

LA STANDARDISATION DES PHYTOMÉDICAMENTS PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

K. DOTSE*, R. ASSAGBUI**, K. KOUMAGLO*, J.T. ARNASON**
et M. GBEASSOR*

* Centre de Recherche et de Formation sur les Plantes
Médicinales (CERFOPLAM),
Université du Bénin, B.P. 1515, Lomé, Togo.

** Université d'Ottawa, Département de Biologie,
Ontario, Canada.

RESUME

L'utilisation des plantes médicinales dans les soins de santé primaires dans les pays africains, est très répandue et répond à des exigences tant culturelles qu'économiques. Pour permettre une meilleure intégration de la médecine traditionnelle dans le système sanitaire de nos pays, il s'avère de plus en plus important de bien caractériser les médicaments dérivés de plantes sur le plan chimique, pharmacologique et toxicologique.

Dans le souci d'assurer le contrôle de qualité des phytomédicaments éthiques, nous avons mis au point une méthode par HPLC nous permettant de quantifier l'une des molécules actives dans la préparation.

Mots clés : Phytomédicament, Standardisation, *Azadirachta indica*, *Psidium guajava*, *Zingiber officinale*, HPLC

INTRODUCTION

La production de Phytomédicaments éthiques semble être une étape indispensable dans les pays en développement et particulièrement ceux d'Afrique pour assurer une meilleure couverture sanitaire de la population.

Le contrôle de qualité des produits dérivés de plantes est une exigence avant leur mise sur le marché comme médicaments. Trop souvent on remarque qu'une action

pharmacologique spécifique est décrite pour un produit de plante mais qu'il n'y a pas de caractérisation chimique.

La chromatographie est la méthode la plus utilisée pour le contrôle de qualité des extraits de plante (1). Généralement la chromatographie sur couche mince (TLC), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sont utilisées comme des méthodes qualitatives. Si les principes actifs sont connus, les mêmes techniques sont appliquées à des fins quantitatives.

Dans notre centre nous avons développé des méthodes de standardisation avec le HPLC. Les résultats obtenus pour trois extraits sont présentés dans cette communication.

MATERIEL ET METHODES

Trois extraits de plantes différentes ont été utilisés. Il s'agit de *Azadirachta indica*, *Psidium guajava* et *Zingiber officinale*.

Les échantillons des plantes ont été récoltés au Togo, leur authentification a été effectuée par le laboratoire de Botanique de l'Université du Bénin où des spécimens sont déposés.

Les méthodes de préparation des extraits varient d'une plante à l'autre.

. Extrait de *Azadirachta indica*

Les feuilles de *Azadirachta indica* (236.29g) hachées sont extraites dans l'éthanol 95%. Après filtration sous vide sur papier Whatman N°1, le filtrat est concentré à 500 ml par évaporation sous vide, puis filtré par microfiltre et dilué 3 fois pour l'analyse.

. Extrait de *Psidium guajava*

A 5g de feuille de goyavier moulue sont ajoutés 100ml d'éthanol 95%. Le mélange est agité et laissé pour macération pendant 24H. Après filtration sous vide sur papier Whatman N°1, l'extrait est évaporé presque à sec. Le concentré est récupéré en rinçant le ballon avec de l'eau ultra-pure. On y ajoute du HCl concentré pour avoir un pH entre 1N et 2N. On chauffe avec reflux dans un bain d'eau bouillant pendant 30 minutes et on laisse refroidir. La quercétine est extraite dans une ampoule à décanter de 250 ml avec 2 fois 50 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est récupérée et filtrée sur papier Whatman N°1 sous vide. Après évaporation à sec, le résidu est dissous dans 5 ml de méthanol, filtré par microfiltre et analysé à l'HPLC.

. Extrait de Zingiber officinale

170 ml de méthanol sont ajoutés à 5g de gingembre broyé. Le mélange est agité pendant 1 mn avec le Waring Blender, puis laissé macérer pendant 20 min. Il est filtré sous vide sur papier Whatman N°1 et le filtrat est évaporé à sec. L'extrait repris dans 5 ml de méthanol est filtré sur membrane (0,2µm) puis analysé par HPLC.

RESULTATS

Extrait de Azadirachta indica

Le principe actif recherché dans cet extrait est la gédunine. L'étalonnage a été effectué avec un standard mis en solution dans de l'éthanol à 95% à raison de 1mg/ml. L'analyse chromatographique a été faite dans les conditions suivantes :

- Phase mobile : mélange méthanol/eau dans les proportions initiales respectives de 40% et 60% avec un gradient d'eau de 60 - 35% de 0 à 5 min, 35-0% de 20 à 24 min et 0-60% de 27 à 28 min.
- débit : 1ml/min
- longueurs d'onde : 215 et 350 nm
- volume injecté : 20µl
- durée de l'analyse : 45 min

Les résultats pour la courbe standard sont les suivants :

Quantité injectée (mg)	Hauteur du pic (cm)
1,000	3,98
0,500	1,96
0,250	1,31
0,125	0,79
0,0625	0,55
0.000	0

De ces résultats on tire l'équation de la droite qui est $Y = 4.0694x$ ($r^2 = 0,973$) avec Y = hauteur du pic et x la quantité injectée en mg.

La figure 1 montre le profil du spectre après l'injection de 20µl de l'extrait de *Azadirachta indica*. Le pic de la Gédunine sort à 26,58 min avec une hauteur de 1,18 cm. La concentration est estimée à 1,84mg/g de matériel sec.

Extrait de Psidium guajava

Le principe actif recherché est la quercétine. Les conditions de l'analyse chromatographique sont les suivantes :

- phase mobile : Méthanol / 5% acide acétique (aq) (7:83)
- gradient d'acide : 93-83% de 2 à 8 min, 83-25% de 8 à 25 min, 25-20% de 25 à 27 min, 20-0% de 29 à 30 min, 0-93% de 32 à 33 min.
- débit : 1,5ml/min
- longueur d'onde : 280 et 350 nm
- volume injecté : 20µl
- durée d'analyse : 35 min.

L'équation de la courbe d'étalonnage à partir du standard est $Y = 0,067x$, x étant la quantité exprimée en µg.

La figure 2 montre le profile du spectre de l'extrait. La quercétine sort à 20.90 min. Sa concentration dans l'extrait est estimée à 71,65µg/g de matériel sec.

Extrait de Zingiber officinale

Le principe actif recherché est le gingerol. Les conditions de l'analyse chromatographique sont les suivantes :

- phase mobile : Acétonitrile/2% acide acétique (aq) (40:60)
- débit : 1,5 ml/min ;
- longueur d'onde : 270 nm
- volume injecté : 20 µl
- durée d'analyse : 10 min.

DISCUSSION

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la méthode la plus utilisée pour l'analyse chimique des extraits bioactifs(1). La raison principale est que cette

technique permet une analyse directe d'extraits aqueux. Par ailleurs il existe un certain nombre de détecteurs susceptibles de donner des signes spécifiques en fonction des composés.

Nous avons montré que le HPLC permet de caractériser la gédunine, la quercétine et le gingerole qui sont des composés bioactifs retrouvés respectivement dans les extraits de *Azadirachta indica* (2) de *Psidium guajava* (5,7) et *Zingiber officinale* (3,4). En disposant de standards commerciaux purs de ces composés, la technique permet même d'estimer leur quantité présente dans les échantillons. Ce qui fait une méthode fiable pour le contrôle de qualité des phytomédicaments.

REFERENCES

- 1 - Karlsen Jan : Quality control and instrumental analysis of plant extracts. In the Medicinal Plant Industry. CRC Press, pp : 99 - 105, 1991
- 2 - Khalid, S.A., Duddeck, H. Gonzalez-Sierra, M. J. Nat. Prod. 52(5), 922 -927, 1989
- 3 - Connell, D.W. and sutherland, M.D. : Aust. J. Chem, 22, 1033, 1969
- 4 - Govindarajan, V.S. : CRC crit. Rev. Food Sci. Nutr., 17, 189, 1982
- 5 - Lozoya, X., Meckes, M., Abou-Zaid, M., Tortoriello, J., Nozzolillo, C., Arnason, J.T. : Quercetin glycosides in *Psidium guajava* leaves and determination of a spasmolytic principle. Arch. Med. Res. 25 1 : 11-15, 1994
- 6 - Lozoya, X., Abou-Zaid, M., M., Nozzolillo, C. and Arnason, J.T. : spasmolytic effect of the methanolic extract of *Psidium guajava*
- 7 - Lutterodt, G.D. : J. Ethnopharmacology 25, 235-247, 1989.

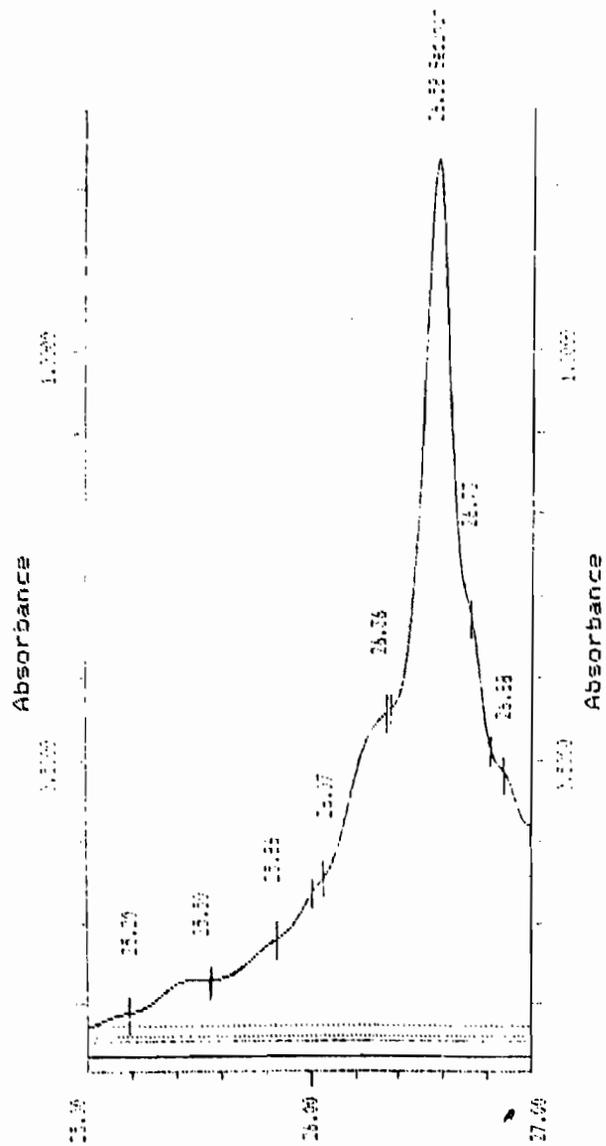


Figure 1 : Spectre d'absorption de la gáduanine extraite du Neem.

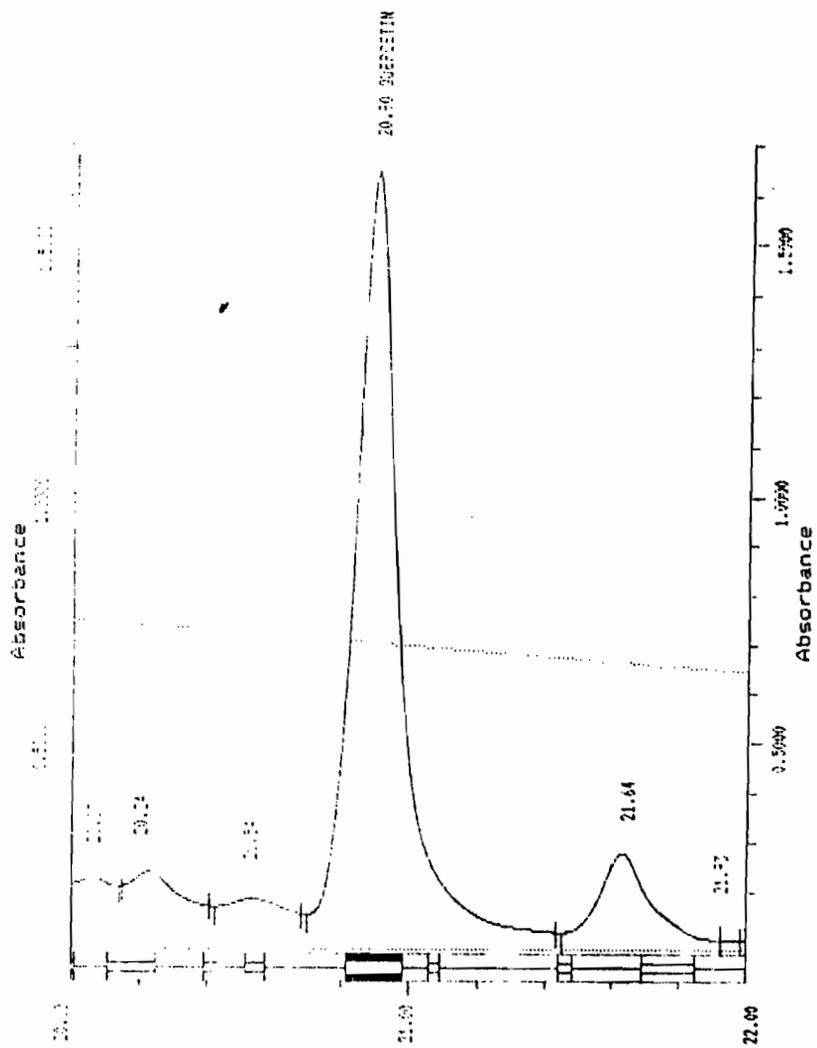


Figure 2 : Spectre d'absorption de la quercétine extraite des feuilles du goyavier.

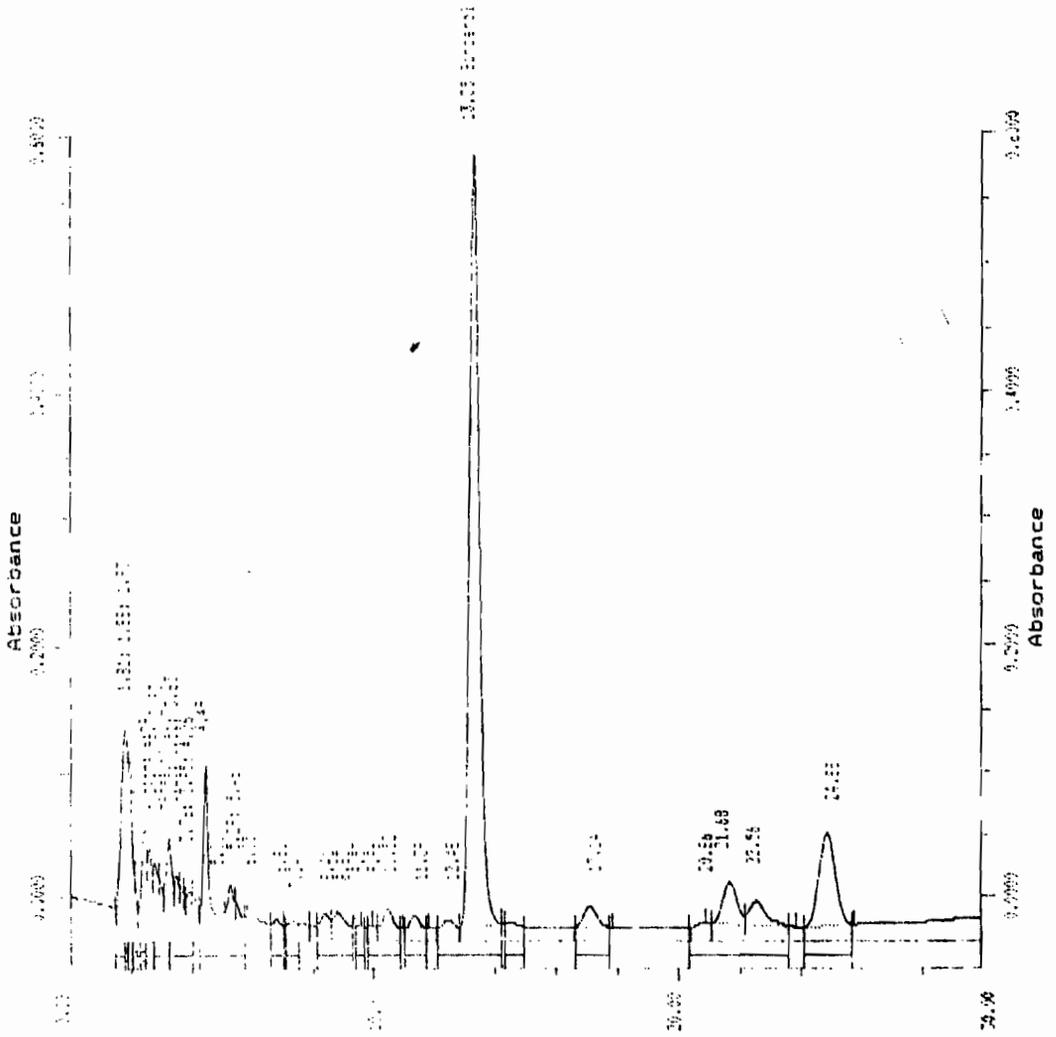


Figure 3 : Chromatogramme d'un extrait de gingembre.