

## DOSAGE DE L'INGENOL DANS LES TEINTURES MERES HOMEOPATHIQUES DE DIVERSES ESPECES D'EUPHORBIA PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

S. PAPHASSARANG<sup>1</sup>, M.A. GIRIN<sup>1</sup>, Ch. DAVID-ETEVE<sup>1</sup>, A. CHABOUD<sup>2</sup>,  
J. RAYNAUD<sup>2</sup>

1. Laboratoires BOIRON, 20 rue de la Libération 69110 SAINTE-FOY-LES-LYON (FRANCE)

2. Département de botanique et biologie cellulaire, Pharmacognosie (Matière médicale). Faculté de Pharmacie, 8 avenue Rockefeller 69373 LYON CEDEX 08 (FRANCE)

### MOTS CLES:

*Euphorbia amygdaloides* L. ; *Euphorbia esula* L. ; *Euphorbia helioscopia* L. ; *Euphorbia lathyris* L. ; *Euphorbia palustris* L. ; *Euphorbia pilosa* L. ; *Euphorbia pilulifera* L. ; *Euphorbia resinifera* Berg. ; Ingenol ; Ingenol esters ; HPLC.

### ABSTRACT

High performance liquid chromatography has been developed for the identification and quantitation of ingenol in homeopathic mother tinctures of 8 *Euphorbia* species. The ingenol esters were hydrolyzed with KOH in methanol and the free ingenol was analyzed by C18 RP column using methanol-water (60 : 40 V/V) as the mobile phase. The ingenol content ranged from 0.5 µg/ml to 16.7 µg/ml. *Euphorbia resinifera* Berg. mother tincture was found to be the richest in ingenol. On the other hand, ingenol content was not significant in *E. amygdaloides* L. or *E. pilulifera* L. mother tinctures.

## I. INTRODUCTION

Notre travail porte sur 8 teintures mères homéopathiques fabriquées à partir des différentes espèces du genre *Euphorbia*: *Euphorbia amygdaloides* L., *Euphorbia esula* L., *Euphorbia helioscopia* L., *Euphorbia lathyris* L., *Euphorbia palustris* L., *Euphorbia pilosa* L., *Euphorbia pilulifera* L. et *Euphorbia resinifera* Berg. Malgré l'hétérogénéité morphologique, on constate chez le genre *Euphorbia* la présence sur le plan histologique de laticifères (1). Le latex confère à ces plantes une certaine toxicité, due surtout aux dérivés terpéniques en particulier aux esters des diterpènes dérivés du phorbol et de l'ingénol (2)(3). Les esters d'ingénol sont les plus fréquemment rencontrés dans toutes les espèces étudiées (4). Le dosage direct d'ingénol sous forme d'esters dans les teintures mères n'est pas possible. Cela est dû d'une part à la diversité structurale de ces constituants et d'autre part à la non disponibilité des témoins esters d'ingénol dans le commerce. Par contre, il est possible de se procurer de l'ingénol et de le doser dans nos teintures mères après sa libération. Parmi les techniques chromatographiques utilisées pour le contrôle, la chromatographie liquide haute performance est sans doute la technique la plus adaptée. Elle permet l'étude quantitative de ce type de constituant directement sans dérivatisation.

## II. PARTIE EXPERIMENTALE

### - MATERIEL ET CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

#### \* Appareillage

Les analyses ont été effectuées sur un chromatographe liquide Hewlett-Packard, série 1050, équipé d'un injecteur automatique et d'un détecteur multilongueur d'onde. Ce système est piloté par HP ChemStation de Hewlett Packard (Hewlett-Packard, Palo-Alto, Californie, Etats-Unis)

#### \* Conditions chromatographiques

- . Colonne Sphérisorb ODS 2, 5 $\mu$ , 250 x 4mm Hewlett-Packard, Palo-Alto, Californie, Etats-Unis)
- . Solvant: méthanol-eau (60:40; V/V)
- . Débit: 1 ml/min
- . Détection: 204 nm
- . Température de la colonne: 30°C
- . Volume d'injection: 20  $\mu$ l

## - SOLUTIONS A ANALYSER

### \* Solution témoin:

L'ingénol sous forme libre est commercialisé par les Laboratoires Sigma (St Louis, MO., Etats-Unis). Il est conditionné dans des ampoules en verre scellées sous azote et se présente sous forme d'un film solide invisible adhérant aux parois. L'ingénol est solubilisé dans le méthanol et conservé à moins de 0°C et à l'abri de la lumière.

### \* Préparation de l'échantillon

L'ingénol est en général dans la plante sous forme de mono ou de diesters. Pour savoir la quantité d'esters d'ingénol dans les teintures mères, on peut doser l'ingénol libre après saponification.

La technique de saponification des teintures mères utilisées lors de ce travail dérive de celle décrite par UPADHAY et coll. (1980) (5): 5 ml de teinture mère sont lavés par 3 fois 5 ml d'hexane pour se débarrasser des fractions lipidiques et triterpéniques. La phase restante est évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu est saponifié par 5 ml de potasse méthanolique 0,5M pendant 45mn à la température ambiante. L'excès de KOH est neutralisé par HCl 1N. Après adjonction de 5 ml d'eau distillée, la solution obtenue est extraite par 3 fois 5 ml de dichlorométhane. La solution extractive obtenue est évaporée à sec sous pression réduite et le résidu est repris par 100 µl de méthanol. La solution méthanolique obtenue ont été conservée à une température inférieure à 0°C et à l'abri de la lumière.

## III- RESULTATS ET DISCUSSION

Dans les conditions décrites, l'ingénol donne un pic au temps de rétention voisin de 7.23 min.

Le pic de l'ingénol dans la teinture mère a été identifié par son temps de rétention. La confirmation a été effectuée par la méthode d'ajout. La quantification d'ingénol dans les teintures mères est faite par la méthode d'étalonnage externe. Différents essais ont été effectués pour la validation du dosage.

### - Etude de la répétabilité

Nous avons injecté 10 fois de suite un volume de 20 µl d'une solution étalon d'ingénol à 50 µg/ml. L'aire du pic d'ingénol a été enregistré. La moyenne de l'aire des pics et le coefficient de la variation (CV) de la répétabilité sont ensuite calculés. Le CV est de 0.51 %. La méthode de dosage est considérée comme répétable car le CV de la répétabilité est inférieur à 1 %.

#### - Etude de la reproductibilité

Nous avons réalisé une série de 9 dosages sur 3 jours d'une solution étalon d'ingénol à 50 µg/ml. L'aire correspondant au pic d'ingénol a été enregistré. Nous calculons ensuite la moyenne et le CV de la reproductibilité des réponses. Le CV trouvé est de 0.88 %. La méthode de dosage peut être considérée comme reproductible car le coefficient de variation de la reproductibilité est inférieur à 2 %.

#### - étude de la linéarité

Elle a été faite avec une gamme d'étalonnage de 6 solutions témoins allant de 50 à 670 µg/ml. Chaque solution est injectée 3 fois et l'aire des pics mentionnée est la moyenne des 3 aires enregistrées. La droite d'étalonnage est linéaire dans la gamme de concentration essayée. L'équation de la droite est de la forme:  $Y = aX + b$   $a = 31.356$ ;  $b = 121.399$ . Le coefficient de corrélation  $r$  trouvé est de 0.99.

La concentration en ingénol dans les teintures mères est la suivante (par ordre décroissant): *E. resinifera* Berg. > *E. pilosa* L. > *E. lathyris* L. > *E. helioscopa* L. > *E. palustris* L. > *E. esula* L. > *E. amygdaloïdes* L. et *E. pilulifera* L.

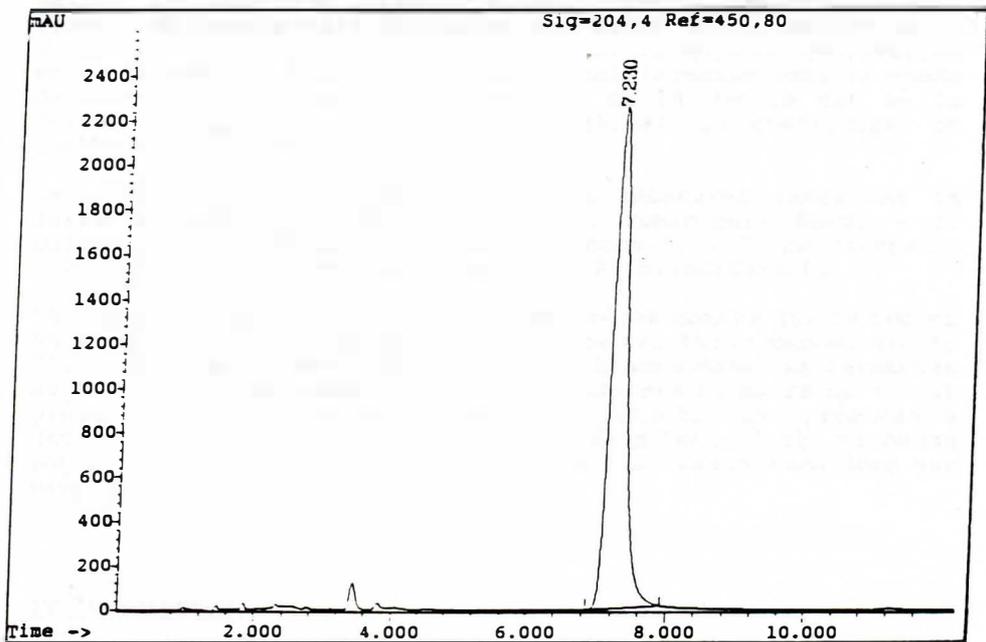
Le dosage d'ingénol dans les teintures mères montre que la teneur en ingénol est très variable suivant les teintures mères. Ainsi, l'ingénol n'est présent qu'à l'état de traces dans les teintures mères d'*E. amygdaloïdes* L. et d'*E. pilulifera* L. alors qu'il est présent en grande quantité dans les échantillons préparés à partir de la teinture mère d'*E. resinifera* Berg. Cette richesse peut s'expliquer par le fait que la TM d'*E. resinifera* Berg est préparée à partir du latex.

#### IV. CONCLUSION

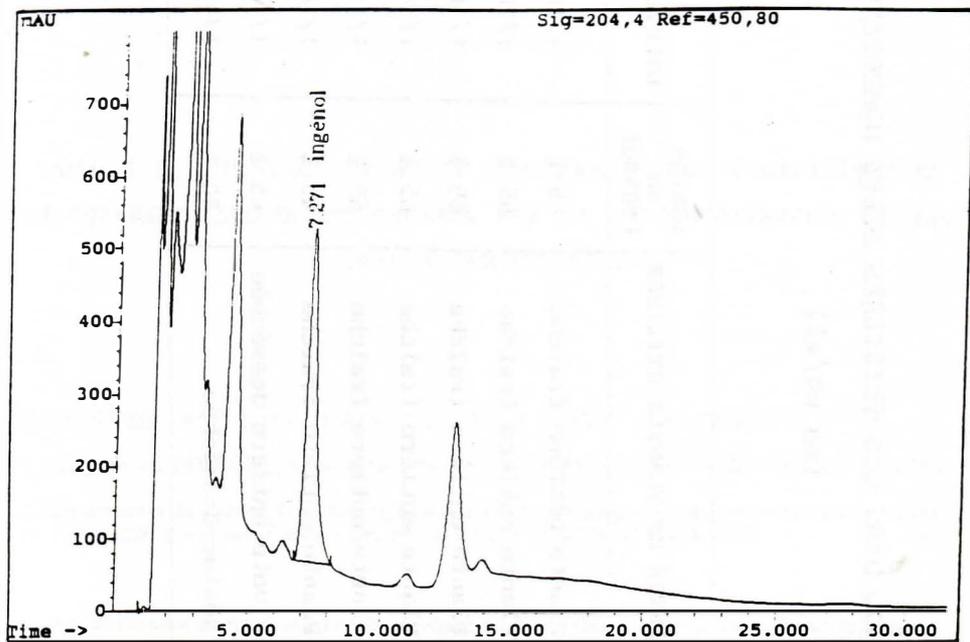
L'ingénol est un traceur intéressant pour le contrôle des teintures mères d'Euphorbe en raison de son rapport avec leur toxicité. La chromatographie liquide haute performance s'avère être une technique bien adaptée à l'étude qualitative et quantitative de ce composé. Elle est rapide, fiable et permet le dosage de l'ingénol directement sans faire des dérivatisations.

## V. BIBLIOGRAPHIE

1. G. DEYSSON: Eléments d'anatomie des plantes vasculaires  
Edit.Sedes, Paris, 1965,266 pages
2. A.D. KINGHORN, F.J. EVANS, *Planta Med.*, 28 (1975), 324-335
3. E.H. SEIP, E. HECKER, *Planta Med.*, 46 (1982), 215-218
4. F.J. EVANS, C.J.SOPER, *Lloydia.*, 41 (1978) 193-233
5. R.R. UPADHYAY, F. BAKHTARAR, H. MOHSENI, A.M. SATER, N. SALEH,  
A. TAFAZULI, F.N. DIZAJI, G. MOHADDES, *Planta Med.*, 38 (1980),  
151-154



**CHROMATOGRAMME DE LA SOLUTION TEMOIN D'INGENOL**



CHROMATOGamme D'UN EXTRAIT DE LA TEINTURE MERE D'EUPHORBIA PILOSA L.

TENEUR EN INGENOL DANS LES TEINTURES MERES HOMEOPATHIQUES

(en µg/ml)

NOMS DE LA TEINTURE MERE	PARTIE DE PLANTES UTILISEE	TENEUR EN ETHANOL	DILUTION	TENEUR EN INGENOL en µg/ml
<i>Euphorbia amygdaloïdes</i> L.	Plante entière fraîche	65 %	1/10	Traces
<i>Euphorbia esula</i> L.	Plante entière fraîche	65 %	1/10	0,51
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	Plante entière fraîche	65 %	1/10	1,54
<i>Euphorbia lathyris</i> L.	Plante entière fraîche	65 %	1/10	3,02
<i>Euphorbia palustris</i> L.	Plante entière fraîche	65 %	1/10	1,27
<i>Euphorbia pilosa</i> L.	Plante entière fraîche	65 %	1/10	9,47
<i>Euphorbia pilulifera</i> L.	Plante entière desséchée	65 %	1/10	Traces
<i>Euphorbia resinifera</i> Berg.	Résine desséchée	90 %	1/10	16,71