

CHROM. 17,427

## Note

### **Analyses qualitatives et quantitatives de la hyoscyamine-atropine et de la scopolamine dans les teintures mères de Solanacées par chromatographie liquide haute performance**

S. PAPHASSARANG\* et J. RAYNAUD

*Laboratoire de Botanique, Faculté de Pharmacie, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08 (France)*  
et

R. P. GODEAU et A. M. BINSARD

*Laboratoires de Pharmacologie Homéopathique DOLISOS, 62 rue Beaubourg, 75003 Paris (France)*  
(Reçu le 23 juillet 1984; manuscrit modifié reçu le 28 novembre 1984)

De nombreux travaux en chromatographie liquide haute performance (CLHP) ont été publiés<sup>1-6</sup> sur les préparations médicamenteuses contenant de l'atropine ou (et) de la scopolamine avec une composition bien définie de chaque composant. Mais peu de publications sont consacrées à l'étude quantitative de ces alcaloïdes dans les préparations végétales, mélanges plus complexes nécessitant des traitements préliminaires de l'échantillon avant le dosage.

Nous décrivons dans ce travail une méthode sélective d'extraction suivie du dosage de ces alcaloïdes dans les teintures mères allopathiques et homéopathiques de la Belladone, du Datura et de la Jusquiame.

#### MATERIEL ET METHODE

##### *Appareillage*

Chromatographe en phase liquide comprenant une pompe 6000 A Waters, un détecteur UV à longueur d'onde fixe à 254 nm, une colonne  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (30 cm  $\times$  3,9 mm) 10  $\mu$ m, un filtre précolonne Waters. Enregistreur Omniscribe type B 5000 et l'intégrateur Hewlett-Packard 3380 A.

##### *Conditions chromatographiques*

Phase mobile: solution aqueuse d'acide acétique à 3%—méthanol (70:30), pour l'analyse qualitative; (75:25), pour l'analyse quantitative. Débit: 1 ml/min. Détection UV à 254 nm, s. 0,02. Vitesse de l'enregistrement: 5 mm/min.

##### *Réactifs*

Tous les réactifs utilisés sont de qualité purs pour analyses.

Le chlorure de méthylène (Art. 822271 Merck-Schuchardt) est filtré sur oxyde d'aluminium actif basique (Réf. 84 5758 Merck AG, Darmstadt, R.F.A.).

Le solvant pour la CLHP est préparé chaque jour et filtré sur filtre Millipore.

##### *Préparation des témoins*

Ajouter à 1 ml de la solution méthanolique de la L-hyoscyamine (Réf. Sarsyn-

tex, 1 mg/ml), 1 ml de la solution de bromhydrate de scopolamine (Art. 7701 Merck, 1 mg/ml), 0.5 ml de la solution d'acide tropique (Serlabo, 1 mg/ml) et 0,5 ml de la solution d'apostatropine hydrochlorure (Réf. 462126 Fluka, 0,5 mg/ml). Injecter 10  $\mu$ l du mélange (Fig. 1).

#### Préparation des échantillons

Peser exactement  $x^*$  ml de teinture mère (soit p son poids).

Evaporer sous pression réduite à basse température ( $< 40^\circ\text{C}$ ) jusqu'à un volume de 1 ml pour chasser l'alcool. La phase aqueuse restante, reprise par 5 ml de 0,1 *N* acide sulfurique est alcalinisée par 1 ml d'ammoniaque concentrée et transvasée dans une ampoule à décantation.

L'extraction des alcaloïdes totaux est faite par le mélange éther éthylique-chloroforme (3:1, v/v) quatre fois 15 ml.

La phase éthéro-chloroformique, évaporée à sec sous pression réduite et reprise par 20 ml de chloroforme est extraite quatre fois par 10 ml de 0,1 *N* acide sulfurique. Les phases acides réunies sont alcalinisées par 2 ml d'ammoniaque concentrée.

L'extraction finale est faite par le chlorure de méthylène: trois fois 15 ml. Les phases organiques sont réunies et évaporées à sec puis reprises par 1 ml de méthanol.

La solution méthanolique (10  $\mu$ l), filtrée sur filtre Millipore, est injectée en CLHP (Fig. 2).

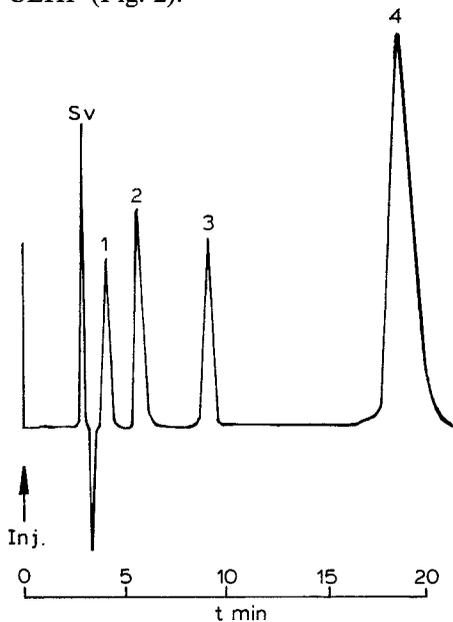


Fig. 1. Séparation des mélanges témoins d'alcaloïdes sur  $\mu$ Bondapak  $\text{C}_{18}$  avec comme phase mobile la solution aqueuse d'acide acétique à 3%-méthanol (7:3). Débit: 1 ml/min. Détection UV à 254 nm, vitesse d'enregistrement 5 mm/min. Identification: 1 = bromhydrate de scopolamine; 2 = *l*-hyoscyamine; 3 = acide tropique; 4 = apotropine. Sv = solvant.

\*  $x = 10$  ml pour les teintures mères homéopathiques et la teinture mère allopathique de Jusquiame.  $x = 5$  ml pour les teintures mères allopathiques de Belladone et de Datura.

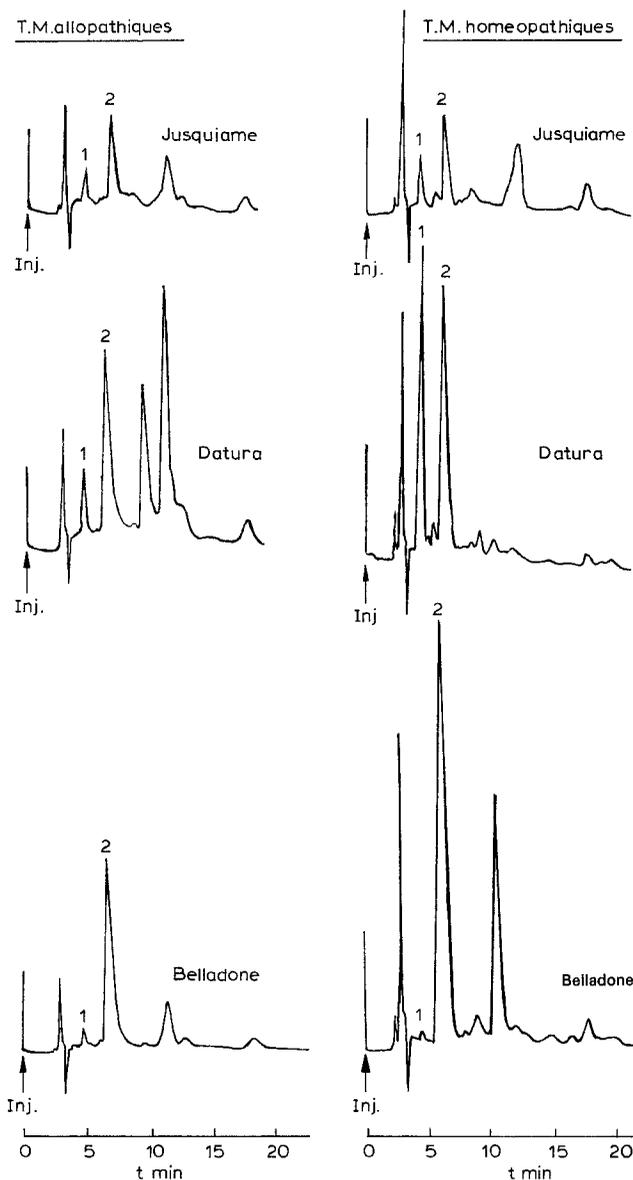


Fig. 2. Chromatogrammes des différentes teintures mères analysées. Colonne  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$  (30 cm  $\times$  3,9 mm); phase mobile, solution aqueuse d'acide acétique à 3%–méthanol (70:30). Débit: 1 ml/min. Détection UV à 254 nm (s. 0,02); vitesse d'enregistrement 5 mm/min. Identification: 1 = scopolamine; 2 = *l*-hyoscyamine.

### *Etude quantitative*

*Etalonnage.* Nous avons retenu la technique d'étalonnage externe. Une gamme étalon est réalisée à partir des solutions méthanoliques de la *l*-hyoscyamine et du bromhydrate de scopolamine précédemment préparées. Une dilution géométrique de

ces solutions permet d'obtenir une gamme d'étalonnage des deux substances avec les concentrations: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 mg/ml. Volumes injectés: 10  $\mu$ l.

#### *Calculs de la teneur en alcaloïdes totaux de l'échantillon*

La teneur en alcaloïdes totaux de l'échantillon (en mg pour 100 g de teinture mère) est donnée par la formule

$$\frac{100 a + 69,2 b}{p}$$

ou  $a$  et  $b$  sont les concentrations (en mg/ml) respectivement en *l*-hyoscyamine et en bromhydrate de scopolamine, et  $p$  est le poids de l'échantillon en grammes.

Cette formule s'applique quand le témoin bromhydrate de scopolamine contient trois molécules d'eau soit un poids moléculaire de 438,31 g.

La teneur en alcaloïdes totaux de l'échantillon est obtenue en faisant la somme de la teneur en *l*-hyoscyamine et celle en scopolamine. Ces deux alcaloïdes étant majeurs dans les trois teintures mères.

#### RESULTATS ET DISCUSSIONS

##### *Choix de la phase mobile*

L'emploi du mélange [ solution aqueuse d'acide acétique à 3%-méthanol (70:30)] comme phase mobile de la CLHP donne des résultats satisfaisants. Ce solvant permet d'analyser les principaux alcaloïdes des Solanacées en moins de 20 min et convient donc à l'étude qualitative des teintures mères. Signalons que dans les échantillons de teintures mères analysés, l'acide tropique et l'apoptropine qui sont les produits de dégradation de la hyoscyamine-atropine<sup>4</sup> n'ont pas été détectés.

Cependant, avec ce solvant, le facteur de capacité de la scopolamine est faible ( $k' = 0,4$ ) aussi pour l'analyse quantitative une proportion acide-méthanol de 75:25 (v/v) a-t-elle été choisie pour avoir un  $k'$  plus élevé ( $k' = 0,71$ ).

L'augmentation de la proportion de la solution aqueuse d'acide dans la phase mobile a pour première conséquence l'augmentation des temps de rétention des solutés mais provoque également une inversion dans l'ordre d'élution de la hyoscyamine-atropine et de l'acide tropique (Fig. 3).

##### *Stabilité des solutions étalons*

Les solutions étalons, gardées à 4°C, ont été régulièrement testées pendant deux semaines. Aucune détérioration n'a été notée.

##### *Linéarité des réponses*

Un volume de 10  $\mu$ l de chaque série de 10 solutions étalons contenant de 0 à 2 mg d'alcaloïdes/ml est été analysé en CLHP. Les courbes  $|C| = f[(So)]$  tracées pour la *l*-hyoscyamine et le bromhydrate de scopolamine montrent la linéarité des réponses (Fig. 4).

Six injections successives d'une même solution étalon témoin ont été analysées. Le coefficient de variation est de 1,7 (C.V.% = 1,7) pour le bromhydrate de scopolamine et de 0,5 (C.V.% = 0,5) pour la *l*-hyoscyamine.

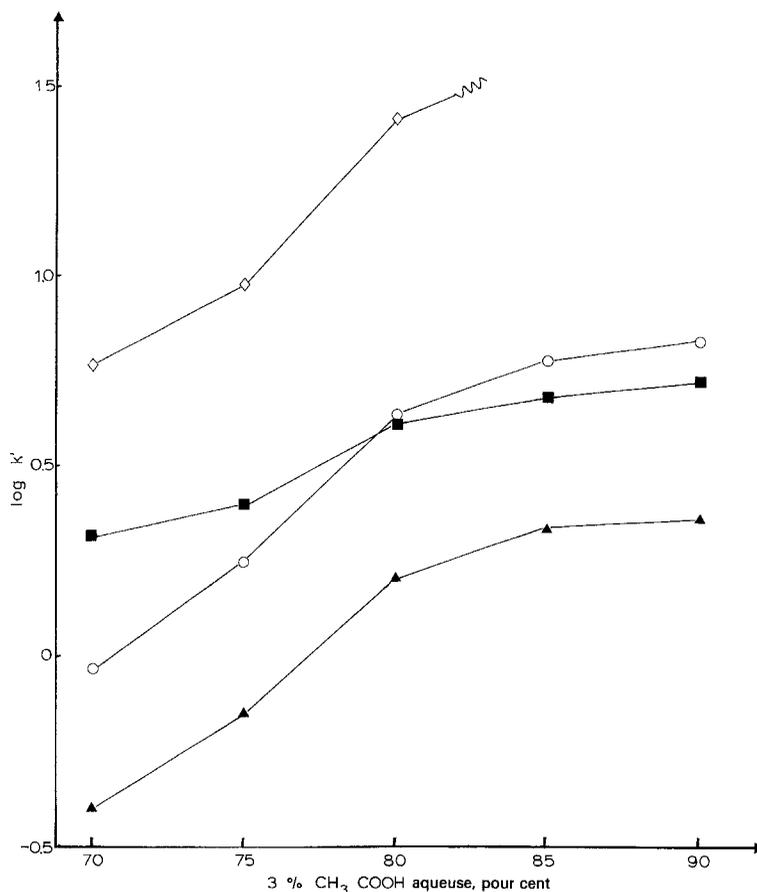


Fig. 3. Variation de  $\log k'$  en fonction du pourcentage de la solution aqueuse d'acide acétique à 3%. ▲ = Bromhydrate de scopolamine; ○ = *l*-hyoscyamine; ■ = acide tropique; ◇ = apoatropine. Colonne  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (30 cm × 3,9 mm). Phase mobile: solution aqueuse d'acide acétique à 3%-méthanol. Débit: 1 ml/min. Détection UV à 254 nm.

#### *Dosage des alcaloïdes totaux des teintures mères commerciales.*

Dix-sept échantillons de teintures mères homéopathiques et allopathiques de la Belladone, du Datura et de la Jusquiame de différentes dates de fabrication ont été analysés. Le dosage est réalisé en triple exemplaire. La justesse de la méthode a été testée sur trois échantillons d'alcool à 45% (v/v) (le titre alcoolique choisi est celui qu'ont généralement les teintures mères des Solanacées) contenant des quantités connues de bromhydrate de scopolamine et de *l*-hyoscyamine. Les résultats trouvés sont de 95,7% (93,8; 97,2; 96,2) pour le bromhydrate de scopolamine et de 97,1% (95,5; 97,5; 98,3) pour la *l*-hyoscyamine des quantités introduites. Les alcaloïdes montrent une stabilité remarquable dans les teintures mères (Tableau I).

#### CONCLUSION

L'application de la CLHP dans la détermination des alcaloïdes du groupe tro-

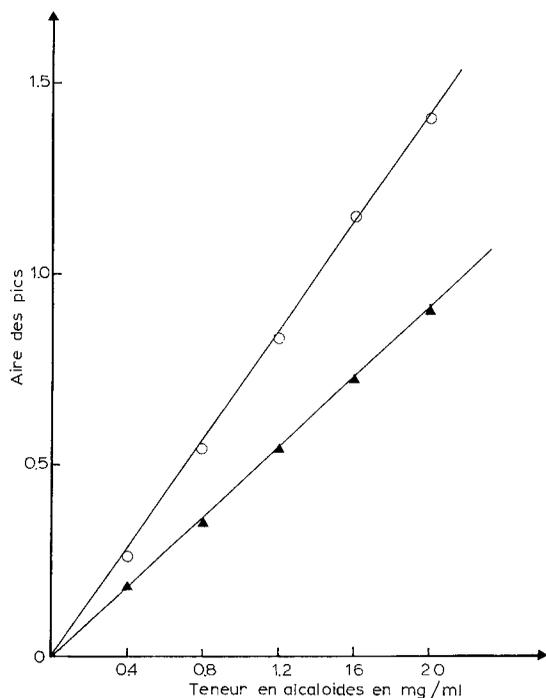


Fig. 4. Courbe d'étalonnage des deux principaux alcaloïdes des Solanacées. ▲ = Bromhydrate de scopolamine; ○ = *l*-hyoscyamine. Colonne  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$  (30 cm  $\times$  3,9 mm). Phase mobile: solution aqueuse d'acide acétique à 3%-méthanol (75:25). Débit: 1 ml/min. Détection UV à 254 nm (s. 0,02).

## TABLEAU I

## TENEURS EN ALCALOÏDES DES TEINTURES MÈRES ANALYSÉES

$\bar{x}$  = Teneur en alcaloïdes en mg pour 100 g de teinture mère (moyenne de trois analyses effectuées). DS = Déviation standard (en mg pour 100 g de teinture mère).

Echantillons de teintures mères analysées		$\bar{x}$	DS
<i>Atropa belladonna</i>	1	15,00	0,400
	2	3,00	0,100
	3	12,96	1,158
	5	24,86	0,750
	6	30,40	1,212
	<i>Datura stramonium</i>	1	18,06
2		15,96	0,159
3		16,11	0,102
4		19,11	1,300
5		14,93	0,300
6		26,45	0,455
<i>Hyoscyamus niger</i>	1	4,07	0,206
	2	3,08	0,159
	3	5,10	0,100
	4	4,00	0,044
	5	9,83	0,303

pane présente par rapport aux procédés officiels (*Pharmacopée française*)<sup>7,8</sup> des avantages certains. La CLHP est une méthode précise, sensible. Elle permet d'évaluer séparément la teneur en alcaloïdes (hyoscyamine-atropine, scopolamine) présents dans les teintures mères en utilisant une quantité de teinture mère de départ au moins 10 fois inférieure à celle utilisée par la méthode officielle de la *Pharmacopée française*.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions les Laboratoires de Pharmacologie Homéopathique Dolisos qui, par leur contribution financière, nous ont permis de réaliser ce travail.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 N. D. Brown, L. L. Hall, H. K. Sleeman, B. P. Doctor et G. E. Demaree, *J. Chromatogr.*, 148 (1978) 453.
- 2 N. D. Brown et H. K. Sleeman, *J. Chromatogr.*, 150 (1978) 225.
- 3 J. M. Huen, R. W. Frei, W. Santi et J. P. Thevenin, *J. Chromatogr.*, 149 (1978) 359.
- 4 L. J. Pennington et W. F. Schmidt, *J. Pharm. Sci.*, 71 (8) (1982) 951.
- 5 U. Lund et S. H. Hansen, *J. Chromatogr.*, 161 (1978) 371.
- 6 R. Verpoorte et A. Baerheim Svendsen, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 203.
- 7 *Pharmacopée Française*, éditée sous la direction de la commission permanente du Codex par l'ordre national des Pharmaciens, VIIe édition 1949, 1227 pages; VIII édition 1965, 1898 pages.
- 8 *Homéopathie: Pharmacotechnie et Monographies des Médicaments Courants*, publiée sous l'égide du Syndicat des Pharmacies et Laboratoires Homéopathiques, 2 tomes (1979-1980).