

E.N.S.S.I.BECOLE NATIONALE SUPERIEURE
DES SCIENCES DE L'INFORMATION
ET DES BIBLIOTHEQUES**U.C.B.L**
UNIVERSITE
CLAUDE BERNARD
Lyon I**DESS en INFORMATIQUE DOCUMENTAIRE****RAPPORT DE RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE**

Apport de l'électrophorèse capillaire

à l'étude des flavonoïdes.

par

Claude CERDON

Sous la direction de

Bernard VOIRIN

Université Claude Bernard - LYON I

U.F.R Biologie

Laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie

BIBLIOTHEQUE DE L'ENSSIB



8083588

ANNEE 1996 - 1997

E.N.S.S.I.B

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
DES SCIENCES DE L'INFORMATION
ET DES BIBLIOTHEQUES

U.C.B.L

UNIVERSITE
CLAUDE BERNARD
Lyon I

DESS en INFORMATIQUE DOCUMENTAIRE

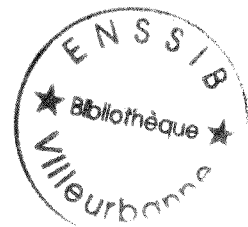
RAPPORT DE RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Apport de l'électrophorèse capillaire

à l'étude des flavonoïdes.

par

Claude CERDON



Sous la direction de

Bernard VOIRIN

Université Claude Bernard - LYON I
U.F.R Biologie
Laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie

ANNEE 1996 - 1997

1997
117
05

Année 1996-1997

Auteur : CERDON Claude

Titre : Apport de l'électrophorèse capillaire à l'étude des flavonoïdes

Résumé

La plupart des flavonoïdes, composés phénoliques végétaux, possèdent des propriétés biologiques et sont d'un grand intérêt pour l'industrie pharmaceutique. De ce fait, l'analyse de ces métabolites secondaires par électrophorèse capillaire, technique relativement récente, fait l'objet de nombreux travaux.

Cette étude présente les différents moyens et méthodes mis en œuvre pour réaliser une bibliographie aussi complète que possible sur ce sujet. Suite à cette recherche, est exposée une synthèse de l'apport de l'électrophorèse capillaire à l'étude des flavonoïdes.

Descripteurs : Electrophorèse capillaire - Chromatographie MECC - Flavonoïde - Glycoside

Abstract

Flavonoids are a widespread group of natural products with biochemical and pharmacological properties. Their analysis has mainly been performed by reversed-phase high-performance liquid-chromatography (HPLC). Recently, capillary electrophoresis (CE), an important analytical separation technique, has been proposed as a complementary method and is now widely used because of its efficiency, flexibility and accuracy.

This study reports the different methods employed to collect documentation concerning this subject. The most important pieces of information have been selected to realize a synthesis on the capillary electrophoresis contribution in the flavonoid analysis.

Keywords : Capillary electrophoresis - MECC Chromatography - Flavonoid - Glycoside

SOMMAIRE

Introduction générale	6
Recherche bibliographique	
I - Recherche automatique	8
1. Les bases de données	8
1.1. Interrogation du serveur Dialog	8
1.1.1. Choix des mots-clés	9
1.1.2. Equations de recherche et résultats	10
1.1.3. Prix de la recherche	12
1.2. Interrogations de CD-ROMs	13
1.2.1. Les CD-ROMs interrogés	13
1.2.2. Résultats des interrogations	13
2. Recherche sur l'Internet	14
II - Recherche manuelle	15
1. Recherche manuelle de références	15
2. Localisation et récupération des documents primaires	15
III - Conclusion	15
Synthèse bibliographique	
I - Electrophorèse capillaire	18
1. Historique	18
2. Les données bibliographiques et l'électrophorèse capillaire	18
3. Principe de l'électrophorèse capillaire	20
3.1. Introduction	20
3.2. Principe	21
4. Les différentes techniques d'électrophorèse capillaire	23
4.1. Electrophorèse capillaire de zone (CZE)	23
4.2. Chromatographie électrocinétique micellaire (MECC)	24
4.3. Electrophorèse capillaire sur gel (CGE)	25
4.4. Focalisation isoélectrique capillaire (CIEF)	25
4.5. Isotachophorèse (ITP)	25
5. Domaines d'application de l'électrophorèse capillaire	26
II - Electrophorèse capillaire des flavonoïdes	26
1. Introduction	26
2. Analyse des flavonoïdes par électrophorèse capillaire	27
2.1. Flavonoïdes aglycones	27
2.1.1. Analyse par chromatographie électrocinétique micellaire (MECC)	27
2.1.2. Analyse par électrophorèse capillaire de zone (CZE)	29
2.2. Flavonoïdes glycosylés	29
2.2.1. Flavonoïdes-O-glycosides	30
2.2.1.1. Analyse par chromatographie électrocinétique micellaire	30

2.2.1.2. Analyse par électrophorèse capillaire de zone	31
2.2.2. Flavonoïdes-C-glycosides	32
2.3. Isoflavones	32
2.4. Anthocyanines	32
III - Conclusion	33
Conclusion générale	35
Références bibliographiques	37

INTRODUCTION GENERALE

Le sujet de ce rapport de recherche bibliographique a été proposé par Monsieur Voirin, Maître de Conférences au laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie de l'Université Claude Bernard (Lyon I).

Cette étude vise à décrire l'état actuel des connaissances en matière d'analyse des flavonoïdes par électrophorèse capillaire.

Depuis quelques années, cette méthode d'analyse est en pleine expansion. Aujourd'hui, elle est reconnue comme une technique à part entière, complémentaire des techniques classiques que sont la chromatographie sur papier, la chromatographie liquide haute performance ou encore la chromatographie en phase gazeuse. Les principaux avantages de l'électrophorèse capillaire sont la rapidité des analyses et le besoin de très faibles quantités d'échantillon se traduisant par une forte sensibilité.

Pour chaque composé ou catégorie de composés, l'utilisation de cette technique nécessite des mises au point analytiques relevant de la recherche fondamentale. Les résultats obtenus, importants pour la communauté scientifique, font l'objet de nombreuses publications.

Depuis peu, l'électrophorèse capillaire est appliquée à l'étude des flavonoïdes. Parmi eux, les C-glycosylflavones, composés analysés au laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie, n'ont fait l'objet que d'un seul travail publié à ce jour.

L'électrophorèse capillaire est également utilisée dans les domaines appliqués. Elle constitue par exemple, pour l'industrie pharmaceutique une méthode de contrôle rapide d'identification des espèces végétales : obtention d'électrophérogrammes qui servent "d'empreintes digitales". Elle peut être aussi une technique de dosage des principes actifs contenus dans des lots de plantes.

Enfin, compte tenu de l'importance grandissante de cette méthode, les principes et techniques d'électrophorèse capillaire sont enseignés aux étudiants en maîtrise de Sciences et Techniques.

Ce rapport de recherche bibliographique est composé de trois parties principales. Dans la première, sont exposées les méthodes de recherche bibliographique pour l'obtention des documents primaires ou secondaires. Après une sélection de ces documents, ceux jugés pertinents feront l'objet d'une synthèse bibliographique, constituant la seconde partie de cette étude. La troisième et dernière partie de ce rapport, faisant suite à une conclusion générale, contiendra la liste de tous les documents cités et classés selon leur ordre d'apparition dans la synthèse.

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I - RECHERCHE AUTOMATIQUE

1. Les bases de données

En fonction de la nature de l'information fournie, on peut distinguer les bases de données bibliographiques, les bases factuelles et les bases en texte intégral.

Les bases de données bibliographiques permettent de retrouver et d'identifier les documents (articles, périodiques, ouvrages, thèses, comptes-rendus de congrès, documents audiovisuels ou iconographiques...). Les références obtenues, titre, auteur, source sont le plus souvent accompagnées d'un résumé et de mots-clés qui décrivent le contenu du document.

Il existe plus de 5 000 bases de données et une même base peut être accessible sur plusieurs serveurs.

Le choix d'une base doit prendre en compte plusieurs critères : sa richesse, son ancienneté, sa couverture géographique, la nature des documents analysés, le délai d'entrée et de mise à jour des données, la structuration du vocabulaire et la fiabilité de l'indexation.

1.1. Interrogation du serveur Dialog

Dialog est un serveur américain (Knight Rider, Californie, USA) de bases de données. Aujourd'hui, il fait partie des serveurs les plus importants. Il gère environ 550 bases de données commerciales et couvre de nombreux domaines : Sciences et Techniques, Brevets, Informations des Entreprises, Informations Economiques, Presse Américaine.

D'une façon générale, plusieurs domaines peuvent contenir des informations sur notre sujet :

- la physiologie, biologie végétale : biosynthèse des flavonoïdes, localisation des flavonoïdes,
- la chimie - biochimie : extraction, purification des flavonoïdes,
- la chimie analytique : analyse des flavonoïdes,
- la médecine - pharmacie : propriétés des flavonoïdes.

En consultant le catalogue d'informations de Knight Rider, nous avons sélectionné 6 bases de données hébergées par Dialog, interrogeable à l'ENSSIB.

Dans le tableau I, sont résumées les principales caractéristiques de chacune des bases interrogées sur Dialog.

Tableau I : Présentation des bases de données retenues pour l'interrogation en ligne.

Caractéristiques	Biosis Previews	Life Science	Pascal	Analytical Abstracts	Chemical Abstracts	Current Contents
Numéro	55	76	144	305	399	440
Pays producteur	USA	USA	France	UK	USA	USA
Années interrogées	1985 +	1982 +	1973 +	1980 +	1967 +	1990 +
Fréq. de mise à jour	bimensuel	mensuel	mensuel	mensuel	bihebdo.	hebdo.
nb. enreg./mise à jour	22 500	10 000	40 000	1 200	17 000	15 000
nb. titres traités	9 500	5 000	8 500	1 300	14 000	6 500
Domaines						
Chimie/Industrie chimique				X	X	X
Agriculture/Agronomie	X		X			X
Santé/Médecine/Biosciences	X	X	X			X
Industrie pharmaceutique					X	X

Comme nous avons plusieurs bases à interroger, notre recherche sera effectuée en OneSearch : interrogation simultanée des 6 bases. Dans ces conditions, nous ne pouvons pas faire de requêtes utilisant les propriétés spécifiques de chacune, comme par exemple utiliser les "Concepts Codes" et les "Biosystematic Codes" de Biosis Previews.

1.1.1. Choix des mots-clés

Compte tenu de la remarque précédente, nous avons cherché à utiliser des mots pouvant être des mots-clés ou descripteurs dans les différentes bases de données.

A partir des articles fournis par Monsieur Voirin, points de départ de cette recherche, nous avons étudié le contenu des rubriques mots-clés.

Nous avons également consulté l'index de Pascal sur CD-Rom, l'index de Chemical Abstracts sur papier et le Master Index de Biosis. Ceci nous a permis de constater que "capillary electrophoresis " et "flavonoïd" sont très souvent présents dans les index ou les mots-clés.

Pour la technique, les mots utilisés lors de la recherche sont les suivants :

- "électrophorèse" / "électrophorèse capillaire"
- "capillary electrophoresis"
- "capillary zone electrophoresis" / "free solution capillary electrophoresis"
- "micellar electrokinetic capillary chromatography" / "micellar electrokinetic chromatography".

Pour les composés analysés, nous avons utilisé :

- "flavonoïde"
- "flavonoid"

Pour élargir la recherche, nous pouvons également utiliser d'autres termes organisés autour du mot-clé "flavonoïde" de la façon suivante :

- polyphénol ou composés phénoliques
 - phenol
 - acide phénolique
 - flavonoïde**
 - flavonol
 - flavanone
 - flavone
 - isoflavone
 - chalcone
 - aurone
 - anthocyanidine

Une autre hiérarchie peut également être proposée :

- polyphénol ou composés phénoliques
 - phenol
 - acide phénolique
 - flavonoïde**
 - flavonoïde aglycone
 - flavonoïde glycosylé
 - flavonoïde-O-glycoside
 - flavonoïde-C-glycoside

1.1.2. Equations de recherche et résultats

* Première requête

La première équation posée (présentée avec les réponses globales) est la suivante :

?s capillary(1w)electrophoresis

S1 18540 CAPILLARY(1W)ELECTROPHORESIS

?s micellar(w)electrokinetic(1w)chromatography

S2 2920 MICELLAR(W)ELECTROKINETIC(1W)CHROMATOGRAPHY

?s s1 or s2

S3 20344 S1 OR S2

?s flavonoid? ?

S4 31755 FLAVONOID? ?

?s s3 and s4

S5 187 S3 AND S4

?rd s5

S6 68 RD S5 (unique items)

Dans le tableau II, ces résultats sont repris en précisant le nombre de réponses obtenues pour chaque base interrogée.

Tableau II : Nombre de notices bibliographiques en fonction de la question posée et de la base interrogée.

Base Question	144	305	55	440	399	Total
S1	2765	2933	2982	5295	4565	18540
S2	468	487	446	1025	494	2920
S3	3074	3299	3258	5698	5015	20344
S4	6992	305	5970	3934	14554	31755
S5	27	24	22	82	32	187

Avec cette équation, nous regroupons les différentes formes d'électrophorèse, sous le terme de "capillary electrophoresis". De plus, nous interrogeons plus spécifiquement les deux techniques les plus utilisées : l'électrophorèse capillaire de zone et la chromatographie électrocinétique micellaire.

Les résumés de la base Pascal sont souvent longs et bien détaillés, c'est pourquoi nous avons mis cette base en premier.

Pour la base Chemical Abstracts, nous avons interrogé l'ensemble de la base 399, sachant bien que cela était inutile puisque l'utilisation de la CE date de 1990 environ. Cependant, nous n'avons pas la possibilité d'interroger sur une période plus courte car les bases 312 (1987-1991) et 313 (1992+) n'étaient pas autorisées.

La base 76 (Life Science) n'a pas été interrogée puisque dans l'autre requête (voir deuxième requête), elle n'avait donné qu'une seule réponse compte tenu de sa place, et qui plus est, était un doublon non éliminé.

Les interrogations ont été faites sur l'ensemble des champs afin d'éviter de perdre des références se rapportant à l'électrophorèse capillaire des flavonoïdes et dont l'un des termes n'apparaîtrait pas dans le titre ni dans les mots-clés ou descripteurs.

De cette manière, nous avons obtenu 187 références.

Le lancement de la commande RD (Remove Double) permet d'éliminer les doublons entre les bases. Dans un tel cas, la référence qui est dans la première base interrogée (par rapport aux autres bases concernées) est gardée. Nous n'avons alors plus que 68 références. Sur ces 68 notices rapatriées, nous avons observé un grand nombre de parasites (lettres manquantes le plus souvent) apparus avant le lancement de RD et gênant ainsi l'efficacité de cette commande. Nous avons retrouvé 30 doublons, pour obtenir finalement 38 références uniques, toutes pertinentes par rapport à la question posée.

*** Deuxième requête**

La seconde requête a consisté à utiliser des mots englobant le terme flavonoïde.

La requête et les résultats obtenus sont les suivants :

N°	Nb. de réponses	Question
S1	13994	CAPILLARY(1W)ELECTROPHORESIS
S2	2398	MICELLAR(W)ELECTROKINETIC(1W)CHROMATOGRAPHY
S3	15341	S1 OR S2
S4	13689	PHENOLIC(W)COMPOUND? ? OR POLYPHENOL? ?
S5	2229	FLAVONO? ?
S6	2887	PHENOLIC(W)ACID? ?
S7	8581	FLAVONE? ?
S8	2613	FLAVON?(2N)GLYCOS? OR FLAVON?(N)C-GLYCOS?
S9	27205	S4 OR S5 OR S6 OR S7 OR S8
S10	199	S3 AND S9
S11	61	RD S10 (unique items)
S12	15	C-GLYCOS?(1N)FLAVO?
S13	0	S3 AND S12

Les 61 réponses se décomposent en fonction des bases de la façon présentée dans le tableau III.

Tableau III : Présentation des résultats de la deuxième requête.

Base \ Résultats	Nombre Réponses	Double	Reste	Non Pertinente	Pertinente
Biosis 55	28	0	28	5	23
Life Sciences 76	1	1	0	0	0
Pascal 144	13	2	11	5	6
Anal. Abs. 305	12	4	8	6	2
Curr. Cont. 440	8	0	8	0	8
TOTAL	61	6	55	16	39

Sur ces 39 réponses pertinentes (65%), 15 sont nouvelles par rapport à la première requête, ce qui montre l'intérêt de l'élargissement.

On observe également qu'il n'y pas de réponse pour la question S13 (S3 et S12), les flavonoïdes intéressants tout particulièrement mon commanditaire. Avec une telle question, il n'existe pas, à priori, de documents traitant de cette classe de flavonoïdes. Nous en avons cependant trouvé un où le descripteur est flavonoïde, d'où l'intérêt de prendre soin de ne pas trop réduire l'espace de recherche.

*** Troisième requête**

Une troisième requête a consisté à interroger la base de données "Current Contents" (440) pour voir l'évolution du nombre de publications concernant l'électrophorèse capillaire.

Cette base dépouille environ 6 500 journaux relatifs à toutes disciplines des sciences, sciences sociales, arts et humanités.

D'autre part, cette base nous donne le plus de réponses pour la requête "S3 = S1 or S2" : 5698, pour la période 1990-1997.

L'interrogation année par année a donné le résultat suivant :

N°	Nb. de réponses	Question
S1	5295	CAPILLARY(1W)ELECTROPHORESIS
S2	1025	MICELLAR(W)ELECTROKINETIC(1W)CHROMATOGRAPHY
S3	5698	S1 OR S2
S4	828903	PY = 1990
S5	225	S3 AND S5
S6	850582	PY = 1991
S7	431	S3 AND S6
S8	862210	PY = 1992
S9	585	S3 AND S8
S10	894415	PY = 1993
S11	815	S3 AND S10
S12	934744	PY = 1994
S13	1062	S3 AND S12
S14	970054	PY = 1995
S15	1230	S3 AND S14
S16	903580	PY = 1996
S17	1331	S3 AND S16

Cette requête permet de constater que même si l'augmentation du nombre de publications n'est plus exponentielle comme dans les années 80, elle reste cependant significative, preuve que cette technique est en plein développement.

1.1.3. Prix de la recherche.

A l'aide du détail fourni à la fin de chaque cession et repris dans le tableau IV, nous avons pu estimer le coût de cette recherche à 2 736 francs (les tarifs utilisés datent de septembre 1995 et 1 \$ = 5,70 francs au 28 février 1997).

Tableau IV : Prix de revient de l'interrogation de Dialog.

Bases	Prix .h ⁻¹ de connexion	temps de connexion	prix	Prix unitaire réf	Nombre réf.	prix réf.	Total (\$)
55	60 \$	0.647	38,8	1,25 \$	52	65,0	103,8
76	60 \$	0.106	6,4	1,25 \$	2	2,5	8,9
144	60 \$	0.79	47,4	1,10 \$	56	61,6	109,0
305	90 \$	0.249	22,4	2,95 \$	36	106,2	128,61
440	90 \$	0.495	44,6	1,75 \$	32	56,0	100,6
399	90 \$	0.238	21,4	1,75 \$	5	8,8	30,2
Total		2.525	181,0		183	300,0	481,1

1.2. Interrogation des CD-ROMs

1.2.1. Les CD-ROMs interrogés

Doc-Thèses 1996. CD-ROM qui recense les thèses, scientifiques entre autres, soutenues dans les universités françaises depuis 1972. Ce CD-ROM est disponible à l'ENSSIB et à la Bibliothèque Universitaire des Sciences de Lyon I.

Pascal sur CD-ROM : n'a pas pu être interrogé assez longtemps pour présenter les résultats compte tenu des problèmes rencontrés aussi bien à l'ENSSIB qu'à la BU de Lyon I.

Du fait de l'importance des flavonoïdes pour leurs propriétés biologiques nous avons interrogé 3 bases de données à orientation médicale disponibles sur CD-ROM (avec WinSpirs) à la BU de Lyon I.

Medline : CD-ROM de l'Index Medicus (document sur papier). Cette base offre une couverture biomédicale et pharmacologique complète (3 700 périodiques dont environ 100 français). Contrairement à l'Index Medicus, Medline fournit des résumés et, comme l'Index Medicus, il possède une indexation fine et rigoureuse grâce au MeSh (vocabulaire à structure hiérarchisée).

Sur CD-ROM, la BU de Lyon I possède la période 01/1990 - 09/96.

Embase : Base de données de Excerpta Medica. Couvre également le domaine médical, biomédical avec une orientation particulière vers la pharmacologie et la toxicologie. Son autre caractéristique est de fournir une très bonne couverture de la littérature européenne. Les articles sont sélectionnés parmi 3 500 revues : 2 900 sont bien dépouillées et sur les 600 autres ne sont extraits que les informations relatives aux médicaments. Dans la base de données en ligne, le délai d'insertion est très rapide (moins de 1 mois après la parution de la revue).

Sur CD-ROM, la BU de Lyon I possède la période 07/1996 - 10/96.

Biosis : Base de données très riche dans le domaine des sciences de la vie et des recherches médicales (9 500 périodiques + livres et rapports de congrès). Cependant, la structuration complexe de l'information est la raison de sa sous-utilisation.

Sur CD-ROM, la BU de Lyon I possède la période 01/1994 - 09/95.

1.2.2. Résultats de l'interrogation des CD-ROMs

Pour ces CD-ROMs, les questions posées sont plus généralistes et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau V :

Tableau V : Résultats de l'interrogation des CD-ROMs.

Requête	Doc-Thèse		Medline		Embase		Biosis	
	Réponses	Réponses pertinentes	Réponses	Réponses pertinentes	Réponses	Réponses pertinentes	Réponses	Réponses pertinentes
électrophorèse capillaire	17	3						
électrophorèse capillaire ET flavo*	1	1						
electrophoresis AND flavo*			45	4	2	1	16	9
capillary electrophoresis AND flavo*			3	3	1	1	8	7

Pour la base de données Doc-Thèses, nous avons obtenu 3 réponses pertinentes.

Dans Medline, Embase et Biosis, la question "capillary electrophoresis AND Flavo*" fournit peu de réponses, pertinentes mais pas nouvelles par rapport à celles obtenues sur Dialog.

Les réponses jugées non pertinentes dans Medline pour la question "electrophoresis AND flavo*", traitent principalement de l'électrophorèse des protéines - enzymes intervenant dans la synthèse des flavonoïdes.

2. Recherche sur l'Internet

L'Internet est un réseau de réseaux qui s'appuie sur un ensemble de protocoles de communication (matériels et logiciels). Aujourd'hui, on compte plusieurs millions d'ordinateurs reliés à l'Internet.

La navigation dans l'Internet se fait grâce à des outils de navigation et d'orientation reliés aux services du réseau. Le plus utilisé est le World Wide Web (WWW) développé au CERN. Il sert d'interface vers les services Wais, Gopher, News, FTP, Telnet. Les serveurs WWW sont actuellement en pleine expansion.

Pour retrouver des serveurs et donc des informations, nous avons utilisé un programme client : Netscape disponible à l'ENSSIB.

Rechercher des informations sur l'Internet demande beaucoup de temps, compte tenu du bruit énorme obtenu au niveau des réponses : 1 000 réponses à une question n'est pas rare et espérer diminuer ce nombre en utilisant des opérateurs booléens (ET) n'est pas toujours concluant!

Cela pour préciser d'une part que le temps passé sur l'Internet, environ 30 heures, n'a pas été aussi bien géré que pour les autres recherches et d'autre part que les résultats seront présentés de façon moins rigoureuse. Malgré tout, des informations m'ont paru suffisamment intéressantes pour être rapportées ici.

Utilisation de moteurs de recherche :

- **Altavista**

URL : <http://altavista.digital.com/>

Altavista, développé par la société Digital Equipment, est considéré comme le plus large index et le plus performant. Le robot appelé Scooter, visite chaque mois pendant une dizaine de jours plus de 175 000 serveurs W3. Tous les documents sont alors indexés.

Requête : capillary electrophoresis AND polyphenol*

Réponses : 12 dont 1 pertinente : correspond à une liste de 500 titres environ de la revue Analytica Chimica Acta. Parmi eux, 3 étaient intéressants et visibles en texte intégral. La recherche est quelque peu fastidieuse.

Requête : capillary electrophoresis AND flavon*

Réponses : 27 réponses : 1 pertinente : le serveur de l'Institut de Chimie Analytique et Organique d'Orléans (ICAO).

Requête : capillary electrophoresis

Réponses : 4 000 réponses.

Requête : NEWS AND (capillary electrophoresis)

Réponses : 300 ressources : 4 intéressants : liste de travaux d'un laboratoire japonais, d'un laboratoire canadien, serveur de Beckman, serveur d'une société d'électrophorèse.

- **Ecila** est un moteur de recherche qui n'indexe que des serveurs W3 en France.

URL : <http://www.ceic.com/ecila>

Requête : électrophorèse capillaire

Réponses : 200 documents : 1 pertinent : l'ICAO.

Requête : électrophorèse capillaire ET flavonoid*

Réponses : 15 ressources : 1 pertinente : l'ICAO.

- **Excite**. Recherche par thèmes et par mots-clés

URL : <http://www.excite.com/>

Requête : "capillary electrophoresis" (Recherche sur le Web) : 29 024 réponses

Requête : "capillary electrophoresis AND flavonoid" (Recherche sur le Web) : 17 252 réponses
Requête : "capillary electrophoresis AND flavonoid" (Recherche dans Usenet Newsgroup) : 30 réponses dont l'adresse électronique pour une liste de discussion ayant pour thème l'électrophorèse capillaire.
Requête : "capillary electrophoresis AND flavonoid" (Recherche dans "Site de Revues") : 65 réponses : 2 intéressantes : le site Elsevier et CRC Press, Inc.
Requête : "capillary electrophoresis AND flavonoid" (Recherche avancée) : 38 documents : 1 concerne une Société d'électrophorèse.

Utilisation de plusieurs moteurs de recherche :

- **Savvy Search.** Recherche sur 28 moteurs simultanément.

URL : <http://guaraldi.cs.colostate.edu:2000/form>

Requête : "capillary electrophoresis AND flavonoid*"

Réponse : sur le service Magellan 1 réponse retenue sur 8 : le site Beckman

- **Inference find**

URL : <http://m5.inference.com/ifind/>

Depuis les mots-clés, Inference Find lance la recherche en parallèle sur plusieurs moteurs, compte les résultats et élimine les doublons, regroupe les réponses en catégorie et présente les résultats.

Requête : "capillary electrophoresis AND flavonoid*"

Réponse : 18 catégories. Celles présentant un intérêt : les sites commerciaux : Beckman, Elsevier...

II - RECHERCHE MANUELLE

1. Recherche de références

La consultation des documents de départ fournis par Monsieur Voirin et qui font référence à de nombreux travaux a fourni, outre les mots-clés, bon nombre de références de documents antérieurs contenant des informations sur notre sujet.

Pour l'année 1996 et 1997, j'ai consulté les "Chemical Abstracts" (documents sur papier) grâce à l'index de chaque volume pour les mots "capillary electrophoresis", "flavonoid", "flavonoid glycoside", "phenol".

Pour la même période, j'ai également regardé les pages de sommaire de "Journal of Chromatography" pour la rubrique "electrophoresis".

J'ai récupéré ainsi quelques documents supplémentaires.

2. Localisation et récupération des documents primaires

La localisation de la plupart des documents s'est faite à l'aide du CD-Rom Myriade : Catalogue Collectif National des Publications en Série (il recense 2 800 établissements français publics ou privés) consultable à l'ENSSIB et à la BU de Lyon I. 85% des revues nécessaires se trouvant dans cette BU, l'obtention des documents primaires n'a pas posé véritablement de problèmes.

III - CONCLUSION

La recherche sur Dialog a fourni des résultats très pertinents et complets (malgré l'interrogation en OneSearch) par rapport au sujet à traiter. "Current Contents" est la base qui recense le plus de références. Viennent ensuite les autres bases interrogées, d'une valeur égale si on regarde le nombre de documents rapatriés de chacune (avant dédoublonnage bien sûr).

Dialog est donc un moyen efficace pour trouver en un temps relativement court (3 heures environ) une importante quantité de références de qualité. L'inconvénient majeur, mais il est justifié en quelque sorte, reste le coût élevé de ce service.

La consultation des CD-ROMs Medline et Embase n'a pas fourni de références supplémentaires. En revanche, Embase aurait pu donner de nombreuses informations à propos des flavonoïdes : extraction faites sur des plantes médicinales et propriétés de ces métabolites secondaires.

Avec Internet, les résultats obtenus ne concernent pas directement le sujet. Cependant, ils apportent des informations intéressantes à propos de l'électrophorèse capillaire.

Le suivi des documents papier au fur et à mesure de leur parution a permis de continuer la recherche documentaire jusqu'en mi-février en surveillant d'éventuelles parutions.

Compte tenu du thème de notre recherche bibliographique, Dialog est sans conteste l'outil le plus adapté à la fourniture de documents secondaires. Cependant, pour la rédaction de la synthèse, les "à-côtés", trouvés à l'aide d'autres outils (CD-ROMs, Internet, Suivi des documents papier) ont été très utiles.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I - ELECTROPHORESE CAPILLAIRE (CE)

1. Historique

Une des conditions préalables pour toute discipline en sciences chimiques ou biochimiques est la nécessité de pouvoir séparer individuellement les composants d'un mélange.

Depuis les temps médiévaux et jusqu'au début de ce siècle, les principales méthodes dont disposait le chimiste pour la purification et l'isolement des différentes molécules ou familles de molécules d'un mélange étaient la filtration, la distillation et la cristallisation. Cependant, l'évolution de la complexité des systèmes étudiés, en biochimie principalement, a nécessité le développement de nouvelles technologies de séparation.

Aujourd'hui, les principales techniques d'analyse sont :

- la centrifugation,
- la chromatographie liquide ou gazeuse,
- l'électrophorèse ou électromigration.

Dans le monde scientifique, il n'est pas rare que la formulation de nouveaux concepts ou de nouvelles techniques analytiques soient antérieures de plusieurs dizaines d'années à leur large utilisation par la communauté scientifique.

Ainsi, l'électrophorèse en est un exemple. En effet, les premières expériences que l'on peut considérer comme pionnières de la technique électrophorétique actuelle furent menées par Tiselius à la fin des années 1930 [1]. D'autres formes d'électrophorèse ont suivi ces travaux comme l'électrophorèse sur papier applicable à l'analyse de diverses molécules et plus tard les gels de polymères et d'agarose pour l'analyse de peptides, de protéines, d'ADN et d'ARN.

D'un point de vue historique, l'électrophorèse capillaire n'apparaît sur la scène analytique que beaucoup plus tard. En effet, c'est Hjerten qui, en 1967, décrit le premier système d'analyse par électrophorèse capillaire [2]. Avec cet appareil, il était capable de démontrer la séparation d'ions inorganiques, de protéines et d'acides nucléiques de microorganismes. La performance de ce système était cependant limitée par des variations de qualité optique le long de l'axe du capillaire et par un large diamètre interne de ce même capillaire. Finalement, les travaux de Mikkers *et al.* [3] et de Jorgenson et Lukacs [4], à la fin des années 1970, début des années 1980 ont mis en évidence le pouvoir séparatif de l'électrophorèse capillaire. Ces travaux décrivent des appareils relativement simples, composés d'un capillaire de silice fondue, de réservoirs à électrodes, d'un détecteur optique, soumis à un champ électrique de fort voltage.

La simplicité de ce système et l'excellente séparation des molécules, aussi bien les grosses que les petites, ont inspiré de nombreux chercheurs et aujourd'hui, l'électrophorèse capillaire est une technique largement répandue.

2. Les données bibliographiques et l'électrophorèse capillaire

Compte tenu des raisons précédemment évoquées, la littérature concernant l'électrophorèse capillaire a augmenté de façon exponentielle depuis le début des années 1980 jusqu'au début des années 1990 [5]. En interrogeant la base de données "Current Contents", année par année, de 1990 à 1996, nous avons pu également constater une évolution du nombre de publications ayant trait à cette technique d'analyse (figure 1).

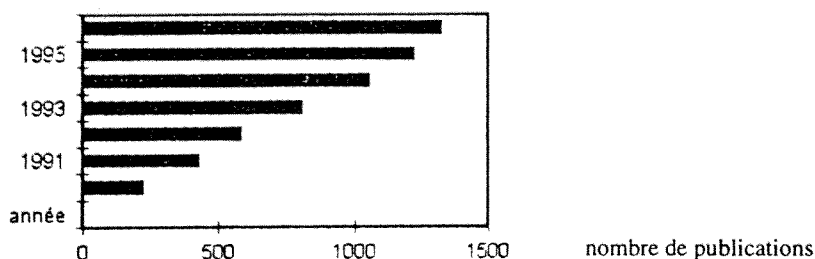


Figure 1 : Croissance de la littérature concernant l'électrophorèse capillaire dans la Base de Données "Current Contents".

D'autre part, bien que l'électrophorèse capillaire ait représenté une part importante des congrès et des meetings d'électrophorèse et de chromatographie ces 10 dernières années, elle est apparue véritablement comme une technique à part entière en 1989 à l'occasion du 1^{er} Symposium International d'Electrophorèse Capillaire Haute Performance (HPCE) qui s'est tenu à Boston. Depuis, cette manifestation a lieu chaque année et un compte-rendu de ces journées est publié, sous forme d'articles classés par thèmes, dans un numéro spécial de "Journal of Chromatography", l'une des principales revues internationales de grande renommée dans le domaine des méthodes de séparation et d'analyse. Par exemple, le compte-rendu du 8^{ème} Symposium International d'HPCE qui s'est tenu à Orlando du 21 au 25 janvier 1996 se trouve dans les volumes 744 [6] et 745 [7] de cette revue. La 9^{ème} édition de ce symposium a eu lieu du 26 au 30 janvier 1997 à Anaheim en Californie.

Dans cette même revue sont également publiés, dans des numéros spéciaux, des comptes-rendus d'autres symposiums sur l'électrophorèse capillaire comme par exemple :

- le Symposium International d'Electrophorèse Capillaire (York, Angleterre) qui a lieu tous les deux ans,
- le Symposium International d'Electrophorèse Capillaire et d'Isotachophorèse qui se tient également

tous les deux ans.

En parcourant les sommaires des dernières années de cette revue, nous avons aussi trouvé un numéro spécial entièrement consacré à la séparation par électrophorèse capillaire des produits pharmaceutiques [8].

La revue "Journal of Chromatography" a publié en 1996 deux numéros : 747 [9] et 748 [10] sous le titre de "Section Bibliographique". Nous y avons trouvé une partie "Electrophorèse" contenant 35 sections : livres et revues; théorie; techniques générales; techniques spéciales; dérivés hydrocarbonés ; alcools ; phénols; acides organiques; stéroïdes... A l'intérieur de chacune de ces sections se trouve une liste d'articles récents provenant de diverses revues se rapportant à l'intitulé de la section.

Sur le serveur Web de Elsevier [11], très gros éditeur de revues et ouvrages scientifiques, nous avons accès à une liste contenant les numéros et dates de parution des volumes de "Journal of Chromatography" des deux dernières années et pour chaque numéro, il est possible d'avoir la page de sommaire des titres.

Sur ce serveur, nous pouvons également faire des recherches de documents dans les différentes et nombreuses disciplines couvertes par le grand nombre de revues et livres de cet éditeur.

Il y a 3 ans, en 1994, une revue consacrée entièrement à l'électrophorèse capillaire a vu le jour, signe de l'importance grandissante de cette technique. Il s'agit de "Journal of Capillary Electrophoresis". Actuellement, 2 bibliothèques universitaires y sont abonnées : celle de Tours et celle de Nancy (répertoriées dans Myriade, le catalogue collectif national des publications en série, CD-ROM de 1995).

Depuis 4-5 ans, il existe aussi des livres traitant uniquement de l'électrophorèse capillaire. Ainsi, la bibliothèque universitaire de Lyon I en possède 4 (consultation du catalogue en ligne de l'ensemble des ouvrages disponibles dans les bibliothèques universitaires de Lyon I, OPAC).

- "Capillary Electrophoresis - Principles, practice and applications." 1992 [12],
- "Capillary Electrophoresis - Principles and practice." 1993 [13],
- "Capillary Electrophoresis Technology." 1993 [14],
- "Handbook of Capillary Electrophoresis." 1994 [15].

Enfin, pour clore cette partie concernant l'évolution de la bibliographie ayant trait à l'électrophorèse capillaire, nous pouvons signaler que nous avons trouvé des informations d'ordres divers et variés sur l'Internet.

- Sociétés d'Electrophorèse :

* Serveur de "l'American Electrophoresis Society" [16], où se trouvent des informations ainsi que le dossier d'inscription et de réservation concernant le meeting, associé au congrès des Sociétés d'Electrophorèse, qui aura lieu du 24 au 27 Mars 1997 à Seattle (Washington).

* Serveur de la "British Electrophoresis Society" (BES) [17]. Ce serveur propose des comptes-rendus de congrès, meetings, symposiums qui ont eu lieu en 1993, 94, 95 et 96 et pour lesquels cette société a participé.

* Serveur de la "Société Française d'Electrophorèse" [18]. Sur ce serveur, nous avons accès par exemple :

- au compte-rendu du Congrès International d'Electrophorèse qui s'est tenu à Paris du 30 août au 2 septembre 1995,

- au programme des prochaines manifestations pour cette discipline,
- à un dossier d'inscription pour devenir membre de la société,
- à la consultation des deux serveurs cités précédemment.

- Laboratoires de recherches :

Certains laboratoires mettent sur l'Internet la liste de leurs travaux et publications.

* Serveur du laboratoire Komatsu (Japon) [19] où est consultable la liste des publications de 1991 à 1995. Certains de ces travaux utilisent l'électrophorèse capillaire comme technique de séparation.

* Serveur de l'équipe de recherche de Charles A. Lucy de Calgary, Canada [20]. Ce laboratoire travaille beaucoup sur les applications et les facteurs influençant les analyses par électrophorèse capillaire. Son serveur répertorie tous les articles parus, à paraître, soumis ou en cours de rédaction ainsi que les participations des chercheurs aux manifestations passées ou à venir.

* Serveur de L'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), Orléans [21]. Sur ce serveur se trouve la liste de toutes les publications, communications et brevets de ce laboratoire réalisés entre janvier 1990 et décembre 1995. Certains de ces travaux concernent l'analyse des flavonoïdes par électrophorèse capillaire.

- Sociétés commerciales :

* Serveur de Merck [22], fabricant de réactifs et matériels pour l'analyse en général. Ce site propose des réactifs électropurs destinés à l'analyse par électrophorèse capillaire.

* Serveur de Beckman [23], sur lequel on trouve des informations sur les conférences de 1996 et 1997 concernant l'Analyse. Ainsi, du 16 au 19 juin 1997 se tiendra à la Faculté de Pharmacie de Montpellier un stage intitulé : "l'Electrophorèse Capillaire, méthode de routine pour le contrôle de qualité des médicaments : approche pratique". Le programme et le formulaire d'inscription y sont également disponibles.

3. Principe de l'électrophorèse capillaire

3.1. Introduction

L'électrophorèse capillaire appartient à la grande famille de l'électrophorèse, l'une des techniques les plus largement répandues pour la séparation et l'analyse des substances ioniques. Presque tous les modes d'électrophorèse utilisent une forme solide de support pour la migration électrique des analytes.

Ces formes solides de support sont :

- le papier : très utilisé pour la séparation des acides aminés et d'autres petites molécules organiques.

- le gel d'agarose ou de polyacrilamide : largement utilisé pour l'analyse des protéines et des ARN/ADN.

Cependant, en dépit de sa capacité à une analyse à haute résolution de systèmes complexes, elle présente quelques inconvénients que les scientifiques ont "supporté" pendant longtemps par manque d'alternative.

L'inconvénient principal est certainement la vitesse de séparation qui est limitée par la chaleur de Joule (l'échauffement du milieu conducteur dû au courant électrique qui le traverse). La faible dissipation de cette chaleur de Joule dans les solides (gel sur plaque) impose une utilisation de champs électriques de faible potentiel. De plus, d'un point de vue méthodologique, il y a des tâches "lourdes" et longues en temps, allant du moulage du gel, en passant par la préparation et le dépôt des échantillons, la résolution des espèces ioniques/moléculaires, pour arriver au stade final où le gel est coloré et les résultats obtenus.

Il existe enfin d'autres problèmes comme :

- la faible reproductibilité surtout avec l'analyse bidimensionnelle.

- des différences de coloration dépendant de l'analyte qui engendrent des difficultés de quantification.

- l'impossibilité d'automatiser entièrement ce procédé électrophorétique.

C'est ainsi que l'utilisation de capillaires comme canaux d'électromigration pour la séparation de diverses molécules présente non seulement une approche unique de séparation mais aussi de nombreux avantages par rapport à l'approche standard : électrophorèse avec supports solides.

Au cours des années 80 - 90, comme l'instrumentation pour la CE devenait techniquement réalisable, ce mode d'analyse s'est largement répandu compte tenu d'une part, des besoins nécessités par des analyses reproductibles en très petites quantités, et d'autre part, d'une volonté de réduire la consommation de réactifs

toxiques, choses qui n'étaient pas réalisables avec l'électrophorèse conventionnelle et les techniques chromatographiques classiques que sont la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie liquide haute performance (HPLC).

En plus de la dissipation de la chaleur de Joule il y a de nombreux avantages associés à l'utilisation de capillaires. Ceux-ci fournissent des volumes totaux de colonne de l'ordre du μl . Cette technique utilise donc de très petites quantités de tampon. Le volume de l'échantillon ne devant pas excéder 1 à 5 % du volume total, les volumes d'échantillon introduits sont de l'ordre du nl ($< 0,2 \text{ nl}$). Donc 5 μl d'échantillon suffisent amplement pour des analyses répétitives.

En résumé, nous pouvons retenir que l'électrophorèse capillaire est issue de 3 technologies :

- le développement de la séparation de substances chimiques par l'électrophorèse conventionnelle ,
- le développement de tubes en silice peu chers et de haute qualité provenant de la chromatographie en phase gazeuse,
- le développement de détecteurs optiques très sensibles provenant de l'HPLC.

D'autre part, elle présente de réels avantages tels que :

- l'utilisation d'une faible quantité d'échantillon pour les analyses,
- l'utilisation d'une petite quantité de solvant,
- une vitesse d'analyse élevée, donc un temps d'analyse court,
- une forte sensibilité.

3.2. Principe

La base de la séparation par électrophorèse capillaire est identique à celle des autres techniques électrophorétiques : les molécules chargées migrent en présence d'un champ électrique vers l'électrode de charge opposée.

Une particule chargée en solution sera mobile quand elle sera placée dans un champ électrique. La vitesse, acquise par le soluté sous l'influence du champ électrique appliqué, est la résultante de la mobilité apparente du soluté et le champ électrique [4].

Avec l'électrophorèse capillaire, le "coeur" du système d'analyse est un tube capillaire (figure 2).

Ce sont généralement des capillaires de silice fondue ayant des diamètres internes de 20 à 100 μm , des longueurs de 20 à 100 cm et contenant une solution tampon. Extérieurement, ils sont recouverts avec une substance polymérique qui leur confère une grande flexibilité.

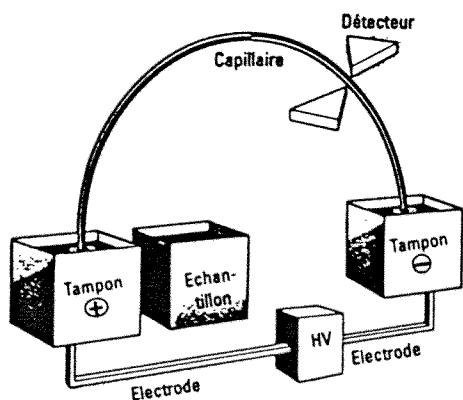


Figure 2 : Schéma général de l'appareil d'électrophorèse capillaire.

D'un point de vue général, plus le diamètre interne du capillaire est faible, meilleure sera la résolution.

Avec de telles dimensions, le très fort rapport surface/volume des capillaires favorise une très grande dissipation de la chaleur de Joule générée par le champ électrique appliqué. Ceci est illustré dans le tableau VI qui compare le rapport volume/surface d'un système d'analyse standard de gel sur plaque avec des capillaires standards de différents diamètres internes remplis de gel (électrophorèse capillaire sur gel). Cette forte disparité du rapport

surface/volume rend compte du fait que l'analyse sur plaque de gel est limitée à des champs électriques de 15 à 40 V/cm alors que des champs supérieurs à 800 V/cm peuvent être appliqués à des capillaires contenant le même type de gel [5]. Du fait de sa forte capacité à dissiper la chaleur de Joule, la séparation électrophorétique peut être réalisée à plus de 30 000 V avec une température du capillaire thermostatée à température ambiante [5].

Tableau VI : Comparaison des rapports Surface/Volume pour du gel sur plaque et pour des capillaires de 57 cm de longueur et de diamètres internes variables (d'après Oda et Landers [5]).

	Surface (mm ²) = S	Volume (µl) = V	Rapport S/V
Gel sur plaque (14 x 11.5 x 0.15 cm)	32,20	24,15	1,3
Capillaire (diamètre interne)			
20 µm	35,81	0,179	200
50 µm	89,53	1,119	80
75 µm	134,3	2,518	53
100 µm	179,1	4,477	40
200 µm	358,1	17,907	20

L'échantillon est introduit la plupart du temps à l'anode et cette injection peut se faire de plusieurs façons :

- par différence de pression (création de vide en sortie du capillaire ou de surpression en entrée),
- par siphonnement (injection hydrostatique),
- à l'aide d'une valve d'injection,
- par injection électrophorétique.

La quantité d'échantillon à injecter est très faible (de l'ordre du ng) mais sa concentration doit être relativement importante pour permettre la détection (de l'ordre du µg.ml⁻¹). Ceci du fait que le volume pouvant être injecté sans perturber la séparation est très faible (de l'ordre du nl). En effet, la résolution et les plateaux théoriques des analyses par CE diminuent quand augmente la quantité injectée. D'autre part, le temps d'injection doit être aussi court que possible [25].

Une fois que l'échantillon est injecté et le champ électrique appliqué, les solutés se séparent en fonction de leur différence de mobilité.

Après une durée d'analyse de 15 à 20 minutes, les solutés passent devant une "fenêtre", un détecteur, sur le capillaire et sont détectés en UV/Visible.

La séparation est basée sur la différence d'électromobilité des composés c'est-à-dire sur la différence de vitesse des molécules dans un champ électrique. Le champ électrique est fonction du voltage appliqué et de la longueur du capillaire (V/cm). Si les champs électriques utilisés en HPCE excèdent 300 ou 400 V/cm, les intensités sont par contre de l'ordre de quelques dizaines de µampères seulement.

La paroi interne du capillaire est chargée négativement, principalement par l'ionisation des groupes silanol. Adjacents à la paroi, on trouve les contre-ions hydratés (cations) (figure 3).

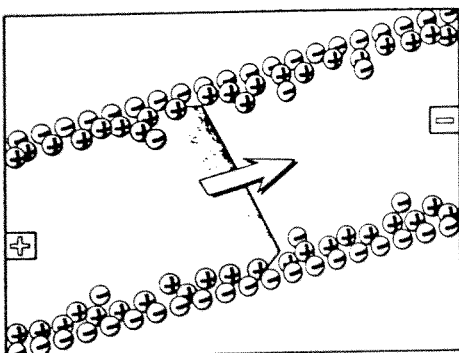


Figure 3 : Représentation de la paroi interne du capillaire chargée négativement sur laquelle sont fixés les cations.

Lorsque l'on applique le champ électrique, ces cations sont attirés vers la cathode (-), induisant un déplacement du liquide dans le capillaire. Ce courant est appelé le flux électroosmotique (EOF) et joue un rôle essentiel dans de nombreux modes de CE, et plus particulièrement dans la CZE [5].

L'EOF est la force majeure de conduction dans les séparations par CE et ce flux à travers le capillaire est le résultat du fort potentiel de champ appliqué et la nature de silice. C'est l'une des principales propriétés de la CE. Une caractéristique importante de l'EOF est qu'il est plat et non laminaire. Associé à un fort champ électrique, l'EOF contribue à l'efficacité et à la résolution élevées de la HPCE. La puissance de l'EOF est dépendante d'un certain nombre de paramètres comme le pH, la constante diélectrique et la viscosité du milieu [26].

L'application du champ électrique provoque une migration vers la cathode (-) des contre-ions et des molécules associées, liées par des liaisons hydrogène [24].

D'une façon générale, quand le voltage est appliqué, tous les solutés sont transportés vers la cathode par le flux électroosmotique (EOF) de l'eau, mais la vitesse (et l'ordre donc) à laquelle ces molécules migrent varie selon leur charge.

Les molécules sont séparées de la façon suivante :

- les cations migrent dans la même direction que l'EOF,
- les anions sont attirés vers l'anode (+),
- les neutres migrent à une vitesse intermédiaire entre celle des espèces anioniques et celle des espèces cationiques et ne seront pas bien séparées [27].

Plus le rapport masse/charge est élevé, plus la vitesse de migration électroosmotique est élevée en valeur absolue. Cependant, quelle que soit leur charge, toutes les molécules sont entraînées vers la cathode par l'EOF.

La vitesse de migration effective des molécules est donc la résultante de la vitesse de l'EOF et de la vitesse d'origine électrostatique.

Ainsi la détection des différentes molécules à la cathode se fait dans l'ordre suivant :

- cations
- neutres
- anions.

Tout comme il existe plusieurs techniques d'électrophorèse conventionnelle (standard, sur plaque), il existe 5 techniques spécialisées regroupées sous le terme "électrophorèse capillaire".

Actuellement, les 2 principales, largement développées et exploitées, sont l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) et la chromatographie électrocinétique micellaire (MECC).

4. Les différentes techniques d'électrophorèse capillaire

4.1. Electrophorèse capillaire de zone (CZE) ou électrophorèse capillaire en solution libre (FSCE).

L'électrophorèse capillaire de zone est non seulement la forme la plus simple de CE mais aussi la forme la plus utilisée.

A partir de cette forme d'électrophorèse capillaire, il est possible de décliner toutes les autres formes par l'addition de réactifs spécialisés (spécifiques) au tampon de séparation.

Ainsi :

- l'addition de surfactants pour la chromatographie électrocinétique micellaire,
- l'addition de gel polymérisé ou non pour l'électrophorèse capillaire sur gel,
- l'addition d'ampholines pour la focalisation isoélectrique capillaire,
- l'addition d'un second système de tampon pour l'isotachophorèse.

Le mécanisme de séparation par CZE est basé sur les différences de rapport charge/masse. Les molécules sont éluées à travers le capillaire dans l'ordre décroissant de charges positives (pour une même masse).

Pour les séparations conduites à des valeurs de pH >4, l'EOF entraîne vers la cathode (donc vers le détecteur) les molécules dans cet ordre : les molécules chargées positivement puis les molécules neutres et en dernier les molécules chargées négativement. Les espèces avec une petite masse et très chargées négativement, donc possédant un fort rapport charge/masse seront les plus repoussées par rapport à la cathode et ce sont elles qui

auront le temps de migration le plus long tandis que les petites molécules chargées positivement seront détectées les premières (figure 4).

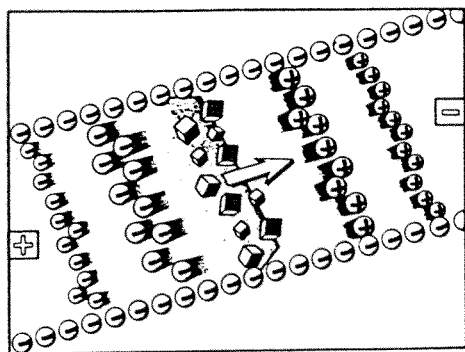


Figure 4 : Principe de la séparation des molécules chargées par CZE.

La CZE peut être menée avec ou sans agent complexant. Dans ce dernier cas, l'agent complexant le plus souvent utilisé est le borate qui peut former avec les molécules électrophorétiquement neutres (comme les sucres) des complexes ayant une charge négative rendant possible leur séparation par CZE [28].

4.2. Chromatographie électrocinétique micellaire (MECC) [29]

La MECC est un mode unique de la HPCE, capable de séparer aussi bien les solutés neutres que les solutés chargés.

Cette technique a été décrite pour la première fois par Terabe *et al.* en 1984 [30] et est très efficace pour la séparation des solutés neutres et hydrophobes.

D'autre part, la théorie de l'application de la MECC pour l'analyse des solutés anioniques [31] et des solutés cationiques [32] a été décrite en détail ainsi que les différents facteurs affectant la résolution et la reproductibilité de ces analyses.

En MECC, des surfactants ioniques sont rajoutés au tampon pour former des micelles. La micelle a une structure tridimensionnelle, avec les parties hydrophobes du surfactant à l'intérieur, les parties chargées à l'extérieur.

La séparation des molécules neutres est basée sur l'interaction hydrophobe des solutés avec les micelles. Plus l'interaction est forte, plus le temps de migration des solutés avec les micelles est long. La sélectivité de la MECC peut être contrôlée par le choix du surfactant et par l'ajout d'un modificateur au tampon.

Les micelles sont introduites et elles migrent en direction opposée à l'EOF.

Les micelles les plus largement utilisées sont celles formées avec le surfactant anionique SDS (sodium dodécyl sulfate) chargé négativement pour une large gamme de pH et migrant vers l'anode tandis que l'EOF va vers la cathode [24] (figure 5).

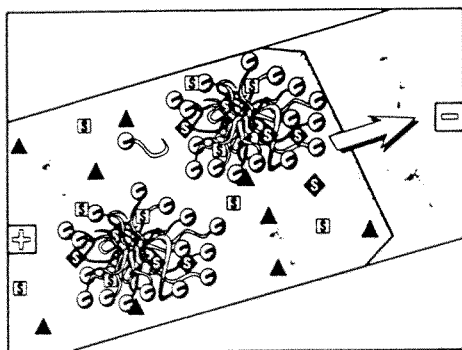


Figure 5 : Représentation de la séparation par MECC avec des micelles de SDS.

Le taux de migration de l'EOF est maintenu supérieur à celui des micelles, la migration "nette" se fait alors en direction de la cathode. Le partage des échantillons de molécules (neutres et hydrophobes) entre les micelles de SDS et la phase aqueuse ajoute une dimension supplémentaire de chromatographie et de sélectivité; dans ce cas, on parle de "facteur de capacité" (k') des différentes molécules.

Le comportement de migration des solutés chargés en MECC est affecté par les propriétés électrophorétiques du soluté et par son interaction avec les micelles. Les deux doivent être considérées pour obtenir une description adéquate du comportement "migratoire" et donc de la résolution. C'est pourquoi Corstjens *et al.*, en 1996, [33] ont mis au point une nouvelle équation dans laquelle la résolution est exprimée comme une fonction de l'interaction micellaire (facteur de capacité pour les molécules chargées) et la mobilité électrophorétique (temps de migration en solution libre) du soluté chargé. Il devient alors possible d'ajuster les paramètres expérimentaux pour améliorer la résolution.

Le surfactant cationique CTAB (bromure de cétyltriméthylammonium) peut aussi être utilisé en MECC. Dans ce cas l'EOF est inversé vers l'anode et les micelles migrent vers la cathode. La vitesse des solutés chargés négativement est alors augmentée par l'EOF tandis que la migration des micelles de CTAB est retardée [24].

L'une des applications les plus importantes de la MECC est l'analyse des molécules neutres. Par CZE, ces substances migrent toutes en même temps et à peu près à la même vitesse que l'EOF.

Avec un surfactant ajouté à une concentration supérieure à la concentration micellaire critique (CMC) les composés neutres hydrophobes migrent lentement du fait de leur interaction avec les micelles. Dans ce cas, les solutés migrent de la même façon que s'ils étaient analysés par HPLC en phase inverse, où les séparations résultent aussi de différences d'hydrophobicité des molécules.

4.3. Electrophorèse capillaire sur gel (CGE) [34]

La CGE est l'équivalent en HPCE de l'électrophorèse conventionnelle sur plaque. Elle est utilisée pour la séparation stérique des macromolécules biologiques telles que les oligonucléotides, les fragments d'ADN et les protéines. La séparation est réalisée en remplissant le capillaire avec, par exemple, une matrice polyacrylamide réticulée ou même des solutions de polymère linéaires.

Ses principaux avantages sur l'électrophorèse sur plaque de gel :

- un choix beaucoup plus large de matrices gélosées et de compositions,
- la détection directe,
- de meilleures analyses quantitatives,
- l'automatisation.

4.4. Focalisation isoélectrique capillaire (CIEF) [35]

La focalisation isoélectrique capillaire est utilisée pour la séparation des biomolécules, principalement les protéines, en fonction de leur point isoélectrique (pI). La CIEF est réalisée en remplissant le capillaire avec un mélange d'ampholytes et d'échantillon, et en réalisant un gradient de pH. En plaçant une solution basique à la cathode et une solution acide à l'anode, puis en appliquant un champ électrique, les ampholytes et les solutés migrent jusqu'à ce qu'ils atteignent une région où leur charge globale est neutre (à leur pI). Les zones d'ampholytes et de solutés restent extrêmement étroites étant donné que la diffusion vers une zone de pH différent produit une charge, et donc le retour à la zone originale.

4.5. Isotachophorèse (ITP) ou isotachophorèse capillaire (CITP) [36]

L'isotachophorèse utilise deux systèmes de tampon différents. La prise en sandwich des solutés entre un électrolyte frontal et un électrolyte postérieur crée un état stable au sein duquel les zones de solutés migrent l'une derrière l'autre en ordre de mobilité décroissante.

L'ITP présente deux caractéristiques spécifiques : toutes les zones de solutés migrent à la même vitesse et adoptent toutes la concentration de l'électrolyte de tête. Cette dernière caractéristique fait de l'ITP une technique

très utile pour l'analyse de solutions diluées. Les échantillons peuvent être concentrés jusqu'à plusieurs ordres de grandeur.

5. Domaines d'application de l'électrophorèse capillaire

Compte tenu du très grand éventail de molécules pouvant être analysées par électrophorèse capillaire et des nombreux avantages qu'elle présente, cette technique est utilisée dans de nombreux domaines aussi bien pour des analyses de routine (pour le contrôle qualité par exemple) que pour des analyses expérimentales.

L'électrophorèse capillaire est ainsi utilisée dans :

- le domaine agroalimentaire [37, 38],
 - * analyse des vitamines [39, 40],
 - * analyse des additifs alimentaires [41],
 - * analyse des acides organiques [42, 43],

- le domaine médical et pharmaceutique [44, 45]
 - * analyse des vitamines [46, 47],
 - * analyse des médicaments [8],

- le domaine de l'environnement
 - * analyse des polluants [48, 49],
 - * analyse des résidus de pesticides et herbicides [50, 51].

II - ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES FLAVONOIDES

1. Introduction

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires végétaux appartenant à la classe des composés phénoliques. Actuellement, plus de 4 000 ont été identifiés dans les plantes vasculaires. Certains sont des pigments floraux (*flavus* = jaune) dans la plupart des familles d'angiospermes. Cependant leur présence n'est pas seulement limitée aux fleurs, ils sont contenus dans toutes les parties de la plante. Leur rôle biologique est mal connu. En raison de leur structure polyphénolique, ils pourraient intervenir dans les chaînes d'oxydoréduction.

On désigne sous le terme de flavonoïdes plusieurs groupes de substances. Pour leur classification, le stade d'oxydation de l'hétérocycle C et la position du cycle B sont pris en compte. Ainsi les sous-groupes les plus importants sont : les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones, les chalcones, les auronones, et les anthocyanidines (figure 6). A l'exception des chalcones, toutes ces molécules sont tricycliques [52].

Dans les végétaux, ces molécules peuvent se trouver à l'état libre (aglycones) ou glycosylées.

Ces composés diffèrent par :

- * leur degré de saturation,
- * le nombre de groupements hydroxyles,
- * le nombre de groupements méthyles
- * le nombre de sucres.

La détermination des flavonoïdes, isolement, analyse et identification, est essentielle du fait de leurs différentes propriétés physiologiques et activités biologiques.

L'étude de ces composés nécessite la séparation de mélanges complexes de composés souvent de nature chimique très proche. Les techniques chromatographiques telles que la chromatographie sur papier et la chromatographie sur couche mince (TLC) ont joué un rôle important [53]. Ces techniques, utilisées avec une large gamme d'agents de détection peuvent fournir de bonnes informations qualitatives mais sont peu fiables pour une étude quantitative. Jusque dans les années 90, l'HPLC donne une bonne séparation des flavonoïdes à travers l'optimisation des phases mobiles et stationnaires et est très efficace pour la quantification [54].

L'arrivée de la CE a donné un "second souffle" à l'analyse des flavonoïdes du fait de ses énormes possibilités.

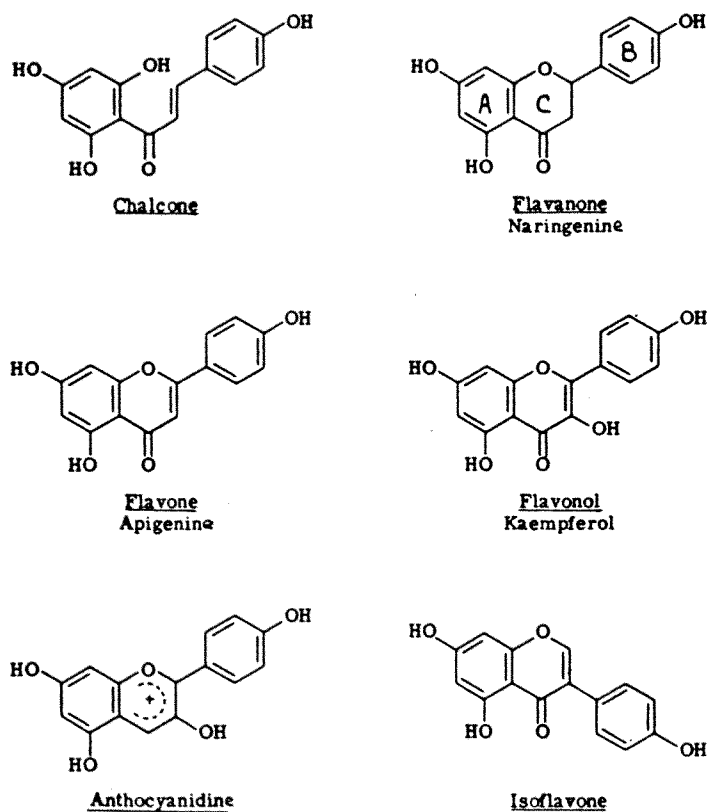


Figure 6 : Représentation des principaux sous-groupes de flavonoïdes.

2. Analyse des flavonoïdes par électrophorèse capillaire

Depuis maintenant quelques années, l'électrophorèse capillaire est utilisée comme technique d'analyse de nombreux métabolites secondaires. A ce sujet, un article de synthèse a été réalisé en 1994 par Tomas-Barberan [24] dans lequel il indique que cette technique s'applique aussi bien aux composés acides (composés phénoliques [55, 56]) qu'aux composés basiques (métabolites secondaires azotés [57, 58]) ou aux métabolites neutres (terpénoïdes [59]).

En ce qui concerne les flavonoïdes qui sont des composés phénoliques, ils sont analysés principalement par CZE et MECC [60].

2.1. Flavonoïdes aglycones (flavones, flavanones et flavonols principalement)

2.1.1. Analyse par chromatographie électrocinétique micellaire (MECC)

Les flavonoïdes aglycones sont soit naturellement présents dans les plantes soit obtenus après une hydrolyse acide des flavonoïdes-O-glycosides.

En MECC, les principaux paramètres analytiques affectant la séparation des molécules sont le pH et la concentration en SDS. Ng *et al.* [61, 62] proposent alors un schéma d'optimisation systématique des conditions d'analyse d'un mélange de flavonoïdes aglycones commerciaux (flavonols, flavones, flavanones). En faisant varier le pH de 6,5 à 8,5 et la concentration en SDS de 10 à 50 mM, ils obtiennent la meilleure séparation avec un tampon phosphate (50mM) - borate (50 mM) à pH 7,5 et une concentration de 42 mM en SDS, avec un temps d'analyse de 28 mn. Dans ces conditions, ils constatent que les flavonoïdes aglycones sont séparés par leur

différence de tendance à être retenus par les micelles de SDS et migrent dans l'ordre suivant : du plus polaire (le moins retenu) au plus lipophile (le plus retenu).

Un résultat similaire a été obtenu par Pietta *et al.* [63] avec des flavonoïdes aglycones obtenus après une hydrolyse acide de 3-O-glycosides de flavonol. Ils montrent qu'en présence de tampon borate (25 mM) à pH 8,3 et de 30 mM de SDS (détection, 260 nm et 27°C), la myricétine, la quercétine, le kaempférol et l'isorhamnétine migrent dans cet ordre et sont bien séparés. Dans ces conditions, il semble que l'hydrophobicité de la molécule soit le principal facteur affectant la séparation.

Delgado *et al.* [64] ont analysé les flavonoïdes aglycones natifs du miel par MECC dans le but de pouvoir en déduire son origine botanique. La multiplicité des interactions ayant lieu dans les micelles : hydrophobes, électrostatiques et liaisons hydrogènes, permet une séparation très efficace et la meilleure a été obtenue dans les conditions suivantes : tampon borate, 200 mM à pH 8,5 et SDS, 50 mM.

D'autres travaux ont été effectués pour établir des corrélations entre les profils flavonoïdiques et l'origine botanique des miels (lavande, romarin, citron, bruyère...). En utilisant les mêmes conditions que précédemment, Ferreres *et al.* [65] ont obtenu des éluions simultanées de plusieurs flavonoïdes. Un apport de méthanol à une concentration de 10% a nettement amélioré la séparation. En effet, l'addition de méthanol entraîne une augmentation de la solubilité des flavonoïdes dans le tampon et une diminution de l'EOF qui a pour résultat une augmentation du temps de migration. Ceci étant dû à une modification de la viscosité du tampon. Cette séparation est un plus par rapport à l'HPLC, technique avec laquelle certaines paires de flavonoïdes n'étaient pas séparées. En effet, en MECC, les flavonoïdes aglycones sont séparés par la combinaison de 2 facteurs : la charge et l'hydrophobicité. Plus la molécule est chargée négativement, plus son temps de migration est long. Ce "chargement négatif" des flavonoïdes est accru par leur complexation possible avec le borate ce qui donne aux molécules une nouvelle mobilité électrophorétique.

Archambault *et al.* [66] ont observé cependant que le paramètre dominant en MECC pour l'analyse de solutés possédant des groupes hydroxyles ionisables était le pH par rapport à la concentration en SDS. De plus, la séparation de plusieurs flavonoïdes aglycones hydroxylés ou méthoxylés nécessite l'addition de solvants organiques, comme précédemment. Le méthanol améliore de beaucoup la résolution des flavonoïdes méthoxylés.

Un autre solvant organique a été également testé : l'acétonitrile pour dissoudre des échantillons contenant des flavones aglycones méthylées, constituants de nombreuses plantes et herbes médicinales possédant des propriétés antioxydatives et ayant également des effets pharmacologiques et écologiques [67]. Ces auteurs ont étudié l'influence du degré de méthylation sur le comportement de ces molécules en MECC. Les meilleures conditions d'analyse ont été les suivantes : tampon borate, 0,1 M à pH 8, SDS, 50 mM et 10% d'acétonitrile pour dissoudre l'échantillon. Pour la séparation de ces flavones, en plus de l'interaction hydrophobe avec les micelles, l'ionisation avec les groupements hydroxyles et leur complexation avec le borate affectent l'ordre de migration des molécules. Plus la molécule est hydrophobe, plus son temps de migration est long car il existe plus d'interactions avec les micelles. Ce qui explique l'augmentation du temps de migration lorsque le rapport "Groupement méthoxyle/Groupement hydroxyle" augmente. Ainsi, les auteurs ont observé que pour un -OH remplacé par un -OCH₃, le temps de migration augmente de 2 mn. Et la substitution d'un second -OH l'augmente de 7 mn.

Les flavones avec des -OH susceptibles d'être ionisés au pH du tampon auront une charge négative et donc une migration électrophorétique vers l'anode (+), ce qui augmentera leur temps de migration.

Dans ce cas, l'acidité (pKa) des différents groupes hydroxyles jouent un rôle très important dans la séparation. Un -OH dont le pKa est 8 (ou moins), placé dans un tampon de pH 8 également, sera ionisé et entraînera une modification de la migration électrophorétique de la molécule. En fonction de la place du groupement hydroxyl sur le squelette flavonoïdique, le pKa varie.

Le SDS est le surfactant le plus utilisé mais Li et Sheu [68] ont testé le sodium cholate car ils voulaient analyser simultanément par MECC des flavonoïdes aglycones et des alcaloïdes de 2 plantes dont le mélange est utilisé en médecine chinoise. Ils ont déterminé que les conditions optimales d'analyse étaient un tampon borate, 5 mM à pH 6,97, du sodium-cholate, 50 mM et 40% d'acétonitrile.

2.1.2. Analyse par électrophorèse capillaire de zone (CZE)

La CZE est peu utilisée pour l'étude des flavonoïdes aglycones, il existe cependant quelques travaux.

Ainsi, McGhie et Markham [69] séparent des flavonols aglycones par CZE. Les conditions d'analyse sont les suivantes : tampon borate de sodium, 25 mM à pH 9,5 et 20% de méthanol. Ils constatent que les différences d'électromobilité des 3-flavonols aglycones : quercétine-3'-méthyl ether, kaempferol et quercétine, est due aux différences de taille moléculaire et d'acidité des groupes phénoliques libres. Les groupes phénoliques liés au squelette flavonoïdique contribuent aux différents niveaux de charge des flavonols à cause de leur différence d'acidité. Par exemple, le pKa du groupement 7-OH est de 8,2 pour le kaempferol (et de 7,3 pour la quercétine) et celui du groupement 5-OH est de 12,5.

Dans leurs conditions d'analyse, les groupements 7-OH et 4'-OH (pKa, 9,5) interviennent dans la charge de la molécule alors que les groupements 3-OH et 3'-OH participent de façon beaucoup moins importante compte tenu de leur pKa élevé.

La différence de mobilité électrophorétique entre la quercétine qui possède un groupement 3'-OH et le kaempférol qui ne l'a pas est probablement due à "l'acidité nette" plus importante des groupes 7-OH et 4'-OH de cette première comparée à celle du kaempférol. Celui-ci sera donc moins dissocié, et aura une vitesse de migration plus rapide.

Ces deux mêmes auteurs [70] ont étudié de façon plus approfondie cette influence du pKa sur la mobilité électrophorétique de flavonoïdes de synthèse : 8 monohydroxyflavones et 4 dérivés tri-O-méthylés de lutéoline. Pour chaque série, ils ont ainsi éliminé l'influence de la taille moléculaire. Les conditions d'analyse sont les mêmes que précédemment.

Ils constatent alors qu'il existe une relation linéaire entre la mobilité électrophorétique (EM) et le pKa pour chaque série. Le pKa est donc un facteur déterminant dans l'EM : plus il est faible, plus la mobilité électrophorétique est importante.

De plus, les mobilités électrophorétiques sont plus élevées dans le cas des monohydroxyflavones par rapport aux dérivés tri-O-méthyl de lutéoline, à cause de leur taille plus faible.

Dans le cas des dérivés tri-O-méthyl de lutéoline, ces composés ont le même poids moléculaire mais diffèrent par la position du groupe hydroxyle sur le squelette. Les autres groupements sont méthylés donc non chargés à pH 9,5 et n'ont alors pas d'influence sur l'EM. Les auteurs constatent que la position du groupement -OH a le même effet sur l'EM que dans le cas des monohydroxyflavones. Les différences de pKa dues à la présence des groupements méthoxyles est négligeable.

Concernant les dihydroxyflavones également étudiées, les différences d'EM sont plus complexes. Bien que la taille moléculaire augmente par l'addition du groupe -OH, la diminution de l'EM attendue est masquée par les changements d'acidité de la molécule consécutifs à l'ajout de ce groupement.

Fernandes *et al.* [71] utilisent aussi cette technique pour la détermination de flavonoïdes, d'acides phénoliques et cinnamiques d'extraits de *Ribes nigrum*. Le tampon est un mélange sodium dihydrogène sulfate, 50 mM, acide borique, 100 mM à pH 7 et le solvant, le 1-propanol à 9%. Ce solvant améliore la séparation mais altère les caractéristiques de la colonne suite à une utilisation prolongée.

2.2. Flavonoïdes glycosylés

Les molécules de sucre sont neutres et par conséquent ne peuvent pas être séparées électrophorétiquement sauf à pH élevé (supérieur à 11). Cependant par addition de borate aux solutions aqueuses, ils peuvent être transformés en complexes boratés chargés négativement à condition de posséder deux groupements hydroxyles vicinaux *cis*. Cette complexation augmente avec la concentration en borate et avec le pH, ce qui entraîne une augmentation de la mobilité électrophorétique [72].

L'amplitude de la complexation avec le borate des flavonoïdes glycosides dépend du nombre de sites sur le résidu sucre pouvant être complexé et par conséquent de sa configuration. Cet élément va avoir un effet sur les ordres de migration des molécules. En effet, la mobilité du complexe borate-soluté dépend de sa "charge nette" et de sa masse.

2.2.1. Flavonoïdes-O-glycosides (flavones, flavanones et flavonols principalement)

2.2.1.1. Analyse par chromatographie électrocinétique micellaire (MECC)

Les premiers travaux sur l'analyse des flavonoïdes-O-glycosides par MECC datent de 1991 dans le but de comparer ces résultats avec ceux obtenus en HPLC [72]. Les échantillons analysés sont des 3-O-glycosides de flavonoïde commerciaux et un extrait méthanolique à 30% de *Ginkgo biloba*, arbre sacré, dont les feuilles sont utilisées actuellement en thérapeutique. Les conditions d'analyse retenues sont un tampon sodium-borate, 20 mM à pH 8,3 et 50 mM de SDS. A ce pH, l'EOF est suffisamment fort pour contrecarrer la tendance des molécules chargées négativement à migrer à l'opposé du détecteur (-) et la séparation résulte des différences de répartition des molécules à l'intérieur et à l'extérieur des "coeurs" hydrophobes des micelles.

Les premières molécules détectées sont les 3-O-glycosides de quercétine, viennent ensuite les 3-O-glycosides de kaempférol et enfin les 3-O-glycosides d'isorhamnétine.

Compte tenu des résultats, la MECC a une puissance de résolution plus importante et est plus rapide que l'HPLC. Cette technique est également plus sensible et plus économe en solvant.

D'autres extraits végétaux obtenus à partir de fleurs de *Calendula officinalis* et de *Sambucus nigra* et contenant également des 3-O-glycosides de flavonoïde ont également été analysés. Une bonne séparation a été obtenue dans des conditions d'analyse voisines: tampon sodium-borate, 20 mM à pH 8,3 et 60 mM de SDS [73].

En 1994, Pietta *et al.* ont étudié le comportement de migration des O-glycosides de flavonoïde en fonction de leur degré d'hydroxylation et en fonction des conditions d'analyse [74].

Ils constatent que le 2-propanol pose des problèmes pour la migration et la résolution. En revanche, une concentration de 30% en méthanol offre une résolution maximale.

La présence de SDS est primordiale pour la séparation de tous les composants. Le SDS diminue la mobilité électrophorétique du kaempférol et de l'isorhamnétine par rapport à celle de la quercétine.

L'étude d'une gamme de pH de 8 à 10 indique qu'à pH 8,3 la structure de l'aglycone et le type de sucre substitué ont un impact sur la migration tandis qu'à pH 9,3, le comportement électrophorétique est essentiellement influencé par les liaisons carbohydrate-borate. A ce pH, la présence de SDS est moins significative. A pH 10,5 elle n'a plus aucune incidence sur la mobilité et la résolution.

Plus récemment encore, la MECC a été utilisée pour optimiser la séparation de 16 flavonoïdes pharmacologiquement actifs extraits d'espèces d'*Epimedium*, herbes chinoises [75].

Ces molécules diffèrent par :

- * des glycosides et des aglycones avec des substituants différents,
- * un même aglycone peut avoir différents degrés de glycosylation,
- * même nombre, même type de liaisons, même position du sucre mais avec différents modèles d'hydroxylation des aglycones,
- * même nombre, même type de liaison entre sucre et aglycone mais avec types de sucre variés,
- * constituants avec différences seulement dans les sucres terminaux.

Les composés flavonoïdiques sont des acides faibles avec des constantes d'ionisation (pKa) allant de 9 à 12 liées à la présence de groupements hydroxyles phénoliques. Leur charge apparente dépend des valeurs de pKa, du pH de l'échantillon et du tampon.

Leurs études ont montré qu'à pH neutre, les flavonoïdes étudiés coéluent pour différentes concentrations de tampon phosphate (30 - 100 mM). A cause de la nature phénolique des flavonoïdes, des systèmes de tampons alcalins ont été testés. Les auteurs (Liang *et al.*) ont retenu le tampon borate, 20 mM à pH 10,5, qui s'est avéré être le meilleur : 9 des 16 composés sont séparés par CZE.

La concentration micellaire critique (CMC) du SDS est de 8,2 mM dans de l'eau pure à 25°C. En présence d'une solution d'électrolytes, un tampon phosphate-borate, elle n'est plus que de 2,9 mM.

Quand on augmente la concentration en SDS, la résolution augmente. Au delà d'une concentration de 20 mM, une augmentation supplémentaire améliore la séparation des flavonoïdes aglycones mais pas celle des flavonoïdes glycosides, di- ou trisaccharides.

Les aglycones migrent plus doucement que leurs glycosides correspondants, ceci à cause de la glycosylation de ces derniers qui les rend plus hydrophiles et donc plus solubles dans l'eau.

Ces auteurs ont également testé différents solvants. Ils ont observé que le 2-propanol ou l'acétonitrile (de 5 à 15%) améliore la résolution tout en augmentant les temps de migration et entraîne également un élargissement de la base des pics. En revanche, une concentration de 1 mM de 1,3-diaminopropane s'est révélée bénéfique pour une meilleure séparation.

Les conditions finalement retenues sont un tampon borate, 20 mM à pH 8,5, 40 mM de SDS et 1 mM de 1,3-diaminopropane. 14 flavonoïdes sur 16 sont séparés en un seul passage et en moins de 20 mn.

Jusqu'à présent, le seul surfactant utilisé était le SDS. Bjergegaard *et al.* [76] ont analysé des flavonoïdes glycosylés extraits de crucifères en présence d'autres d'autres détergents :

- * le CTAB (bromure de cetyltriméthylammonium) qui forme des micelles cationiques. Dans ce cas, l'EOF est en direction de l'anode tandis que les micelles de CTAB migrent vers la cathode.

- * le cholate utilisé comme détergent en combinaison avec la taurine. Dans ce cas, l'EOF est en direction de la cathode et les micelles migrent "naturellement" vers l'anode.

Il ressort de cette étude que ces deux surfactants peuvent être utilisés pour la séparation des flavonoïdes. Celle-ci est comme toujours basée sur la migration des molécules en fonction de leur charge et de leur masse. Cependant, le changement d'hydrophobicité de certains des flavonoïdes a une répercussion plus importante sur leur temps de migration dans le système cholate-aurine, ce qui le rend plus performant par rapport au système CTAB.

2.2.1.2. Analyse par électrophorèse capillaire de zone (CZE)

Les premiers travaux datent de 1992 sur des extraits méthanoliques de *Sambucus nigra* [25]. La meilleure séparation est obtenue dans les conditions d'analyse suivantes : tampon borate 0,15 M à pH 10.

A ce pH, les analytes chargés négativement ont tendance à migrer vers l'anode (+). L'EOF étant supérieur à la mobilité électrophorétique, la migration "nette" sera en direction de la cathode.

Une analyse quantitative de la rutine a été réalisée, flavonoïde d'un très grand intérêt pour l'industrie pharmaceutique. La solution standard est injectée en même temps que l'échantillon. Sa courbe de calibration est linéaire pour des concentrations de 0,1 à 1 mg.ml⁻¹. Cependant, les coefficients de variation restent importants (10,3%) d'une injection à l'autre.

Morin et Dreux [77] et Morin *et al.* [78] ont étudié l'influence de deux électrolytes à pH 10,5.

- * tampon phosphate-borate

- * tampon sodium-borate

Avec le premier système, ils constatent que l'ionisation des squelettes flavonoïdiques n'est pas assez forte pour permettre une bonne séparation.

Dans le cas des glycosides de flavonoïde (3-O-glycosides de quercétine), la concentration en borate a une incidence sur le degré de complexation des sucres ou du squelette flavonoïdique : le temps de migration de chaque soluté est alors augmenté quand se produit cette complexation.

Cette formation de complexes est un équilibre fortement dépendant du pH : plus le pH augmente, plus la formation de complexes est importante. Ceci entraîne une plus grande mobilité électrophorétique et par conséquent une augmentation des temps de migration.

De plus, ces temps de migration dépendent aussi de la concentration en borate qui influe sur l'EOF.

Ainsi, le 3-O-disaccharide de quercétine a une mobilité électrophorétique plus faible que les 3-O-monosaccharides de quercétine à cause de sa plus faible densité de charge.

Les 3-O-disaccharides de quercétine seront détectés en premier et les 3-O-monosaccharides de quercétine ensuite. A l'intérieur de chaque groupe, le temps de migration dépendra des préférences structurales pour la formation de complexes boratés (dépend des sucres présents).

Morin *et al.* [79] ont également étudié la séparation de 7-O-glycosides de flavonoïde par CZE. Des résultats similaires ont été obtenus, à savoir la nécessité d'un tampon complexant, le borate, 200 mM, un pH de 10,5 pour lequel la partie sucre des flavonoïdes glycosides n'est pas ionisée (pKa, 11,9-12,5).

La complexation est plus importante avec un tampon alcalin et une forte concentration en acide borique.

Fernandez de Simon *et al.* [80] ont étudié l'effet du pH et de la température sur des flavonoïdes glycosides extraits de jus de fruits et de vin. Ils constatent qu'à pH 10, des augmentations de température diminuent la viscosité du milieu, ce qui engendre une augmentation de la mobilité électrophorétique (EM).

Cette augmentation est identique pour tous les flavonoïdes étudiés. Même s'il existe un effet évident de la température sur la mobilité électrophorétique, elle n'a pas ou peu d'incidence sur la résolution. Il n'est donc pas nécessaire de travailler à des températures supérieures à 25°C. Une bonne résolution est obtenue à pH 9,5 et 9,6. Dans cet intervalle, le comportement électrophorétique est principalement influencé par le type de sucres lié à l'aglycone.

La formation de complexes borate-sucres est d'une grande importance dans la séparation par CZE des flavonoïdes glycosides ayant le même aglycone [69]. En effet, la glycosylation des groupes phénoliques libres diminue l'EM à cause de l'augmentation de la taille moléculaire et de la réduction de charge par la perte des groupements ionisables.

L'effet de la réduction de l'EM suite à une augmentation de la taille moléculaire est également mise en évidence par la comparaison de glycosides et de méthyl ether substitués. Ainsi, l'EM est plus faible (d'un facteur 2) pour un glucose que pour un méthyl ether, principale conséquence de l'augmentation de la taille moléculaire, indépendamment de la complexation borate-sucres possible qui modifie également l'EM.

La CZE est capable de séparer un grand nombre de glycosides de flavonol. Cette séparation est le résultat d'interactions complexes affectant la mobilité électrophorétique. Les facteurs dominants sont la taille moléculaire et la position et le nombre de groupements hydroxyles restant sur le flavonol. D'autres facteurs importants sont le type des sucres et la présence éventuelle de substituants ionisables supplémentaires. Ces facteurs fournissent une base pour l'estimation du comportement électrophorétique de nombreux flavonols aglycones et glycosides et la prédiction de leur possible séparation par CZE.

2.2.2. Flavonoïdes-C-glycosides

A notre connaissance, un seul travail a été effectué sur cette classe de composés, c'est l'étude menée par McGhie [81]. Son but est d'optimiser par CZE la séparation des flavonoïdes de la canne à sucre dont certains sont des flavonoïdes-C-glycosides. L'auteur constate un effet marqué du pH sur les temps de migration et la séparation des composés : le temps d'analyse augmente avec le pH.

Les meilleures conditions d'analyse sont un tampon borate, 25mM à pH 9,5 et 20% de méthanol.

L'apigénine, utilisée comme standard a permis une étude quantitative des flavonoïdes de la canne à sucre.

2.3. Isoflavones

Contrairement aux flavonoïdes largement répandus chez les végétaux, les isoflavones ne sont rencontrées que dans la sous famille des Légumineuses : les Lotoideae.

Leur analyse par CZE date de 1994 [82]. Ces molécules sont extraites de graines de soja et sont analysées dans les conditions suivantes : un tampon borate, 200 mM à pH 8,6 et un mélange acétonitrile-eau comme solvant. Cette technique s'est avérée très utile pour l'isolement et la purification de ces composés. Par rapport à l'HPLC, elle est plus rapide et les capillaires pour la CZE sont moins chers que les colonnes pour HPLC.

Enfin, cette technique, comme l'HPLC, peut être couplée à la spectrométrie de masse, technique indispensable pour l'identification de nouvelles molécules [83].

2.4. Anthocyanines

Ce sont des flavonoïdes colorés. Elles forment le groupe le plus important des pigments végétaux visibles par l'œil humain.

Des anthocyanines (anthocyanidines glycosylées) ont été analysées pour la première fois par CZE en 1996 [84]. La séparation se fait selon la nature de l'aglycone et le degré de glycosylation.

Dans cette première approche, les conditions d'analyse sont les suivantes : un tampon borate, 150 mM à pH 8. La séparation des anthocyanines est satisfaisante et l'optimisation des paramètres analytiques peut alors être envisagée.

III - CONCLUSION

L'électrophorèse capillaire est une technique analytique présentant de nombreux avantages par rapport aux techniques classiques que sont la chromatographie liquide haute performance ou la chromatographie sur couche mince ou sur papier. Parmi les principaux, nous pouvons citer la forte sensibilité qui entraîne une faible consommation d'échantillon, la courte durée des analyses et l'utilisation de petites quantités de solvant.

Compte tenu des différentes formes d'électrophorèse capillaire, les molécules neutres, positives ou négatives peuvent être analysées.

Pour l'étude des flavonoïdes, métabolites secondaires végétaux, les deux formes d'électrophorèse capillaire utilisées sont l'électrophorèse capillaire de zone et la chromatographie électrocinétique micellaire. Pour chaque classe de composés des mises au point des conditions analytiques sont nécessaires du fait de la grande diversité de ces molécules. Cette diversité (degré de saturation, nombre de groupements -OH, nombre de groupements -CH₃, nombre de sucres...) entraîne des variations de résolution et donc influe sur la qualité de la séparation.

CONCLUSION GENERALE

De par leurs propriétés biologiques, les flavonoïdes, composés phénoliques végétaux présentent un grand intérêt pour l'industrie pharmaceutique. Les mises au point d'extraction et d'analyse sont donc primordiales. Jusque dans les années 1990, leur analyse se faisait principalement par chromatographie liquide haute performance mais depuis est apparue une technique complémentaire et plus performante : l'électrophorèse capillaire.

La recherche bibliographique portant sur l'étude des flavonoïdes par électrophorèse capillaire a été menée de plusieurs façons. Il ressort que pour le sujet proprement dit, l'interrogation de bases de données par l'intermédiaire du serveur Dialog permet de récupérer de nombreuses références pertinentes par rapport au sujet. "Current Contents" est la base de données qui recense le plus de notices bibliographiques prenant en compte la technique d'analyse et les composés étudiés. Les autres bases interrogées fournissent un nombre de références approximativement équivalent mais inférieur à "Current Contents".

L'interrogation de bases de données à orientation médicale sur CD-ROMs nous a permis d'obtenir des notices portant sur l'extraction, l'analyse et les propriétés des flavonoïdes.

Pour replacer cette étude dans un contexte plus général, le catalogue des bibliothèques (OPAC) et les recherches sur l'Internet ont fourni bon nombre d'informations intéressantes.

Enfin, la consultation des "Chemical Abstracts" (documents papier) et des pages de sommaire de "Journal of chromatography", revue internationale spécialisée dans les techniques de chromatographie, a permis de surveiller la parution de nouvelles publications.

Cette recherche documentaire montre que les travaux portant sur l'électrophorèse capillaire en général sont nombreux. Depuis 1990, beaucoup d'ouvrages ont été publiés, qu'il s'agisse de monographies ou de comptes-rendus de congrès (publiés dans des numéros spéciaux de revues scientifiques).

L'analyse des flavonoïdes a été améliorée par l'utilisation de l'électrophorèse capillaire. Les deux formes d'électrophorèse les plus utilisées sont l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) et la chromatographie électrocinétique micellaire (MECC). Compte tenu de la grande diversité des flavonoïdes, les conditions analytiques nécessitent des mises au point pour chaque catégorie.

L'intérêt de l'électrophorèse capillaire a été également mis en évidence pour les analyses en contrôle de routine dans les domaines médicaux, pharmaceutiques et le domaine de l'étude de l'environnement. Les avantages de cette technique sont la rapidité des analyses, les faibles quantités d'échantillon et de solvant nécessaires et une forte sensibilité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 -**Tiselius, A.** A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixture. *Trans. Faraday Soc.*, 1937, **33**, p. 524-531.
- 2 -**Hjerten, S.** Free zone electrophoresis. *Chromatogr. Rev.*, 1967, **9**, p. 122-129.
- 3 -**Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., and Verheggen, T. P. E. M.** High performance zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 1979, **169**, p. 11-20.
- 4 -**Jorgenson, J. W. and Lukacs, K. D.** Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries. *Anal. Chem.*, 1981, **53**, p. 1298-1302.
- 5 -**Oda, R. P. and Landers, J. P.** Introduction to capillary electrophoresis. In : *Handbook of capillary electrophoresis*. Boca Raton : CRC Press, 1994. p. 9-42.
- 6 -*Journal of chromatography A*. Edited by E. Heftmann and Z. Deyl. Vol. 744. Amsterdam : Elsevier, 1996, 354 p.
- 7 -*Journal of chromatography A*. Edited by E. Heftmann and Z. Deyl. Vol. 745. Amsterdam : Elsevier, 1996, 304 p.
- 8 -*Journal of chromatography A*. Edited by U. A. Th. Brinkman *et al.* Vol. 735. Amsterdam : Elsevier, 1996, 450 p.
- 9 -*Journal of chromatography A*. Edited by Z. Deyl *et al.* Vol. 747. Amsterdam : Elsevier, 1996, 234 p.
- 10 -*Journal of chromatography A*. Edited by Z. Deyl *et al.* Vol. 748. Amsterdam : Elsevier, 1996, 193 p.
- 11 -**Elsevier.** (Page consultée le 13 décembre 1996). *Elsevier Science*, [En ligne], Adresse URL : <http://www.elsevier.nl:80/>
- 12 -**Li, S. F. Y.** *Capillary electrophoresis : principles, practice and applications*. Amsterdam : Elsevier, 1992. 578 p.
- 13 -**Kuhn, R. and Hoffstetter-Kuhn, S.** *Capillary electrophoresis : principles and practice*. Berlin : Springer Verlag, 1993. 375 p.
- 14 -**Guzman, N. A. (Ed.)**. *Capillary electrophoresis technology*. New-york : Marcel Dekker, Inc., 1993. 857 p.
- 15 -**Landers, P.J. (Ed)**. *Handbook of capillary electrophoresis*. Boca Raton : CRC Press, 1994. 649 p.
- 16 -**The Electrophoresis Society** (Page consultée le 13 décembre 1966). *The Electrophoresis Society*, [En ligne]. Adresse URL : <http://www-lmmb.ncifcrf.gov/ASAB/> (adresse temporaire)
- 17 -**British Electrophoresis Society** (Page consultée le 13 décembre 1996). *British Electrophoresis Society*, [En ligne]. Adresse URL : <http://sunspot.bioc.cam.ac.uk/BES.html>
- 18 -**Société Française d'Electrophorèse.** (Page consultée le 13 décembre 1996). *Société Française d'Electrophorèse*, [En ligne]. Adresse URL : <http://europe.u-strasbg.fr/sfe/sfe.html>
- 19 -**Komatsu Laboratory.** (Page consultée le 17 décembre 1996). *Publications in recent five years (1991 - 1995)*, [En ligne]. Adresse URL : <http://133.3.40.20/puble.html>
- 20 -**Lucy, C. A.** (Page consultée le 14 décembre 1996). *List of publications and presentations*, [En ligne]. Adresse URL : <http://www.chem.ucalgary.ca/groups/lucy.public.html>

- 21 -**Institut de Chimie Organique et Analytique.** (Page consultée le 13 décembre 1996). *Thèmes de recherches*, [En ligne]. Adresse URL : http://web.univ-orleans.fr/ICOA/page_icoa/publications.html
- 22 -**Merck.** (Page consultée le 10 décembre 1996). *Newsletter chromatography Merck, Darmstadt*, [En ligne]. Adresse URL : <http://merck.de/chromatography/newsmain.htm>
- 23 -**Beckman.** (Page consultée le 10 décembre 1996). *Symposia and Seminars*, [En ligne]. Adresse URL : <http://www.beckman.com/biorsrch/sympo/>
- 24 -**Tomas-Barberan, F. A.** Capillary electrophoresis : a new technique in the analysis of plant secondary metabolites. *Phytochemical analysis*, 1995, **6**, p. 177-192.
- 25 -**Seitz, U., Oefner, P. J., Nathakarnkitkool, S., Popp, M. and Bonn, G. K.** Capillary electrophoretic analysis of flavonoids. *Electrophoresis*, 1992, **13**, p. 35-38.
- 26 -**Kuhr, W. G.** Capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 1990, **62**, p. 403R-414R.
- 27 -**Lurie, I. S.** Micellar electrokinetic capillary chromatography of the enantiomers of amphetamine, methamphetamine and the hydroxyphenethylamine precursors. *J. Chromatogr.*, 1992, **605**, p. 269-275.
- 28 -**Hoffstetter-Kuhn, S., Paulus, A., Gassmann, E. and Widmer, H. M.** Influence of borate complexation on the electrophoretic behaviour of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 1991, **63**, p. 1541-1547.
- 29 -**Khaledi, M. G.** Micellar electrokinetic capillary chromatography. In : *Handbook of capillary electrophoresis*. Boca Raton : CRC Press, 1994. p. 43-93.
- 30 -**Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. and Ando, T.** Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.*, 1984, **56**, p. 111-113.
- 31 -**Khaledi, M. G., Smith, S. C. and Straters, J. K.** Micellar electrokinetic capillary chromatography of acidic solutes : migration behaviour and optimization strategies. *Anal. Chem.*, 1991, **63**, p. 1820-1830.
- 32 -**Strasters, J. K. and Khaledi, M. G.** Migration behaviour of cationic solutes in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chem.*, 1991, **63**, p. 2503-2508.
- 33 -**Corstjens, H., Billiet, H. A. H., Frank, J. and Luyben, K. Ch. A. M.** Equation for the description of the resolution of charged solutes in micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1996, **753**, p. 121-131.
- 34 -**Guttman, A.** Separation of DNA by capillary electrophoresis. In : *Handbook of capillary electrophoresis*. Boca Raton : CRC Press, 1994. p. 129-143.
- 35 -**Kilar, F.** Isoelectric focusing in capillaries. In : *Handbook of capillary electrophoresis*. Boca Raton : CRC Press, 1994. p. 95-109.
- 36 -**Wanders, B. J. and Everaerts, F. M.** Isotachopheresis in capillary electrophoresis. In : *Handbook of capillary electrophoresis*. Boca Raton : CRC Press, 1994. p. 111-127.
- 37 -**Harms, J. and Schwedt, G.** Application of capillary electrophoresis in element speciation analysis of plant and food extracts. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1994, **350**, p. 93-100.
- 38 -**Lindeberg, J.** Capillary electrophoresis in food analysis. *Food Chemistry*, 1996, **55**, p. 73-101.

- 39 -**Cancalon, P. F. and Bryan, C.R.** Use of capillary electrophoresis for monitoring citrus juice composition. *J. Chromatogr. A.*, 1993, **652**, p. 555-561.
- 40 -**Chiari, M. and Nesi, M.** Determination of total vitamin C in fruits by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 1993, **645**, p. 197-200.
- 41 -**Bütehorn, U. and Pyell, U.** Micellar electrokinetic chromatography as a screening method for the analysis of vanilla flavourings and vanilla extracts. *J. Chromatogr. A.*, 1996, **736**, p. 321-332.
- 42 -**Cartoni, G., Coccioli, F. and Jasionowska, R.** Capillary electrophoretic separation of phenolic acids. *J. Chromatogr. A.*, 1995, **709**, p. 209-214.
- 43 -**Wu, Ch., Lo, Ys., Lee, Yh., et al.** Capillary electrophoretic determination of organic acids with indirect detection. *J. Chromatogr. A.*, 1995, **716**, p. 291-301.
- 44 -**Landers, J. P., Oda, R. P., Spelsberg, J. A., et al.** Capillary electrophoresis : a powerful microanalytical technique for biologically active molecules. *BioTechniques*, 1993, **14**, p. 98-111.
- 45 -**Nishi, H. and Terabe, S.** Application of electrokinetic chromatography to pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, **11**, p. 1277-1287.
- 46 -**Boonkerd, S., Detaevernier, M. R. and Michotte, Y.** Use of capillary electrophoresis for the determination of vitamins of the B group in pharmaceutical preparations. *J. Chromatogr. A.*, 1994, **670**, p. 209-214.
- 47 -**Schiewe, J., Mrestani, Y., Neubert, R. and Engelhardt, H.** Application and optimisation of capillary zone electrophoresis in vitamin analysis. *J. Chromatogr. A.*, 1995, **717**, p. 255-259.
- 48 -**Feng, H., Fasching, J. L., Brown, P. R. and Issaq, H.** Speciation of organotin compounds by capillary electrophoresis using indirect ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B.*, 1995, **669**, p. 103-112.
- 49 -**Lin, C. E., Lin, W. C. and Chiou, W. C.** Migration behaviour and selectivity of dichlorophenols in micellar electrokinetic capillary chromatography. Influence of micelle concentration and buffer pH. *J. Chromatogr. A.*, 1996, **722**, p. 333-343.
- 50 -**Puig, D. and Barcelo, D.** Determination of phenolic compounds in water and waste water. *Trac. Trends in Analytical Chemistry*, 1996, **15**, p. 362-371.
- 51 -*Journal of chromatography A*. (Chromatography and electrophoresis in environmental analysis. Pesticide residues). Edited by U. A. T. Brinkman, R. W. Giese, C. F. Poole *et al.* Vol. 754. Amsterdam : Elsevier, 1996, 518 p.
- 52 -**Hahlbrock, K.** Flavonoids. In : *The biochemistry of plants*, Vol. 7. New-York : Academic Press, 1981. p. 425-456.
- 53 -**Markham, K. R.** Techniques of flavonoids identification. In : *Biological Techniques Series*. London : Academic Press, 1982. 113 p.
- 54 -**Vande Castele, K., Geiger, H. and Van Sumere, C. F.** Separation of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1982, **240**, p. 81-94.
- 55 -**Jen, J. F., Hsu, Y. H. and Lee, M.R.** Separation of plant phenolic compounds by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, 1996, **734**, p. 375-380.

- 56 -Fernandes, J. B., Griffiths, D. W., Bain, H. and Fernandes, F. A. N. The development and evaluation of capillary electrophoretic methods for the determination of the major phenolic constituents of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemical Analysis*, 1996, **7**, p. 253-258.
- 57 -Stupper, H. and Egger, R. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis of betalains from *Beta vulgaris*. *J. Chromatogr. A.*, 1996, **735**, p. 409-413.
- 58 -Yang, S. S., Smetena, I. and Goldsmith, A. I. Evaluation of micellar electrokinetic capillary chromatography for the analysis of selected tobacco alkaloids. *J. Chromatogr. A.*, 1996, **746**, p. 131-136.
- 59 -Mauri, P., Catalano, G., Gardana, C. and Pietta, P. Analysis of *Stevia* glycosides by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 1996, **17**, p. 367-371.
- 60 -Morin, Ph. Capillary electrophoresis as an alternative to HPLC for the separation of polyphenols. In : *Colloques de l'INRA, Polyphenols 94, 17th International Conference on Polyphenols, Palma de Mallorca, Spain, may 23-27, 1994*. Paris : INRA, 1994. p. 439-440.
- 61 -Ng, C. L., Ong, C. P., Lee, H. K. and Li, S. F. Y. Systematic optimization of micellar electrokinetic chromatographic separation of flavonoids. *Chromatographia*, 1992, **34**, p. 166-172.
- 62 -Ng, C. L., Ong, C. P., Lee, H. K. and Li, S. F. Y. Systematic optimization of capillary electrophoretic separations using the overlapping resolution mapping scheme. *J. Micobiol. Sep.*, 1993, **5**, p. 191-197.
- 63 -Pietta, P., Gardana, C. and Mauri, P. Application of HPLC and MECC for the detection of flavonol aglycones in plant extracts. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1992, **15**, p. 136-139.
- 64 -Delgado, C., Tomas-Barberan, F. A., Talou, T. and Gaset, A. Capillary electrophoresis as an alternative to HPLC for determination of honey flavonoids. *Chromatographia*, 1994, **38**, p. 71-78.
- 65 -Ferrerres, F., Blazquez, M. A., Gil, M. I. and Tomas-Barberan, F. A. Separation of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1994, **669**, p. 268-274.
- 66 -Archambault, J. C., Morin, Ph., Gaydou, E. *et al.* Optimization of pH and SDS concentration factors in MECC separation of flavonoids. In : *Colloques de l'INRA, Polyphenols 94, 17th International Conference on Polyphenols, Palma de Mallorca, Spain, may 23-27, 1994*. Paris : INRA, 1994. p. 437-438.
- 67 -Gil, M. I., Ferreres, F. and Tomas-Barberan, F. A. Micellar electrokinetic capillary chromatography of methylated flavone aglycones. *Journal of Liquid Chromatography*, 1995, **18**, p. 3007-3019.
- 68 -Li, K. W. and Sheu, S. J. Determination of flavonoids and alkaloids in the scute-coptis herb couple by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 1995, **313**, p. 113-120.
- 69 -McGhie, T. K. and Markham, K. R. Separation of flavonols by capillary electrophoresis : the effect of structure on electrophoretic mobility. *Phytochemical Analysis*, 1994, **5**, p. 121-126.
- 70 -Markham, K. R. and McGhie, T. K. Separation of flavones by capillary electrophoresis : the influence of pKa on electrophoretic mobility. *Phytochemical Analysis*, 1996, **7**, p. 300-304.
- 71 -Fernandes, J. B., Griffiths, D. W. and Bain, H. The evaluation of capillary zone and micellar electrokinetic capillary chromatographic techniques for the simultaneous determination of flavonoids, cinnamic and phenolic acids in blackcurrant (*Ribes nigrum*) bud extracts. *Phytochemical Analysis*, 1996, **5**, p. 97-103.

- 72 -**Pietta, P. G. and Mauri, P. L.** Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the determination of flavonoid drugs. *J. Chromatogr.*, 1991, **549**, p. 367-373.
- 73 -**Pietta, P. and Bruno A.** Separation of flavonol-3-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr.*, 1992, **593**, p. 165-170.
- 74 -**Pietta, P. G., Mauri, P. L., Zini, L. and Gardana, C.** Optimization of separation selectivity in capillary electrophoresis of flavonoids. *J. Chromatogr. A.*, 1994, **680**, p. 175-179.
- 75 -**Liang, H. R., Siren, H., Riekkola, M. L. et al.** Optimized separation of pharmaceutically active flavonoids from *Epimedium* species by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, 1996, **746**, p. 123-129.
- 76 -**Bjergegaard, C., Michaelsen, S., Mortensen, K. and Sorensen, H.** Determination of flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1993, **652**, p. 477-485.
- 77 -**Morin, Ph. and Dreux, M.** Factors influencing the separation of ionic and non-ionic chemical natural compounds in plant extracts by capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography*, 1993, **16**, p. 3735-3755.
- 78 -**Morin, Ph., Villard, F., Dreux, M. and André, P.** Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis. II. Separation of flavonoid-3-O-glycosides differing in their sugar moiety. *J. Chromatogr.*, 1993, **628**, p. 161-169.
- 79 -**Morin, Ph., Villard, F., Dreux, M. and André, P.** Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis. I. Separation of flavonoid-7-O-glycosides differing in their flavonoid aglycone. *J. Chromatogr.*, 1993, **628**, p. 153-160.
- 80 -**Fernandez de Simon, B., Estrella, I. and Hernandez, T.** Flavonoid separation by capillary electrophoresis. Effect of temperature and pH. *Chromatographia*, 1995, **41**, p. 389-392.
- 81 -**Mcghie, T. K.** Analysis of sugarcane flavonoids by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 1993, **634**, p. 107-112.
- 82 -**Shihabi, Z. K., Kute, T., Garcia, L. L. and Hinsdale, M.** Analysis of isoflavones by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, 1994, **680**, p. 181-185.
- 83 -**Aramendia, M. A., Garcia, I., Lafont, F. and Marinas, J. M.** Determination of isoflavones using capillary electrophoresis in combination with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1995, **707**, p. 327-333.
- 84 -**Bridle, P., Garcia-Viguera, C. and Tomas-Barberan, F. A.** Analysis of anthocyanidins by capillary zone electrophoresis. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 1996, **19**, p. 537-545.