

La troxérutine et la rutine sulfate sodique possèdent-elles encore les propriétés de la rutine ?

T. BRASSEUR*, L. ANGENOT*, J. PINCEMAIL et C. DEBY****

(*) *Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie,
5, rue Fusch, B 4000 Liège*

(**) *Laboratoire de Biochimie et de Radiobiologie, Institut de Chimie,
Sart Tilman, B 4000 Liège*

Do troxerutin and sodium rutin sulfate possess still rutin properties ?

T. BRASSEUR, L. ANGENOT, J. PINCEMAIL and C. DEBY. *Ann. Pharm. Fr.*, 1987, 45, 329-334.

SUMMARY. – *Rutin, sodium rutin sulfate and troxerutin were tested for their antiradicalar, antilipoperoxydant, antioxygen properties and for their activity on in vitro prostaglandin biosynthesis. In each test, rutin is more powerful than its derivatives. This fact results of free orthodiphenolic group (3'4' hydroxyls).*

La troxérutine et la rutine sulfate sodique possèdent-elles encore les propriétés de la rutine ?

T. BRASSEUR, L. ANGENOT, J. PINCEMAIL et C. DEBY. *Ann. Pharm. Fr.*, 1987, 45, 329-334.

RÉSUMÉ. – *Nous avons testé la rutine, la troxérutine et la rutine sulfate sodique pour leurs propriétés antiradicalaires, antilipoperoxydantes, antioxygènes et leur action sur la biosynthèse in vitro des prostaglandines. Nous avons toujours observé les activités suivantes : rutine > rutine sulfate sodique > troxérutine. Cette baisse d'activité s'explique par la substitution des hydroxyles situés en 3', 4'.*

INTRODUCTION

HISTORIQUE

Il faut remonter à 1936 pour retrouver l'origine de l'utilisation des flavonoïdes en thérapeutique. A cette époque, RUSZNYAK et SZENT-GYORGYI [15] observent que l'acide ascorbique est incapable de traiter des affections caractérisées par de la fragilité des capillaires ou une augmentation de leur perméabilité ; par contre, des préparations impures d'acide ascorbique (des extraits de paprika ou du jus de citron) viennent facilement à bout de cette

Manuscrit reçu le 10 juin 1986, accepté le 5 février 1987.

Tirés à part : T. BRASSEUR et L. ANGENOT, à l'adresse ci-dessus (*).

maladie. Un fractionnement de ces extraits montre que la fraction active est constituée de flavonoïdes ; administrés par voie intraveineuse chez l'Homme, ceux-ci restaurent en deux semaines une résistance capillaire normale : les saignements spontanés cessent, les parois capillaires perdent leur fragilité vis-à-vis des changements de pression et on n'observe plus de fuite de protéines plasmatiques sous l'augmentation de la pression veineuse. Ces chercheurs ont proposé de donner le nom de vitamine P à ces substances responsables de l'action sur la perméabilité capillaire.

SUBSTANCES UTILISÉES EN THÉRAPEUTIQUE

Parmi les préparations disponibles sur le marché, on trouve des anthocyanosides de myrtilles, des oligomères procyanidoliques de pépins de raisins, de la quercétine, de l'héspéridine (citroflavonoïde), de la diosmine (flavonoïde naturel reproduit par hémisynthèse à partir d'héspéridine [12]) et surtout de la rutine (ou rutoside : fig. 1). Flavonoïde très répandu dans le règne végétal, la rutine a d'abord été isolée de la Rue (*Ruta graveolens* L.), ce qui lui a valu son nom ; industriellement, on peut l'obtenir à partir des feuilles de Sarrasin (*Fagopyrum esculentum* Moench. : 2 à 8 % de rutine), des feuilles d'*Eucalyptus macrorhyncha* F. Muell. (environ 10 %) et des boutons floraux de *Sophora japonica* L. (15 à 20 %). La rutine est un médicament très utilisé, décrit dans diverses pharmacopées et employé notamment dans la prévention des accidents vasculaires de l'athérosclérose et de l'hypertension (rétinites, purpuras), dans les radiodermites et dans les troubles de la circulation veineuse (varices, hémorroïdes). Aux Etats-Unis, on l'a préconisée comme protecteur contre les radiations ionisantes [14]. Elle améliore également la vision des couleurs [10]. Les doses usuelles en sont de 20 mg trois fois par jour, associée ou non à de l'acide ascorbique.

La rutine est malheureusement peu soluble dans l'eau. Pour pallier cet inconvénient, on en a synthétisé des dérivés solubles quoiqu'il ne semble pas y avoir un rapport direct entre la résorption des flavonoïdes et leur solubilité dans l'eau [8]. Deux produits se trouvent sur le marché : la rutine sulfate

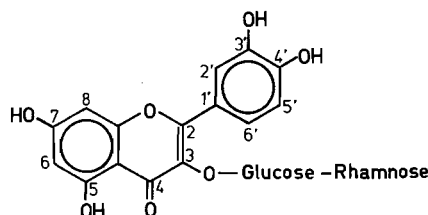


FIG. 1. — Rutine.

sous forme de sel sodique et la troxérutine (trihydroxyéthylrutine) appelée aussi vitamine P4 ou facteur P-Zyma du nom de la firme qui l'a synthétisée et commercialisée [17].

COMPOSITION DE LA TROXÉRUTINE ET DE LA RUTINE SULFATE SODIQUE

La chromatographie en couche mince suivie d'une révélation avec un réactif composé de diphénylborate d'aminoéthanol et de PEG 400 [1] montre que ces produits sont en fait des mélanges (fig. 2). La rutine présente une fluorescence orange caractéristique d'un flavonol possédant deux fonctions phénoliques libres en 3', 4'. La rutine sulfate contient encore de la rutine non modifiée dont la teneur a été évaluée à 6,2 % par CLHP. Le spot de fluorescence rougeâtre serait constitué de rutine substituée en 7 tandis que les deux spots qui l'entourent ont une fluorescence verte due à la disparition du groupement *ortho*-diphénolique libre. La troxérutine utilisée ne possède aucun spot fluorisant en orange : il ne reste qu'un spot fluorisant en vert et correspondant à la trihydroxyéthyl 7, 3', 4' rutine et un spot de fluorescence bleue constitué de tétrahydroxyéthyl 5, 7, 3', 4' rutine. Il n'y a donc pas de substance visible gardant de groupement *ortho*-diphénolique libre.

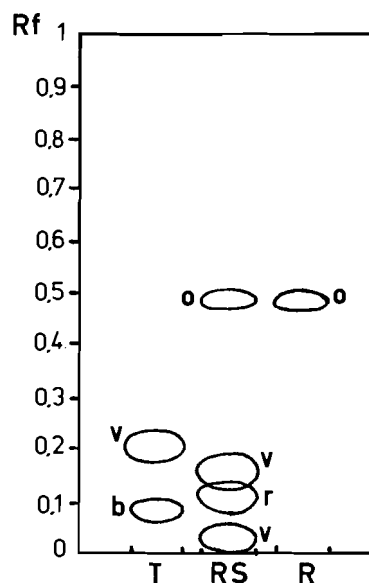


FIG. 2. — Chromatogramme. T : troxérutine. RS : rutine sulfate sodique. R : rutine. o : orange. b : bleu. v : vert. r : rougeâtre.

BUT DU TRAVAIL

Il nous a paru intéressant de vérifier si ces deux produits hémisynthétiques conservaient les propriétés de la molécule originale. Dans ce but, nous avons testé des activités importantes des flavonoïdes [6, 11]: action antiradicalaire, propriété antilipoperoxydante, activité antioxygène et modulation de la biosynthèse des prostaglandines *in vitro*. Nous ne donnerons pour chaque test que les résultats obtenus avec une seule concentration en flavonoïdes.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CCM

Phase stationnaire: gel de silice 60. Phase mobile: EtOAc-HCOOH-H₂O 6: 1: 1. Solutions à déposer réalisées à 1 % p/v dans le méthanol. Dépôts: 20 μ l pour les molécules hémisynthétiques et 5 μ l pour la rutine en trait de 10 mm. Migration: 6 puis 10 cm. Révélation par pulvérisation d'une solution méthanolique à 1 % p/v de diphénylborate d'aminoéthanol et à 5 % de PEG 400. Observation du chromatogramme à 360 nm. Seuls les spots principaux sont repris dans le chromatogramme.

Dosage de la rutine par HPLC

Colonne Merck Hibar® C₁₈ 5 μ m. 125-4 mm. Phase mobile: HOAc 10 % - MeOH 67: 33. Débit: 1,1 ml/mn. Détection: 257 nm; t₀: 1,16 mn; k' rutine: 2,54.

Substances utilisées

La rutine, la rutine sulfate sodique (Merck; PM moyen 763) et la troxérutine (Institut H. BEAUFOUR) sont dissoutes dans des solutions alcalines diluées et ajoutées aux différents systèmes décrits ci-dessous.

Action antiradicalaire contre le radical diphénylpicryl-hydrazyle (DPPH)

On ajoute à une solution tamponnée à pH 7 une solution méthanolique du radical (Fluka). Après 5 mn, on extrait le radical encore intact par du toluène. On centrifuge et on mesure l'absorbance de la solution violette à 517 nm [3]. Concentration en flavonoïdes: $3 \cdot 10^{-6}$ M.

Action antiradicalaire contre le radical hydroxyle

Une solution aqueuse d'acide méthylthio-4 oxo-2 butyrique (KMB 10^{-3} M; Sigma) de pH 7,4 est soumise à irradiation λ (10 Gy; ¹³⁷Cs) en vials scellés. L'éthylène formé par la réaction entre le KMB et les radicaux hydroxyles (OH $\cdot$) est quantifiée par CPG: colonne porapak T, t°: 100 °C, injecteur 160 °C, détecteur à ionisation de flamme: 180 °C; phase mobile: argon [4]. Concentration en flavonoïde: 10^{-4} M.

Action antilipoperoxydante

Un cycle d'autooxydation est initié et maintenu par incubation à pH 6,4 d'acide linoléique peroxydé (10^{-5} M), d'acide arachidonique (10^{-3} M), d'ions ferreux (10^{-4} M) et d'EDTA ($5 \cdot 10^{-5}$ M). Les lipoperoxydes formés sont dosés par une méthode à la diméthylparaphénylène-diamine [2]. Concentration en flavonoïdes: 10^{-3} M.

Action antioxygène

On incube pendant 20 mn à 37 °C une solution d'acide ascorbique tamponnée à pH 8,2. L'acide ascorbique résiduel est dosé par une méthode colorimétrique à l'acide tungstique [9] ; mesure à 710 nm. Concentration en flavonoïdes : 10^{-4} M.

Modulation de la biosynthèse des prostaglandines in vitro

On incube une suspension enzymatique (6 mg de protéines/ml) préparée à partir de vésicules séminales de taureau [4] avec de l'acide arachidonique marqué au 14 C (Amersham $7,5 \cdot 10^{-2}$ μ Ci/ml) en présence de glutathion (10^{-4} M) dans un tampon phosphate de pH 7,8. Après 10 mn, les prostanoïdes sont extraits par de l'éther diéthylique et séparés par CCM. Les spots marqués sont visualisés par autoradiographie et les spots de PGD₂ et PGE₂ sont élués ensemble automatiquement (Eluchrom). Le comptage de la radioactivité est réalisé à l'aide d'un Nuclear Chicago beta scintillator. Concentration en flavonoïdes : 10^{-3} M.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

TABLEAU I. – Résultats exprimés en %

	Rutine	R. sulfate	Troxérutine
Action contre le radical DPPH			
% de destruction du radical	36	7	0
100 % : teneur en DPPH du témoin			
Action contre le radical OH [•]			
% d'inhibition du dégagement d'éthylène	20	17	12
100 % : inhibition totale du dégagement d'éthylène			
Action antilipoperoxydante			
% d'inhibition de la formation de lipoperoxydes	25	2	0
100 % : inhibition totale de la lipoperoxydation			
Action antioxygène			
Teneur résiduelle en acide ascorbique exprimée en %	67	40	12
100 % : teneur initiale en acide ascorbique			
Action sur la biosynthèse des prostaglandines in vitro			
Stimulation de la biosynthèse exprimée en % du contrôle	248	186	141
100 % : contrôle : biosynthèse des prostaglandines en l'absence de flavonoïdes			

A la lecture du tableau I, nous voyons que dans tous les tests la rutine est la molécule la plus active ; vient ensuite la rutine sulfate sodique et finalement la troxérutine. Ces différences d'activités peuvent s'expliquer par le fait que le groupement *ortho*-diphénolique non substitué du cycle B est d'une importance primordiale pour la molécule. Dans le cas de la troxérutine, il n'y en a plus tandis qu'il y en a encore dans la rutine sulfate sodique. Certes, ces expériences

sont réalisées *in vitro* et peuvent ne pas être un reflet de l'activité *in vivo*. Des pharmacologues polonais ont cependant récemment confirmé ces résultats *in vivo* chez le Chat [16] : ils ont observé que l'action antiagrégante plaquettaire de la troxérutine était environ 15 fois moindre que celle de la rutine ; ils ont noté qu'elle était cependant encore plus active que l'aspirine. Un autre indice de la moindre activité de la troxérutine peut être tiré de l'observation des doses usuelles : 250 mg 3 à 4 fois par jour pour la troxérutine [13] contre 20 mg 3 fois par jour pour la rutine ; une molécule mieux résorbée et aussi active que la rutine devrait pouvoir être utilisée à des doses plus faibles, ce qui n'est pas le cas.

Cette baisse d'activité par rapport à la molécule originale semble peu à peu sensibiliser les chercheurs. On peut notamment citer HLADOVEC [7] qui utilise la monohydroxyéthyl-7 rutine dans un test de protection de l'endothélium vasculaire (alors qu'il est censé tester la troxérutine...) et GERDIN [5] qui teste l'action inhibitrice de cette même molécule sur l'augmentation de la perméabilité microvasculaire sous l'action de divers agents. L'avantage de cette molécule est de conserver 2 hydroxyles libres sur le cycle B. L'activité de la rutine sulfate ne semble pas liée à la seule présence de la rutine ; le dérivé sulfaté en 7 y participerait également. L'étude de dérivés substitués en 7 semble donc prometteuse. L'avenir nous le dira.

CONCLUSIONS

Notre but n'a pas été de mettre en doute les propriétés des dérivés synthétiques de la rutine, mais nous espérons avoir mis en exergue le risque de faire perdre à une molécule une partie de son activité en la modifiant dans le but louable et légitime d'en augmenter la solubilité et la biodisponibilité.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRASSEUR T. & ANGENOT L., *J. Chromatogr.*, 1986, 351-355.
- [2] DEBY C., DEBY-DUPONT G., HANS P., PINCEMAIL J., NEURAY J. & GOUTIER R., *Experientia*, 1983, 39, 1113-1115.
- [3] DEBY C. & MAGOTTEAUX G., *C.R. Soc. Biol.*, 1970, 164, 2675-2681.
- [4] DEBY C. & DEBY-DUPONT G., *Clin. Respir. Physiol.*, 1981, 17, suppl., 129-139.
- [5] GERDIN B. & SVENSJOE E., *Int. J. Microcirc., Clin. Exp.*, 1983, 2, 39-46 ; *Chem. Abst.*, 99, 47701 p.
- [6] HAVSTEEN B., *Biochem. Pharmacol.*, 1983, 32, 1141-1148.
- [7] HLADOVEC J. & PREROVSKY I., *International Congress and Symposium Series*, Academic Press, London, 1981, 42, 19-22.
- [8] KOZJEK F., DJORDJEVIC N., COMBIER H. & NETIEN G., *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon*, 1975, 19, 103-109.
- [9] KZAU A., *Clin. Chem. Acta*, 1978, 86, 153.
- [10] LAROCHE J. & LAROCHE C., *Ann. Pharm. Fr.*, 1977, 35, 173.
- [11] LETAN A., *J. Food. Sc.*, 1966, 31, 518-523.
- [12] LORETTE N., GAGE T. & WENDER S., *J. Org. Chem.*, 1951, 16, 930.
- [13] MARTINDALE, *The Extra Pharmacopoeia*, 28 Ed., The Pharmaceutical Press, London, 1982, 1767.
- [14] PARIS R. & MOYSE H., *Matière Médicale*, Masson Edit., Paris, Tome II, 2^e Ed., 1981, 128, 375 & 443.
- [15] RUSZNYAK S. & SZENT-GYORGYI A., *Nature*, 1936, 138, 27.
- [16] SWIES J., ROBAK J., DABROWSKI U., DUNIEC Z., MICHALSKA Z. & GRYGLEWSKI R.J., *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1984, 36, 455-463.
- [17] ZYMA S.A., Br. Patent, 833, 174, 21 apr. 1960 ; *Chem. Abst.*, 54, 21135i.