

Analyse des acides aminés par chromatographie

I. Considérations générales sur l'intégration des pics. Une méthode rapide d'intégration manuelle

Les perfectionnements récents des divers types d'analyseurs automatiques d'acides aminés, dérivés de celui de MOORE ET STEIN, permettent actuellement d'obtenir plusieurs chromatogrammes en 24 h: jusqu'à 8 selon certains constructeurs*. L'intégration prend alors d'avantage de temps que le travail analytique proprement dit. C'est donc sur ce point que l'on peut désormais attendre des améliorations. La méthode préconisée par SPACKMAN, MOORE ET STEIN¹ est certainement la plus employée. Elle demande environ une heure par chromatogramme. Il existe des intégrateurs automatiques** qui donnent d'excellents résultats. Un appareil semi-automatique moins onéreux a été décrit récemment².

Méthode générale d'intégration

La surface en unités de densité optique d'un pic enregistré en transmission peut être obtenue en additionnant les densités optiques de points régulièrement espacés sur l'axe des temps (Fig. 1):

$$S = c \sum_{i=1}^{i=n} H_i \quad (a)$$

H_i est la densité optique du point d'abscisse "i".

SPACKMAN, MOORE ET STEIN¹ ont remarqué qu'il existe, dans le cas de pics symétriques, un rapport constant entre l'aire réelle du pic et celle du triangle de même hauteur et de même largeur à la moitié de l'ordonnée du maximum (Fig. 1):

$$S = k \cdot H \cdot L \quad (b)$$

où H est l'ordonnée du maximum et L la largeur du pic à mi-hauteur.

Ce résultat est en accord avec les études théoriques de VERMEULEN ET HIESTER³ qui ont montré que, d'une manière générale, on peut admettre que les profils d'élution obtenus avec des échangeurs d'ions sont des courbes de Gauss, ou en diffèrent très peu.

Dans ces conditions, pour mesurer l'aire d'un pic, il suffit d'en déterminer deux paramètres convenablement choisis, leur produit est proportionnel à la surface du pic, le coefficient de proportionnalité ne dépendant que du choix des paramètres.

A priori rien n'oblige à prendre, comme l'ont fait SPACKMAN *et al.*, la largeur à mi-hauteur comme second paramètre. Nous avons calculé, en adoptant la hauteur comme paramètre fixe, les valeurs du coefficient k dans la formule (b), en fonction de la fraction x de la hauteur totale à laquelle le paramètre de largeur L_x est mesuré. Le Tableau I groupe les résultats obtenus pour soixante pics, pris au hasard dans dix chromatogrammes.

Ces calculs montrent que la précision reste bonne si l'on mesure le paramètre

* Technicon Instruments Corporation, Chauncey, New York.

** Infotronics, Houston, Texas.

TABLEAU I

VALEUR DES COEFFICIENTS D'INTÉGRATION EN FONCTION DE L'ORDONNÉE À LAQUELLE EST MESURÉ LE PARAMÈTRE DE LARGEUR

Ordonnée où est mesuré le paramètre de largeur (H)	k^*	k'^{**}	Ecart maximum pour k (%)	Observations (%)
0.5	1.045 (1.064)	1.00 (1.00)	2.5	55 valeurs sur 60 à ± 1.43
0.6	1.21 (1.239)	1.16 (1.16)	4.4	58 valeurs sur 60 à ± 2.48
0.7	1.44 (1.483)	1.38 (1.39)	5.2	55 valeurs sur 60 à ± 3.47
0.75	1.60 (1.651)	1.53 (1.55)	5.3	56 valeurs sur 60 à ± 3.44
0.8	1.82 (1.876)	1.74 (1.76)	5.3	55 valeurs sur 60 à ± 3.84
0.9	2.63 (2.730)	2.52 (2.56)	8.2	55 valeurs sur 60 à ± 5.70

* k Est le coefficient d'intégration à appliquer pour connaître l'aire réelle; entre parenthèses on a mis le coefficient correspondant calculé pour la courbe de Gauss.

** k' Est le coefficient à appliquer pour connaître l'aire du triangle construit sur la hauteur et la largeur à demi-hauteur du pic; entre parenthèses: le même coefficient calculé pour la courbe de Gauss.

de largeur jusqu'aux huit dixièmes de la hauteur. Aux neuf dixièmes l'écart est encore inférieur à 6% dans neuf cas sur dix.

Dans la plupart des cas, il n'y a aucun avantage à mesurer le paramètre de largeur à une hauteur différente de $H/2$, sauf pour vérifier éventuellement un résultat; c'est cependant la méthode la plus rapide et parfois la seule applicable pour intégrer des pics qui se chevauchent. Il suffit en effet, dans ce cas, de se placer à une ordonnée telle que la contribution de la coloration due au second amino-acide soit négligeable, pour mesurer le paramètre de largeur.

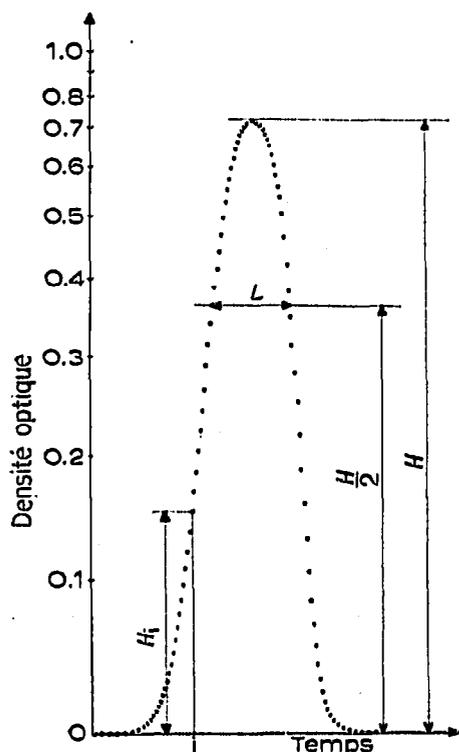


Fig. 1. Intégration d'un pic enregistré en transmission.

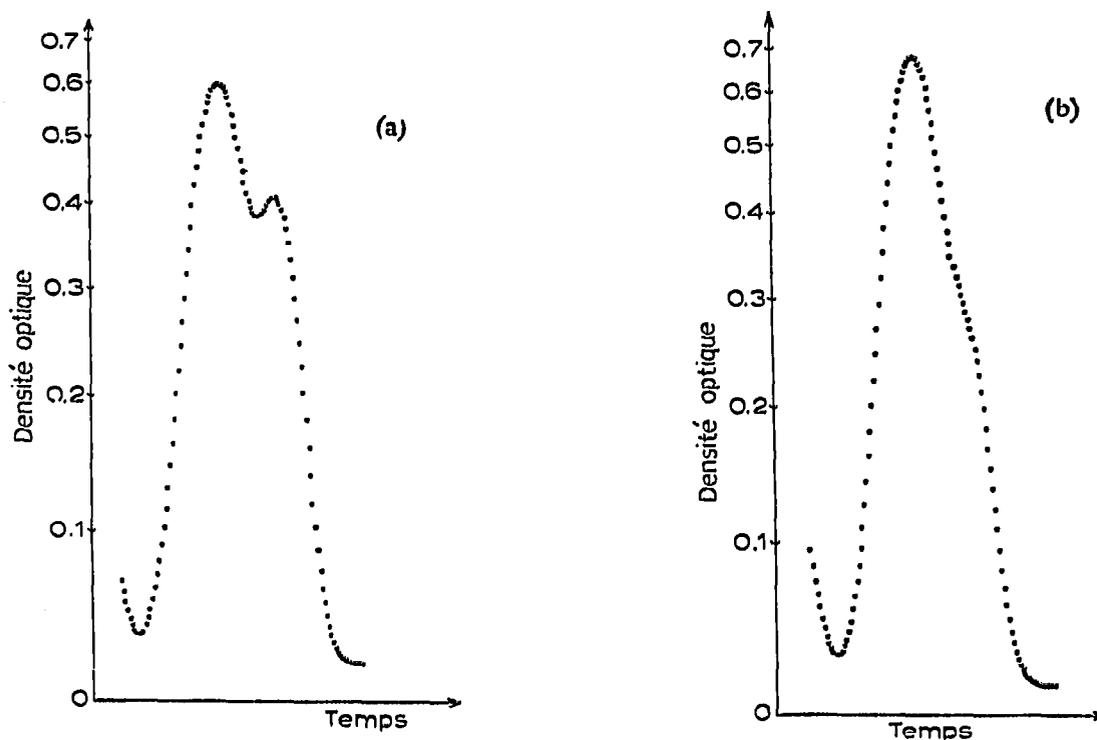


Fig. 2a et b. Deux exemples de séparations incomplètes où l'intégration reste possible.

Ceci suppose bien entendu que le profil de l'élution d'un acide aminé ne soit pas affecté par le chevauchement d'une autre substance. Il en est bien ainsi car nous avons constaté, en révélant simultanément des chromatogrammes par la ninhydrine et par un réactif spécifique des guanidines, que la forme du pic d'un acide aminé était indépendante de la présence d'une guanidine ninhydrine négative éluee simultanément⁴.

L'application de la méthode est illustrée par les exemples ci-dessous: dans les deux cas le pic principal est celui de la sérine, le pic secondaire ou l'épaulement correspond à la glutamine.

Dans le premier cas, il n'est pas possible de mesurer $L_{1/2}$ (Fig. 2a).

L'intégration à toutes les ordonnées où elle est possible donne les valeurs suivantes pour la sérine:

$S_{0.9} = 17.53$	$S_{0.75} = 17.86$	S_x est l'aire calculée en mesurant
$S_{0.8} = 17.70$	$S_{0.7} = 18.49$	la largeur à l'ordonnée $x \cdot H$.

Les trois premières valeurs sont concordantes et leur moyenne peut être prise pour une bonne évaluation de l'aire du pic principal.

Dans le second cas (Fig. 2b) où le pic présente un épaulement on calcule les valeurs:

$S_{0.9} = 20.11$	$S_{0.7} = 20.97$
$S_{0.8} = 20.45$	$S_{0.6} = 21.72$
$S_{0.75} = 20.64$	$S_{0.5} = 22.93$

Le fait de trouver une valeur commune à partir d'une certaine ordonnée permet d'affirmer que celle-ci est une bonne estimation de l'aire du pic principal. On peut évaluer l'aire correspondant au second acide aminé par le même procédé d'intégration, s'il est applicable, ou en retranchant la valeur calculée pour le pic principal de celle obtenue par sommation des densités optiques pour l'ensemble des deux acides aminés.

Nous n'avons pas vérifié si les valeurs que nous avons calculées sont valables pour des colonnes ou des systèmes d'éluion différents de ceux que nous utilisons. Vu le faible écart des valeurs expérimentales et des valeurs théoriques calculées à partir de la courbe de Gauss (Tableau I) nous pensons qu'il en est probablement ainsi.

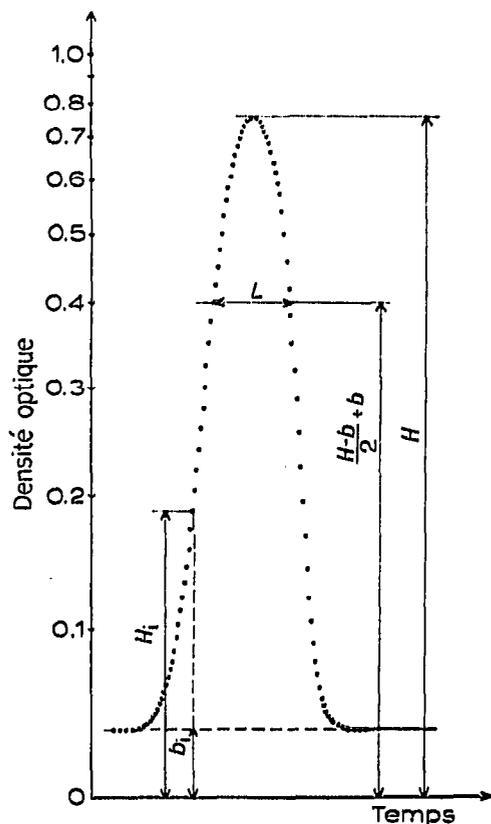


Fig. 3. Intégration d'un pic lorsque la ligne de base n'est pas confondue avec le zéro de l'enregistreur.

Intégration rapide

Lorsque la ligne de base du chromatogramme n'est pas confondue avec le zéro du papier d'enregistrement (Fig. 3), il faut en tenir compte pour l'intégration. Les formules (a) et (b) deviennent respectivement :

$$S = c \sum_{i=1}^n (H_i - b_i) \quad (a')$$

et

$$S = k(H - b)L \quad (b')$$

où b_i est l'ordonnée de la ligne de base interpolée à l'abscisse "i" et b est l'ordonnée de la ligne de base interpolée à l'abscisse du maximum.

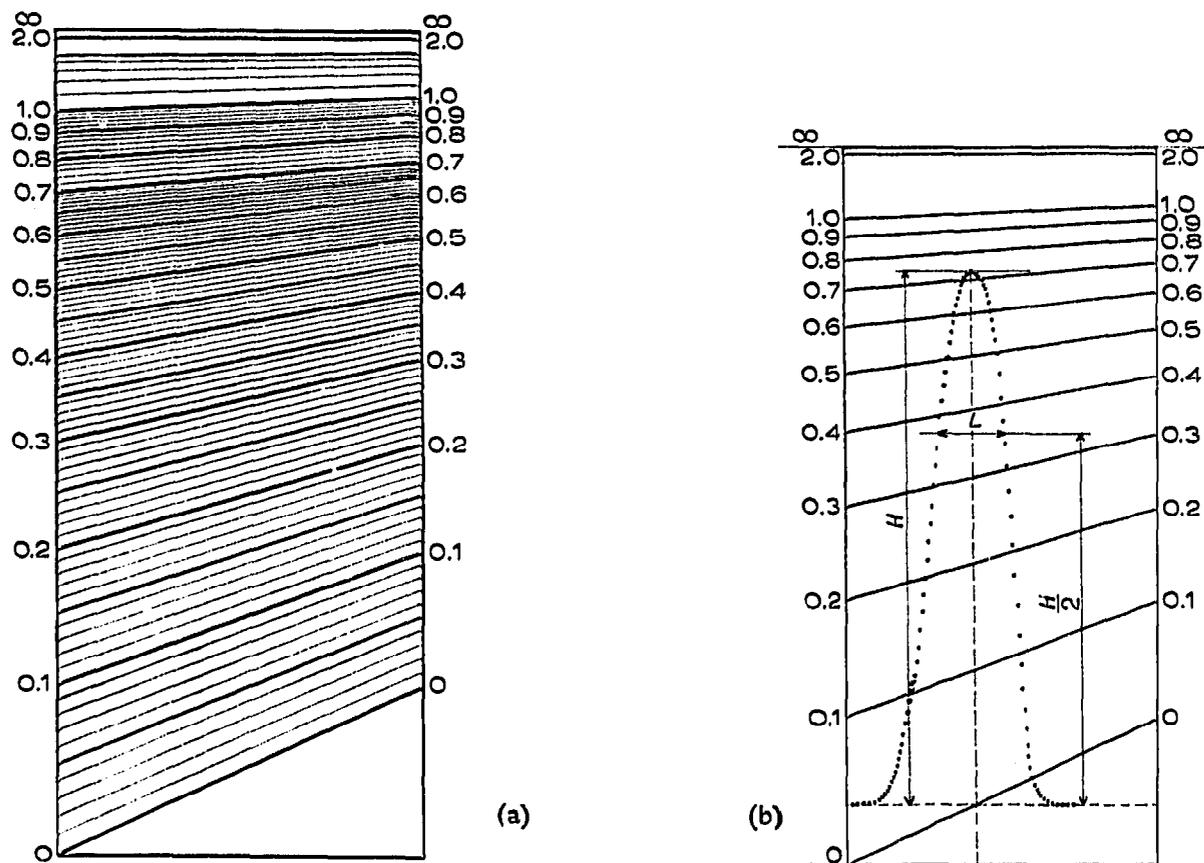


Fig. 4. (a) Échelle en densité optique de module variable. (b) Intégration au moyen de l'échelle de module variable.

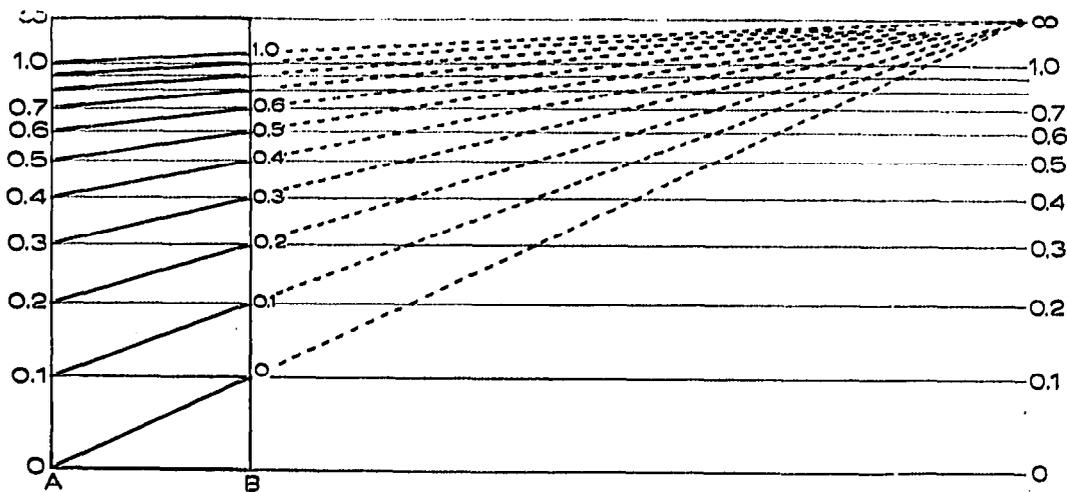


Fig. 5. Construction géométrique de l'échelle.

Nous utilisons pour ceci une échelle (Fig. 4a) transparente; en la plaçant sur l'enregistrement de telle sorte que les lignes de densité infinie soient superposées et que la droite marquée zéro coupe la ligne de base à l'abscisse du maximum, on lit directement la densité optique réelle ($H-b$) de ce point. (Fig. 4b). On repère ensuite sur le papier le point correspondant à la demi-hauteur et après avoir retiré l'échelle on mesure sur l'horizontale passant par ce point la largeur du pic L , par la méthode des points de SPACKMAN *et al.*¹.

On peut facilement réaliser une telle échelle en traçant le faisceau des droites s'appuyant sur l'échelle des ordonnées et passant par un point de la droite de densité infinie (Fig. 5). La même figure montre que l'on peut également joindre deux à deux les points situés sur deux parallèles, A et B, à l'axe des densités optiques et différant entre eux d'une quantité constante. Par exemple, on aura une échelle utilisable pour des lignes de base comprises entre 0 et 0.1 en joignant le point 0 de A au point 0.1 de B, le point 0.1 de A au point 0.2 de B, etc.

La pente de la droite de densité optique nulle dépend de l'espacement des deux droites A et B ou de l'éloignement du point de concours à l'axe des ordonnées dans la première construction. Il importe, pour ne pas diminuer la précision, que cette droite ne soit pas trop inclinée sur l'axe des abscisses; d'autre part, il ne faut pas que l'échelle devienne trop encombrante, celle que nous utilisons, pour des lignes de base comprises de 0 à 0.1 de densité optique, a 10 cm de large pour 28 cm de haut.

La précision obtenue sur la mesure de la hauteur réelle et le repérage de la demi-hauteur du pic est au moins égale à celle de la méthode classique car elle substitue une coïncidence optique, facile à réaliser, à une interpolation non linéaire.

Cette méthode rapide nous permet d'intégrer un chromatogramme complet en une demi-heure.

L'utilisation d'une machine à calculer imprimante (DIEHL-transmatic) nous a permis de réduire le temps d'intégration à 20 min.

Toutes nos mesures ont été faites sur des chromatogrammes obtenus en 22 h sur auto-analyseur Technicon par Mlle MAILLE.

Les calculs sont de Mme S. DELHAYE.

*Station Centrale de Physiologie
Végétale, C.N.R.A., Versailles (France)*

JACQUES TEMPÉ

1 D. H. SPACKMAN, S. MOORE ET W. H. STEIN, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1190.

2 G. WINTER ET H. HOLY, *Symp. Intern. Tech., New York*, 1965.

3 T. VERMEULEN ET N. K. HIESTER, *Ind. Eng. Chem.*, 44 (1952) 636.

4 A. MÉNAGÉ, J. TEMPÉ ET G. MOREL, *Physiol. Vég.*, sous la presse.

Reçu le 16 février 1966