

CHROM. 11,480

## ÉTUDE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PRESSION DES ALCALOÏDES DE L'ERGOT

AKIRA YOSHIDA, SEIETSU YAMAZAKI et TOSHIO SAKAI

Central Research Laboratories, Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd., Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki-ken 300-03 (Japon)

(Reçu le 18 septembre 1978)

---

### SUMMARY

#### *High-performance liquid chromatography of ergot alkaloid*

A method for the analysis of ergot alkaloids has been developed by high-performance liquid chromatography. A silica column was used for preparation of ergotinine and ergotoxine from ergot. Separation of the individual ergot alkaloids was successfully accomplished on a column of Hitachi Gel No. 3011-O (porous polystyrene modified by hydroxymethyl) with an eluent of *n*-hexane-ethanol-triethylamine (70:30:0.5, v/v). The method was applied to the analysis of  $\alpha$ -ergocryptinine, ergocorninine, ergocristinine,  $\alpha$ -ergocryptine, ergocornine and ergocristine in ergot and dihydroergocryptine ( $\alpha + \beta$ ), dihydroergocornine and dihydroergocristine in pharmaceutical tablets.

---

### INTRODUCTION

De l'intérêt considérable a été accordé à l'analyse qualitative et quantitative des alcaloïdes de l'ergot et de leurs dérivés hydrogénés ces dernières années. Un certain nombre de méthodes pour l'analyse des alcaloïdes de l'ergot ont été proposées précédemment; telles que la chromatographie sur papier<sup>1</sup> et la chromatographie en couche mince<sup>2-5</sup> en se basant sur la réaction de Van Urk ou la fluorescence naturelle du spot séparé. Toutefois, ces méthodes ont les désavantages qu'elles prennent beaucoup de temps et leurs exactitude et précision sont peu satisfaisantes. Une méthode de séparation par la distribution de contre-courant<sup>6</sup> n'a pas d'utilité pratique et ne semble pas d'avoir été utilisée récemment. La chromatographie en phase gazeuse<sup>7,8</sup> ne peut être appliquée qu'aux alcaloïdes de peptide qui se composent des peptides avec structures différentes.

Une autre méthode applicable à l'analyse des alcaloïdes de l'ergot est la chromatographie liquide à haute pression (CLHP). Dans les méthodes proposées précédemment, les colonnes de silice<sup>9,13</sup> et de phases inversées<sup>10-13</sup> ont été employées pour la séparation. La colonne de silice a pu s'employer pour la séparation des groupes de l'ergotinine telle que l'ergokryptinine ( $\alpha + \beta$ ), l'ergocorninine ou l'ergocristinine, et de l'ergotoxine telle que l'ergokryptine ( $\alpha + \beta$ ), l'ergocornine ou l'ergocristine.

Sur les colonnes de phases inversées, la séparation de chaque ergotoxine, ergotinine et dihydroergotoxine a été faite d'une façon très satisfaisante.

CLHP sur une colonne du polystyrène poreux (les particules sphériques poreuses du copolymère de styrène-benzène divinylque) était très utile à la séparation des composés de structure similaire: les acides phénoliques tels que l'acide 4-hydroxy-3-méthoxymandélique, l'acide 3,4-dihydroxymandélique, l'acide 4-hydroxy-3-méthoxyphénylacétique ou l'acide 3-hydroxy-4-méthoxyphénylacétique<sup>14</sup>, et les tautomères de céto-énol de l'acide phénylpyruvique<sup>15</sup>. Dans le présent travail, nous avons appliqué avec succès la colonne du polystyrène poreux modifié par hydroxyméthyl (Hitachi Gel No. 3011-O) à la séparation et au dosage des alcaloïdes de l'ergot dans l'ergot et la tablette pharmaceutique.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### *Matières*

Les composés suivants sont d'origine commerciale: les tablettes de la méthanesulfonate de dihydroergotoxine (Sankyo, Tokyo, Japon); l' $\alpha$ -ergokryptine et l'ergocristine (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.); l'ergotaminine et l'ergométrine (Nakarai, Kyoto, Japon). L' $\alpha$ -ergokryptinine et l'ergocristinine ont été préparées en bouillant l' $\alpha$ -ergokryptine et l'ergocristine respectivement dans le méthanol selon la méthode de Stoll *et al.*<sup>16</sup>. L'ergocornine et l'ergocorninine ont été isolées à partir de l'ergot par CLHP sur une colonne de Hitachi Gel No. 3011-O décrite dans la présente publication. La dihydro- $\alpha$ -ergokryptine, la dihydroergocornine et la dihydroergocristine ont été isolées à partir des tablettes de la méthanesulfonate de dihydroergotoxine par la même CLHP. Tous les autres produits chimiques sont des produits purs pour analyse.

### *Système chromatographique*

Un chromatographe liquide à haute pression utilisé pour la séparation de chaque alcaloïde de l'ergot a été assemblé avec une pompe du type plongeur (9SU, Hissko, Tokyo, Japon), une soupape d'injection (Nihon Seimitsu Kagaku, Tokyo, Japon), un tube d'acier inoxydable (500 × 4.6 mm I.D.) rempli de Hitachi Gel No. 3011-O (le diamètre des grains, 5-7  $\mu$ m) et un détecteur d'ultra-violet (LDC Modèle 1280; la longueur d'onde, 280 nm).

Les groupes de l'ergotinine et de l'ergotoxine ont été séparés sur la colonne de verre (700 × 3 mm I.D.) remplie de gels de silice (Wako Gel C-300, Wako, Osaka, Japon) et les éluats de la colonne ont été révélés à l'aide d'un spectrofluorimètre (MPF-4, Hitachi, Tokyo, Japon) équipé avec une cellule à écoulement.

### *Extraction des alcaloïdes à partir de l'ergot*

Une 10-g quantité de la poudre de l'ergot ont été dégraissés au moyen de 150 ml d'éther de pétrole pendant 1 h. Une 5-g quantité de la poudre dégraissée ont été extraits au moyen de 75 ml d'1,2-dichloroéthane par agitation pendant 1.5 h et filtrés. L'1,2-dichloroéthane dans le filtrat a été évaporé sous pression réduite à 40° et le résidu a été repris dans 20 ml d'1,2-dichloroéthane. La solution de l'1,2-dichloroéthane a été extraite 10 fois, avec 5 min d'agitation à chaque fois, par 40 ml de la solution aqueuse (pH 1.0) d'acide tartarique à 2%-acide sulfurique<sup>17</sup>. Les phases aqueuses réunies ont été alcalisées par addition d'ammoniaque à 28% et extraites

3 fois, avec 5 min d'agitation chaque fois, par 200 ml de chloroforme. Le chloroforme dans les phases organiques réunies a été évaporé sous pression réduite à 40°. Le résidu (cela s'appelle extrait de l'ergot) a été repris dans 0.25 ml de chloroforme et 50  $\mu$ l de la solution ont été injectés sur la colonne du gel de silice. L'ergotinine et l'ergotoxine ont été éluées dans les conditions montrées dans la Fig. 1. L'éluat contenant l'ergotinine a été réuni et évaporé sous pression réduite à 40° et le résidu a été repris dans 0.2 ml de chloroforme; le même procédé s'est appliqué à l'éluat contenant l'ergotoxine. Un 10- $\mu$ l volume de chaque solution ont été analysés par CLHP, comme l'indique la Fig. 2.

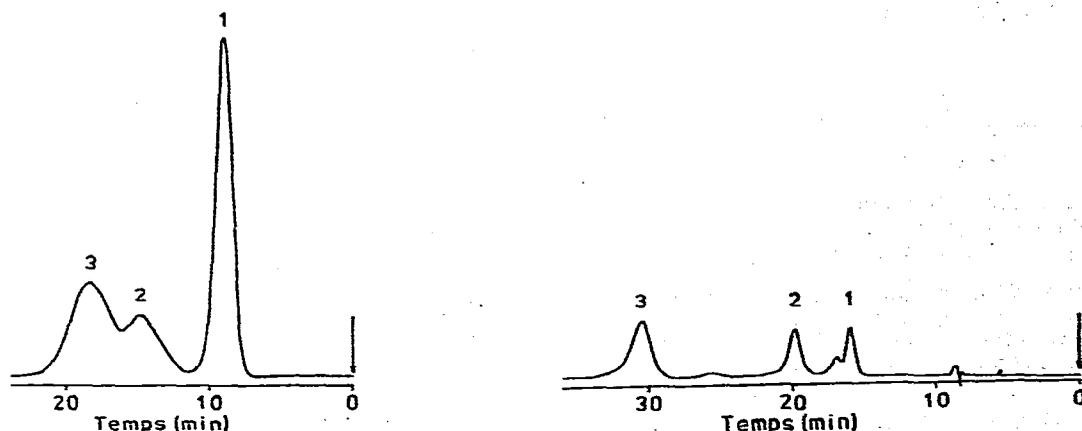


Fig. 1. Chromatogramme d'un extrait de l'ergot. Un 50- $\mu$ l volume de la solution du chloroforme ont été analysés en CLHP dans les conditions suivantes. Colonne: Wako Gel C-300 (700  $\times$  3 mm I.D.) à température ambiante. Éluant: cyclohexane-acétone (50:50, v/v). Longueurs d'ondes: Ex: 350 nm, Em: 400 nm. Fentes: Ex: 10 nm, Em: 5 nm. Débit: 0.72 ml/min. Pics: 1 = ergotinine; 2 = ergotaminine; 3 = ergotoxine.

Fig. 2. Chromatogramme d'un éluat contenant des alcaloïdes de l'ergotinine élués à partir de la colonne du gel de silice. Un 10- $\mu$ l volume de la solution du chloroforme obtenue par la méthode décrite dans le texte ont été analysés en CLHP dans les conditions suivantes. Colonne: Hitachi Gel No. 3011-O (500  $\times$  4.6 mm I.D.) à 40°. Éluant: *n*-hexane-éthanol-triéthylamine (70:30:0.5, v/v). Longueur d'onde: 280 nm. Débit: 0.91 ml/min. Pics: 1 =  $\alpha$ -ergokryptinine; 2 = ergocorninine; 3 = ergocristinine.

#### Extraction de la dihydroergotoxine à partir de la tablette

A une tablette de la méthanesulfonate de dihydroergotoxine qui a été réduite en poudre, on a ajouté 5 ml d'eau distillée, 0.2 ml d'ammoniaque à 28% et 10 ml de chloroforme. Après l'agitation de 5 min, 8 ml de la phase organique ont été pris et évaporés sous pression réduite à 40°. Le résidu a été repris dans 0.2 ml de chloroforme et 10  $\mu$ l de la solution ont été analysés par CLHP comme l'indique la Fig. 2.

#### Spectrométrie de masse

L'éluat correspondant à chaque pic dans les Figs. 2, 3 et 4 a été réuni et évaporé sous pression réduite à 40°. Le résidu a été repris dans 50-100  $\mu$ l de chloroforme. Un 10- $\mu$ l volume de la solution ont été mis dans la sonde en quartz et le chloroforme s'est évaporé par le chauffage. Les spectres de masse ont été réalisés

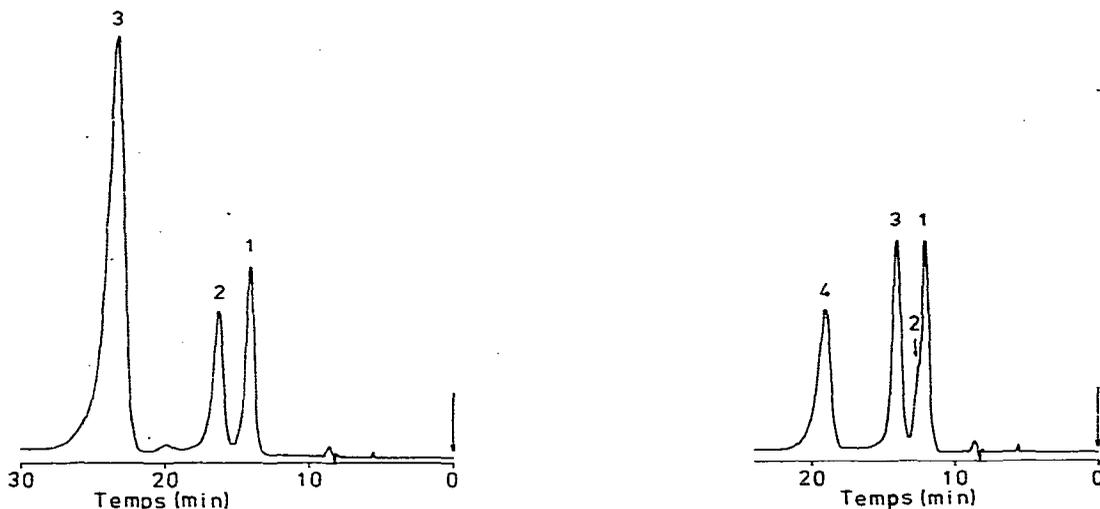


Fig. 3. Chromatogramme d'un éluat contenant des alcaloïdes de l'ergotoxine élués à partir de la colonne du gel de silice. Les mêmes conditions que celles décrites dans la Fig. 2 ont été utilisées. Pics: 1 =  $\alpha$ -ergokryptine; 2 = ergocornine; 3 = ergocristine.

Fig. 4. Chromatogramme de la dihydroergotoxine extraite à partir d'une tablette. Les mêmes conditions que celles décrites dans la Fig. 2 ont été utilisées. Pics: 1 = dihydro- $\alpha$ -ergokryptine; 2 = dihydro- $\beta$ -ergokryptine; 3 = dihydroergocornine; 4 = dihydroergocristine.

dans les conditions suivantes: appareil Shimadzu-LKB 9000; énergie des électrons 70 eV; voltage d'accélération 3.5 kV; courant d'ionisation 60  $\mu$ A; température de la source d'ions 290°; température du système d'introduction directe entre 80 et 150°.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Szepesy *et al.*<sup>13</sup> ont montré que la silice était convenable à la séparation des groupes de l'ergotinine et de l'ergotoxine. Par conséquent, nous avons utilisé la colonne du gel de silice pour la préparation des alcaloïdes à partir de l'ergot. La Fig. 1 montre le chromatogramme d'un extrait de l'ergot sur une colonne du gel de silice. Dans les conditions employées, l'ergotinine et l'ergotoxine ont été éluées à 8.8 et 18.3 min, respectivement. L'ergotaminine a été éluée à 14.7 min. Ces composés ont été bien séparés des autres composants dans l'ergot. L'ergotamine, l'ergométrine, l'ergométrinine et la dihydroergotoxine ont été absorbées sur la colonne du gel de silice et n'ont pas été éluées dans les présentes conditions. Ces composés ont été élués avec des éluants plus polaires tels que acétone-cyclohexane (70:30, v/v) ou chloroforme-éthanol (80:20, v/v).

Afin de séparer chaque alcaloïde de l'ergotinine et de l'ergotoxine, Hitachi Gel No. 3011-O a été utilisé. Le Tableau I donne les facteurs de capacité ( $k'$ ) de quelques alcaloïdes de l'ergot pour les éluants différents. La meilleure séparation de chaque alcaloïde dans un groupe donné a été obtenue dans le système de *n*-hexane-éthanol-triéthylamine (70:30:0.5, v/v). Sur les colonnes du polystyrène poreux tel que Hitachi Gel No. 3010 (le diamètre des grains, 20–25  $\mu$ m) ou No. 3011 (le diamètre des grains, 10–12  $\mu$ m), les paires de l'ergokryptinine-l'ergocorninine, l'ergokryptine-

TABLEAU I

FACTEUR DE CAPACITÉ ( $k'$ ) DES ALCALOÏDES DE L'ERGOT SUR HITACHI GEL NO. 3011-O AVEC LES ÉLUANTS DIFFÉRENTS

Éluants: 1 = *n*-hexane-éthanol-triéthylamine (70:30:0.5, v/v); 2 = cyclohexane-éthanol-triéthylamine (70:30:0.5, v/v); 3 = *n*-hexane-chloroform-triéthylamine (5:95:0.5, v/v).

Substance	$k'$		
	1	2	3
Ergométrine	8.68	5.15	26
$\alpha$ -Ergokryptine	1.47	0.73	0.76
Ergocornine	1.85	0.88	0.84
Ergocristine	3.07	1.31	1.11
$\alpha$ -Ergokryptinine	1.78	0.89	2.14
Ergocorninine	2.45	1.15	2.86
Ergocristinine	4.31	1.82	3.23
Ergotaminine	5.57	2.41	3.41
Dihydro- $\alpha$ -ergokryptine	1.13	0.57	1.53
Dihydroergocornine	1.48	0.71	1.96
Dihydroergocristine	2.38	1.00	2.37

l'ergocornine et la dihydroergokryptine-la dihydroergocornine n'ont pas été séparées. En utilisant No. 3011-O du diamètre des grains de 5-7  $\mu\text{m}$ , la séparation a pu s'effectuer avec meilleure sélectivité et résolution que dans le cas où l'on a utilisé No. 3011-O de 10-12  $\mu\text{m}$ . Par conséquent, dans ce travail, No. 3011-O du diamètre des grains de 5-7  $\mu\text{m}$  a été utilisé.

Le chromatogramme des alcaloïdes de l'ergotinine préparés à partir d'un extrait de l'ergot est montré dans la Fig. 2 et celui des alcaloïdes de l'ergotoxine préparés à partir d'un extrait de l'ergot dans la Fig. 3. Ces chromatogrammes ont été utilisés pour le dosage de chaque ergotinine et ergotoxine dans l'ergot. Le chromatogramme de la dihydroergotoxine extraite à partir d'une tablette, qui est montré dans la Fig. 4, a été utilisée pour le dosage de la composition de la méthanesulfonate de dihydroergotoxine. Chaque pic sur les chromatogrammes des Figs. 2, 3 et 4 a été identifié par comparaison du temps de rétention aussi bien que du spectre de masse de l'éluat correspondant à ceux du composé authentique<sup>18</sup>.

La relation entre l'aire de pic et la quantité introduite sur la colonne était linéaire de 2 jusqu'à 20  $\mu\text{g}$  pour tous les alcaloïdes étudiés. La déviation des aires de pics mesurées était au-dessous de  $\pm 1\%$  quand 10  $\mu\text{g}$  des alcaloïdes de l'ergot ont été introduits à plusieurs reprises. La quantité minimum de la détection pour les alcaloïdes étudiés était d'environ 1  $\mu\text{g}$ . Les pourcentages de récupération de l'ergotinine et de l'ergotoxine à partir de l'ergot étaient environ 87% l'un et l'autre. Le pourcentage de récupération de la dihydroergotoxine à partir de la tablette était environ 80%.

Il semble que la présente méthode est pleine de promesses pour la tâche analytique envisagée dans la production des alcaloïdes de l'ergot. Puisque les éluants utilisés dans cette méthode sont plus volatils que ceux de CLHP sur les colonnes des phases inversées<sup>10-13</sup>, cette méthode peut se développer pour les travaux productifs variés de purification et fractionnement des composés pharmaceutiques tels que la dihydroergotoxine.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions très vivement Drs. T. Hashimoto et T. Ohashi pour leur discussion de valeur, et Dr. N. Takai pour son offre de Hitachi Gel No. 3011-O.

## RÉSUMÉ

Une méthode pour l'analyse des alcaloïdes de l'ergot a été développée par la chromatographie liquide à haute pression. Une colonne de silice a été utilisée pour la préparation de l'ergotinine et de l'ergotoxine à partir de l'ergot. La séparation de chaque alcaloïde de l'ergot a été accomplie avec succès sur une colonne de Hitachi Gel No. 3011-O (le polystyrène poreux modifié par hydroxyméthyl) avec un éluant de *n*-hexane-éthanol-triéthylamine (70:30:0.5, v/v). La méthode s'est appliquée à l'analyse de l' $\alpha$ -ergokryptinine, l'ergocorninine, l'ergocristinine, l' $\alpha$ -ergokryptine, l'ergocornine et l'ergocristine dans l'ergot et la dihydroergokryptine ( $\alpha + \beta$ ), la dihydroergocornine et la dihydroergocristine dans la tablette pharmaceutique.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Stoll et A. Rügger, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 1725.
- 2 M. Vanhaelen et R. Vanhaelen-Fastré, *J. Chromatogr.*, 72 (1972) 139.
- 3 R. Fowler, P. J. Gomm et D. A. Patterson, *J. Chromatogr.*, 72 (1972) 351.
- 4 J. Reichelt et S. Kudrnáč, *J. Chromatogr.*, 87 (1973) 433.
- 5 M. Prošek, E. Kučan, M. Katić et M. Bano, *Chromatographia*, 9 (1976) 273.
- 6 C. Galeffi et E. M. Monache, *J. Chromatogr.*, 88 (1974) 413.
- 7 G. Szepesi et M. Gazdag, *J. Chromatogr.*, 122 (1976) 479.
- 8 T. A. Plomp, J. G. Leférink et R. A. A. Maes, *J. Chromatogr.*, 151 (1978) 121.
- 9 R. A. Heacock, K. R. Langille, J. D. MacNeil et R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 77 (1973) 425.
- 10 R. V. Vivilecchia, R. L. Cotter, R. J. Limpert, N. Z. Thimot et J. N. Little, *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 407.
- 11 H. Bethke, B. Delz et K. Stich, *J. Chromatogr.*, 123 (1976) 193.
- 12 J. Dolinar, *Chromatographia*, 10 (1977) 364.
- 13 L. Szepesy, I. Fehér, G. Szepesi et M. Gazdag, *J. Chromatogr.*, 149 (1978) 271.
- 14 A. Yoshida, M. Yoshioka, T. Yamazaki, T. Sakai et Z. Tamura, *Clin. Chim. Acta*, 73 (1976) 315.
- 15 A. Yoshida, M. Yoshioka, T. Sakai et Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 26 (1978) 1177.
- 16 A. Stoll et A. Hofmann, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 1570.
- 17 A. N. Ban'kovskaya, L. D. Vechkanova et A. I. Ban'kovskii, *Khim. Prir. Soedin.*, 5 (1971) 678.
- 18 J. Vokoun et Z. Řeháček, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 40 (1975) 1731.