

# DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS, DE 61 ACIDES AMINÉS ET COMPOSÉS APPARENTÉS

G. BONNOT et B. DELOBEL

avec la collaboration technique de Josette GUILLAUD

*Laboratoire de Biologie, I. N. S. A., 69 - Villeurbanne*

---

## RÉSUMÉ

L'identification et le dosage des acides aminés contenus dans l'hémolymphe des insectes, et séparés par chromatographie d'échange d'ions, grâce à un analyseur automatique, implique l'étude des caractéristiques chromatographiques ( $R_f$ ) de nombreuses substances, ainsi que de leurs aptitudes chromatiques ( $W_R$ ,  $F$ ) après réaction à la ninhydrine.

Pour chaque acide aminé, les valeurs des trois paramètres considérés ( $R_f$ ,  $W_R$ ,  $F$ ) ont été calculées après plusieurs chromatographies et exprimées par leur moyenne et l'intervalle de confiance (tabl. 1).

Les grandeurs  $R_f$  et  $W_R$  permettent dans la grande majorité des cas d'identifier un pic. La valeur de  $F$  permet alors de doser l'acide aminé.

La possibilité de déceler un pic double et de doser ses constituants est discutée.

---

## INTRODUCTION

La chromatographie des acides aminés présents dans l'hémolymphe d'insecte pose différents problèmes : choix de la technique chromatographique permettant la meilleure résolution des nombreux pics obtenus, identification de ces pics et dosage des composés ainsi identifiés.

Différents auteurs (SPACKMAN, STEIN et MOORE, 1958 ; PIEZ et MORRIS, 1960 ; ZACHARIUS et TALLEY, 1962 ; HAMILTON, 1963) ont établi des critères d'identification des pics obtenus par chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions, de composés révélables à la ninhydrine. Mais ces critères ne sont valables que dans des conditions expérimentales strictement définies, en ce qui concerne d'une part les facteurs chromatographiques (nature de la résine, mode et température d'élution, composition des tampons, etc.) et d'autre part les facteurs analytiques (composi-

tion et pouvoir réducteur du réactif à la ninhydrine, durée et température de réaction, géométrie du système analytique et son incidence sur l'amortissement des pics, etc.). Or ces conditions ne correspondent jamais exactement à celles qui nous sont imposées par la complexité du milieu biologique étudié, compte tenu de l'appareillage dont nous disposons.

Nos premiers essais de chromatographie d'hémolymphe d'insecte ont été réalisés avec l'appareillage et la technique décrits par ROBIN et coll. (1967). Nous avons été amenés ultérieurement à modifier les conditions de température de la résine au cours de l'élution.

La chromatographie des étalons substances nous a permis de caractériser le comportement de ces substances dans des conditions expérimentales maintenues constantes.

Outre l'exploitation de nos chromatogrammes, les valeurs obtenues doivent permettre, d'une part, de juger de l'aptitude de la technique que nous avons utilisée, à résoudre d'autres problèmes de séparation, et d'autre part, d'identifier et de doser les composés chromatographiés dans les conditions définies dans ce travail.

## I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Appareillage

#### a) Colonne.

L'appareil de base est un analyseur d'acides aminés Technicon identique à celui utilisé par ROBIN *et al* (1967) ; il est équipé d'une colonne de 140 cm de long pour 3 mm de calibre interne, garnie de résine Chromobeads-Technicon type B.

#### b) Température de la colonne.

Il nous est apparu qu'une bonne séparation de la plupart des acides aminés sortant entre méthionine sulfoxyde et proline est obtenue en maintenant la colonne à 37°C pendant 30 mn, puis à 45°C pendant 90 mn et enfin à 60°C jusqu'à la fin du chromatogramme. De plus, la reproductibilité des temps de sortie relatifs des acides aminés étant très étroitement dépendante de la durée des paliers thermiques, nous avons équipé notre appareil d'un dispositif automatique contrôlant l'évolution de la température de la colonne.

#### c) Dispositif d'élution.

La pompe haute pression est réglée pour un débit de 9 ml/heure, ce qui entraîne une pression en haut de colonne comprise entre 300 et 500 psi selon la température. Cette pompe est alimentée par les réactifs d'élution provenant d'un autograd.

#### d) Circuit analytique.

La totalité de l'effluent de la colonne est envoyée dans le circuit analytique. Ce flux de tampon de 0,15 ml/mn arrive latéralement dans une canalisation où circule déjà une solution de ninhydrine (0,32 ml/mn) segmentée par de l'azote (0,23 ml/mn) débarrassé de ses traces d'ammoniac et d'oxygène par passage dans deux pièges contenant respectivement acide sulfurique concentré et pyrogallol.

De tels débits, dans le circuit classique de révélation des acides aminés de l'Autoanalyseur Technicon, conduisent à une durée totale du parcours de 25 minutes dont 14 de chauffage à 95 °C

## 2. Réactifs

### a) Tampons d'éluotion.

L'éluotion est réalisée avec deux tampons citrates selon EFRON (1965).

— pH 2,875-0,05 M en citrate ;

— pH 4,740-0,267 M.

Ces tampons sont ajustés à leur pH respectif avec de l'acide chlorhydrique 6 N. Cette titration et toutes les opérations ultérieures sont faites à l'abri de l'air ambiant, dont la teneur en ammoniac est parfois élevée dans notre laboratoire. Cela est rendu possible par l'utilisation combinée du vide et de surpression ou de courants d'azote.

### b) Réactif à la ninhydrine.

La solution de travail est préparée quotidiennement par dilution de 125 ml de solution mère avec 375 ml de methyl cellosolve à 50 p. 100. Cette dilution est réalisée à l'abri de l'air, et la solution est maintenue sous atmosphère d'azote.

La solution mère est composée de 10 g de ninhydrine, 0,75 g d'hydrindantine (préparée par réduction de ninhydrine par l'acide ascorbique) dissous dans 325 ml de methyl cellosolve, fraîchement distillée et exempte de peroxydes. On ajoute alors 175 ml de tampon acétate 4 M à pH 5,51. Toutes ces opérations sont effectuées sous azote pour prévenir l'oxydation de l'hydrindantine.

## 3. Fonctionnement

Avant chaque chromatogramme, la colonne est régénérée par circulation pendant 30 mn de soude 0,2 N. La colonne est ensuite équilibrée en tampon pH 2,875 pendant 90 mn. Les neuf chambres de l'autograd reçoivent chacune 22 ml de tampon, à pH 2,875 pour les cinq premières, et à pH 4,740 pour les quatre dernières. Pendant le remplissage de l'autograd les tampons sont protégés des contaminations atmosphériques par un fort courant d'azote. Pendant l'éluotion la protection est assurée par une surpression d'azote. Il s'est avéré de même que la soude devait être préservée de la carbonatation par un piège de soude concentrée. Le tampon de régénération est protégé de l'ammoniac par un piège à acide sulfurique.

L'échantillon est déposé au contact de la résine à l'aide d'une seringue Hamilton. Simultanément démarrent alors l'éluotion, l'enregistrement et la programmation de température.

## 4. Préparation des échantillons

Les échantillons sont composés à partir de solutions mères contenant chacune 10 mM d'un acide aminé par litre d'acide chlorhydrique 0,1 N. Seize aliquotes (0,1 ml) de ces solutions sont mélangées pour réaliser un échantillon. On rajoute 0,4 ml de glycérine à 62,5 p. 100. Dans ces conditions, un dépôt de 100 mm<sup>3</sup> en haut de colonne correspond à 50 nM de chacun des acides aminés.

Dans tout échantillon étaient obligatoirement présents l'arginine et soit la norleucine, soit la norvaline, soit l'acide cystéique.

## II. — RÉSULTATS

### 1. Définition

Nous avons retenu deux paramètres d'identification des acides aminés : le R<sub>f</sub> et le W<sub>R</sub> caractérisant respectivement les propriétés chromatographiques et les aptitudes chromatiques de chaque acide aminé.

Le R<sub>f</sub> est le rapport du temps de sortie de l'acide aminé considéré à celui de l'arginine. Le temps de sortie d'un acide aminé est mesuré entre l'injection de l'échan-

tillon et le sommet du pic correspondant enregistré par le premier colorimètre (570 nm).

Le  $W_R$  (Wavelength ratio) est ainsi défini par HOLY (1967) :

$$W_R = \frac{H_A \ 570}{H_A \ 440} \frac{H_{NL} \ 440}{H_{NL} \ 570}$$

Dans cette relation  $H_A \ 570$  et  $H_A \ 440$  représentent les hauteurs des maxima des pics de l'acide aminé enregistrés respectivement à 570 et 440 nm.

$H_{NL} \ 570$  et  $H_{NL} \ 440$  sont les grandeurs correspondantes concernant la norleucine.

Ces hauteurs, exprimées en densité optique sont mesurées avec un abaquantique à celui décrit par TEMPÉ (1966).

Sur les mêmes chromatogrammes nous avons calculé un coefficient  $F$  permettant la conversion de l'aire d'un pic en la quantité molaire correspondante. Considérons la chromatographie simultanée d'un acide aminé  $A$  et de norleucine, déposés respectivement en quantités  $Q_A$  et  $Q_{NL}$ . Les pics correspondants ont une surface  $S_A$  et  $S_{NL}$ .

$$\text{Nous posons : } \frac{S_{NL}}{S_A} \times \frac{Q_A}{Q_{NL}} = F$$

$F$  est une constante caractéristique de l'acide aminé  $A$  qui permet de calculer sur un chromatogramme la quantité de  $A$  déposée.

$$Q_A = Q_{NL} \times F \times \frac{S_A}{S_{NL}}$$

Dans nos essais les surfaces sont calculées en multipliant la hauteur du pic par sa largeur à mi-hauteur, largeur mesurée par le nombre de points imprimés par l'enregistreur.

## 2. Valeurs expérimentales

Les grandeurs  $R_f$ ,  $W_R$  et  $F$  définies ci-dessus sont soumises à quelques variations. En conséquence nous avons estimé ces grandeurs par la moyenne et son intervalle de confiance.

Ces résultats sont consignés dans le tableau 1.

La première colonne ( $N^0$ ) indique l'ordre de sortie des acides aminés. Les troisième, sixième et neuvième colonnes ( $N$ ) indiquent le nombre d'essais ayant servi à calculer moyenne et intervalle de confiance.

Dans la figure 1 nous avons représenté les acides aminés par les intervalles de confiance de leurs  $R_f$  et  $W_R$ . Les nombres portés près de chaque rectangle se rapportent au numéro d'ordre de sortie dans le tableau 1. Cette représentation met en relief les difficultés d'identification de certains acides aminés, difficultés que nous discuterons plus bas.

TABLEAU I  
Moyennes et intervalles de confiance, calculés à partir de N essais pour les grandeurs  $R_f$ ,  $W_R$ ,  $F$  de chaque acide aminé

N°	Acide aminé Nom	Rf × 100			W <sub>R</sub>			F		
		N	Moyenne	$t \frac{S}{\sqrt{N}}$	N	Moyenne	$t \frac{S}{\sqrt{N}}$	N	Moyenne	$t \frac{S}{\sqrt{N}}$
1	Acide cystéique	30	5,01	0,41	21	1,167	0,022	24	0,980	0,091
2	Taurine	17	6,92	0,15	16	1,131	0,027	15	4,446	0,081
3	Urée	6	7,47	0,38	4	0,975	0,084	4	82,4	4,9
4	Méthionine sulfoxyde **	12	45,32	0,34	7	0,944	0,073	8	1,073	0,058
5	Hydroxyproline *	9	15,95	0,35	7	0,044	0,005	6	4,71	0,16
6	Méthionine sulfone	10	17,13	0,27	9	0,877	0,055	9	1,085	0,095
7	Acide aspartique	8	17,21	0,44	8	0,904	0,054	7	1,054	0,045
8	Thréonine	14	18,94	0,31	13	0,945	0,033	13	1,021	0,032
9	Glutamine **	5	19,3	1,0	5	0,872	0,096	5	2,48	0,46
10	Sérine	15	19,65	0,30	14	0,957	0,020	14	1,030	0,042
11	Asparagine **	3	20,16	0,58	3	0,147	0,079	4	1,800	0,014
12	Sarcosine	9	21,10	0,42	6	0,870	0,022	8	6,1	1,4
13	Homosérine	14	22,54	0,35	13	0,892	0,023	12	1,588	0,054
14	Acide glutamique	12	23,24	0,45	13	0,532	0,011	12	1,029	0,023
15	Proline *	11	26,84	0,48	11	0,042	0,002	8	0,939	0,036
16	Citrulline	14	27,71	0,58	13	0,833	0,015	12	0,990	0,017
17	β-Thiovaline **	5	30,44	1,45	5	0,520	0,035	3	17,8	2,9
18	Glycocolle	14	31,29	0,44	12	0,897	0,015	10	0,997	0,053
19	Acide α-amino adipique	8	32,32	0,72	8	0,785	0,036	8	4,226	0,068
20	Alanine	11	34,21	0,55	9	0,876	0,018	7	0,976	0,029
21	Lanthionine I	12	34,86	1,30	10	0,640	0,049	12	6,17	0,16
22	Acide α-aminoisobutyrique	15	36,63	0,52	10	0,811	0,061	7	14,2	2,2
23	Lanthionine II	13	36,86	1,20	11	0,661	0,019	13	2,879	0,059
24	Acide α-aminobutyrique	8	38,70	0,75	7	0,864	0,016	8	4,009	0,022
25	Glucosamine	7	40,35	0,98	6	0,813	0,011	7	1,047	0,023
26	Homocitrulline	11	41,21	0,66	8	0,775	0,021	9	0,979	0,035
27	Valine	8	41,66	0,52	6	0,920	0,029	5	1,032	0,030
28	Acide pipécolique	4	42,00	0,91	4	0,38	0,11	4	19,68	0,51
29	Acide α-amino pimélique	9	44,14	0,43	8	0,930	0,012	9	1,151	0,095
30	Cystine	9	44,42	0,56	8	0,465	0,014	6	1,828	0,056
31	Méthionine	13	46,20	0,33	10	0,871	0,021	7	0,919	0,042

TABLEAU I (suite)

N°	Acide aminé	Rf × 100			W <sub>R</sub>			F		
		N	Moyenne	$t \frac{S}{\sqrt{N}}$	N	Moyenne	$t \frac{S}{\sqrt{N}}$	N	Moyenne	$t \frac{S}{\sqrt{N}}$
32	Acide djenkolique	6	46,94	0,99	6	0,437	0,013	6	1,220	0,050
33	Norvaline	19	46,97	0,24	8	0,997	0,009	8	0,977	0,016
34	Cystathionine I	6	47,30	0,64	3	0,83	0,17	4	1,78	0,65
35	Cystathionine II	7	47,76	0,55	4	0,70	0,17	4	1,60	0,21
36	Isoleucine	12	49,47	0,38	11	0,998	0,013	8	1,019	0,040
37	Éthionine	9	50,03	0,47	9	0,851	0,017	9	1,053	0,034
38	Leucine	12	50,80	0,40	10	1,002	0,014	9	1,007	0,039
39	DOPA	9	51,83	0,39	7	0,301	0,031	6	3,65	0,13
40	Norleucine	23	51,94	0,25	23	1,000	0	23	1,000	0
41	Tyrosine	12	54,81	0,37	11	0,895	0,022	9	1,013	0,029
42	Acide γ-A β-Hydroxybutyrique	14	55,41	0,27	13	0,923	0,014	11	1,024	0,013
43	Phényl alanine	12	55,95	0,37	12	0,887	0,021	10	1,032	0,033
44	β-alanine	15	56,47	0,23	13	0,919	0,023	11	3,63	0,35
45	Acide β-aminoisobutyrique	14	58,57	0,23	12	0,947	0,022	13	2,89	0,30
46	Homocystine	7	59,80	0,45	7	0,660	0,018	6	1,438	0,035
47	Acide γ-aminobutyrique	14	64,55	0,21	12	0,554	0,023	13	2,273	0,056
48	Cynurénine	7	67,18	0,31	7	0,853	0,015	6	1,263	0,064
49	Ammoniac	26	70,39	0,34	19	0,871	0,018	8	2,51	0,24
50	Hydroxylysine I	10	72,86	0,20	9	0,611	0,021	8	2,10	0,22
51	Hydroxylysine II	10	73,49	0,24	9	0,726	0,024	4	1,212	0,085
52	Acide diamminobutyrique	9	76,65	0,59	7	0,587	0,013	7	0,980	0,042
53	Ornithine	9	76,97	0,34	11	0,636	0,020	10	1,252	0,064
54	Tryptophane	15	77,99	0,35	10	0,551	0,012	9	0,880	0,035
55	Lysine	11	79,90	0,22	7	0,679	0,006	6	1,054	0,037
56	Méthylhistidine	7	80,74	0,31	8	0,721	0,032	5	0,96	0,11
57	Histidine	11	83,04	0,14	8	0,709	0,012	6	4,00	0,22
58	Acide β-aminobutyrique	14	83,13	0,20	10	0,751	0,018	7	1,66	0,12
59	Carnosine	8	86,42	0,13	8	0,761	0,036	6	1,24	0,11
60	Azatriptophane	10	89,54	0,41	9	0,823	0,012	6	1,788	0,060
61	Canavanine	8	89,75	0,10	6	0,823	0,012	6	1,788	0,060
62	Arginine	40	100	0	28	0,823	0,011	33	1,032	0,028

\* F calculé à partir des aires des pics obtenus pour ces substances et la norleucine à 445 nm.

\*\* F calculé compte tenu de la présence d'impuretés dosées dans la solution standard.

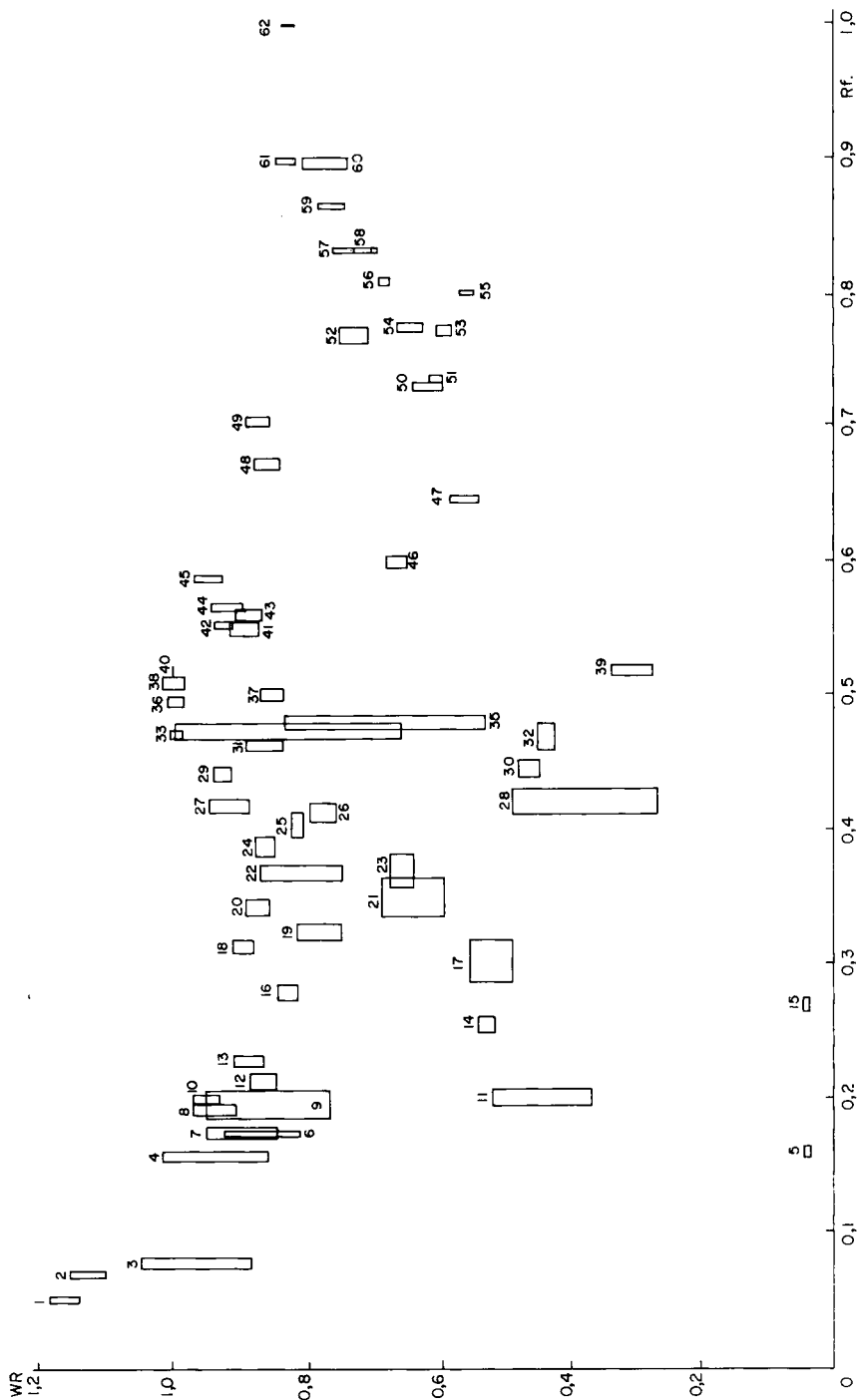


FIG. 1. — Analyse graphique des paramètres d'identification des acides aminés

Chaque acide aminé est représenté par une surface délimitée par les bornes de l'intervalle de confiance du Rf en abscisse et du W<sub>R</sub> en ordonnée. Les nombres associés aux rectangles correspondent au numéro d'ordre de sortie du tableau I.

## III. — DISCUSSION

Les trois paramètres étudiés ici ont été définis de façon relative afin de leur conférer une signification plus universelle, susceptible de les rendre utilisables sur un autre appareil que le nôtre.

Ainsi, certaines modifications du système chromatographique peuvent se produire et altérer sérieusement les temps de rétention de tous les acides aminés : hauteur et tassement du lit de résine, par exemple. Le temps de rétention le plus long, celui de l'arginine, permet d'apprécier ces perturbations aléatoires avec le maximum de rigueur. C'est pourquoi nous avons rapporté tous les temps de sortie à celui de l'arginine.

Le choix de la norleucine comme référence pour  $W_R$  et  $F$  se justifie par la très large utilisation de cet acide aminé comme témoin interne.

Les résultats obtenus amènent un certain nombre de remarques concernant tant l'identification d'un pic inconnu que le dosage d'un amino-acide identifié.

I. *Identification*

Le  $R_f$  constitue le paramètre d'identification primordial. Il peut en effet être mesuré de façon précise même sur de très petits pics. Néanmoins la validité de ce critère dépend très étroitement des conditions chromatographiques et en particulier des pH et force ionique des tampons, des conditions thermiques de l'élution et du pH de l'échantillon. En dépit des précautions prises pour contrôler ces différents facteurs, lanthionine et  $\beta$ -thiolvaline, parmi les substances étudiées, présentent d'importantes variations de  $R_f$ . Ces variations demeurent inexplicées.

Pour certains pics, le  $R_f$  seul ne permet pas l'identification ; ainsi par exemple les couples valine et homocitrulline, norvaline et acide djenkolique ou DOPA et norleucine ne sont pas séparés. L'examen du  $W_R$ , dans ces cas, permet d'établir d'une part l'unicité ou la duplicité du pic et d'autre part, dans l'hypothèse de la duplicité du pic, d'évaluer la contribution respective de chaque composant. En effet, considérons deux acides aminés A et B confondus en un pic de hauteurs  $H_{570}$  et  $H_{440}$ . On peut alors déterminer la contribution  $H_{A_{570}}$  et  $H_{B_{570}}$  de chacun de ces acides aminés à  $H_{570}$  et celle  $H_{A_{440}}$  et  $H_{B_{440}}$  à  $H_{440}$ . Le  $W_R$  calculé pour le pic étant  $\omega_r$ , on peut montrer que :

$$H_{A_{570}} = H_{570} \times \frac{W_{RA}}{\omega_r} \times \frac{W_{RB} - \omega_r}{W_{RB} - W_{RA}}$$

Lorsque deux pics sont rigoureusement superposés, leurs surfaces respectives peuvent être calculées à partir des hauteurs ainsi évaluées. L'application de ce procédé à des chromatogrammes de standards présentant deux pics superposés nous a permis le calcul, à 10 p. 100 près, des quantités de chacun des constituants.

Ce calcul, également applicable dans le cas de deux pics non entièrement résolus, permet de tenir compte des contributions réciproques de ces pics l'un à l'autre. Il faut remarquer que, dans le cas du couple norleucine/DOPA, le calcul ci-dessus



ne peut être fait directement, le  $W_R$  étant défini par rapport au pic de norleucine. En présence de DOPA, présence signalée par une élévation anormale de tous les  $W_R$ , il y aura lieu de se référer à un autre pic dont l'identification ne fait pas de doute.

Par ailleurs, certains pics composites peuvent apparaître, dont l'interprétation sera malaisée. C'est ce qui se produira en particulier en la présence simultanée dans l'échantillon de thréonine, glutamine, sérine et asparagine. En ce qui concerne nos propres travaux, ce problème n'est jamais soulevé, tous nos échantillons étant soumis à une hydrolyse préalable. Par contre, histidine et acide  $\beta$ -amino-butérique, qui ont même  $R_f$  et même  $W_R$  ne peuvent être distingués par cette méthode.

Le  $W_R$  est donc en général d'un grand intérêt ; cependant sa mesure précise exige des conditions particulières. Notamment la concentration de l'acide aminé doit être suffisante pour permettre une mesure correcte du pic à 440 nm. Par ailleurs, il est nécessaire de prendre des précautions draconiennes pour abaisser autant que possible le plateau d'ammoniac, lequel présente trois effets néfastes : baisse de la hauteur réelle des pics, dissymétrie de la base des pics et limitation de l'intervalle d'application de la loi de Beer. De plus, on peut constater sur la figure 1 que les acides aminés élués en milieu très acide sont sujets à de fortes variations de  $W_R$ , ce qui suggère que le pouvoir tampon du réactif à la ninhydrine n'est pas toujours suffisant.

Enfin les acides aminés peu colorables, ayant des  $F$  élevés, ont leur  $W_R$  mesurés avec moins de précision. Il en est de même pour les cystathionines dont les pics jumeaux ne sont que très imparfaitement résolus.

## 2. Dosage

Le  $F$ , contrairement aux  $R_f$  et  $W_R$ , dépend de l'exactitude des quantités chromatographiées. En effet, dans le calcul de  $F$  intervient le rapport de la quantité de l'acide aminé à celle de la norleucine. Ce paramètre est donc soumis aux erreurs de pesée et surtout de pipetage lors de la préparation de l'échantillon. Moyenne et intervalle de confiance ayant été calculés à partir de solutions échantillons différentes, réalisées par des pipetages multiples, les erreurs commises au cours de cette opération contribuent pour une part importante à l'élargissement des intervalles de confiance. On peut évaluer à 1 p. 100 l'erreur sur chaque pipetage, soit une erreur de 2 p. 100 sur la valeur de  $F$  définie à partir de deux pipetages. La chromatographie répétée d'un même mélange d'acides aminés aurait certes fourni une variance sur  $F$  plus réduite, mais, sans doute, une moyenne ayant moins de chance d'être centrée sur la valeur réelle de  $F$ . De même, il existe une incertitude liée à la pureté des produits chromatographiés. Certains d'entre eux contiennent d'autres acides aminés que nous avons dosés. C'est le cas de la  $\beta$ -thiolvaline, contenant de la cystathionine, de la méthionine sulfoxyde contenant de la méthionine, de la glutamine libérant de l'acide glutamique, et de l'asparagine libérant de l'acide aspartique. Dans tous ces cas, nous avons pu rectifier la valeur  $F$ . Cependant, il n'est pas exclu que d'autres contaminants puissent entacher d'erreur certains résultats. Cela peut expliquer des divergences importantes avec les résultats de SPACKMAN, STEIN et MOORE (1958) au niveau de deux substances particulières : urée et sarcosine bien que, par ailleurs, la concordance soit effective.

Enfin, il demeure une incertitude quant aux  $F$  des lanthionines, cystathionines

et hydroxylysines. Chacune de ces substances donne en effet deux pics sur les chromatogrammes mais on ne connaît le rapport des quantités respectives de chacun des isomères ni dans les témoins ni dans la nature. Ainsi une cystathionine d'origine naturelle ne nous a donné qu'un seul pic assimilable à la cystathionine II. Par contre, la méthionine sulfoxyde dont nous avons relevé la présence dans des milieux naturels apparaîtrait sous forme de deux pics, alors que notre produit étalon n'en donne qu'un. Le double pic de méthionine sulfoxyde a d'ailleurs été obtenu par HAMILTON (1963).

Ce travail nous a permis de doser la plupart des acides aminés de l'hémolymphe de deux insectes : *Galleria mellonella* et *Thaumetopoea pityocampa*. Cependant il existe dans ces milieux quelques substances ne correspondant pas aux étalons étudiés dans ce travail et dont la nature n'a pu encore être définie avec certitude. Ces analyses d'hémolymphe serviront de base à l'étude de la nutrition azotée d'un parasite entomophage de la Processionnaire du Pin (BONNOT et DELOBEL, 1970), parasite que nous avons réussi à élever au laboratoire sur un hôte de remplacement : *G. mellonella* (DELOBEL et LAVIOLETTE, 1969 ; DELOBEL, 1970).

Reçu pour publication en avril 1970.

## SUMMARY

### DETERMINATION OF IDENTIFICATION AND MEASUREMENT PARAMETERS FOR 6I NINHYDRINE-REACTIVE SUBSTANCES BY ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

The identification and measurement of insect hæmolymp aminoacids by ion exchange chromatography on an auto-analyser calls for the study of the chromatographic and chromatic characteristics of some ninhydrine-reactive substances.

The R<sub>f</sub> and wavelength ratio (W<sub>R</sub>) of the 6I substances were calculated (table 1) so as to allow the identification of peaks. The values of the F-coefficient of proportionality between the peaks and the amounts of aminoacids are tabularized in col. 3 (table 1). The reliance intervals of R<sub>f</sub>, W<sub>R</sub> and F values were calculated.

Quantitative interpretation of unresolved peaks is tentatively discussed.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BONNOT G., DELOBEL B., 1970. Étude sur la nutrition de *Phryxe caudata*, tachinaire parasite de *Thaumetopoea pityocampa*. I. comparaison des amines acidémiques de deux hôtes possibles *T. pityocampa* et *G. mellonella* à différents stades physiologiques. Ann. Zool. Ecol. an<sup>1</sup> m. (sous presse).
- DELOBEL B., 1970. *Galleria mellonella*, hôte de remplacement pour *Phryxe caudata* ROND Larvaevoridae parasite de *Thaumetopoea pityocampa*. Ann. Zool. Ecol. anim. (sous presse).
- DELOBEL B., LAVIOLETTE P., 1969. Élevage de *Phryxe caudata* ROND (Larvavoridae) parasite de *Thaumetopoea pityocampa* SCHIFF. sur un hôte de remplacement *Galleria mellonella*. C. R. Acad. Sci., D, Fr., **268**, 2436-2438.
- EFRON M. L., 1965. Quantitative estimation of Aminoacids in physiological fluids using a Technicon Analyser 637, in : *Automation in analytical chemistry, Technicon symposium*, New York.
- HAMILTON P. B., 1963. Ion exchange chromatography of Amino Acids. A single column high resolving, fully automated procedure. *Anal. Chem.*, **35**, 2055-2064.
- HOLY H. W., 1967. Chart of amino acids : position and characteristics. 159-162 in : *5th colloquium in aminoacids analysis, Technicon Monograph 2*. Domont, France.

- PIEZ K. A., MORRIS L., 1960. A modified procedure for the Automatic Analysis of Amino Acids. *Anal. Biochem.*, **1**, 187-201.
- ROBIN P., ROBIN D., JACQUOT R., 1967. Submicro-détermination des amino acides. 1-7, in : *Colloque sur la chromatographie*, Technicon, Paris.
- SPACKMAN D. H., STEIN W. H., MOORE S., 1958. Automatic Recording apparatus for use in the Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.*, **32**, 1190-1206.
- TEMPE J., 1966. Analyse des acides aminés par chromatographie. I. Considérations générales sur l'intégration des pics. Une méthode rapide d'intégration manuelle. *J. Chromatog.*, **24**, 169-174.
- ZACHARIUS R. M., TALLEY E. A., 1926. Elution behavior of naturally occurring ninhydrin-positive compounds during ion exchange chromatography. *Anal. Chem.*, **34**, 1551-1556.
-