

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

UNIVERSITE FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY  
ABIDJAN-COCODY

ÉCOLE DOCTORALE : CHIMIE DE PARIS SUD - 470  
LABORATOIRE DE CHIMIE ANALYTIQUE EA4041  
FACULTE DE PHARMACIE  
UNIVERSITE DE PARIS-SUD

*POLE : CHIMIE*

ANNEE : 2013

SERIE DOCTORAT N°

THESE

Présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY  
UNIVERSITE DE PARIS SUD

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD ET L'UNIVERSITE FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY ABIDJAN-COCODY

par

**Nicaise François BONY**

**Stratégie analytique des tradimédicaments : établissement de profils chromatographiques des métabolites phytochimiques apolaires**

soutenue le 26 septembre 2013

**Composition du jury :**

Directeurs de thèse : Pierre CHAMINADE / Anglade Kla MALAN  
Université PARIS SUD / Université FHB ABIDJAN COCODY

Président du jury : Luc EVELEIGH AGROPARISTECH  
Rapporteurs : Yves PELISSIER Université MONTPELLIER  
Didier THIEBAUT ESPCI PARISTECH  
Examineurs : Michel LARROQUE Université MONTPELLIER  
Eugène ATINDEHOU Université FHB ABIDJAN COCODY  
Danielle LIBONG Université PARIS SUD  
Membre invité : Pierre CHAMPY Université PARIS SUD

*A Mélanie*

*A mes filles : Esther ; Deborah ; Grace-Emmanuella et Marie-Cécilia*

*A mon Père et ma Mère*

*A mes frères et sœurs*



## Remerciements

A :

Mr Pierre CHAMINADE, qui sans même m'avoir vu, a effectué les démarches pour mon inscription, m'a accueilli dans son laboratoire et a accepté de diriger ma thèse. Toute ma reconnaissance pour sa grande disponibilité, ses encouragements, ses aides et toute sa sympathie dont j'ai bénéficié durant mes séjours.

Mr Anglade MALAN, qui m'a guidé dans le monde de la recherche et accepté encore une fois de diriger ma thèse de Doctorat. Merci pour ta disponibilité, tes conseils, tes encouragements et tes aides.

Messieurs Yves PELISSIER et Didier THIEBAUT, pour avoir accepté sans hésitation d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs.

Messieurs Eugène ATINDEHOU, Michel LARROQUE et Luc EVELEIGH, pour avoir accepté de participer au jury de ma thèse.

Madame Arlette BAILLET-GUFFROY, pour tous ses mots d'encouragement dont j'ai bénéficié.

Danielle LIBONG, pour ton encadrement, tes encouragements et tout le soutien dont j'ai bénéficié durant mes séjours.

Pierre CHAMPY, qui m'a accueilli dans son laboratoire pour la préparation des échantillons. Toute ma gratitude pour son apport en phytochimie, ses suggestions, sa grande sympathie et tout le soutien dont j'ai bénéficié.

Jean BLETON, pour son expérience en GC/MS dont j'ai bénéficié et également tous ses encouragements et suggestions.

Audrey SOLGADI, pour son bon accueil au SAMM et ses encouragements malgré le surcroît de travail lié à mes extraits plantes.

Laurent, Raoul, Ali, Rabei, Rime, Sonia, Juliette, Madeleine, Stéphanie pour les moments partagés.

Tout le personnel du Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud, EA4041. Université de Paris Sud.

Tout le personnel du Département de Chimie Analytique, Chimie Minérale et Générale, (UFR) des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université d'Abidjan-Cocody.

## Résumé

Les médicaments traditionnels à base de plantes (tradimédicaments) sont très utilisés par les populations africaines. Mais leur qualité est difficile à maîtriser, car ce sont des mélanges complexes de plusieurs drogues végétales ou des préparations à base de drogues végétales d'origine souvent inconnue et/ou très variable. Le profil chromatographique des métabolites phytochimiques constitue un outil important pour l'évaluation de la qualité de ces produits.

L'objectif de ce travail est de proposer un protocole de préparation des échantillons et d'établissement de profil par chromatographie liquide et chromatographie en phase gazeuse des métabolites apolaires, pour l'évaluation de la qualité des médicaments traditionnels à base de plantes.

La méthodologie est basée sur le traitement chimiométrique des profils chromatographiques des métabolites apolaires issus de différents lots de feuilles de *Combretum micranthum* et *Mitracarpus scaber*.

Le profilage métabolique s'est effectué par chromatographie liquide sur Carbone Graphite Poreux en milieu non-aqueux et par chromatographie en phase gazeuse à haute température, couplées à la spectrométrie de masse, après extraction au dichlorométhane et élimination de la chlorophylle adsorbée sur charbon actif.

L'analyse chimiométrique des données utilisant l'analyse PLS-discriminante avec ou sans correction orthogonale du signal, appliquée aux profils chromatographiques des feuilles de *Combretum micranthum* et *Mitracarpus scaber*, a montré de faibles différences entre les lots de chaque drogue végétale, et une différenciation claire des deux drogues végétales.

Les deux méthodes d'analyse par chromatographie liquide et chromatographie en phase gazeuse permettent de détecter la plupart des métabolites secondaires apolaires bioactifs ou non déjà identifiés dans les feuilles des deux espèces.

## **Analytical strategy of traditional herbal medicines: establishing chromatographic profiles of non-polar phytochemical metabolites**

### **Abstract**

The traditional herbal medicines are widely used by African people. But their quality control is difficult, because they are complex mixtures of several herbal drugs or herbal drugs preparations. Their origin is often unknown and/or highly variable. The chromatographic profile of phytochemical metabolites is an important tool for quality assessment of these products.

The objective of this work is to propose a protocol for sample preparation and liquid chromatographic and gas chromatographic profiling of non-polar metabolites for quality assessment of african traditional herbal medicinal products.

The methodology is based on the chemometric treatment of chromatographic profiles of non-polar metabolites from different batches of leaves of *Combretum micranthum* and *Mitracarpus scaber*.

Metabolic profiling is carried out by non-aqueous liquid chromatography on Porous Graphitic Carbon and by high temperature gas chromatography, coupled with mass spectrometry, after extraction with dichloromethane and removal of chlorophyll adsorbed on activated charcoal.

The chemometric data analysis using PLS-discriminant analysis with or without orthogonal signal correction applied to the chromatographic profiles of leaves of *Combretum micranthum* and *Mitracarpus scaber* showed small differences between batches of each herbal drug, and a clear differentiation two herbal drugs.

Both analyses by liquid chromatography and gas chromatography methods detect most non-polar metabolites bioactive or/not already identified in the leaves of both species.

**Mots-clés:** profil chromatographique liquide non aqueux, profil chromatographique gaz haute température, Carbone Graphite Poreux; métabolites apolaires; chimiométrie; médicaments traditionnels à base de plantes; *Combretum micranthum*; *Mitracarpus scaber*

**Keywords:** non-aqueous liquid chromatographic profile, high temperature gas chromatographic profile, Porous Graphitic Carbon; non-polar metabolites, chemometrics, traditional herbal medicines; *Combretum micranthum*; *Mitracarpus scaber*

**Adresse du laboratoire d'accueil :**

Laboratoire de Chimie Analytique, tour D2 3ème étage

Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud, EA 4041

Faculté de Pharmacie, Université de Paris Sud

5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex.

## TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	3
Résumé .....	4
Abstract.....	5
Liste des acronymes.....	10
Liste des figures .....	11
Liste des tableaux .....	11
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>12</b>
<b>PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>14</b>
<i>I. MÉDICAMENTS TRADITIONNELS .....</i>	<i>15</i>
I.1. Généralités sur les médicaments traditionnels .....	15
I.1.1. Médecine traditionnelle .....	15
I.1.2. Acteurs de la médecine traditionnelle.....	15
I.1.2.1. Tradipraticien de santé .....	15
I.1.2.2. Autres praticiens ou acteurs .....	15
I.1.3. Médicaments traditionnels à base de plantes.....	16
I.1.3.1. Médicament traditionnel .....	16
I.1.3.2. Médicaments traditionnels à base de plante.....	16
I.1.3.3. Drogues végétales.....	17
I.1.3.4. Préparations à base de drogues végétales.....	17
I.2. Composés phytochimiques d'intérêt pharmacologique.....	18
I.2.1. Alcaloïdes .....	18
I.2.1.1. Structure des alcaloïdes .....	19
I.2.1.2. Propriétés pharmacologiques des alcaloïdes.....	28
I.2.2 Composés phénoliques.....	29
I.2.2.1. Structure des composés phénoliques .....	29
I.2.2.2. Propriétés pharmacologiques des composés phénoliques.....	39
I.2.3. Terpénoïdes et stéroïdes .....	41
I.2.3.1. Structure des terpénoïdes et stéroïdes.....	41
I.2.3.2. Propriétés pharmacologiques des terpénoïdes et stéroïdes .....	50
I.2.4. Autres composés.....	50
I.2.4.1. Bases puriques .....	50
I.2.4.2. Dérivés des acides aminés .....	51
I.2.4.3. Dérivés des sucres.....	52
I.2.4.4. Composés apparentés aux lipides.....	52
I.3. Drogues végétales utilisées .....	53
I.3.1 Feuilles de <i>Combretum micranthum</i> G. Don.....	53
I.3.1.1. Usages traditionnels.....	54
I.3.1.2. Composition phytochimique.....	54
I.3.1.3. Activités pharmacologiques .....	58
I-3-2 Feuilles de <i>Mitracarpus scaber</i> Zucc .....	59
I.3.2.1. Usages traditionnels.....	59
I.3.2.2. Composition phytochimique.....	60
I.3.2.3. Activités pharmacologiques .....	62
I.4. Références : Médicaments traditionnels.....	63
<i>II. EVALUATION ANALYTIQUE DES MÉDICAMENTS TRADITIONNELS.....</i>	<i>66</i>
II.1. Méthodes de préparation d'échantillon.....	66
II.1.1. Solvants d'extraction .....	66
II.1.2. Méthodes d'extraction .....	67
II.1.2.1 Procédures d'extraction.....	67
II.1.2.2 Extraction par chauffage à reflux .....	68
II.1.2.2 Extraction assistée par ultrasons .....	68
II.1.3. Artefacts et composés interférants .....	69
II.2. Techniques d'analyse .....	69

II.2.1. Méthodes chromatographiques .....	69
II.2.1.1. Chromatographie en phase gazeuse.....	70
II.2.1.2. Chromatographie liquide haute performance .....	73
II.2.1.3. Détecteurs.....	82
II.3. Traitement des données.....	100
II.3.1. Analyses multivariées non supervisées. ....	100
II.3.2 Analyses multivariées supervisées.....	100
II.3.2.1. Visualisation des résultats.....	102
II.3.2.1. Evaluation de modèle. ....	103
II.4. Références : Evaluation analytique des médicaments traditionnels.....	104
<b>PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS.....</b>	<b>108</b>
I. <i>ETABLISSEMENT DE PROFILS EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE : Publication 1</i> .....	110
Résumé publication 1 .....	111
Abstract.....	113
1. Introduction .....	114
2. Materials and methods.....	116
2.1. Chemical Compounds .....	116
2.2. Apparatus.....	116
2.3. Plant Material .....	116
2.4. Sample preparation .....	117
2.4.1. Extraction .....	117
2.4.2. Elimination of chlorophyll.....	117
2.5. Chromatographic Conditions.....	117
2.6. Method for mass spectrometry .....	118
2.7. Identification of compounds.....	118
2.8. Chemometric Analysis .....	118
3. Results and discussion .....	119
3.1. Method development.....	119
3.1.1. Sample preparation .....	119
3.1.2. Chromatographic separation and detection.....	120
3.2. Chemometric analysis.....	120
3.2.1. Influence of chlorophyll removal.....	121
3.2.2. Different plant batches.....	121
3.3. Compounds identification.....	122
4. Conclusion.....	124
Acknowledgements .....	124
References .....	124
II. <i>ETABLISSEMENT DE PROFILS EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE : Projet de Publication</i> .....	137
Résumé .....	139
1 Introduction .....	140
2. Matériel et méthodes .....	141
2.1. Produits chimiques .....	141
2.2 Appareillage .....	141
2.3 Matériel végétal .....	142
2.4. Préparation des échantillons .....	142
2.4.1. Extraction .....	142
2.4.2. Elimination de la chlorophylle .....	143
2.5. Optimisation de la séparation chromatographique.....	143
2.6. Spectrométrie de masse .....	143
2.7. Identification des composés .....	143
2.8. Analyse chimométrique .....	143
3. Résultats et discussion.....	144
3.1. Optimisation de la séparation chromatographique.....	144
3.2. Spectrométrie de masse .....	145
3.3. Analyse chimométrique .....	146
3.3. 1. Influence de l'élimination de la chlorophylle.....	146

3.3.2. Différents lots de drogues végétales .....	147
3.4. Identification des composés .....	148
4. Conclusion.....	149
Remerciements.....	150
Références .....	150
<i>III. DISCUSSION GÉNÉRALE</i> .....	165
III.1. Profil chromatographique .....	165
III.2 Analyse chimométrique.....	167
III.2.1. Préparation des échantillons .....	167
III.2.2. Différents lots de drogues végétales .....	168
III.3. Identification des composés.....	170
III.4. Références : Discussion générale .....	170
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	171
Annexe.....	173

## Liste des acronymes

APCI : <i>acronyme anglais pour</i>	Ionisation chimique à pression atmosphérique
CAD : <i>acronyme anglais pour</i>	Détecteur d'Aréosol Chargé
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CE : <i>acronyme anglais pour</i>	Electrophorèse Capillaire
CE/MS : <i>acronyme anglais pour</i>	Electrophorèse Capillaire couplée à la spectrométrie de masse
CI : <i>acronyme anglais pour</i>	Ionisation Chimique
EI : <i>acronyme anglais pour</i>	Ionisation Electronique
ELSD : <i>acronyme anglais pour</i>	Détecteur Evaporatif à Diffusion de la Lumière
ESI : <i>acronyme anglais pour</i>	Ionisation par électronébulisation
GC : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie Phase Gazeuse
HPLC : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie Liquide Haute Performance
HPLC/MS : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse
HTGC/MS : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie en phase gazeuse à haute température couplée à la spectrométrie de masse
IR-TF :	Infra-Rouge à Transformé de Fourier
LC : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie Liquide
LC/MS : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
MRM :	Multiple Reaction Monitoring
MS : <i>acronyme anglais pour</i>	Spectrométrie de Masse
MS/MS : <i>acronyme anglais pour</i>	Spectrométrie de masse en tandem
MS <sup>n</sup> : <i>acronyme anglais pour</i>	Spectrométrie de masse en tandem à n étapes de fragmentation
MTA	Médicament Traditionnel Amélioré
NARP-LC : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse non aqueuse
NARP-LC/MS : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse non aqueuse couplée à la spectrométrie de masse
NP-HPLC : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie liquide Haute Performance en phase normale
OPLS : <i>acronyme anglais pour</i>	Projection orthogonale des moindres carrés partiels
OPLS-DA : <i>acronyme anglais pour</i>	Analyse discriminante par projection orthogonale des moindres carrés partiels
OSC : <i>acronyme anglais pour</i>	Correction orthogonale du signal
PCA : <i>acronyme anglais pour</i>	Analyse en composantes principales
PCG : <i>acronyme anglais pour</i>	Carbone Graphite Poreux
PLS : <i>acronyme anglais pour</i>	Régression des moindres carrés partiels
PLS-DA : <i>acronyme anglais pour</i>	Analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels
PVA :	Polyvinyl Alcool
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse
SIM :	Single Ion Monitoring
SIS :	Single Ion Storage
TIC : <i>acronyme anglais pour</i>	Courant ionique total
Tr :	Temps de rétention
UHPLC : <i>acronyme anglais pour</i>	Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance
UV :	Ultra-Violet

## Liste des figures

Figure 1 : Structure des terpénoïdes et stéroïdes .....	41
Figure 2 : Feuilles de <i>Combretum micranthum</i> .....	54
Figure 3 : Feuilles de <i>Mitracarpus scaber</i> .....	59
Figure 4 : Montage d'un système de chauffage à reflux .....	68
Figure 5 : Chromatogramme .....	70
Figure 6. Représentation schématique d'une colonne capillaire .....	72
Figure 7 : Schéma d'un chromatographe en phase liquide.....	74
Figure 8 : Pompe à deux têtes montées en opposition de phase avec une came en forme de cardioïde . .....	75
Figure 9 : Vanne d'injection à boucle externe.....	77
Figure 10 : Silices greffées apolaires .....	79
Figure 11 : Carbone graphite tridimensionnel (a) et bidimensionnel (b) .....	80
Figure 12 : Polarisation à la surface du PGC à l'approche d'une charge d'après.....	81
Figure 13 : Détecteur Corona® CAD, schéma de fonctionnement d'après .....	83
Figure 14 : Schéma d'un spectromètre de masse ITQ 900™ GC/MC ThermoFischerScientific.....	87
Source d'ionisation externe (EI et CI), Analyseur trappe ionique et Détecteur à dynode de conversion .....	87
Figure 15 : Schéma d'un spectromètre de masse API 3000™ LC/MS/MS System - AB/SCIEX.....	87
Figure 16 : Domaine d'utilisation des principales sources d'ionisation .....	89
Figure 17 : Schéma d'ionisation chimique à pression atmosphérique .....	92
Figure 18 : Résolution à 10 % de vallée .....	94
Figure 19 : Schéma d'un détecteur constitué d'une dynode de conversion avec un multiplicateur d'électrons.....	97
Figure 20 : Schéma d'un détecteur de type canal multiplicateur d'électron "channeltron" .....	98
Figure 21 : Illustration géométrique de la différence entre la PLS-DA et l'OPLS-DA.....	101
Figure 22 : Interprétation de la figure « S-plot ».....	103
Figure 23 : TIC chromatogramme HTGC/MS d'un extrait traité au charbon actif de <i>M. scaber</i> (MS1) .....	165
Figure 24 : TIC chromatogramme NARP-LC/MS d'un extrait traité au charbon actif de <i>M. scaber</i> (MS1).....	166
Figure 25 : TIC chromatogrammes GC/MS (A) et LC/MS (B) des triterpènes et stéroïdes d'un extrait de <i>M. scaber</i> .....	166
Figure 26 : Comparaison des TIC chromatogrammes GC/MS d'un extrait brut (haut) et traité au charbon actif (bas) de <i>M. scaber</i> (MS1) .....	167
Figure 27 : Comparaison des TIC chromatogrammes LC/MS d'un extrait brut (bleu) et traité au charbon actif (rouge) de <i>M. scaber</i> (MS1).....	168
Figure 28 : Score-plot PCA des profils chromatographiques LC/MS (A) et GC/MS (B) des différents lots de <i>C. micranthum</i> .....	169
Figure 29 : Score-plot PCA des profils chromatographiques LC/MS (A) et GC/MS (B) des différents lots de <i>M. scaber</i> .....	169

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Solvants utilisés pour l'extraction des composés phytochimiques des plantes médicinales	67
Tableau 2 : Méthodes d'ionisation en spectrométrie de masse .....	88
Tableau 3 : Résolution et gammes de rapports m/z analysables des principaux analyseurs. ....	93

## **INTRODUCTION GENERALE**

Les médicaments traditionnels à base de plantes (tradimédicaments) sont très utilisés par les populations africaines (80%) pour leurs besoins de santé (Organisation Mondiale de la Santé).

La qualité de ces médicaments pose d'énormes problèmes, car de nombreux effets secondaires associés aux modes de préparation, aux falsifications et à la présence de contaminants (métaux lourds, pesticides et micro-organismes) sont signalés.

L'évaluation de la qualité des médicaments à base de plantes utilisés en Afrique est difficile, car ce sont des mélanges complexes de plusieurs drogues végétales ou de préparations à base de drogues végétales auxquels peuvent être associées des drogues minérales et/ou animales. Aussi la source, la récolte et la préparation des matières premières sont très variables.

Le profil chromatographique des métabolites phytochimiques associé à l'analyse chimométrique constitue un bon outil pour l'évaluation de la qualité des produits complexes à base de plantes.

Notre étude qui se situe dans un cadre d'évaluation analytique des tradimédicaments, a pour objectif de proposer des techniques d'établissement de profil chromatographique de métabolites phytochimiques après une préparation efficace des échantillons.

Nos travaux ont porté sur deux techniques couramment utilisées pour l'analyse des produits à base de plantes : la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie liquide haute performance couplées à la spectrométrie de masse.

Le travail que nous présentons s'articule autour de deux grandes parties :

- une partie bibliographique sur les médicaments traditionnels à base de plantes, les différents composés responsables de leur activité pharmacologique, les drogues végétales utilisées et les méthodes analytiques d'évaluation de ces médicaments ;
- et une partie sur nos travaux personnels portant sur l'établissement de profils chromatographiques des métabolites phytochimiques et les discussions qui en découlent.

## **PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. MÉDICAMENTS TRADITIONNELS**

### **I.1. GENERALITES SUR LES MEDICAMENTS TRADITIONNELS**

#### **I.1.1. Médecine traditionnelle**

L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit la médecine traditionnelle comme l'ensemble des méthodes, connaissances et croyances sanitaires intégrant des médicaments à base de plantes, d'animaux et/ou de minéraux, de thérapies spirituelles, de techniques et d'exercices manuels, appliqués seuls ou en association afin de maintenir le bien-être et traiter, diagnostiquer ou prévenir la maladie.

Dans le contexte africain la médecine traditionnelle peut être définie comme un ensemble de connaissances, de savoirs, de techniques de préparation et d'utilisation de substances et de pratiques explicables ou non, basées sur les fondements socioculturels et religieux des communautés africaines. Cet ensemble de connaissances et de pratiques s'appuie sur les expériences vécues et les observations transmises de génération en génération et qui servent à diagnostiquer, prévenir et/ou éliminer un déséquilibre physique, mental ou social [1-4].

Dans les pays industrialisés, on parle de médecine «complémentaire» ou «parallèle».

#### **I.1.2. Acteurs de la médecine traditionnelle**

Les acteurs ou praticiens de la médecine traditionnelle sont constitués par [1,3-7] :

##### **I.1.2.1. Tradipraticien de santé**

Le tradipraticien de santé est une personne reconnue par la communauté dans laquelle elle vit, comme compétente pour diagnostiquer des maladies et invalidités y prévalant, mener des activités de prévention et dispenser des soins de santé grâce à des traitements spirituels, des techniques manuelles et exercices et ou l'emploi de substances d'origine végétale, animale et ou minérale. Les tradipraticiens de santé sont généralement les guérisseurs, herboristes, naturothérapeutes et phytothérapeutes.

##### **I.1.2.2. Autres praticiens ou acteurs**

- Accoucheuses traditionnelles ;
- Psychothérapeutes ;
- Les tradipraticiens assimilés (rebouteux, chirothérapeutes) ;
- Spiritualistes (comians, devins, féticheurs, exorcistes, occultistes, ...) ;
- Aromathérapeutes ;
- Apithérapeutes.

### **I.1.3. Médicaments traditionnels à base de plantes**

#### **I.1.3.1. Médicament traditionnel**

Le médicament traditionnel est un médicament conçu et développé par un tradipraticien de santé, constitué d'une ou plusieurs substances d'origine naturelle (drogues naturelles ou matières premières) c'est-à-dire soit à partir de végétaux (drogues végétales), soit d'animaux (drogues animales), ou soit à partir de minéraux (drogues minérales) ou un mélange de ces différents éléments. Il n'est pas destiné à être injecté ni par voie intraveineuse ni par voie intramusculaire [1,2,5].

Le médicament traditionnel amélioré (MTA) est un médicament traditionnel ayant subi des modifications afin d'améliorer la présentation, le goût, le conditionnement et les modalités d'utilisation tout en conservant l'efficacité et la sécurité d'emploi.

On distingue dans la région africaine 4 catégories de médicament traditionnel fondées sur le mode de préparation, l'indication et le degré d'innovation par rapport au médicament traditionnellement utilisé [1] :

***Catégorie 1*** : médicament préparé par le tradipraticien pour un patient ;

***Catégorie 2*** : médicament issu de la communauté (usage populaire) avec applications commerciales ;

***Catégorie 3*** : médicament issu des travaux des instituts de recherche ;

***Catégorie 4*** : médicament originaire d'un pays situé en dehors de la région africaine.

#### **I.1.3.2. Médicaments traditionnels à base de plante**

Les médicaments traditionnels à base de plante (*tradimédicaments*) sont définis selon l'OMS [2,8] comme des produits médicinaux finis et étiquetés qui contiennent comme principe actif exclusivement des plantes (partie aérienne ou souterraine) ou des associations des plantes à l'état brut ou sous forme de suc ou extrait.

Exceptionnellement, dans certains pays les médicaments à base de plantes peuvent contenir par tradition des principes actifs naturels, organique ou inorganique qui ne sont pas d'origine végétale.

### I.1.3.3. Drogues végétales

Les drogues végétales sont des substances, issues de plantes fraîches ou desséchées, utilisées à des fins thérapeutiques. Les drogues végétales sont parfois des plantes entières, le plus souvent des parties de plantes (racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, graines...).

### I.1.3.4. Préparations à base de drogues végétales

Les préparations à base de drogue(s) végétale(s) sont constituées par des drogues végétales en fragments ou en poudre, des extraits, des teintures, des huiles grasses, des huiles essentielles, des sucs.

## **I.2. COMPOSES PHYTOCHIMIQUES D'INTERET PHARMACOLOGIQUE**

Les composés phytochimiques pharmacologiquement actifs sont des molécules issues du métabolisme des végétaux (métabolites). On distingue deux classes de métabolites: métabolites primaires et métabolites secondaires [9-11].

Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme. On distingue :

- Les glucides ;
- Les lipides ;
- Les protéines.

Les métabolites secondaires sont repartis en trois grandes familles chimiques.

- Les alcaloïdes ou composés azotés ;
- Les composés phénoliques ou phénoloïdes ;
- Les terpénoïdes.

Les métabolites secondaires peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques).

### **I.2.1. Alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont définis comme des substances azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte, les alcaloïdes ont une structure complexe. Leur atome d'azote est incluse dans un système hétérocyclique et ils possèdent une activité pharmacologique significative. Ils existent à l'état de sels et ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé [9-11].

On distingue généralement:

- les *alcaloïdes vrais*, qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle ;
- les *proto-alcaloïdes*, qui dérivent d'acides aminés, dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique ;
- Les *pseudo-alcaloïdes*, qui présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés.

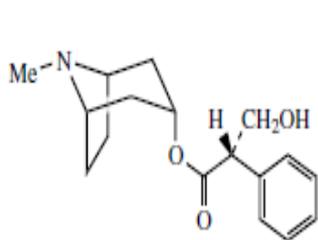
### I.2.1.1. Structure des alcaloïdes

L'atome d'azote dans les alcaloïdes vrais provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon raisonnable est alors de classer les alcaloïdes en groupes, selon leur précurseur biosynthétique. Il existe cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur. Dans ces cas-là, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones [9-12].

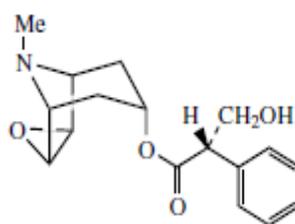
#### I.2.1.1.1. Alcaloïdes dérivés de l'ornithine

##### ❖ *Dérivés tropaniques*

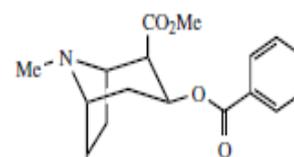
Les alcaloïdes tropaniques ont en commun un élément structural bicyclique azoté. Ce sont des 8-méthyl-8-azabicyclo(3,2,1) octanes. Chez les solanaceae et les erythroxyllaceae.



atropine  
(Belladone)



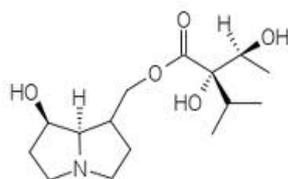
scopolamine  
(Datura)



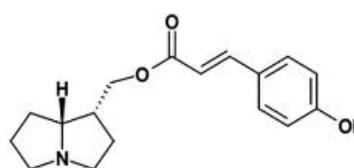
cocaïne  
(Coca)

##### ❖ *Dérivés pyrrolizidiniques*

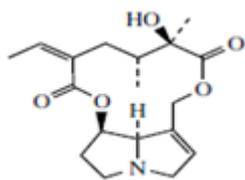
Ce sont des azabicyclo(3,3,0) octanes. Chez les boraginaceae et les astéraceae.



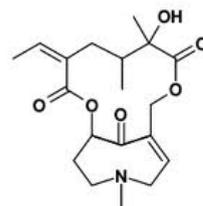
lycopsamine  
(Bourache)



thésinine  
(Bourache)



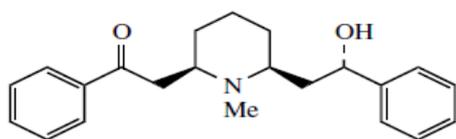
Sénécionine  
(Sénéçon)



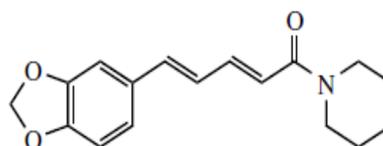
senkirikine  
(Tussilage)

### I.2.1.1.2. Alcaloïdes dérivés de la lysine

#### ❖ Dérivés pipéridiniques



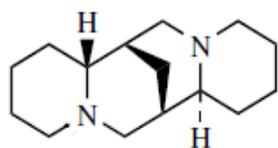
lobéline  
(Lobélie) lobéliaceae



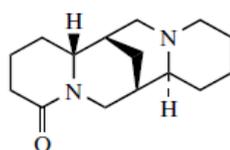
pipérine  
(Poivrier) pipéraceae

#### ❖ Dérivés quinolizidiniques

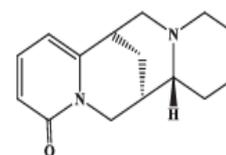
Dérivés caractéristiques de la famille des Fabaceae



sparteïne  
(Genêt)



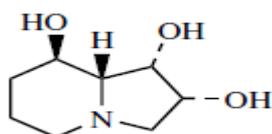
(-) lupanine  
(Lupin)



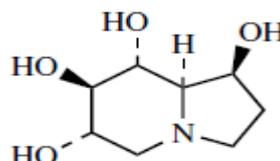
anagyrine  
(Lupin)

#### ❖ Dérivés indolizidiniques

Dérivés retrouvés chez des espèces de Fabaceae.

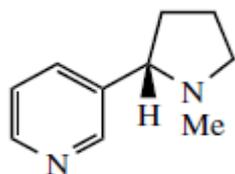


swainsonine

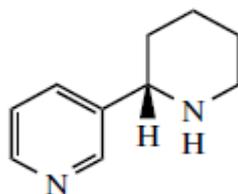


castanospermine

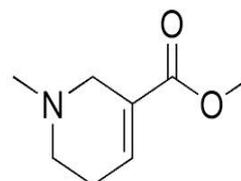
## I.2.1.1.3. Alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique



nicotine  
(tabac) Solanaceae



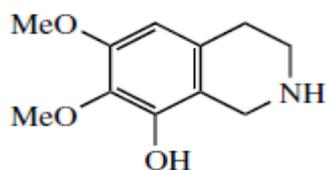
anabasine  
(tabac) Solanaceae



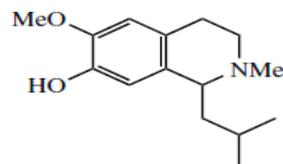
arecoline  
(noix d'arec) Arecaceae

## I.2.1.1.4. Alcaloïdes dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine

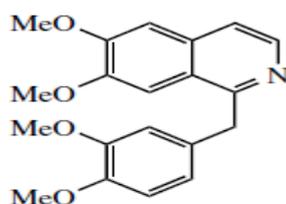
Ce sont des alcaloïdiques issues du métabolisme des acides aminés aromatiques, il s'agit presque toujours d'alcaloïdes isoquinoléiques.

❖ *Tétrahydroisoquinoléines*- *Tétrahydroisoquinoléines simples*

anhalamine  
(peyolt) Cactaceae

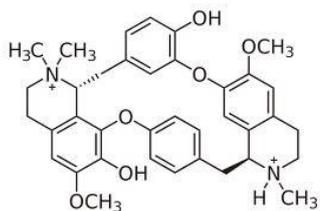


lophocerine  
(lophocera) Pyralidae

- *Benzyltétrahydroisoquinoléines*

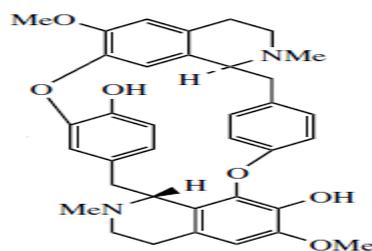
Papavérine  
(pavot) Papavéraceae

- *Bisbenzyltétrahydroisoquinoléines*



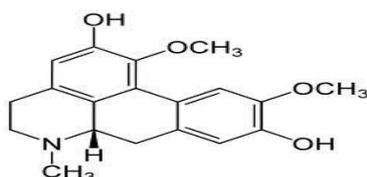
tubocurarine

(chondrodendron) Ménispermaceae



curine

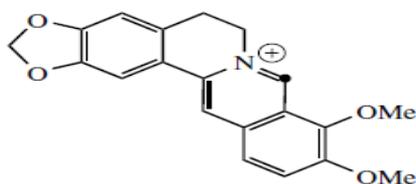
- *Aporphines*



boldine

(boldo) Monimiaceae

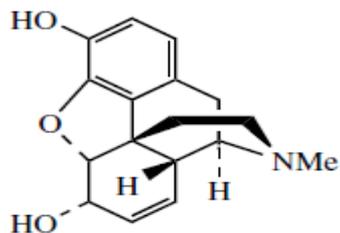
- *Protoberbérines*



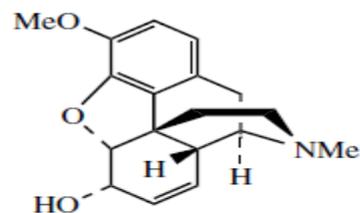
berbérine

(hydrastis) Ranunculaceae

- *Morphinanes*



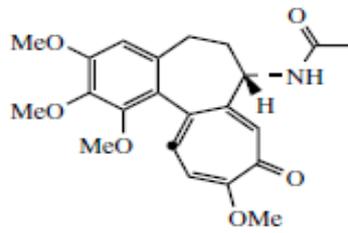
morphine



codéine

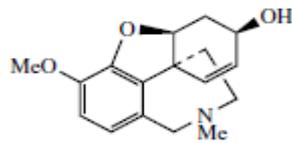
(pavot) Papavéraceae

❖ *Phénéthylisoquinoléines*

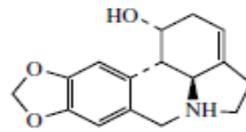


colchicine  
(colchique) Colchicaceae

❖ *Isoquinoléines des Amaryllidaceae*

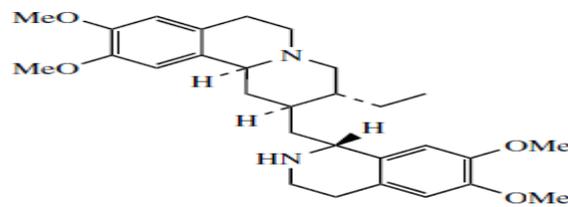


galanthamine  
(galanthus, narcisse)



lycorine  
(jonquille)

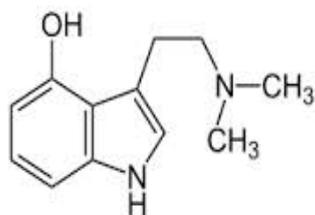
❖ *Isoquinoléino-monomerpiéniques*



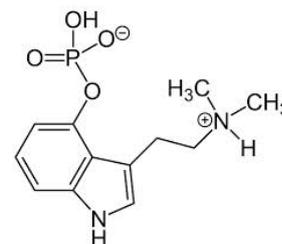
émétine  
(ipéca) Rubiaceae

I.2.1.1.5. Alcaloïdes dérivés du tryptophane

❖ *Tryptamines*



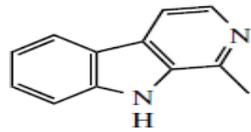
psilocine



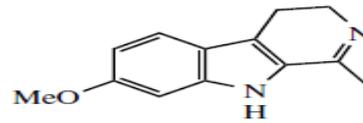
psilocybine

Agaricaceae

❖ *β-Carbolines*



harmane

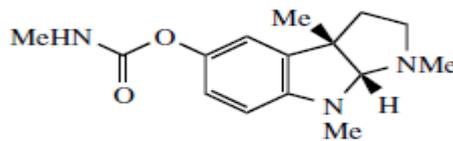


harmaline

(ayahuasca) Malpighiaceae

❖ *Pyrroloindoles*

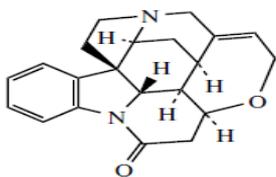
Alcaloïdes de l'éséré



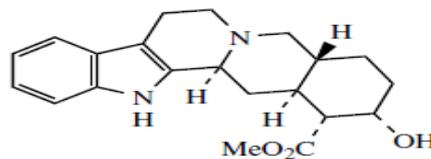
physostigmine (ésérine)  
(fève de calabar) Fabaceae

❖ *Indolo-monoterpéniques*

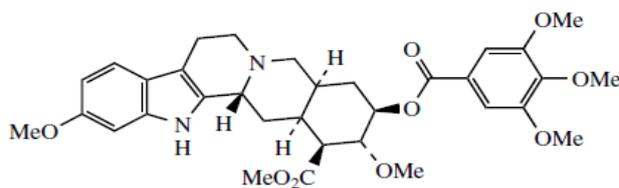
Groupe d'alcaloïdes issu du métabolisme du tryptophane avec un précurseur commun la strictosidine.



Strychnine  
(noix vomique) Loganiaceae

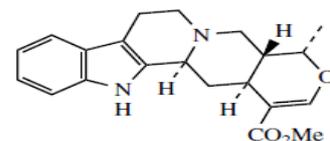


yohimbine  
(yohimbé) Rubiaceae

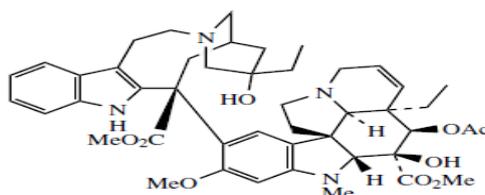


réserpine

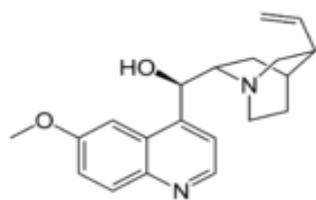
(sarpagandha) Apocynaceae



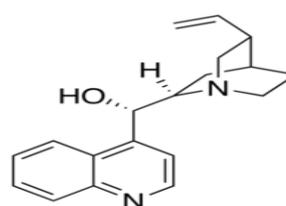
ajmalicine (raubasine)



vinblastine  
(pervenche de Madagascar) Apocynaceae

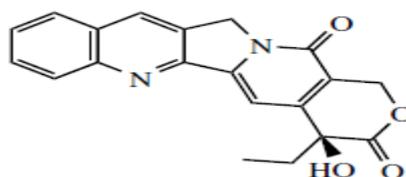
❖ *Quinoléines*

quinine



cinchonine

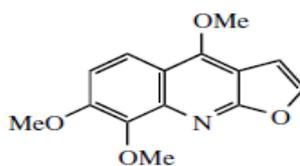
(quinaquina) Rubiaceae

❖ *Pyrroloquinoléines*

camptothécine

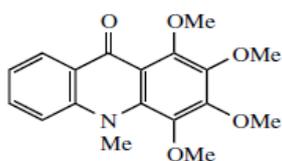
(camptotheca) Nyssaceae

## I.2.1.1.6. Alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique

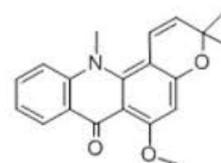
❖ *Furoquinoléines*

skimmianine

(Fagara xanthoxyloides) Rutaceae

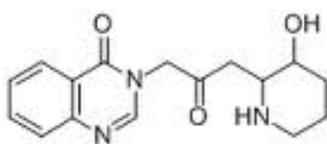
❖ *Acridines*

melipotecine



acronycine

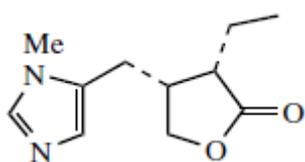
(Sarcomelicope simplicifolia) Rutaceae

❖ *Quinazolines*

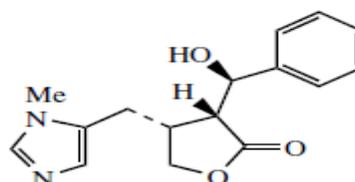
fébrifugine  
(*Dichroa febrifuga*) Saxifragaceae

## I.2.1.1.7 Alcaloïdes dérivés de l'histidine

Ce sont des alcaloïdes à structure imidazolique



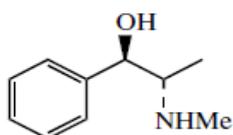
pilocarpine



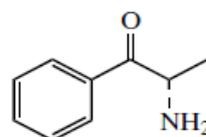
pilosine

(jaborandi) Rutaceae

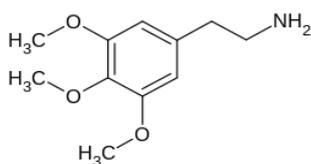
## I.2.1.1.8. Alcaloïdes à structures diverses

❖ *Phénéthylamines*

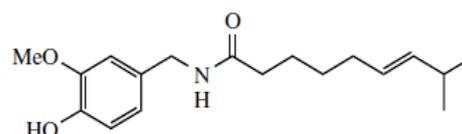
éphédrine  
(éphédra) Ephedraceae



cathinone  
(khat) Celastraceae

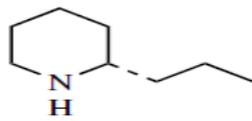


mescaline  
(peyolt) Cactaceae

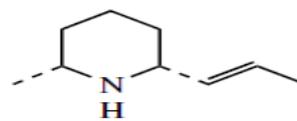


capsaicine  
(piment) Solanaceae

❖ *Dérivés pipéridiniques*



coniine  
(grande ciguë) Apiaceae

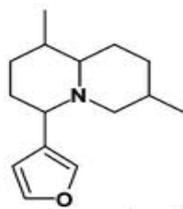


pinidine  
(*Pinus sabiniana*) Pinaceae

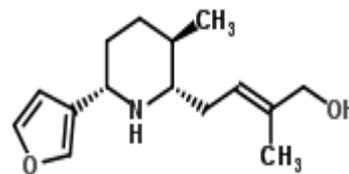
❖ *Alcaloïdes terpéniques*

Les alcaloïdes terpénoïdes sont des alcaloïdes issus du métabolisme terpénique.

- *Sesquiterpéniques*



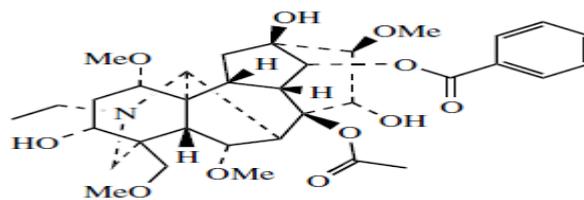
desoxynupharidine  
(nénuphar) Nymphaeaceae



nuphamine

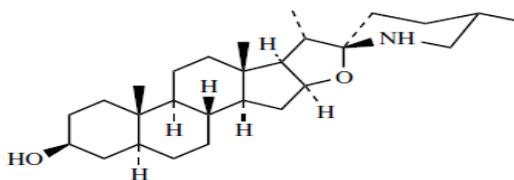
- *Diterpéniques*

Les alcaloïdes diterpéniques actuellement connues sont en majorité isolés de diverses Ranunculaceae.

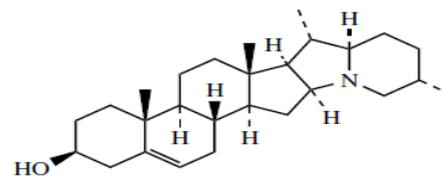


Aconitine  
(aconit) Ranunculaceae

- *Stéroïdiques*



tomatidine  
(tomate) Solanaceae



solanidine  
(*Solanum*) Solanaceae

### I.2.1.2. Propriétés pharmacologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont recherchés pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans divers domaines [9,11] :

- *niveau du système nerveux central* : dépresseurs (morphine, scopolamine), stimulants (strychnine);

- *niveau du système nerveux autonome* : sympathomimétiques (éphédrine), sympatholytiques (yohimbine), parasympathomimétiques (ésérine, pilocarpine), anticholinergiques (atropine, hyoscyamine) et ganglioplégiques (spartéine, nicotine).

- *autres domaines* : curarisants, anesthésiques locaux (cocaïne), antifibrillants (quinidine), antitumoraux (vinblastine, ellipticine), antimalariques (quinine), amoebicides (émétine) et antibiotiques (cyclosérine, la mytomycine).

## I.2.2 Composés phénoliques

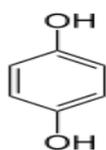
Les composés phénoliques (phénoloides) sont caractérisés par la présence dans leur structure d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside. Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse : [9-12]

- ❖ La voie la plus courante est celle de l'acide shikimique, qui conduit, des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine), puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénones, lignanes, lignines, coumarines, etc...
- ❖ L'autre voie part de l'acétate et conduit à des poly- $\beta$ -cétosters (polyacétates) de longueur variable. Les polyacétates engendrent par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique) des composés souvent polycycliques: chromones, isocoumarines, orcinols, xanthones, quinones, etc ;
- ❖ Dérivés mixtes des deux voies (flavonoïdes, stilbènes, pyrones, xanthones, etc.) ;

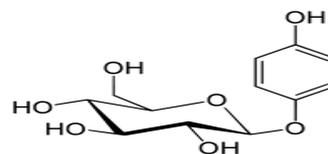
### I.2.2.1. Structure des composés phénoliques

#### I.2.2.1.1. Phénols simples et dérivés

- Les phénols simples (catéchol, phloroglucinol) sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae) le plus souvent à l'état de glucoside du diphénole (arbutoside) ou de monométhyléther (gaïacol) ;
- Les alkylphénols : eugénol (allylphénol) ; thymol (monoterpènes phénoliques) ;
- Alcénylphénol : urushiol, acides anacardiques ;
- Les phénones : acétophénones, benzophénones.

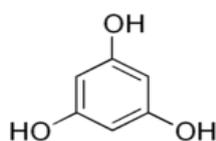


hydroquinone

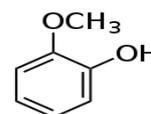


arbutoside

(busserole) Ericaceae

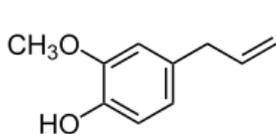


phloroglucinol

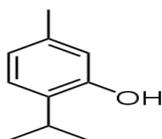
*(Dryopteris)* Dryopteridaceae

gaïacol

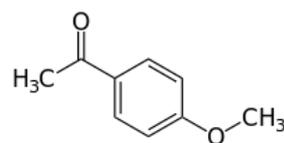
(gaiac) Zygophyllaceae



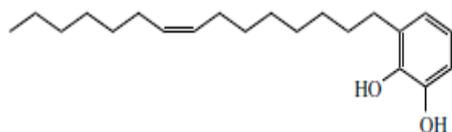
eugénol  
(clou de girofle) Myrtaceae



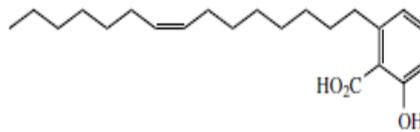
thymol  
(thym) Lamiaceae



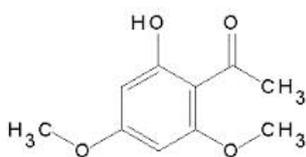
4-méthoxyacétophenone  
(*Mitracarpus scaber*) Rubiaceae



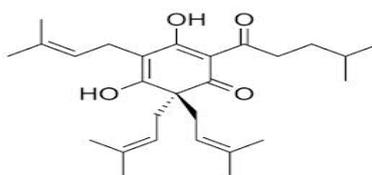
urushiol  
(*Toxicodendron*) Anarcadiaceae



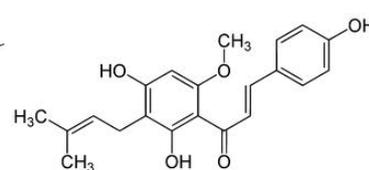
acide anarcadique  
(sumac,) Anarcadiaceae



Xanthoxylone (benzophénone)  
(poivre de sishuan)



lupulone  
(houblon) Cannabaceae



xanthohumol (chalcone)  
Cannabaceae

#### I.2.2.1.2. Acides phénols

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique.

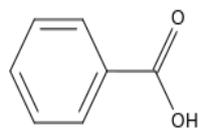
La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

- Dérivés de l'acide benzoïque ( $C_6-C_1$ ) : Les acides-phénols dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside (acides benzoïque, vanillique, gallique, ellagique).

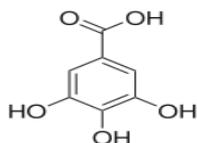
On connaît également les aldéhydes correspondant à ces acides : la vanilline (le plus répandu) et l'ansaldéhyde (dans certaines huiles essentielles).

- Dérivés de l'acide cinnamique ( $C_6-C_3$ ) : La plupart des acides-phénols en (acides 4-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large; les autres (acide 2-coumarique) sont peu fréquents. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés : acide

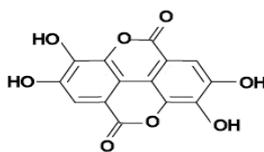
chlorogénique (esters de l'acide quinique) et acide rosmarinique spécifiques des Lamiaceae et des Boraginaceae.



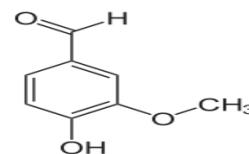
acide benzoïque



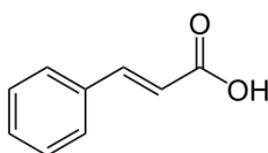
acide gallique



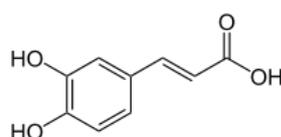
acide ellagique



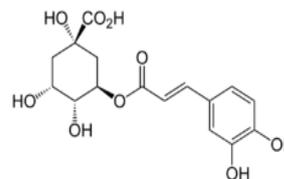
vanilline



acide cinnamique



acide caféique

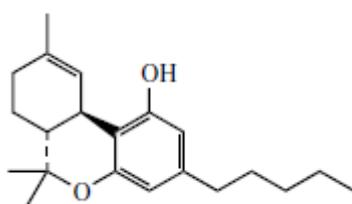


acide chlorogénique

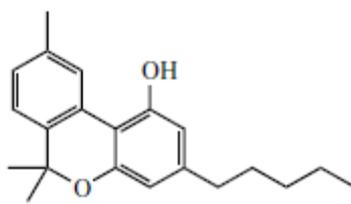
#### I.2.2.1.3 Cannabinoïdes

Les cannabinoïdes sont des terpénophénols classés en plusieurs groupes en fonction de leur structure. Les principaux représentants de ce groupe sont:

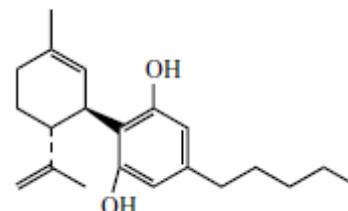
- ❖  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC ou THQ, benzotétrahydropyranique) ;
- ❖ cannabinoïde (CBN), dibenzopyranique ;
- ❖ cannabidiol (CBD), diphenolique.



tetrahydrocannabinol



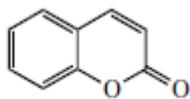
cannabinoïde



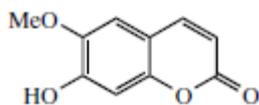
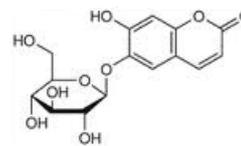
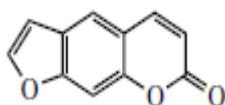
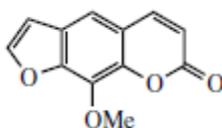
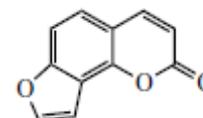
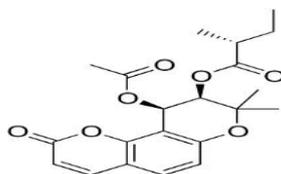
cannabidiol

#### I.2.2.1.4. Coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de la fève tonka (*Dipteryx odorata* Willd., Fabaceae) d'où fut isolée, en 1820, la coumarine. Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-one que l'on peut considérer, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Z cinnamiques.

❖ *Coumarines simples*

coumarine

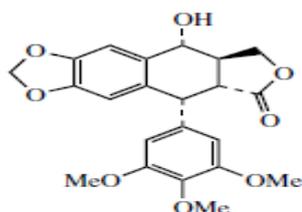
scopolétine  
(Viorne) Caprifoliaceaeesculoside  
(marron d'inde)❖ *Furanocoumarines*psoralène  
(*Mitracarpus scaber*) Rubiaceaexanthotoxine  
(*Fagara xanthoxyloides*)angélicine  
(angélique) Apiaceae❖ *Pyranocoumarines*

visnadine

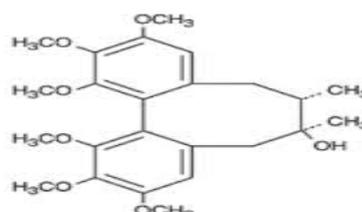
## I.2.2.1.5. Lignanes et lignoïdes

Ce sont des groupes de composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques : lignanes, lignoïdes.

- Lignanes : composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones  $\beta$  des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane (liaison 8-8'). On dit aussi que ce sont des dimères d'alcools ou d'acides cinnamiques ;



podophyllotoxine  
(podophylle)



shizandrine  
shizandinaceae

#### I.2.2.1.6. Dérivés d'extension du phénylpropane

L'allongement des composés de type phénylpropane ( $Ar-C_3$ ) par des additions successives d'unités dicarbonées est à l'origine des styrylpyrones ( $Ar-C_3 + 2 \times C_2$ ), des stilbénoides, des flavonoides, des isoflavonoïdes ( $Ar-C_3 + 3 \times C_2$ ) et des xanthones ( $Ar-C_1 + 2 \times C_2$ )

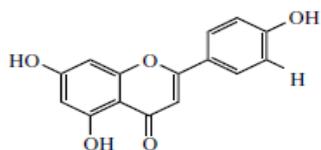
##### ❖ Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés en  $C_{15}$ , avec deux noyaux benzéniques qui sont unis par un chaînon de trois atomes de carbone ( $Ar-C_3-Ar$ ), selon un enchainement 1,3-diarylpropane (flavonoïdes), 1,2-diarylpropane (isoflavonoïdes) ou 1,1-diarylpropane (néoflavonoïdes).

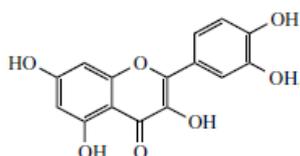
Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le motif 2-phénylchromane. On distingue plusieurs classes :

- ❖ 2-phénylchromones : flavones, flavonols et dimères (biflavonoïdes) flavanones et dihydroflavonol (dérivés 2,3-dihydrogénés)
- ❖ 2-phénylchromanes (flavanes, flavan-3-ols et flavan-3,4-diols)
- ❖ Chalcones et dihydrochalcones (cycle pyranique ouvert)
- ❖ Aurones (2-benzylidène-coumaranone)
- ❖ 3-phénylchromanes (isoflavonoïdes)
- ❖ 4 aryl-2-*H*-1-benzopyran-2-one ou 4-arylcoumarines (néoflavonoïdes)
- ❖ 2-phénylbenzopyriliums (anthocyanes)

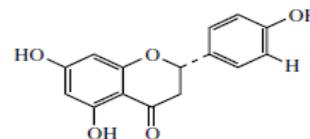
Certains auteurs, compte tenu du comportement et des propriétés particulières de certains groupes, réservent l'appellation flavonoïde (*stricto sensu*) pour les flavones, les flavonols, leurs dérivés 2,3-dihydrogénés, leurs dimères, les aurones et chalcones.

- *Flavonoïdes « stricto sensu »*

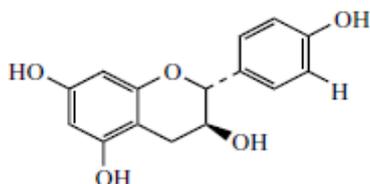
apigénine (flavone)



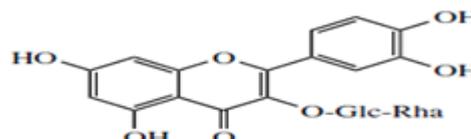
quercétine (flavonol)



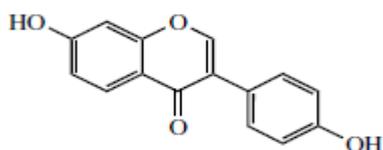
naringénine (flavanone)



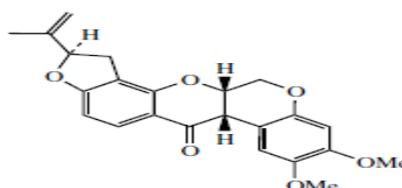
(+) -catéchine (catechine)



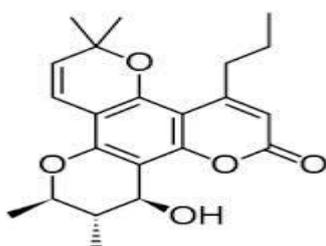
rutine ( O-hétéroside)

- *Isoflavonoïdes*

daidzéine (isoflavone)



roténone (rotenoïde)

- *Néoflavonoïdes*

calanolide A

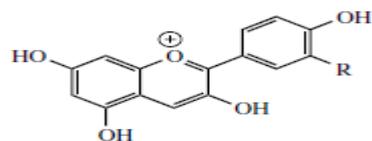
(calophyllum) Clusiaceae

soullatrolide

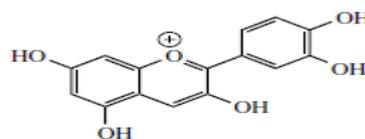
- *Anthocyanes*

Les anthocyanes sont des groupes de pigments hydrosolubles responsables de la coloration rouge, rose, mauve, pourpre, bleue ou violette de la plupart des fleurs et des fruits. Leurs génines (anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium (cation

flavylium), ce qui souligne l'appartenance de ces molécules au vaste groupe des flavonoïdes au sens large.



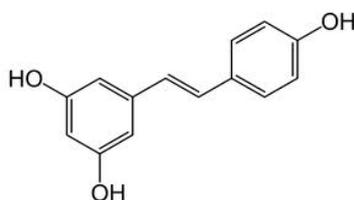
2-phénylbenzopyrylium



cyanidine

#### ❖ *Stilbénoides*

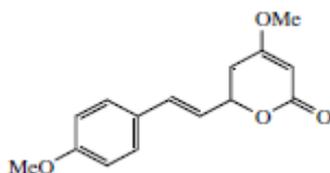
Les stilbénoides sont des composés phénoliques qui possèdent deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane (bisbenzyl) ou éthène (stilbènes).



resvératrol

#### ❖ *Styrylpyrones*

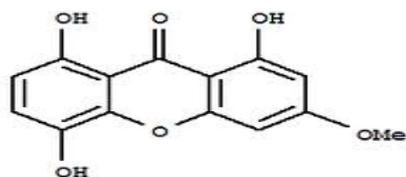
Ce sont des pyrones insaturées substituées par un groupe styryle ou phénéthyle.



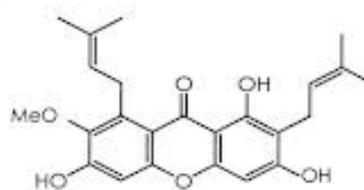
kawaïne

#### ❖ *Xanthones*

En règle générale, les xanthones sont formées par cyclisation des benzophénones.



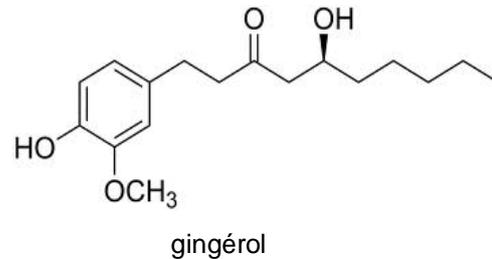
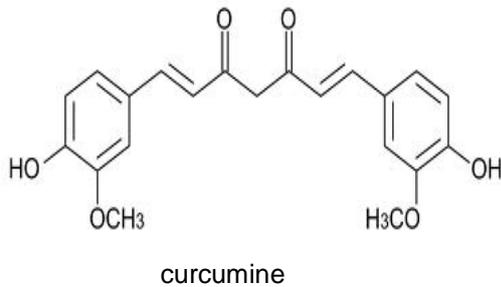
bellidifoline



mangostine

❖ *Dérivés d'acide phénylpropanoïque*

Ceux sont les curcuminoïdes (diaryl-heptanoïdes), les gingérols (aryl-alcanones) et leurs dérivés, spécifiques de plusieurs genres de Zingiberaceae. Ils constituent les substances colorantes des curcumas et les principes piquants du gingembre.



### I.2.2.1.7. Tanins

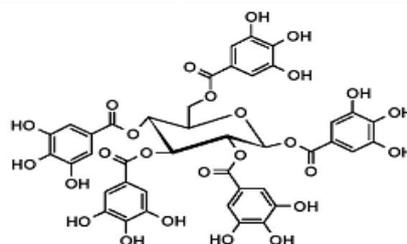
On distingue, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables (gallique et ellagiques) et les tanins condensés ou proanthocyanidols.

❖ *Tanins hydrolysables*

Il s'agit d'esters d'acide gallique (gallotanins) ou d'acide ellagique (ellagitanins) et de glucose.

- *Gallotanins ou tanins galliques*

Les gallotanins ou tanins galliques sont formés autour d'un sucre (glucose ou polyol dérivé du D-glucose) comportant plusieurs liaisons esters avec des acides galliques (ou leurs dérivés).

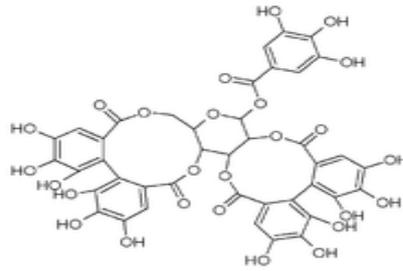


pentagalloylglucose (tanin gallique)

- *Ellagitanins ou tanins ellagiques*

Les ellagitanins ou tanins ellagiques sont formés autour d'un sucre (glucose ou polyol dérivé du D-glucose) comportant plusieurs liaisons esters d'acide hexahydroxydiphénique

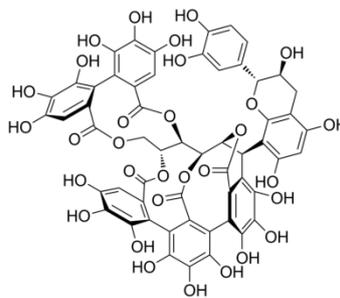
(HHDP) et de ses dérivés d'oxydation (déhydrohexahydroxydiphénique = DHHDP, acide chébulique).



casuarictine (tanin ellagique)

- *Tanins complexes*

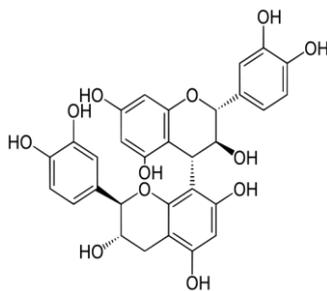
Les tanins complexes sont construits par une unité gallotanin ou ellagitanin comportant une liaison à une catéchine.



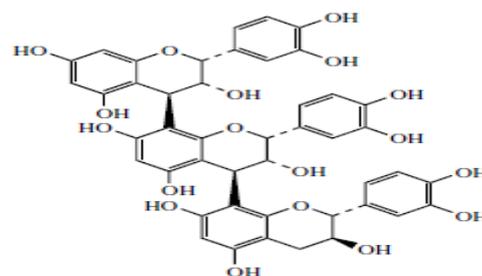
acutissime (tanin complexe)

❖ *Tanins condensés non-hydrolysables (Proanthocyanidines)*

Les tanins condensés (tanins catéchiques) sont des oligomères ou polymères de flavanols. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone de type 4→8 ou 4→6. Ils sont non hydrolysables, mais traités à chaud par un acide, ils se dégradent en pigments colorés formés d'anthocyanidols.



procyanidol B-3

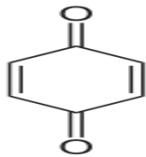


trimère d'épicatéchine

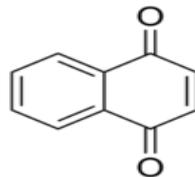
I.2.2.1.8. Quinones

Les quinones sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques. Les quinones naturelles ont leur dione conjuguée aux doubles liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé : naphthalène (naphtoquinones), anthracène (anthraquinones).

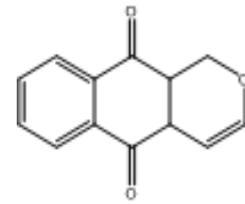
❖ *Quinones non hétérosidiques*



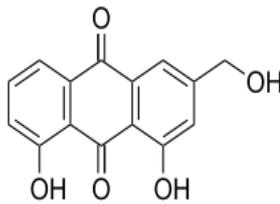
1,4-benzoquinone



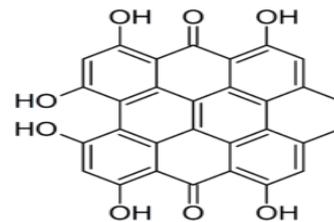
1,4-naphtoquinone



pentalgin  
(*Mitracarpus scaber*) Rubiaceae

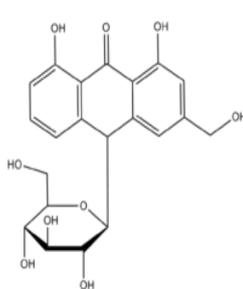


aloë émordine (anthraquinone)  
(aloës)

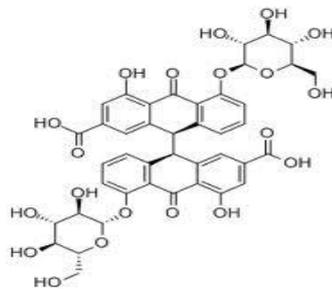


hypericine (naphthodianthrone)  
(millepertuis)

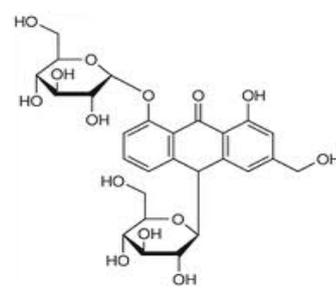
❖ *Quinones hétérosidiques*



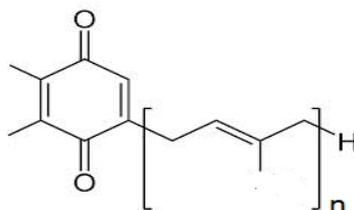
aloïne  
(aloës)



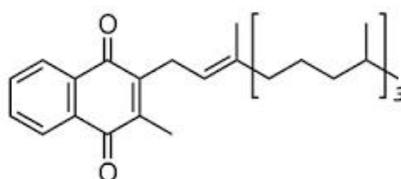
sennoside A  
(sené)



cascaroside A  
(cascara)

❖ *Quinones terpéniques*- *Benzoquinones*

plastoquinone-n (n = 3-10)

- *Phylloquinones*

vitamine K1 (phytoménadione)

I.2.2.2. Propriétés pharmacologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et antibactériennes. Les composés phénoliques avec des structures très variées possèdent diverses propriétés pharmacologiques : [9,11]

- *Phénols simples* : antipyrétiques, antiseptiques, anti-inflammatoires, inhibiteurs d'enzyme ;
- *Acides phénoliques* : antibactériens, antifongiques, antioxydants ;
- *Coumarines* : veinotoniques et vasculoprotecteurs, anti-œdémateuses et anti-inflammatoires. Les pyranocoumarines sont connues pour leurs propriétés vasodilatatrices coronariennes (action favorable sur les troubles de la sénescence cérébrale). Certaines furanocoumarines photosensibilisantes sont utilisées dans le traitement du psoriasis ;
- *Lignanes et néolignanes* : antibactériennes, antifongiques, inhibiteurs de l'enzyme ;
- *Stilbènes* : parfois des phytoalexines, peuvent dans certains cas être des régulateurs de croissance. ils sont souvent antifongiques et antimicrobiens, en particulier les bis(bibenzyls) ;

- *Flavonoïdes* : antioxydants, anti-inflammatoires, hépatoprotecteurs, anticancéreux, antibactériens, antiviraux, antiallergiques, veinotoniques. Ils diminuent la fragilité et la perméabilité capillaire. Les isoflavones, comme la daidzéine du soja possède des propriétés phytoestrogènes, Certains dérivés d'isoflavones sont des bactériostatiques. On retrouve de nombreuses phytoalexines des légumineuses (phaséoline du haricot, glyceolline du soja) ;
- *Anthocyanes* : diminuent la fragilité et la perméabilité des capillaires. Ils sont veinotoniques, anti-œdémateux, antioxydant et antibactériens.
- *Tanins* : antioxydants, sont utilisés à usage externe dans les inflammations et les ulcérations des muqueuses, dans les hémorragies, les œdèmes et les plaies. Ils ont des activités cicatrisantes et hémostatiques, antibactériennes, antivirales et antifongiques. Par voie interne les tanins exercent un effet anti-diarrhéique ;
- *Quinones* : antibactériennes, antifongiques. Les anthraquinones sont douées de propriétés laxatives. Les phylloquinones dont la vitamine K jouent un rôle indispensable dans la coagulation sanguine et dans le métabolisme osseux. Beaucoup de naphthoquinones sont antibactériennes et fongicides.

### I.2.3. Terpénoïdes et stéroïdes

Les terpénoïdes et stéroïdes (isoprénoïdes) sont des composés issus de la condensation d'unités de base penta-carbonnées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène (isoprène) (figure 1) [9-12].

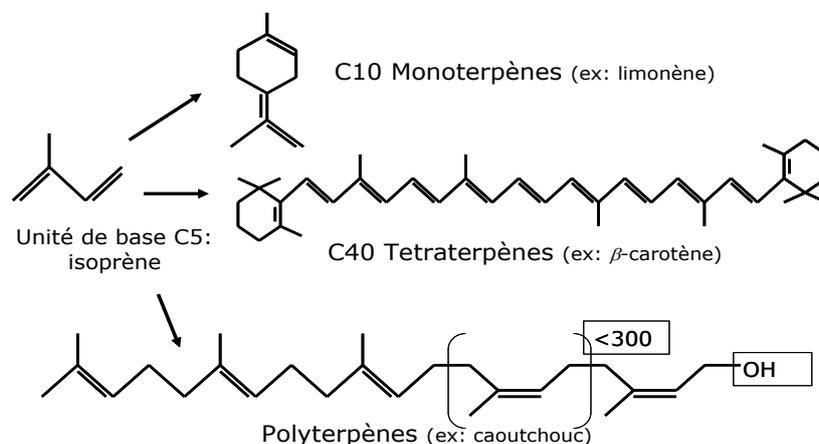


Figure 1 : Structure des terpénoïdes et stéroïdes

On distingue :

C5 : hémiterpénoïdes (une unité isoprène)

C10 : monoterpénoïdes (deux unités isoprène)

C15 : sesquiterpénoïdes (trois unités isoprène)

C20 : diterpénoïdes (quatre unités isoprène)

C30 : triterpénoïdes (six unités isoprène)

C40 : tetraterpénoïdes (huit unités isoprène)

C45 et C50 : queues terpénoïdes des molécules d'ubiquinone et de plastoquinones

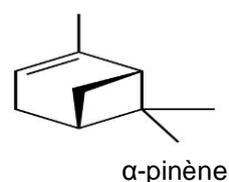
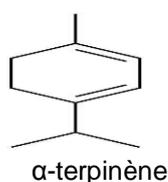
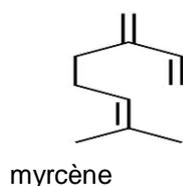
Au-delà : polyterpénoïdes (caoutchouc...)

#### I.2.3.1. Structure des terpénoïdes et stéroïdes

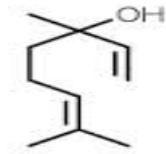
##### I.2.3.1.1. Monoterpénoïdes

###### ❖ *Monoterpénoïdes réguliers volatils*

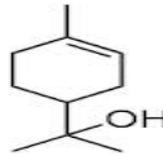
- *Carbures* : acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques ( $\alpha$ - et  $\gamma$ -terpinène, *p*-cymène) ou bicycliques (pinène,  $\Delta^3$ -carène, camphène, sabinène) ;



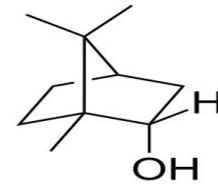
- *Alcools* : acycliques (géraniol, linalol, citronellol), monocycliques (menthol,  $\alpha$ -terpinéol, terpin-1-én-4-ol), bicycliques (bornéol, fenchol) ;



linalol

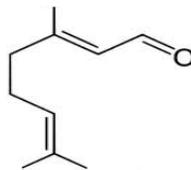


$\alpha$ -terpinéol

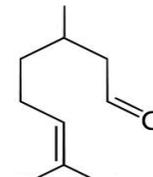


bornéol

- *Aldéhydes* : souvent acycliques (géraniol, néral, citronellal) ;

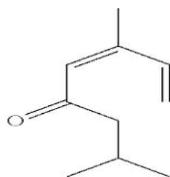


géraniol

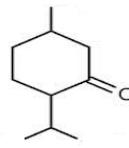


citronellal

- *Cétones* : acycliques (tagétone), monocycliques (menthone, isomenthone, carvone), bicycliques (camphre, fenchone, thuyone) ;



tagetone  
(*Lippia multiflora*)

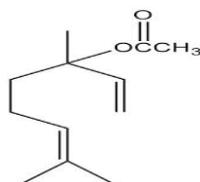


menthone  
(menthe)

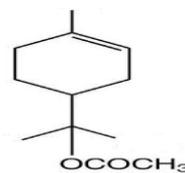


camphre  
(camphrier)

- *Esters* : acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle), monocycliques (acétate de menthyle, acétate de terpinyle), bicycliques (acétate d'isobornyle) ;

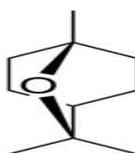


acétate de linalyle

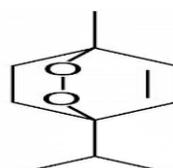


acétate de terpinyle

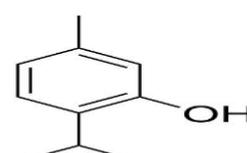
- *Ethers* (eucalyptol, oxydes de linalol) ; *peroxydes* (ascaridole) ; *phénols* (thymol, carvacrol).



eucalyptol  
(eucalyptus)



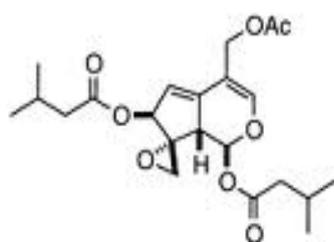
ascaridole  
(boldo)



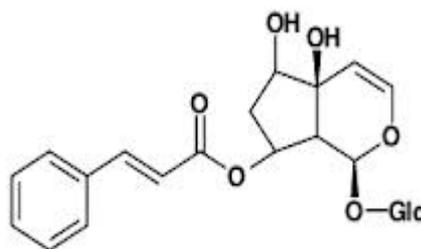
thymol  
(thym)

❖ *Iridoïdes (monoterpénoïdes réguliers)*

Les monoterpénoïdes réguliers sont représenté par les iridoïdes caractérisés par un squelette cyclopenta[c]pyranique, parfois désigné par le terme d'iridane (cis-2-oxabicyclo[4,3,1]nonane). Ils sont majoritairement sous forme d'hétéroside.



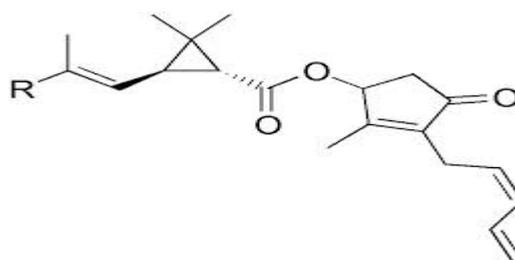
valtrate  
(valériane) Valerianaceae



harpagoside  
(harpagophyton) Pedaliaceae

❖ *Monoterpénoïdes irréguliers*

Les seuls monoterpènes irréguliers utilisés sont les pyréthrinoïdes, esters d'acides cyclopropaniques à squelette chrysanthéinane isolés d'une Asteraceae (pyrèthre). Insecticides non toxiques pour l'homme et les autres mammifères. Ils ont donné naissance à une série de composés synthétiques les pyrethrinoïdes



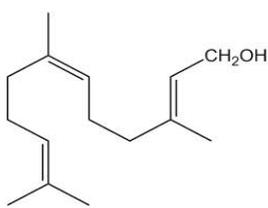
Pyrethrine I (R = CH<sub>3</sub>)  
Pyrethrine II (R = CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
(pyrèthre) Asteraceae

### I.2.3.1.2. Sesquiterpénoïdes

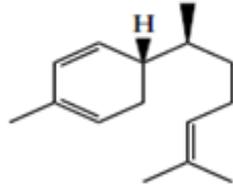
Ce sont des hydrocarbures de formule C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> (3 unités isopréniques). Le farnésol un sesquiterpène linéaire de nombreuses huiles essentielles, abondamment utilisé en parfumerie. On distingue également les sesquiterpènes monocycliques et polycycliques (caryophyllène).

❖ *Sesquiterpénoïdes volatiles*

On distingue : carbures (caryophyllène), alcools (farnésol), cétones, aldéhydes et esters.

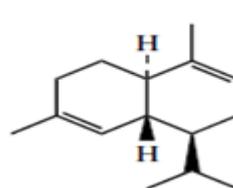


farnésol

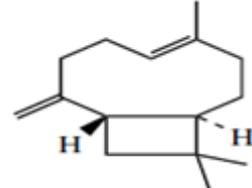


(-)-zingibérène

(gingembre) Zingiberaceae



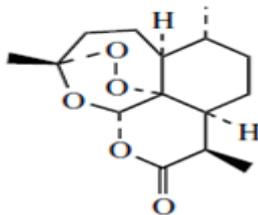
$\alpha$ -cadinène



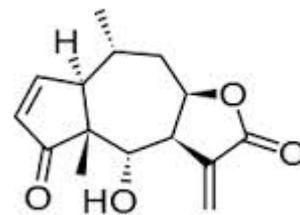
$\beta$ -caryophyllène

❖ *Sesquiterpénoïdes lactoniques*

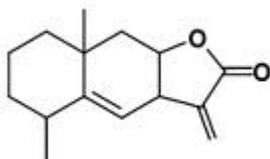
Les lactones sesquiterpéniques «principe amers» dérivent de la cyclisation du cyclodécadiénylique. Le plus souvent rencontrés chez des espèces de la famille des Asteraceae.



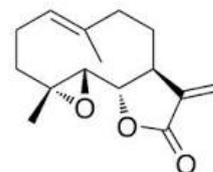
artémisinine  
(armoise annuelle)



héliénaline  
(arnica)



alantolactone  
(aunée)



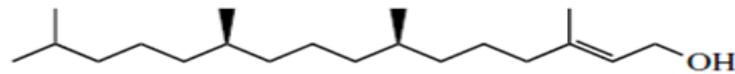
parthénolide  
(grande camomille)

I.2.3.1.3. Diterpénoïdes

Ces composés en C20 sont très répandus

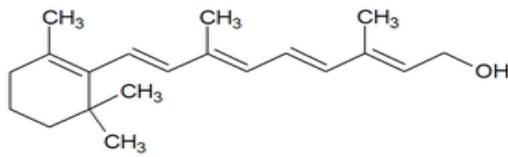
❖ *Diterpènes acycliques*

Parmi les diterpènes acycliques, on rencontre la famille des phytanes dont le phytol est le représentant le plus connu (dans la chlorophylle), les tocophérols (vitamine E) ou la phylloquinone (vitamine K1).

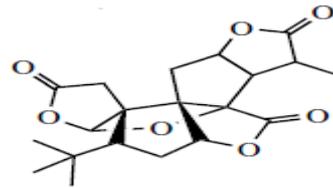


phytol

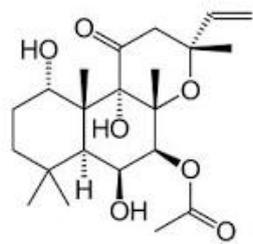
❖ *Diterpènes cycliques*



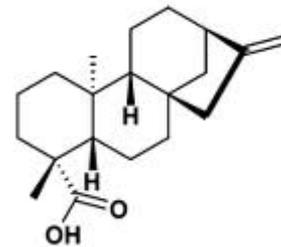
vitamine A (cyclophytane)



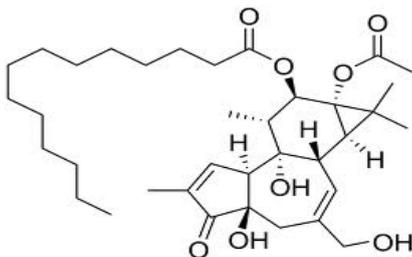
ginkgolide (diterpène lactonique)  
(ginkgo)



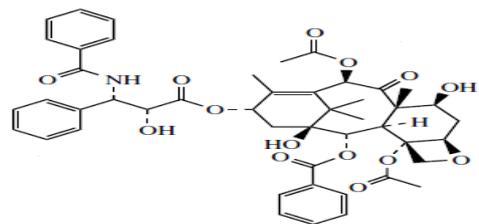
forskoline (labdane)



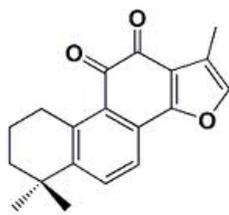
teucrine G (clérodane)



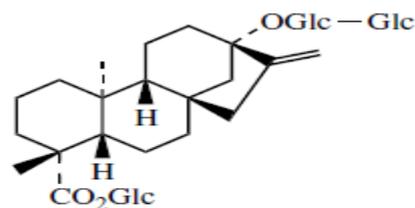
phorbol acétate (tiglane)  
(croton)



paclitaxel (taxane)  
(ifs) Taxaceae



Tanshinone II (abietane)  
(*Salvia miltiorrhiza*) Lamiaceae



Stéviósíde (kaurène)  
(*Stevia rebaudiana*) Asteraceae

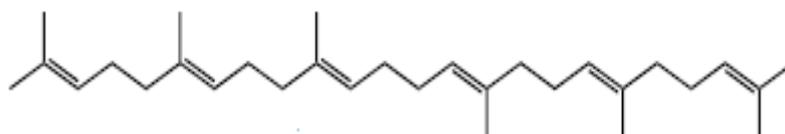
#### I.2.3.1.4. Triterpénoïdes

Ces composés en C30 (contenant 6 unités d'isoprène) sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifié, ou sous forme hétérosidique.

##### ❖ *Triterpénoïdes non hétérosidiques*

##### - *Triterpènes acycliques*

Parmi les triterpènes acycliques se trouve le squalène qui est le précurseur des autres triterpènes.

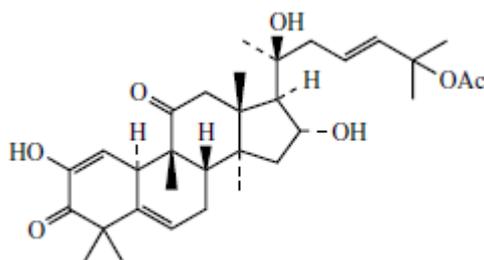


squalène

##### - *Triterpènes cycliques*

##### . *Cucurbitacines*

Les cucurbitacines sont des triterpènes tétracycliques particulièrement toxiques, amers, cytotoxiques.

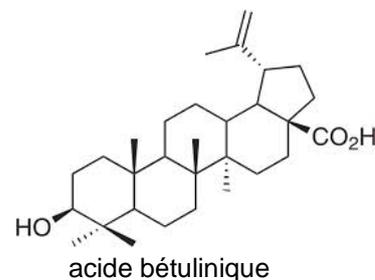
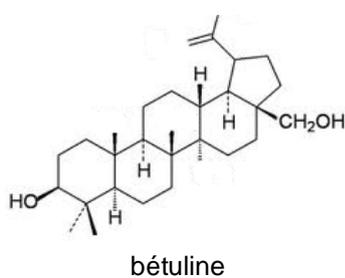
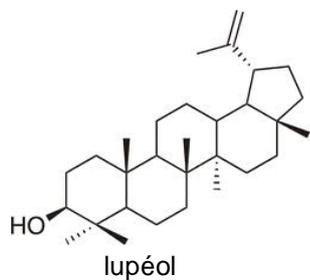


cucurbitacine E  
Cucurbitaceae

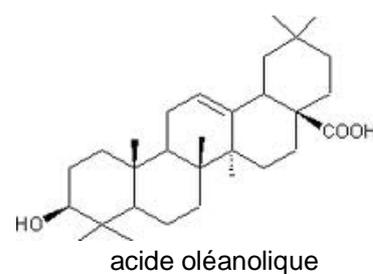
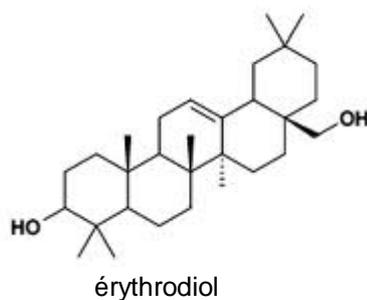
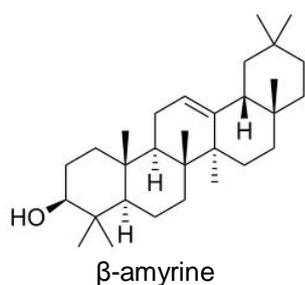
### . Pentacycliques

Les triterpènes pentacycliques sont représentés par les différentes structures suivantes : lupane, oléane et ursane.

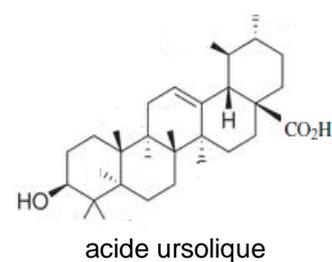
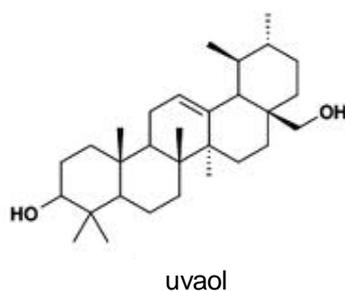
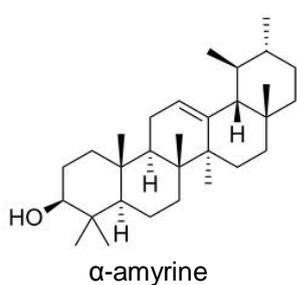
#### Lupane :



#### Oléane :

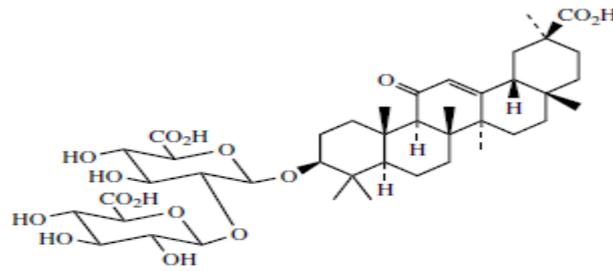


#### Ursane :



#### ❖ Triterpénoïdes hétérosidiques

Les plus fréquents dans les plantes médicinales sont des saponosides triterpéniques (hétéroside de triterpènes).



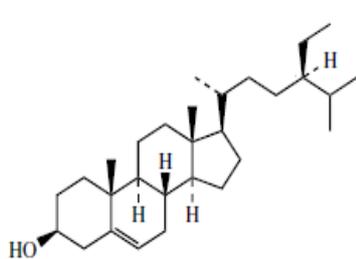
Glycyrrhizine  
(régliasse) Fabaceae

### I.2.3.1.5. Stérols

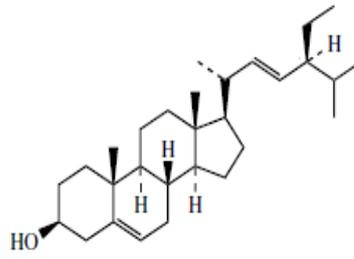
Les stérols ont une structure stéroïdique proche de celle des triterpènes. Les phytostérols sont spécifiques des végétaux. Ils sont sous forme libre, mais nombreux sont sous forme hétérosidique (saponosides et cardiotoniques).

#### ❖ *Stérols non hétérosidiques*

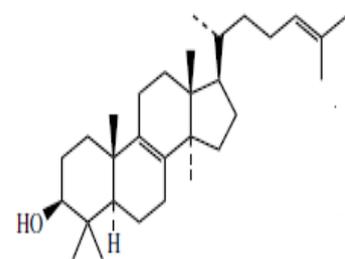
La plupart des stérols libres sont représentés par les phytostérols



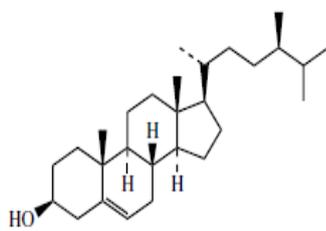
sitostérol



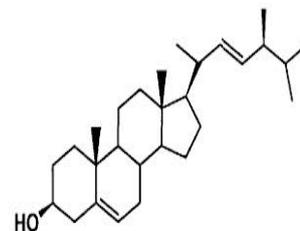
stigmasterol



lanosterol



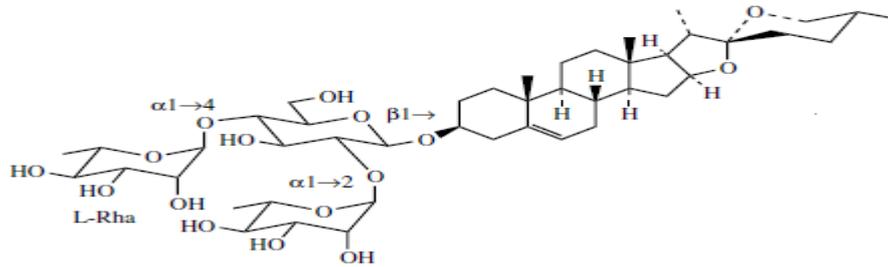
campesterol



brassicasterol

❖ *Stérols hétérosidiques*

- *Saponosides stéroïdiques*

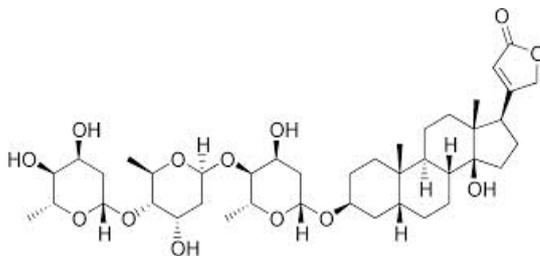


dioscine  
(igname) Dioscoreaceae

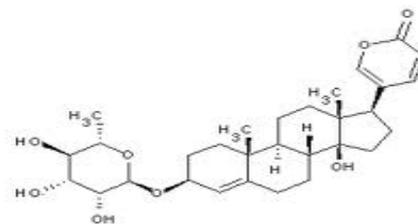
- *Hétérosides cardiotoniques*

Les glycosides cardiotoniques constituent un groupe bien individualisé et d'une grande homogénéité tant structurale que pharmacologique. Ce sont des glycosides stéroïdes qui possèdent une structure tétracyclique 10,13-diméthylcyclopentanoperhydrophénantrène. La partie osidique peut être constituée d'un ose, ou ce qui est très fréquent, d'un oligosaccharide.

Deux structures généralement rencontrées : cardénolide et bufadiénolide



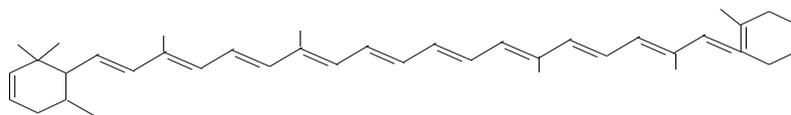
digitoxine (cardenolide)  
(digitale)



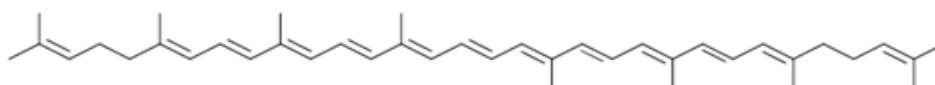
proscillaridine (bufadiénolide)  
(scille)

I.2.3.1.5. Tétraterpènes

Les tétraterpènes sont représentés par les caroténoïdes.



β carotène



lycopene

### I.2.3.2. Propriétés pharmacologiques des terpénoïdes et stéroïdes

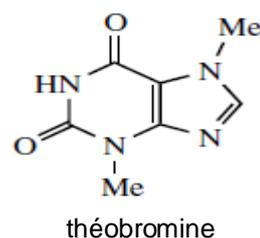
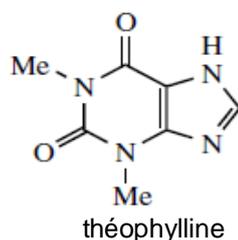
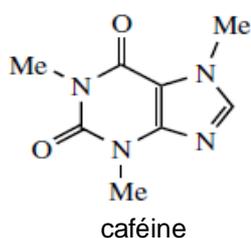
Les terpénoïdes et stéroïdes possèdent diverses propriétés pharmacologiques [9,11] :

- *Monoterpènes* : constituants majoritaires des huiles essentielles, et sont responsables des propriétés variées des huiles essentielles et des plantes qui les contiennent ( antiseptiques, antispasmodiques, sédatives et anti-inflammatoires).
- *Iridoides* : action anti-inflammatoire.
- *Sesquiterpènes* : en dehors de l'artémisinine et ses dérivés qui ont des propriétés antiamariles la thérapeutique contemporaine n'utilise pas les lactones sesquiterpéniques.
- *Diterpènes* : propriétés anti-hypertensives, antirétrovirales, antitumorales, anti-inflammatoires et analgésiques. Ils sont utilisés comme anticonceptionnel, et pour favoriser l'accouchement. Plusieurs diterpènes sont des toxiques violents.
- *Saponosides* : anti-inflammatoires, anti-œdémateuses, antimycosiques.
- *Cucurbitacines* : particulièrement toxiques, et possèdent des propriétés purgatives drastiques.
- *Hétérosides cardiotoniques* : activité sur le cœur à plusieurs niveaux :
  - . niveau sinusal, une diminution de l'automatisme avec un effet chronotrope négatif ;
  - . niveau auriculaire, une diminution de la conduction et de l'excitabilité ;
  - . niveau nodal, une diminution de la conduction avec effet chronotrope négatif ;
  - . niveau ventriculaire, un raccourcissement des périodes réfractaires avec dépression de la conduction et de l'automatisme.
- *Phytostérols* sont hypocholestérolémiants.
- *Tétraterpènes* ont des propriétés anti-oxydantes.

### I.2.4. Autres composés

D'autres composés, dérivés simples de métabolites primaires possèdent des activités pharmacologiques [9,11].

#### I.2.4.1. Bases puriques

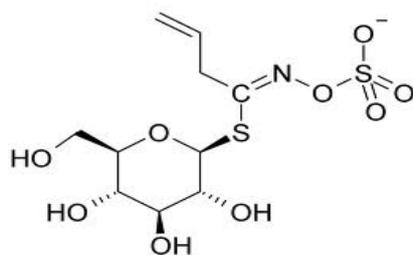


### I.2.4.2. Dérivés des acides aminés

#### I.2.4.2.1. Composés soufrés

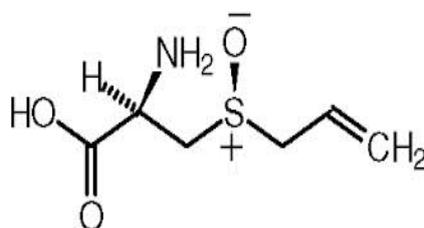
##### ❖ - *Glucosinolates*

Les Glucosinolates (thioglucosides) sont caractéristiques des plantes de l'ordre des Brassicales et responsables du goût âcre caractéristique des choux et de la moutarde ;



sinigrinose

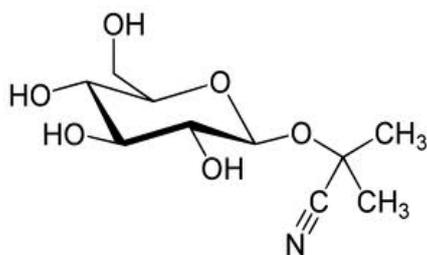
##### ❖ *Composés soufrés de l'ail*



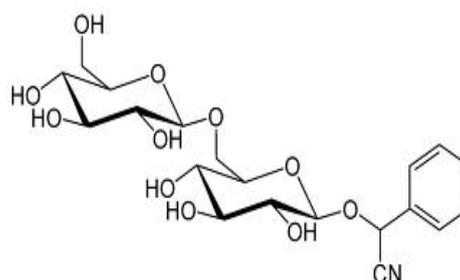
alliine

#### I.2.4.2.2. Hétérosides cyanogènes

Hétérosides dérivés d'acides aminés capables de libérer de l'acide cyanhydrique.



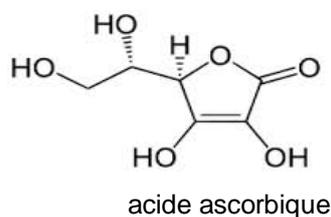
linamarine



amygdaline

### I.2.4.3. Dérivés des sucres

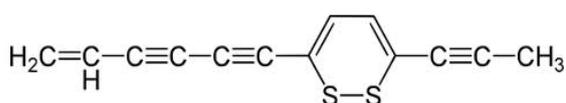
Des acides organiques comme l'acide ascorbique (vitamine C)



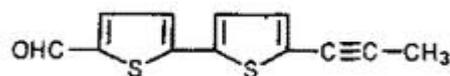
### I.2.4.4. Composés apparentés aux lipides

#### I.2.4.4.1. Polyacétyléniques

Les dérivés polyacétyléniques (polyines) présentant des activités antifongiques et antimicrobiennes.



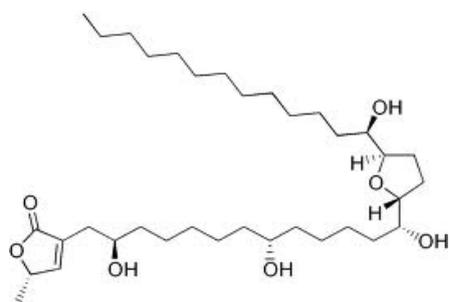
thiarubrine A  
(*Aspilia africana*) Asteraceae



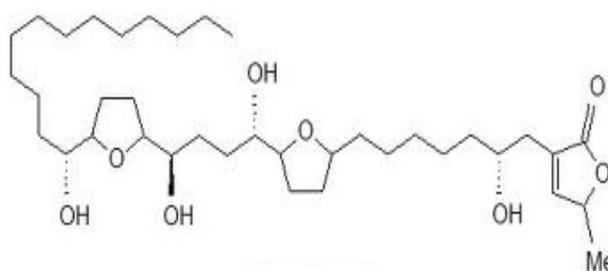
arctinal  
(bardane) Asteraceae

#### I.2.4.4.2. Acétogénines

L'intérêt de ces molécules est lié à leurs propriétés cytostatiques et potentiellement antitumorales, mais aussi antiparasitaires. Elles sont caractéristiques des Annonaceae.



annonacine  
(corossol)



gigantecine  
(*Goniothalamus giganteus*)

### **I.3. DROGUES VEGETALES UTILISEES**

Pour l'évaluation qualitative des profils métaboliques durant l'étude expérimentale, nous avons sélectionné deux drogues végétales largement utilisées en Afrique de l'Ouest notamment en Côte d'Ivoire [13], et dans lesquelles plusieurs composés polaires et apolaires ont été identifiés (feuilles de Kinkeliba *Combretum micranthum* G. Don. Combretaceae et feuilles de *Mitracarpus scaber* Zucc. Rubiaceae).

Elles diffèrent également par rapport aux fractions utilisées en thérapeutique : pour *C. micranthum* l'activité thérapeutique traditionnelle est liée aux composés polaires (extrait aqueux) [14-16], par contre pour *Mitracarpus scaber*, l'activité thérapeutique traditionnelle est basée sur les composés peu polaires ou apolaires [17-23].

#### **I.3.1 Feuilles de *Combretum micranthum* G. Don**

*Combretum micranthum* plante connue sous le nom de kinkéliba (*N'golobé*, *N'kolobelen*, *Singolobé*, *Kolobé* en Bambara ou Malinké, *kenkiliba* en Wolof, *talli* ou *gumuni* en Peuhl, *geza* en Haoussa), est une plante de la famille des Combrétacées. On la trouve dans la zone sahélienne, mais aussi dans les pays jouxtant le Golfe de Guinée allant du Sénégal au Cameroun (Afrique de l'Ouest).

Il s'agit d'un arbuste buissonnant atteignant la taille d'un arbre dans la zone pluvieuse. Ses rameaux sont brun-rougeâtre. Les feuilles sont alternes, opposées, ovales, verticillées, réticulées, poisseuses, avec une pubescence blanche ou parfois glabre. Ses fleurs blanches sont groupées en épis axillaires. Le fruit est composé d'un petit akène. [13]

Les feuilles de *Combretum micranthum* (figure 2) ont été utilisées dans un médicament traditionnel amélioré au Mali (*Hepatisane*) [24] et dans de nombreuses formulations galéniques (sirops, comprimés et solutions buvables) [14].

La feuille de *Combretum micranthum* est inscrite à la pharmacopée française 11<sup>ème</sup> édition [25]. La partie utilisée du kinkéliba est constituée par la feuille séchée de *Combretum micranthum* G. Don. Le kinkéliba contient au minimum 1,20 pour cent de dérivés flavoniques totaux, exprimés en vitexine (*Mr* 432,4) et au minimum 11,0 pour cent de polyphénols totaux (annexe).



Figure 2 : Feuilles de *Combretum micranthum*

#### I.3.1.1. Usages traditionnels

En médecine traditionnelle africaine, on utilise les feuilles de couleur verte. La pharmacopée prescrit de rejeter les feuilles rougeâtres, moins efficaces. Au Sénégal, les feuilles du kinkéliba sont consommées en décoction au petit déjeuner. Les feuilles séchées de Kinkeliba sont utilisées couramment en boisson comme diurétique et digestif, également dans les problèmes gastro-intestinaux, les coliques et les vomissements [26-29]. En Casamance, les feuilles sont mâchées, quand la population s'attend à une période de malaria et les feuilles fraîches sont utilisées pour réduire la fièvre, en particulier celle induite par le paludisme [27,29,30]. En outre, *C. micranthum* est également l'un des principaux ingrédients d'un remède antiviral indigène Nigérian appelés «Seven Keys to Power», qui est utilisé pour traiter la variole, la varicelle, la rougeole [31].

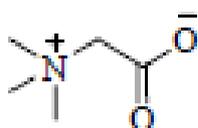
#### I.3.1.2. Composition phytochimique

Des études phytochimiques ont permis d'isoler de nombreuses substances responsables des différentes activités de *C. micranthum* appartenant aux trois grands groupes phytochimiques :

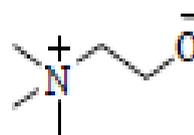
## I.3.1.2.1 Alcaloïdes

Différents études ont permis d'identifier des alcaloïdes [15,16,32,33] :

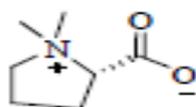
- Ammonium quaternaire ;



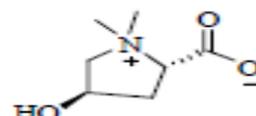
bétaine



choline

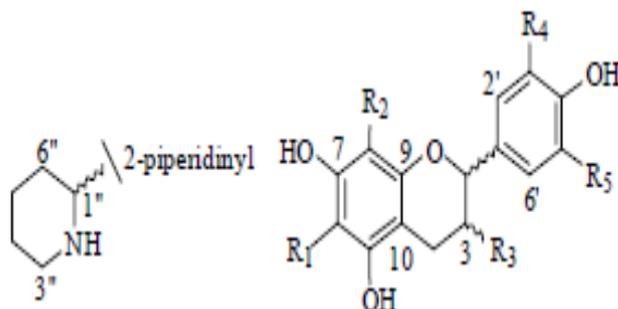


stachydrine



combretine

- Pipéridine-flavane alcaloïdes [16]



Kinkéloïde A<sub>1</sub> : R<sub>1</sub> = 2-piperidinyl, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> = H

Kinkéloïde A<sub>2</sub> : R<sub>2</sub> = 2-piperidinyl, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> = H

Kinkéloïde B<sub>1</sub> : R<sub>1</sub> = 2-piperidinyl, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> = H, R<sub>4</sub> = OH

Kinkéloïde B<sub>2</sub> : R<sub>2</sub> = 2-piperidinyl, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> = H, R<sub>4</sub> = OH

Kinkéloïde C<sub>1</sub> : R<sub>1</sub> = 2-piperidinyl, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> = OH

Kinkéloïde C<sub>2</sub> : R<sub>2</sub> = 2-piperidinyl, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> = OH

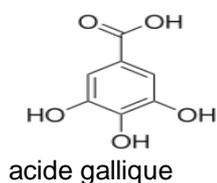
Kinkéloïde D<sub>1</sub> : R<sub>1</sub> = 2-piperidinyl, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> = OH

Kinkéloïde D<sub>2</sub> : R<sub>2</sub> = 2-piperidinyl, R<sub>1</sub> = H, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> = OH

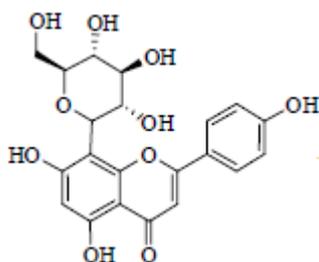
## I.3.1.2.2 Composés phénoliques

Différents composés phénoliques ont été identifiés [15,26,33-35] :

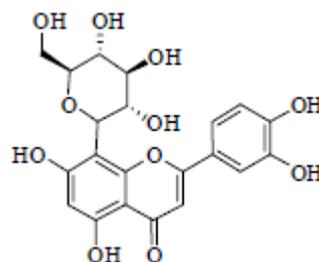
## - Acide phénols



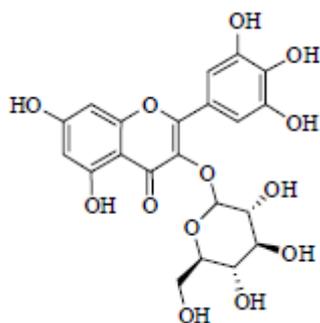
## - Flavonoïdes



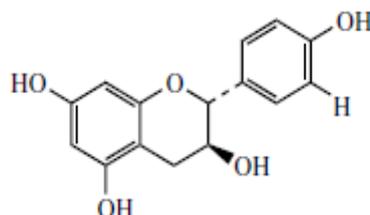
Vitexine (C-glycosyl-8 apigénine)  
Isovitexine (C-glycosyl-6 apigénine)



orientine (C - glycosyl-8 lutéoline)  
Homoorientine (C - glycosyl-6 lutéoline)



myricétine-3-O-glycoside



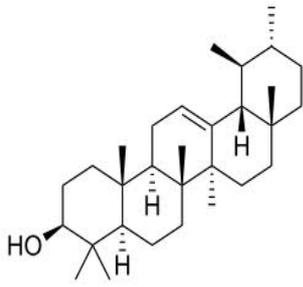
(+)-catéchine

## - Tanins

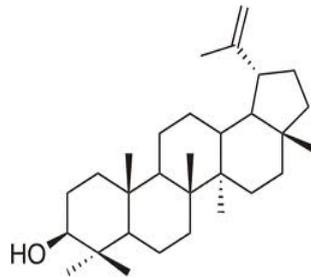
Des tanins catéchiques (combrétanin)

I.3.1.2.3 Composés terpéniques

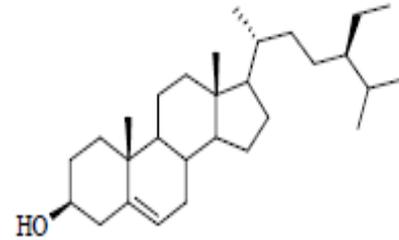
Des triterpéniques et stérols [15,36]



α-amyrine



lupéol

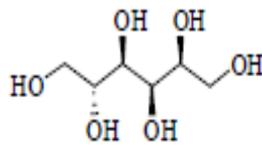


β-sitostérol

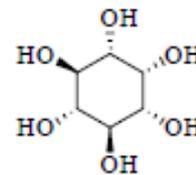
I.3.1.2.4 Autres composés

D'autres composés ont été identifiés [15,36,37]:

- Sucres



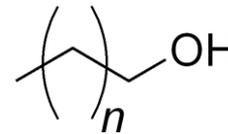
sorbitol



m-inositol

- Alcools gras

Alcool cétylique (C16) Hexadecanol  
 Alcool stéarylique (C18) Octadecanol  
 Alcool cérylique C<sub>26</sub>H<sub>53</sub>OH  
 Octacosanol (C28)  
 Alcool myricique triacontanol C<sub>30</sub>H<sub>61</sub>OH



- Acides gras



acide palmitique



acide oléique



acide linoléique

### I.3.1.3. Activités pharmacologiques

Le Kinkeliba possède des propriétés antioxydantes liées aux polyphénols (13-14%) [16,38,39].

Karou et al. [38] ont montré l'activité microbicide des feuilles de Kinkeliba contre *Shigella dysenteriae*, *Salmonella paratyphi B.* et *Staphylococcus aureus* et l'activité microbiostatique contre *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Salmonella thyphi*, *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella ozenae*.

Benoit et al. et Ancolio et al. [40,41] ont montré une activité antipaludique des feuilles Kinkéliba dans le traitement du paludisme. Olajide et al. [30] ont validé l'utilisation traditionnelle des feuilles Kinkéliba contre la fièvre paludéenne.

Chika et al. [42] ont montré les propriétés antidiabétiques de l'extrait aqueux des feuilles de kinkeliba.

Olajide et al. [30] ont rapporté l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique des feuilles du kinkéliba.

Ferrea et al. [43] ont démontré l'activité antivirale in vitro d'un extrait méthanolique des feuilles de Kinkéliba contre les virus herpès simplex 1 et 2.

### I-3-2 Feuilles de *Mitracarpus scaber* Zucc

*Mitracarpus scaber* Zucc. Rubiaceae (*kabani* en Bambara ou Malinké ; *ndötukan*, *ndatukan*, *gurguli* en Wolof) est une herbe annuelle de 10 à 50 cm de hauteur, à tige ramifiée, évasée, ronde, blanchâtre ou jaunâtre, pubescente. Les feuilles (figure 3) sont lancéolées de 5 cm sur 1 cm, opposées, glabres dessous, scabres ou lisses dessus. Les fleurs sont blanches; très petites 2 à 3 mm, disposées en glomérules à l'aisselle des feuilles. La partie supérieure de la fleur tombe en découvrant la graine. Les graines sont chagrinées dorsalement; la face inférieure présente une empreinte semblable à une patte de chien.[13]



Figure 3 : Feuilles de *Mitracarpus scaber*

Les feuilles de *Mitracarpus scaber* ont été utilisées en Côte d'Ivoire et au Mali pour la préparation de pommade dermique pour le traitement d'affections dermatologiques [22,44].

Les feuilles de *Mitracarpus scaber* ont été utilisées au Benin pour la préparation de sirops antimicrobiens [45].

#### I.3.2.1. Usages traditionnels

Les feuilles *Mitracarpus scaber* Zucc. sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses affections cutanées [13,24,46].

En Côte d'Ivoire, Les feuilles sont préconisées pour le traitement des dartres en Côte d'Ivoire [13], les branchages feuillés de *Mitracarpus scaber* sont écrasés et le jus appliqué sur les mycoses [47].

Au Sénégal, les feuilles sont préconisées pour le traitement la lèpre, la syphilis, aussi contre les maux de ventre, de tête et de dent [28].

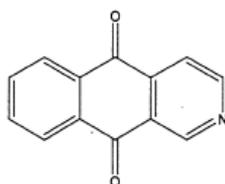
Au Bénin Les extraits des feuilles de *Mitracarpus scaber* ont été utilisés pour traiter les dermites et eczémas. L'huile essentielle des feuilles de *Mitracarpus scaber* a été utilisée pour traiter les teignes et eczémas au Nigeria [17].

### I.3.2.2. Composition phytochimique

Des études phytochimiques ont permis d'isoler de nombreuses substances responsables des différentes activités de *Mitracarpus scaber* appartenant aux trois grands groupes phytochimiques :

#### I.3.2.2.1 Alcaloïdes

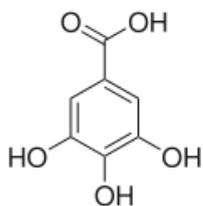
Un alcaloïde a été identifié [48-50]



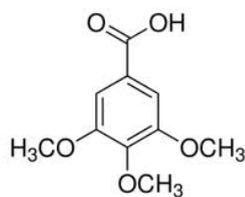
2-azaanthraquinone  
2-aza 9-10 anthraquinone  
benzoisoquinoline 5-10 dione

#### I.3.2.2.2 Composés phénoliques

##### - Phénols acides

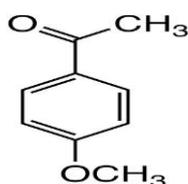


acide gallique

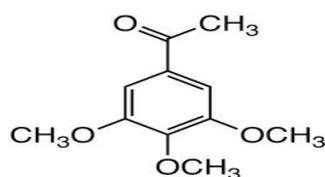


acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque  
(acide eudesmique)

##### - Phénones [20]

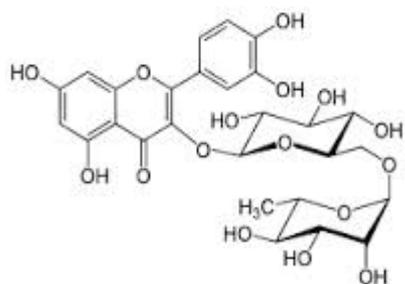


4-méthoxyacétophénone

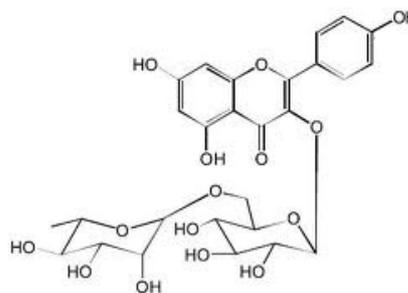


3,4,5-triméthoxyacétophénone

- Flavonoïdes [20]

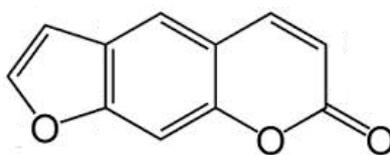


rutine



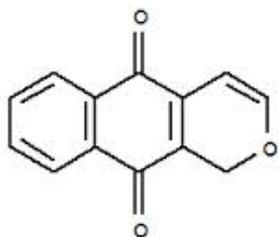
kaempférol-3-O-rutinoside

- Coumarines [20]

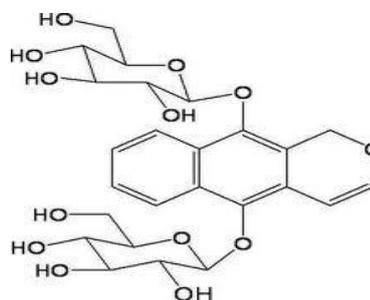


psoralène

- Naphtoquinone [51,52]



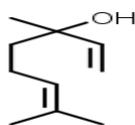
pentalongine  
1H-naphtho [2,3-c] pyran-5,10-dione



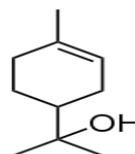
harounoside  
pentalongin hydroquinone diglycoside

I.3.2.2.3 Composés terpéniques

- Monoterpènes [17]

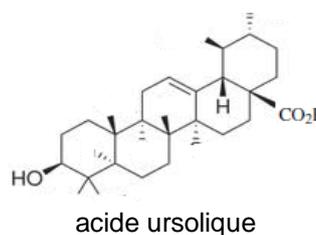
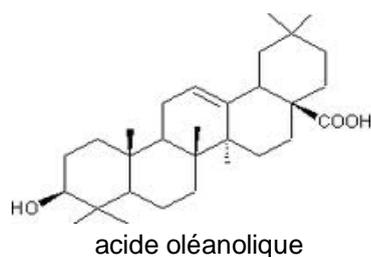


linalol

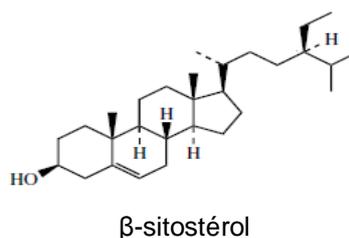


terpinéol

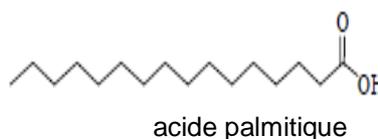
- Triterpènes [20,48,53]



- Stérols [19].



#### I.3.2.2.4 Autres composés



#### I.3.2.3. Activités pharmacologiques

De nombreuses publications ont démontré les activités antifongiques et antibactériennes de *Mitracarpus scaber* [19,20,54-56].

En Côte d'Ivoire, Bonga et al. [19] ont montré l'activité de la fraction éthanolique des feuilles de *Mitracarpus scaber* sur *Cryptococcus neoformans*.

Au Burkina Faso, Kambou [57] a retrouvé une activité antifongique in vitro de l'extrait à l'acétate d'éthyle et au n-hexane contre *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton interdigitale* et *Microsporum langeronii*.

Ekpendu et al. [18] ont mis en évidence l'activité anti-inflammatoire et antimicrobienne (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) de l'extrait à l'éther de pétrole de *Mitracarpus scaber*.

Au Mali, Sanogo et al. [58] ont testé in vitro l'activité antimicrobienne de *Mitracarpus scaber* sur plusieurs souches de staphylocoques et de candida.

Cimanga et al. [21] ont montré l'activité antimicrobienne et antifongique des extraits hexaniques et méthanoliques des feuilles de *Mitracarpus scaber*.

#### **I.4. REFERENCES : MEDICAMENTS TRADITIONNELS**

1. WHO (2010) Guidelines for registration of traditional medicines in the WHO african region. AFR/TRM/04. World Health Organization, Geneve
2. WHO (2000) General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. World Health Organization, Geneve
3. OMS (2002) Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002 - 2005, vol WHO/EDM/TRM/2002.1. Organisation Mondiale de la Santé, Genève
4. OMS (2002) Perspectives politiques de l'OMS sur les médicaments - Médecine traditionnelle : Besoins croissants et potentiel, vol 2. Organisation Mondiale de la Santé, Genève
5. Gbortsu F, Gbortsu P (2008) Médecine et médicaments traditionnels en Afrique. Terre d'Afrique,
6. WHO (1978) The promotion and development of traditional medicine. Report of the WHO meeting World Health Organization, Geneve
7. Mbwambo ZH, R.L.A. M, E.J. K (2007) Traditional health practitioner and the scientist: bridging the gap in contemporary health research in Tanzania. Tanzania Health Research Bulletin 9 (2):115-120
8. OMS (1998) Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques. Recueil de directives et autres documents, vol 1. Organisation Mondiale de la Santé, Genève
9. Bruneton J (2009) Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 4 edn. Tec & Doc Lavoisier,
10. Dewick PM (2001) Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. 2 edn. John Wiley & Sons,
11. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T (2008) Thin layer chromatography in phytochemistry, vol 99. CRC Press, Boca Raton
12. Wagner H, Bladt S (1996) Plant drug analysis: a Thin Layer Chromatography atlas. 2 edn. Springer, Berlin
13. Adjanohoun E, Aké Assi L (1979) Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire, vol 1. Centre Nationale de Floristique, Université d'Abidjan-Cocody, Abidjan
14. Perrey F, Staub H, Goetz P (2004) Monographie médicalisée : Kinkéliba, *Combretum micranthum* G. Don ou *Combretum raimbauldii* (Combrétacées). Phytothérapie 3:82-84
15. Olschwang D, Bassene E, Colonna J-P (1991) Tradition africaine et analyse scientifique : l'utilisation du kinkéliba (*Combretum micranthum* G. Don) en Afrique de l'Ouest. Epistème 2:74-82
16. Welch CR (2010) Chemistry and pharmacology of Kinkéliba (*Combretum micranthum*), a west African medicinal plant. Ph D Graduate Program in Medicinal Chemistry, University of New Jersey, New Brunswick
17. Ekpendu TOE, Adesomoju AA, Ekundayo O, Okogun JI, Laakso I (1993) Constituents of the volatile oil of *Mitracarpus scaber* Zucc. Flavour and Fragrance Journal 8 (5):269-271
18. Ekpendu TO, Akah PA, Adesomoju AA, Okogun JI (1994) Antinflammatory and antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extracts. Pharmaceutical Biology 32 (2):191-196
19. Bonga GM, Vanga-Mandah M, de Souza C, Guede-Guina FR (1995) Mise en évidence de phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*. Revue de Medecines et Pharmacopees Africaines 9 (1):21-30
20. Bisignano G, Sanogo R, Marino A, Aquino R, D'Angelo V, Germano MP, De Pasquale R, Pizza C (2000) Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. Letters in Applied Microbiology 30 (2):105-108
21. Cimanga RK, Kambu K, Tona L, De Bruyne T, Sandra A, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ (2004) Antibacterial and antifungal activities of some extracts and fractions *Mitracarpus scaber* Zucc. (Rubiaceae). Journal of Natural Remedies 4 (1):17-25

22. Sanogo R, Konipo A, Maiga A, Arama AE, Diallo D, Bougoudogo F (2006) Formulation d'une pommade dermique à base d'extraits de *Mitracarpus scaber* (zucc). *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaines* 14:159-177
23. Makambila-Koubemba M-C, Mbatchi B, Ardid D, Gelot A, Henrion C, Janisson R, Abena AA, Banzouzi J-T (2011) Pharmacological studies of ten medicinal plants used for analgesic purposes in Congo Brazzaville. *International Journal of Pharmacology* 7:608-615
24. Pousset J-L (2004) *Plantes médicinales d'Afrique ; comment les reconnaître et les utiliser ?* Secum-Edisud, France
25. Pharmacopée Française (2012) Kinkéliba, *Combretum micranthum*. 11 edn. ANSM, France
26. Paris R (1942) Sur une Combretacee africaine, le "kinkeliba" (*Combretum micranthum* G. Don.). *Bulletin des Sciences Pharmacologiques* 10-11-12:181-186
27. Le Grand A (1989) Les Phytotherapies Anti-infectieuses de la Foret-savane, Senegal (Afrique occidentale) III: Un Resume des Substances Phytochimiques et l' Activite Antimicrobienne de 43 Species. *Journal of Ethnopharmacology* 25:315-338
28. Kerharo J, Adam JG (1974) *Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle: Plantes Médicinales et toxiques*. Edit. Vigot-frères, Paris
29. Le Grand A, Wondergem PA (1987) Les Phytotherapies Anti-infectieuses de la Foret-savane, Senegal (Afrique occidentale) I: Un Inventaire. *Journal of Ethnopharmacology* 21:109-125
30. Olajide O, Makinde JM, Okpako DT (2003) Evaluation of the anti-inflammatory property of the extract of *Combretum micranthum* G. Don. (Combretaceae). *Inflammopharmacology* 11 (3):293-298
31. Esimone CO, Grunwald T, Wildner O, Nchinda G, Tippler B, Proksch P, Uberla K (2005) In vitro pharmacodynamic evaluation of antiviral medicinal plants using a vector-based assay technique. *Journal of Applied Microbiology* 99 (6):1346-1355
32. Bassene E, Olschwang D, Pousset J-L (1986) Plantes medicinales africaines. Les alcaloides du *Combretum micranthum* G. Don (Kinkeliba). *Annales Pharmaceutiques Francaises* 44 (3):191-196
33. D' Agostino M, Biagi C, De Feo V, Zollo F, Pizza C (1990) Flavonoids of *Combretum micranthum*. *Fitoterapia LXI* (5):477
34. Bassene E, Laurance A, Olschwang D, Pousset J-L (1985) Plantes medicinales africaines XIX: Dosage de la vitexine par chromatographie liquide haute performance dans un extrait brut de *Combretum micranthum* G. Don. *Journal of Chromatography* 346:428-430
35. Bassene E, Olschwang D, Pousset J-L (1987) Plantes medicinales africaines XXIII : Flavonoides du *Combretum micranthum*, G. Don (Kinkeliba). *Plantes medicinales et phytotherapie XXI* (2):173-176
36. Bassene E, Olschwang D, Pousset J-L (1989) Etude de l'insaponifiable de l'extrait lipidique des feuilles de *Combretum micranthum* G. Don (Kinkeliba). *Herba Hungarica* 28 (1-2):75-79
37. Bassene E, Olschwang D, Pousset J-L (1981) Plantes medicinales africaines I: Caracterisation de l'inositol et du sorbitol, principes actifs probables du Kinkeliba ("*Combretum micranthum*" G. Don.). *Dakar Medical* 26 (2):219-225
38. Karou D, Dicko MH, Simporé J, Traore AS (2005) Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology* 4 (8):823-828
39. Juliani HR, Koelliker Y, Bucuk M, Welch CR, Tepper BJ, Jefthas E, Simon JE (2009) Quality and Consumer Studies in the USA of African Herbal Teas for the Natural Product Industry Development in Sub-Sahara Africa. In: 1021 ACS (ed) *African Natural Plant Products: Discoveries and Challenges in Quality Control*. American Chemical Society, Washington, D.C.,
40. Ancolio C, Azas N, Mahiou V, Ollivier E, Di Giorgio C, Keita A, Toimon-David P, Balansard G (2002) Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. *Phytotherapy Research* 16 (7):646-649

41. Benoit F, Valentin A, Pelissier Y, Diafouka F, Marion C, Kone-Bamba D, Kone MM, M., Yapo A, Bastide J-M (1996) In Vitro Antimalarial Activity of Vegetal Extracts Used in West African Traditional Medicine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54 (1):67-71
42. Chika A, Bello SO (2010) Antihyperglycaemic activity of aqueous leaf extract of *Combretum micranthum* (Combretaceae) in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 129 (1):34-37
43. Ferrea G, Canessa A, Sampietro F, Cruciani M, Romussi G, Bassetti D (1996) In vitro activity of a *Combretum micranthum* extract against herpes simplex virus types 1 and 2. *Antiviral Research* 21:317-325
44. Koffi A, Dally I, Aka B, Coulibaly S, Guede-Guina FR (2007) Développement galénique d'une pommade à base d'huile de *Mitracarpus scaber* pour le traitement de cinq types de mycoses superficielles. *Journal des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques* 8 (2):18-24
45. Abere TA, Onyekweli AO, Ukoh GC (2007) In vitro Antimicrobial Activity of the Extract of *Mitracarpus scaber* Leaves Formulated as Syrup. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 6 (1):679-682
46. Bouquet A, Debray M (1974) Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire, vol 32. Travaux et Documents de l'O.R.S.T.O.M., Paris
47. Pousset JL (1989) Plantes médicinales africaines: utilisation pratique. Ellipses ACCT,
48. Gbaguidi F, Muccioli G, Accrombessi G, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J (2005) Densitometric HPTLC quantification of 2-azaanthraquinone isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity against *Dermatophilus congolensis*. *Journal of Planar Chromatography* 18 (5):377-379
49. Okunade AL, Clark AM, Hufford CD, Oguntimein BO (1999) Azaanthraquinone. An antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. *Planta Medica* 65 (5):447-448
50. Nok AJ (2002) Azaanthraquinone inhibits respiration and in vitro growth of long slender bloodstream forms of *Trypanosoma congolense*. *Cell Biochemistry and Function* 20:205-212
51. Moulis C, Pelissier Y, Bamba D, Fourasté L Pentalongin, antifungal naphthoquinoid pigment from *Mitracarpus scaber*. In: Uppsala (ed) 2nd International Congress on Ethnopharmacology, Sweden, 1992.
52. Harouna H, Faure R, Elias R, Debrauwer L, Saadou M, Balansard G, Boudon G (1995) Harounoside a pentalongin hydroquinone diglycoside from *Mitracarpus scaber*. *Phytochemistry* 39 (6):1483-1484
53. Gbaguidi F, Accrombessi G, Gbenou J, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J (2006) Identification, purification and quantification of two bioactive terpenes in *Mitracarpus scaber*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie* 11 (22):13-20
54. Ali-Emmanuel N, Moudachirou M, Akakpo AJ, Quetin-Leclercq J (2002) Activités antibactériennes in vitro de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* sur *Dermatophilus congolensis* isolé au Bénin. *Revue Elev Méd vét Pays tropical* 55 (3):183-187
55. Ali-Emmanuel N, Moudachirou M, Akakpo JA, Quetin-Leclercq J (2003) Treatment of bovine dermatophilosis with *Senna alata*, *Lantana camara* and *Mitracarpus scaber* leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 86:167-171
56. Nwachukwu CB, Azoro C, Idris A, Wokem GN (2006) Antibacterial activity of methanol and aqueous leaf extracts of *Mitracarpus scaber* on *Staphylococcus aureus*. *Biosciences, Biotechnology Research Asia* 3 (2a):305-308
57. Kambou YSE (1999) Contribution à l'étude de l'activité antifongique de *Mitracarpus scaber* Zucc (Rubiaceae). Université Ouagadougou,
58. Sanogo R, Germano MP, De Pasquale R, Keita A, Bisignano G (1996) Selective antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* Zucc. Against *Candida* and *Staphylococcus sp.* *Phytomedicine* 2 (3):265-268

## **II. EVALUATION ANALYTIQUE DES MÉDICAMENTS TRADITIONNELS**

La qualité des médicaments à base de plantes a un impact direct sur leur innocuité et leur efficacité. Des rapports ont montré des effets secondaires associés aux falsifications et à la présence de contaminants (métaux lourds, pesticides et micro-organismes) [1].

L'évaluation de la qualité des médicaments à base de plantes utilisés en Afrique est difficile, car ce sont des mélanges complexes de plusieurs drogues végétales ou des préparations à base de drogues végétales, auxquels peuvent être associés des drogues minérales et/ou animales. Aussi la source, la récolte et la préparation des matières premières sont très variables [2,3]. Une approche multi-technique est nécessaire afin d'authentifier le lien entre les composants et l'usage traditionnel [4,5].

Le profil chromatographique des métabolites (modèle global des constituants pharmacologiquement actifs et/ou chimiquement caractéristiques présents dans une drogue végétale) constitue un outil permettant une évaluation qualitative et quantitative des médicaments à base de plantes [4-7].

L'association des profils chromatographiques à l'analyse chimiométrique permet l'extraction d'informations multivariées utiles pour comprendre les changements et les variations des profils chromatographiques. [8-10].

Nous présenterons dans cette partie les méthodes de préparations des échantillons, les techniques analytiques et les méthodes de traitement des données utilisées.

### **II.1. METHODES DE PREPARATION D'ECHANTILLON**

La préparation de l'échantillon est une étape importante pour l'analyse des profils chromatographiques des drogues végétales. La partie de la plante, le traitement préalable (séchage, fragmentation), le solvant et la procédure d'extraction influent sur la composition de l'extrait obtenu.

#### **II.1.1. Solvants d'extraction**

Le choix d'un solvant ou d'un mélange de solvants pour l'extraction de matières végétales est fondé sur divers facteurs : polarité, solubilité des constituants cibles, innocuité, facilité d'élimination, faible potentiel de formation d'artefacts et pureté du solvant [11-13]. Le tableau 1 présente divers solvants utilisés pour l'extraction plantes médicinales.

Le dichlorométhane, l'hexane et le chloroforme sont les solvants couramment utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires apolaires des plantes médicinales [13-16].

Tableau 1 : Solvants utilisés pour l'extraction des composés phytochimiques des plantes médicinales [11]

Solvant	Point d'ébullition (°C)	Miscibilité avec H <sup>2</sup> O (% v/v)
Acétone	56	∞
Acétate d'éthyle	77	80
Acide acétique	116 - 117	∞
Benzène	80	<0,01
2-Butanol	79,5	19
Cyclohexane	80,7	<0,01
Dichlorométhane	39,7	1,3
Chloroforme	61	8
Hexane	69	<0,01
Ethanol	78	∞
Ether éthylique	34,6	1,2
Ether de pétrole	30 - 50	<0,01
Méthanol	64,7	∞
1-Propanol	91	M
2-Propanol	82,4	M
Tétrachlorure de carbone	76,77	0,8
Toluène	110,6	0,06

M miscible ; ∞ complètement miscible

### **II.1.2. Méthodes d'extraction**

On distingue de nombreuses méthodes d'extraction (solide-liquide) des composés phytochimiques : des méthodes classiques (décoction, infusion, distillation à la vapeur, percolation, macération, chauffage sous reflux et Soxhlet) [11-13] et des méthodes modernes (ultrasons, micro-onde, contre-courant, fluide supercritique, liquide pressurisé et phase solide) [11,17,18]. On distingue des méthodes d'extraction à froid ou à chaud.

#### **II.1.2.1 Procédures d'extraction**

Deux procédures d'extraction sont généralement utilisées [11-13] :

- Extraction par mise en contact avec un solvant : les échantillons végétaux broyés sont mis en contact avec le solvant dans un mélangeur, puis l'extrait est filtré. Le filtrat peut être séché sous pression réduite, puis redissout dans le solvant.

- Extraction successive avec des solvants de polarité croissante : d'un solvant apolaire (hexane) à un solvant polaire (méthanol) afin d'assurer une extraction optimale des composés de polarités différentes.

L'efficacité de l'extraction peut être améliorée en effectuant des extractions multiples [13,19]

### II.1.2.2 Extraction par chauffage à reflux

C'est une méthode d'extraction solide-liquide à chaud. Le reflux permet la réalisation d'une extraction à une température constante (température de reflux) égale à la température d'ébullition du solvant. Ainsi le solvant s'évapore et le réfrigérant recondense les vapeurs qui retombent dans le ballon, permettant au solvant d'être ainsi recyclé (figure 4).

Le chauffage (augmentant solubilité et transfert de matière), l'ébullition (agitation) et le reflux (recyclage du solvant) permettent une extraction efficace avec un appareillage relativement simple [11]. Le chauffage à reflux est utilisé pour extraire efficacement des composés phytochimiques [19,20].

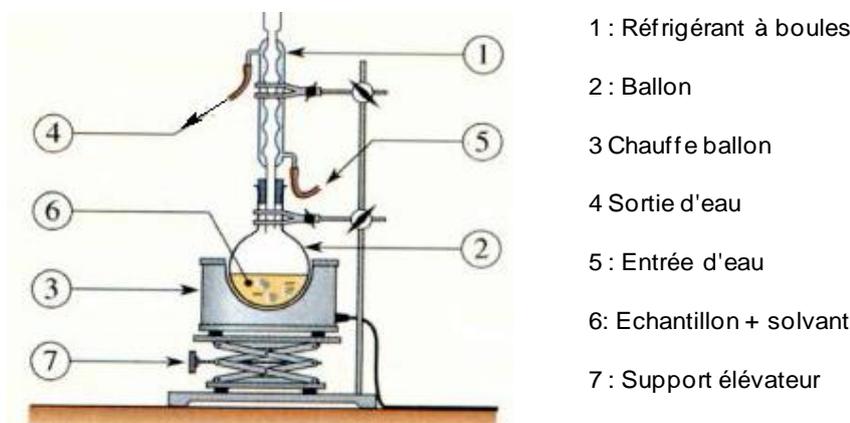


Figure 4 : Montage d'un système de chauffage à reflux

### II.1.2.2 Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons consiste à utiliser des ultrasons à des fréquences allant de 20 kHz à 2000 kHz, engendrant de très hautes températures (augmentation solubilité et diffusivité) et des pressions (amélioration de la pénétration et du transfert de matière) entre la matrice végétale et le solvant.

Un inconvénient de la procédure est l'effet délétère de l'énergie ultrasonore (plus de 20 kHz) sur les principes actifs végétaux par la formation de radicaux libres et dégradation des composés. Son application à grande échelle est limitée en raison des coûts plus élevés [18]. Extraction assistée par ultrasons est cependant une méthode efficace pour extraire des composés bioactifs des plantes, phytonutriments, huiles essentielles, stéroïdes, triterpénoïdes et lipides [18-22].

### **II.1.3. Artefacts et composés interférants**

Lors de l'extraction de matières végétales, il est important de minimiser les interférences des composés qui peuvent être co-extraits avec les composés cibles et éviter toute contamination de l'extrait, dégradation des métabolites ou formation d'artefacts en raison des conditions d'extraction ou des impuretés des solvants.

Jones *et al*, 2005 [13] notent qu'au cours de l'extraction des métabolites secondaires des plantes médicinales de nombreux composés interférant qualitativement et quantitativement sont extraits (lipides et pigments). Parmi les pigments, on note les chlorophylles souvent extraites en très grande proportion des feuilles, provoquant une influence négative sur la quantité des composés phytochimiques bioactifs des médicaments à base de plantes. Egalement de nombreux artéfacts peuvent apparaître par diverses réactions chimiques (hydrolyse, oxydation, isomérisation, ...) : exemple du phosgène (composé réactif et toxique, obtenu avec le chloroforme en présence d'air et de lumière) qui réagit avec les alcools (méthanol et éthanol).

## **II.2. TECHNIQUES D'ANALYSE**

Diverses techniques analytiques sélectives et sensibles sont utilisées pour le profilage métabolique des extraits de plantes. Les techniques chromatographiques sont les plus utilisées, telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie liquide (LC), chromatographie en phase gazeuse (GC), l'électrophorèse capillaire (CE), qui sont associés à différentes méthodes de détection : absorption dans l'ultra-violet (UV), fluorescence, diffusion de la lumière (ELSD), d'aérosol chargé (CAD), spectrométrie de masse (MS) et résonance magnétique nucléaire (RMN). Le développement de la spectrométrie de masse et son couplage aux techniques chromatographiques, fait que GC/MS, HPLC/MS et CE/MS sont les techniques couramment utilisées dans le profilage métabolique des plantes médicinales [6-8,23].

Nous présenterons ci-dessous, les principales techniques analytiques utilisées aux cours de notre étude.

### **II.2.1. Méthodes chromatographiques**

La chromatographie est une technique de séparation, d'analyse quantitative et qualitative. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration des composés entraînés entre deux phases non miscibles dont l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans

une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, qui se déplace au contact de la première. L'échantillon doit impérativement être soluble dans la phase mobile (solvant d'élution).

Le temps de rétention associé à un pic chromatographique (figure 5) caractérise qualitativement une substance dans des conditions chromatographiques données. L'aire ou la hauteur des pics chromatographiques permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

Lorsque l'on développe une méthode chromatographique, l'objectif est triple : obtenir des pics chromatographiques les plus fins possibles (grande efficacité), les mieux séparés possibles (bonne résolution), en un temps d'analyse minimum.

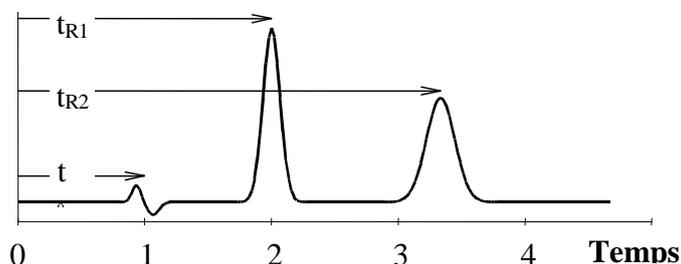


Figure 5 : Chromatogramme

### II.2.1.1. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC), est une technique chromatographique couramment utilisée pour l'analyse des produits à base de plantes et particulièrement pour les composés apolaires. Couplée à la spectrométrie de masse, elle offre une grande capacité de séparation, des informations structurales, et avec les bases de données spectrales existantes une possible identification des composés. En outre, la grande sélectivité des colonnes capillaires permet la séparation de nombreux composés simultanément en très peu de temps. Cependant, elle est peu adaptée pour l'analyse des composés polaires, non volatils et thermolabiles. [5,7,23-26]

En chromatographie en phase gazeuse, l'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. Contrairement à la plupart des autres types de chromatographie, il n'y a pas d'interaction entre les molécules d'analyte et la phase mobile ; la seule fonction de la phase mobile est de transporter l'analyte dans la colonne [27].

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur [26,28].

### II.2.1.1.1. Injecteur

L'injecteur est une zone chauffée où l'échantillon est introduit en solution au moyen d'une seringue puis vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Le gaz vecteur en GC/MS classiquement utilisé est l'hélium. Il constitue la phase "mobile" et aussi un gaz tampon pour l'analyseur. Son rôle consiste à véhiculer les analytes depuis l'injecteur jusqu'au détecteur via la colonne analytique. La viscosité d'un gaz varie avec la température, la plupart des injecteurs sont aujourd'hui équipés d'un régulateur électronique de débit. Ce dernier ajuste la pression du gaz en fonction de la température, de manière à ce que le débit gazeux dans la colonne soit constant, ce qui améliore considérablement les performances du chromatographe. Il existe deux familles d'injecteurs [25,26,28] :

✓ La première regroupe les injecteurs dits "à fuite". Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en "*split*" ou injection avec "division de flux", il est utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. L'injection se fait à haute température et l'échantillon est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. L'injection "*split*" présente néanmoins des problèmes de discrimination, lorsque la solution à analyser contient des composés dont les volatilités sont très hétérogènes (les produits "légers" auront tendance à s'échapper par la fuite alors que les produits "lourds", mal vaporisés, resteront majoritairement dans l'injecteur). Elle est donc peu adaptée pour l'analyse des mélanges complexes.

✓ La seconde famille regroupe les injecteurs "sans fuite" :

- L'injection "*splitless*", ou "sans division de flux", est utilisée pour introduire des analytes en solution diluée. L'électrovanne est fermée pendant les quelques dizaines de secondes qui suivent l'injection, de manière à ce qu'une quantité maximum d'analyte pénètre dans la colonne. Elle est ensuite ouverte pour purger l'injecteur d'éventuels résidus. L'échantillon est injecté à une température telle que solvant et solutés sont instantanément vaporisés à l'entrée de la colonne. Pendant l'injection, la température du four est inférieure de 20 à 30°C à la température d'ébullition du solvant afin de condenser ce dernier en tête de colonne et de piéger les molécules. Dans un premier temps, le solvant joue le rôle de phase stationnaire vis-à-vis des différents constituants du mélange. Sa polarité doit donc être compatible avec celle de la phase stationnaire de manière à ce que le solvant se répartisse de façon homogène en tête de colonne. En raison de son pouvoir de rétention important, cette phase condensée permet de ralentir les molécules volatiles jusqu'à ce qu'elle soit entraînée par le gaz vecteur.

- L'injection "*on column*" (performante en terme de répétabilité et de sensibilité) consiste à introduire directement l'analyte en solution dans la colonne ou dans une précolonne. La solution étant directement injectée dans la précolonne, 100 % de l'échantillon est effectivement introduit. Ce type d'injection permet l'introduction de volumes d'échantillons dix fois supérieurs à ceux injectés en "split" ou en "*splitless*" (jusqu'à 10  $\mu\text{L}$  en "*on column*"). L'injection s'opère le plus souvent "à froid", l'échantillon est introduit à l'état liquide en tête de colonne avant d'être rapidement vaporisé et condensé, car à chaud l'expansion brutale du volume de la solution injectée entraînerait dans la colonne une surpression telle que le gaz refluerait vers l'injecteur. [28]

#### II.2.1.1.2. Colonne et four

Les colonnes les plus utilisées en GC sont des colonnes dites "capillaires". La colonne capillaire (figure 6) [28] est constituée d'un tube de silice fondue dont la paroi interne est recouverte d'un film chimique nommé "phase stationnaire". La paroi externe est gainée d'un revêtement en polyimide qui confère souplesse et robustesse à la colonne. La phase stationnaire est caractérisée par les fonctions chimiques greffées sur la silice (si elles sont constituées de chaînes alcanes ou groupements phényles, la colonne est dite "peu polaire" ; si ce sont des polyéthylènes glycols, la colonne est dite "polaire").

Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité et volatilité si la phase stationnaire est polaire, et seulement de leur volatilité si cette dernière est apolaire.

Pour l'analyse d'un mélange complexe, on privilégie souvent le choix des colonnes peu polaires, généralement plus robustes et thermiquement plus stables que leurs homologues polaires. [26,28]

En plus de la nature de la phase stationnaire, la colonne capillaire est caractérisée par trois paramètres géométriques : sa longueur (10 à 100 m), son diamètre interne (0,1 à 0,5 mm), l'épaisseur de sa phase stationnaire (0,1 à 5  $\mu\text{m}$ ) ; chacun exerce une influence déterminante sur la qualité de la séparation.

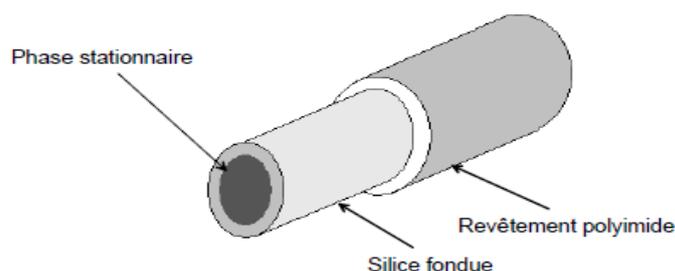


Figure 6. Représentation schématique d'une colonne capillaire [28]

La plupart des applications en GC utilisent des colonnes de 25 à 30 m. L'augmentation du diamètre interne permet de diminuer la rétention des composés (raccourcissement des temps d'analyse), mais se traduit par une diminution de l'efficacité. Les interactions entre les solutés et la colonne augmentent avec l'épaisseur de la phase stationnaire, ce qui améliore la séparation chromatographique mais augmente la durée de l'élution donc de l'analyse. On choisit généralement une épaisseur de film importante lorsque l'on souhaite séparer des composés très volatils. La colonne "de référence" est une colonne peu polaire (greffée à 5 % avec des groupes phényles), longue de 30 mètres, de diamètre interne 0,25 mm et d'épaisseur de phase stationnaire 0,25  $\mu\text{m}$ .

La colonne capillaire est placée dans un four car les interactions entre les composés et la phase stationnaire sont fonction de la température. L'augmentation de la température favorise l'élution des composés et diminue ainsi les temps d'analyse. La plupart des utilisateurs travaillent en "programmation de température", il est très fréquent que des méthodes, dites de "screening" utilisent une programmation de température allant de 40 à 350°C pour permettre la détection de toutes sortes de composés aux propriétés physico-chimiques variées.

L'hélium est le seul gaz vecteur utilisé en GC/MS, car les ions  $\text{He}^+$  résultant de l'EI n'interfèrent pas avec ceux de l'analyte en raison de leur faible rapport  $m/z$  ; l'hydrogène est proscrit en raison de la présence d'un filament chauffé dans la source.

La colonne capillaire sort du chromatographe et entre dans le spectromètre de masse via une "ligne de transfert". Il s'agit d'un cylindre intensément chauffé (environ 300°C) de manière à éviter que les molécules éluées ne se recondensent entre les deux appareils. [28]

### II.2.1.2. Chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une méthode populaire et couramment utilisée pour l'analyse des médicaments traditionnels à base de plantes, car elle est facile à utiliser et n'est pas limitée par la volatilité ou l'instabilité thermique des constituants des échantillons contrairement à la GC. Aussi plusieurs types de phase stationnaire sont utilisés et cette méthode chromatographique peut être associée à de nombreux détecteurs (UV, ELSD, CAD, IR-TF, MS et RMN) offrant ainsi beaucoup de possibilités pour l'analyse de différentes classes de composés chimiques [5-7,23,24].

On distingue en fonction des phases stationnaires deux types de chromatographie liquide haute performance :

- *Chromatographie liquide en phase inverse* (RP-HPLC) : une phase stationnaire considérée comme "apolaire" et une phase mobile polaire. RP-HPLC fonctionne sur le principe d'interactions hydrophobes, qui résultent des forces de répulsion entre un éluant polaire, l'analyte relativement moins polaire, et la phase stationnaire apolaire. La liaison de l'analyte sur la phase stationnaire est proportionnelle à la surface de contact autour du segment non polaire de la molécule lors de l'association avec le ligand dans l'éluant.

- *Chromatographie liquide en phase normale* (NP-HPLC) : une séparation des analytes en fonction de la polarité. Le soluté est transféré depuis la phase mobile apolaire vers la phase stationnaire polaire selon un équilibre réversible. La polarité de l'éluant augmente lors de l'utilisation d'un gradient, et à partir d'un certain seuil de polarité, le soluté établit des interactions avec la phase mobile et est élué.

Un chromatographe en phase liquide (*chaîne HPLC*) est constitué comme le montre la figure 7, de quatre modules principaux : un système de pompage, un injecteur, une colonne et un détecteur.

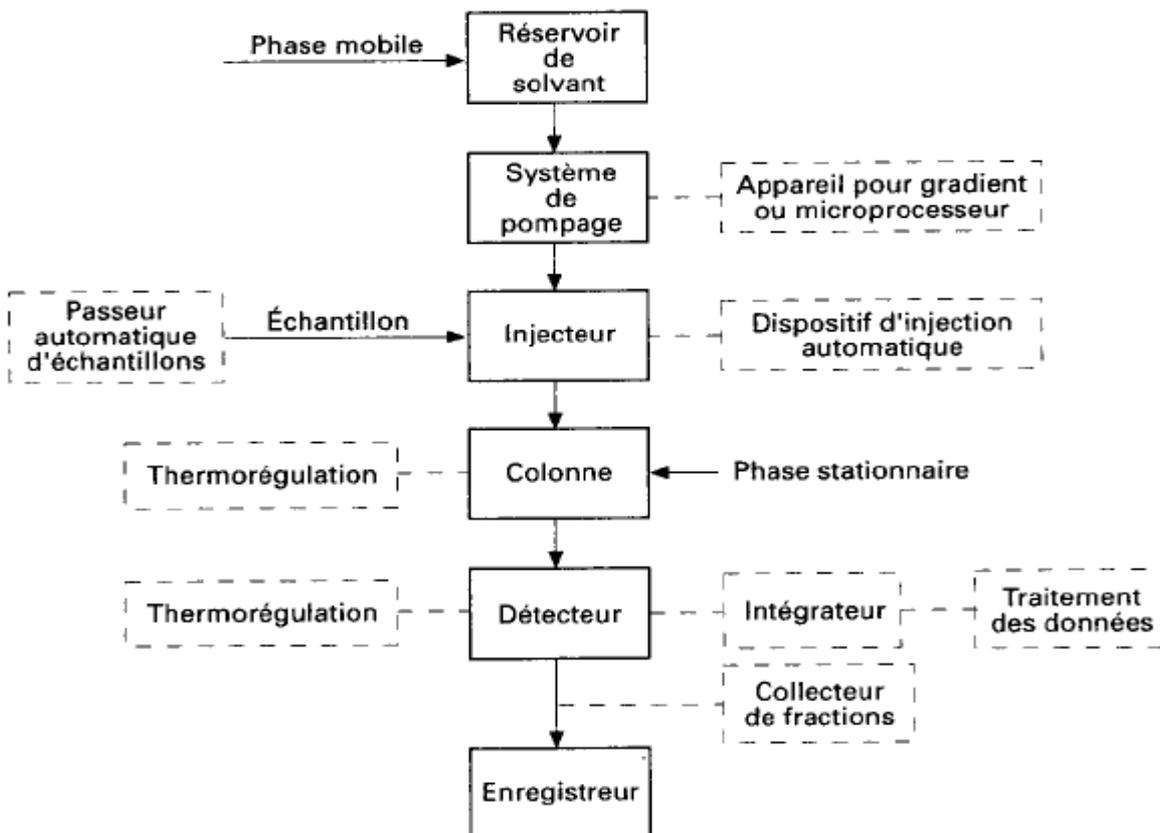


Figure 7 : Schéma d'un chromatographe en phase liquide [29]

II.2.1.2.1. Pompe

Le système de pompage est la partie du chromatographe qui permet de prélever l'éluant, d'en réguler le débit et de maintenir la pression de l'ensemble. Sur une chaîne HPLC classique, le système de pompage est capable de refouler le liquide jusqu'à une pression de 400 bars. En pratique, la pression de travail est généralement comprise entre 100 et 250 bars. La plupart des constructeurs ont équipé leurs systèmes de pompage de pompes à pistons avec un mouvement alternatif. Ce dispositif a été choisi car il présente l'avantage d'avoir un volume de chambre faible, ce qui permet de changer facilement de solvant, et qu'il permet de réguler facilement le débit par simple changement de la fréquence du mouvement. En revanche, ce type de système nécessite de filtrer correctement les solvants d'éluion pour ne pas endommager les pistons, et le pompage s'effectue par à-coups. Ce dernier point a été résolu par l'utilisation de plusieurs pistons en décalage de phase comme le montre la figure 8, et/ou par l'utilisation de systèmes d'amortissement des pulsations.

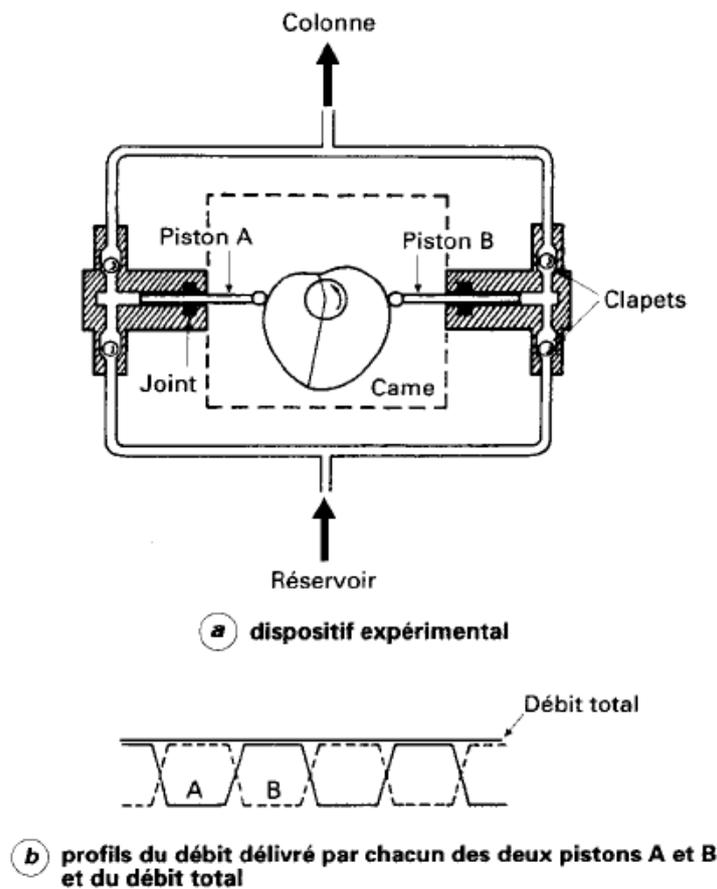


Figure 8 : Pompe à deux têtes montées en opposition de phase avec une came en forme de cardioïde [29]

Un système de pompage peut être utilisé soit en mode isocratique, soit en gradient d'élution :

❖ *Mode isocratique*

Ce mode d'élution, très simple à mettre en œuvre ne nécessite pas de temps de rééquilibrage de la colonne HPLC entre deux analyses. Il consiste à faire débiter par la pompe les mêmes proportions de solvant A et B sur toute la durée de l'analyse, ou éventuellement de n'utiliser qu'un seul réservoir de solvant.

❖ *Gradient d'élution*

Ce mode d'élution est généralement préféré pour les analyses de mélanges complexes car il permet de réduire le temps d'analyse tout en conservant une séparation satisfaisante des analytes.

Un gradient d'élution est une variation des proportions des constituants du mélange éluant. Pour appliquer un gradient d'élution, il faut au minimum deux solvants et une chambre de mélange. La chambre de mélange peut être placée avant le dispositif de pompage, on parle alors de gradient *basse pression* et les proportions des solvants sont contrôlées par l'ouverture/fermeture d'électrovannes. Dans le cas d'un gradient *haute pression* la chambre de mélange est placée après le dispositif de pompage. Le gradient basse pression est aujourd'hui celui qui est le plus utilisé par les constructeurs car il permet de s'affranchir des éventuels effets de contraction de volume ; son coût est par ailleurs inférieur.

#### II.2.1.2.2. Injecteur

La pression en tête de colonne étant de plusieurs dizaines de bars, il n'est pas possible d'utiliser une seringue et de percer au travers d'un septum pour injecter l'échantillon comme cela se fait en chromatographie gazeuse. Il est donc indispensable d'utiliser une boucle d'échantillonnage montée sur une vanne d'injection.

*Principe de fonctionnement d'une vanne d'injection :*

Une vanne d'injection est souvent une vanne six voies. La figure 9 présente deux temps de fonctionnement d'une vanne d'injection à boucle externe.

Dans un premier temps, en position *Load*, la boucle d'échantillonnage est remplie à l'aide d'une seringue jusqu'à ce qu'une partie de l'échantillon déborde vers la poubelle : c'est le remplissage total. Ensuite, la vanne d'injection est basculée en position *Inject* et l'éluant issu de la pompe HPLC circule au travers de la boucle, entraînant avec lui l'échantillon dans la

colonne. Si le volume d'échantillon est insuffisant, il est possible de ne remplir que partiellement la boucle d'échantillonnage à l'aide d'une seringue graduée, mais cette méthode est moins reproductible et donc moins précise dans le cadre d'analyses quantitatives. Il est alors préférable d'adapter la taille de la boucle (de 1 à 100  $\mu\text{L}$  pour de la chromatographie analytique, et au-delà pour de la chromatographie préparative) aux quantités que l'on veut injecter. Cela réduit le volume mort et améliore la résolution chromatographique.

En pratique, dans le cadre d'un couplage LC/MS, l'injecteur est toujours couplé avec un passeur d'échantillons.

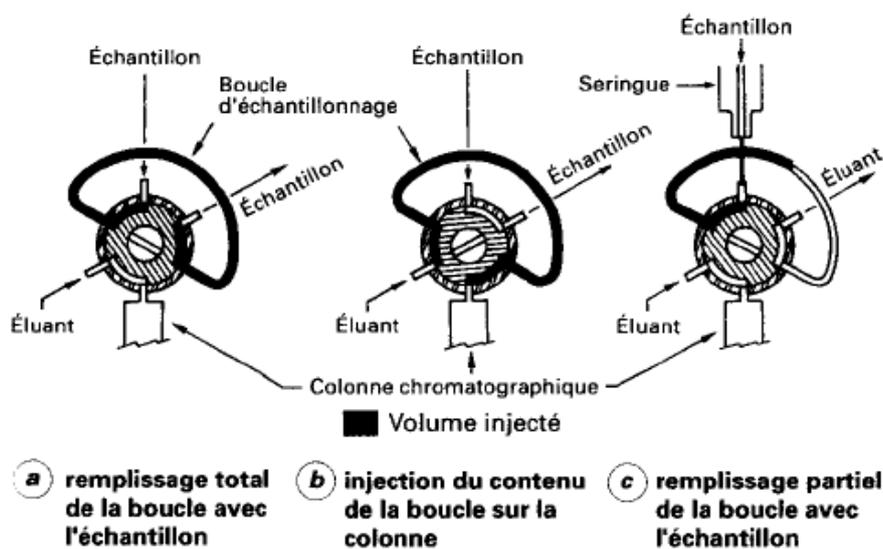


Figure 9 : Vanne d'injection à boucle externe [29]

### II.2.1.2.3. Colonne

La colonne est le cœur du système : c'est en grande partie d'elle que dépend la qualité de la séparation chromatographique. Pour en optimiser les performances, il faut veiller à réduire les volumes morts au niveau des connections, de la boucle d'injection et des raccords. Pour la préserver, la tête de colonne étant généralement la partie qui se dégrade en premier, il est possible de lui adjoindre une colonne de garde ou précolonne ainsi qu'un filtre haute pression.

Une colonne HPLC est caractérisée par sa phase stationnaire, sa longueur, son diamètre et la taille de ses particules. Typiquement, une colonne HPLC a des dimensions comprises entre 5 et 30 cm pour la longueur, 1 et 4,6 mm pour le diamètre et 3 à 5  $\mu\text{m}$  pour la taille des particules. Le débit de solvant est adapté en fonction du diamètre de la colonne : 20 à 100

$\mu\text{l}/\text{min}$  pour une colonne de 1 mm, jusqu'à 0,5 à 2 ml/min pour une colonne de 4,6 mm de diamètre. Le choix de la phase stationnaire est beaucoup plus vaste.

Actuellement, les colonnes HPLC connaissent de nombreuses évolutions. La première concerne la production de colonnes avec des particules de diamètre inférieur à 2  $\mu\text{m}$  utilisée en UHPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography). De telles colonnes sont également disponibles pour une utilisation sur une chaîne HPLC classique. Ces colonnes sont réalisées à base de silice ou de zirconium greffé, la technologie actuelle ne permettant pas de créer des particules inférieures à 3  $\mu\text{m}$  pour les colonnes à base de polymères ou de carbone graphite [30].

#### ❖ *phases stationnaires polaires*

La phase stationnaire polaire la plus utilisée est à base de gel de silice ( $\text{SiO}_2$ ) à laquelle on a fait subir une série de transformations par voie aqueuse. Ce composé résulte de la polymérisation, puis de la calcination de l'acide silicique obtenu par acidification du silicate de sodium ( $\text{NaSiO}_3$ ). L'acide silicique commence par se condenser sur lui-même en un dimère avant de se polycondenser en un gel à surface hydroxylée ; la calcination conduit à des particules de gel de silice. La particularité structurale essentielle pour les applications chromatographiques est la présence, à la surface du gel de silice, de groupements silanols formés au cours de la phase finale de préparation, par ébullition dans l'acide chlorhydrique dilué. Des procédés de préparation élaborés conduisent à l'obtention des particules sphériques qui permettent un remplissage régulier des colonnes.

Plusieurs paramètres interviennent pour définir la qualité d'une silice parmi lesquels la structure interne, la taille des particules, la porosité ouverte, la surface spécifique, la résistance à l'écrasement et la polarité. Son mécanisme d'action repose sur l'adsorption des composés à la surface de la phase stationnaire, avec la formation d'une monocouche de solutés. Mais souvent, il apparaît des forces d'attraction entre les molécules déjà adsorbées et celles qui sont restées en solution. Les groupements silanols permettent à la silice de retenir les composés à analyser par des liaisons hydrogènes (adaptée à la séparation des composés polaires). Mais ce type de phase stationnaire est sensible aux conditions opératoires (choix de solvant, pH, ...)

Actuellement, des nouvelles phases stationnaires à base de polymères organiques ont été développées, parmi elles on retrouve les phases diol, nitrile, nitro, méthylcyano, phénylcyano. Ces types de phases offrent des séparations plus reproductibles avec moins d'élargissement des pics, et enfin, elles atteignent plus rapidement l'équilibre lors de l'utilisation des gradients d'éluion. Cependant, ces phases peuvent encore présenter de groupements silanols non greffés, qui pourrait exercer un effet sur la séparation.

Pour résoudre ce problème, une nouvelle phase a été développée, il s'agit d'une phase silice greffée par un polymère d'alcool polyvinylique (phase PVA-Sil<sup>®</sup>). Cette phase contient une couche de polymère d'alcool polyvinylique qui recouvre complètement la surface de silice en générant une couche uniforme de groupements hydroxyles pour l'interaction avec la phase mobile. Ce recouvrement de la silice par l'alcool polyvinylique protège le support de silice contre des tampons, solvants agressifs au pH élevé et adapté à des solvants de toute polarité (apolaire à polaire).

❖ *phases stationnaires apolaires*

Cette phase stationnaire est dite "inversée" car la phase devient apolaire et lipophile. Pour diminuer la polarité excessive du gel de silice et neutraliser son acidité (pka descend à 3.8 pour certaines silices), on modifie sa surface en mettant à profit la réactivité des fonctions silanols présentes.

- Les phases stationnaires apolaires classiquement utilisées sont de la silice greffée par des fonctions chimiques, le plus souvent des chaînes alkyles à 18 atomes de carbones ou ODS (Octadecyl) (figure 10). Les phases C<sub>8</sub> (Octyl) et C<sub>4</sub> (butyl) sont employées souvent quand la phase C<sub>18</sub> est trop hydrophobe. Ce type de greffage permet la séparation des composés apolaires. Selon le taux de greffage, on obtient une plus ou moins grande rétention. Les fonctions silanols (Si-OH) qui subsistent engendrent des interactions hydrophiles parasites, qui provoquent des élargissements de pics surtout pour les molécules basiques.

Pour éviter cela, la surface de la silice est généralement recouverte par une fonction méthyle et les fonctions silanols ne sont plus libres mais sous la forme Si-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, c'est cette étape que l'on appelle « end-capping ». Les fonctions chimiques utilisées pour le « end-capping » peuvent toutefois être de nature très diverses et les colonnes de dernières générations résistant à des pH extrêmes sont généralement « end-capped ».

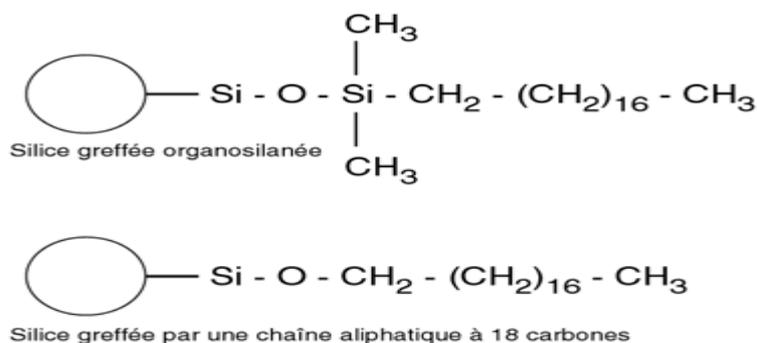


Figure 10 : Silices greffées apolaires

- Un autre type de phase stationnaire apolaire développé est la phase carbone, dont l'utilisation a longtemps été limitée par des problèmes liés à la capacité de rétention, à la fragilité des particules, et surtout à un transfert de masse beaucoup trop lent. Après des modifications de préparation par Knox et Kaur, sous forme de carbone graphite poreux (PGC) ; la phase carbone graphite poreux est actuellement le premier matériau carboné utilisé en HPLC avec des propriétés chromatographiques comparables à celles des silices greffées en terme d'efficacité et de symétrie de pics chromatographiques [31].

L'étude détaillée de la structure du PGC, réalisée par Knox et Kaur, par diffraction des rayons X montre que ce carbone graphite présente une structure bidimensionnelle. Les particules de PGC sont composées de feuillets plans d'atomes de carbone disposés selon un arrangement hexagonal et reliés entre eux par des liaisons  $sp^2$ . Les atomes de carbone sont liés par des liaisons covalentes pour former des feuillets qui sont maintenus entre eux par des interactions de Van der Waals (figure 11). La structure du PGC peut alors être assimilée à de gigantesques molécules aromatiques. Les feuillets sont enchevêtrés les uns dans les autres conférant ainsi au matériau une grande robustesse et une très forte stabilité mécanique.

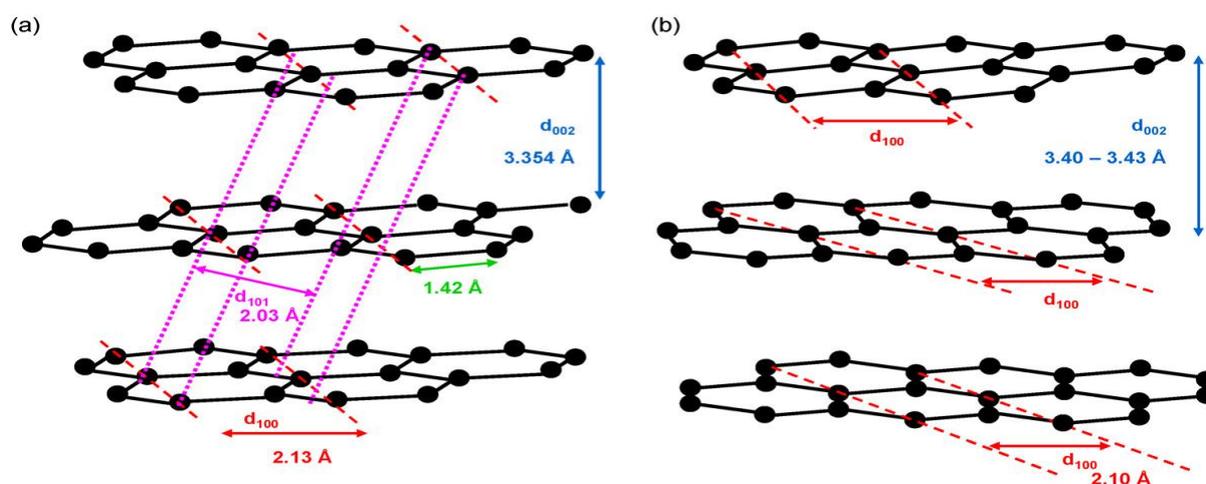


Figure 11 : Carbone graphite tridimensionnel (a) et bidimensionnel (b) d'après [31-33]

Le carbone graphite poreux est une phase stationnaire robuste car elle résiste aux solvants agressifs tels que les solvants type chlorés et n'est pas sensible aux pH extrêmes. Toutes les phases mobiles ayant un pH compris entre 0 et 14 peuvent être utilisées. Elle possède par ailleurs une grande résistance mécanique et thermique (jusqu'à 200°C).

Le type de chromatographie observé sur phase carbone est complexe, faisant intervenir la chromatographie d'adsorption et de partage. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons faibles de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée (liaison dipôle-dipôle, liaison de Van der Waals, liaison de dispersion de London) et également des liaisons fortes.

La rétention d'une molécule va dépendre de sa planéité ou de sa capacité à adopter une conformation plane. Par exemple, les molécules aromatiques vont avoir tendance à se positionner parallèlement à la surface du PGC qui est composé de rubans de graphite planaires. La position des substituants sur les cycles aromatiques va déterminer la proximité avec laquelle les solutés vont interagir avec la phase stationnaire. De même les groupements apolaires vont se positionner, autant que possible, au contact de la surface du graphite. Ainsi la planéité et la rigidité du carbone graphite poreux permettent dans une certaine mesure la reconnaissance de forme [31-33].

Le PGC a été développé pour jouer le rôle d'un support totalement apolaire pour la chromatographie liquide à polarité de phases inversée. Il s'est avéré que cette phase stationnaire offrait des sélectivités particulières. La surface du PGC serait sensible à la densité électronique donc au caractère électro donneur ou accepteur des groupements fonctionnels dans la molécule. Lorsqu'un composé polaire se trouve à proximité de la surface du PGC, il introduit une polarisation de la surface pouvant être schématisée (figure 12) [33,34].

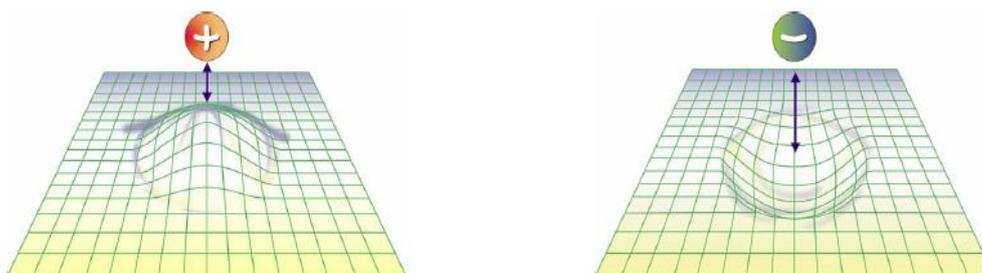


Figure12 : Polarisation à la surface du PGC à l'approche d'une charge d'après [33,34].

- Il est important de préciser que les forces éluantes des solvants entre les silices greffées octadécyles et le PGC sont nettement différentes. En effet, le méthanol et l'acétonitrile sur  $C_{18}$  sont connus pour être considérés comme des solvants forts, avec une force éluante un peu plus importante pour le méthanol. L'utilisation du carbone graphite poreux, qui est plus apolaire que les phases stationnaires  $C_{18}$ , va engendrer deux conséquences : la première étant que l'ordre des forces éluantes des solvants sur PGC est globalement le même que celui sur les silices greffées octadécyles. Cependant, le PGC étant considéré comme plus apolaire que les  $C_{18}$ , les solvants considérés comme solvants forts sur silice greffée octadécyle deviennent des solvants faibles sur PGC. Un réel décalage des forces éluantes des solvants organiques est donc observé lors du passage des phases stationnaires  $C_{18}$  au carbone graphite poreux. Ainsi sur PGC, acétonitrile, méthanol deviennent des solvants très faibles et chloroforme, dichlorométhane, heptane des solvants forts [35]. Ceci permettant de faire une séparation chromatographique en phase inversée en milieux non aqueux.

### II.2.1.3. Détecteurs

L'absence de groupements chromophores dans de nombreux composés phytochimiques apolaires (lipophiles) et l'utilisation de solvants organiques apolaires absorbant dans l'UV, font que les détecteurs évaporatif à diffusion de la lumière (ELSD), d'aérosol chargé (CAD) ou le spectromètre de masse sont les détecteurs les plus adaptés pour l'analyse des métabolites phytochimiques apolaires en mélange complexe [36,37].

Nous présenterons ci-dessous les détecteurs utilisés au cours de notre étude.

#### II.2.1.3.1. Détecteur d'aérosol chargé

Une nouvelle méthode de détection a été proposée par Dixon et Peterson [37]. Ce détecteur, appelé Corona® CAD, est basé sur la détection d'un aérosol chargé. L'une des particularités de ce détecteur est son universalité pour tous les composés non volatils qui lui donne un véritable potentiel analytique.

##### ❖ *Principe de fonctionnement du CAD*

Le principe de fonctionnement se compose de quatre étapes. La figure 13 permet de visualiser les différentes phases de fonctionnement du Corona® CAD et leur localisation au sein de l'appareil :

##### 1) Nébulation de l'effluent de la colonne

Les analytes contenus dans la phase mobile sont introduits dans la chambre de nébulisation. L'éluant est alors nébulisé, par un nébuliseur pneumatique, à l'aide d'un gaz inerte comme l'azote. Seules les fines gouttelettes sont acheminées jusqu'au tube d'évaporation. Les grosses gouttelettes sont évacuées par un drain et recueillies dans un réservoir.

##### 2) Evaporation de la phase mobile

Le nébulisât traverse le tube d'évaporation. Au cours de ce parcours, les gouttelettes de solvants sont évaporées et leurs tailles diminuent progressivement jusqu'à obtenir un diamètre  $d_p$  qui dépend du diamètre  $D_o$  des gouttelettes de l'aérosol primaire. Les particules d'analytes sont ensuite acheminées dans une chambre d'ionisation contenant  $N_2^*$ .

$$d_p = D_o (c / \rho_s)^{1/3} \quad \text{Equation (1)}$$

$c$  : concentration du soluté

$\rho_s$  : densité du soluté

$D_o$  : diamètre des gouttelettes présents dans l'aérosol primaire.

3) Ionisation des particules par l'intermédiaire d'un gaz inerte ionisé par décharge corona  
 La phase vapeur est mise en présence de  $N_2$  ionisé par décharge corona grâce à une aiguille portée à un potentiel élevé (+2500V). Les molécules de  $N_2$  sont alors chargées positivement et vont effectuer par la suite des collisions avec les particules de soluté. Des réactions de transfert de charges vont se produire entre ces 2 entités. Le nombre de collisions varie en fonction de la pression en  $N_2$ , plus cette dernière sera élevée, plus on augmentera le nombre de collisions.

#### 4) Détection des particules chargées

Les particules chargées sont dirigées vers un collecteur en passant à travers une trappe d'ions dont le rôle est d'éliminer les particules à haute mobilité et de diamètre inférieur à 10 nm grâce à la présence d'une cathode. La charge des particules à faible mobilité est mesurée par un électromètre à haute sensibilité. Ce dernier génère un signal proportionnel à la quantité de charges.

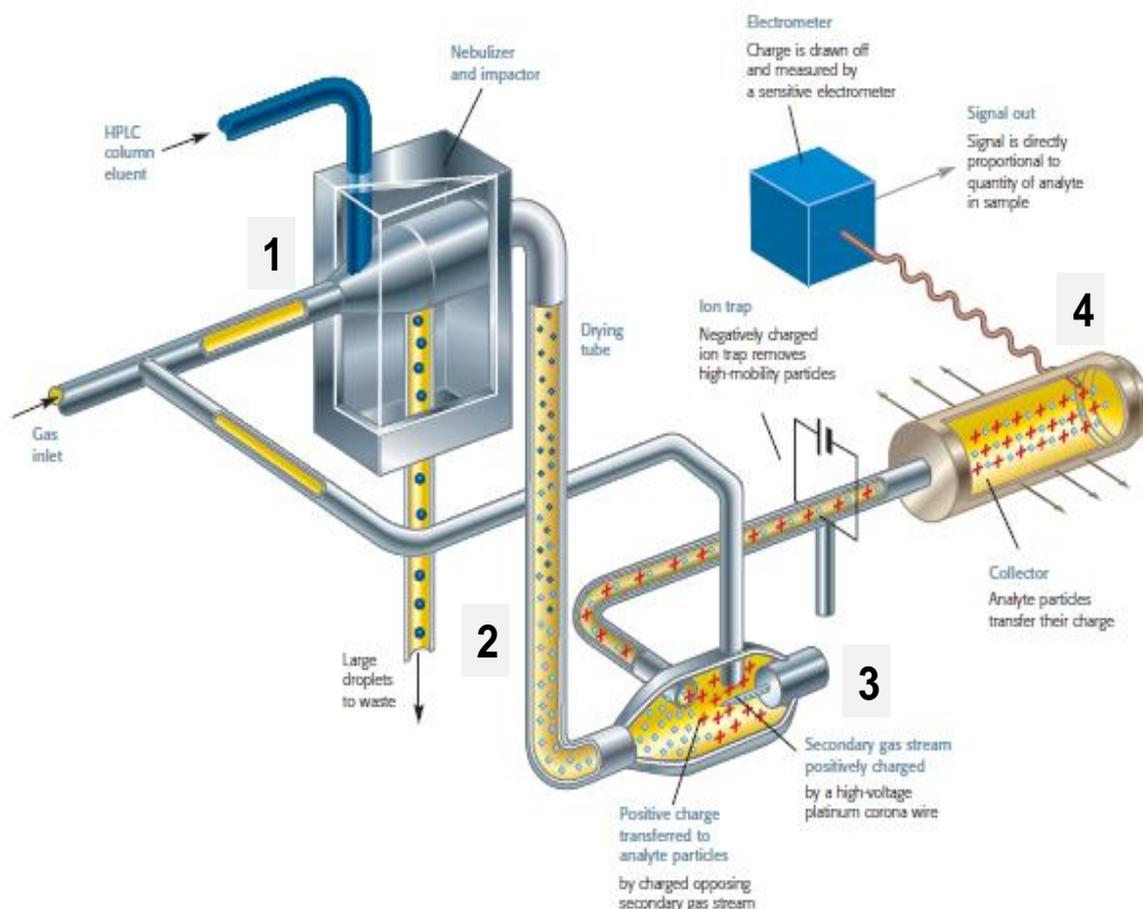


Figure 13 : Détecteur Corona® CAD, schéma de fonctionnement d'après [38]

### ❖ Type de réponse du CAD

Le CAD est un détecteur qui est sensible à la concentration. D'après l'équation 1, on remarque que si la concentration du soluté augmente, le diamètre des particules augmente aussi. Par ailleurs, une sélection des particules en fonction de leur diamètre au sein du détecteur se produit. Toutes les particules qui présentent un diamètre supérieur à 100nm vont être détectées. La sensibilité de l'appareil en fonction de la taille des particules est donnée par les équations (2) et (3) [39]:

$$d_p < 100 \text{ nm} \quad S = 2,3 \times 10^{-16} d_p^{6,6} \quad \text{Equation (2)}$$

$$d_p > 100 \text{ nm} \quad S = 1,61 \times 10^{-10} d_p^{1,11} \quad \text{Equation (3)}$$

$S$  : sensibilité exprimée en fA.m<sup>3</sup>.particule<sup>-1</sup>

$d_p$  : diamètre des particules

L'intensité de la réponse du CAD est donc influencée par le diamètre et le nombre de particules. Concernant la forme de réponse du CAD, la première étude réalisée sur le détecteur a été publiée en 2005 par Gamache et *al.* [40]. La forme de réponse générale de ce nouveau détecteur est la suivante (équation 4):

$$y = ax^b \quad \text{Equation (4)}$$

$y$  : aire (ou la hauteur)

$x$  : quantité injectée

$b$  : sensibilité du détecteur.

Les valeurs de  $b$  sont inférieures ou égales à 1. La forme de réponse du détecteur est linéaire pour des valeurs de  $b$  très proches de 1.

### ❖ Caractéristiques du CAD

#### - Composés détectables

Une des particularités dans le fonctionnement du CAD est sa capacité à pouvoir détecter une molécule quelle que soit sa structure. Normalement, la détection est indépendante de la structure du composé à analyser [40,41].

L'étude réalisée par Gamache et *al.* [40] a démontré la capacité de ce nouveau détecteur à détecter divers composés chimiques de natures très différentes telles que des protéines, des acides aminés, des lipides et des glucides.

En revanche, aucune détection n'a été possible pour le naphthol qui est un composé fortement volatil. En effet ce dernier est évaporé lors de son passage dans le tube d'évaporation. Pour des composés semi-volatils une faible détection peut être observée [40].

#### - Gamme de solvants exploitables

Le CAD est également un détecteur qui peut être utilisé avec une très large gamme de solvants et de modificateurs organiques tels que l'acétone, le dichlorométhane, l'hexane, ainsi que la triéthylamine et l'acide trifluoroacétique [40].

Bien que le CAD soit basé sur la détection d'un aérosol chargé il présente des limites à l'étape de nébulisation. L'une des limitations est la nature et la composition de la phase mobile qui va influencer la réponse du détecteur. Pour des phases mobiles hydro organiques, la réponse sera plus importante pour les compositions à forte proportion de solvant organique. En effet ce dernier est plus facilement nébulisé qu'une phase aqueuse augmentant ainsi l'efficacité de la nébulisation [42] par un plus grand nombre de particules générées.

Ce problème est observé également en gradient d'élution, où la partie du gradient qui est plus riche en proportion de solvant organique est la partie où les intensités de réponse sont les plus importantes.

Górecki et al. [43] propose une approche empirique et universelle pour solutionner ce problème lors de l'utilisation de gradient. Le principe est de pouvoir fournir au détecteur, à tout moment, une composition constante de la phase mobile. Le gradient d'élution est compensé, en sortie de colonne, par un gradient inversé délivré par une seconde pompe.

L'homogénéisation de la composition de la phase mobile permet un facteur de réponse constant au cours de l'analyse.

#### - Répétabilité du CAD

La première étude réalisée sur les performances et caractéristiques du CAD a démontré, pour les divers composés étudiés et leurs conditions expérimentales, des taux de répétabilité très satisfaisants. Pour des faibles quantités injectées (de l'ordre de 10ng), les coefficients de variation ne dépassent pas les 3%. Pour des quantités beaucoup plus importantes (de l'ordre de 25µg), une variation de moins de 2% est observée pour la majorité des composés testés et cela quelle que soit leur nature [40].

#### - Limites de détection du CAD

Les limites de détection que peut atteindre le CAD sont significativement basses. En effet, elles sont de l'ordre du nanogramme [40]. Selon une étude réalisée par Inagaki et al. [44], le détecteur pourrait atteindre des limites de détection plus faibles que celles atteintes avec un spectrophotomètre UV. Cette meilleure détectabilité permet ainsi à ce détecteur d'être préconisé dans la détermination de ratios énantiomériques pour des composés non volatils dans le secteur pharmaceutique [45].

### II.2.1.3.1. Spectromètre de masse

Un spectromètre de masse est un appareil qui permet de caractériser des composés par la mesure des rapports masse sur charge ( $m/z$ ) de molécules ionisées et de leurs produits de fragmentation. La spectrométrie de masse peut apporter des informations relatives à la masse moléculaire d'un composé et des informations structurales. Elle peut également permettre une mesure de la quantité.

Tous les spectromètres de masse possèdent trois éléments en commun : une source, un analyseur et un détecteur (figures 14 et 15) [46,47]. Les molécules sont introduites dans la source où sont formés les ions. Ces derniers sont guidés vers l'analyseur où ils sont séparés, puis vers le détecteur. Les spectres sont enregistrés à l'aide d'un logiciel qui permet également d'assurer le pilotage du spectromètre.

#### ❖ *Spectromètres de masse utilisés*

##### - Spectromètre ITQ 900<sup>TM</sup> GC/MS Ion Trap System ThermoFisher

Le spectromètre de masse ITQ 900<sup>TM</sup> (figure 14) est constitué d'une source d'ionisation externe avec des chambres d'ionisation (volume d'ion) amovible pour l'ionisation électronique (EI) ou chimique (CI). Une vanne d'entrée sous vide permet d'installer et de retirer les chambres d'ionisation sans mettre l'enceinte à la pression atmosphérique. Les ions produits dans la chambre d'ionisation sont ensuite transférés par un système de 3 lentilles (constituées par des plaques et des cylindres en acier inox portés à différents potentiels) dans l'analyseur de masse.

L'analyseur de masse trappe ionique (piège à ions quadripolaire) comporte trois électrodes en acier inoxydable qui forment une cavité dans laquelle les ions sont stockés et dont la masse est analysée. Les électrodes latérales d'entrée et de sortie possèdent toutes deux en leur centre un orifice qui permet aux ions respectivement d'entrer et sortir de la cavité de l'analyseur de masse. L'électrode annulaire est située entre les deux électrodes latérales. Les ions produits dans la source EI/CI parviennent dans la cavité de l'analyseur de masse par l'orifice de l'électrode d'entrée. Le gaz tampon (hélium) pénètre dans l'analyseur au niveau d'un raccord placé également sur l'électrode latérale d'entrée. Les ions produits peuvent être éjectés par chacune des deux électrodes latérales.

Une tension continue de décalage (dc offset) est appliquée sur les électrodes de l'analyseur de masse pour créer un champ qui extrait les ions hors de la source. La valeur type de cette tension est de -10 V en mode ions positifs et de +10 V en mode ions négatifs. Différentes

tensions alternatives sont appliquées sur les électrodes latérales et l'électrode centrale, elles permettent de piéger et d'éjecter les ions en fonction du rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Les ions qui sont éjectés par l'électrode latérale de sortie sont focalisés par la lentille de sortie vers le système de détection des ions (dynode de conversion et multiplicateur d'électron).

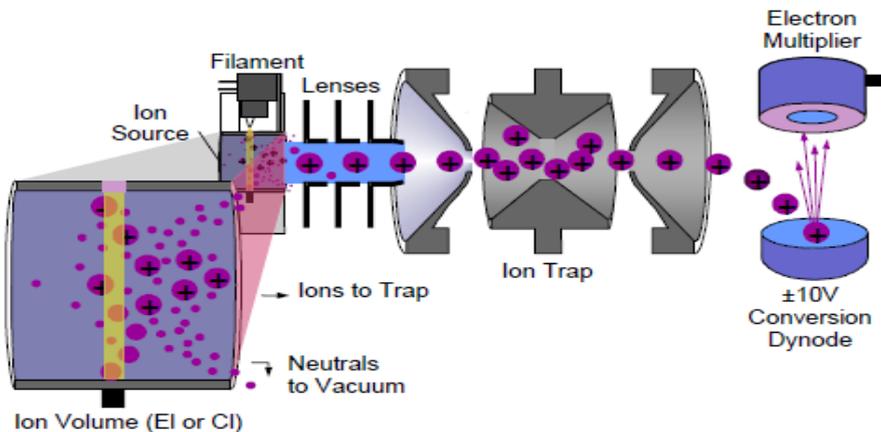


Figure 14 : Schéma d'un spectromètre de masse ITQ 900<sup>TM</sup> GC/MC ThermoFischerScientific [46]

Source d'ionisation externe (EI et CI), Analyseur trappe ionique et Détecteur à dynode de conversion

- Spectromètre API 3000<sup>TM</sup> LC/MS/MS System Applied Biosystem/SCIEX

Le spectromètre de masse API 3000<sup>TM</sup> LC/MS/MS System (figure 15) est un spectromètre de masse triple quadripôle de chromatographie liquide à source d'ionisation à pression atmosphérique. Il est équipé de deux sources d'ionisation à pression atmosphérique amovibles : source d'ionisation par electrospray (TurboIonSpray, ionisation de l'échantillon avec un gaz chauffé pour favoriser la désolvatation et nébulisation) et source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI Heated Nebulizer). L'analyseur est un triple quadripôle constitué de deux quadripôles filtres de masse identiques (Q1 et Q3), séparées par une cellule de collision avec un quadripôle (Q2). Le système de détection est constitué d'un canal multiplicateur d'électron.

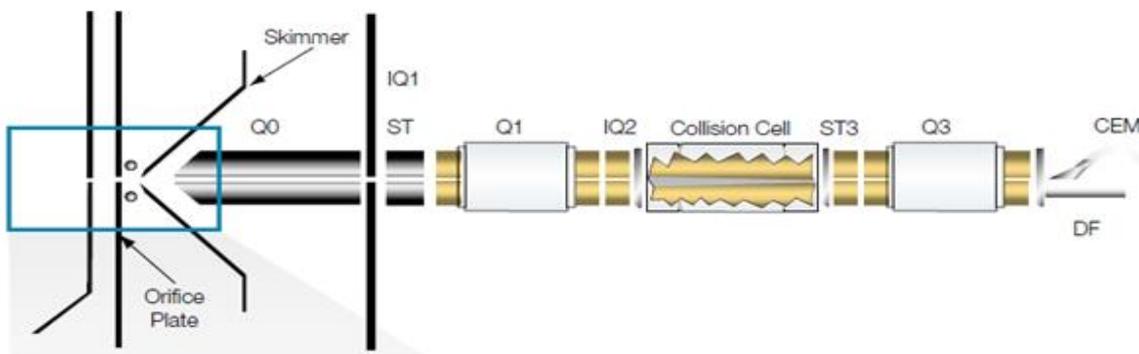


Figure 15 : Schéma d'un spectromètre de masse API 3000<sup>TM</sup> LC/MS/MS System - AB/SCIEX [47]

Source d'ionisation (APCI et ESI), Analyseur triple quadripôle et Détecteur à canal multiplicateur d'électron

❖ *Source d'ionisation*

La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. La nature de la source utilisée dépend des caractéristiques physico-chimiques de la molécule à analyser. On peut ainsi utiliser une source d'ionisation-désorption lorsque l'analyte est un solide, une source d'ionisation-désolvatation lorsqu'il s'agit d'un liquide (source à pression atmosphérique), ou une source d'ionisation électronique ou chimique dans le cas d'un couplage avec un chromatographe en phase gazeuse.[28]

Les sources d'ions peuvent se classer en sources d'ionisation *dure* ou d'ionisation *douce* (tableau 2). Les ionisations *dures* engendrent souvent des ions moléculaires à nombre impair d'électrons qui se fragmentent beaucoup, parfois même totalement, avant leur sortie de la source. Leurs fragments peuvent être analysés et donnent des informations structurales.

Les ionisations *douces* engendrent des ions moléculaires à nombre pair d'électrons qui sont relativement stables, avec des durées de vie suffisantes pour traverser l'analyseur et parvenir au détecteur. Ce type d'ionisation produit peu ou pas de fragments.

La nature de la source d'ionisation utilisée dépend des caractéristiques physico-chimiques des molécules étudiées. La figure 16 présente les sources à pression atmosphérique utilisables et leur domaine d'application.

Tableau 2 : Méthodes d'ionisation en spectrométrie de masse

Ionisation	Méthodes d'ionisation
« très dure »	Plasma induit couplé (Induced Coupled Plasma: ICP-MS)
«dure »	Impact électronique (EI)
« assez douce »	Ionisation chimique (CI) Ionisation de champ (FI) Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) Photolonisation à pression atmosphérique (APPI) Désorption de champ (FD) Spectrométrie de masse d'ion secondaire (SIMS) Bombardement d'atomes rapides (FAB) Ionisation chimique directe (DCI) Désorption thermique (TD) Ionisation par thermospray (TSI)
« douce »	Désorption / ionisation laser (MALDI) Ionisation electrospray (ESI)

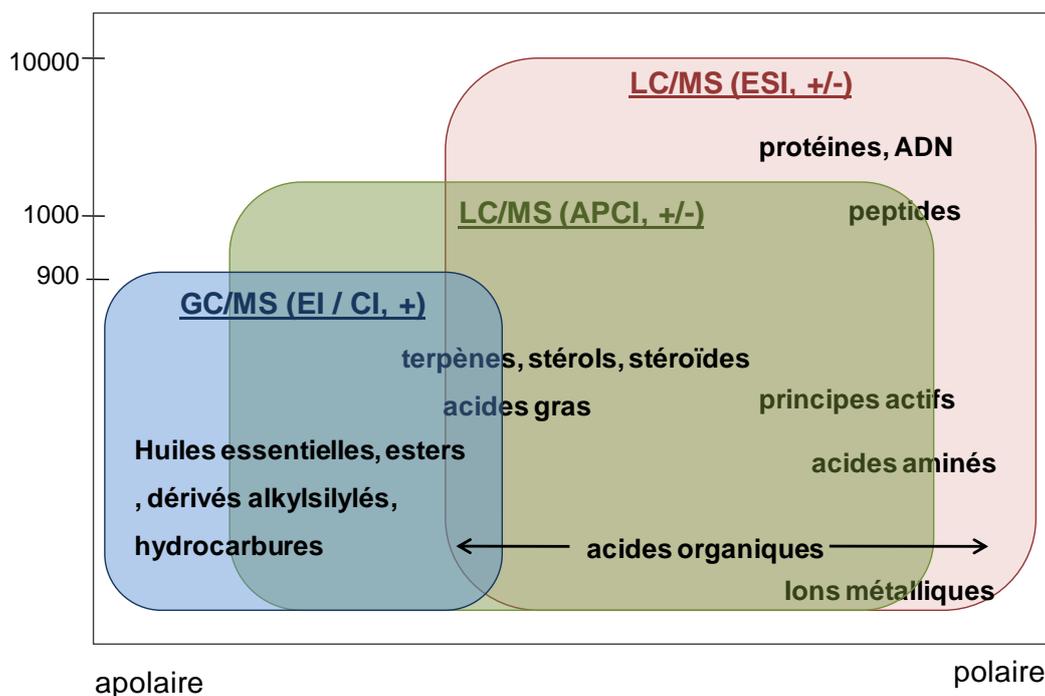
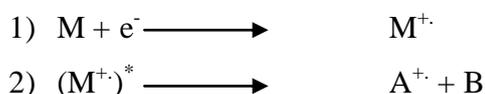


Figure 16 : Domaine d'utilisation des principales sources d'ionisation [23]

- Sources sous vide

#### . Ionisation électronique

L'ionisation électronique (EI) [28] consiste à "bombarder" les molécules par un faisceau d'électrons de haute énergie. La source EI est maintenue à une température importante entre 100 à 250 °C afin d'éviter la condensation des analytes. L'"impact" d'un électron sur la molécule M a pour effet d'arracher un électron à cette dernière, conduisant ainsi à la formation d'un ion radicalaire  $M^+$ . L'énergie des électrons incidents est telle que l'ion  $M^+$  acquiert une grande quantité d'énergie interne qui l'amène généralement à se fragmenter spontanément en ions plus petits baptisés "ions-fils" ou "ions-fragments".



Les électrons sont produits par le chauffage d'un filament métallique (tungstène ou rhénium, le plus souvent) et accélérés par une différence de potentiel de 70 V, ce qui leur confère une énergie cinétique de 70 eV. Le fait de disposer d'un standard mondial pour l'énergie des électrons ionisants permet de comparer des spectres de masse réalisés sur différents appareils et d'avoir recours à des bases de données (comprenant plusieurs dizaines de milliers de spectres) dispensant d'interpréter les spectres obtenus pour identifier les analytes. Les algorithmes de recherche extraient des bases de données les composés dont les spectres de masse ressemblent le plus au spectre étudié et il est parfois difficile de trancher entre les

solutions proposées. Les bases de données ne sont évidemment efficaces que si les spectres des composés étudiés y sont répertoriés. Dans le cas contraire, l'analyste doit tenter "d'interpréter" le spectre de masse, ce qui est souvent difficile. L'universalité de l'ionisation électronique (la quasi-totalité des molécules sont "ionisables"), justifie l'immense succès de cette technique.

#### *. Ionisation chimique*

L'ionisation chimique (CI) [28] est plus sélective et toutes les molécules éluées ne sont pas ionisées, ce qui peut constituer un avantage avec des échantillons particulièrement complexes. Comparée à l'EI, la CI est un mode d'ionisation "doux" : les ions  $MH^+$  obtenus en CI ont beaucoup moins d'énergie interne que les ions  $M^+$  produits par EI et se fragmentent donc beaucoup moins que ces derniers. Le spectre d'CI informe presque toujours sur le poids moléculaire de l'analyte alors que celui d'EI fournit plus d'informations structurales mais pas de certitude sur le poids moléculaire.

En ionisation chimique positive, l'analyte n'est pas directement ionisé par les électrons. C'est un gaz R, dit "gaz réactant" qui introduit dans la source, subit l'ionisation électronique. Ce gaz est à une pression telle que les ions  $R^+$  formés réagissent immédiatement avec les molécules R non ionisées pour former des ions  $RH^+$  à nombre pair d'électrons. Ce sont ces derniers qui, dans un deuxième temps, vont réagir avec l'analyte M en lui transférant un proton pour former des ions  $MH^+$ . Le transfert n'est évidemment possible que si l'affinité protonique de l'analyte se trouve supérieure à celle du gaz réactant.

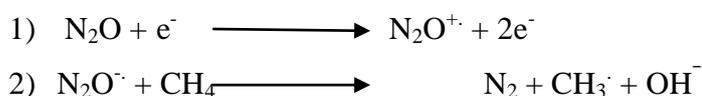


Le gaz utilisé est, classiquement du méthane, de l'isobutane ou de l'ammoniac, certains appareils permettent d'utiliser des liquides tels que le méthanol ou l'acétonitrile (on introduit dans la source la vapeur pompée en surface du liquide). Le choix du gaz réactant obéit à des critères chimiques précis. Plus l'affinité protonique du gaz est élevée, plus le transfert de proton vers les analytes est difficile et, par conséquent, moins l'énergie interne des ions  $MH^+$  est élevée et moins ces derniers se fragmentent. En d'autres termes, on choisit un réactant à forte affinité protonique ( $NH_3$ ) si l'on ne souhaite pas fragmenter l'ion  $MH^+$  ; on a recours, au contraire, à un réactant de faible affinité protonique ( $CH_4$ ) si l'on veut dissocier cet ion pour obtenir un spectre de masse plus riche en informations structurales. Les affinités protoniques (en kJ/mol) des principaux réactants utilisés sont les suivantes : méthane : 550,1 ; méthanol :

760,3 ; acétonitrile : 787,5 ; isobutane : 818,9 et ammoniac : 852,7. La formation d'ions  $MH^+$  est souvent en compétition avec celles d'adduits. Ces adduits sont d'autant mieux observés que l'analyte est polaire et peu basique. Des adduits tels que  $[M+CH_3]^+$  avec le méthane ou  $[M+C_4H_9]^+$  et  $[M+C_3H_3]^+$  avec l'isobutane sont fréquemment observés, ils sont généralement moins abondants que les ions  $MH^+$ . L'ammoniac fournit, lui, un adduit  $[M+NH_4]^+$  souvent très abondant, parfois même plus abondant que  $MH^+$ .

L'ionisation chimique négative est un peu plus complexe à mettre en œuvre. L'obtention d'ions négatifs est liée à deux processus distincts : interaction électrons-molécules et interaction ions-molécules. L'ionisation chimique a lieu, dans le premier cas, par capture électronique et dans le second cas, par des ions réactants. Dans ce dernier processus, le gaz réactant, placé dans la source à une pression de l'ordre de 1 Torr, est ionisé par des électrons d'énergie de 70 eV. Les ions ainsi générés réagissent avec les substances à analyser et produisent des ions négatifs.

Parmi les gaz réactifs, nous pouvons citer, notamment, les ions hydroxydes  $OH^-$ , qui sont formés à partir d'un mélange gazeux constitué à 75% de méthane et à 25% de protoxyde d'azote  $N_2O$  selon les réactions suivantes :



Ce plasma présente un intérêt particulier par la présence simultanée d'électrons, et d'ions  $OH^-$  réagissant avec les substances acides selon le schéma habituel des réactions acide-base.

#### - Source à Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) est également considérée comme une source d'ionisation assez douce, bien qu'elle ne le soit pas autant que l'ESI. L'APCI permet d'ioniser des analytes apolaires ou de faible polarité présentant une certaine volatilité avec une masse moléculaire relativement faible (jusqu'à 2000 u) [48].

Il est possible d'utiliser la source APCI en mode positif ou négatif. Pour la plupart des molécules, les meilleurs résultats sont obtenus en ionisation positive. Cependant, dans le cas des acides carboxyliques et des alcools avec un proton acide, l'ionisation négative engendre un courant ionique plus élevé, ce qui est très avantageux dans la mesure où le bruit chimique est généralement moindre qu'en mode positif.

- Le principe d'ionisation source APCI :

En APCI (figure 17), les gouttelettes sont formées à la sortie du nez de la sonde, sous la pression du gaz gaine et du gaz auxiliaire. Elles traversent ensuite le tube de vaporisation en céramique qui est chauffé entre 350 et 550 °C (environ 150 °C au dessus de la température de formation des ions). Le solvant et les analytes passent en phase vapeur et forment un *plasma* à proximité d'une aiguille sur laquelle une haute tension est appliquée, provoquant ainsi une décharge corona. Une décharge corona est une décharge électrique entraînée par l'ionisation du milieu entourant un conducteur lorsque la formation d'un arc n'est pas possible [49,50]. Cette décharge permet d'obtenir un réactif d'ionisation chimique en phase gazeuse à partir des molécules de solvant. Le mécanisme de formation des ions en APCI résulte d'une série de réactions chimiques débutant par la formation d'un cation : c'est la réaction primaire. Des réactions secondaires ont également lieu [51].

- 1)  $N_2 + \bar{e} \rightarrow N_2^{+\bullet} + 2\bar{e}$
- 2)  $N_2^{+\bullet} + H_2O \rightarrow N_2 + H_2O^{+\bullet}$
- 3)  $H_2O^{+\bullet} + H_2O \rightarrow H_3O^+ + \cdot OH$

Les ions  $H_3O^+$  et les radicaux libres  $\cdot OH$  sont présents dans la région où se produit la décharge corona, ils peuvent protoner ou déprotoner les analytes lors de la traversée du plasma.

- 4)  $H_3O^+ + M \rightarrow [M+H]^+ + H_2O$
- 5)  $\cdot OH + M \rightarrow [M-H]^- + H_2O^{+\bullet}$

Le choix de la polarité des ions analysés est réalisé au niveau de l'optique du spectromètre de masse, en fonction de la polarité du potentiel d'extraction appliqué.

Les ions formés sont ensuite dirigés par un potentiel électrique vers l'entrée de l'analyseur *via* l'interface.

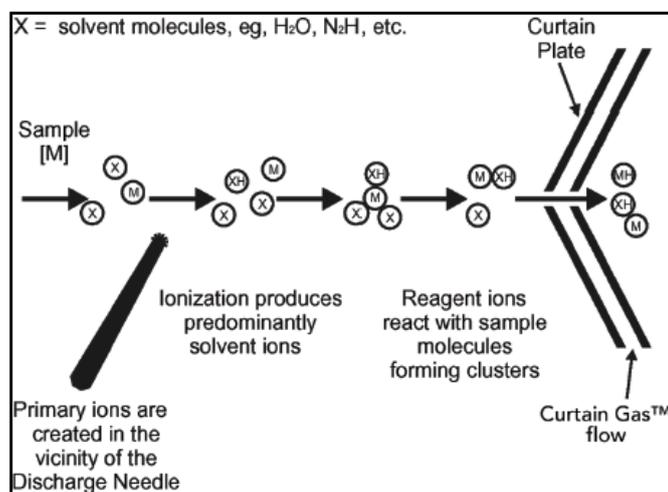


Figure 17 : Schéma d'ionisation chimique à pression atmosphérique [52]

- Avantages et inconvénients de la source *APCI*

La source *APCI* offre les avantages énumérés ci-dessous :

- très bonne désolvatation des analytes introduits en solution, ce qui favorise le couplage avec la chromatographie liquide
- bonne ionisation pour les composés peu polaires : complémentaire de l'ESI
- ionisation douce, ce qui permet d'observer des molécules intactes

La source *APCI* ne permet d'étudier les analytes que dans une gamme de masse restreinte à 2000 u, elle est peu adaptée à l'étude des composés thermosensibles et l'ionisation étant très sélective, toutes les molécules ne sont pas ionisées avec un rendement suffisant.

#### ❖ *Analyseur*

L'analyseur est la partie du spectromètre de masse où sont séparés les ions produits par la source en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ).

Les analyseurs sont caractérisés par quatre paramètres : la résolution, la vitesse de balayage, la gamme de rapports masse/charge balayée et la transmission (tableau 3).

La résolution (figure 18) traduit la précision sur la mesure des rapports  $m/z$  des ions. Si la gamme de rapports masse/charge balayée par un analyseur quadripolaire peut atteindre 8000  $m/z$ , elle est généralement limitée à 1000  $m/z$  en couplage GC-MS où l'on analyse des composés volatils donc de poids moléculaires faibles ou moyens. La transmission caractérise la capacité de l'analyseur à conserver les ions entre leur formation et leur détection. Elle est difficile à évaluer car on ne connaît pas précisément la quantité d'ions formés en source.

Il existe deux principales catégories d'analyseurs; la première regroupe les quadripôles et la seconde est constituée des trappes ioniques (encore appelées "pièges à ions").

Tableau 3 : Résolution et gammes de rapports  $m/z$  analysables des principaux analyseurs.

Analyseur	Résolution	Gamme $m/z$
Q (Quadripôle)	2 000	8 000
EB (Magnétique)	60 000	20 000
TOF (Temps de vol)	20 000	500 000
IT (Piège à ions)	5 000	6 000
Orbitrap	100 000	4 000
FT-ICR (Résonance cyclotronique)	1 000 000	4 000

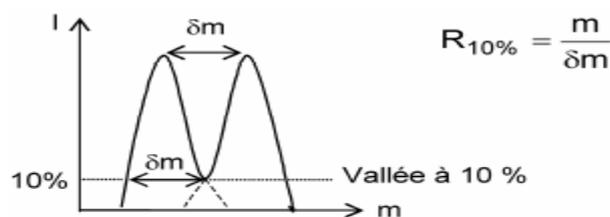


Figure 18 : Résolution à 10 % de vallée

### - *Trappe ionique*

Il existe deux types de trappes ioniques : lorsque les ions sont produits dans une source analogue à celle d'un quadripôle avant d'être introduits dans la trappe, on parle de "trappe ionique à source externe" ; lorsque les ions sont directement produits au cœur de la trappe (la colonne chromatographique "arrive" dans la trappe), cette dernière joue tour à tour le rôle de source et d'analyseur ; on parle alors de "trappe ionique à ionisation interne".

Une trappe ionique est constituée de trois électrodes métalliques : une électrode annulaire et deux électrodes dites "chapeaux". Des "séparateurs" ou "spacers" en forme d'anneau jouent le rôle d'isolants électriques entre ces électrodes (figure 14).

Les deux électrodes chapeaux sont percées en leur centre, l'une pour permettre l'introduction séquentielle d'électrons ou d'ions (selon que l'ionisation est interne ou non), l'autre pour permettre l'éjection des ions vers le détecteur. Précisons que, quelque soit le lieu de l'ionisation, les trappes ioniques permettent, comme les quadripôles, de travailler en ionisation électronique ou chimique. Contrairement au quadripôle, la trappe ionique possède la capacité de stocker les ions : l'application d'une radiofréquence de type  $V \cos \omega t$  sur l'électrode annulaire produit un champ quadripolaire au sein duquel chaque ion acquiert un mouvement oscillant dont l'amplitude et la fréquence dépendent du rapport  $m/z$  de l'ion et de la valeur de  $V$ . Le champ quadripolaire n'est homogène qu'au centre de la trappe ionique.

Il faut éviter que les ions ne s'approchent des électrodes sinon leurs trajectoires deviennent instables et ils ne sont plus piégés. Pour cela, on introduit dans l'analyseur de l'Hélium à une pression partielle de  $10^3$  torr. Les ions subissent de multiples collisions avec les atomes d'Hélium, ce qui a pour effet de diminuer les amplitudes de leurs trajectoires et de les confiner au centre de l'analyseur. Lors de la phase d'éjection et donc de détection des ions, la valeur de  $V$  est progressivement augmentée alors qu'une radiofréquence de type  $V_2 \cos \omega_2 t$  est appliquée entre les électrodes chapeaux. Le balayage de  $V$  amène tous les ions, tour à tour et par  $m/z$  croissant, en résonance avec  $V_2 \cos \omega_2 t$ .

Il y a alors augmentation brutale de l'amplitude de la trajectoire de l'ion et éjection de ce dernier vers le détecteur. L'écart entre les électrodes n'étant que de quelques millimètres, le

volume disponible pour le piégeage des ions est faible. Les premières trappes ioniques n'ont pas rencontré le succès commercial escompté en raison de phénomènes d'espace de charge importants : la répulsion électrostatique exercée par chaque ion vis-à-vis des autres ions provoque des distorsions spectrales en fonction de la quantité d'analyte introduite. Les trappes ioniques sont aujourd'hui équipées de régulateurs automatiques de gain qui ajustent le nombre d'ions présents dans l'analyseur, en jouant sur la durée d'ionisation. Le spectre de masse est toujours enregistré à partir du même nombre d'ions, quelle que soit la quantité d'analyte injectée en chromatographie ; le tracé du chromatographe prend en compte le temps d'ionisation optimisé, de manière à conserver l'aspect quantitatif de la méthode. Grâce aux régulateurs électroniques de gain, les trappes ioniques fournissent aujourd'hui une reproductibilité spectrale satisfaisante, néanmoins inférieure à celle des quadripôles. [28,53,54].

#### - *Quadripôles*

Comme le montre la figure 15, un quadripôle est systématiquement associé à un système d'extraction et de focalisation des ions produits en source. Il s'agit le plus souvent d'un hexapôle ou d'une lentille électrostatique (analogue électrique d'une lentille optique). Le quadripôle est constitué de quatre électrodes métalliques parallèles raccordées électriquement deux à deux, de section idéalement hyperbolique. Ces électrodes sont cylindriques et longues de douze à vingt centimètres selon les modèles. L'application d'un potentiel de type  $U + V \cos \omega t$  crée un champ quadripolaire entre les électrodes.

Deux électrodes symétriques par rapport à l'axe central du quadripôle sont portées à un potentiel de type  $U + V \cos \omega t$ , les deux autres au même potentiel mais de signe opposé ( $-U - V \cos \omega t$ ).  $U$  et  $V \cos \omega t$  sont, respectivement, les composantes de tension continue et de tension alternative du potentiel de radiofréquence.  $V$  et  $\omega$  sont, respectivement, l'amplitude et la pulsation de la tension alternative. La valeur de  $\omega$  est fixée par le constructeur. Les polarités des électrodes sont rapidement inversées, ce qui confère aux ions un mouvement "en tire-bouchon" dont l'amplitude radiale dépend des paramètres  $U$  et  $V$ . Pour qu'un ion de rapport  $m/z$  donné ait une trajectoire stable dans le quadripôle et qu'il puisse ainsi atteindre le détecteur, il faut que les paramètres  $U$  et  $V$  soient tels que l'amplitude radiale de la trajectoire de l'ion soit inférieure à la distance séparant les électrodes. Dans la pratique, le quadripôle fonctionne comme un filtre à ions : on fait varier simultanément les valeurs de  $U$  et de  $V$  de manière à ce que les ions produits par la source soient stables à tour de rôle. A un instant  $t$  donné, ne sont détectés que les ions d'un  $m/z$  donné. Les autres ions vont heurter les électrodes ou les parois internes du spectromètre ; ils se déchargent et sont entraînés par le système de pompage [28,53].

### ❖ *Détecteur d'un spectromètre de masse*

Le rôle du détecteur est double : détecter les ions proportionnellement à leur nombre et amplifier le courant correspondant (de l'ordre de  $10^{-12}$  ampère) pour le rendre détectable par l'électronique du système. Les détecteurs utilisés sont constitués d'une dynode de conversion et d'un multiplicateur d'électrons en GC/MS (figure 19) ou d'une dynode continue (canal multiplicateur d'électron, *channeltron*) en LC/MS (figure 20).

#### - *Dynode de conversion et Multiplicateur d'électrons*

La dynode de conversion (figure 19) est une électrode métallique concave placée perpendiculairement à la trajectoire des ions. Un potentiel de +15 kV pour la détection des ions négatifs ou de -15 kV pour la détection des ions positifs est appliqué à la dynode de conversion. Lorsqu'un ion frappe la surface de la dynode de conversion, une ou plusieurs particules secondaires sont éjectées. On trouve parmi ces particules secondaires des ions positifs, négatifs, des électrons et des neutres. Lorsque des ions positifs frappent la surface négative de la dynode de conversion, ce sont les ions négatifs et les électrons qui intéresseront le détecteur. En revanche si des ions négatifs frappent la dynode de conversion polarisée positivement, ce sont les protons et les ions positifs qui intéresseront le détecteur. Les particules secondaires sont focalisées par la concavité de la dynode de conversion, puis accélérées par un gradient de potentiel vers le multiplicateur d'électrons.

Le multiplicateur d'électrons est monté à proximité de l'analyseur de masse sur le couvercle de l'enceinte à vide. Le multiplicateur d'électrons comprend une cathode et une anode. La cathode du multiplicateur d'électrons est en forme d'entonnoir et recouverte d'un oxyde de plomb. Un potentiel pouvant aller jusqu'à -3 kV est appliqué à la cathode au niveau de la bague haute tension. La sortie de la cathode (située juste en face de l'anode) est à un potentiel voisin de la masse. La cathode est maintenue en place par la bague haute tension, 2 pattes latérales, le support du multiplicateur et le blindage du multiplicateur. Une rondelle ressort ondulée maintient la cathode au contact du blindage du multiplicateur d'électrons. Le support du multiplicateur d'électrons est fixé sur le couvercle de l'enceinte à vide par 2 vis.

Les particules secondaires émises par la dynode de conversion viennent frapper la proche paroi interne de la cathode du multiplicateur d'électrons avec une énergie suffisante pour éjecter des électrons. Les électrons éjectés sont accélérés vers l'intérieur de la cathode grâce au gradient de potentiel positif qui y règne. A cause de la forme en entonnoir de la cathode, les électrons heurtent à nouveau la paroi après une brève course, produisant ainsi à chaque impact une nouvelle gerbe d'électrons et ainsi de suite. De proche en proche, un très grand nombre d'électrons est produit, pour engendrer finalement à la sortie de la cathode, un courant

mesurable au niveau de l'anode du multiplicateur d'électrons. Le courant recueilli par l'anode est proportionnel au nombre de particules secondaires frappant la cathode du multiplicateur.

L'anode du multiplicateur d'électrons collecte les électrons produits par la cathode. C'est une électrode en forme de coupe placée à la sortie de la cathode et vissée dans le passage étanche de l'anode traversant le couvercle de l'enceinte à vide.

La valeur type du gain d'un multiplicateur d'électrons est de  $10^5$ . Si le courant ionique et électronique envoyé par la dynode de conversion qui parvient au multiplicateur est de  $10^{-12}$  A, et que le gain du multiplicateur d'électrons est de  $10^5$ , on recueille sur l'anode du multiplicateur un courant de  $10^{-7}$  A. Ce courant est converti en une tension par l'électromètre, cette dernière est enregistrée par le système informatique.

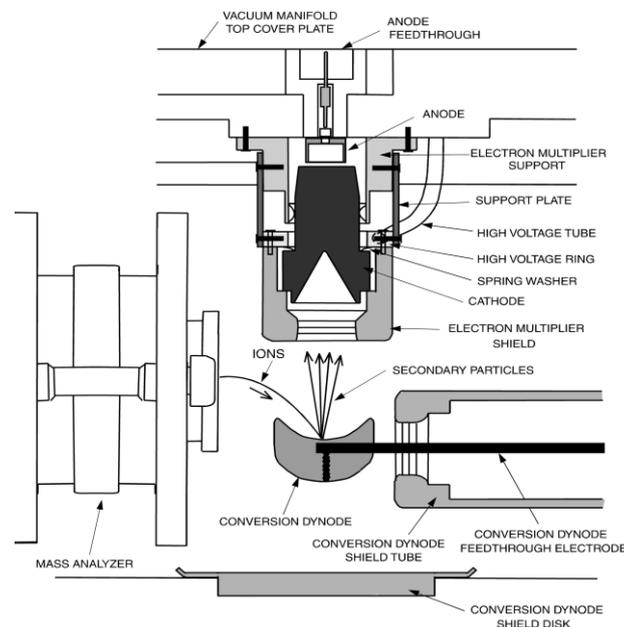


Figure 19 : Schéma d'un détecteur constitué d'une dynode de conversion avec un multiplicateur d'électrons [55]

- *Détecteur à canal multiplicateur d'électron "Channeltron" »*

Un détecteur canal multiplicateur d'électron "channeltron" (figure 20) se présente sous la forme d'un entonnoir courbe ou d'une corne d'abondance. L'intérieur est enduit d'un alliage plomb/oxyde de plomb qui a la propriété d'émettre des électrons sous l'effet d'un choc. Une différence de potentiel de 1000 à 3000 V est appliquée entre l'entrée et la sortie de l'entonnoir. Lorsqu'un ion vient heurter la paroi interne, il y a émission d'électrons qui, accélérés par la différence de potentiel, rebondissent de part et d'autre de la paroi. Chaque choc décroche de nouveaux électrons qui sont eux-mêmes accélérés; on parle de "cascade électronique". Un "channeltron" fournit un gain de l'ordre de  $10^5$ ; c'est à dire que l'arrivée d'un ion est traduite par un courant de  $10^5$  électrons.

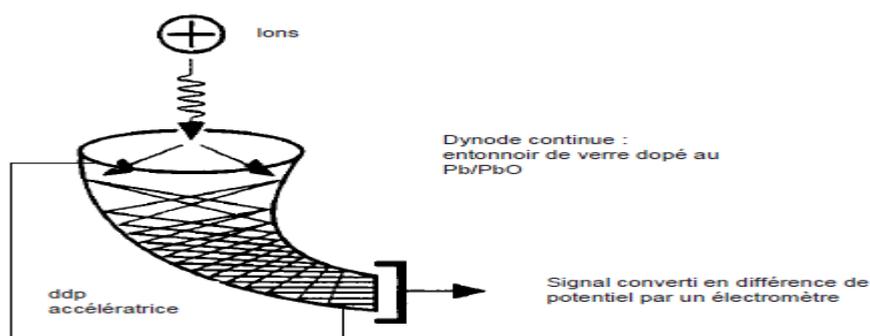


Figure 20 : Schéma d'un détecteur de type canal multiplicateur d'électron "channeltron"

#### ❖ Principaux modes d'acquisition

##### - Analyses en balayage ou "fullscan"

Le mode dit "de balayage" ou "fullscan" est utilisé lorsque l'on souhaite enregistrer des spectres dit "de source", c'est-à-dire des spectres où sont présents tous les ions produits dans la source à un instant donné. On parle de "balayage" car l'obtention d'un tel spectre nécessite le balayage des tensions  $U$  et  $V$  du potentiel utilisé. Les spectres "de source" permettent l'identification des analytes.

##### - Analyses en "SIM" et "SIS"

Le terme "SIM" ("Single Ion Monitoring") est employé par les utilisateurs de quadripôles pour désigner l'opération qui consiste à ne détecter que un (ou quelques) ion(s). Le terme "SIS" ("Single Ion Storage") désigne la même opération sur une trappe ionique. En SIM ou en SIS, le spectromètre de masse fonctionne comme un filtre ; il est programmé pour ne détecter que quelques ions caractéristiques des analytes étudiés (1 à 4, en général). Le gain de sensibilité est spectaculaire car SIM et SIS augmentent le signal associé à la détection des analytes tout en diminuant le bruit de fond chromatographique. Avec un quadripôle, la durée du balayage des ions est proportionnelle à la gamme de rapports  $m/z$  balayée ; opérer sur peu de valeurs de  $m/z$  augmente donc considérablement le temps imparti à la détection des ions correspondants, comparativement au mode "fullscan". Parallèlement, l'élimination des ions indésirables (ions issus de la phase stationnaire de la colonne chromatographique ou d'impuretés de l'échantillon) supprime le "bruit de fond" constitué par ces derniers ainsi que les pics chromatographiques associés aux molécules parasites. On dit que la détection est "sélective". En trappe ionique, le SIS diminue les seuils de détection car l'élimination des ions "parasites" libère de l'espace pour stocker plus d'ions d'intérêt dans l'analyseur. SIM et SIS sont très performants dans le cadre de la détection de traces en milieux complexes.

- *Analyses en MS/MS*

Si le SIM et le SIS sont très performants en termes de sélectivité et de sensibilité, ils fournissent des spectres de masse peu intéressants pour caractériser les analytes car pauvres en ions. La technique MS/MS (on parle aussi de spectrométrie de masse "en tandem") allie les avantages du SIM et du SIS à ceux du "fullscan" ; elle est sélective, sensible, et fournit des spectres de masse suffisamment riches en ions pour caractériser un analyte sans ambiguïté. La MS/MS ne peut être opérée sur un simple quadripôle ; elle nécessite un triple quadripôle tel que celui présentée sur la figure 15. Elle est aisée à mettre en œuvre en trappe ionique, sans modification du spectromètre.

Un protocole de MS/MS comporte trois étapes :

- (i) isolation d'un ion caractéristique de l'analyte (ion "précurseur") ;
- (ii) fragmentation de cet ion par collisions dans un gaz inerte ;
- (iii) balayage et détection des ions fragments obtenus.

Les trois étapes sont séparées dans l'espace avec un triple quadripôle (une étape par quadripôle) ; elles sont séparées dans le temps avec une trappe ionique. La première étape s'apparente au SIM ou au SIS : on y sélectionne les ions précurseurs correspondant à un  $m/z$  donné. La seconde étape est l'étape dite "de collisions". Avec un triple quadripôle, les ions sélectionnés par le premier quadripôle (Q1) subissent des collisions avec des atomes de gaz (généralement de l'Argon) introduits dans le second quadripôle (Q2). Les chocs augmentent l'énergie potentielle des ions, ce qui conduit à leur dissociation dans Q2. Dans une trappe ionique, on accélère les ions sélectionnés, afin que les collisions avec les atomes d'Hélium présents deviennent suffisamment violentes pour conduire à la fragmentation des premiers. Avec un triple quadripôle, un balayage "classique" du troisième quadripôle (Q3) permet de séparer les ions fragments issus de Q2. Le maximum de sensibilité est obtenu lorsque Q3 est opéré en SIM sur quelques fragments. On parle alors de "MRM" pour "Multiple Reaction Monitoring". En trappe ionique, la troisième étape de la MS/MS consiste en un balayage classique de la radiofréquence de piégeage. Il existe d'autres modes d'analyse MS/MS tels que la recherche d'ions précurseurs en triple quadripôle ou la "MS<sup>n</sup>" en trappe ionique. Ceux-ci sont surtout utilisés en analyse structurale pour l'élucidation de structures inconnues (des métabolites) et pour la détermination de mécanismes réactionnels. [54]

### **II.3. TRAITEMENT DES DONNEES**

Les énormes volumes de données générés par les techniques d'analyse exigent de puissants outils de traitement des données, telle que la chimiométrie qui permet l'extraction de l'information multivariée utile pour comprendre les changements et les variations des profils chromatographiques [8-10].

Les analyses multivariées sont couramment utilisées pour traiter de grandes quantités de données issues de techniques analytiques appliquées aux médicaments à base plantes.[8] En général, les données sont traitées en vue de prédire une réponse avec le maximum de précision possible. Les variations systématiques des données représentent une tendance prévisible alors que les variations non-systématiques sont considérées comme un bruit aléatoire. Dans le cas optimal, les variations systématiques étudiées (voulues) co-varient avec la réponse contrairement aux variations systématiques indésirables.

#### **II.3.1. Analyses multivariées non supervisées.**

Les analyses non supervisées sont utilisées pour identifier des tendances évidentes, et ainsi grouper et isoler des observations. Les analyses supervisées sont utilisées pour identifier des relations pertinentes avec une question ou une hypothèse spécifique.

L'analyse en composantes principales (PCA) est la plus utilisée des analyses multivariées non supervisées. Elle repose sur l'analyse sans a priori des variables à forte variance, permettant de séparer des groupes d'individus dans un espace réduit à deux ou trois composantes et de mettre en évidence les tendances, et les valeurs aberrantes [56]. Les composantes d'un modèle de PCA sont désignées composantes principales.

#### **II.3.2 Analyses multivariées supervisées.**

La méthode statistique multivariée supervisée la plus courante demeure la régression des moindres carrés partiels (PLS : *partial least squares*) [56]. Cette méthode consiste à examiner la relation entre deux séries de données, une série X de données prédictives et une série Y de données à prédire. La méthode permet de mesurer la covariance entre les composantes issues de X et celles issues de Y, et rétrospectivement à déterminer quelles sont les variables individuelles X et Y qui « pèsent » le plus dans cette relation. Ces dernières variables pourront alors être retenues comme des indicateurs importants dans le cadre d'analyses de données.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA : *partial least squares-discriminant analysis*) [56]. Cette méthode prend en compte l'appartenance des individus Y à un groupe prédéfini. Le but de la PLS-DA est de décrire de manière optimale la séparation des groupes prédéfinis d'individus Y (classes) à partir de leurs variables prédictives X (matrice de données initiale). Cette méthode est un modèle d'analyse discriminante utilisé pour la classification, et la mise en évidence des variables discriminantes entre les groupes. En fait, cette méthode permet de maximiser les différences inter-groupes et de minimiser les différences intra-groupes.

Une méthode de filtrage des données par correction orthogonale du signal (OSC : *orthogonal signal correction*) [56,57] peut être réalisée, afin d'éliminer les variables X qui ne sont pas corrélées aux variables Y (essentiellement la variation non-prédictive), ce qui permet de réduire le volume de données, facilitant ainsi l'interprétation et la visualisation des résultats. Par ailleurs, La projection orthogonale des moindres carrés partiels (OPLS : *orthogonal projections to latent structures*) [56,58] permet de séparer la variation systématique en X en 2 parties, une variation linéairement corrélée à Y et l'autre orthogonale à Y. L'information prédictive Y à partir de X sera concentrée dans la première composante prédictive. Ainsi, les classes seront séparées en fonction de cette composante. La variation en X qui n'est pas corrélée à Y sera classée dans la deuxième composante. Cette répartition des X améliore la transparence et l'interprétabilité du modèle[59] (figure 21).

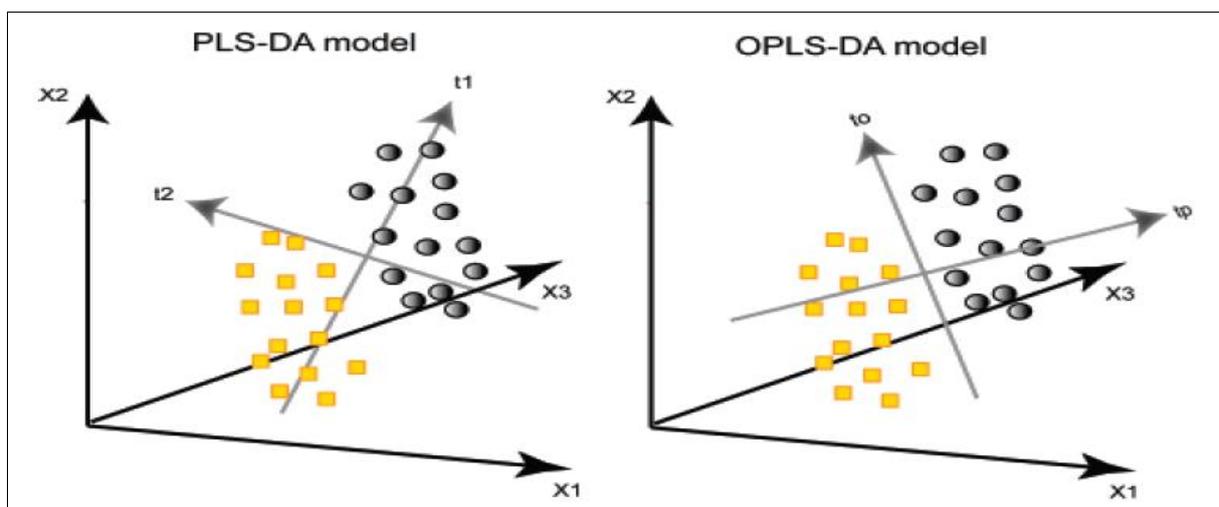


Figure 21 : Illustration géométrique de la différence entre la PLS-DA et l'OPLS-DA. Avec l'OPLS-DA, la différence inter-groupes (X corrélés à Y) se trouve sur la composante prédictive  $t_p$ , et la variation en X qui n'est pas corrélée à Y sera classée dans la deuxième composante  $t_o$ [59].

### II.3.2.1. Visualisation des résultats.

L'utilisation d'outils de visualisation appropriés facilite la communication et l'interprétation des données scientifiques.

Afin de détecter les composés responsables de la discrimination entre les différents groupes étudiés, nous avons utilisé une figure qui met en évidence l'influence des variables X dans le modèle. La méthode S-plot combine la contribution (la covariance) [axe p1], avec celle de la confiance (la corrélation) [axe p(corr)1] des variables du modèle OPLS-DA [59] (figure 22). Les 2 vecteurs utilisés dans le S-plot sont calculés ainsi :

$$\text{Cov}(t, X_i) = \frac{t^T X_i}{N - 1}$$

$$\text{Corr}(t, X_i) = \frac{\text{Cov}(t, X_i)}{s_t s_{X_i}}$$

*t* : est le vecteur de score dans le modèle OPLS-DA.

*t<sup>T</sup>* : est la transposée du vecteur *t*.

*i* : est la variable centrée dans la matrice des données X.

*s* : ce sont les écart-types estimés.

*N* : nombre d'observations.

Cette figure est sigmoïde. Les variables qui se trouvent aux extrémités de l'axe de covariance sont les variables qui présentent le plus d'influence dans le modèle. De plus, les variables qui présentent une corrélation importante sont celles qui se situent aux extrémités de l'axe de corrélation. Les variables qui expriment l'influence et la corrélation la plus importante sont à l'origine de la séparation entre les groupes d'observations étudiés (figure 22).

Dans cette méthode, la corrélation varie entre une valeur minimale de (-1) et une valeur maximale de (+1). Selon la littérature [60,61] ces valeurs sont classées dans 3 zones en fonction de l'importance de la corrélation :

- 1- Corrélation faible : entre |0.1| et |0.3|
- 2- Corrélation moyenne : entre |0.3| et |0.5|
- 3- Corrélation importante entre |0.5| et |1|

De ce fait, nous nous sommes intéressés aux variables placées aux extrémités de la figure pour les valeurs négatives et positives de la covariance et de la corrélation (-0.5 > p Corr > +0.5) [61].

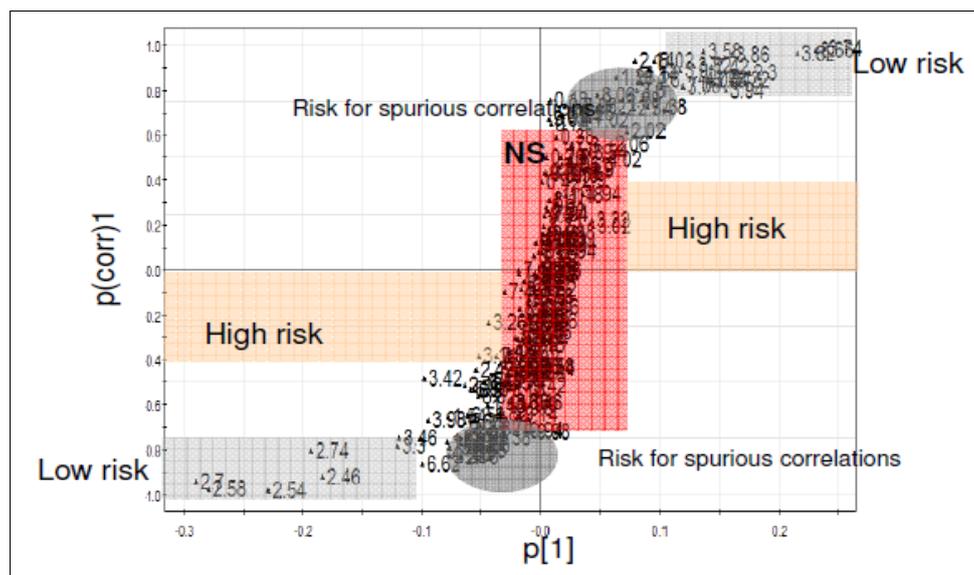


Figure 22 : Interprétation de la figure « S-plot ».

L'axe  $p$  représente la contribution des variables dans le modèle. L'axe  $p(\text{corr})$  représente la confiance. Les variables qui présentent une faible contribution sont proches du niveau du bruit (NS). Le risque de fausse corrélation est élevé. Les variables idéales présentent des valeurs importantes de contribution et de corrélation (risque bas de fausse corrélation) [61].

Enfin, le S-Plot est un moyen facile de visualiser les résultats obtenus à partir d'un modèle OPLS-DA. Cependant, il peut être effectué à l'aide de l'PCA ou la PLS-DA seulement si une bonne séparation des classes, en fonction de la première composante, est obtenue. Il est souvent utilisé pour mettre en évidence des marqueurs présumés à partir de données obtenues en RMN, LC/MS ou GC/MS [59].

### II.3.2.1. Evaluation de modèle.

La performance d'un modèle est évaluée selon deux critères, la capacité explicative  $R^2$  (variation expliquée) et la capacité prédictive du modèle  $Q^2$  (la variation prédite), dont les valeurs se situent dans l'intervalle [0-1].

- La capacité explicative  $R^2$ .

Le coefficient  $R^2$  indique la proportion de la variance des données qui peut être expliquée par le modèle utilisé [56]. Un faible coefficient  $R^2$  indique qu'il existe un bruit important ou des informations non pertinentes dans les données. Donc le modèle n'est pas utilisable.

$$R^2 = 1 - \text{variation inexplicée} = 1 - \text{RSS/SS}$$

*RSS* : Somme des carrés des résidus

*SS* : Somme des carrés totaux

- La capacité prédictive  $Q^2$ .

Ce paramètre est calculé à l'aide de la validation croisée (CV). La CV est une approche pratique et fiable pour évaluer la pertinence des modèles statistiques, aussi bien en ACP qu'en PLS. Le principe de cette approche est de tenir une portion (P) des données en dehors du développement du modèle (M). Une fois le modèle M développé, il sera utilisé pour prédire les données écartées (les données prédites sont désignées par la lettre E). Par la suite, ces valeurs prédites (E) sont comparées avec les valeurs observées (P) [56].

Les carrés des différences entre les valeurs prédites et les valeurs observées sont sommés et appelés « the predictive residual sum of squares (PRESS) ». Le PRESS est une mesure du pouvoir prédictif du modèle testé.

$$\text{PRESS} = \sum (\text{Obs}-\text{Pred})^2$$

Le coefficient  $Q^2$  indique la proportion de la variance des données qui peut être prédite par le modèle utilisé.

$$Q^2 = 1 - \text{PRESS} / SS$$

*SS : Somme des carrés totaux*

Généralement, un  $Q^2 > 0,5$  est considéré comme acceptable, et une  $Q^2 > 0,9$  représente un très bon pouvoir prédictif. Il est impossible d'obtenir une valeur élevée de  $Q^2$  sans avoir une valeur élevée de  $R^2$ . Enfin, la différence entre  $R^2$  et  $Q^2$  ne doit pas être importante et par conséquent ne doit pas dépasser 0,2-0,3 [56].

#### **II.4. REFERENCES : ÉVALUATION ANALYTIQUE DES MÉDICAMENTS TRADITIONNELS**

1. Sahoo N, Manchikanti P, Dey S (2010) Herbal drugs: standards and regulation. *Fitoterapia* 81 (6):462-471
2. WHO (2010) Guidelines for registration of traditional medicines in the WHO african region. AFR/TRM/04. World Health Organization, Geneve
3. Booker A, Johnston D, Heinrich M (2012) Value chains of herbal medicines - research needs and key challenges in the context of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 140 (3):624-633
4. Giri L, Andola H, Purohit V, Rawat M, Rawal R, Bhatt I (2010) Chromatographic and spectral fingerprinting standardization of traditional medicines: an overview as modern tools. *Research Journal of Phytochemistry* 4:234-241
5. Kamboj A (2012) Analytical evaluation of herbal drugs. In: Vallisuta O, Olimat SM (eds) *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*. InTech, Croatia,
6. Liang Y-Z, Xie P, Chan K (2004) Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B* 812 (1-2):53-70
7. Liang X-m, Jin Y, Wang Y-p, Jin G-w, Fu Q, Xiao Y-s (2009) Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A* 1216 (11):2033-2044

8. Jing D, Deguang W, Linfang H, Shilin C, Minjian Q (2011) Application of chemometrics in quality evaluation of medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (17):4001-4008
9. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TW-M, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, Hankemeier T, Hardy N, Harnly J, Higashi R, Kopka J, Lane AN, Lindon JC, Marriott P, Nicholls AW, Reily MD, Thaden JJ, Viant MR (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Chemical Analysis Working Group (CAWG), Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 3 (3):211-221
10. Liang Y, Yi L, Xu Q (2008) Chemometrics and modernization of traditional Chinese medicine. *Science in China Series B: Chemistry* 51 (8):718-728
11. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD (2008) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology,
12. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H (2011) Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 1 (1):98-106
13. Jones WP, Kinghorn AD (2005) Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI (eds) *Natural Products Isolation*, vol 20. *Methods in Biotechnology*. Humana Press, Totowa, pp 323-351
14. Lytovchenko A, Beleggia R, Schauer N, Isaacson T, Leuendorf J, Hellmann H, Rose J, Fernie A (2009) Application of GC-MS for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues. *Plant Methods* 5 (1):4
15. Wagner H, Bladt S (1996) *Plant drug analysis: a Thin Layer Chromatography atlas*. 2 edn. Springer, Berlin
16. dos Santos Pereira A, Carbonell SA, de Aquino Neto FR, do Amaral ACF, Barnes RA (2002) High-temperature gas chromatography-mass spectrometry with glass capillary columns for the screening of natural products. *Journal of Chromatography A* 947 (2):255-265
17. Huie C (2002) A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 (1-2):23-30
18. Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17 (6):300-312
19. Gao M, Liu C-Z (2005) Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21 (8-9):1461-1463
20. Plesa C, Hadaruga D, Hadaruga N, Branic A, Ardelean A, Lupea A (2011) *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* hydrophobic extracts: a multivariate analysis approach. *Revista de Chimie* 62 (9):941-946
21. Wu J, Lin L, Chau F-t (2001) Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry* 8 (4):347-352
22. Melecchi MIS, Martinez MM, Abad FC, Zini PP, do Nascimento Filho I, Caramão EB (2002) Chemical composition of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers: A study of extraction methods. *Journal of Separation Science* 25 (1-2):86-90
23. Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RKP, Fraser PD, Bramley PM (2005) Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany* 56 (410):219-243. doi:10.1093/jxb/eri069
24. Yongyu Z, Shujun S, Jianye D, Wenyu W, Huijuan C, Jianbing W, Xiaojun G (2011) Quality Control Method for Herbal Medicine - Chemical Fingerprint Analysis. In: Shoyama Y (ed) *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas*. InTech, pp 171-194
25. Tranchant J (1995) *Pratique de la Chromatographie en Phase Gazeuse*. Manuel Masson,
26. Tranchant J (1996) *Chromatographie en phase gazeuse*. Techniques de l'Ingénieur p1485
27. Skoog DA, West DM, Holler FJ (1997) *Chimie analytique* (trans: Buess-Herman c, Dauchot-Weymeers J, Dumont F), vol 7. De Boeck,

28. Bouchonnet S, Libong D (2004) Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *l'actualité chimique* 275:7-14
29. Caude M, Jardy A (1995) Chromatographie en phase liquide - Appareillage et applications. *Techniques de l'Ingénieur PE* 1456:1-17
30. Tchaplal A Les Colonnes HPLC : Nouvelles Perspectives. Quelles Solutions Technologiques pour l'Avenir ? In: Conférence à Forum Labo & Forum Biotech, 2006.
31. Knox JH, Kaur B, Millward GR (1986) Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography. *Journal Chromatography* 352 3-25
32. Kaur B (1990) The use of porous graphitic carbon in high performance liquid chromatography. *LC GC* 8 (6):468-477
33. West C, Elfakir C, Lafosse M (2010) Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1217 (19):3201-3216
34. Ross P (2000) The role of porous graphitic carbon in HPLC. *LC-GC Europe* 13 310-319
35. Gaudin K, Chaminade P, Baillet A (2002) Eluotropic strength in non-aqueous liquid chromatography with porous graphitic carbon. *Journal of Chromatography A* 973 (1-2):61-68
36. Charlesworth JM (1978) Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 50 1414-1420
37. Dixon RW, Peterson DS (2002) Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging. *Analytical Chemistry* 74:2930-2937
38. Esa Corona CAD brochure [www.go-jsb.com/.../CoronaCAD%20Brochure.pdf](http://www.go-jsb.com/.../CoronaCAD%20Brochure.pdf) (page consultée en juillet 2013 ).
39. Liu BYH, Pui DYH (1975) On the Performance of the Electrical Aerosol Analyzer. *Journal Aerosol Science* 6:249-264
40. Gamache PH, McCarthy RS, Freeto SM, Asa DJ, Woodcock MJ, Laws K, Cole RO (2005) HPLC Analysis of non-volatile analytes using charged aerosol detection. *LC-GC* 18:345-354
41. Moreau RA (2006) The Analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector. *Lipids* 41 727-734
42. Cobb Z, Shaw PN, Lloyd LL, Wrench N, Barrett DA (2001) Evaporative light scattering detection coupled to microcolumn liquid chromatography for the analysis of underivatized amino acids: Sensitivity, linearity of response and comparisons with UV absorbance detection. *Journal of Microcolumn Separations* 13 169-175
43. Górecki T, Lynen F, Szucs R, Sandra P (2006) Universal response in liquid chromatography using charged aerosol detection. *Analytical Chemistry* 78:3277-3281
44. Inagaki S, Min JZ, Toyo'oka T (2007) Direct detection method of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection. *Biomedical Chromatography* 21 338-342
45. Wipf P, Werner S, Twining LA, Kendall C (2007) HPLC determinations of enantiomeric ratios. *Chirality* 19 5-9
46. ThermoFischerScientific Optimization of Parameters for External Ionization GC-Ion Trap Mass Spectrometers. [www.thermo.com/eThermo/CMA/.../File\\_5601.pdf](http://www.thermo.com/eThermo/CMA/.../File_5601.pdf) (page consultée en juillet 2013 ).
47. AppliedBiosystems/SCIEX World-leading LC/MS/MS technology for quantitation and identification API 3000™ LC/MS/MS System. [www3.appliedbiosystems.com/.../cms\\_039794.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/.../cms_039794.pdf).
48. Shibukawa A, Nagao M, Kuroda Y, Nakagawa T (1990) Stereoselective determination of free warfarin concentration in protein binding equilibrium using direct sample injection and an on-line liquid chromatographic system. *Analytical Chemistry* 62 (7):712-716
49. Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Horning MG, Stillwell RN (1974) Liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical systems. *Journal Chromatography* 99:13-21

50. Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Horning MG, Stillwell RN (1974) Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream. *Journal of Chromatographic Science* 12:725-729
51. Good A, Durden DA, Kebarle P (1970) Ion-molecule reactions in pure nitrogen and nitrogen containing traces of water at total pressures 0.5-4 torr. Kinetics of clustering reactions forming  $H^+(H_2O)_n$ . *The Journal of Chemical Physics* 52 (1):212-221
52. AppliedBiosystems/SCIEX (2010) API 4000™ LC/MS/MS System. Hardware Manual.
53. Bouchonnet S, Hoppilliard Y, Kargar-Grisel T (1999) Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bioorganiques. *Spectra Analyse* 207 (28):11-25
54. Bouchonnet S (2001) Comparaison des performances des analyseurs quadripolaires en spectrométrie de masse : trappes ioniques versus quadripôles. *Spectra Analyse* 222 (30):11-18
55. ThermoElectron (2003) Finnigan™ LCQ™ Series - Hardware Manual Rev. A. Thermo Electron Corporation, San Jose, CA
56. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikström C, Wold S (2006) Multi- and megavariate data analysis part I basic principles and applications, second revised and enlarged edition. Umetrics AB, Sweden
57. Wold S, Antti H, Lindgren F, Öhman J (1998) Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 44 (1-2):175-185
58. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T (2007) Chemometrics in metabonomics. *Journal of Proteome Research* 6:469-479
59. Wiklund S, Johansson E, Sjostrom L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, Gottfries J, Moritz T, Trygg J (2007) Visualization of GC/TOF-MS based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry* 80 (1):115-122
60. Cohen J (1988) *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2 edn. Lawrence Erlbaum Associates, England
61. Cohen J (1990) Things I Have Learned (So Far). *American Psychologist* 45 (12):1304-1312

## **PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS**

La stratégie analytique des médicaments traditionnels à base de plantes (tradimédicaments) proposée est basée sur l'établissement de profils chromatographiques des métabolites phytochimiques.

Notre stratégie était fondée sur l'application des techniques chromatographiques et de traitement chimiométrique de données développés au sein du Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud - EA4041 aux substances phytochimiques apolaires (lipophiles) et parallèlement développer des techniques chromatographiques d'analyse des substances phytochimiques polaires, afin de proposer une méthode d'analyse en routine des tradimédicaments.

Vue la complexité des mélanges phytochimiques (plusieurs classes chimiques) et les résultats des différents essais préliminaires, les travaux que nous présentons dans le cadre de ce mémoire de thèse sont axés sur la fraction apolaire des métabolites.

La première partie bibliographique nous a permis d'indiquer que les profils chromatographiques des métabolites phytochimiques, après préparation des échantillons et associés à l'analyse chimiométrique constituent un outil pour l'évaluation de la qualité des médicaments complexes à base de plantes.

La chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie liquide haute performance couplées à la spectrométrie de masse, techniques couramment utilisées pour l'analyse des produits à base de plantes nous ont intéressés au cours de nos travaux de thèse de doctorat.

L'objectif principal de notre étude expérimentale est de développer des protocoles d'établissement de profils chromatographiques des composés phytochimiques apolaires de deux drogues végétales (feuilles de *Combretum micranthum* et *Mitracarpus scaber*) avec ces deux types de techniques chromatographiques.

Pour atteindre ce but, les objectifs spécifiques suivants ont été fixés :

- Proposer une méthode de préparation efficace des échantillons ;
- Réaliser un profilage des métabolites apolaires en chromatographie en phase gazeuse ;
- Réaliser un profilage des métabolites apolaires en chromatographie en phase liquide ;
- Faire une analyse chimiométrique des profils chromatographiques obtenus.

## **I. ETABLISSEMENT DE PROFILS EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE : Publication 1**

La première étude a porté sur la chromatographie en phase gazeuse, technique chromatographique couramment utilisée pour l'analyse des produits à base de plantes et particulièrement pour les composés apolaires. Couplée à la spectrométrie de masse, elle offre une grande capacité de séparation, des informations structurales et avec les bases de données spectrales existantes une possible identification des composés. Par contre, elle présente des limites pour les composés peu volatils, thermiquement instables et de haute masse moléculaire.

La méthodologie et les résultats de cette étude sur le profilage des composés phytochimiques apolaires par chromatographie en phase gazeuse sont regroupés dans la **publication 1** acceptée dans *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* :

## Résumé publication 1

L'évaluation de la qualité des médicaments traditionnels africains est difficile, car ce sont des mélanges complexes de plusieurs drogues végétales ou des préparations à base de drogues végétales. Leur source est souvent inconnue et/ou très variable. Le profil chromatographique des métabolites phytochimiques est un outil important pour le contrôle de qualité de ces médicaments à base de plantes.

L'objectif de ce travail est de proposer un protocole de préparation des échantillons et d'établissement de profils chromatographiques en phase gazeuse des métabolites phytochimiques apolaires pour le contrôle de qualité des médicaments traditionnels africains à base de plantes.

La méthodologie est basée sur l'analyse chimiométrique des profils chromatographiques des métabolites apolaires de différents lots de feuilles de *Combretum micranthum* et *Mitracarpus scaber*. Les profils chromatographiques sont obtenus par chromatographie en phase gazeuse à haute température couplée à la spectrométrie de masse, après extraction au dichlorométhane sous reflux, et élimination des pigments chlorophylliens.

La méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse à haute température après extraction au dichlorométhane permet de détecter la plupart des métabolites apolaires bioactifs ou non déjà identifiés dans les deux drogues végétales.

L'analyse chimiométrique utilisant l'analyse en composantes principales et la régression des moindres carrés partiels après correction orthogonale du signal appliquée aux profils chromatographiques des feuilles à *C.micranthum* et *M. scaber* a montré de faibles différences entre les lots de chaque drogue végétale, et permet une distinction des drogues végétales l'une de l'autre.

Mots-clés: profil chromatographique gaz haute température; métabolites apolaires; Chimiométrie; médicaments africains à base de plantes, *Combretum micranthum*, *Mitracarpus scaber*

## **Establishing high temperature gas chromatographic profiles of non-polar metabolites for quality assessment of African traditional herbal medicinal products**

Nicaise F. Bony <sup>(1) (2)</sup>, Danielle Libong <sup>(1)</sup> ✉, Audrey Solgadi <sup>(3)</sup>, Jean Bleton <sup>(4)</sup>, Pierre Champy <sup>(5)</sup>, Anglade K. Malan <sup>(2)</sup>, Pierre Chaminade <sup>(1)</sup>

1 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, EA4041 IFR141, Faculté de Pharmacie, Univ. Paris-Sud, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

2 Département de Chimie Analytique, Chimie Minérale et Générale, Technologie Alimentaire, Unité de Formation et de Recherche (UFR) des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université d'Abidjan-Cocody 01 BP V 34 Abidjan, République de Côte d'Ivoire

3 Service d'Analyse des Médicament et Métabolites (SAMM), IFR141 IPSIT, Univ. Paris-Sud, 5 rue Jean-Baptiste Clément 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

4 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, EA 4041 IFR141, LETIAM-IUT d'Orsay, Univ. Paris-Sud, Plateau de Moulon, 91400 Orsay, France

5 Laboratoire de Pharmacognosie, CNRS UMR 8076 BioCIS, LabEX LERMIT, Faculté de Pharmacie Univ. Paris-Sud, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

✉ Corresponding author. E-mail: danielle.libong@u-psud.fr

**Abstract**

The quality assessment of African traditional herbal medicinal products is a difficult challenge since they are complex mixtures of several herbal drug or herbal drug preparations. The plant source is also often unknown and/or highly variable. Plant metabolites chromatographic profiling is therefore an important tool for quality control of such herbal products.

The objective of this work is to propose a protocol for sample preparation and gas chromatographic profiling of non-polar metabolites for quality control of African traditional herbal medicinal products.

The methodology is based on the chemometric assessment of chromatographic profiles of non-polar metabolites issued from several batches of leaves of *Combretum micranthum* and *Mitracarpus scaber* by high temperature gas chromatography coupled to mass spectrometry, performed on extracts obtained in refluxed dichloromethane, after removal of chlorophyll pigments.

The method using high temperature gas chromatography after dichloromethane extraction allows detection of most non-polar bioactive and non-bioactive metabolites already identified in leaves of both species

Chemometric data analysis using Principal Component Analysis and Partial Least Squares after Orthogonal Signal Correction applied to chromatographic profiles of leaves of *Combretum micranthum* and *Mitracarpus scaber* showed slight batch to batch differences, and allowed clear differentiation of the two herbal extracts.

**Keywords:** High Temperature Gas Chromatographic profile; Non-polar metabolites; Chemometrics; African herbal medicinal products; *Combretum micranthum*; *Mitracarpus scaber*

## 1. Introduction

The therapeutic arsenal of African traditional medicine, which is used by more than 80% of the African population (World Health Organization), consists largely of traditional herbal medicinal products. Rational use of these herbal medicinal products in the health systems requires that they are of proven quality, safety and efficacy [1].

The quality assessment of these herbal medicinal products used in Africa is difficult because they are complex mixtures of several herbal drugs or herbal drug preparations which may be associated with animal and mineral active ingredients. Also source, harvesting and preparation of raw materials are highly variable [1, 2].

The quality of herbal medicinal products has a direct impact on their safety and efficacy. Reports have shown side effects associated with falsifications and contaminants (heavy metals, pesticides and microorganisms) [3].

Due to the variations and inherent complexities of herbal drugs, conventional quality control, botanical techniques and marker approach [4] are insufficient as the sole means for identifying or authenticating relevant properties, safety and/or efficacy. A multi-technique approach is necessary in order to authenticate the link between the components and the traditional use [5, 6].

The metabolites chromatographic profiling plays an important role in the quality control of complex herbal medicinal products. The metabolites chromatographic profile is in practice an overall fingerprinting of chemically characteristic and/or pharmacologically active constituents of herbal drug, and therefore allows the qualitative and quantitative analysis of herbal medicinal products [5-8].

The sample preparation is an important step for chromatographic profiling of herbal medicines. Secondary metabolites belong to various chemical classes and their extraction is generally based on their polarity. Commonly used extraction solvents are water, methanol and ethanol for the polar metabolites and chloroform, dichloromethane and hexane for non-polar metabolites [9, 10].

Many methods can be distinguished for extracting phytochemicals compounds: conventional methods (decoction, infusion, maceration, heating under reflux and Soxhlet) and modern methods (ultrasonic, microwave, supercritical fluid and pressurized liquid) [9, 11].

Jones *et al.* [9] noted that in the extraction of secondary metabolites of medicinal plants many interfering compounds such as lipids and pigments are obtained. In particular, chlorophylls are often extracted in very large proportion from the leaves, causing a negative impact on the

amount of other phytochemicals; pretreatment of extracts before chromatographic analysis is then preferable but the impact on chemical composition of the extract must be evaluated.

Different selective and sensitive analytical techniques are used for metabolic profiling of plant extracts. Chromatographic techniques are the most used, such as thin layer chromatography (TLC), gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC), capillary electrophoresis (CE) that are associated with different detection methods (ultraviolet, fluorescence, evaporative light scattering (ELSD), mass spectrometry (MS) and even nuclear magnetic resonance (NMR). The development of mass spectrometry (MS) makes its coupling with separation techniques (GC-MS, HPLC-MS and CE-MS) the most commonly used technique in metabolic profiling of medicinal plants [7, 8, 12].

The huge volumes of data generated by these analytical techniques require powerful tools for data processing, such as chemometrics that enable the extraction of useful multivariate information to understand the changes and variations of chromatographic profiles. [12-14].

Gas Chromatography is a popular and useful technique for the analysis of herbal medicinal products [7, 8]. When hyphenated with mass spectrometry, GC-MS provides a high capacity of separation together with structural information and the ability to library-search unknown peaks. These advantages must be counterbalanced by its limitations with regard to non-volatile and/or polar compounds for which liquid chromatography appears to be a better choice. Hence, non-polar phytochemicals extractible by organic solvents are the compounds preferably analyzable by this technique.

Our study aims to propose a protocol for establishing gas chromatographic profile of non-polar phytochemical metabolites for quality assessment of African traditional herbal medicinal products.

For the qualitative assessment of metabolic profiles, we selected two herbal drugs largely used in West Africa especially in Côte d'Ivoire [15] in which several polar or apolar compounds were already identified.

Firstly, leaves of Kinkeliba (*Combretum micranthum* G. Don., Combretaceae) are used as cholagogue, choloretic, diuretic, antidiabetic and anti-inflammatory and have medicinal status in Europe; Various compounds were identified, belonging to piperidine flavan-alkaloids (kinkeloids), quaternary ammonium compounds, flavones, catechins and triterpenoids ( $\alpha$ -amyrin, lupeol and  $\beta$ -sitosterol) [16, 17]. The french Pharmacopoeia (11<sup>th</sup> edition) monograph for the leaves of Kinkeliba proposes flavonoids as markers for qualitative and quantitative analysis [18];

Secondly, leaves of *Mitracarpus scaber* Zucc. (Rubiaceae) which exhibit potent antifungal antibacterial, anti-inflammatory and analgesic activities, contain an azaanthraquinone,

naphthoquinones, anthraquinones, phenolic acids, flavonols, coumarins, pentacyclic triterpenes and sterols [19-26].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical Compounds

All of the following reference compounds used were of analytical grade.

Benz- $[\gamma]$ -isoquinoline-5,10-dione (azaanthraquinone), 4-methoxyacetophenone,  $\alpha$ -amyrin, artemisinin, betulin, campesterol, *trans*-caryophyllene, glyceryl trioctanoate, linalool, linolenic acid, lupeol, 1,4-naphthoquinone, oleanolic acid, palmitic acid,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -sitosterol, squalene, stigmasterol,  $\alpha$ -terpineol, thymol,  $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocopherol acetate and ursolic acid were obtained from Sigma-Aldrich (ST. Quentin Fallavier France). Eugenol was obtained from Extrasynthèse (Genay, France). Activated charcoal was purchased (Roth, Lauterbourg, France). Solvents were from VWR (Fontenay-sous-bois, France).

### 2.2. Apparatus

Gas chromatography unit (Trace GC Ultra; Thermo Fisher Scientific, Austin TX) equipped with manual On-column and automatic Split/Splitless injector was coupled to an ion trap mass spectrometer (ITQ 900) with an electron impact and chemical ionization ion source. The system is controlled by computer with software XCALIBUR 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific); an ultrasonic bath of 47 KHz was used (BRANSON 2210, Ultrasonic cleaner, Connecticut, USA).

### 2.3. Plant Material

This study was carried out on samples of two herbal drugs:

- Five samples of *Combretum micranthum* G. Don. (CM1 to CM5) from the commercial circuit:

- . CM1 (September 2009), CM4 (October 2010) obtained plant market in the town of Adjame (Côte d'Ivoire);

- . CM2 (April 2009) and CM3 (October 2010) (raw materials of phytomedicinal industry provided by the Laboratory of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Abidjan-Cocody)
  - . CM5 (October 2010) from Senegal.
- Four samples of *Mitracarpus scaber* Zucc. (MS1 to MS4) of known harvest location:
- . MS1 (October 2008), MS2 (April 2009), MS3 (October 2010) collected at the Botanical Garden of the University of Abidjan-Cocody;
  - . MS4 (October 2010) collected in the municipality of Bingerville (Côte d'Ivoire).
- All of the samples were authenticated by Pr. Aké-Assi (National Institute of Floristic, University Abidjan Cocody). Fresh leaves were dried at room temperature for two weeks, then homogenously ground.

## **2.4. Sample preparation**

### **2.4.1. Extraction**

2 g of plant powder were extracted twice by refluxing or ultrasound stirring with 20 ml of dichloromethane for thirty minutes and then filtered through Whatman filter paper No. 42. The filtrates were combined and evaporated under reduced pressure at 40-45°C. The dry residue was dissolved with 5 ml of the same solvent and then filtered on Teflon syringe filter (0.22 µm). The extracts were diluted to 2 mg/ml in dichloromethane.

### **2.4.2. Elimination of chlorophyll**

The elimination of chlorophyll was performed by adsorption on activated charcoal through shaking 1 mg of dry residual of the extract with 6 mg of activated charcoal for 2 minutes and then filtered through Whatman filter paper (No. 42). The filtrate was used for GC/MS analysis

## **2.5. Chromatographic Conditions**

After splitless injection of 1 µl of diluted extract separation was performed on a high temperature capillary column (Agilent Technologies, DB-5HT, 30 m × 0.32 mm × 0.1 µm

coated with 5% diphenyl/ 95% dimethyl polysiloxane) using helium as the mobile phase at a constant flow of 2 ml/min

The temperatures of the injector and of the transfer line were respectively 250°C and 350°C. The oven temperature was programmed from 40 to 390°C at 10°C/minute and then maintained at 390°C for 10 minutes.

## 2.6. Method for mass spectrometry

Electron impact and chemical ionization were used for the chromatographic analysis of plant extracts. Electron impact was selected for its inherent ability to provide structural information. Chemical ionization was selected to evaluate the molecular mass of solutes but also to generate profiles with a lesser amount of low  $m/z$  ions. Such profiles appeared to be easier to integrate in the chemometric analysis.

In electron impact, source was heated to 250°C and the ionization energy was 70 eV; chemical ionization was performed at 200°C and 120 eV with methane as reagent gas at a constant flow of 1 ml/min. The mass spectra were recorded in the full scan mode with the mass range from  $m/z$  50 to  $m/z$  900.

## 2.7. Identification of compounds

The compounds were identified by comparison of the mass spectra with those of a software database (NIST MS Search 2.0 2008) and whenever possible by comparison with GC/MS analysis of pure compounds dissolved in dichloromethane at 0,1 mg/ml.

## 2.8. Chemometric Analysis

Before chemometric analysis, the GC-MS data files were converted to netCDF format using Xcalibur Xconverter module and then processed by software tool Mzmine 2.2 for detection and construction of chromatograms, peak alignment and gap filling, creation and export of the processed data in the form of a matrix.

The data matrix was used for chemometric analysis by the software of SIMCA P-11 (Umetrics AB, Umeå, Sweden). An unsupervised multivariate analysis (Principal Components Analysis: PCA) was performed to study the similarity of different batches of

plant extract; while the influence of different treatments of the extracts was studied by supervised multivariate analysis (partial least squares regression: PLS) after orthogonal correction of signal (OSC).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Method development

Sample preparation condition was optimized. Different solvents were evaluated and the impact of removal of interfering phytochemicals such as chlorophyll was assessed. In addition, chromatographic condition were also optimized

##### 3.1.1. Sample preparation

The effectiveness of extraction was evaluated by determining the average yield in dry extract expressed as percentage (% , w/w) of sample weight. Two samples per plant (CM1, CM2 for *C. micranthum* and MS1, MS2 of *M. scaber*) was utilized.

Dichloromethane, hexane and chloroform which are the most commonly used solvents for the extraction of non-polar plant secondary metabolites were evaluated in preliminary tests under refluxed conditions [9, 27-29]., indicating that hexane gave low extraction yields, but dichloromethane and chloroform gave similar higher yields (not shown) with superimposable (not shown) chromatographic profiles of extracts. Dichloromethane was chosen as the solvent due to its low boiling point and less toxicity [9].

In addition to reflux, ultrasound stirring was also evaluated for the extraction. Both of the aforementioned extraction methods were commonly proposed in Pharmacopoeia monographs [30]

It was found that reflux gave higher yields than ultrasound stirring (Fig.1), which is consistent with what reported by Gao *et al.* [31] and Plesa *et al.* [32],

Extraction time of 15, 30 and 60 minutes were evaluated to reveal that increasing 15 min to 60 minutes only resulted in a minor increase in the average yield of extraction (Fig.2) and the vast majority of extractable compounds were recovered after the first solvent renewal (Fig.3), which are in agreement with Gao *et al.* [31] who showed that the maximum extraction efficiency is reached after 30 minutes and Jones *et al.* [9] who indicate that, generally, one renewal of the solvent allows a satisfactory depletion of interested plant components.

Accordingly, this report chose reflux for 30 minutes with one solvent renewal as sample extraction procedure

### 3.1.2. Chromatographic separation and detection

The chromatographic condition was based on the work of dos Santos Pereira *et al.* [27] who used high temperature gas chromatography coupled to mass spectrometry (HTGC-MS) with on-column injection for screening of natural herbal products. A new medium polar capillary column was used which can withstand high temperatures of 400-480°C to allow separation of species of relatively high molecular weight (MW > 600 Da) including plant extracts that may contain high molecular weight esters, n-alkanes (up to C100), lipids, oligosaccharides and porphyrins [33, 34].

Automatic splitless injection was performed.

### 3.2. Chemometric analysis

PCA (Principle Component Analysis) is a mathematical procedure that transforms the original variables into orthogonal components accounting for the largest variance in the dataset. PCA calculation results in two matrixes: the scores matrix and the loadings matrix. The scores are the coordinates of objects in the Principal Component (PC) space and inform about the distances between objects. Similar objects clusters in the same area. The loadings express the weight of the original variables. The most important original variables have the higher loading values.

PCA is a non-supervised method and is useful to appreciate how data self-organize.

When different classes of objects are to be discriminated, the class information can be included in the calculation as a Y matrix to achieve a supervised multivariate model. PLS-DA, Projection to Latent Structures-Discriminant Analysis is the most common method. This algorithm rotates the PC such that a maximum separation among classes is obtained. Filtering of the X-data by orthogonal signal correction (OSC) eliminates the non-predictive variations that are not correlated with Y variables [35, 36]. By removing the variations that are not correlated with the class distinction, OSC reinforces the between class discrimination, thus facilitating the interpretation.

The chemometric analysis was performed on chromatographic profiles of three extracts of 5 batches of *C. micranthum* (CM1 to CM5) and 4 batches of *M. scaber* (MC1 to MC4).

### 3.2.1. Influence of chlorophyll removal

The adsorption property of chlorophylls on charcoal indicated by Jones *et al.* [9] was used for extract clean-up. Fig.4 indicated that the same chromatographic peaks are observed from both of the crude and charcoal treated extract of *M. scaber* but with noticeable difference in peak intensities.

PLS-DA and affiliated techniques are used to resolve two-class problem when two groups of observations (e.g. control and disease) are compared [37]. Once the chemometric model establishes a clear distinction between the two groups a S-plot (covariance correlation plot of the t-scores and X variables) can be used to identify the most important variables responsible for this distinction [38]. This approach was employed here to appreciate the possible loss of relevant compounds after the extract was treated with charcoal to remove chlorophyll. The chromatographic profiles of either *C. micranthum* or *M. scaber* were compared through a PLS-DA after an orthogonal signal correction (OSC) applied to remove the information non correlated with the treated vs non treated class. For both *C. micranthum* and *M. scaber*, the PLS-DA score plot separated the treated batches and the non treated batches into two distinct groups. The corresponding S-plots (red area Fig.5) show the variables that either increase or diminish. Most of the variables are under expressed in treated samples indicating adsorption of the corresponding compounds by the activated charcoal.

Examining the EI mass spectra of corresponding peaks (red area Fig.5) indicated that the phytochemicals unfavorably influenced by the treatment of activated charcoal are phytosterols (retention time (Rt) 21.50 to 23 min) and quinonic derivatives (azaanthraquinone 12.72). Charcoal treated samples also showed additional peaks (Rt 9.32; 12.91; 17.36 and 17.66) due to contamination of phthalate derivatives (Fig.4). Phytosterol and quinone derivatives are partially adsorbed by the charcoal resulting in chromatographic peak intensity decrease.

### 3.2.2. Different plant batches

Principal Component Analysis (PCA) based methods are already used to reinforce the discriminating ability between different classes of samples considering within class variation. The Hotelling  $T^2$  is used to draw a confidence interval around the data point issued from a defined class. The assignment of test sample to the class is then performed in, basically, two steps. First, the distance between the spectrum to be predict and the model is calculated. This distance calculation involves the amount of residual information remaining after the spectrum

scores are calculated by using the modeled PC. If this distance exceeds a given limit, this data is considered to be too different for the model spectra to be predicted. Otherwise, its location in the PC space can be considered. In other words, this qualitative assessment consists in comparing different classes of samples after the inherent variability is modeled

Fig.6A shows the score plot obtained from the chromatographic profiles of the 5 batches of *C. micranthum* with the extraction process realized in triplicate. Axis 1 which accounts for 36% of the information shows a spread of the data into two groups: CM1 - 2 and CM3 - 4 - 5.

These groups correspond to the harvest date. CM 1 and CM 2 were harvested in 2009; while the others were harvested in 2010. The harvest date is a more pronounced source of variance than the harvest location (Côte d'Ivoire or Senegal) or the origin of the batches (plant market or industrial source). The second component (14% of the total variance) shows that the variability related to the location or origin is of the same magnitude as that of the sample preparation.

The same trend can be described in the case of *M. scaber* in Fig.6B, where batch MS1 harvested in 2008 is at the right side of axis 1 while MS2, harvested in 2009 at the left side and the two batches of 2010 (MS 3 and 4) are grouped at the center of the graph. Here also, the sample preparation appeared to have a more pronounced influence on data variation than the harvest location that differs for batches 3 and 4.

Thus, the two PCA calculated for *C. micranthum* and *M. scaber* allow to model their inherent variability. As mentioned previously, PCA models can be used for identification and/or discrimination. To appreciate the specificity of the two models, the chromatographic profiles of each herbal drug was projected in the PAC space built from the other. The distance to model of *C. micranthum* profiles projected in the *M. scaber* model and the distance to model of the *M. scaber* projected in the *C. micranthum* model showed values higher than the confidence limit set for the 5% risk. The two species were thus distinguished one from the other.

### 3.3. Compounds identification

In this study, several known classes of phytochemicals including phenolics, quinones, terpenoids and sterols were observed from the plant extracts. Some esters of terpenes, fatty acids and hydrocarbons (alkane, alkene, alkyne) were identified.

Highly volatile compounds were retrieved in low abundance due to potential loss during solvent evaporation and low levels of essential oils in *C. micranthum* and *M. scaber* as

reputed by Ekpendu *et al.* [19] that the level of essential oil is as low as 0.04% (w/w) in *M. scaber*.

The GC/MS analysis of charcoal treated dichloromethane extracts of *C. micranthum* and *M. scaber* (Figures 7 and 8) allowed the detection of about fifty phytochemicals. Structural identification of compounds was performed through comparing their mass spectra with that of NIST spectral database. The identified compounds were reported per the categories as proposed by Sumner *et al.* [13]. For the compounds which have already been reported in the literature with fragmentation pattern matching that of NIST spectral database, they are considered identified ones. For the compounds which have less satisfactory match with the database for positive structural identification, only the proposed phytochemical class is reported. Some compound is considered as "unknown" where the spectral match even cannot allow distinguishing the chemical class

For *C. micranthum* 48 compounds were found to present an exploitable mass spectrum (Table 1). Eight compounds were identified as 3-tetradecanone (Rt 9.09), palmitic acid (Rt 13.08), squalene (Rt 19.48),  $\alpha$ -tocopherol (Rt 21.36),  $\gamma$ -sitosterol (Rt 22.33),  $\alpha$ -amyirin (Rt 22.72), lupeol (Rt 22.55), betulin (Rt 22.72); Thirteen compounds were found to belong to the chemical classes of 2  $\alpha$ -tocopherol derivatives, 1 monoterpene, 2 alkynes or 4 alkanes and 4 phytol alkanoates. Twenty one compounds are unknowns and six were artifacts. Compounds including  $\gamma$ -sitosterol, betulin, lupeol,  $\alpha$ -amyirin,  $\alpha$ -tocopherol, 3-tetradecanone, derived tocopherol and monoterpene were present but in lower levels than derivatives of hydrocarbons, esters and free fatty acids. All the apolar phytochemicals compounds reported [16, 17] were identified (sitosterol, lupeol,  $\alpha$ -amyirin, palmitic acid).

For *M. scaber*, fifty one compounds were detected with exploitable mass spectra (Table 2). Fourteen compounds were identified as  $\beta$ -ionone (Rt 7.99), 2,3-dimethyl-1,4-naphthoquinone (Rt 9.55), azaanthraquinone (Rt 12.72), palmitic acid (Rt 13.15), linolenic acid (Rt 14.73), squalene (Rt 19.56),  $\alpha$ -tocopherol (Rt 21.45), campesterol (Rt 21.88), stigmasterol (Rt 22.08),  $\beta$ -sitosterol (Rt 22.41), vitamin K1 (Rt 22.59),  $\alpha$ -amyirin (Rt 22.79), oleanolic acid (Rt 23.85), ursolic acid (Rt 24.12); seventeen compounds were found belong to the chemical classes of 2  $\alpha$ -tocopherol derivatives, 3 Fatty acid derivatives, 4 alkynes, 5 alkanes and 3 phytol alkanoates; fifteen compounds were unknowns and five were artifacts. All the phytochemical compounds (azaanthraquinone,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -amyirin, oleanolic acid, ursolic acid, palmitic acid) reported in literature [19-22, 24] were identified. The extracts are particularly rich in apolar phytochemicals of interest such as quinones, coumarins, phytosterols, and triterpenes, which may be possibly responsible for pharmacological activities (antifungal, antimicrobial, anti-inflammatory and analgesic) [20-26]

#### 4. Conclusion

High temperature gas chromatography/mass spectrometric screening of dichloromethane extracts of *C. micranthum* and *M. scaber* after chlorophyll pigments removal by adsorption on activated charcoal allows establishment of chromatographic profiles of most non-polar phytochemical metabolites with possible bioactivities. Chemometrics evaluation revealed that differences in harvesting location and time induced slight but measurable variations in chromatographic profiles as indicated by the PLS-DA score plots. It is highly possible that high temperature GC-MS screening in conjunction with chemometrics could be used as a quality control tool to assess the plant materials. Firstly, a discriminant model from authenticated plant material using PLS can be built for global comparison with test samples; secondly, using PLS S-plot identifies relevant compounds that explain the variations between samples and serves as chemical markers for quality assessment.

#### Acknowledgements

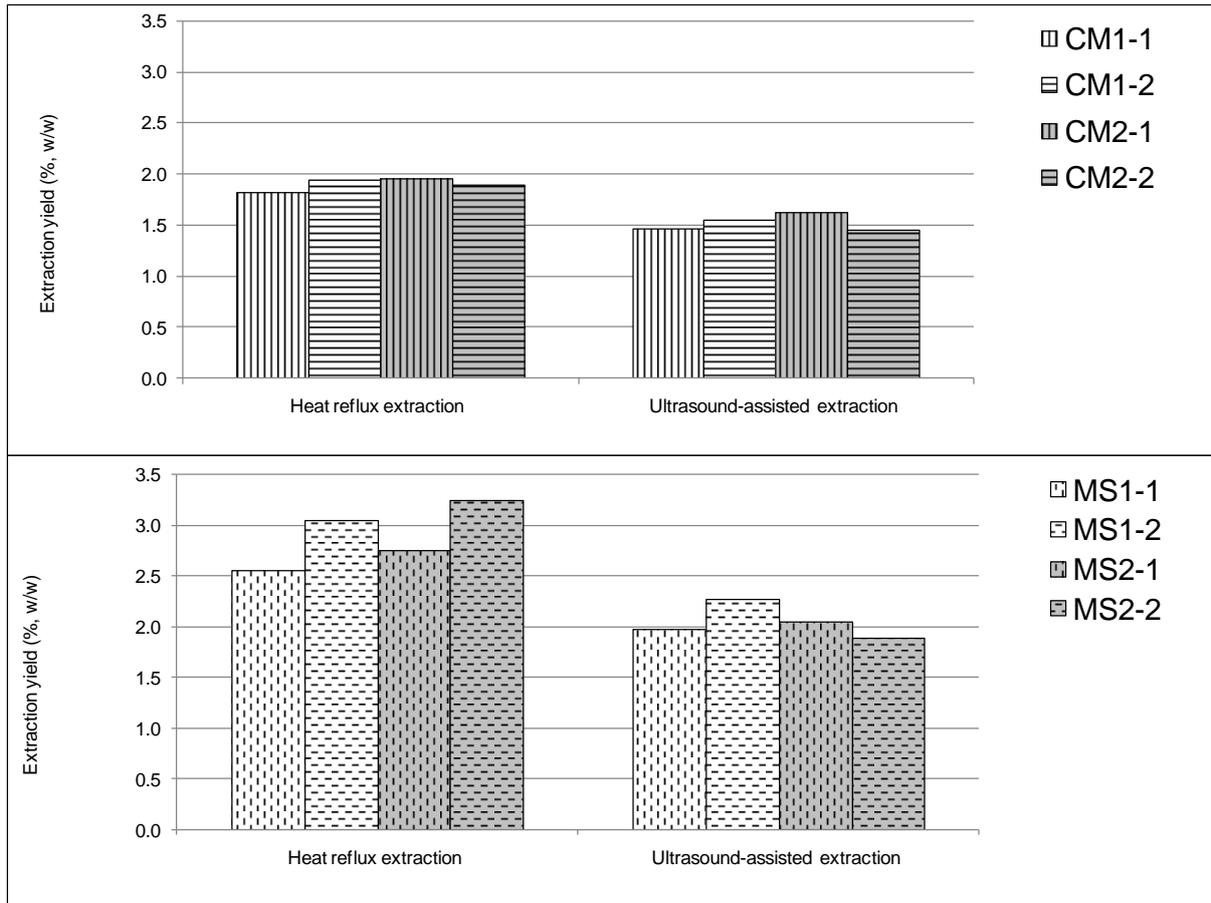
The authors wish to thank Pr Aké-Assi (National Institute of Floristic University of Abidjan Cocody) for botanical authentication.

#### References

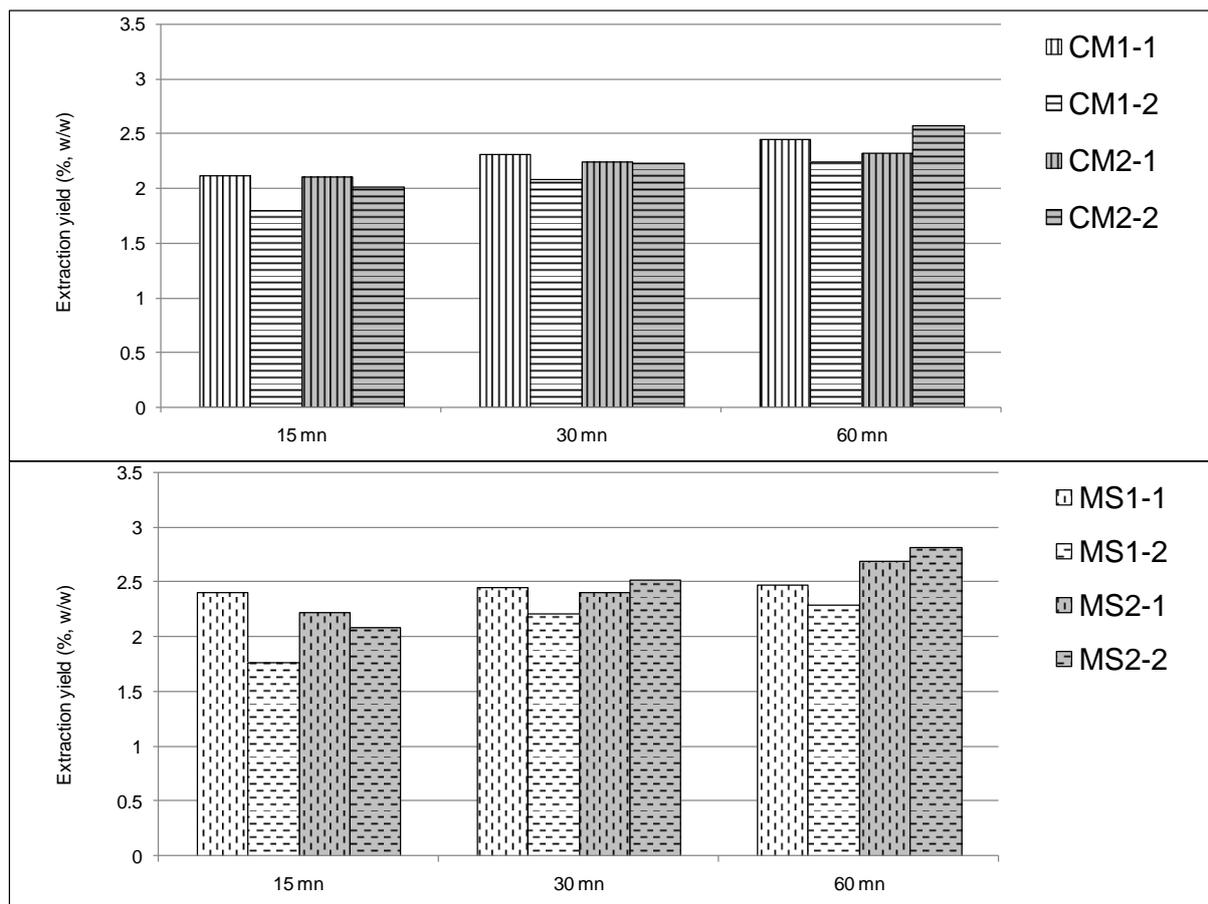
- [1] WHO, Guidelines for registration of traditional medicines in the who african region, World Health Organization, Geneve, 2010.
- [2] A. Booker, D. Johnston, M. Heinrich, Value chains of herbal medicines - research needs and key challenges in the context of ethnopharmacology, *Journal of Ethnopharmacology*, 140 (2012) 624-633.
- [3] N. Sahoo, P. Manchikanti, S. Dey, Herbal drugs: Standards and regulation, *Fitoterapia*, 81 (2010) 462-471.
- [4] WHO, Quality control methods for herbal materials, World Health Organization, Geneve, 2011.
- [5] L. Giri, H. Andola, V. Purohit, M. Rawat, R. Rawal, I. Bhatt, Chromatographic and spectral fingerprinting standardization of traditional medicines: An overview as modern tools., *Research Journal of Phytochemistry*, 4 (2010) 234-241.
- [6] A. Kamboj, Analytical evaluation of herbal drugs, in: O. Vallisuta, S.M. Olimat (Eds.) *Drug discovery research in pharmacognosy*, InTech, Croatia, 2012.
- [7] Y.-Z. Liang, P. Xie, K. Chan, Quality control of herbal medicines, *Journal of Chromatography B*, 812 (2004) 53-70.

- [8] X.-m. Liang, Y. Jin, Y.-p. Wang, G.-w. Jin, Q. Fu, Y.-s. Xiao, Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional chinese medicines, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 2033-2044.
- [9] W.P. Jones, A.D. Kinghorn, Extraction of plant secondary metabolites, in: S.D. Sarker, Z. Latif, A.I. Gray (Eds.) *Natural products isolation*, Humana Press, Totowa, 2005, pp. 323-351.
- [10] N. Rispail, R. Nash, J. Webb, Secondary metabolic profiling, in: A.J. Márquez, J. Stougaard, M. Udvardi, M. Parniske, H. Spaink, G. Saalbach, J. Webb, M. Chiurazzi (Eds.) *Lotus japonicus handbook*, Springer, Netherlands, 2005, pp. 341-348.
- [11] L. Wang, C.L. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006) 300-312.
- [12] D. Jing, W. Deguang, H. Linfang, C. Shilin, Q. Minjian, Application of chemometrics in quality evaluation of medicinal plants, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (2011) 4001-4008.
- [13] L.W. Sumner, A. Amberg, D. Barrett, M.H. Beale, R. Beger, C.A. Daykin, T.W.-M. Fan, O. Fiehn, R. Goodacre, J.L. Griffin, T. Hankemeier, N. Hardy, J. Harnly, R. Higashi, J. Kopka, A.N. Lane, J.C. Lindon, P. Marriott, A.W. Nicholls, M.D. Reily, J.J. Thaden, M.R. Viant, Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Chemical analysis working group (cawg), metabolomics standards initiative (msi). *Metabolomics*, 3 (2007) 211-221.
- [14] Y. Liang, L. Yi, Q. Xu, Chemometrics and modernization of traditional chinese medicine, *Science in China Series B: Chemistry*, 51 (2008) 718-728.
- [15] E. Adjanohoun, L. Aké Assi, Contribution au recensement des plantes médicinales de côte d'ivoire, Centre Nationale de Floristique, Université d'Abidjan-Cocody, Abidjan, 1979.
- [16] D. Olschwang, E. Bassene, J.-P. Colonna, Tradition africaine et analyse scientifique : L'utilisation du kinkéliba (*Combretum micranthum* g. Don) en afrique de l'ouest, *Epistème*, 2 (1991) 74-82.
- [17] C.R. Welch, in: Graduate School-New Brunswick Rutgers, University of New Jersey, New Brunswick, 2010, pp. 268.
- [18] Pharmacopée Française, Kinkéliba, *Combretum micranthum*., 11 ed., ANSM, France, 2012.
- [19] T.O.E. Ekpendu, A.A. Adesomoju, O. Ekundayo, J.I. Okogun, I. Laakso, Constituents of the volatile oil of *Mitracarpus scaber* zucc, *Flavour and Fragrance Journal*, 8 (1993) 269-271.
- [20] T.O. Ekpendu, P.A. Akah, A.A. Adesomoju, J.I. Okogun, Antinflammatory and antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extracts, *Pharmaceutical Biology*, 32 (1994) 191-196.
- [21] G.M. Bonga, M. Vanga-Mandah, C. de Souza, F.R. Guede-Guina, Mise en evidence de phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*, *Revue de Medecines et Pharmacopees Africaines*, 9 (1995) 21-30.
- [22] G. Bisignano, R. Sanogo, A. Marino, R. Aquino, V. D'Angelo, M.P. Germano, R. De Pasquale, C. Pizza, Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents, *Letters in Applied Microbiology*, 30 (2000) 105-108.
- [23] R.K. Cimanga, K. Kambu, L. Tona, T. De Bruyne, A. Sandra, J. Totte, L. Pieters, A.J. Vlietinck, Antibacterial and antifungal activities of some extracts and fractions *Mitracarpus scaber* zucc. (rubiaceae), *Journal of Natural Remedies*, 4 (2004) 17-25.
- [24] F. Gbaguidi, G. Muccioli, G. Accrombessi, M. Moudachirou, J. Quetin-Leclercq, Densitometric hptlc quantification of 2-azaanthraquinone isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity against *Dermatophilus congolensis*, *Journal of Planar Chromatography*, 18 (2005) 377-379.
- [25] R. Sanogo, A. Konipo, A. Maiga, A.E. Arama, D. Diallo, F. Bougoudogo, Formulation d'une pommade dermique à base d'extraits de *Mitracarpus scaber* (zucc). *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaines*, 14 (2006) 159-177.
- [26] M.-C. Makambila-Koubemba, B. Mbatchi, D. Ardid, A. Gelot, C. Henrion, R. Janisson, A.A. Abena, J.-T. Banzouzi, Pharmacological studies of ten medicinal plants used for analgesic purposes in congo brazzaville, *International Journal of Pharmacology*, 7 (2011) 608-615.

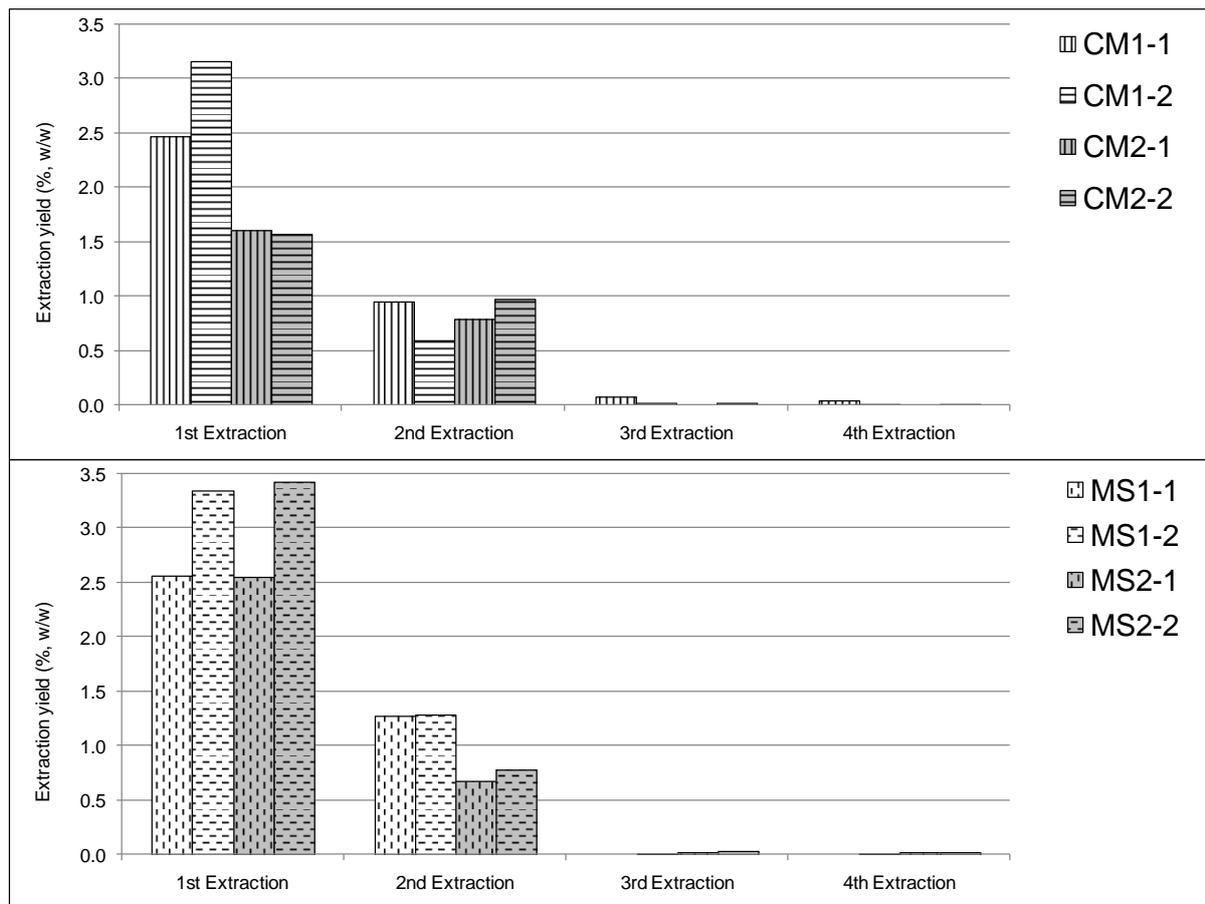
- [27] A. dos Santos Pereira, S.A. Carbonell, F.R. de Aquino Neto, A.C.F. do Amaral, R.A. Barnes, High-temperature gas chromatography-mass spectrometry with glass capillary columns for the screening of natural products, *Journal of Chromatography A*, 947 (2002) 255-265.
- [28] H. Wagner, S. Bladt, *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*, 2 ed., Springer, Berlin, 1996.
- [29] A. Lytovchenko, R. Beleggia, N. Schauer, T. Isaacson, J. Leuendorf, H. Hellmann, J. Rose, A. Fernie, Application of gc-ms for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues, *Plant Methods*, 5 (2009) 4.
- [30] M. Mosihuzzaman, M. Iqbal Choudhary, Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine., *Pure and Applied Chemistry*, 80 (2008) 2195-2230.
- [31] M. Gao, C.-Z. Liu, Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* maxim, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (2005) 1461-1463.
- [32] C. Plesa, D. Hadaruga, N. Hadaruga, A. Branic, A. Ardelean, A. Lupea, *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* hydrophobic extracts: A multivariate analysis approach, *Revista de Chimie*, 62 (2011) 941-946.
- [33] A. dos Santos Pereira, F.R. de Aquino Neto, High-temperature high-resolution gas chromatography: Breaching the barrier to the analysis of polar and high molecular weight compounds, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18 (1999) 126-136.
- [34] V.A. Isidorov, L. Szczepaniak, Gas chromatographic retention indices of biologically and environmentally important organic compounds on capillary columns with low-polar stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 8998-9007.
- [35] L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, J. Trygg, C. Wikström, S. Wold, *Multi- and megavariate data analysis part i basic principles and applications*, second revised and enlarged edition, Umetrics AB, Sweden, 2006.
- [36] S. Wold, H. Antti, F. Lindgren, J. Öhman, Orthogonal signal correction of near-infrared spectra, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44 (1998) 175-185.
- [37] J. Trygg, E. Holmes, T. Lundstedt, Chemometrics in metabonomics, *Journal of Proteome Research*, 6 (2007) 469-479.
- [38] S. Wiklund, E. Johansson, L. Sjöstrom, E.J. Mellerowicz, U. Edlund, J.P. Shockcor, J. Gottfries, T. Moritz, J. Trygg, Visualization of gc/tof-ms based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using opls class models, *Analytical Chemistry*, 80 (2007) 115-122.



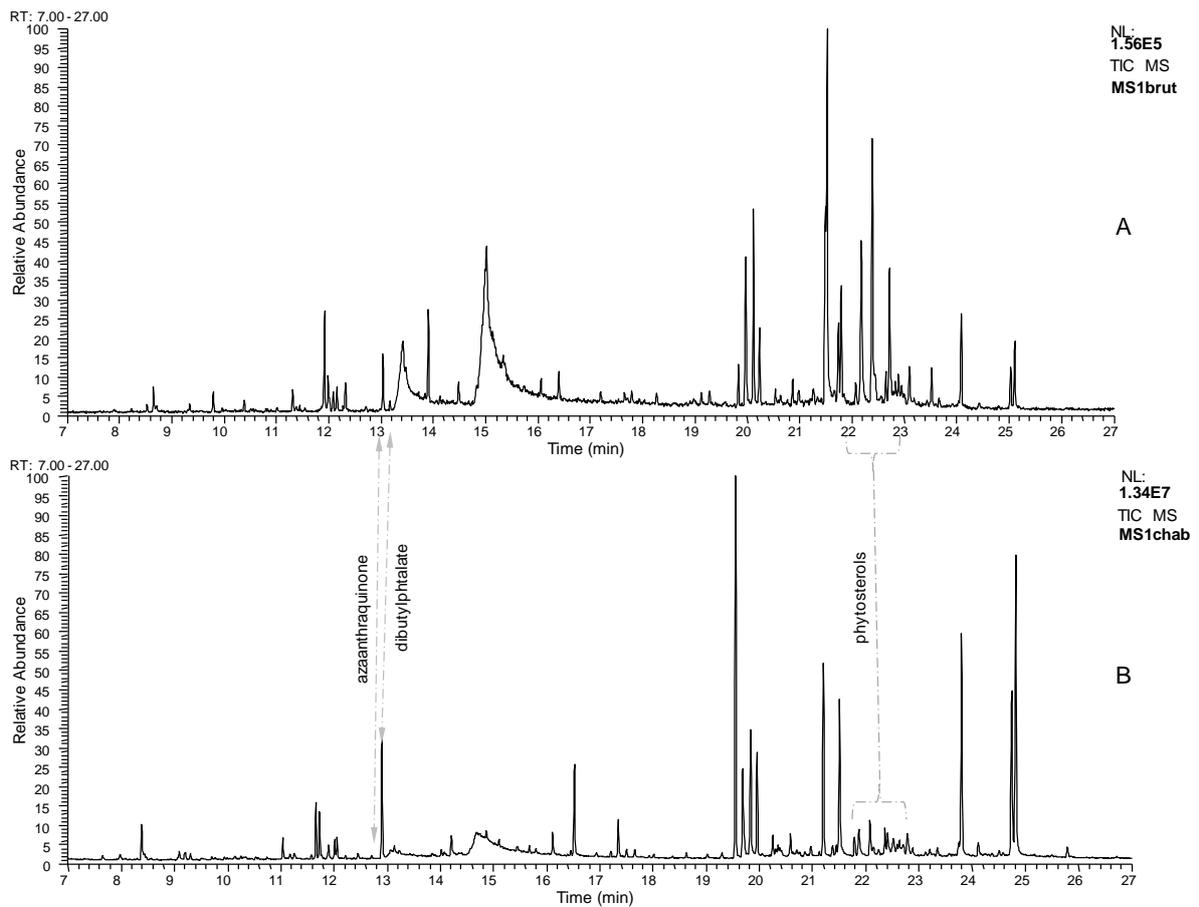
**Fig.1** Comparison of extraction yields of *C. micranthum* (CM1; CM2) and *M. scaber* (MS1; MS2) by heating under reflux and ultrasound stirring



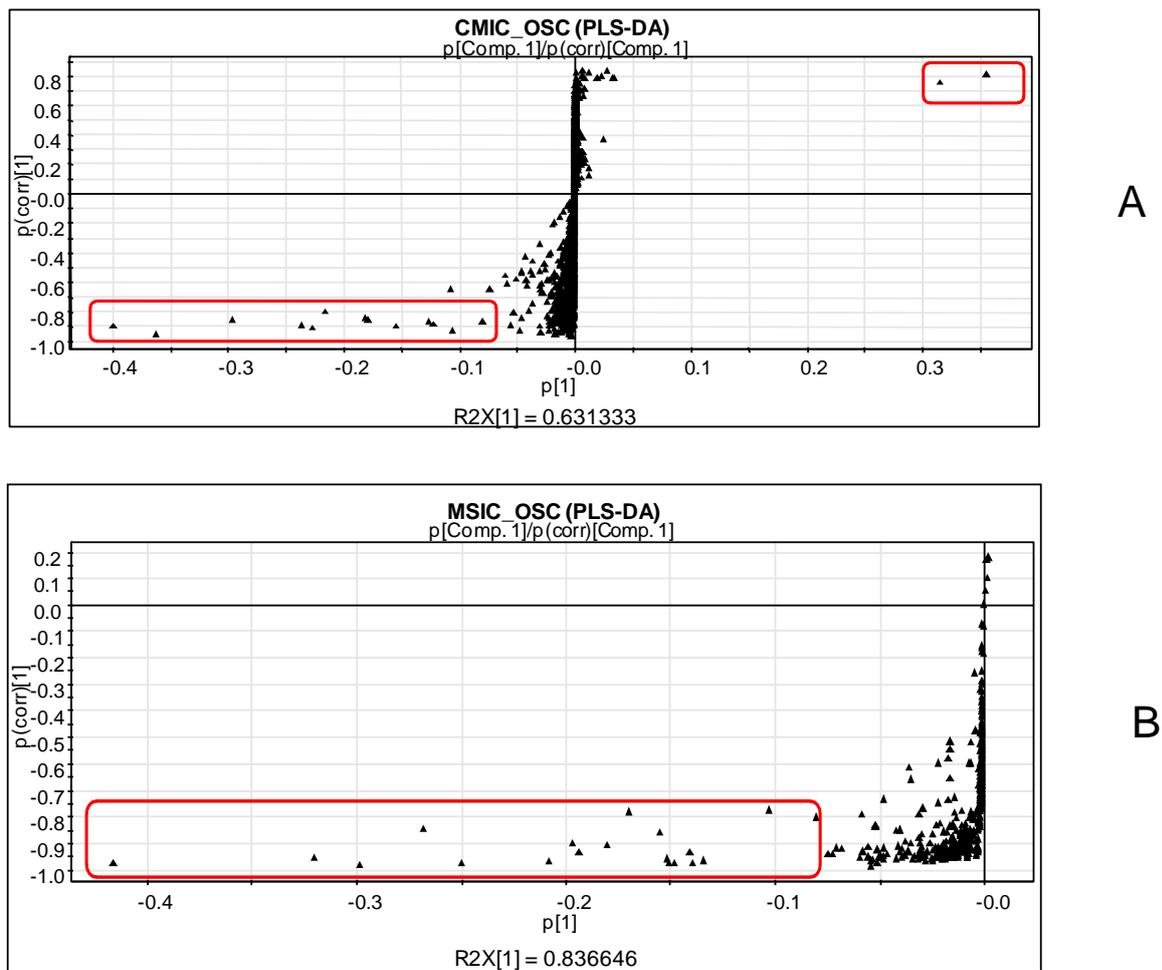
**Fig.2** Extraction yield of *C. micranthum* (CM1; CM2) and *M. scaber* (MS1; MS2) by refluxing according to the extraction time



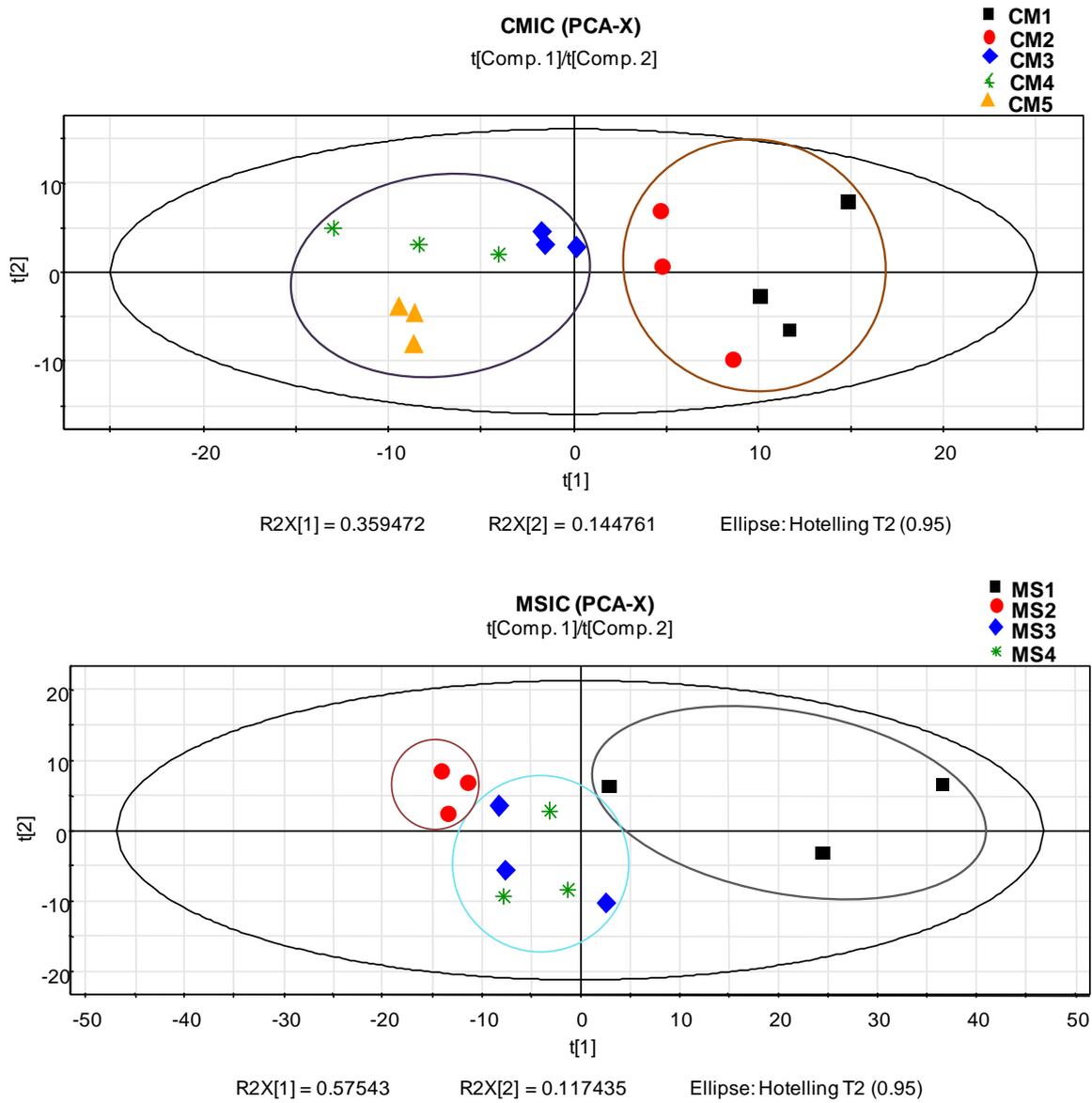
**Fig.3** Extraction yield of *C. micranthum* (CM1; CM2) and *M. scaber* (MS1; MS2) by refluxing according to the number of solvent renewal



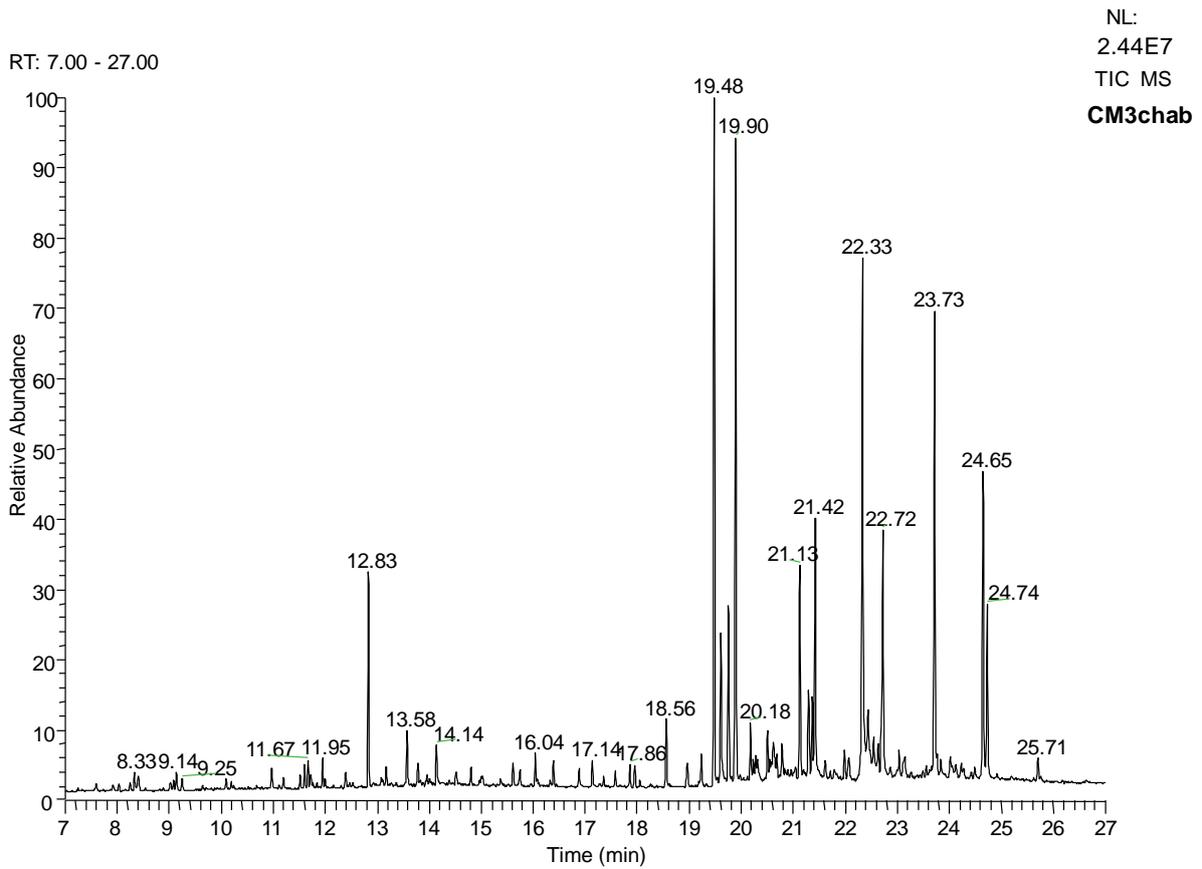
**Fig.4** Comparison of Total Ion Current chromatograms of *M. scaber* (MS1) crude extracts (A) and charcoal treated extracts (B)



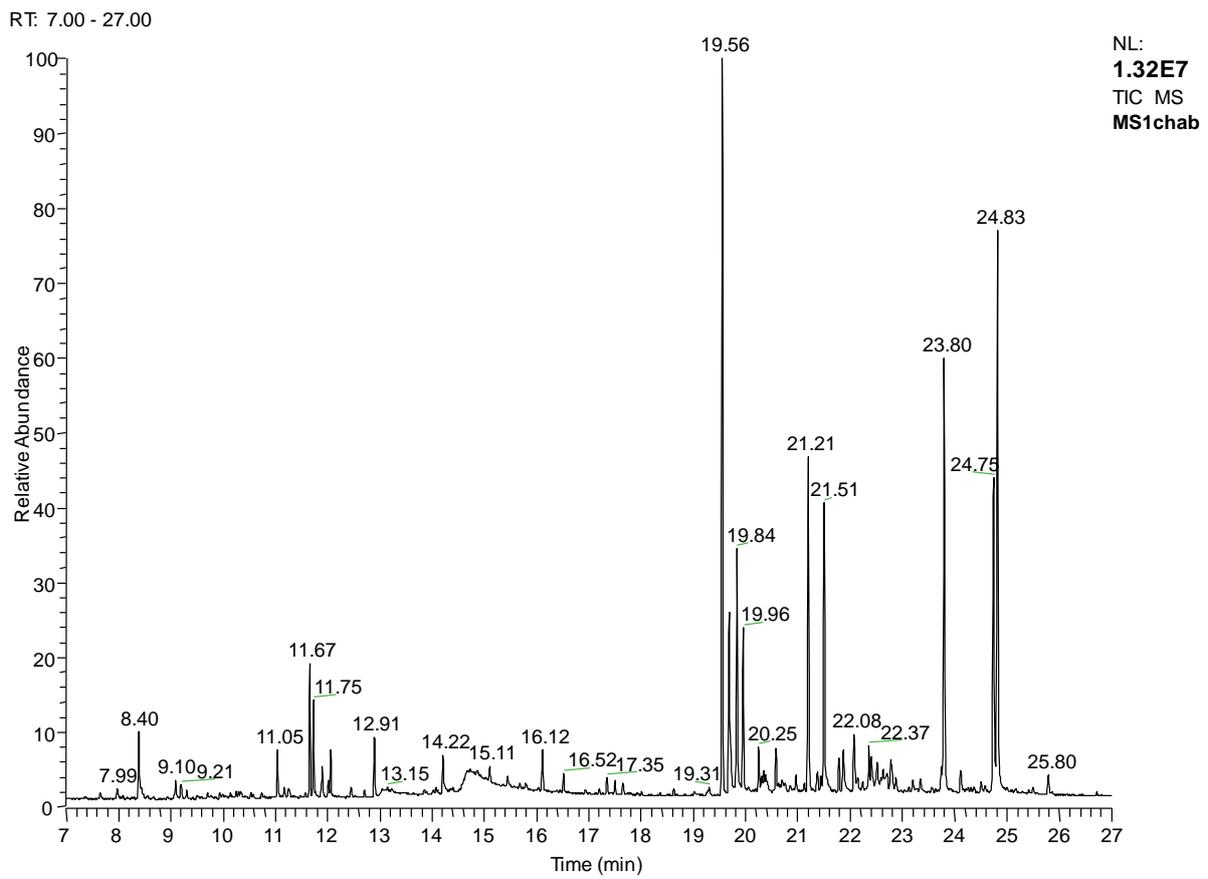
**Fig.5** S-Plot calculated for the first component of the PLS-DA (after OSC filtering) from chromatograms of *C. micranthum* (A) and *M. scaber* (B) extracts. Red area shows the variables (compounds) that are affected by the charcoal treatment



**Fig.6** Score plot of chromatographic profiles of batches of *C. micranthum* (A) and *M. scaber* batches (B). The inner ellipsoids show the harvest date. The outer ellipsoid is the hotelling T2



**Fig.7** GC-MS TIC chromatogram of a charcoal treated extract of *C. micranthum* (CM3)



**Fig.8** GC-MS TIC chromatogram of a charcoal treated extract of *M. scaber* (MS1)

Table 1

Phytochemical compounds detected by GC-MS (electron impact) in the charcoal treated extract of *C. micranthum* (CM3)

Tr (mn)	Compounds	<i>m/z</i>
8.33	Artifact	<b>111</b> 137 67 109 81 79
8.41	Unknown	<b>67</b> 91 107 79 81 135
9.03	Unknown	<b>127</b> 99 91 93 55 136
9.09	3-Tetradecanone <sup>b</sup>	<b>57</b> 95 109 55 81 183 85
9.14	Unknown	<b>57</b> 71 85 55 69
9.25	Unknown	<b>149</b> 177 176 150 105
9.65	Unknown	<b>91</b> 109 107 81 79
10.10	Artifact	<b>73</b> 355 147 221 401
10.20	Unknown	<b>123</b> 55 81 67 119 79
10.98	Monoterpene <sup>c</sup>	<b>135</b> 111 95 107 163 178
11.52	Unknown	<b>87</b> 61 55 60 129 228 57
11.60	Alkyne <sup>c</sup>	<b>67</b> 95 81 55 79 123
11.67	Unknown	<b>95</b> 81 109 67 55 69
11.95	Artifact	<b>149</b> 150
12.00	Alkyne <sup>c</sup>	<b>67</b> 81 95 79 55 109
12.40	Unknown	<b>149</b> 81 93 107 95 79
12.83	Artifact	<b>149</b> 150
13.08	Palmitic acid <sup>a</sup>	<b>55</b> 87 73 57 129 83 60
13.18	Artifact	<b>73</b> 281 147 55 87 207
13.58	Artifact	<b>75</b> 117 73 129 313
13.79	Unknown	<b>184</b> 119 157 91 79 131 252
14.14	Unknown	<b>67</b> 81 95 123 55 71
15.61	Unknown	<b>57</b> 71 85 55 69
16.04	Unknown	<b>99</b> 55 69 95 81
16.39	Unknown	<b>57</b> 71 85 55 99
17.14	Unknown	<b>57</b> 71 85 55 83
17.86	Alkane <sup>c</sup>	<b>57</b> 71 286 85 55 99
18.05	Unknown	<b>316</b> 299 275 317 67 93
18.56	Alkane <sup>c</sup>	<b>57</b> 71 85 99 55 97
19.48	Squalene <sup>a</sup>	<b>81</b> 95 79 67 121 69 93
19.61	Unknown	<b>419</b> 153 193 191 420 402 137
19.76	Unknown	<b>419</b> 153 137 193 402 177 420
19.90	Alkane <sup>c</sup>	<b>57</b> 71 99 55 113
20.18	Unknown	<b>81</b> 93 91 67 79 107
20.51	Unknown	<b>57</b> 85 71 67 109
21.13	Alkane <sup>c</sup>	<b>57</b> 71 85 99 55 113
21.30	Unknown	<b>167</b> 99 139 177 57
21.36	$\alpha$ -Tocopherol <sup>a</sup>	<b>165</b> 164 430 205 166 430
21.42	$\alpha$ -tocopherol derivative <sup>c</sup>	<b>165</b> 150 178 180 203 138
22.33	$\gamma$ -Sitosterol <sup>b</sup>	<b>145</b> 213 161 107 135 91
22.44	$\alpha$ -Amyrin <sup>a</sup>	<b>203</b> 218 189 119 105 107 121
22.55	Lupeol <sup>a</sup>	<b>134</b> 105 204 120 122 189
22.72	Betulin <sup>a</sup>	<b>107</b> 95 119 93 147 189 81
23.15	$\alpha$ -tocopherol derivative <sup>c</sup>	<b>165</b> 164 430 205 166 431 136
23.73	Phytyl alkanoate <sup>c</sup>	<b>95</b> 81 67 123 109 55 69 96
24.65	Phytyl alkanoate <sup>c</sup>	<b>81</b> 95 67 55 79 109 123 245
24.74	Phytyl alkanoate <sup>c</sup>	<b>81</b> 95 79 67 55 135 121 277
25.71	Phytyl alkanoate <sup>c</sup>	<b>95</b> 81 67 123 55 109 137

a Identified compounds

b Putatively annotated compounds

c Putatively characterized compound classes [13]

Base peak is indicated in bold character

Table 2  
Phytochemical compounds detected by GC-MS (electron impact) in the charcoal treated extract of *M. scaber* (MS1)

Tr (mn)	Compounds	<i>m/z</i>
7.66	Unknown	<b>91</b> 107 93 79 67
7.99	$\beta$ -Ionone <sup>b</sup>	<b>177</b> 123 91 77 105
8.40	Artifact	<b>67</b> 111 109 137 79 95
9.10	Unknown	<b>127</b> 99 55 67 79
9.21	Unknown	<b>71</b> 55 79 67 69
9.32	Artifact	<b>149</b> 65 177 105 50
9.55	2,3-dimethyl- 1,4-Naphthoquinone <sup>b</sup>	<b>91</b> 67 77 79 107 135
11.05	Unknown	<b>135</b> 79 95 111 67
11.67	Alkyne <sup>c</sup>	<b>67</b> 81 95 55 79 69
11.75	Alkyne <sup>c</sup>	<b>95</b> 81 67 55 58 109
11.91	Unknown	<b>67</b> 79 81 95 55 109
12.07	Alkyne <sup>c</sup>	<b>67</b> 81 95 79 55
12.72	Azaanthraquinone <sup>a</sup>	<b>209</b> 153 126 181 50 74
12.91	Artifact	<b>149</b> 150 76 105 65
13.15	Palmitic acid <sup>a</sup>	<b>55</b> 87 73 57 81 60 57
14.22	Alkyne	<b>67</b> 81 55 95 71 79 69
14.73	Linolenic acid <sup>a</sup>	<b>79</b> 67 81 55 93 77
14.87	Faty acid derivative <sup>c</sup>	<b>87</b> 57 117 185 98
15.11	Faty acid derivative <sup>c</sup>	<b>67</b> 81 79 55 95
16.12	Unknown	<b>99</b> 67 69 71 55 95 109
16.52	Faty acid derivative <sup>c</sup>	<b>111</b> 129 55 83 57 101 71
17.35	Artifact	<b>149</b> 167
17.51	Unknown	<b>254</b> 239 342 255 97
17.66	Artifact	<b>149</b> 167
18.63	Alkane <sup>c</sup>	<b>57</b> 71 85 55 67 99
19.31	Alkane <sup>c</sup>	<b>57</b> 71 85 55 69 99
19.56	Squalene <sup>a</sup>	<b>81</b> 69 79 67 95 121
19.69	Unknown	<b>153</b> 137 55 81 125 419 139
19.84	Unknown	<b>137</b> 153 55 81 139 125 419
19.96	Alkane <sup>c</sup>	<b>57</b> 71 85 55 99 69
20.25	Unknown	<b>81</b> 93 91 79 67 107 105 69
20.59	Alkane <sup>c</sup>	<b>57</b> 71 85 55
21.21	Alkane <sup>c</sup>	<b>57</b> 71 85 55
21.45	$\alpha$ -Tocopherol <sup>a</sup>	<b>165</b> 164 430 205 166
21.51	$\alpha$ -tocopherol derivative <sup>c</sup>	<b>165</b> 150 178 180 203 138
21.79	Unknown	<b>71</b> 57 85 99 113
21.88	Campesterol <sup>a</sup>	<b>91</b> 105 79 145 81 119
22.08	Stigmasterol <sup>a</sup>	<b>55</b> 81 79 91 105 145 67
22.37	Unknown	<b>57</b> 71 85 55 99
22.41	$\beta$ -Sitosterol <sup>a</sup>	<b>91</b> 105 93 95 147 79 119
22.52	Unknown	<b>203</b> 81 218 95 119 79
22.59	Phytonadione (Vitamin K1) <sup>b</sup>	<b>186</b> 225 211 450 124
22.79	$\alpha$ -Amyrin <sup>a</sup>	<b>218</b> 147 203 119 189
22.88	Unknown	<b>95</b> 107 109 91 79 123 81
23.23	$\alpha$ -tocopherol derivative <sup>c</sup>	<b>165</b> 164 430 205 203 165
23.80	Unknown	<b>67</b> 81 95 55 123 79 109
23.85	Oleanolic acid <sup>a</sup>	<b>203</b> 189 133 105 119 466
24.12	Ursolic acid <sup>a</sup>	<b>133</b> 203 189 73 119 173 320
24.75	Phytyl alkanoate <sup>c</sup>	<b>67</b> 81 95 55 79 109 123 137
24.83	Phytyl alkanoate <sup>c</sup>	<b>67</b> 79 95 81 55 109 123 135 149
25.80	Phytyl alkanoate <sup>c</sup>	<b>67</b> 95 81 55 123 79 69 57 109

a Identified compounds

b Putatively annotated compounds

c Putatively characterized compound classes [13]

Base peak is indicated in bold character

## **II. ETABLISSEMENT DE PROFILS EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE : Projet de Publication**

La deuxième étude a porté sur la chromatographie liquide haute performance (HPLC), méthode populaire et couramment utilisée pour l'analyse des médicaments traditionnels à base de plantes.

Durant cette étude les mêmes échantillons de drogues végétales de la première étude ont été analysés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse.

Les différents résultats obtenus sont présentés sous forme de projet de publication à soumettre.

**Etablissement de profils en chromatographie liquide non-aqueuse des métabolites apolaires pour l'évaluation de la qualité des médicaments traditionnels africains à base de plantes**

**Establishing non-aqueous liquid chromatographic profiles of non-polar metabolites for quality assessment of african traditional herbal medicinal products**

Nicaise F. BONY <sup>(1) (2)</sup>, Danielle LIBONG <sup>(1)</sup>, Pierre CHAMPY <sup>(3)</sup>, Anglade K. MALAN <sup>(2)</sup>, Pierre CHAMINADE <sup>(1)</sup>

1 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, EA4041 IFR141, Faculté de Pharmacie, Univ. Paris-Sud, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

2 Département de Chimie Analytique, Chimie Minérale et Générale, Technologie Alimentaire, Unité de Formation et de Recherche (UFR) des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université d'Abidjan-Cocody 01 BP V 34 Abidjan, République de Côte d'Ivoire

3 Laboratoire de Pharmacognosie, CNRS UMR 8076 BioCIS, LabEX LERMIT, Faculté de Pharmacie Univ. Paris-Sud, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

## Résumé

La qualité des médicaments traditionnels africains à base de plantes a un grand impact sur leur innocuité et leur efficacité. L'évaluation de la qualité des médicaments traditionnels africains est difficile, car ce sont des mélanges complexes de plusieurs drogues végétales ou des préparations à base de drogues végétales. La source végétale est souvent inconnue et/ou très variable. Le profil chromatographique des métabolites phytochimiques constitue un outil important pour le contrôle de qualité de ces produits.

L'objectif de ce travail est de proposer un protocole de préparation des échantillons et d'établissement de profil par chromatographie liquide des métabolites apolaires pour l'évaluation de la qualité des médicaments traditionnels à base de plantes.

La méthodologie est basée sur le traitement chimiométrique des profils chromatographiques des métabolites apolaires issus de différents lots de feuilles de *Combretum micranthum* et *Mitracarpus scaber*.

Le profilage métabolique est effectué par chromatographie liquide sur Carbone Graphite Poreux en milieu non-aqueux, couplée à la spectrométrie de masse par ionisation chimique à pression atmosphérique, après extraction au dichlorométhane et élimination de la chlorophylle adsorbée sur charbon actif.

La méthode d'analyse par chromatographie liquide non aqueuse en phase inverse permet de détecter la plupart des métabolites secondaires apolaires bioactifs ou non déjà identifiés dans les feuilles des deux espèces de plante.

L'analyse chimiométrique des données utilisant l'analyse PLS-discriminante avec ou sans correction orthogonale du signal, appliquée aux profils chromatographiques des lots de feuilles de *Combretum micranthum* et *Mitracarpus scaber*, a montré de faibles différences entre les lots de chaque drogues végétales, et une distinction des deux drogues végétales l'une de l'autre.

Mots-clés: profil chromatographique liquide non aqueux, Carbone Graphite Poreux; métabolites apolaires; Chimiométrie; médicaments traditionnels à base de plantes, *Combretum micranthum*, *Mitracarpus scaber*

## 1 Introduction

Les médicaments traditionnels à base de plantes sont très utilisés par les populations africaines (80%) pour leur besoin de santé (Organisation Mondiale de la Santé). Leur utilisation rationnelle nécessite qu'ils fassent la preuve de leur innocuité, efficacité thérapeutique et qualité pharmaceutique [1,2].

La qualité des médicaments à base de plantes a un impact direct sur leur innocuité et leur efficacité. Des rapports ont montré des effets secondaires associés aux falsifications et à la présence de contaminants (métaux lourds, pesticides et micro-organismes) [3].

L'évaluation de la qualité des médicaments à base de plantes utilisés en Afrique est difficile, car ce sont des mélanges complexes de plusieurs drogues végétales ou de préparations à base de drogues végétales auxquels peuvent être associées des drogues minérales et/ou animales. Aussi la source, la récolte et la préparation des matières premières sont très variables [1,2].

Pour l'évaluation de la qualité de ces médicaments complexes, une approche multi-technique est nécessaire afin d'authentifier le lien entre les composants et l'usage traditionnel [4,5].

Le profil chromatographique des métabolites, modèle global des constituants pharmacologiquement actifs et/ou chimiquement caractéristiques présents, constitue un bon outil pour l'évaluation qualitative et quantitative des médicaments à base de plantes [4-7]

Les énormes volumes de données contenus dans les profils chromatographiques exigent de puissants outils de traitement des données, tel que la chimiométrie qui permet l'extraction de l'information multivariée utile pour comprendre les changements et les variations des profils chromatographiques [8-10].

Le développement de la spectrométrie de masse (MS) fait que les techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse (GC-MS et HPLC-MS) sont les plus couramment utilisées dans les profilages métaboliques des plantes médicinales [6-8].

Parmi ces techniques l'HPLC, est une méthode populaire et couramment utilisée pour l'analyse des médicaments traditionnels à base de plantes, car elle est facile à utiliser et n'est pas limitée par la volatilité ou l'instabilité thermique des constituants des échantillons contrairement à la GC. Aussi plusieurs types de phase stationnaire sont utilisés et cette méthode chromatographique peut être associée à de nombreux détecteurs (UV, DEDL, Corona-CAD, IR-TF, SM et RMN) offrant ainsi beaucoup de possibilités pour l'analyse de différentes classes de composés chimiques. [5-7,11,12]

L'objectif de cette étude est de proposer une technique performante d'établissement de profils en chromatographie liquide haute performance des métabolites secondaires apolaires pour l'évaluation de la qualité des médicaments traditionnels.

Pour l'évaluation qualitative des profils métaboliques durant l'étude expérimentale, nous avons sélectionné deux drogues végétales largement utilisées en Afrique de l'Ouest notamment en Côte d'Ivoire [13], et dans lesquelles plusieurs composés polaires et apolaires ont été identifiés (feuilles de Kinkeliba *Combretum micranthum* G. Don, Combretaceae et feuilles de *Mitracarpus scaber* Zucc. Rubiaceae).

Elles diffèrent également par rapport aux fractions utilisées en thérapeutique : pour *C. micranthum* l'activité thérapeutique traditionnelle est liée aux composés polaires (extrait aqueux) [14-16], par contre pour *Mitracarpus scaber*, l'activité thérapeutique traditionnelle est basée sur les composés peu polaires ou apolaires [17-23].

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Produits chimiques

Tous les produits utilisés sont de qualité analytique.

*Substances de référence*: azaantraquinone (benz-[ $\gamma$ ]-isoquinoléine-5,10-dione),  $\alpha$ -amyrine, artémisinine, carotène, campesterol, *trans*-caryophyllène, ginkgolide A, linalol, lupéol, 4-méthoxyacétophenone 1, 4-naphtoquinone, acide oléanolique, acide palmitique,  $\alpha$ -pinène, psoralène, réserpine,  $\beta$ -sitostérol, squalène,  $\alpha$ -terpinéol, thymol,  $\alpha$ -tocophérol,  $\alpha$ -tocophérol acétate, tripalmitoléine, acide ursolique et acide formique ont été obtenus auprès de Sigma - Aldrich (Saint-Quentin Fallavier France); eugénol de Extrasynthèse (Genay, France). charbon actif de Roth (Lauterbourg, France).

*Solvants de grade HPLC*: chloroforme, dichlorométhane, éthanol 96%, heptane, méthanol et propanol-2 fournis par VWR<sup>®</sup> International (Fontenay-sous-Bois, France).

### 2.2 Appareillage

- La chaîne HPLC comprend : un dégazeur (Degasys D6-1310 Eurosep, Cergy Pontoise, France), une pompe ternaire (Jasco 980 système gradient GPL, Kyoto, Japon), un passeur automatique d'échantillon (Kontron 360) avec une boucle de 20  $\mu$ l, un four à colonne (Cluzeau 560-CIL, Saint Foy Le Grande, France) et un détecteur d'aérosol chargé (Corona<sup>®</sup> CAD<sup>TM</sup> ESA Biosciences, Chelmsford, MA, USA). Les chromatogrammes ont été enregistrés en utilisant le logiciel KromaSystem 2000 de Bio-Tek Kontron Instruments (Milan, Italie).

- Pour la HPLC/MS, le système chromatographique comprend : un dégazeur, une pompe quaternaire, un échantillonneur automatique HP 1050 (Hewlett-Packard ® GmbH, Böblingen, Allemagne) et un four à colonne (Cluzeau 560-CIL, Saint Foy la Grande, France) couplé à un spectromètre de masse API3000 triple quadripôle (TQ-MS ABSciex, Allemagne) équipé d'une source ESI et APCI. Le système est contrôlé par un ordinateur avec le logiciel d'acquisition de données Analyst 1.4.1 (Applied Biosystems / MDS-SIEX).
- Colonne PolyVinyl Alcool (PVA-Sil YMC; 5 µm ; 150 x 2,1 mm avec précolonne 10 x 2,1 mm) fournie par Interchim Montluçon, France).
- Colonne de Carbone Graphite Poreux (PGC Hypercab 5 µm ; 100 x 2,1 mm avec précolonne 10 x 2,1 mm) obtenue chez Thermo Fisher Scientific (Courtabeouf, France).

### 2.3 Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les échantillons de deux drogues végétales :

. Cinq lots de feuilles de *C. micranthum* G. Don. (CM1 à CM5) :

- CM1 (Septembre 2009), CM4 (Octobre 2010) obtenus au marché aux plantes dans la commune d'Adjamé (Côte d'Ivoire) ;
- CM2 (Avril 2009) et CM3 (Octobre 2010) (matières premières d'une industrie de phytomédicament, fournies par le laboratoire de chimie analytique, Faculté de Pharmacie, Université de Cocody-Abidjan) ;
- CM5 (Octobre 2010) provenant du Sénégal.

. Quatre lots de feuilles de *M. scaber* Zucc. (MS1 à MS4) :

- MS1 (Octobre 2008), MS2 (Avril 2009), MS3 (Octobre 2010) récoltés au jardin botanique de l'Université d'Abidjan Cocody ;
- MS4 (Octobre 2010) récolté dans la commune de Bingerville (Côte d'Ivoire).

### 2.4. Préparation des échantillons

#### 2.4.1. Extraction

2 g de poudre de plante ont été extraits deux fois par chauffage à reflux avec 20 ml de dichlorométhane pendant trente minutes et ensuite filtrés à travers un papier filtre Whatman n° 42. Les filtrats ont été réunis et évaporés sous pression réduite à 40-45 ° C. Le résidu sec a été repris avec 5 ml du même solvant, puis filtré sur filtre seringue en téflon (0,22 µm). Les extraits ont été dilués à 10 mg / ml dans le dichlorométhane.

#### **2.4.2. Elimination de la chlorophylle**

L'élimination de la chlorophylle a été réalisée par adsorption sur charbon actif (6 mg pour 1 mg résidu sec), en secouant 2 minutes puis filtration à travers un papier filtre (Whatman n° 42). Le filtrat a été utilisé pour l'analyse HPLC.

#### **2.5. Optimisation de la séparation chromatographique**

L'optimisation de la séparation chromatographique a été réalisée sur les colonnes (PVA-Sil et PGC Hypercab) à 25°C (température ambiante).

Les solvants ont été dégazés avant utilisation et la phase mobile à un débit de 0,4 ml/min est dégazée en continu. La détection est réalisée avec un détecteur d'aérosol chargé (CAD) à 35 psi de pression de gaz et une température de 35°C.

#### **2.6. Spectrométrie de masse**

Après séparation chromatographique de 10 µl d'extrait à un débit de 0,4 ml/min, l'éluat est introduit dans le spectromètre de masse avec source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et un analyseur triple quadripôle. Les paramètres d'ionisation sont les suivants : gaz de nébulisation 6 (unité arbitraire), gaz auxiliaire 9 (u.a.), température de la source (350 °C), potentiel de declustering 56 V, potentiel de focalisation 370 V et potentiel d'entrée 11V. Une méthode d'acquisition en balayage « full scan » en ionisation positive entre  $m/z$  100 et  $m/z$  1200 a été utilisée.

#### **2.7. Identification des composés**

Les composés ont été caractérisés par leur temps de rétention et leur spectre de masse et si possible identifiés par comparaison à des composés purs analysés à la concentration de 25 µg/ml dans les mêmes conditions.

#### **2.8. Analyse chimiométrique**

Avant l'analyse chimiométrique, les données ont été converties au format mzData avec le logiciel Wiff to mzData (v 1.0.0.4) fourni par ABSciex. Les données brutes ont ensuite été traitées par le logiciel Mzmine 2.2 pour la détection, l'alignement des pics et le remplissage des lacunes, la création et l'exportation des données traitées sous la forme d'une matrice.

La matrice de données a été utilisée pour l'analyse chimiométrique par le logiciel SIMCA P-11 (Umetrics AB, Umeå, Suède).

Nous avons effectué une analyse multivariée non supervisée (Analyse en Composantes Principales: ACP) afin d'étudier la similarité entre les différents lots de plantes.

L'impact du mode d'élimination de la chlorophylle des extraits a été évalué par une analyse multivariée supervisée (régression partielle des moindres carrés: PLS) après correction orthogonale du signal (OSC).

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Optimisation de la séparation chromatographique

L'optimisation des conditions chromatographiques est fondée sur l'exploitation des informations complémentaires des deux types de méthodes chromatographiques liquides: polarité de phases normales (élution par ordre de polarité croissante) et polarité de phases inversées (élution par ordre de polarité décroissante).

Le développement de la méthode de séparation chromatographique liquide des métabolites apolaires (composés lipophiles) était basé sur les travaux de Deschamps et al [24,25] ; travaux portant sur le profilage chromatographique de différentes classes de lipides sur des phases stationnaires PVA (phase normale) et PGC (phase inverse).

L'optimisation des conditions chromatographiques s'est effectuée en utilisant un détecteur d'aérosol chargé (CAD), détecteur adapté à l'analyse des composés sans chromophores (composés lipophiles) et dont le principe fondé sur l'ionisation des composés [26] se rapproche de l'ionisation en spectrométrie de masse.

Les différents essais ont été réalisés sur un mélange de 23 composés apolaires (100 µg/ml) appartenant à différentes classes chimiques (tableau1) et le choix des conditions opératoires est basé sur celles qui permettent de distinguer le plus de composés (meilleure sélectivité).

Le choix des différents solvants a été fonction des caractéristiques physico-chimiques (force éluante et miscibilité) et sur l'impact en spectrométrie de masse.

Les premiers essais ont été effectués en testant les gradients ternaires de Deschamps et al [24], sur colonne PVA en utilisant comme solvant faible l'heptane, solvant intermédiaire mélange propanol-2 / chloroforme et solvant fort le méthanol ou l'éthanol 96% et en additionnant aux phases mobiles uniquement de l'acide formique à 0,1%.

Les profils chromatographiques obtenus (figures 1A, B) des gradients ternaires proposés par Deschamps et al. [24] avec le méthanol ou l'éthanol 96% sont similaires ; on note également une similarité des ces profils chromatographiques avec le profil chromatographique obtenu (figure 1C) avec un gradient binaire de 100% heptane à 100% éthanol (solvant miscible) à

0,4%/mn. Il n'existe donc pas une grande différence de sélectivité des phases mobiles et particulièrement entre le méthanol et l'éthanol 96%, mais avec des pertes de charge plus élevées pour l'éthanol. Cette similarité de sélectivité entre le méthanol et l'éthanol a été indiquée par divers auteurs [27,28], ce qui nous a amené à proposer le gradient binaire entre l'heptane et l'éthanol 96% pour la suite de nos essais sur les phases stationnaires PolyVinyle Alcool (PVA) et Carbone Graphite Poreux (PGC).

Les profils chromatographiques (figures 2A, B) des essais de gradients binaires entre l'heptane et l'éthanol 96% sur des phases stationnaires PVA et PGC montrent que la plupart des composés sont élués pratiquement avec le front du solvant sur la PVA, par contre la PGC plus rétentive permet de différencier plus de composés. La phase stationnaire PGC présentant une meilleure sélectivité par rapport à la PVA a été choisie pour le profilage des composés phytochimiques apolaires.

Des essais ont été ensuite réalisés sur la phase stationnaire PGC pour le choix du solvant fort entre l'heptane, le dichlorométhane et le chloroforme. Les profils chromatographiques (figures 3A, B, C) indiquent une meilleure sélectivité avec l'heptane durant les 30 premières minutes par contre après 30 minutes on observe une meilleure élution avec les deux autres solvants et surtout avec le chloroforme. L'heptane possède une force éluante intermédiaire par rapport au dichlorométhane et chloroforme qui sont des solvants forts sur la phase stationnaire Carbone Graphite Poreux (PGC) [29,30].

Au vue des ces résultats nous avons proposé un gradient ternaire Ethanol-Heptane-Chloroforme (tableau 2) à un débit de 0,4 ml/mn sur phase stationnaire Carbone Graphite Poreux pour le profilage chromatographique des composés phytochimiques apolaires.

### 3.2. Spectrométrie de masse

Pour la méthode de spectrométrie de masse nous avons choisi la source d'ionisation APCI plus adaptée à l'analyse des métabolites apolaires [12].

Les paramètres du spectromètre de masse ont été optimisés pour obtenir une bonne sensibilité des ions  $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$  en mode d'ionisation positive et négative, en infusant les composés purs à la concentration de 20  $\mu\text{g/ml}$ . Chaque échantillon a été injecté dans le spectromètre de masse avec la composition de l'éluant correspondant à la composition de la phase mobile au temps de rétention du composé.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le mode d'ionisation positive, ceci en effet lié à présence d'acide formique dans la phase mobile. Et les composés monoterpéniques très

volatiles, ceux de faible poids moléculaire ( $m/z < 150$ ) et les acides gras n'ont pu être détectés.

Les autres classes des composés apolaires (terpènes, dérivés phénoliques, alcaloïdes, quinones, alcanes et dérivés estérifiés) ont été détectés avec en général comme fragments majoritaires  $[M+H-H_2O]^+$  et/ou  $[M+H]^+$ . Ceci est en accord avec les travaux de divers auteurs sur les composés lipophiles [31-33].

### 3.3. Analyse chimiométrique

Les analyses multivariées sont couramment utilisées pour traiter de grandes quantités de données issues de techniques analytiques appliquées aux médicaments à base de plantes.[8]

L'analyse en composante principale (PCA) a été déjà utilisée pour renforcer le pouvoir discriminant des techniques spectrales (Spectroscopie Proche InfraRouge, SPIR) afin de comparer des formulations pharmaceutiques et également distinguer des médicaments contrefaits [34] ; et donc permettre de distinguer différentes drogues végétales ou des produits à base de drogues végétales.

L'analyse supervisée (PLS-DA) est utilisée dans le domaine de la métabolomique pour comparer des classes ou des groupes d'observations, comme différents lots d'une drogue végétale [35].

Le filtrage des données  $X$  par correction orthogonale du signal (OSC) [36-38], éliminant les variations non prédictives qui ne sont pas corrélées avec les variables, renforce la discrimination des classes, facilitant ainsi l'identification des variables les plus importantes responsables des différences.

L'analyse chimiométrique a été réalisée sur les profils chromatographiques de deux extraits des 5 lots de *C. micranthum* (CM1 à CM5) et 4 lots de *M. scaber* (MC1 à MC4).

#### 3.3. 1. Influence de l'élimination de la chlorophylle

Dans notre étude, la propriété d'adsorption des chlorophylles sur charbon actif indiquée par Jones et al. [39] a été utilisée pour l'élimination de la chlorophylle. Cette méthode a été préférée à l'extraction préalable par l'acétone [40] et à l'hydrolyse alcaline [41], en raison de sa facilité de mise en œuvre. Après des essais préliminaires le rapport 6 mg de charbon actif pour 1mg de résidu sec correspondait à la quantité minimum de charbon actif permettant d'obtenir un filtrat de l'extrait dichlorométhanique de couleur jaune à jaune-orangée (élimination des pigments chlorophylliens verdâtres).

L'observation des chromatogrammes d'un extrait brut et traité au charbon actif de *M. scaber* (figure 4) indique la présence des mêmes pics chromatographiques. Cependant, on note des différences dans l'intensité des pics chromatographiques.

L'exploitation des S-Plot (figure 5) de l'analyse multivariée supervisée (PLS-DA) après correction orthogonale du signal (OSC) des profils chromatographiques des extraits de *C. micranthum* et *M. scaber* bruts et traités au charbon nous permet de dire que les composés phytochimiques défavorablement influencés par le traitement au charbon actif sont les triterpènes (temps de rétention (Rt) de 6 à 13 min), les tocophérols (tocophérol 13.04) et les phytostérols (Rt 15 à 25 min) (Figure 4).

Cependant, les triterpènes, phytostérols et dérivés quinoniques ne sont que partiellement adsorbés par le charbon actif, ce qui se traduit par une diminution des intensités des pics chromatographiques. Une concentration du filtrat traité au charbon avant analyse LC/MS pourrait améliorer l'intensité des pics chromatographiques de ces classes de composés phytochimiques.

### 3.3.2. Différents lots de drogues végétales

L'analyse en composante principale (PCA) des profils chromatographiques des extraits de *C. micranthum* et *M. scaber* (figure 6) a indiqué une faible différence entre les lots de chaque drogue végétale :

- Le Score-Plot (figure 6A) des profils chromatographiques des extraits des 5 lots de *C. micranthum* montre : par rapport à la première composante (axe 1 : 22% de la variance totale), une variabilité liée à la préparation des échantillons. La deuxième composante (axe 2 : 17% de la variance totale), montre un rapprochement des lots en fonction du lieu d'obtention des échantillons : CM5 (Sénégal), CM1 et 4 (marché aux plantes) et CM2 (industrie de phytomédicament). On note également un rapprochement selon l'année d'obtention : CM4 proche de CM5 et CM1 proche de CM2.

Les échantillons des feuilles de *C. micranthum* proviennent de circuits commerciaux dont les lieux de récolte ne sont pas connus, mais à l'analyse de ces résultats, l'on pourrait supposer que le marché aux plantes et l'industrie de phytomédicament ont la même source d'approvisionnement, qui ne se trouve pas au Sénégal.

- La même tendance peut être décrite dans le cas de *M. scaber* (figure 6B) : l'axe 1 (25% de la variance totale) une variabilité liée à la préparation des échantillons, et l'axe 2 (20% de

la variance totale) une variabilité liée à la date de récolte (MS1 en 2008, MS2 en 2009 et MS3 et 4 en 2010 sur des lieux différents (jardin botanique et Bingerville).

Par contre l'analyse croisée par projection des modèles *C. micranthum* et *M. scaber* l'un dans l'autre et la valeur calculée des distances entre les deux modèles supérieure à la limite de confiance fixée au risque de 5% indique que les modèles chimiométriques permettent de distinguer les deux drogues végétales.

### 3.4. Identification des composés

Dans le cadre de notre étude, l'identification a porté principalement sur les composés phytochimiques apolaires déjà identifiés dans les deux drogues végétales, afin de vérifier que l'on retrouve tous ces composés dans les profils chromatographiques.

Les différents composés de *C. micranthum* et *M. scaber* dont les spectres de masse étaient exploitables sont caractérisés par leur temps de rétention et leur spectre de masse. Ils sont distingués selon les différentes catégories proposées par Sumner et al. [9]: identifié si le temps de rétention et le spectre de masse sont similaires à ceux d'un composé pur ; appartenant à une classe chimique si la zone de temps de rétention et les fragments  $m/z$  sont caractéristiques de cette classe ; et les autres composés sont considérés comme «inconnu».

L'analyse par NARP-LC/MS sur colonne PGC des extraits dichlorométhaniques traités au charbon actif de *C. micranthum* et *M. scaber* (Figures 7 et 8) a permis respectivement de détecter environ quarante et soixante dix composés phytochimiques.

- Pour *C. micranthum* (tableau 3) 44 composés ont été trouvés : 5 ont été identifiés et correspondent au lupéol (Rt 11.90),  $\alpha$ -amyrine (Rt 12.23),  $\alpha$ -tocophérol (Rt 13.04), squalène (Rt 17.75),  $\beta$ -sitostérol (Rt 20,48) ; 14 appartiennent à différentes classes chimiques : 1 dérivé  $\alpha$ -tocophérol, 5 triterpènes, 3 esters de stérol et 5 triglycérides ; 25 composés inconnus.

Tous les métabolites secondaires apolaires rapportés par plusieurs auteurs [15,16] ont été identifiés (sitostérol, lupeol,  $\alpha$ -amyrine). Comme cela était prévisible, les composés polaires présents dans les feuilles de *C. micranthum* [15,16] n'ont pas été détectés, mais le profil chromatographique obtenu par notre méthode chromatographique liquide en phase inverse des métabolites apolaires peut être proposé pour distinguer des produits à base des feuilles de *C. micranthum*.

- En ce qui concerne *M. scaber* (tableau 4) 68 composés ont été détectés : 6 composés ont été identifiés: acide oléanolique (Rt 6,77), acide ursolique (Rt 7.42),  $\alpha$ -amyrine (Rt 12.38),  $\alpha$ -tocophérol (Rt 12.97), squalène (Rt 18.31), sitostérol (Rt 21,32), 19 appartiennent à

différentes classes chimiques : 1 dérivé  $\alpha$ -tocophérol, 8 triterpènes, 4 esters de stérol et 6 triglycérides ; 43 composés inconnus.

La majorité des métabolites secondaires apolaires mentionnés dans la littérature (sitostérol,  $\alpha$ -amyrine, acide oléanolique, acide ursolique) ont été identifiés [17-20,42]. Les extraits sont particulièrement riches en composés phytochimiques apolaires tels que quinones, phytostérols, triterpènes et leurs dérivés estérifiés, éventuellement responsable des activités pharmacologiques de *M. scaber* (antifongique, antimicrobien, anti-inflammatoire et analgésique) [17-23].

Le profil chromatographique renfermant de nombreux métabolites secondaires apolaires avec ou sans activité thérapeutique et/ou pharmacologique, et appartenant à différentes classes chimiques peut représenter une empreinte chromatographique pour l'évaluation de la qualité des médicaments à base des feuilles de *M. scaber*.

#### 4. Conclusion

La méthode que nous proposons dans cette étude utilisant la chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversées couplée à la spectrométrie de masse en milieu non aqueux (NARP-LC/MS) après extraction au dichlorométhane sous reflux (1:10, *m/v*) et élimination des pigments chlorophylliens par adsorption sur charbon actif, permet d'établir des profils chromatographiques riches de métabolites secondaires apolaires bioactifs ou non de drogues végétales.

Cette méthode, associée à la chimiométrie, a été appliquée à différents lots de deux drogues végétales largement utilisées (feuilles de *C. micranthum* et *M. scaber*) :

Elle permet de distinguer les deux drogues végétales et éventuellement les produits à bases des feuilles de *C. micranthum* et *M. scaber*.

La méthode NARP-LC/MS permet de différencier les lieux d'approvisionnement des drogues végétales et également de mesurer les variations liées aux périodes d'obtention des échantillons.

En outre, elle permet de détecter la plupart des métabolites secondaires apolaires bioactifs ou non déjà identifiés dans des feuilles de *C. micranthum* et *M. scaber*.

La méthode par chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversées non aqueuse couplée à la spectrométrie de masse proposée dans cette étude, permet l'établissement de profil chromatographique des métabolites secondaires apolaires. Elle peut être utilisée pour l'évaluation de la qualité de divers médicaments traditionnels à base de drogues végétales.

## Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Pr Aké Assi (Institut National de Floristique Université d'Abidjan Cocody) pour l'authentification botanique.

## Références

1. WHO (2010) Guidelines for registration of traditional medicines in the WHO african region. AFR/TRM/04. World Health Organization, Geneve
2. Booker A, Johnston D, Heinrich M (2012) Value chains of herbal medicines - research needs and key challenges in the context of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 140 (3):624-633
3. Sahoo N, Manchikanti P, Dey S (2010) Herbal drugs: standards and regulation. *Fitoterapia* 81 (6):462-471
4. Giri L, Andola H, Purohit V, Rawat M, Rawal R, Bhatt I (2010) Chromatographic and spectral fingerprinting standardization of traditional medicines: an overview as modern tools. *Research Journal of Phytochemistry* 4:234-241
5. Kamboj A (2012) Analytical evaluation of herbal drugs. In: Vallisuta O, Olimat SM (eds) *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*. InTech, Croatia,
6. Liang Y-Z, Xie P, Chan K (2004) Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B* 812 (1-2):53-70
7. Liang X-m, Jin Y, Wang Y-p, Jin G-w, Fu Q, Xiao Y-s (2009) Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A* 1216 (11):2033-2044
8. Jing D, Deguang W, Linfang H, Shilin C, Minjian Q (2011) Application of chemometrics in quality evaluation of medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (17):4001-4008
9. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TW-M, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, Hankemeier T, Hardy N, Harnly J, Higashi R, Kopka J, Lane AN, Lindon JC, Marriott P, Nicholls AW, Reily MD, Thaden JJ, Viant MR (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Chemical Analysis Working Group (CAWG), Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 3 (3):211-221
10. Liang Y, Yi L, Xu Q (2008) Chemometrics and modernization of traditional Chinese medicine. *Science in China Series B: Chemistry* 51 (8):718-728
11. Yongyu Z, Shujun S, Jianye D, Wenyu W, Huijuan C, Jianbing W, Xiaojun G (2011) Quality Control Method for Herbal Medicine - Chemical Fingerprint Analysis. In: Shoyama Y (ed) *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas*. InTech, pp 171-194
12. Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RKP, Fraser PD, Bramley PM (2005) Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany* 56 (410):219-243. doi:10.1093/jxb/eri069
13. Adjanohoun E, Aké Assi L (1979) Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire, vol 1. Centre Nationale de Floristique, Université d'Abidjan-Cocody, Abidjan
14. Perrey F, Staub H, Goetz P (2004) Monographie médicalisée : Kinkeliba, *Combretum micranthum* G. Don ou *Combretum raimbouldii* (Combrétacées). *Phytothérapie* 3:82-84
15. Olschwang D, Bassene E, Colonna J-P (1991) Tradition africaine et analyse scientifique : l'utilisation du kinkéliba (*Combretum micranthum* G. Don) en Afrique de l'Ouest. *Epistème* 2:74-82

16. Welch CR (2010) Chemistry and pharmacology of Kinkéliba (*Combretum micranthum*), a west African medicinal plant. Ph D Graduate Program in Medicinal Chemistry, University of New Jersey, New Brunswick
17. Ekpendu TOE, Adesomoju AA, Ekundayo O, Okogun JI, Laakso I (1993) Constituents of the volatile oil of *Mitracarpus scaber* Zucc. *Flavour and Fragrance Journal* 8 (5):269-271
18. Ekpendu TO, Akah PA, Adesomoju AA, Okogun JI (1994) Antinflammatory and antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extracts. *Pharmaceutical Biology* 32 (2):191-196
19. Bonga GM, Vanga-Mandah M, de Souza C, Guede-Guina FR (1995) Mise en evidence de phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*. *Revue de Medecines et Pharmacopees Africaines* 9 (1):21-30
20. Bisignano G, Sanogo R, Marino A, Aquino R, D'Angelo V, Germano MP, De Pasquale R, Pizza C (2000) Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Letters in Applied Microbiology* 30 (2):105-108
21. Cimanga RK, Kambu K, Tona L, De Bruyne T, Sandra A, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ (2004) Antibacterial and antifungal activities of some extracts and fractions *Mitracarpus scaber* Zucc. (Rubiaceae). *Journal of Natural Remedies* 4 (1):17-25
22. Sanogo R, Konipo A, Maiga A, Arama AE, Diallo D, Bougoudogo F (2006) Formulation d'une pommade dermique à base d'extraits de *Mitracarpus scaber* (zucc). *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaines* 14:159-177
23. Makambila-Koubemba M-C, Mbatchi B, Ardid D, Gelot A, Henrion C, Janisson R, Abena AA, Banzouzi J-T (2011) Pharmacological studies of ten medicinal plants used for analgesic purposes in Congo Brazzaville. *International Journal of Pharmacology* 7:608-615
24. Deschamps FS, Chaminade P, Ferrier D, Baillet A (2001) Assessment of the retention properties of poly(vinyl alcohol) stationary phase for lipid class profiling in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 928 (2):127-137
25. Deschamps FS, Gaudin K, Lesellier E, Tchaplà A, Ferrier D, Baillet A, Chaminade P (2001) Response enhancement for the evaporative light scattering detection for the analysis of lipid classes and molecular species. *Chromatographia* 54 (9-10):607-611
26. Dixon RW, Peterson DS (2002) Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging. *Analytical Chemistry* 74:2930-2937
27. Destandau E, Lesellier E (2008) Chromatographic Properties of Ethanol/Water Mobile Phases on Silica Based Monolithic C18. *Chromatographia* 68 (11-12):985-990
28. Ribeiro RLV, Bottoli CBG, Collins KE, Collins CH (2004) Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLS-RP mobile phases. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15 (2):300-306
29. Kaur B (1990) The use of porous graphitic carbon in high performance liquid chromatography. *LC GC* 8 (6):468-477
30. Gaudin K, Chaminade P, Baillet A (2002) Eluotropic strength in non-aqueous liquid chromatography with porous graphitic carbon. *Journal of Chromatography A* 973 (1-2):61-68
31. Lísá M, Holčápek M (2008) Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1198-1199:115-130
32. Vrkoslav V, Urbanová K, Cvačka J (2010) Analysis of wax ester molecular species by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217 (25):4184-4194
33. Rhourri-Frih B, Chaimbault P, Dequeral D, André P, Lafosse M (2012) Investigation of porous graphitic carbon for triterpenoids and natural resinous materials analysis by high performance liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1240:140-146

34. Storme-Paris I, Rebiere H, Matoga M, Civade C, Bonnet PA, Tissier MH, Chaminade P (2010) Challenging Near InfraRed Spectroscopy discriminating ability for counterfeit pharmaceuticals detection. *Analytica Chimica Acta* 658 (2):163-174
35. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T (2007) Chemometrics in metabonomics. *Journal of Proteome Research* 6:469-479
36. Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, Gottfries J, Moritz T, Trygg J (2007) Visualization of GC/TOF-MS based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry* 80 (1):115-122
37. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikström C, Wold S (2006) Multi- and megavariate data analysis part I basic principles and applications, second revised and enlarged edition. Umetrics AB, Sweden
38. Wold S, Antti H, Lindgren F, Öhman J (1998) Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 44 (1-2):175-185
39. Jones WP, Kinghorn AD (2005) Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI (eds) *Natural Products Isolation*, vol 20. *Methods in Biotechnology*. Humana Press, Totowa, pp 323-351
40. Quach HT, Steeper RL, Griffin GW (2004) An improved method for the extraction and Thin-Layer Chromatography of chlorophyll a and b from Spinach. *Journal of Chemical Education* 81 (3):385-387
41. Wun CK, Litsky W (1982) Rapid determination of algal chlorophyll by gas-liquid chromatography. *Environmental Science & Technology* 16 (6):335-338
42. Gbaguidi F, Muccioli G, Accrombessi G, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J (2005) Densitometric HPTLC quantification of 2-azaanthraquinone isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity against *Dermatophilus congolensis*. *Journal of Planar Chromatography* 18 (5):377-379

Tableau 1 : Liste de 23 composés apolaires appartenant à différentes classes chimiques

Classe chimique	Composés
Monoterpène	linalol
Monoterpène	$\alpha$ -terpinéol
Monoterpène	$\alpha$ -pinène
Monoterpène	thymol
Sesquiterpène	artémisinine
Sesquiterpène	<i>trans</i> -caryophyllène
Diterpène	ginkgolide A
Triterpène	acide ursolique
Triterpène	$\alpha$ -amyrine
Stérol	$\beta$ -sitostérol
Stérol	campestérol
Tétraterpène	carotène
Alcaloïde	réserpine
Coumarine	psoralène
Phénol	4-méthoxyacetophénone
Phénol	eugénol
Quinone	1-4 naphtoquinone
Quinone Alcaloïde	azaanthraquinone
Quinone terpénique	$\alpha$ -tocophérol
Quinone terpénique estérifiée	$\alpha$ -tocophérol acétate
Alcane	squalène
Acide gras	acide palmitique
Triglycéride	tripalmitoleine

Tableau 2: Gradient ternaire à un débit de 0,4 ml/mn

Time (mn)	Ethanol 96% (0,1% acide formique) (%)	Heptane (0,1% acide formique) (%)	Chloroforme (0,1% acide formique) (%)
0	100	0	0
30	40	60	0
50	0	0	100
60	0	0	100
61	100	0	0
90	100	0	0

Tableau 3 : Composés phytochimiques détectés par LC-MS (APCI) d'un extrait traité au charbon actif de *C. micranthum* (CM1)

Tr (mn)	Compounds	m/z
1.09	Inconnu	<b>197.1</b> 181.1
2.85	Inconnu	<b>278.7</b>
5.94	Inconnu	<b>353.5</b>
6.37	Triterpène <sup>b</sup>	<b>439.5</b> 463.5
7.64	Triterpène <sup>b</sup>	<b>391.5</b> 463.5
8.82	Triterpène <sup>b</sup>	<b>425.5</b> 443.5
10.78	Triterpène <sup>b</sup>	<b>409.5</b>
11.90	Lupéol <sup>a</sup>	<b>409.4</b>
12.23	α-Amyrine <sup>a</sup>	<b>427.4</b> 338.6
13.04	α-Tocophérol <sup>a</sup>	<b>429.3</b>
13.68	Triterpène <sup>b</sup>	<b>427.2</b> 435.
14.91	Inconnu	<b>445.4</b>
15.18	Inconnu	<b>444.9</b>
16.78	Inconnu	<b>445.4</b> 425.4
17.75	Squalène <sup>a</sup>	<b>411.3</b>
18.33	Inconnu	<b>613.5</b>
20.48	β-Sitostérol <sup>a</sup>	<b>397.4</b>
21.90	Inconnu	<b>617.7</b> 591.5
22.20	Inconnu	<b>615.5</b> 597.7
23.78	Inconnu	<b>557.7</b>
25.05	Dérivé α-tocophérol <sup>b</sup>	<b>428.8</b>
25.94	Inconnu	<b>575.8</b> 747.2
27.20	Inconnu	<b>603.6</b> 585.6
28.37	Inconnu	<b>577.6</b> 585.6
29.66	Inconnu	<b>409.5</b>
36.53	Inconnu	<b>413.6</b>
37.11	Inconnu	<b>613.7</b> 423.4 747.2 870.9
38.77	Inconnu	<b>409.7</b>
40.32	Inconnu	<b>579.8</b> 613.5
41.60	Triglycéride <sup>b</sup>	<b>874.7</b> 595.8
41.87	Triglycéride <sup>b</sup>	<b>872.8</b> 595.8
42.77	Triglycéride <sup>b</sup>	<b>876.6</b>
44.00	Triglycéride <sup>b</sup>	<b>882.7</b> 555.7 607.8
44.40	Triglycéride <sup>b</sup>	<b>853.1</b> 597.8 575.7 663.8
45.87	Inconnu	<b>423.6</b> 601.7 577.7 854.8
46.86	Inconnu	<b>409.6</b> 881.0
47.26	Inconnu	<b>577.8</b> 603.7
48.29	Inconnu	<b>589.7</b> 575.6 882.8
49.14	Inconnu	<b>409.7</b> 533.8
49.69	Inconnu	<b>577.7</b> 603.6 359.1
52.28	Inconnu	<b>631.9</b> 561.7 359.5
54.18	Ester de stérol <sup>b</sup>	<b>397.4</b>
54.94	Ester de stérol <sup>b</sup>	<b>589.8</b>
56.52	Ester de stérol <sup>b</sup>	<b>397.5</b> 749.2

a Composés identifiés

b Composés appartenant à une classe chimique (classification Summer et al [9])  
Pic de base indiqué en gras

Tableau 4: Composés phytochimiques détectés par LC-MS (APCI) d'un extrait traité au charbon actif de *M. scaber* (MS1)

Tr (mn)	Compounds	<i>m/z</i>
1.07	Inconnu	196.9 208.8 243.2 179.0
2.30	Inconnu	279.0
3.10	Inconnu	343.1 279.2 329.2
6.02	Inconnu	353.3 277.1
6.77	Acide Oléanolique <sup>a</sup>	439.1 457.5 411.5 503.8
7.20	Triterpène <sup>b</sup>	457.4 411.3
7.42	Acide Ursolique <sup>a</sup>	438.8 411.5 457.3
9.30	Triterpène <sup>b</sup>	439.3 425.4 327.2
9.78	Triterpène <sup>b</sup>	439.3 425.4 359.1 327.1
10.91	Triterpène <sup>b</sup>	439.3 327.3 371.1
12.38	$\alpha$ -Amyrine <sup>a</sup>	409.6
12.75	Triterpène <sup>b</sup>	427.4 338.4
12.97	$\alpha$ -Tocophérol <sup>a</sup>	429.3 475.7
13.44	Triterpène <sup>b</sup>	427.3 310.5 409.5
14.22	Triterpène <sup>b</sup>	427.3 409.5 435.5
14.75	Triterpène <sup>b</sup>	409.6 261.2 427.4
15.26	Inconnu	445.4
16.24	Inconnu	611.6
17.13	Inconnu	425.4 445.5 407.4
17.54	Inconnu	611.8 445.8
18.31	Squalène <sup>a</sup>	411.3
18.95	Inconnu	613.7 589.4
19.55	Inconnu	555.6
20.48	Inconnu	615.6 557.7
20.72	Inconnu	613.8
21.32	$\beta$ -Sitostérol <sup>a</sup>	383.4 397.3
21.61	Inconnu	573.6 591.4 311.3 337.0
21.94	Inconnu	599.6 589.8
22.14	Inconnu	615.8 597.8
22.27	Inconnu	615.6 597.8
22.64	Inconnu	573.6 613.6
22.96	Inconnu	613.5 595.6
23.45	Inconnu	609.7
23.63	Inconnu	601.7 619.8
24.16	Inconnu	559.9 609.7
24.39	Inconnu	557.6 591.4
24.48	Inconnu	557.4 575.5 383.5
25.40	Dérivé $\alpha$ -tocophérol <sup>b</sup>	431.4 447.5
26.08	Inconnu	575.5
27.04	Inconnu	573.6 591.5 395.5
27.65	Inconnu	339.5 603.6 549.6 371.2 423.4
28.41	Inconnu	577.8 637.9 409.5
30.47	Inconnu	409.4
31.16	Inconnu	423.4 395.5 651.9
32.05	Inconnu	603.7 409.5 747.1
34.17	Inconnu	591.6 551.8
34.87	Inconnu	409.6 605.6 872.7 619.4
36.73	Inconnu	613.6 423.3
38.56	Inconnu	870.9 545.7
40.18	Inconnu	409.6 613.5 579.6
41.18	Inconnu	872.5 595.9
43.30	Inconnu	876.6 599.9
44.39	Inconnu	601.7 882.7 409.6
45.05	Triglycéride	853.1 598.0 573.7 409.6
45.90	Triglycéride	603.9 341.5
46.28	Triglycéride	601.8 577.8 856.9
47.45	Triglycéride	878.8 597.8
47.89	Triglycéride	577.7 603.6 858.9
48.73	Triglycéride	575.6 601.8 884.8
49.72	Inconnu	908.6 533.8 341.2
50.24	Inconnu	577.8 551.8 605.6
51.23	Inconnu	575.8 579.7 603.6
52.78	Inconnu	577.9 606.0 860.7
53.49	Inconnu	603.9 607.7
55.04	Ester de stérol <sup>b</sup>	397.5 605.6
55.64	Ester de stérol <sup>b</sup>	384.5 589.7
57.59	Ester de stérol <sup>b</sup>	749.1 397.3
61.04	Ester de stérol <sup>b</sup>	383.5 359.3 395.6

a Composés identifiés

b Composés appartenant à une classe chimique (classification Summer et al [9])

Pic de base indiqué en gras

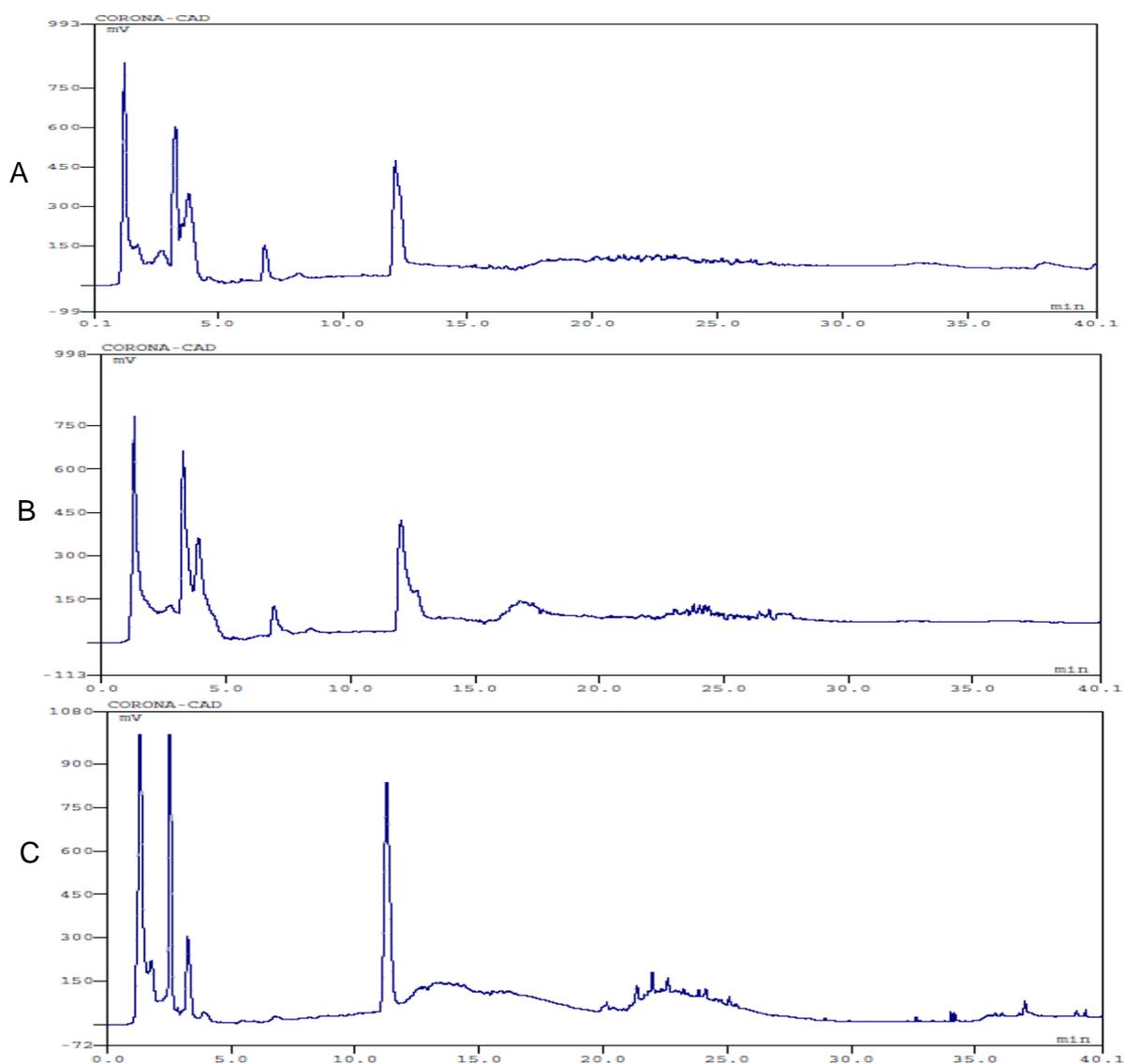


Figure 1: Chromatogrammes du mélange de 23 témoins apolaires (100  $\mu\text{g/ml}$ ) sur colonne PVA des gradients ternaires de Deschamps et al [24] avec heptane / chloroforme-isopropanol / méthanol (A) ; heptane / chloroforme-isopropanol / éthanol (B) et du gradient binaire 100% heptane à 100% éthanol à 0,4 %/mn (C). Toutes les phases mobiles contiennent 0,1 % d'acide formique.

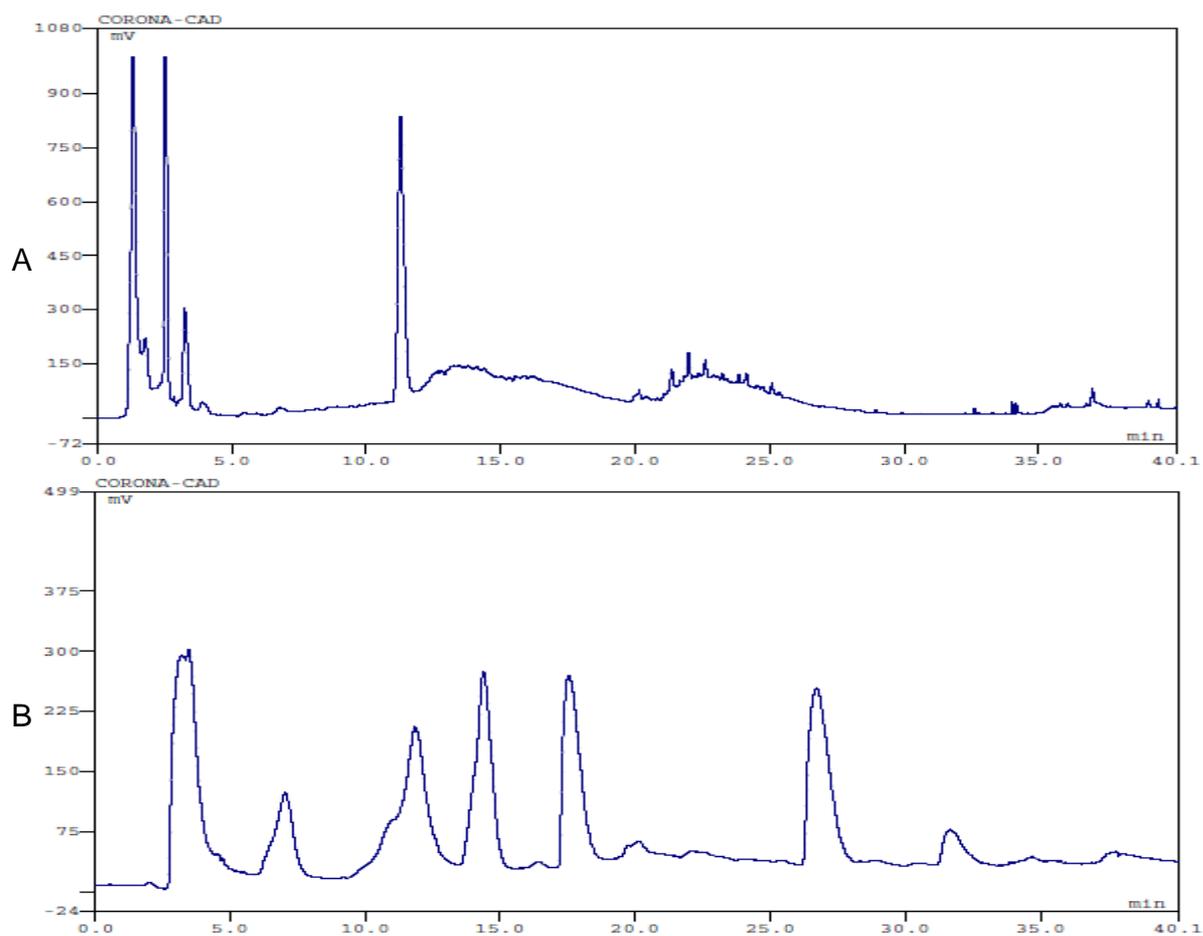


Figure 2 : Chromatogrammes du mélange de 23 témoins apolaires (100  $\mu\text{g/ml}$ ) des gradients binaires à 0,4 %/mn entre 100% heptane à 100% éthanol 96 sur colonne PVA (A) et 100% éthanol à 100% heptane sur colonne PGC (B). Toutes les phases mobiles contiennent 0,1 % d'acide formique.

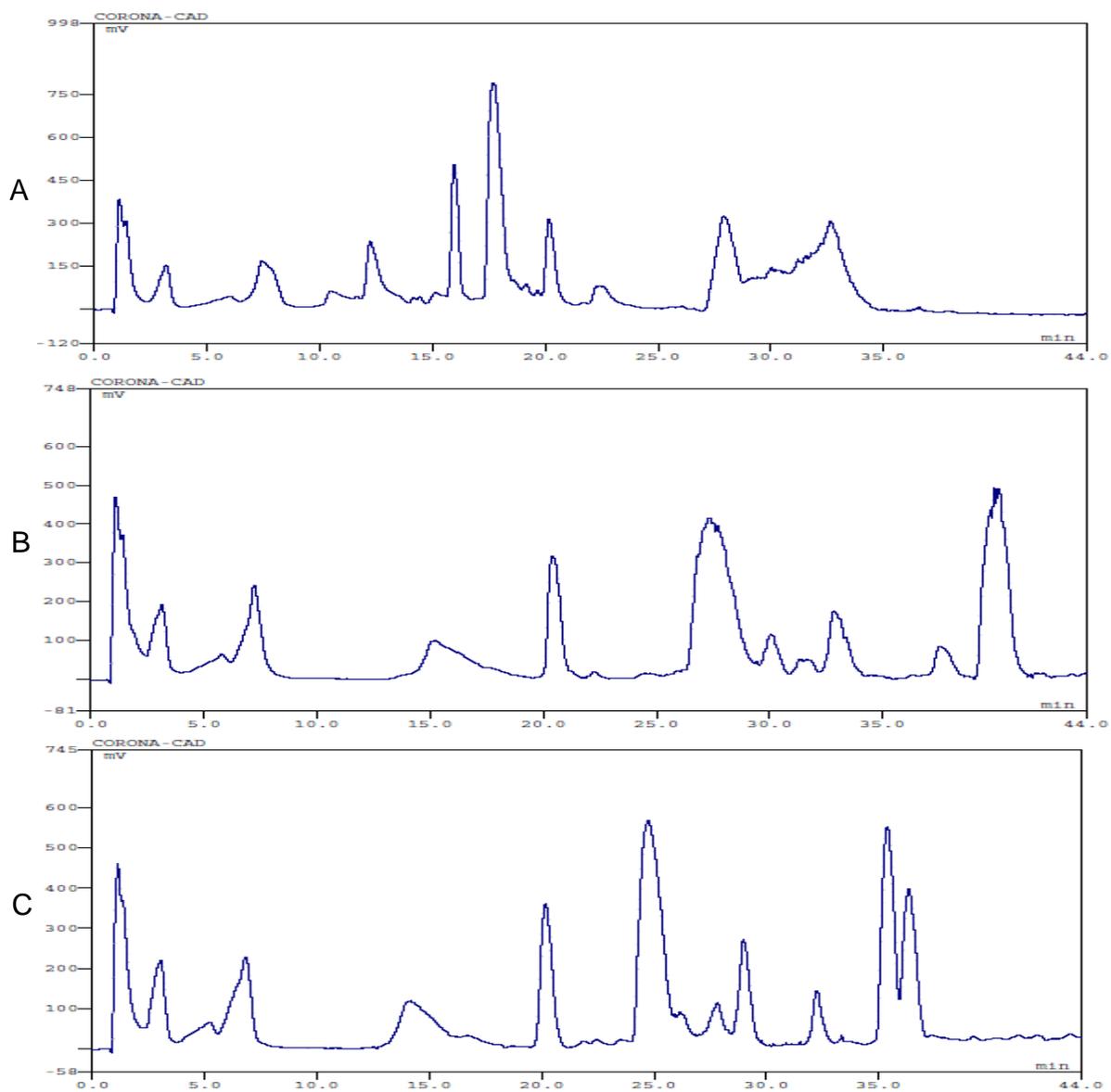


Figure 3 : Chromatogrammes du mélange de 23 témoins apolaires (100  $\mu\text{g/ml}$ ) des gradients binaires à 0,4 %/mn sur colonne PGC entre 100% éthanol à 100% heptane (A), 100% éthanol à 100% dichlorométhane (B) et 100% éthanol à 100% chloroforme (C). Toutes les phases mobiles contiennent 0,1 % d'acide formique.

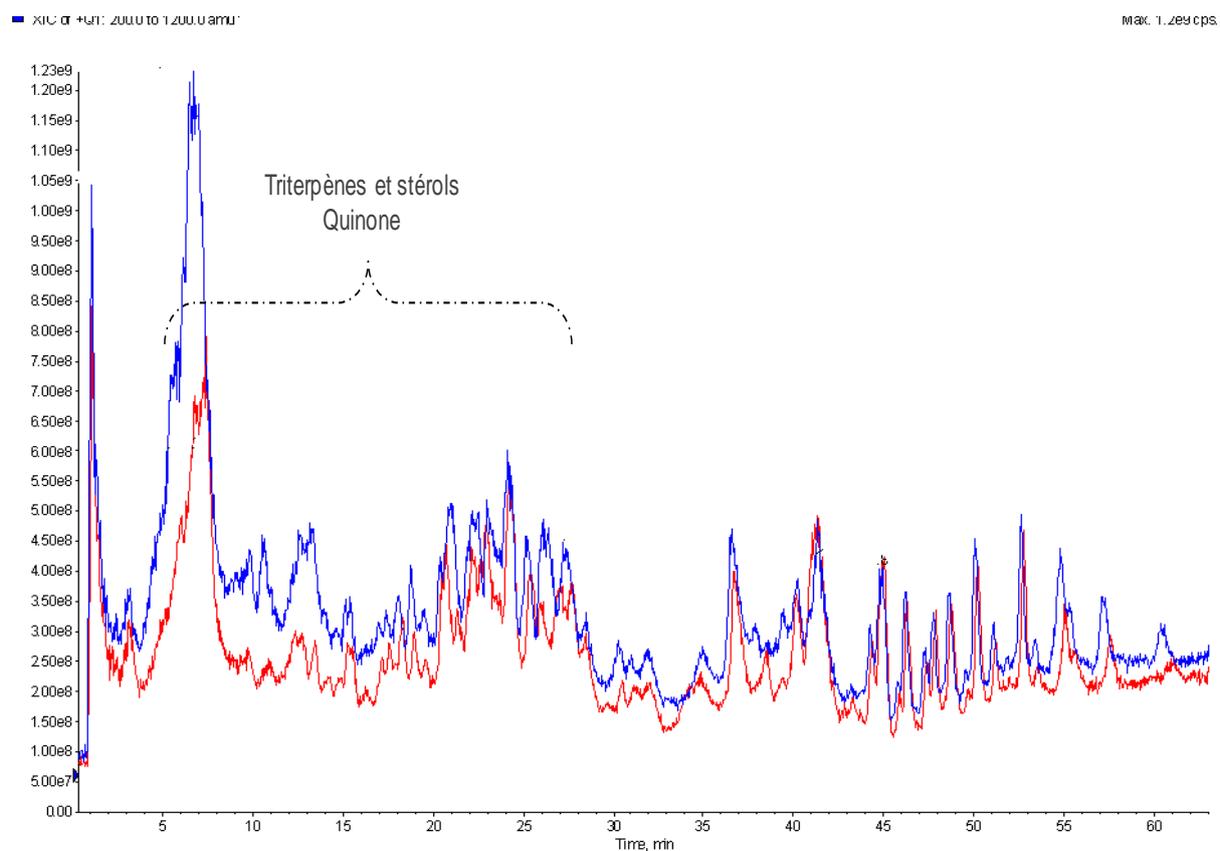


Figure 4 : Comparaison des TIC chromatogrammes LC/MS d'un extrait brut (bleu) et traité au charbon actif (rouge) de *M. scaber* (MS1)

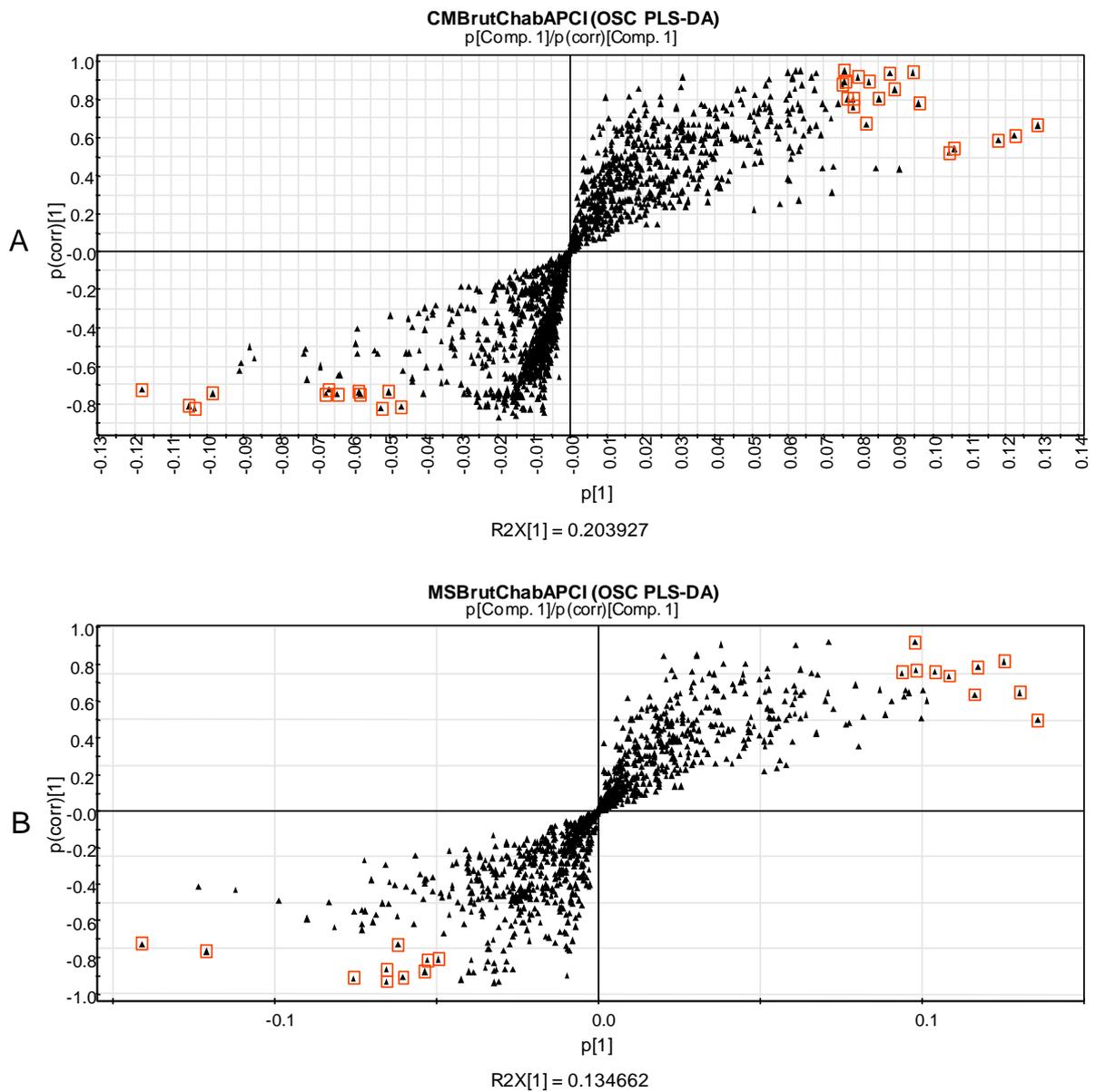


Figure 5 : S-Plot OSC PLS-DA des profils chromatographiques LC/MS des extraits bruts et traités au charbon des différents lots de *C. micranthum* (A) et *M. scaber* (B)

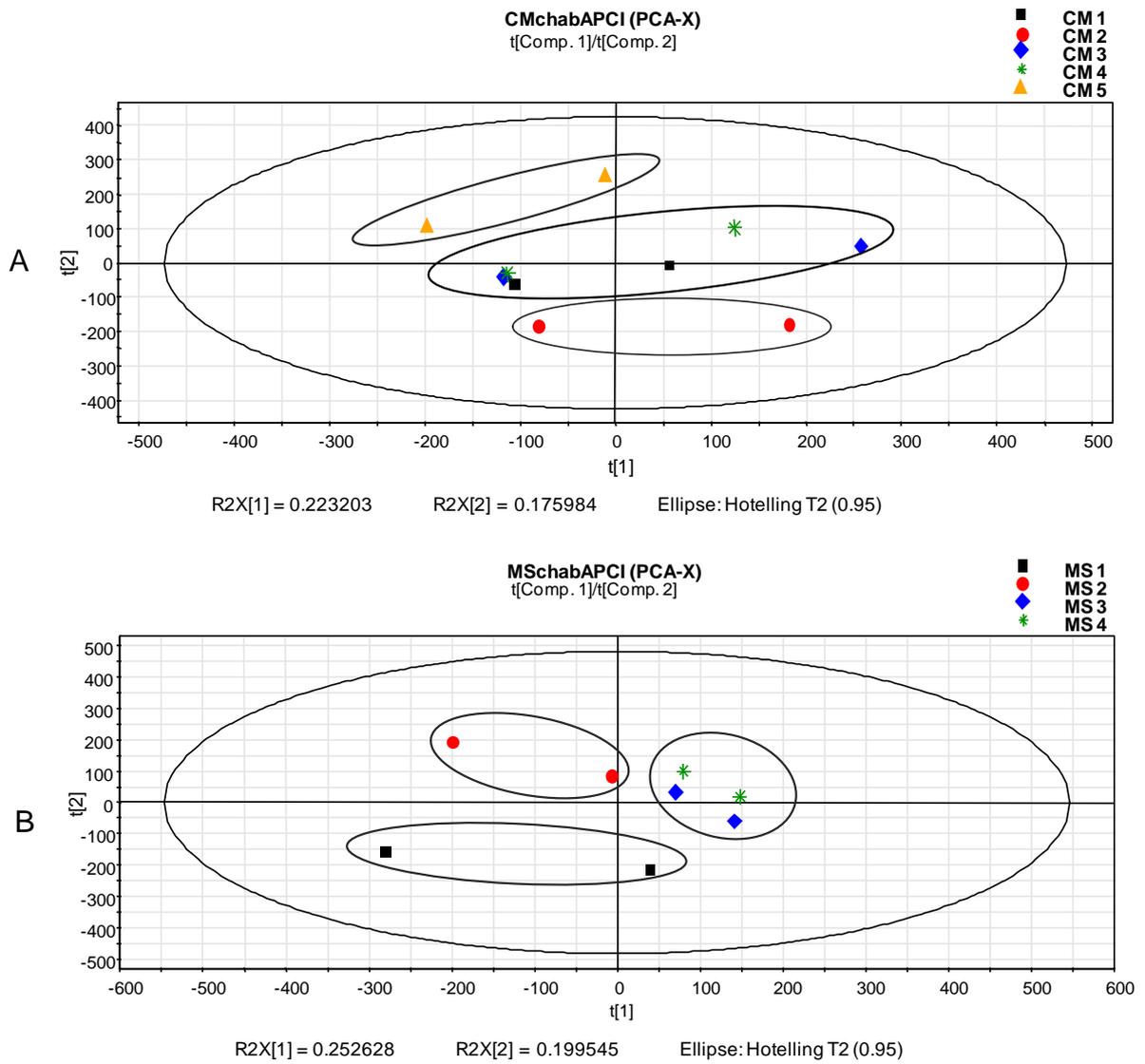


Figure 6: Score-plot des profils chromatographiques des différents lots de *C. micranthum* (A) et *M. scaber* (B)

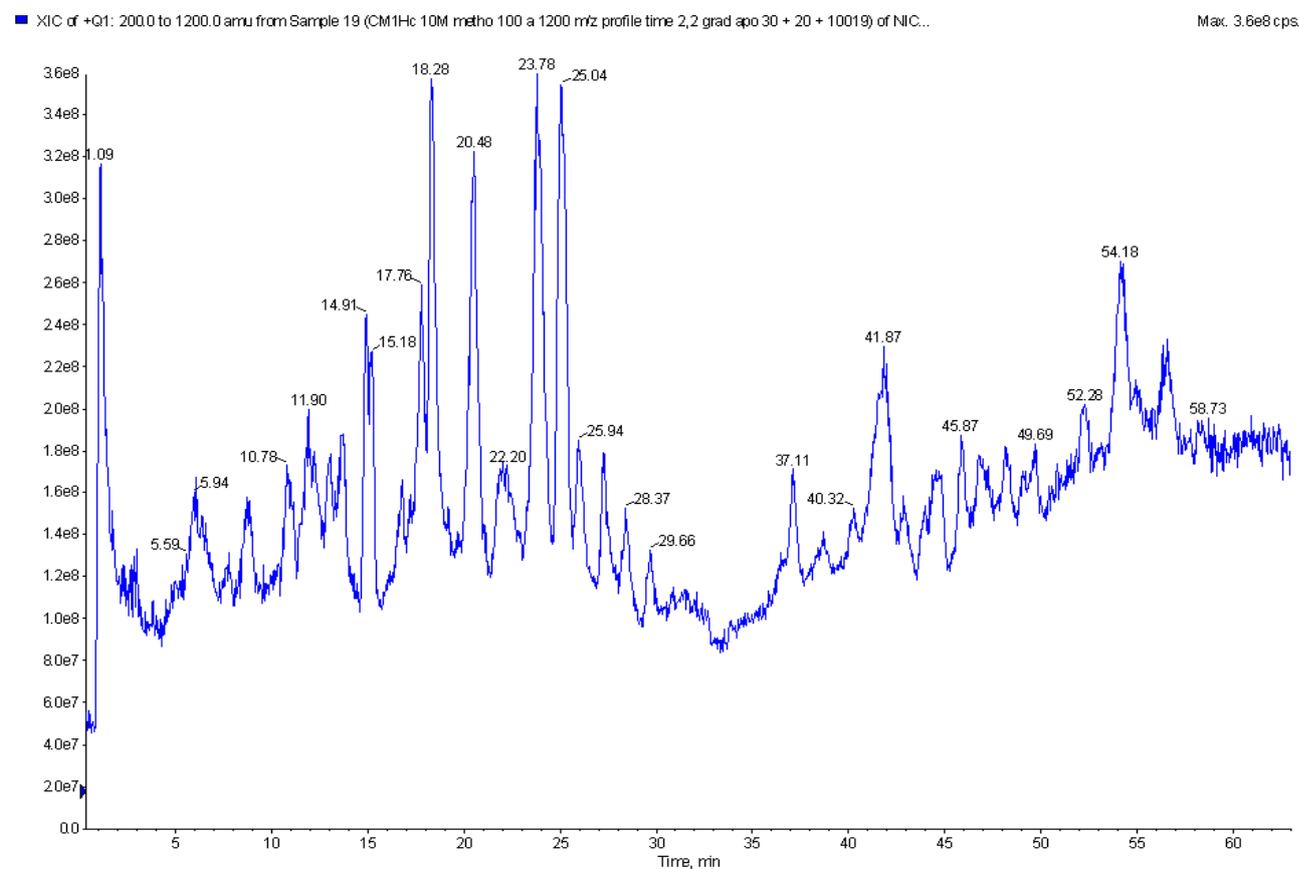


Figure 7: TIC chromatogramme LC/MS d'un extrait traité au charbon actif de *C. micranthum* (CM1)

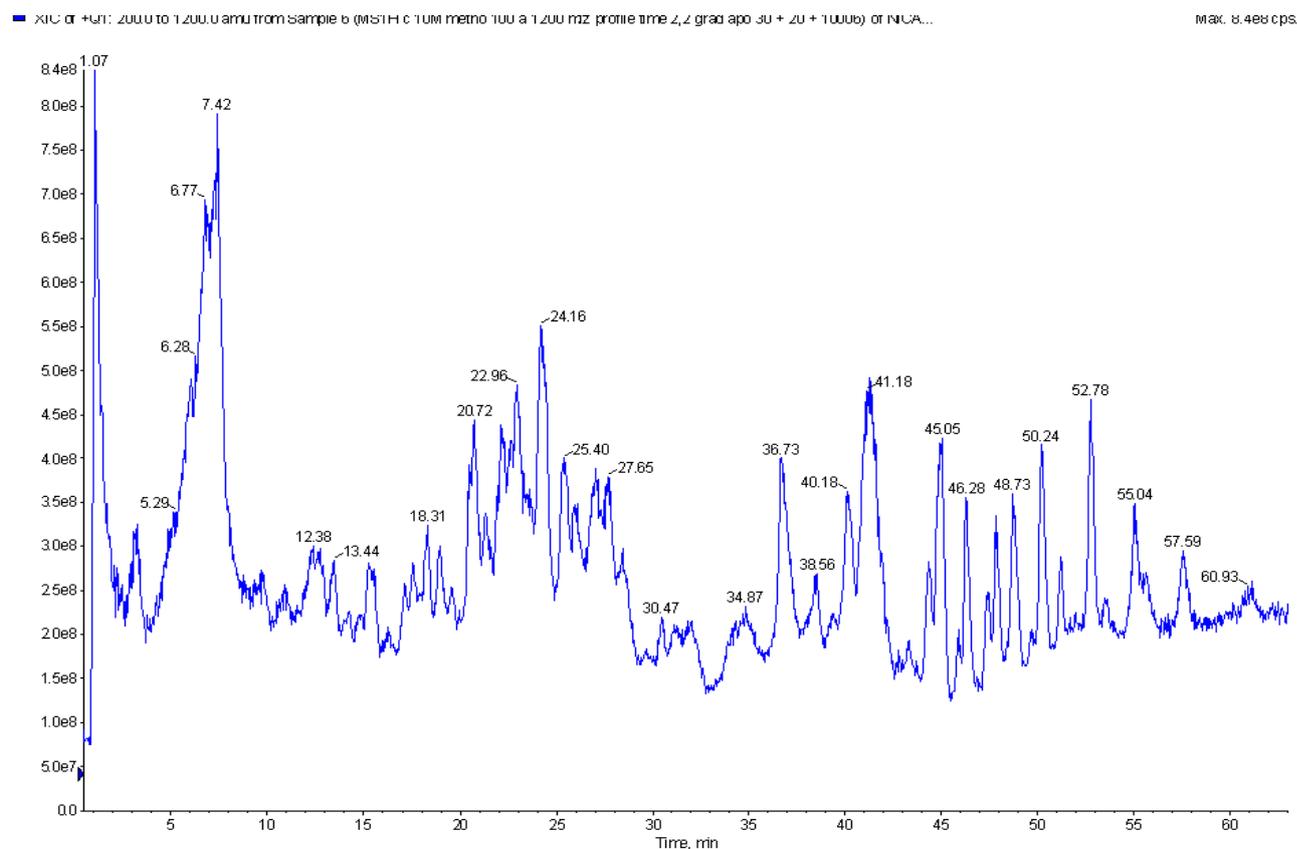


Figure 8 : TIC chromatogramme LC/MS d'un extrait traité au charbon actif de *M. scaber* (MS1)

### III. DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours de notre étude sur le profilage chromatographique des métabolites phytochimiques apolaires deux méthodes nous ont intéressés : la chromatographie phase gazeuse haute température (HTGC) et la chromatographie liquide à polarité de phases inversées non aqueuse (NARP-LC) couplées à la spectrométrie de masse.

Les performances, avantages et inconvénients des deux techniques chromatographiques proposées seront discutés dans cette partie.

#### III.1. PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE

Les deux méthodes chromatographiques (HTGC/MS et NARP-LC/MS) permettent d'obtenir des profils riches en information (figures 23 et 24).

L' HTGC/MS avec une mise en œuvre relativement plus simple permet une analyse plus rapide (environ 60 minutes) par rapport à la NARP-LC/MS (90 minutes) différence liée au temps d'équilibrage de la colonne PGC.

Les TIC chromatogrammes GC/MS et LC/MS (figure 25) des zones chromatographiques des triterpènes et stéroïdes d'un extrait de *M. scaber* indiquent, comme on pouvait s'attendre, une meilleure efficacité et résolution de la GC/MS (pics fins en 3 mn) par rapport à la LC/MS (pics larges en 18mn).

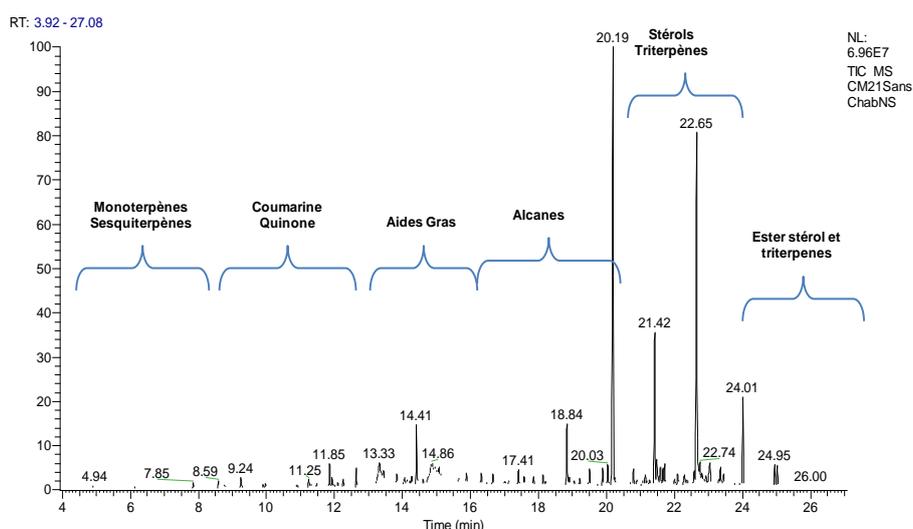


Figure 23 : TIC chromatogramme HTGC/MS d'un extrait traité au charbon actif de *M. scaber* (MS1)

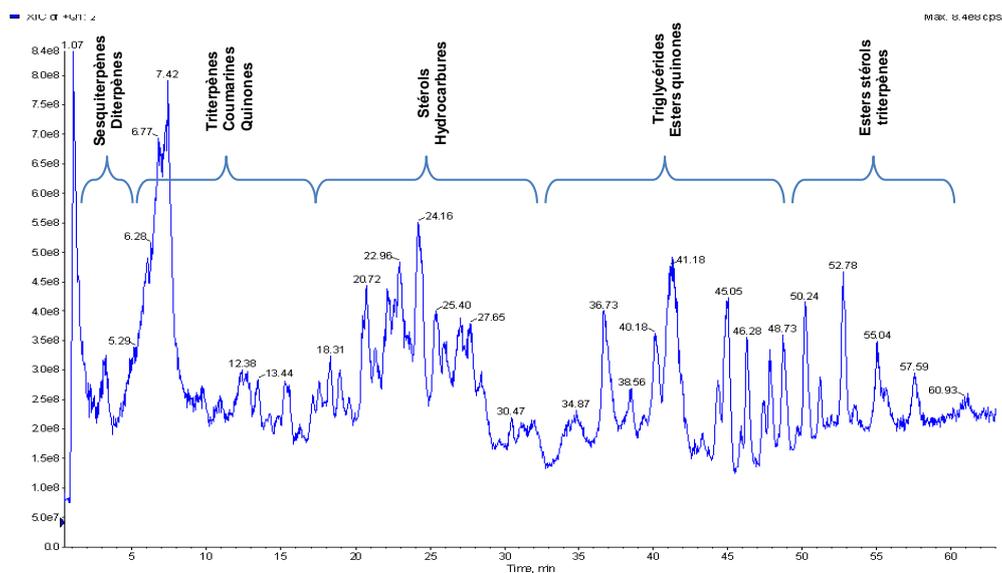


Figure 24 : TIC chromatogramme NARP-LC/MS d'un extrait traité au charbon actif de *M. scaber* (MS1)

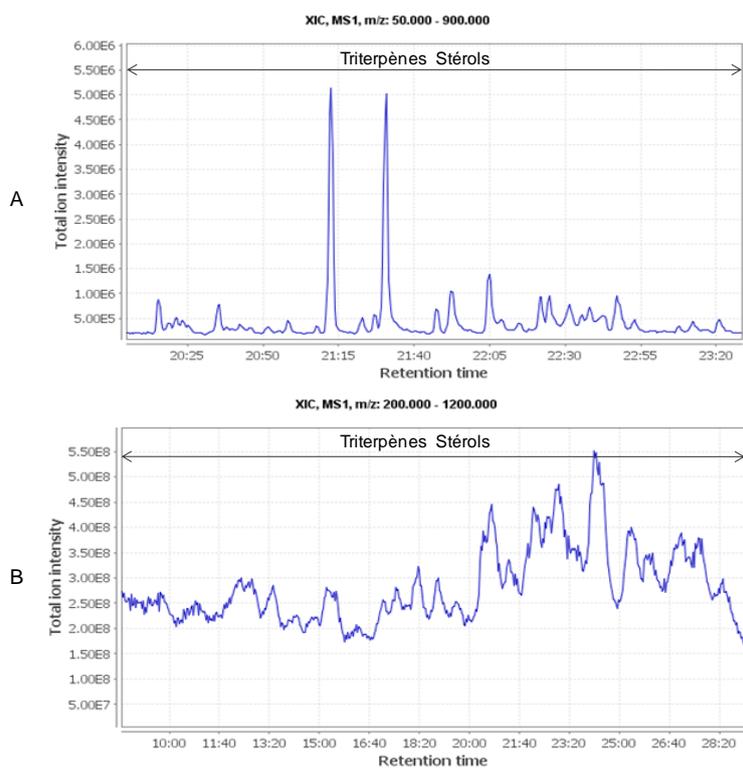


Figure 25 : TIC chromatogrammes GC/MS (A) et LC/MS (B) des triterpènes et stérois d'un extrait de *M. scaber*

## III.2 ANALYSE CHIMIOMETRIQUE

### III.2.1. Préparation des échantillons

Dans notre étude, la propriété d'adsorption des chlorophylles sur charbon actif indiqué par Jones et al. [1] a été utilisée pour l'élimination de la chlorophylle.

Les figures 26 et 27 montrent la présence des mêmes pics chromatographiques dans les chromatogrammes d'un extrait de *M. scaber* brut et traité au charbon actif. Cependant, on note des différences dans l'intensité des pics chromatographiques.

L'exploitation des S-Plot de l'analyse multivariée supervisée (PLS-DA) après correction orthogonale du signal (OSC) des profils chromatographiques HTGC/MS et NARP-LC/MS des extraits de *C. micranthum* et *M. scaber* permet de montrer que les deux techniques chromatographiques mettent en exergue la même influence du traitement au charbon actif, adsorption partielle des même composés phytochimiques (triterpènes, phytostérols et dérivés quinoniques).

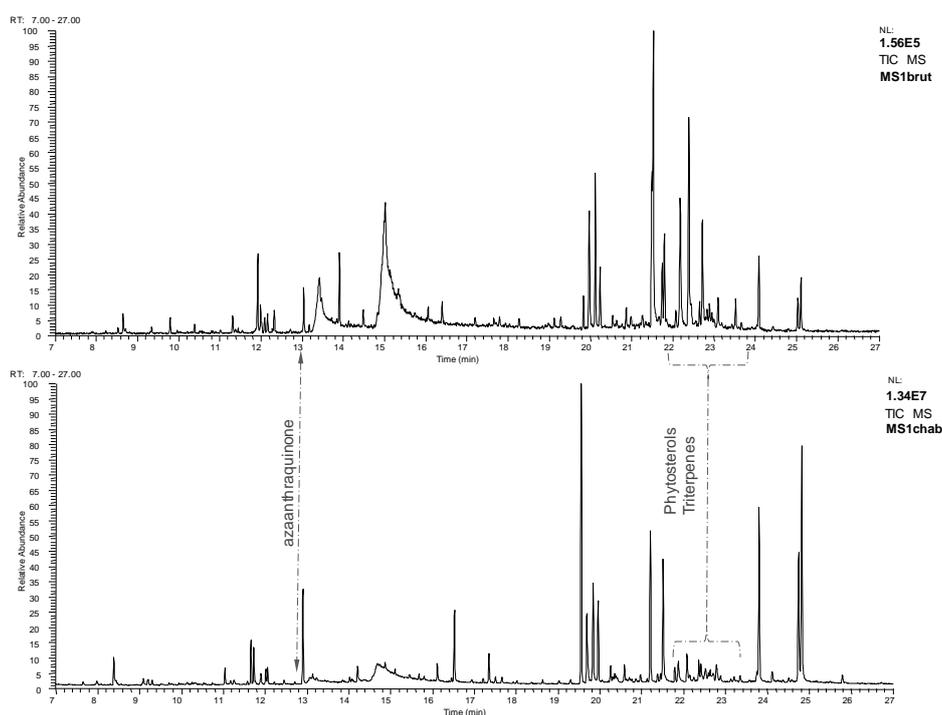


Figure 26 : Comparaison des TIC chromatogrammes GC/MS d'un extrait brut (haut) et traité au charbon actif (bas) de *M. scaber* (MS1)

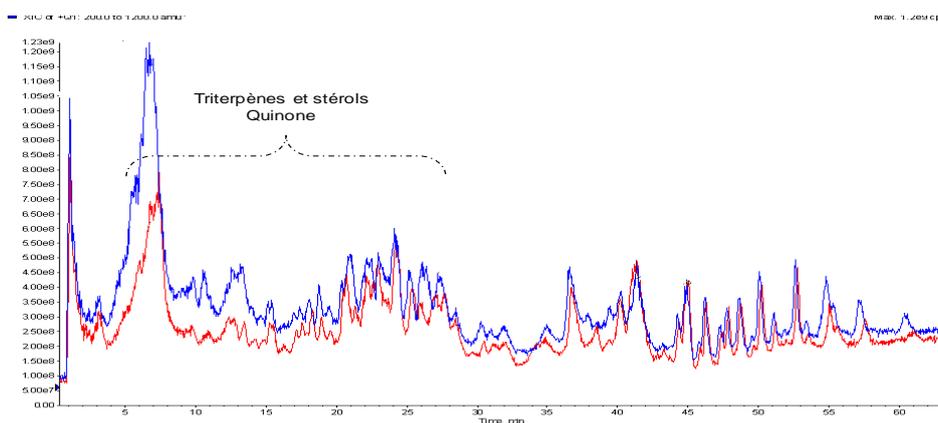


Figure 27 : Comparaison des TIC chromatogrammes LC/MS d'un extrait brut (bleu) et traité au charbon actif (rouge) de *M. scaber* (MS1)

### III.2.2. Différents lots de drogues végétales

L'échantillonnage des deux drogues végétales s'est effectué sur des années différentes et/ou des lieux de récolte ou d'approvisionnement commercial différents.

L'analyse en composantes principales des profils chromatographiques HTGC/MS et NARP-LC/MS des extraits de *C. micranthum* (figure 28) et *M. scaber* (figure 29) a indiqué une faible différence entre les lots de chaque drogue végétale. En effet, les scores des différents échantillons sont proches, même si on observe une distinction entre certains lots : le cas des lots CM2 et CM3, CM1 et CM4, MS1 et MS2 en HTGC/MS ; CM2 et CM5, MS1 et MS2 en NARP-LC/MS.

L'HTGC/MS permet de distinguer les différents lots en fonction des dates d'obtention donc des variations liées à la conservation des échantillons. Par contre la NARP-LC/MS permet de séparer les lots de drogues végétales en fonction des différentes sources d'obtention et également de mesurer les variations liées à la conservation des échantillons.

De plus, les répétitions de la préparation d'échantillon ont plus d'influence sur les profils NARP-LC/MS (première composante principale) que les profils HTGC/MS (deuxième composante principale).

L'analyse croisée par projection des modèles *C. micranthum* et *M. scaber* l'un dans l'autre et la valeur calculée des distances entre les deux modèles supérieure à la limite de confiance fixée au risque de 5% indique que les deux modèles chimiométriques permettent de distinguer les deux drogues végétales l'une de l'autre.

L'observation des Score-Plot fait ressortir que les variables discriminantes ne sont pas les mêmes dans les deux techniques chromatographiques. L'analyse des S-plot indique qu'en HTGC/MS, ce sont les hydrocarbures (alcane, alcène et alcyne), par contre en NARP-LC/MS les triterpènes, stérois et leurs esters prédominent.

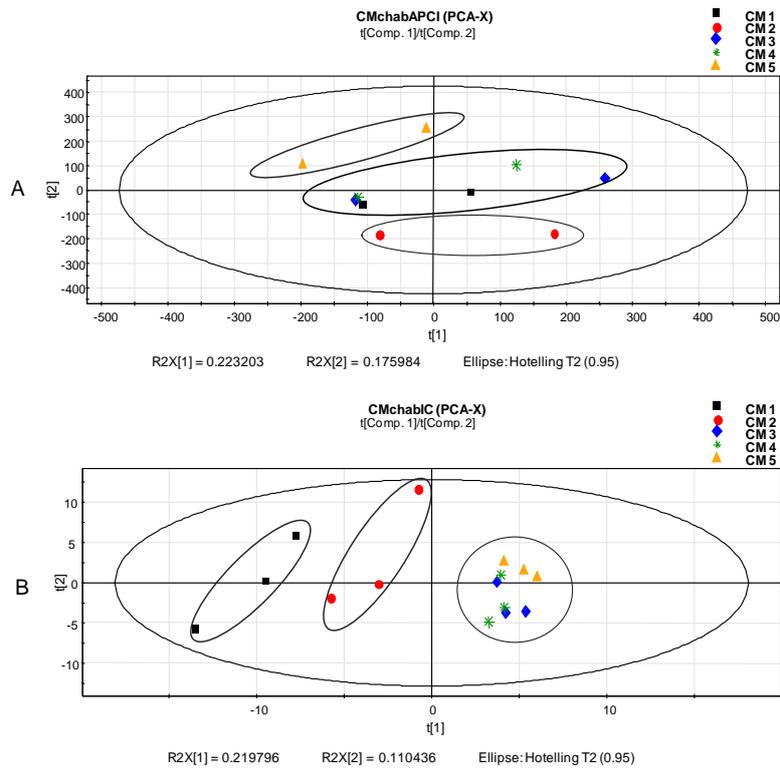


Figure 28 : Score-plot PCA des profils chromatographiques LC/MS (A) et GC/MS (B) des différents lots de *C. micranthum*

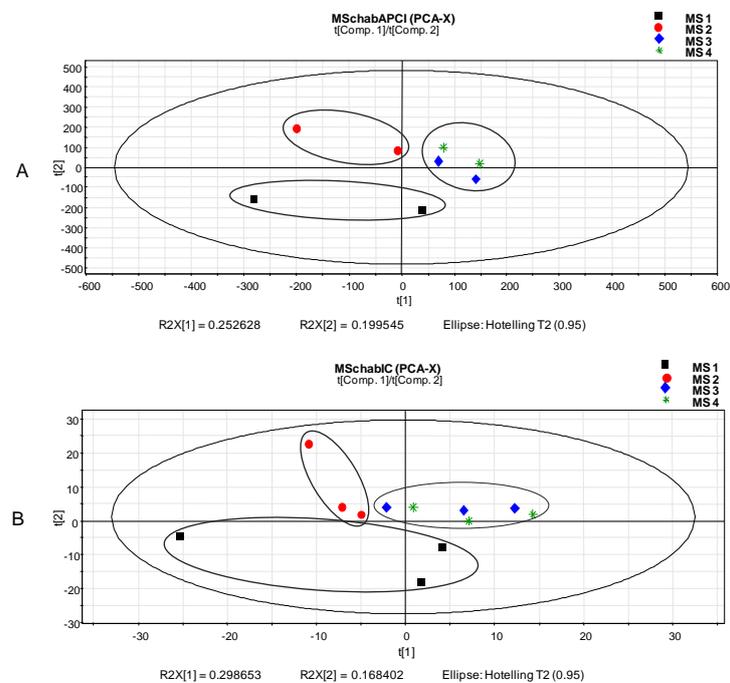


Figure 29 : Score-plot PCA des profils chromatographiques LC/MS (A) et GC/MS (B) des différents lots de *M. scaber*

### **III.3. IDENTIFICATION DES COMPOSES**

Les deux méthodes chromatographiques (HTGC/MS et NARP-LC/MS) proposées dans le cadre de nos travaux de thèse permettent de détecter plusieurs classes de métabolites secondaires apolaires phytochimiques (figures 23 et 24) : terpènes, stérols, quinones et phénols ; ainsi que des acides gras, glycérides et hydrocarbures (alcane, alcène, alcyne).

Les composés très volatils ont été détectés uniquement en HTGC/MS, par contre les composés de poids moléculaire élevé en NARP-LC/MS ce qui exprime les limites de chaque méthodes chromatographiques.[2-4]

Les deux méthodes chromatographiques (HTGC/MS et NARP-LC/MS) proposées ont permis de caractériser la majorité des métabolites secondaires apolaires identifiés dans les feuilles de *C. micranthum* [5,6] et de *M. scaber* [7-11].

### **III.4. REFERENCES : DISCUSSION GENERALE**

1. Jones WP, Kinghorn AD (2005) Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI (eds) Natural Products Isolation, vol 20. Methods in Biotechnology. Humana Press, Totowa, pp 323-351
2. Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RKP, Fraser PD, Bramley PM (2005) Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. Journal of Experimental Botany 56 (410):219-243. doi:10.1093/jxb/eri069
3. Kamboj A (2012) Analytical evaluation of herbal drugs. In: Vallisuta O, Olimat SM (eds) Drug Discovery Research in Pharmacognosy. InTech, Croatia,
4. Yongyu Z, Shujun S, Jianye D, Wenyu W, Huijuan C, Jianbing W, Xiaojun G (2011) Quality Control Method for Herbal Medicine - Chemical Fingerprint Analysis. In: Shoyama Y (ed) Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. InTech, pp 171-194
5. Olschwang D, Bassene E, Colonna J-P (1991) Tradition africaine et analyse scientifique : l'utilisation du kinkéliba (*Combretum micranthum* G. Don) en Afrique de l'Ouest. Epistème 2:74-82
6. Welch CR (2010) Chemistry and pharmacology of Kinkéliba (*Combretum micranthum*), a west African medicinal plant. Ph D Graduate Program in Medicinal Chemistry, University of New Jersey, New Brunswick
7. Ekpendu TO, Akah PA, Adesomoju AA, Okogun JI (1994) Antinflammatory and antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extracts. Pharmaceutical Biology 32 (2):191-196
8. Ekpendu TOE, Adesomoju AA, Ekundayo O, Okogun JI, Laakso I (1993) Constituents of the volatile oil of *Mitracarpus scaber* Zucc. Flavour and Fragrance Journal 8 (5):269-271
9. Bonga GM, Vanga-Mandah M, de Souza C, Guede-Guina FR (1995) Mise en évidence de phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*. Revue de Medecines et Pharmacopees Africaines 9 (1):21-30
10. Bisignano G, Sanogo R, Marino A, Aquino R, D'Angelo V, Germano MP, De Pasquale R, Pizza C (2000) Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. Letters in Applied Microbiology 30 (2):105-108
11. Gbaguidi F, Muccioli G, Accrombessi G, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J (2005) Densitometric HPTLC quantification of 2-azaanthraquinone isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity against *Dermatophilus congolensis*. Journal of Planar Chromatography 18 (5):377-379

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Notre travail se situe dans un cadre de l'évaluation analytique des tradimédicaments africains (médicaments traditionnels améliorés à base de plantes), qui sont complexes dans la composition et la préparation.

La stratégie que nous proposons repose sur l'établissement de profils chromatographiques des métabolites phytochimiques associés à la chimiométrie.

Les résultats de nos travaux de thèse axés sur les métabolites apolaires, nous permettent de retenir deux techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse : la chromatographie en phase gazeuse à haute température (HTGC/MS) et la chromatographie liquide en milieux non-aqueux sur phase inverse Carbone Graphite Poreux (NARP-LC/MS).

Les deux techniques chromatographiques associées à la chimiométrie, après extraction au dichlorométhane et élimination de la chlorophylle par adsorption sur charbon actif peuvent être utilisées pour :

- Distinguer clairement deux drogues végétales l'une de l'autre ;
- Mesurer les variations liées aux différentes sources et/ou période d'obtention des drogues végétales.

L'analyse des métabolites polaires constitue l'essentiel de nos perspectives. Elles vont porter sur la poursuite des essais sur l'établissement de profils chromatographiques des métabolites phytochimiques polaires en chromatographie liquide à polarité de phases inversées et en chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) couplées à la spectrométrie de masse.

Avec la combinaison des différents résultats obtenus, nous envisagerons développer des techniques de profilage chromatographique global des métabolites phytochimiques pour l'évaluation de la qualité des médicaments traditionnels de la région africaine.

## Annexe

### Monographie pharmacopée française des feuilles de kinkéliba

ANSM

#### KINKÉLIBA

##### Combretum micranthum

La partie utilisée du kinkéliba est constituée par la feuille séchée de *Combretum micranthum* G. Don. Le kinkéliba contient au minimum 1,20 pour cent de dérivés flavoniques totaux, exprimés en vitexine (*Mr* 432,4) et au minimum 11,0 pour cent de polyphénols totaux.

#### CARACTÈRES

La feuille de kinkéliba est entière, ovale, coriace, courtement pétiolée, pennatinervée et acuminée au sommet ; le limbe vert à brun rougeâtre, mesure de 5 cm à 9 cm de longueur sur 2 cm à 5 cm de largeur ; la face supérieure est luisante et glabre, la face inférieure plus terne et pubescente à l'aisselle des nervures secondaires. De la nervure médiane partent 4 à 6 nervures secondaires, rarement opposées, ascendantes et incurvées, presque parallèles et saillantes surtout sur la face inférieure.

*Examinée au microscope*, la section transversale de la feuille présente une nervure médiane proéminente, surtout sur la face inférieure ; l'épiderme est formé de cellules arrondies et de petite taille et porte des poils tecteurs, unicellulaires, à paroi épaisse et des poils pluricellulaires, en rosette, parfois un peu enfoncés dans une dépression épidermique ; la nervure présente, sous l'épiderme, du collenchyme rond, peu épais sur la face supérieure et angulaire sur la face inférieure ; le parenchyme fondamental, polyédrique, à méat, renferme de nombreuses macles d'oxalate de calcium dont certaines de grande taille ; au centre le faisceau libéro-ligneux en arc est entouré de fibres péricycliques peu colorables ; le liber renferme de petites macles d'oxalate de calcium disposées en strates ; un liber pérимédullaire, formé de nombreux ilots criblés est nettement séparé du faisceau libéro-ligneux. Le limbe, à mésophylle bifacial, présente une assise de tissu palissadique à cellules très étroites sur la face supérieure et du tissu lacuneux sur la face inférieure.

*Examiné au microscope*, le kinkéliba pulvérisé (300), brun rougeâtre, est constitué de fibres à parois minces et à lumen large ; de poils tecteurs, pluricellulaires, en rosette, rarement entiers ; de quelques poils tecteurs, unicellulaires, longs et effilés ; de stomates de type anomocytique entourés de cellules à parois sinueuses et de macles d'oxalate de calcium dont certaines à gros cristaux.

#### IDENTIFICATION

- A. Le kinkéliba présente les caractères macroscopiques précédemment décrits.
- B. Examiné au microscope, le kinkéliba pulvérisé (300) présente les caractères microscopiques précédemment décrits.
- C. À 0,5 g de kinkéliba, ajoutez 10 mL d'éthanol à 60 pour cent V/V R et laissez en contact pendant 10 min en agitant de temps à autre. Filtrez. À 0,5 mL de filtrat, ajoutez 50 mL d'éthanol à 60 pour cent V/V R et 0,1 mL d'une solution de chlorure de ferrique R à 10 pour cent m/V dans l'éthanol à 96 pour cent R et agitez. La coloration de la solution vire au vert-brun (tanins).

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

Pharmacopée française 1993

## ESSAI

**Éléments étrangers (2.8.2).** Le taux des éléments étrangers n'est pas supérieur à 2,0 pour cent.

**Chromatographie.** Opérez par chromatographie sur couche mince (2.2.27) en utilisant une plaque recouverte de *gel de silice G R*.

*Solution à examiner.* À 1 g de kinkéliba pulvérisé, ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez, en agitant, au bain-marie à 60 °C pendant 10 min. Laissez refroidir et filtrez sur un filtre contenant 0,5 g de *sulfate de sodium anhydre R*. Évaporez le filtrat à siccité. Dissolvez le résidu dans 1 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 5 mg d'*orientine R* dans du *méthanol R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 5 mg de *vitexine R* dans du *méthanol R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (c).* Dissolvez 5 mg d'*isoorientine R* dans du *méthanol R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

Déposez sur la plaque, en bandes, 20 µL de chacune des solutions. Développez sur un parcours de 15 cm avec un mélange de 10 volumes d'*acide formique anhydre R*, de 20 volumes d'*eau R*, de 30 volumes de *méthyléthylcétone R* et de 50 volumes d'*acétate d'éthyle R*. Laissez sécher la plaque à l'air (l'odeur d'acide formique reste perceptible). Pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 1 pour cent *m/V* et de *polyéthylèneglycol 400 R* à 5 pour cent *m/V* dans du *méthanol R*. Laissez sécher la plaque à l'air. Après 30 min examiner en lumière ultraviolette à 365 nm. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente dans la moitié supérieure quatre bandes fluorescentes. Par ordre croissant de  $R_f$ , une jaune orangé, est semblable quant à sa position et sa fluorescence à la bande principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c), une autre jaune-vert correspond à l'isovitexine ; les deux autres respectivement jaune orangé et jaune-vert, sont semblables quand à leur position et leur fluorescence aux bandes principales des chromatogrammes obtenus avec les solutions témoin (a) et (b). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente également une bande de fluorescence orangée à un  $R_f$  voisin de 0,35 et une bande de fluorescence bleue au front de solvant.

**Perte à dessiccation (2.2.32).** Déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,00 g de kinkéliba pulvérisé, la perte à la dessiccation n'est pas supérieure à 10,0 pour cent.

**Cendres totales (2.4.16).** Déterminé sur 1,00 g de kinkéliba pulvérisé, le taux des cendres totales n'est pas supérieur à 10,0 pour cent.

## DOSAGE

**Polyphénols totaux.** Dans une fiole conique, introduisez 1,000 g (*mg*) de kinkéliba pulvérisé (300) et ajoutez 150 mL d'*eau R*. Faites bouillir et maintenez au bain-marie pendant 30 min. Refroidissez à l'eau courante, puis introduisez le mélange dans un ballon jaugé et complétez à 250,0 mL avec de l'*eau R*. Laissez décanter, puis filtrez le liquide sur un papier filtre de diamètre de 12 cm. Éliminez les 50 premiers millilitres du filtrat et utilisez le reste pour le dosage. Prélevez 5,0 mL du filtrat et complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 5,0 mL de cette solution, ajoutez 1,0 mL de la solution d'*acide phosphotungstique R*, mélangez et complétez à 50,0 mL avec une solution de

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

**Pharmacopée française 1993**

*carbonate de sodium R* à 15 pour cent *m/V*. Mesurez l'absorbance (2.2.25) à 715 nm ( $A_1$ ) exactement 2 min après la dernière addition de réactif et utilisez l'eau R comme liquide de compensation.

*Essai témoin. Effectuez les opérations suivantes à l'abri de la lumière.* Dissolvez 50,0 mg de *pyrogallol R* dans l'eau R et complétez à 100,0 mL avec de l'eau R. Prélevez 5,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec de l'eau R. Prélevez 5,0 mL de cette dernière solution, ajoutez 1,0 mL de la *solution d'acide phosphotungstique R* et complétez à 50,0 mL avec une *solution de carbonate de sodium R* à 15 pour cent *m/V*. Mesurez l'absorbance à 715 nm ( $A_2$ ) exactement 2 min après la dernière addition de réactif et dans les 15 minutes qui suivent la dissolution du pyrogallol. Utilisez l'eau R comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en polyphénols totaux à l'aide d'expression :

$$\frac{13,12 \times A_1}{A_2 \times m}$$

*Dérivés flavoniques.* À 2,000 g de kinkéliba pulvérisé (300), ajoutez 100 mL d'*éthanol* à 60 pour cent *V/V R* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 1 h. Laissez refroidir et filtrez. Recueillez le filtrat et renouvelez une fois l'extraction sur le marc. Introduisez les filtrats réunis dans un ballon jaugé et complétez à 250 mL avec de l'*éthanol* à 60 pour cent *V/V R* (solution mère). Dans un ballon jaugé, introduisez 2,0 mL de solution mère, 2 mL d'une solution de *chlorure d'aluminium R* à 2 pour cent *m/V* dans le *méthanol R* et complétez à 25,0 mL avec du *méthanol R* (solution 1). Dans un ballon jaugé, introduisez 2,0 mL de solution mère et complétez à 25,0 mL avec du *méthanol R* (solution 2).

Mesurez l'absorbance (2.2.25) de la solution 1, après 25 min, à 394 nm en utilisant la solution 2 comme liquide compensation.

Calculez la teneur en dérivés flavoniques totaux, exprimés en vitexine, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A \times 11,57}{m} \text{ pour cent}$$

en prenant 270 comme valeur de l'absorbance spécifique.

$A$  = absorbance de la solution 1 à 394 nm.  
 $m$  = masse de la prise d'essai, en grammes.

#### CONSERVATION

À l'abri de la lumière et de l'humidité.

---

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

**Pharmacopée française 1993**

## RESUME

Les médicaments traditionnels à base de plantes (tradimédicaments) sont très utilisés par les populations africaines. Mais leur qualité est difficile à maîtriser, car ce sont des mélanges complexes de plusieurs drogues végétales ou des préparations à base de drogues végétales d'origine souvent inconnue et/ou très variable. Le profil chromatographique des métabolites phytochimiques constitue un outil important pour l'évaluation de la qualité de ces produits.

L'objectif de ce travail est de proposer un protocole de préparation des échantillons et d'établissement de profil par chromatographie liquide et chromatographie en phase gazeuse des métabolites apolaires, pour l'évaluation de la qualité des médicaments traditionnels à base de plantes.

La méthodologie est basée sur le traitement chimiométrique des profils chromatographiques des métabolites apolaires issus de différents lots de feuilles de *Combretum micranthum* et *Mitracarpus scaber*.

Le profilage métabolique s'est effectué par chromatographie liquide sur Carbone Graphite Poreux en milieu non-aqueux et par chromatographie en phase gazeuse à haute température, couplées à la spectrométrie de masse, après extraction au dichlorométhane et élimination de la chlorophylle adsorbée sur charbon actif.

L'analyse chimiométrique des données utilisant l'analyse PLS-discriminante avec ou sans correction orthogonale du signal, appliquée aux profils chromatographiques des feuilles de *Combretum micranthum* et *Mitracarpus scaber*, a montré de faibles différences entre les lots de chaque drogue végétale, et une différenciation claire des deux drogues végétales.

Les deux méthodes d'analyse par chromatographie liquide et chromatographie en phase gazeuse permettent de détecter la plupart des métabolites secondaires apolaires bioactifs ou non déjà identifiés dans les feuilles des deux espèces.

Mots-clés: profil chromatographique liquide non aqueux, profil chromatographique gaz haute température, Carbone Graphite Poreux; métabolites apolaires; chimiométrie; médicaments traditionnels à base de plantes; *Combretum micranthum*; *Mitracarpus scaber*

## ABSTRACT

The traditional herbal medicines are widely used by African people. But their quality control is difficult, because they are complex mixtures of several herbal drugs or herbal drugs preparations. Their origin is often unknown and/or highly variable. The chromatographic profile of phytochemical metabolites is an important tool for quality assessment of these products.

The objective of this work is to propose a protocol for sample preparation and liquid chromatographic and gas chromatographic profiling of non-polar metabolites for quality assessment of african traditional herbal medicinal products.

The methodology is based on the chemometric treatment of chromatographic profiles of non-polar metabolites from different batches of leaves of *Combretum micranthum* and *Mitracarpus scaber*.

Metabolic profiling is carried out by non-aqueous liquid chromatography on Porous Graphitic Carbon and by high temperature gas chromatography, coupled with mass spectrometry, after extraction with dichloromethane and removal of chlorophyll adsorbed on activated charcoal.

The chemometric data analysis using PLS-discriminant analysis with or without orthogonal signal correction applied to the chromatographic profiles of leaves of *Combretum micranthum* and *Mitracarpus scaber* showed small differences between batches of each herbal drug, and a clear differentiation two herbal drugs.

Both analyses by liquid chromatography and gas chromatography methods detect most non-polar metabolites bioactive or/not already identified in the leaves of both species.

Keywords: non-aqueous liquid chromatographic profile, high temperature gas chromatographic profile, Porous Graphitic Carbon; non-polar metabolites, chemometrics, traditional herbal medicines; *Combretum micranthum*; *Mitracarpus scaber*

## Adresse du laboratoire d'accueil :

Laboratoire de Chimie Analytique, tour D2 3ème étage  
Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud, EA 4041  
Faculté de Pharmacie, Université de Paris Sud  
5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex.