

Note

Séparation et dosage des différents constituants de la troxérutine par chromatographie liquide haute performance en phase inverse

Application au contrôle pharmaceutique

M. D. LE HOANG, E. POSTAIRE*, P. PROGNON et D. PRADEAU

Laboratoires de Contrôle de Qualité, Pharmacie Centrale des Hopitaux de Paris, 7 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris (France)

et

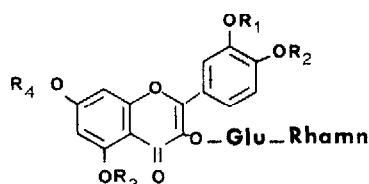
A. BLONDIN et J. SAUZIÈRE

Laboratoires NEGMA, 584 rue de Fourny, 78530 Buc (France)

(Reçu le 24 juin 1985)

La troxérutine est un dérivé des flavonoïdes destinée à réduire la fragilité et la perméabilité capillaire. Elle a été utilisée dans le traitement des hémorroïdes¹ et des désordres veineux des membres inférieurs². On note également quelques utilisations dans le cas de rétinopathies chez les diabétiques³ et de syndrome de Raynaud⁴.

La troxérutine commerciale n'est pas un composé chimiquement pur, il s'agit d'un mélange contenant 3 molécules: le trihydroxyéthylrutoside (tri-HER), composé majoritaire; le dihydroxyéthylrutoside (di-HER); le tétrahydroxyéthylrutoside (tétra-HER). Les structures chimiques sont reportées sur la Fig. 1.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
rutoside	H	H	H	H
di-HER	H	CH ₂ CH ₂ OH	H	CH ₂ CH ₂ OH
tri-HER	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	H	CH ₂ CH ₂ OH
tétra-HER	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH

Fig. 1. Structure chimique des différents composés de la troxérutine.

En fait le dérivé le plus actif, le trihydroxyéthylrutoside est obtenu par action de la chlorhydrine du glycol sur la rutine, ce qui a pour conséquence l'obtention d'un dérivé hydrosoluble par l'introduction de groupements hydroxyéthyles⁵.

Le contrôle de la réaction étant délicat, on aboutit toujours à un mélange de trois dérivés substitués (di-, tri- et tétra-HER) contenant en majorité le dérivé tri-substitué.

Les polarités très proches de ces dérivés rendent impossible la purification totale du dérivé tri-HER.

C'est pourquoi, nous proposons ici une méthode de dosage de la troxérutine dans les matières premières destinées à la fabrication de différentes formes pharmaceutiques par chromatographie liquide avec appariement d'ions.

En effet, si la littérature est riche en travaux concernant la séparation par chromatographie liquide des flavonoides d'origine végétale⁶⁻⁸, peu d'auteurs se sont intéressés à l'analyse des flavonoides glycosylés⁹⁻¹², en particulier la rutine^{14,15}, et encore moins de travaux concernent les dérivés hydroxyéthyl rutosides¹⁶⁻²⁰.

Courbat *et al.*^{5,17} ont étudié leur séparation par chromatographie sur papier et leur identification par spectroscopie dans l'ultra-violet; Tan *et al.*¹⁸ ont proposé une méthode de dosage spectrofluorimétrique du dérivé tri-HER dans l'urine. Ainsi, à notre connaissance, aucune technique simple de chromatographie liquide haute performance n'avait été appliquée à la séparation des trois dérivés hydroxyéthyles du rutoside.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Appareillage

Le chromatographe Hewlett-Packard 1090 équipé d'un détecteur spectrophotométrique à réseau de diodes, réglé à 254 nm, longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de ces composés, et d'un injecteur à boucle (5 μ l) Rhéodyne 7010.

Les chromatogrammes sont enregistrés par un intégrateur Hewlett-Packard 3390 A.

Le spectromètre de masse est un Nermag 10 C, la température de la source est de 150°C.

Colonnes

Les colonnes suivantes ont été utilisées: colonne μ Bondapak C₁₈ 10 μ m (Waters Assoc.) 300 \times 4.1 mm; colonnes μ Porasil Si 10 μ m (Waters Assoc.) 300 \times 4.1 mm; colonne Hamilton PRP-1 10 μ m (Touzart et Matignon) 150 \times 4.1 mm.

La phase stationnaire est une résine à base de copolymère styrène-divinylbenzène de grande stabilité chimique permettant l'utilisation des solvants organiques courants ainsi que des éluants particulièrement acides (pH = 1) ou basiques (pH = 13).

Réactifs

Méthanol, éthanol pour analyse (Carlo Erba); acide acétique pour analyse (UCB); acide orthophosphorique R. P. Normapur (Prolabo); acétonitrile pour chromatographie (Merck); hydroxyde de tétrabutylammonium 40% (Sigma); dérivés di-, tri- et tétrahydroxyéthyles des rutosides (Laboratoire Negma).

Phase mobile: les solvants pour élution utilisés sont filtrés sur filtre millipore 0.45 μm et dégazés par l'hélium.

RÉSULTATS

Identification des composés par spectrométrie de masse

Avant toute étude chromatographique et afin de s'assurer de façon certaine de l'identité des trois composés chimiquement très proches: di-, tri- et tétra-hydroxyéthylrutoside. Une étude par spectrométrie de masse de la troxérutine et des di- et tétra-HER a été réalisée. La technique employée est une méthode de désorption-ionisation chimique (DCI-MS) classique pour les composés de ce type et permettant l'introduction directe de l'échantillon¹⁹. Les substances ont été étudiées en ionisation négative (NH_3/I) permettant ainsi une très faible fragmentation et une détermination facile des structures. Le couplage avec la chromatographie en phase gazeuse est ici exclu en raison de la très faible volatilité des composés, et de leur polarité. Enfin, la silylation des fonctions phénoliques aboutit à des composés de masse moléculaire trop élevée pour permettre une chromatographie en phase gazeuse.

Spectre de masse de la troxérutine (brute). La Fig. 2 reporte le spectre de masse de la troxérutine obtenu par la technique DCI/ NH_3 I.

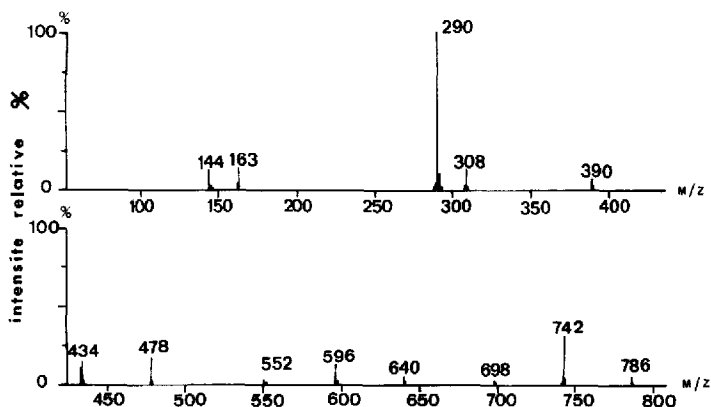


Fig. 2. Spectre de masse de la troxérutine (DCI/ NH_3 I).

La troxérutine correspondant à un mélange de di-, tri- et tétra-HER, on retrouve dans le spectre les ions parents correspondants à ces trois molécules en mélange ($m/z = 786$, $m/z = 742$ et $m/z = 698$). Chaque ion parent va perdre successivement un radical neutre rhamnosyl ($m/z = 146$) puis glucosyl ($m/z = 162$) pour donner apparition à des ions fragments tétra-, tri- et dihydroxyéthylglucosylquercétine.

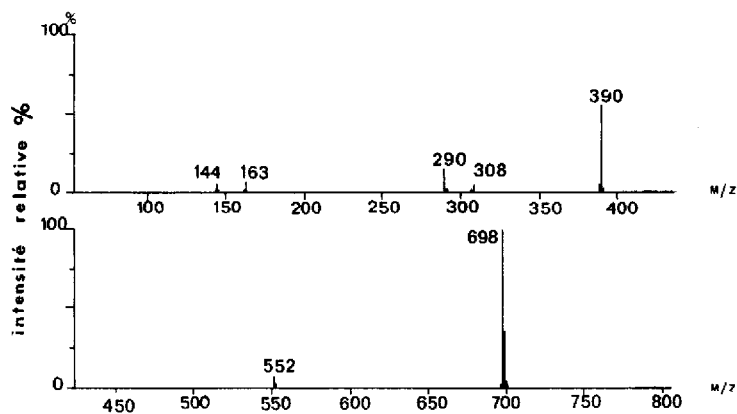
Le Tableau I rassemble les fragments spécifiques de chaque composé, le Tableau II comprend tous les fragments communs à ces trois molécules.

Spectre de masse des di- et tétra-hydroxyéthylrutine. Les Figs. 3 et 4 reportent les spectres de masse des dérivés di- et tétra-HER obtenus purs, les principaux ions fragments retrouvés confirment la fragmentation de la troxérutine vue précédemment.

TABLEAU I

MASSES DES MOLÉCULES OU FRAGMENTS SPÉCIFIQUES DES DI-, TRI- ET TÉTRA-HER

	<i>m/z</i>		
	<i>Tétra</i>	<i>Tri</i>	<i>Di</i>
Hydroxyéthylrutine	786	742	698
Hydroxyéthylglucosyl- quercétine	640	596	552
Hydroxyéthylquercétine	478	439	390

Fig. 3. Spectre de masse de la di-HER (DCI/NH₃ I).

En raison de la faible intensité des différents fragments spécifiques correspondants aux dérivés di- et tétra-HER, l'analyse directe de la troxérutine par spectrométrie de masse ne donne pas une précision acceptable, c'est pourquoi une analyse par chromatographie liquide a été envisagée.

Séparation par chromatographie liquide

La Fig. 5 montre une séparation satisfaisante sur colonne PRP1 des 3 dérivés tétra-, tri- et di-HER dont les temps de rétention sont respectivement 3,5, 5,4 et 6,7 min.

TABLEAU II

MASSE DES FRAGMENTS COMMUNS AUX TROIS MOLÉCULES

	<i>m/z</i>
Rutnose	308
Rutnose-H ₂ O	290
Glucosyl	162
Rhamnosyl	146

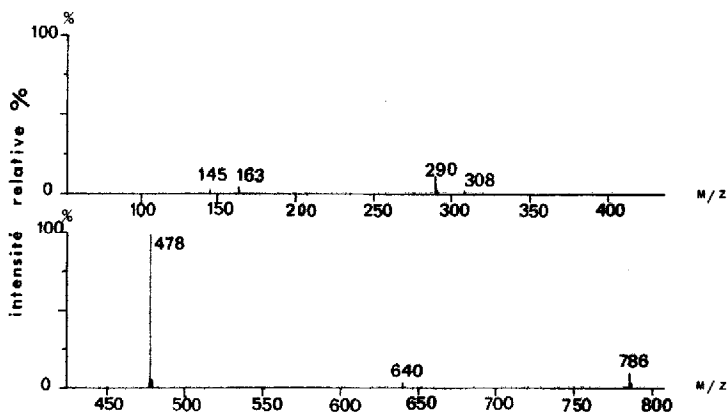


Fig. 4. Spectre de masse de la tétra-HER (DCI/NH₃ I) di-HER (3).

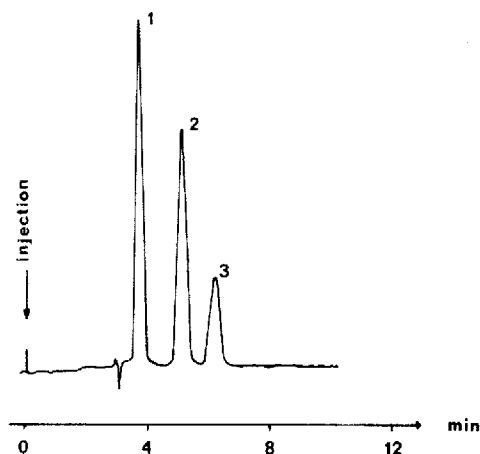


Fig. 5. Séparation des dérivés tétra- (1), tri- (2) et di-HER (3).

Conditions: colonne PRP 1: 150 × 4,1 mm (10 μ m); phase mobile: acétonitrile-solution aqueuse d'hydroxyde de tétrabutylammonium 0,005 M (1:4) (pH ajusté à 9 par une solution à 20% de H₃PO₄); débit: 1 ml/min; détection à 254 nm.

Le but de l'étude est la détermination simultanée de tétra-, di- et tri-HER. La teneur en dérivé di-, tri- et tétra-HER est calculée par étalonnage avec une gamme constituée par des quantités croissantes-dérives di-, tri- et tétra-HER. Les caractéristiques de la méthode ont été étudiées pour les trois dérivés.

Les limites de sensibilité de la tétra- et de la di-HER sont respectivement de 12 et 14 ng (pour un volume injecté de 5 μ l) ce qui correspond à 2,4 μ g/ml (0,003 μ M/ml) et 2,8 μ g/ml (0,004 μ M/ml). En raison de la forte proportion de tri-HER (environ 90%) il n'est pas nécessaire de déterminer de limite de sensibilité.

Les limites de détection suivantes (exprimées en pourcentage par rapport à l'aire du pic de la tri-HER) ont été trouvées: tétra-HER: 2%, di-HER: 3%.

La linéarité de la méthode est satisfaisante. Le coefficient de corrélation est de 0,998 pour des concentrations de 0–30 μg de tétra-HER par ml, celui de la di-HER est de 0,999 pour des concentrations de 0–36 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La linéarité de la méthode pour la tri-HER a été étudiée de 0–3 mg/ml, le coefficient de corrélation est de 0,998.

La répétabilité de la méthode déterminée à partir de 10 injections du même échantillon donne des coefficients de variation de 5% pour la tétra-HER, 2,5% pour la tri-HER et 9% pour la di-HER.

DISCUSSION

La polarité de ces trois molécules ne diffère que par la présence d'un groupe ment hydroxyéthyle en plus ou en moins par rapport à la tri-HER. Nous nous sommes donc orientés vers une chromatographie d'adsorption sur une phase stationnaire de silice. Le caractère particulièrement polaire de ces composés laissait présager une meilleure séparation sur silice non greffée.

Essai de séparation sur silice non greffée

Après optimisation des différents paramètres chromatographiques, nous n'avons pu obtenir que des résultats très médiocres qui figurent dans le Tableau III.

TABLEAU III

RÉSULTATS DE LA CHROMATOGRAPHIE DE TROXÉRUTINE SUR SILICE AVEC COMME PHASE MOBILE UN MÉLANGE ISOCRATIQUE: ÉTHANOL-HEPTANE-CHLOROFORME-ACIDE ACÉTIQUE (55:40:5:0,4)

	<i>Temps de rétention (min)</i>	<i>Résolution (R_s)</i>	<i>Facteur de capacité (k')</i>
Tétra-HER	6,82		1,91
Tri-HER	5,09	0,9	1,14
di-HER	3,67	0,7	0,57

Ne pouvant réaliser une séparation satisfaisante sur ce type de phase stationnaire, nous nous sommes orientés vers une silice greffée en C_{18} .

Essais de séparation sur silice greffée en C_{18}

La séparation du dérivé tétra-HER des deux autres composés ne posant pas de problème, les essais de séparation des dérivés tri- et di-HER ont essentiellement retenu notre attention. La paramètre chromatographique que nous avons suivi est donc le facteur de résolution de ces deux molécules (R_s), dont l'étude figure dans le Tableau IV.

Nous n'avons pas pu retenir cette phase stationnaire en raison de la mauvaise résolution entre la di- et la tri-HER.

Essais de séparation sur copolymère styrène-divinylbenzène (PRP-1)

Ce type de phase stationnaire a la particularité essentielle de permettre l'emploi de phases mobiles de pH compris entre 1 et 13.

TABLEAU IV
ÉTUDE DE LA RÉOLUTION DI- ET TRI-HER SUR SILICE GREFFÉE EN C₁₈

	Phase mobile (1 ml/min)		
	A	B	C
Méthanol	30	30	33
Eau	70	70	67
Contre-ion	—	—	Perchlorate de tétrabutylammonium (0,005 M)
pH apparent	6,5	3,1 (HCl)	7,46 (NH ₄ OH)
di-HER t_R (min)	5,56	6,23	14,15
R_s	0,78	0,27	0,17
tri-HER t_R (min)	6,86	6,94	14,48

Les résultats obtenus ont été optimisés en réalisant une paire d'ions avec l'hydroxyde de tétrabutyl ammonium à pH 9, comme cela apparaît dans le Tableau V.

L'acétonitrile en raison de son caractère plus éluant que le méthanol a donc été retenu, puisqu'il permet une nette amélioration des facteurs de capacité et de la résolution. Le choix de l'hydroxyde de tétrabutylammonium à pH 9 a été guidé par le caractère acide faible de ces molécules lié à la présence des groupements hydroxyles phénoliques ionisés à pH alcalin et donc susceptibles de former une paire d'ions avec un sel d'ammonium quaternaire. Bien que les colonnes PRP1 supportent un pH de 13 et que le pK théorique des phénols soit voisin de 9, cette valeur de pH de phase mobile a été choisie pour ne pas détériorer la cellule de détection du spectrophotomètre. C'est donc la phase mobile D qui a été retenue.

TABLEAU V
OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE SUR COPOLYMÈRE STYRÈNE-DIVINYLBENZÈNE

	Phase mobile			
	A	B	C	D
Méthanol (%)	55	50	—	—
Acétonitrile (%)	—	—	15	20
Eau (%)	45	50	85	80
Contre-ion	—	hydroxyde de: tétrabutylammonium (0,005 M)	—	Hydroxyde de tétrabutylammonium (0,005 M)
pH apparent	6,5	9 (H ₃ PO ₄)	6,5	9 (H ₃ PO ₄)
tétra-HER t_R (min)	2,60	7,62	7,84	3,52
k'	0,63	0,41	2,61	0,51
tétra-, tri- R_s	2,4	1,85	4,52	3,15
tri-HER t_R (min)	4,20	11,63	16,12	5,36
k'	1,64	1,15	6,42	1,30
di-, tri- R_s	0,38	0,83	0,84	2,15
di-HER t_R (min)	4,55	12,94	17,93	6,96
k'	4,86	1,39	7,26	1,99

APPLICATION

A titre d'exemple nous indiquons dans le Tableau VI quelques teneurs en dérivés di-, tri- et tétrahydroxyéthyles dans différents lots de matière première.

TABLEAU VI
TENEURS EN DÉRIVÉS DI-, TRI- ET TÉTRA-HER DANS 2 MATIÈRES PREMIÈRES

	<i>di-HER</i> (%)	<i>tri-HER</i> (%)	<i>tetra-HER</i> (%)
Matière No. 1	5,1	92,3	2,6
Matière No. 2	7,8	89,9	2,3

CONCLUSION

L'identification et le dosage des trois principaux constituants de la troxérutine par chromatographie liquide haute performance en phase inverse permet le contrôle de qualité de ce principe actif entrant dans la formulation d'un grand nombre de médicaments utilisés dans le traitement de maladies du tissu conjonctif vasculaire. Le composé trihydroxyéthylrutine étant le composé le plus actif, il apparait important d'en déterminer la teneur réelle.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. S. Sinnatamby, *Clin. Trials J.*, 10 (1973) 45.
- 2 S. Allen, *Practitioner*, 205 (1970) 221.
- 3 M. Tschopp, *Diabetologia*, 102 (1970) 475.
- 4 A. H. Sorensen et H. Hansen, *Brit. Med. J.*, 3 (1969) 352.
- 5 P. Courbat, J. Faure, R. Guerne et G. Uhlmann, *Helv. Chim. Acta*, 49 (1966) 1203.
- 6 W. Acourt, *J. Chromatogr.*, 130 (1977) 287.
- 7 D. Strack et J. Krause, *J. Chromatogr.*, 156 (1978) 359.
- 8 J. M. Hardin et C. A. Stutte, *Anal. Biochem.*, 102 (1980) 171.
- 9 R. Galensa et K. Herrmann, *J. Chromatogr.*, 189 (1980) 217.
- 10 J. P. Bianchini et E. M. Gaydou, *J. Chromatogr.*, 190 (1980) 233.
- 11 K. Van de Castele, H. Geiger et C. F. van Sumere, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 81.
- 12 R. V. Tamma, G. C. Miller et R. Everett, *J. Chromatogr.*, 322 (1985) 236.
- 13 H. Becker, G. Wilking et K. Hostettmann, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 174.
- 14 L. W. Wulf et C. W. Nagel, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 271.
- 15 D. Daigle et E. J. Conkerton, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 202.
- 16 P. Dittrich, J. Ostrowski, E. Beubler, E. Schraven et N. Kukovetz, *Arzneim. Forsch.*, 35 (1985) 765.
- 17 P. Courbat, G. Uhlmann et R. Guerne, *Helv. Chim. Acta*, 49 (1966) 1420.
- 18 H. Tan, P. J. Mowery, W. A. Ritschel et C. Nel, *J. Pharm. Sci.*, 67 (1978) 1142.
- 19 W. Kuhn et H. Rembold, *Biomed. Mass Spectrom.*, 7 (1980) 269.
- 20 W. Kuhn, K. Zech, R. Lupp, G. Jung, W. Voelter et F. Matzkies, *J. Chromatogr.*, 272 (1983) 333.