

CHROM. 11,986

IDENTIFICATION ET DOSAGE D'ALCALOÏDES EN MÉLANGE DANS UNE FORME PHARMACEUTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

R. GIMET et A. FILLOUX

Centre de Recherche Delalande, 92500 Rueil-Malmaison (France)

(Reçu le 21 décembre 1978; manuscrit modifié reçu le 7 mai 1979)

SUMMARY

Identification and determination of a mixture of alkaloids in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography

A high-performance liquid chromatographic method is described for the separation of alkaloids on a silica gel column. Different concentrations of the mobile phase (diethyl ether-water-diethylamine) are discussed. The procedure, well suited for the quantitative analysis of 3 alkaloids in syrup samples, is extended to the determination of 16 alkaloids belonging to 8 different families, as well as to the analysis of several non-alkaloid compounds.

INTRODUCTION

L'objet de cette étude est la mise au point d'une méthode analytique permettant l'identification et le dosage simultanés d'alcaloïdes ayant en commun un même squelette et d'alcaloïdes appartenant à différentes familles en vue de réaliser leur dosage spécifique en mélange.

L'aspect quantitatif n'est pas résolu par chromatographie sur couche mince. La nature des produits (grande polarité, faible volatilité, instabilité thermique) élimine la possibilité offerte par la chromatographie en phase vapeur. La chromatographie liquide haute performance a été envisagée.

De nombreux auteurs ont décrit des séparations d'alcaloïdes au moyen de cette technique, utilisant les chromatographies solide-liquide, liquide-liquide, d'échange d'ions ou de paire d'ions. La plupart d'entre eux ont réalisé la séparation de plusieurs alcaloïdes appartenant à un même groupe structural, que ce soient ceux de l'opium¹⁻¹⁰, de l'ergot¹¹⁻¹⁷, des solanées¹⁸⁻²¹, des strychnos^{22,23} ou bien encore de diverses autres familles²⁴⁻³⁷.

Wheals et Jane³⁸ ont fait le point des techniques chromatographiques utilisées pour chaque groupe d'alcaloïdes.

D'autres auteurs ont abordé le problème de séparation des alcaloïdes d'une façon plus générale utilisant la chromatographie de partage en phase inverse^{39,40}, la chromatographie d'échange d'ions sur des colonnes modifiées par des ions métalliques^{41,42},

la chromatographie sur colonne de silice imprégnée d'ions Ag^{+43} , ou la chromatographie solide-liquide sur colonne de silice⁴⁴⁻⁴⁸.

Certains auteurs ont décrit la séparation d'un très grand nombre d'alcaloïdes^{44,46,48}; mais nous n'avons pas trouvé dans la littérature de technique offrant une résolution suffisante pour permettre le dosage de trois alcaloïdes (codéine, éthylmorphine, éphédrine) en présence d'autres alcaloïdes tels que ceux de l'aconit, de l'ipécacuanha et de la belladone.

Cette étude présente une méthode de séparation des alcaloïdes contenus dans un sirop* de composition suivante: codéine (30 mg pour 100 ml); éthylmorphine (30.6 mg pour 100 ml); éphédrine (39.2 mg pour 100 ml); alcaloïdes totaux de l'aconit (0.25 mg, exprimé en aconitine, pour 100 ml); alcaloïdes totaux de l'ipéca (1.8 mg, exprimé en émétine, pour 100 ml); alcaloïdes totaux de la belladone (0.4 mg, exprimé en atropine, pour 100 ml).

La technique utilise une colonne de silice préalablement modifiée par une phase mobile moyennement polaire contenant de faibles proportions d'eau et de diéthylamine dans l'éther éthylique. L'importance de l'eau et de la diéthylamine est discutée. La méthode est généralisée à la séparation de 16 alcaloïdes appartenant à 8 groupes différents ainsi qu'à la séparation de quelques autres molécules non alcaloïdiques.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillage

Les instruments utilisés sont: un chromatographe en phase liquide haute performance (Du Pont modèle 830) équipé d'un détecteur photométrique UV à 254 nm, d'une vanne d'injection (Du Pont 204 590) munie d'une boucle d'environ 3.3 μl , et opérant à température ambiante; un intégrateur-calculateur (LTT modèle ICAP 10). Colonne: Partisil PXS 5/25 (Whatman H 4115108) en acier inoxydable garnie de particules de silice entièrement poreuses de diamètre 5 μm (présentant une surface spécifique d'environ 400 m^2/g); longueur: 25 cm, diamètre intérieur: 4.6 mm.

Phase mobile et solutés

La phase mobile utilise des solvants de qualité "pour analyse" sans purification ultérieure. Elle est composée d'éther éthylique non stabilisé (Carlo Erba 447534) à proportions variables en eau déminéralisée et en diéthylamine (Carlo Erba 442753): eau: 50 à 100% de saturation de l'éther (solubilité à saturation de l'eau dans l'éther voisine de 1.2%); diéthylamine: 0.5 à 8% (v/v).

Les échantillons d'alcaloïdes sont dissous à des concentrations comprises entre 20 et 300 mg pour 100 ml dans du chloroforme additionné éventuellement de méthanol et de diéthylamine.

Conditionnement de la colonne

Le conditionnement de la colonne, obtenu par passage de 300 à 500 ml de phase mobile, est atteint lorsque le pH en sortie de colonne est alcalin et que les facteurs de capacité d'alcaloïdes injectés régulièrement (éphédrine par exemple) sont stabilisés.

* Sirop Solucamphre (Delalande).

Ainsi conditionnée, la colonne conserve ses propriétés séparatrices durant quelques mois d'une utilisation semi-continue, après quoi un déséquilibre de la colonne, se manifestant par une diminution des facteurs de capacité, peut intervenir.

Dans ce cas, la régénération de la colonne est réalisée, après activation par passage de méthanol et de chloroforme, par un nouveau conditionnement comme précédemment.

Conditions expérimentales

Toutes les analyses sont réalisées sous une pression de 1000 p.s.i. (69 bars) en tête de colonne, correspondant à un débit de phase mobile voisin de 2 ml/min et à une vitesse linéaire proche de 0.3 cm/sec.

Les valeurs des facteurs de capacité (k') sont calculées pour tous les alcaloïdes et autres composés par rapport au pic de solvant (chloroforme).

ÉTUDE DES PRINCIPAUX PARAMÈTRES

Influence de la teneur en eau de la phase mobile

L'importance de la teneur en eau de la phase mobile, soulignée par certains

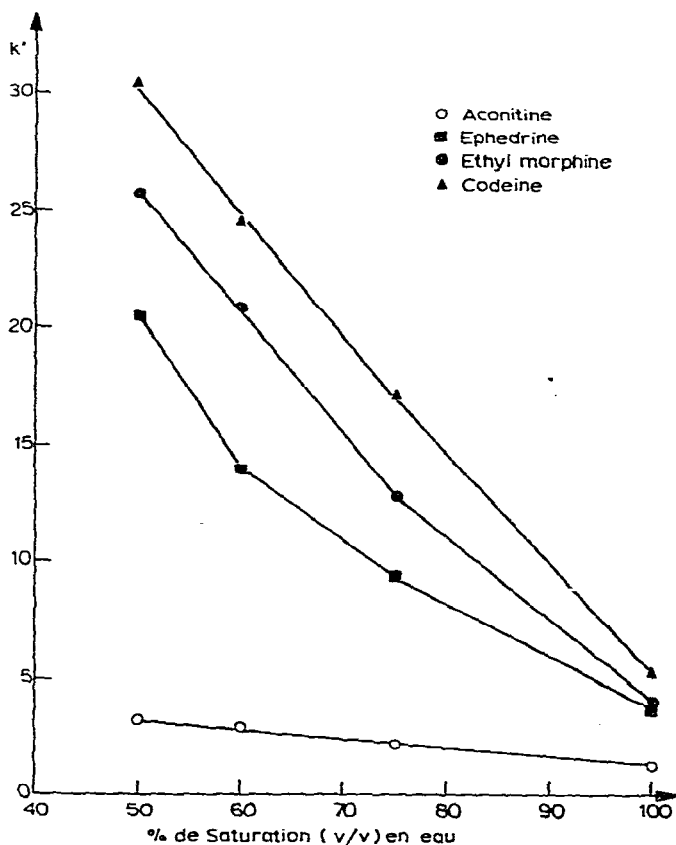


Fig. 1. Influence de la teneur en eau de la phase mobile sur les k' . Colonne de silice (5 μ m). Phase mobile: éther éthylique-eau (50 à 100% de saturation) + 3% en diéthylamine.

auteurs^{49,50}, intervient sur la quantité de phase aqueuse fixée sur la silice après conditionnement de la colonne.

La Fig. 1 montre son influence sur la variation des k' de 4 alcaloïdes injectés. Un accroissement de la teneur en eau diminue la valeur des k' sans modifier leur ordre d'éluion. Afin de minimiser les temps d'analyse ($k' = 5$ correspond à un temps d'éluion voisin de 8 min) et pour éliminer le risque de déphasage, nous avons retenu comme composition de phase mobile un pourcentage de saturation en eau de l'éther éthylique de 95%.

Influence de la concentration en diéthylamine de la phase mobile

La présence de diéthylamine dans la phase mobile intervient comme agent de recul d'ionisation des composés basiques dans la phase stationnaire aqueuse fixée sur la silice.

La Fig. 2 montre l'influence de la concentration en diéthylamine de la phase mobile sur la variation des k' de 8 alcaloïdes injectés. D'une façon générale, un accroissement de la concentration en diéthylamine diminue la valeur des k' . Cepen-

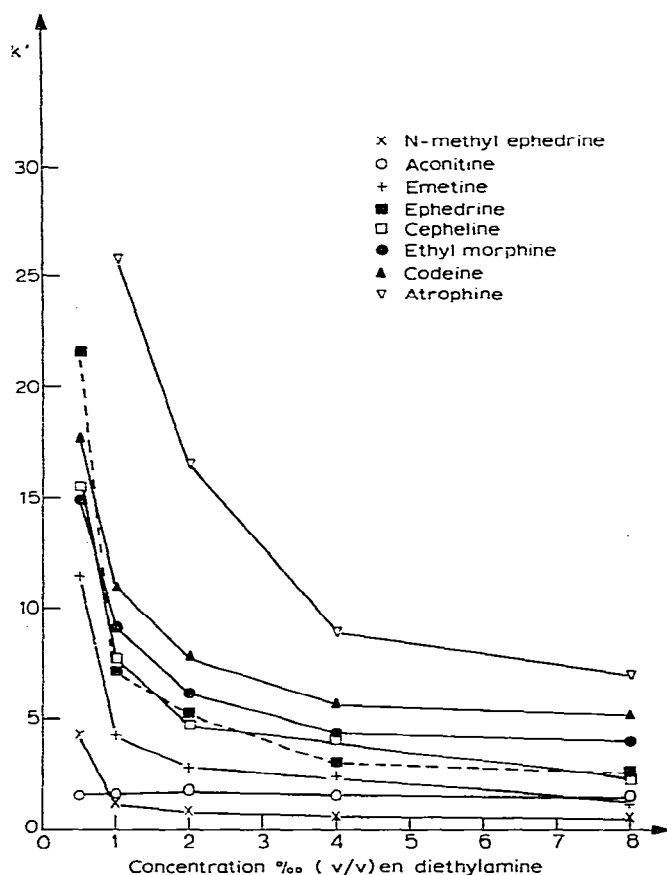


Fig. 2. Influence de la concentration en diéthylamine de la phase mobile sur les k' . Colonne de silice (5 μ m). Phase mobile: éther éthylique-eau (à 95% de saturation) + diéthylamine variable entre 0.5 et 8% (v/v).

tant les courbes expérimentales présentent des variations de pente dépendant de la nature même des composés, ce qui provoque un changement de leur ordre d'élution en fonction de la concentration en diéthylamine.

RÉSULTATS

Séparation qualitative des alcaloïdes d'une forme pharmaceutique

La séparation qualitative des alcaloïdes contenus dans le sirop cité précédemment a été réalisée à partir d'une solution chloroformique les contenant aux concentrations suivantes: aconitine, 24 mg/100 ml; émétine, 18 mg/100 ml; éphédrine, 81 mg/100 ml; éthylmorphine, 27 mg/100 ml; codéine, 36 mg/100 ml; atropine, 81 mg/100 ml.

Les résultats obtenus avec une phase mobile composée d'éther éthylique à 95% de saturation en eau et de diéthylamine à 3‰ (v/v) sont représentés sur le chromatogramme de la Fig. 3a.

Pour les pics d'éphédrine, d'éthylmorphine et de codéine, le nombre de plateaux théoriques, voisin de 4000 sur une colonne neuve, n'est plus que de 2000

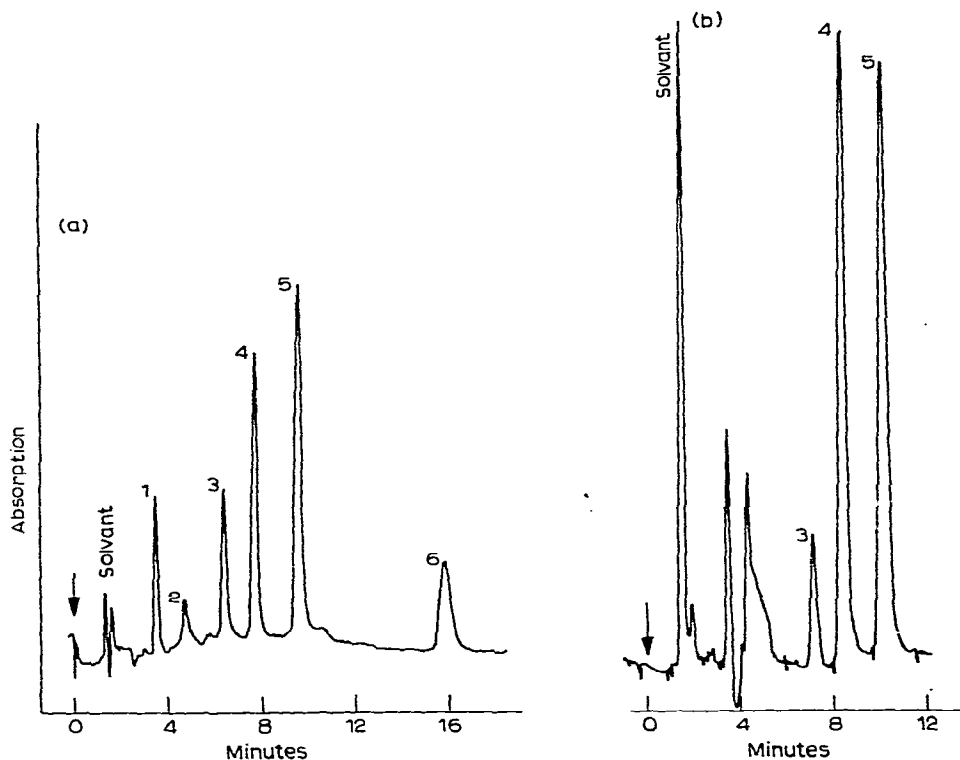


Fig. 3. (a) Séparation qualitative des alcaloïdes du sirop. Colonne de silice (5 μ m), longueur 25 cm, diamètre intérieur 4.6 mm. Phase mobile: éther éthylique à 95% de saturation en eau + 3‰ (v/v) de diéthylamine. $\Delta P = 1000$ p.s.i. (69 bars). Débit 2 ml/min; vitesse linéaire 0.3 cm/sec. Enregistrement 0.25 in./min; détecteur UV (254 nm); sensibilité 0.04 μ A. Pics: 1 = aconitine; 2 = émétine; 3 = éphédrine; 4 = éthylmorphine; 5 = codéine; 6 = atropine. (b) Dosage des 3 principaux alcaloïdes du sirop. Conditions et pics identiques à (a).

plateaux sur une colonne utilisée à mi-temps pendant 2 ans. Dans les mêmes conditions, la résolution entre deux pics successifs passe de 4 à 3, ce qui s'explique par le contact prolongé de la diéthylamine avec la silice. Ces valeurs sont toutefois suffisantes pour l'analyse effectuée et permettent d'envisager une durée de vie de la colonne en utilisation continue d'un an au minimum.

Dosage des principaux alcaloïdes contenus dans le sirop

Compte tenu de la proportion relative des alcaloïdes dans le sirop, seuls les principaux (éphédrine, éthylmorphine et codéine) ont été dosés. La solution de dosage est obtenue par extraction en milieu très basique des alcaloïdes par le chloroforme et concentration de cette phase organique à des valeurs nominales de 78.4 mg d'éphédrine, 61.2 mg d'éthylmorphine et 60 mg de codéine pour 100 ml.

Le dosage est réalisé dans les mêmes conditions chromatographiques que précédemment, en double exemplaire (ou en nombre supérieur) en intercalant entre chaque essai une solution étalon des trois alcaloïdes de référence.

La justesse de la méthode a été testée sur deux échantillons reconstituant des sirops à teneur en alcaloïdes connue. Les résultats trouvés varient entre 92.4 et 101.4% des quantités introduites.

TABLEAU I

RÉSULTATS QUANTITATIFS DES 3 ALCALOÏDES MAJEURS DU SIROP

Lot	Éphédrine (mg/100 ml)		Éthylmorphine (mg/100 ml)		Codéine (mg/100 ml)	
	Résultats individuels	Moyenne	Résultats individuels	Moyenne	Résultats individuels	Moyenne
1	33.5	36.4	23.8	24.3	25.2	26.05
	38.0		24.4		26.1	
	37.3		24.9		26.5	
	36.8		24.2		26.4	
2	38.3	37.8	26.6	26.0	26.9	27.1
	37.3		25.4		27.3	
	34.4		24.9		26.6	
3	36.6	35.65	28.2	26.5	28.6	27.4
	35.8		25.6		26.7	
	35.8		27.4		27.8	
4	34.4	35.25	25.4	24.7	27.3	26.6
	36.1		24.0		25.9	
	39.6		29.1		28.2	
5	38.4	38.2	26.3	28.3	27.7	28.0
	38.3		27.9		28.4	
	36.6		29.8		28.2	
6	35.6	34.75	27.9	27.8	28.4	28.0
	33.9		27.7		27.6	
7	36.8	37.8	27.1	27.4	26.7	27.05
	38.8		27.7		27.4	
8	35.9	34.5	26.3	26.85	26.9	26.95
	33.1		27.4		27.0	
Coefficient de variation individuel	3.9%		4.2%		2.5%	

La Fig. 3b représente le chromatogramme des trois alcaloïdes dosés dans un lot de cette forme pharmaceutique. Les résultats obtenus sur 8 lots sont rassemblés dans le Tableau I.

Le dosage de chacun des alcaloïdes réalisé en double exemplaire et calculé avec deux solutions étalon indépendantes présente un coefficient de variation de 2,6% soit une précision relative, au niveau de confiance de $p = 0.99$ et pour 48 degrés de liberté, de $\pm 7\%$.

Généralisation de la méthode à la séparation d'autres alcaloïdes

Cette méthode de séparation des alcaloïdes par recul d'ionisation en phase stationnaire sur colonne de silice a été appliquée à un ensemble de 16 alcaloïdes provenant de 8 familles différentes ainsi qu'à la séparation de trois molécules non alcaloïdiques.

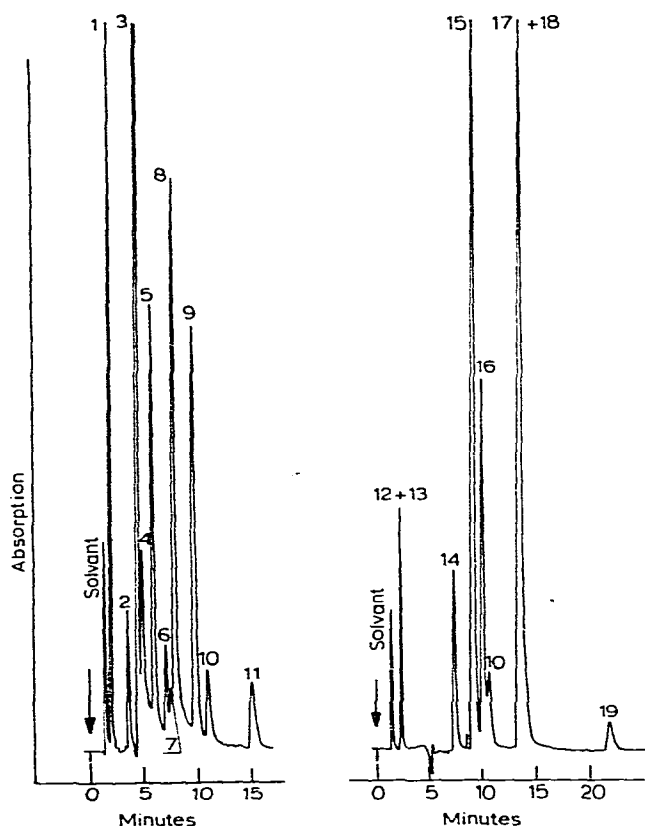


Fig. 4. Séparation de 16 alcaloïdes et 3 composés non-alcaloïdiques. Colonne de silice (5 μ m); longueur 25 cm; diamètre intérieur 4.6 mm. Phase mobile: éther éthylique à 95% de saturation en eau + 4^o/₀₀ (v/v) de diéthylamine. ΔP : 1000 p.s.i. (69 bars); débit 2 ml/min; vitesse linéaire 0.3 cm/sec. Enregistrement 3 mm/min; détecteur UV (254 nm); sensibilité 0.16 μ A. Pics: 1 = noscapine; 2 = aconitine; 3 = papavérine; 4 = émétine; 5 = éphédrine; 6 = céphéline; 7 = scopolamine; 8 = éthylmorphine; 9 = codéine; 10 = phénytoïne; 11 = homatropine; 12 = N-méthyléphédrine; 13 = narceïne; 14 = quinine; 15 = caféine; 16 = strychnine; 17 = sulfanilamide; 18 = atropine; 19 = phénobarbital.

TABLEAU II
SÉPARATION DES ALCALOÏDES ET DE QUELQUES AUTRES COMPOSÉS

<i>Alcaloïdes et dérivés</i>	<i>Nom du composé</i>	<i>k'</i>	<i>No. du pic (Fig. 4)</i>	<i>Quantité injectée (µg)</i>
Aconit	Aconitine	1.51	2	3.3
Ephédra	N-méthyléphédrine	0.58	12	5.6
	Éphédrine	2.89	5	10
Ipecacuanha	Émétine	2.36	4	7
	Céphéline	3.95	6	7
Opium				
Type phénanthrène	Éthylmorphine	4.29	8	3.3
	Codéine	5.58	9	3.3
Type benzyl isoquinoléine	Papavérine	2.15	3	1.7
Type phtalide isoquinoléine	Noscapine	0.35	1	1.7
	Narcéine	0.58	13	3.3
Solanées	Scopolamine	4.11	7	2.7
	Atropine	8.93	18	10
	Homatropine	9.55	11	7.7
Cinchona	Quinine	4.34	14	3.3
Strychnos	Strychnine	6.32	16	3.3
Xanthine	Caféine	5.62	15	3.3
Autres composés	Phénytoïne	6.73	10	3.3
	Sulfanilamide	8.82	17	1.7
	Phénobarbital	14.9	19	3.3

Les séparations sont représentées sur les deux chromatogrammes de la Fig. 4. Les résultats des k' sont rassemblés, par famille d'alcaloïdes, dans le Tableau II.

DISCUSSION

La méthode de chromatographie liquide haute performance utilisée dans cette étude s'avère efficace pour la séparation d'alcaloïdes appartenant à différents groupes structuraux en mélange.

Elle est également très résolutive pour la séparation des alcaloïdes d'une même famille; c'est ainsi que parmi les groupes étudiés, quatre présentent des couples d'alcaloïdes très bien séparés entre eux alors que leurs formules ne diffèrent que par un groupement méthylène.

Il s'agit des couples codéine-éthylmorphine, éphédrine-N-méthyléphédrine, céphéline-émétine et homatropine-atropine. On remarque d'ailleurs que pour chacun d'eux, l'alcaloïde le moins retenu est le moins hydrophile.

La méthode présente par ailleurs une grande souplesse d'utilisation: elle permet, par les variations de composition de la phase mobile en eau et en diéthylamine, d'optimiser les conditions analytiques en fonction des séparations désirées: elle présente de plus une précision convenable lors de la réalisation de dosages d'alcaloïdes contenus dans une forme pharmaceutique: elle est enfin applicable à la séparation d'autres composés non alcaloïdiques rencontrés fréquemment dans l'industrie pharmaceutique.

RÉSUMÉ

Une méthode de chromatographie liquide haute performance pour la séparation d'alcaloïdes sur colonne de silice est présentée. Les variations de composition de la phase mobile (éther éthylique-eau-diéthylamine) sont discutées. La méthode, autorisant le dosage de trois alcaloïdes dans un sirop, est généralisée à la séparation de seize alcaloïdes appartenant à huit familles différentes ainsi qu'à la séparation de quelques molécules non alcaloïdiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. Y. Wu et J. J. Wittick, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 359.
- 2 V. Das Gupta et A. G. Ghanekar, *J. Pharm. Sci.*, 66 (1977) 895.
- 3 F.-F. Wu et R. H. Dobberstein, *J. Chromatogr.*, 140 (1977) 65.
- 4 J. H. Knox et J. Jurand, *J. Chromatogr.*, 82 (1973) 398.
- 5 C. Olieman, L. Maat, K. Waliszewski et H. C. Beyerman, *J. Chromatogr.*, 133 (1977) 382.
- 6 P. J. Cashman et J. I. Thornton, *J. Forens. Sci. Soc.*, 12 (1972) 417.
- 7 D. W. Smith, T. H. Beasley, R. L. Charles et H. W. Ziegler, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 1691.
- 8 T. H. Beasley, D. W. Smith, H. W. Ziegler et R. L. Charles, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 57 (1974) 85.
- 9 H. W. Ziegler, T. H. Beasley et D. W. Smith, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 58 (1975) 888.
- 10 B. B. Wheals, *J. Chromatogr.*, 122 (1976) 85.
- 11 F. Erni, R. W. Frei et W. Lindner, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 265.
- 12 P. Schauwecker, R. W. Frei et F. Erni, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 63.
- 13 V. Hartmann, M. Rödiger, W. Ableidinger et H. Bethke, *J. Pharm. Sci.*, 67 (1978) 98.
- 14 M. Wurst, M. Flieger et Z. Řeháček, *J. Chromatogr.*, 150 (1978) 477.
- 15 L. Szepesy, I. Fehér, G. Szepesi et M. Gazdag, *J. Chromatogr.*, 149 (1978) 271.
- 16 J. D. Wittwer et J. H. Kluckhohn, *J. Chromatogr. Sci.*, 11 (1973) 1.
- 17 R. A. Heacock, K. R. Langille, J. D. Mac Neil et R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 77 (1973) 425.
- 18 I. L. Honigberg, J. T. Stewart, A. P. Smith et R. D. Plunkett, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 1389.
- 19 W. Santi, J. M. Huen et R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 423.
- 20 M. H. Stutz et S. Sass, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 2134.
- 21 R. Verpoorte et A. Baerheim Svendsen, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 203.
- 22 C. Y. Wu et S. Siggia, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 1499.
- 23 R. Verpoorte et A. Baerheim Svendsen, *J. Chromatogr.*, 109 (1975) 441.
- 24 G. H. Jolliffe et E. J. Shellard, *J. Chromatogr.*, 81 (1973) 150.
- 25 D. G. I. Kingston et B. T. Li, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 431.
- 26 J. J. Kirkland, *Modern Practice of Liquid Chromatography*, Wiley, 1971.
- 27 T. Hattori, N. Kamiya, M. Inoue et M. Hayakawa, *J. Pharm. Soc. Japan*, 97 (1977) 1305.
- 28 Y. Akada et Y. Tanase, *J. Pharm. Soc. Japan*, 97 (1977) 940.
- 29 J. Strömbom et J. G. Bruhn, *Planta Med.*, 31A (1977) 41.
- 30 J. Strömbom et J. G. Bruhn, *J. Chromatogr.*, 147 (1978) 513.
- 31 S. Görög, B. Merényi et K. Jovánovics, *J. Chromatogr.*, 139 (1977) 203.
- 32 C. C. Fu et M. J. Sibley, *J. Pharm. Sci.*, 66 (1977) 425.
- 33 W. G. Crouthamel, B. Kowarski et P. K. Narang, *Clin. Chem.*, 23 (1977) 2030.
- 34 M. Gazdag, G. Szepesi et G. Takacsinagy, *Gyogyszereszet*, 21 (1977) 323.
- 35 V. Das Gupta et O. H. Shek, *Amer. J. Hosp. Pharm.*, 33 (1976) 1086.
- 36 I. R. Hunter, M. K. Walden, J. R. Wagner et E. Heftmann, *J. Chromatogr.*, 119 (1976) 223.
- 37 M. C. Castle, *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 437.
- 38 B. B. Wheals et I. Jane, *Analyst (London)*, 102 (1977) 625.
- 39 W. A. Trinler et D. J. Reuland, *J. Forens. Sci. Soc.*, 15 (1975) 153.
- 40 B. B. Wheals, *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, 13 (1976) 164.
- 41 H. F. Walton, *J. Chromatogr.*, 102 (1974) 57.
- 42 E. Murgia et H. F. Walton, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 417.
- 43 R. Aigner, H. Spitzky et R. W. Frei, *J. Chromatogr. Sci.*, 14 (1976) 381.

- 44 R. Verpoorte et A. Baerheim Svendsen, *J. Chromatogr.*, 100 (1974) 227.
- 45 R. Verpoorte et A. Baerheim Svendsen, *J. Chromatogr.*, 100 (1974) 231.
- 46 I. Jane, *J. Chromatogr.*, 111 (1975) 227.
- 47 R. W. Frei, W. Santi et M. Thomas, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 365.
- 48 R. G. Achari et E. E. Theimer, *J. Chromatogr. Sci.*, 15 (1977) 320.
- 49 J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, 83 (1973) 149.
- 50 Z. El Rassi, C. Gonnet et J. L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 179.