

CHROM. 20 173

Note

Dosage densitométrique d'hétérosides de la quercétine dans les extraits végétaux

THIERRY BRASSEUR, JEAN-NOEL WAUTERS et LUC ANGENOT*

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

(Reçu le 10 septembre 1987; manuscrit modifié reçu le 14 novembre 1987)

Qu'il s'agisse d'un dosage total ou du dosage de certaines substances seulement, la quantification des flavonoïdes reste une opération délicate. Contrairement à beaucoup d'autres molécules naturelles, comme par exemple les acides aromatiques, alcaloïdes, composés volatiles de plantes à huiles essentielles, anthraquinones et naphthoquinones, etc. les flavonoïdes ne peuvent généralement pas être extraits sélectivement. Dès lors, leur dosage risque de subir des interférences dues à d'autres molécules.

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) connaît un succès croissant et est utilisée dans des domaines de plus en plus variés. Dans le domaine des flavonoïdes cependant, les publications relativement peu nombreuses, sont intéressantes davantage pour leur aspect qualitatif que quantitatif, compte-tenu du problème signalé plus haut. C'est ainsi que Galensa et Hermann¹ ont réussi à séparer sur silice des flavonoïdes préalablement acétylés. Cette technique est utile pour l'identification de flavonoïdes mais pas pour leur quantification. A l'heure actuelle, les colonnes de silice tendent à être supplantées par des colonnes de silice greffée^{2,3}. McMurrrough⁴ est parvenu à séparer quelques hétérosides de quercétine sur RP-18 mais ne teste pas d'hétérosides de kaempférol bien que ces derniers accompagnent souvent ceux de la quercétine. Vande Castele *et al.*² ont réalisé une remarquable publication en testant la séparation de 141 flavonoïdes sur RP-18. La rhamnoglucosyl-3 quercétine (rutine) est malheureusement mal séparée de la glucosyl-3 quercétine (isoquercitrin). La même année, Daigle et Conkerton⁵ ont testé la séparation de 34 flavonoïdes sur RP-18 également mais ne sont pas parvenus à améliorer la séparation de la rutine et de l'isoquercitrin. McMurrrough et Hennigan³, peu après, parvinrent à optimiser la séparation sur RP-8 mais ne teste que quelques composés. La comparaison avec la technique de Vande Castele *et al.*² est donc difficile. Harborne et Boardley⁶, plus récemment, ont testé la séparation de 40 flavonoïdes sur colonne RP-8, celle-ci donnant de meilleurs résultats que les colonnes RP-18; les pics de rutine et d'isoquercitrin restent cependant proches. Une simple séparation sur papier en utilisant de l'eau comme phase mobile semble plus efficace. Toutes ces techniques malgré certaines imperfections constituent néanmoins un atout sérieux pour l'identification de flavonoïdes. Par contre, l'intérêt quantitatif de ces méthodes est moins évident. Cet aspect n'est cité que par McMurrrough⁴ qui constate, lors d'une analyse de cônes de houblon, que de nombreux petits pics incomplètement

résolus se mêlent aux pics principaux. Ces pics de nature indéterminée ainsi que ceux superposés aux pics principaux constituent un bruit de fond qu'il est indispensable d'évaluer si on veut procéder à un dosage correct des composés. Cette détermination du bruit de fond est impossible en HPLC. La chromatographie sur couche mince présente un avantage considérable sur l'HPLC car il est possible de révéler certains composés spécifiquement. Schmid⁷ a réussi à doser certains flavonoïdes isolés notamment en mesurant leur fluorescence après pulvérisation de trichlorure d'aluminium ou de diphénylborate d'aminoéthanol. Malheureusement, il n'a pas testé sa technique sur des extraits végétaux et n'a pas vérifié si les hétérosides du kaempférol n'interfèrent pas avec le dosage des hétérosides de la quercétine. De surcroît, le problème du bruit de fond n'a pas été traité.

La technique proposée ici permet de doser spécifiquement des hétérosides de la quercétine en les révélant par un mélange de diphénylborate d'aminoéthanol et de PEG 400⁸. Les hétérosides du kaempférol ne produisent pas d'interférence. Ce réactif qui permet de faire fluoriser des flavonoïdes sous l'action des UV longs, fait également apparaître les hétérosides de la quercétine en orange ou rouge orangé (suivant la structure du composé) en lumière visible. Cette technique a été appliquée avec succès au dosage des principaux hétérosides des feuilles de *Strychnos variabilis*^{9,10}: galactosyl-3 quercétine (coloration orange), robinobiosyl-3 quercétine (coloration orange) et (*p*-coumaroyl-4") robinobiosyl-3 glucosyl-7 quercétine (coloration rouge orange). La séparation de la rhamnogalactosyl-3 quercétine et de la galactosyl-3 quercétine est excellente alors que la séparation des analogues structuraux (rhamnoglucosyl-3 quercétine et glucosyl-3 quercétine) posait des problèmes en HPLC².

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel

Densitomètre Vitatron[®] muni d'un filtre de 533 nm; largeur de balayage: 12 et 18 mm. L'enregistrement des signaux et leur intégration ont été obtenus par un intégrateur Hewlett-Packard 3390 A[®]. Les chromatographies sont réalisées sur plaques de verre de gel de silice 60 F 254 Merck[®].

Chromatographie

Les chromatogrammes sont développés sur 14 cm dans le système acétate d'éthyle-acide formique-eau (6:1:1). Les dépôts sont réalisés en triple: 5 μ l pour l'extrait de *S. variabilis* et trois volumes différents (3, 4 et 5 μ l) pour la solution étalon. La révélation est assurée par pulvérisation, jusqu'à saturation du gel de silice, d'une solution méthanolique à 1% de diphénylborate d'aminoéthanol et à 5% de PEG 400.

Extrait de feuilles de S. variabilis

5,0 g de poudre (tamis 0,3 mm) sont agitées pendant 1 h avec 50,0 ml de méthanol dans un flacon bouché émeri. On laisse reposer une nuit puis on filtre. 10 ml de filtrat correspondent à 1 g de poudre de feuilles.

Solution étalon

Solution méthanolique renfermant par 10 ml: 5,58 mg galactosyl-3 quercétine, 6,27 mg de robinobiosyl-3 quercétine et 5,48 mg de (*p*-coumaroyl-4") robinobiosyl-3 glucosyl-7 quercétine.

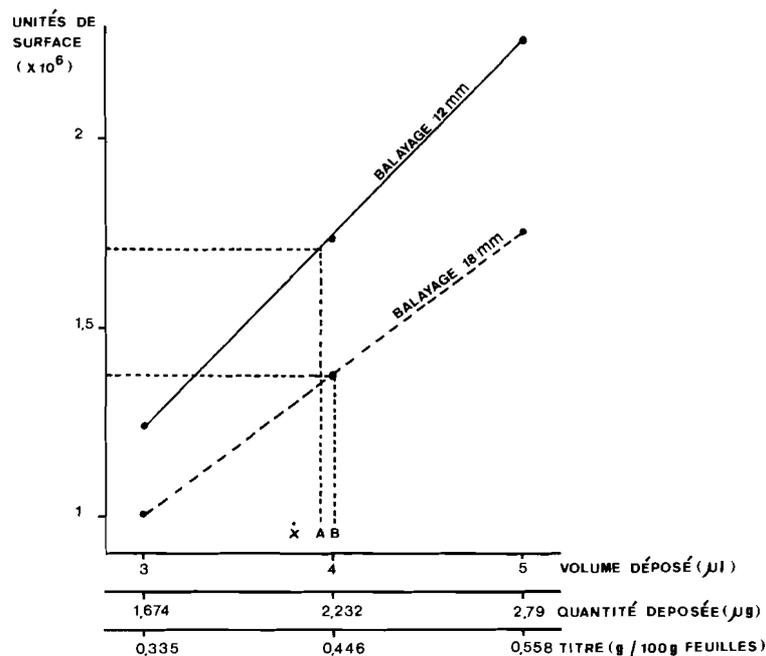


Fig. 1. Dosage de la galactosyl-3 quercétine (essai 1). Détermination du bruit de fond (voir Partie Expérimentale).

Détermination du bruit de fond

On réalise d'abord une mesure en utilisant un balayage transversal de 12 mm et on obtient le résultat A. On réalise 1-s mesure avec une largeur de balayage portée à 18 mm; on obtient un résultat B supérieur au résultat A. La différence entre B et A représente la valeur du bruit de fond pour un balayage de 6 mm. La première mesure ayant été réalisée avec un balayage de 12 mm, le titre réel de l'échantillon (X) est donné par l'équation suivante: $X = A - 2(B - A)$ (Fig. 1).

TABLEAU I

RÉSULTATS DU DOSAGE DES FEUILLES DE *STRYCHNOS VARIABILIS*

Composé et R_f	Largeur de balayage (mm)	Coefficient de corrélation	Titre provisoire*	Bruit de fond*	Titre corrigé*
Galactosyl-3 quercétine (0,6)	12	0,9986	0,449	0,024	0,42
	18	0,9986	0,461		
Robinobiosyl-3 quercétine (0,35)	12	0,9997	0,587	0,072	0,51
	18	0,9997	0,623		
(4"-p-Coumaroyl) robinobiosyl-3 glucosyl-7 quercétine (0,23)	12	0,9997	0,503	0,078	0,42
	18	0,9999	0,542		

* Résultats exprimés en g/100 g de poudre de feuille.

TABLEAU II
PRÉCISION CHROMATOGRAPHIQUE

<i>Composé</i>	<i>Surface moyenne (unités de surface)</i>	<i>Déviat ion standard (unités de surface)</i>	<i>Déviat ion standard relative (%)</i>
Galactosyl-3 quercétine	19 719	450	2,3
Robinobiosyl-3 quercétine	20 763	189	0,9
(4''-p-Coumaroyl) robinobiosyl-3 glucosyl-7 quercétine	14 445	182	1,3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Linéarité

Les courbes d'étalonnage présentent une bonne linéarité comme le montrent les coefficients de corrélation calculés par régression linéaire (Tableau I).

Précision chromatographique

La précision chromatographique a été obtenue en réalisant huit dépôts de 4 μ l de la solution étalon et en mesurant les surfaces pour chacun des composés à doser (Tableau II).

Reproductibilité des extractions

La reproductibilité des extractions a été obtenue en comparant trois solutions extractives. Chaque solution a fait l'objet de trois dépôts de 5 μ l et les surfaces ont été mesurées pour chacun des composés à doser (Tableau III).

En observant les résultats (Tableau II) nous constatons que le bruit de fond varie selon que l'on se trouve dans le bas ou le haut du chromatogramme. Il est donc nécessaire de l'évaluer pour chaque substance dosée.

Par la révélation sélective des composés à doser et par la possibilité d'une détermination correcte du bruit de fond, la densitométrie présente un atout particulier face à la HPLC dans le domaine du dosage d'extraits végétaux.

TABLEAU III
REPRODUCTIBILITÉ DES EXTRACTIONS

<i>Composé</i>	<i>Surface moyenne</i>			<i>Moyenne des essais</i>	<i>Variation standard</i>	<i>Variation standard relative (%)</i>
	<i>Essai 1</i>	<i>Essai 2</i>	<i>Essai 3</i>			
Galactosyl-3 quercétine	11 270	11 627	11 680	11 526	223	1,9
Robinobiosyl-3 quercétine	15 271	15 834	15 988	15 698	377	2,4
(4''-p-Coumaroyl) robinobiosyl-3 glucosyl-7 quercétine	17 038	17 237	17 477	17 251	220	1,3

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. Galensa et K. Herrmann, *J. Chromatogr.*, 189 (1980) 217-224.
- 2 K. Vande Castele, H. Geiger et C. F. Van Sumere, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 81-94.
- 3 I. McMurrrough et G. P. Hennigan, *J. Chromatogr.*, 258 (1983) 103-109.
- 4 I. McMurrrough, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 683-693.
- 5 D. J. Daigle et E. J. Conkerton, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 202-205.
- 6 J. B. Harborne et M. Boardley, *J. Chromatogr.*, 299 (1984) 377-385.
- 7 P. P. S. Schmid, *J. Chromatogr.*, 157 (1978) 217-225.
- 8 T. Brasseur et L. Angenot, *J. Chromatogr.*, 351 (1986) 351-355.
- 9 T. Brasseur et L. Angenot, *Phytochemistry*, 25 (1986) 563-564.
- 10 T. Brasseur et L. Angenot, *Phytochemistry*, 26 (1987) 3331-3334.