

Développement et validation de méthodes d'analyses comparées CLHP et CCMHP : Application au dosage de l'artémisinine dans *Artemisia annua* cultivé au Bénin

Hippolyte GANSE¹, Hermine ZIME¹, Fernand GBAGUIDI¹, Mansourou MOUDACHIROU¹, Joëlle QUETIN-LECLERCQ², Taofiki³* AMINOU.

1-Laboratoire Nationale de Pharmacognosie /CBRST Porto-Novo (Bénin) 01BP 06
senakponganse@yahoo.fr, zimegani@yahoo.fr, ahokannou@yahoo.fr,
moudmans@yahoo.fr

2-Laboratoire de Pharmacognosie, Unité CHAM, Département de Pharmacie, Université Catholique de Louvain UCL 7230 Av. E. Mounier .72.1200Bruxelle, Belgique. joelle.leclercq@uclouvain.be.

3-Laboratoire d'Expertise et de Recherche en Chimie de l'Environnement et de l'Eau (LEERCE) Université d'Abomey Calavi 01BP 526 aminoutaofiki@yahoo.fr.

Abstract

Artemisia annua, species of the family of the asteraceae is a plant whose leaves contain a sesquiterpenic lactone called artemisinin which is effective against all the strains responsible of malaria. This study enabled us to develop and validate two chromatographic methods: High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with the aim to find out the correlation parameters to quantify the artemisinin in the powders of leaves of *Artemisia annua* cultivated in BENIN. The reliability of HPTLC method (fast, simple and less expensive method) possible to carry out the quantification artemisinin in routine. HPLC method which has been developed is validated for the quantities in artemisinin in the range of 200 to 1200 ng. The analyses have provided good accuracy, reproducibility, and selectivity for the quantitative determination of artemisinin. The Relative Standard Deviation (RSD) intra-day or repeatability and inter-days or intermediate precision are lower than 8.5% for all series of artemisinin quantified in by the two methods. The absolute recovery of the artemisinin by the method of soxhlet extraction is approximately 98%. A good correlation ($R^2= 0,976$) between the contents of artemisinin by HPLC and HPTLC was highlighted. The limits of detection and quantification were determined for both methods.

Key words: HPLC, HPTLC, artemisinin, *artemisia annua*.

Résumé

Artemisia annua, espèce de la famille des asteraceae est une plante dont les feuilles contiennent une lactone sesquiterpénique appelée artémisinine qui est efficace contre toutes les souches de parasites responsables du paludisme. Cette étude nous a permis de développer et de valider deux méthodes de Chromatographie : la méthode de Chromatographie sur Couche Mince à Haute Performance (CCMHP) et la méthode de Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) dans le but de trouver les paramètres de corrélation pour quantifier l'artémisinine dans les poudres de feuilles de *Artemisia annua* cultivé au BENIN. La fiabilité de la méthode CCMHP (méthode rapide, simple et moins coûteuse) a permis de réaliser la quantification en routine de l'artémisinine. La méthode de Chromatographie Liquide à Haute Performance développée, est validée pour les quantités en artémisinine de 200 à 1200 ng. Les analyses fournissent une bonne : exactitude, reproductibilité, et sélectivité pour l'analyse quantitative de l'artémisinine. Les coefficients des variations (CV) intra-jour ou répétabilité et inter-jours ou fidélité intermédiaire sont inférieurs à 8,5% pour toutes les séries de quantités en artémisinine par les deux méthodes. Les taux de récupération de l'artémisinine par la méthode d'extraction sont d'environ 98%. Une bonne corrélation ($R^2 \approx 0,976$) entre les teneurs en artémisinine par CLHP et par CCMHP, a été mise en évidence. Les limites de détection et de quantification ont été déterminées par les deux méthodes.

Mots Clés : CLHP, CCMHP, artémisinine, *artemisia annua*.

1. Introduction

La malaria est depuis longtemps connue comme un des soucis principaux de santé publique en Afrique Sub-saharienne. On estime que 300 à 500 millions de personnes sont atteintes tous les ans de la malaria. Les efforts déployés pour lutter contre le paludisme étant contrariés par l'apparition et la propagation de résistances à la plupart des molécules présentes sur le marché (la chloroquine, la quinine, le fansidar etc...), il en résulte une proportion importante de décès dans les pays en voie de Développement. Pendant longtemps, les programmes de gestion de la malaria dans les pays endémiques se sont fondés sur des traitements monothérapeutiques. Cependant, sur la base de l'évidence de l'efficacité, l'Organisation Mondiale de la Santé a recommandé l'application des thérapies de combinaisons contenant les dérivés de l'artémisinine. Elles sont à ce jour considérées comme les plus efficaces contre le paludisme [1].

L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique extraite des feuilles de la plante chinoise QINHAO (*Artemisia annua*). *Artemisia annua*, espèce de la famille des Asteraceae est employée dans la médecine chinoise depuis plus de 1500 ans. Ses feuilles, ses fleurs et ses petites tiges contiennent de l'artémisinine qui est le principe actif [2].

De nombreuses méthodes analytiques ont mis en évidence l'identification et la quantification de l'artémisinine. Nous pouvons citer : La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) [3]; la méthode de Chromatographie sur Couche Mince à Haute Performance Ultra-Violet (CCMHP-UV) [4,5] et la méthode de Chromatographie Liquide à Haute Performance Ultra-Violet (CLHP-UV) [6,7,8,9,10,11]. Notre objectif est de développer et de valider deux méthodes de dosage de l'artémisinine dans les poudres de feuilles d'*Artemisia annua*: une méthode de CCMHP-UV et une méthode de CLHP-UV inspirées des méthodes décrites dans les publications de Simonnet et al et de Zhao et Zeng (1985) [12] puis déterminer les coefficients de corrélation entre ces méthodes. Les critères de validation des procédures analytiques quantitatives de la Commission SFSTP [13] ont été utilisés.

2. Matériels et méthodes

2.1 Matériels

2.1.1 Matériel végétal

Les plantes d'*Artemisia annua* ont été cultivées dans la ferme de la Faculté des Sciences Agronomiques (FSA) de l'Université d'Abomey-Calavi. La plante a été d'abord séchée à la température ambiante dans une chambre à l'abri de la lumière et retournée tous les jours. La plante séchée a été ensuite soigneusement réduite en poudre par un broyeur et stockée à température ambiante.

2.1.2 Matériels analytiques

-Le système CLHP Merck Hitachi LaChrom Elite utilisant une colonne Lichrospher RP-18 (5µm) est composé des modules suivants : une pompe CLHP ; un autosampler ; un four pour colonne ; un détecteur à barrettes de diodes ; un ordinateur muni d'un clavier et d'un écran, utilisant pour l'acquisition des données, le logiciel LaChrom Elite.

-Le système CCMHP est composé d'un déposeur automatique, d'un Scanner 3 et d'un ordinateur utilisant le logiciel winCATS 1.2.6. Les chromatographies ont été réalisées sur plaques HPTLC (Silicagel 60F₂₅₄ 10cmx 20cm).

2.1.3 Solvants

Les solvants, en majorité fournis par Sigma Aldrich étaient de grade analytique pour les extractions, de grade CLHP pour les analyses CLHP et CCMHP.

2.2. Méthodes

2.2.1 Méthode de préparation d'extraits

Une méthode d'extraction a été utilisée (Extraction au soxhlet) : 5g de poudre sont utilisés dans 350mL d'éther de pétrole pendant 4 heures. Le filtrat obtenu est complété à 320mL puis divisé en deux et évaporé séparément. On passe au dosage après avoir dissout chaque résidu sec dans 100mL d'éthanol puis on passe au dosage après filtration avec des filtres de diamètre de pores 0,45µm.

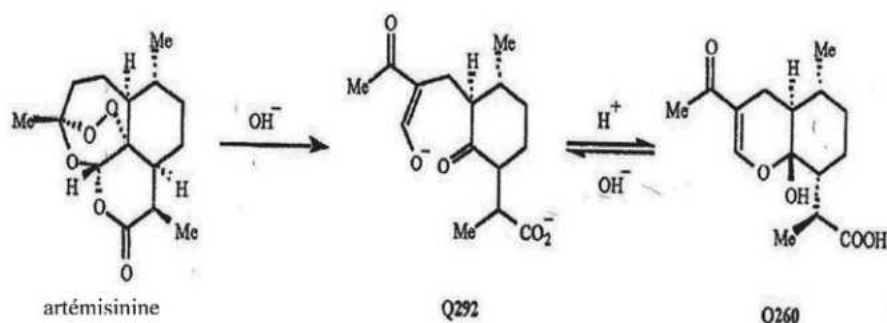
2.2.2 Méthode d'analyse de CCMHP

Une solution mère d'artémisinine à 1 mg/mL est préparée dans de l'éthanol et les volumes 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,2µL sont successivement déposés sur plaques HPTLC (phase stationnaire) pour obtenir des dépôts de 200, 400, 800 et 1200ng.

Les dépôts sont effectués en bandes de 6mm espacés de 8mm. Les premiers et derniers dépôts sont à 10cm de chaque bord. La plaque a été ensuite séchée 10min à l'air libre et développée sur 70cm dans une phase mobile préalablement saturée pendant 15min, composée du mélange 9,3mL toluène et 0,7mL d'acétate d'éthyle contenu dans une cuve de CCM à une température de 15°C. La plaque, révélée à l'anisaldéhyde sulfurique a été séchée à 100°C à l'étuve pendant 10min et lues par le Scanner 3 à 530nm ; les données sont acquises et traitées par le Logiciel WinCats 1.2.6.

2.2.3 Méthode d'analyse par CLHP

La molécule d'artémisinine a été prédérivée selon la méthode Zhao Zeng (1985). Son principe consiste à réaliser avant injection une transformation de l'artémisinine non détectable aux UV en un composé stable réagissant aux UV : on dit que l'artémisinine a subi une prédérivation.



Pour réaliser cette réaction, 1mL de solution (extrait éthanolique de poudre de feuilles de *Artemisia annua* ou solution éthanolique d'artémisinine pure) est prélevé auquel on ajoute 4mL de solution de soude à 0,2% ; le mélange obtenu est ensuite porté au bain marie à 50°C pendant 30min ; on laisse refroidir pendant 10min, ensuite on ajoute 1mL d'éthanol puis on complète jusqu'au trait de jauge d'une fiole de 10mL avec une solution d'acide acétique 0,2N.

-La phase mobile utilisée est constituée d'un tampon phosphate pH= 6,3 (solvant A) et de méthanol (solvant B) avec un débit de 1 mL/min et un temps d'analyse de 15 min.

- Pour établir la courbe de calibration, on prélève respectivement 0,1mL ; 0,2mL ; 0,4mL ; 0,6mL de solution mère de 1mg/mL (artémisinine pure dans de l'éthanol) soit des concentrations de standards de 10, 20, 40, et 60µg/mL. Le volume de solution

injecté étant de 20µL, la gamme de quantités en artémisinine est : 200, 400, 800 et 1200ng.

2.2.4. Procédure de validation et quantification

-Courbes de calibration : Le modèle de régression est établi en rapportant les quantités 200, 400, 800, 1200ng sur l'axe des abscisses et la surface du pic correspondant sur l'axe des ordonnées.

-Limite de détection et Limite de quantification

La limite de détection(LD) est la quantité donnant un pic de hauteur égale à trois fois le bruit de fond. La limite de quantification(LQ) est la quantité donnant un pic de hauteur égale à 10 fois le bruit de fond [14]. **LD=3s/a ; LQ=10s/a**

s=écart type de la réponse, a=pente de la courbe d'étalonnage.

-La répétabilité : La fidélité intra-jour et inter-jour a été déterminée pour les quatre quantités en artémisinine, trois fois de suite le même jour pour la fidélité intra-jour et trois fois pendant quatre différents jours pour la fidélité inter-jour.

-Taux de récupération : Le rendement d'extraction a été déterminé à partir de 5g de poudre avec ajout de 4,6mg d'artémisinine.

Taux de récupération (%) = $(A-B)/C \times 100$

A est la quantité d'artémisinine extraite du mélange poudre de la plante avec ajout de l'artémisinine.

B est la quantité d'artémisinine dans la poudre de la plante sans ajout.

C est la quantité d'artémisinine ajoutée.

3. Résultats et discussions

Les résultats et discussions s'articulent autour de :

3.1 Chromatographie sur Couche Mince à Haute Performance

L'artémisinine a été identifiée par la méthode CCMHP dans les extraits éthanoliques par comparaison des spectres UV des spots de standard et celui de l'échantillon au même Rf (Rf=0,26) (figure.1).

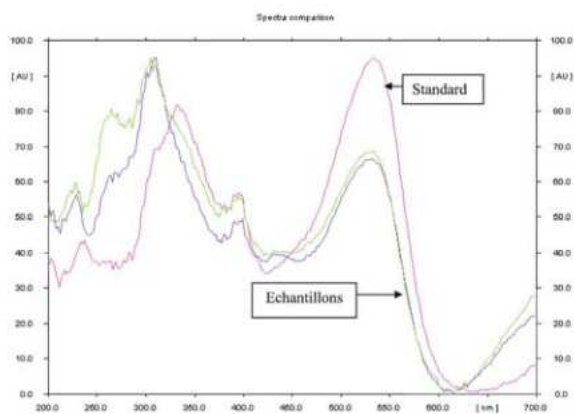


Figure1: Spectre UV comparé du témoin et de l'échantillon

L'homogénéité des deux spectres montre bien que le spectre analysé est celui de l'artémisinine. Ils montrent respectivement les pics correspondants à l'artémisinine dans le standard et dans l'échantillon.

La pureté des pics analysés dans l'extrait a été vérifiée en comparant les spectres UV pris au scanner du témoin d'artémisinine et des spots correspondants dans l'extrait (figure 1). La similitude des spectres montre la spécificité des analyses.

3.2 Chromatographie Liquide à Haute Performance

L'artémisinine a été identifié par la méthode CLHP dans les extraits éthanoliques par comparaison des chromatogrammes d'absorption en Q du standard et celui de l'échantillon au même temps de rétention 10,54min (figure.2).

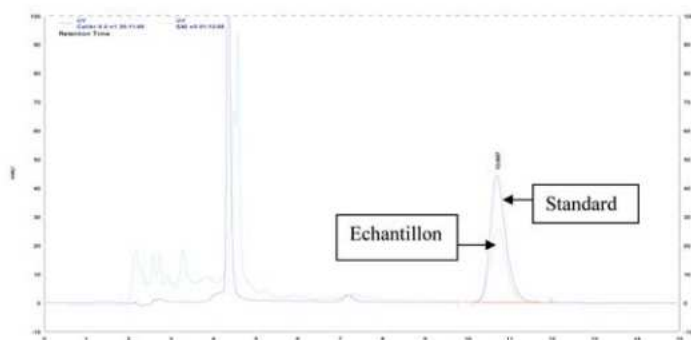


Figure2: Chromatogrammes comparés du témoin et d'un échantillon

L'homogénéité des deux chromatogrammes montre bien que le chromatogramme analysé est celui de l'artémisinine. Ils montrent respectivement les pics correspondants à l'artémisinine dans le standard et dans l'échantillon.

3.3 Critères de validation utilisés

- **Spécificité-Sélectivité**

Les méthodes développées ont permis de séparer et d'établir de manière univoque l'existence de l'artémisinine dans la matrice que représente l'extrait. La qualité de la séparation chromatographique (figures 1 et 2) justifie le degré de sélectivité élevé des procédures de dosage.

- **Fonction de réponse (courbe de calibration)**

Les équations des courbes de calibration de l'analyse de 3 ou 4 jours sont:

$y=4,6636x-135,89$ avec $R^2=0,9988$ (CLHP) et

$y= 1,6499x- 8,455$ avec $R^2=0,9998$ (CCMHP).

- **Linéarité**

Dans l'intervalle de dosage : 200ng-1200ng, la réponse (signal) est proportionnelle à la quantité en artémisinine dans l'échantillon: ce qui montre la linéarité de chacune des procédures analytiques utilisées.

- **Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)**

Afin d'estimer la fidélité de chacune des techniques, les CV de répétabilité (fidélité intra jour) et la fidélité inter jours (tableau :I), ont été déterminés à chaque niveau de quantités en artémisinine.

Tableau I: Coefficients de variations des analyses intra jour et inter jours

Standard Quantité (ng)	CV (%)			
	Intra jour (n = 3)		Inter jours	
	CCMHP	CLHP	(n = 4) CCMHP	CLHP
200	8,40	4,67	4,21	2,97
400	6,07	3,55	5,80	2,05
800	6,35	0,87	2,24	1,43
1200	1,42	2,02	1,27	3,09

Les C.V.intra-jour (répétabilité) et inter-jours (fidélité intermédiaire) sont inférieurs à 8,4% pour CCMHP et 5% pour CLHP.

- **Limites de détection et de quantification**

Tableau II: Limites de détection et de quantification

Standard quantité (ng)	LD and LQ			
	LD		LQ	
	CCMHP	CLHP	CCMHP	CLHP
200	0,051	0,331	0,168	1,104
400	0,032	0,485	0,106	1,617
800	0,160	0,693	0,535	2,310
1200	0,051	2,371	0,170	7,905

Ces résultats confirment la linéarité de chacune des méthodes développées à l'intérieur de l'intervalle de dosage. Le Système CLHP détecte et quantifie mieux que le système CCMHP. Ils sont intéressants par rapport aux travaux de Simonet et al : ce qui justifie l'exactitude de chacune des méthodes.

- **Taux de récupération**

Les taux de récupération de l'artémisinine par la méthode d'extraction sont d'environ 98%: ce qui est excellent compte tenu de la complexité de la matrice végétale. Résultats intéressants par rapport aux travaux de Simonet et al (91%).

3.4 Paramètre de corrélation : Teneur en artémisinine

Une bonne corrélation est mise en évidence entre les résultats d'analyse par CCMHP et CLHP (Figure 3).

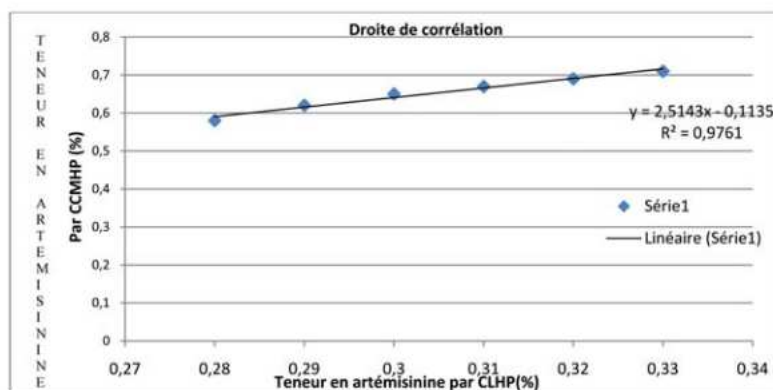


Figure 3 : Comparaison des résultats de dosage de l'artémisinine par CCMHP et par CLHP

Le coefficient de corrélation ($R \approx 0,976$) entre les résultats CCMHP et CLHP confirme la proportionnalité entre ces teneurs. Elles sont néanmoins faibles par rapport à celles d'Action Nature Médecine (Anamed) 1 à 1,4%.

4. Conclusion

La méthode de CCMHP-densitométrie développée en utilisant un modèle linéaire, présente une bonne répétabilité et fidélité pour la gamme de quantités en artémisinine analysées (200, 400, 800 et 1200ng). Les coefficients de variations (CV) intra-jour ($n = 3$) et inter-jours ($n = 4$) obtenus avec la méthode CCMHP sont inférieurs à 10% pour toute la série de quantités analysées. Nous avons ensuite utilisé la méthode pour déterminer la quantité d'artémisinine dans les poudres de feuilles de *Artemisia annua* soit $(0,65 \pm 0,01) \%$ avec une distance de migration moyenne $R_{f moy} = 0,26$.

La méthode de chromatographie liquide à haute performance a été développée pour l'identification, la quantification de l'artémisinine dans la poudre de feuilles de *Artemisia annua*: la teneur en artémisinine est de $(0,305 \pm 0,013) \%$ avec un temps de rétention moyen égal à 10,54min. Ces taux sont largement inférieurs à ceux d'Anamed (1 à 1,4%). Les coefficients des variations intra-jour ou répétabilité ($n = 3$) et inter-jour ou fidélité intermédiaire ($n = 4$) sont inférieurs à 10% pour toute la série des quantités en artémisinine analysées. Elle est simple, rapide, précise, reproductible, fiable mais onéreuse. Elle peut être utilisée pour l'analyse quantitative d'autres principes actifs analogues. La variation des teneurs obtenues confirme l'hypothèse selon laquelle, la méthode CCMHP

quantifie d'autres molécules autre que l'artémisinine. Une bonne corrélation ($R^2=0,976$) entre les teneurs en artémisinine par CLHP et par CCMHP, a été mise en évidence.

Remerciements

Tous nos remerciements à la CIUF (Conseil Interuniversitaire de la Communauté Française de Belgique), à l'UCL (Université Catholique de Louvain) et à l'UAC (Université d'Abomey Calavi).

Références

- L.Chekem, S. Wierucki Extraction de l'artémisinine et synthèse de ses dérivés : artésunate et artéméther Propharex sa, Courcelles Belgique.
- Hans Martin Hir, Konda Ku Mbuta et Innocent Balagizi. La Médecine Naturelle Tropicale : Traitements (Anamed) (2006) P23-29.
- Myriam GAUDIN et X. SIMMONET Dosage de l'artémisinine par Chromatographie sur Couche Mince (CCM). Revue Suisse de Vitic. Arboric. Hortic (2002). vol 34(3) : 205-208.
- M. Gabriels and J. Plaizier-Vercammen (2004). Development of reversed-phase thin-layer Chromatographic method for artemisinin and its derivatives. J. Chromatogr. Sci, 42, 341-347.
- Marchand, Els; Atemnkeng, Magnus A.; Vanermen, Stijn. Development and validation of a simple thin layer chromatographic method for the analysis of artemisinin in *Artemisia annua* L. plant extracts. Biomedical Chromatography (2008), 22(5), 454-459.
- H.N. ElSohly, E. M. Croom and Elsohly (1987). Analysis of the antimalarial sesquiterpene artemisinin in *Artemisia annua* by High-performance Liquid Chromatography (HPLC) with postcolumn derivatization and ultraviolet detection. Pharm. Res. 4, 258-260.
- G-P. Qian, Y-W. Yang and Q-L. Ren. Determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. by reversed phase HPLC. J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. (2005) 28, 705-712.
- P. Bhandari, A. P. Gupta and V.K. Kaul (2005). Simultaneous densitometric determination of artemisinin, artemisinic acid and arteannuin-B in *Artemisia annua* using reversed-phase thin layer chromatography. J. Sep. Sci. 28, 2288-2292.
- Jorge F.S. Ferreira and Javier M. Gonzalez Analysis of underivatized artemisinin and related sesquiterpene lactones by HPLC with ultraviolet detection Phytochemical Analysis (2009). Phytochem. Anal.; 20:91-97.
- J. A. Marchese, J. A. Rehder, V. L. G. Sartoratto A. Quantification of artemisinin in *Artemisia*

annua L. A comparison of thin-layer Chromatography with densitometric detection and high performance liquid chromatography with UV detection. Rev. Brasil. Plant. Med. (2001) 4, 81-87.

Celeghini, R. M.; Silva, A. P.; Sousa, I. M. Q. Foglio, M. A. Evaluation of *Artemisia annua* L. Clean-up methods for artémisinine quantification by HPLC (2006) Rev. Bras Pl. Med. v.8 p119-122.

Zhao S. S. et Zeng (1985) Spekmetrische Hochdruck-Chromatograishe (HPLC) Untersuchungen zur Analytik von Qinghaosu.

Philippe Hubert (2000). Commission SFSTP. Validation des Procédures Analytiques Quantitatives : Harmonisation des Démarches Version 4.3

Philippe Hubert. Validation des méthodes analytiques (2006) 45-46.