

CHROM. 5959

MISE EN ÉVIDENCE DES ALCALOÏDES DE LA BELLADONE ET DE LEURS  
DÉRIVÉS PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES

## EMPLOI D'UN RÉVÉLATEUR DE SENSIBILITÉ ACCRUE

A. PUECH, M. JACOB ET D. GAUDY

*Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie\*, Montpellier (France)*

(Reçu le 14 octobre 1971; modifié le 7 février 1972)

## SUMMARY

*Thin-layer chromatography of belladonna alkaloids and derivatives. The use of a highly sensitive detection reagent*

A study has been made of a mobile phase and the use of a second reagent (Dragendorff's reagent followed by a solution of sodium nitrite) which give greater sensitivity (0.1  $\mu\text{g}$ ) in the identification of the different alkaloid derivatives of Belladonna and their transformation products. Identification is based on differences in their colorations and  $R_F$  values.

## INTRODUCTION

Le contrôle pharmaceutique tend, à l'heure actuelle, à exiger toujours davantage de la part de l'analyste; en particulier, il ne suffit plus de constater que la fabrication d'un médicament, ou sa conservation dans le temps, est défectueuse, encore faut-il définir les limites décelables de ces évolutions possibles, ainsi que la nature exacte des dérivés formés.

Ayant rencontré ces problèmes et ces difficultés, pour des préparations belladonnées ou à base d'alcaloïdes purs correspondants, nous avons été amenés à rechercher des méthodes ultra-sensibles permettant la mise en évidence des différents constituants alcaloïdiques de la Belladone, ainsi que leurs dérivés de transformation. Nos travaux nous ont conduit à l'élaboration d'un protocole expérimental chromatographique portant sur les deux points suivants: (1) recherche d'un révélateur alcaloïdique de sensibilité accrue; (2) mise au point d'un solvant de migration permettant la séparation des constituants de la Belladone.

## RECHERCHE D'UN RÉVÉLATEUR ALCALOÏDIQUE DE SENSIBILITÉ ACCRUE

L'utilisation des multiples formules du réactif iodo-bismuthique de Dragendorff, classiquement retenues pour la révélation des alcaloïdes, et l'emploi de diéthylamine, agent alcalinisant dans divers systèmes de solvants de migration chromatographique, ne permettent pas de déceler des quantités alcaloïdiques inférieures à 1 ou 2  $\mu\text{g}$ .

Cette difficulté est essentiellement liée à l'élimination délicate de l'agent alcalini-

\* Directeur: Prof. A. PUECH.

sant, la diéthylamine, qui même après un chauffage prolongé à l'étuve à 120° (45 min) n'est pas totalement chassé. De plus, ce traitement thermique élevé et prolongé en milieu alcalin est néfaste pour l'identification de l'hyoscyamine qui peut alors se racémiser en atropine.

Nous avons donc été amenés à révéler les différents constituants de nos préparations galéniques, c'est-à-dire, atropine, hyoscyamine, scopolamine, dérivés "apo" de ces alcaloïdes, géalcaloïdes, tropanol et scopanol par pulvérisation successive de réactif de Dragendorff et de solution de nitrite de soude.

Dans ces conditions, les alcaloïdes et leurs dérivés apparaissent sur les chromatogrammes, avec une sensibilité assez élevée et des colorations variables, différentes selon les constituants.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### *Réactif de Dragendorff*

Le réactif de Dragendorff est obtenu en mélangeant une solution de sous-nitrate de bismuth 17 g, d'acide tartrique 200 g et d'eau distillée 400 g et une solution de d'iodure de potassium R.P. 160 g et d'eau distillé 400 g par agitation prolongée d'une heure. La solution est ensuite filtrée et le filtre lavé avec 400 ml d'eau distillée. Cette solution constitue le réactif de Dragendorff de base. On utilise, pour la révélation des alcaloïdes, une dilution au quart de ce réactif, avec de l'eau distillée.

### *Solution de nitrite de soude*

La solution de nitrite de soude se compose de nitrite de soude R.P. 10g et d'eau distillé q.s.p. 100 ml.

### *Solutions alcaloïdiques et dérivés*

*Solutions Alc 1.* 0.1  $\mu\text{g}$  d'alcaloïde par microlitre d'alcool à 95° est utilisé pour atropine base, hyoscyamine base, scopolamine base, tropanol et scopoline et 0.1  $\mu\text{g}$  d'alcaloïde par microlitre d'eau distillée pour génatropine chlorhydrate et génoscopolamine bromhydrate.

*Solutions Alc 10.* 1  $\mu\text{g}$  d'alcaloïde par microlitre d'alcool à 95° est utilisé pour atropine base, hyoscyamine base, scopolamine base, tropanol et scopoline et 1  $\mu\text{g}$  d'alcaloïde par microlitre d'eau distillée pour génatropine chlorhydrate et génoscopolamine bromhydrate.

N'ayant pu nous approvisionner en dérivés "apo-alcaloïdes", nous avons donc été amenés à réaliser ces constituants par déshydratation des alcaloïdes déposés sur un chromatoplaque. La déshydratation est obtenue par chauffage à l'étuve à 100° pendant 30 min. Une partie des alcaloïdes est alors transformée en apoalcaloïde, ce qui permet de retrouver sur le chromatogramme après migration deux spots dont un correspond à l'alcaloïde témoin, l'autre au dérivé "apo".

Les dépôts de solutions sur les chromatoplaques correspondent aux valeurs suivantes: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 et 0.5  $\mu\text{g}$  et 1, 2, 3, 4 et 5  $\mu\text{g}$ .

La révélation des spots est obtenue après migration dans des solvants sans diéthylamine, et séchage à l'étuve à 100° pendant 5 min. On pulvérise le réactif de Dragendorff; les spots apparaissent en orangé sur fond jaune. Le tropanol et la scopoline sont de couleur violette. On note la présence d'un spot à partir de 1  $\mu\text{g}$  et

TABLEAU I

COLORATION IMMÉDIATE ET APRÈS SÉCHAGE DES SPOTS ALCALOÏDIQUES ET DE LEURS DÉRIVÉS

Composés	Coloration	
	Immédiate	Après séchage
Atropine	brune	grise
Hyoscyamine	brune	brun-rouge
Scopolamine	brune	orangée
Tropanol	grise	brun-fugace
Scopoline	grise	brun-fugace
Apotropine	brune	disparaît
Aposcopolamine	brune	disparaît
Génatropine	brune	disparaît
Génoscopolamine	brune	disparaît

très nettement à partir de 2  $\mu\text{g}$ . Après séchage rapide de la plaque, on pulvérise la solution de nitrite de sodium en imprégnant suffisamment la plaque. On observe les nuances des spots, immédiatement, puis après un court séchage à l'aide d'un sèche-cheveux (Tableau I). Les colorations observées permettent une identification nette à 0.1  $\mu\text{g}$ .

Ce système de révélation revêt, par conséquent, un double intérêt: (1) Celui d'augmenter la sensibilité de révélation d'un dérivé alcaloïdique, en mettant en évidence 0.1  $\mu\text{g}$ . Pour nos travaux, où nous cherchons à déceler le début d'une altération du bloc alcaloïdique dans des préparations galéniques diverses, nous pouvons noter au moins 1 pour 100 de dégradation alcaloïdique pour un dépôt de 10  $\mu\text{g}$  d'alcaloïdes totaux. (2) Celui d'identifier les composants par les nuances variées obtenues après pulvérisation de la solution de nitrite, et ceci pour les alcaloïdes et les dérivés les plus intéressants, l'atropine, l'hyoscyamine et le tropanol.

#### Remarque

Six autres formules de Dragendorff modifiées (concentrations en nitrate de bismuth et en iodure de potassium variables, milieu chlorhydrique, acétique ou sulfurique) ont été testées dans les mêmes conditions.

Après pulvérisation de la solution de nitrite de sodium, seul le réactif proposé permet de déceler 0.1  $\mu\text{g}$  d'alcaloïdes atropiniques et dérivés.

#### MISE AU POINT D'UN SOLVANT DE MIGRATION

Nos conditions de recherche nous ayant fait écarter les solvants de migration les plus courants pour la mise en évidence des alcaloïdes de la Belladone, celui de TEICHERT *et al.*<sup>1</sup> ne permettant pas d'obtenir tous les dérivés atropiniques, celui de KAESS ET MATHIS<sup>2</sup>, à base de diéthylamine, diminuant la sensibilité du révélateur, nous avons recherché un solvant plus compatible avec nos exigences expérimentales. Dans nos essais, le support de chromatographie est constitué par une couche mince de gel de Silice G de Merk (de 0.25 mm d'épaisseur), à caractère légèrement acide ayant tendance à "bloquer" les alcaloïdes. Il est donc nécessaire d'utiliser un solvant peu

polaire en milieu suffisamment alcalin pour étaler les différents constituants analysés sur tout le parcours du chromatogramme.

Une recherche systématique nous a conduit à définir le solvant et le protocole opératoire suivant. Comme solvant de migration: chloroforme-acétone-alcool éthylique ammoniacal pH 12.4 (3 ml de  $\text{NH}_4\text{OHRP}$  + 17 ml d'alcool absolu) (5:4:1) est utilisé. Ce solvant est placé dans une cuve à chromatographie 2 h avant la migration, à la température de  $10^\circ$ , pour saturer l'atmosphère de la cuve. La migration est réalisée à la température de  $10^\circ$ , pour un parcours du front du solvant de 10 à 12 cm (20 à 30 min). Les plaques sont alors séchées à l'étuve ( $100^\circ$ , 5 min), et révélées par le réactif de Dragendorff, puis par la solution de nitrite de sodium.

Une vue schématique des chromatogrammes permet de situer chaque alcaloïde et chaque dérivé, seul ou associé (Fig. 1).

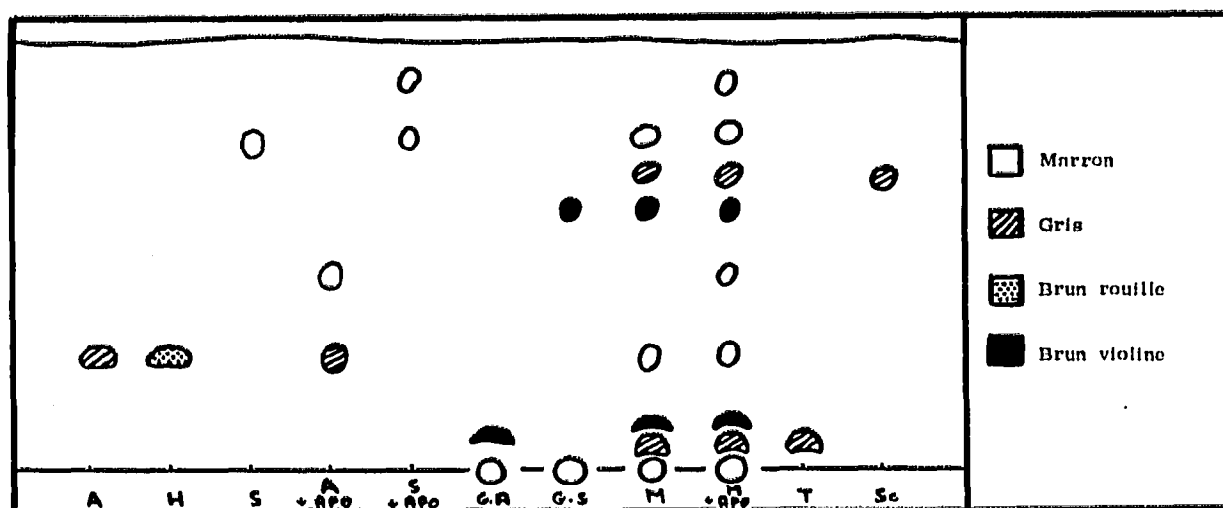


Fig. 1. Chromatographie fonctionnelle de solutions de référence. Révélation par les réactifs de Dragendorff et de nitrite de sodium. A = Atropine; H = Hyoscyamine; S = Scopolamine; A + Apo = atropine + apotropine; S + Apo = scopolamine + aposcopolamine; G. A. = génatropine; G. S. = génoscopolamine; M = mélange des alcaloïdes; M + Apo = mélange des alcaloïdes + apoalcaloïdes; T = tropanol; Sc = Scopoline.

Les résultats de ces chromatogrammes permettent de mettre en évidence à des concentrations de l'ordre de  $0.1 \mu\text{g}$  les principaux alcaloïdes de la Belladone, c'est-à-dire l'atropine ou l'hyoscyamine, la scopolamine, les dérivés "apo", soit l'apopatropine et l'aposcopolamine, les dérivés d'hydrolyse, le scopanol et le tropanol.

Quant aux gènalcaloïdes, ils ne migrent pas et il n'est pas possible d'établir la distinction entre la génatropine et la génoscopolamine. Dans certains cas, la révélation fait apparaître pour ces deux composés une tache supplémentaire brun-violine, dont les valeurs  $R_F$  sont de 0.08 (génatropine) et 0.57 (génoscopolamine). Nous n'avons pu identifier pour l'instant ces dérivés. À titre purement indicatif, nous reproduisons les valeurs  $R_F$  obtenus pour chaque composant selon les conditions opératoires décrites: atropine ou hyoscyamine, 0.20; scopolamine, 0.70; tropanol, 0.05; scopoline, 0.63; apopatropine, 0.43; aposcopolamine, 0.85; génatropine, 0; et génoscopolamine, 0.

En conclusion de ce travail, nous avons mis au point un solvant et un révélateur nous permettant de chromatographier et de mettre en évidence les alcaloïdes atropiniques et leurs dérivés, avec une sensibilité de  $0.1 \mu\text{g}$ . De plus, l'emploi d'un double

réactif Dragendorff-nitrite, augmente les possibilités d'identification par les colorations variables des différents constituants.

Ce protocole nous a paru particulièrement intéressant pour suivre l'évolution de la dégradation des alcaloïdes de la Belladone dans des préparations galéniques diverses, cette dégradation faisant apparaître simultanément des dérivés d'hydrolyse, des apoalcaloïdes et des généralcaloïdes.

#### RÉSUMÉ

Une technique chromatographique est étudiée, portant sur le choix d'un solvant de migration et l'utilisation d'un double révélateur (réactif de Dragendorff et solution de nitrite de sodium), permettant une plus grande sensibilité (0.1  $\mu$ g) dans l'identification de différents composés alcaloïdiques de la Belladone et leurs dérivés de transformation, par leur coloration distincte et leur valeur  $R_F$ .

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 K. TEICHERT, E. MUTSCHLER ET M. ROCHELMEYER, *Deut. Apoth. Ztg.*, 18 (1960) 477.
- 2 A. KAESS ET C. MATHIS, *Ann. Pharm. Fr.*, 23 (1965) 267.

*J. Chromatogr.*, 68 (1972) 161-165