

Utilisation de la dialyse et de la chromatographie ultra-rapide pour le dosage de l'acide abscissique: Application à la vigne

par

M. BROQUEDIS

Use of dialysis and high pressure liquid chromatography for determination of abscisic acid: Application to grapevine

S u m m a r y : A method for ABA extraction using dialysis together with high pressure liquid chromatography (with a short reverse phase column, C_{18} — $3 \mu m$) obviously improves the conditions of ABA and ABA-GE analysis in different organs of vine. The most obvious improvement is the reduction of chromatographic run time to 3 min without any loss of efficiency. Besides saving time, reproducibility of results shows that the proposed method is really suitable for routine analysis.

K e y w o r d s : abscisic acid, extraction, analysis, berry.

Introduction

Une analyse quantitative correcte de l'acide abscissique (ABA) et de ses différents métabolites ne peut être réalisée avec la même méthode. Le protocole que nous avons mis au point pour la détermination de l'ABA et de son ester de glucose (ABA-GE) a été décrit dans un travail précédent (BROQUEDIS 1983). Ce protocole dérive des méthodes de MILBORROW (1967) et de DURING (1977) pour l'ABA libre, et de celles de MILBORROW (1970) et de BULARD *et al.* (1974), pour l'ABA lié. Il s'agit d'une méthode fiable mais longue. Nous avons cherché à l'améliorer en éliminant certaines manipulations de façon à réduire au maximum les pertes éventuelles et en utilisant une colonne courte pour diminuer le temps nécessaire aux analyses chromatographiques.

Extraction de l'ABA et de l'ABA-GE

Le broyage des échantillons lyophilisés (en présence de méthanol à 80 %), la filtration de la solution obtenue et l'évaporation sous pression réduite de l'alcool afin qu'il ne subsiste que la phase aqueuse du filtrat, sont effectués selon le protocole déjà signalé en 1983. La totalité de l'ABA et de l'ABA-GE se trouve dans la phase aqueuse ainsi obtenue.

1. Intérêt de la dialyse

L'intérêt essentiel de cette technique, appliquée pour la première fois par LIU et TILLBERG (1983) à *Zea mays* L. et *Beta vulgaris* L., est de supprimer la première extraction à l'éther éthylique, telle qu'elle a été signalée en 1983 (Fig. 1), ainsi que les phases

d'agitation et de décantation qui sont longues et susceptibles de retenir une quantité non négligeable de l'ABA.

a) Caractéristiques du tube à dialyse utilisé

Composition : Le tube à dialyse est en cellulose; sa paroi contient des composés sulfurés (0,1 %) et un peu de glycérine nécessaire à sa conservation. Avant de l'utiliser, il est donc indispensable de le laver à l'eau distillée.

Perméabilité : Le diamètre moyen des pores de la paroi cellulosique du tube est de 24 Å. Il est donc perméable à l'eau et aux molécules de faible poids moléculaire, mais pas aux macromolécules de poids moléculaire supérieur à 6000 (protéines).

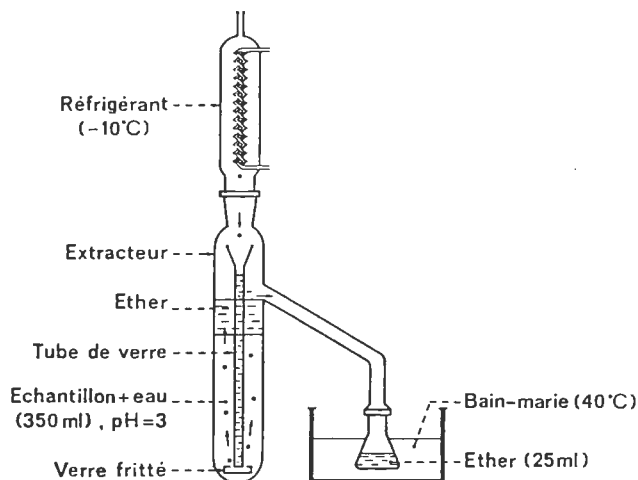


Fig. 1: Extracteur pour solvants légers utilisé pour l'extraction de l'ABA par l'éther éthylique.

Low-boiling solvent type extractor used for extraction of ABA by ether.

b) Mode opératoire

L'extrait aqueux (70 ml) recueilli après l'évaporation du méthanol est introduit dans une éprouvette à dialyse (longueur: 27 cm, diamètre: 4 cm). Son pH est ajusté à 2,5 avec une solution d'acide phosphorique (H_3PO_4 à 2,8 M). On ajoute ensuite 140 ml d'éther éthylique contenant 10 mg l^{-1} de BHT (2,6 di-t-butyl-4-méthyl phénol) (Fig. 2).

Un tube à dialyse, de 23 cm de longueur et de 2,38 cm de diamètre, contenant 30 ml d'une solution basique de phosphate dipotassique (K_2HPO_4 à 0,5 M), est plongé dans la phase étherée de façon que cette solution basique soit complètement immergée dans l'éther. L'extrémité inférieure du tube à dialyse est maintenue à 2 cm du niveau de la phase inférieure.

La dialyse s'effectue à l'abri de la lumière et sous agitation magnétique pendant 20 h. Au début, essentiellement pendant la première heure, une légère diffusion de la solution basique se produit, ce qui provoque le passage d'une petite quantité de cette solution à travers la membrane du tube à dialyse; le pH de la phase acide inférieure contenant l'extrait se trouve donc modifié. Il est alors nécessaire de réajuster le pH de cette phase à 2,7 au bout d'une heure d'extraction. A la fin de la dialyse le pH est voisin de 3,0.

Dans ces conditions, on réalise un système d'extraction à 3 phases contiguës non miscibles: la phase aqueuse inférieure, acide ($\text{pH} = 2,5$), où se trouve l'ABA et l'ABA-GE à extraire, la phase étherée, intermédiaire et la phase basique supérieure ($\text{pH} = 9,0$) contenue dans le tube à dialyse. La dialyse va donc s'effectuer entre cette phase basique et la phase étherée par l'intermédiaire de la paroi poreuse du tube à dialyse.

Au cours de l'extraction, les acides libres, solubles dans l'éther, se trouvant dans la phase aqueuse inférieure, ont la possibilité de migrer et de s'accumuler dans la phase étherée (cas de l'ABA libre), ils passent ensuite dans la phase supérieure où ils sont attirés et bloqués en raison de son pH basique.

Après la dialyse, l'extraction à l'éther de l'ABA libre contenu dans la solution basique obtenue, sa purification et son évaporation à sec sont réalisées selon le protocole décrit en 1983.

La fraction aqueuse acide, que l'on récupère quand la dialyse est terminée, ne contient plus d'ABA libre mais il reste la totalité de l'ABA-GE. Elle est alors soumise à une hydrolyse ménagée en milieu basique ($\text{pH} 11,5$), pendant 20 h à 40°C , afin de séparer l'ABA du glucose. Selon BARTHE (1983), l'hydrolyse pratiquée de cette façon donne le meilleur rendement et présente aussi l'avantage de ne pas affecter l'autre forme importante d'ABA lié, l'ABA-GS, identifiée en 1981 par LOVEYS et MILBORROW.

La solution hydrolysée, dont le pH est ajusté à 3,0, est clarifiée avec 5 g de PVP avant de subir une nouvelle dialyse pour extraire l'ABA libéré et l'extraction se poursuit alors comme précédemment pour l'ABA libre (Fig. 3).

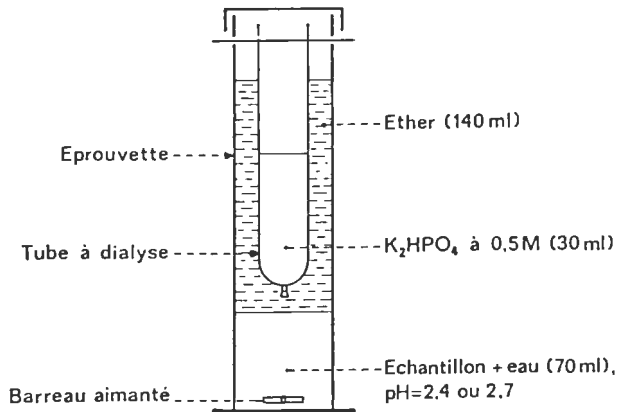


Fig. 2: Dispositif expérimental de la dialyse.

Device for dialysis.

2. Reproductibilité de la méthode et taux de récupération de l'ABA

La reproductibilité de la méthode a été étudiée sur différents organes de la vigne. Quand on réalise 10 extractions à partir d'un même échantillon homogène, la différence qui apparaît entre les deux résultats les plus divergents ne dépasse jamais 6 %.

Selon LIU et TILLBERG (1983), la concentration de la solution alcaline dipotassique a une influence sur le taux de récupération de l'ABA. Avec une solution alcaline à la con-

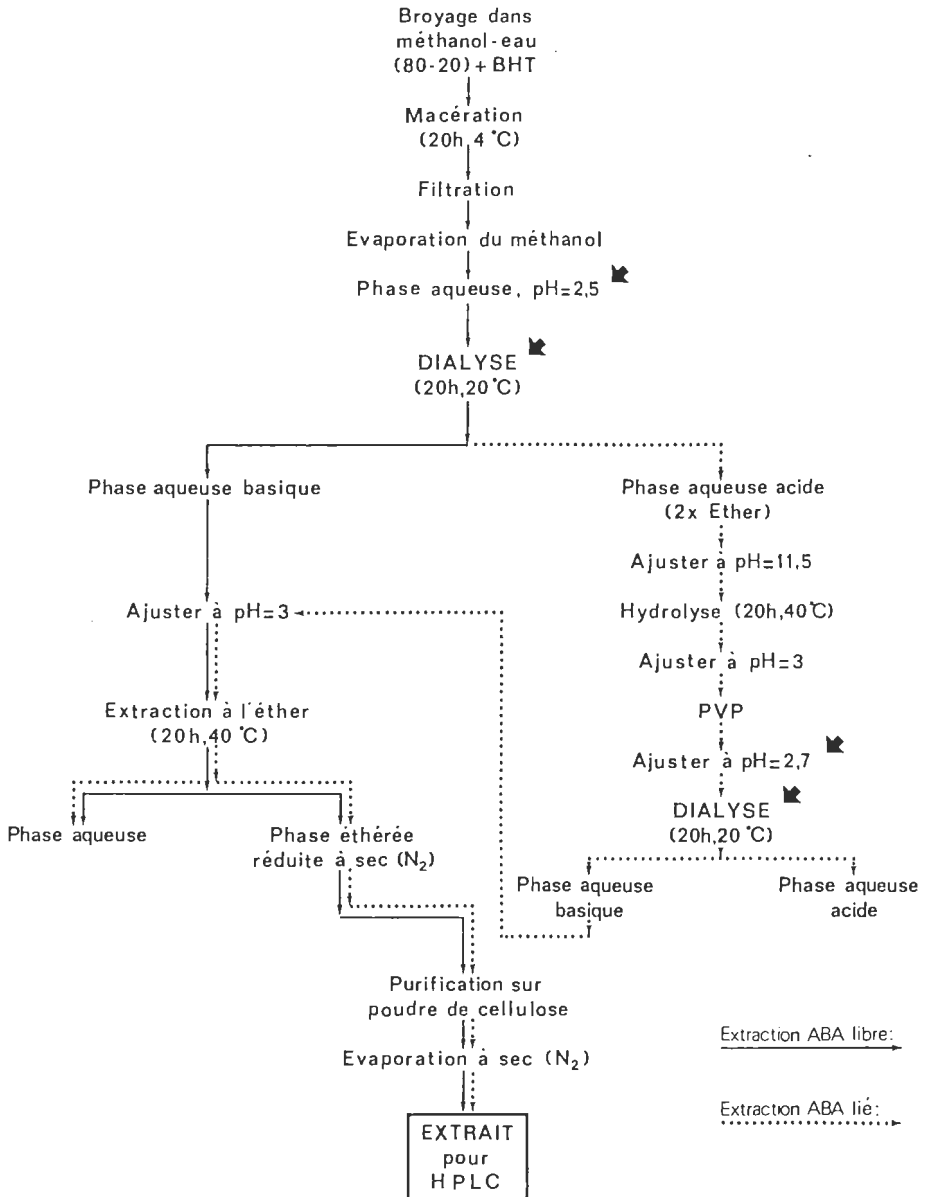


Fig. 3: Protocole d'extraction de l'ABA et de l'ABA-GE. Les flèches indiquent les modifications apportées à la méthode décrite en 1983.

Process used for ABA and ABA-GE extraction. The arrows point to the improvements of the method described in 1983.

centration de 0,005 M et en ajoutant une quantité connue de 2-¹⁴C-ABA, ces auteurs ont obtenu un taux de récupération de l'ABA incorporé supérieur à 50 % à la fin de la dialyse.

Dans nos conditions expérimentales, en utilisant une solution dipotassique à 0,5 M, on récupère environ 50 % de l'ABA après 2 h de dialyse et 78 % en fin d'extraction.

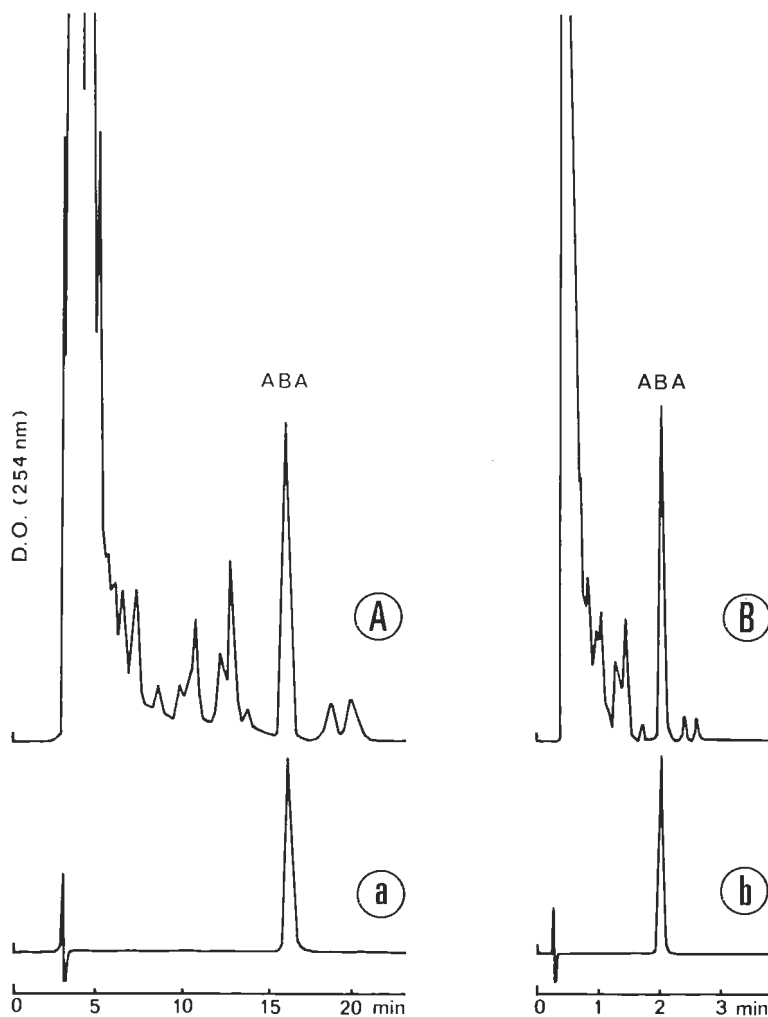


Fig. 4: Analyse chromatographique de l'extrait obtenu par dialyse d'un échantillon de pépins de Cabernet Sauvignon. — A: Chromatogramme de l'extrait, réalisé par HPLC avec une colonne classique (25 cm, C₁₈, 5 μ m). B: Chromatogramme du même extrait obtenu avec une colonne courte (3 cm, C₁₈, 3 μ m). a et b: Chromatogrammes correspondants de l'étalon externe de (+)-ABA (Fluka), à 5 μ g ml⁻¹ dans du méthanol.

HPLC analysis of an extract obtained by dialysis from Cabernet Sauvignon seeds. — A: Total chromatogram of the extract using a conventional column (25 cm, C₁₈, 5 μ m). B: The same extract analysed with a short column (3 cm, C₁₈, 3 μ m). a and b: The corresponding chromatograms of the external standard, (+)-ABA (Fluka), 5 μ g ml⁻¹ in methanol.

Dosage de l'ABA et de l'ABA-GE

Les analyses chromatographiques ont été effectuées par HPLC, avec un appareillage Spectra Physics comprenant un chromatographe SP 8100, un détecteur SP 8400 et un intégrateur-calculateur SP 4100.

1. Intérêt et performances d'une colonne courte

Une telle colonne contenant une phase inverse à haute performance permet de réduire considérablement la durée de la chromatographie, de diminuer de façon appréciable la consommation de solvant et cela sans perte d'efficacité. En outre, avec ce type de chromatographie ultra-rapide la stabilité des temps de rétention est améliorée et la pression en tête de colonne, pour un débit donné, est plus basse que pour une colonne classique, ce qui réduit le travail de la pompe à solvant. Il faut signaler enfin, que le temps nécessaire pour équilibrer ce type de colonne est court, ce qui peut faciliter l'utilisation d'un gradient d'élution.

La longueur de la colonne (3 cm) et la qualité de sa phase stationnaire (C_{18} — 3 μm), permettent de réduire le temps total de la chromatographie de plus de 20 min, par rapport à une colonne classique (25 cm). Dans nos conditions expérimentales, la durée de la chromatographie passe de 25 min à 3 min, et le temps de rétention du (+)-ABA passe de 16,10 min à 2,02 min (Fig. 4).

2. Colonnes utilisées et conditions chromatographiques

a) Colonne	courte	classique
Phase stationnaire:	Pecos sphere C_{18}	Lichrosorb RP 18
Diamètre des particules:	3 μm	5 μm
Longueur:	3 cm	25 cm
Diamètre intérieur:	4 mm	4 mm
Température:	30 °C	35 °C
b) Phase mobile		
Composition: eau	67 %	70 %
méthanol	28 %	25 %
ac. acétique	5 %	5 %
Débit:	1,5 ml · min ⁻¹	1,5 ml · min ⁻¹
c) Détecteur		
Longueur d'onde:	254 nm	254 nm
Sensibilité:	0,08 AUFS	0,02 AUFS
d) Intégrateur		
Vitesse du papier:	1 min · cm ⁻¹	4 min · cm ⁻¹
e) Injecteur		
Volume injecté:	10 μl	10 μl

3. Remarque

Pour que l'efficacité de la colonne courte soit optimale, il est indispensable que les conditions expérimentales suivantes soient réalisées: le temps de réponse du détecteur ne doit pas dépasser 0,8 s et le volume de la cellule de détection doit être le plus réduit

possible. En outre, il est nécessaire d'éliminer pratiquement tous les volumes morts qui peuvent exister dans la liaison de l'injecteur à la tête de la colonne d'une part et de la sortie de la colonne à la cellule du détecteur d'autre part (diamètre intérieur des tubulures 0,007 inch).

Dans nos conditions chromatographiques, afin d'éviter une éventuelle diminution de la sensibilité provoquée par la production d'ozone due au rayonnement UV traversant la cellule du détecteur, celle-ci était constamment maintenue sous atmosphère d'azote.

4. Seuil de sensibilité

Les résultats obtenus avec les deux colonnes, courte et classique, montrent que les seuils de sensibilité, calculés à partir d'une hauteur de pic de (+)-ABA étalon supérieure à 3 fois l'amplitude du bruit de fond du détecteur, sont voisins de 1 ng, avec un léger avantage pour la colonne courte.

Comparaison des résultats obtenus pour le dosage de l'ABA et de l'ABA-GE dans les différentes parties de la baie de raisin à maturité en utilisant une colonne courte et une colonne classique · Les valeurs mentionnées représentent, pour chaque échantillon, la moyenne de 4 extractions

Comparison between ABA and ABA-GE contents from the different parts of the mature grape berry using a short and a conventional column · The values given for each sample are averages from 4 extractions

	ABA ($\mu\text{g}/100 \text{ g MS}$)		ABA-GE ($\mu\text{g}/100 \text{ g MS}$)	
	Colonne courte	Colonne classique	Colonne courte	Colonne classique
Pellicules	56,3 \pm 1,6	54,9 \pm 1,6	21,3 \pm 0,6	20,3 \pm 0,6
Pulpes	21,1 \pm 0,7	20,2 \pm 0,7	96,5 \pm 3,3	94,2 \pm 3,3
Pépins	54,6 \pm 1,0	52,2 \pm 1,0	56,2 \pm 1,1	55,4 \pm 1,1

Application aux baies de raisin

Les deux colonnes, courte et classique, ont été utilisées pour déterminer, à partir des mêmes extraits, les teneurs en ABA et en ABA-GE des différentes parties, pellicules, pulpes et pépins, des baies de Cabernet Sauvignon. Les résultats obtenus, donnés dans le tableau montrent que, dans les conditions expérimentales décrites, l'efficacité de la colonne courte est au moins égale à celle de la colonne classique en un temps 8 fois plus court.

En définitive, les deux modifications apportées, l'extraction par la dialyse et la chromatographie ultra-rapide à l'aide d'une colonne courte à haute performance, sont donc tout à fait adaptées aux analyses de routine et permettent, en outre, un gain de temps, une bonne reproductibilité et une économie de solvants appréciables.

Résumé

Une méthode d'extraction de l'ABA faisant intervenir la dialyse et l'analyse chromatographique ultra-rapide par HPLC (utilisation d'une colonne courte avec une phase inverse C_{18} — $3 \mu\text{m}$) ont permis d'améliorer nettement les conditions du dosage de l'ABA et de l'ABA-GE dans différents organes de la vigne. La réduction à 3 min de la durée de la chromatographie, sans perte d'efficacité, constitue l'amélioration la plus spectaculaire. Outre le gain de temps, la reproductibilité des résultats obtenus montre que cette technique est tout à fait adaptée aux analyses de routine.

Références bibliographiques

- BARTHE, PH.; 1983: Acide abscissique et dormance embryonnaire chez *Pyrus malus* L. Thèse de Doctorat d'Etat, Nice.
- BROQUEDIS, M.; 1983: Evolution de l'acide abscissique lié (abscissate de β -D-glucopyranose) et de l'acide abscissique libre au cours du développement de la baie de raisin. *Connaiss. Vigne Vin* **17**, 247—257.
- BULARD, C.; BARTHE, PH.; GARELLO, G.; LE PAGE-DEGIVRY, M.-TH.; 1974: Mise en évidence d'acide abscissique lié au β -D-glucopyranose dans les embryons dormants de *Pyrus malus* L. *C. R. Acad. Sci. (Paris), Sér. D*, **278**, 2145—2148.
- DURING, H.; 1977: Analysis of abscisic acid and indole-3-acetic acid from fruits of *Vitis vinifera* L. by high pressure liquid chromatography. *Experientia* **33**, 1666—1667.
- LIU, S.; TILLBERG, E.; 1983: Three-phase extraction and partitioning with the aid of dialysis — a new method for purification of indolyl-3-acetic and abscisic acids in plant materials. *Physiol. Plant.* **57**, 441—447.
- LOVEYS, B. R.; MILBORROW, B. V.; 1981: Isolation and characterization of 1'-0-abscisic acid- β -D-glucopyranoside from vegetative tomato tissue. *Austral. J. Plant Physiol.* **8**, 571—589.
- MILBORROW, B. V.; 1967: The identification of (+)-abscisin II [(+)-Dormin] in plants and measurement of its concentrations. *Planta* **76**, 93—113.
- — ; 1970: The metabolism of abscisic acid. *J. Exp. Bot.* **21**, 17—29.

Eingegangen am 26. 5. 1986

Dr. M. BROQUEDIS
Laboratoire de Physiologie
végétale et Ampélogie
Université de Bordeaux I
Avenue des Facultés
33405 Talence cédex
France