

CHROM. 21 042

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ÉCHANGEUSE D'IONS EN DÉTECTION ULTRAVIOLETTE, POUR LE DOSAGE DES CATIONS DANS LES SÈVES XYLÉMIQUES

BRUNO SARROBERT, PHILIPPE BRUNET et NICOLE PARIS-PIREYRE*

Laboratoire de Physiologie Végétale, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Place E. Bataillon, 34060 Montpellier Cedex (France)

(Reçu le 3 octobre 1988)

SUMMARY

Determination of cations in xylem sap by ion-exchange high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection

An high-performance liquid chromatographic method is described for the simultaneous determination of cations in xylem sap without pretreatment. In order to reduce analysis time and to improve peak separation we calculated the mobile phase velocity and the Ce^{3+} concentration in the mobile phase using the capacity factor, the separation factor and the peak width at half height. Xylem sap was analyzed under optimal conditions. The reproductibility of this method was determined and compared with that of flame spectrophotometric methods. No significant differences were found between the two methods described. Advantages of the new method and its application to a wide range of biological samples are discussed.

INTRODUCTION

Durant ces dix dernières années, de nombreuses recherches ont été effectuées sur l'utilisation de l'analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour la séparation et la quantification d'ions inorganiques. Les premiers travaux dans ce domaine furent réalisés par Small *et al.*¹ qui utilisaient un système de séparation à double colonne couplé à un conductimètre. Depuis, ce dispositif a été amélioré. En effet, la mise au point de nouvelles phases stationnaires avec des polymères échangeurs d'ions à faible capacité greffés sur des résines de faible granulométrie, ainsi que de nouvelles méthodes de détection, a permis une réduction du temps d'analyse et un gain de sensibilité^{2–6}.

Si la détection par conductimétrie reste encore la plus employée, la détection par chromatographie par détection photométrique indirecte (IPC) devient de plus en plus populaire⁷. Son principe est basé sur la mesure en UV, à une longueur d'onde

appropriée, de la diminution de l'absorbance initiale de l'éluant due au passage d'ions dans la cellule de détection^{8,9}. Ainsi, il est possible de doser selon le type de colonnes et d'éluants, soit les anions^{10,11} soit les cations¹².

Si, dans le domaine de l'analyse cationique de l'eau, cette méthode a été immédiatement pressentie¹³ et employée¹⁴, seuls quelques rares travaux portent sur l'analyse d'extraits biologiques, tel le sérum humain¹⁵ ou différents jus de légumes¹⁶. Pour les sèves xylémiques, l'emploi des méthodes classiques de dosages par spectrophotométrie de flamme reste prépondérant¹⁷⁻²⁰. Dans notre laboratoire, la méthode de dosage au microanalyseur à sonde électronique selon la technique de Roinel²¹, a été adaptée avec succès par Gartner *et al.*^{22,23}. Mais à notre connaissance aucune approche utilisant les technique d'analyses par HPLC n'a été réalisée.

En conditions de cultures normales, les cations présents et analysés dans les sèves xylémiques sont le sodium, le potassium, le magnésium, le calcium, et selon l'apport d'azote dans le milieu de culture, l'ammonium. Les méthodes classiques d'analyses cationiques nécessitent souvent un volume de prise d'essai trop important par rapport aux volumes exsudés limitant très souvent les dosages, particulièrement pour des plantes mises en conditions de stress (salin, froid ...).

Conscients des avantages que procure l'emploi de l'HPLC pour l'analyse des sèves xylémiques²⁴, nous nous sommes inspirés des travaux de Sherman et Danielson¹⁴ pour mettre au point une méthode adaptée à notre matériel en vue de dosages répétitifs et rapides.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Instrumentation

L'appareil d'HPLC utilisé est un Varian LC 5000, équipé d'une boucle d'injection de 10 μ l, et couplé à un détecteur Varian UV 100. Un intégrateur Varian 4270 est utilisé pour le tracé des chromatogrammes et le calcul des concentrations. Les séparations sont réalisées sur une colonne ION 210 (Interaction Chemicals, Mountain View, CA, U.S.A.), de dimension 100 \times 3,2 mm I.D., à température ambiante. La phase est constituée de particules de 5 μ m de résine de polystyrène-divinylbenzène greffée de ponts sulfoniques.

Notre dispositif étant prévu pour des analyses de sèves par injection directe sans purification préalable, une pré-colonne (Interaction GC-200) est montée afin de préserver la colonne.

Pour la vérification de la méthode par HPLC, nous avons dosé en parallèle les cations des différents types de sèves sur un spectrophotomètre de flamme IL 4000, en émission pour K^+ et Na^+ et en absorption pour Ca^{2+} et Mg^{2+} .

L'ion NH_4^+ est dosé selon la méthode de Solarzano²⁵ par colorimétrie sur un spectrophotomètre Lambda 3 (Perkin-Elmer, Norwalk, CO, U.S.A.). Les spectres d'absorption sont réalisés sur le même appareil couplé à un intégrateur Shimadzu C-R4A (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Réactifs

Les solutions étalons sont préparées à partir de produits Merck pour analyse (Darmstadt, F.R.G.). L'éluant est une solution de Ce^{3+} [$Ce_2(SO_4)_3 \cdot 8H_2O$, Aldrich, Gold Label]. Nous utilisons de l'eau bidistillée et dé-ionisée sur un appareil Waters.

Les solutions sont filtrées sur filtres Millipore (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) HATF (hydrosol analysis triton free) de 0,45 μm .

Prélèvements des sèves xylémiques

Les conditions de culture et de prélèvements des sèves xylémiques sont celles décrites par Lakhdari²⁶. Le matériel végétal choisi est la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Les analyses sont effectuées à partir d'un mélange prélevé sur huit plantes poussant dans les mêmes conditions de culture. Les stress appliqués sont le froid (10°C) ou un apport de chlorure de sodium (50 mM) dans la solution de culture durant 14 jours avant la récolte.

RÉSULTATS

Partant des travaux de Sherman et Danielson¹⁴, nous avons défini les conditions chromatographiques pour l'analyse simultanée des cations majeurs présents dans les sèves xylémiques de tomate.

Détermination des conditions chromatographiques

Choix des paramètres de détection

Détermination de la longueur d'onde optimale. L'origine et la qualité du solvant d'éluion pouvant intervenir sur le profil du spectre d'absorption en UV, et de ce fait nuire à la qualité de la détection par IPC, nous avons jugé nécessaire de fixer la longueur d'onde où la différence d'absorption entre l'éluant pur et en présence d'une solution de chlorure de sodium est maximale. La Fig. 1 nous montre que, dans notre dispositif, c'est à 254 nm que cette différence est la plus grande.

Sensibilité du détecteur. La détection en UV, par rapport à d'autres détections telle la fluorimétrie, entraîne des fluctuations et parfois des dérives de lignes de bases importantes malgré l'emploi d'un solvant en condition isocratique. Ces fluctuations peuvent être autant de sources d'erreurs pour le calcul des surfaces des pics détectés. Les travaux de Sherman et Danielson¹⁴ ont montré que l'emploi du $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ comme solvant d'éluion en IPC par rapport au CuSO_4 permet d'abaisser les limites de détection pour un grand nombre de cations. De plus, les différentes analyses de sèves xylémiques que nous avons effectuées (Tableau I), montrent que les teneurs des différents cations sont bien au-delà du seuil de sensibilité défini par ces auteurs. Cela nous permet de diluer par dix les exsudats et de constituer pour la suite des travaux la solution étalon suivante: NaCl, 1 mM; KNO_3 , 1 mM; MgSO_4 , 0,25 mM; CaSO_4 , 0,5 mM.

En faisant varier la sensibilité du détecteur (0,002, 0,005, 0,01, 0,02 et 0,05 A.U. mV^{-1}), nous avons constaté qu'au fur et à mesure que la sensibilité augmente, la ligne de base devient de plus en plus instable. Afin d'obtenir une ligne de base qui fluctue peu, tout en conservant une bonne intégration, nous avons retenu une sensibilité de 0,01 A.U. mV^{-1} pour la suite des expériences.

Choix des paramètres sur l'HPLC

Afin de pouvoir analyser un grand nombre d'échantillons, il était important pour nous de réduire le plus possible la durée de l'analyse sans nuire à sa qualité. Pour

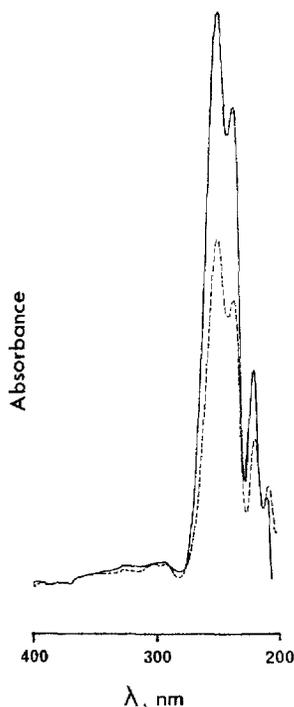


Fig. 1. Spectres d'absorption d'une solution $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mM) sans (—) et avec (---) NaCl (1 mM).

cela, nous avons étudié d'une part le flux du solvant, d'autre part la concentration en Ce^{3+} dans le solvant. L'influence de ces paramètres a été mesurée par le calcul des facteurs suivants: (i) le facteur de capacité du soluté, $k' = (t_R - t_0)/t_0$ (t_R = temps de rétention du soluté; t_0 = temps de rétention du pic négatif); (ii) le facteur de séparation entre deux pics consécutifs, $\alpha = k'_2/k'_1$; (iii) la largeur du pic à mi-hauteur: $\text{PW}_{1/2}$, mesurée en secondes.

Détermination du flux. Nous avons testé différents flux pour une concentration en Ce^{3+} de 0,05 mM. Pour évaluer le temps maximum d'analyse, nous considérons le

TABLEAU I

COMPOSITION CATIONIQUE (mM) DES SÈVES XYLÉMIQUES DE TOMATE SELON DIFFÉRENTES CONDITIONS CULTURALES.

Analyses par spectrophotométrie de flamme. Les valeurs entre parenthèses donnent les limites de détection (mM) selon Sherman et Danielson¹⁴.

	Na^+ (0,175 · 10 ⁻³)	K^+ (0,5 · 10 ⁻³)	Mg^{2+} (0,25 · 10 ⁻³)	Ca^{2+} (0,2 · 10 ⁻³)
Témoin	Traces	17	1,66	2,05
Froid (10°C)	Traces	8,75	1,25	3,87
NaCl (50 mM)	25,80	21,03	4,42	10,52

TABLEAU II

ÉVOLUTION DES FACTEURS k' ET α EN FONCTION DU FLUX $[Ce^{3+}] = 0,05 \text{ mM}$. $\alpha = k'_2/k'_1$.

Flux (ml min^{-1})	k'_1 (Na^+)	k'_2 (K^+)	k'_3 (Mg^{2+})	k'_4 (Ca^{2+})	α
0,5	0,70	2,31	6,19	16,23	3,30
0,6	0,71	2,27	5,80	15,21	3,20
0,7	0,73	2,29	5,20	12,83	3,13
0,8	0,69	1,79	4,80	12,70	2,60
0,9	0,58	1,37	4,30	11,30	2,35
1	0,49	1,10	3,81	10,80	2,25

k' du calcium qui est le dernier cation élué. Le Tableau II montre qu'on peut réduire le temps d'analyse d'environ 40% en passant de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ à 1 ml min^{-1} . Cependant ce gain de temps se fait au détriment de la qualité de la séparation entre K^+ et Na^+ . En effet, le calcul des α donné par le Tableau II, montre qu'à partir de $0,8 \text{ ml min}^{-1}$, les valeurs α passent de 2,60 à 2,35 ce qui indique une baisse sensible du pouvoir de séparation de la colonne. De plus, dans le cas de plantes poussant sur des solutions salines, les fortes concentrations en sodium attendues (cf. Tableau I) ne peuvent que nuire à la séparation Na^+/K^+ . Nous choisissons donc de nous placer à un flux de $0,7 \text{ ml min}^{-1}$ qui, tout en réduisant la durée de l'analyse (env. 20%), permet de conserver une distance entre les pics Na^+ et K^+ garantissant une bonne séparation ainsi qu'une pression raisonnable (72 atm) au niveau de la colonne.

Détermination de la concentration en Ce^{3+} . En chromatographie échangeuse d'ions, l'élution des cations divalents nécessite, par rapport aux monovalents, un solvant de force ionique supérieure. La Fig. 2 montre que le profil d'élution des pics de Mg^{2+} et de Ca^{2+} est peu satisfaisant (base trop large donnant un aspect de pic trainant) à une concentration en Ce^{3+} de $0,05 \text{ mM}$. Nous avons augmenté la concentration en Ce^{3+} dans la phase mobile. Pour en estimer l'influence, nous mesurons $\text{PW}_{1/2}$.

Le Tableau III montre qu'au fur et à mesure que la concentration en Ce^{3+} augmente, le facteur $\text{PW}_{1/2}$ diminue, signe d'une meilleure élution. Mais le calcul des k' (cf. Tableau IV) d'après les chromatogrammes obtenus, dénote, pour les concentrations élevées ($0,3$ et $0,4 \text{ mM}$), une mauvaise séparation entre les monovalents. Par contre, la durée de l'analyse est fortement réduite. Devant cette alternative, nous retenons comme concentration en Ce^{3+} dans la phase mobile, $0,2 \text{ mM}$, qui représente un bon compromis (cf. Fig. 2).

La solution consistant à faire varier les conditions chromatographiques (flux et $[\text{Ce}^{3+}]$) entre le pic de K^+ et celui de Mg^{2+} , a été examinée. Mais, dans notre dispositif, le temps de stabilisation de la colonne s'est avéré trop important pour que l'élution du pic de Mg^{2+} ne soit pas perturbée.

Choix des paramètres d'intégration

L'expérience acquise avec notre matériel, nous a permis de fixer la plupart des paramètres d'intégration sans avoir recours à une mise au point. Ainsi nous avons

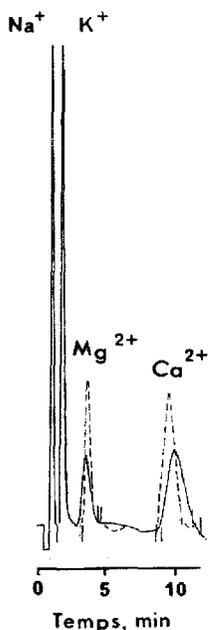


Fig. 2. Chromatogrammes d'une solution étalon pour une concentration en Ce^{3+} de 0,05 mM (—) et de 0,2 mM (---).

TABLEAU III

ÉVOLUTION DU $\text{PW}_{1/2}$ POUR Ca^{2+} ET Mg^{2+} EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CÉRIUM

Flux = 0,7 ml min⁻¹.

$[\text{Ce}^{3+}]$ (mM)	Mg^{2+}	Ca^{2+}
0,05	36	96
0,10	30	84
0,20	24	60
0,30	24	54
0,40	23	53

TABLEAU IV

ÉVOLUTION DES FACTEURS k' ET α SELON LA CONCENTRATION EN CÉRIUM

Flux = 0,7 ml min⁻¹. $\alpha = k'_2/k'_1$

$[\text{Ce}^{3+}]$ (mM)	k'_1 (Na^+)	k'_2 (K^+)	k'_3 (Mg^{2+})	k'_4 (Ca^{2+})	α
0,05	0,73	2,29	5,20	12,83	3,13
0,10	0,74	2,31	4,60	11,60	3,12
0,20	0,76	2,52	4,08	10,00	3,31
0,30	0,73	2,04	3,90	9,70	2,79
0,40	0,73	1,84	3,60	9,50	2,52

programmé: atténuation, $AT = 0,5$; vitesse de déroulement du papier, $CS = 0.5 \text{ cm min}^{-1}$; pics marqueurs, $PM = 1$; rapport hauteur/largeur pics, $PW = 1$; auto-zéro, $AZ = 1$; méthode de calcul, $MN = 0$.

Cependant, la présence d'un pic négatif due à l'éluion des anions d'accompagnement, nous a conduit à examiner l'influence du paramètre NP (negative peak) sur le calcul des aires. En effet, la programmation de ce paramètre ($NP = 1$) ne fait débiter le calcul de l'aire qu'une fois la ligne de base franchie. Par contre, en $NP = 0$ (valeur par défaut), l'intégration commence au départ du pic, même si celui-ci n'est pas visible sur le tracé.

Afin d'évaluer l'importance de ce facteur, pour chacun des cations, nous avons effectué une régression linéaire du type: aire du pic = f (concentration). Les coefficients de corrélation obtenus (cf. Tableau V) nous montrent que la programmation $NP = 1$ ne peut pas être utilisée dans le cas du sodium.

Application au dosage des sèves

Etude qualitative

Nous avons examiné trois types d'exsudats xylémiques, récoltés à partir: de plantes témoins, de plantes soumises au froid ($T = 10^\circ\text{C}$) et de plantes soumises à un stress salin ($[\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}$). Les exsudats sont dilués par dix avec de l'eau bidistillée, et injectés directement. La Fig. 3 montre que les tracés obtenus à partir des sèves sont de qualité comparable à celui de la solution étalon. De plus dans le cas des plantes stressées (Fig. 3 c et d), il apparait un pic nouveau que nous avons identifié comme étant de l'ammonium, preuve d'une modification du métabolisme azoté en relation avec le stress. Nous avons donc modifié la solution étalon en incorporant 1 mM de NH_4NO_3 et vérifié que les réglages définis précédemment sont valables. Le chromatogramme de la solution étalon définitive est donné par la Fig. 4. Nous remarquons également (cf. Fig. 3b) la présence d'une pic de Na^+ dans des sèves de plantes cultivées en absence de NaCl , due en partie à l'ajustement du pH des solutions nutritives avec de la soude. D'autre part des contaminations semblent inévitables au cours des différentes étapes de la culture.

Validité de la méthode

Pour vérifier la reproductibilité d'une analyse sur l'autre, nous avons procédé à trois injections consécutives de la solution étalon définitive. Les pourcentages de déviation standart relative pour chacun des cations sont: Na^+ , 2,85%; NH_4^+ , 0,95%.

TABLEAU V

COEFFICIENTS DE CORRÉLATION ENTRE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN CATIONS ET LEURS AIRES AVEC OU SANS LE FACTEUR NP

	$NP = 0$	$NP = 1$
Na^+	0,997	0,754
K^+	0,999	0,996
Mg^{2+}	0,993	0,994
Ca^{2+}	0,998	0,997

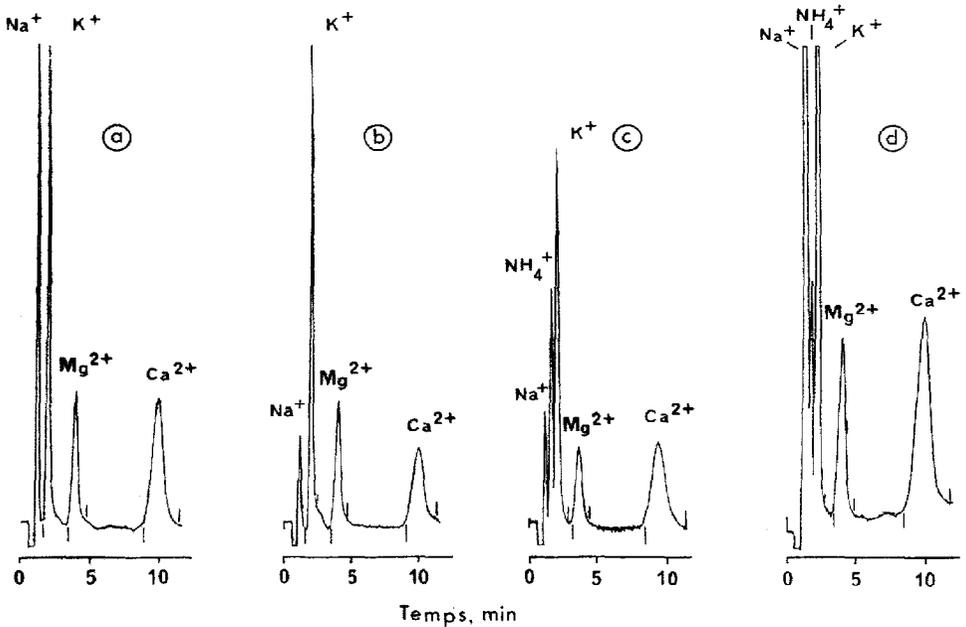


Fig. 3. Chromatogrammes d'une solution étalon et de différents échantillons de sèves. (a) Etalon; (b) témoin; (c) froid, 10°C; (d) NaCl, 50 mM.

K^+ , 2,42%; Mg^{2+} , 1,25%; Ca^{2+} , 2,56%. Ces valeurs, toutes inférieures à 3%, nous assurent d'une bonne reproductibilité des analyses, ce qui nous permet de comparer, sur nos différents échantillons de sèves, des dosages effectués par cette nouvelle méthode avec ceux réalisés par les méthodes classiques. Celles-ci nécessitant des volumes de prise d'essai importants, nous avons mélangé les sèves de plantes d'un même milieu de culture. Chaque échantillon ainsi obtenu est dosé à la fois sur HPLC et par spectrophotométrie avec trois répétitions.

Nous avons comparé les deux méthodes en utilisant le Test de Moyenne de Student²⁷. Les résultats consignés dans le Tableau VI montrent que les deux méthodes sont comparables au seuil de 5%.

DISCUSSION

Nous venons de démontrer que l'utilisation de l'HPLC pour le dosage des cations dans les sèves xylémiques donne des résultats équivalents en qualité à ceux obtenus par les méthodes spectrophotométriques. De plus, la méthode que nous venons de décrire possède certains avantages qui, dans le cas de l'analyse des sèves, nous semblent prépondérants. Ce sont: (i) une injection directe de l'échantillon sans préparation; (ii) un volume d'injection faible (10 μ l); (iii) le dosage simultané des cinq principaux cations au cours d'une même analyse. Grâce à cela, des bilans cationiques, plante par plante et sur un grand nombre d'individus, sont réalisables, ce qui est d'un grand intérêt pour des études physiologiques.

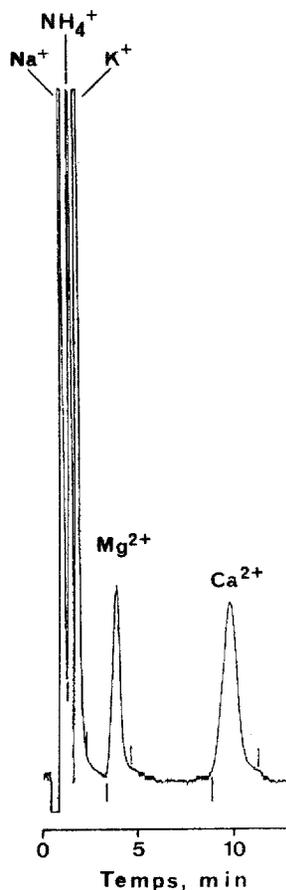


Fig. 4. Chromatogramme de la solution étalon définitive.

TABLEAU VI

COMPARAISON STATISTIQUE SELON UN TEST "t" DE STUDENT ENTRE LES DEUX TECHNIQUES DE DOSAGES CATIONIQUES UTILISÉES

Les valeurs entre parenthèses représentent les écarts types.

	HPLC (IPC)			Spectrophotométrie		
	Témoin	Froid (10°C)	NaCl (50 mM)	Témoin	Froid (10°C)	NaCl (50 mM)
Na ⁺	Traces	Traces	29,06 (0,33)	Traces	Traces	25,80 (2,07)
NH ₄ ⁺	Traces	1,53 (0,07)	4,89 (0,35)	Traces	1,40 (0,10)	4,54 (0,37)
K ⁺	16,98 (0,60)	8,72 (0,13)	20,53 (1,00)	17,00 (0,75)	8,75 (0,31)	21,03 (1,67)
Mg ²⁺	1,70 (0,05)	1,30 (0,05)	4,48 (0,07)	1,66 (0,05)	1,25 (0,08)	4,42 (0,19)
Ca ²⁺	2,13 (0,08)	3,82 (0,11)	10,95 (0,24)	2,05 (0,08)	3,87 (0,30)	10,52 (0,55)

Cependant la détection par IPC en UV, même si elle est plus sensible que la conductimétrie, est plus délicate à maîtriser et plus onéreuse³. En effet, le système est parfois long à se stabiliser. Aussi, plutôt que des utilisations ponctuelles, nous recommandons de travailler par grandes séries. Ceci est d'autant plus concevable que le dispositif d'analyse peut être aisément automatisé. Nous avons également remarqué que la phase employée, résine avec des ponts sulfoniques, est plus fragile que les phases classiques à base de silice greffée, d'où une durée de vie de la colonne plus courte, malgré de nombreuses précautions.

CONCLUSION

La méthode que nous venons de décrire, possède les avantages requis pour se substituer aux méthodes classiques d'analyses cationiques, notamment dans le cas des échantillons de faible volume. Bien que l'analyse des sèves xylémiques au micro-analyseur à sonde électronique nécessite des volumes d'échantillons très faibles (de l'ordre du nl) et se prête également à des analyses en série, la préparation est trop complexe et trop longue pour envisager son application dans le cas d'analyses de routine. De plus, les récents travaux que nous avons effectués dans notre laboratoire sur l'analyse par HPLC des anions et des acides organiques des sèves xylémiques (résultats non publiés), ainsi que nos précédents travaux sur l'analyse des acides aminés²⁴, nous permettent maintenant de réaliser des bilans ioniques complets avec une prise d'essai minimale. D'autre part, ces techniques ne se limitent pas aux sèves, mais leur emploi peut-être envisagé dans d'autres domaines (analyse des eaux, de liquides biologiques entre autres).

RÉSUMÉ

Nous décrivons une méthode pour l'analyse simultanée par chromatographie liquide haute performance des cations majeurs des sèves xylémiques. Pour réduire le temps d'analyse et améliorer la séparation entre les pics, nous avons déterminé le flux et la concentration en Ce^{3+} dans la phase mobile en utilisant les grandeurs fondamentales: k' , α et $\text{PW}_{1/2}$. Nous avons testé ces nouvelles conditions dans le cas de l'analyse des sèves xylémiques. La reproductibilité de cette méthode a été vérifiée. La comparaison avec les méthodes classiques de spectrophotométrie de flamme ne donne aucune différence significative. Les avantages et les applications possibles de cette technique sont discutés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. Small, T. S. Stevens et W. C. Bauman, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1801.
- 2 D. T. Gjerde et J. S. Fritz, *J. Chromatogr.*, 176 (1979) 199.
- 3 P. R. Haddad et A. L. Heckenberg, *J. Chromatogr.*, 252 (1982) 177.
- 4 H. Hershcovitz, C. Yarnitzky et G. Schmuckler, *J. Chromatogr.*, 252 (1982) 113.
- 5 S. H. Lee et L. R. Field, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 2647.
- 6 I. S. Krull, dans M. Bernhard, F. E. Brinckman et P. J. Sadler (Editors), *The importance of Chemical "Speciation" in Environmental Processes*, Springer-Verlag, Berlin, 1986, p. 579.
- 7 K. Harrison, W. C. Beckham Jr., T. Yates et C. D. Carr, *Am. Lab. (Fairfield, Conn.)*, 17 (5) (1985) 114-121.
- 8 H. Small et T. E. Miller Jr., *Anal. Chem.*, 54 (1982) 462.

- 9 R. C. L. Foley et P. R. Haddad, *J. Chromatogr.*, 366 (1986) 13.
- 10 D. R. Jenke, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 2468.
- 11 D. R. Jenke, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 2674.
- 12 Z. Iskandarani et T. E. Miller, Jr., *Anal. Chem.*, 57 (1985) 1591.
- 13 A. Laurent et R. Bourdon, *Ann. Pharm. Fr.*, 36 (1978) 453.
- 14 J. H. Sherman et N. D. Danielson, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 490.
- 15 H. Shintani, *J. Chromatogr.*, 341 (1985) 53.
- 16 K. Hayakawa, R. Ebina, M. Matsumoto et M. Miyazaki, *Bunseki Kagaku*, 33 (1984) 390.
- 17 G. E. Wilcox, C. A. Mitchell et J. E. Hoff, *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 102 (1977) 192.
- 18 M. J. Armstrong et E. A. Kirkby, *Plant Physiol.*, 63 (1979) 1143.
- 19 A. E. S. Macklon et A. Sim, *Physiol. Plant.*, 49 (1980) 449.
- 20 M. C. White, A. M. Decker et R. L. Chaney, *Plant Physiol.*, 67 (1981) 292.
- 21 N. Roinel, *J. Microsc.*, 123 (1981) 311.
- 22 S. Gartner, L. Lefaucheur, N. Roinel et N. Paris-Pireyre, *Scanning Electron Microscopy*, IV (1984) 1739.
- 23 S. Gartner, *Diplôme de Doctorat*, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 1985.
- 24 P. Brunet, B. Sarrobert et N. Paris-Pireyre, *J. Chromatogr.*, 455 (1988) 173.
- 25 L. Solarzano, *Limnol. Oceanogr.*, 15 (1969) 799.
- 26 F. Lakhdari, *Diplôme de Doctorat*, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 1986.
- 27 P. Dagnelie, *Théorie et Méthodes Statistiques: Applications Agronomiques*, Les Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, 1986.