

CHROM. 18 256

## 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, cascarosides...)<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-butanone-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*

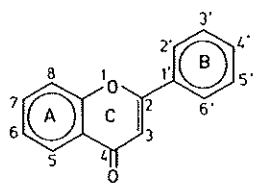
Après séchage rapide du chromatogramme (l'odeur d'acide formique ou acétique persiste), on pulvérise une solution méthanolique à 1% de diphenylborate d'α-aminoéthanol et à 5% de PEG 400 à raison de 10 ml environ pour une plaque 20 × 20 cm. On sèche dans un courant d'air froid et on observe à 360 nm immédiatement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

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

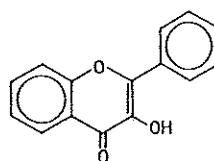
La présence de deux OH en position 5,7 n'est pas suffisante pour obtenir une fluorescence notable; un OH en 4' (apigénine) ou 3 (galangine) fait apparaître respectivement une fluorescence vert brun ou verte. Cette dernière n'est pas influencée par la présence d'un OH supplémentaire en 4' (kaempférol) 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

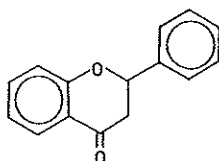
| Génines                          | Substitution     |                  |    |                  |    |    |                  |                  |
|----------------------------------|------------------|------------------|----|------------------|----|----|------------------|------------------|
|                                  | 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               |    |    |                  | OH               |
| Kaempférol                       | OH               | OH               |    | OH               |    |    |                  | OCH <sub>3</sub> |
| Kaempféride                      | OH               | OH               |    | OH               | OH |    |                  |                  |
| Datiscétine                      | OH               | OH               |    | OH               | OH |    | OH               | OH               |
| Quercétine                       | OH               | OH               |    | OH               | OH |    | OH               | OH               |
| Morine                           | OH               | OH               |    | OH               | OH | OH | OH               | OH               |
| Dihydroquercétine                | OH               | OH               |    | 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               |
| Quercétagétine                   | OH               | OH               | OH | OH               |    |    | OH               | OH               |



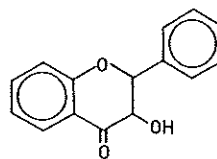
1. FLAVONE



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

|                              | Génines     | Glycosylation                | $R_F \times 100$ |    |   |    |    |    |    | Fluorescences observées<br>après révélation |
|------------------------------|-------------|------------------------------|------------------|----|---|----|----|----|----|---|
|                              |             |                              | 1                | 2  | 3 | 4  | 5  | 6  | 7  |   |
| Astragaline                  |             |                              | 65               | 71 | 3 | 74 | 31 | 10 | 17 | Vert  |
| Rhamnoglucosyl-3 kaempférol  | Kaempférol  | Glucosyl-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  | Rhamnoglactosyl-3            | 16               | 20 | 0 | 84 | 22 | 47 | 58 | Vert  |
| Hypéroside                   | Quercétine  | Rhamnosyl-7                  | 47               | 57 | 2 | 65 | 14 | 7  | 12 | Orange                                      |
| Isoquercitroside             | Quercétine  | Galactosyl-3                 | 56               | 61 | 2 | 65 | 13 | 7  | 12 | Orange                                      |
| Quercitroside                | Quercétine  | Glucosyl-3                   | 76               | 75 | 4 | 71 | 21 | 12 | 19 | Orange                                      |
| Rutine                       | Quercétine  | Rhamnosyl-3                  | 23               | 35 | 0 | 70 | 12 | 20 | 28 | Orange                                      |
| Myricitroside                | Myricétine  | Rutinoyl-3                   | 67               | 67 | 2 | 63 | 8  | 13 | 18 | Orange                                      |
| Glucosyl-7 apigénine         | Apigénine   | Rhamnosyl-7                  | 66               | 65 | 2 | 65 | 34 | 1  | 5  | Vert  |
| Apioside                     | Apigénine   | Apio-glucosyl-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<br>rhamnosyl-4' | 35               | 37 | 0 | 76 | 14 | 45 | 50 | Vert  |
| Naringoside                  | Naringétine | Rutinoyl-7                   | 41               | 46 | 0 | 83 | 36 | 50 | 63 | Verdâtre ou brunâtre*                       |
| Hespéridoside                | Hespéretine | Rutinoyl-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 kampfériol 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.