

SHORT COMMUNICATION

## EXTRACTION, ANALYSIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF A FAMILY OF DITERPENES<sup>♦</sup>

## EXTRACTION, ANALYSE ET EVALUATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES D'UNE FAMILLE DE DITERPENES

Emmanuelle Villedieu<sup>1</sup>, Emilie Destandau<sup>1</sup>, Chantal Pichon<sup>2</sup>,  
Sabine Berteina-Raboin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Chimie Organique et Analytique, UMR 6005,  
Université d'Orléans, BP 6759 Orléans cedex 2, France*

<sup>2</sup>*Centre de Biophysique Moléculaire UPR 4301 CNRS,  
Rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2, France*

\*Corresponding author: [sabine.berteina-raboin@univ-orleans](mailto:sabine.berteina-raboin@univ-orleans)

Received: June 30, 2010

Accepted: February 28, 2011

**Abstract:** Our study deals with a diterpenoid lactone family isolated from *Andrographis paniculata*. Our work was to perform extraction method, HPLC analysis and purification starting from commercial products. It led to the isolation of several pure compounds. Then, we investigated the effect of these molecules and the crude extracts towards immunostimulation.

**Keywords:** *andrographolide, anti-inflammatory, diterpenes, HPLC, plant extract*

<sup>♦</sup> Paper presented at the 6<sup>th</sup> edition of *Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée, COFrRoCA 2010*, 7-10 July 2010, Orléans, France

## INTRODUCTION

*Andrographis paniculata* est une acanthacée d'origine asiatique. Les extraits de cette plante sont connus pour avoir des propriétés biologiques, ils sont d'ailleurs utilisés depuis plus de deux mille ans en médecine traditionnelle asiatique afin de traiter, notamment, des fièvres, infections respiratoires et troubles digestifs. Des études préliminaires ont montrées que l'andrographolide, une lactone diterpénique [1] était responsable de ces activités. Vu l'intérêt que porte cette plante et ses composés, notre équipe a décidé de s'intéresser à la famille des andrographolides à partir de compléments alimentaires de différentes origines. Nous avons mis au point des méthodes d'extraction, d'analyses et de purification des composés. L'activité des extraits bruts ainsi que les molécules isolées a été évaluée sur NFκB [2].

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Extraction et analyses

Cette étude est menée sur des compléments alimentaires commerciaux. Il s'agit de gélules contenant des extraits secs de diverses parties de la plante. Les extraits méthanoliques bruts sont constitués d'une famille de composés analogues qui ont été analysés et caractérisés. Après extraction, une méthode d'analyse par HPLC a été mise au point afin d'évaluer la composition de chaque extrait [3]. La Figure 1 montre le profil HPLC obtenu [Colonne Altima C18 (150 x 4,6 mm, 5μm) à 20 °C. Phase mobile eau désionisée/MeOH, gradient de MeOH de 20 à 100% sur 45 min, débit = 1 mL·min<sup>-1</sup>. Détection UV à 210 nm, 220 nm, 250 nm et DEDL].

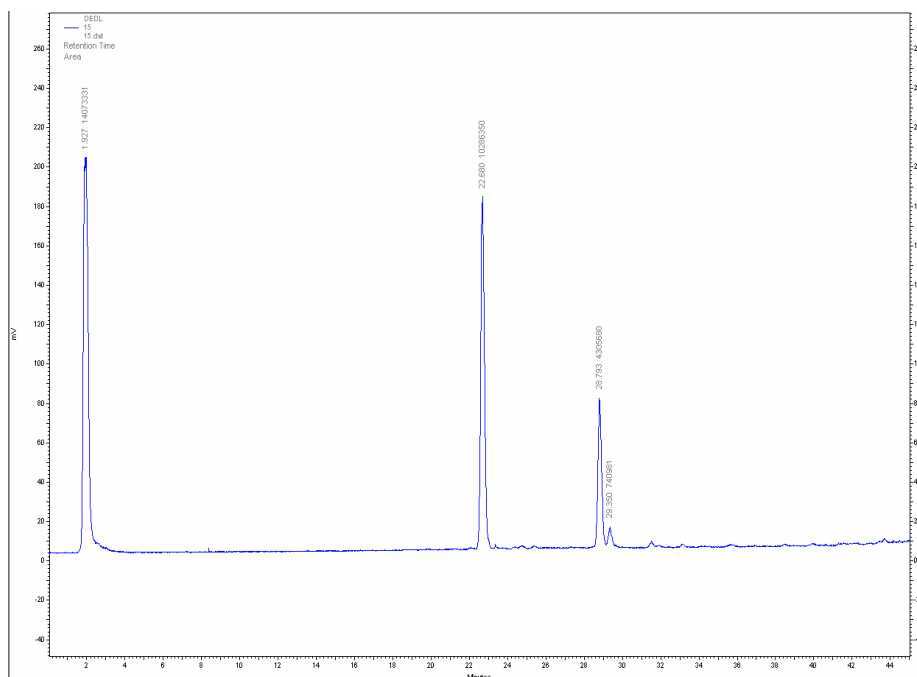


Figure 1. Chromatogramme HPLC d'un extrait méthanolique

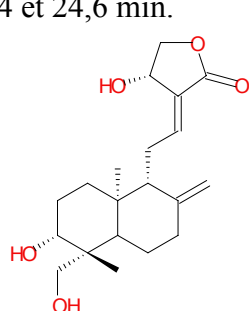
Quatre sources différentes de compléments alimentaires ont été extraites et analysées par HPLC [4]. Il s'avère que les extraits ont des compositions variées en chacun des trois composés majoritaires. Les pourcentages de chaque composé **C1** ( $t_R = 22$  min), **C2** ( $t_R = 27$  min) et **C3** ( $t_R = 28$  min) ont été évalués par régression linéaire à partir de solutions étalon (Tableau 1).

**Tableau 1.** Pourcentages de chaque composé obtenus par régression linéaire  
[ $\log C = f(\log \text{réponse})$ ]

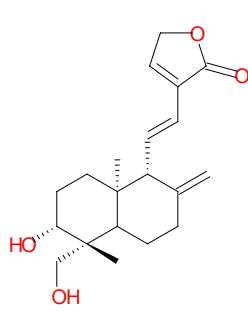
Brut	% C1	% C2	% C3
<b>1</b>	57	28	19
<b>2</b>	46	44	10
<b>3</b>	43	34	23
<b>4</b>	61	26	3

Une analyse LC-MS du brut 1 a été effectuée. A l'aide de la littérature [3], nous avons pu identifier la nature des trois composés majoritaires.

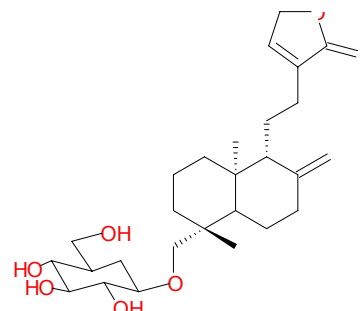
Les composés ont pu être purifiés par chromatographie sur gel de silice. Chacun d'entre eux a été caractérisé en RMN, MS et HPLC. Le composé **C3** a été peracétylé par une méthode classique à l'anhydride acétique afin de vérifier la nature du sucre et de confirmer qu'il s'agissait d'un  $\beta$ -D-glucoside. Lors de la purification, il a aussi été isolé une fraction d'un mélange d'andrographiside et didéhydroandrographiside (2/1) à  $t_R = 24$  et 24,6 min.



**C1.** Andrographolide



**C2.** Didéhydroandrographolide



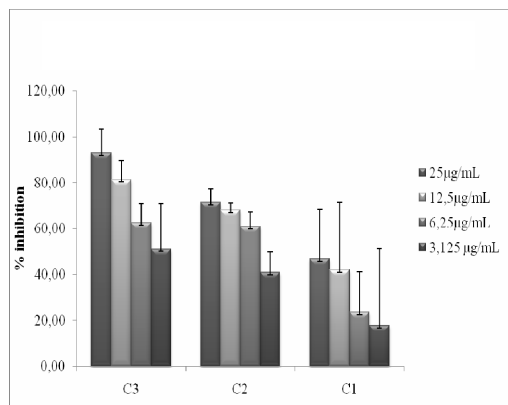
**C3.** Néoandrographiside

Les rendements de purification obtenus sont similaires aux pourcentages obtenus par régression linéaire ce qui montre que les extraits sont relativement riches en andrographolides.

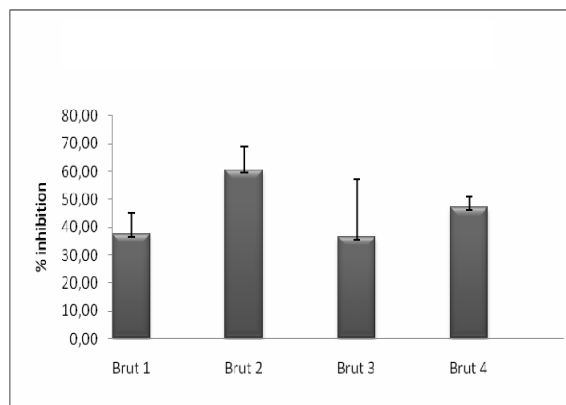
### Evaluations des activités biologiques

Il a été reporté que les andrographolides avaient une activité anti-inflammatoire. Afin de vérifier si le composé majoritaire était le composé le plus actif, nous avons alors étudié l'inhibition de l'inflammation par les échantillons sur des cellules A549. L'inflammation est induite par le TNF $\alpha$  (20 ng·mL<sup>-1</sup>) sur 10<sup>5</sup> cellules dans 1 mL de DMEM. Le milieu cellulaire a été traité par les extraits bruts ainsi que les composés purifiés (25  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>). Au bout de 24 h d'incubation, on peut doser la quantité de luciférase exprimée, et ainsi calculer le pourcentage d'inhibition de l'inflammation. Les

résultats sont donnés en pourcentage d'inhibition, après avoir déduit le niveau basal (témoin négatif sans induction de l'inflammation) et en utilisant une référence non traitée (Figures 2 et 3).



**Figure 2.** Variation de la réponse anti-inflammatoire en fonction de la dose



**Figure 3.** Inhibition de l'inflammation pour les bruts 1 – 4

D'après les résultats, il apparaît que le composé majoritaire est le plus actif. Cependant, si on compare la composition des extraits bruts avec leurs activités inhibitrices, on constate qu'elles ne suivent pas la concentration en andrographolide. En fait, plus l'extrait est riche en **C3** moins l'extrait inhibe l'inflammation. Un mélange de composés purifiés suivant la composition évaluée précédemment donne les mêmes résultats que les extraits, ce qui montre que seuls les activités des extraits sont dues uniquement aux diterpènes. Ces résultats pourraient évoquer une synergie dans l'activité des composés, d'autres expériences doivent être menées sur cette piste.

## CONCLUSION

Plusieurs composés d'une même famille ont été extraits et purifiés à partir de sources commerciales. L'andrographolide, composé majoritaire de la plante, s'est révélé être le composé le plus actif. En fonction de la composition des extraits bruts, il est possible d'obtenir une réponse anti-inflammatoire variable, mais qui ne suit pas le pourcentage d'andrographolide.

Vu l'activité anti-inflammatoire intéressante qui apparaît, une pharmacomodulation de l'andrographolide est envisagée.

## REFERENCES

1. Pamanick, S., Banerjee, S., Achari, B., Das, B., Sen, A.K., Mukhopadhyay, S., Neuman, A., Prange, T.: *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 403-405;
2. Xia, Y-F., Ye, B-Q., Li, Y-D., Wang, J-G., He, X-J., Lin, X., Yao, X., Ma, D., Slungaard, A., Hebbel, R.P., Key, N.S., Geng, J-G.: *J. Immunol.*, **2004**, 173, 4207-4217;
3. Li, W., Fitzloff, J.F.: *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **2002**, 25 (9), 1335-1343;
4. Du, Q., Jerz, G., Winterhalter, P.: *J. Chrom. A*, **2003**, 984, 147-151.