

Note

Détermination rapide de polyamines et de quelques mono- et diamines dans des extraits végétaux

V. R. VILLANUEVA, R. C. ADLAKHA* et A. M. CANTERA-SOLER*

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette (France)

(Reçu le 18 avril 1977)

La chromatographie automatique sur colonne d'échangeur d'ions est une des techniques de choix pour l'analyse de mélanges de mono-, di- et polyamines. Bien qu'un grand nombre de méthodes aient été publiées (par ex. bibl. 1-4) elles concernent souvent l'analyse de matériel d'origine animale. Très peu d'entre elles ont été consacrées à la détermination des amines contenues dans du matériel d'origine végétale⁵. D'autre part ces méthodes donnent de bons résultats, lorsqu'il s'agit d'échantillons purifiés, par contre on obtient des chromatogrammes difficiles à interpréter si l'on analyse des extraits bruts. Quand on cherche à détecter la présence de ces composés aminés, pouvant se trouver en petite quantité, il vaut mieux éviter la purification préalable de l'échantillon, car ceci peut contribuer à la perte de quelques constituants mineurs. De plus, dans les cas où l'on doit effectuer un grand nombre d'analyses, cette purification préalable représente une perte considérable de temps.

Dans cette note, nous rapportons une nouvelle méthode permettant l'analyse directe de mono-, di- et polyamines d'origine végétale, dont la durée est de deux heures, ce qui représente un progrès par rapport aux techniques décrites antérieurement, qui nécessitaient huit heures d'analyse⁵. L'emploi de l'*o*-phtalaldehyde pour le dosage par fluorimétrie augmente la sensibilité de la méthode permettant la détection de ces composés à des concentrations de 10^{-12} M.

La Fig. 1 montre le chromatogramme d'un mélange standard préparé avec de produits commerciaux et les Figs. 2 et 3 les chromatogrammes obtenus avec des extraits bruts des plantes de soja (*Phaseolus mungo*) et de petits pois (*Pisum sativum*).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé un analyseur automatique Liquimat-Labotron muni d'un fluorimètre Labotron FFM-31 (Soc. Kontron, Boulogne, France) possédant une microcellule de circulation de 50 μ l de capacité. La colonne (0.4 \times 9 cm) de résine Durrum DC 6A est thermostatée à 66°. La composition des deux tampons servant à l'élution est comme suit; premier tampon (pH 5.65): citrate de sodium \cdot 2 H₂O 0.2 N, NaCl 1.0 N; deuxième tampon (pH 5.65): citrate de sodium \cdot 2 H₂O 0.2 N, NaCl 2.6 N. Les deux tampons ont été filtrés sur une membrane Millipore (0.22 μ m). Les valeurs

* Boursiers du gouvernement français.

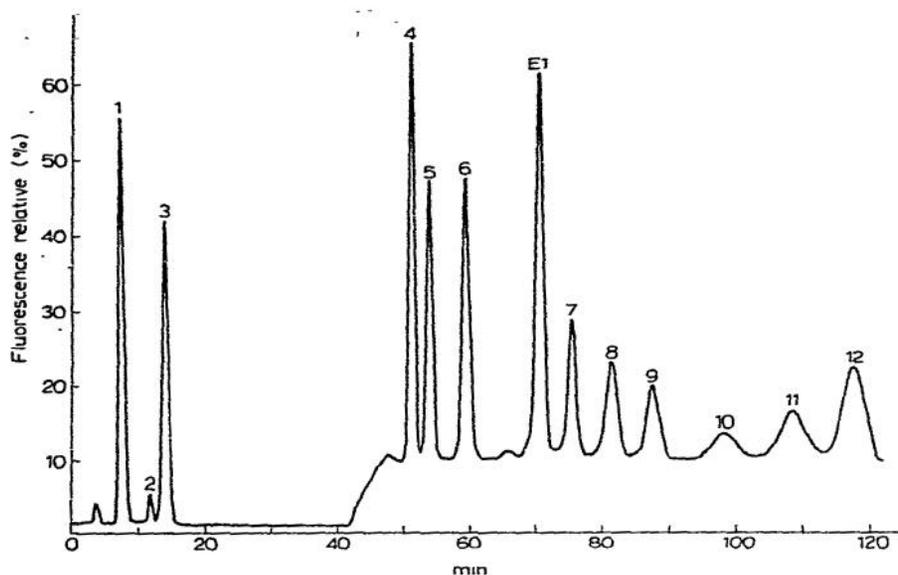


Fig. 1. Chromatogramme d'un mélange standard contenant 500 pmoles de chaque amine sauf pour l'étalon interne (E.I.) qui contient 375 pmoles. Voir Tableau I pour leur identité et comportement chromatographique.

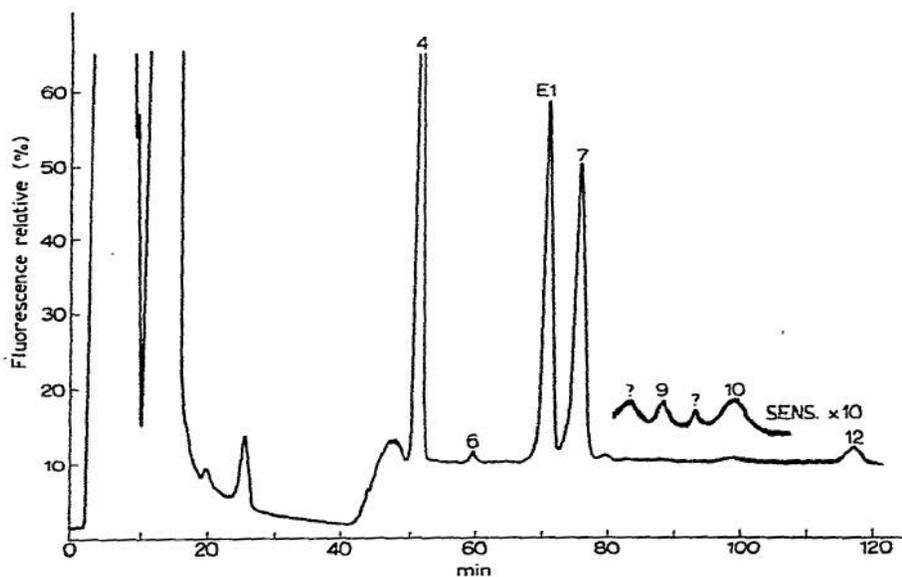


Fig. 2. Chromatogramme d'un extrait de soja (mis à germé pendant dix jours). Voir Tableau I pour l'identité des produits.

pH sont ajustés avec HCl après avoir ajouté 5% d'éthanol à chaque tampon. La détection est effectuée à l'aide d'une solution d'*o*-phthalaldehyde (Fluka, Buchs, Suisse)^{6,7}. L'enregistreur, W + W 600-Tarkan (Soc. Kontron) est réglé sur 100 mV pour 100% de fluorescence relative ce qui laisse la possibilité d'augmenter encore de

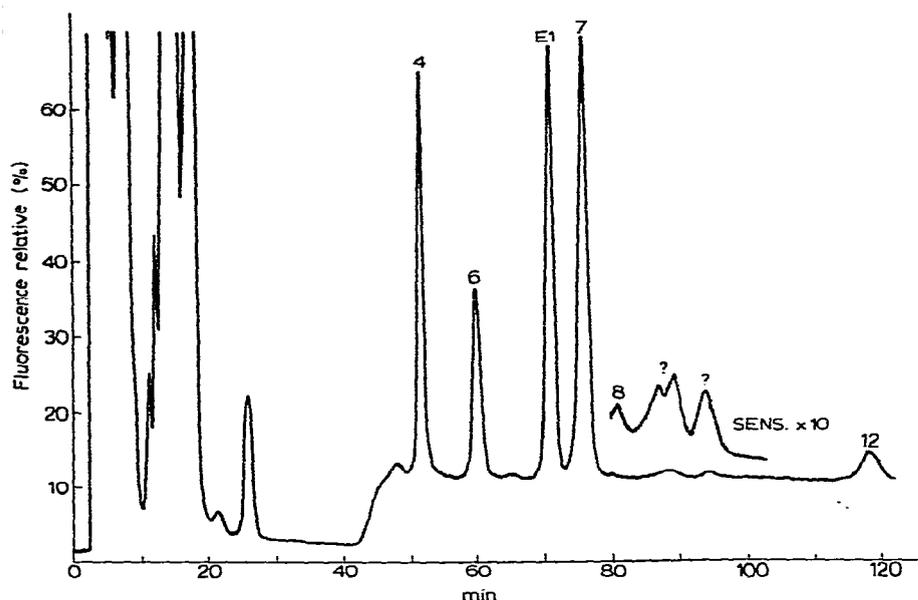


Fig. 3. Chromatogramme d'un extrait de petit pois (mis à germé pendant deux jours). Voir Tableau I pour l'identité des produits.

10 fois la sensibilité de l'enregistreur. Ceci nous a été utile pour la détection de quelques composés mineurs des extraits analysés (voir Figs. 2 et 3).

La quantification est faite avec un intégrateur ICAP 10 (LTT Conflans Saint Honorine, France) par la méthode de l'étalon interne.

Préparation des échantillons

La solution standard ($10 \mu M$) contenant les produits aminés (voir Tableau I) a été préparé dans un tampon citrate de sodium $0.2 N$ (pH 2.2). La 4-aza heptaméthylène 1,7-diamine (Merck) a été employée comme étalon interne ($7.5 \mu M$).

L'extraction des polyamines à partir du soja ou des petits pois a été réalisée sur des graines mises à germer pendant des périodes allant de 1 à 10 jours. Les plantes ainsi obtenues ont été broyées dans un mortier et extraites deux fois avec une solution de TCA à 5% contenant HCl $0.05 N$. Après centrifugation les surnageants sont réunis et une partie aliquote de cet extrait est directement analysée sans purification préalable.

Les volumes analysés, solution standard ou extraits de végétaux, étaient de 25 à $100 \mu l$.

Méthode

Un débit de 22.5 ml/h est utilisé pour les tampons d'éluion et un débit de 25 ml/h pour la solution d'*o*-phthalaldehyde. Lors de la chromatographie, les temps de passage sont: pour le premier tampon de 35 min et pour le deuxième tampon de 83 min; 10 min de passage de NaOH $0.2 N$ suffisent pour le recyclage de la colonne et 20 min du premier tampon pour la rééquilibrer.

TABLEAU I
RÉSULTATS DE LA MÉTHODE

Surfaces des pics: pour 500 pmoles de produit. Coefficients de réponse:référence, étalon interne (E.I.).

No.	Composé	Temps de rétention (min)	Surface des pics	Coefficient de réponse
1	Lysine	7.6 ± 0.1	104877	1879
2	Ammoniaque	12.1 ± 0.1	25747	7657
3	Arginine	14.2 ± 0.1	122319	1611
4	Putrescine	51.1 ± 0.1	130135	1515
5	Histamine	53.8 ± 0.3	96753	2037
6	Cadaverine	59.6 ± 0.1	90712	2173
E.1.	4-Aza heptaméthylènediamine	70.4 ± 0.1	147873 (375 pmoles)	
7	Spermidine	75.2 ± 0.1	71378	2762
8	Hexaméthylènediamine	81.7 ± 0.1	80221	2457
9	Agmatine	87.7 ± 0.1	75012	2628
10	Tyramine	99.1 ± 0.1	87078	2264
11	Phényléthylamine	109.3 ± 0.1	109557	1799
12	Spermine	116.5 ± 0.2	125046	1576

RÉSULTATS

La Fig. 1 montre le chromatogramme obtenu lors de la séparation d'un mélange standard contenant 500 pmoles de chaque composé. Le premier tampon sert à éluer tous les acides aminés et à éliminer toute autre substance moins basique que les polyamines. Le deuxième tampon élue par la suite les polyamines et amines apparentées. L'éthanol qu'on ajoute aux tampons est nécessaire pour obtenir une bonne séparation. Sur le Tableau I figurent les temps de rétention, les surfaces des pics et les coefficients de réponse obtenus.

A titre d'exemple les Figs. 2 et 3 montrent les chromatogrammes correspondant aux polyamines des plantes de soja et de petits pois, dont les résultats sont en accord avec les données bibliographiques^{8,9}.

La reproductibilité de la méthode chromatographique est comparable à celle de l'analyse automatique d'acides aminés. Le fait de chromatographier des échantillons bruts non tamponés, comme c'est le cas pour les extraits végétaux analysés n'a aucune influence sur la séparation de polyamines et il n'est pas observé de déplacement anormal des pics. Ceci a été vérifié en chromatographiant un mélange d'extrait brut avec une solution standard de polyamines. La méthode permet, grâce à l'utilisation de la quantification fluorimétrique, la détection des composés aminés présents à des concentrations de l'ordre de picomole.

Nous employons cette méthode pour (1) la détection rapide de mono-, di- et polyamines dans du matériel végétal; (2) le dosage simultané des décarboxylases de quelques acides aminés tels que la tyrosine, la phénylalanine, l'ornithine, la lysine, l'histidine, l'arginine. Une étude concernant les variations des concentrations des polyamines par rapport à la croissance végétale est actuellement en cours.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. H. Russell (Editor), *Polyamines in normal and neoplastic growth*, Raven Press, New York, 1973.
- 2 H. Veening, W. W. Pitt, Jr. et G. Jones, Jr., *J. Chromatogr.*, 90 (1974) 129.
- 3 C. W. Gehrke, K. C. Kuo, R. W. Zumwalt et T. P. Waalkes, *J. Chromatogr.*, 89 (1974) 231.
- 4 H. Adler, M. Margoshes, L. R. Snyder et C. Spitzer, *J. Chromatogr.*, 143 (1977) 125.
- 5 D. Le Rudulier et G. Goas, *C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 273 (1971) 1108.
- 6 M. Roth et A. Hampai, *J. Chromatogr.*, 83 (1973) 353.
- 7 J. R. Benson et P. E. Hare, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 72 (1975) 619.
- 8 U. Bachrach, *Function of naturally occurring polyamines*, New York, Academic Press, 1973.
- 9 T. A. Smith, *Phytochemistry*, 14 (1975) 865.