

CHROM. 6169

**DOSAGE PHOTODENSITOMÉTRIQUE *IN SITU* DES ALCALOÏDES
DANS *SECALE CORNUTUM***

M. VANHAELEN ET R. VANHAELEN-FASTRÉ

Service de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles (Belgique)

(Reçu le 3 avril 1972)

SUMMARY*Photodensitometric in situ evaluation of Secale cornutum alkaloids*

After separation of *Secale cornutum* alkaloids by silica gel thin-layer chromatography, a method was developed for quantitative *in situ* colorimetry of ergometrine, ergotamine and ergocristine chromatograms.

Photodensitometry with Van Urck spray reagent at 580 nm was found more sensitive and specific than UV spectrophotodensitometry at 305 nm.

This new method has found application for the rapid quantitative evaluation of the main *Secale cornutum* alkaloids. The sensitivity of the method is such that amounts of 2 μg (ergometrine) to 6 μg (ergotamine and ergocristine) can be evaluated.

INTRODUCTION

La séparation par chromatographie sur couche mince des alcaloïdes de *Secale cornutum*, suivie de leur détermination quantitative, a fait l'objet de nombreux travaux¹.

Les méthodes analytiques, préconisées jusqu'ici, impliquent l'élution des spots détectés soit par des réactifs plus ou moins spécifiques (Dragendorff, Van Urck, acide perchlorique- Cl_3Fe) soit par leur fluorescence propre à 356 nm ou le quenching d'un agent fluorescent inclus dans l'adsorbant; les alcaloïdes séparés sont ensuite dosés, après élution, par colorimétrie à l'aide, le plus généralement, du réactif de Van Urck.

La méthode proposée utilise la chromatographie sur couche mince couplée à une photodensitométrie directe des alcaloïdes révélés par le réactif de Van Urck. Les nombreuses manipulations que nécessite l'élution des spots sont, de ce fait, supprimées; entr'autres avantages, ce dosage s'applique à des concentrations alcaloïdiques plus faibles.

La méthode est utilisée avec succès pour le dosage de l'ergotamine, de l'ergométrine et de l'ergocristine dans la poudre de *Secale cornutum*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Tous les solvants utilisés sont du type "pour la chromatographie" ou "pour analyse". Le chloroforme est stabilisé par addition de 1 % d'éthanol.

Extraction des alcaloïdes à partir de Secale cornutum

La poudre fine est dégraissée au moyen de pétroléine (zone d'ébullition 25–50°) pendant 6 h au Soxhlet. 4 g de poudre dégraissée et séchée sont additionnés d'éther éthylique (jusqu'à l'obtention d'une masse semi-fluide) et de 3.2 ml d'ammoniaque à 10 %. La masse homogénéisée est extraite au Soxhlet par l'éther éthylique, sous azote, pendant 5 h (volume de renouvellement: 1 l/h). La solution éthérée, desséchée sur sulfate de soude anhydre, est évaporée sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est repris par des portions successives d'acétone (au total, environ 100 ml). La solution acétonique est filtrée sur un filtre de verre fritté G4. Le filtrat est concentré sous pression réduite et transvasé dans un ballon de 10 ml. Le résidu d'évaporation de cette dernière solution est repris par de l'acétone à 40°; après refroidissement, la solution est filtrée, à nouveau, sur un microfiltre de verre fritté G4 et portée à 2 ml dans un matras.

Pour le dosage de l'ergotamine et de l'ergométrine, la solution est utilisée telle quelle tandis que pour celui de l'ergocristine, elle est diluée six fois à l'aide d'acétone.

Chromatographie sur couche mince

Chromatoplaques. Les chromatoplaques de Gel de Silice H, Merck (20 × 20 cm), sont préparées à l'aide d'un appareillage construit dans nos laboratoires². Elles sont activées, avant l'utilisation, par chauffage à 120°, pendant 30 min.

Le poids d'adsorbant déposé par 20 cm² de support (glace polie) est de 250 mg ± 3 %.

Dépôt. Les bases alcaloïdiques témoins sont isolées extemporanément à partir de leurs sels (tartrates et méthanesulfonates).

Les différents échantillons et témoins sont appliqués, en solution acétonique, à l'aide d'une seringue Unimetrics de 10 µl munie d'une aiguille dont l'embout coupé à 90° est recouvert de Téflon.

Le dépôt est effectué à 12 mm du bord inférieur de la chromatoplaque. Les différents volumes et concentrations utilisés sont renseignés dans le Tableau I.

Les solutions sont appliquées µl par µl avec un séchage intermédiaire tous les 5 µl.

Développement et révélation. Les parois internes des cuves sont garnies de papier filtre épais. La composition des phases mobiles figure au Tableau I.

Entre chaque développement (durée approximative: 35–45 min), les chromatoplaques sont séchées pendant 3 min sous un courant d'azote. La distance parcourue par la phase mobile, à partir de la ligne de dépôt, est limitée à 180 mm.

TABLEAU I

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES POUR LE DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'ERGOCRISTINE, DE L'ERGOTAMINE ET DE L'ERGOMÉTRINE

| Alcaloïde | Composition de la phase mobile ^a (chloroforme-méthanol) | Volume de solution acétonique déposé (µl) | Échelle des témoins (µg) | Valeur du facteur R _F ² |
|--------------|---|---|--------------------------|---|
| Ergocristine | 98:2 | 10 | 3,6,7.2 et 9 | 0.23 ± 0.02 |
| Ergotamine | 95:5 | 10 | 4.3,8.7,10.4 et 13 | 0.25 ± 0.02 |
| Ergométrine | 93:7 | 15 | 1.3,2.7,3.2 et 4 | 0.17 ± 0.02 |

^a Deux développements successifs.

La révélation est obtenue en pulvérisant uniformément, par chromatoplaque, 40 ml d'une solution fraîchement préparée de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde à 0.5 % dans le cyclohexane.

Les chromatoplaques sont ensuite maintenues, pendant 10 min, dans une cuve dont l'atmosphère est saturée en acide chlorhydrique puis conservées pendant 2 h à l'air libre et à la lumière.

Lectures densitométriques

Un appareillage de la marque Chromoscan équipé d'une fente de 10 mm de largeur et d'un filtre à 580 nm est utilisé pour la mesure des spots colorés; la détermination des maxima d'absorption et la comparaison des lectures à 305 et 580 nm sont obtenues au moyen d'un appareillage de la marque Zeiss (largeur de fente = 14 mm).

Dans les deux cas, les mesures sont effectuées par réflectance et dans le sens de migration des spots. Une surface blanche et opaque est placée sous la chromatoplaque de façon à éviter les phénomènes de diffusion de la lumière. Les valeurs lues à l'intégrateur du Chromoscan servent de base pour les calculs.

Les échelles sont établies à partir d'une part, de quatre concentrations différentes du témoin et d'autre part, d'une même concentration de l'échantillon répétée quatre fois. Ces spots sont dispersés aléatoirement sur une même chromatoplaque et déposés en solution dans des volumes identiques d'acétone. Dans le calcul de la droite de régression, le couple de valeurs constantes, concentration = 0: nombre d'unités d'intégration = 5, est introduit systématiquement.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La séparation des alcaloïdes est effectuée dans des conditions classiques.

Les deux développements successifs permettent d'obtenir des spots bien définis sans qu'une diffusion gênante n'apparaisse pour les mesures densitométriques.

Les effets de bord observés depuis longtemps pour ce type de séparation³ sont totalement supprimés par la saturation de la cuve.

Le recouvrement uniforme des supports permet d'obtenir des séparations reproductibles, sans distorsion des spots; de plus, la ligne de base observée au cours des mesures densitométriques du blanc est parfaitement plane.

La Fig. 1 rassemble les différents aspects des mêmes chromatogrammes d'un extrait de *Secale cornutum*; pour la comparaison, les lectures opérées à 305 nm et, après révélation, à 580 nm sont superposées.

A l'analyse de ces résultats, il est évident que la méthode colorimétrique, avec une sensibilité plus élevée, permet d'obtenir des spots mieux différenciés du bruit de fond et s'avère nettement plus spécifique pour le dosage envisagé. Il faut noter un léger déplacement des maxima d'absorption observés en UV soit en solution méthanolique (312 nm) soit par réflectance sur chromatoplaque (305 nm), de même dans le visible, avec le réactif de Van Urck, 551 nm en solution et en présence de Cl_3Fe comme sensibilisant, 580 nm sur chromatoplaque.

La séparation n'est pas complète. L'ergométrine est totalement isolée; par contre, l'ergotamine est contaminée par l'ergosine, et l'ergocristine par l'ergocornine et l'ergokryptine. Toutefois, ce fait ne constitue pas un inconvénient majeur, étant

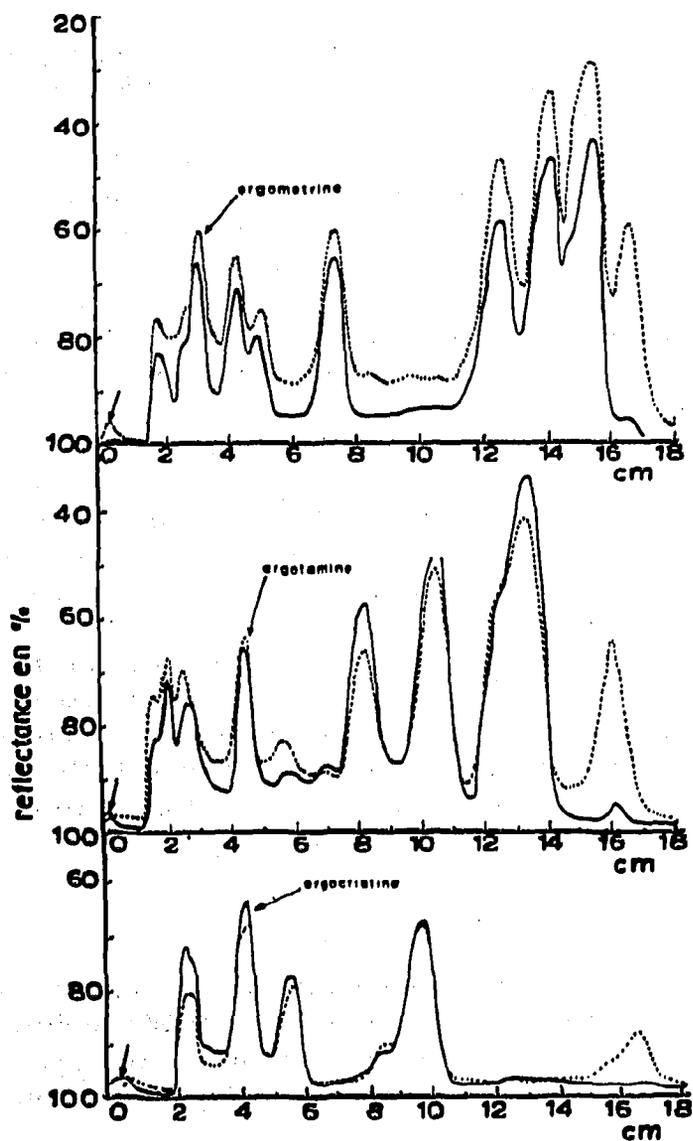


Fig. 1. Comparaison d'une lecture densitométrique à 305 nm (---) et après révélation à 580 nm (—).

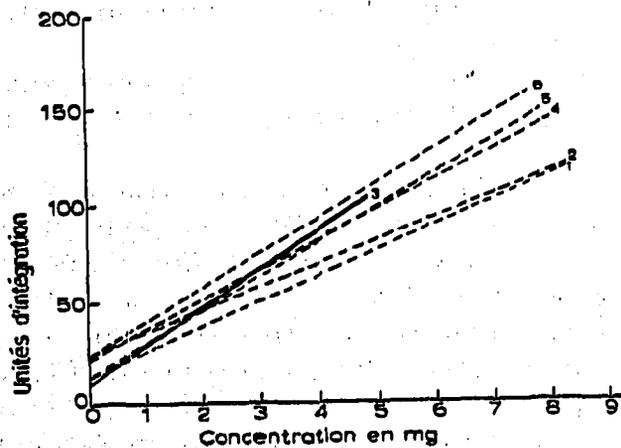


Fig. 2. Relations entre les valeurs d'intégration des surfaces et les concentrations des alcaloïdes. Droites de régression pour les colorimétries: 1 = Ergotamine; 2 = ergosine; 3 = ergométrine; 4 = ergocristine; 5 = ergocornine; 6 = ergokryptine.

données la proportion très faible de ces contaminants par rapport aux alcaloïdes principaux⁴ et les sensibilités assez voisines présentées par les courbes colorimétriques (Fig. 2). Les teneurs alcaloïdiques seront donc toujours exprimées en l'alcaloïde principal.

La cinétique de la réaction colorée a été étudiée et est reportée graphiquement à la Fig. 3. Les différents alcaloïdes étudiés présentent des courbes comparables.

Le délai de conservation préconisé est suffisant pour le développement optimal de la coloration. Des laps de temps plus longs déterminent le jaunissement progressif du fond du chromatogramme.

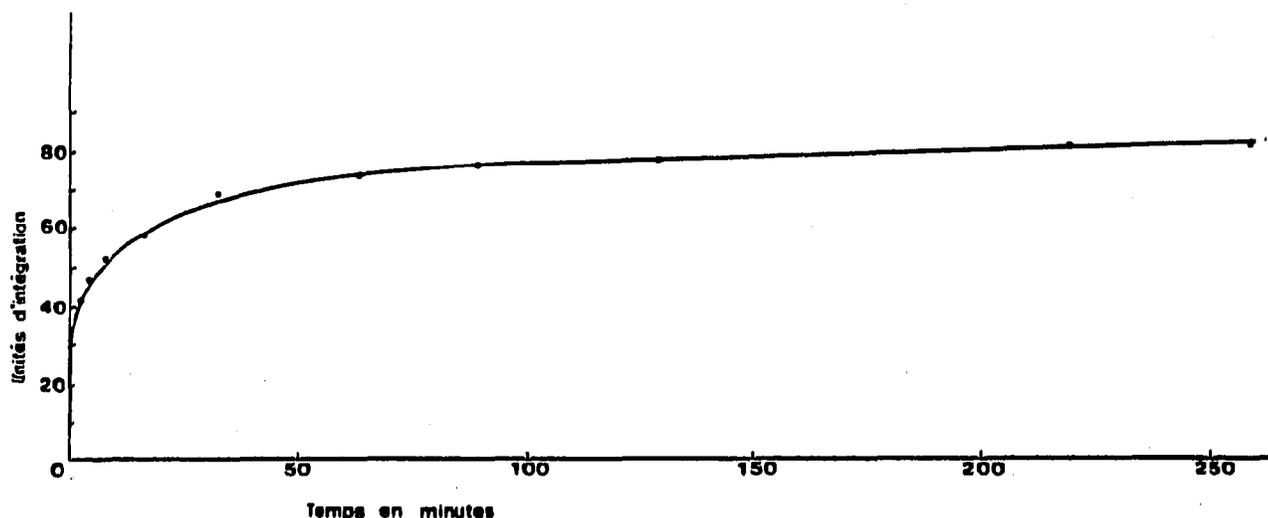


Fig. 3. Cinétique du développement de la réaction colorée de Van Urck appliquée à un spot d'ergotamine. Au temps = 0, la chromatoplaque est sortie de la cuve saturée en acide chlorhydrique.

Le domaine de linéarité de la réponse, exprimée en unités d'intégration, a été explorés pour diverses concentrations de chacun des alcaloïdes étudié. Il se situe pour l'ergotamine entre 0 et 14 μg , pour l'ergocristine entre 0 et 10 μg , et pour l'ergométrine entre 0 et 5 μg . La meilleure sensibilité présentée par l'ergométrine en comparaison des autres alcaloïdes est due au rapport noyau indol: poids moléculaire total plus favorable.

En ce qui concerne l'extraction des alcaloïdes à partir de la poudre de *Secale cornutum*, les premiers stades d'isolement sont conformes aux prescriptions habituelles des pharmacopées. La totalité des alcaloïdes est effectivement extraite après 5 h de traitement aux Soxhlet.

Les reprises et concentrations successives par l'acétone tiennent compte de la solubilité des différents alcaloïdes et d'une purification par précipitations des matières de charge.

Pour l'interprétation des résultats, la droite de régression est calculée à partir des valeurs expérimentales fournies par l'échelle des témoins.

La lecture densitométrique est effectuée en opérant, si nécessaire, une mise à 100 % de réflectance sur la zone précédant le spot mesuré, de façon à soustraire le bruit de fond. Pour une largeur moyenne de base de pic, et pour ce dernier réglage, le comptage de l'intégrateur s'élève à cinq unités. Dans ces conditions, il est nécessaire de faire intervenir également, dans le calcul de la droite de régression, le couple de

TABLEAU II
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

| Alcaloïde | g% en alcaloïdes, exprimé pour la poudre dégraissée et séchée | % CV | Nombre de mesure |
|--|---|------|------------------|
| Ergométrine | 0.0063 | 7 | 9 |
| Alcaloïdes du groupe de l'ergotamine et de l'ergosine, calculés en ergotamine | 0.0610 | 5 | 9 |
| Alcaloïdes du groupe de l'ergocristine, de l'ergokryptine, et de l'ergocornine, calculés en ergocristine | 0.1730 | 1 | 9 |

valeurs constantes, concentration = 0: nombre d'unités d'intégration = 5, imposé dans nos conditions expérimentales.

L'exactitude de la méthode a été testée par additions d'alcaloïdes en quantités connues dans les extraits totaux. Le "recovery" atteint $100 \pm 2.5\%$.

La méthode a été appliquée au dosage de la poudre de *Secale cornutum*. Les résultats de l'analyse ainsi que les coefficients de variation calculés pour l'ensemble de la méthode, y comprise l'extraction, sont repris dans le Tableau II. Le coefficient de variation relativement élevé obtenu pour l'ergométrine est dû à la faible teneur de cet alcaloïde dans la poudre et au volume de solvant déposé plus important.

La grande sensibilité de la méthode nous permet de doser jusqu'à $2 \mu\text{g}$ d'ergométrine et $6 \mu\text{g}$ d'ergotamine et d'ergocristine; à la limite, un dosage des trois alcaloïdes nécessiterait moins de 50 mg de poudre.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à la firme Sandoz pour les témoins d'alcaloïdes qu'elle a bien voulu nous fournir et à la Manufacture de Produits Pharmaceutiques A. Christiaens pour les déterminations spectrophotodensitométriques qu'elle nous a permis d'effectuer.

RÉSUMÉ

Après séparation des alcaloïdes *Secale cornutum* par chromatographie sur couche mince, une méthode a été mise au point pour le dosage photodensitométrique *in situ* de l'ergométrine, de l'ergotamine et de l'ergocristine.

La photodensitométrie à 580 nm utilisée après révélation à l'aide du réactif de Van Urck est plus sensible et plus spécifique que la spectrodensitométrie à 305 nm.

Cette nouvelle méthode a été appliquée à la détermination quantitative rapide des alcaloïdes principaux de *Secale cornutum*. La sensibilité de la méthode est telle que des quantités de l'ordre de $2 \mu\text{g}$ (ergométrine) et de $6 \mu\text{g}$ (ergotamine et ergocristine) peuvent être évaluées.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. KEIPERT ET R. VOIGT, *J. Chromatogr.*, 64 (1972) 327.
- 2 M. VANHAELLEN, *J. Chromatogr.*, 67 (1972) 182.
- 3 E. STAHL, *Thin-Layer Chromatography*, Springer Verlag, Berlin, 1960, p. 95.
- 4 A. HOFMANN, *Die Mutterhorn-Alkaloide*, F. Enke Verlag, Stuttgart, 1964.