

## Détermination par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) - détecteur à barrettes de Diode DAD-Spectrométrie de masse (SM) de dix anthocyanes principaux des feuilles pourpres de *Canna indica* Linn (1753)

Adingite Adingite NDUNGI<sup>1\*</sup>, Jérôme PONGI NZITA<sup>2</sup>, Roland MARINI DJANG'EING'A<sup>3</sup>,  
Adrien MOANGO MANGA<sup>4</sup> et Jean KAYEMBE SUNGULA<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Université de MAKERERE, UGANDA, Institut Supérieur des Techniques Médicales de Kikwit (ISTM Kikwit),  
Option Biologie Médicale, Laboratoires de Chimie Analytique, Inorganique (ISTM) Kikwit et de Spectroscopie,  
BP 126 KIKWIT, KWILU, RD Congo

<sup>2</sup> Université Pédagogique Nationale (UPN), Faculté des Sciences, Département de Chimie, Laboratoire de  
Chimie, BP 8815 Kinshasa, BINZA, RD Congo

<sup>3</sup> Université de Liège (ULG) en Belgique, Département de Pharmacie, Laboratoire de Chimie Analytique et de  
Spectroscopie, BP 4000 Liège, Belgique

<sup>4</sup> Université de Kisangani (UNIKIS), Faculté des Sciences, Laboratoire de Pédologie, BP 2012, Kisangani, RD Congo

<sup>5</sup> Université de KINSHASA (UNIKIN), Faculté des Sciences, Département de Chimie, Laboratoire de Chimie  
Organique et Energétique (LACOREN), BP 127 Kinshasa XI, RD Congo

(Reçu le 07 Mars 2022 ; Accepté le 04 Janvier 2023)

\* Correspondance, courriel : [ndungjadingite@gmail.com](mailto:ndungjadingite@gmail.com)

### Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer par la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) et par l'Ultra Performance Liquide Chromatographie (UPLC) couplée au spectromètre des masses de principaux anthocyanes de feuilles pourpres de *Canna indica*, utilisés comme antioxydant naturel. Le criblage chimique a montré que cette plante possède des anthocyanes et des poly phénols en quantité notables. En partant de 40g de poudre des feuilles pourpres de *Canna indica*, la méthode d'extraction à reflux utilisée a conduit à l'obtention de 1,24g d'anthocyanes soit un rendement de 3,1 %. Ainsi, la séparation des anthocyanes par CLHP – DAD-SM a montré que les feuilles pourpres de *Canna indica* renferment 11 pics parmi lesquels : 6 anthocyanines et 4 anthocyanes acylés (Pic 2 et 3 identiques) ; les formules brutes et les masses molaires des anthocyanes identifiées par l'Ultra Performance Liquide Chromatographie (UPLC) couplée au spectromètre des masses sont les suivantes : delphinidine-3-O-glucoside ( $C_{21}H_{21}O_{13} = 481$  g/mol) ; cyanidine-3-O-glucoside ( $C_{21}H_{21}O_{12} = 465$  g/mol) ; pétunidine-3-O-glucoside ( $C_{16}H_{12}O_7 = 316$  g/mol) ; péonidine-3-O-glucoside ( $C_{12}H_{22}O_{12} = 358$  g/mol); malvidine-3-O-glucoside ( $C_{23}H_{25}O_{13} = 509$  g/mol) ; pelargonidine-3-O-glucoside ( $C_{21}H_{22}O_{11} = 450$  g/mol).

**Mots-clés :** chromatographie, performance, détecteurs, Di iode.

## Abstract

### Determination by Hight performance liquid chromatography (HPLC)-DAD Diiodine Array Detector-Mass Spectrometry (MS) of ten main anthocyanin's of the purple leaves of *Canna indica* Linn (1753)

The target of this study, is to determine through high performance liquid chromatography to the put together with the mass spectrometer of the main anthocyanin's of purple leaves of *Canna indica* as used in natural antioxidant. The chemical screening has shown significantly that such plant has huge amount of anthocyanin's and polyphenols as well. Going from 40g of powder wich is from these purple leaves of *Canna indica*, the reflux extraction method compulsory lead to obtain 1.24g of anthocyanin's. That to say a yield of 3.1 % only .Thus, the separation of anthocyanin's by HPLC –DAD-MS has shown that the purple leaves of *Canna indica volcanoes*, which contain eleven peaks among which : six anthocyanin's and that is to say 4 acylated anthocyanin's peak 2 and 3 identical; Consider the raw formulas and the molar masses of the anthocyanin's identified by Ultra Performance Chromatography(UPLC) coupled to the mass spectrometer are as follows : delphinidin-3-O-glucoside ( $C_{21}H_{21}O_{13} = 481$  g/mol); cyanidin-3-O-glucoside ( $C_{21}H_{21}O_{12} = 465$  g/mol); pétunidin-3-O-glycoside ( $C_{16}H_{12}O_7 = 316$  g/mol); péonidin-3-O-glucoside ( $C_{12}H_{22}O_{12} = 358$  g/mol) ; malvidine-3-O-glucoside ( $C_{23}H_{25}O_{13} = 509$  g/mol) ; pelargonidin-3-O-glucoside ( $C_{21}H_{22}O_{11} = 450$  g/mol).

**Keywords :** chromatography, high performance, detector iodine.

## 1. Introduction

Les anthocyanes sont des pigments naturels des feuilles, des pétales et des fruits, situés dans les vacuoles des cellules, solubles dans l'eau, allant du rouge orangé au bleu pourpre dans le spectre visible [1]. Ces composés existent sous forme d'hétérosides formés par la condensation d'une molécule non glucidique (appelé aglycone) et d'oses, et souvent, de groupes acyles [2]. L'aglycone qui les caractérise est un anthocyanidol de la classe des flavonoïdes [3]. Ils donnent leur couleur aussi bien aux feuilles qu'aux fruits rouges. Ils jouent un rôle important dans la pollinisation des fleurs et la dispersion des graines, ainsi que dans la protection des plantes contre les agressions du milieu (froid, lumière, ravageurs, etc.). Ils sont le sujet d'un grand nombre d'études qui abordent en général les aspects concernant l'effet bénéfique de leur consommation sur la santé [4]. Ces aspects sont particulièrement importants lorsqu'on envisage de les extraire en vue de leur utilisation comme colorant alimentaire naturel [5]. La coloration vive d'un grand nombre de fleurs et fruits est due à la présence des anthocyanines dérivés du cation flavylium qui sont des métabolites secondaires [6]. Leur fort pouvoir colorant, leur solubilité en milieu aqueux et leur absence de toxicité font des anthocyanosides des colorants naturels susceptibles de remplacer les colorants synthétiques utilisés dans l'industrie agroalimentaire [7]. Enfin, leur activité antioxydante laisse supposer que leur apport par l'alimentation pourrait jouer un rôle bénéfique dans la santé humaine, notamment dans le domaine des risques cardiovasculaires [8]. Le stress oxydant et les Espèces Réactives Oxygénées (ERO) sont devenus des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé. Le milieu médical prend conscience que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plusieurs pathologies associées au vieillissement (maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète, etc.) [9]. Les antioxydants les plus connus qui permettent à l'organisme de se défendre contre le stress oxydant sont : le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), le Super Oxyde Dismutase (SOD), la catalase, le glutathion ainsi que le coenzyme Q (CoQ) [7]. Ils peuvent, à l'instar de coenzyme Q10, agir comme antioxydants, en passant de la forme hydroxylée à la forme quinonique [10]. Entre les formes quinoniques et les formes hydroxylées, il y a des formes semi-quinoniques, comme pour le coenzyme Q10.

On comprend aisément pourquoi les anthocyanes possèdent des propriétés anti oxydantes marquées. C'est dans cette optique que nous nous proposons, dans le cadre de la présente étude, d'extraire, de caractériser les anthocyanes des feuilles pourpres de *Canna indica* afin d'en déterminer les structures chimiques, étudier l'activité antioxydante en comparaison avec celle de la vitamine C, molécule de référence. *Canna indica*, est une espèce de plantes à fleurs herbacées de la famille des *Cannaceae*, genre *Canna*, espèces : *Canna indica* L., ordre de *Zingiberales*, classe d'*Equisetopsida*, règne : *Pantae*. On l'appelle parfois Canna des Indes [11]. En Europe, le *Canna* est surtout utilisé comme plante ornementale dans les jardins, tandis qu'en Amérique latine, il est principalement cultivé pour ses rhizomes, qui sont importants pour l'alimentation humaine et l'agro-industrie [12]. Les rhizomes de *Canna indica* (Achira) mesurent jusqu'à 60 centimètres de long et sont comestibles. En décoction, les racines sont utilisées comme diurétiques et les feuilles comme cicatrisant [13]. En RD Congo, le Canna est utilisé comme plante ornementale dans des maisons et au niveau de cimetières.

## 2. Matériel et méthodes

Les feuilles pourpres de *Canna indica*, jeunes (avant la floraison) utilisées dans cette étude ont été récoltées à la Faculté des Sciences de l'Université de Kisangani dans la Province de la TSHOPO et ont été séchées sous l'ombre, à l'air libre, pendant 3 semaines. Le séchage a été achevé à l'étuve, réglée à 45°C, durant 72 h. Ces feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur mécanique au laboratoire de Pédologie de l'Université de Kisangani à la Faculté des Sciences jusqu'à l'obtention de poudre fine, qui a été gardée dans des sachets en polyéthylène propres et secs, étanches, jusqu'au moment des analyses. Les anthocyanes totaux ont été extraits sur la poudre de feuilles de *Canna indica* au Soxhlet à l'aide de l'éther di éthylique préalablement délipidés [7]. La chromatographie-DAD (DéTECTEUR à barrettes de Diodes) a été réalisée à l'Université de Kinshasa, la chromatographie liquide à haute performance à détection UV-Vis pour les anthocyanes à 518 et 520 nm sans témoins d'abord à l'Université de MAKERERE/UGANDA et enfin le couplage à la masse LC-SM à l'Université de Liège en Belgique.

### 2-1. CLHP-DAD (Diode Array Detector)

#### 2-1-1. Appareillage

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'une chaîne HPLC Agilent / séries HP1100, à compartiments thermostatés séries HP(G1316A) munie d'une pompe quaternaire Agilent (G1311A) et d'un détecteur UV à barrettes de diodes HP(G1315A), avec un dégazeur Agilent (G1379A) Série JP13212087 et un injecteur automatique Agilent (G1313A), pilotés par le logiciel Chromaster (Anvers, Belgique). Nous avons utilisé la colonne chromatographique C18, 250 x 4,6 mm, 5 µM provenant de la société Waters (Massachusetts-MA, USA), d'une balance électronique GRAM FV-220C (IPESAGE S.A.S, France) [7].

#### 2-1-2. Matériel chimique

Le méthanol qualité HPLC ainsi que l'acide Tri Fluoro Acétique (TFA, 99,8%) nous ont été fournis par le laboratoire Merck (Darmstadt, Allemagne). L'eau de qualité ultra-pure a été produite grâce à un appareil de marque Milli-Q Plus 185 (Massachusetts-MA, USA).

#### 2-1-3. Choix de la colonne

Etant donné qu'on est en présence des composés inconnus (extrait total) à séparer, nous avons choisi en premier temps l'utilisation d'une colonne de 250 mm de longueur pour maximiser la séparation des pics puis

voir la possibilité d'utilisation d'une courte colonne de 100 mm tout en gardant dans la mesure du possible la qualité de chromatogramme, autrement le temps de rétention relatif du pic chromatographique qui sera sélectionné comme biomarqueur.

#### **2-1-4. Choix de la phase mobile**

En chromatographie liquide, le choix de la phase mobile est très important. Etant en présence de produits inconnus, il est convenablement indiqué d'utiliser une élution graduée plutôt qu'une élution isocratique dans le but d'éluer les composés les plus hydrophobes en un temps d'analyse acceptable.

### **2-2. Séparation des anthocyanes par CLPH avec la détection UV-Visible**

#### **2-2-1. Appareillage**

La méthode analytique concerne la détermination de la composition relative des anthocyanes. La séparation est réalisée à l'aide d'une colonne en phase inverse et une détection UV-vis. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'une chaîne-HPLC SPD-M20A C070-MAS UP. Marque UFLC SHIMADZU; MAX/SIDA3/CONAS-HPLC-001 IMP/CONAS-8005 : (SHIMADZU, KYOTO, JAPON) munie d'un spectrophotomètre SHIMADZU, 1700 CE (SHIMADZU, KYOTO, JAPON, numéro CAT.206-55-401-340) et un détecteur à barrettes de diodes ou un détecteur UV avec une gamme visible piloté par le logiciel LC Solution, une pompe binaire à gradient, un système d'injection pour des volumes d'échantillons de 10 à 20 µl; un intégrateur ou un ordinateur avec logiciel d'acquisition des données et un four permettant le chauffage des colonnes à 40°C ; un système de dégazage des solvants; le filtre à membrane joue le rôle de dégazer les solvants pour la préparation des échantillons à analyser [7].

#### **2-2-2. Conditions d'analyses chromatographiques**

Les conditions pour les analyses chromatographiques ont été les suivantes : La colonne de marque XL3-ODS C18 Beckmann courte de 7 cm, remplie des particules à granulométrie très fine (3 µm) ; La phase mobile constituée de l'eau à 5 % d'acide formique, le pH 2,1 (solvant A) et méthanol à 5 % d'acide formique (solvant B) à 520 nm. ; et l'eau/ Acide formique/ Acetonitrile (518 nm) ; La température de la colonne à 40°C ; - Le débit de la phase mobile est de 0,8 mL/minute ; le volume d'injection : de 50 µl jusqu'à 200 µl ; Le temps de passage : 45 minutes et le temps de retour aux conditions initiales de 5 minutes.

#### **2-2-3. Principe**

##### **2-2-3-1. Choix de la phase mobile**

L'utilisation de la colonne inverse et une élution avec un gradient : Eau/ Acide formique/ Acetonitrile (518 nm).

##### **2-2-3-2. L'utilisation de la colonne inverse avec les solvants : Eau à 5% d'acide formique, pH 2,1(solvant A) et méthanol à 5% d'acide formique (solvant B) à 520nm.**

L'élution est programmée selon le gradient ascendant de solvant B suivant le temps en minutes : 2 ; 6 ; 18 ; 20 et 30 et le % de solvant B : 0 ; 15 ; 20 ; 40 et 100 par rapport au temps. Ces conditions chromatographiques permettent de séparer les anthocyanes de 20 µl d'extrait en 45 minutes (temps de rinçages inclus), avec une résolution comparable à celle obtenue avec une colonne plus longue ; les pics sont détectés à 518 ou 520 nm [7].

#### **2-2-4. Système d'éluion**

- Solvant A : C'est un milieu aqueux acidifié (exemple : CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ou HCOOH)
- Eluant B : C'est un milieu organique moins polaire (Méthanol, Acetonitrile) éventuellement acidifié. D'autres auteurs utilisent les tampons pour les acides hydro benzoïques ou hydro cinnamiques.

#### **2-2-5. Matériel chimique**

##### *2-2-5-1. Réactifs et matériel*

Le méthanol utilisé de qualité HPLC ; l'Acetonitrile (pureté HPLC) ; l'Acide formique (pour analyse : 98 %). Les solvants utilisés sont de deux types :

- Pour détecter les anthocyanes à 518nm  
-Solvant A : Eau/acide formique/Acetonitrile dans les proportions de : 87/10/3(v/v/v) ;  
-Solvant B : Eau/acide formique/Acetonitrile dans les proportions de : 40/10/50(v/v/v).
- Pour détecter les anthocyanes à 520nm  
-Solvant A : Eau à 5 % d'acide formique, pH 2,1 dans les proportions de (5 mL – 95 mL) pour analyse.  
-Solvant B : Méthanol à 5 % d'acide formique dans les proportions (25 mL - 475 mL)

- Séparation des anthocyanes par Analyse LC-MS

C'est une méthode analytique permettant de "peser" les molécules avec une très grande précision. Sa masse moléculaire est déterminée.

- Principe de la spectrométrie de masse

La méthode analytique permet de mesurer la masse des molécules par rapport à leur nombre de charge, le rapport masse sur charge : m/z [7].

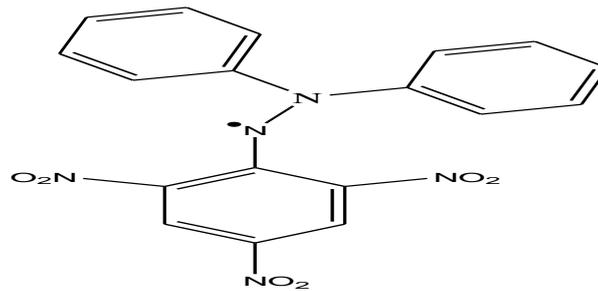
- Conditions chromatographiques

Des anthocyanes individuels ont été analysés à l'aide de L'UPLC Eksigent ultra LC100 et le détecteur TOF-MS est un Triple TOF 4600 commercialisé par Sciex. La phase stationnaire est une colonne inverse Phénomènes Kinetex 2.6 C18, 100 Å, 50 x 3.00 mm ; et les phases mobiles sont un tampon formate d'ammonium 10 mM en A et un mélange 50/50 Me OH/ACN en B. La température est de 30°, on injecte 10 µl et le débit est de 0,4 ml/min selon un gradient : 1 min : A/B : 98/2 ; 10 min : A/B : 0/100 ; 13 min: A/B : 0/100 ; 13,1 min : A/B : 98/2 ; 15,5 min: A/B : 98/2 ; la température de la source est à 500°. Après avoir volatilisé, ionisé et fragmenté les composés, les masses molaires ont été calculées de la manière suivante : la valeur m/z du pic moléculaire a permis de calculer la masse moléculaire, les pics de fragmentation ont permis de reconstituer une partie de la structure, l'intensité des pics a permis de faire de l'analyse quantitative [7].

#### **2-2-6. Étude des propriétés anti oxydantes (Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup>)**

##### *2-2-6-1. Principe de la méthode*

Le 2,2-Diphényle 1-picrihydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), est l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques, la méthode utilisée pour cette étude est celle de, [14 - 16]. La mesure de l'efficacité a été faite en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH<sup>•</sup>, mesurable par spectrophotométrie à 515 - 518 nm. La *Figure 1* suivante est la structure de DPPH<sup>•</sup>



**Figure 1 :** Structure de DPPH• [14 - 16]

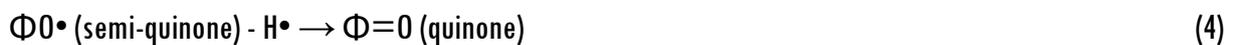
Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanisme :

- ✓ La libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certains acides et dérivées phénoliques) ;
- ✓ La libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycolyses et des anthocyanes).

Dans le cas des composés phénoliques ( $\Phi$ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH•, alors transformé en une molécule stable DPPHH :



Plusieurs voies réactionnelles sont alors possibles qui forment des structures plus au moins stables :



La capacité anti radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier. Le calcul des pourcentages résiduels de différentes solutions de DPPH• se fait selon la **Relation** suivante :

$$\% \text{ DPPH}\cdot = \frac{[\text{DPPH}\cdot]_0 - [\text{DPPH}\cdot]_t}{[\text{DPPH}\cdot]_0} \quad (5)$$

avec,  $[\text{DPPH}\cdot]_0$  = concentration initiale en DPPH• ;  $[\text{DPPH}\cdot]_t$  = concentration en DPPH• au temps t.

La concentration en anthocyanes qui permet de réduire 50 % de DPPH• (désignée par  $\text{EC}_{50}$ ) est déterminée en portant sur graphique le pourcentage de réduction de DPPH• en fonction de la concentration de l'extrait de *Canna indica*

#### 2-2-6-2. Droite d'étalonnage de la solution du DPPH•

En application de la loi de Beer- Lambert, six solutions du DPPH• faites dans du méthanol dans l'intervalle de 3,17 - 63,4  $\mu\text{M}$  ont été testées selon la méthode utilisée par [7, 16].

2-2-6-3. Détermination de l'EC50 et de l'activité antioxydant

L'EC<sub>50</sub> est un paramètre important pour l'évaluation de l'activité antioxydante. Elle correspond à la concentration des anthocyanes capable de réduire de moitié la concentration de l'oxydant (DPPH•). Elle est déterminée en portant sur graphique le pourcentage de réduction du DPPH• en fonction de la concentration des extraits et en extrapolant à 50 %. Les effets antioxydants des anthocyanes extraits sont mesurés selon la méthode de [7, 16] qui consiste à réduire le radical DPPH•.

3. Résultats et discussion

3-1. Chromatogrammes de l'extrait de *Canna indica* obtenus par CLHP-DAD

Les résultats obtenus par CLHP-DAD sont consignés dans la **Figure 2** suivante : On observe 46 pics chromatographiques avec le temps de rétention correspondant. De l'examen des résultats de cette figure : Il ressort que les pics 13,8 et 44,9 minutes sont majoritaires et peuvent être utilisés comme bio marqueur à la quantification de cet extrait. A partir des résultats obtenus à 320 nm, nous constatons que les produits absorbent mieux, ce qui est le maxima en ultra-violet. Au fur et à mesure que la longueur d'onde augmente, le nombre des pics diminue, c'est le cas observé à 518 et 520 nm en UV-Visible.

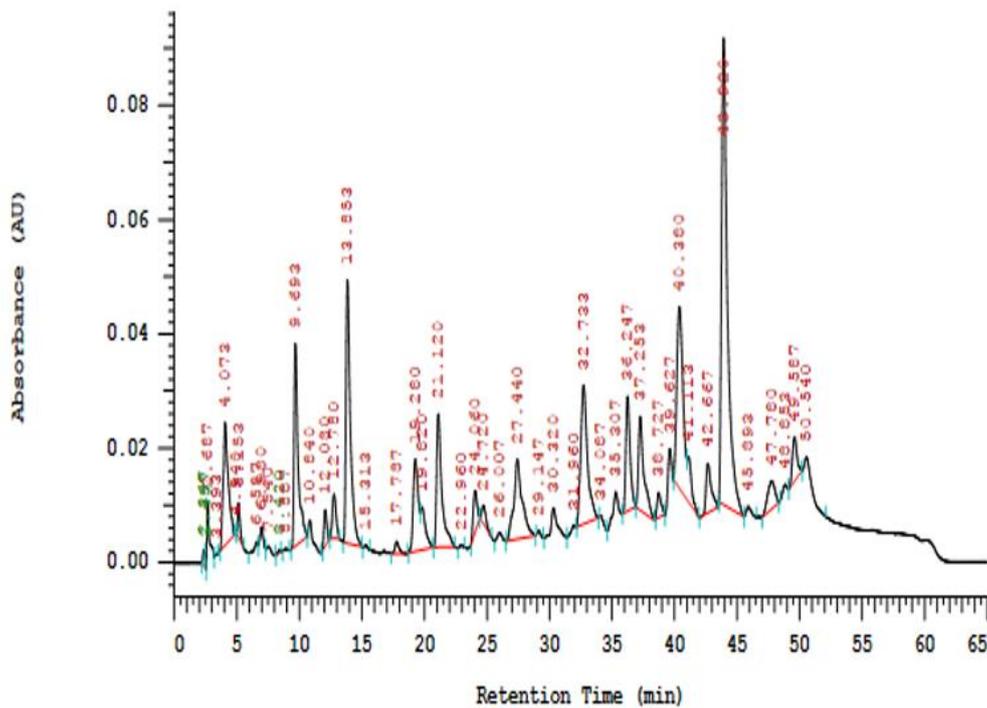


Figure 2 : Chromatogramme de l'extrait *Canna indica* à 320 nm

3-2. Séparation des anthocyanes isolés de *Canna indica* par CLHP avec détection UV-Visible (518, 520 nm)

Les résultats obtenus à 518 et 520 nm sont consignés dans la **Figure 3**. Les chromatogrammes des anthocyanes totaux des feuilles pourpres de *Canna indica* renferment 11 pics qui identifient : 6 anthocyanes à des intervalles du temps allant de 12,1 à 22,6 minutes pour les anthocyanines (non acylés ou pures), et 4 anthocyanines acylés (combinés) de 23,1 à 24,7 minutes. Les pics 2 et 3 sont identiques. Les anthocyanes

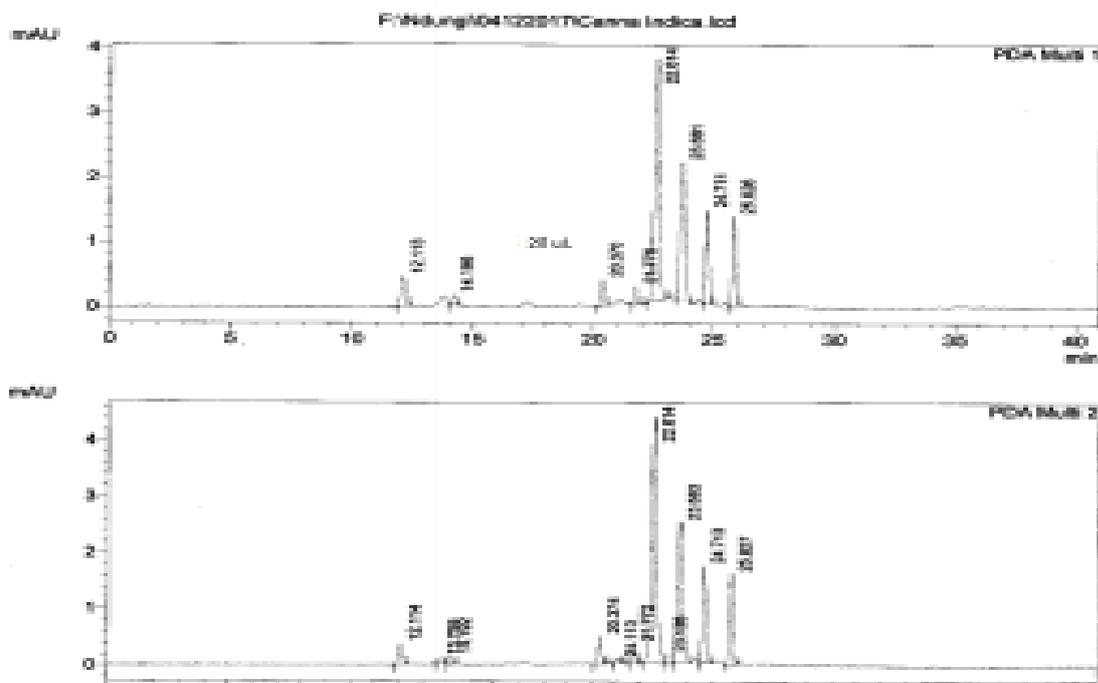
acylés sont dans l'ordre de 36,4 % tandis que les non-acylés représentent 63,6 %. La nature des anthocyanes élués selon les deux groupes nettement séparés, d'une part les anthocyanines et d'autre part les anthocyanines acylés se présente de la manière suivante : le premier groupe est constitué de six anthocyanines, il s'agit de : Delphinidine (pic n°1), Cyanidine (pic n°2et3), Petunidine (pic n°4), Peonidine (pic n°5), Malvidine (pic n°6) et la Pelargonidine (pic n°7). C'est ce que confirment les travaux de [17, 18] à 518 - 520 nm tandis le second groupe (quatre anthocyanines) correspond à des pigments soit estérifiés par des acides organiques, soit combinés à des tanins. C'est ce que confirment les travaux de [19] : Acétate de Mono glucoside 3- Delphinidine (pic n°8), Acétate de Mono glucoside 3-Cyanidine (pic n°9), Acétates de Mono glucoside 3-Péonidine et de Mono glucoside 3-Malvinidine confondus (pic n°10), Caféates de Mono glucoside 3-Cyanidine et de Mono glucoside 3-Malvinidine confondus (pic n°11). De nombreux auteurs ont publié des données concernant cette méthode telle que [20 - 22]. Par ailleurs, certains chercheurs ont détecté et identifié 21 anthocyanes tel que [23] et d'autres qui ont trouvés près de 40 anthocyanes par la Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la Spectroscopie des Masses [24]. La **Figure 3** illustre les résultats de la séparation des anthocyanes des feuilles pourpres de *Canna indica* selon le temps de rétention à 518 et 520 nm obtenus à l'Université de MAKERERE/ UGANDA [7].

04-Dec-17 17:16:28.1

### ==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by	Topher	F:\Mbung\04122017\Canna indica.lcd
Sample Name	CI	
Sample ID	CI	
Vial #	3	
Injection Volume	10 µL	
Data File Name	Canna indica.lcd	
Method File Name	Anthra 2.1cm	
Batch File Name	4.job	
Report File Name	Default.rpt	
Data Acquired	04-Dec-17 12:04:28 PM	
Data Processed	04-Dec-17 1:52:08 PM	

#### <Chromatogram>

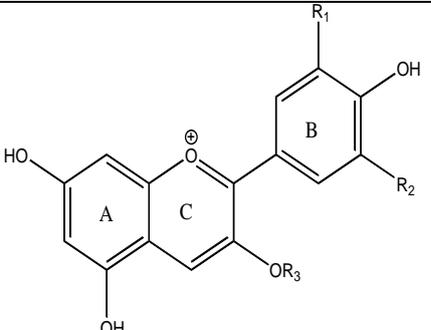


**Figure 3 :** Résultats de la séparation des anthocyanes des feuilles pourpres de *Canna indica* selon le temps de rétention à 518 et 520 nm

### 3-2-1. Structures, localisation et teneurs

La molécule d'anthocyanes contient un noyau flavylum (**Tableau 1**), possédant un oxygène chargé positivement. Compte tenu de l'existence des doubles liaisons conjuguées, la charge est de fait délocalisée sur l'ensemble du cycle qui est stabilisé par résonance. Les anthocyanes se différencient, d'une part, par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, et d'autre part par la nature des oses liés à la molécule. Ces molécules sont beaucoup plus stables que sous leur forme aglycone (anthocyanidines). Les formules brutes sont obtenues à partir du cation flavylum ( $C_{15}H_8O_5^+$ ) avec les radicaux  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  (glucose), sans l'utilisation de témoins. Ce résultat est en phase avec celui de [25] qui suggère les différentes structures et masses molaires des anthocyanes trouvées selon l'ordre d'apparition. Le **Tableau 1** donne les structures Chimiques et masses molaires des anthocyanines de *Canna indica* suggérées par CLHP sans témoins au Laboratoire de Spectroscopie de l'Université de *MAKERERE/UGANDA*.

**Tableau 1** : Structures Chimiques et masses molaires des anthocyanines de *Canna indica* suggérées par CLHP sans témoins

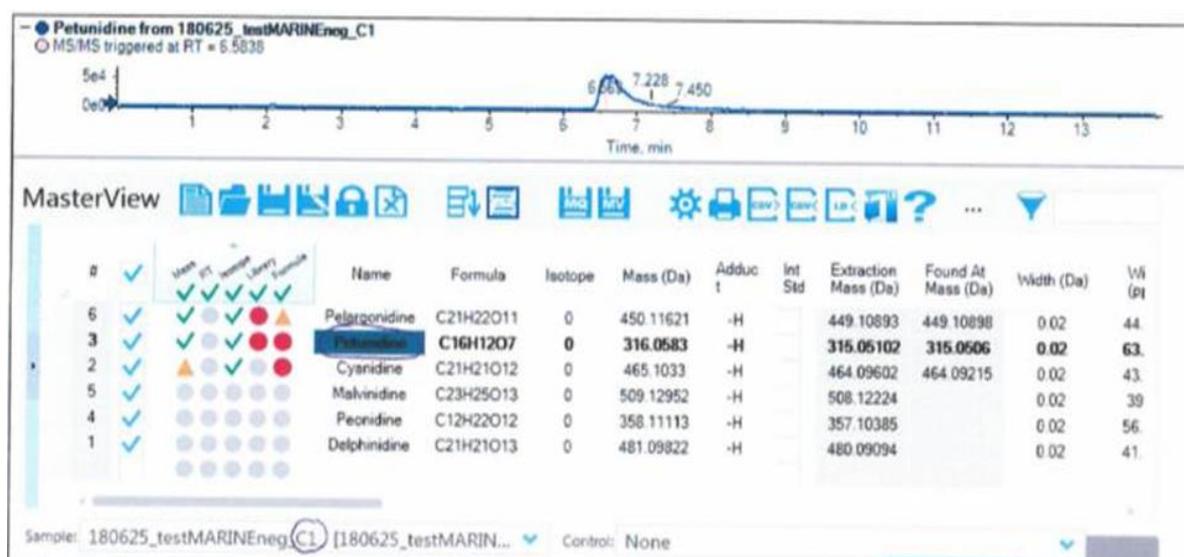
 <p><math>R_1 = R_2 = H, OH</math> ou <math>OCH_3</math> et <math>R_3 =</math> mono, di ou trisaccharide <math>\Rightarrow</math> Anthocyanine</p>	<b>Anthocyane</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>Mm</b>
	Delphinidine-3-O-glucoside	OH	OH	481 g/mol
	Cyanidine-3-O-glucoside	OH	H	465 g/mol
	Pétunidine-3-O-glucoside	$OCH_3$	OH	316g/mol
	Péonidine-3-O-glucoside	$OCH_3$	H	358 g/mol
	Malvidine-3-O-glucoside	$OCH_3$	$OCH_3$	509g /mol
Pelargonidine-3-O-glucoside	H	H	450 g /mol	

**NB** :  $R_3 =$  Glucose pour le mono glucoside sauf pour la Pétunidine ( $R_3 = H$ )

A partir du cation flavylum ( $C_{15}H_8O_5^+$ ), sans étalons avec les radicaux  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$ , les structures identifiées et les masses molaires des anthocyanes trouvées et suggérées sont les suivantes: Delphinidine-3-O-glucoside ( $C_{21}H_{21}O_{13} = 481$  g/mol); Cyanidine-3-O-lucoside ( $C_{21}H_{21}O_{12} = 465$  g/mol); Pétunidine-3-O-glucoside ( $C_{16}H_{12}O_7 = 316$  g/mol); Péonidine-3-O-glucoside ( $C_{12}H_{22}O_{12} = 358$  g/mol); Malvidine-3-O-glucoside ( $C_{23}H_{25}O_{13} = 509$  g/mol); et Pelargonidine-3-O-glucoside ( $C_{21}H_{22}O_{11} = 450$  g/mol).

### 3-2-2. Séparation des anthocyanes isolés de *Canna indica* par LC-SM

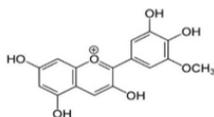
La quantification a été réalisée en fonction des concentrations des étalons externes soit la Mono Glucoside 3-O de la Pétunidine, Malvinidine, Cyanidine, Pelargonidine, Péonidine et de la Delphinidine au laboratoire de spectroscopie de l'Université de Liège en Belgique. Cela est confirmé également par les travaux de [26, 27]. Les anthocyanes ont été identifiés à l'aide d'un spectromètre de masse avec une ionisation par électro nébulisation (ESI) en mode ions positifs. Les analyses ont été effectuées en utilisant le balayage complet (analyse MS dépendant des données de  $m/z$ ) dont les résultats sont consignés dans le **Tableau 2** suivant.

**Tableau 2 : Résultats des analyses de l'échantillon de *Canna indica* par UPLC avec témoins**

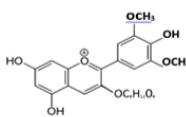
Source : Résultats obtenus au laboratoire de l'Université de Liège (ULG)

Les structures trouvées sont les suivantes :

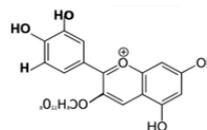
Petunidine



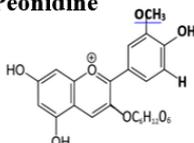
Malvidine



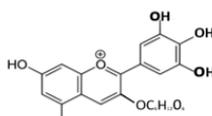
Cyanidine



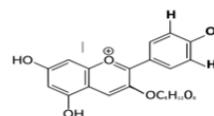
Peonidine



Delphinidine



Pelargonidine



Ces résultats vont en ligne droite avec les études de [28 - 30]. Cela est confirmé également avec certaines normes Internationales des méthodes d'analyses telles que : [17, 18, 25]. Ces résultats ont été notés par [31, 32] en Chine. Ils sont également conformes avec ceux trouvés par [33], et se confortent avec ceux de l'Organisation Internationale de la Vigne et de Liming Zeng. En outre, les résultats obtenus par [34] en 2013 par la Chromatographie Liquide à Haute Performance avec une détection UV-vis à l'aide d'une colonne inverse sans étalons et du couplage LC-SM viennent renforcer les notre étant donné que les résultats présentés ont tenu compte de mêmes éléments.

### 3-3. Propriétés anti oxydantes

La **Figure 4** donne les résultats obtenus à partir de la droite d'étalonnage.

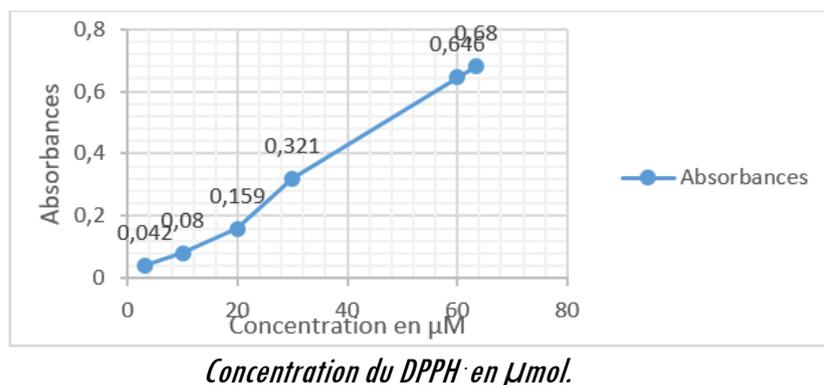


Figure 4 : Droite d'étalonnage du DPPH

En portant en graphique les pourcentages de réduction du DPPH<sup>•</sup> en fonction de la concentration des extraits de *Canna indica* ou de la vitamine C, on obtient les concentrations efficaces ( $EC_{50}$ ) suivantes consignés dans le **Tableau 3** suivant :

Tableau 3 : Valeurs d' $EC_{50}$  des anthocyanes extraits et de la vitamine C

Produits	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Vitamine C	0,04375
Anthocyanes <i>Canna indica</i>	0,157

Pour le calcul de l' $EC_{50}$ , la **Formule** suivante a été appliquée :

$$EC_{50} = y - b/a \tag{6}$$

En tenant compte du pourcentage de réduction du DPPH<sup>•</sup>, les concentrations des extraits de *Canna indica* et de la vitamine C prélevées dans le spectrophotomètre et de la concentration du DPPH<sup>•</sup> ont été les suivantes : la vitamine C ( 28, 92625  $\mu\text{M}$ ) et *Canna indica* : 21,74  $\mu\text{M}$  ; la concentration du DPPH<sup>•</sup> étant déjà connu (63,4  $\mu\text{M}$ ), Ceci permet de calculer le rapport molaire de la vitamine C et de *Canna indica* qui sont respectivement de 0,45625 et 0,343 en appliquant la **Formule** suivante  $\frac{b}{a} = \frac{[ ] \text{antioxydant}}{[ ] \text{DPPH}^{\bullet}}$  à partir de l'Équation

$$Y = ax + b \tag{7}$$

$$\text{où, } X = EC_{50}; (7) \text{ devient } Y = a EC_{50} + b \tag{8}$$

D'où,  $EC_{50} = Y - \frac{b}{a}$  qui est la valeur de l'Équation (6) ci-haut ; A partir des rapports molaires de *Canna indica* et celui de la vitamine C trouvés, les différentes concentrations inhibitrices ont été calculées : 0,04375  $\mu\text{g/mL}$  pour la vitamine C, soit (0,5 - 0,45625) et 0,157  $\mu\text{g/mL}$  pour *Canna indica* soit (0,5 - 0,343), sachant que  $EC_{50}$  ou CE 50 est la concentration entraînant 50 % de l'effet maximum. Les résultats obtenus montrent que la vitamine C a une activité antioxydante plus élevée que celles des anthocyanes totaux de *Canna indica*. Ce fait s'explique facilement par le fait que la vitamine C utilisée est un composé pur alors que les anthocyanes sont des mélanges de plusieurs composés ; donc les anthocyanes totaux de *Canna indica* présentent un potentiel pouvant conduire à leur utilisation comme source d'antioxydants et peuvent être utilisés contre certaines maladies causées par des stress oxydatifs divers. Toujours à titre comparatif, il paraît utile de signaler également les résultats obtenus par [35] sur l'activité antioxydante des pelures de treize

espèces de citrus. Ils avaient enregistré des  $EC_{50}$  allant de 0,6 à 3,3  $\mu\text{g/mL}$  et avaient qualifiés ces activités d'importantes ; Pourtant, celle que nous avons enregistrée dans le présent travail est nettement meilleur (0,157  $\mu\text{g/mL}$ ) tant que l' $EC_{50}$  est trop petit, l'activité antioxydante est élevée. En comparant nos résultats avec ceux enregistrés par [36], cette activité est nettement plus importante car ils ont trouvés les  $EC_{50}$  dans l'ordre de 6,73  $\mu\text{g/mL}$  pour le thé vert et 681,5 pour *Elettaria cardamomum* (L) et pourtant les anthocyanes totaux extraits de *Canna indica* ont présenté l' $EC_{50}$  de 0,157  $\mu\text{g/mL}$  alors que la vitamine C prise comme antioxydant témoin a présenté une  $EC_{50}$  de 0,04375  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4. Conclusion

Cette étude qui se situe dans le cadre général de la recherche des pigments végétaux naturels pouvant servir, comme antioxydants avait pour objectif principal : de déterminer par la Chromatographie Liquide à Haute Performance couplé au Spectromètre des Masses les anthocyanes principales des feuilles pourpres de *Canna indica* et comme objectifs spécifiques de : extraire, les caractériser et les utiliser comme antioxydants naturels. Les principaux résultats obtenus ont été les suivants : L'évaluation des propriétés anti oxydantes a été menée grâce à la réaction de réduction du radical DPPH• qui est stable et présente un maximum d'absorption à 515 nm. Les anthocyanes totaux extraits de *Canna indica* ont présenté une  $EC_{50}$  de 0,157  $\mu\text{g/mL}$  alors que la vitamine C prise comme antioxydant témoin a présenté une  $EC_{50}$  de 0,0437  $\mu\text{g/mL}$ . Enfin, la séparation des anthocyanes par LC-SM a montré que les feuilles pourpres de *Canna indica* renferment 10 anthocyanes différents parmi lesquels : 6 anthocyanines, le Pic 2 et 3 étant identiques et 4 anthocyanes acylés. Toutefois, il sera question en perspectives de tester pour chaque anthocyane isolé : ses propriétés anti oxydantes, d'autres activités biologiques de l'organisme.

#### Références

- [1] - J. BRUNETON, Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4<sup>e</sup> éd. Revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, (2009) 1288 p. (ISBN 978-2-7430-1188-8)
- [2] - P. SARMI- MANCHANDO and V. CHEYNIER, Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions Tec & Doc, (2006) 398 p. ISBN (2-7430-0805-9)
- [3] - « Indicateur coloré naturel : le jus de chou rouge - SPC - Au laboratoire des Sciences Physiques et Chimiques » sur [www.spc.ac-aix-marseille.fr](http://www.spc.ac-aix-marseille.fr), (25 Janvier, 2019)
- [4] - CHEIKH BEYE, LAT SOUK TONKAWA, MAMADOU AMADOU SEEK, PHYLIPPETOUNARD and PATRICK, *Biotech. Agron. Soc. Env.*, Vol. 19, N<sup>o</sup> 4 (2015) 392 - 401
- [5] - D. J. CRAM et G. S. HAMMOND, Chimie organique, Presses Universitaires de Laval, Québec : ISBN-10 :2257151045, ISBN-13, (2017) 978 - 22 57151049
- [6] - N. KOVINICH, Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in Arabidopsis, *Plantae*, Vol. 240, (2014) 931 - 940
- [7] - A. NDUNGI, Etude de l'activité antioxydante des pigments poly phénoliques naturels : cas des anthocyanes des feuilles pourpres de *Canna indica* L. et d'*Hibiscus acetocella* Whern ex Hiern « Essai de leur utilisation comme indicateur de titrages acide-base ». Thèse de Doctorat Université de Kisangani, (2019) 152 p.
- [8] - LS. LEV-YADUN and K. GOULD, « Role of Anthocyanins in Plant Defence ». In K. Gould, K. Davies & C. Winefield (eds.), *Anthocyanins. Biosynthesis, functions, and applications*, Springer, (2009) 21 - 48
- [9] - J. PINCEMAIL et O. DEFRAIGNE, Espèces oxygénées en médecine humaine : une approche didactique. Vaisseaux, Cœur, Poumon, Vol. 3, (2003) 133 - 8

- [10] - ISOREZ, Contribution à la chimie de flavonoïdes : accès à des analogues du pigment du vin rouge, Thèse de Doctorat Université Louis Pasteur de Strasbourg, (2007) 228 p.
- [11] - S. A. NIRMAL, S. MSHELKE, P. B GAGARE, P. R. JADHAV & P. M. DETHE, Anti nociceptive and anthelmintic activity of *Canna indica*. *Natural Product Research*, Vol. 21, N°12 (2007) 1042 - 1047
- [12] - S. A. NIRMAL and N. M. KOLHE, Non polar compounds from *Canna indica* rhizomes, Fact a University, series physics, *Chemistry and Technology*, Vol. 6, (2008) 141 - 144
- [13] - G. XU, J. CHEN and LIU, Effects of heat treatment on the Phenolic compound and anti oxydative capacity of citrus peelexttract, *J Agric Food Chemistry*, 55 (2007) 330 - 335
- [14] - D. HABRANT, Synthèse et caractérisation des nouveaux antioxydants aromatiques d'acides fulviques pour application en dermo-cosmétique : 187-191 ; Thèse de Doctorat Strasbourg, Université Louis Pasteur, bases des données W.W.W. Thèse .fr depuis 1985 en France, (2008)
- [15] - W. BRAND-WILLIAMS, M. E. CUVELIER BERSET, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technology*, Vol. 28, (1995) 25 - 30
- [16] - P. MOLYNEUX, The use of the stable free radical Diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.*, Vol. 26, N° 2 (2004) 211 - 219
- [17] - G. DARNE and Y. GLORIES, Anthocyanes des feuilles de différentes variétés de *Vitis Vinifera* L. entre la véraison des raisins et la chute des feuilles : O.I.V. Paris, Vol. 27, (1988) 71 - 78
- [18] - Organisation Internationale de la Vigne (O.I.V) (Résolution oéno 2003/2007)
- [19] - J. M. DOURNEL, Recherches sur les combinaisons Anthocyanes-Flavonols. Influence de ces réactions sur la couleur du Vin Rouge. Thèse de Doctorat 3è Cycle, Bordeaux II, (1985)
- [20] - F. MATTIVI, A. SCIENZA, O. FAILLA, P. VIKI, R. ANZANI, G. RODESCO, *Vitis vinifera* a chemotaxonomic approach : Anthocyanin's in the skin. *Vitis* (special issue), (1990) 119 - 133
- [21] - H. OTTENEDER, B. HOLBACH, R. MARX, *Is Rotwein mittels Hoschdrufiussig*, Vol. 50, (2002) 4096 - 4102
- [22] - I. BUMS, W. MLLEN, P. TEISSENDRE, A. CROZIER, Variations in the profile and Content of Anthocyanin's in Wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J. Agric. Food chem*, Vol. 50, (2002) 4096 - 4102
- [23] - L. W. WULF and C. W. NAGEL, High-pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *Am. Enol. Vitic.*, Vol. 29, (1978) 42 - 49
- [24] - A. HEIER, W. BLASS, A. DROF, R. WITTKOWKI, Anthocyanin analysis by HPLC/ESI-MS, *Am. J. Enol. Vitis*, Vol. 80, (2002) 1909 - 1917
- [25] - LIMING ZENG, Etude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle, Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux, (2015)
- [26] - WENZEL KARRIS SON, H. DITTRICH, M. HEIMFAHRT, Die Zusammensetzung der Anthocyane in den Beeren verschiedener Rebsorten, *Vitis*, Vol. 26, (1987) 65 - 78
- [27] - X. L. WU, L. GU, R. L. PRIOR & S. MCKAY, Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, (2004) 7846 - 7856
- [28] - C. DALLAS and O. LAUREANO, Effect of SO<sub>2</sub> on the extraction of individual anthocyanin's and Colored matter of three Portuguese grapes varieties during wine making, *Vitis*, 33 (1994) 41 - 47
- [29] - PEIPEI TANG and M. MONICA GIUSTI, Black goji as a potential source of natural color in a wide pH range in Food Chemistry, Vol. 269, (2018) 419 - 426
- [30] - DONGNAN LI, XIANJUN MENG, BIN LI, Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis, *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 47, (2016) 1 - 7

- [31] - YUKI KIMURAA, TAKESHI MAEDAA, SATORU IUCHIA, NOBUAKI KOGAA, YASUJIRO MURATAB, ATSUSHI WAKAMIYAB, KUMI YOSHIDAA, Characterization of dye-sensitized solar cells using five pure anthocyanidin 3-O-glucosides possessing different chromophores. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, Vol. 335, (2017) 230 - 238
- [32] - L. SUN, X. DING, J. QI, H. YU, S. HE, J. ZHANG, H. GE, B. YU, Antioxidant anthocyanins screening through spectrum—effect relationships and DPPHHPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China. *Food Chem.*, Vol. 132, N°2 (2012) 759 - 765
- [33] - Q. TIAN, M. M. GIUSTI, G. D. STONER, S. J. SCHWARTZ, Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *J. Chromatogr., A* Vol. 1091, N°1 et 2 (2005) 72 - 82
- [34] - A. VIOLETA NOUR, B. FRANCI STAMPAR, B. ROBERT VEBERIC, B. JERNEJA JAKOPIC, Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration, (2013)
- [35] - G. KAMRAN, JOSEPH., R. MOHAMED, Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Scie*, Vol. 22, N° 3 (2009) 277 - 281
- [36] - KHALAF, K. ASHOK, SHAKYA, Antioxidant Activity of Some Common Plants; *TÜBITAK Turk J. Biol*, Vol. 32, 55 (2008) 51 - 55 p.