

CHROM. 6072

DOSAGE DENSITOMÉTRIQUE DIRECT PAR RÉFLEXION DES FLAVONOÏDES DE LA GAUDE (*Reseda luteola L.*) SÉPARÉS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

A. JACQUIN-DUBREUIL

Département de Matière Médicale et Botanique, Faculté de Médecine et Pharmacie, 80 Amiens (France)

(Reçu le 14 février 1972; manuscrit modifié reçu le 5 avril 1972)

SUMMARY

*Direct densitometric determination by absorption of flavonoids of the yellow-weld (*Reseda luteola L.*) separated by thin-layer chromatography*

This paper describes a method for the determination of the flavonoids of the yellow-weld (*Reseda luteola L.*) by analysis of ethanolic extracts of the different parts of the plant on cellulose thin layers, followed by measurement of the intensity of ultra-violet absorption. Standard curves have been established for each of the following flavonoids: luteolin, luteolin 7-O-glucoside, and luteolin diglucoside. The optimum ranges for measurements are: 0.17–0.85 µg for luteolin, 0.17–1.50 µg for luteolin 7-O-glucoside, and 0.20–1.0 µg for luteolin diglucoside.

The observed variation factors are less than $\pm 6\%$. The method permits the separate determination of each of the flavonoids found in the different parts of the yellow-weld with satisfactory precision.

INTRODUCTION

La Gaude (*Reseda luteola L.*) renferme un certain nombre de composés flavoniques. À côté du lutéolol, signalé depuis longtemps^{1,2}, PARIS a caractérisé le 7-mono-glucoside du lutéolol ou "lutéoloside"³, et nous mêmes avons isolé et identifié un glucoside du lutéoloside ou "glucolutéoloside"⁴ et le 7-monoglucoside de l'apigénol⁵.

La chromatographie sur papier nous a permis de mettre en évidence une très inégale répartition de ces composés flavoniques dans les divers organes de la Gaude⁶. Aussi, dans le cadre général de l'étude de la formation de ces substances et de leur rôle dans le métabolisme des végétaux, nous a-t-il semblé intéressant de suivre l'évolution respective de chacun des flavonoïdes dans les divers organes de la plante, en la précisant par des données pondérales. Pour cela il était nécessaire de posséder une

technique de dosage précise, suffisamment simple pour pouvoir s'appliquer en série aux extraits complexes, que l'on peut facilement préparer par épuisement de la plante par un solvant convenablement choisi.

CHOIX D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DES FLAVONOÏDES

Diverses méthodes de dosage des flavonoïdes sont couramment employées, basées soit sur leurs propriétés physiques: techniques fluorométriques⁷ et spectro-photométriques⁸, soit sur la présence de fonctions phénoliques qui permettent la formation de dérivés colorés se prêtant à des mesures⁹: les chélates obtenus avec des sels d'aluminium sont les plus fréquemment utilisés, soit encore sur leurs propriétés réductrices vis-à-vis de solutions de phosphomolybdate et de tungstate de sodium¹⁰ ou de ferricyanure ferrique¹¹.

Tous ces procédés de dosage sont largement utilisés par les différents auteurs, qui, selon les conditions dans lesquelles ils les emploient, obtiennent des informations plus ou moins complètes: s'ils les appliquent à des extraits végétaux simplement purifiés, qui sont, à de rares exceptions près¹², des mélanges de flavonoïdes, ils procèdent seulement à une évaluation globale du contenu flavonique du matériel étudié^{10,13-17}. Dans le cas particulier où une aglycone et un de ses hétérosides sont les seuls composés flavoniques de la solution à doser, les teneurs respectives ont été obtenues en comparant les résultats avant et après hydrolyse¹⁸.

Dans tous les autres cas, l'estimation singulière d'un ou de plusieurs flavonoïdes présents dans le matériel étudié doit être précédée d'une séparation de ceux-ci. À ces fins les techniques chromatographiques, sur papier ou sur couche mince, ont été abondamment utilisées. Il s'agit ensuite d'appliquer aux différents composés isolés l'un des procédés de dosage rapportés ci-dessus.

On peut alors choisir entre deux types de méthodes: la première consiste à d'abord séparer chaque substance isolée du support sur lequel elle est adsorbée¹⁹⁻²⁰. Elle oblige à procéder à de nombreuses manipulations intermédiaires, longues, fastidieuses et sources d'erreurs, par excès lorsque le solvant d'élution entraîne, avec le pigment flavonique, des impuretés qui absorbent la lumière aux mêmes longueurs d'onde que lui, par défaut lorsque la récupération de la substance à doser est incomplète^{20,21,27}. De plus, il faut noter qu'il est très difficile de sélectionner un seul et même solvant satisfaisant, à la fois, pour l'élution des génines et de leurs hétérosides.

La deuxième méthode, consiste à évaluer directement sur les chromatogrammes la concentration de chaque tache séparée, sans élution préalable. Le procédé le plus simple est celui qui fait appel à l'appréciation visuelle des taches^{13,28}; le plus souvent on compare la surface de la tache formée par la substance à doser à celles obtenues avec une gamme étalon. On a ainsi une première estimation de la concentration de la solution étudiée en ses différents constituants²⁰. La précision des résultats est limitée du fait que cette technique ne tient pas compte de l'intensité de la coloration ou de la fluorescence des taches.

La photodensitométrie a l'avantage sur le procédé ci-dessus de permettre la mesure de l'intensité lumineuse réfléchie ou transmise par les taches du chromatogramme.

Plusieurs auteurs^{16,20-22} utilisent cette technique après avoir pulvérisé sur les

chromatogrammes un révélateur chimique tel le chlorure d'aluminium ou le ferri-cyanure ferrique. On doit cependant noter qu'il est très difficile dans ces conditions d'obtenir des colorations uniformes dans l'épaisseur de la couche adsorbante.

Afin d'éviter cet inconvénient, nous avons choisi d'étudier une méthode photodensitométrique basée sur sa seule révélation par l'éclairage en lumière de Wood des chromatogrammes réalisés sur couche mince de cellulose.

ESSAIS SUR DES SOLUTIONS DE FLAVONOÏDES PURS

Partie expérimentale

Séparation chromatographique

L'analyse de solutions de flavonoïdes par chromatographie descendante sur papier avec le solvant de Partridge: *n*-butanol-acide acétique-eau (4:1:5), permet de mettre en évidence des taches bien isolées mais très allongées, ne se prêtant pas à une lecture facile au photodensitomètre. Par contre, la chromatographie sur couche mince permet généralement d'observer des taches plus ramassées et aux contours bien définis, répondant mieux aux conditions de lecture par l'appareil.

De nombreux essais, associant divers types de couches minces et de solvants de développement, nous ont permis de sélectionner, d'une part la cellulose, d'autre part le mélange original que constitue la phase butanolique du mélange suivant: *n*-butanol-méthyl éthyl cétone-eau (5:3:3).

Choix des plaques. L'utilisation de plaques préparées au laboratoire a attiré notre attention sur l'importance de l'homogénéité et de la régularité de l'épaisseur de la couche de cellulose, ce qui nous a amené à employer des plaques "prêtes à l'emploi" commercialisées*, de 20 × 20 cm, d'une épaisseur de 0.25 mm.

Ayant constaté des variations au cours de mesures densitométriques effectuées à blanc en divers points d'une même plaque ou sur des plaques différentes, nous avons pu les imputer à la présence d'impuretés solubles dans l'éthanol. C'est pourquoi nous prenons la précaution de procéder, avant de les utiliser, à un lavage des couches minces par migration ascendante d'éthanol à 96°, qui a pour effet d'entraîner les impuretés avec le front du solvant dans une région de la plaque que nous maintiendrons ultérieurement en dehors de la surface de développement de la chromatographie des flavonoïdes.

Dépot des échantillons sur les plaques. Des études systématiques ont montré que la plus grande attention doit être prêtée à cette opération, en raison de son incidence sur la précision et la reproductibilité de la méthode. Les meilleurs résultats sont obtenus en procédant de la façon suivante: on dépose des volumes constants (5 µl) des solutions à doser, à l'aide d'une micropipette calibrée, afin d'obtenir des dépôts de surface réduite et régulière. La diffusion du flavonoïde au cours de la migration est ainsi comparable d'une tache à l'autre.

Nous verrons plus loin que l'emploi de la même micropipette pour tous les dépôts ajoute à la précision de la méthode.

Développement et révélation. Le développement se fait en migration ascendante, avec le solvant défini plus haut, dans une enceinte saturée. Le front du solvant met environ 3 h à parcourir une quinzaine de centimètres.

* Nous avons utilisé des "plaques fines de cellulose pour CCM", sans indicateur fluorescent, des Établissements Merck.

On laisse sécher les plaques à la température ambiante, à l'air libre, à l'abri toutefois des vapeurs alcalines. Les taches formées par les différents flavonoïdes séparés sont mises en évidence par simple exposition à un faisceau de lumière de Wood. Le calcul des R_F donne les valeurs suivantes: lutéolol = 0.86, lutéoloside = 0.35, glucolutéoloside = 0.22.

Analyse densitométrique

La plaque est entraînée sous un faisceau de lumière de Wood de longueur d'onde proche de celle qui correspond à l'absorption maximale des substances à doser. On mesure la densité optique de la lumière réfléchie par la plaque, à l'aide d'un densitomètre à double faisceau qui permet l'enregistrement automatique des courbes traduisant la variation de l'absorption lumineuse au niveau des taches*. Un "blanc" développé conjointement aux échantillons à doser permet le réglage du zéro de l'appareil (ligne de base).

L'appareil peut intégrer automatiquement la surface de chaque pic en unités arbitraires, mais il est très difficile de faire coïncider le zéro de l'intégrateur et la ligne de base des pics, comme l'ont d'ailleurs déjà observé HEATHCOTE ET HAWORTH³³.

À la mesure de la surface des pics, entachée d'erreurs dues à la séparation imparfaite des flavonoïdes sur les chromatogrammes, nous préférons la mesure de la hauteur maximale des pics.

Les meilleures conditions d'utilisation de l'appareil que nous avons déterminées sont les suivantes: source lumineuse, lampe à hydrogène; filtre correspondant à une lumière de longueur d'onde égale à 3400 Å; fente de lecture, 1 × 0.5 mm; sensibilité, came C.

Résultats

Vérification de la valeur de la méthode

Afin de vérifier la valeur de la méthode proposée, nous avons déterminé, à l'aide de solutions des flavonoïdes purs, (lutéolol et ses deux hétérosides: lutéoloside et glucolutéoloside)**, les erreurs imputables aux diverses manipulations nécessaires au

TABLEAU I

INFLUENCE DE L'EMPLOI DE MICROPETTES DIFFÉRENTES

Dépôts de 1.008 µg de lutéoloside, effectués avec des micropipettes différentes.

Dépôt No.	1	2	3	Total	Moyenne arithmétique	Écart-type	Coefficient de variation (%)
Hauteurs (mm) des pics enregistrés	50	55	51	156	52.75	±4.38	±8.3
au cours de lectures répétées	49	55	52	156			
	53	56	52	161			
Moyenne arithmétique	51.2	55	52	160			
Écart-type	±2.05	±0.8	±0.8				
Coefficient de variation (%)	±4	±1.45	±1.45				

* Nous avons utilisé un appareil Chromoscan, distribué par les Établissements Joyce-Loebl, France.

** Nous avons préparé nous-mêmes ces flavonoïdes par extraction à partir de la Gaude.

TABLEAU II
PRÉCISION DES RÉSULTATS POUR DES DÉPÔTS EFFECTUÉS AVEC LA MÊME MICROPIPETTE
Dépôts de 0.840 µg de lutéoloside, effectués avec la même micropipette.

Dépôt (No.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total	Moyenne arithmétique	Écart-type	Coefficient de variation (%)
Hauteurs (mm) des pics en- registrés au cours de les- tures répétées	51	51	54	53	53	53	53	52	51	516	52.31	±1.17	±2.25
Moyenne arithmétique	52.3	50	54	53	53	53	53	52	51	516	52.1	51.1	0.2
Écart-type	± 0.9	± 0.6	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0.8	± 0.9	± 1.8	± 0.9	± 0.2	0.2
Coefficient de variation (%)	± 1.72	± 1.20	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	± 1.51	± 1.70	± 3.45	± 0.39	1.70	0.2

TABLEAU III

EFFET SUR LE DOSAGE DE LA QUANTITÉ DE LUTÉOLOSIDÉ DÉPOSÉ

Dépôts de lutéoloside (μg)	0.168	0.336	0.504	0.672	0.840	1.008	1.176	1.344	1.512	1.680
Hauteurs (mm) des pics enregistrés:	8	20	26	43	46	56	60	69	70	70
lectures répétées	8	20	26	43	46	54	60	65	70	70
Moyenne arithmétique	8	19	27	42	46	53	61	68	71	70
Écart-type	8	21.5	28	41	45	53	61	66	72	73
Coefficient de variation (%)	±0	± 5	± 3.3	± 2.1	± 1	± 2.5	± 0.8	± 2.6	± 1.2	± 2.1

TABLEAU IV

EFFET SUR LE DOSAGE DE LA QUANTITÉ DE GLUCOLUTÉOLOSIDÉ DÉPOSÉ

Dépôts de glucolutéoloside (μg)	0.106	0.213	0.320	0.427	0.533	0.640	0.747	0.854	0.960	1.067
Hauteurs en mm des pics enregistrés:	6	10	14	18	20	29	28	32	34	42
lectures répétées	5	10	15	18	22	28	29	32	34	41
Moyenne arithmétique	3	9	14	18	22.5	28	29	31	32	42
Écart-type	5	8	15	18	23	28	30	32	32	41
Coefficient de variation (%)	±25	± 9.7	± 3.4	± 0	± 5.9	± 2.1	± 2.7	± 1.5	± 3.3	± 1.2

TABLEAU V

INFLUENCES CONJUGUÉES DE LA CONCENTRATION DES DÉPÔTS ET DE L'EMPLOI DE DIFFÉRENTES PLAQUES SUR LE DOSAGE DU LUTÉOLOSIDÉ

Dépôts de lutéoloside (μg)	0.168	0.336	0.504	0.672	0.840	1.008	1.176	1.344	1.512	1.680
Hauteurs (mm) des pics enregistrés au cours de lectures répétées										
Plaque No. 1	8	20	26	43	46	56	60	65	70	70
	8	20	26	43	46	54	60	66	70	70
	8	19	27	42	46	53	61	68	71	70
	8	21.5	28	41	45	53	61	69	72	73
Plaque No. 2		18		37		50		60		63
		18		36.5		49		60		64
		18		37		53		61		65
		18		39		51		59		63
Plaque No. 3		17		38		53		58		62
		20		37		52		57		63
		18		35		52		61		65
		19		35		53		59		66
Plaque No. 4		19		37		55		79		78
		19		38		55		78		78
		20		39		56		68		78
		20		40		54		70		79
Moyenne arithmétique	8	19	26.75	38.5	45.75	53	60.5	64.8	70.75	69
Écart-type	±0	± 1.1	± 1	± 2.5	± 0.5	± 1.9	± 0.5	± 6.8	± 0.9	± 6.2
Coefficient de variation (%)	±0	± 5.7	± 3.3	± 6.4	± 2.1	± 3.5	± 0.8	± 10.4	± 1.2	± 9

TABLEAU VI

INFLUENCES CONJUGUÉES DE LA CONCENTRATION DES DÉPÔTS ET DE L'EMPLOI DE DIFFÉRENTES PLAQUES SUR LE DOSAGE DU GLUCOLUTÉOLOSIDÉ

Dépôts de glucolutéoside (μg)	0.107	0.213	0.320	0.427	0.534	0.640	0.747	0.854	0.961	1.067
<i>Hauteurs (mm) des pics enregistrés au cours de lectures répétées</i>										
<i>Plaque No. 1</i>										
6	10	14	18	20	28	28	32	34	42	
5	10	15	18	22	28	29	32	34	41	
3	9	14	18	22.5	29	29	31	32	42	
5	8	15	18	23	28	30	32	32	41	
4	10	16	17	21	29	29	31	33	43	
5	8.5	14	18	21	27	28.5	31.5	32	41	
4	9	15	18	22	28	29.5	32	33	40	
6	9.5	13	19	23	29	29	32.5	34	42	
<i>Moyenne arithmétique</i>	4.75	9.25	14.5	18	21.8	28.25	29	31.75	33	41.5
<i>Écart-type</i>	± 1.07	± 0.57	± 0.85	± 0.71	± 1.14	± 0.5	± 0.8	± 0.3	± 0.85	± 0.9
<i>Coefficient de variation (%)</i>	± 22.5	± 6.1	± 5.8	± 3.9	± 4.1	± 1.7	± 2.7	± 1	± 2.5	± 2.1

TABLEAU VII

INFLUENCES CONJUGUÉES DE LA CONCENTRATION DES DÉPÔTS ET DE L'EMPLOI DE DIFFÉRENTES PLAQUES SUR LE DOSAGE DU LUTÉOLOL

Dépôts de lutéolol (μg)	0.171	0.257	0.353	0.429	0.515	0.601	0.686	0.772	0.858
<i>Hauteurs (mm) des pics enregistrés au cours de lectures répétées</i>									
Plaque No. 1	15	22	28	34	43	53	56	70	80
	15	23	29	32	44	52	54	69	81
	13	24	32	33	43	49	56	73	82
	14	23	31	32	43	51	57	73	81.5
Plaque No. 2	16	22	31	32.5	45	52	56	71	78
	15	25	29	33	42	50	55	73	78
	13	25.5	30.5	34	43	51	54	70	77.5
	15	23.5	30	33	43.5	54	57	69	77
Moyenne arithmétique	14.5	23.5	30	32.9	43.3	51.5	55.6	71	79.3
Écart-type	± 1.14	± 1.64	± 1.75	± 0.60	± 0.78	± 2.57	± 1.40	± 3.14	± 3.91
Coefficient de variation (%)	± 7.8	± 6.9	± 5.8	± 1.8	± 1.8	± 5	± 2.5	± 5.6	± 4.9

dosage, ce qui a permis de définir les meilleures conditions opératoires et de mesurer la reproductibilité des mesures.

De la comparaison des résultats obtenus lors des deux essais rapportés dans les Tableaux I et II, nous avons conclu: (1) que la reproductibilité de la mesure était satisfaisante (coefficient de variation, 1.5%); (2) qu'il était important d'effectuer les différents dépôts avec la même micropipette.

Les Tableaux III en IV montrent que la quantité de flavonoïdes déposée en une tache n'influence pas, dans les limites indiquées, la qualité de la mesure.

Les Tableaux V-VII traduisent la somme des erreurs qui peuvent être introduites par les diverses opérations du dosage: préparation des dilutions à partir d'une solution mère de concentration connue, dépôts, migration, lecture, ainsi que celles qui sont dues aux variations inhérentes à la couche mince d'une plaque à l'autre. Néanmoins, la précision des résultats obtenus par la méthode reste bonne.

On peut noter que la limite de détection de l'appareil n'autorise pas les mesures pour des dépôts inférieurs à 0.20 μg pour le glucolutéoloside, à 0.17 μg pour le lutéolol et le lutéoloside, respectivement.

Établissement des courbes d'étalonnage

Les résultats consignés dans les tableaux précédents ont conduit au tracé de trois courbes d'étalonnage; les quantités de flavonoïdes déposées ont été exprimées soit en poids (Fig. 1), soit en concentrations molaires (Fig. 2).

Le tracé des courbes d'étalonnage appelle les remarques suivantes:

(1) Si on exprime les quantités de flavonoïdes en poids, on mesure le glucolutéoloside avec une plus grande sensibilité que le lutéoloside, lui-même mesuré plus sensiblement que le lutéolol.

(2) Les courbes peuvent être confondues avec des droites, passant par l'origine des coordonnées, pour des dépôts compris entre 0.17 et 0.85 μg pour le lutéolol, entre 0.17 et 1.50 μg pour le lutéoloside, et entre 0.20 et 1.0 μg pour le glucolutéoloside.

On a calculé par la méthode des moindres carrés l'équation de ces droites qui correspondent aux zones de sensibilité optimale. On obtient les relations suivantes

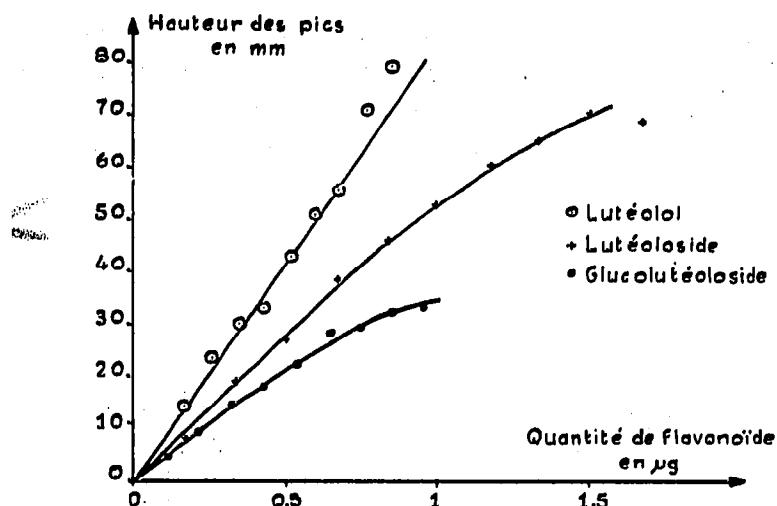


Fig. 1. Courbes d'étalonnage. En abscisse: quantité de flavonoïde (μg); en ordonnée: hauteur des pics enregistrés (mm).

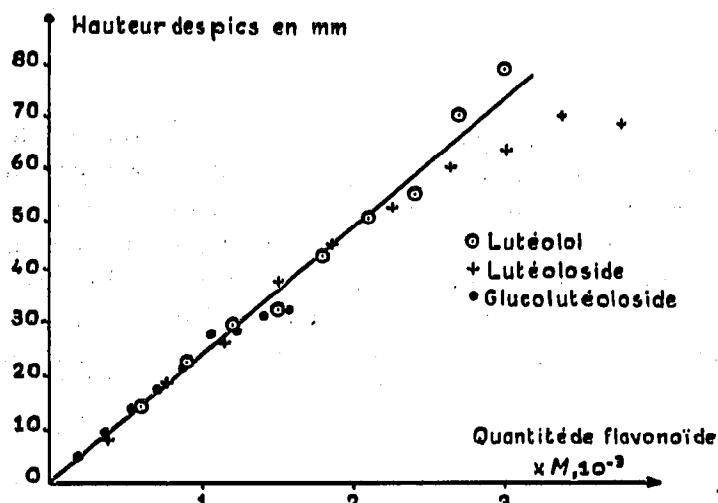


Fig. 2. Courbe d'étalonnage. En abscisse: quantité de flavonoïde ($\times M, 10^{-3}$); en ordonnée: hauteur des pics enregistrés (en mm). Les courbes sont confondues pour les trois flavonoïdes.

entre la hauteur (h) du pic d'absorption enregistré, mesurée en mm, et la teneur en flavone (c) exprimée en μg :

$$\text{Lutéoloside: } \text{pour } h \leq 45.7 \quad c = h \times 0.01756 + 0.01863$$

$$\text{Glucolutéoloside: } \text{pour } h \leq 29 \quad c = h \times 0.02496 - 0.02074$$

$$\text{Lutéolol: } \text{pour } h \leq 55 \quad c = h \times 0.0120 - 0.0009$$

(3) Si on exprime les quantités de flavonoïde en moles, une seule droite passant par l'origine des coordonnées peut être tracée pour le lutéolol et ses deux hétérosides, pour des dépôts correspondant à des quantités inférieures à $1.5 \cdot 10^{-3} M^*$.

Cette constatation expérimentale doit être rapprochée du fait que les trois flavonoïdes possèdent tous la même génine, qui est à l'origine du phénomène d'absorption de la lumière.

La coïncidence des trois courbes d'étalonnage lorsque les résultats sont exprimés

* Le dosage par spectrophotométrie directe des solutions étalons a confirmé ce résultat.

en moles traduit une sensibilité égale de la méthode pour les trois flavonoïdes. Ce mode d'expression des résultats, qui semble d'ailleurs physiologiquement le plus intéressant pour établir des comparaisons entre les variations des divers flavonoïdes observés dans la plante, permet donc l'estimation chiffrée de tous les dérivés d'une même génine, même en l'absence de solution étalon de certains d'entre eux.

APPLICATION AU DOSAGE DES FLAVONOÏDES DANS LA GAUDE

Partie expérimentale

Préparation des extraits

On épouse les organes secs réduits en poudres grossières par l'éthanol à 90° bouillant dans lequel tous les flavonoïdes sont solubles de façon satisfaisante, jusqu'à extraction complète des pigments flavoniques: la dernière colature ne doit donner lieu à aucune coloration en présence d'ammoniaque.

Les différentes solutions éthanoliques obtenues à partir d'un organe donné sont réunies et amenées à un volume connu en relation avec le poids de poudre sèche traitée.

Séparation chromatographique

Dans un premier temps, on évalue approximativement la teneur en chacun des flavonoïdes des extraits à doser en comparant à l'oeil les taches qu'ils donnent par chromatographie descendante sur papier (Arches 302, solvant de Partridge), et celles de solutions témoins de concentrations connues obtenues dans les mêmes conditions.

On calcule ensuite, si nécessaire, la dilution qu'il faut faire subir à l'extrait pour pouvoir effectuer le dosage dans la zone de sensibilité optimale de chacun des flavonoïdes. Les concentrations respectives du lutéolol et de ses hétérosides dans un

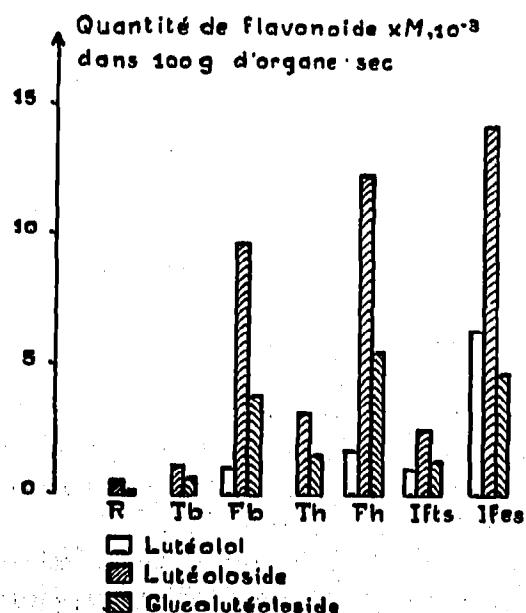


Fig. 3. Concentrations molaires pour 100 g d'organes secs. (R, racines; Tb, moitié inférieure des tiges; Fb, feuilles portées par la moitié inférieure des tiges; Th, moitié supérieure des tiges; Fh, feuilles portées par la moitié supérieure des tiges; Ifts, partie en fruits des inflorescences, Ifes, partie encore en fleurs des inflorescences).

même extrait sont le plus souvent trop différentes pour que la même dilution permette un dosage correct de chacun d'eux. On prépare donc trois dilutions appropriées, dont on dépose ponctuellement 5 µl côte à côte sur une même plaque de cellulose, du type dont nous avons précédemment justifié le choix, préalablement lavée à l'éthanol.

Le développement est conduit dans les conditions précisées antérieurement.

Dosage proprement dit

La plaque, séchée à l'air libre à l'abri des vapeurs alcalines, est soumise à la lecture par le photodensitomètre dans les conditions optimales indiquées plus haut.

On relève, pour chaque flavonoïde, la hauteur du pic obtenu avec la dilution correspondante. Cette valeur reportée sur les courbes d'étalonnage permet de connaître la concentration en poids ou en moles du flavonoïde dans la dilution en question. Il suffit alors de ramener par le calcul à l'extrait, puis au poids d'organe sec ayant servi à préparer celui-ci.

Résultats

Application de la méthode

Les diverses parties de la Gaude ont été traités séparément pour la préparation d'extraits que l'on a soumis au procédé décrit ci-dessus.

Les résultats, rapportés par la Fig. 3, expriment la concentration molaire pour 100 g de chacun des organes secs traités.

Vérification de la méthode

Pour mettre en évidence les qualités du dosage, nous avons effectué les calculs d'erreurs se rapportant aux extraits, d'une part les moins riches en flavonoïdes (extraits de racines), d'autre part les plus riches en flavonoïdes (extraits d'inflorescences).

TABLEAU VIII

DOSAGE DES FLAVONOÏDES DANS LES RACINES ET LES INFLORESCENCES EN FLEURS DE LA GAUDE

	<i>Lutéolol</i> (mg/100 g d'organe sec)	<i>Lutéoloside</i> (mg/100 g d'organe sec)	<i>Glucolutéoloside</i> (mg/100 g d'organe sec)
<i>Racines</i>			
<i>Dosage No. 1</i>	0	170.7	56
<i>Dosage No. 2</i>	0	176.8	67.8
<i>Dosage No. 3</i>	0	182.5	70.7
<i>Moyenne</i>		176.6	64.8
<i>Écart-type</i>		± 6	± 7.8
<i>Coefficient de variation (%)</i>		± 3.4	± 12
<i>Inflorescences encore en fleur</i>			
<i>Dosage No. 1</i>	1835	6227	2900
<i>Dosage No. 2</i>	1735	6000	2480
<i>Dosage No. 3</i>	1885	7009	3320
<i>Moyenne</i>	1818	6412	2900
<i>Écart-type</i>	± 76.5	± 222	± 132
<i>Coefficient de variation (%)</i>	± 4.2	± 3.5	± 4.5

rescences encore en fleur). A ces fins, nous avons procédé, à trois reprises différentes, au dosage de ces extraits dans les conditions décrites ci-dessus. Les résultats sont réunis dans le Tableau VIII.

RÉSUMÉ

On a mis au point une technique de dosage des flavonoïdes de la Gaude (*Reseda luteola* L.) par mesure photodensitométrique dans l'ultra-violet, après chromatographie sur couche mince de cellulose des extraits éthanoliques des différents organes de la plante. Les courbes d'étalonnage ont été établies pour chacun des flavonoïdes suivants: lutéolol, lutéoloside, glucolutéoloside. Les zones optimales de mesure se situent entre 0.17 et 0.85 µg pour le lutéolol, entre 0.17 et 1.50 µg pour le lutéoloside, et entre 0.20 et 1.0 µg pour le glucolutéoloside.

Les coefficients de variation observés sont inférieurs à $\pm 6\%$. La méthode a permis de doser séparément chacun des flavonoïdes cités dans les différents organes de la Gaude, avec une précision très satisfaisante.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. CHEVREUL, *J. Chim. Méd.*, 6 (1830) 157.
- 2 F. MOLDENHAUER, *Ann. Chim. Pharm.*, 100 (1856) 180.
- 3 R. R. PARIS, *Ann. Pharm. Fr.*, 13 (1955) 485.
- 4 A. DUBREUIL, R. MONIEZ, P. FRIGOT ET A. GORIS, *Ann. Pharm. Fr.*, 19 (1961) 655.
- 5 A. JACQUIN-DUBREUIL, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, 264 (1967) 149.
- 6 A. GORIS, A. DUBREUIL ET R. MONIEZ, *Ann. Pharm. Fr.*, 19 (1961) 648.
- 7 M. F. SHOSTAKOVSKII, N. A. TYUKAVKINA, A. I. KIRILLOV, K. I. LAPTEVA ET N. G. DEVYATKO, *Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. Nauk.*, 2 (1962) 121.
- 8 W. PORTER, B. BRICE, M. COBLEY ET J. COUCH, *Circulaire A.I.C.* 159, Bureau of Agricultural and Industrial Chemistry, Agricultural Research Administration, U.S. Dept. of Agriculture, 1947.
- 9 P. DELAVEAU, *Prod. Probl. Pharm.*, 21 (1966) 164.
- 10 J. TANGUY ET M. GALLET, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, 269 (1969) 773.
- 11 J. MICHAUD, *Bull. Soc. Pharm., Bordeaux*, 105 (1966) 219.
- 12 J. W. MCCLURE ET K. G. WILSON, *Phytochemistry*, 9 (1970) 763.
- 13 R. R. PARIS, A. HERISSET ET J. P. CHAUMONT, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, 267 (1968) 740.
- 14 S. DURET ET R. R. PARIS, *Plant. Méd. Phytoth.*, 4 (1970) 158.
- 15 R. LIPPERT ET H. HONERLAGEN, *Deut. Apoth. Ztg.*, 110 (1970) 873.
- 16 P. DELAVEAU, *Thèse Doct. État Sci. Nat.*, Paris, 1967.
- 17 M. TISSUT, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, 268 (1969) 65.
- 18 N. PISLARASU, V. ISTUDOR ET C. POPOVICI, *Farmacia (Bucharest)*, 17 (1969) 695.
- 19 L. SWIFT, *J. Agr. Food Chem.*, 15 (1967) 99.
- 20 N. A. TYUKAVKINA, K. I. LAPTEVA ET N. G. DEVYATKO, *Zh. Anal. Khim.*, 24 (1969) 777.
- 21 J. LARSON, *J. Chromatogr.*, 43 (1969) 287.
- 22 D. B. HARPER ET H. SMITH, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 138.
- 23 W. POETHKE, *Pharm. Zentralh.*, 108 (1969) 733.
- 24 R. MÜLLER ET R. POHL, *Planta Med.*, 18 (1970) 114.
- 25 M. BOURZEIX ET N. HEREDIA, *Ann. Technol. Agr.*, 16 (1967) 349.
- 26 B. MAKH-SUDOVA, Z. P. PAKUDINA ET A. S. SADYKOV, *Nauch. Tr., Tashkent. Gos. Univ.*, 341 (1968) 77.
- 27 E. J. SHELLARD ET M. Z. ALAM, *J. Chromatogr.*, 32 (1968) 472.
- 28 G. CLAIR, P. DELAVEAU ET R. R. PARIS, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 111 (1964) 215.
- 29 R. BONDIVENNE, N. BUSH, J. SIMOND ET A. MONTEIL, *J. Chromatogr.*, 50 (1970) 274.
- 30 J. MICHAUD, *Ann. Pharm. Fr.*, 24 (1966) 533.
- 31 S. LEIBA, *Thèse Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1967.
- 32 J. MICHAUD ET M. F. LESCA, *Bull. Soc. Pharm., Bordeaux*, 107 (1968) 49.
- 33 J. C. HEATHCOTE ET C. HAWORTH, *J. Chromatogr.*, 43 (1969) 84.