

Stratégies d'extraction et de purification de la Marinobufagénine à partir du venin du crapaud *Bufo marinus*

Mathilde Wells^{1,2}, Charline Lenaerts¹, Stéphanie Hambye¹, Bertrand Blankert¹

¹ Laboratoire d'Analyse Pharmaceutique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Institut de recherche en Sciences et Technologies de la Santé de l'UMons, Place du Parc 20, 7000 Mons, Belgique.

² Faculté de Pharmacie – Université Libre de Bruxelles - Belgique

E-mail : bertrand.blankert@umons.ac.be

Introduction

- La Marinobufagénine (MBG) est un bufadiénolide cardiotonique présent dans les sécrétions des glandes parotides du crapaud *Bufo marinus*.
- Elle est également présente en tant que substance endogène dans le plasma humain. La MBG inhibe l'isoforme $\alpha 1$ de la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Ceci explique ses propriétés vasoconstrictives et cardiotoniques qui peuvent mener à de l'hypertension et de la natriurèse.
- Au cours d'études récentes, il a été démontré que de faibles quantités de MBG étaient présentes dans des échantillons plasmatiques et urinaires prélevés chez des femmes atteintes de pré-éclampsie. Cette molécule pourrait s'avérer être un biomarqueur dans le diagnostic précoce de la pré-éclampsie.
- La MBG est très difficilement disponible commercialement, l'objectif de ce travail était d'obtenir un standard pur de MBG. Ce standard est actuellement utilisé pour le développement d'une méthode sensible de détection de la MBG par LC-MS/MS.

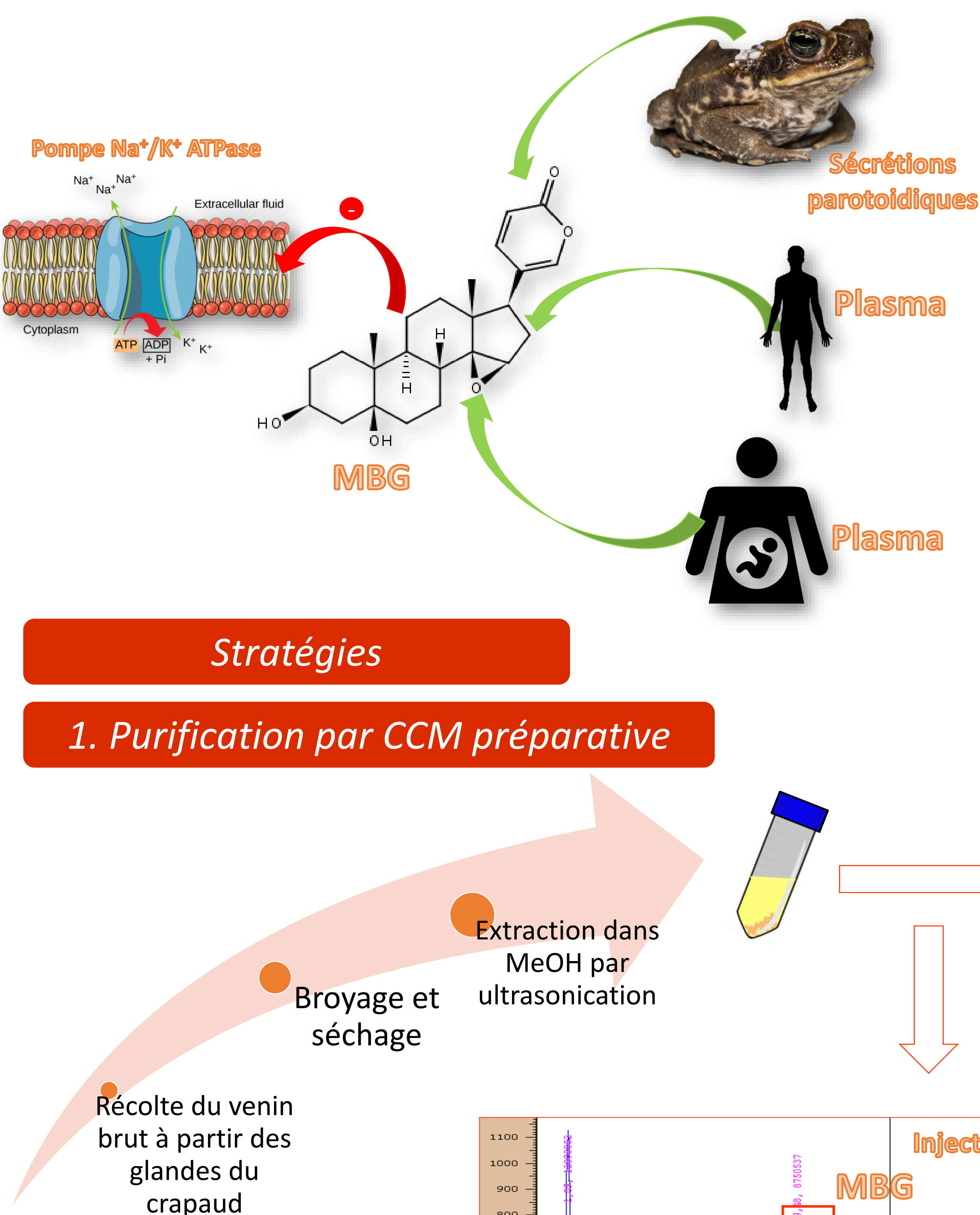
Références:

Lenaerts, C., et al., Analytical aspects of marinobufagenin. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **421**, 193-201, 2013.

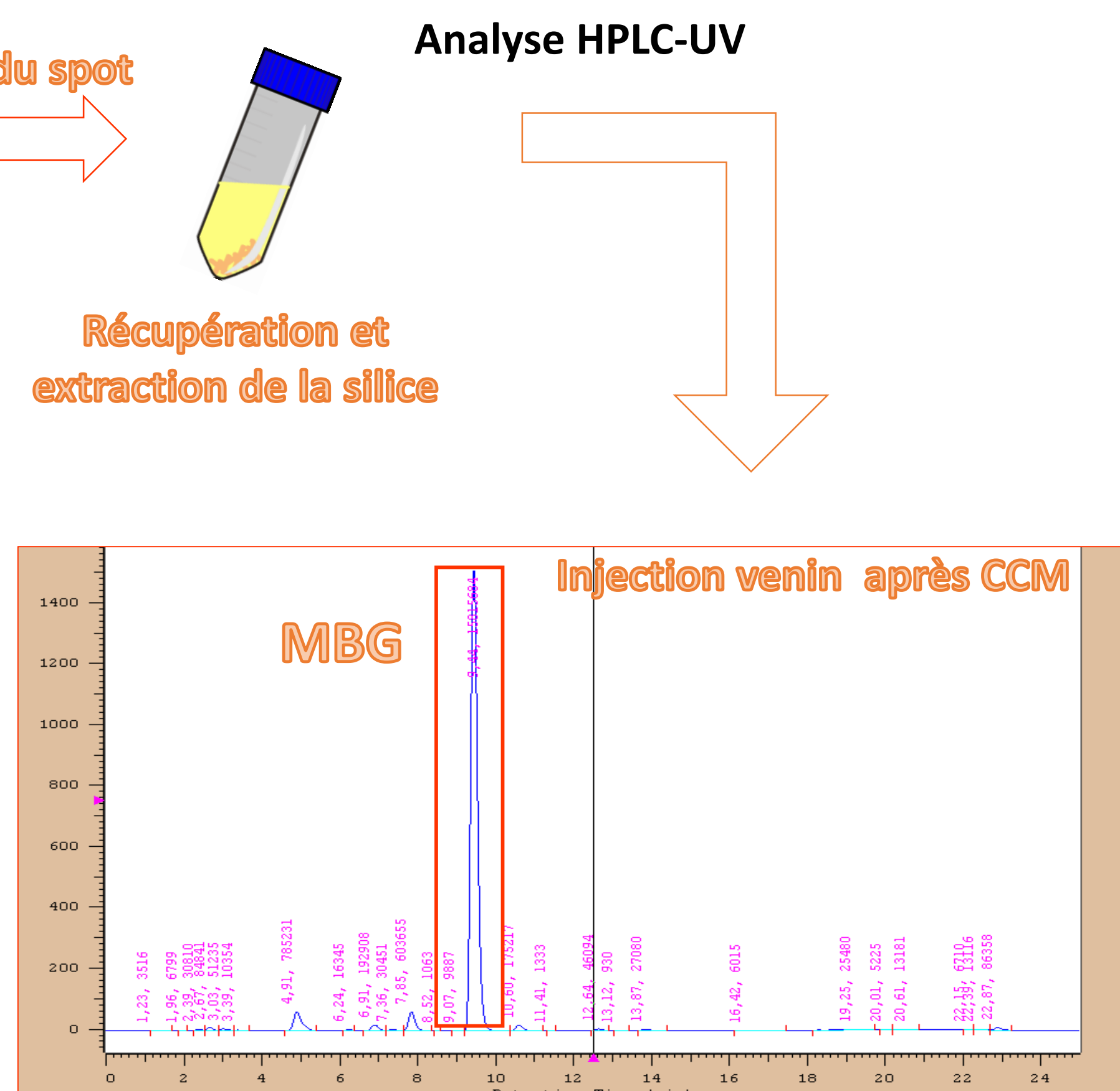
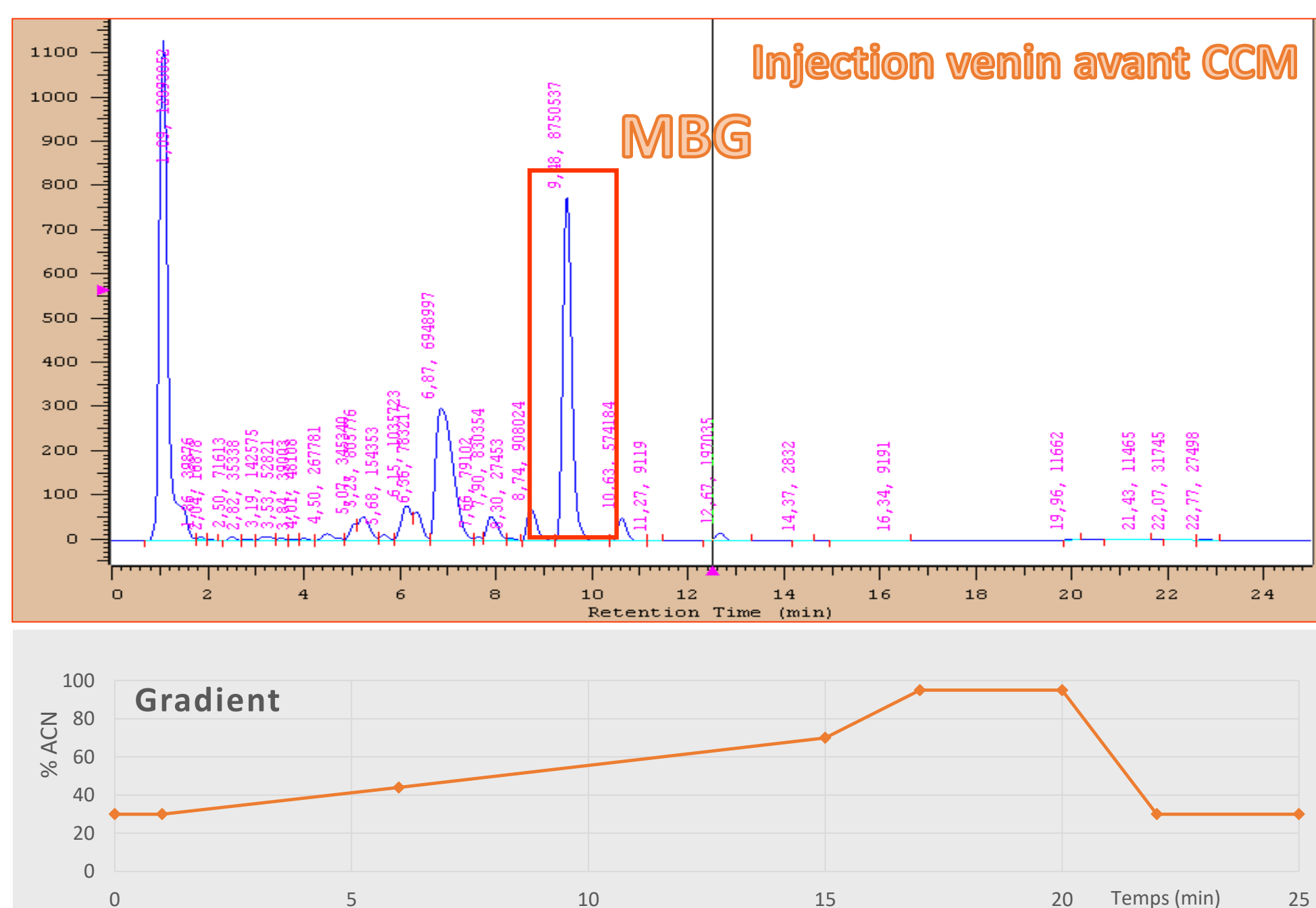
Puschett, J.B., et al., Marinobufagenin, resibufogenin and preeclampsia. *Biochimica & biophysica acta*, **1802**(12), 1246-53, 2010.

Stratégies

1. Purification par CCM préparative



Conditions HPLC-UV	
Colonne	Atlantis dC18 (10 cm)
λ_{max} détection UV	296 nm
Phase mobile	Gradient eau/Ac formique 0,1% et ACN
Flux	1mL/min

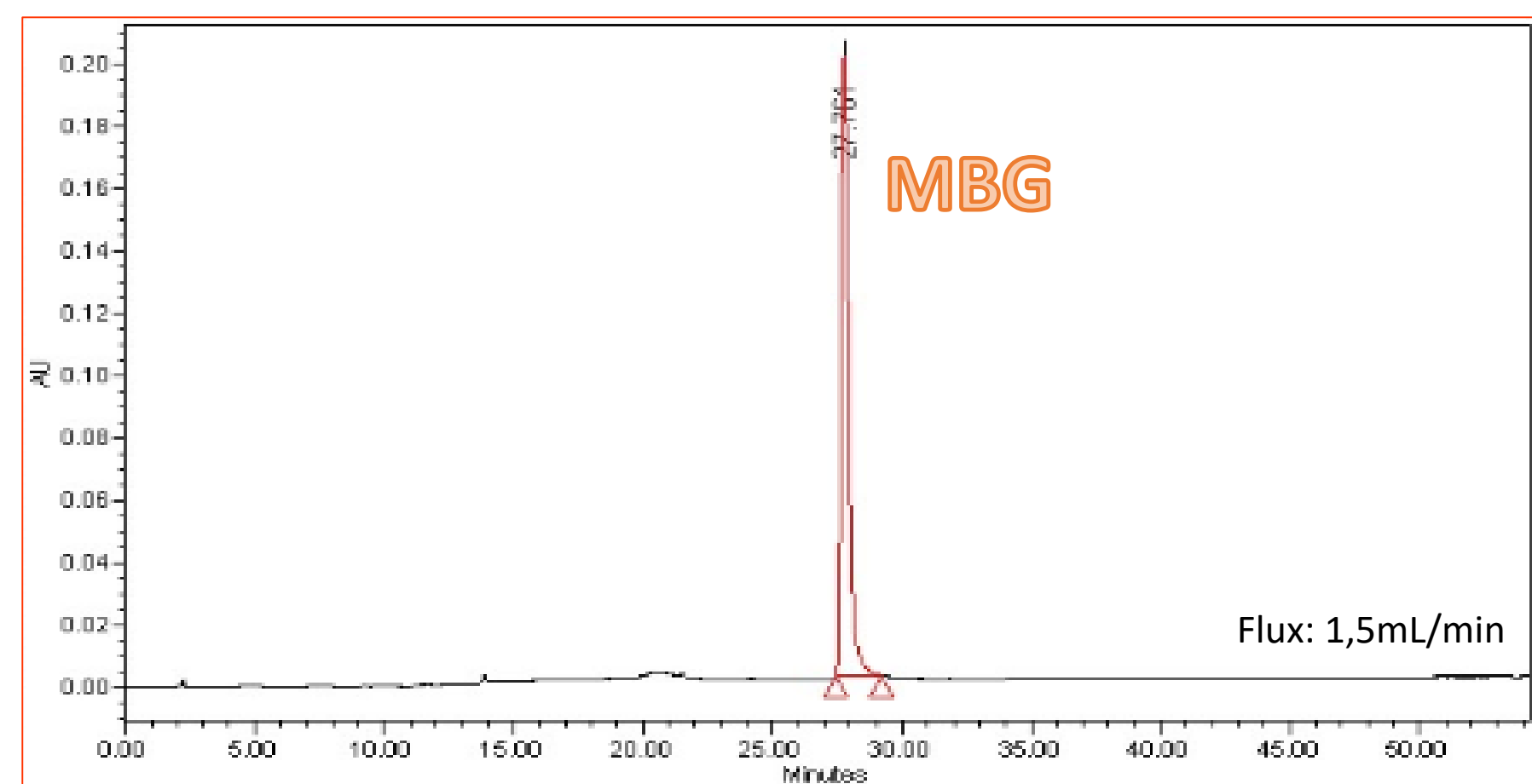
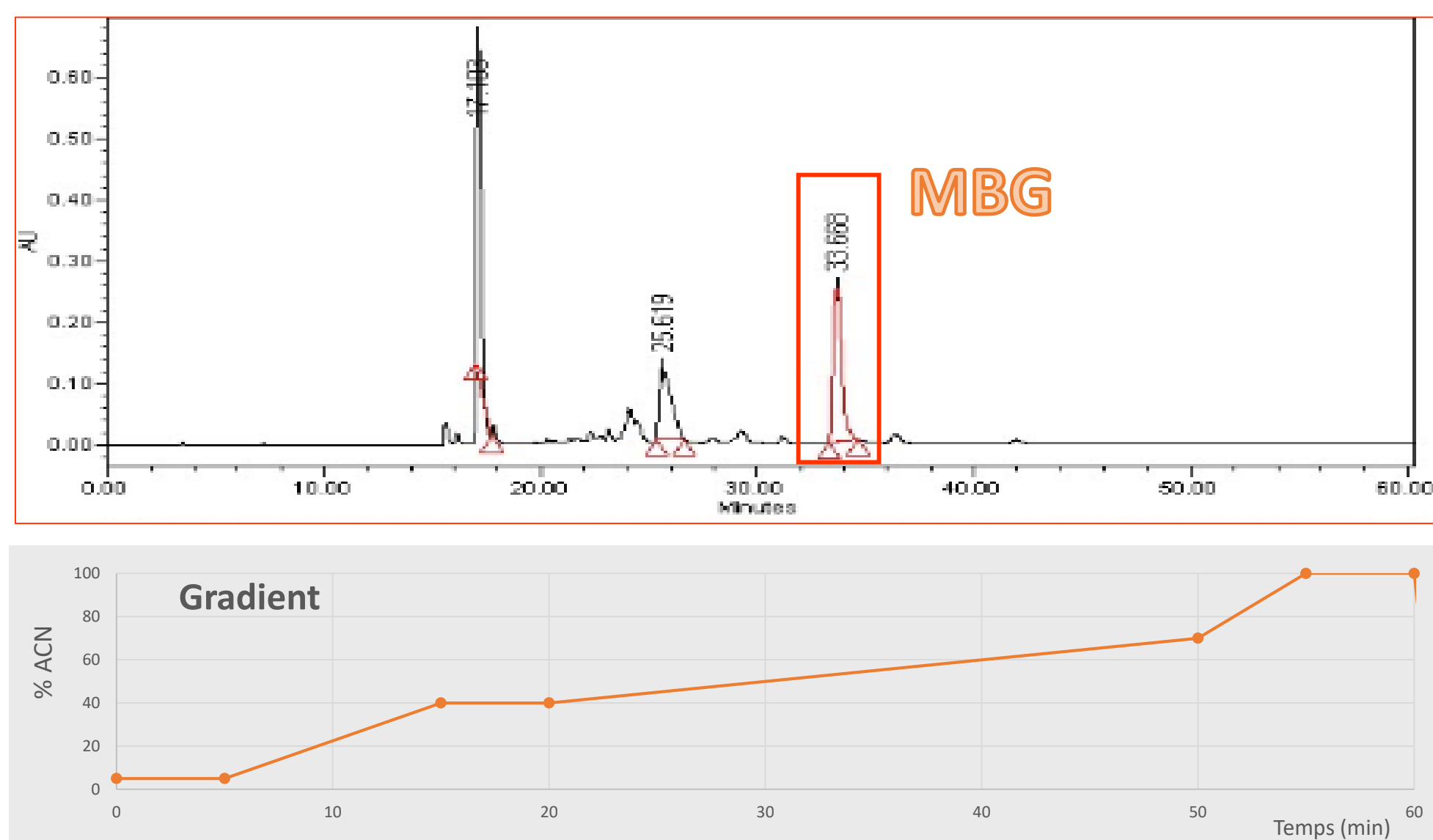


La MBG est isolée dans les deux cas. Cependant, de nombreux pics d'intensité variable sont présents dans le chromatogramme sans préparation par CCM, à l'inverse du chromatogramme après élution/purification par CCM. Ces différentes étapes permettent de purifier l'extrait du venin mais présentent un risque élevé de pertes et par conséquent diminuent la quantité finale de MBG récoltée.

2. Fractionnement direct par HPLC-UV

Conditions HPLC-UV	
Colonne	Atlantis dC18 (25 cm)
λ_{max} détection UV	296 nm
Phase mobile	Gradient eau/Ac formique 0,1% et ACN
Flux	1mL/min

Extrait brut dans
MeOH/Eau (50/50)

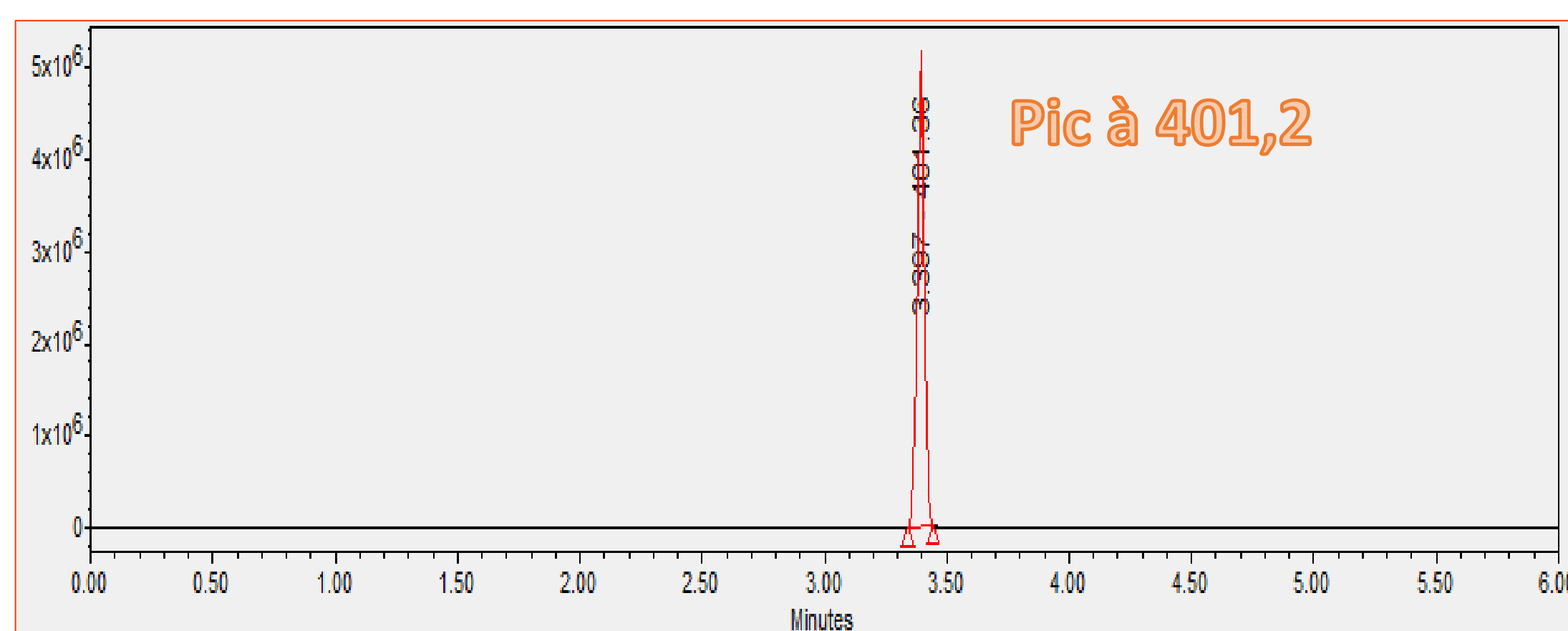
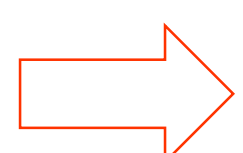


La modification des conditions chromatographiques (longueur de colonne; gradient d'élution) améliore la résolution et l'isolement du pic de la MBG et permet son fractionnement aisé. Le chromatogramme de cette fraction réinjectée montre le pic unique de la MBG.

Confirmation de l'identité

Les différents pics identifiés par leur Rt ont été récoltés manuellement ou par collecteur de fraction et analyses par UPLC-UV-Qda (Waters®), afin de confirmer leur identité. Rapport m/z de MBG = 401,2

Conditions HPLC-UV	
Colonne	BEH C18 2,1x100mm $\phi=1,7\mu\text{m}$
λ_{max} détection UV	296 nm
Phase mobile	Gradient eau/ Ac formique 0,1% et ACN
Flux	0,5mL/min



Conclusion

- L'extraction préliminaire permet d'isoler les composants du venin dont la MBG.
- Les différentes étapes de purification par CCM préparative permettent d'isoler la MBG mais entraînent des pertes. On observe également un phénomène de diffusion des spots d'intérêt sur la silice. Le rendement final est faible.
- Une méthode HPLC-UV couplée à un collecteur de fraction a été développée avec succès pour tenter de minimiser les pertes.
- Une fois la molécule isolée, l'identité de celle-ci est confirmée par spectrométrie de masse et RMN (non montré) et permet de disposer du standard de MBG afin de développer la méthode analytique de quantification.