

## Note

---

### Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG 400

#### Un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes

THIERRY BRASSEUR et LUC ANGENOT\*

*Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie, Université de Liège, Rue Fusch, 5, B-4000 Liège (Belgique)*

(Reçu le 4 octobre 1985)

C'est en 1957 que Neu<sup>1</sup> proposa l'emploi de complexes d'acides diarylboriques et d'oxyalkylamines comme réactifs des dérivés de la phényl-benzo- $\gamma$ -pyrone. Le réactif commercialisé est le diphénylborate d'aminoéthanol aussi appelé Naturstoffreagenz A, Natural Product Reagent A et Flavognost; il est notamment repris dans la Pharmacopée Européenne.

Les chromatogrammes pulvérisés par une solution de ce réactif et exposés aux UV longs (360 nm) laissent apparaître des fluorescences dépendant de la structure des composés mis en évidence<sup>2</sup>. Ce réactif est de plus en plus employé. Il est cependant possible d'en augmenter la sensibilité et la spécificité en pulvérisant ensuite une solution de polyéthylène glycol. Hiermann<sup>3</sup> et Wagner<sup>4</sup> utilisent le PEG 4000 en solution dans l'alcool tandis que Stahl<sup>5</sup> emploie le PEG 400 en solution dans le méthanol. Comme le PEG 4000 ne présente pas d'intérêt majeur par rapport au PEG 400, nous avons utilisé par commodité (solubilisation, pulvérisation), une solution méthanolique renfermant à la fois le diphénylborate d'aminoéthanol et le PEG 400<sup>6</sup>. Afin d'éclairer le chercheur et l'analyste, nous avons testé une série de flavonosides et de génines dans différents systèmes chromatographiques, les références sur ce sujet étant rares ou très incomplètes. Ces flavonoïdes, à deux exceptions près, sont tous substitués par deux hydroxyles en position 5 et 7, comme le sont la majorité des flavonoïdes. Notre étude s'attache ainsi à observer l'influence des substituants des cycles B et C et de l'absence ou présence de double liaison dans le cycle C.

Signalons finalement que ce réactif permet également la révélation d'autres composés tels que des acides phénols (acide caféique... des depsides (acide chlorogénique, cynarine...) et des dérivés anthraquinoniques (aloïnes, cascariosides...)<sup>7</sup>.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

##### *Matériel*

Plaques 20 × 20 cm de gel de silice 60 F 254 (Merck); plaques 20 × 20 cm de cellulose sans indicateur de fluorescence (Merck); papier Whatman 1.

##### *Réactifs*

Diphénylborate d'aminoéthanol pour analyse (Fluka); PEG 400 (U.C.B.).

*Systèmes utilisés*

(1) Gel de silice: acétone-butane-acide formique (10:7:1); migration, 12 cm. (2) Gel de silice: acétate d'éthyle-acide formique-eau (6:1:1), migration, 12 cm. (3) Gel de silice: benzène-acétate d'éthyle-acide formique (8:2:1); migration, 12 cm. (4) Cellulose: acide acétique (60%); migration, 15 cm. (5) Cellulose: chloroforme-acide acétique-eau (10:9:1); migration, 15 cm. (6) Cellulose: eau; migration, 12 cm. (7) Papier: eau; migration, 35 cm.

*Révélation*

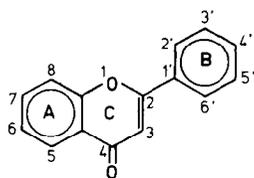
Après séchage rapide du chromatogramme (l'odeur d'acide formique ou acétique persiste), on pulvérise une solution méthanolique à 1% de diphénylborate d'aminoéthanol et à 5% de PEG 400 à raison de 10 ml environ pour une plaque 20 × 20 cm. On sèche dans un courant d'air froid et on observe à 360 nm immédiatement et après une demi-heure, certaines fluorescences apparaissant lentement ou se modifiant.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

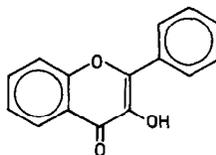
La présence de deux OH en position 5,7 n'est pas suffisante pour obtenir une fluorescence notable; un OH en 4' (apigénine) ou 3 (galangine) fait apparaître respectivement une fluorescence vert brun ou verte. Cette dernière n'est pas influencée par la présence d'un OH supplémentaire en 4' (kaempférol) ou 2' (datiscétine). La présence de deux OH en 3',4' fait apparaître une flavone en jaune (lutéoline) et un flavonol en orange (quercétine). Si les deux OH du cycle B d'un flavonol sont placés en meta l'un par rapport à l'autre, la fluorescence passe au vert. La présence de trois OH en 3',4',5' (myricétine) produit une fluorescence orange; on peut cependant distinguer la myricétine de la quercétine car la première apparaît en rouge en visible et

TABLEAU I  
COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES GÉNINES

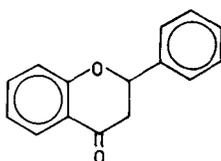
Génines	Substitution							
	3	5	6	7	2'	3'	4'	5'
Chrysin		OH		OH				
Apigénine		OH		OH			OH	
Acacétine	OH			OH			OCH <sub>3</sub>	
Lutéoline		OH		OH		OH	OH	
Galangine	OH	OH		OH				
Kaempférol	OH	OH		OH			OH	
Kaempféride	OH	OH		OH			OCH <sub>3</sub>	
Datiscétine	OH	OH		OH	OH			
Quercétine	OH	OH		OH		OH	OH	
Morine	OH	OH		OH	OH		OH	
Dihydroquercétine	OH	OH		OH		OH	OH	
Diméthyl-3,7 quercétine	OCH <sub>3</sub>	OH		OCH <sub>3</sub>		OH	OH	
Tetraméthyl-5,7,3',4' quercétine	OH	OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	
Fisétine	OH			OH		OH	OH	
Myricétine	OH	OH		OH		OH	OH	OH
Quercétagétine	OH	OH	OH	OH		OH	OH	



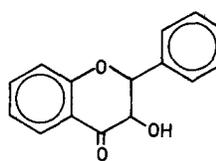
1. FLAVONE



2. FLAVONOL



3. FLAVANONE



4. DIHYDROFLAVONOL

la seconde en orange. Le rôle de la double liaison du cycle C est plus difficile à cerner faute de référence. On peut cependant dire que l'absence de la double liaison soit diminue l'intensité de la fluorescence (naringoside, hespéridoside) soit retarde son apparition (dihydroquercétine). Hiermann<sup>3</sup> qui utilise le PEG 4000 signale pour la chryisine une fluorescence violette. Nous avons réalisé cette expérience mais nous avons obtenu la même fluorescence qu'en utilisant le PEG 400. Par surcroît de précaution, nous avons réalisé les spectres UV de cette molécule: ils correspondent à ceux de la littérature<sup>8</sup>. D'autres fluorescences signalées par cet auteur nous semblent douteuses.

$R_f \times 100$							Fluorescences observées après révélation
1	2	3	4	5	6	7	
100	100	72	75	94	0	0	Brun
100	100	51	56	66	0	0	Vert brun
100	100	65	69	95	0	0	Vert brun
100	100	39	38	32	0	0	Jaune
100	100	73	60	92	0	0	Vert
100	100	58	36	47	0	0	Vert
100	100	67	54	92	0	0	Vert
100	100	43	74	83	38	10	Vert
100	100	43	23	17	0	0	Orange
100	92	24	56	37	20	0	Vert
100	100	30	67	27	30	27	
100	100	52	68	90	0	0	Orange
100	Trainée	31	62	98	0	0	Vert
100	100	40	36	28	0	0	Orange
100	100	38	13	4	0	0	Orange (rouge en visible)
22	42	27	18	2	0	0	Rouge foncé

TABLEAU II

## COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES HÉTÉROSIDES

Naringétine = trihydroxy-5,7,4' flavanone; hespérintine = méthyl-4' trihydroxy-5,7,3' flavanone.

	Génines	Glycosylation	$R_F \times 100$							Fluorescences observées après révélation
			1	2	3	4	5	6	7	
Astragaline	Kaempférol	Glucosyl-3	65	71	3	74	31	10	17	Vert
Rhamnoglucosyl-3 kaempférol	Kaempférol	Rhamnoglucosyl-3	35	45	0	77	27	23	31	Vert
Néohespéridosyl-7 kaempférol	Kaempférol	Néohespéridosyl-7	35	44	0	69	19	4	8	Vert vif
Robinoside	Kaempférol	Rhamnogalactosyl-3	16	20	0	84	22	47	58	Vert
		Rhamnosyl-7								
Hypéroside	Quercétine	Glactosyl-3	47	57	2	65	14	7	12	Orange
Isoquercitroside	Quercétine	Glucosyl-3	56	61	2	65	13	7	12	Orange
Quercitroside	Quercétine	Rhamnosyl-3	76	75	4	71	21	12	19	Orange
Rutine	Quercétine	Rutinosyl-3	23	35	0	70	12	20	28	Orange
Myricitroside	Myricétine	Rhamnosyl-3	67	67	2	63	8	13	18	Orange
Glucosyl-7 apigénine	Apigénine	Glucosyl-7	66	65	2	65	34	1	5	Vert
Apioside	Apigénine	Apioglucosyl-7	42	42	0	76	27	3	8	Vert
Glucosyl-7 lutéoline	Lutéoline	Glucosyl-7	55	60	2	48	12	0	1	Jaune orange
Isoorientine	Lutéoline	C-glucosyl-6	36	48	1	62	10	7	10	Jaune
Vitexine	Apigénine	C-glucosyl-8	69	64	2	53	14	2	7	Vert
Vitexine rhamnoside	Apigénine	C-glucosyl-8 rhamnosyl-4'	35	37	0	76	14	45	50	Vert
Naringoside	Naringétine	Rutinosyl-7	41	46	0	83	36	50	63	Verdâtre ou brunâtre*
Hespéridoside	Hespérintine	Rutinosyl-7	46	44	0	83	48	35	58	Verdâtre ou brunâtre*

\* Systèmes 6 et 7.

La méthylation ou la glycosylation de l'OH en position 3 des flavonols ne modifie pas la fluorescence. Par contre, la méthylation des OH du cycle B, supprime l'effet de ceux-ci: la tétraméthyl-5,7,3',4' quercétine fluorise en vert comme la galangine, l'hespéridoside comme la naringoside. Le kaempférol et le kampféride apparaissent en vert tous les deux car la seule présence de l'OH en 3 suffit pour faire apparaître cette fluorescence.

Le comportement chromatographique des génines (Tableau I) dans les systèmes 3, 4 et 5 est lié d'une part à l'hydroxylation de la molécule et d'autre part à la disposition de ces OH. D'une manière générale, plus la molécule est hydroxylée et moins elle migre. Les molécules hydroxylées en 2' et 2',4' migrent davantage que celles hydroxylées en 4' et 3',4'. Le système 5 a un excellent pouvoir de résolution pour les génines courantes (apigénine, lutéoline, kaempférol et quercétine). Il n'est malheureusement applicable qu'aux extraits dépourvus d'hétérosides car ceux-ci migrent également. Pour l'analyse d'extraits renfermant à la fois génines et hétérosides, le système 3 est seul valable. Dans le système 6, seuls la morine, la datiscétine et la dihydroquercétine migrent.

Le comportement des hétérosides (Tableau II) dans les systèmes 1 et 2 est, d'une part, conditionné par la nature de la génine (plus celle-ci est hydroxylée et moins l'hétéroside migre) et par la nature des sucres et leur nombre. Plus une molécule est chargée sucres et moins elle migre. Pour un même site de fixation des sucres, les  $R_F$  des hétérosides suivent ceux des sucres seuls chromatographiés dans les systèmes habituels:  $R_F$  rhamnose >  $R_F$  glucose >  $R_F$  galactose et  $R_F$  quercitroside >  $R_F$  isoquercitroside >  $R_F$  hypéroside. Le système 2 est le plus intéressant et ne donne pas de spots allongés.

En observant les  $R_F$  obtenus dans les deux derniers systèmes, on remarque que, s'ils sont globalement comparables, certains peuvent être bien différents (datiscétine, morine, hespéridoside). La chromatographie sur couche mince de cellulose est plus commode à utiliser et nécessite moins de solvants et de réactif de révélation: elle peut donc avantageusement remplacer la chromatographie sur papier dans la plupart des cas. Remarquons cependant que dans le domaine des flavonoïdes, celle-ci continue à être utilisée.

Signalons finalement que la sensibilité de détection du réactif testé pour la rutine avec le système 2 est de 30 ng environ pour des dépôts circulaires de 4 mm de diamètre. Sur plaque HPTLC, on peut arriver à 10 ng pour des dépôts de 3 mm de diamètre.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. Neu, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 181.
- 2 W. Wildanger et K. Herrmann, *J. Chromatogr.*, 76 (1973) 433.
- 3 A. Hiermann et Th. Kartnig, *J. Chromatogr.*, 140 (1977) 322.
- 4 H. Wagner, S. Bladt et E. M. Zgainski, *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, 1984, pp. 164 and 303.
- 5 E. Stahl et S. Juell, *Dtsch. Apoth. Z.*, 39 (1982) 1951.
- 6 Th. Brasseur et L. Angenot, *J. Pharm. Belg.*, 39 (1984) 15.
- 7 H. Wagner, S. Bladt et E. M. Zgainski, *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, 1984, pp. 102 et 104.
- 8 T. J. Mabry, K. R. Markham et M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, Berlin, 1970, spectrum 7.