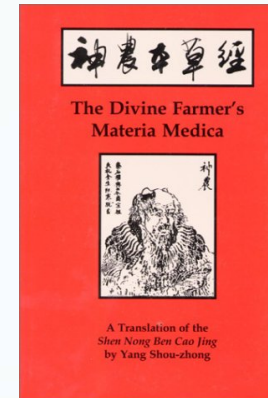


Quantification d'alcaloïdes des racines d'*Aconit* par une méthode de RP-HPLC modifiée.

Zhi-Hong Jiang, Ying Xie, Hua Zhou, Jing-Rong Wang,
Zhong-Qiu Liu, Yuen-Fan Wong, Xiong Cai, Hong-Xi Xu
and Liang Liu
Hong Kong, Chine

INTRODUCTION:

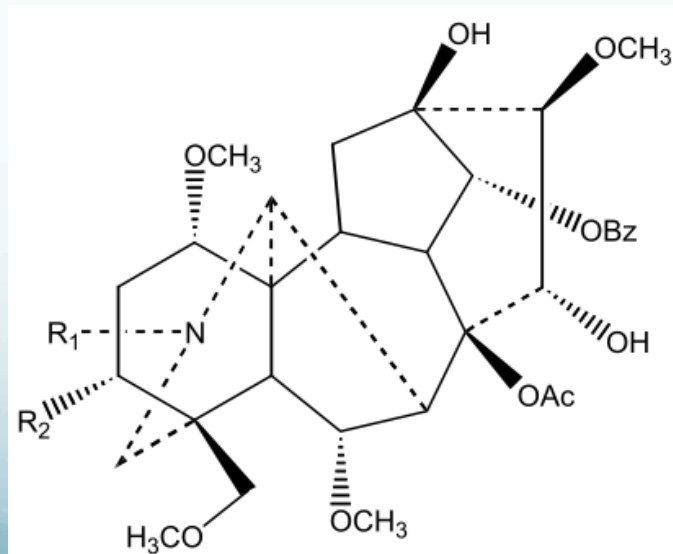
Aconit (*Aconitum*), Ranunculaceae



Racines utilisées en Chine depuis plus de 2000 ans (Shen Nong Ben Cao Jing, -100 avant JC)

Propriétés antirhumatismales, analgésiques et anti-inflammatoires.

MAIS... Forte toxicité causée par 3 alcaloïdes



Aconitine ($R_1 = C_2H_5$;
 $R_2 = OH$)

Mesaconitine ($R_1 = CH_3$;
 $R_2 = OH$)

Hypaconitine ($R_1 = CH_3$;
 $R_2 = H$)

- Extraction, Séparation et Quantification délicates
- Pas de protocole standard performant dans la pharmacopée chinoise
- HPLC: (Hikino et al, 1983; Kitagawa et al, 1984)
protocoles d'extraction et séparation lourds
Résultats peu précis et robustesse du protocole
- RP HPLC paire d'ions (Peng et al., 1995)
Beaucoup d'interférences et défauts de séparations
- Electrophorèse capillaire (Feng and Li, 2002)
Beaucoup d'interférences et limites de détection élevées
- SPE + RP HPLC (Ohta et al, 1997, Wang et al., 2004)
Bonne sensibilité et sélectivité
Détermination dans sang et urines



Nécessité d'une méthode précise, rapide, reproductible pour l'analyse d'une grande quantité de racines.

MÉTHODE PROPOSÉE:

20 Souches → **poudre (0,5g)** → **Extraction**

1) Broyage
Tamisage (0,45mm)

3) 3,0mL d'éthanol 75%
30 min
T° ambiante X 3
assistées par ultrasons

4) Vortex 2 min
Centrifugation 3000rpm 5min
Récupération des surnageants
Évaporation du solvant sous flux d'air
jusqu'à ≈ 1 mL
Reprise dans 10mL d'éthanol 75%
Vortex
Filtration 0,45µm

Analyse

6) Detecteur à
barette de
diodes
240 nm

Détection

HPLC

5) injection de 50µL
colonne RP18

phase mobile gradient acétonitrile/tampon bicarbonate d'ammonium pH=9,8
Débit = 1mL/min, T° ambiante

EXTRACTION:

Solvant: **éthanol 75%** car meilleur rendement qu'à 50% et 95%

méthode classique: 0,4 mL d'ammoniaque pour 1g
extraction au diéthyl ether
reprise dans HCl

Durée extraction: **30 min** plutôt que 60 min

Nombre d'extraction: **3** successives plutôt que 5

Table 3. Comparison of the effect of different times of extraction and the number of repetitions on the extraction efficiency of three *Aconitum* alkaloids from a processed aconite sample (batch FZ040406-06)

Time of extraction (min)	Number of times extraction repeated	Amount of alkaloid extracted (µg/g) ^a		
		Aconitine (1)	Mesaconitine (2)	Hypaconitine (3)
30	3	6.19 ± 0.04	18.43 ± 0.01	91.01 ± 0.69
30	5	5.84 ± 0.15	18.80 ± 0.01	93.78 ± 0.37
60	3	6.01 ± 0.00	18.75 ± 0.20	95.65 ± 0.03

^a Mean ± SD (n = 2).

Préparation des standards et calibrage:

Solutions standards des 3 alcaloïdes

National institute for the control of pharmaceutical and biological products (Pekin, Chine)

Vérifiées par HPLC-MS

8 concentrations / alcaloïde  courbe d'étalonnage

Table 5. Regression equations and respective correlation coefficients for the quantitative determination of three *Aconitum* alkaloids using the developed HPLC method

Alkaloid	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	Regression equation ^a	Correlation coefficient (R^2)
Aconitine (1)	1.13–135.12	$y = 47.589x - 18.105$	0.9999
Mesaconitine (2)	1.21–145.56	$y = 49.472x - 5.623$	1.0000
Hypaconitine (3)	1.05–126.48	$y = 47.959x - 10.056$	0.9999

^a x denotes the concentration and y denotes the peak area for each alkaloid, respectively.

concentration calculée grâce à l'équation de la droite de régression

HPLC:

Système HPLC Agilent 1100 series

Pré-colonne Waters RP₁₈ Xterra™ (20 x 3,9mm i.d.)
(protège la colonne des composés indésirables)

Colonne Waters RP₁₈ Xterra™ (250 x 4,6mm i.d. taille particule 5µm)

Dépôt 50 µL à T° ambiante, détection à 240 nm.

Gradient d'élution: Acétonitrile/tampon bicarbonate d'ammonium pH=9,8+/-0,2

pH peut endommager la colonne

Table 2. The gradient elution program used in the developed HPLC method

Time (min)	Composition of mobile phase (%)	
	Ammonium bicarbonate buffer (pH 9.8 ± 0.2)	Acetonitrile
0	80	20
10	70	30
50	65	35
75	56	44
80	20	80

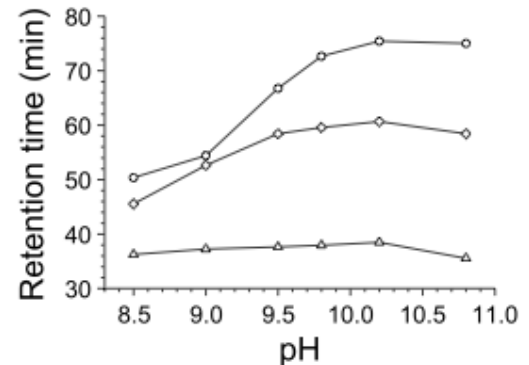


Figure 1. Influence of the pH value of the mobile phase on the retention times of *Aconitum* alkaloids: (—◇—) aconitine (1), (—△—) mesaconitine (2), and (—○—) hyaconitine (3), separated using the developed HPLC method. (For chromatographic protocol see the Experimental section.)

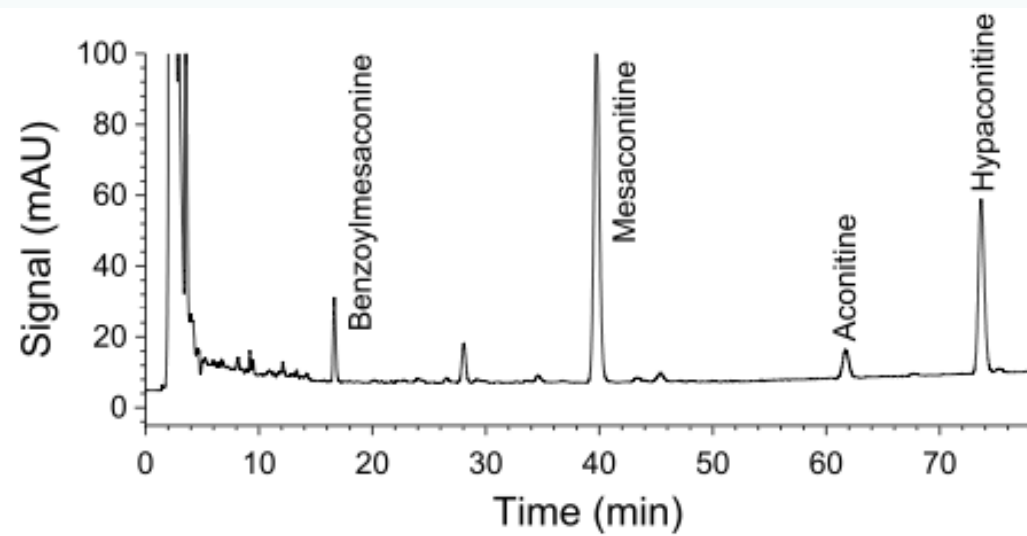
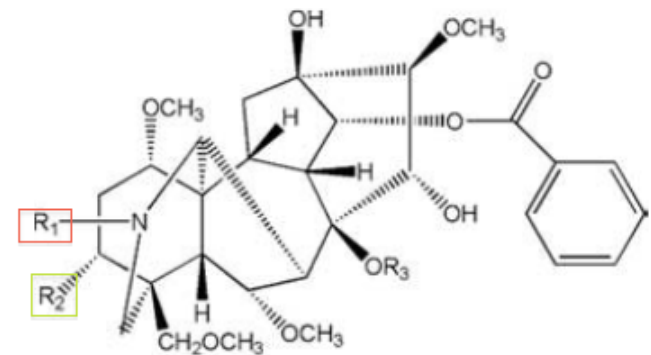


Figure 3. Typical HPLC chromatogram of an unprocessed aconite root (*Radix Aconiti Lateralis*) sample (batch SFZ040419-01) showing the relative contents of the *Aconitum* alkaloids. (For chromatographic protocol see the Experimental section.)

Tr dépendent de R₁ et R₂

Temps d'analyse trop long

Rs >> 1,5



Alkaloids	R ₁	R ₂	R ₃
Aconitine (1)	C ₂ H ₅	OH	COCH ₃
Mesaconitine (2)	CH ₃	OH	COCH ₃
Hypaconitine (3)	CH ₃	H	COCH ₃
Benzoylaconine (4)	C ₂ H ₅	OH	H
Benzoylmesaconine (5)	CH ₃	OH	H
Benzoylhypaconine (6)	CH ₃	H	H

Figure 1. Structures of diester-diterpene alkaloids and monoester-diterpene alkaloids in crude and processed aconite roots.

Validation de la méthode:

Fidélité intra: même échantillon analysé 5x/jour.

Fidélité inter: même échantillon analysé 1x/jour pendant 3 jours.

Répétabilité: 5 échantillons d'un même lot analysés en parallèle.

Rendement: ajouts dosés des 3 standards dans un échantillon de composition connu. Répétés 5x

$$R (\%) = \frac{(\text{quantité d'alcaloïdes mesurée} - \text{quantité d'alcaloïdes échantillon})}{\text{quantité ajoutée des standards}}$$

Validation de la méthode:

Table 6. Intra-day and inter-day precision of the developed HPLC method for the determination of the three *Aconitum* alkaloids

Parameter	Aconitine (1)		Mesaconitine (2)		Hypaconitine (3)	
	Peak area ^a	RSD (%)	Peak area ^a	RSD (%)	Peak area ^a	RSD (%)
Intra-day ^b	297.91 ± 1.47	0.49	400.60 ± 2.40	0.60	4173.67 ± 8.14	0.19
Inter-day ^c	298.06 ± 2.59	0.87	400.66 ± 2.84	0.71	4173.95 ± 38.46	0.92

^a Mean ± SD.

^b Sample analysed five times during one day. *n* = 5.

^c Sample analysed each day over three consecutive days. *n* = 3.

Table 7. Repeatability of the developed HPLC method for the determination of three *Aconitum* alkaloids in a processed aconite sample (batch FZ040406-10)

Alkaloid	Content (µg/g) ^a	RSD (%)
Aconitine (1)	9.80 ± 0.13	1.30
Mesaconitine (2)	13.16 ± 0.23	1.74
Hypaconitine (3)	186.95 ± 1.97	1.05

^a Mean ± SD. *n* = 5.

Table 8. Recoveries of three *Aconitum* alkaloids from a processed aconite sample (batch FZ040406-10) using the developed method

Alkaloid	Recovery (%) ^a	RSD (%)
Aconitine (1)	98.05 ± 1.03	1.05
Mesaconitine (2)	104.23 ± 2.38	2.28
Hypaconitine (3)	103.85 ± 0.27	0.26

^a Mean ± SD. *n* = 5.

Pas d'essais de la stabilité de la méthode (recommandée par EMEA = European Medicines Evaluation Agency pour substances d'origine naturelle).

Limites et améliorations de la méthodes:

Protocole d'extraction long

Validation de la méthode incomplète

Durée de la chromatographie > 80 min !!!

On pourrait jouer sur - la colonne de séparation

diminuer la granulométrie ($5\mu\text{m} \rightarrow 3,5\mu\text{m}$)

diminuer la longueur de la colonne ($250\text{mm} \rightarrow 150\text{mm}$)

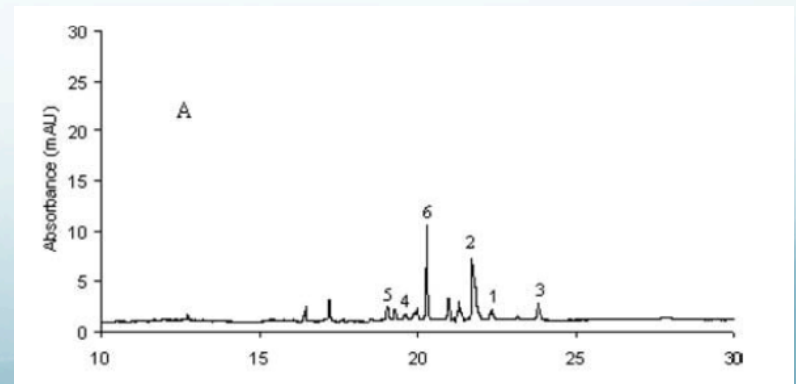
utiliser une colonne Nucleodur®

- le gradient d'élution

Alternatives:

Développement de
l'électrophorèse capillaire

Jing-Zheng Song, Quan-Bin Han et al. (2009)



Coût du protocole:

Matériel:

- Branson Model 5210 Ultrasonicator ≈ **200 €**
- Eppendorf Model 5810 centrifuge ≈ **5000 €**
- HPLC Agilent 1100 series ≈ **15000 €**
- Pré-colonne Waters RP₁₈ Xterra™ (20 x 3,9mm i.d.) ≈ **170 €**
- Colonne Waters RP₁₈ Xterra™ (250 x 4,6mm i.d. 5µm) ≈ **600 €**

Total → **21000 €**

Pour l'analyse de 20 lots:

- 20 extractions = 500mL ethanol ≈ **6 €** (*durée: 20x3x30min*)
- 20 filtres Millipore (0,45 µm) ≈ **20 €**
- 20 HPLC = 1L d'acétonitrile ≈ **37 €** (*durée: 20x80min*)
+ 1L tampon bicarbonate d'ammonium ≈ **22 €**
- Main d'oeuvre pour 57h (22,5 €/h) ≈ **12825 €** (en France)

Total → **12910 €**

C'est la durée d'extraction et de chromatographie qui coûte le plus chère!

MERCI DE VOTRE ATTENTION