; Rammes, G.; Hasnan, J.; Abdullah, J. Effects of asiatic acid on passive and active avoidance task in male Sprague–Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *134*, 203–209.
- (114) Boopathy, R.; Chitra, L.; Srilakshmi Prabha, N.; Babu, S. A. Effect of asiatic acid on hippocampal cell line: A novel inhibitor of acetylcholinesterase from *Centella asiatica*. *Alzheimer's and Dementia* **2009**, *5*, P328–P329.
- (115) Yun, K.-J.; Kim, J.-Y.; Kim, J.-B.; Lee, K.-W.; Jeong, S.-Y.; Park, H.-J.; Jung, H.-J.; Cho, Y.-W.; Yun, K.; Lee, K.-T. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *International Immunopharmacology* **2008**, *8*, 431–441.
- (116) Zhang, X.; Wu, J.; Dou, Y.; Xia, B.; Rong, W.; Rimbach, G.; Lou, Y. Asiatic acid protects primary neurons against C2-ceramide-induced apoptosis. *European Journal of Pharmacology* **2012**.
- (117) Krishnamurthy, R. G.; Senut, M.-C.; Zemke, D.; Min, J.; Frenkel, M. B.; Greenberg, E. J.; Yu, S.-W.; Ahn, N.; Goudreau, J.; Kassab, M.; Panickar, K. S.; Majid, A. Asiatic Acid, a Pentacyclic Triterpene From *Centella asiatica*, Is Neuroprotective in a Mouse Model of Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Neuroscience Research* **2009**, *87*, 2541–2550.
- (118) Boopathy, R.; Chitra, L.; Srilakshmi Prabha, N.; Babu, S. A. Effect of asiatic acid on hippocampal cell line: A novel inhibitor of acetylcholinesterase from *Centella asiatica*. *Alzheimer's and Dementia* **2009**, *5*, P328–P329.
- (119) Jew, S.; Yoo, C.; Lim, D.; Kim, H.; Mook-Jung, I.; Whan Jung, M.; Choi, H.; Jung, Y.; Kim, H.; Park, H. Structure–activity relationship study of asiatic acid derivatives against beta amyloid (A β)-induced neurotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, *10*, 119–121.
- (120) Qinna, N.; Taha, H.; Matalka, K. Z.; Badwan, A. A. A new herbal combination, Etana, for enhancing erectile function: an efficacy and safety study in animals. *International Journal of Impotence Research* **2009**, *21*, 315–320.

- (121) Tang, X.-L.; Yang, X.-Y.; Jung, H.-J.; Kim, S.-Y.; Jung, S.-Y.; Choi, D.-Y.; Park, W.-C.; Park, H. Asiatic Acid Induces Colon Cancer Cell Growth Inhibition and Apoptosis through Mitochondrial Death Cascade. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2009**, 32, 1399–1405.
- (122) Park, B. C.; Bosire, K. O.; Lee, E.-S.; Lee, Y. S.; Kim, J.-A. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Cancer Letters* **2005**, 218, 81–90.
- (123) Won, J.-H.; Shin, J.-S.; Park, H.-J.; Jung, H.-J.; Koh, D.-J.; Jo, B.-G.; Lee, J.-Y.; Yun, K.; Lee, K.-T. Anti-inflammatory Effects of Madecassic Acid via the Suppression of NF- κ B Pathway in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophage Cells. *Planta Medica* **2009**, 76, 251–257.
- (124) Boiteau, P.; Allorge-Boiteau, L. *Plantes médicinales de Madagascar: cinquante-huit plantes médicinales utilisées sur le marché de Tananarive (Zoma) à Madagascar*; KARTHALA Editions, 1993.
- (125) Paocharoen, V. The efficacy and side effects of oral *Centella asiatica* extract for wound healing promotion in diabetic wound patients. *Journal of the Medical Association of Thailand* **2010**, 93 Suppl 7, S166–170.
- (126) Haftek, M.; Mac - Mary, S.; Bitoux, M. L.; Creidi, P.; Seité, S.; Rougier, A.; Humbert, P. Clinical, biometric and structural evaluation of the long - term effects of a topical treatment with ascorbic acid and madecassoside in photoaged human skin. *Experimental Dermatology* **2008**, 17, 946–952.
- (127) Ahshawat, M. S.; Saraf, S.; Saraf, S. Preparation and characterization of herbal creams for improvement of skin viscoelastic properties. *International Journal of Cosmetic Science* **2008**, 30, 183–193.
- (128) Martelli, L.; Berardesca, E.; Martelli, M. Topical formulation of a new plant extract complex with refirming properties. Clinical and non-invasive evaluation in a double-blind trial. *International Journal of Cosmetic Science* **2000**, 22, 201–206.
- (129) Klöve Korn, W.; Tepe, A.; Danesch, U. A randomized, double-blind, vehicle-controlled, half-side comparison with a herbal ointment containing *Mahonia aquifolium*, *Viola tricolor* and *Centella asiatica* for the treatment of mild-to-moderate atopic dermatitis. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2007**, 45, 583–591.
- (130) Gomes, J.; Pereira, T.; Vilarinho, C.; Duarte, M. da L.; Brito, C. Contact dermatitis due to *Centella asiatica*. *Contact Dermatitis* **2010**, 62, 54–55.
- (131) Mato, L.; Wattanathorn, J.; Muchimapura, S.; Tongun, T.; Piyawatkul, N.; Yimtae, K.; Thanawirattananit, P.; Sripanidkulchai, B. *Centella asiatica* improves Physical Performance and Health-Related Quality of Life in Healthy Elderly Volunteer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2011**, 2011.
- (132) Jana, U.; Sur, T. K.; Maity, L. N.; Debnath, P. K.; Bhattacharyya, D. A clinical study on the management of generalized anxiety disorder with *Centella asiatica*. *Nepal Medical College Journal* **2010**, 12, 8–11.
- (133) Katz, M.; Adar Levine, A.; Kol-Degani, H.; Kav-Venaki, L. A Compound Herbal Preparation (CHP) in the Treatment of Children With ADHD: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Attention Disorders* **2010**, 14, 281–291.
- (134) Wattanathorn, J.; Mator, L.; Muchimapura, S.; Tongun, T.; Pasuriwong, O.; Piyawatkul, N.; Yimtae, K.; Sripanidkulchai, B.; Singkhoraard, J. Positive modulation of cognition and mood in the healthy elderly volunteer following the administration of *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, 116, 325–332.
- (135) Gupta, G. D.; Sujatha, N.; Dhanik, A.; Rai, N. P. Clinical Evaluation of Shilajatu Rasayana in patients with HIV Infection. *Ayu* **2010**, 31, 28–32.
- (136) Pointel, J. P.; Boccalon, H.; Cloarec, M.; Ledevéhat, C.; Joubert, M. Titrated extract of *Centella asiatica* (TECA) in the treatment of venous insufficiency of the lower limbs. *Angiology* **1987**, 38, 46–50.

- (137) Chiummariello, S.; De Gado, F.; Monarca, C.; Ruggiero, M.; Carlesimo, B.; Scuderi, N.; Alfano, C. [Multicentric study on a topical compound with lymph-draining action in the treatment of the phlebostatic ulcer of the inferior limbs]. *Il Giornale di chirurgia* **2009**, *30*, 497–501.
- (138) Huriez, C. [Action of the titrated extract of *Centella asiatica* in the cicatrization of leg ulcers (10 mg. tablets). Apropos of 50 cases]. *Lille Medical* **1971**, *17*, Suppl 3:574–579.
- (139) Darnis, F.; Orcel, L.; de Saint-Maur, P. P.; Mamou, P. [Use of a titrated extract of *Centella asiatica* in chronic hepatic disorders (author's transl)]. *Seminaires des Hôpitaux Thérapeutiques* **1979**, *55*, 1749–1750.
- (140) *Centella* Phytosome: improved action in vein and skin disorders. *Fitoterapia* **2005**, *76*, III.
- (141) Mukherjee, P. K.; Maity, N.; Nema, N. K.; Sarkar, B. K. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine*.
- (142) Randriamampionona, D.; Diallo, B.; Rakotoniriana, F.; Rabemanantsoa, C.; Cheuk, K.; Corbisier, A.-M.; Mahillon, J.; Ratsimamanga, S.; El Jaziri, M. Comparative analysis of active constituents in *Centella asiatica* samples from Madagascar: Application for ex situ conservation and clonal propagation. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 482–489.
- (143) Rouillard-Guellec, F.; Robin, J.-R.; Rakoto-Ratsimamanga, A.; Ratsimamanga, S.; Rasoanaivo, P. Etude comparative de *Centella asiatica* d'origine malgache et d'origine indienne. Comparative study of *Centella asiatica* of Madagascar origin and Indian origin. *Acta botanica gallica* **1997**, *144*, 381–508.
- (144) Han, W.-J.; Xia, Y.-F.; Dai, Y. Development and validation of high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for assay of madecassoside in rat plasma and its application to pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography: BMC* **2011**.
- (145) Kwon, H.-J.; Park, J.-H.; Kim, G.-T.; Park, Y.-D. Determination of madecassoside and asiaticoside contents of *C. asiatica* leaf and *C. asiatica*-containing ointment and dentifrice by HPLC-coupled pulsed amperometric detection. *Microchemical Journal* **2011**, *98*, 115–120.
- (146) Tiwari, R. K.; Chanda, S.; Deepak, M.; Murli, B.; Agarwal, A. HPLC method validation for simultaneous estimation of madecassoside, asiaticoside and asiatic acid in *Centella asiatica*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2010**, *2*, 223–229.
- (147) Devkota, A.; Dall'Acqua, S.; Comai, S.; Innocenti, G.; Jha, P. K. *Centella asiatica* (L.) Urban from Nepal: Quali-quantitative analysis of samples from several sites, and selection of high terpene containing populations for cultivation. *Biochemical Systematics and Ecology* **2010**, *38*, 12–22.
- (148) Zheng, X.-C.; Wang, S.-H. Determination of asiatic acid in beagle dog plasma after oral administration of *Centella asiatica* extract by precolumn derivatization RP-HPLC. *Journal of Chromatography B* **2009**, *877*, 477–481.
- (149) Zhang, F.; Wei, Y.; Zhu, J.; Gong, Z. Simultaneous quantitation of three major triterpenoid glycosides in *Centella asiatica* extracts by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Biomedical Chromatography* **2008**, *22*, 119–124.
- (150) James, J. T.; Meyer, R.; Dubery, I. A. Characterisation of two phenotypes of *Centella asiatica* in Southern Africa through the composition of four triterpenoids in callus, cell suspensions and leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **2008**, *94*, 91–99.
- (151) PAN, J.; KAI, G.; YUAN, C.; ZHOU, B.; JIN, R.; YUAN, Y. Separation and Determination of Madecassic Acid in Extracts of *Centella asiatica* Using High Performance Liquid Chromatography with β -Cyclodextrin as Mobile Phase Additive. *Chinese Journal of Chromatography* **2007**, *25*, 316–318.
- (152) Guiqing Kai, Chuanxun Yuan, and Yuan Yuan; Jian Pan Separation of Madecassoside and Madecassic Acid Isomers by High Performance Liquid Chromatography Using β -Cyclodextrin as Mobile Phase Additive. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2008**, *29*.

- (153) Schaneberg, B. T.; Mikell, J. R.; Bedir, E.; Khan, I. A. An improved HPLC method for quantitative determination of six triterpenes in *Centella asiatica* extracts and commercial products. *Pharmazie* **2003**, *58*, 381–384.
- (154) Verma, R. K.; Bhartariya, K. G.; Gupta, M. M.; Sushil Kumar Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography of Asiaticoside in *Centella asiatica*. *Phytochemical Analysis* **1999**, *10*, 191–193.
- (155) Günther, B.; Wagner, H. Quantitative determination of triterpenes in extracts and phytopreparations of *Centella asiatica* (L.) urban. *Phytomedicine* **1996**, *3*, 59–65.
- (156) Inamdar, P. K.; Yeole, R. D.; Ghogare, A. B.; de Souza, N. J. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *Journal of Chromatography A* **1996**, *742*, 127–130.
- (157) www.edqm.eu *European Pharmacopoeia*; 6th ed.; 2008.
- (158) Jacinda, J.; Ian, D. Identification and Quantification of Triterpenoid Centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by Densitometric TLC. *Journal of Planar Chromatography* **2011**, *24*, 82–87.
- (159) Ganse, H.; Gbaguidi, F.; Agbani, P. O.; Josse, R. G.; Moudachirou, M.; Sinsin, B. A.; Quetin-Leclercq, J.; Aminou, T. Densitometric HPTLC quantification of asiaticoside isolated from *Centella asiatica* (L.) Urb (Apiaceae) of Benin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **2011**, *4*.
- (160) Thomas, M. T.; Kurup, R.; Johnson, A. J.; Chandrika, S. P.; Mathew, P. J.; Dan, M.; Baby, S. Elite genotypes/chemotypes, with high contents of madecassoside and asiaticoside, from sixty accessions of *Centella asiatica* of south India and the Andaman Islands: For cultivation and utility in cosmetic and herbal drug applications. *Industrial Crops and Products* **2010**, *32*, 545–550.
- (161) Sathiyarayanan, L.; Paradkar, A. R.; Mahadik, K. R. Development and validation of a densitometric HPTLC method for simultaneous analysis of wedelolactone and asiaticoside in a polyherbal formulation. *Acta Chromatographica* **2010**, *22*, 651–663.
- (162) Zainol, N. A.; Voo, S. C.; Sarmidi, M. R.; Aziz, R. A. Profiling of *Centella asiatica* (L.) Urban extract. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* **2008**, *12*, 322–327.
- (163) Bonfill, M.; Mangas, S.; Cusidó, R. M.; Osuna, L.; Piñol, M. T.; Palazón, J. Identification of triterpenoid compounds of *Centella asiatica* by thin - layer chromatography and mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* **2006**, *20*, 151–153.
- (164) Gupta, A. P.; Gupta, M. M.; Kumar, S. High performance thin layer chromatography of asiaticoside in *Centella asiatica*. *Journal of the Indian Chemical Society* **76**, 321–322.
- (165) Watson, L.; Dallwitz, M. J. The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. **2000**.
- (166) Barbosa-Filho, J.; Vasconcelos Leitão da-Cunha, E.; Gray, A. I. Alkaloids of the menispermaceae. Dans *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Academic Press, 2000; Vol. Volume 54, p. 1–190.
- (167) www.uj.ac.za .
- (168) Tropicos | Name - *Spirospermum penduliflorum* DC.
- (169) Schmelzer, G. H.; Gurib-Fakim, A. *Plantes médicinales 1*; PROTA, 2008.
- (170) Rasoanaivo, P.; Ratsimamanga-Urverg, S.; Rakoto-Ratsimamanga, A. Isoquinoline alkaloid constituents of *Spirospermum penduliflorum* and *Strychnopsis thouarsii* (Menispermaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **1995**, *23*, 679–680.
- (171) Ratsimamanga-Urverg, S.; Rasoanaivo, P.; Ramiamanana, L.; Milijaona, R.; Rafatro, H.; Verdier, F.; Rakoto-Ratsimamanga, A.; Le Bras, J. *In vitro* antimalarial activity and chloroquine potentiating action of two bisbenzylisoquinoline enantiomer alkaloids isolated from *Strychnopsis thouarsii* and *Spirospermum penduliflorum*. *Planta Medica* **1992**, *58*, 540–543.

- (172) Frappier, F.; Jossang, A.; Soudon, J.; Calvo, F.; Rasoanaivo, P.; Ratsimamanga-Urverg, S.; Saez, J.; Schrevel, J.; Grellier, P. Bisbenzylisoquinolines as modulators of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* and multidrug resistance in tumor cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1996**, *40*, 1476–1481.
- (173) Schlitter, E.; Weber, N. Isolation of columbin and palmatine from *Spirospermum penduliflorum*. *Lloydia* **1972**, *35*, 181–182.

Chapitre 1

**Isolation and identification of vasorelaxant
molecules from leaves of *Spirospermum
penduliflorum* Thouars (Menispermaceae)**

Spirospermum penduliflorum Thouars is an endemic species of Madagascar growing in the rainforest and used by the local population to treat malaria (roots) and hypertension (leaves). Previous studies confirmed the traditional use of the roots as an adjuvant of chloroquine but we decided to investigate the antihypertensive properties of the plant's leaves as they are very commonly used remedy. Before developing an analytical method to control the quality of this plant, we first sought to verify its activity and identify active molecules. To do so, we analyzed the vasorelaxant activity of crude extracts, isolated and identified active molecules by bioguided fractionations. This work was the result of a collaboration with R. Razafindrazaka, Pr A. Randrianthoa and Dr G. Raoelison from IMRA and Pr N. Morel from UCL.

This chapter is derived from a manuscript submitted for publication.

**Vasorelaxant alkaloids from *Spirospermum penduliflorum* Thouars.
(MENISPERMACEAE) a plant used to treat hypertension in Malagasy traditional
medicine**

G.E. Raelison^a, M. Rafamantanana^{a,d}, R. Razafindrazaka^b, A. Randriantoa^b, S. Urverg-Ratsimamanga^{a,b}, N. Morel^c, J. Quetin-Leclercq^{d,*}

^a*Laboratoire de Phytochimie, Institut Malgache de Recherches Appliquées, BP: 3833, Antananarivo 101 Madagascar*

^b*Laboratoire de Pharmacologie expérimentale, Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA), BP: 3833, Antananarivo 101 Madagascar*

^c*Laboratoire de physiologie, Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain, Av. Hippocrate 55, Bruxelles 1200, Belgium*

^d*Groupe de Recherche en Pharmacognosie, Louvain Drug Research Institute (LDRI), Université catholique de Louvain, Av. Mounier 7230 Bte 7203, 1200 Bruxelles, Belgium.*

1. Introduction

Madagascar is one of the lands where traditional medicine based on the use of plants has an important place in the society. Several plants in Malagasy flora are alleged to possess therapeutic virtues and are largely used by the local population. Numerous of these plants are used without pharmacological or phytochemical data or clinical evaluation. Aiming at promoting the safety and effectiveness of the traditional therapeutic means, a traditional medicine service was created inside the Ministry in charge of the public health. This service is engaged to integrate the traditional medicine as a conventional therapeutic mean in the national health system, to identify and survey the medicinal plants and other traditional practices used by Malagasy population and to edit a national pharmacopoeia. This study contributed to this National Health Policy by investigating plants used for the treatment of hypertension. Among these plants, *Spirospermum penduliflorum* (*S. penduliflorum*) (Menispermaceae) is mentioned to be effective against arterial hypertension. The aim of the present study was to verify the traditional use of the plant and to determine the nature of the active compounds by a bio-guided fractionation approach combining chromatographic methods with vasorelaxant activity tests.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Fresh leaves of *S. penduliflorum* were collected in the East coast of Madagascar (18°51'0"S, 49°7'59"E). Botanical identification was made by the botanist Benja Rakotonirina. A voucher specimen was deposited at the herbarium of the IMRA (n° AML13).

2.2. Chemical compound and apparatus

Dicentrine was purchased from Sequoia Research Products (Pangbourne, UK). Methanol, ethylacetate, dichloromethane and ammonia solution 25% were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Silica gel 60 and silica gel 60F₂₅₄ plates were from Merck (Darmstadt, Germany), Sephadex gel from Pharmacia biotech Healthcare (Diegem, Belgium).

HPLC Shimadzu CLASS-VP system (Japan) consisted of a LC-10ATVP pumps, a DAD detector SPD-10 AVP an automatic injector SIL-10ADVP and a controller system SCL-

10AVP, all piloted by a CLASS-VP software. Separation was performed with reversed-phase C18 LichroCART® column (250 x 4 mm i.d.; particle size: 5 µm) (Merck, Darmstadt, Germany).

2.3. Extraction

The plant material used was in form of finely grounded powder of the dried leaves. Extraction was performed by successive maceration of the plant material (750 g) in increasing polarity solvents namely hexane, dichloromethane, methanol (2.5 l of each and for 24 h) (Fig. 21). The extracts were filtered and dried under reduced pressure.

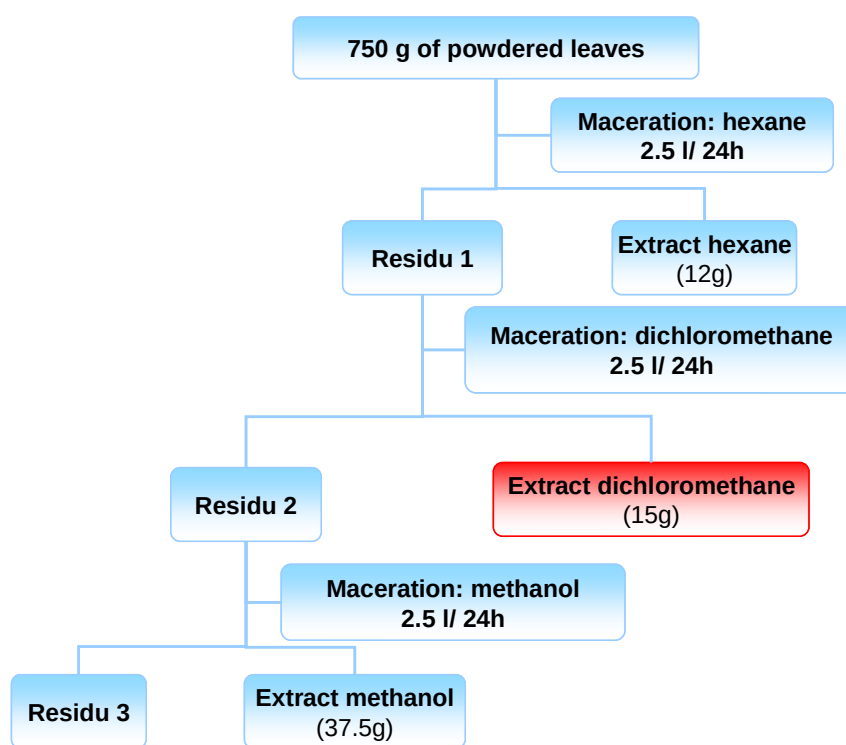


Figure 21: Extraction of leaves of *S. penduliflorum*.

2.4. Pharmacological experiments

Wistar rats of either sex weighing between 200 to 300g were used in the study. Animals were killed; the thoracic aorta was isolated and cut into rings of 2 mm in length. The rings were mounted under a tension of 2g in an organ bath containing physiological solution (mM: NaCl: 122, KCl: 5.9, NaHCO₃: 15, MgCl₂: 1.25, CaCl₂: 1.25, and glucose: 11). The bath solution was maintained at 37°C and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂. Aorta were equilibrated in the

medium for 2 hours and bath solution was changed every 30 minutes. After 1 hour of equilibration, the tension was adjusted to 2g. Phenylephrine (1 μ M) was added to the bath in order to pre-contract the aorta. Cumulative concentrations of the extract dissolved in DMSO/water (90/10, v/v) at 100 μ g/ml were added to the organ bath and the relaxation was evaluated. Concentration-response curves of phenylephrine (from 10^{-9} M to 3×10^{-5} M) were realized in aorta rings without or in the presence of different concentrations of dicentrine (0.1 μ M and 1 μ M), the contraction was then evaluated. Contractions and relaxations were recorded with an Ugobasile 7003 isometric force transducer.

All experiments were performed in accordance with international guidelines and the local ethic committee.

IC₅₀ were determined by the analysis of the sigmoidal curve-fitting of the concentration-response.

2.5. Bioguided fractionation

Figure 22 summarizes the fractionation of the dichloromethane extract. The first fractionation was realised on an open column chromatography (100 x 40 cm) with silica gel 60 (0.063-0.200 mm) as stationary phase and using dichloromethane/methanol (99:1, v/v) as mobile phase. Eight sub-fractions were obtained. Sub-fractions 5 and 6 were passed through a Sephadex Gel LH-20 column (100 x 20 cm). These fractionations led to obtain 5 sub-fractions from 5 (5.1-5.5) and 5 sub-fractions from 6 (6.1-6.5). The sub-fraction 5.3 was separated with a silica gel open column using hexane/ethyl acetate/methanol (2:6:2, v/v/v). Seven sub-fractions were obtained (5.3.1-5.3.7). Preparative thin layer chromatographies of 5.3.6, 6.3 and 6.4 using ethyl acetate/methanol (9:1, v/v) as *mobile* phase were done separately. The spots having the same R_f were combined and led to obtain 4 sub-fractions: RR, RR1, RR2 and RR3. Final purification of RR1 was also performed with preparative thin layer chromatography, realised on silica gel 60F₂₅₄ plates (Merck) using hexane/ethylacetate/ethanol/NH₄OH (6/6/2.5/0.01) as mobile phase. The separated components were visualised under visible and ultraviolet light (254 and 365 nm). The purity of the isolated compounds was analysed on HPLC using RP18 column chromatography, with a gradient of acetonitrile-ammonium acetate aqueous solution (10 mM) adjusted to pH = 3 with acetic acid (90:10,v/v). Detection wavelength was set at 307 nm according to the conditions described in the literature (1).

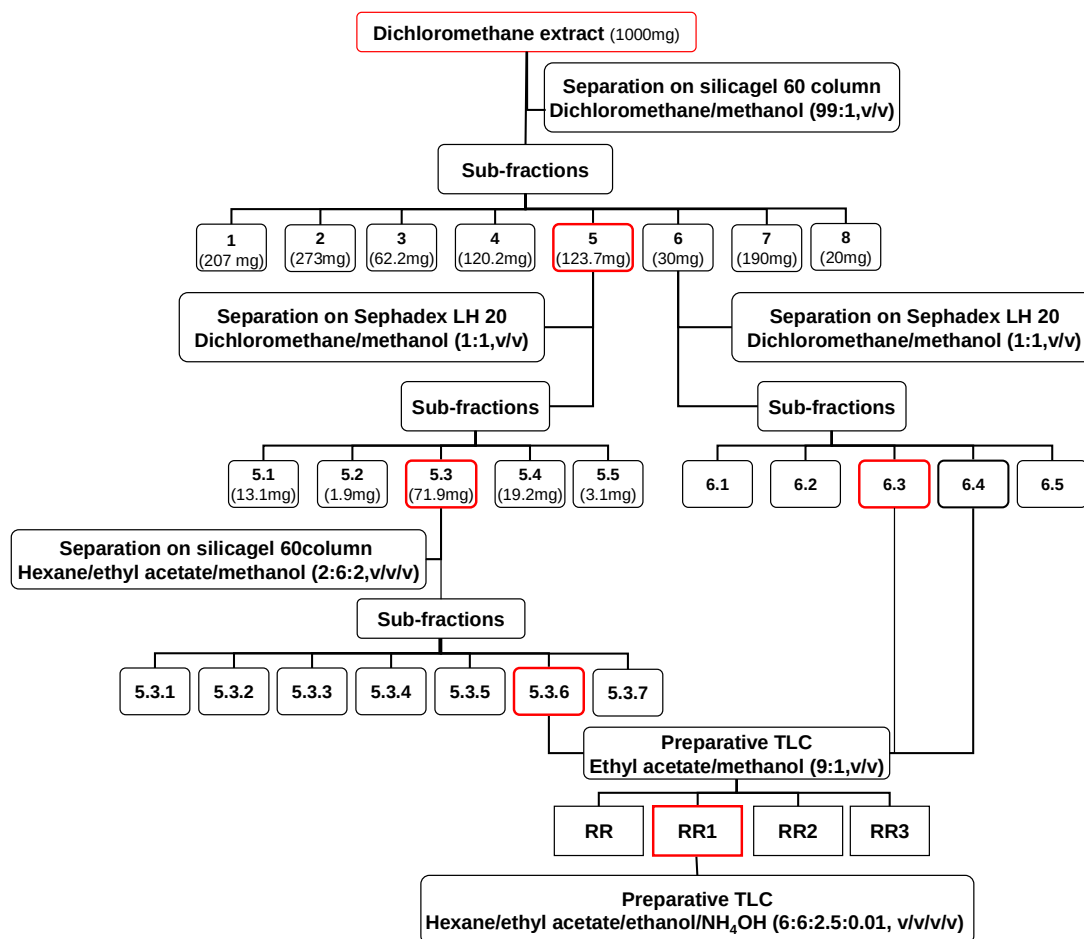


Figure 22 : Bioguided fractionation of the leaves of *S. penduliflorum* (the most active fractions are in red).

2.6. Identification method

Identification of the isolated compounds was performed by direct injection into a LCQ Advantage Thermo Finnigan (Waltham, MA, USA) mass spectrometer piloted by X-Calibur software. Mass spectra were determined using ESI source in positive mode, a vaporizer temperature of 455°C, a sheat gaz flow rate at 45 (arb) and a capillary voltage at 2V as conditions. ^{13}C NMR and ^1H NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX-400 spectrometer in CDCl_3 , CD_3OD or DMSO at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C), at 30°C. A combination of COSY, HMQC, HMBC and ROESY experiments were used when necessary for the assignment of ^1H and ^{13}C chemical shifts.

2.7. Statistical analysis

The data were analysed using a Student's *t*-test and were considered to be significantly different when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Identification of the active fraction

When tested on phenylephrine-contracted aorta, the dichloromethane extract (DCM) was the most active fraction compared to hexane and methanol extracts with IC_{50} values of 0.3 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ and 1.9 $\mu\text{g/ml}$ respectively (Table 5). Isoprenaline, used as reference standard exhibited vasorelaxant activity with an IC_{50} of 1.7 $\mu\text{g/ml}$ (data not shown).

Table 5 : Vasorelaxant activities of different extracts of *S. penduliflorum* leaves in rat aorta contracted by phenylephrine (1 μM), (n=6).

Extract	Hexane	Dichloromethane	Methanol
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	25	0.3	1.9

After different chromatographic fractionations of the dichloromethane extract, several sub-fractions were obtained (Fig. 22). Table 6 shows the vasorelaxant activities of the 4 final sub-fractions (RR, RR1, RR2 and RR3). It was shown that RR1 sub-fraction presented the highest relaxation of the contracted rat aorta.

Table 6 : Vasorelaxant activities of the four sub-fractions RR, RR1, RR2, RR3 on phenylpephrine-induced contraction of rat aorta at 1 $\mu\text{g/ml}$.

Fractions	RR	RR1	RR2	RR3
Relaxation (%) (n = 4)	12.5 $\pm$ 0.09	100 $\pm$ 8.50	7.19 $\pm$ 0.64	37.53 $\pm$ 0.41

3.2. Identification of active compounds

The developed TLC chromatogram of RR1 showed two well separated spots at R_f 0.62 and 0.81 which gave a positive reaction with Dragendorff reagent. Bioassay-guided fractionation by successive open column chromatographies followed by purification on preparative TLC led to the isolation of two active compounds, **1** and **2**.

Compound **1**, which was the major alkaloid, gave a molecular ion peak at m/z 340 in the positive mode, in accordance with the molecular formula of $C_{20}H_{21}O_4N$. Furthermore, 20C

were observed on the ^{13}C NMR spectra. Comparison of our data with literature data (2) and a reference sample allowed us to identify this compound as dicentrine with typical fragments at m/z 309, 279, 264, 251, 236, 220.

Compound 2 gave an ion peak at m/z 324 in positive mode, differing from compound 1 by 16 mass units giving the molecular formula of $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}$. Positive ESI MS^n spectra of 2 revealed fragments at m/z 324 corresponding to $[\text{M}+\text{H}]^+$ and other fragments at m/z 293, 263, 235, 205, 177. These results are in accordance with those found in the literature for neolitsine (2). Thus, 2 was identified as neolitsine (Fig. 23).

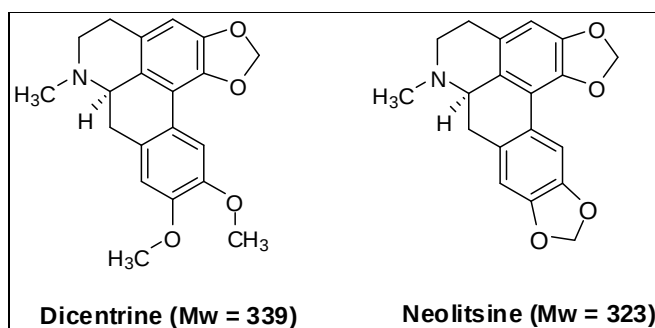


Figure 23: Structures of dicentrine (1) and neolitsine (2).

3.3. Effect of dicentrine on the vasoconstriction induced by phenylephrine

Because of the small amount of neolitsine that could be isolated, the determination of its pharmacological profile was not possible. Dicentrine was tested for its relaxing activity on phenylephrine-induced contraction in endothelium-denuded artery rings. As shown in figure 24A, preincubation of the aorta with dicentrine shifted the concentration-contraction curve of phenylephrine to the right, in a concentration-dependent manner. The EC_{50} value of phenylephrine was significantly increased from 12 nM to 52 nM and 341 nM in the absence and in the presence of 0.1 μM and 1 μM of dicentrine, respectively ($\log \text{EC}_{50}$ values were -7.9 ± 0.02 in control aorta, -7.14 ± 0.05 and -6.47 ± 0.03 , in the presence of 0.1 μM and 1 μM dicentrine, respectively, $p < 0.05$ dicentrine vs control) (Fig. 24).

Dicentrine relaxed aorta pre-contracted with phenylephrine, with a $\log \text{IC}_{50}$ (M) value of -5.53 ± 0.05 (IC_{50} value was 2.95 μM).

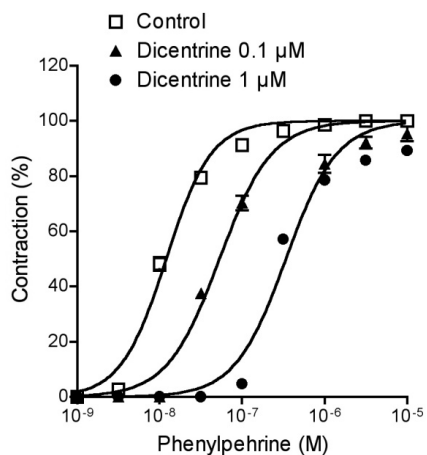


Figure 24 :Effect of dicentrine on the concentration-effect curves of phenylephrine in endothelium-denuded rat aorta.

4. Discussion and Conclusion

High blood pressure represents the main cause of death in the world. A recent study in 2009 on the prevalence of hypertension in Antananarivo-Madagascar revealed that 28.05% of adult population suffer from this disease with a mean age of 49 years. High blood pressure prevalence increased from 19.10% in 2000 to 28.05% in 2009 in Antananarivo (3). The fact is that hypertension requires a long-term treatment which implies a high cost. Consequently, the alternative is the traditional phytomedicine whose practice is current in Madagascar and *S. penduliflorum* is used in Malagasy traditional medicine to treat hypertension. Our results show that the crude extracts of its leaves exhibited significant concentration-dependent relaxation on rat aorta pre-contracted by phenylephrine. The dichloromethane extract of *S. penduliflorum* leaves was the most active fraction ($IC_{50} < 0.3 \mu\text{g/ml}$).

Bioguided fractionations of dichloromethane extract led to obtain RR_1 sub-fraction in which aporphine alkaloids were isolated and identified as dicentrine and neolitsine. The vasorelaxant activity of dicentrine was also demonstrated with a IC_{50} value of $2.95 \mu\text{M}$. These results confirmed those published in the literature (4-5). Despite that the neolitsine activity could not be demonstrated, the literature data report that it is a potent vasorelaxing agent on precontracted rat aorta preparations (6). Indeed, Menispermaceae family is known to be rich of aporphine alkaloids (7-9). The presence of dicentrine and neolitsine may support the use of the plant as antihypertensive. However, the total safety of the use of the plant is uncertain

because dicentrine and neolitsine were confirmed to be cytotoxic even if IC_{50} were higher on cultured cells (10–12).

On the other hand, a previous study mentioned that no alkaloid was found in leaves (13). Their plant materials were collected in another geographic region than the region where we collected our samples. It could suggest that the chemical composition of *S. penduliflorum* is affected by this parameter. These observations show the need for chemical control of samples of this plant, that is why we developed a method for the identification, separation and quantification of dicentrine for routine quality control of the leaves of *S. penduliflorum* in order to assure the safety and effectiveness of the traditional use of this plant.

Acknowledgements

Financial supports of Commission Universitaire pour le Développement (CUD), Belgique is gratefully acknowledged. Authors wish to thank A. Randrianirina for technical helps.

Bibliography

- (1) Stévigny, C.; Wautier, M.-C.; Habib Jiwan, J.-L.; Chiap, P.; Hubert, P.; Quetin-Leclercq, J. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for quantitative determination of aporphine alkaloids from different samples of *Cassytha filiformis*. *Planta Medica* **2004**, *70*, 764–770.
- (2) Stévigny, C.; Jiwan, J.-L. H.; Rozenberg, R.; de Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 523–528.
- (3) Rabarijaona, L. M. P. H.; Rakotomalala, D. P.; Rakotonirina, E.-C. J.; Rakotoarimanana, S.; Randrianasolo, O. Prévalence et sévérité de l'hypertension artérielle de l'adulte en milieu urbain à Antananarivo. *Revue d'Anesthésie-Réanimation et de Médecine d'Urgence* **2009**, *1*, 24–27.
- (4) Che-MinG Teng; Yu, S.-M.; Ko, F.-N.; Chen, C.-C.; Huang, Y.-L.; Huang, T.-F. Dicentrine, a natural vascular α 1-adrenoceptor antagonist, isolated from *Lindera megaphylla*. *British journal of pharmacology* **104**, 651–656.
- (5) Mustafa, M. R.; Achike, F. I. Dicentrine is preferentially antagonistic to rat aortic than splenic alpha 1-adrenoceptor stimulation. *Acta Pharmacologica Sinica* **2000**, *21*, 1165–1168.
- (6) Tsai, T.-H.; Wang, G.-J.; Lin, L.-C. Vasorelaxing Alkaloids and Flavonoids from *Cassytha filiformis*. *Journal of Natural Product* **2008**, *71*, 289–291.
- (7) Kashiwaba, N.; Ono, M.; Toda, J.; Suzuki, H.; Sano, T. Aporphine Glycosides from *Stephania cepharantha* Seeds. *Journal of Natural Product* **2000**, *63*, 477–479.
- (8) Guinaudeau, H.; Shamma, M.; Tantisewie, B.; Pharadai, K. Aporphine Alkaloids Oxygenated at C-7. *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 355–357.
- (9) Blanchfield J.T.; Sands D.P.A.; Kennard C.H.L.; Byriel K.A.; Kitching W. Characterisation of alkaloids from some Australian *Stephania* (Menispermaceae) species. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 711–720.
- (10) Huang, R. L.; Chen, C. C.; Huang, Y. L.; Ou, J. C.; Hu, C. P.; Chen, C. F.; Chang, C. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. *Planta Medica* **1998**, *64*, 212–215.
- (11) Stévigny, C.; Block, S.; De Pauw-Gillet, M. C.; de Hoffmann, E.; Llabrès, G.; Adjakidjé, V.; Quetin-Leclercq, J. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*. *Planta Medica* **2002**, *68*, 1042–1044.
- (12) Konkimalla, V. B.; Efferth, T. Inhibition of epidermal growth factor receptor over-expressing cancer cells by the aphorphine-type isoquinoline alkaloid, dicentrine. *Biochemical Pharmacology* **2010**, *79*, 1092–1099.
- (13) Rasoanaivo, P.; Ratsimamanga-Urverg, S.; Rakoto-Ratsimamanga, A. Isoquinoline alkaloid constituents of *Spirospermum penduliflorum* and *Strychnopsis thouarsii* (Menispermaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **1995**, *23*, 679–680.

Chapitre 2

**Development of a HPLC-UV method for the
quantification of dicentrine in leaves of
Spirospermum penduliflorum Thouars:
application of design of experiments (DOE)**

In the previous chapter, we showed that leaves extracts of *Spirospermum penduliflorum* possessed vasorelaxant properties. We also demonstrated that this effect was mainly due to the presence of aporphine alkaloids: dicentrine and neolitsine. Moreover, we observed that dicentrine was the major molecule responsible for this activity. However, according to the literature, alkaloids are not present in all leaves samples of *S. penduliflorum*. Furthermore, in various studies, high doses of dicentrine proved cytotoxic activity for human cell lines; therefore, we sought to develop a HPLC-UV method for the quantification of this molecule in order to assess the effectiveness but also the safety of the plant.

As method development was time consuming; we applied the DOE in order to determine the optimum conditions allowing the separation of all the alkaloids present in the leaves.

This chapter is adapted from the following published article.

**APPLICATION OF DESIGN OF EXPERIMENTS AND DESIGN SPACE
METHODOLOGY FOR THE HPLC-UV SEPARATION OPTIMIZATION OF
APORPHINE ALKALOIDS FROM LEAVES OF
Spirospermum penduliflorum THOUARS**

Mamy H. Rafamantanana^{a,b}, Benjamin Debrus^c, Guy E. Raoelison^b, Eric Rozet^{c,#}, Pierre Lebrun^c, Suzanne Uverg-Ratsimamanga^b, Phillippe Hubert^c, Joëlle Quetin- Leclercq^a

^a *Groupe de Recherche en Pharmacognosie, Louvain Drug Research Institute (LDRI), Université catholique de Louvain, Av. Mounier 7230 Bte 7203, 1200 Bruxelles, Belgium.*

^b *Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA), BP 3833, Itaosy, Antananarivo 102, Madagascar.*

^c *Laboratoire de Chimie Analytique, Département de Pharmacie, CIRM, Université de Liège, CHU, Av. de l'hôpital 1, B36, B-4000 Liège, Belgium.*

[#]*F.R.S.-FNRS Postdoctoral researcher (Belgium)*

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.
Volume 62, 25 March 2012, Pages 23–32

1. Introduction

Nowadays, traditional medicine still holds an important place to cure diseases in developing countries. It is mainly due to the non accessibility of modern medicine by the local population. The safety, effectiveness and quality of finished herbal medicinal products depend on the quality of their source materials, which can include hundreds of natural constituents, and how elements are handled through production processes.

S. penduliflorum Thouars (Menispermaceae) was chosen among a list of medicinal plants used by Malagasy population because it is an endemic species of Madagascar. The decoction of all parts is traditionally used as vasorelaxant (1) and the decoction of leaves is also used for the treatment of malaria and as a chloroquine adjuvant. The dried leaves are also smoked for pulmonary tuberculosis treatment. The decoction of roots was taken as cholagogue, tonic and for hepatic disorders (2). Different studies on root extracts of *S. penduliflorum* allowed the isolation of some active molecules: columbine (clerodane- type diterpenoid), palmitine (protoberberine-type quaternary alkaloid) and limacine (bisbenzylisoquinoline alkaloid) (3). Recently, Raoelison *et al.* (submitted for publication) found a vasorelaxant activity on isolated rat aorta using a dichloromethane leaves extract. Two aporphine alkaloids were then isolated by bioguided fractionation: dicentrine and neolitsine (Fig. 23), both known to possess antihypertensive activities. In their experimental model, dicentrine gave an IC_{50} value of $2.95 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ on rat aorta relaxation.

In the previous studies, Teng *et al.* also demonstrated that dicentrine is a strong vascular α -1 adrenoceptor antagonist having antiplatelet (4–6), and antiarrhythmic activities (7). It confirms the traditional use of this plant as an antihypertensive. Lai *et al.* (8) and Tsai *et al.* (9) proposed two HPLC methods for the quantification of dicentrine in rat plasma and urine. The first method was not validated (8). The second method (9) was fully validated but the separation of some peaks was not complete. A validated HPLC method was also described by Stévigny *et al.* for the quantification of aporphin alkaloids of *Cassytha filiformis* (10). Besides, the present matrix was more complex and different than plasma, urine and *Cassytha filiformis*. Therefore, a HPLC method coupled with UV and MS detection was developed to separate and quantify these molecules and to control the quality and effectiveness of this plant. The optimization of chromatographic methods for plant extracts is often intricate and can be time consuming. In fact, it is a thorny problem to separate components because of the

number of compounds, the similarities between the chromatographic behaviours of some of them while some others have widely distinct physico-chemical properties (e.g. polarities, pKa, Log P). Usually, optimization of a chromatographic method is achieved by changing parameters one by one which is commonly called “one factor/variable at a time” methodology. On the contrary, design of experiments (DoE) methodology investigates the factors effects and the interactions between them by modifying multiple factors at a time. Combined with design space (DS) (11–16), it leads to a powerful methodology (DoE-DS) allowing the identification of optimal conditions for the achievement of robust analytical methods. In the present study, DoE-DS methodology was used to develop a method for the separation of aporphin alkaloids contained in leaves extract of *S. penduliflorum*. The method was then fully validated using the total error concept and the accuracy profile approach for the quantification of dicentrine in these leaves extracts (17,18).

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

Dicentrine reference standard was purchased from Sequoia Research Products Ltd. (Pangbourne, UK). The reagents were purchased as follows: methanol HPLC grade, ethoxyethane from VWR (Leuven, Belgium), dichloromethane from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), ammonia solution (25%) from J.T. Baker (Deventer, Netherlands), acetic acid from Fisher scientific (Erembodegem, Belgium), ammonium formate and anhydrous sodium sulphate from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Plant material

Fresh leaves of *S. penduliflorum* were collected in March 2007 and December 2009 in the Eastern Region of Madagascar (18°51'0"S, 49°7'59"E). The voucher specimens (AML 13) were deposited at the herbarium of the “Institut Malgache de Recherches Appliquées” (IMRA). Leaves were dried at ambient temperature and reduced to powder. In order to have a homogenous powder, the dried powdered leaves were passed through a sieve of 710 µm meshes. The powdered leaves were stored at ambient temperature in obscurity and in a dry area.

2.3. Apparatus

Chromatographic separations were performed with a reversed-phase C18 LiChroCART[®] column (250 mm × 4 mm i.d.; particle size: 5 µm), (Merck, Darmstadt, Germany), a HPLC Waters 2690 separation module (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a UV spectrophotometric detector Kromaton (Angers, France); all controlled by Borwin software (Borwin, Rostock, Germany). The column was maintained at 30°C. For the peaks identification, a LCQ Advantage Thermo Finnigan (Waltham, MA, USA) mass spectrometer with ESI ion source in positive mode was used, a vaporizer temperature of 455°C, a sheat gaz flow rate at 45 (arb) and a capillary voltage at 2V as conditions and piloted by X-Calibur software.

Method validation experiments were performed using a Merck Hitachi HPLC system consisting of a pump L6200, an automatic injector AS 2000 A, and a UV detector L400; all piloted by the Borwin software.

2.4. Plant extraction

One gram of powdered leaves was macerated in a refluxing water bath at 50°C for 1 hour with 50 ml of methanol-acetic acid 99% (99:1, v/v). The residue was washed with 10 ml of the same solvent and filtered through a filter paper (N°5, Whatman). These operations were repeated 4 times in order to have an extraction of 4 hours.

The extracts were combined and evaporated to dryness under reduced pressure. Dried crude extract was diluted in 50 ml of water acidified with 1% of acetic acid, filtered and washed twice with 30 ml of diethylether. The aqueous extract was basified with NH₄OH to pH 9.5. Liquid-liquid extraction was performed four times with 50 ml of dichloromethane. Organic phases were dried over anhydrous sodium acetate and evaporated to dryness. The dried crude extract was diluted to 40 ml of methanol, filtered through a 0.45 µm filter (Whatman). Finally, 20 µl of this solution were injected into the HPLC system.

2.5. Preliminary assay

Preliminary tests were performed to identify the critical factors (i.e. the factors having the highest effect on the responses) to be further used during optimization procedure. These preliminary tests also allowed the establishment of the ranges of factors. Generally, the factors can be classified in 3 groups:

- The stationary phase: particles size, length and diameter of the column
- The mobile phase: % of organic solvent, pH, buffer concentration, ions pair agent...
- Physical factors: temperature, pression, viscosity of the mobile phase...

Different columns were therefore tested to change chromatographic selectivity: a LiChroCART® RP-18e column (250 mm × 4 mm i.d.; particle size: 5 µm), a LiChroCART® RP-select B (C8 endcapped) column (250 mm × 4 mm i.d.; particle size: 5 µm) and a Aluspher® C8 column (250 mm × 4 mm i.d.; particle size: 3 µm) were tested. pH and gradient slopes were also varied. The mobile phase consisted of a mixture of ammonium buffer 10 mM and methanol (80:20: v/v) as solvent A and methanol as solvent B.

2.6. Experimental design

The method optimization involved a full factorial design set up with 3 chromatographic factors: pH and gradient slope were both studied at 3 levels and methanol proportion at the beginning of the gradient (pci) was studied at 4 levels (Table 7). Table 8 summarizes the gradient conditions which ensue from the DoE. As we observed in the preliminary test that the peaks were eluated at 60% of methanol, 12 different gradient times to obtain 60% methanol in the mobile phase were defined using pci and gradient slope and used for 3 pH levels. Finally a total of 43 analyses were performed including the 36 conditions defined by the DoE. The conditions at pH 2.5, pci = 30%, slope = 1%/min; pH 4.5, pci = 30%, slope = 0.6% and pH 4.5, pci = 50%, slope = 0.4%/min were carried out in duplicate and 4 independent repetitions were performed at pH 4.5, pci = 40%, slope = 0.6%/min. These independent repetitions were carried out to estimate the responses variability over the whole experimental domain: at some extreme points (i.e. pH 2.5, pci = 30%, slope = 1%/min and pH 4.5, pci = 50%, slope = 0.4%/min) and at the two points which are the closest to the DoE geometrical center (i.e. pH 4.5, pci = 30%, slope = 0.6% and pH 4.5, pci = 40%, slope = 0.6%/min).

Table 7: Chromatographic parameters studied for the method robust optimization. pci: methanol proportion at the beginning of the gradient.

Parameter	Levels			
pH	2.5	4.5	7	
Gradient slope (%/min)	0.4	0.6	1	
pci (%)	20	30	40	50

Table 8: Gradient conditions tested for the robust optimization of the HPLC method.

Gradient slope (%/min)						
	0.4		0.6		1	
pci (%)	Time (min)	MeOH (%)	Time (min)	MeOH (%)	Time (min)	MeOH (%)
20	0	20	0	20	0	20
	100	60	66.6	60	40	60
	110	60	77	60	50	60
	111	20	78	20	51	20
30	0	30	0	30	0	30
	75	60	50	60	30	60
	85	60	60	60	40	60
	86	30	61	30	41	30
40	0	40	0	40	0	40
	50	60	33.3	60	20	60
	60	60	43	60	30	60
	61	40	44	40	31	40
50	0	50	0	50	0	50
	25	60	16.6	60	10	60
	35	60	26	60	20	60
	36	50	44	50	21	50

2.7. Design of experiments and design space methodology

DoE provides a structured methodology for the determination of effects and the interactions between factors affecting a process and the output response of that process (19). The most common objective of chromatographic methods development is to determine the operating conditions which allow obtaining an optimal separation of all compounds in the shortest analysis time. Factors which have the highest effects on the response (and therefore on the separation) must be selected. Usually, the chromatographic resolution (R_s) between two adjacent peaks is modelled to assess separation. Nevertheless, R_s cannot be selected as the response of multiple linear models due to discontinuities when selectivity changes and peaks interbred (11,20). Hence, the beginning, apex and end (t_B , t_R , t_E , respectively) of each peak were measured. The chromatographic behavior of each peak was modeled by 3 equations. The first modeling the logarithm of the retention factor ($\log(k_{tRi})$) with

$k_{tRi} = (t_{Ri} - t_0)/t_0$ and t_0 : the column dead time, the second modeling the logarithm of the left half-width, $\log(w_l)$ with $w_l = k_{tRi} - k_{tBi}$ and the third modeling the logarithm of the right half-width, $\log(w_r)$ with $w_r = k_{tEi} - k_{tRi}$. These responses were modeled by multiple linear equations (Eq. 37).

$$\log(kt_{Ri}) = \beta_0 + \beta_1.pH + \beta_2.pH^2 + \beta_3.pci + \beta_4.pci^2 + \beta_5.slope + \beta_6.slope^2 + \beta_7.pH.pci + \beta_8.pH.slope + \beta_9.pci.slope + \beta_{10}.pH.pci.slope + \varepsilon$$

Eq. 37

where $\log(kt_{Ri})$ represents the logarithm of the retention factor (kt_R) of the i th peak. Logarithms of peaks half-widths were modelled by the same equations. The β_1 to β_{10} are the parameters of the mathematic model, pH, pci and slope are the factors of the design of experiments and ε is representative of the residual error assumed to be normally distributed. Furthermore, a new separation criterion, S , was used to ease the predictive error propagation from the modelled responses to this criterion (11–13,20). S is defined as the difference between t_B (the beginning) of the second peak and t_E (the end) of the first peak of the critical pair (i.e. the two most proximate peaks). The error affecting the modelled responses was estimated and propagated to S using Monte Carlo simulations and allowed to compute the DS. The DS corresponds to a region of the experimental domain where the probability to attain $S > 0$ (i.e. baseline-resolved peaks) is higher than a selected quality level (11–13). The quality level and the design space shapes are also representative of the robustness of a method (21–24). This is expressed in Eq. 38.

$$DS = \{x_0 \in \chi | E_\theta[P(S > \lambda) | \theta] \geq \pi\}$$

Eq. 38

where x_0 is a point in the experimental domain, χ . λ is the threshold on the separation criterion S , θ is the estimated parameter of the model and π is the quality level. P and E correspond to the estimators of probability and mathematical expectation, respectively.

This equation can be interpreted as follow: DS is defined as a part of the experimental domain where for x_0 point of this domain, the estimated E_θ probability P to attain $S > \lambda$ (in our case λ should be ≥ 0), with θ , the parameters of the model; is higher than π quality level. A low π value does not mean that unacceptable separations could be obtained (i.e. $S < 0$). The peak could be well separated concurrently with a relatively high error tarnishing the t_R predictions leading to predictions of low probability while peaks could be well separated. On the other hand, a high π value could induce obtaining a good separation (12).

2.8. Chromatographic conditions

The mobile phase consisted of methanol and ammonium formate buffer (20 mM) Experiments were carried out in gradient mode (see Table 7 for gradients). The pH of the

aqueous solution was adjusted to 2.5, 4.5 or 7 with concentrated formic acid or ammonia. The column was thermostated at 30°C, flow rate was 1 ml/min and the detection was performed at a wavelength of 307 nm.

2.9. Determination of extraction efficiency

One gram of dried and powdered leaves was extracted as described in figure 25. The leaves were first extracted for 1 hour. The residue was recuperated and extracted again with fresh solvent for 1 hour. This was repeated until the exhaustion of leaves in dicentrine. Each extract obtained after each extraction was evaporated to dryness separately and fractionated. The alkaloidic fraction was injected separately onto HPLC column. The kinetics of the extraction was established by monitoring the peak area of dicentrine.

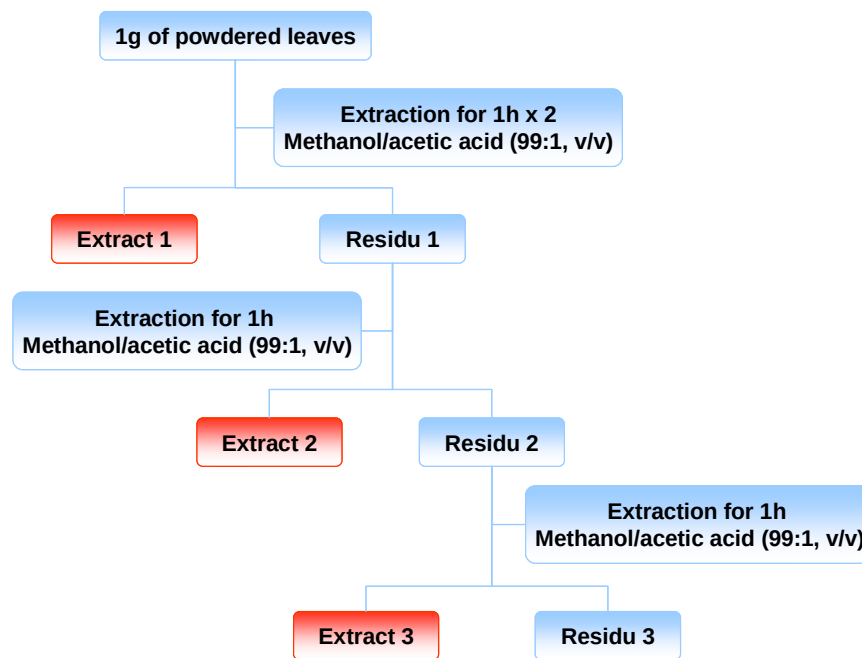


Figure 25: Extraction procedure performed to assess extraction efficiency.

2.10. Method validation

Selectivity, response function, trueness, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy, linearity, range, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were the criteria determined to validate the method (21,25,26). The validation of the method was done during three days to evaluate time-dependant intermediate precision. Data were analyzed with e-nova V3.0 software (Arlenda, Liège, Belgium).

2.10.1. Calibration standards

Stock solution of 1 mg/ml of dicentrine was prepared in methanol. This solution was diluted and four concentration levels (10, 25, 50 and 75 µg/ml) were used to establish the calibration curve. Each level of the calibration standards was analyzed in duplicate.

2.10.2. Validation standards

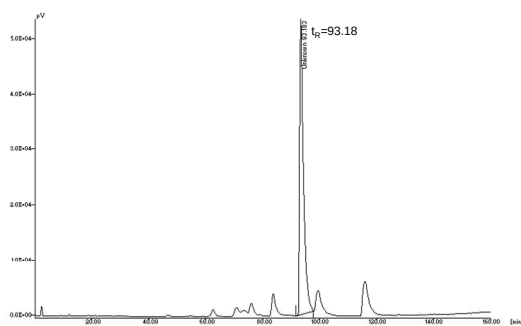
Validation standards were prepared within the matrix. Dried extract of leaves was diluted in 40 ml of methanol. This solution was spiked to reach final validation standards at 10, 25, 50, and 75 µg/ml of dicentrine. Each level of the validation standards was analyzed independently in triplicate.

3. Results and discussion

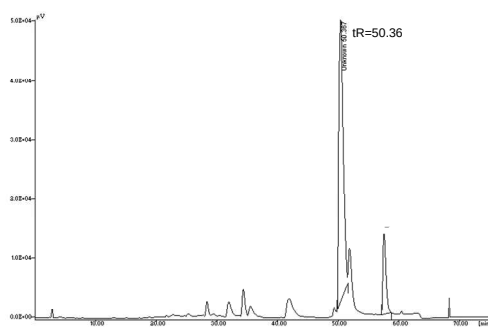
3.1. Preliminary tests

Different chromatographic profiles of the total alkaloid extract of the leaves of *S. penduliflorum* were obtained after changing the HPLC conditions (Fig. 26). These chromatograms showed that dicentrine was the most abundant in the extract.

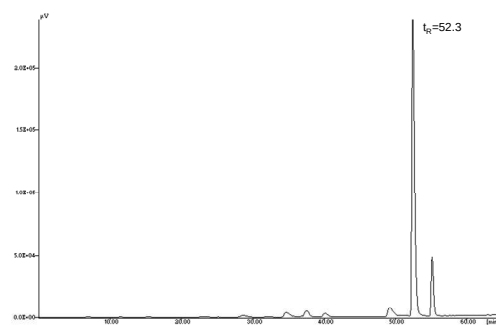
We observed that no significant difference was observed with the different types of column used: C18, C8, RP-select B. On the other hand, the gradient mode affects the retention time. The pH has also its effect because alkaloids are ionisable. We can conclude here that the pH, the initial proportion of methanol and the slope of the gradient were the parameters which influence the separation and the retention time. The column type did not have a significative effect. We observed also that all the peaks were eluted with a maximum of 60% of methanol in water. Then, the pH of the aqueous phase, the initial proportion of methanol and the gradient slope were selected as parameters for the experimental design and the separation was performed with RP-select B column type because this column allows to work with a higher level of pH.



(a) C18, pH 2, Isocratic mode 95A/5B: v/v



(b) C8, pH 7, gradient mode: 0 to 100% of B in 90min



(c) RP-select B, pH 7, gradient mode: 0 to 40% of B in 60 min, 40 to 100% in 80 min, 100 to 0% in 81 min

Figure 26: Chromatograms obtained with different chromatographic conditions for the separation of the alkaloids in leaves of *S. penduliflorum* (A: ammonium buffer 10mM and methanol (80:20, v/v), B: methanol).

3.2. Experimental design

The first step is to verify the validity of the model for each response. In total, we found 13 peaks whose MS spectra were in accordance with an aporphine alkaloid skeleton in the total alkaloid extract. As depicted in figure 27a, the adequacy between the experimental retention times and the predicted ones is good. The adjusted coefficients of determination (R^2_{adj}) are summarized in Table 9. Furthermore, the corresponding residuals were normally distributed for most compounds - for each response p-values were > 0.05 ; (p-values for $\log(k_{tR})$ are presented in Table 10) -and mainly located into the interval $[-2, 2]$ minutes (Fig. 27b).

Despite the high number of interactions added in the model (see Eq. 37), a curved tendency can be observed on the residuals in figure 27b. It suggests that some terms of higher orders (e.g. pH^3) could have been added in the model to avoid this slight lack of fit situation. Additionally, the heteroscedasticity of the residuals distribution on figure 27b highlights the need to perform the logarithmic transformation used to predict $\log(k_{tR})$. Indeed, the p-value computed on the modeled response ($\log(k_{tR})$) were acceptable (> 0.05 ; see Table 10) for 10 of the 13 compounds suggesting that the models were suitable for the optimization of the separation.

Then, once the responses are correctly modeled, the error can be propagated from them to the separation criterion S . This step is carried out to estimate the prediction error affecting S and to give confidence in predicted optima. Thus, the predicted criterion was computed over the whole experimental domain using a grid search approach. Moreover, the probability to reach the criterion threshold $S > 0$ min was also computed from 2000 Monte Carlo simulations over each point of this grid (11–13). Figure 28 displays the probability surfaces to at least reach a complete separation for each studied parameters: $P(S > 0 \text{ min})$.

Table 9: Adjusted coefficient of determination (R^2_{adj}) for the 3 modeled responses.

Compounds	R^2_{adj}			Compounds	R^2_{adj}		
	$\log(k_{tR})$	$\log(w_l)$	$\log(w_r)$		$\log(k_{tR})$	$\log(w_l)$	$\log(w_r)$
1	0.9995	0.9305	0.8374	8	0.9996	0.9016	0.9816
2	0.9995	0.9278	0.9754	9	0.9996	0.9901	0.9592
3	0.9995	0.8926	0.9763	10	0.9997	0.7972	0.7215
4	0.9996	0.9828	0.6205	11	0.9995	0.7923	0.6341
5	0.9997	0.8521	0.8258	12	0.9995	0.7876	0.8241
6	0.9993	0.8202	0.7595	13	0.9998	0.8588	0.7886
7	0.9995	0.9641	0.9497	mean	0.9995	0.8844	0.8349

Table 10: Shapiro-Wilk normality test p -values for $\log(k_{iR})$.

Compounds	p-value	Compounds	p-value
1	0.243	8	0.524
2	0.028	9	0.446
3	0.028	10	0.057
4	0.091	11	0.433
5	0.075	12	0.127
6	0.004	13	0.502
7	0.622		

The optimal separation was predicted at pH 3.0 with a gradient starting at 32% of methanol and whose slope was 0.42%/min. On figure 28, the DS is hedged in by a red line.

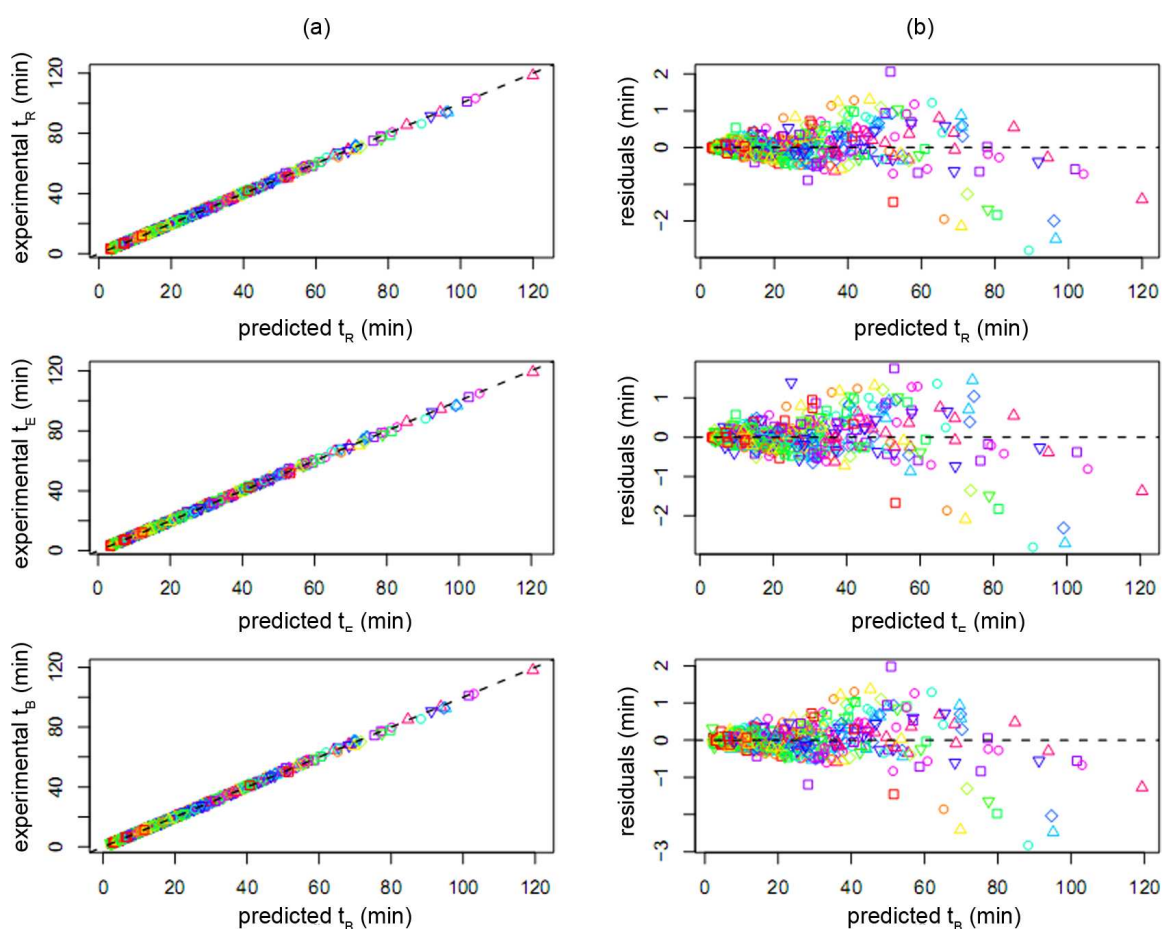


Figure 27: (a) Correlation between predicted and experimental responses of total alkaloids of *S. penduliflorum*. (b) Corresponding residual distributions.

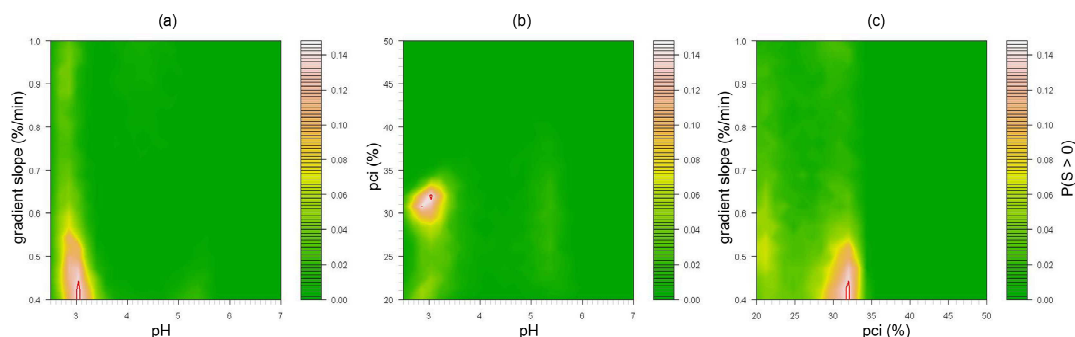


Figure 28: Probability surfaces to reach at least $S > 0$ min. (a) pH vs gradient slope (%/min), (b) pH vs pci (%) and (c) pci (%) vs gradient slope (%/min). The DS is encircled by the red lines.

The DS corresponds to a probability of 14% to get a complete separation and gives the optimal operating conditions in the light of the residuals range (between -2 and +2 min) in which all compounds should be separated.. As depicted on figure 29b, the chromatogram recorded at the above mentioned optimal operating condition allows the complete separation of all the investigated compounds and is in accordance to the predicted chromatogram (Fig. 29a).

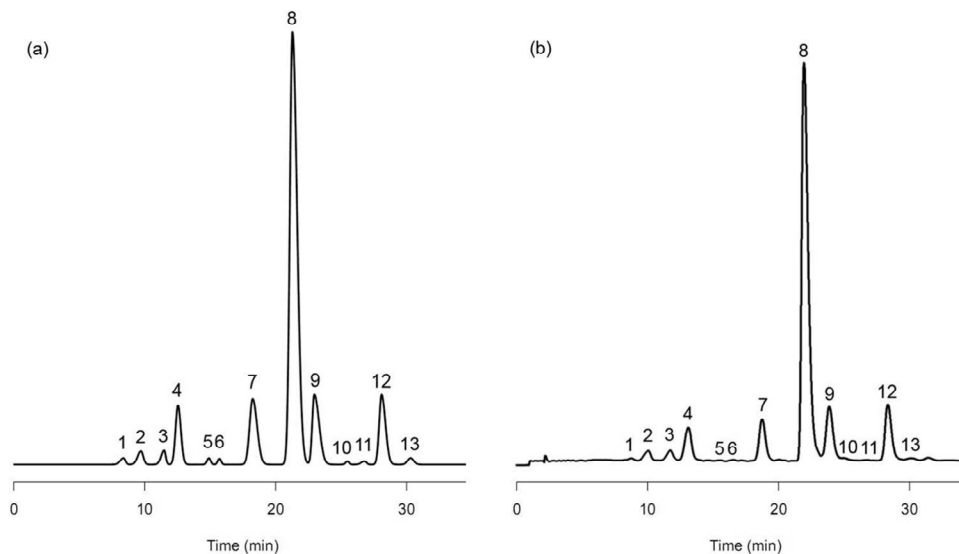


Figure 29: (a) Predicted chromatogram at optimal conditions (see text for details), (b) experimental chromatogram recorded at optimal conditions of total alkaloids extract of *S. penduliflorum*. Peak numbering: 1 = unidentified peak, 2 = isocorydine, 3-6 = unidentified peaks, 7 = glaucine, 8 = dicentrine, 9-11 = unidentified peaks, 12 = neolitsine, 13 = unidentified peak.

The use of DoE and DS allowed separating of 13 compounds whose UV and MS spectra indicated that they possess an aporphine skeleton, among them dicentrine, a positional isomer of dicentrine and neolitsine. Other compounds such as isocorydine and glaucine (Fig. 30) were identified by the comparison of their mass spectra with literature and with our database (27).

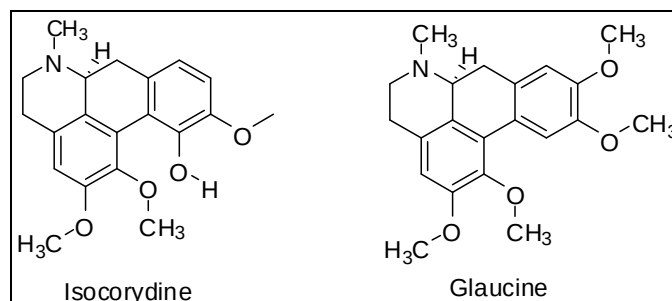


Figure 30 : Structure of alkaloids found in the leaves extract of *S. penduliflorum*

3.3. Extraction efficiency

The kinetic of the extracted amount of dicentrine (Fig. 31) showed that a significant quantity of dicentrine is extracted after 2 hours (Student t-test ($p < 0.05$), but not after 3 or 4 hours. This result shows that 3 hours of extraction are sufficient but we applied 4 hours of extraction to account for possible rich samples. Furthermore, an extraction efficiency of $99.61 \pm 0.01\%$ ($n = 3$) was obtained.

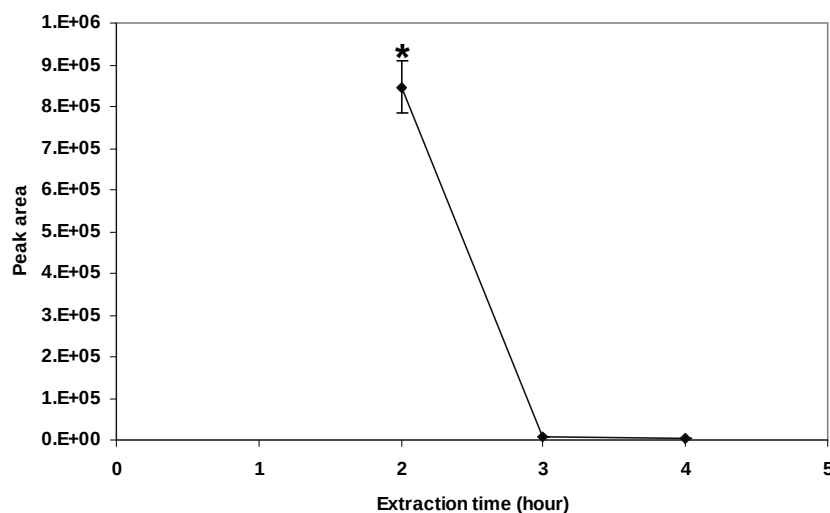


Figure 31: Dicentrine peak area responses after 2 hours, after a third and fourth hour extraction obtained with the same powdered leaves of *S. penduliflorum* ($n = 3$). * means a significant amount of dicentrine extracted (Student t-test $*p < 0.05$)

3.4. Method validation

The method validation focused on the demonstration of the ability of the optimized method to accurately quantify dicentrine in extracts of *S. penduliflorum*. The assessed validation criteria were method selectivity, trueness, precision, linearity, range, LOQ and LOD as well as the accuracy of the generated results. The selection of the most adequate response function was also performed during the method validation phase (17,28). To achieve this, the accuracy profile methodology was endorsed which allows to decide about the validity of the method. This accuracy profile is based on the predictive quality of future results that will be generated by the method under trial (29,30). In this framework two values have to be defined a priori. The first one is the acceptance limits. They represent the maximum relative error that is acceptable for the future application of the method being validated. These acceptance limits were set at $\pm 30\%$ as commonly done for plant matrices (26,31,32). The second one is the guarantee or minimum probability to have future results included within these limits. It was set at 90%.

3.4.1. Selectivity

The selectivity of the method was insured by the comparison of the retention time and mass spectra with the reference standard of dicentrine. Mass spectra at the beginning, the middle and the end of the chromatographic peak of dicentrine were recorded and found to be comparable (Fig. 32).

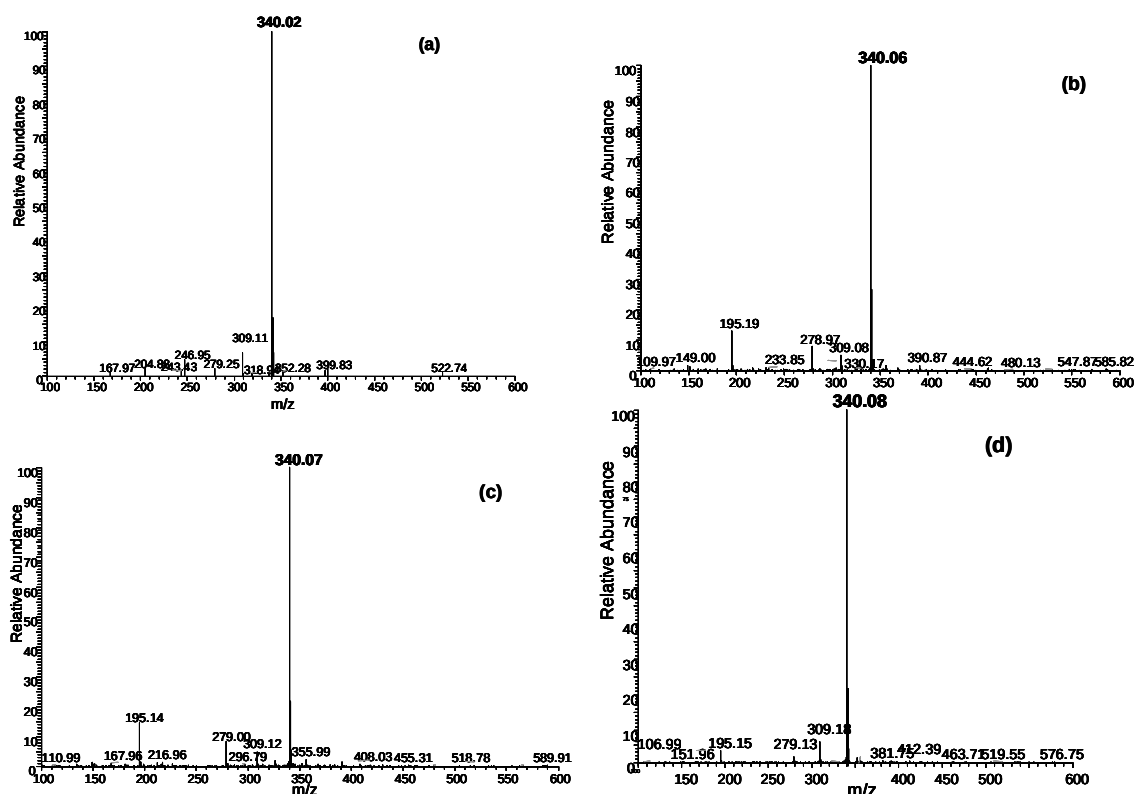


Figure 32: Positive ion mode mass spectra of dicentrine standard (a), and at the beginning, apex and end of the dicentrine peak in total alkaloid extract (b, c, d) of *S. penduliflorum* [M+H=340].

3.4.2. Response function

Calibration standards without matrix were prepared at four concentration levels of dicentrine. Analyses were performed in duplicate. Validation standards were prepared independently with the matrix and also contained known concentrations of dicentrine at the same four concentration levels. They were analyzed in triplicate. These validation standards concentration levels were considered as conventionally true values. The concentration for both calibration and validation standards ranged from 10 to 75 $\mu\text{g/ml}$. Different regression models were fitted on the calibration standards such as: simple linear regression, weighted (1/X) linear regression, weighted (1/X²) linear regression, linear regression through 0 fitted with the highest calibration level only, linear regression after logarithmic transformation, quadratic regression, weighted 1/X quadratic regression and weighted 1/X² quadratic regression (some examples of regression models were presented in the figure 33 below).

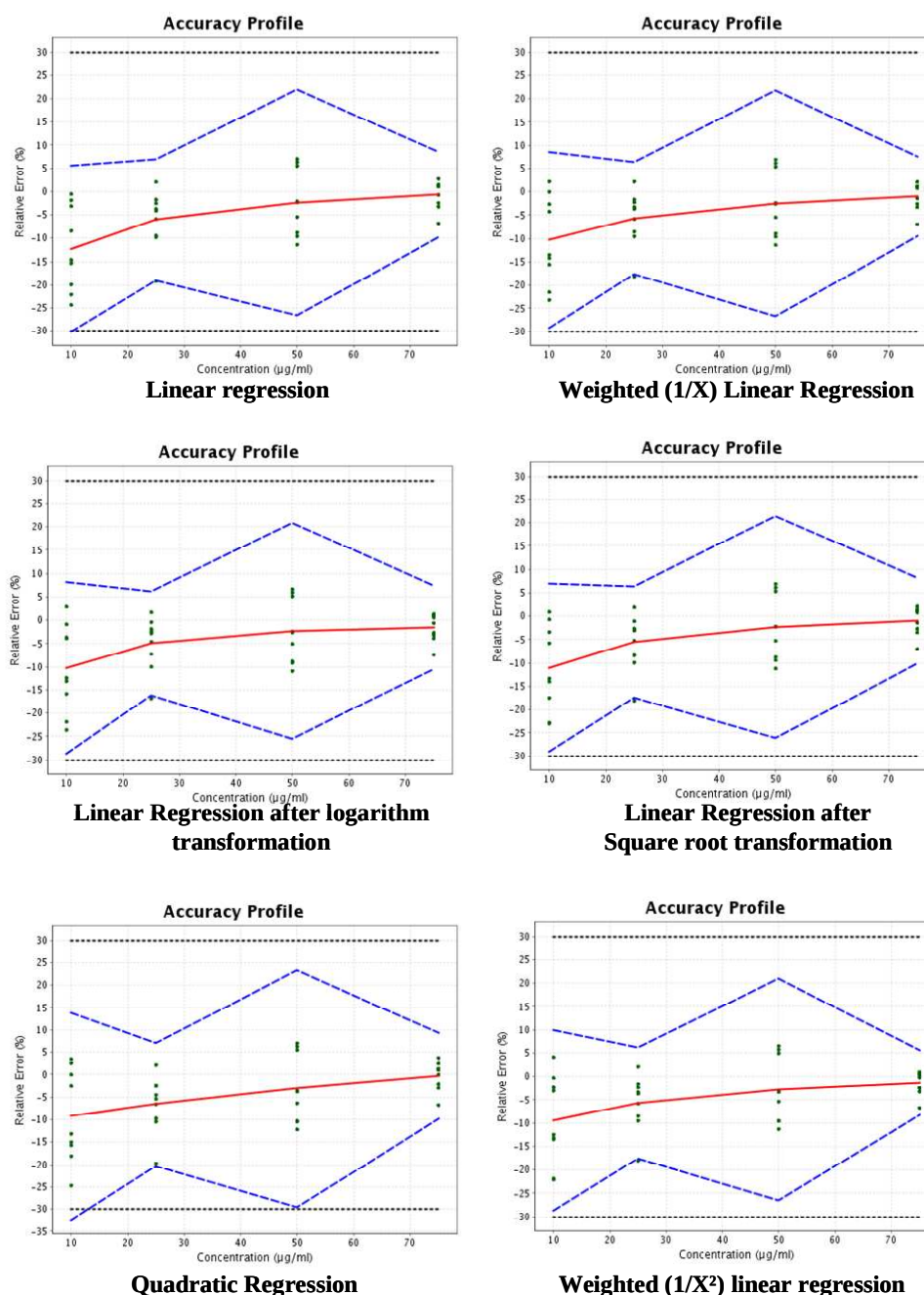


Figure 33: Different accuracy profiles of dicentrine with different regression models (The plain line is the relative bias (%), the dashed lines are the β -expectation tolerance limits ($\beta = 90\%$) and the dotted lines represent the acceptance limits ($\pm 30\%$)).

According to accuracy index (18), the weighted (1/X²) linear regression model was the most adequate calibration model. Indeed, the 90% β -expectation tolerance intervals are included inside the $\pm 30\%$ acceptance limits within the range of 10 to 75 µg/ml of dicentrine (17,28,30). These tolerance intervals are intervals one can claim to include each future result

with 90% probability, thus giving a high level of guarantee about the suitability of the method for its intended purpose (28,30).

3.4.3. Trueness

The systematic error between the accepted true values of the validation standards and the mean experimental ones represents the trueness of the method (17,30). It can be expressed in relative bias which did not exceed -10% (see Table 11) showing the adequate trueness of the method.

3.4.4. Precision

Precision represents the variation of the results of dicentrine in intraday (or repeatability) and interday conditions (intermediate precision) (21,25,30). Precision was assessed during three days ($p = 3$) with three independent repetitions ($n = 3$) at each of the four concentration levels of the validation standards, leading to 9 results per level of dicentrine and a total amount of 36 results. It was evaluated in terms of relative standard deviation (RSD%) values. These values did not exceed 10% for repeatability as well as for intermediate precision (Table 11).

3.4.5. Accuracy

Accuracy refers to the closeness of agreement between the test result and the accepted reference value, namely the conventionally true value (21,25,30). Accuracy takes into account the sum of systematic and random errors giving the total error (30). The acceptance limits have been set at $\pm 30\%$ according to the complexity of the matrix (plant extract) (26,31,32).

Figure 33 shows that the 90% β -expectation upper and lower tolerance limits are totally included inside the acceptance limits for the whole concentration range of 10 to 75 $\mu\text{g/ml}$ of dicentrine when a weighted ($1/X^2$) linear regression model is used as calibration curve. This demonstrates the accuracy of the results obtained by the developed method. (17,28,29). This dicentrine concentration interval is very small because of the closeness of the retention times of dicentrine and of its isomer. A high concentration level of dicentrine may cause a coelution with its isomer, impairing its accurate quantification.

Table 11: Validation results of the HPLC-UV method for the determination of dicentrine in leaves extract of *S. penduliflorum* (3 series, 3 repetitions)

Validation criteria	Dicentrine		
Response function	Weighted ($1/X^2$) linear regression Calibration range (4 levels) 10-75 $\mu\text{g/ml}$		
Trueness	Concentration ($\mu\text{g/ml}$) 10 25 50 75	Relative bias (%) -9.4 -5.6 -2.8 -1.4	
Precision	Concentration ($\mu\text{g/ml}$) 10 25 50 75	Repeatability (RSD%) 9.1 5.6 2.8 1.7	Intermediate precision (RSD%) 9.6 5.9 7.9 2.8
Accuracy	Concentration ($\mu\text{g/ml}$) 10 25 50 75	90% β -expectation lower and upper tolerance limits of the relative error (%) -28.6, 9.9 -17.5, 6.3 -26.5, 20.9 -8.3, 5.6	
Linearity Slope Intercept r^2	0.9995 -1.176 0.991		

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 3.0 $\mu\text{g/ml}$ and 10.0 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The LOD was estimated using the mean intercept of the calibration model and the residual variance of the regression. For the LOQ it was obtained from the accuracy profile (Fig. 32) as the smallest concentration where the 90% β -expectation tolerance limits remain inside the $\pm 30\%$ acceptance limits (17,21,30). Consequently, the range over which the method is valid extends from 10 to 75 $\mu\text{g/ml}$ of dicentrine as shown on figure 33.

3.4.6. Linearity

The linearity of an analytical method is the ability within a definite range to obtain results directly proportional to the concentration of the analyte in the sample (17,21,30). It was

evaluated comparing spiked samples with different concentrations and standard solutions. Good relationship was shown between introduced and back calculated concentration. A regression line fitted on the back-calculated results obtained with the selected calibration curve and the concentration levels of the validation standards led to the equation:

$$Y = -1.176 + 0.9995X.$$

The linearity of the results generated by the method is demonstrated in figure 34 showing that the 90% β -expectation tolerance limits expressed in concentration units are totally included between the $\pm 30\%$ acceptance limits.

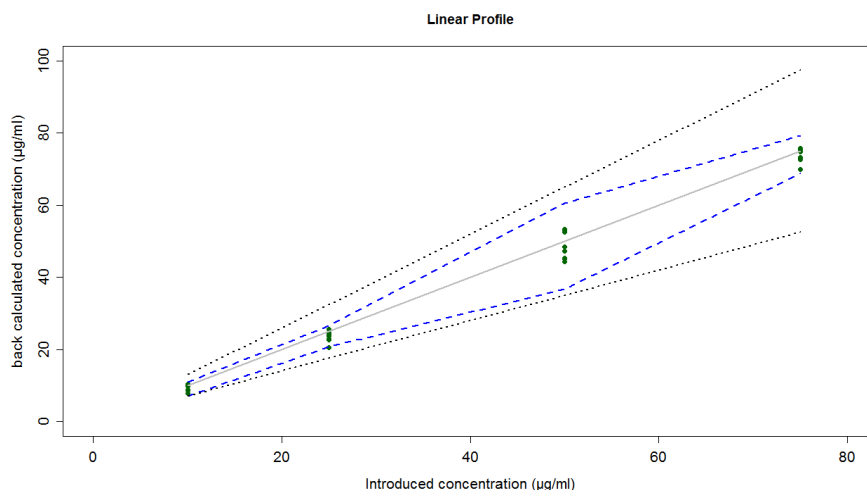


Figure 34: Linearity profile of dicentrine. The continuous line is the identity line $y = x$, the dotted lines are the $\pm 30\%$ acceptance limits expressed in concentration units ($\mu\text{g/ml}$ of dicentrine) and the dashed lines are the upper and lower β -expectation tolerance limits ($\beta = 90\%$) also expressed in $\mu\text{g/ml}$ of dicentrine.

3.5. Sample analyses

Two samples of leaves of *S. penduliflorum* collected in the same region but in different period were analyzed 3 times. Sample 1 was collected in March 2007 while the second one in December 2009. The amounts of dicentrine obtained using the newly developed and validated method were respectively $1.42 \pm 0.06\%$ (m/m) for S1 and $1.015 \pm 0.007\%$ for S2.

4. Conclusion

A novel analytical method for the quantification of dicentrine in leaves of *S. penduliflorum* was developed using DoE and DS methodology. This methodology allowed the separation of dicentrine and its positional isomer without using specific column or mobile phase. The DS which corresponds to the robustness of the method was also defined. 11 other compounds were then separated and some of them were identified by MS detection, showing the advantage of hyphenated techniques for peak identification and to confirm the selectivity of the analytical method.. This method was then successfully validated using the accuracy profile methodology within the range of 10 to 75 µg/ml of dicentrine.

This analytical method is suitable for routine analyses and was used for the quantification of dicentrine, the major vasorelaxant compound, in two plant samples, giving results of 1.42 and 1.015%. These preliminary results show the variability of the active principle content in plants according to their harvesting season. It also shows the necessity of a quantification of dicentrine to standardize the activity of the plant extract, and then of the development of such a validated method. Moreover, the developed method allowed the separation of several alkaloids and molecules whose structures were analysed by MS. Nevertheless, MS did not allow to determine the stereochemistry and to distinguish between isomers, but the analytical method can also be the basis of preparative purifications of crude extract of *S. penduliflorum* to provide enough pure compounds for NMR analysis. The determination of the structures and stereochemistries of these compounds could be finally determined.

Acknowledgements

We are thankful to the «Coopération Universitaire pour le Développement» and «l'Université Catholique de Louvain» for the Financial supports. We acknowledge Dr Gabrielle Chataigné, Marie Christine Fayt, Jean Paul Vanhelpute, Ramazan Colak, Aubin Randrianirina for technician assistance and Benja Rakotonirina for botanical identification.

The authors would like to thank the Wallone Region of Belgium for the PPP convention funds N°917007 and Arlenda SA for partial funding of Optimal-DS project. A research grant from the Belgium National Fund for Scientific Research (F.R.S-FNRS) to E. Rozet is also gratefully acknowledged.

Bibliography

- (1) Zafera Rabesa, A. *Pharmacopée de l'Alaotra*; Antananarivo, 1986.
- (2) A, S., G.H. & Gurib-Fakim, *Plantes médicinales 1*; PROTA, 2008.
- (3) Rasoanaivo, P.; Ratsimamanga-Uverg, S.; Rakoto-Ratsimamanga, A. Isoquinoline alkaloid constituents of *Spirospermum penduliflorum* and *Strychnopsis thouarsii* (Menispermaceae). *Biochemical systematics and ecology* **23**, 679–680.
- (4) Teng, C. M.; Yu, S. M.; Ko, F. N.; Chen, C. C.; Huang, Y. L.; Huang, T. F. Dicentrine, a natural vascular alpha 1-adrenoceptor antagonist, isolated from *Lindera megaphylla*. *British Journal of Pharmacology* **1991**, *104*, 651–656.
- (5) Yu, S. M.; Hsu, S. Y.; Ko, F. N.; Chen, C. C.; Huang, Y. L.; Huang, T. F.; Teng, C. M. Haemodynamic effects of dicentrine, a novel alpha 1-adrenoceptor antagonist: comparison with prazosin in spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *British Journal of Pharmacology* **1992**, *106*, 797–801.
- (6) Mustafa, M. R.; Achike, F. I. Dicentrine is preferentially antagonistic to rat aortic than splenic alpha 1-adrenoceptor stimulation. *Acta Pharmacologica Sinica* **2000**, *21*, 1165–1168.
- (7) Young, M. L.; Su, M. J.; Wu, M. H.; Chen, C. C. The electrophysiological effects of dicentrine on the conduction system of rabbit heart. *British Journal of Pharmacology* **1994**, *113*, 69–76.
- (8) Lai, Y. C.; Kuo, T. F.; Chen, C. K.; Lee, S. S. Dicentrine metabolites characterized in miniature pid urine by HPLC-SPE-NMR.
- (9) Tsai, T. H.; Tsai, T. R.; Chou, C. J.; Chen, C. F. Determination of dicentrine in rat plasma by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications* **1996**, *681*, 277–281.
- (10) Stévigny, C.; Wautier, M.-C.; Habib Jiwan, J.-L.; Chiap, P.; Hubert, P.; Quetin-Leclercq, J. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for quantitative determination of aporphine alkaloids from different samples of *Cassytha filiformis*. *Planta Medica* **2004**, *70*, 764–770.
- (11) Lebrun, P.; Govaerts, B.; Debrus, B.; Ceccato, A.; Caliaro, G.; Hubert, P.; Boulanger, B. Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2008**, *91*, 4–16.
- (12) Debrus, B.; Lebrun, P.; Ceccato, A.; Caliaro, G.; Rozet, E.; Nistor, I.; Oprean, R.; Rupérez, F. J.; Barbas, C.; Boulanger, B.; Hubert, P. Application of new methodologies based on design of experiments, independent component analysis and design space for robust optimization in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *691*, 33–42.
- (13) Debrus, B.; Lebrun, P.; Ceccato, A.; Caliaro, G.; Govaerts, B.; Olsen, B. A.; Rozet, E.; Boulanger, B.; Hubert, P. A new statistical method for the automated detection of peaks in UV-DAD chromatograms of a sample mixture. *Talanta* **2009**, *79*, 77–85.
- (14) Debrus, B.; Lebrun, P.; Rozet, E.; Nistor, I.; Ceccato, A.; Caliaro, G.; Oprean, R.; Boulanger, B.; Hubert, P. Nouvelle méthodologie pour le développement automatisé de méthodes analytiques en chromatographie liquide pour l'analyse de mélanges de composés inconnus. *Spectra Analyse* **2009**, *268*, 28–33.
- (15) Molnár, I.; Rieger, H.-J.; Monks, K. E. Aspects of the « Design Space » in high pressure liquid chromatography method development. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 3193–3200.
- (16) Peterson, J. J. A posterior predictive approach to multiple response surface optimization. *Journal of quality technology* **36**, 139–153.

- (17) Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Valat, L.; Rozet, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal: Part IV. Examples of application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, *48*, 760–771.
- (18) Rozet, E.; Wascotte, V.; Lecouturier, N.; Préat, V.; Dewé, W.; Boulanger, B.; Hubert, P. Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation: Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *591*, 239–247.
- (19) International Conference of Harmonization (ICH) of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Topic Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology **2005**.
- (20) Dewé, W.; Marini, R. D.; Chiap, P.; Hubert, P.; Crommen, J.; Boulanger, B. Development of response models for optimising HPLC methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2004**, *74*, 263–268.
- (21) ICH Q2 (R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and methodology*; 2005.
- (22) Vander Heyden, Y.; Nijhuis, A.; Smeyers-Verbeke, J.; Vandeginste, B. G. .; Massart, D. . Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2001**, *24*, 723–753.
- (23) Dejaegher, B.; Heyden, Y. V. Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1158*, 138–157.
- (24) Marini, R. D.; Rozet, E.; Heyden, Y. V.; Ziemons, E.; Boulanger, B.; Bouklouze, A.; Servais, A.-C.; Fillet, M.; Crommen, J.; Hubert, P. Robustness testing of a chiral NACE method for R-timolol determination in S-timolol maleate and uncertainty assessment from quantitative data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *44*, 640–651.
- (25) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation **2001**.
- (26) Viswanathan, C. T.; Bansal, S.; Booth, B.; DeStefano, A. J.; Rose, M. J.; Sailstad, J.; Shah, V. P.; Skelly, J. P.; Swann, P. G.; Weiner, R. Workshop/conference report—Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: Best practices for chromatographic and ligand binding assays. *The AAPS Journal* **2007**, *9*, E30–E42.
- (27) Stévigny, C.; Jiwan, J. H.; Rozenberg, R.; de Hoffmann, E.; Quetin - Leclercq, J. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 523–528.
- (28) Bouabidi, A.; Rozet, E.; Fillet, M.; Ziemons, E.; Chapuzet, E.; Mertens, B.; Klinkenberg, R.; Ceccato, A.; Talbi, M.; Streel, B.; Bouklouze, A.; Boulanger, B.; Hubert, P. Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 3180–3192.
- (29) Boulanger, B.; Rozet, E.; Moonen, F.; Rudaz, S.; Hubert, P. A risk-based analysis of the AAPS conference report on quantitative bioanalytical methods validation and implementation. *Journal of Chromatography B* **2009**, *877*, 2235–2243.
- (30) Rozet, E.; Ceccato, A.; Hubert, C.; Ziemons, E.; Oprean, R.; Rudaz, S.; Boulanger, B.; Hubert, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1158*, 111–125.
- (31) Rafamantanana, M. H.; Rozet, E.; Raoelison, G. E.; Cheuk, K.; Ratsimamanga, S. U.; Hubert, P.; Quetin-Leclercq, J. An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (APIACEAE). *Journal of Chromatography B* **2009**, *877*, 2396–2402.

- (32) Kpoviéssi, D. S. S.; Gbaguidi, F.; Gbénou, J.; Accrombessi, G.; Moudachirou, M.; Rozet, E.; Hubert, P.; Quetin-Leclercq, J. Validation of a method for the determination of sterols and triterpenes in the aerial part of *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders by capillary gas chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, 48, 1127–1135.

Chapitre 3

**Quantitative determination of triterpenic
glycosides and their aglycones in leaves of
Centella asiatica Urb. (Apiaceae) by HPLC-
UV**

Centella asiatica (L.) Urb. (*C. asiatica*) known as a memory enhancer, a tonic and mainly for its wound healing properties is largely used nowadays in cosmetic industries as indicated in the introduction section. Its anti-age properties and its effectiveness for the treatment of skin disorders (varicous vein, stretch marks, wrinkles...) were also investigated and proved to be mainly due to the presence of triterpenes in the plant leaves: asiaticoside, madecassoside, asiatic acid and madecassic acid. The content of triterpenes in leaves is therefore an important quality feature of batches which collected in different geographical regions and periods and thus may contain variable amounts of triterpenes (1).

This work dealt with the development and validation of an improved HPLC-UV method for the quantification of these four major triterpenes in leaves of *C. asiatica*. It was published before the revised monograph of the European Pharmacopoeia.

This chapter is adapted from the article published in Journal of chromatography B.

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

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

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

^b *Groupe de Recherche en Pharmacognosie, Louvain Drug Research Institute (LDRI), Université catholique de Louvain, Av. Mounier 7230 Bte 7203, 1200 Bruxelles, Belgium.*

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

^d *Chargé de Recherches F.R.S.-FNRS (Belgium)*

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

1. Introduction

Centella asiatica (Apiaceae) is an ethnomedicinal herbaceous species, originated from India which grows spontaneously in subtropical regions: China, Malaysia, Australia, America, South Africa and Madagascar. In Madagascar, the plant is largely used by the local population and is the second medicinal species exported (2). *C. asiatica* is claimed to have a number of medicinal properties and is used in Ayurvedic medicine for the treatment of leprosy, skin tuberculosis, wound healing, stomach aches, arthritis, varicose veins, high blood pressure and as a memory enhancer (3). Recently, several studies demonstrated that extracts of the plant possess antioxidant activity (4,5), have antiproliferative effects in tumor cells (6), improve venous wall alterations in chronic venous hypertension and protect the venous endothelium (7). Asiaticoside, one of its active molecules, is reported to cause changes in gene expression and to induce type I collagen synthesis in human fibroblasts (8–10). Madecassoside was reported to have an anti-rheumatoid effect and wound healing properties (11,12). Triterpenes of *C. asiatica* (Fig. 35) are components of medicinal drugs and are much used in cosmetic preparations for skin care (13,14). Collected during all year long, considerable differences of the triterpenoid contents were observed according to geographic regions, phenotype and genotype (15,16), so the assessment of a validated analytical method is necessary. This will also help local population to determine the best cultivating and harvesting conditions.

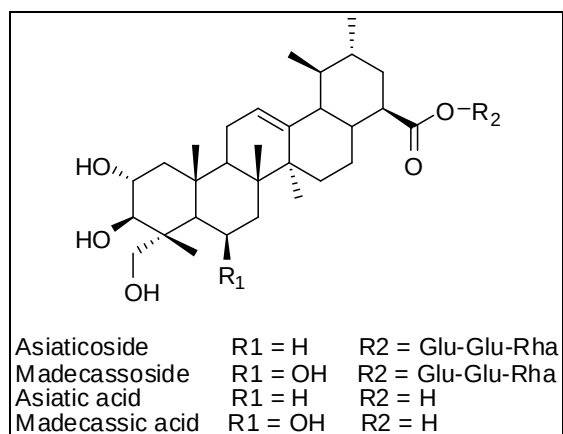


Figure 35: Structure of triterpenes of *C. asiatica* (Glu: glucose, Rha: rhamnose).

Most studies led on *C. asiatica* report the quantification of heterosides (17,18), acids (19) or acids and heterosides but with insufficiently validated methods (15,16,20–22). Several reported methods were based on HPLC differing only in the mobile phase composition or in the detection system. Xingyi *et al.* (17) proposed a method only dedicated for the quantification of madecassoside and asiaticoside using acetonitrile/water (29/17, v/v) in isocratic mode. Quantification of only madecassoside, asiaticoside and its isomer has been reported by Zhang *et al.* (18) using ELSD detector. An addition of cyclodextrin in the mobile phase was used for the quantification of the sole madecassic acid (19). The existing methods for the simultaneous quantification of madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid used either acetonitrile/water (20), acetonitrile/water with TFA 0.1% (21) or acetonitrile/water each containing 0.05% of H_3PO_4 as mobile phase (22), together with detection at 205 nm. Most methods did not give good resolution or were not suitable for LC–MS and all were insufficiently validated (20–22). The monography of the European Pharmacopeia (1) quantifies total triterpenes (Fig. 35a) but our attempts to reproduce the separation did not allow us to quantify precisely these compounds. Only the peak corresponding to madecassoside was clearly identified, asiaticoside and the two aglycones eluted during the washing part of the gradient and were not distinguished (Fig. 35b). This was also observed by the European Pharmacopeia expert group in which the monography is under revision. The main objective of this work is thus to improve the existing methods based on HPLC-UV and validate it for the simultaneous quantitation of madecassoside, asiaticoside and their aglycones, madecassic and asiatic acids in *C. asiatica*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and plant material

Asiaticoside (99%, HPLC), madecassoside (98%, HPLC), asiatic acid (99%, HPLC) and madecassic acid (95%, HPLC) were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Acetonitrile and methanol HPLC grade were from Prolabo, VWR (Leuven, Belgium). Fresh leaves of *C. asiatica* (L.) Urban were collected in December 2007 and January 2008 at the East and High Plateau regions of Madagascar (18°58'18"S, 048°34'49"E and 18°55'34"S, 047°28'48"E).

Leaves were separated from stems, dried at 40°C, powdered and sifted with a sieve of 355 µm meshes (1). The powdered leaves were stored at ambient temperature in obscurity and in a dry area. One gram dried powdered leaves (1) were extracted by Soxhlet for 8 h with 100 ml of methanol. The extracts were evaporated to dryness under reduced pressure. The dried crude extract was dissolved in 10 ml of methanol, filtered through a 0.45 µm filter (Whatman, New Jersey, USA).

2.2. Apparatus

The HPLC Waters 2690 separation module (Waters, Milford, MA, USA) used consisted of a pump, an autoinjector, a UV spectrophotometric detector Kromaton (Angers, France), all controlled by Borwin software (Borwin, Rostock, Germany).

For the determination of mass spectra, a LCQ Advantage Thermo Finnigan (Waltham, MA, USA) was used piloted by X-Calibur software. Chromatographic separation was performed with a reversed phase RP-18 LiChroCART® column (250 mm × 4 mm I.D.; particle size: 5 µm). Mobile phase was a gradient of acetonitrile/water (Table 12), a flow rate of 1 ml/min and detection at 206 nm.

Table 12: Gradient conditions for HPLC

Time (Minutes)	Pump A Water %	Pump B Acetonitrile %
0	80	20
15	65	35
30	35	65
35	20	80
40	20	80
45	80	20
55	80	20

2.3. Standards solutions

Stock solutions of asiaticoside and asiatic acid were prepared in methanol at 5.0 and 2.5 mg/ml, respectively, and stored at 0°C. Dilution was done for each experiment. Three concentrations (m = 3) of asiaticoside (0.5, 2.5 and 5.0 mg/ml) and of asiatic acid (0.25, 1.0 and 2.5 mg/ml) were used. Each concentration was analyzed two times (n = 2) for 3 days (k = 3). The extract solution was diluted with methanol (1:5, v/v) for the preparation of the validation standards and spiked with three known concentrations of a stock mixture of

asiaticoside and asiatic acid. Each validation standard was analysed three times ($n = 3$) for 3 days ($k = 3$).

2.4. Evaluation of the extraction

The extraction method described in European Pharmacopoeia (1) was verified. The extraction kinetic was established by evaluating the peak area (HPLC analysis) of each compound after 4, 6, 8 and 10 h ($n = 3$). The most appropriate Soxhlet extraction time was determined using these data.

2.5. Validation of the method

All the reference compounds are commercially available but asiaticoside and asiatic acid were selected to achieve the validation of the method and to quantify madecassoside and madecassic acid, respectively, because we observed identical response factors for the two osides and the two aglycones in HPLC-UV (Table 13). Consequently, choosing only two references reduces the cost of the analysis.

The calibration standard and the validation standard with matrix were used for the validation of the method.

Table 13: Peaks area ratio of the different compounds investigated with asiaticoside

Compounds	Madecassoside	Asiaticoside	Madecassic acid	Asiatic acid
Reference standards Purity	97.94%	99.2%	95%	99%
Peak area ratio ^a ($n = 2$)	1 ± 0.5^b	1.0 ± 0.2^b	2.1 ± 1.3^b	2.1 ± 0.3^b

^aArea ratio for each compound was calculated using the response of asiaticoside (major compound) as reference.

^bRSD (%)

As *C. asiatica* is a biological matrix, relatively large acceptance limits are prescribed (23). Validation of the method was done for 3 days by testing the following criteria: response function, linearity, trueness, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), and quantification range. Statistical analyses of data were done using the e-noval V2.0 (Arlenda-Liège) software.

3. Results and discussions

3.1. Chromatographic separation

The chromatogram of an extract of *C. asiatica* using the European Pharmacopoeia method showed that all peaks eluted at the end of the gradient (Fig. 36b). Comparison of the chromatogram (Fig. 36a) with the chromatograms obtained with our method (Fig. 36c and d) shows its good resolution and the interest of this developed method for the quantification of aglycones. We also observed that madecassoside and its isomer (asiaticoside B also called terminoloside) were slightly separated, but as both are considered to be active and are usually not separated; we added both areas and considered both peaks as one madecassoside peak to allow comparison with other results.

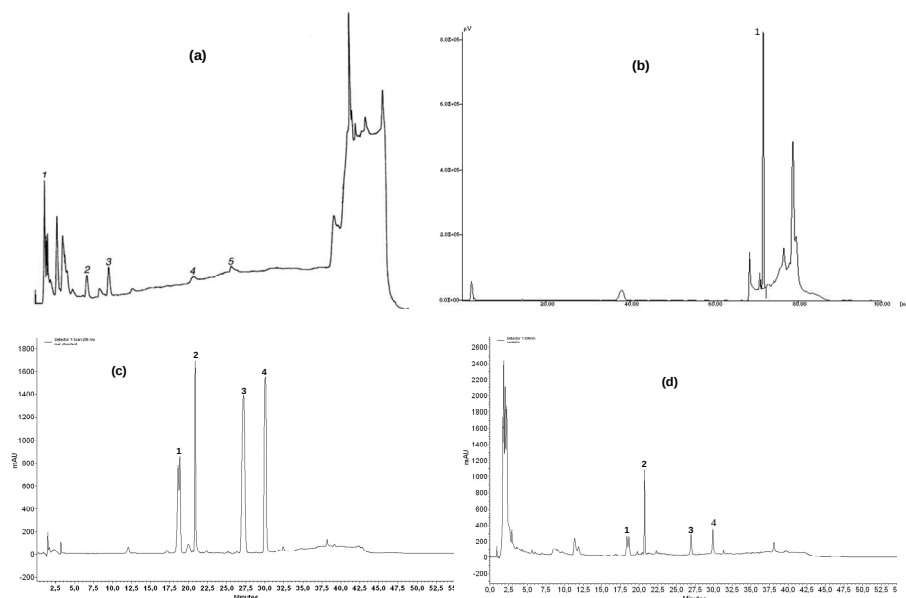


Figure 36: (a) Chromatogram of a crude extract of *C. asiatica* given in European Pharmacopoeia (2002) (1: solvent, 2: madecassoside (TR = 5.8), 3: asiaticoside (TR = 8.1), 4: madecassic acid (TR = 17.6), 5: asiatic acid (TR = 21.7)). (b) Chromatogram of a crude extract of *C. asiatica* obtained in our lab with European Pharmacopoeia method (1: madecassoside). (c) Chromatogram of reference standards with the developed method (1: madecassoside and its isomer asiaticoside B, 2: asiaticoside, 3: madecassic acid, 4: asiatic acid). (d) Chromatogram of a crude extract of *C. asiatica* with the developed method.

3.2. Optimization of the extraction

Several extraction modes were proposed such as maceration, sonication or Soxhlet. Soxhlet extraction was selected as it is easier to control. As illustrated in figure 37, despite the visible increase of the mean extraction efficiency for the 4 triterpenes between 4 and 8 hours of extraction, the Student test (p value <0.05) did not detect any significant difference between all extraction durations. However, an extraction time of 8 h was used for all experiments as recommended by the European Pharmacopeia. These results also indicated that the problem observed with the European Pharmacopeia method is due to the chromatographic conditions and not an extraction failure.

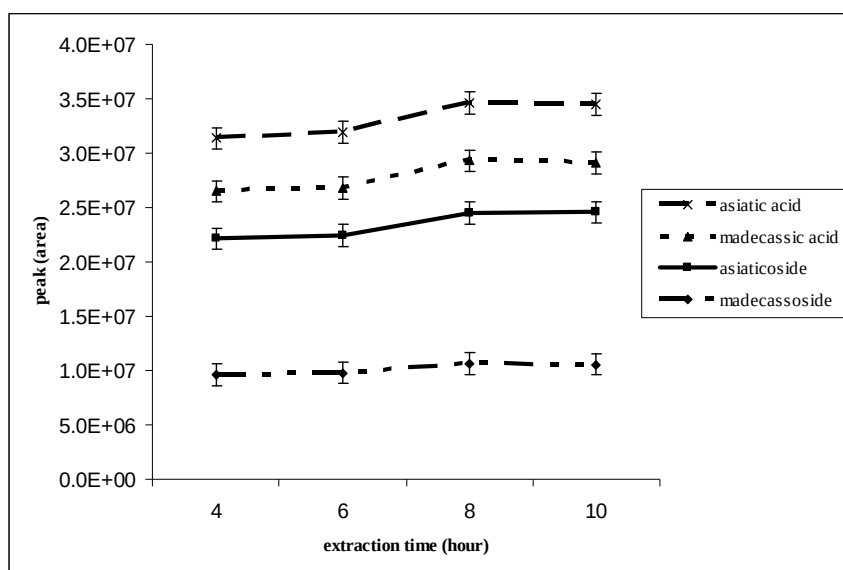


Figure 37: Madecassoside, asiaticoside, madecassic and asiatic acids responses after different times of Soxhlet extraction of *C. asiatica* ($n = 3$, $RSD < 1\%$). No statistical difference was observed between quantity extracted at the different extraction times (Student test $p < 0.05$)

3.3. Method validation

3.3.1. Selectivity and peak purity

Selectivity and peak purity were analysed by the comparison of retention times and mass spectra with reference compounds. Mass spectra were analysed at three levels (beginning, middle and end) of each peak investigated and found to be comparable (Fig. 38a–d).

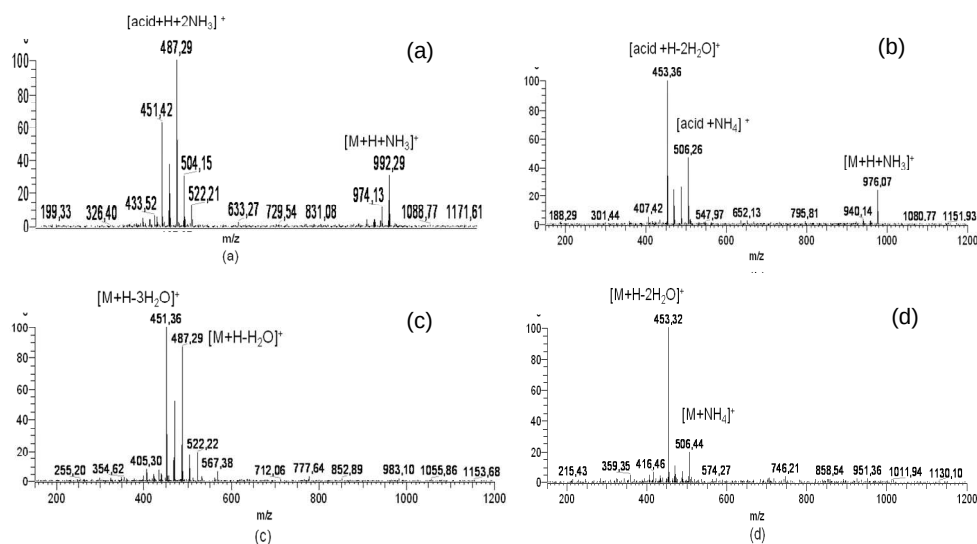


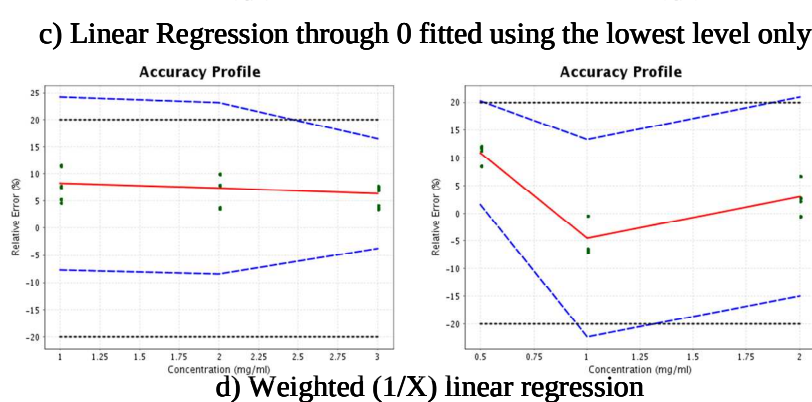
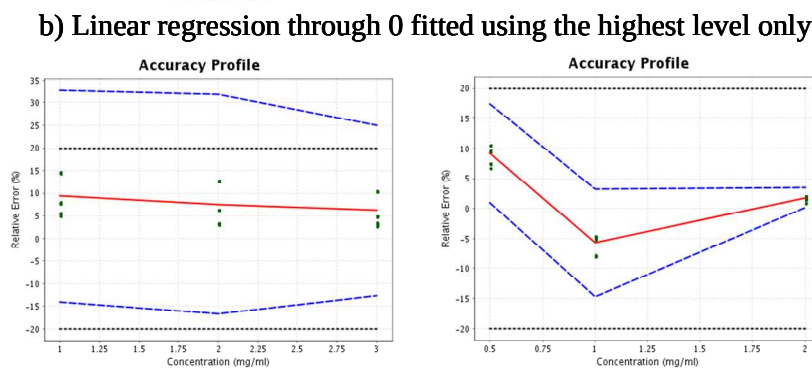
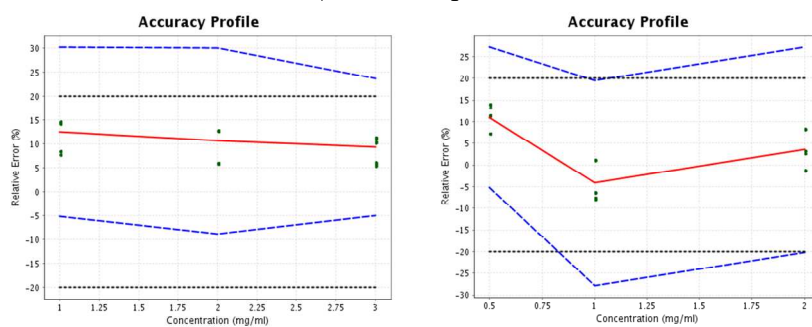
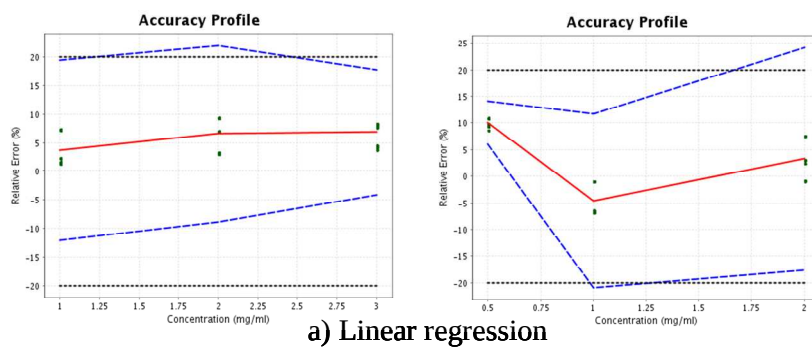
Figure 38: Positive ion mode mass spectra obtained for peaks of the methanol extract of *C. asiatica*: (a) madecassoside $[M+NH_4]^+ = 992$; (b) asiaticoside $[M+NH_4]^+ = 976$; (c) madecassic acid $[M+NH_4]^+ = 522$; (d) asiatic acid $[M+NH_4]^+ = 506$.

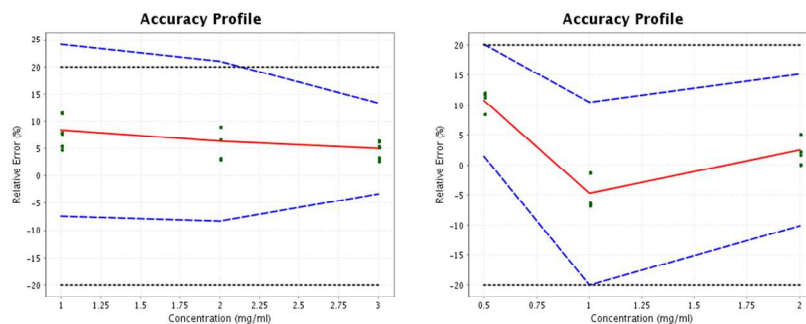
3.3.2. Response function

Calibration standards of asiaticoside and asiatic acid were prepared without matrix ($m = 3$, $n = 2$). Ten different regression models were tested such as: linear regression, linear regression through 0 fitted using the highest level only, linear regression through 0 fitted using the lowest level only, weighted ($1/X$) linear regression, weighted ($1/X^2$) linear regression, linear regression after logarithm transformation, linear regression after square root transformation, quadratic regression, weighted ($1/X$) quadratic regression, weighted ($1/X^2$) quadratic regression. Accuracy profiles were plotted to determine the most suitable regression model (24). A regression model is selected if the 95% β -expectation tolerance intervals were totally included inside the $\pm 20\%$ acceptance limits predefined. For both analytes (asiaticoside and asiatic acid), figure 38a-g show that for accuracy profiles obtained by linear regressions except the linear regression through 0 fitted using the lowest level for asiatic acid, the 95% β -expectation tolerance intervals were not included in the acceptance limits over the whole concentration range of the validation standard. On the other hand, all quadratic regressions gave good results (Fig. 39h-j). The quadratic regression was then selected as the most adequate one for both standards for the response function.

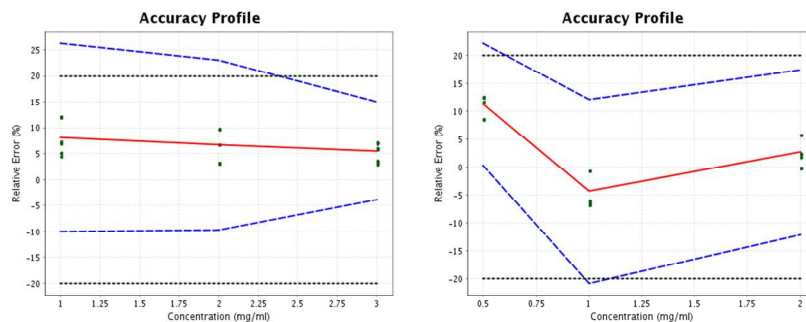
Asiaticoside

Asiatic acid

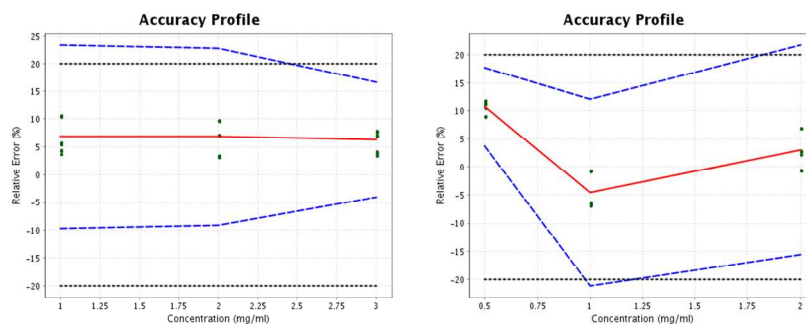




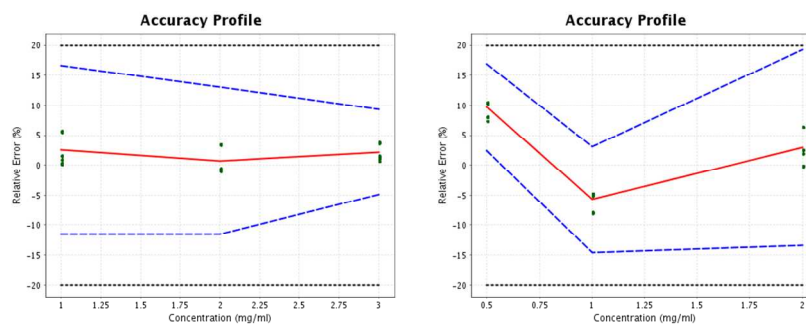
e) Weighted (1/X²) linear regression



f) Linear regression after logarithm transformation



g) Linear regression after square root transformation



h) Quadratic regression

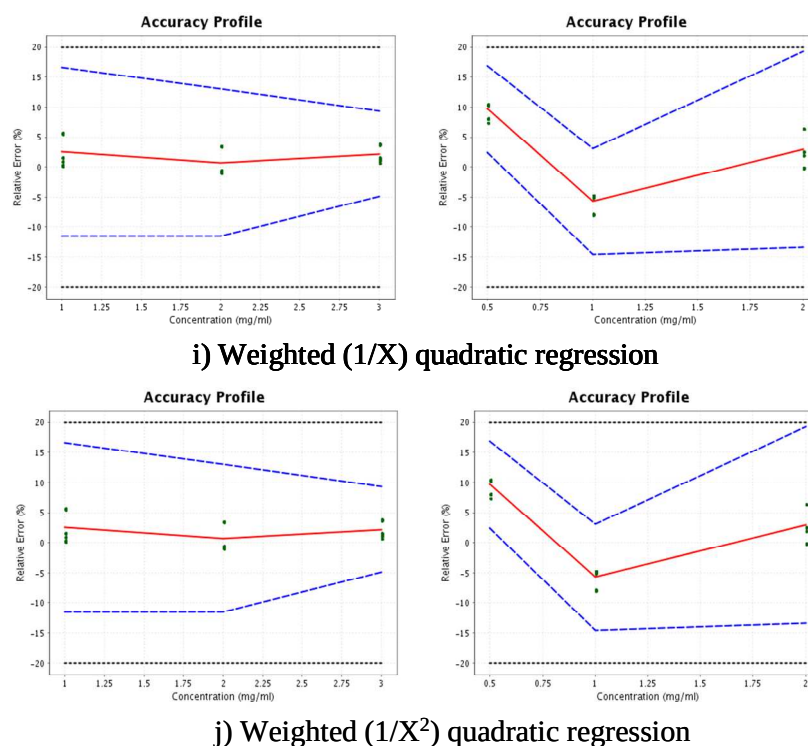


Figure 39: Accuracy profiles of asiaticoside and asiatic acid obtained with different regression models (The plain line is the relative bias, dashed lines are the β -expectation tolerance limits ($\beta = 95\%$) and dotted lines represent the acceptance limits ($\pm 20\%$). The dots represent the relative back-calculated concentrations of the validation standards and are plotted according to their targeted concentration).

3.3.3. Trueness and precision

Trueness (25,26) is expressed in relative bias (%) at each concentration level of the validation standards. Relative bias was less than 3% (Table 14) for asiaticoside and 10% for acid asiatic showing the excellent trueness of the method.

Precision was evaluated in terms of standard deviation (SD, mg/ml) and relative standard deviation (RSD %) values for repeatability and intermediate precision (27,28). As seen in Table 14, RSD (%) for repeatability and intermediate precision did not exceed 4%.

3.3.4. Accuracy, LOD and LOQ

Accuracy allows to evaluate total error, the sum of systematic and random errors of the tests results (24–28). For asiaticoside and asiatic acid, as illustrated in figure 39h, their respective accuracy profiles obtained with quadratic regression show that the relative upper and lower 95% β -expectation tolerance limits are totally included inside the acceptance limits

set at $\pm 20\%$. The method can thus be considered as accurate between 1.0 and 3.0 mg/ml for asiaticoside and between 0.5 and 2.0 mg/ml for asiatic acid.

For asiaticoside and asiatic acid, LOD (the smallest quantity of the analyte that can be detectable in the sample, but not quantifiable) were 0.0113 and 0.0023 mg/ml, respectively. These results were estimated using the mean intercept of the calibration model and the residual variance of the regression. The LOQ (the smallest quantity quantifiable in the sample) were determined with the accuracy profiles as they are the smallest concentration levels where the 95% -expectation tolerance limits remain inside the $\pm 20\%$ acceptance limits (24–26). In other words, they are the smallest concentration levels with a maximum total error of 20%. As shown in figure 39h, the LOQ are the smallest concentration levels of the validation standards, i.e. 1.0 and 0.5 mg/ml for asiaticoside and asiatic acid, respectively.

3.3.5. Uncertainty of the measurment

Uncertainty of the measurement characterises the dispersion of the values that could reasonably be attributed to the measurement results (29,30). It was evaluated using expanded uncertainty where true value can be observed with a confidence level at 95%. Table 15 shows that relative expanded uncertainties were less than 10% for asiaticoside and asiatic acid which means that the unknown true value is located at a maximum of $\pm 10\%$ around the measured result.

3.3.6. The linearity

The linearity demonstrated the relationship between introduced and calculated concentration (25,26,28) using 95% β -expectation tolerance interval approach. It was evaluated comparing spiked samples and standard solutions. The concentrations of the validation standards were back-calculated in order to determine, by concentration level, the mean relative bias as well as the upper and lower β -expectation tolerance intervals. The acceptance limits were set at $\pm 20\%$. In order to demonstrate method linearity, a regression line was fitted on the calculated concentrations of the validation standards as a function of the introduced concentrations by applying a linear regression model. The equations obtained for asiaticoside and asiatic acid with their coefficient of determination are presented in Table 14. The slopes values obtained for the two standards were, respectively 1.02, 1.023. Figure 40a and b demonstrate the linearity of the results.

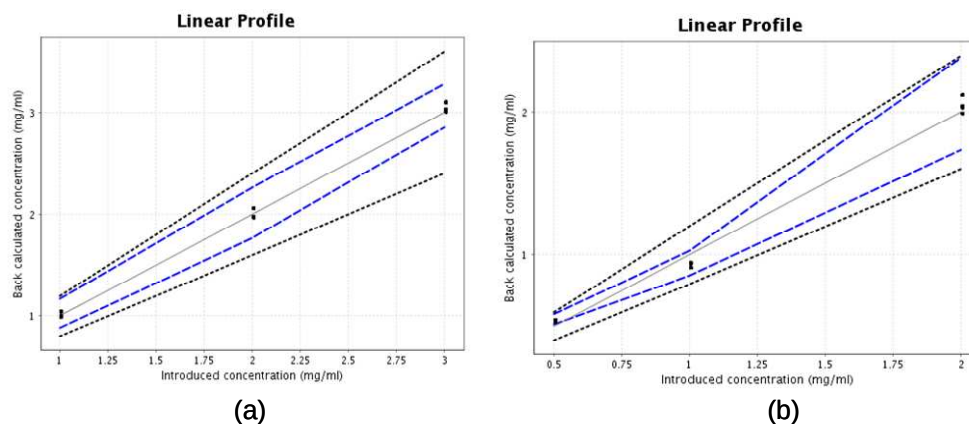


Figure 40: Linear profiles of asiaticoside (c) and asiatic acid (d). The continuous line is identity line ($y = x$), the dotted lines are the upper and lower acceptance limits in absolute values and the dashed lines are the upper and lower β -expectation tolerance limits ($\beta = 95\%$).

Table 14: Validation results in crude extract of *C. asiatica*.

Validation criteria	Asiaticoside		Asiatic acid	
Response function	Quadratic regression Calibration range (3 points) 0.5 – 5 mg/ml		Quadratic regression Calibration range (3 points) 0.25 – 2.5 mg/ml	
Trueness	Concentration	Relative bias (%)	Concentration	Relative bias (%)
	1 mg/ml	2.6	0.5 mg/ml	9.7
	2 mg/ml	0.7	1 mg/ml	-5.8
	3 mg/ml	2.2	2 mg/ml	3
Precision	Repeatability (SD mg/ml)	Intermediate precision (RSD %)	Repeatability (SD mg/ml)	Intermediate precision (RSD %)
	0.2313	2.9	0.2421	1.5
	0.0987	2.5	0.1427	1.8
	0.252	1.5	0.1997	3.3
Accuracy	β -expectation lower and upper tolerance limits of the relative error (%) -11.5, 16.6 -11.6, 13.0 -5.0, 9.3		β -expectation lower and upper tolerance limits of the relative error (%) 2.5, 16.9 -14.6, 3.1 -13.4, 19.3	
Linearity	Slope Intercept r^2		Slope Intercept r^2	
	1.02 -0.005007 0.998		1.023 -0.01017 0.9912	

Table 15: Estimates of the measurement uncertainties related to asiaticoside and asiatic acid, at each concentration level investigated in validation using quadratic regression model

	Concentration level (mg/ml)	Mean introduced concentration (mg/ml)	Uncertainty of the bias (mg/ml)	Uncertainty (mg/ml)	Expanded Uncertainty (mg/ml)	Relative Expanded Uncertainty (%)
Asiaticoside	1.0	1.0	0.016	0.032	0.065	6.6
	2.0	2.0	0.028	0.057	0.114	5.7
	3.0	3.0	0.025	0.051	0.102	3.4
Asiatic acid	0.5	0.5	0.004	0.008	0.017	3.4
	1.0	1.0	0.010	0.020	0.041	4.1
	2.0	2.0	0.038	0.076	0.152	7.6

3.3.7. Application to samples of *C. asiatica*

Three samples of *C. asiatica* were collected in the East and High Plateau regions of Madagascar. Extracts were analyzed and the results obtained by our method and the data described in the literature (15,16) are given in Table 16. Our results are in the same range than those obtained in the previous works. The heterosides are more abundant than aglycones and asiaticoside is often the major compound. Nevertheless, differences occur between samples and those analyzed here seemed less rich than the others, but we have to point out that all these other methods were not validated so the reliability of these results needs caution. This proposed method gives low RSD (%) values and is reliable. These results stress the importance of a good quantification method to determine the best culture and harvesting conditions.

A validated method for the quantification of asiaticoside, madecassoside, asiatic and madecassic acids in drug samples of *C. asiatica* was developed. This method allows the simultaneous quantification of madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid. Most of other validated methods only quantified some of these active molecules. Furthermore, the method described in European Pharmacopeia does not give good signal to noise ratio for the accurate quantification of aglycones and was not reproducible in our laboratory. The method developed and validated was then successfully applied to quantify these four compounds in different samples of *C. asiatica* collected in Madagascar.

Table 16: Comparison of the content of triterpenes in *C. asiatica* samples analysed by our method ($n = 3$) in % of the dry plant with results given in previous works [14, 15]

Sample	Madecassoside	Asiaticoside	Madecassic acid	Asiatic acid
S1	1.7 ± 0.04	2.0 ± 0.02	0.95 ± 0.039	0.98 ± 0.03
S2	1.27 ± 0.013	1.63 ± 0.04	<LOD	<LOD
S3	1.64 ± 0.02	1.75 ± 0.02	0.72 ± 0.02	0.72 ± 0.08
CA-1 [14]	4.76 ± 1.342	5.23 ± 0.025	1.97 ± 0.007	1.89 ± 0.08
CA-2 [14]	4.28 ± 0.124	4.52 ± 0.138	1.88 ± 0.07	1.79 ± 0.102
CA-3 [14]	5.89 ± 0.15	6.42 ± 0.48	0.23 ± 0.00	0.16 ± 0.07
CA-4 [14]	3.23 ± 0.06	3.37 ± 0.26	0.37 ± 0.09	0.44 ± 0.17
CA-5 [14]	4.74 ± 0.23	4.58 ± 0.63	0.23 ± 0.08	0.25 ± 0.10
CA-6 [14]	2.38 ± 0.18	2.67 ± 0.27	0.42 ± 0.29	0.36 ± 0.28
CA-7 [14]	2.76 ± 0.29	3.09 ± 0.24	0.12 ± 0.05	0.09 ± 0.07
Leaves type-1 [15]	3.62 ± 0.29	3.68 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Leaves type-2 [15]	2.76 ± 0.15	3.13 ± 0.14	0.59 ± 0.12	0.64 ± 0.14

$\pm$ RSD%

Bibliography

- (1) Péchard, G.; Antona, M.; Aubert, S.; Koszycki, D. Ressources phytogénétiques, contrats et application de la Convention biodiversité à Madagascar: une approche prospective. Phytogenetic resources, contrats and the application of the convention on biodiversity in Madagascar: a prospective approach. *Recur. Bois et forêts des tropiques* **2005**, 45-58.
- (2) Boiteau, P.; Ratsimamanga, A. R. L'asiaticoside extrait de *Centella asiatica* et ses emplois thérapeutiques dans la cicatrisation des plaies expérimentales et rebelles (lèpre, tuberculose cutanée et lupus). *Thérapie* **1956**, 11, 125-149.
- (3) Jayashree, G.; Kurup Muraleedhara, G.; Sudarslal, S.; Jacob, V. B. Anti-oxidant activity of *Centella asiatica* on lymphoma-bearing mice. *Fitoterapia* **2003**, 74, 431-434.
- (4) Gnanapragasam, A.; Kumar Ebenezer, K.; Sathish, V.; Govindaraju, P.; Devaki, T. Protective effect of *Centella asiatica* on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. *Life Sciences* **2004**, 76, 585-597.
- (5) Yoshida, M.; Fuchigami, M.; Nagao, T.; Okabe, H.; Matsunaga, K.; Takata, J.; Karube, Y.; Tsuchihashi, R.; Kinjo, J.; Mihashi, K.; Fujioka, T. Antiproliferative Constituents from Umbelliferae Plants VII. Active Triterpenes and Rosmarinic Acid from *Centella asiatica*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2005**, 28, 173-175.
- (6) Incandela, L.; Cesarone, M. R.; Cacchio, M.; De Sanctis, M. T.; Santavenere, C.; D'Auro, M. G.; Bucci, M.; Belcaro, G. Total triterpenic fraction of *Centella asiatica* in chronic venous insufficiency and in high-perfusion microangiopathy. *Angiology* **2001**, 52 Suppl 2, S9-13.
- (7) Coldren, C. D.; Hashim, P.; Ali, J. M.; Oh, S.-K.; Sinskey, A. J.; Rha, C. Gene expression changes in the human fibroblast induced by *Centella asiatica* triterpenoids. *Planta Medica* **2003**, 69, 725-732.
- (8) Lu, L.; Ying, K.; Wei, S.; Liu, Y.; Lin, H.; Mao, Y. Dermal fibroblast - associated gene induction by asiaticoside shown *in vitro* by DNA microarray analysis. *British Journal of Dermatology* **2004**, 151, 571-578.
- (9) Lee, J.; Jung, E.; Kim, Y.; Park, J.; Park, J.; Hong, S.; Kim, J.; Hyun, C.; Kim, Y. S.; Park, D. Asiaticoside induces human collagen I synthesis through TGFbeta receptor I kinase (TbetaRI kinase)-independent Smad signaling. *Planta Medica* **2006**, 72, 324-328.
- (10) Liu, M.; Dai, Y.; Yao, X.; Li, Y.; Luo, Y.; Xia, Y.; Gong, Z. Anti-rheumatoid arthritic effect of madecassoside on type II collagen-induced arthritis in mice. *International Immunopharmacology* **2008**, 8, 1561-1566.
- (11) Liu, M.; Dai, Y.; Li, Y.; Luo, Y.; Huang, F.; Gong, Z.; Meng, Q. Madecassoside isolated from *Centella asiatica* herbs facilitates burn wound healing in mice. *Planta Medica* **2008**, 74, 809-815.
- (12) Park, E. K.; Park, S. H. Cosmetic composition with skin irritation improving effect and anti-inflammatory effect by comprising extract of mixture consisting of soybean, chamomile, *Glycyrrhiza uralensis* and *Centella asiatica*.
- (13) Park, D. H.; Lee, J. S.; Jung, J. . Skin care composition comprising the extract of *Centella asiatica* and *Magnolia kobus*.
- (14) Randriamampionona, D.; Diallo, B.; Rakotoniriana, F.; Rabemanantsoa, C.; Cheuk, K.; Corbisier, A.-M.; Mahillon, J.; Ratsimamanga, S.; El Jaziri, M. Comparative analysis of active constituents in *Centella asiatica* samples from Madagascar: Application for *ex situ* conservation and clonal propagation. *Fitoterapia* **2007**, 78, 482-489.
- (15) James, J. T.; Meyer, R.; Dubery, I. A. Characterisation of two phenotypes of *Centella asiatica* in Southern Africa through the composition of four triterpenoids in callus, cell suspensions and leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2008**, 94, 91-99.

- (16) Xingyi, L.; Lijuan, F. Determination the Contents of Madecassoside and Asiaticoside of Total Glucoside in *Centella asiatica*(L)urban by HPLC. *China Pharmacist* **1**, 2008.
- (17) Zhang, F.; Wei, Y.; Zhu, J.; Gong, Z. Simultaneous quantitation of three major triterpenoid glycosides in *Centella asiatica* extracts by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Biomedical Chromatography* **2008**, *22*, 119-124.
- (18) Pan, J.; Kai, G.; Yuan, C.; Zhou, B.; Jin, R.; Yuan, Y. Separation and Determination of Madecassic Acid in Extracts of *Centella asiatica* Using High Performance Liquid Chromatography with β -Cyclodextrin as Mobile Phase Additive. *Chinese Journal of Chromatography* **2007**, *25*, 316-318.
- (19) Schaneberg, B. T.; Mikell, J. R.; Bedir, E.; Khan, I. A.; Nachname, V. An improved HPLC method for quantitative determination of six triterpenes in *Centella asiatica* extracts and commercial products. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, *58*, 381-384.
- (20) Inamdar, P. K.; Yeole, R. D.; Ghogare, A. B.; de Souza, N. J. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *Journal of Chromatography A* **1996**, *742*, 127-130.
- (21) Günther, B.; Wagner, H. Quantitative determination of triterpenes in extracts and phytopreparations of *Centella asiatica* (L.) urban. *Phytomedicine* **1996**, *3*, 59-65.
- (22) *European Pharmacopoeia*; 6^e éd.; 2008.
- (23) Committee, A. M. Uncertainty of measurement: implications of its use in analytical science. *Analyst* **1995**, *120*, 2303-2308.
- (24) Rozet, E.; Hubert, C.; Ceccato, A.; Dewé, W.; Ziemons, E.; Moonen, F.; Michail, K.; Wintersteiger, R.; Streel, B.; Boulanger, B.; Hubert, P. Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results: The fit-for-future-purpose concept. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1158*, 126-137.
- (25) Rozet, E.; Ceccato, A.; Hubert, C.; Ziemons, E.; Oprean, R.; Rudaz, S.; Boulanger, B.; Hubert, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1158*, 111-125.
- (26) Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Chiap, P.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Lallier, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Nivet, C.; Valat, L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—part I. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, *36*, 579-586.
- (27) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) Guidance for IndustryBioanalytical Method Validation **2001**.
- (28) Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Valat, L.; Rozet, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—Part III. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *45*, 82-96.
- (29) EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement **2000**.
- (30) EA 4/16 EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing **2003**.

Chapitre 4

**A HPTLC method for separation and
quantification of four triterpenes in *Centella
asiatica* (L.) Urb (APIACEAE)**

A validated HPLC-UV method was developed in the previous chapter for the quantification of the main triterpenes and aglycones of *C. asiatica* leaves. In Madagascar, it is difficult to purchase and maintain HPLC equipments and to obtain good quality solvents. Consequently, we decided to develop an alternative HPTLC method which was proven to be rapid and less expensive than HPLC, allowing the quantification of several samples simultaneously. We also developed an ultrasonic extraction method which can be used instead of the Soxhlet extraction.

All these methods were validated using the Bland and Altman method comparison.

An adapted version of this chapter will be submitted for publication in the Journal of Separation Sciences.

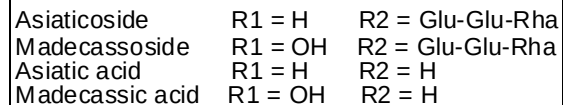
1. Introduction

Quality control is a step to guarantee the standardization of the activity of medicinal plant based products. It was demonstrated that the amount of active principles in a plant varied significantly from region to region and according to the period of the collection (1).

Centella asiatica (L.) Urb (Apiaceae) (*C. asiatica*) is largely exploited nowadays for the preparation of crude extracts or extraction of its active molecules: asiaticoside, madecassoside and their aglycones: asiatic acid and madecassic acid (Fig. 41). These four molecules are very well known for their antioxidant and wound healing activities and are largely used in cosmetic or pharmaceutical industries. At least 120 tons of dried leaves of *C. asiatica* are exported each year by Madagascar (2). To assess the quality of batches, it is necessary to quantify the active molecules. Furthermore, two phenotypic varieties of *C. asiatica* exist at Madagascar which differ in the size and the shape of the leaf. The West region variety has a larger leaf size than the East one. Rahajanirina *et al.* (3) demonstrated that the total triterpenes content of the leaves from East region is higher than the West region but in a small sample and also they demonstrated the variability of the amount of asiaticoside in leaves but only those collected in the East region.

In the literature, the majority of the studies report the use of the HPLC-UV quantification of the 4 triterpenes. Recently, we developed a HPLC-UV method for this quantification and observed that this method was time consuming for large number of samples (4). That is why we developed a HPTLC method which is more rapid but also less expensive than the HPLC-UV method.

In the literature were reported a few studies concerning the quantification of triterpenes in leaves on *C. asiatica* with a HPTLC method. These studies were focused only on the quantification of madecassoside and asiaticoside, the major triterpenes constituents of the leaves (5,6). The most recent study published by Jacinda *et al.* (7) allowed the quantification of the 4 triterpenes of *C. asiatica* but we observed that this method was not very selective and had a low sensitivity. So we developed a new HPTLC-densitometric method for the quantification of these 4 molecules which was validated by the comparison with the HPLC-UV method using the Bland and Altman method comparison. A more rapid ultrasonic extraction method was also developed instead of the Soxhlet extraction which lasted 8 hours.



and stored at ambient temperature in obscurity and in a dry area.

Scientific (Loughborough-Leicestershire, UK).

MS interface (CAMAG) coupled with Orbitrap Thermo Scientific MS detection.

2.4. Sample preparation

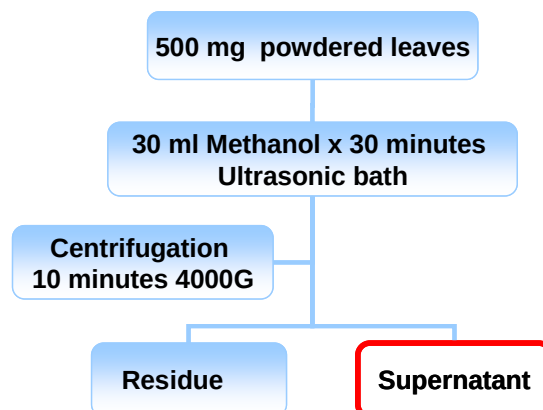


Figure 42: Protocol of extraction of powdered leaves of *C. asiatica*.

Dried powdered leaves (500 mg) were extracted in ultrasonic bath for 30 minutes with 30 ml of methanol. The extracts were centrifuged at 4000 G for 10 minutes. The supernatant was recuperated and the residue was extracted again with the same procedure 3 more times. All the supernatants were combined and evaporated to dryness under reduced pressure (Fig 42). The dried crude extract was diluted with 20 ml of methanol. Two concentrations were used for the quantification: for the acids, the stock solution was used directly; for the osides, the stock solution was diluted 10 times.

2.5. Preparation of standard solutions

Stock solutions of asiaticoside, madecassoside at 0.15 mg/ml; asiatic and madecassic acids at 0.1 mg/ml were prepared separately. Five quantity levels, respectively from 0.15 to 0.75 μg for osides and from 0.1 to 0.5 μg for acids were used for the calibration standards. Five independent analysis were realised for each level.

2.6. Chromatography

2.6.1. Stationary phase

HPTLC 10 x 10 cm silicagel 60 F₂₅₄ plates (Merck) were prewashed with methanol-water (4/1: v/v), heated at 100°C for 1 hour before use.

2.6.2. Sample application

1, 2, 3, 4, 5 μ l of the standard solutions and 1 μ l of the sample were applied as 6 mm bands with ATS 4. The first application was done at 8 mm from the lower edge and 15 mm from the left edge. The distance between tracks was set at 10 mm.

2.6.3. Chromatography

Chromatographic separation was performed with a horizontal development chamber saturated for 15 min. Preliminary assays using two different solvent mixtures composed of hexane/ ethyl acetate /methanol (5:3:1, v/v/v), which only allowed the separation of osides, and ethyl acetate /methanol/acetic acid/water (9/1/2/2) allowing the separation of acids were realised. Different combination of these mixtures were tried and a separation of the four triterpenes on the same plate was then obtained using a solvent system composed of hexane/ethyl acetate/methanol/water (0.5:8:2:2, v/v/v/v) on a distance of 80 mm.

2.6.4. Derivatisation and detection

The plate was immersed in an anisaldehyde sulphuric reagent for the derivatisation with an immersion device (speed: 25 mm/s, immersion time: 1 s). The anisaldehyde reagent was composed by a mixture of 1 ml anisaldehyde, 5 ml acetic acid, 85 ml methanol and 5 ml sulphuric acid. The plate was then heated at 100°C ($\pm$ 5°C) for 10 minutes. The detection wavelength was determined by the maximum peak wavelength in the spectra of each molecule analysed between 200 to 700 nm.

2.7. Evaluation of the extraction efficiency

The ultrasonic extraction efficiency was evaluated by comparison with the Soxhlet extraction described in the European pharmacopoeia (8) whose completeness was also verified in our previous work (4). Extraction was repeated 3 times with ultrasonic and Soxhlet methods on 4 samples for osides and 2 samples for acids. The extracts were evaporated to dryness and diluted in methanol before HPLC analysis.

2.8. Method validation

2.8.1. Stability on the plate

Two dimensions (2D) chromatographies were performed to evaluate the stability of the 4 molecules on the plate (9). Each migration was done on a distance of 80 mm with the same mobile phase.

2.8.2. LOD and LOQ

The LOD and LOQ of each triterpene were determined according to the European Pharmacopoeia method (8). This method is based on the signal-to-noise ratio (S/N).

$$S / N = \frac{2H}{h} \quad \text{Eq. 39}$$

Where H is defined as the height of the peak of the standard component measured from the maximum of the peak to the extrapolated baseline of the signal and h the range of the noise in a chromatogram obtained after application of a blank (Fig. 43) observed over a distance equal to at least 5 times the width at half-height of the standard component and around the place where this peak would be found.

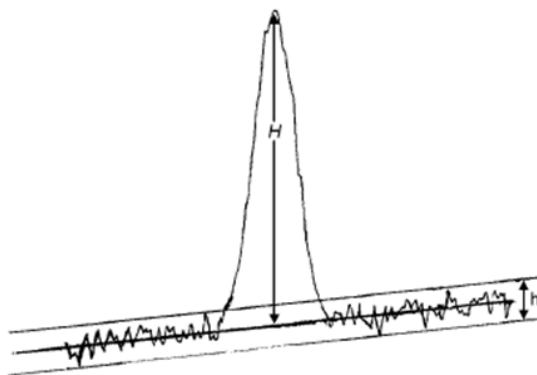


Figure 43: schematic identification of peak signal and the baseline noise (8).

The limit of detection (LOD) corresponds to a signal-to-noise ratio of 3 and 10 for the limit of quantification (LOQ).

2.8.3. Selectivity

The selectivity of the method was evaluated by the comparison of the mass spectra of the standards with the corresponding spots in the sample using the HPTLC-MS interface coupled with a mass detector (Fig 44). The HPTLC-MS interface inlet was recorded to a pump allowing the extraction of the analyte with methanol-NH₄OH (1%) at a flow rate set at 0.2 ml/min. The interface outlet was connected to an APCI-MS orbitrap (vaporizer temperature: 400, sheat gas flow rate: 20, capillary temperature: 250, capillary voltage: 46, tube lens: 55).

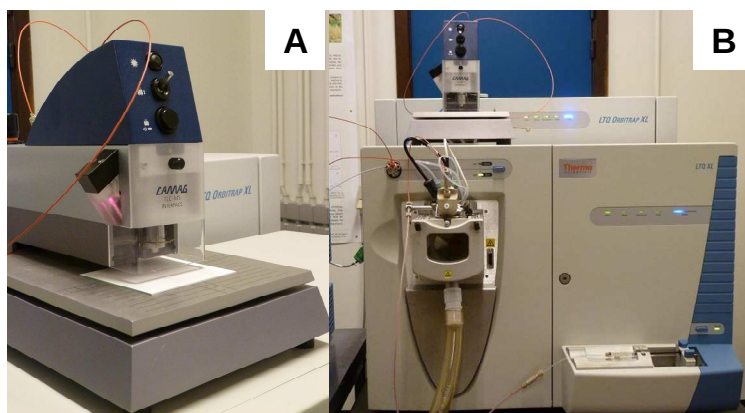


Figure 44: Representation of the TLC-MS interface (A) coupled with MS detector (B) (Thermo-Scientific).

2.8.4. Response function, repeatability, trueness and accuracy

The major validation criteria were assessed using the Bland and Altman method comparison. We considered that the HPLC method is the reference method, then paired measurements were done for each sample ($n = 10$ for osides, $n = 4$ for acids) and the results were compared. The repeatability was given with 2 repetitions for each sample. For the accuracy, the acceptance limits were set at $\pm 30\%$.

2.8.5. Statistics

Statistical analyses of data were done using Microsoft[®] excel 2007.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic separation

Good separation of madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and acid asiatic was obtained (Fig. 45). The R_f obtained with 7 independent repetitions were respectively 0.12 ± 0.02 , 0.17 ± 0.02 , 0.61 ± 0.03 and 0.65 ± 0.03 for madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid.

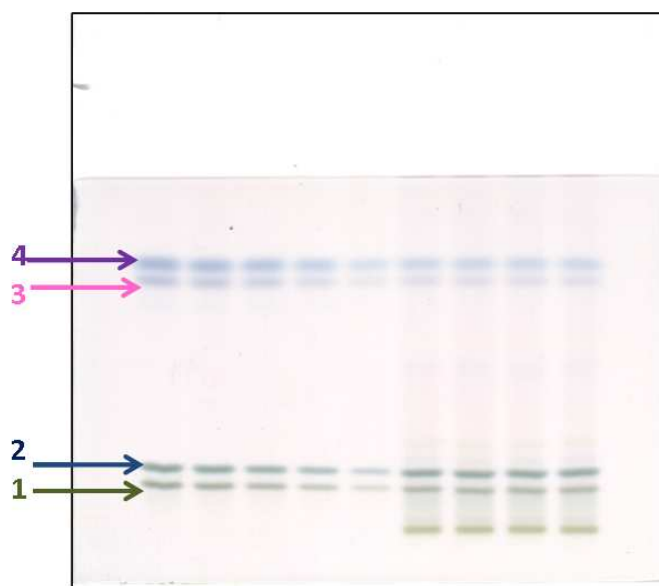


Figure 45: Chromatogram of standards and methanolic extracts of *C. asiatica* (1: madecassoside, 2: asiaticoside, 3: madecassic acid, 4: asiatic acid).

3.2. Stability on the plate

No degradation was observed for each triterpene because all the spots are situated on the diagonal of the chromatogram (Fig. 46).

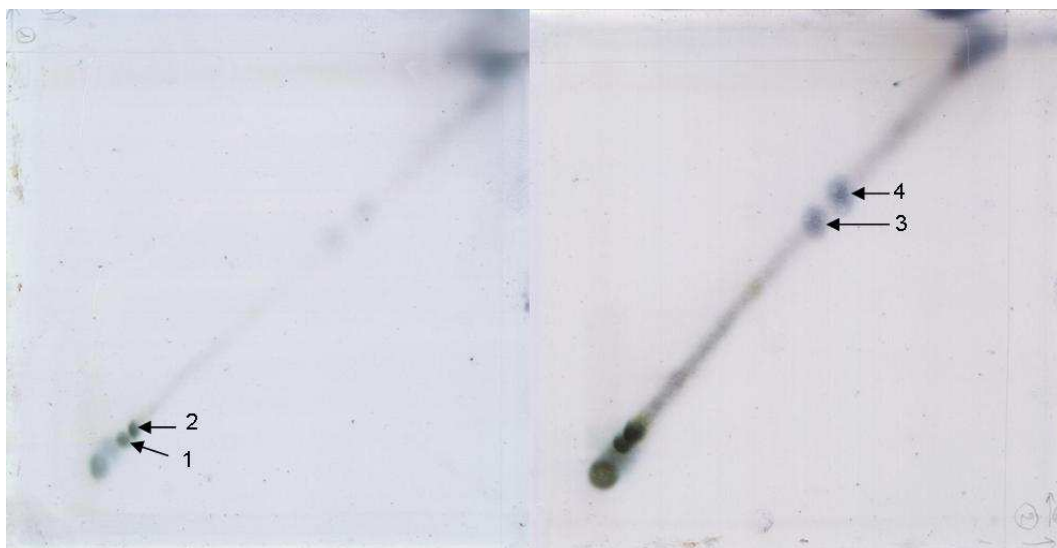


Figure 46 : Chromatograms showing the stability of asiaticoside (1), madecassoside (2), asiatic acid (3) and madecassic acid (4).

3.3. Wavelength determination

After derivatization, the plate was scanned directly because the intensity of the coloration decreased. The spectra of madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid showed the same maximum of absorption at 600 nm (Fig. 47), then the quantification was performed at this wavelength.

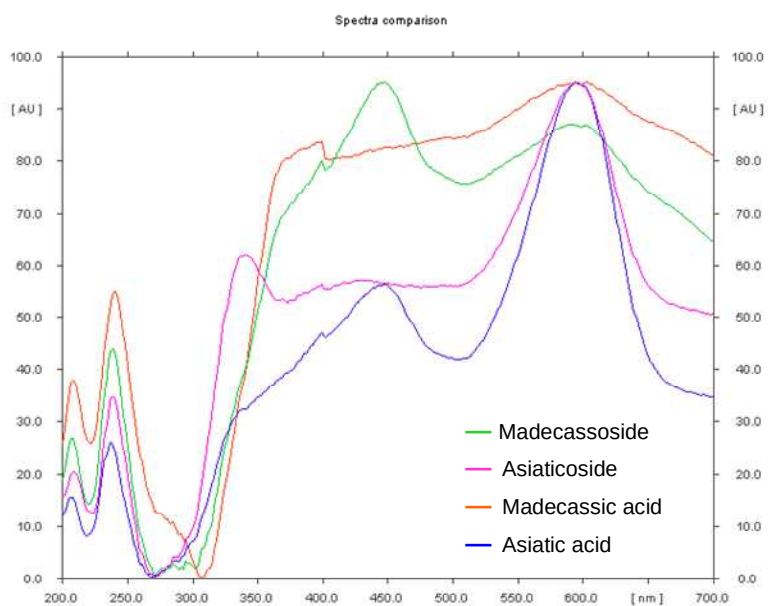


Figure 47: Absorption spectra of the 4 triterpenes in leaves extract of *C. asiatica*.

3.4. Determination of the extraction efficiency

Numerous extraction methods of the leaves of *C. asiatica* were described in the literature. Soxhlet (8), maceration (10), subcritical water (11), microwave-assisted solvent and sonication (12) are the extraction methods usually used. Shen *et al.* showed that the microwave assisted solvent extraction gave slightly higher results than Soxhlet and sonication. Soxhlet and maceration extractions were time consuming and sophisticated materials are required for the subcritical water and microwave assisted solvent extractions. Ultrasonic extraction is the most simple and is more rapid than Soxhlet and maceration. The comparison with Soxhlet extraction showed that ultrasonic extraction seemed a little bit less efficient; nevertheless, the Bland-Altman plot demonstrated that for the 4 triterpenes, the 95% limits of agreement (LoA) are totally included between the acceptance limits set at $\pm 15\%$ (Fig. 48). These results confirm that both methods may be considered as equivalent with a probability of 95% so that the 95% of the future ultrasonic extraction data will be contained in these limits of acceptance.

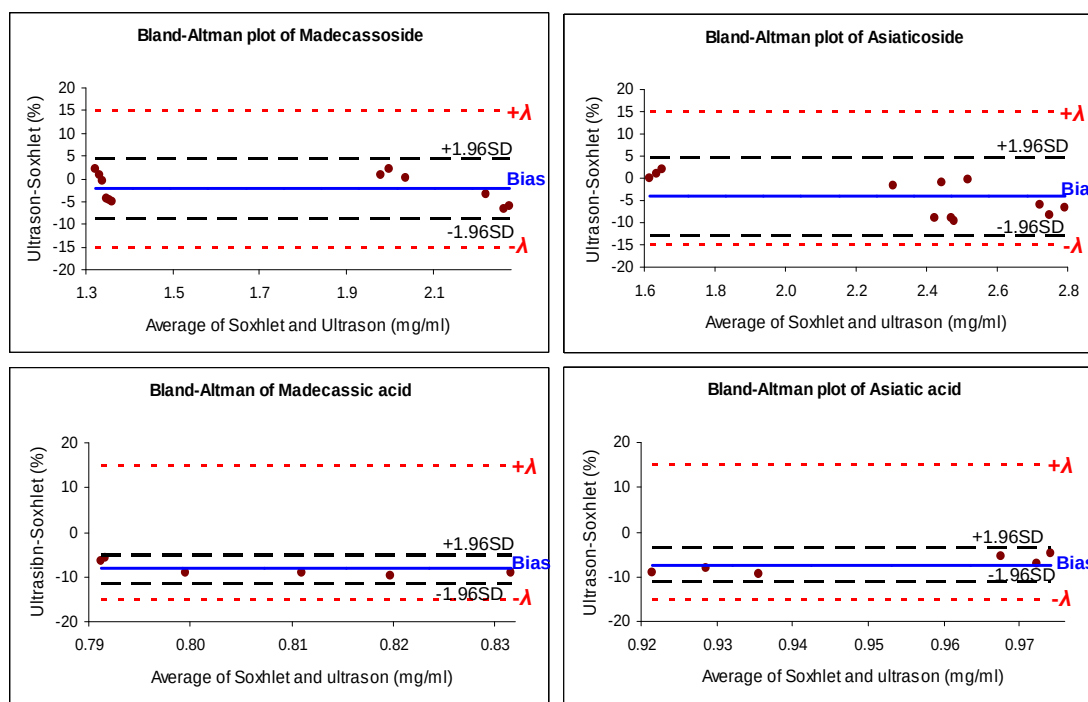


Figure 48: Bland-Altman plot of the Soxhlet and ultrasonic extraction of madecassoside, asiaticoside, madecassic and asiatic acids in leaves of *C. asiatica* (results obtained by HPLV method). (The dots represent the relative difference between both methods for each paired measurements, the blue line represents the mean of all the relative differences, the dotted black lines the LoA and the dotted red lines the acceptance limits set at $\pm 15\%$).

3.5. Method validation

The method was demonstrated to be selective for madecassoside, asiaticoside, madecassic and asiatic acids in the extract of *C. asiatica* as MS spectra were similar to those of reference standard (Fig. 48).

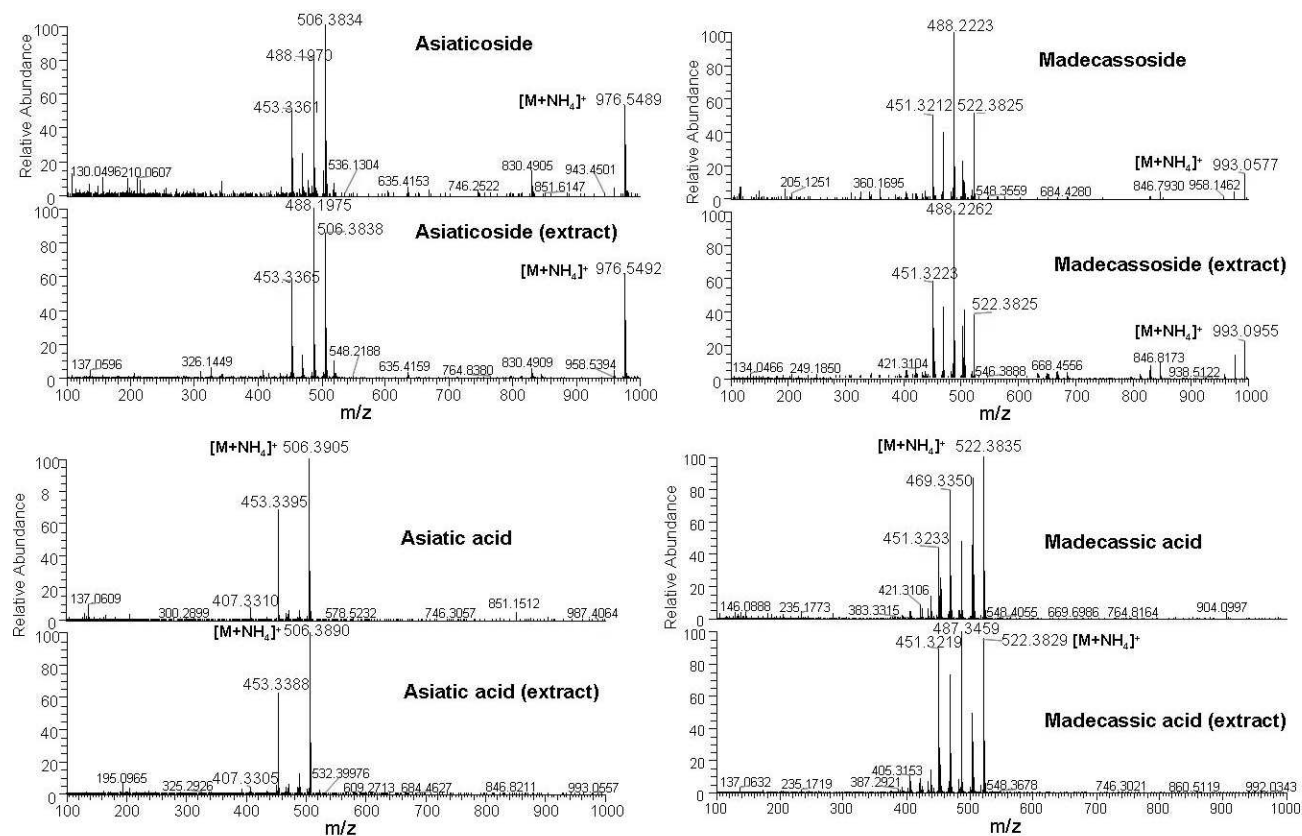


Figure 49: Comparison of the exact mass spectra of asiatic acid, madecassic acid, asiaticoside and madecassoside (+ NH_4^+ added in the mobile phase in order to facilitate the ionization) in the standard solution and in the leaves extract of *C. asiatica*.

The heights and the areas of the peaks of madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid were the two responses used to establish the response function. Figure 50 showed that the responses (area and height) did not increase linearly with the quantity of calibration standards within the range of 0.15 to 0.750 µg for osides and 0.1 to 0.5 µg for acids.

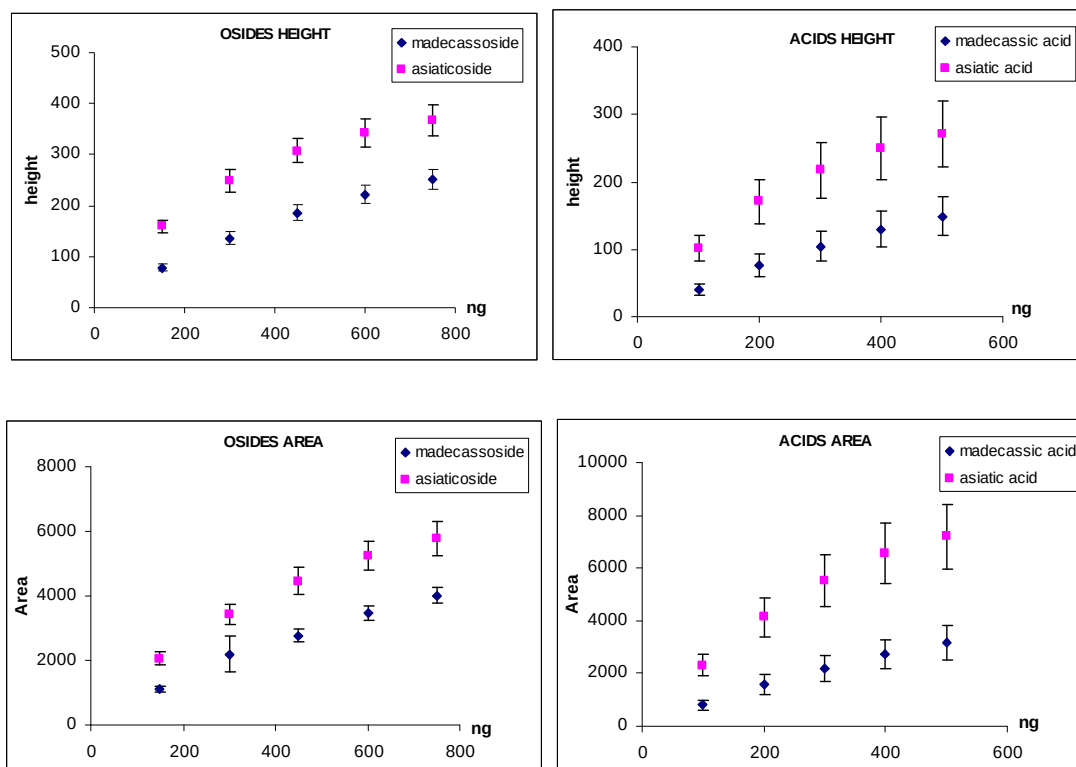


Figure 50: Response functions of madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid (area vs quantity/ height vs quantity).

So, linear regression, polynomial, Michaelis-Menten 1 ($\frac{aX}{b+X}$) and Michaelis-Menten 2 ($\frac{aX}{b+X} + c$) were tested (13). The different results calculated with the two responses (area and height) and using different regression equations were compared with the HPLC results. Figure 51 represents for each regression model the LoAs around the bias in blue expressed in relative difference between these HPTLC and the HPLC results (reference method). If we compare the different regression models we observed that the height polynomial, for madecassoside and madecassic acid and the area linear regression for asiaticoside and asiatic acid were the adequate response functions because they give the lowest bias and LoA values. Dotted red line represents a relative difference of 0 when HPLC and HPTLC results are equal.

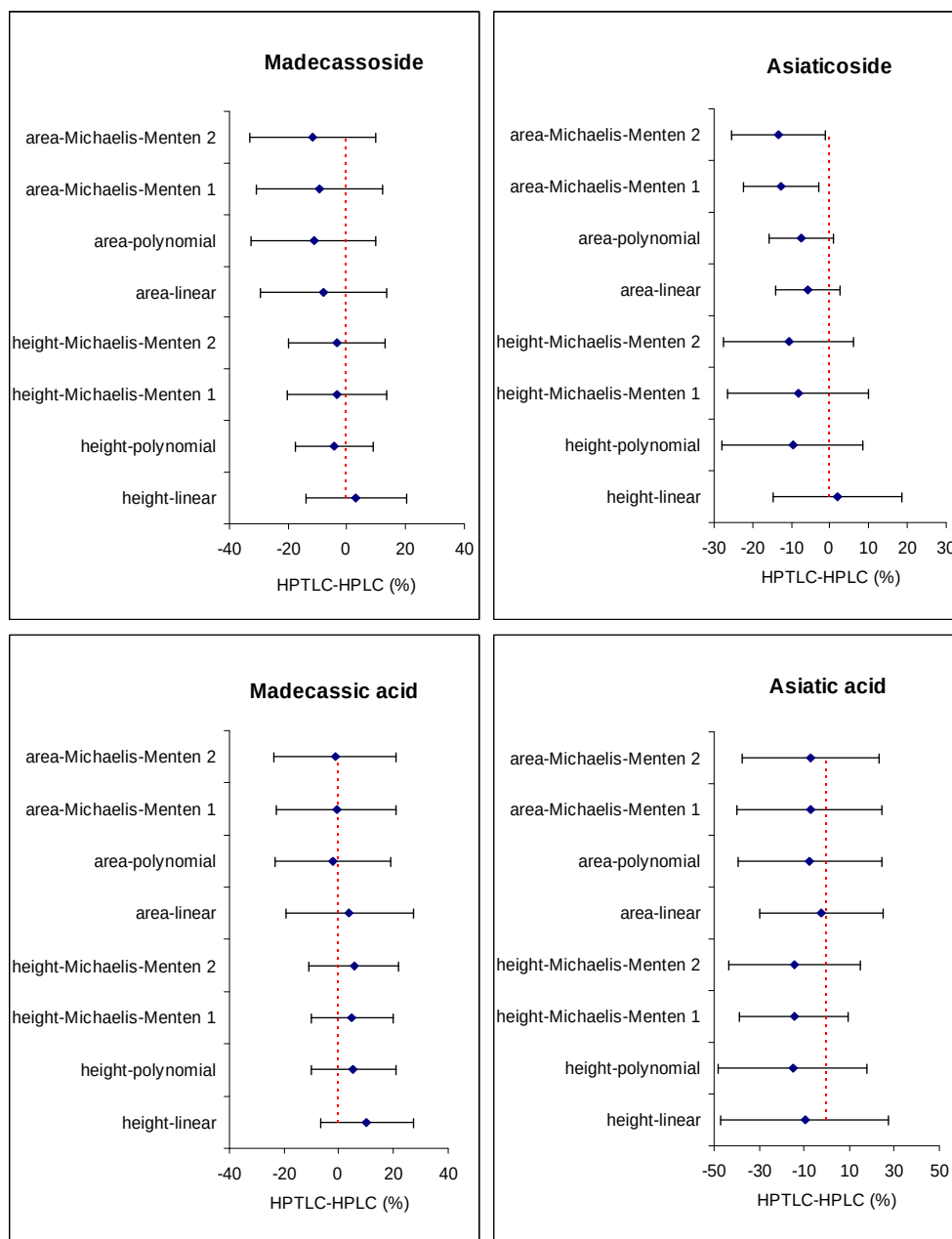


Figure 51: Comparison of the LoA and the bias of the HPTLC results obtained with different regression models. The $\pm$ error represent the LoA, dots represent the bias of the HPTLC results compared with HPLC results.

Table 17 shows the results obtained by the paired measurement with HPLC and HPTLC methods for the 4 triterpenes using the selected regression model. Scatter diagrams of the results obtained by the two methods were presented in the figure 52 for each triterpene. The diagonal line represents the line of equality. The correlation analysis results show us that for

madecassoside, asiaticoside, the r values were close to 1 (0.9930 and 0.9934) and for madecassic and asiatic acids, the r were respectively 0.9775 and 0.8883.

Table 17: *Madecassoside, asiaticoside, madecassic and asiatic acids results obtained with 10 paired analysis of leaves of C. asiatica with HPLC and HPTLC methods.*

	Madecassoside		Asiaticoside	
Sample	HPLC	HPTLC	HPLC	HPTLC
1	2.14	1.92	2.52	2.33
1	2.16	1.93	2.52	2.40
2	7.30	7.35	2.18	1.80
2	7.30	7.36	2.18	1.90
3	3.30	3.33	3.94	3.82
3	3.32	3.34	3.94	3.88
4	3.30	2.75	4.20	3.70
4	3.32	2.92	4.22	3.77
5	3.38	3.27	4.30	3.95
5	3.44	3.28	4.40	4.17
6	3.30	2.84	3.50	3.18
6	3.28	2.91	3.50	3.20
7	2.78	2.80	2.82	2.70
7	2.79	2.91	2.83	2.70
8	4.52	4.59	5.76	5.42
8	4.42	4.60	5.82	5.43
9	5.30	5.26	4.64	4.32
9	5.28	5.33	4.62	4.41
10	2.36	2.26	3.40	3.22
10	2.40	2.28	3.36	3.24
	Madecassic acid		Asiatic acid	
	HPLC	HPTLC	HPLC	HPTLC
1	0.63	0.65	0.63	0.65
1	0.61	0.66	0.61	0.66
2	0.96	1.09	0.96	1.09
2	0.95	1.10	0.95	1.10
3	0.71	0.78	0.71	0.78
3	0.71	0.76	0.71	0.76
4	0.68	0.65	0.68	0.65
4	0.67	0.62	0.67	0.62

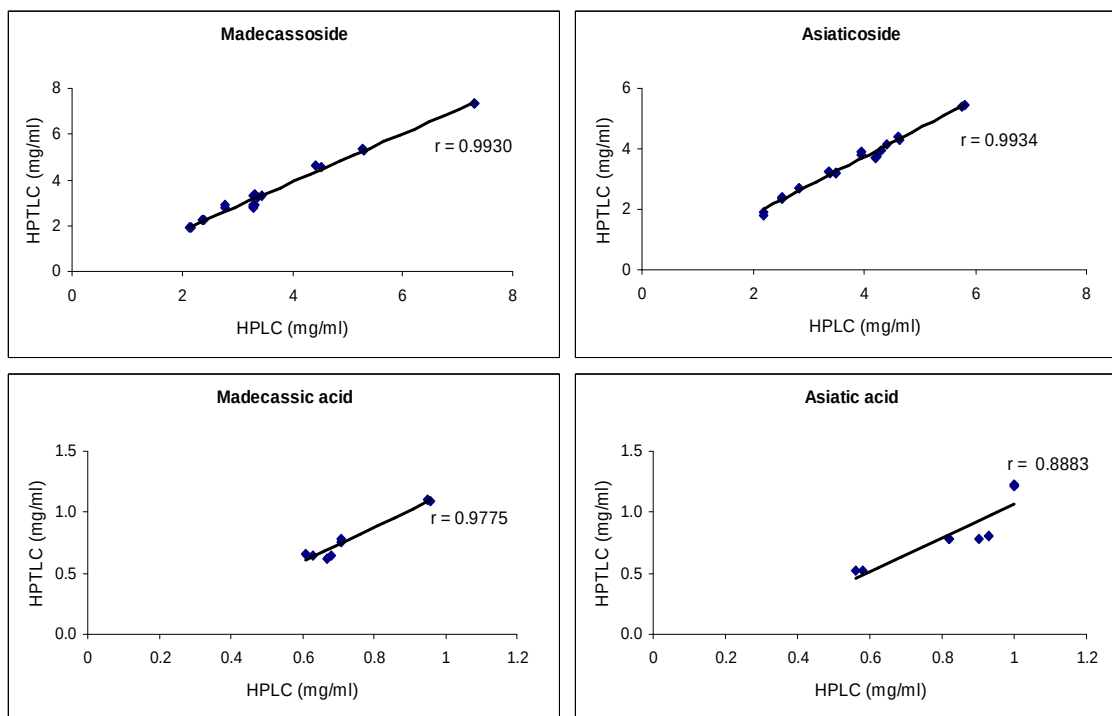


Figure 52: Scatter diagrams, correlation coefficient of the amount of madecassoside, asiaticoside, madecassic and asiatic acids obtained with paired HPLC and HPTLC measurments in different samples of *C. asiatica* leaves.

These results give us only an overview of the relation between the 2 methods but not their agreement. On the contrary, the graphical method comparison of Bland and Altman (Fig. 53) led us to estimate this agreement.

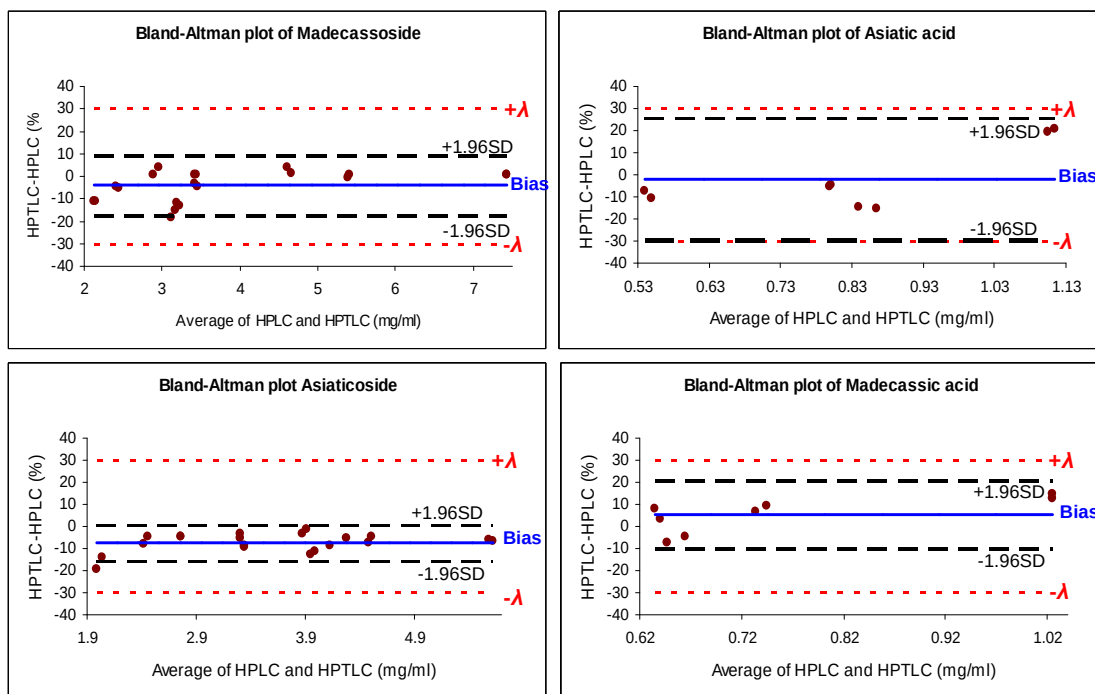


Figure 53: Bland-Altman plot of the amounts of madecassoside, asiaticoside, asiatic and madecassic acid in leaves extract of *C. asiatica* obtained by HPLC and HPTLC methods. (Dots represent the relative difference between both methods for each paired measurement, the blue plain line represents the bias, the dotted black lines the LoA and the dotted red lines the acceptance limits set at $\pm 30\%$).

The LoA obtained for madecassoside and asiaticoside are lower than those obtained for madecassic and asiatic acids but all are totally included in the acceptance limits ($\pm 30\%$) showing that the degree of agreement of the method was acceptable. It can be suggested that the low content of the acids generate more error than for the osides. In conclusion, we can confirm that the HPTLC method can replace the HPLC method or that the two methods can be used interchangeably. We can also be confident that 95% of relative differences between HPTLC and HPLC of the future measurements will fall within these LoA.

The trueness expressed as bias was respectively -4.17%, -5.68%, 5.28% and 2.24% for madecassoside, asiaticoside, madecassic and asiatic acids. Precision was evaluated by the relative standard deviation (RSD %), RSD of 1.39%, 1.82%, 1.64% and, 1.47% were obtained. The negative values of the trueness suggest that HPTLC method gives lower results than HPLC, it is the case for the osides and the opposite for the acids. Nevertheless, these values demonstrated the excellent trueness and the good precision of the HPTLC method. For the accuracy, Figure 52 shows for the four triterpenes that the LoA (which corresponds to the

accuracy value) are totally included in the acceptance limits set at $\pm 30\%$ which is acceptable for complex matrices as plants. The method was then demonstrated to be accurate in the range of 0.15 to 0.75 μg for osides and 0.1 to 0.5 μg for acids.

The LOD and LOQ were respectively 0.03 μg and 0.150 μg for osides and 0.01 μg and 0.1 μg for acids. These results showed that this method is more sensitive than the method proposed by Jacinda *et al.* (7), Thomas *et al.* (5) and Ganse *et al.* (6) in which the LOD were higher than 0.317 μg .

3.6. Sample analysis

The HPTLC method was applied to quantify the triterpenes in leaves of samples of *C. asiatica* collected in the East and West regions of Madagascar at the same period. The results were summarized in Table 18.

Table 18: Content of triterpenes in *C. asiatica* samples collected in the East and West regions of Madagascar analysed by the HPTLC method (in % of the dry plant).

Locality	Lot	Madecassoside	Asiaticoside	Madecassic acid	Asiatic acid	Total quantified triterpenes*
East region	1	2.15 $\pm$ 0.006	2.52 $\pm$ 0.06	< LOD	< LOD	4.67
	2	2.37 $\pm$ 0.03	2.86 $\pm$ 0.04	< LOD	< LOD	5.23
	3	2.78 $\pm$ 0.05	2.83 $\pm$ 0.006	< LOD	< LOD	5.61
	4	2.35 $\pm$ 0.03	2.57 $\pm$ 0.14	< LOD	< LOD	4.92
	5	2.28 $\pm$ 0.03	2.87 $\pm$ 0.01	< LOD	< LOD	5.15
	6	3.38 $\pm$ 0.07	3.56 $\pm$ 0.06	< LOD	< LOD	6.94
	7	2.26 $\pm$ 0.18	3.22 $\pm$ 0.20	< LOD	< LOD	5.48
	8	2.87 $\pm$ 0.12	2.93 $\pm$ 0.01	< LOD	< LOD	5.8
	9	4.47 $\pm$ 0.08	5.79 $\pm$ 0.06	< LOD	< LOD	10.26
	10	5.29 $\pm$ 0.07	4.63 $\pm$ 0.09	< LOD	< LOD	9.92
	11	4.18 $\pm$ 0.01	6.05 $\pm$ 0.3	< LOD	< LOD	10.23
	12	3.68 $\pm$ 0.05	4.47 $\pm$ 0.1	< LOD	< LOD	8.15
West region	13	7.30 $\pm$ 0.25	2.18 $\pm$ 0.10	< LOD	< LOD	9.48
	14	3.31 $\pm$ 0.07	3.94 $\pm$ 0.05	< LOD	< LOD	7.25
	15	2.75 $\pm$ 0.07	4.21 $\pm$ 0.07	< LOD	< LOD	6.96
	16	3.41 $\pm$ 0.29	4.35 $\pm$ 0.22	< LOD	< LOD	7.76
	17	3.29 $\pm$ 0.02	3.5 $\pm$ 0.018	< LOD	< LOD	6.79
	18	1.94 $\pm$ 0.03	2.70 $\pm$ 0.01	< LOD	< LOD	4.94
	19	1.10 $\pm$ 0.002	1.22 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.009	0.78 $\pm$ 0.002	3.76
	20	2.67 $\pm$ 0.004	3.00 $\pm$ 0.1	< LOD	< LOD	5.67
	21	1.97 $\pm$ 0.07	2.41 $\pm$ 0.1	0.74 $\pm$ 0.01	< LOD	4.38
	22	4.68 $\pm$ 0.02	4.83 $\pm$ 0.07	< LOD	< LOD	9.51
	23	3.46 $\pm$ 0.1	3.34 $\pm$ 0.09	< LOD	0.41 $\pm$ 0.004	6.8
	24	3.27 $\pm$ 0.1	4.66 $\pm$ 0.3	< LOD	< LOD	7.93

*Total tripernes : sum of quantified osides and acids

The means of the total triperpenes contents of the samples of the East phenotype of *C. asiatica* and of the West are quite equal (6.86% and 6.77%). A variability of the content of triterpenes in samples from both regions was observed, from 3.76 to 9.51% for the West variety and 4.67 to 10.26% for the East one. Rahajanirina *et al.* had demonstrated that the East variety is richer in triterpenes than the West one; our results showed that on average, these contents were quite equal. However, the variability of the content of triterpenes within the varieties confirmed the need of the quality control of the batches and the analysis of large number of samples. Further, Rahajanirina *et al.* demonstrated that the culture of the variety from the East region gave more biomass than the Western in the same culture conditions (14). Even though, we can suggest the exploitation of the West phenotype by means of good growing conditions.

We proposed here a simple and accurate HPTLC method for the quantification of the triterpenes in leaves of *C. asiatica*. The ultrasonic extraction also allowed the simultaneous extraction of large number of samples. This method is complementary to HPLC and suitable for routine quality control of *C. asiatica*.

Acknowledgements

We wish to thank the “Commission Universitaire pour le Développement” for the material supports and the “Université Catholique de Louvain” for the fellowship allowing the achievement of this research.

Bibliography

- (1) Randriamampionona, D.; Diallo, B.; Rakotoniriana, F.; Rabemanantsoa, C.; Cheuk, K.; Corbisier, A.-M.; Mahillon, J.; Ratsimamanga, S.; El Jaziri, M. Comparative analysis of active constituents in *Centella asiatica* samples from Madagascar: Application for ex situ conservation and clonal propagation. *Fitoterapia* **2007**, 78, 482–489.
- (2) www.instat.mg.
- (3) Rahajanirina, V.; Rakotondralambo Raoseta, S. O.; Roger, E.; Razafindrazaka, H.; Pirotais, S.; Boucher, M.; Danthu, P. The Influence of Certain Taxonomic and Environmental Parameters on Biomass Production and Triterpenoid Content in the Leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb. from Madagascar. *Chemistry and Biodiversity* **2012**, 9, 298–308.
- (4) Rafamantanana, M. H.; Rozet, E.; Raoelison, G. E.; Cheuk, K.; Ratsimamanga, S. U.; Hubert, P.; Quetin-Leclercq, J. An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (APIACEAE). *Journal of Chromatography B* **2009**, 877, 2396–2402.
- (5) Thomas, M. T.; Kurup, R.; Johnson, A. J.; Chandrika, S. P.; Mathew, P. J.; Dan, M.; Baby, S. Elite genotypes/chemotypes, with high contents of madecassoside and asiaticoside, from sixty accessions of *Centella asiatica* of south India and the Andaman Islands: For cultivation and utility in cosmetic and herbal drug applications. *Industrial Crops and Products* **2010**, 32, 545–550.
- (6) Ganse, H.; Gbaguidi, F.; Agbani, P. O.; Josse, R. G.; Moudachirou, M.; Sinsin, B. A.; Quetin-Leclercq, J.; Aminou, T. Densitometric HPTLC quantification of asiaticoside isolated from *Centella asiatica* (L.) Urb (Apiaceae) of Benin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **2011**, 4.
- (7) Jacinda, J.; Ian, D. Identification and Quantification of Triterpenoid Centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by Densitometric TLC. *Journal of Planar Chromatography* **2011**, 24, 82–87.
- (8) European Pharmacopoeia **2011**.
- (9) Renger, B.; Végh, Z.; Ferenczi-Fodor, K. Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 2712–2721.
- (10) Gupta, A. P.; Gupta, M. M.; Kumar, S. High performance thin layer chromatography of asiaticoside in *Centella asiatica*. *Journal of the Indian Chemical Society* 76, 321–322.
- (11) Kim, W.-J.; Kim, J.; Veriansyah, B.; Kim, J.-D.; Lee, Y.-W.; Oh, S.-G.; Tjandrawinata, R. R. Extraction of bioactive components from *Centella asiatica* using subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids* **2009**, 48, 211–216.
- (12) Shen, Y.; Liu, A.; Ye, M.; Wang, L.; Chen, J.; Wang, X.; Han, C. Analysis of Biologically Active Constituents in *Centella asiatica* by Microwave-Assisted Extraction Combined with LC–MS. *Chromatographia* **2009**, 70, 431–438.
- (13) www.camag.com.

DISCUSSION GENERALE

La médecine traditionnelle constitue une richesse culturelle et sa pratique est encore largement répandue à Madagascar où les plantes sont les plus utilisées. La valorisation de cette richesse culturelle implique son intégration dans le système de soins de santé national, ce qui nécessite l'obtention de données scientifiques afin d'assurer la sécurité de la population, l'efficacité et la standardisation des soins. De plus, le contrôle de qualité de ces plantes médicinales ne peut se limiter au niveau botanique vu les grandes variations de compositions chimiques au sein de la même espèce (1,2). Ce travail avait comme objectif de mettre au point des méthodes simples et rapides qui seront utilisées en routine pour le contrôle de qualité de plantes médicinales et contribuer entre autres à la valorisation de la MTR. Pour cela, deux plantes ont été choisies : *S. penduliflorum*, utilisée pour ses propriétés vasorelaxantes et *C. asiatica*, très exploitée pour ses propriétés cicatrisantes dues principalement à la présence de 4 triterpènes : madécassoside, asiaticoside, acide madécassique et acide asiatique. Il a donc été nécessaire dans un premier temps de vérifier l'activité et identifier les principes actifs de *S. penduliflorum*. Nous nous sommes ensuite attachés à la mise au point d'une méthode CLHP-UV pour le dosage de la molécule majoritaire. Pour *C. asiatica*, deux méthodes de dosage par CLHP-UV et CCMHP des 4 triterpènes ont été développées et validées. Dans ce chapitre seront discutés les résultats obtenus et une revue globale de la littérature en relation avec ces résultats.

1. Isolement et identification de molécules à propriétés vasorelaxantes dans les feuilles de *S. penduliflorum* Thouars

S. penduliflorum est une plante endémique de Madagascar dont les feuilles ont été et sont toujours couramment utilisées en décoction en médecine traditionnelle pour traiter l'hypertension. Elle a été choisie car aucune étude n'avait été faite pour vérifier ses propriétés antihypertensives. Après avoir mis en évidence l'effet vasorelaxant d'extraits, des fractionnements bioguidés ont permis d'isoler pour la première fois dans les feuilles de *S. penduliflorum* des alcaloïdes aporphiniques : la dicentrine et la néolitsine. La dicentrine est connue comme antagoniste des récepteurs adrénergiques α -1 (3–5), ce qui est corroboré par nos résultats. La néolitsine a été moins étudiée puisqu'une seule étude montre son activité vasorelaxante (6). Les travaux que nous avons réalisés en collaboration avec les équipes de pharmacologie de l'IMRA et de l'UCL nous ont donc permis de confirmer l'utilisation traditionnelle de la plante comme vasorelaxante. Néanmoins, Rasoanaivo *et al.* (7) avaient mentionné qu'aucun alcaloïde n'avait été détecté dans leur échantillon de feuilles de *S.*

penduliflorum. Ces résultats contradictoires pourraient être expliqués par le fait que nos échantillons ont été collectés dans une autre zone géographique, or il est connu que la zone de récolte peut avoir un effet déterminant sur la composition chimique (2). Suite à nos résultats, nous avons effectué un rapide screening d'échantillons de *S. penduliflorum* collectés dans différents endroits par CCM. Ces échantillons ont été collectés dans les années 95 et étaient conservés dans l'échantillonnage de l'IMRA. Ce test nous a montré que sur les 6 échantillons analysés, les teneurs en dicentrine et néolitsine sont inférieures à la limite de détection.

Ces résultats montrent l'importance du contrôle de qualité chimique des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle. Par conséquent, nous avons décidé de mettre au point une méthode de dosage de la dicentrine dont l'activité a été démontrée et qui est l'alcaloïde majoritaire dans les feuilles de *S. penduliflorum*.

2. Mise au point d'une méthode de quantification de la dicentrine dans *S. penduliflorum*

Nous avons choisi la CLHP-UV car des méthodes de dosage de la dicentrine par CLHP-UV étaient décrites dans la littérature (8,9). Ces méthodes ont servi de base pour notre étude mais la complexité de l'extrait à analyser a nécessité une optimisation de la séparation en modifiant différents paramètres influençant la séparation. Des études préliminaires effectuées, nous avons observé que la composition de la phase stationnaire (C-8, C-18, RP select-B : C-8) n'avait pas un effet significatif mais logiquement que le pH et le gradient étaient importants. Nous avons également observé que tous les alcaloïdes étaient élués à 60% de méthanol dans l'eau. Si on analyse l'effet de chaque facteur l'un après l'autre pour optimiser la séparation, un grand nombre d'essais doivent être réalisés, ce qui prend beaucoup de temps.

Nous avons donc décidé d'appliquer un plan d'expérience, une méthode structurée et rapide qui permet de tester plusieurs paramètres à la fois. Le plan d'expérience nous a permis, en réalisant seulement 36, expériences de prédire et de déterminer les conditions optimales pour séparer les 13 alcaloïdes présents dans les feuilles de *S. penduliflorum* en 67 minutes. Le plan d'expérience est largement utilisé dans le développement d'une méthode et permet non seulement de prédire les conditions optimales en analysant l'effet combiné de plusieurs facteurs mais également de tester la robustesse de la méthode (10). D'ailleurs l'ICH recommande son utilisation dans les démarches qualités (11). En effet, dans le développement pharmaceutique, le concept de « design » (plan d'expérience) est utilisé afin d'assurer que la

méthode est de bonne qualité mais que c'est également le cas pour les produits (résultats) issus de cette méthode. L'analyse de 2 lots de feuilles de plantes collectées à des périodes différentes a montré des teneurs en dicentrine respectives de $1.46 \pm 0.006\%$ et $1.05 \pm 0.007\%$. Ces résultats montrent également la variation de la teneur en principes actifs en fonction de la période de collecte et l'intérêt de réaliser des quantifications pour déterminer les conditions optimales de culture ou la période optimale de collecte.

Quelques études ont rapporté que la dicentrine et la néolitsine présentaient des activités cytotoxiques (12–14) mais cet effet s'observe à une concentration 10 fois supérieure à la concentration vasorelaxante. En effet, *in vitro* la dicentrine pure présente une activité vasorelaxante avec une IC_{50} de $2.95 \mu M$ et est cytotoxique contre des lignées de cellules cancéreuses et normales avec une IC_{50} minimale de $28.3 \mu M$ (12). Ce rapport pourrait paraître faible comparé à d'autres médicaments, mais il faut aussi tenir compte du fait que l'activité/toxicité d'une molécule pure ne peut pas être directement extrapolée à un extrait brut qui contient de nombreuses autres molécules qui peuvent modifier la disponibilité et/ou réduire la toxicité. Il est donc important de quantifier la dicentrine dans les plantes utilisées pour protéger la population vis-à-vis d'une éventuelle toxicité et de déterminer la dose moyenne à utiliser.

3. Analyse quantitative des triterpènes des feuilles de *C. asiatica* (L.) Urban

C. asiatica a été choisie dans notre étude du fait de son exportation massive de Madagascar et de son utilisation locale dans plusieurs préparations médicamenteuses. Le contrôle de qualité des différents lots de plante est aussi nécessaire car des normes de teneur en principes actifs sont habituellement exigées par les clients. De plus, l'acquisition de ces données constitue, non seulement une valeur ajoutée au lot exporté, mais permet également de standardiser les médicaments à base de cette plante et de définir des conditions de collecte ou culture optimales.

Notre objectif était de mettre au point des méthodes simples et rapides pour les pays en voie de développement afin d'assurer localement le contrôle et la standardisation des matières premières et des produits finis à base de plantes médicinales.

3.1. Mise au point d'une méthode de dosage par CLHP-UV des triterpènes dans les feuilles de *C. asiatica* Urban

La technique d'analyse par CLHP-UV est souvent utilisée pour le dosage des saponines malgré le fait que ces molécules n'absorbent qu'à une faible longueur d'onde limitant les types de solvants que l'on peut utiliser et réduisant la sensibilité. Dans la Pharmacopée Européenne a été décrite une méthode CLHP-UV qui a été révisée suite à un problème rencontré au niveau de la séparation (15) ce que nous avons également observé. Notons que cette révision est postérieure à nos travaux. Nous avons donc décidé d'améliorer les méthodes existantes dans la littérature et de valider la nouvelle méthode obtenue. Cette méthode permet de séparer le madécassoside, l'asiaticoside, l'acide madécassique et l'acide asiatique en 55 minutes soit 30 minutes de moins que la méthode révisée de la Pharmacopée Européenne (16). Inamdar *et al.* avaient aussi développé une méthode de séparation et de dosage de ces triterpènes (17). Cette méthode bien que seulement partiellement validée est la plus citée et la plus utilisée dans la littérature, mais les avantages de la méthode que nous avons développée, outre le fait qu'elle soit complètement validée, est qu'elle utilise uniquement deux standards : l'asiaticoside et l'acide asiatique, ce qui réduit l'utilisation de standards, difficiles d'accès. Les autres méthodes qui permettent de doser les 4 triterpènes ne sont pas validées (18,19). Pourtant, la validation est une étape recommandée par l'ICH (20,21). Elle a comme objectif de démontrer qu'une méthode est bien appropriée à son utilisation. En d'autres termes, la validation garantit la fiabilité des résultats et également de la méthode utilisée (20,22–24). Dans plusieurs guides sont définies des procédures à suivre pour la validation de méthodes (ICH, FDA, ...). Dans notre cas, la méthode basée sur le profil d'exactitude a été adoptée (SFSTP pharma). Cette procédure garantit à la fois que la méthode est bonne et que les résultats obtenus sont exacts en évaluant l'exactitude qui combine les différents critères de validation avec des limites d'acceptation fixées à l'avance à l'intérieur desquelles la méthode est valide.

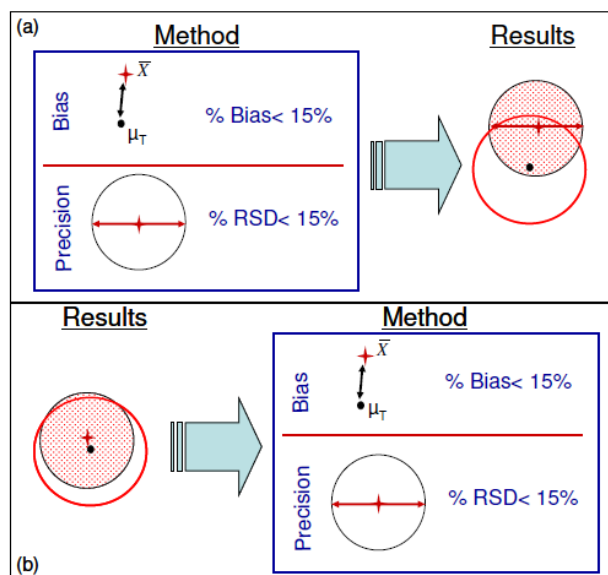


Figure 54 : Illustrations de deux méthodes présentant les mêmes justesse (bias) et fidélité intermédiaire (precision) donnant deux résultats différents (a) résultats non acceptables, (b) résultats acceptables (μ_T : vraie valeur, $\bar{X}$: moyenne des résultats) (source Rozet, 2009).

Cette figure nous montre que deux méthodes qui ont exactement les mêmes erreurs systématique (biais) et aléatoire (fidélité) ne donnent pas obligatoirement les mêmes résultats. Une méthode présentant un biais relatif et une fidélité intermédiaire inclus dans des limites acceptables ($<15\%$) ne donnent pas obligatoirement des résultats acceptables (Fig. 54a), d'où la nécessité d'utiliser l'exactitude qui prend en compte la somme de ces deux types d'erreurs (Fig. 54b).

Nous avons donc développé une méthode CLHP-UV rapide, fiable et appropriée pour des analyses de routine de feuilles de *C. asiatica* et la quantification des 4 principes actifs majeurs.

3.2. CCMHP des triterpènes des feuilles de *C. asiatica* Urban. Comparaison avec la méthode CLHP-UV

Après avoir validé la méthode CLHP-UV, nous nous sommes concentrés sur une autre méthode qui est plus rapide et moins coûteuse : la CCMHP densitométrie. Cette méthode requiert moins de volume de solvant, le temps d'analyse est beaucoup plus court car plusieurs échantillons peuvent être analysés en même temps. De plus, l'absorption aux UV des solvants ne constitue pas non plus un problème étant donné que le solvant de migration est évaporé

après la migration. Par conséquent, une large gamme de solvants peut être utilisée (25). Nous avons donc développé une méthode pour le dosage des 4 triterpènes de *C. asiatica* rapide, qui permet d'analyser jusqu'à 7 échantillons sur une plaque de 20 x 10 cm par exemple avec une durée totale de 55 minutes (saturation de la cuve, migration, dérivatisation, analyse). 20 échantillons de deux variétés de *C. asiatica* ont été analysés et on a observé qu'en moyenne, ces deux variétés présentent des teneurs en triterpènes totaux de 6.86 et de 6.77%. La variété qui pousse à l'Est est la plus exploitée vu la biomasse élevée obtenue par rapport à la variété qui pousse à l'Ouest (Fig. 55).



Figure 55 : Variétés de *C. asiatica* Urb. (A : variété à feuille orbiculaire, B : feuilles des 2 variétés, C : variété à feuille réniforme).

La validation a été faite en comparant les résultats obtenus par CCMHP avec ceux obtenus par CLHP-UV considérée comme méthode de référence. La comparaison a été réalisée par le test de Bland et Altman qui est largement utilisé surtout pour les tests cliniques et peut être également appliqué en analyse (26). Elle est basée sur la détermination des « Limits of Agreement » (LoA) qui doivent être comprises entre les limites d'acceptation qui sont également fixées au préalable par l'analyste afin de faciliter la prise de décision. Nous avons obtenu une justesse $< |5,68|\%$ et une fidélité intermédiaire $< 1,64\%$. Les LoA calculées étaient comprises entre les limites d'acceptation fixées à $\pm 30\%$, une valeur acceptable pour les échantillons complexes comme les extraits de plantes, ce qui montre que la méthode CCMHP peut être utilisée à la place de la méthode CLHP-UV. La sélectivité de la méthode a été démontrée en couplant CCMHP et spectrométrie de masse en utilisant une interface TLC-MS qui permet de récupérer le contenu des spots et les injecte directement dans le détecteur MS. En CCMHP, une tâche peut éventuellement correspondre à plusieurs molécules si le solvant de migration n'est pas adéquat. Nous avons pu démontrer que la méthode est sélective, confirmant ainsi l'efficacité de la technique couplée (27). Des valeurs négatives de la justesse ($-4,17\%$ pour le madécassoside et $-5,68\%$ pour l'asiaticoside) montrent que la méthode

CCMHP donne des valeurs un peu plus faibles que la méthode CLHP. Malgré cela, ces différences sont acceptables et les deux méthodes peuvent être utilisées interchangeablement. Jacinda *et al.* (28) ont également mentionné que la CCMHP donne des résultats plus faibles que la CLHP mais dans leur travail, la comparaison des résultats obtenus avec une méthode CLHP n'est basée sur aucun test statistique. Les limites de détection de la méthode de Jacinda *et al.* étaient de 0.3 µg pour les acides et 0.72 µg pour les osides. Dans notre cas, ces limites sont respectivement de 0.01 et 0.03 µg, ce qui montre sa meilleure sensibilité. De plus, nous avons obtenu une meilleure séparation surtout pour les acides (Fig. 56).

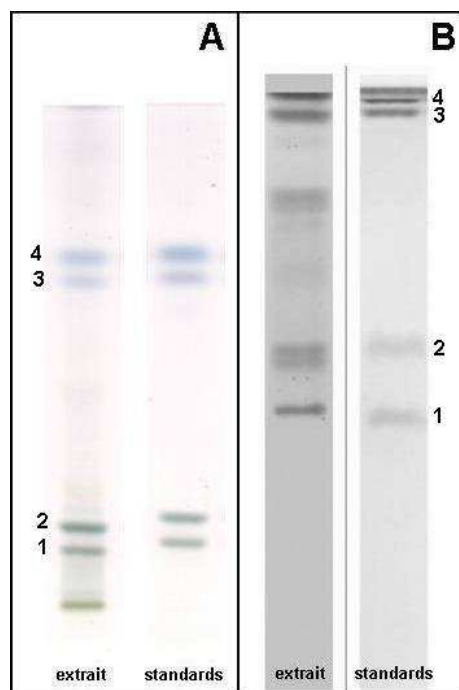


Figure 56 : Chromatogrammes du madécassoside (1), de l'asiaticoside (2), de l'acide madécassique (3) et de l'acide asiatic (4) de solutions standards et d'extraits de *C. asiatica* obtenus avec notre méthode (A) et la méthode décrite par Jacinda *et al.* (B).

Ce test de Bland et Altman a montré que nous avons donc réussi à développer une méthode CCMHP plus rapide et appropriée pour des analyses de routine des triterpènes dans les feuilles de *C. asiatica*.

Bibliography

- (1) Randriamampionona, D.; Diallo, B.; Rakotoniriana, F.; Rabemanantsoa, C.; Cheuk, K.; Corbisier, A.-M.; Mahillon, J.; Ratsimamanga, S.; El Jaziri, M. Comparative analysis of active constituents in *Centella asiatica* samples from Madagascar: Application for ex situ conservation and clonal propagation. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 482–489.
- (2) Danthu, P.; Lubrano, C.; Flavet, L.; Rahajanirina, V.; Behra, O.; Fromageot, C.; Rabevohitra, R.; Roger, E. Biological factors influencing production of xanthenes in *Aphloia theiformis*. *Chemistry and Biodiversity* **2010**, *7*, 140–150.
- (3) Yu, S. M.; Ko, F. N.; Chueh, S. C.; Chen, J.; Chen, S. C.; Chen, C. C.; Teng, C. M. Effects of dicentrine, a novel alpha 1-adrenoceptor antagonist, on human hyperplastic prostates. *European Journal of Pharmacology* **1994**, *252*, 29–34.
- (4) Teng, C. M.; Yu, S. M.; Ko, F. N.; Chen, C. C.; Huang, Y. L.; Huang, T. F. Dicentrine, a natural vascular alpha 1-adrenoceptor antagonist, isolated from *Lindera megaphylla*. *British Journal of Pharmacology* **1991**, *104*, 651–656.
- (5) Mustafa, M. R.; Achike, F. I. Dicentrine is preferentially antagonistic to rat aortic than splenic alpha 1-adrenoceptor stimulation. *Acta Pharmacologica Sinica* **2000**, *21*, 1165–1168.
- (6) Tsai, T.-H.; Wang, G.-J.; Lin, L.-C. Vasorelaxing Alkaloids and Flavonoids from *Cassytha filiformis*. *Journal of Natural Product* **2008**, *71*, 289–291.
- (7) Rasoanaivo, P.; Ratsimamanga-Uverg, S.; Rakoto-Ratsimamanga, A. Isoquinoline alkaloid constituents of *Spirospermum penduliflorum* and *Strychnopsis thouarsii* (Menispermaceae). *Biochemical systematics and ecology* **2003**, *23*, 679–680.
- (8) Stévigny, C.; Wautier, M.-C.; Habib Jiwan, J.-L.; Chiap, P.; Hubert, P.; Quetin-Leclercq, J. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for quantitative determination of aporphine alkaloids from different samples of *Cassytha filiformis*. *Planta Medica* **2004**, *70*, 764–770.
- (9) Tsai, T. H.; Tsai, T. R.; Chou, C. J.; Chen, C. F. Determination of dicentrine in rat plasma by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications* **1996**, *681*, 277–281.
- (10) Debrus, B. Nouvelle méthodologie pour le développement de méthodes chromatographiques, Ulg, 2011.
- (11) ICH Pharmaceutical development Q8 (R2) **2009**.
- (12) Stévigny, C.; Block, S.; De Pauw-Gillet, M. C.; de Hoffmann, E.; Llabrès, G.; Adjakidjé, V.; Quetin-Leclercq, J. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*. *Planta Medica* **2002**, *68*, 1042–1044.
- (13) Huang, R. L.; Chen, C. C.; Huang, Y. L.; Ou, J. C.; Hu, C. P.; Chen, C. F.; Chang, C. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. *Planta Medica* **1998**, *64*, 212–215.
- (14) Konkimalla, V. B.; Efferth, T. Inhibition of epidermal growth factor receptor over-expressing cancer cells by the aporphine-type isoquinoline alkaloid, dicentrine. *Biochemical Pharmacology* **2010**, *79*, 1092–1099.
- (15) www.edqm.eu *European Pharmacopoeia*; 2nd ed.; 2002.
- (16) www.edqm.eu *Pharmacopée Européenne* version 6th ed. **2008**.
- (17) Inamdar, P. K.; Yeole, R. D.; Ghogare, A. B.; de Souza, N. J. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *Journal of Chromatography A* **1996**, *742*, 127–130.
- (18) Schaneberg, B. T.; Mikell, J. R.; Bedir, E.; Khan, I. A. An improved HPLC method for quantitative determination of six triterpenes in *Centella asiatica* extracts and commercial products. *Pharmazie* **2003**, *58*, 381–384.
- (19) Günther, B.; Wagner, H. Quantitative determination of triterpenes in extracts and phytopreparations of *Centella asiatica* (L.) urban. *Phytomedicine* **1996**, *3*, 59–65.

- (20) ICH Q2 (R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and methodology*; 2005.
- (21) Blume, H.; Brendel, E.; Brudny-Klöppel, M.; Grebe, S.; Lausecker, B.; Rohde, G.; Siethoff, C. Workshop/conference report on EMA draft guideline on validation of bioanalytical methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, *42*, 300–305.
- (22) Food and Drug Administration, International Conference on Harmonization Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology. *Federal Register* **1995**, *60*, 11260–11262.
- (23) International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure and Applied Chemistry* **2002**, *74*, 835–855.
- (24) Commission SFSTP, P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat Validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches. *STP PHARMA PRATIQUES* **2003**, *13*, 101–138.
- (25) Waksmundzka-Hajnos, M. Editorial: thin-layer chromatography with biodetection for the screening of natural origin samples. *Medicinal Chemistry* **2012**, *8*, 72–74.
- (26) Bland, J. M.; Altman, D. G. Agreed Statistics: Measurement Method Comparison. *Anesthesiology* **2012**, *116*, 182–185.
- (27) Srivastava, M. *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*; Springer, 2010.
- (28) Jacinda, J.; Ian, D. Identification and Quantification of Triterpenoid Centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by Densitometric TLC. *Journal of Planar Chromatography* 2011, *24*, 82–87
- .

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de notre travail était la mise au point de méthodes pour le contrôle de qualité de plantes médicinales malgaches et la détermination des conditions optimales de culture/récolte. *C. asiatica* et *S. penduliflorum* ont été choisies pour cette étude. Le schéma ci-dessous (Fig.57) résume les objectifs, les procédures suivies pour atteindre ces objectifs et les résultats obtenus.

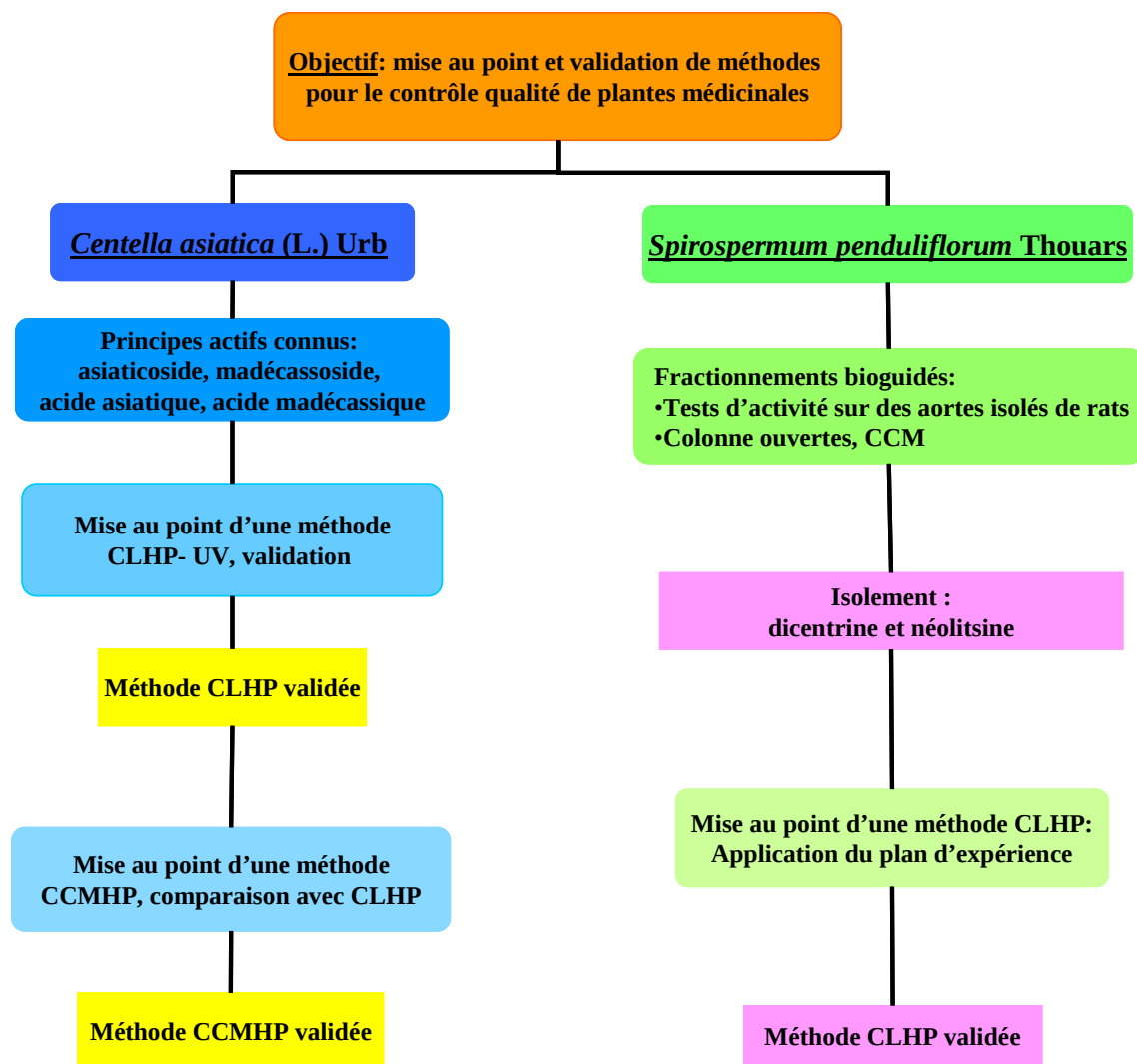


Figure 57 : Résumé des études et des résultats obtenus.

Nous avons ainsi identifié les principes actifs (dicentrine et néolitsine) des feuilles de *S. penduliflorum*. L'activité vasorelaxante de la dicentrine a été également démontrée *in vitro* sur des aortes isolées de rats contractées avec la phényléphrine avec une IC_{50} de $2.95 \mu M$. Une méthode de dosage de la dicentrine, molécule majoritaire de la plante a été mise au point en appliquant un plan d'expérience. Les conditions optimales en CLHP-UV permettant de

séparer les 13 alcaloïdes aporphiniques présents sont les suivantes: pH 3.0, pourcentage de méthanol au départ de 32%, gradient de 0.42% de méthanol/minute. Cette méthode a été complètement validée avec une exactitude de $\pm 30\%$ pour une gamme de concentrations comprise entre 10 à 75 $\mu\text{g/ml}$. Cette méthode a été appliquée sur 2 échantillons seulement de la plante vu la difficulté d'accès aux zones où la plante pousse abondamment et indiquent une différence relative d'environ 50% entre les deux échantillons, ce qui montre la nécessité d'analyse chimique des lots commercialisés pour standardiser les traitements.

En ce qui concerne la *C. asiatica*, une méthode CLHP-UV a été mise au point en améliorant les méthodes décrites dans la littérature. Cette méthode a été montrée comme valide entre des concentrations de 0.5 à 2 mg/ml pour les acides madécassique et asiatique et entre 1 à 3 mg/ml pour le madécassoside et l'asiaticoside. Une méthode CCMHP plus rapide, plus sensible et moins coûteuse que la CLHP a été également mise au point et validée en comparant les résultats avec ceux de la méthode CLHP-UV par la méthode de comparaison de Bland et Altman. Cette méthode CCMHP a été validée pour des concentrations de 100 $\mu\text{g/ml}$ à 500 $\mu\text{g/ml}$ pour les acides et 150 $\mu\text{g/ml}$ à 750 $\mu\text{g/ml}$ pour les osides. Il a été prouvé que ces deux méthodes peuvent être considérées comme équivalentes. Ceci prouve également que la méthode de comparaison de Bland et Altman est applicable en analyse quantitative.

Ces méthodes pourront être utilisées en routine pour le contrôle de qualité des matières premières et des produits finis à base de ces plantes et pour définir les meilleures conditions de culture/collecte. Elles serviront également à élaborer une monographie des deux plantes pour la réalisation d'une pharmacopée malgache. Pour la *C. asiatica*, la détermination des teneurs en triterpènes apportera de la valeur ajoutée aux extraits ou lots de plante à exporter.

Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives : ainsi l'identification des autres alcaloïdes présents dans les feuilles de *S. penduliflorum* et la détermination de leurs propriétés pharmacologiques seraient intéressantes. Des études *in vivo* compléteront utilement les études *in vitro* effectuées. Il serait utile aussi d'analyser d'autres lots de plantes provenant d'autres zones géographiques afin de vérifier la présence ou non d'alcaloïdes et de déterminer s'il existe deux chimiotypes distincts de la plante.

La majorité des plantes médicinales malgaches sont collectées à l'état sauvage. Même si aucune menace ne pèse sur ces ressources, la mise au point d'une culture serait essentielle pour la survie de ces espèces. Par conséquent, ces méthodes devront être appliquées dans le futur sur plusieurs échantillons afin de pouvoir identifier la période et l'endroit où le

maximum de teneur en principes actifs est observé, ces échantillons types pourront servir par la suite de matériel végétal pour la culture.

La formation en analyse, plan d'expérience et développement de méthodes me permettra, une fois rentrée à Madagascar, de mettre au point d'autres méthodes de dosage pour le contrôle de qualité de plantes utilisées en médecine traditionnelle, identifier les principes actifs, mieux standardiser les traitements et aider les agriculteurs locaux à optimiser leurs cultures et récoltes.

ANNEXE

ANNEXE 1

Table 19: Analyse par CLHP des saponines avec les différents détecteurs décrites dans la littérature (2006-2011).

Espèces	Phase mobile	Phase stationnaire	Détection	Références
Ginsenosides	0.1% ac formique-MeOH	C18 (150mm×4.6mm i.d.,5μ)	MS/APCI	(1)
	Ac. acétique-H ₂ O-ACN	C18 (250mm×4.6mm i.d.,5μ)	MS	(2)
	H ₂ O-ACN	C18 (250mm×3.2mm i.d.,5μ)	UV 202 nm	(3)
	H ₂ O-ACN	C18 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm)	ELSD	(4),(5),(6),(7)
	ACN-H ₂ O	DIOL (250 mm×2-mm i.d., 5μ)	ELSD	(8)
	Tampon phosphate-ACN	C18	UV 200nm	(9)
	Non définie	C18	203 nm DAD	(10),(11),(12)
	0.01%ac acétique-ACN	C18 (150 mm×2.1 mm i.d., 5μ)	ESI/MS	(13),(14)
	0.1% ac formique-ACN	C18	ELSD	(15),(16),(17)
	Tampon ammonium-ACN	C18	ESI/MS	(18),(19),(20)
	ACN-H ₂ O	C18	UV 203nm	(21)
	ACN-H ₂ O	C18	UV 203 - 206nm	(22)
<i>Bupleurum</i>	ACN-H ₂ O	C18	UV 203 nm	(23)
Astragalosides	0.1% ac formique-ACN	C18 (250×4.6μm i.d.,5μ)	MS/ESI	(24)
	0.3% ac formique-ACN	C18 (250 mm×4.6 mm i.d. 5μ)	DAD- 280nm	(25)
	0.3% ac acétique/ACN	C18	ELSD	(26),(27)
	ACN-H ₂ O	C18	ELSD	(28),(29),(30) (31),(32),(33)
	ACN-H ₂ O	C18	ESI/MS	(34)
	ACN-H ₂ O	HILIC (250 mm× 4.6 mm i.d.,5μ)	UV 203nm	(35)
<i>Dipacus asperoides</i>	ACN-H ₂ O	ODS Kromasil	UV 212nm	(36)
<i>Paris</i>	0.1%ac formique/ACN	C18 (150 mm× 4.6 mm i.d.,5μ)	ESI/MS	(37),(38)
	ACN-H ₂ O	C18(150 mm× 4.6 mm i.d.,5μ)	ELSD	(39),(40),(41)

Espèces	Phase mobile	Phase stationnaire	Détection	Références
Platycosides	ACN/H ₂ O	C18 (150 mm× 4.6 mm i.d., 5μ)	ELSD	(42)
<i>Lonicerae japonicae</i>	0.1% ac acétique-MeOH	C18 (250 mm× 4.6 mm i.d., 5μ)	UV 210 nm	(43)
	ACN-ac acétique	ODS	ELSD	(44)
Saikosaponines	ACN-H ₂ O	C18	UV 205 nm-ELSD	(45)
	ACN-tampon acétate d'ammonium	C18 (100mmx4.6mm i.d.,2.7μ)	ELSD-CAD	(46)
<i>Saponaria officinalis</i>	0. ac phosphorique/ACN	C18	UV 210 nm	(47)
Saponin I,II	0.02% ac phosphorique/ACN	C18	UV 203 nm	(48)
<i>Zizyphus jujuba var. sapinosa</i>	Ac formique-ACN	C18(250 mm× 4.6 mm i.d.,5μ)	UV 203 nm 210nm	(49) (50)
	Ac acétique-ACN	C18	ELSD	(51),(52)
Tubeimoside I	ACN-H ₂ O	C 18 (150 mm x 2.1mm i.d.,3.5μ)	MS	(53)
<i>Aesculus chinensis</i>	ACN-0.2% ac phosphorique	C18 (200 mm 4.6 mm i.d;x, 5μ)	ESI/TOF	(54)
<i>Tupistra chinensis</i>	ACN-H ₂ O	ODS	UV 203 nm	(55)
Concombre de mer	Non définie	Non définie	ELSD	(56)
<i>Momordica charantia</i>	Ac.acétique-MeOH-ACN	C18	ELSD-UV203 nm	(57),(58)
<i>Clematis</i>	Ac formique-ACN	C18	ELSD	(59)
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Ac formique-ACN	C18	ESI/MS	(60)
Soyasaponins	Ac acétique/MeOH	C18	ESI/MS	(61)
<i>Panicum virgatum</i>	Ac formique/ACN	C8	ESI/MS	(62)
<i>Conodopsis lanceolata</i>	Ac formique/ACN	C18	ESI/MS	(63)
<i>Bacopa monnieri</i>	ACN-H ₂ O	C18 (100mm×4.6 mm i.d.)	ELSD	(64)
<i>Pueraria</i>	Ac formique-ACN	C18	ELSD	(65)
<i>Yucca</i>	TFA-ACN	C18 modifiée	ESI/MS	(66),(67)

Espèces	Phase mobile	Phase stationnaire	Détection	Références
<i>Pulsatilla koreana</i>	H ₂ O-ACN	C18	ELSD	(68)
<i>Impatiens</i>	H ₂ O-MeOH	ODS	ELSD	(69)
<i>Medicago polymorpha</i>	ACN-TFA	C18	DAD 2150 nm	(70)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	ACN-TFA	C18	ESI/MS	(71)
<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	MeOH/ac formique	C18	ESI/MS	(72)
<i>Caulophyllum thalictroides</i>	Acetate d'ammonium-.ACN	C18	ELSD	(73)
<i>Labisia pumila</i>	H ₂ O/ACN	C18	ELSD	(74)
<i>Pulsatilla koreana</i>	MeOH-H ₂ O	C18 (150mm×4.6mm i.d., 2.7μ)	CAD	(75)

Bibliography

- (1) Yu, Z.; Gao, X.; Zhao, Y.; Chen, X.; Bi, K. Simultaneous determination of components in preparation Naodesheng injection by high performance liquid chromatograph-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (HPLC-MS/APCI). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2006**, *54*, 588-590.
- (2) Wang, Y.; Pan, J.-Y.; Xiao, X.-Y.; Lin, R.-C.; Cheng, Y.-Y. Simultaneous determination of ginsenosides in *Panax ginseng* with different growth ages using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* **2006**, *17*, 424-430.
- (3) Wang, C.-Z.; Ni, M.; Sun, S.; Li, X.-L.; He, H.; Mehendale, S. R.; Yuan, C.-S. Detection of adulteration of notoginseng root extract with other *Panax* species by quantitative HPLC coupled with PCA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 2363-2367.
- (4) Wan, J.-B.; Li, P.; Li, S.; Wang, Y.; Dong, T. T.-X.; Tsim, K. W.-K. Simultaneous determination of 11 saponins in *Panax notoginseng* using HPLC-ELSD and pressurized liquid extraction. *Journal of Separation Science* **2006**, *29*, 2190-2196.
- (5) Wan, J. B.; Yang, F. Q.; Li, S. P.; Wang, Y. T.; Cui, X. M. Chemical characteristics for different parts of *Panax notoginseng* using pressurized liquid extraction and HPLC-ELSD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *41*, 1596-1601.
- (6) Sun, B.-S.; Gu, L.-J.; Fang, Z.-M.; Wang, C.-yan; Wang, Z.; Lee, M.-R.; Li, Z.; Li, J.-J.; Sung, C.-K. Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC-ELSD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2009**, *50*, 15-22.
- (7) Chen, Z.; Zhang, M.; Li, X.; Xu, Q.; Yang, S. [Simultaneous determination of five glycosides in Aidi injection by RP-HPLC-ELSD]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2011**, *36*, 706-708.
- (8) Lou, D.-W.; Saito, Y.; Zarzycki, P. K.; Ogawa, M.; Jinno, K. Isocratic separation of ginsenosides by high-performance liquid chromatography on a diol column at subambient temperatures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *385*, 96-104.
- (9) Yao, H.; Shi, P.; Shao, Q.; Fan, X. Chemical fingerprinting and quantitative analysis of a *Panax notoginseng* preparation using HPLC-UV and HPLC-MS. *Chinese Medicine* **2011**, *6*, 9.
- (10) Christensen, L. P.; Jensen, M.; Kidmose, U. Simultaneous determination of ginsenosides and polyacetylenes in American ginseng root (*Panax quinquefolium* L.) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 8995-9003.
- (11) Wei, Y.-J.; Li, S.-L.; Li, P. Simultaneous determination of seven active components of Fufang Danshen tablet by high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* **2007**, *21*, 1-9.
- (12) Zhu, J.-jing; Wang, Z.-min; Kuang, Y.-hui; Zhang, Q.-wei; Gao, Q.-pin; Ma, N. [A quantitative method using one marker for simultaneous assay of ginsenosides in *Panax ginseng* and *P. notoginseng*]. *Yao Xue Xue Bao* **2008**, *43*, 1211-1216.
- (13) Yu, K.; Ma, Y.; Shao, Q.; Qu, H.; Cheng, Y. Simultaneously determination of five ginsenosides in rabbit plasma using solid-phase extraction and HPLC/MS technique after intravenous administration of "SHENMAI" injection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *44*, 532-539.
- (14) Ding, L.; Luo, X.; Tang, F.-L.; Nie, L.; Yao, S. To improve the quantification sensitivity of large molecular weight compounds--with ginsenosides as example. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 989-996.
- (15) Wei, Y.-J.; Qi, L.-W.; Li, P.; Luo, H.-W.; Yi, L.; Sheng, L.-H. Improved quality control method for Fufang Danshen preparations through simultaneous determination of phenolic acids, saponins and diterpenoid quinones by HPLC coupled with diode array and evaporative

light scattering detectors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *45*, 775-784.

- (16) Wan, J.-B.; Li, S.-P.; Chen, J.-M.; Wang, Y.-T. Chemical characteristics of three medicinal plants of the *Panax* genus determined by HPLC-ELSD. *Journal of Separation Science* **2007**, *30*, 825-832.
- (17) Kim, S. N.; Ha, Y. W.; Shin, H.; Son, S. H.; Wu, S. J.; Kim, Y. S. Simultaneous quantification of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* C.A. Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control. *J Pharm Biomed Anal* **2007**, *45*, 164-170.
- (18) Li, X.; Sun, J.; Wang, G.; Hao, H.; Liang, Y.; Zheng, Y.; Yan, B.; Sheng, L. Simultaneous determination of panax notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, Rd, Re and Rb1 in rat plasma by HPLC/ESI/MS: platform for the pharmacokinetic evaluation of total panax notoginsenoside, a typical kind of multiple constituent traditional Chinese medicine. *Biomedical Chromatography* **2007**, *21*, 735-746.
- (19) Zhou, W.; Li, J.; Li, X.; Yan, Q.; Zhou, P. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative determination of ginsenosides Rb1, Rd, F2, and compound K during the process of biotransformation of ginsenoside Rb1. *Journal of Separation Science* **2008**, *31*, 921-925.
- (20) Liu, X.-X.; Wang, L.; Chen, X.-Q.; Deng, X.-T.; Cao, Y.; Wang, Q. Simultaneous quantification of both triterpenoid and steroidal saponins in various Yunnan Baiyao preparations using HPLC-UV and HPLC-MS. *Journal of Separation Science* **2008**, *31*, 3834-3846.
- (21) Qian, Z. M.; Wan, J. B.; Zhang, Q. W.; Li, S. P. Simultaneous determination of nucleobases, nucleosides and saponins in *Panax notoginseng* using multiple columns high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, *48*, 1361-1367.
- (22) Qian, Z. M.; Lu, J.; Gao, Q. P.; Li, S. P. Rapid method for simultaneous determination of flavonoid, saponins and polyacetylenes in folium ginseng and radix ginseng by pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 3825-3830.
- (23) Xiao, R.; Wang, C.-ying; Zhang, Z.-fei; Yuan, Z.-fang; Zhang, L.-tong [Studies on fingerprints of *Bupleurum chinense* from Hebei Province with HPLC-UV]. *Zhong Yao Cai* **2006**, *29*, 119-123.
- (24) Wang, D.; Song, Y.; Li, S.; Bian, Y.; Guan, J.; Li, P. Simultaneous analysis of seven astragalosides in radix Astragali and related preparations by liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **2006**, *29*, 2012-2022.
- (25) Qi, L.-W.; Yu, Q.-T.; Li, P.; Li, S.-L.; Wang, Y.-X.; Sheng, L.-H.; Yi, L. Quality evaluation of radix Astragali through a simultaneous determination of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1134*, 162-169.
- (26) Yu, Q.-T.; Qi, L.-W.; Li, P.; Yi, L.; Zhao, J.; Bi, Z. Determination of seventeen main flavonoids and saponins in the medicinal plant Huang-qi (Radix Astragali) by HPLC-DAD-ELSD. *Journal of Separation Science* **2007**, *30*, 1292-1299.
- (27) Yi, L.; Qi, L.-W.; Li, P.; Ma, Y.-H.; Luo, Y.-J.; Li, H.-Y. Simultaneous determination of bioactive constituents in Danggui Buxue Tang for quality control by HPLC coupled with a diode array detector, an evaporative light scattering detector and mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 571-580.
- (28) Li, J.; Li, P.; Li, H.-J.; Song, Y.; Bi, Z.-M.; Li, Y.-J. Simultaneous qualification and quantification of eight triterpenoids in radix achyranthis bidentatae by high-performance

liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometric detection. *Journal of Separation Science* **2007**, *30*, 843-850.

- (29) Zhao, J.; Wang, D.; Duan, S.; Wang, J.; Bai, J.; Li, W. Analysis of fuzhisan and quantitation of baicalin and ginsenoside Rb(1) by HPLC-DAD-ELSD. *Archives of Pharmacal Research* **2009**, *32*, 989-996.
- (30) Xia, G.-P.; Liu, P.; Han, Y.-M. Determination of the total content of astragaloside IV in Radix Astragali. *Zhong Yao Cai* **2008**, *31*, 385-387.
- (31) Pei, C.; Wang, Z.; Ja, J.; Song, J. Determination of astragaloside IV of eight area in *Astragali* Radix is by HPLC-ELSD internal standard method. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2011**, *36*, 1982-1984.
- (32) Qi, L.-W.; Yu, Q.-T.; Yi, L.; Ren, M.-T.; Wen, X.-D.; Wang, Y.-X.; Li, P. Simultaneous determination of 15 marker constituents in various radix *Astragali* preparations by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science* **2008**, *31*, 97-106.
- (33) Liu, Y.; Zhang, X.; Zhao, Y.; Chen, H.; Wang, B.; Zhang, Q. Comparative chemical analysis of Radix Astragali and Radix Hedysari by HPLC. *Natural Product Research* **2011**.
- (34) Wen, X.-D.; Qi, L.-W.; Li, P.; Bao, K.-D.; Yan, X.-W.; Yi, L.; Li, C.-Y. Simultaneous determination of calycosin-7-O-beta-D-glucoside, ononin, astragaloside IV, astragaloside I and ferulic acid in rat plasma after oral administration of Danggui Buxue Tang extract for their pharmacokinetic studies by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2008**, *865*, 99-105.
- (35) Liu, J.; Guo, B.; Huang, W.; Xiao, P.; Song, H.; Wang, C. Determination of saponins in Dipsaci Radix by HILIC-HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2011**, *36*, 2367-2371.
- (36) Tan, H.-gen; Lin, S.; Zhang, Q.-wei; Ji, L. Determination of akebia saponin D in root of *Dipacus asperoides* by HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2006**, *31*, 726-727, 739.
- (37) Liu, H.; Huang, Y.; Wang, Q.; Zhang, T.; Song, Y. Detection of saponins in extracts from the rhizomes of *Paris* species and prepared Chinese medicines by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Planta Medica* **2006**, *72*, 835-841.
- (38) Zhang, T.; Liu, H.; Liu, X.-T.; Xu, D.-ran; Chen, X.-qing; Wang, Q. Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51*, 114-124.
- (39) Huang, Y.; Cui, L.-jian; Liu, W.-na; Wang, Q. Quantitative analysis of steroidal saponins in Chinese material medica Rhizoma Paridis by HPLC-ELSD. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2006**, *31*, 1230-1233.
- (40) Man, S.; Gao, W.; Zhang, Y.; Wang, J.; Zhao, W.; Huang, L.; Liu, C. Qualitative and quantitative determination of major saponins in *Paris* and *Trillium* by HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS. *Journal Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2010**, *878*, 2943-2948.
- (41) Lin, J.-T.; Chang, Y.-Z.; Lu, M.-P.; Yang, D.-J. Simultaneous Determination of Furostanol, Pennogenyl, and Diosgenyl Glycosides in Taiwanese Rhizoma Paridis (*Paris formosana* Hayata) by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 1587-1593.
- (42) Ha, Y. W.; Na, Y.-C.; Seo, J.-J.; Kim, S.-N.; Linhardt, R. J.; Kim, Y. S. Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in *Platycodi* Radix by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1135*, 27-35.

- (43) Zhang, X.-G.; Wang, Z.-M.; Song, X.-M.; Zhu, J.-J.; Gao, H.-M.; Lin, L.-M. [Determination of Ionicerside A and C in *Lonicerae japonicae* by RP-HPLC]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2007**, *32*, 2149-2151, 2210.
- (44) Chen, C.-Y.; Qi, L.-W.; Li, H.-J.; Li, P.; Yi, L.; Ma, H.-L.; Tang, D. Simultaneous determination of iridoids, phenolic acids, flavonoids, and saponins in Flos *Lonicerae* and Flos *Lonicerae Japonicae* by HPLC-DAD-ELSD coupled with principal component analysis. *Journal of Separation Science* **2007**, *30*, 3181-3192.
- (45) Tang, Y.-hong; Zhang, Y.-yuan; Zhu, H.-yan; Huang, C.-gang A high-performance liquid chromatographic method for saikosaponin a quantification in rat plasma. *Biomedical Chromatography* **2007**, *21*, 458-462.
- (46) Eom, H. Y.; Park, S.-Y.; Kim, M. K.; Suh, J. H.; Yeom, H.; Min, J. W.; Kim, U.; Lee, J.; Youm, J.-R.; Han, S. B. Comparison between evaporative light scattering detection and charged aerosol detection for the analysis of saikosaponins. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 4347-4354.
- (47) Szakiel, A.; Henry, M. Analysis of gypsogenin saponins in homeopathic tinctures. *Acta Biochimica Polonica* **2007**, *54*, 853-856.
- (48) Pu, Y.-ming; Zhang, Y.; Gu, R.; Lai, X.-rong; Du, J.; Li, R.-chao Studies on quality standard of Yifu ointment. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2007**, *32*, 2368-2370.
- (49) Liu, J.; Chen, B.; Yao, S. Simultaneous analysis and identification of main bioactive constituents in extract of *Zizyphus jujuba* var. *sapinosa* (*Zizyphi spinosi semen*) by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry. *Talanta* **2007**, *71*, 668-675.
- (50) Niu, J.-W.; Zhang, Q.-W.; Gong, M.-X.; Yan, L.-H.; Zhu, J.-J.; Wang, Z.-M.; Li, Q.-F. Determination of zizybeoside II of *Zizyphus jujuba* by HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2008**, *33*, 2935-2937.
- (51) Zhang, M.; Zhang, Y.; Xie, J. Simultaneous determination of jujuboside A, B and betulinic acid in semen *Zizyphi spinosae* by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* **2008**, *48*, 1467-1470.
- (52) Guo, S.; Duan, J.-ao; Tang, Y.; Qian, Y.; Zhao, J.; Qian, D.; Su, S.; Shang, E. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of triterpenic acids, saponins and flavonoids in the leaves of two *Zizyphus* species by HPLC-PDA-MS/ELSD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *56*, 264-270.
- (53) Liang, M.-J.; Zhang, W.-D.; Zhang, C.; Liu, R.-H.; Shen, Y.-H.; Li, H.-L.; Wang, X.-L.; Wang, X.-W.; Zhu, J.-B.; Chen, C.-L. Quantitative determination of the anticancer agent tubeimoside I in rat plasma by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, *845*, 84-89.
- (54) Chen, J.; Li, W.; Yang, B.; Guo, X.; Lee, F. S.-C.; Wang, X. Determination of four major saponins in the seeds of *Aesculus chinensis* Bunge using accelerated solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography and electrospray-time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *596*, 273-280.
- (55) Zhou, Y.; Zou, K.; Yu, L.-ling; Qin, S.-jiu; Xu, L.-lan; Liu, C. Determination of two saponins in *Tupistra chinensis* rhizomes by RP-HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2008**, *33*, 2647-2649.
- (56) Xiong, Y.; Guo, D.; Zheng, X.-L.; Sun, P.; Xu, L.-Y.; Chen, J.-M. [Preliminary study on sea cucumber saponin-nobiliside A liposome and its hemolytic activity]. *Yao Xue Xue Bao* **2008**, *43*, 214-220.
- (57) Wang, Y.-H.; Avula, B.; Liu, Y.; Khan, I. A. Determination and quantitation of five cucurbitane triterpenoids in *Momordica charantia* by reversed-phase high-performance liquid

chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatographic Sciences* **2008**, 46, 133-136.

- (58) Zhang, Y.; Guan, J.; Cui, J.; Zhao, Y. [Quantitative analysis of aglycone of momordicoside L from *Momordica charantia* in different areas by HPLC]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2010**, 35, 620-622.
- (59) Sun, F.; He, Q.; Xiao, P.; Muhammad, I.; Cheng, Y. Simultaneous quantification of five triterpenoid saponins in *Clematis* L. spp. by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Phytochemistry Analysis* **2008**, 19, 40-45.
- (60) Kao, T. H.; Huang, S. C.; Inbaraj, B. S.; Chen, B. H. Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 626, 200-211.
- (61) Sagratini, G.; Zuo, Y.; Caprioli, G.; Cristalli, G.; Giardinà, D.; Maggi, F.; Molin, L.; Ricciutelli, M.; Traldi, P.; Vittori, S. Quantification of soyasaponins I and betag in Italian lentil seeds by solid-phase extraction (SPE) and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57, 11226-11233.
- (62) Lee, S. T.; Mitchell, R. B.; Wang, Z.; Heiss, C.; Gardner, D. R.; Azadi, P. Isolation, characterization, and quantification of steroidal saponins in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57, 2599-2604.
- (63) Ichikawa, M.; Ohta, S.; Komoto, N.; Ushijima, M.; Kodera, Y.; Hayama, M.; Shirota, O.; Sekita, S.; Kuroyanagi, M. Simultaneous determination of seven saponins in the roots of *Codonopsis lanceolata* by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Natural Medicines* **2009**, 63, 52-57.
- (64) Bhandari, P.; Kumar, N.; Singh, B.; Singh, V.; Kaur, I. Silica-based monolithic column with evaporative light scattering detector for HPLC analysis of bacosides and apigenin in *Bacopa monnieri*. *Journal of Separation Science* **2009**, 32, 2812-2818.
- (65) Niiho, Y.; Nakajima, Y.; Yamazaki, T.; Okamoto, M.; Tsuchihashi, R.; Kodera, M.; Kinjo, J.; Nohara, T. Simultaneous analysis of isoflavones and saponins in *Pueraria* flowers using HPLC coupled to an evaporative light scattering detector and isolation of a new isoflavone diglucoside. *Journal of Natural Medicine* **2010**, 64, 313-320.
- (66) Montoro, P.; Skhirtladze, A.; Perrone, A.; Benidze, M.; Kemertelidze, E.; Piacente, S. Determination of steroidal glycosides in *Yucca gloriosa* flowers by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, 52, 791-795.
- (67) Kowalczyk, M.; Pecio, Ł.; Stochmal, A.; Oleszek, W. Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extract and bark powder of *Yucca schidigera* Roezl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59, 8058-8064.
- (68) Lee, K. Y.; Cho, Y. W.; Park, J.; Lee, D. Y.; Kim, S. H.; Kim, Y. C.; Sung, S. H. Quality control of *Pulsatilla koreana* based on the simultaneous determination of triterpenoidal saponins by HPLC-ELSD and principal component analysis. *Phytochemical Analysis* **2010**, 21, 314-321.
- (69) Li, H.-J.; Yu, J.-J.; Li, P. Simultaneous qualification and quantification of baccharane glycosides in *Impatiens Semen* by HPLC-ESI-MSD and HPLC-ELSD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, 54, 674-680.
- (70) Tava, A.; Pecetti, L.; Romani, M.; Mella, M.; Avato, P. Triterpenoid glycosides from the leaves of two cultivars of *Medicago polymorpha* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59, 6142-6149.
- (71) Montoro, P.; Maldini, M.; Russo, M.; Postorino, S.; Piacente, S.; Pizza, C. Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, 54, 535-544.

- (72) Ling, J.; Liu, L.; Wang, Y.; Li, Z.; Liu, R.; Li, Q.; Wang, Y.; Yang, B.; Chen, X.; Bi, K. Characterization and quantification of the triterpenoids in different parts of *Xanthoceras sorbifolia* by HPLC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, 55, 259-264.
- (73) Avula, B.; Wang, Y.-H.; Rumalla, C. S.; Ali, Z.; Smillie, T. J.; Khan, I. A. Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx. using UPLC, HPLC and HPTLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, 56, 895-903.
- (74) Avula, B.; Wang, Y.-H.; Ali, Z.; Smillie, T. J.; Khan, I. A. Quantitative determination of triperpene saponins and alkenated-phenolics from *Labisia pumila* using an LC-UV/ELSD method and confirmation by LC-ESI-TOF. *Planta Medica* **2011**, 77, 1742-1748.
- (75) Yeom, H.; Suh, J. H.; Youm, J.-R.; Han, S. B. Simultaneous Determination of Triterpenoid Saponins from *Pulsatilla koreana* using High Performance Liquid Chromatography Coupled with a Charged Aerosol Detector (HPLC-CAD). *Bulletin of the Korean Chemical Society* 31, 1159-1164.