



Station fédérale de recherches
en production végétale
de Changins <http://www.changins.ch>

Directeur: André Stäubli



Médiplant – Centre de recherches
sur les plantes médicinales et aromatiques
<http://www.mediplant.ch>

Directeur: Charly Darbellay

Dosage de l'artémisinine par chromatographie sur couche mince (CCM)

Validation de protocole

Myriam GAUDIN et X. SIMONNET, Médiplant, Station fédérale de recherches en production végétale de Changins, Centre d'arboriculture et d'horticulture des Fougères, CH-1964 Conthey

@ E-mail: myriam.gaudin@rac.admin.ch
Tél. (+41) 27 34 53 511.

Résumé

L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique aux vertus antipaludiques présente dans les feuilles d'*Artemisia annua*. Cet article évalue un protocole de chromatographie sur couche mince (CCM) pour le dosage de cette molécule en le comparant à l'analyse par chromatographie liquide à haute pression (CLHP). Sa répétabilité est validée dans le domaine de 0,25 à 1,25% d'artémisinine. Ce mode opératoire s'avère simple, rapide et bon marché pour séparer, visualiser la molécule sur plaque de silice et pour la quantifier au densitomètre par absorbance.

Introduction

L'artémisinine, une lactone sesquiterpénique, et ses dérivés sont des molécules prometteuses pour le traitement de la malaria (BHAKUNI *et al.*, 2002), notamment en cas de multirésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques conventionnels (WILAIRATANA et LOOAREESUWAN, 2002; WRIGHT et WARHURST, 2002). L'artémisinine est une molécule trop complexe pour être synthétisée à bas prix; son extraction des feuilles de l'armoise annuelle (*Artemisia annua*) reste donc pour l'instant une étape obligée pour la fabrication de médicaments (WOERDENBAG *et al.*, 1990). Bon nombre de travaux agronomiques sont consacrés à cette espèce, avec pour objectif l'amélioration de son rendement en artémisinine (DELABAYS *et al.*, 2001; SIMONNET *et al.*, 2001; LAUGHLIN *et al.*, 2002). Ces recherches impliquent la réalisation de dosages en série qui justifient la mise au point d'une technique analytique rapide, fiable et bon marché. Tels sont les

avantages de la chromatographie sur couche mince (CCM), plus facile à mettre en place et moins coûteuse que l'analyse par chromatographie liquide à haute pression (CLHP). Ainsi, nous proposons ici de valider, avec notre équipement, un protocole de dosage de l'artémisinine par CCM, inspiré des méthodes décrites dans les publications de GUPTA *et al.* (1996) et de DELABAYS (1997).

Tableau 1. Liste des produits chimiques.
Table 1. List of chemicals.

Produit	Fournisseur	N° d'article	Pureté
Acide acétique	Merck	1.00063	100%
Acide sulfurique	Baker	6057	95-97%
Anisaldéhyde	Fluka	10440	98%
Artémisinine	Aldrich Roth	36.159-3 A.526.1	98% 96-98%
Diéthyl éther	Fluka	31670	99,5%
n-Hexane	Romil Chemicals	A-9389	95%
Toluène	Merck	8325.2500	99,5%

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les plantes d'*A. annua* sont cultivées sur notre site expérimental de Conthey (VS), Suisse.

Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans ce protocole sont inventoriés dans le tableau 1.

Appareillage

La quantification est réalisée par densitométrie à l'aide d'un TLC Scanner 2 (Camag, Muttens, CH) couplé au logiciel CATS. Les échantillons de feuilles sont mixés à l'aide d'un Polytron type PT 20.00 (Kinematica GmbH, Lucerne, CH).

Solutions standard et droite d'étalonnage

Une solution mère d'artémisinine est préparée dans du toluène (1 mg/ml). Cinq standards sont préparés à partir de cette solution pour être déposés sur la plaque de silice. Leur concentration en artémisinine est de 50 ng/μl (0,25%), 100 ng/μl (0,5%), 150 ng/μl (0,75%), 200 ng/μl (1%) et 250 ng/μl (1,25%). Le protocole présenté dans le tableau 2 est suivi pour réaliser la chromatographie. L'artémisinine forme un spot rose avec un Rf de 0,2. La lecture se fait au densitomètre par absorbance à une longueur d'onde de 530 nm, en utilisant une lampe au tungstène. La droite d'étalonnage est tracée en rapportant la concentration en artémisinine à la surface du pic.

Quantification de l'artémisinine dans les échantillons de feuilles

100 mg de feuilles sèches sont réduites en poudre puis mixées (Polytron) pendant 30 secondes dans 5 ml de toluène. L'extrait est centrifugé (3770 tours/minute) durant cinq minutes. La chromatographie est réalisée comme le décrit le tableau 2. La concentration en artémisinine est établie en se référant à la droite d'étalonnage.

Analyse par CLHP

Cette méthode, inspirée de celle proposée par ZHAO et ZENG (1986) et développée par le Laboratoire de chimie de la Station fédérale de recherches en production végétale de Changins (RAC), est décrite par DELABAYS (1997). Son principe est de réaliser, avant injection, une transformation de l'artémisinine, non détectable aux UV, en Q₂₆₀, composé stable réagissant aux UV.

L'artémisinine de 250 mg de feuilles séchées et moulues est extraite à l'acétonitrile. Elle est convertie en Q₂₆₀ qui est séparé et dosé sur colonne CLHP C18 en phase inverse avec l'acétophénone comme standard interne. La phase mobile est un gradient linéaire (80:20) d'un tampon phosphate à 10 mM et d'acétonitrile avec un débit de 0,6 ml/min. Q₂₆₀ est détecté aux UV (260 nm).

Résultats et discussion

La droite d'étalonnage de la concentration en artémisinine est linéaire entre 0,25 (50 ng) et 1,25% (250 ng) (fig. 1). Ce protocole permet, par conséquent, d'identifier des plantes riches (1,25%) comme des plantes pauvres (0,25%) en artémisinine.

La répétabilité de l'analyse est testée en traitant neuf fois consécutives un même échantillon dont la teneur moyenne est

Tableau 2. Mode opératoire de la chromatographie sur couche mince.

Dépôt de l'échantillon	
Plaque	Plaque recouverte de silice 60F ₂₅₄ (Merk), 25 μm
Taille	10 × 20 cm
Application	Application manuelle de gouttes, Nanomat (Camag)
Quantité	1 μl
Position	Les spots sont déposés à 15 mm du bord inférieur de la plaque.
Migration	
Solvants	24 ml n-hexane 20 ml diéthyl éther
Distance	4,5 cm
Cuve	Cuve à double compartiment
Type	Linéaire ascendante
Saturation	Une paroi de la cuve est tapissée de papier buvard. La plaque déposée dans le compartiment vide est conditionnée dans la vapeur des solvants durant 30 minutes. La chromatographie débute lorsque la cuve est inclinée de façon à remplir le deuxième compartiment du mélange de solvants.
Révélation	
Révéléateur	200 ml d'acide acétique 4 ml d'acide sulfurique 2 ml d'anisaldéhyde
Technique	Immersion
Température	100 °C

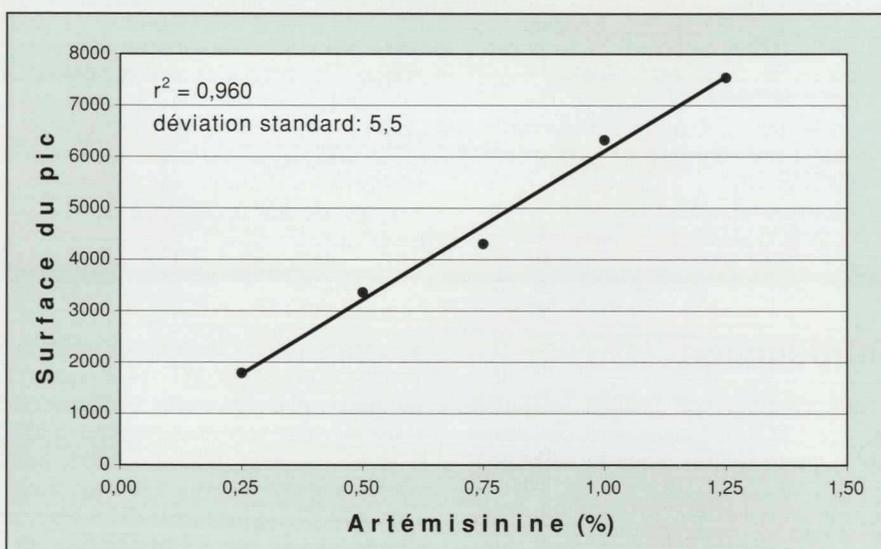


Fig. 1. Droite d'étalonnage de la concentration en artémisinine.

Fig. 1. Calibration curve of artemisinin content.

Tableau 3. Répétabilité de l'analyse et taux de récupération de l'artémisinine.

Echantillon	CCM - Teneurs en artémisinine (%)											
	Teneurs déterminées									Moyenne	SE	CV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Feuilles sèches <i>A. annua</i>	0,54	0,58	0,58	0,53	0,58	0,50	0,50	0,51	0,51	0,54	0,01	6,5%
Echantillon enrichi	0,90	1,03	1,04	1,02	0,91					0,99		
Taux de récupération										91%		

SE: erreur standard. CV: coefficient de variation.

Material and methods

Plant material

A. annua plants were grown in our experimental fields at Conthey, VS, Switzerland.

Chemicals

The chemicals are listed in table 1.

Apparatus

Densitometer was a TLC Scanner 2 (Camag, Muttenz, Switzerland) linked to the CATS software for densitometric evaluation. The mortar was a Polytron PT 20.00 (Kinematica GmbH, Luzern, Switzerland).

Standard solutions and calibration curve

A stock solution of artemisinin (1 mg/ml) was prepared in toluene. Five standard solutions were diluted to 50 ng/ μ l (0,25%), 100 ng/ μ l (0,5%), 150 ng/ μ l (0,75%), 200 ng/ μ l (1%) and 250 ng/ μ l (1,25%) and applied on TLC plate. Chromatography was carried out as described in table 2. Artemisinin appeared as a pink spot with Rf value of 0.2. For quantification, TLC spots corresponding to artemisinin, were scanned at 530 nm using a tungsten lamp. Scanning was performed by absorbance. Calibration curve of artemisinin was constructed by plotting concentration versus peak area of the compound.

Estimation of artemisinin in plant samples

Powdered dried leaves (100 mg) were grounded in 5 ml toluene in a mortar (Polytron) for 30 seconds, then centrifuged (3770 rpm) for 5 minutes. Chromatography was performed as described in table 2. The concentration of artemisinin was measured using the calibration curve of artemisinin standard.

HPLC analysis

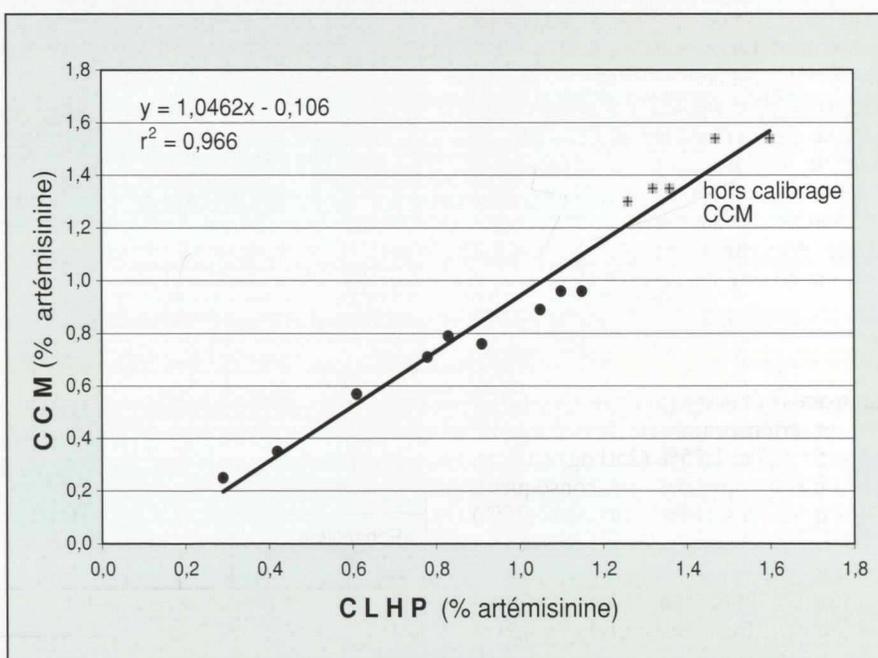
Samples were analysed using the method drawn from ZHAO and ZENG (1986), developed by the Laboratory of Chemistry of the Federal agricultural research station for plant production (RAC), CH-1260 Nyon and reported in DELABAYS (1997). Because artemisinin does not absorb at the UV spectrum, it is converted into Q_{260} which is stable and has a strong UV absorption at 260 nm. Dried and powdered leaves (250 mg) were extracted with acetonitrile. Artemisinin was converted into Q_{260} . Q_{260} was analysed using HPLC on a reversed phase C18 column, with acetophenone as internal standard. A linear gradient (80:20) of phosphate buffer 10 mM and acetonitrile was applied as the mobile phase at a flow rate of 0.6 ml/min. Detection was done at 260 nm.

Table 2. Thin Layer Chromatography standard conditions.

Sample application	
Layer	Precoated silicagel plates 60F ₂₅₄ (Merk), 25 μ m
Size	10 \times 20 cm
Application	Spotwise, manual application, Nanomat (Camag)
Amount	1 μ l
Positioning	The starting points are 15 mm from the lower plate edge.
Development	
Solvent	24 ml n-Hexane 20 ml Diethylether
Separation distance	4,5 cm
Chamber	Twin-trough glass chamber
Separation mode	Linear ascending
Saturation	With filter paper insert and conditioning of the TLC plate with solvent vapour for 30 minutes in the solvent-free half of the twin trough. Chromatographic development is started by tilting the chamber.
Derivatization	
Reagent	200 ml Acetic Acid 4 ml Sulphuric Acid 2 ml Anisaldehyde
Mode	Immersing
Temperature	100 °C

de 0,54%. Le coefficient de variation obtenu est égal à 6,5% (tabl. 3). Le taux de récupération de l'artémisinine est déterminé en ajoutant 100 ng d'artémisinine à ce même échantillon de feuilles. L'analyse est répétée cinq fois et le taux moyen de récupération est de 91% (tabl. 3). Pour tester la fiabilité de l'analyse quantitative par CCM, 15 échantillons de feuilles sont choisis, préalablement dosés par CLHP. L'analyse CLHP détermine pour ces échantillons des teneurs comprises entre 0,42 et 1,60% d'artémisinine. Une très bonne corrélation ($r^2 = 0,97$) est mise en évidence entre les résultats d'analyse par CCM et par CLHP (fig. 2).

Fig. 2. Comparaison des résultats de dosage de l'artémisinine par CCM et par CLHP. Teneurs en artémisinine des feuilles sèches. Fig. 2. Accuracy check of TLC by comparison to HPLC. Artemisinin content in the dry leaves.



Conclusions

- ❑ La CCM est une technique analytique simple, peu onéreuse et rapide qui permet l'analyse en série de nombreuses plantes (pas de colonne CLHP, pas de gradient de solvants).
- ❑ La technique de CCM présentée ici pour le dosage de l'artémisinine dans les feuilles d'*A. annua* offre des résultats comparables à ceux obtenus par analyse CLHP, pour des teneurs allant de 0,25 à 1,25%.
- ❑ Cette technique est actuellement utilisée en routine dans le laboratoire Médiplant pour ses différents projets de sélection d'armoises riches en artémisinine.

Remerciements

Les analyses CLHP ont été réalisées par feu le Dr Jacques Aerny, à qui nous rendons hommage. Nous voulons relever ici la précieuse collaboration de la HEV de Sion qui met à notre disposition son densitomètre. Merci à M^{me} Sandrine D'Andrès, responsable du Laboratoire de chimie des vins, fruits et plantes de la RAC, pour la relecture attentive de ce document.

Bibliographie

- BHAKUNI R. S., JAIN D. C., SHARMA R. P., 2002. Phytochemistry of *Artemisia annua* and the development of artemisinin-derived antimalarial agents. *In: Artemisia - Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles*, Ed. Colin W. Wright, Taylor and Francis, London and New York, 211-248.
- DELABAYS N., 1997. Biologie de la reproduction chez l'*Artemisia annua* et génétique de la production en artémisinine - Contribution à la domestication et à l'amélioration génétique de l'espèce. Thèse de doctorat, Université de Lausanne, 155 p.
- DELABAYS N., SIMONNET X., GAUDIN M., 2001. The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars. *Cur. Med. Chem.* **8**, 1795-1801.

- GUPTA M. M., JAIN D. C., VERMA R. K., GUPTA A. P., 1996. A rapid analytical method for the estimation of artemisinin in *Artemisia annua*. *J. Medic. Arom. Plant Sc.* **18**, 5-6.
- LAUGHLIN J. C., HEAZLEWOOD G. N., BEATTIE B. M., 2002. Cultivation of *Artemisia annua*. *In: Artemisia - Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles*, Ed. Colin W. Wright, Taylor and Francis, London and New York, 159-196.
- SIMONNET X., GAUDIN M., HAUSAMMANN H., VERGÈRES C., 2001. Le fanage au champ d'*Artemisia annua* L.: élever la teneur en artémisinine et abaisser les coûts de production. *Revue suisse de Vitic., Arboric., Horticult.* **33** (5), 263-268.
- WILAIRATANA P., LOOAREESUWAN S., 2002. The clinical use of artemisinin and its derivatives

Summary

Evaluation of artemisinin content by thin layer chromatography

Artemisinin is an antimalarial sesquiterpen lactone extracted from the leaves of *Artemisia annua*. Validation of a thin layer chromatography (TLC) method for the evaluation of artemisinin content is compared with high pressure liquid chromatography (HPLC). Its repeatability is confirmed in the range of 0.25 to 1.25%. This technique proves to be simple, quick and cost effective in order to separate, visualise the molecule on silicagel thin layer plate and to scan its spot by an absorption mode using a densitometer.

Key words: *Artemisia annua*, artemisinin, thin layer chromatography (TLC).

Zusammenfassung

Gehaltsbestimmung von Artemisinin mittels Dünnschicht-Chromatographie

Artemisinin ist ein Sesquiterpen-Lacton der Blätter von *Artemisia annua* mit guter Wirkung gegen Malaria. In diesem Artikel wird die Dosierung dieses Moleküls mittels einer Dünnschicht-Chromatographie (DC) im Vergleich zu einer Flüssighochdruck-Chromatographie (FHC) beurteilt. Die Genauigkeit der Methode wird bei einem Artemisiningehalt der Blätter zwischen 0,25 bis 1,25% bestätigt. Es ist eine einfache, schnelle und billige Analyseverfahren, die die Trennung, Derivatisierung auf einem Kieselgel und die Gehaltsbestimmung von Artemisinin mittels Absorptionsdensitometrie ermöglicht.

Riassunto

Determinazione del tenore in artemisinina per cromatografia su strato sottile (CSS)

L'artemisinina è un lactone sesquiterpenico dalle virtù antimalariche presente nelle foglie d'*Artemisia annua*. Questo articolo valuta un protocollo di cromatografia su strato sottile (CSS) per il dosaggio di questa molecola, confrontandolo all'analisi per cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). La sua ripetitività è convalidata in una variazione da 0,25 a 1,25% d'artemisinina. Questo metodo d'operare si avvera semplice e a buon mercato per separare, visualizzare la molecola su lastrina di gel di silice e per quantificarla al densitometro ad assorbenza.

- in the treatment of malaria. *In: Artemisia - Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles*, Ed. Colin W. Wright, Taylor and Francis, London and New York, 289-308.
- WOERDENBAG H. J., LUGT C. B., PRAS N., 1990. *Artemisia annua* L.: a source of novel antimalarial drugs. *Pharm. Weekbl.* **12**, 169-181.
- WRIGHT C.W., WARHURST D.C., 2002. The mode of action of artemisinin and its derivatives. *In: Artemisia - Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles*, Ed. Colin W. Wright, Taylor and Francis, London and New York, 249-288.
- ZHAO S. S., ZENG M.Y., 1986. Application of precolumn reaction to high-performance liquid chromatography of Qinghaosu in animal plasma. *Anal. Chem.* **58**, 289-292.