

UN REACTIF DE CHOIX POUR LA REVELATION DES FLAVONOIDES: LE MELANGE DIPHENYLBORATE D'AMINOETHANOL - PEG 400

Th. BRASSEUR et L. ANGENOT

Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie
Université de Liège, 5, rue Fusch, B-4000 LIEGE - BELGIQUE



MOTS-CLES. Flavonoïdes, Diphénylborate d' aminoéthanol, Révélation.

INTRODUCTION

Les chromatogrammes pulvérisés par ce réactif et exposés aux UV longs (360 nm) laissent apparaître des fluorescences dépendant de la structure des composés mis en évidence; cette observation associée à celle du comportement chromatographique, aide le chercheur dans l'élucidation de structure de flavonoïdes.

MATERIEL ET METHODES

Matériel: Plaques 20 x 20 cm de gel de silice 60 F 254 Merck
Plaques 20 x 20 cm de cellulose sans indicateur de fluorescence
Papier Whatman 1

Réactif: Solution méthanolique à 1 % p/v de diphénylborate d' aminoéthanol (Fluka) et à 5 % de PEG 400 (UCB)

Systèmes utilisés:

1. Gel de silice:	$\text{Me}_2\text{CO}-\text{EtMeCO}-\text{HCOOH}$	10:7:1	Migration:	12 cm
2. Gel de silice:	$\text{EtOAc}-\text{HCOOH}-\text{H}_2\text{O}$	6:1:1	"	12 cm
3. Gel de silice:	$\text{C}_6\text{H}_6-\text{EtOAc}-\text{HCOOH}$	8:2:1	"	12 cm
4. Cellulose	: HOAc 60 %		"	15 cm
5. Cellulose	: $\text{CHCl}_3-\text{HOAc}-\text{H}_2\text{O}$	10:9:1	"	15 cm
6. Cellulose	: H_2O		"	12 cm
7. Papier	: H_2O		"	35 cm

Révélation: Après séchage rapide du chromatogramme (l'odeur d'acide formique ou acétique persiste), on pulvérise le réactif à raison de 10 ml environ pour une plaque de 20 x 20 cm. On sèche et on observe à 360 nm immédiatement et après une demi-heure, certaines fluorescences apparaissant lentement ou se modifiant.

RESULTATS 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. Celle-ci 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 la lutéoline en jaune et la quercétine en orange. Si les deux OH du cycle B d'un flavonol sont placés en meta, la fluorescence passe au vert. La présence de trois OH en 3', 4', 5' (myricétine) produit une fluorescence orange et une coloration rouge en visible. L'absence de double liaison dans le cycle C, soit diminue l'intensité de la fluorescence (naringoside, hespéridoside) soit retarde son apparition (dihydroquercétine); le glucosyl-7 ériodictyol testé récemment (génine : tetrahydroxy-5,7,3',4' flavanone) présente un comportement curieux et caractéristique: ce n'est qu'après une demi-heure environ qu'il commence à fluoriser en rouge et à apparaître en mauve en lumière visible. La méthylation ou la glycosylation de l'OH en 3 des flavonols ne modifie pas la fluorescence. Par contre, la méthylation des OH du cycle B, supprime l'effet de ceux-ci: la tetraméthyl-5,7,3', 4' quercétine fluorise en vert comme la galangine, l'hespéridoside comme le naringoside. D'autres types de flavonoïdes peuvent également être révélés: il en est ainsi de la maréine (chalcone) et de la maritiméine (aurone) qui fluorisent respectivement en bordeaux et rouge-orange et apparaissent en violet-mauve et rouge en lumière visible (la révélation de l'aurone en lumière visible semble moins sensible); ces molécules possèdent toutes deux un groupement orthodiphénolique sur le cycle B.

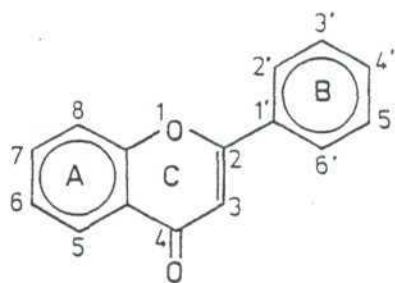
Le comportement chromatographique des génines dans les systèmes 3, 4 et 5 est lié à la fois à l'hydroxylation de la molécule et à la disposition de ces OH. En général, plus la molécule est hydroxylée et moins elle migre. Les molécules hydroxylées en 2' et 2',4' migrent davantage que celles hydroxylées en 4' et 3', 4'. Le système 5 a un excellent pouvoir de résolution pour les génines courantes mais n'est malheureusement applicable qu'aux extraits dépourvus d'hétérosides car ceux-ci migrent également. En cas de présence d'hétérosides, le système 3 est seul valable. Dans le système 6, seules la morine, la datiscétine et la dihydroquercétine migrent.

Le comportement des hétérosides dans les systèmes 1 et 2 est 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 en sucres et moins elle migre. Pour un même site de fixation des sucres, les Rf des hétérosides suivent ceux des sucres seuls chromatographiés dans les systèmes habituels: Rf rhamnose > Rf glucose > Rf galactose et Rf quercitroside > Rf isoquercitroside > Rf hypéroside. Le système 2 est le plus intéressant et ne donne pas de spots allongés.

CONCLUSION

Par les fluorescences et colorations variées qu'il donne, ce réactif est très utile au chercheur et comme il est également capable de révéler d'autres composés tels des acides phénols, des depsides etc... il constitue pour le pharmacographe et le pharmacien d'industrie un réactif de choix pour l'identification des drogues végétales et la recherche de leurs falsification.

BIBLIOGRAPHIE: BRASSEUR Th. et coll. (1986) J. Chromatogr., 351,351-355.



FLAVONE

COMPORTEMENT DES GENINES

Génines	Substitution								Rf x 100							Fluorescences observées après révélation
	3	5	6	7	2'	3'	4'	5'	1	2	3	4	5	6	7	
Chrysrine		OH		OH					100	100	72	75	94	0	0	brun
Apigénine		OH		OH			OH		100	100	51	56	66	0	0	vert brun
Acacétine	OH			OH			OCH ₃		100	100	65	69	95	0	0	vert brun
Lutéoline		OH		OH		OH	OH		100	100	39	38	32	0	0	jaune
Galangine	OH	OH		OH					100	100	73	60	92	0	0	vert
Kaempférol	OH	OH		OH			OH		100	100	58	36	47	0	0	vert
Kaempféride	OH	OH		OH			OCH ₃		100	100	67	54	92	0	0	vert
Datiscétine	OH	OH		OH	OH				100	100	43	74	83	38	10	vert
Quercétine	OH	OH		OH		OH	OH		100	100	43	23	17	0	0	orange
Morine	OH	OH		OH	OH		OH		100	92	24	56	37	20	0	vert
Dihydroquercétine	OH	OH		OH		OH	OH		100	100	30	67	27	30	27	orange apparaissant lentement
Diméthyl-3,7 quercétine	OCH ₃	OH		OCH ₃		OH	OH		100	100	52	68	90	0	0	orange
Tetraméthyl-5,7,3',4' quercétine	OH	OCH ₃		OCH ₃		OCH ₃	OCH ₃		100	100	31	62	98	0	0	vert
Fisétine	OH			OH		OH	OH		100	100	40	36	28	0	0	orange
Myricétine	OH	OH		OH		OH	OH	OH	100	100	38	13	4	0	0	orange (rouge en visible)
Quercétagétine	OH	OH	OH	OH		OH	OH		22	42	27	18	2	0	0	rouge foncé

COMPORTEMENT DES HETEROSIDES

	Génines	Glycosylation	Rf x 100							Fluorescences observées après révélation
			1	2	3	4	5	6	7	observées
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	Rhamnoglucosyl-3	16	20	0	84	22	47	58	vert
Hypéroside	Quercétine	Rhamnosyl-7 Galactosyl-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 ^a	Rutinosyl-7	41	46	0	83	36	50	63	verdâtre ou brunâtre ^c
Hespéridoside	Hespéretine ^b	Rutinosyl-7	46	44	0	83	48	35	58	verdâtre ou brunâtre ^c

^aNaringétine: trihydroxy-5,7,4' flavanone^cSystemes 6 et 7^bHespéretine: méthyl-4' trihydroxy-5,7,3' flavanone