

CHROM. 12,641

Note

Analyse des alcaloïdes du quinquina par chromatographie liquide haute performance

MICHEL BAUER

Société Chimique Pointet-Girard (Pharmuka), 101 Avenue de Verdun, 92390 Villeneuve-la-Garenne (France)

et

GERMAIN UNTZ

Centre de Recherche de Lyon, Produits Chimiques Ugine-Kuhlmann, 1 Rue Henri Moissan, BP No. 2, 69310 Pierre-Bénite (France)

(Reçu le 27 décembre 1979)

Les alcaloïdes extraits des écorces de quinquina continuent à être très utilisés comme médicaments, additifs de boissons gazeuses ou comme produits chiraux utilisables dans le dédoublement de racémiques. La chromatographie sous ses principales formes a été utilisée pour leurs analyses: la chromatographie en couche mince¹⁻³, la chromatographie en phase gazeuse⁴, la chromatographie liquide haute performance (CLHP)⁵⁻¹². Dans cette note nous présentons une méthode par CLHP en élution isocratique sur microparticules de silice que nous utilisons pour le suivi de l'extraction de la quinine et de la synthèse de la quinidine ainsi que pour le dosage des impuretés alcaloïdiques présents dans les sels commerciaux de quinine et de quinidine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillage

La méthode a été étudiée sur un appareillage comprenant: une pompe à débit constant Altex 380 (Touzart Matignon), une vanne Rhéodyne 70-10 (Touzart Matignon) munie d'une boucle d'injection de 20 µl, un détecteur à longueur d'onde variable LC 3 Pye Unicam, un enregistreur PM 281 Philips, un intégrateur DP 101 Pye Unicam. La colonne est en acier inoxydable, longueur 150 mm, diamètre interne 4.6 mm. Elle est remplie de LiChrosorb Si 60 5 µm (Merck) suivant la méthode décrite par Coq *et al.*¹³, mais en utilisant une pompe Haskel MCP 110 (Général Pneumatic-Tourcoing). La colonne est tassée avec 300 ml de chloroforme à 400 bars, puis conditionnée avec 500 ml de phase éluante décrite ci-dessous.

Réactifs et alcaloïdes témoins

Tous les réactifs utilisés sont de qualité purs pour analyse. La phase éluante a la composition suivante: chloroforme 940 ml, isopropanol 57 ml, diéthylamine 1 ml, eau 2.65 ml (voir le chapitre discussion pour la méthode d'ajustement de la teneur

en eau de la phase éluante). Tous les alcaloïdes témoins quinine, hydroquinine, quinidine, hydroquinidine, cinchonidine, cinchonine, quinidinone sont sous forme de bases, sauf l'épiquinine et l'épiquinidine qui sont sous forme de bichlorhydrate. Ces produits ont été fournis par la Société Chimique Pointet-Girard ainsi que le gluconate de quinidine. Pour la structure chimique de ces produits on pourra consulter les publications citées en Bibl. 14 et 15.

Mode opératoire

Dans le cas de la Fig. 1, l'ensemble des témoins ont été mis en solution dans la phase éluante à une concentration de 0.2 mg/ml sauf pour la quinidinone qui est à une concentration de 0.1 mg/ml.

Dans le cas de la Fig. 3, le gluconate de quinidine a été préalablement extrait en milieu alcalin par le chloroforme et injecté sous forme d'une solution chloroformique équivalente à 5 mg/ml de quinidine base. Dans tous les cas le débit est de 1.2 ml/min. La longueur d'onde de mesure est 312 nm dans le cas des Figs. 1, 3 et 5 et 295 nm dans le cas de la Fig. 6.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La Fig. 1 montre le chromatogramme obtenu à partir de l'injection d'une

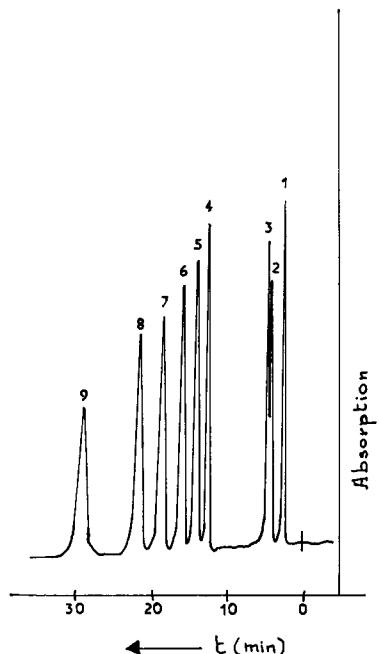


Fig. 1. Chromatogramme des principaux alcaloïdes du quinquina: 1 = quinidinone; 2 = épiquinidine; 3 = épiquinine; 4 = quinidine; 5 = cinchonine; 6 = cinchonidine; 7 = quinine; 8 = hydroquinidine; 9 = hydroquinine. Longueur d'onde de mesure 312 nm. DéTECTEUR calibré sur 0.16 de D.O. pleine échelle. Pour les autres conditions, voir le texte.

solution des principaux alcaloïdes du quinquina. Dans l'ensemble la résolution est satisfaisante sauf pour le groupe épiquinine-épiquinidine. Mais pratiquement pour l'activité de notre laboratoire c'est la somme des deux qui nous intéresse aussi n'avons-nous pas cherché à améliorer la séparation. D'autre part, lors de la mise au point de cette analyse, nous avons constaté que l'utilisation d'une phase éluante contenant une teneur en eau non négligeable permettait d'obtenir une séparation efficace avec des pics exempts de trainée. De tels systèmes d'élutions, décrits par différents auteurs¹⁵⁻¹⁸ permettent de désactiver les sites actifs de la silice. Expérimentalement, nous avons trouvé qu'une teneur en eau de 2.65 ml par litre de phase éluante (correspondant à environ 75 % de la teneur en eau à saturation du solvant d'élution utilisé) fournissait la séparation optimum vis-à-vis du couple résolution-temps d'analyse. Pratiquement pour ajuster cette teneur, nous déterminons le pourcentage d'eau (par la méthode de Karl Fischer) du mélange chloroforme-isopropanol-diéthylamine et ajoutons ensuite de l'eau q.s.p. 2.65 ml par litre de solvant. Pour illustrer l'importance de la maîtrise de cette teneur en eau vis-à-vis de la reproductibilité des temps de rétention, nous avons rassemblé dans le Tableau I six temps de rétention mesurés pour la quinidine à partir de déterminations s'étalant sur quatre semaines, ainsi que la valeur moyenne de ce temps de rétention et l'écart type de la distribution.

TABLEAU I

TEMPS DE RÉTENTION T_R EN SECONDES DE SIX ESSAIS D'ÉLUTION DE QUINIDINE S'ÉTALANT SUR UN MOIS

<i>Temps de rétention (sec)</i>						
<i>Essais</i>						
1	2	3	4	5	6	
731	715	649	619	768	760	
T_R moyen	707 sec					
Écart type	60 sec					

On voit que si les précautions exposées ci-dessus sont respectées l'écart type de la distribution est inférieur à 10 % du temps de rétention moyen. Deux autres remarques sont à faire compléter ce paragraphe :

(a) Dans le cas où le produit étudié contient de la quinidinone, il est souhaitable d'effectuer la mise en solution dans la phase éluante afin d'éviter une perturbation de solvant qui est dommageable pour la quantification de la quinidinone.

(b) La longueur d'onde de mesure choisie est $\lambda = 312$ nm. L'examen de la Fig. 2 montre qu'alors que la quinidine (ainsi que l'hydroquinine, la quinine, l'hydroquinidine, l'épiquinine, l'épiquinidine) a approximativement le même $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ que la cinchonine (ainsi que la cinchonidine).

Ceci introduit une simplification importante lorsque, dans le cas fréquent où ces alcaloïdes sont seuls présents, on veut connaître rapidement la composition d'un produit en ses différents composants.

La Fig. 3 montre un exemple d'application de la méthode au dosage de l'hydroquinidine contenue dans le gluconate de quinidine commercial. Nous opérons par standardisation externe. La Fig. 4 représente la courbe d'étalonnage de l'hydroquinidi-

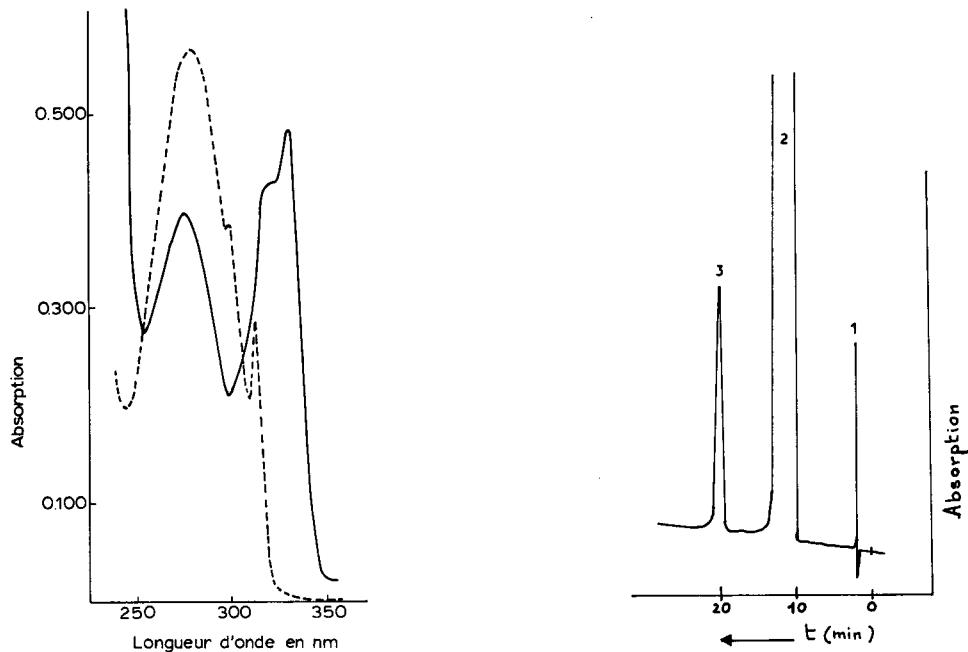


Fig. 2. Spectre d'absorption UV d'une solution de quinidine (—) et de cinchonine (---) dans la phase éluante à la concentration de 3 mg pour 100 ml. (Spectrophotomètre Beckmann Modèle 24.)

Fig. 3. Chromatogramme obtenu à partir d'un gluconate de quinidine extrait sous forme de base en milieu chloroformique: 1 = perturbation due au chloroforme; 2 = quinidine; 3 = hydroquinidine. Longueur d'onde de mesure 312 nm. Détecteur calibré sur 0.16 de D.O. pleine échelle. Pour les autres conditions, voir le texte. Dans cet exemple, la teneur trouvée en hydroquinidine est de 4.4% (P/P) rapportée aux alcaloïdes totaux.

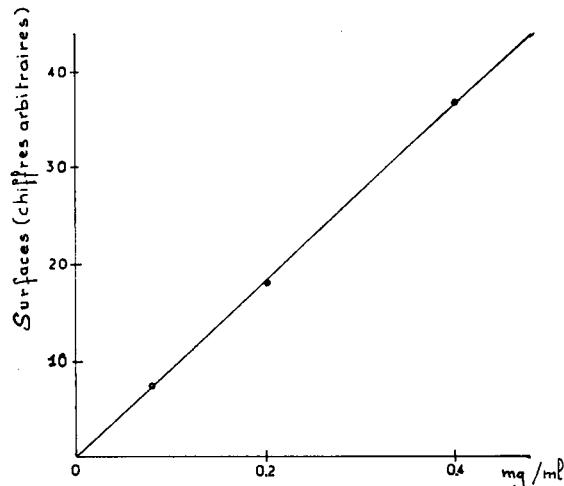


Fig. 4. Courbe d'étalonnage de l'hydroquinidine en solution chloroformique à la longueur d'onde de 312 nm obtenue dans les conditions expérimentales précisées dans le texte.

dine à 312 nm explorée entre 0 et 0.4 mg/ml. Pour illustrer rapidement la sensibilité de la méthode, nous avons chromatographié le même gluconate de quinidine dans lequel nous avons rajouté 0.2% (P/P) de quinine et de cinchonine (Fig. 5). On peut améliorer la sensibilité de la mesure de la cinchonine en se plaçant par exemple à $\lambda = 295$ nm (Fig. 6).

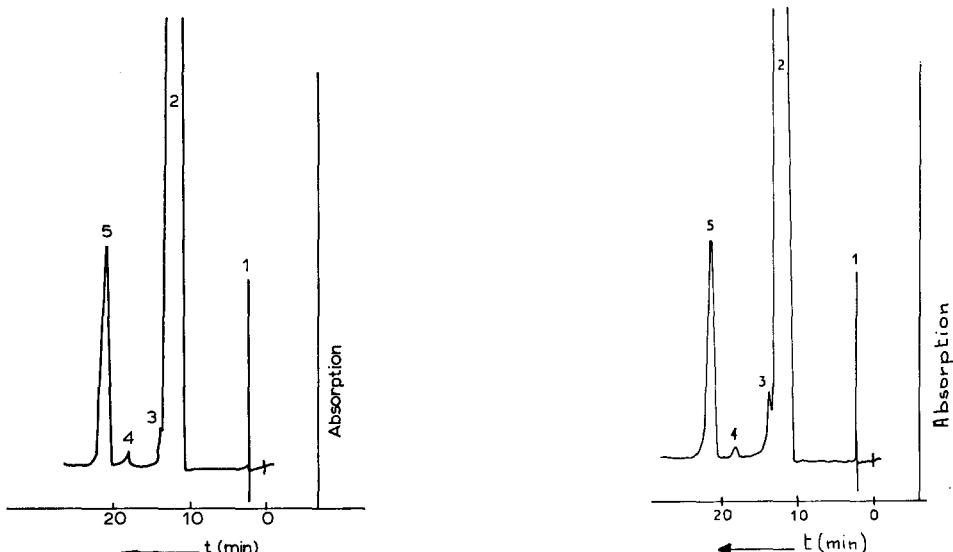


Fig. 5. Chromatogramme obtenu à partir de la même solution chloroformique que celle de la Fig. 3, dans laquelle nous avons rajouté 0.2% de quinine et 0.2% de cinchonine: 1 = perturbation dûe au chloroforme; 2 = quinidine; 3 = cinchonine; 4 = quinine; 5 = hydroquinidine. Longueur d'onde de mesure 312 nm. Autres conditions identiques à celles de la Fig. 3.

Fig. 6. Chromatogramme de la même solution représentée Fig. 5. La longueur d'onde de mesure est 295 nm.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de Mme. Merlevede (Sté Pointet-Girard) et Mr. Forgeart (CRL-PCUK Pierre-Benite). Nous tenons à remercier très sincèrement Mme Caumes-Gourcy, Directeur du Département Contrôle de Qualité de Pointet-Girard, pour l'intérêt et le soutien qu'elle a apportés à ces travaux.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. Storck, J. P. Papin et D. Plas, *Ann. Pharm. Franc.*, 28 (1970) 25.
- 2 V. Massa, P. Susplugas et R. Taillade, *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 34 (1974) 307.
- 3 B. Wesley-Hadzija et A. M. Mattocks, *J. Chromatogr.*, 144 (1977) 223.
- 4 M. A. Moulin et H. Kinsun, *Clin. Chim. Acta*, 75 (1977) 491.
- 5 N. J. Pound et R. W. Sears, *Can. J. Pharm. Sci.*, 10 (1975) 122.
- 6 G. Achari et E. E. Theimer, *J. Chromatogr. Sci.*, 15 (1977) 320.
- 7 S. Sved, I. J. McGilveray et N. Beaudoin, *J. Chromatogr.*, 145 (1978) 437.

- 8 T. W. Guentert, P. E. Coates, R. A. Upton, D. L. Combs et S. Riegelman, *J. Chromatogr.*, 162 (1979) 59.
- 9 M. A. Peat et T. A. Jennison, *Clin. Chem.*, 14 (1978) 2166.
- 10 B. J. Kline, V. A. Turner et W. H. Barr, *Anal. Chem.*, 51 (1979) 449.
- 11 N. Weidner, J. Ladenson, L. Larson, G. Kessler et J. Mc Donald, *Clin. Chim. Acta*, 91 (1979) 7.
- 12 P. K. Narang et W. G. Crouthamel, *J. Pharm. Sci.*, 68 (1979) 917.
- 13 B. Coq, C. Gonnet et J.-L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.
- 14 *Merck Index*, Merck & Co. Inc., Rahway, N.J., 9 éd., 1976, pp. 295, 473, 634, 635, 1047, 1050.
- 15 J. Gutzwiler et M. R. Uskokovic, *Helv. Chim. Acta*, 56 (1973) 1494.
- 16 Z. El Rassi, C. Gonnet et J. L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 179.
- 17 J. H. M. van den Berg, J. Milley, N. Vonk et R. S. Deelder, *J. Chromatogr.*, 132 (1977) 421.
- 18 J. P. Thomas, M. Claude, A. Brun et J. P. Bouine, *Analusis*, 5 (1977) 207.