

Dosage automatique des acides aminés libres dans les feuilles du palmier à huile sur autoanalyseur TSM Technicon

Y. LOZANO (1) et M.-T. RICHERT (2)

avec la collaboration technique de S. GEOFFROY (1)

Résumé. — Mode d'extraction des acides aminés libres des parties végétatives de jeunes plants de palmier à huile soumis à des conditions diverses d'arrosage ou de sécheresse. Comparaison des méthodes en ce qui concerne le rendement de l'extraction et la purification de l'extrait. Technique utilisée, exemple d'analyse au TSM.

Mots clés : Palmier à huile, Aminoacides, Autoanalyseur TSM Technicon.

Dans le cadre des recherches sur les dérèglements physiologiques produits par la sécheresse, une étude du métabolisme des acides aminés libres a été entreprise sur le palmier à huile.

L'expérimentation, effectuée sur la station I. R. H. O. de Pobé au Bénin, a porté sur de jeunes plants de palmiers à huile issus de lignées présumées sensibles et d'autres présumées résistantes à la sécheresse. Ces plants sont normalement arrosés, ou soumis à une sécheresse plus ou moins accentuée.

Les acides aminés libres des parties végétatives des plantules, feuilles et racines, doivent être extraits pour être analysés par chromatographie liquide d'échange d'ions selon la méthode de Moore et Stein [1].

Les différentes parties végétales des plantules prélevées à la station d'expérimentation de Pobé ont été expédiées au laboratoire d'analyses biochimiques du GERDAT à Montpellier. Afin d'éviter toute évolution dans la composition en acides aminés du végétal lors du transport, les enzymes protéolytiques sont inactivées aussitôt après le prélèvement. Selon Bjeliski et Turner [2], une ébullition de 3 mn dans l'éthanol à 80 p. 100 s'est avérée satisfaisante. Ces prélèvements (10 g de végétal) et le solvant d'ébullition (ajusté à un volume de 10 ml) sont mis dans des récipients en verre hermétiquement fermés. Les acides aminés libres sont ainsi fixés dans la solution alcoolique et aucune évolution dans le temps n'a été constatée.

Cependant, bien que l'alcool soit un excellent solvant d'extraction des acides aminés libres des plantes [3, 4, 5], le traitement préalable subi par les échantillons avant leur expédition n'est pas suffisant pour extraire la totalité des acides aminés libres présents dans le végétal. En effet, comme le montre le tableau I, 2/3 seulement de la quantité de la plupart des acides aminés libres sont extraits par la solution alcoolique. Il est donc nécessaire d'effectuer d'autres extractions sur la partie végétale avant analyse. Pour que l'extraction soit complète, il est nécessaire de rebroyer finement le végétal et de l'épuiser en acides aminés libres.

PURIFICATION DE LA SOLUTION D'EXTRACTION

L'extraction éthanolique des acides aminés libres des prélèvements de plantules de palmiers à huile n'est pas sélective. Les sucres, les sels, les lipides et les

TABLEAU I. — Comparaison des acides aminés libres dans 2 parties aliquotes A et B d'un échantillon de plant de palmier à huile non soumis à la sécheresse

Acides aminés	μ moles par g de mat. sèche		
	I	II	III
O. Phosphosérine.....	0,24	0,07	0,21
Acide Aspartique.....	2,37	1,08	1,34
Thréonine.....	0,45	0,11	0,34
Sérine.....	1,60	0,44	1,19
Asparagine.....	0,16	0,06	0,11
Acide glutamique.....	1,84	0,65	1,16
Glutamine.....	0,26	0,13	0,09
Proline.....	0,76	0,33	0,31
Glycine.....	0,16	0,04	0,11
Alanine.....	2,84	0,69	2,13
Valine.....	0,55	0,20	0,35
Isoleucine.....	0,13	0,03	0,08
Leucine.....	0,19	0,04	0,15
Tyrosine.....	0,12	0,03	0,07
Phénylalanine.....	0,16	0,04	0,19
Acide-Aminobutyrique.....	1,78	0,44	1,27
Ethanolamine.....	0,51	0,19	0,58
Somme des acides aminés.....	1,64	0,54	1,09

I : Acides aminés libres dans la solution alcoolique d'ébullition de la partie aliquote A de l'échantillon.

II : Acides aminés libres restant dans le végétal de la partie aliquote A.

III : Acides aminés libres totaux de la partie aliquote B de l'échantillon (végétal + solution alcoolique d'ébullition).

pigments passent aussi en solution. L'extrait obtenu est de couleur marron foncé. L'analyse d'une telle solution ne peut pas être effectuée directement par chromatographie sur colonne. Il faut une purification préalable de la solution d'extraction. En effet, la séparation des acides aminés et l'efficacité des résines se trouvent très fortement affectées par la présence des substances extraites avec les acides aminés. Ceci oblige à faire un nettoyage très fréquent des circuits de l'appareil et des résines, ce qui entraîne une perte de temps incompatible avec le nombre élevé des analyses qui doivent être effectuées au laboratoire d'Analyses biochimiques du GERDAT.

Une méthode classique de purification des solutions d'extraction alcoolique consiste à adsorber les acides aminés sur une petite colonne de résine cationique sous forme acide. Les anions et les substances neutres sont élués avec de l'eau ou avec une solution légèrement acide. Les acides aminés sont alors élués avec une solution basique [6]. La soude et l'ammoniaque à faible concentration sont souvent utilisées comme éluants. Le choix du volume d'éluant doit être adéquat afin de recueillir la totalité des acides aminés

(1) Laboratoire d'Analyses biochimiques et organiques, GERDAT, Montpellier (France).

(2) Laboratoire des Corps Gras I. R. H. O., GERDAT, Montpellier (France).

déposés sur la colonne de purification, et sa concentration doit être judicieuse afin de ne pas provoquer l'éluion des substances colorées plus fortement adsorbées sur les résines [7].

Nowakowski et Byers [8] ont constaté que la purification d'un extrait alcoolique d'acides aminés libres dans le végétal sur colonne de Dowex 50-X8 (forme H⁺) avec NH₄OH 2N comme éluant, permettait de retrouver quantitativement les acides aminés neutres et acides dans la solution ainsi purifiée, mais les acides aminés basiques étaient en partie détruits. D'autres essais de purification ont été tentés sur des résines cationiques Dowex 50-X4 (forme H⁺ et NH₄⁺) avec des éluants acides (HCl 1N ou 6N). Les résultats obtenus n'ont pas été plus satisfaisants d'autant plus que HCl provoque la dégradation de certains acides tels que la glutamine et l'asparagine.

Les mauvais taux de récupération en acides aminés libres que donnent les méthodes de purification par chromatographie d'échange d'ions, nous ont incité à utiliser, pour la purification de l'extrait alcoolique de plantules de palmiers à huile, une technique d'extraction liquide.

Les acides aminés et les substances gênantes (pigments, lipides, etc...) sont transférés en solution aqueuse après évaporation de l'éthanol. Une extraction chloroformique comme l'a décrite Nowakowski *et al.* [8] n'est pas suffisante. On obtient une solution aqueuse peu décolorée (vert très foncé) et trouble car l'émulsion difficile à briser persiste très longtemps. En procédant à un lavage à l'acétate d'éthyle avant le traitement au chloroforme, on obtient une solution claire de teinte jaunâtre mais qui ne se prête pas encore à l'analyse automatique. En effet, les prélèvements ainsi purifiés provoquent un encrassement notable du circuit analytique de l'autoanalyseur (fond élevé, cuves du colorimètre encrassées, etc...) sans que la résolution des pics chromatographiques soit cependant affectée.

Un passage sur petite colonne de polyamide de la solution aqueuse ainsi obtenue, nous a permis d'obtenir un éluat incolore et se prêtant très bien à l'analyse automatique. Cette phase stationnaire s'est révélée être plus inerte vis-à-vis des acides aminés que celles utilisées dans la littérature [8, 9]. Nous avons choisi

l'eau comme éluant car la phase d'évaporation, que l'on doit obligatoirement effectuer après percolation sur résines échangeuses d'ions avec l'emploi des éluants NH₄OH ou HCl, est évitée. En effet, avec une base ou un acide, cette opération supplémentaire est imposée par le fait que les solutions à injecter sur les colonnes de chromatographie doivent avoir un pH = 2. De plus avec NH₄OH, le risque d'avoir un bruit de fond élevé et variable d'un échantillon à l'autre, dû à la réaction ninhydrine-ammoniacque résiduel, est toujours présent. Ceci empêche toute analyse automatique de série.

La reproductibilité (Tabl. II) et la durée de la phase de percolation sur colonne de polyamide sont satisfaisantes.

On remarque cependant que la glutamine est éluee difficilement dans ces conditions normales opératoires. Afin de la récupérer complètement, on est obligé d'éluer avec de grands volumes d'eau. Les temps d'éluion de cette phase de purification deviennent alors excessivement longs (5 h), ce qui peut en retirer tout l'intérêt dans le cas où le facteur temps devient primordial.

Cependant, la purification sur polyamide est utilisée dans les cas où les solutions dites « purifiées » par l'extraction acétate d'éthyle-chloroforme sont encore trop colorées.

Par ailleurs, nous avons adjoint un nettoyage automatique du circuit analytique à chaque cycle d'analyse.

Cet ajout est suffisant pour maintenir le bruit de fond, dû à l'encrassement, assez bas pour qu'il ne nuise pas à l'analyse de série.

TECHNIQUE OPÉRATOIRE

1. — Extraction des acides aminés libres et purification.

Les prélèvements de végétal (10 g) sont bouillis 3 mn dans de l'éthanol à 80 p. 100 et conservés dans cette solution pour expédition.

A réception, et pour chaque échantillon, le végétal est séparé de sa solution alcoolique par filtration puis lavé avec de l'éthanol à même le filtre. Les solutions alcooliques sont réunies.

TABLEAU II. — Essais de purification de la solution aqueuse d'extraction d'un échantillon de feuille de palmier à huile sur polyamide

Acides aminés en mole/g de matière sèche	Solution d'extraction non purifiée	Solution d'extraction purifiée sur polyamide	
		Expérience I	Expérience II
O. Phosphosérine	—	—	—
Acide Aspartique.....	3,83	3,90	3,95
Thréonine.....	5,54	4,70	5,37
Sérine	6,56	6,56	6,70
Asparagine	51,63	50,80	52,20
Acide glutamique.....	2,65	2,72	2,65
Glutamine	1,86	1,10	1,10
Proline	8,86	8,34	8,08
Glycine	0,40	0,40	0,40
Alanine	6,40	6,18	6,18
Valine	3,58	3,50	3,58
Isoleucine	0,69	0,76	0,68
Leucine.....	0,46	0,46	0,46
Tyrosine	1,60	1,71	1,76
Phénylalanine	1,33	1,38	1,27
Arginine	11,19	11,20	11,16
Somme des acides aminés.....	106,58	103,71	104,54

Le végétal est séché à température ambiante et est rebroyé. Le broyat est alors extrait à froid deux fois avec 50 ml d'éthanol à 80 p. 100 sous agitation magnétique. Une troisième extraction s'est avérée inutile.

Les solutions éthanoliques d'extraction et de lavage sont jointes et sont évaporées au rotavapor à $t < 40$ °C. Le résidu, repris par 15 à 20 ml d'acétate d'éthyle est transvasé dans une ampoule à décanter contenant 10 ml d'eau déminéralisée. On agite et on élimine la couche organique par décantation.

On extrait alors avec 5 ml de chloroforme. La phase aqueuse est recueillie puis évaporée à sec. Le résidu est enfin repris par 5 ml de HCl 0,1 N qui peut être conservé à + 5 °C jusqu'à analyse.

Avant analyse on filtre la solution sur disque millipore Swinnex de 0,45 μ , ce qui permet d'être à l'abri d'un bouchage intempêtif des cartouches d'injection.

2. — Analyses des acides aminés libres.

Les analyses d'acides aminés libres des extraits de plantules de palmiers à huile sont effectuées sur auto-analyseur TSM Technicon (Fig. 2) avec un programme dit « physiologique », bicolonne, permettant 4 analyses d'échantillon par 24 h (Fig. 1a). Les tampons lithium utilisés permettent la séparation de 39 acides aminés

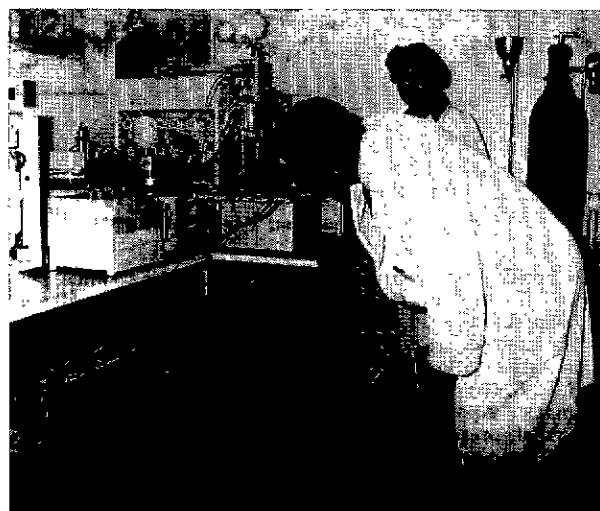


FIG. 2. — Auto-analyseur TSM Technicon.

(Fig. 1b). Le nettoyage du circuit analytique est effectué à chaque cycle par NaOH 2N. Les surfaces de pics sont intégrées automatiquement. Les calculs sont effectués sur calculateur Helwett Packard à cassette.

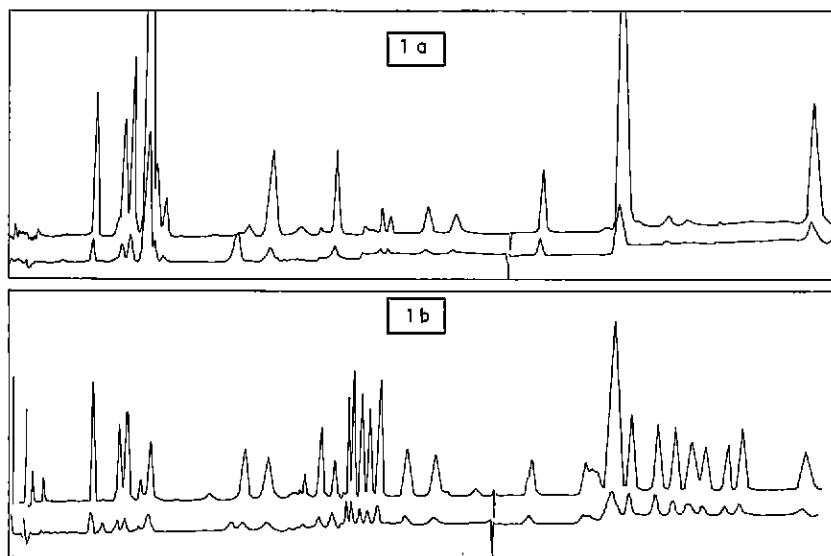


FIG. 1 a. — Chromatogramme d'acides aminés libres d'un échantillon de feuilles de palmiers à huile. b. — Chromatogramme d'un standard de 39 acides aminés à 37,5 n moles (injection de 15 μ l).

CONCLUSION

Les acides aminés libres de plantules de palmier à huile sont dosés par chromatographie.

Ils sont extraits par de l'éthanol à 80 p. 100.

Les solutions alcooliques d'acides aminés sont ensuite purifiées par extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme. Une purification supplémentaire sur colonne de polyamide permet d'obtenir des solutions parfaitement limpides dans le cas où les solutions aqueuses d'acides aminés dites « purifiées » pourraient engendrer des dépôts importants dans les cuves du colorimètre du TSM, malgré l'adjonction d'un cycle de nettoyage dans le programme d'analyse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SPACKMAN D. H., STEIN W. H., MOORE S. (1958). — *Anal. chem.*, **30**, p. 1191.
- [2] BJELISKI R. L. et TURNER W. A. (1966). — *Analyt. Biochem.*, **17**, p. 278.
- [3] *Official Methods of Analysis*, 10^e éd. (1965). — Association of Official Agricultural Chemists, Washington.
- [4] ADAMS C. A., SHEARD R. W. (1966). — *Can. J. Plant Sci.*, **46**, p. 671.
- [5] ROUX C., LESSAINT C. (1959). — *Ann. Physiol. Veg.*, **1-2**, p. 83.
- [6] HARRIS C. K., TIGANE E., HANES C. S. (1961). — *Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**, p. 439.
- [7] LAZARUS W. (1973). — *J. of Chrom.*, **87**, p. 169.
- [8] NOWAKOWSKI T. Z., BYERS M. (1972). — *J. Sci. Fd. Agric.*, **23**, p. 1313.
- [9] THOMPSON J. F., MORRIS C. J., GERING R. K. (1959). — *Analyt. Chem.*, **31**, p. 1028.

SUMMARY

Automatic Quantity Analysis of Free Amino-Acids in Oil Palm Leaves on Technicon TSM Autoanalyser.

Y. LOZANO and M.-T. RICHERT, *Oléagineux*, 1976, **31**, N° 8-9, p. 391-393.

A method of extraction of free amino-acids from the vegetative parts of young oil palm plants submitted to various conditions of watering and drought. Comparison of methods in relation to extraction efficiency and purification of the extract. Technique used, example of an analysis on TSM.

RESUMEN

Dosificación automática de aminoácidos libres en las hojas de palma aceitera sobre autoanalizador TSM Technicon.

Y. LOZANO y M.-T. RICHERT, *Oléagineux*, 1976, **31**, N° 8-9, p. 391-393.

Modo de extracción de aminoácidos libres de las partes vegetativas de jóvenes plantas de palma aceitera sometidas a diversas condiciones de riego o sequía. Comparación de los métodos desde el punto de vista del rendimiento de extracción, y de la purificación del extracto. Técnica utilizada, ejemplo de análisis con TSM.