



YVES ROCHER

CRÉATEUR DE LA COSMÉTIQUE VÉGÉTALE®



Développement de méthodes
d'identification et de quantification
du darutoside par HPTLC-ESI-MS
et HPTLC-Fluorescence dans des
extraits de feuilles de *Sigesbeckia
orientalis*

Jocelyn GIBOULOT

Phytoanalyste

Catherine MERVOYER

Ingénieur Analyste



Sommaire



1-Objectifs de l'étude

2-Le Sigesbeckia (*Siegesbeckia orientalis*)

Présentation de la plante

3-Méthode de Quantification par HPTLC-Fluorescence

Méthode

Détection et révélation des terpènes

4- Méthode d'identification des différents terpènes par HPTLC-MS

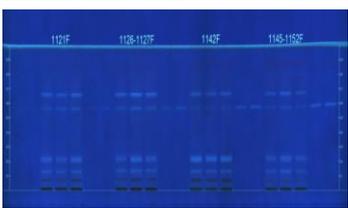
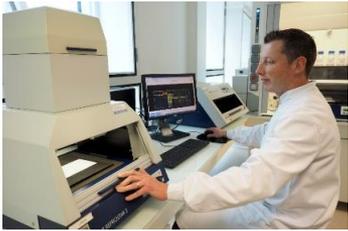
Couplage TLC-MS

Identification des différents terpènes

5-Applications

Quantification des terpènes

Etude de la variabilité de la teneur en Darutoside et en Terpènes en fonction de la date de récolte





Objectifs de l'étude

- 1 - Développement d'une méthode de quantification par HPTLC-Fluorescence rapide et efficace pour réaliser le dosage du Darutoside dans les feuilles de *Sigesbeckia*.
- 2 - Identification des principaux terpènes
- 3 - Etude de la période de récolte optimale

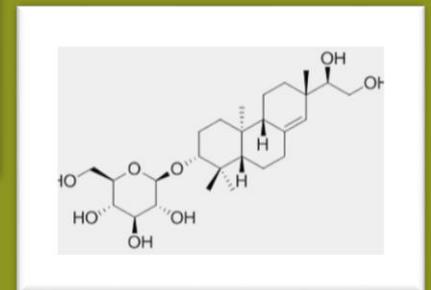


Le Sigesbeckia

Siegesbeckia orientalis

La plante

Les principaux constituants





Le Sigesbeckia



Sigesbeckia orientalis L.

Noms : Colle – Colle , Herbe divine, Herbe de Saint-Paul, Satrikoazamaratra

Famille : Astéracées

Plante herbacée annuelle de 40-50 cm de haut, aux feuilles triangulaires, veloutées et dentées. Les fleurs jaune d'or sont regroupées en inflorescence au sommet des tiges.

Origine géographique



Utilisation/Propriétés

- Cicatrisante (Pharmacopée Malgache)
- Anti-inflammatoire
- Sédatives
- Hémostatiques
- Stimulantes



Le Sigesbeckia

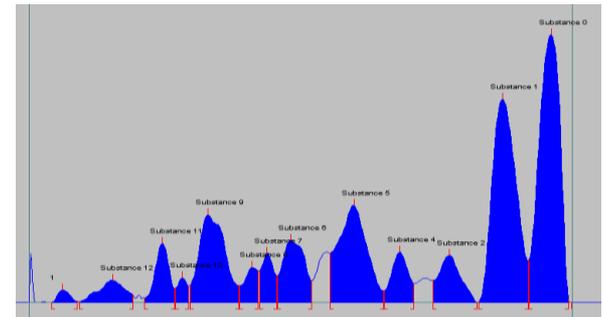
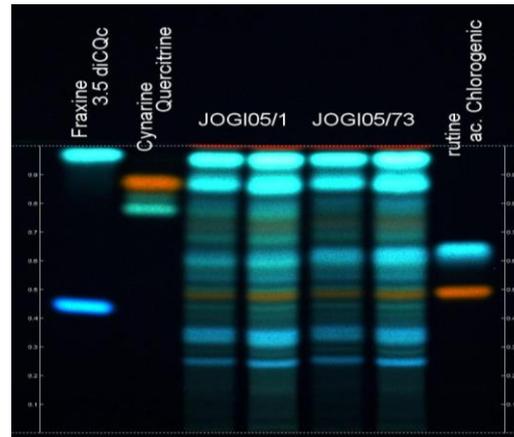
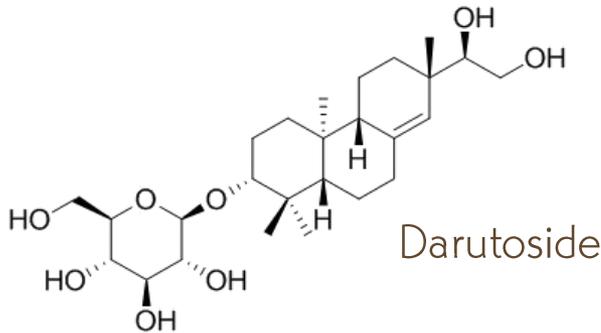
2 Catégories de molécules actives identifiées majoritaires

Gomme-résine

La partie résine renferme différents diterpènes, dont le Darutoside. L'extrait sec contient des sucres (simples et polysaccharides) avec une teneur de 40% en sucres totaux.

Composés phénoliques

Cet extrait contient principalement des acides chlorogéniques à hauteur de 14% (qui font partis des composés phénoliques). Ils sont reconnus pour leurs activités anti-oxydantes.



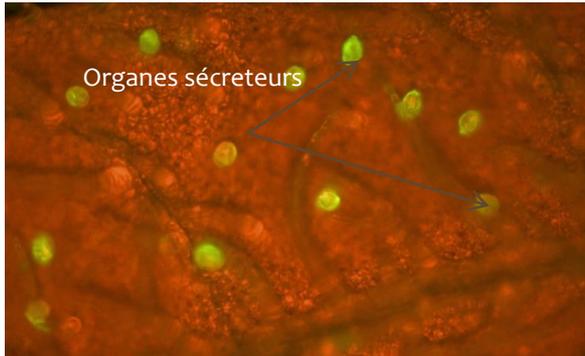


Le Sigesbeckia

2 Catégories de molécules actives identifiées majoritaires

Gomme-résine

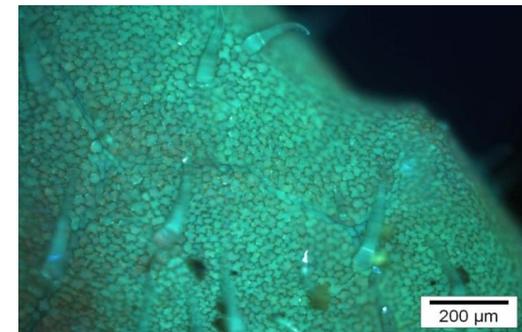
La partie résine renferme différents diterpènes, dont le Darutoside. L'extrait sec contient des sucres (simples et polysaccharides) avec une teneur de 40% en sucres totaux.



Autofluorescence jaune + Analyse spectrale
Mise en évidence de la Gomme-Résine

Composés phénoliques

Cet extrait contient principalement des acides chlorogéniques à hauteur de 14% (qui font partis des composés phénoliques). Ils sont reconnus pour leurs activités anti-oxydantes.



Autofluorescence bleue sous lumière UV
Mise en évidence des Composés Phénoliques



Méthode de Quantification par HPTLC-Fluorescence



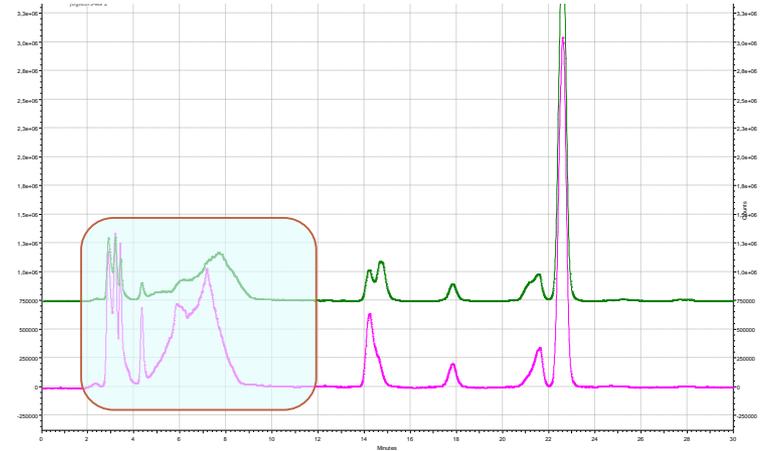


Méthode de Quantification par HPTLC-Fluorescence

Problématique :

L'analyse quantitative des diterpènes est peu décrite, en HPLC ou HPTLC, par le manque de chromophore.

Dans le cas du *Siegesbeckia*, la présence de la Gomme Résine (mix de Polysaccharides et de Terpènes) gêne aussi l'analyse en HPLC - ELSD



Plaque :

HPTLC Si60F254 20 x 10cm

Phase Mobile :

Chloroforme/Methanol/Eau

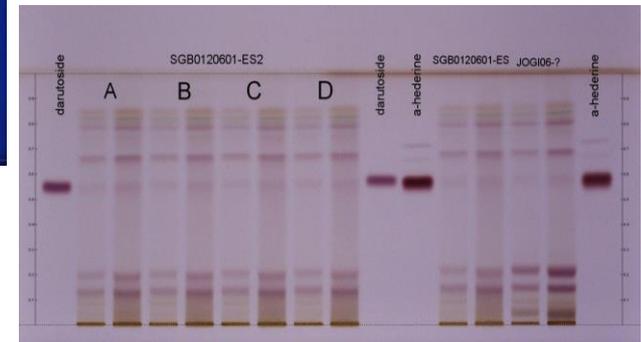
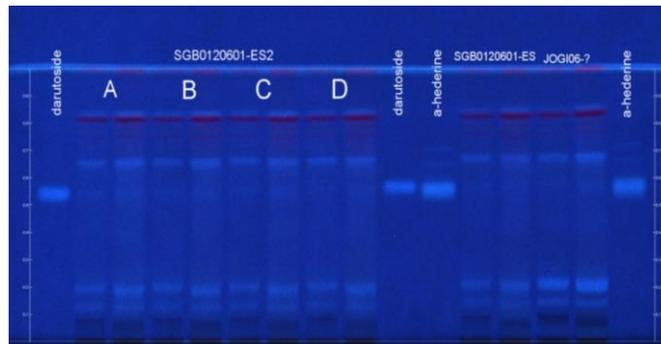
65:25:4 v/v/v

Révélation :

Solution de Primuline

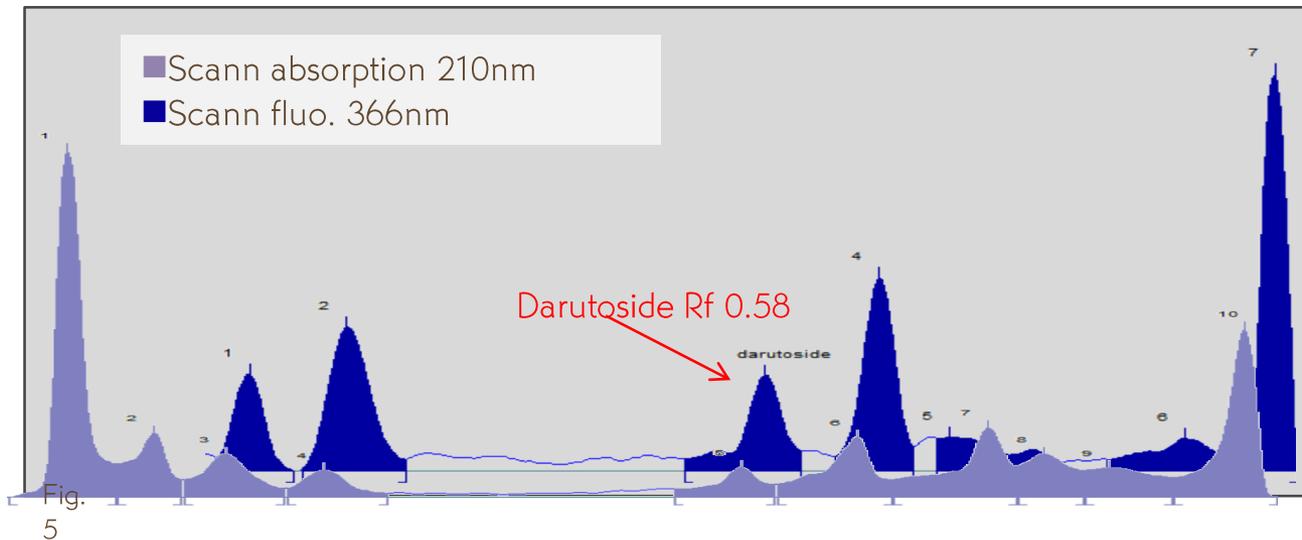
Réactif de Moolisch ou

Solution éthanolique H₂SO₄ dilué

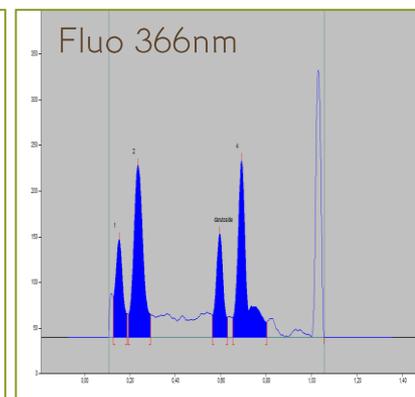
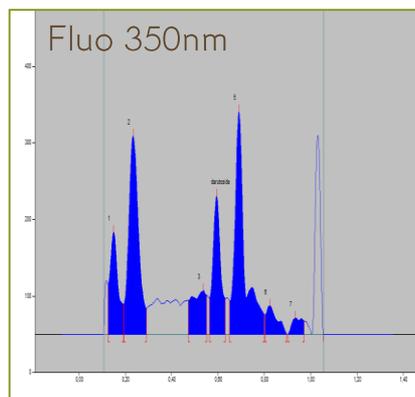
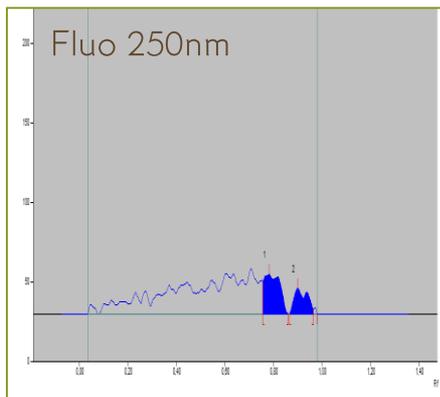




Méthode de Quantification par HPTLC-Fluorescence



Choix de la longueur d'onde de travail





Méthode de Quantification par HPTLC-Fluorescence

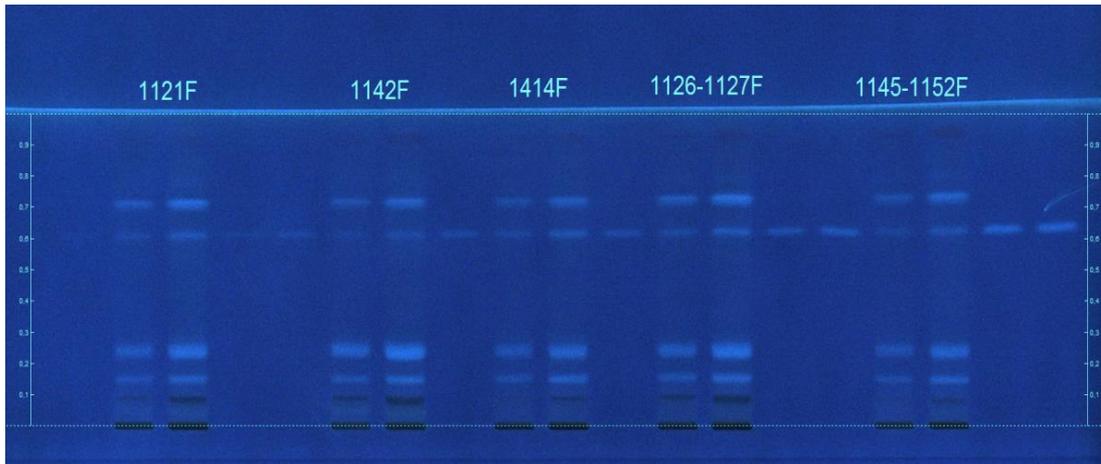
Etalonnage :

- 2 solutions mères différentes de Darutoside purifié
- Dépôts volumes différents : gamme de 40 à 500 ng par spot

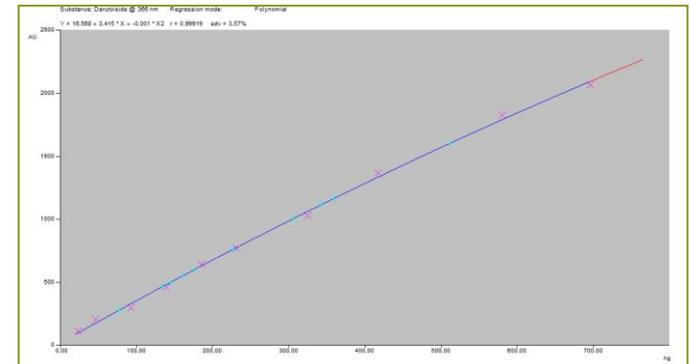
Echantillons :

- Extraction hydroalcoolique des feuilles de Siegesbeckia
- Double dépôt à matière sèche égale avec 2 volumes différents

Etalonnage



Courbe étalonnage type polynomial
Aire = f(Qté par spot)
 $r^2=0.9992$

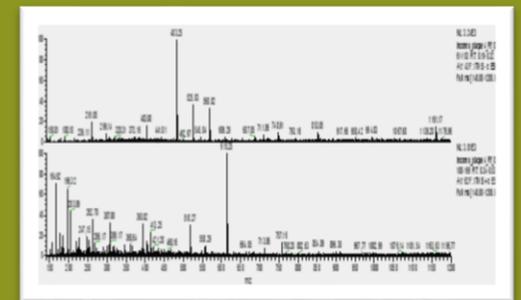


Coefficient de variation sur la quantité en darutoside dans les échantillons

- intra-plaque < 1%
- inter-plaque env. 6%

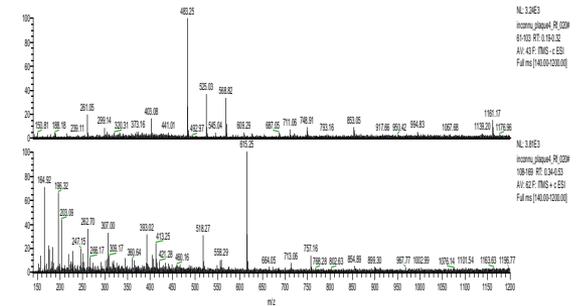


Méthode d'identification des différents terpènes par HPTLC-MS



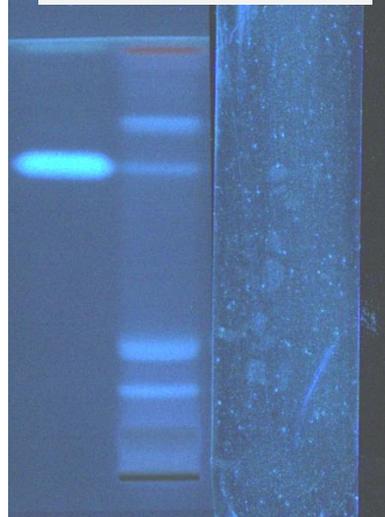


Méthode d'identification des différents terpènes

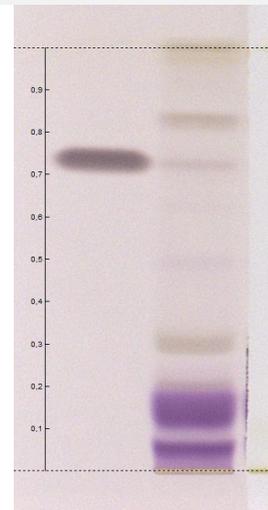


- Révélation sur une partie de la plaque, l'autre étant caché par de l'aluminium.
- Spotage réalisé sur la partie non révélée (voir exemple ci contre)

Révélation Primuline

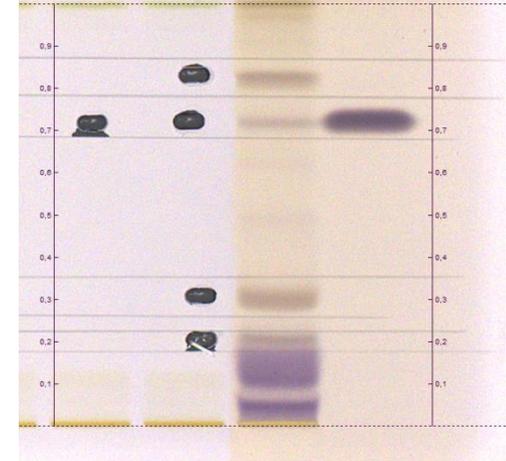


Révélation Moolisch



Après spotage

Extrait *Sigesbeckia*
ETOH40 0.5%(p/v) darutoside

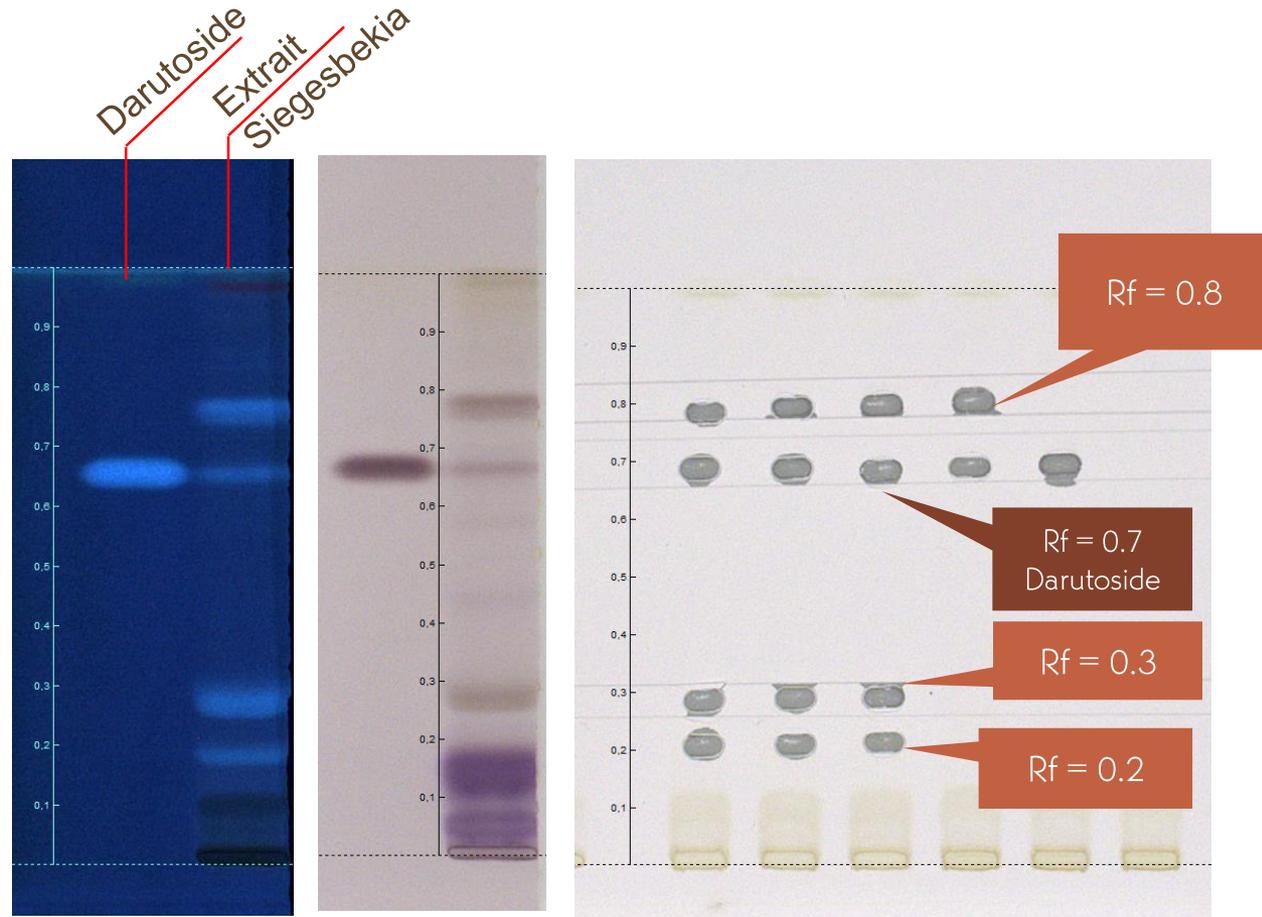




Méthode d'identification des différents terpènes

Conditions MS :

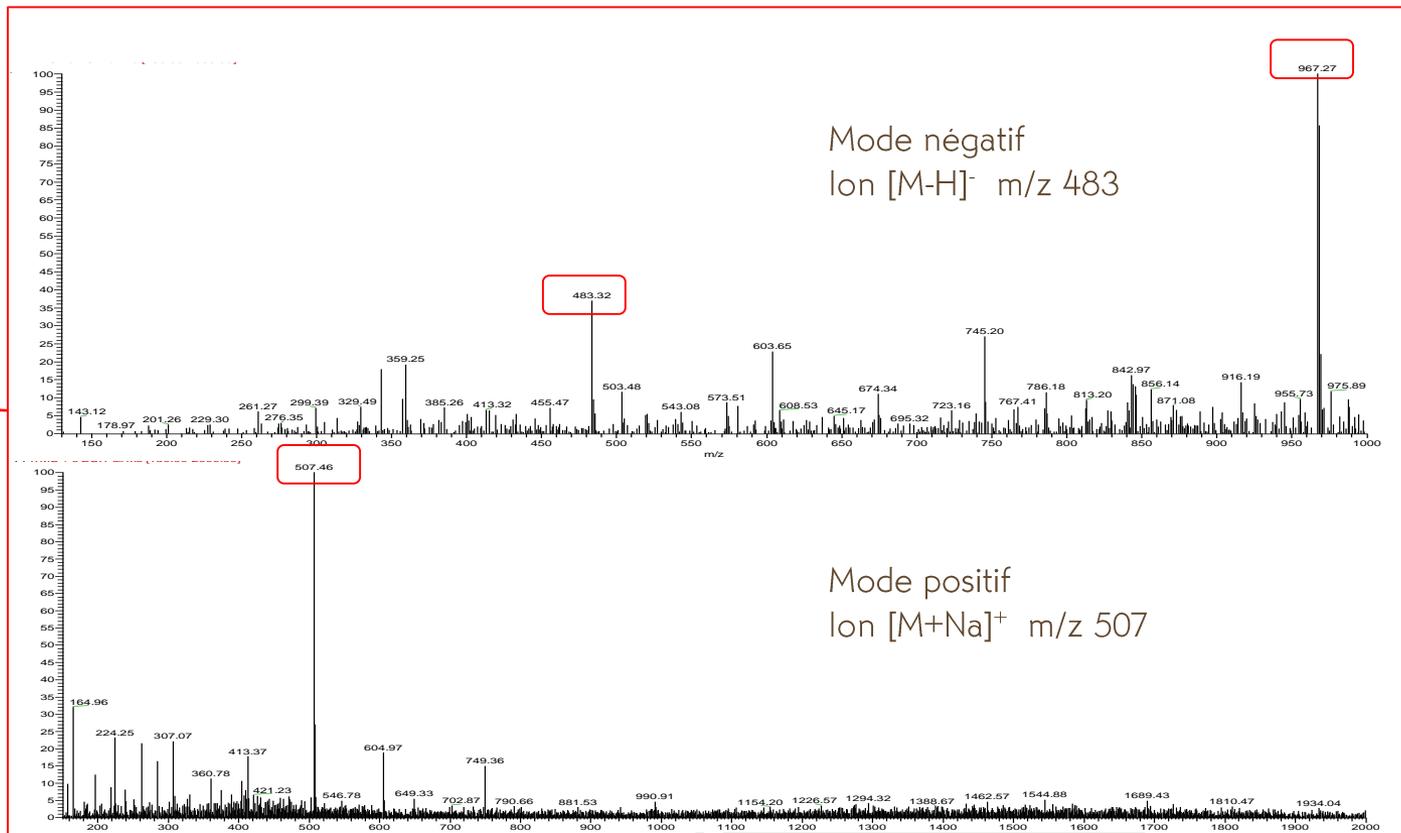
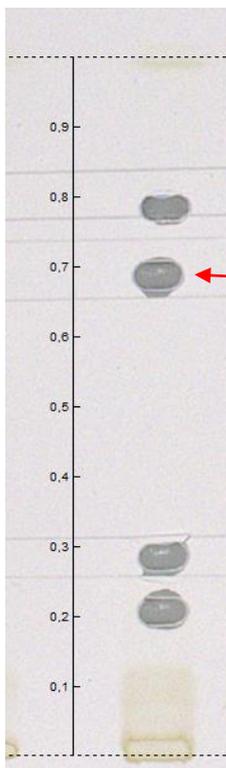
- Flow = 0.2 mL/min
- sheath gas = 25 ml/min
- auxillary gas = 5 ml/min
- capillary temperature 300° C
- spray voltage -3.5 kV (mode négatif)
- -5 kV (mode positif)
- Energie de collision pour MSⁿ 30%



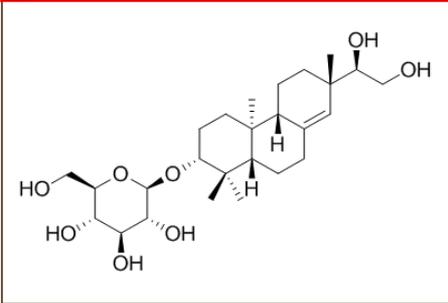


Méthode d'identification des différents terpènes

Rf = 0.7



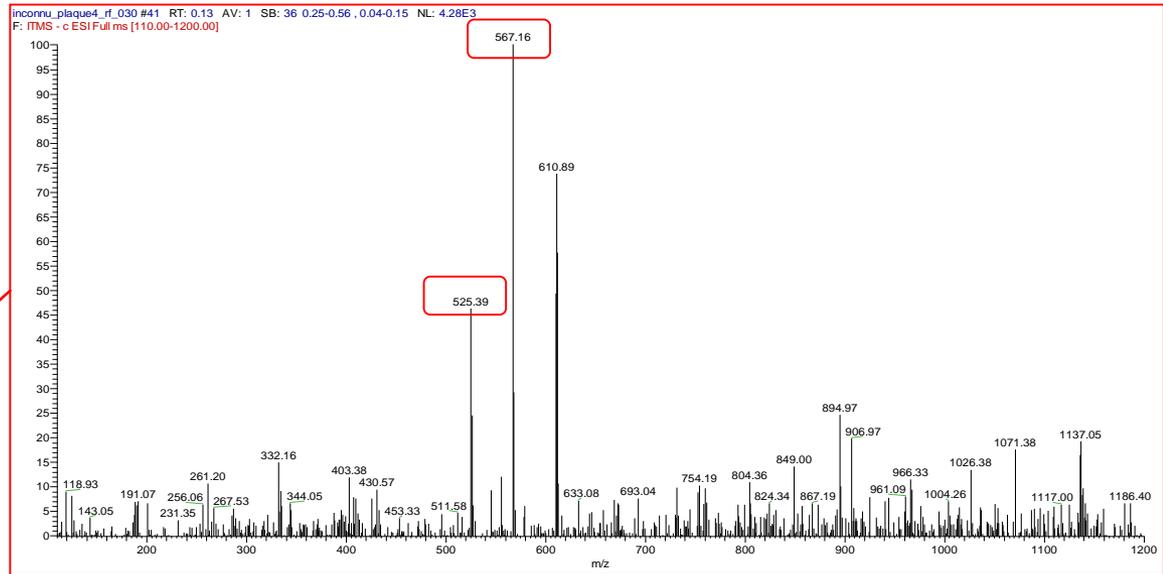
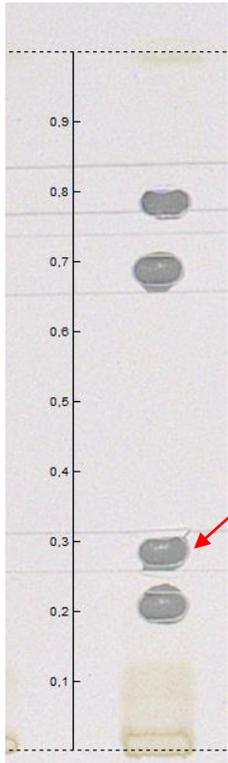
Darutoside
MW = 484



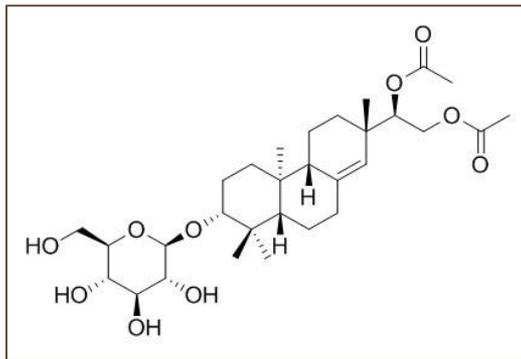


Méthode d'identification des différents terpènes

Rf = 0.3



Mode négatif
ion m/z 567 soit $[M-H]^-$
ion m/z 525 soit $[M-H-CH_3CO]^-$.

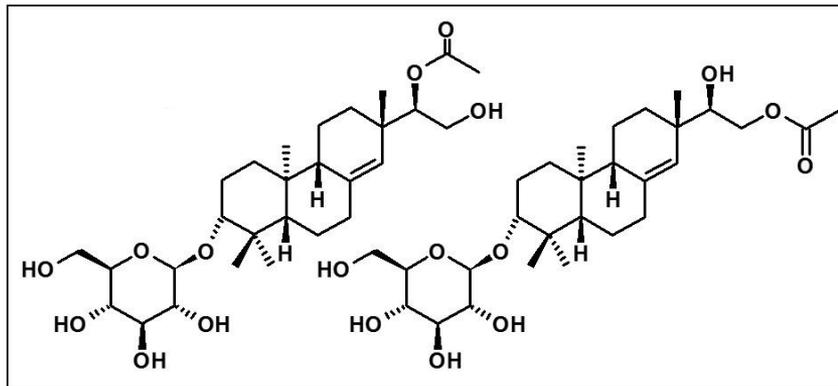
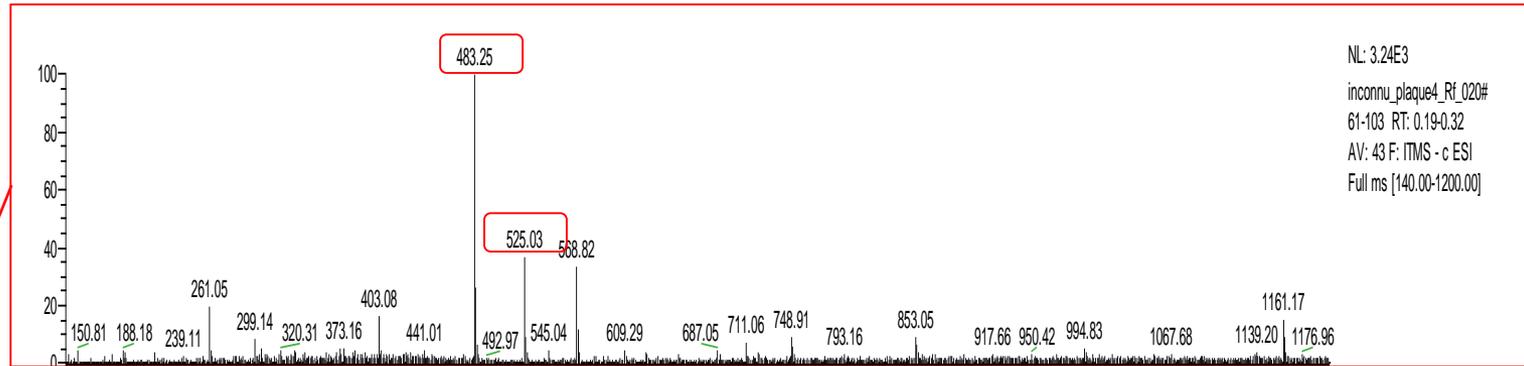
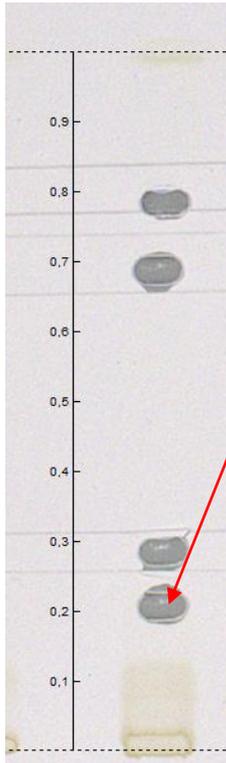


15-16-Di-O-Acetyldarutoside
MW = 568



Méthode d'identification des différents terpènes

Rf = 0.2



Mode négatif

ion m/z 525 soit $[M-H]^-$

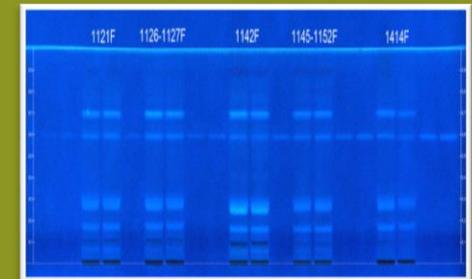
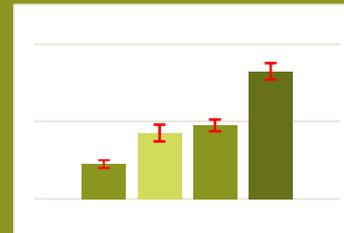
ion m/z 483 soit $[M-H-CH_3CO]^-$.

15-O-Acetyldarutoside ou
16-O-Acetyldarutoside
MW = 526



Applications

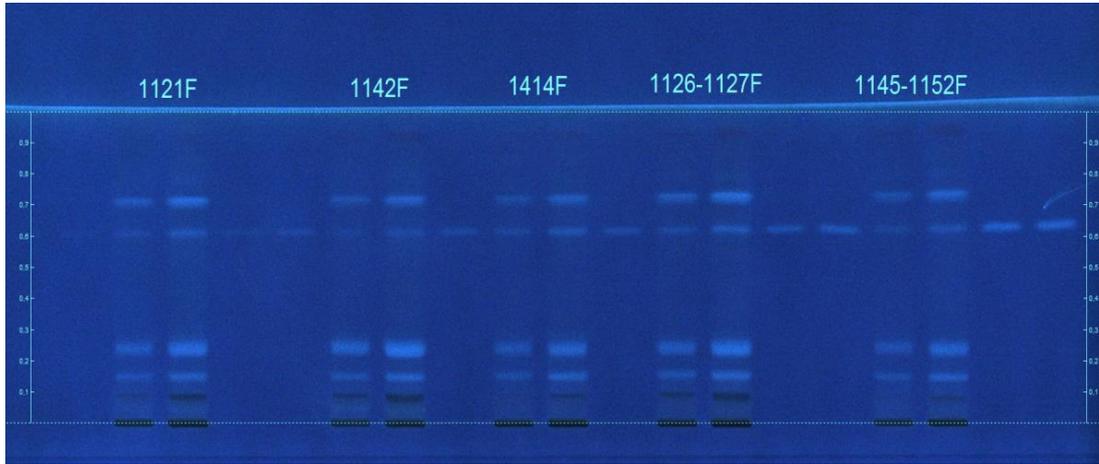
Etude de la période de récolte optimale



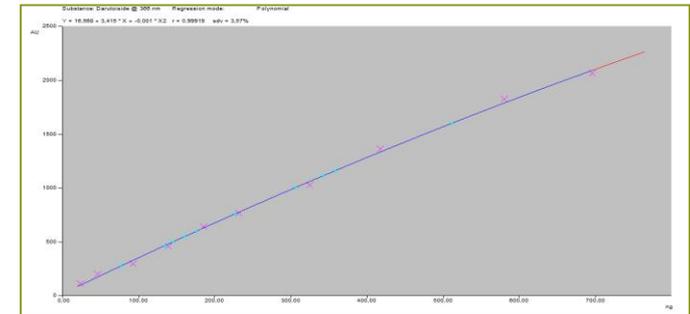


Applications

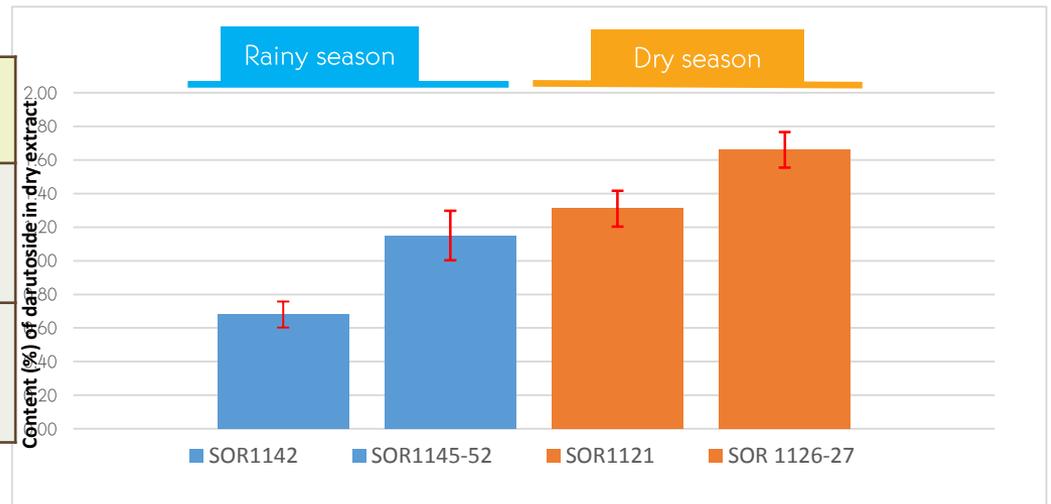
Etalonnage



Courbe etalonnage type polynomial
 Aire = f(Qté par spot)
 $r^2=0.9992$



Extract	Yield of extraction % (w/w)	Darutoside content in dry extract % +/- SD	Date of Harvest	Season in Madagascar (Moramanga)
SOR1121	14.5	1,31 +/- 0,11	End of may	Dry season
SOR1126-27	19.6	1,66 +/- 0,11	End of june-july	
SOR1142	13.1	0,68 +/- 0,08	October	Rainy season
SOR1145-52	14.5	1,15 +/- 0,15	November-december	



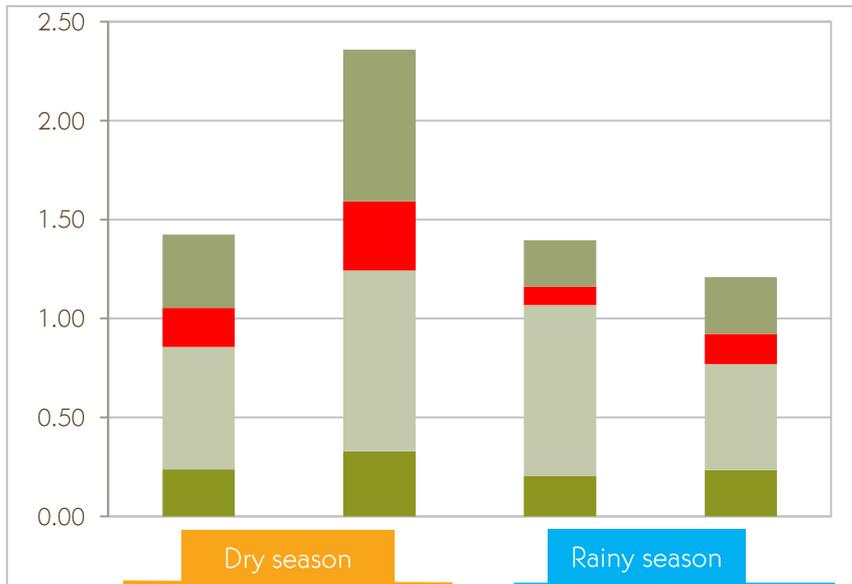


Applications



Lot	% Terpènes totaux en éq Darutoside sur sec	% Terpènes totaux en éq Darutoside sur plante
Mai	9,8%	1,4 %
Juin-Juillet	12,0%	2,4 %
Octobre	10,7%	1,4 %
Novembre Décembre	8,3%	1,2 %

% terpènes totaux



Proportions des différents terpènes



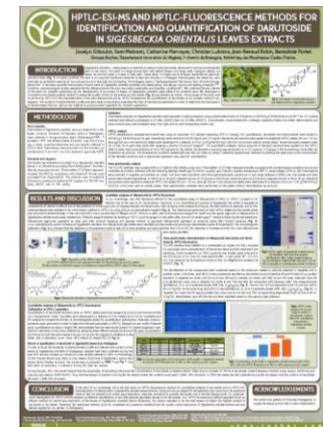


Conclusions

- Méthode rapide de dosage du Darutoside par HPTLC
- Détermination de certains composés terpéniques de notre extrait de Siegesbeckia
- Confirmation de la période optimale de récolte pour les composés d'intérêts



aferp
Association Francophone pour
l'Enseignement et la Recherche
en Pharmacognosie





Merci de votre attention



Département Innovation du Végétal