



YVES ROCHER

CRÉATEUR DE LA COSMÉTIQUE VÉGÉTALE®



Développement d'une méthode de quantification de xantones dans des extraits de coques de mangoustan (*Garcinia mangostana* L.) par HPTLC-UV

Bénédicte Portet

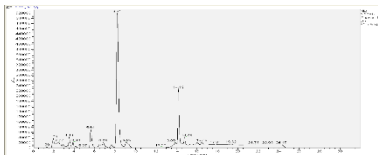
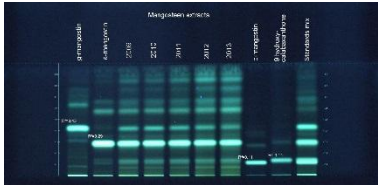
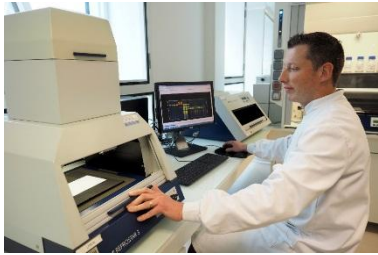
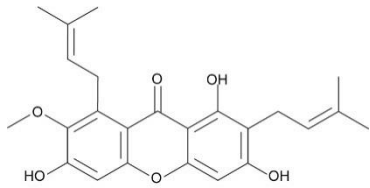
Responsable du laboratoire de Phytochimie

Aline Gilbert

Technicienne phytochimiste



Sommaire



1-Objectifs de l'étude

2-Le Mangoustan (*Garcinia mangostana* L.)

Présentation de la plante

Rappel sur les xanthonés : des molécules polyphénoliques atypiques

3-Présentation de la méthode HPTLC-UV

Détection et révélation des xanthonés

Quantification des xanthonés

4-Applications

Etude de la variabilité de la teneur en xanthonés dans différents lots de coques

Comparaison des résultats obtenus avec une méthode HPLC-UV



Objectifs de l'étude

1-Développement d'une méthode d'analyse par HPTLC-UV rapide et efficace pour réaliser le contrôle qualité de coques de mangoustan.

2- Application de la méthode à l'évaluation de plusieurs lots de plante

3-Comparaison des résultats des dosages de la teneur en xanthones avec ceux obtenus en HPLC-UV.

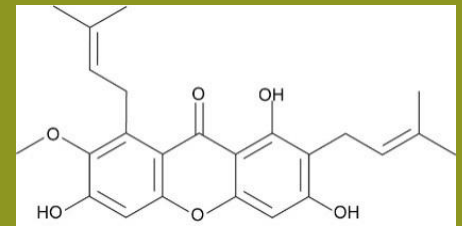




2-Le Mangoustan (*Garcinia mangostana* L.)

Présentation de la plante

Rappel sur les xanthones : des molécules polyphénoliques atypiques





Le Mangoustan, Fruit du *Garcinia mangostana* L. (Clusiaceae)

DESCRIPTION :

- Originaire d'Asie du Sud-Est
- Arbre pouvant atteindre 20 m de haut
- Fruit : coque épaisse, pulpe blanche

CONSTITUANTS PRINCIPAUX

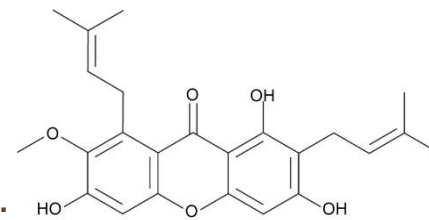
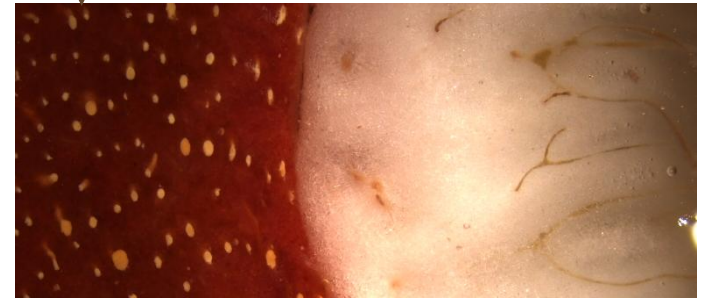
Tannins, anthocyanes

Xanthones

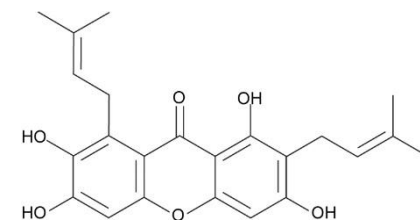
α -mangoustine et γ -mangoustine

UTILISATIONS / PROPRIETES (Bibliographie):

- Partie la plus utilisée : Les fruits (et coques du fruit)
- Utilisation en alimentaire (pulpe du fruit)
- Utilisations traditionnelles pour ses propriétés médicinales (coques du fruit) : antibactériennes, anti-fongiques, anti-oxydantes et anti-inflammatoires.



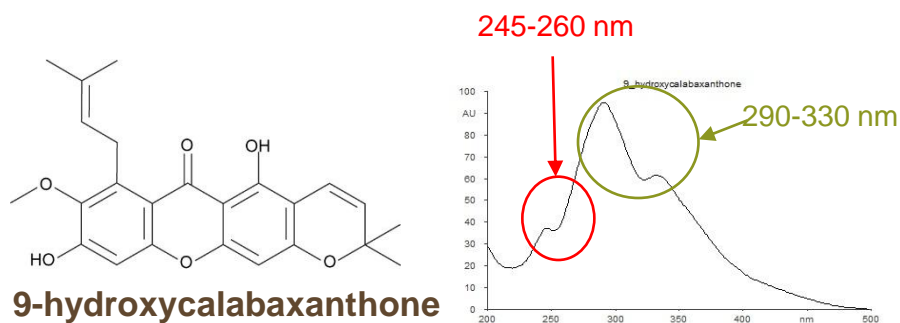
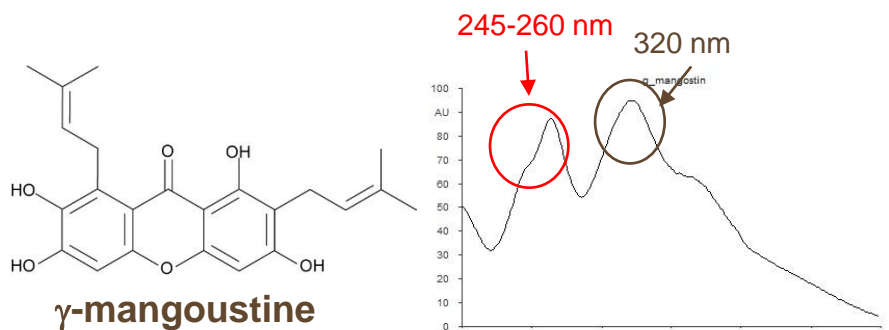
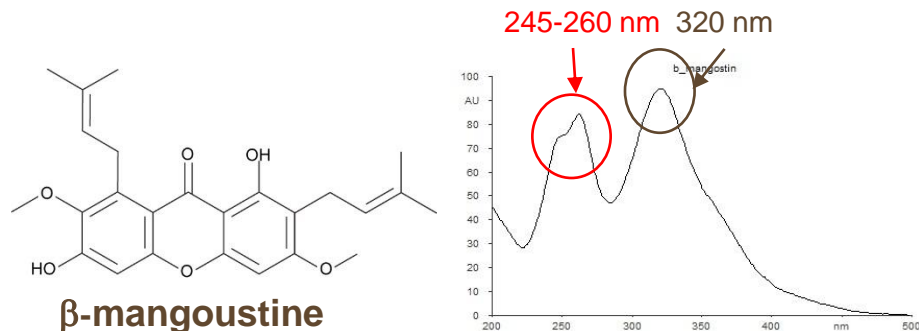
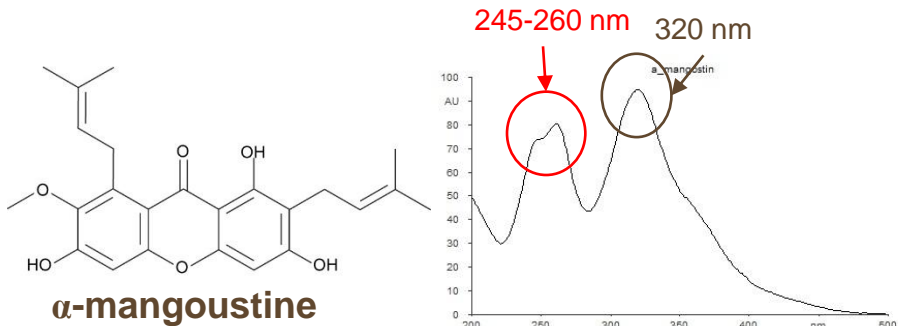
α -mangoustine



γ -mangoustine



Les principales xanthones des coques du mangoustan



Molécules polyphénoliques prénylées

λ_{\max} (UV): vers 250 et 320 nm



Plaque (HP)TLC Si60 vs RP18

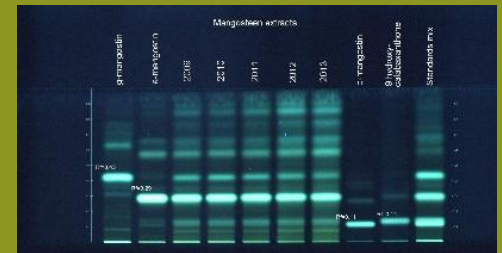
Détection UV: 254, 366 nm

Révélation: réactif de NEU



3-Présentation de la méthode HPTLC-UV

Détection et révélation des xanthones
Quantification des xanthones





Analyse d'extraits éthanoliques de coques de mangoustan par TLC-UV sur plaque Si60

**Rec.Nat.Prod (2009), 3:4, 178-186

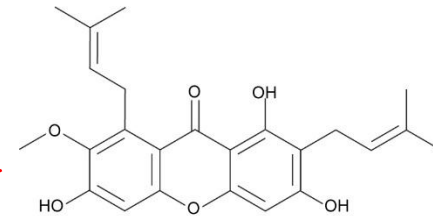
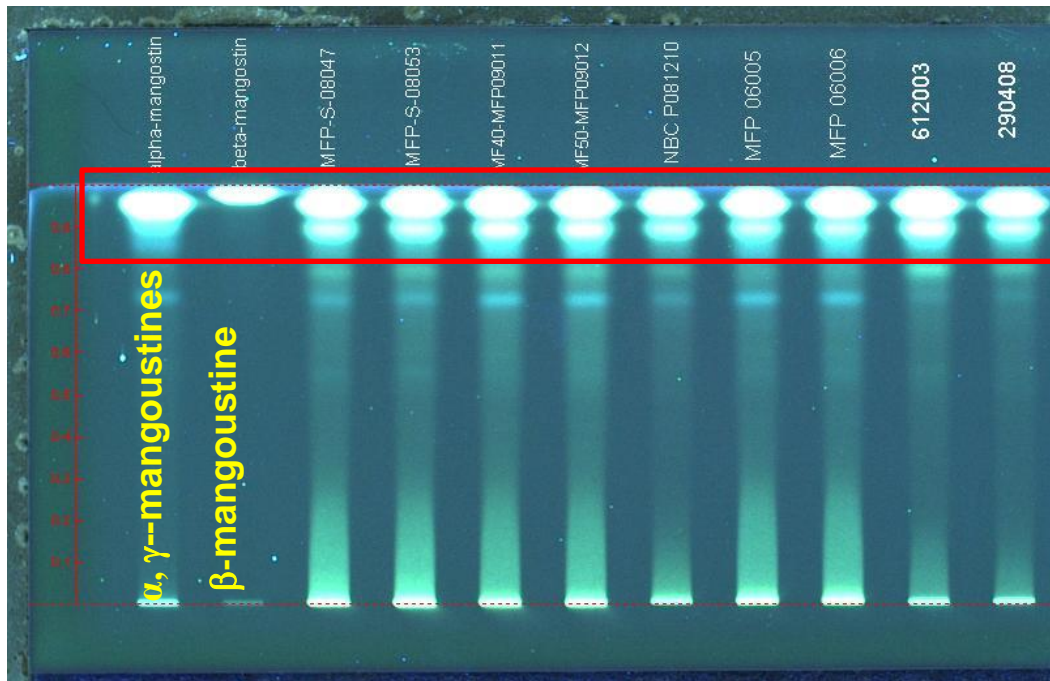
Journal of AOAC international 2008, 91,5, 1145-1148

Plaque : TLC Si60

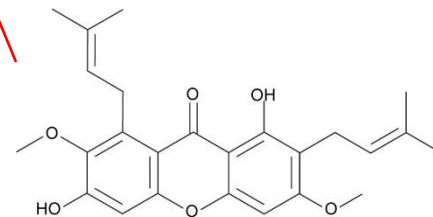
Système : CHCl₃/MeOH 90/10 (v/v)**

Dépôt: 2µl d'une solution éthanolique (EtOH absolu) à 1mg/ml

Révélation :366 nm après pulvérisation du réactif de NEU



α-mangoustine



β-mangoustine



**Systeme non adapté, les xanthones migrent au front de solvant
mauvaise séparation !!**



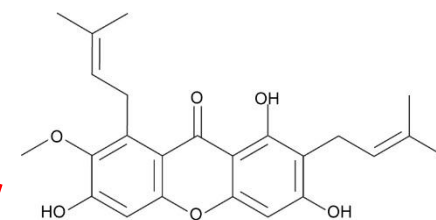
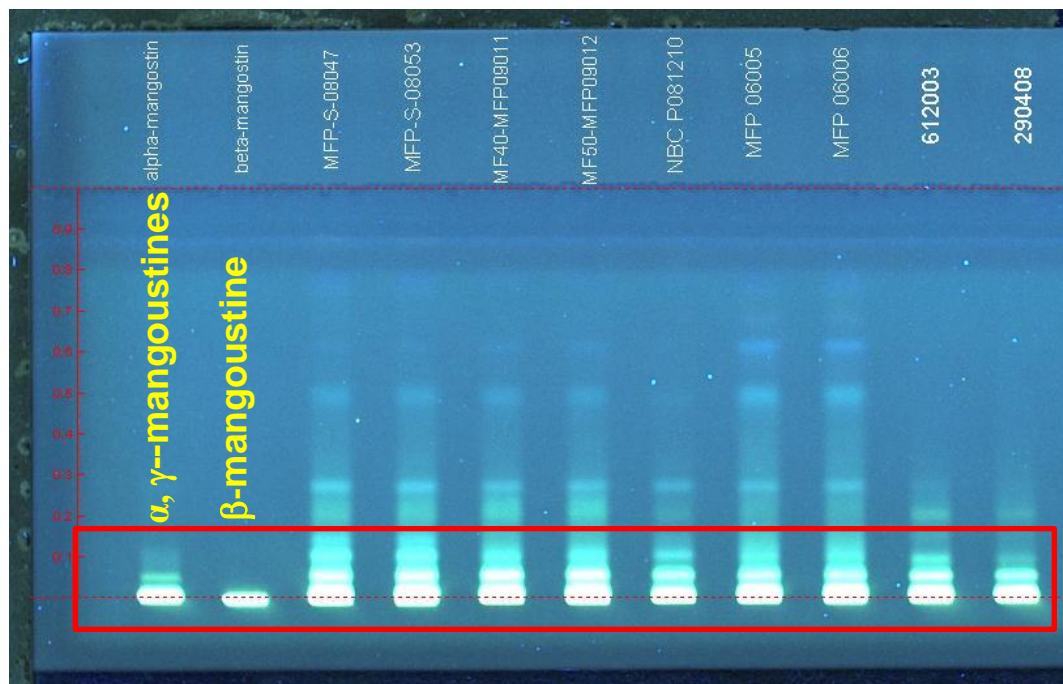
Analyse d'extraits éthanoliques de coques de mangoustan par TLC-UV sur plaque RP18

Plaque : TLC RP18

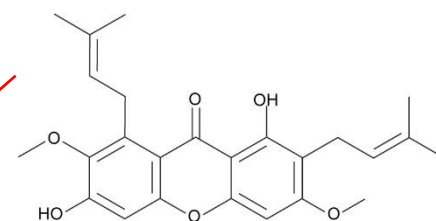
Système : CH₃CN/Eau/HCOOH 50/50/5 (v/v/v)

Dépôt: 2µl d'une solution éthanolique (EtOH absolu) à 1mg/ml

Révélation : 366 nm après pulvérisation du réactif de NEU



α-mangoustine



β-mangoustine



**Système non adapté, les xanthones ne migrent pas suffisamment
mauvaise séparation !!**



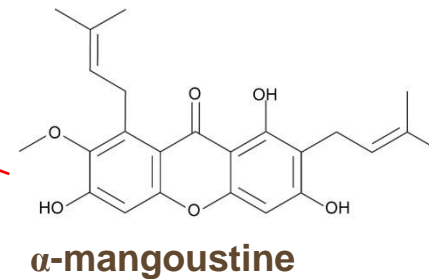
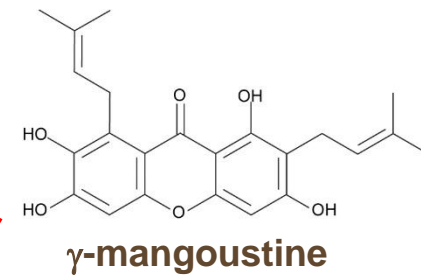
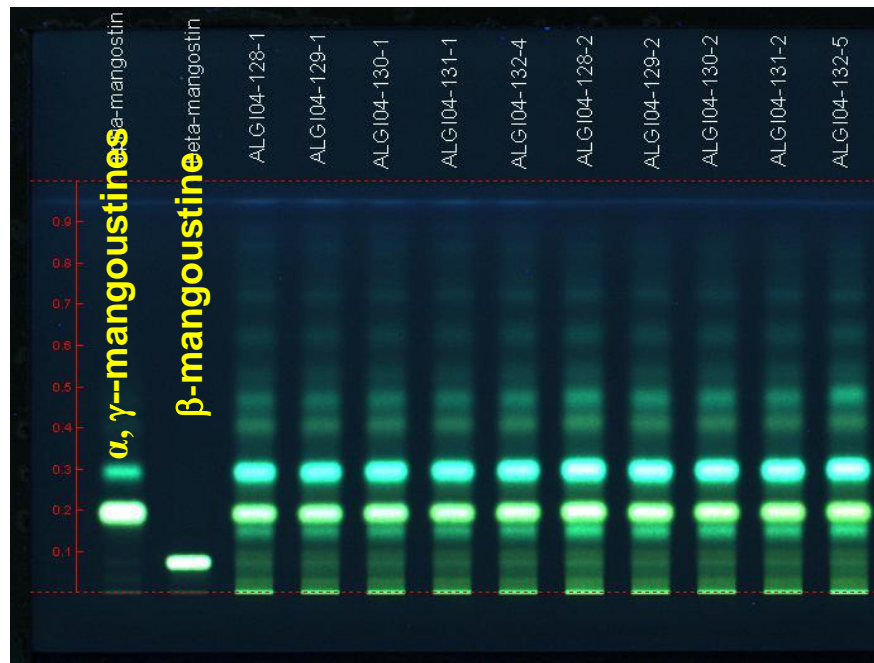
Analyse d'extraits éthanoliques de coques de mangoustan par TLC-UV sur plaque RP18

Plaque : TLC RP18

Système : CH₃CN/Eau/HCOOH 70/27/3 (v/v/v)

Dépôt: 2µl d'une solution éthanolique (EtOH absolu) à 1mg/ml

Révélation : 366 nm après pulvérisation du réactif de NEU



Système adapté, les xanthones sont séparées !!



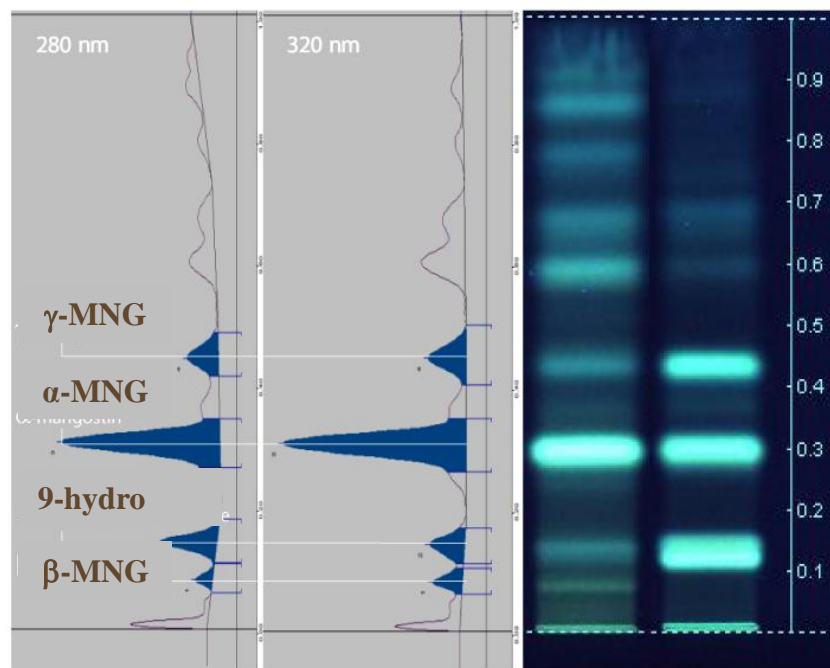
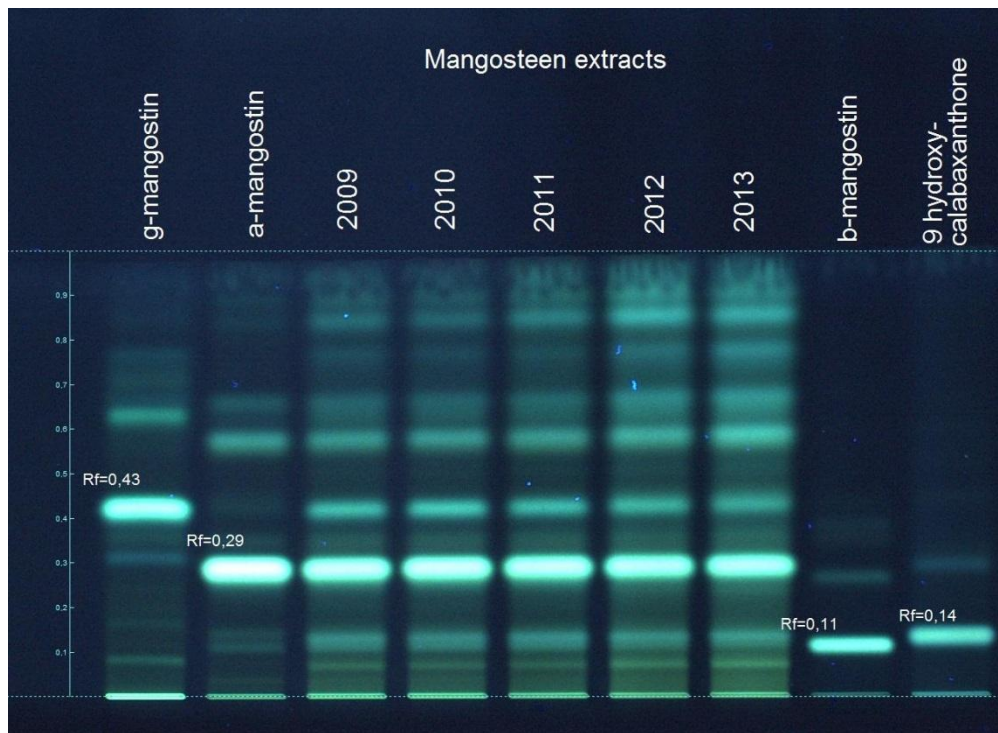
Analyse d'extraits éthanoliques de coques de mangoustan par HPTLC-UV sur plaque RP18

Plaque : HPTLC RP18

Système : CH₃CN/Eau/HCOOH 80/17/3 (v/v/v)

Dépôt: 25µl d'une solution éthanolique (EtOH absolu) à 0,02mg/ml

Révélation :366 nm après pulvérisation du réactif de NEU



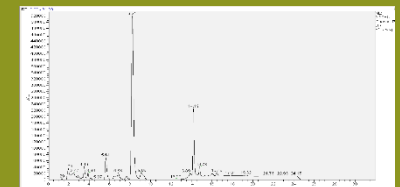
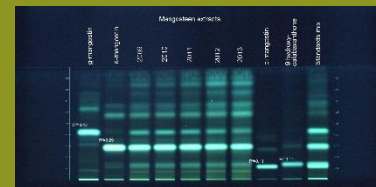
Systeme mieux adapté, les principales xanthones sont séparées



4-Applications

Etude de la variabilité de la teneur en xanthones dans différents lots de coques

Comparaison des résultats obtenus avec une méthode HPLC-UV



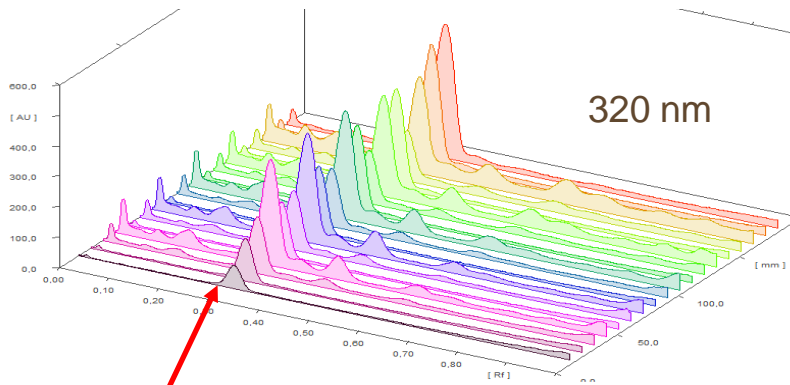


Mise au point de la méthode de quantification par HPTLC-UV

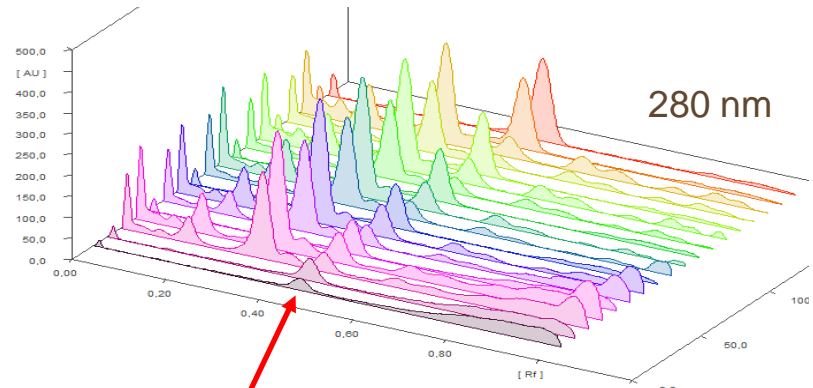
- Quantification réalisée sur 5 lots de coques de mangoustan (extrait EtOH), zone de collecte et saisonnalité identique → **Étude de la variabilité en fonction de l'année.**

Année de Récolte	Récolte 2009	Récolte 2010	Récolte 2011	Récolte 2012	Récolte 2013
MS % (p/p)	0.50	0.52	0.57	0.55	0.50

- Scan de la plaque en UV à deux longueurs d'onde: 320 nm et 280 nm



Dosage α -mangoustine



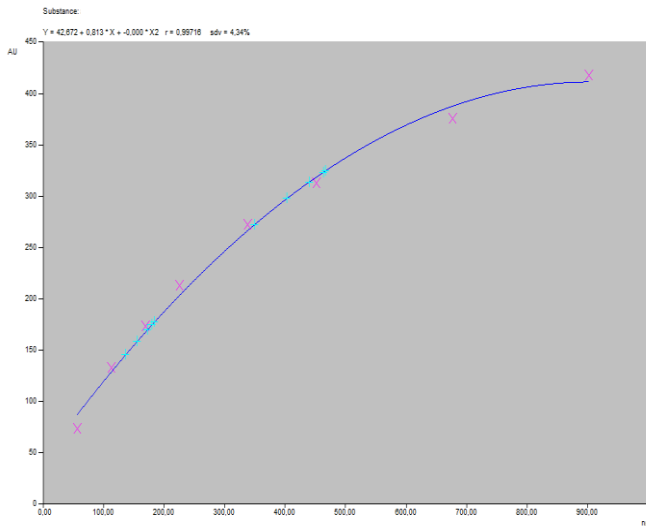
Dosage γ -mangoustine



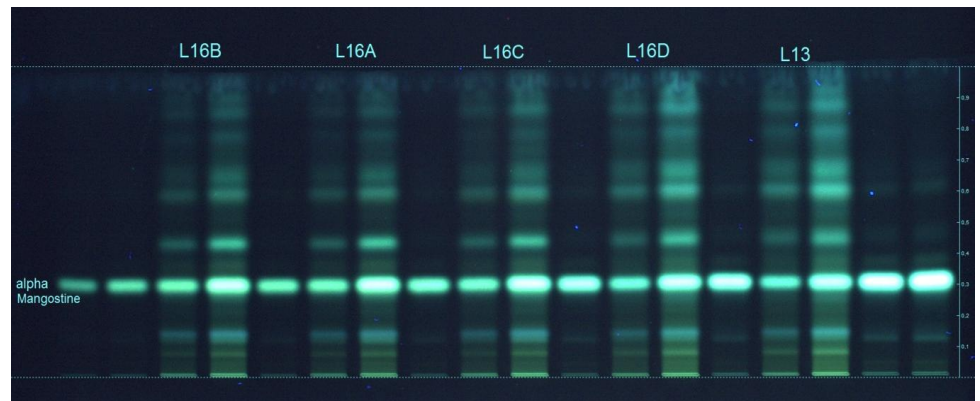
Quantification par HPTLC-UV

- Gamme d'étalonnage de l' α -mangoustine comprise entre 60 et 980 ng/spots
- Dosage de l' α -mangoustine et des xanthones totales en équivalent α -mangoustine, solubilisation dans EtOH absolu
- Courbe d'étalonnage :

Calibration polynomiale par rapport à la hauteur des pics à 320nm pour l'alpha-mangoustine



Regression via height $Y = 42.67 + 0.8126 * X + -0.0004483 * X^2$
 $r = 0.99716$ $sdv = 4.34\%$

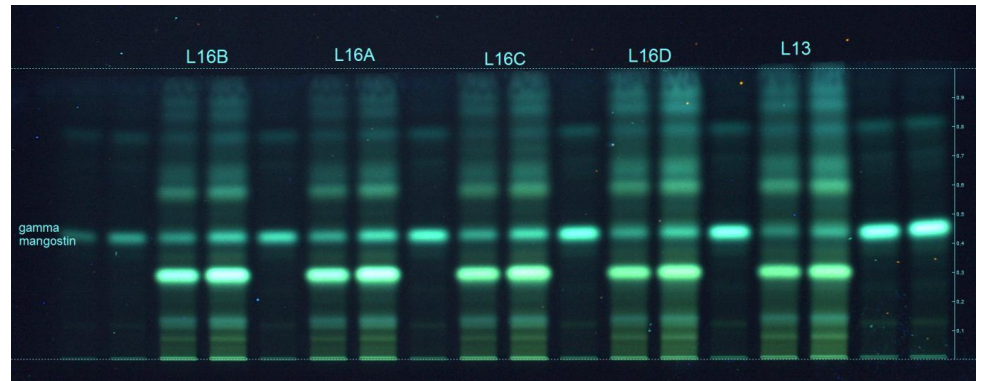
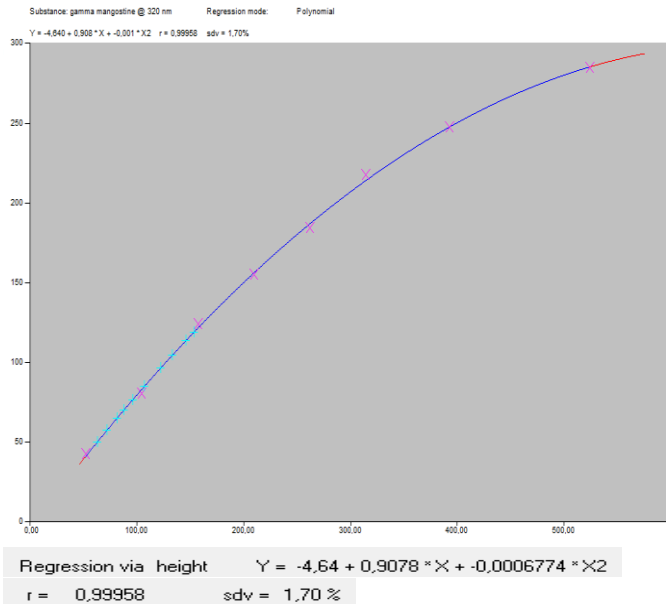




Quantification par HPTLC-UV

- Gamme d'étalonnage de la γ -mangoustine comprise entre 50 et 525 ng/spots, solubilisation dans EtOH absolu
- Courbe d'étalonnage :

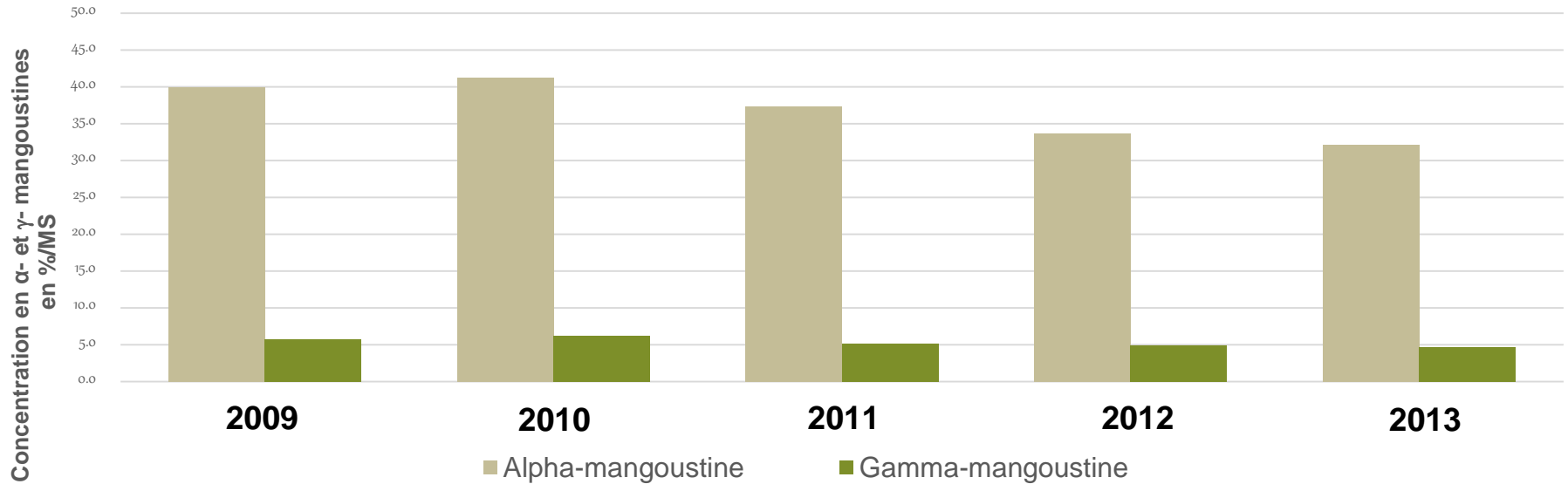
Calibration polynomiale par rapport à la hauteur des pics à 280nm pour la gamma-mangoustine





Résultats obtenus par HPTLC-UV à 320 nm

Concentrations en α - et γ - mangoustines dans des extraits éthanoliques de coques de mangoustan en fonction de la date de récolte



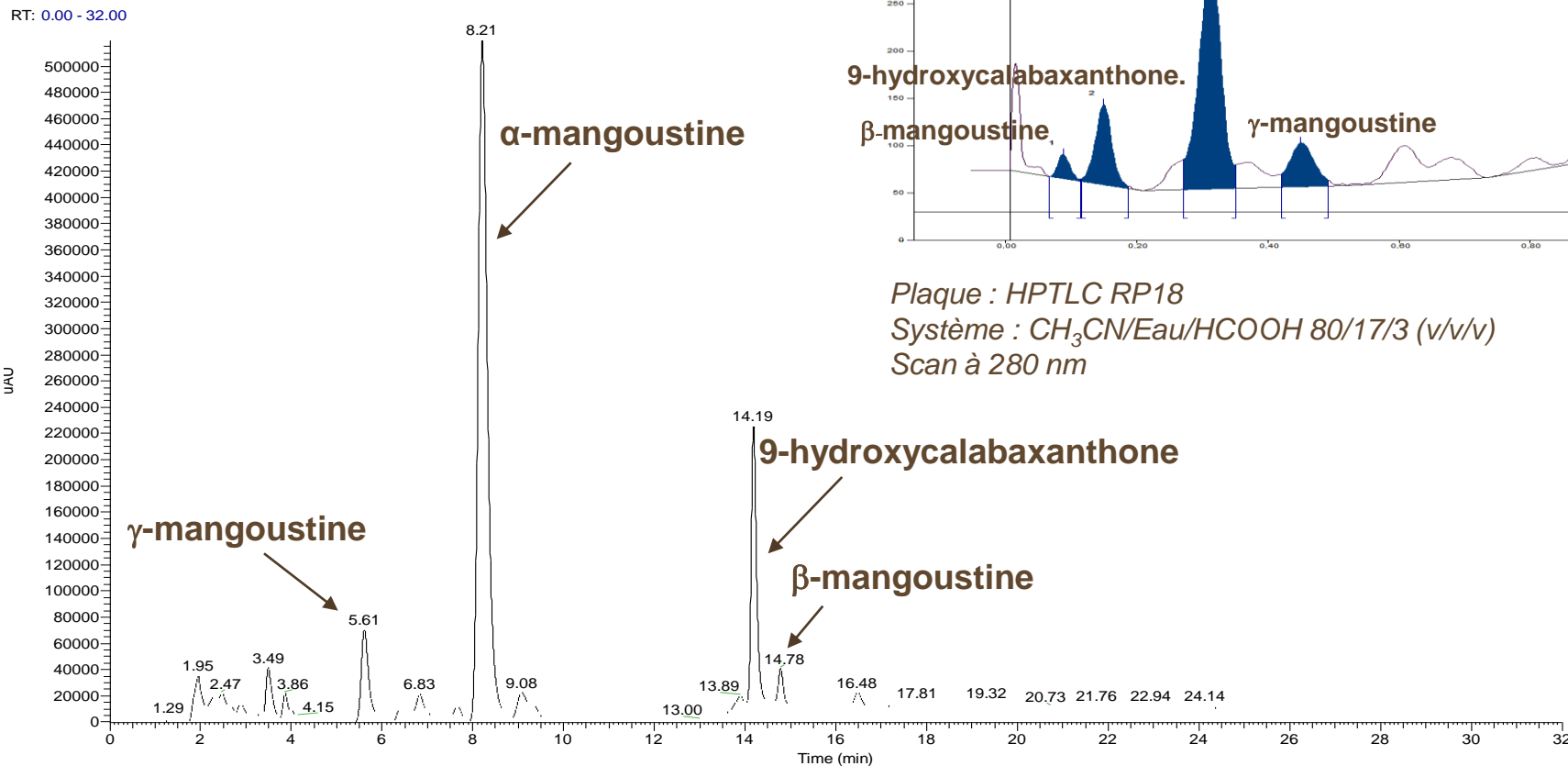
Teneur en α -mangoustine comprise entre 31% et 43% (/MS) et en γ -mangoustine entre 4 et 6% (/MS)

Variabilité observée pour la teneur en α -mangoustine de 2009 à 2013.

La teneur en γ -mangoustine reste globalement stable pendant cette période.



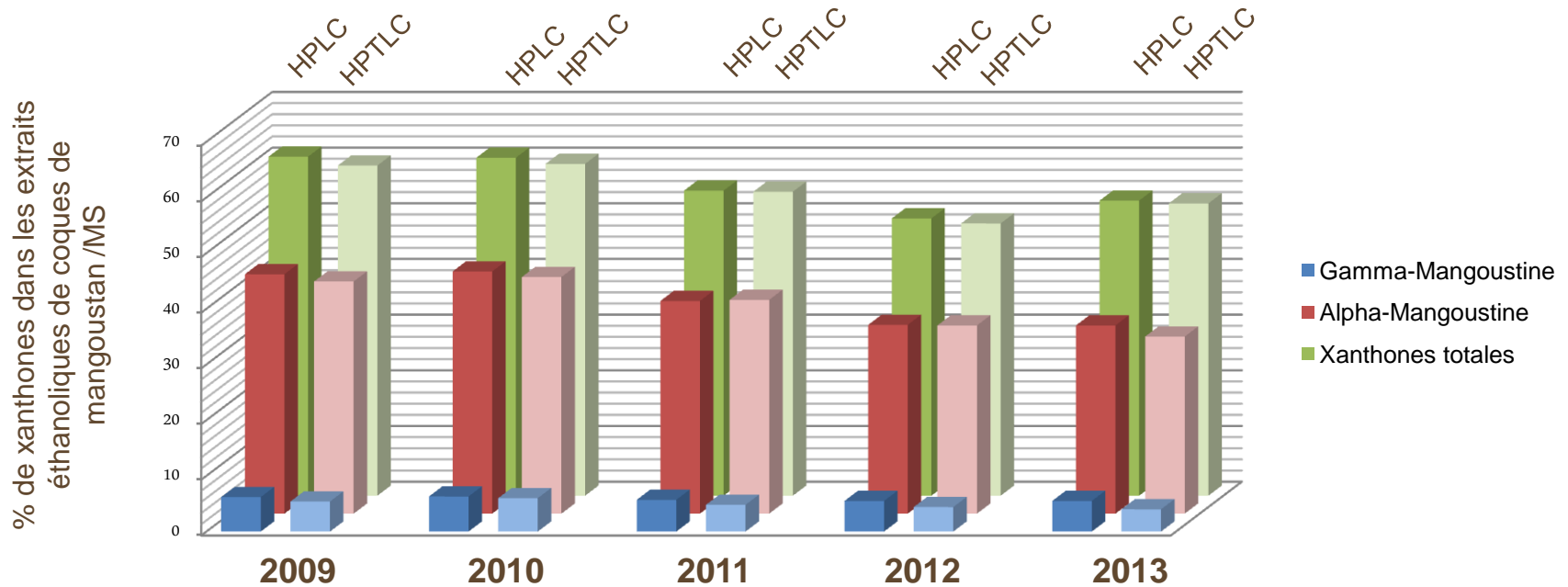
Comparaison des résultats avec une méthode de quantification par HPLC-UV à 280 nm



Colonne : RP-18e Lichrocart-lichrospher
Phase mobile: 20% (A) 0,1% HCOOH, 80% (B) CH₃CN
Détection UV: 280 nm
Débit: 1ml/min



Comparaison des résultats avec une méthode de quantification par HPLC-UV à 280 nm



➔ Teneurs en α et γ -mangouistines plus élevées en HPLC vs HPTLC (respectivement +18% et +2%)

Teneurs en xanthones totales très proche en HPLC vs HPTLC (respectivement moy. 56% et 55%)

Xanthones totales: dosage des 4 xanthones d'intérêt en éq. α -mangouistine



Conclusion

- 1- Première étude de dosage des xanthones par HPTLC-UV sur plaque RP-18.
- 2- Bonne séparation sur les 4 xanthones étudiées : α -mangoustine, γ -mangoustine, β -mangoustine et 9-hydroxycalabaxanthone.
- 3- Résultats de quantification obtenus par HPTLC très proches de ceux obtenus en HPLC



La méthode mise au point par HPTLC-UV peut donc être utilisée comme méthode de contrôle pour s'assurer de la qualité de lots de coques de mangoustan

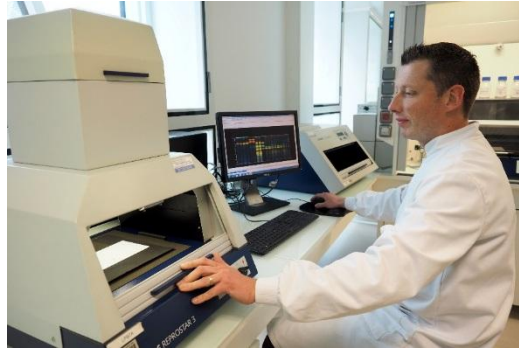


Remerciements

Aline GILBERT



Jocelyn GIBOULOT



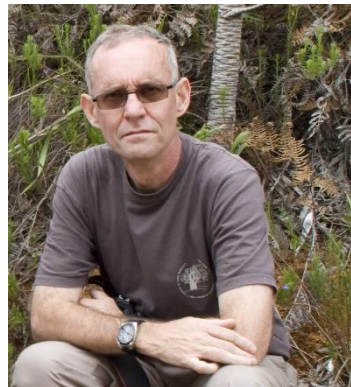
Georges-Olivier MAILLET



Christian LUBRANO



Jean-Renaud ROBIN



Bénédicte PORTET





Merci de votre attention



Département Innovation du Végétal

