

CHROM. 15,995

## Note

---

### Utilisation de la chromatographie liquide haute performance pour la caractérisation et le dosage des principaux alcaloïdes du *Papaver somniferum* L\*

MICHEL HUTIN\* et ANDRÉ CAVÉ

Laboratoire de Pharmacognosie, ERA 317 CNRS, Faculté de Pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry (France)

et

JEAN-PIERRE FOUCHER

Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, 14032 Caen Cedex (France)

(Reçu le 1 mars 1983; manuscrit modifié reçu le 18 mai 1983)

L'identification et le dosage simultanés des 6 alcaloïdes majeurs de *Papaver somniferum* L (Papaveracées) — morphine, codéine, thébaïne, papavérine, noscapine et narcéine— dans des extraits végétaux, des préparations pharmaceutiques ou des milieux biologiques est d'un grand intérêt en pharmacognosie, dans l'industrie du médicament et en toxicologie.

A notre connaissance il n'existe pas de méthode réellement spécifique, fiable et rapide permettant d'obtenir cette identification et ce dosage.

La chromatographie en couche mince (CCM) permet l'identification<sup>1</sup> et le dosage<sup>2</sup> de ces alcaloïdes. Malheureusement c'est une méthode peu sensible rendue de surcroît peu reproductible par la série de manipulations qu'elle demande. Malgré cela, certains auteurs<sup>3</sup> l'ont préférée à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) qui n'est utilisable que sous certaines conditions et limitée à certains alcaloïdes<sup>4-7</sup>.

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) semble être une méthodologie de choix pour identifier et doser les alcaloïdes majeurs de *P. somniferum*.

Depuis 10 ans de nombreux travaux ont été réalisés mettant en oeuvre des séparations par adsorption<sup>8-13</sup>, partage<sup>14-16</sup>, appariement d'ions<sup>17-20</sup> et échange d'ions<sup>21-23</sup>.

Pour notre part nous proposons de nouvelles techniques qui permettent l'identification et le dosage des 6 alcaloïdes majeurs de *P. somniferum*. L'une d'elles — chromatographie de partage en phase inverse— est utilisable pour les 6 alcaloïdes simultanément.

---

\* Une partie de ce travail a été présentée aux Journées de Chromatographie Liquide Haute Performance, Faculté de Médecine de Bichat, 8 et 9 juin 1982.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Matériel*

Pompe 6000A ou pompe M45 Waters; injecteur U6K Waters ou boucle d'injection Rhéodine 7010 (20  $\mu$ l).

Détecteur M440 Waters à 280 nm; programmeur de gradient M660 Waters, colonnes Waters de 30 cm  $\times$  3.9 mm I.D. garnies de  $\mu$ Porasil ou de  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>; précolonne remplie de silice H Merck (phase normale) ou de LiChrorep RP-18 Merck (phase inverse).

*Conditions opératoires de chromatographie*

Détection à 280 nm; débit 2 ml/min.

*Adsorption sur silice en isocratique.* Phase mobile: hexane-dichlorométhane-éthanol absolu-triéthylamine (300:60:60:20).

*Adsorption sur silice avec gradient d'élution.* Phase mobile: solvant A: hexane-dichlorométhane-triéthylamine (300:60:20). Solvant B: éthanol absolu. Programmation linéaire de 2 à 50% du solvant B en 16 min.

*Partage en phase inverse.* Phase mobile: eau distillée-acétonitrile-triéthylamine (40:60:0.1).

*Partage en phase inverse avec appariement d'ions.* Phase mobile: eau distillée-méthanol-acide acétique (56:44:1) acide heptanesulphonique (Pic B<sub>7</sub>) Waters tel que 0.005 M.

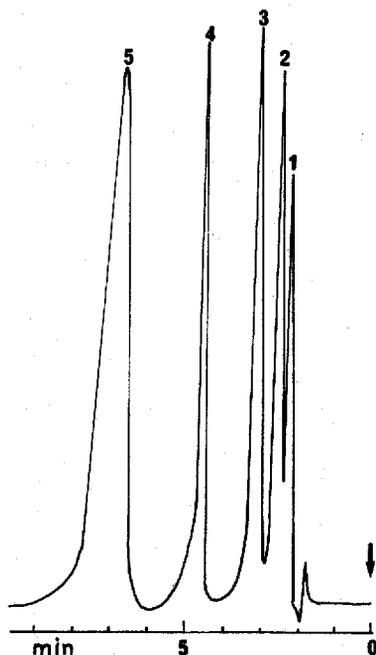


Fig. 1. Séparation des alcaloïdes par adsorption isocratique en phase normale. 1 = Noscapine, 2 = papavérine, 3 = thébaïne, 4 = codéine, 5 = morphine.

### Préparation des solutés

Les échantillons à étudier sont, lorsque cela est possible, mis en solution dans la phase mobile. Dans le cas contraire on procède à une extraction des alcaloïdes totaux. Si besoin est, on peut séparer les alcaloïdes en produits phénoliques et produits non phénoliques.

Les alcaloïdes totaux sont obtenus selon le schéma extractif suivant: épuisement dans un Soxhlet à pH alcalin par le chlorure de méthylène; extraction de la phase organique par une solution d'HCl (1 N); extraction de cette phase aqueuse par le mélange chlorure de méthylène-isopropanol (3:1) après alcalinisation par l'ammoniaque; la phase organique obtenue, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre laisse après évaporation sous pression réduite, le résidu d'alcaloïdes totaux.

La séparation des alcaloïdes phénoliques et non phénoliques est effectuée à partir des extraits alcaloïdiques totaux. On effectue une séparation liquide-liquide entre l'éther et la soude normale. Les alcaloïdes sont récupérés de façon classique, alcaloïdes non phénoliques à partir de la phase étherée, alcaloïdes phénoliques à partir de la phase NaOH 1 N.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Chromatographie d'adsorption en phase normale

A notre connaissance aucune des techniques chromatographiques décrites dans la littérature ne permet, par CLHP en phase normale, d'identifier simultanément les 6 alcaloïdes de *P. somniferum*<sup>8-11</sup>.

Nous présentons ici deux techniques de séparation: la première, isocratique permet l'identification de 5 alcaloïdes, et la deuxième, avec gradient d'élution permet d'identifier les 6 alcaloïdes.

*Technique isocratique (Fig. 1).* La résolution des 5 alcaloïdes élués est très satisfaisante. La force éluante de cette phase mobile ne permet pas l'élution de la narcéine qui est trop polaire. En utilisant une phase mobile de force éluante moindre (sans éthanol absolu —on obtient une meilleure séparation des 3 premiers alcaloïdes et leur dosage est alors possible).

*Technique avec gradient d'élution (Fig. 2).* Ziegler et Beasley<sup>12,13</sup> ont décrit en 1975 la séparation des alcaloïdes de *P. somniferum* en utilisant un gradient d'élution en phase normale.

En nous inspirant des conditions de séparation isocratiques que nous avons décrites plus haut, nous avons augmenté la force éluante en utilisant un gradient d'élution d'éthanol absolu.

La résolution des 3 premiers alcaloïdes élués (noscapine, papavérine et thébaïne) est moins bonne que celle obtenue par la technique isocratique, mais la séparation des 3 derniers alcaloïdes élués (codéine, morphine et narcéine) est excellente. Un large excès de morphine, comme c'est le cas dans les alcaloïdes totaux de paille de pavot, ne perturbe pas la séparation des autres alcaloïdes.

### Chromatographie de partage en phase inverse (Fig. 3)

Parmi les techniques décrites utilisant la CLHP ce sont celles de Wu et Wittick<sup>14</sup>, de Nobuhara *et al.*<sup>15</sup> et de Pettitt et Damon<sup>16</sup> qui semblent les plus intéressantes. Jamais encore, à notre connaissance, une technique d'identification des 6

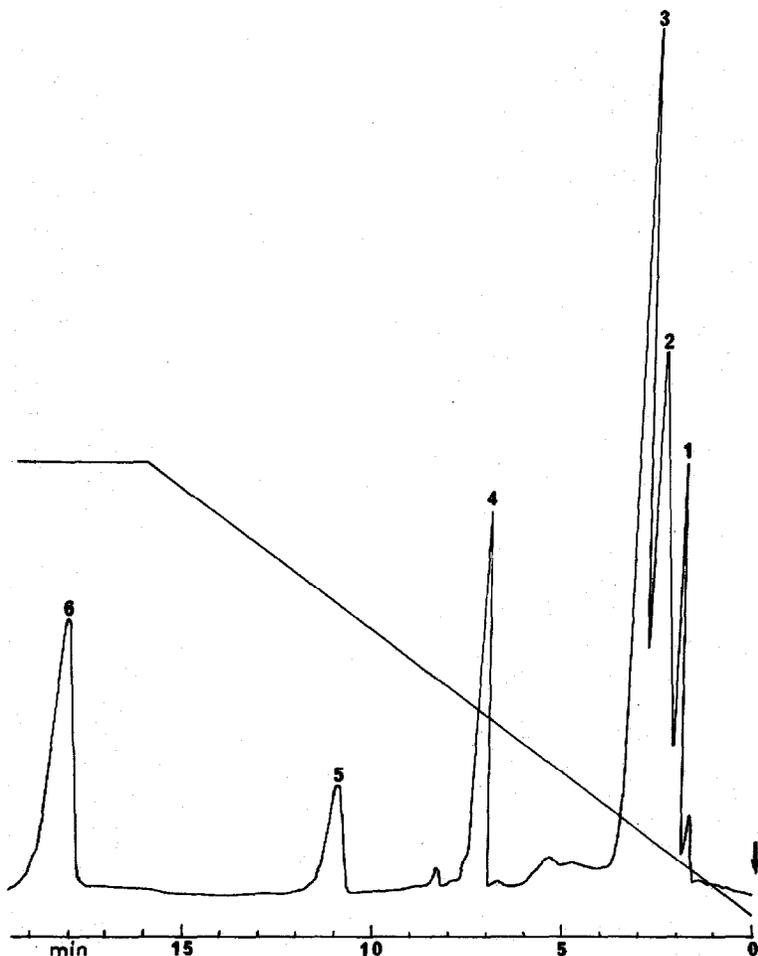


Fig. 2. Séparation des alcaloïdes par adsorption avec gradient d'éluion en phase normale. 1 = Noscapine, 2 = papavérine, 3 = thébaïne, 4 = codéine, 5 = morphine, 6 = narcéine.

alcaloïdes majeurs de pavot n'a été proposée. La technique chromatographique que nous proposons est également applicable au dosage de ces alcaloïdes.

L'identification des alcaloïdes est aisée, mais cette technique semble devoir être réservée à l'identification d'un ou de plusieurs de ces alcaloïdes plutôt qu'à l'analyse d'extraits bruts de plantes. En effet, les pics ont des temps de rétention très proches, et si un alcaloïde est très majoritaire (morphine dans *P. somniferum* ou thébaïne dans *P. bracteatum*) l'identification des autres alcaloïdes devient impossible.

Cette méthode est applicable au dosage des alcaloïdes mais il faut que l'alcaloïde que l'on dose ne soit pas masqué par un autre alcaloïde présent en quantité beaucoup plus importante.

#### *Chromatographie en phase inverse en appariement d'ions (Fig. 4)*

Jusqu'à ce jour aucun auteur n'a décrit de technique chromatographique d'ap-

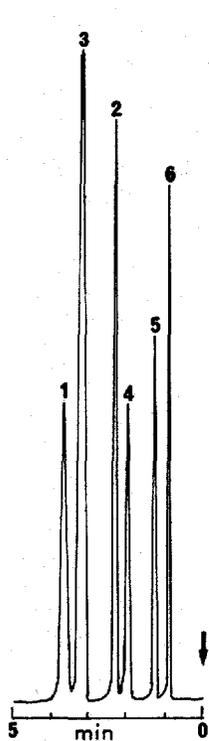


Fig. 3. Séparation des alcaloïdes par partage en phase inverse. 1 = Noscapine, 2 = papavérine, 3 = thébaïne, 4 = codéine, 5 = morphine, 6 = narcéine.

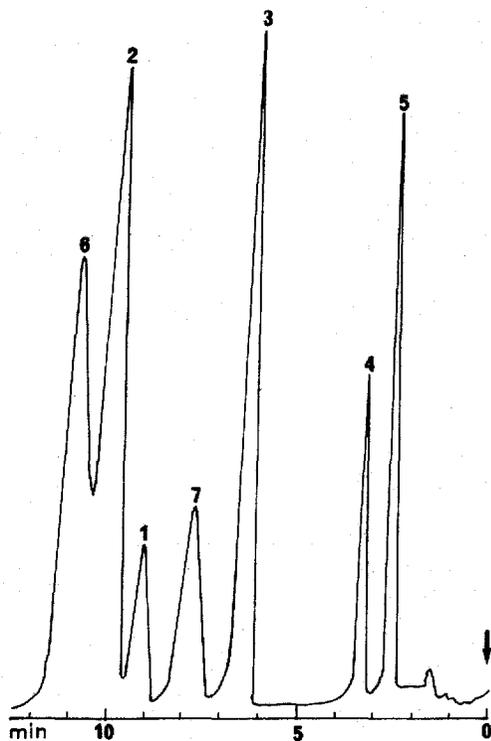


Fig. 4. Séparation des alcaloïdes par appariement d'ions. 1 = Noscapine, 2 = papavérine, 3 = thébaïne, 4 = codéine, 5 = morphine, 6 = narcéine, 7 = cryptopine.

pariement d'ions permettant la séparation des 6 alcaloïdes nous intéressant.

Les principaux travaux décrivent: soit des techniques d'identification d'alcaloïdes de l'opium<sup>17</sup> ou des alcaloïdes morphiniques et de leurs dérivés synthétiques<sup>18</sup>, soit des techniques de dosage d'un seul<sup>19</sup> ou de quatre alcaloïdes en mélange (morphine, codéine, noscapine et papavérine)<sup>20</sup>.

La technique de chromatographie que nous utilisons nous permet de séparer et de doser les 6 alcaloïdes majeurs de *P. somniferum* ainsi qu'un alcaloïde mineur de *P. somniferum*: la cryptopine.

La résolution est satisfaisante mais ici encore la présence d'une quantité trop importante de morphine gêne le dosage de la codéine. Pour éviter ce phénomène de masquage nous proposons l'extraction de la morphine par formation d'un phénate en présence d'une solution aqueuse de soude. Ainsi on peut doser la morphine d'une part et les alcaloïdes non phénoliques d'autre part.

## CONCLUSION

Les méthodes proposées, fondées sur des principes différents, adsorption, par-

tage, appariement d'ions sont tout à fait adaptées à la caractérisation simultanée des principaux alcaloïdes du *P. somniferum*.

Elles sont également utilisables pour le dosage de ces alcaloïdes. La plus grande précision pour le dosage de la morphine, de la codéine et de la thébaïne est obtenue par les techniques d'adsorption et d'appariement d'ions. Pour la papavérine et la noscapine, la technique de partage donne les meilleurs résultats. Pour la narcéine, la technique d'adsorption avec gradient d'élution est la plus satisfaisante, bien que le risque de désactivation de la phase stationnaire ne soit pas négligeable (présence d'une précolonne indispensable). Dans le cas où la morphine est très majoritaire, une séparation préalable des alcaloïdes non phénoliques améliore la précision des dosages.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 B. F. Engelke et P. G. Vincent, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 62 (1979) 538-544.
- 2 N. Y. Mary et E. Brochmann-Hanssen, *J. Nat. Prod.*, 26 (1963) 223-228.
- 3 M. Paris, J. P. Gramond et R. R. Paris, *Ann. Pharm. Fr.*, 32 (1974) 97-102.
- 4 E. Brochmann-Hanssen et T. Furuya, *J. Pharm. Sci.*, 53 (1964) 1549-1550.
- 5 E. Brochmann-Hanssen et A. Baerheim Svendsen, *J. Pharm. Sci.*, 52 (1963) 1134-1136.
- 6 G. Fischer et R. Gillard, *J. Pharm. Sci.*, 66 (1977) 421-423.
- 7 J. W. Fairbairn et K. Helliwell, *J. Pharm. Pharmacol.*, 27 (1975) 217-221.
- 8 D. W. Smith, Th. Beasley, R. L. Charles et H. W. Ziegler, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 1691-1694.
- 9 P. G. Vincent et B. F. Engelke, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 62 (1979) 310-314.
- 10 R. Verpoorte et A. Baerheim Svendsen, *J. Chromatogr.*, 100 (1974) 227-230.
- 11 J. W. Fairbairn et M. J. Steele, *Phytochemistry*, 19 (1980) 2317-2321.
- 12 T. H. Beasley, D. W. Smith, H. W. Ziegler et R. L. Charles, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 57 (1974) 85-90.
- 13 H. W. Ziegler, T. H. Beasley et D. W. Smith, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 58 (1975) 888-897.
- 14 C. Y. Wu et J. J. Wittick, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 359-363.
- 15 Y. Nobuhara, S. Hirano, K. Namba et M. Hashimoto, *J. Chromatogr.*, 190 (1980) 251-255.
- 16 B. C. Pettitt, Jr. et C. E. Damon, *J. Chromatogr.*, 242 (1982) 189-192.
- 17 I. Lurie, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 60 (1977) 1035-1040.
- 18 C. Olieman, L. Maat, K. Waliszewski et H. C. Beyerman, *J. Chromatogr.*, 133 (1977) 382-385.
- 19 E. J. Kubiack et J. W. Munson, *J. Pharm. Sci.*, 69 (1980) 152-156.
- 20 W. Lindberg, E. Johansson et K. Johansson, *J. Chromatogr.*, 211 (1981) 201-212.
- 21 J. H. Knox et J. Jurand, *J. Chromatogr.*, 82 (1973) 398-401.
- 22 S. H. Hansen, *J. Chromatogr.*, 212 (1981) 229-233.
- 23 L. W. Doner et A.-F. Hsu, *J. Chromatogr.*, 253 (1982) 120-123.