

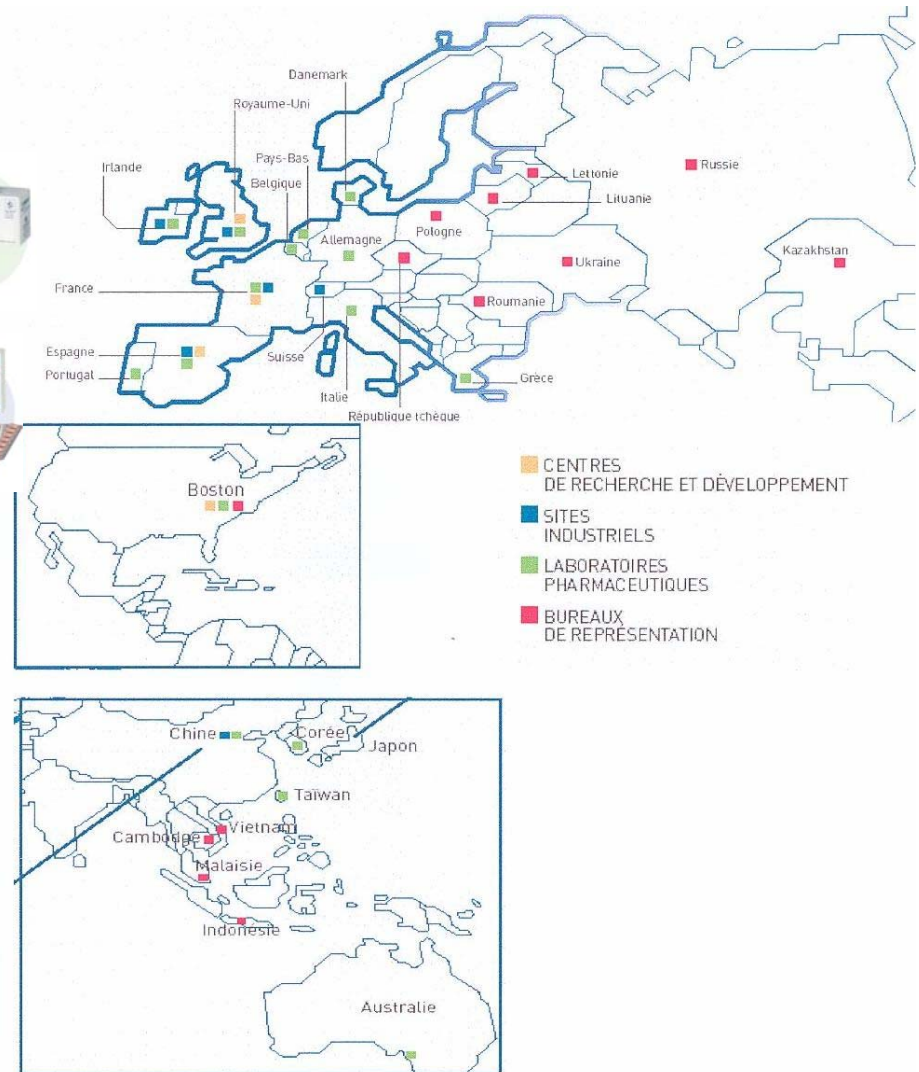
Développement d'une méthode HPTLC globale pour l'identification des acides aminés

Club CCM : Lyon 18/10/2007

Laëtitia Roy



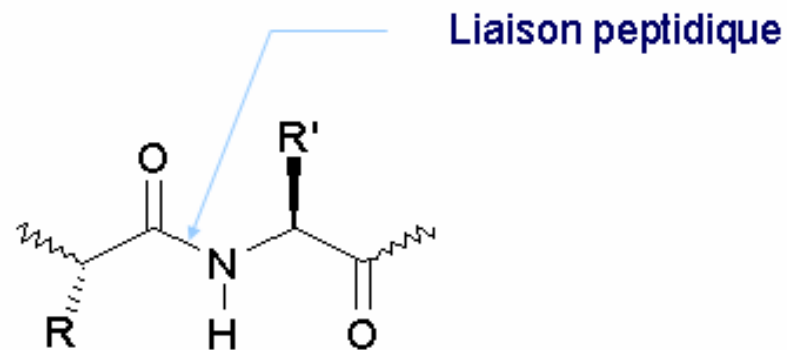
Le Groupe Ipsen



- **700 personnes R&D / 4000**
- **CA 2005 : 800,7 M€**
- **Domaines thérapeutiques ciblés:**
 - Oncologie
 - Endocrinologie
 - Désordres neuromusculaires
- **Médecine générale**

Analyse des peptides

Un peptide est une molécule formée par l'enchaînement de plusieurs acides aminés via des liaisons peptidiques (liaison amide CO-NH)



L'analyse d'un peptide permet :

-L'identification et la quantification de chaque acide aminé formant la séquence après hydrolyse du peptide (24h en milieu HCl 6N à 110°C)

-La vérification de l'absence d'acides aminés libres dans le peptide

Analyse des peptides

Name	AA
Acid amino-Butiric	Abu
Alanine	Ala
Arginine	Arg
Acid Aspartic	Asp
Acid amino-Iso-Butiric	Aib
Cysteine	Cys
Glutamine*	Gln*
Acid Glutamic	Glu
Glycine	Gly
Histidine	His
Isoleucine	Ile
Leucine	Leu
Lysine	Lys
Naphtyl Alanine	Nal
Phenylalanine	Phe
Proline	Pro
Serine	Ser
Threonine	Thr
Tryptophane	Trp
Tyrosine	Tyr
Valine	Val
D-Benzothienyl alanine	D-Bal
amino piperidiny acid	Apc
Isonipectic acid	Inp
stable hydrolyse	

Tous les acides aminés ont été testés dans cette étude

La bonne séparation des acides aminés est d'autant plus importante que peu d'acides aminés sont stables à l'hydrolyse, ceux-ci sont utilisés pour le dosage du peptide

Analyse des peptides

Etape	Méthode actuelle	Commentaires
Séchage	Four à 80°C pendant 2H30	
Hydrolyse	avec HCL sous vide à 110°C pendant 24h (Picotag)	Équipement obsolète et manip longue
Séchage	Four à 80°C pendant 1H	
Analyse	Analyseur amino-acides (Hitachi : HPLC + derivatisation Ninhydrine post colonne)	Technologie « fragile », manip longue (mise en route, stabilisation et rinçage) et coûteuse (réactifs venant du Japon, beaucoup de pannes)

Objectifs : Modifier la méthode pour :

- Diminuer le temps et augmenter la souplesse d'analyse tout en gardant les spécifications suivantes :
- Identifier tous les acides aminés et « doser » les peptides d' IPSEN après hydrolyse
- Rechercher tous les acides aminés libres dans les peptides (essais limites)

Sommaire

1. Première approche en HPTLC : 2 publications sur les acides aminés
2. Développement IPSEN : optimisation des 2 méthodes
3. Application à IPSEN : exemple d'un peptide
4. Conclusions : sur le développement et nos projets

Première approche en HPTLC

2 publications types sur les acides
aminés



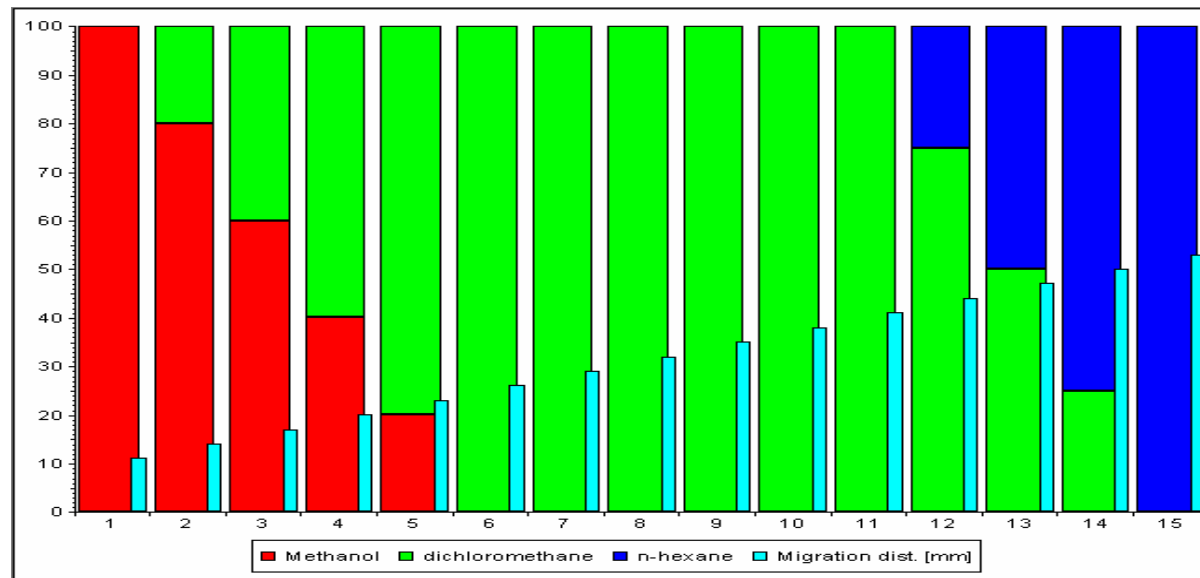
2 publications types sur les AA

Nom méthode	CAMAG	MERCK
publication concerne	Quantification de 8 AA	Identification de 20 AA
type plaque	Plaque HPTLC silice	Plaque HPTLC cellulose
dérivatisation	pré = Dansyl Chloride/acétone (2.5mg/mL)	post = Ninhydrine 0.5%/propan2ol
phase mobile	titriplex3 à pH9/But/Ether (5/10/35) → phase supérieure	2 But/AA/pyridine/eau (30/6/20/24)
Temps élution	50min	120min
Bain	Paraffine/n-Hexane (2/5)	-
détection	Fluorescence (313/400nm)	Visible (440nm)
Commentaires IPSEN	dansylation = 16H 13 AA sur 20 phase mobile exotique et fastidieuse	feuille aluminium souple et fragile 20 AA sur 20 spots larges et diffus phase mobile exotique mais rapide
Publications	« <u>Quantitative determination of amino acids in potatoes</u> Camag, Application notes »	« <u>Detection of amino acids and peptides</u> Michael Schulz/ LSA R&D (Merck) »

→ Pourquoi des phases mobiles aussi spéciales?

Etude de l'impact des solvants à travers l'AMD

Pour comprendre l'intérêt de chacun des solvants dans la composition des phases, nous avons testé l'AMD 2 avec un gradient universel :



→ Les AA restent au niveau du dépôt quelque soit les 3 groupes de solvant.

→ Interactions des solvants trop complexes pour faire migrer l'ensemble des AA avec l'AMD.

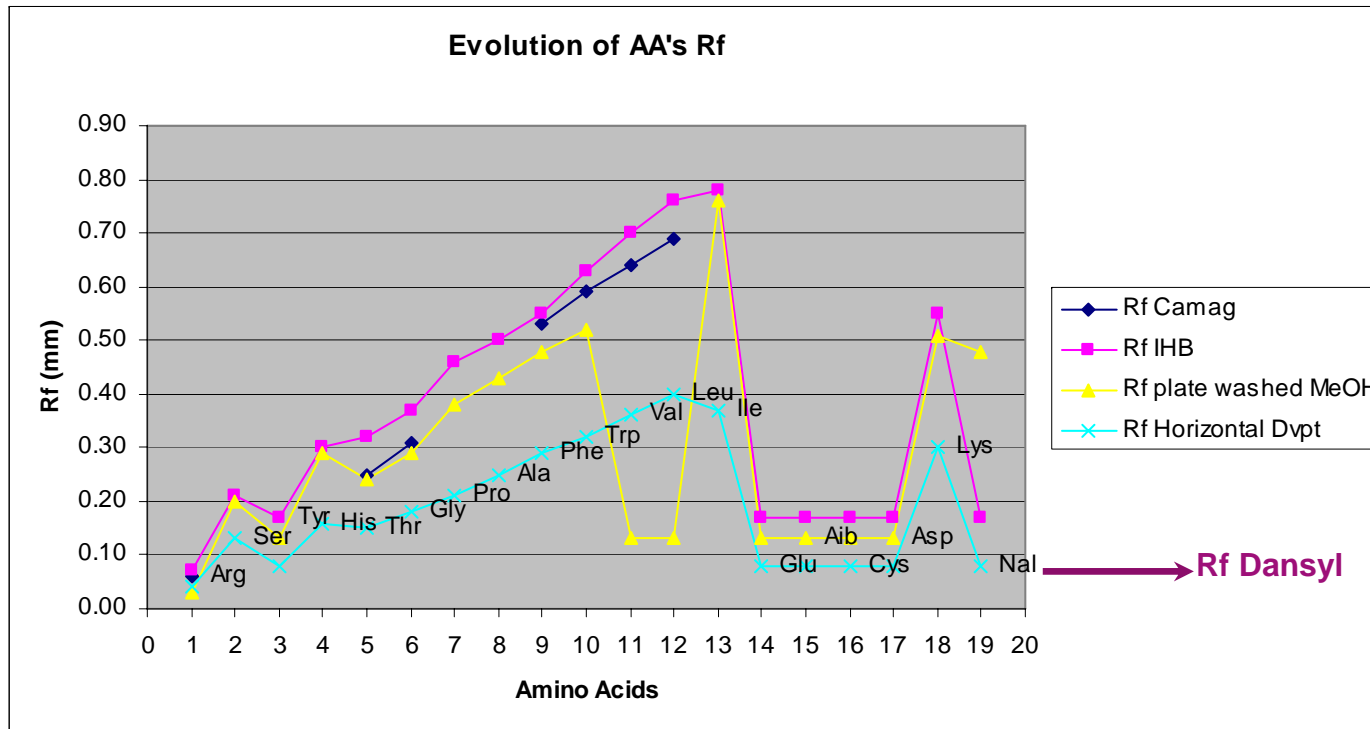
Essais d'optimisation de la méthode Camag

Etapes de développement	Essais	Méthode optimisée
	<u>Concentrations solution de Na_2CO_3 :</u>	
	1%	trop d'ajout de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \rightarrow$ solution réaction trop diluée
	10%	solution non dissoute
	5%	dépassement du pH 8
	2%	meilleure solution
	<u>Proportions de Dansyl dans la solution mélange :</u>	
	1mL de chaque solution AA dansylée	dansyl en excès / solutions d'AA
Camag's method	2mL de chaque solution AA non dansylée	dansyl en excès et solutions d'AA trop concentrées
	<u>Optimizations :</u>	
	spots	meilleure concentration : 20μL of 0.1mg/mL solutions Vitesse de dépôt : 60nL/sec
	séchage	1) sèche-cheveux après dépôt 2) sèche-cheveux après élution 3) plaque chauffante pendant 15min à 45°C après 2) 4) sèche-cheveux après paraffin/n-hexane
	élution	1) vitesse maximum d'immersion (5) 2) temps minimum d'immersion (1sec)
	augmentation du signal	avec paraffin/n-hexane (2/5) après élution
	λ	313nm, lampe Hg, Fluorescence
	<u>Lavage des plaques :</u>	
	MeOH	2 AA de + coelués avec dansyl / 20 AA
Optimisation de la séparation	MeOH à 2% acide acétique sans lavage	11 AA coelués avec dansyl ou pics inconnus / 20 AA meilleur
	<u>Elution Horizontale</u>	pics + fins mais 2 autres AA en moins
	<u>Phase Mobile :</u>	
	(eau/Butanol/Ether)pH9 (sans titriplex)	2 AA de + coelués avec dansyl / 20 AA
Optimisation de l'élution	(Titriplex/Butanol/Ether)pH4.5 (pH non ajusté)	3 Rf d'AA mal séparés / 20 AA
	(Titriplex/Butanol/Ether)pH9	meilleure : 13 AA / 20 AA


```

graph TD
    A["4.5mL solution AA (1 mg/mL)  
+et 0.5mL de dansyl chloride (1mg/mL)  
ajuster à pH 8 avec Na2CO3 at 2% ou NaOH 1N, 2N"] --> B["Chambre noire pendant 16H"]
    B --> C["Reprise de 0.5mL de cette solution dans 10mL of Acetone/Eau (7/3)"]
    C --> D["Dépôt : 20µL at 60nL/s, seringue à 50°C"]
    D --> E["Elution avec phase isocratique"]
    E --> F["Phase mobile : Titriplex 3, ajusté à pH 9 avec NaOH at 48%/ Butanol/ Ether (1/2/7) : phase supérieure  
Distance Migration : 80 mm"]
    F --> G["1) Sèche-cheveux  
2) Plaque-chauffante pendant 15min à 45°C"]
    G --> H["Plonger la plaque séchée dans paraffin/n-Hexane (2/5)"]
    H --> I["Plaque chauffante pendant 15min à 45°C"]
    I --> J["Scanner à 313nm/460nm avec lampe Hg"]
        
```

Essais d'optimisation de la méthode Camag



Publication Camag choisie pour :

- Quantification des acides aminés (comme l'analyseur)
- Détection en fluorescence (permet concentrations + faibles)
- Quantification sur 1 seul AA : Leu, d'autres AA possibles ?

Problèmes rencontrés lors de l'application au laboratoire :

- Dansyl chloride ne réagit pas avec tous nos AA
- Dansyl Chloride coélué avec certains de nos AA

Essais d'optimisation de la méthode Merck

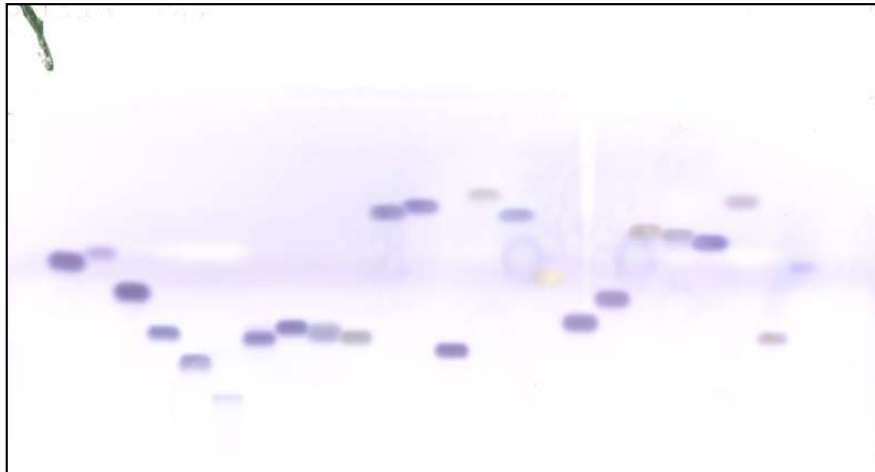
Test de plaques

MERCK	Essais IPSEN
cellulose	Diol
post = Ninhydrine/propan2ol (0.5%)	
2 Butanol/Acide Acétique/Pyridine/eau (30/6/20/24)	
Commentaires IPSEN	
feuille aluminium souple et fragile	plus pratique car plaque verre
20 AA sur 20	20 AA sur 24 (arrivée d'AA supplémentaires au laboratoire)
spots larges et diffus	spots moins larges que cellulose

Essais d'optimisation de la méthode Merck

Changement de plaque

Plaque **Cellulose** , élution verticale



Abu Ala Arg Asp Aib Cys Gln Glu Gly His Ile Leu Lys Nal Phe Pro Ser Thr Trp Tyr Val D-Bal Apc Inp

- Meilleure résolution mais manipulation difficile (plaque souple)
- Mauvaise Reproductibilité des Rf

Plaque **Diol** , élution verticale

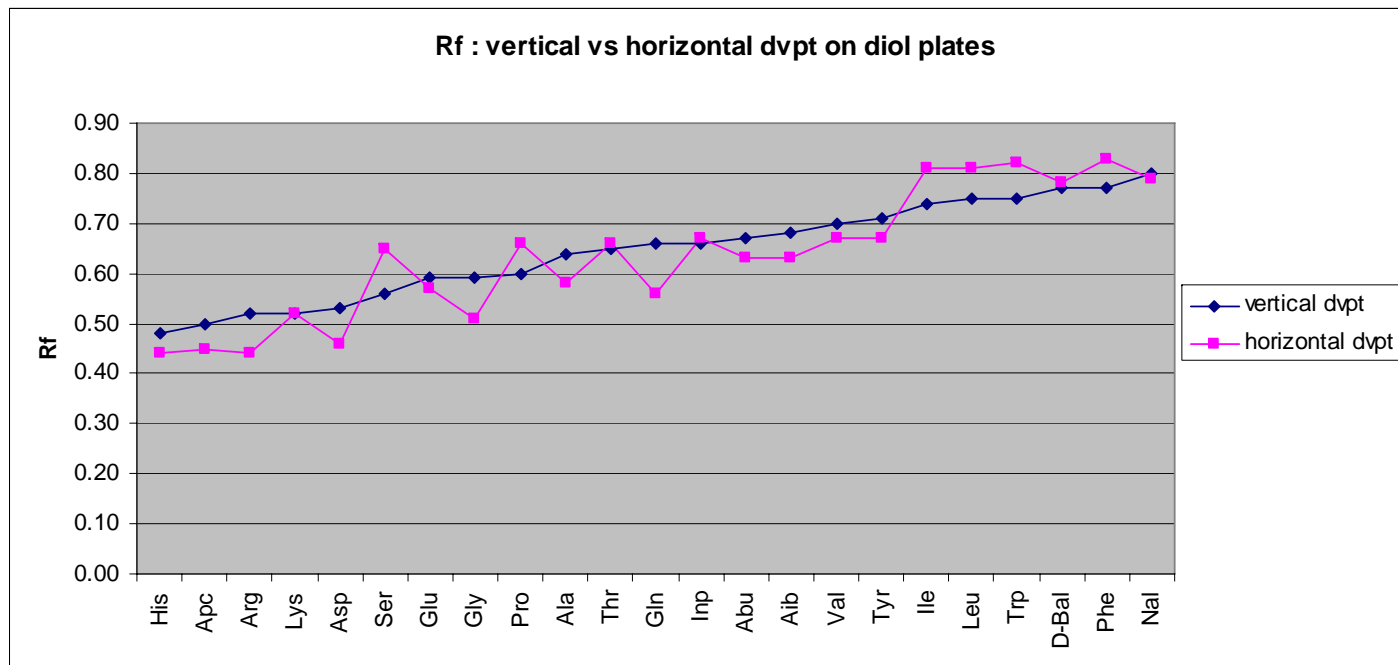


Abu Ala Arg Asp Aib Cys Gln Glu Gly His Ile Leu Lys Nal Phe Pro Ser Thr Trp Tyr Val D-Bal Apc Inp

- Résolution moins bonne mais tentative d'amélioration
- Mauvaise Reproductibilité des Rf

Essais d'optimisation de la méthode Merck

Élution verticale / élution horizontale (plaque diol)



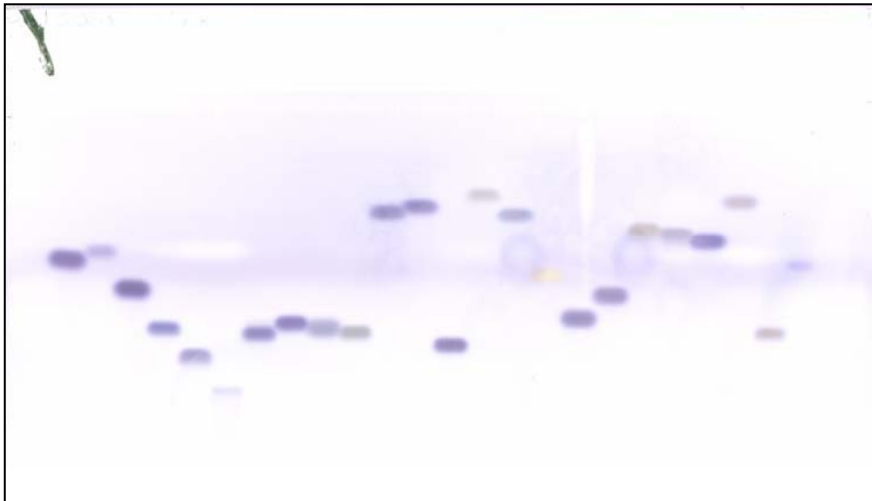
* Cys is missing

- L'élution verticale est plus sensible
- Le choix du mode d'élution dépendra des mélanges d'AA
- La résolution avec la plaque Diol est toujours moins bonne que celle avec la Cellulose

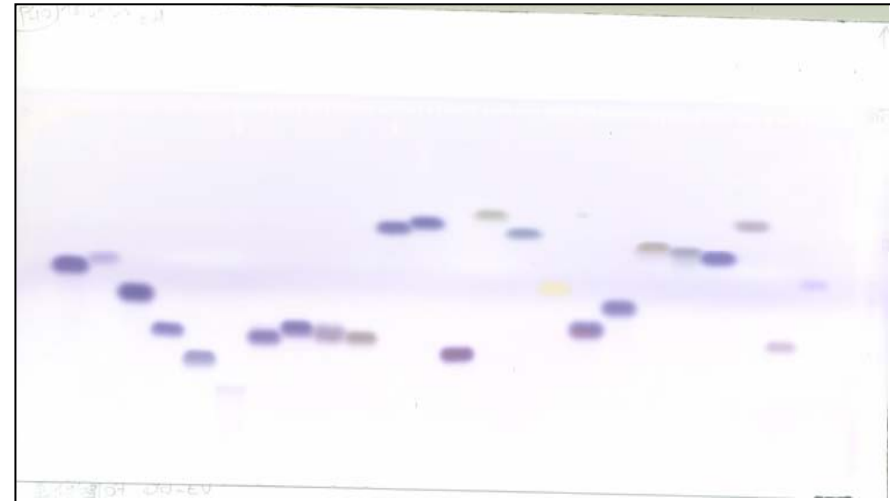
Essais d'optimisation de la méthode Merck

Essai cellulose verticale / horizontale

Plaque Cellulose, élution **verticale**



Plaque Cellulose, élution « **horizontale à l'envers** »



- Résolution identique
- Élution horizontale : élimination du problème de feuille souple par le dispositif

Bilan des essais

Methode →	CAMAG		MERCK			
Dérivatisation →	pré = Dansyl		post = Ninhydrine 0.5%/propan2ol			
Phase Mobile →	titriplex3 pH9/But/Ether		2 But/AA/pyrid./eau			
Plaque →	Silice		Cellulose		Diol	
Elution →	Verticale 1	Verticale 2	Verticale	Horizontale	Verticale	Horizontale
AA						
Abu	non testé	0.51	0.71	0.42	0.67	0.63
Ala	0.50	coélution	0.68	0.47	0.64	0.58
Arg	non testé	0.42	0.63	0.37	0.52	0.44
Asp	non testé	0.05	0.59	0.28	0.53	0.46
Aib	non testé	pas dansylé	0.52	0.19	0.68	0.63
Cys	non testé	coélution	aucun pic	0.11 (très petit)	aucun pic	aucun pic
Gln*	non testé	0.10	0.62	0.25	0.66	0.56
Glu	non testé	0.17	0.59	0.27	0.59	0.57
Gly	0.37	0.32 (mal séparé)	0.57	0.25	0.59	0.51
His	0.30	0.04	0.43	0.27	0.48	0.44
Ile	0.78	0.65	0.73	0.59	0.74	0.81
Leu	0.76	0.62	0.74	0.60	0.75	0.81
Lys	0.55	0.04	0.49	0.22	0.52	0.52
Nal	coélution	coélution	0.77	0.64	0.80	0.79
Phe	0.55	0.49	0.74	0.59	0.77	0.83
Pro	0.46	0.38	0.60	0.39	0.60	0.66
Ser	0.21	0.22	0.62	0.28	0.56	0.65
Thr	0.32	pas dansylé	0.64	0.36	0.65	0.66
Trp	0.63	0.54	0.75	0.53	0.75	0.82
Tyr	coélution	coélution	0.70	0.52	0.71	0.67
Val	0.70	0.58	0.70	0.53	0.70	0.67
Apc	non testé	0.28	0.78	0.63	0.50	0.45
D-Bal	non testé	coélution	0.46	0.27	0.77	0.78
Inp	non testé	pas dansylé	0.64	0.47	0.66	0.67
Commentaires	Méthode longue et difficile (dansylation, phase mobile...) Détection fluorescence (+ sensible que Ninhydrine) Devrait fonctionner après hydrolyse (Nouvelle publi) : "Quantitative HPTLC analysis of dansyl AA Bimal Das & Shubhangi Sawant, 1993" Reproductibilité à revoir		Méthode + rapide Résolution meilleure / Dansyl Cellulose "horizontale à l'envers" meilleure que Diol Reproductibilité à revoir			
Conclusion	<ul style="list-style-type: none"> dépend de la composition du peptide à analyser dépend de la sensibilité nécessaire (AA liés ou recherche AA libres) 					

Application IPSEN

Exemple d'un peptide



Application IPSEN : choix de la méthode

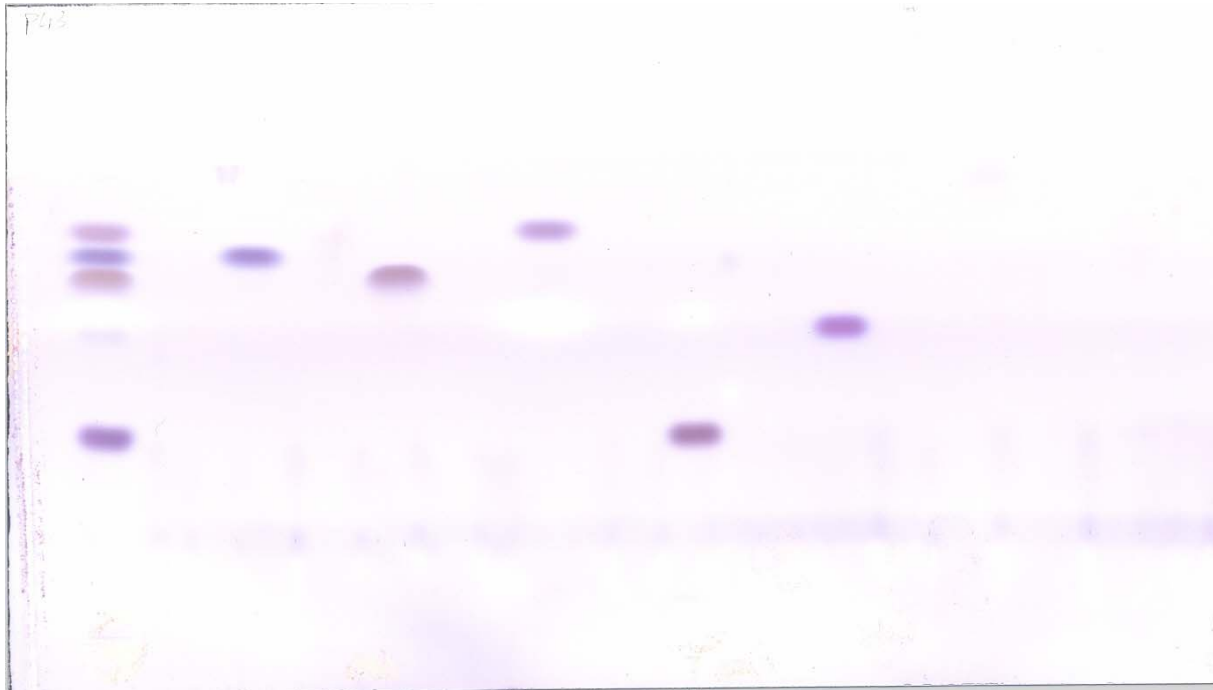
Méthode →	CAMAG	MERCK			
Plaque →	Silice	Cellulose		Diol	
Elution →	Verticale 2	Verticale	Horizontale	Verticale	Horizontale
AA					
Phe	0.49	0.74	0.59	0.77	0.83
Trp	0.54	0.75	0.53	0.75	0.82
Apc	0.28	0.78	0.63	0.50	0.45
D-Bal	coélution Dansyl	0.46	0.27	0.77	0.78
Inp	pas dansylé	0.64	0.47	0.66	0.67

— Coélution

On va tester les AA seuls et le peptide hydrolysé sur :

- Camag, élution verticale, pour envisager la recherche d'AA libres
- Merck, cellulose, élution horizontale à l'envers, pour envisager la recherche d'AA libres, et pourquoi pas le peptide hydrolysé ?

Application IPSEN : méthode Merck Cellulose, élution horizontale à l'envers

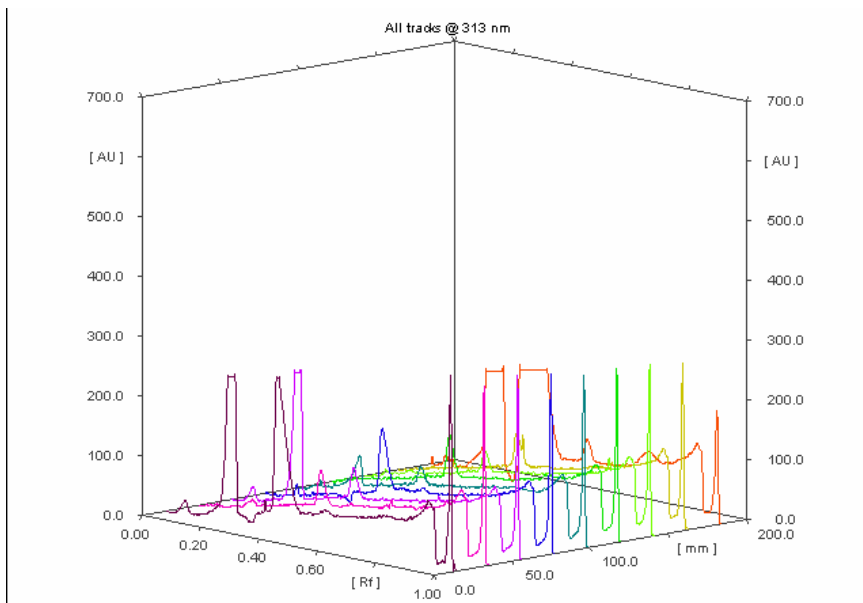


Mélange Spots Phe Trp D-Bal Apc Inp BIM6 BIM6
(non hydrolysé) (hydro/eau)

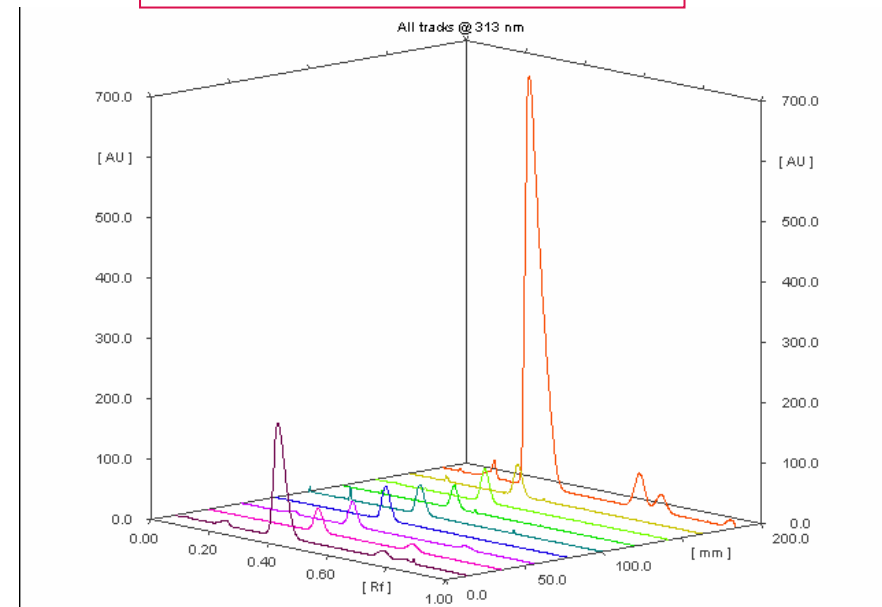
- Bonne résolution des 5 AA seuls et en mélange
- Peptide non hydrolysé : n'interfère pas sur la plaque
- Peptide hydrolysé : problème de pH de reprise après hydrolyse, à revoir
- Définir la Limite de Quantification

Application IPSEN méthode Camag, élution verticale

BIM6 avec excès de dansyl



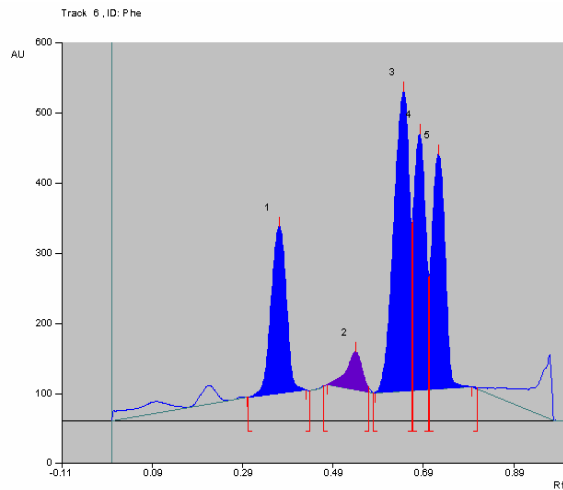
BIM6 avec dansyl équimolaire



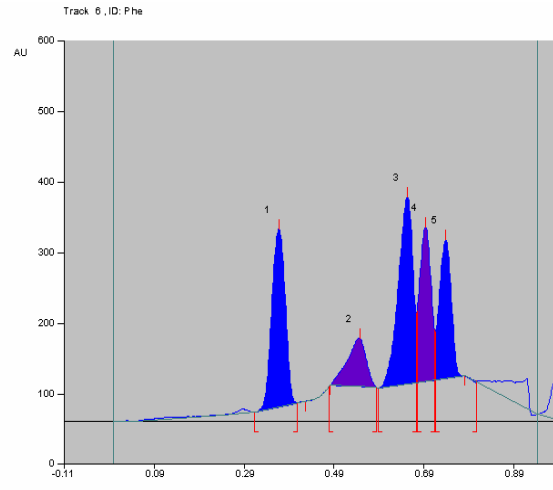
Plaque équimolaire: le dansyl se retrouve en excès car il ne réagit pas avec Inp et est coélué avec D-Bal
→ mélangés, les 5 AA du BIM6 ne sont pas séparés

- Cette méthode est difficile à mettre en route / Dansyl (coélution, non réaction, excès)
- Problème de reproductibilité des Rf

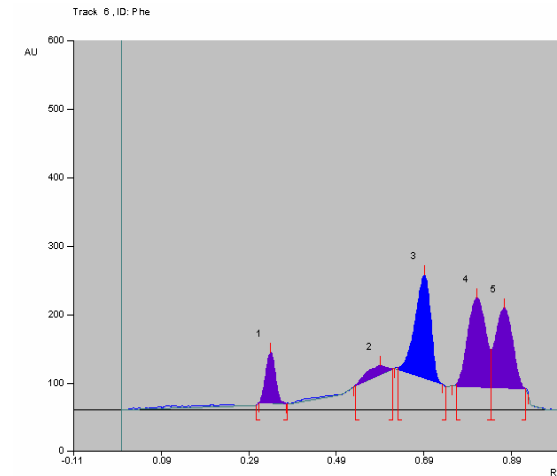
Application IPSEN : méthode Merck élution horizontale et dilutions



Spot = 2µL



Spot = 1µL



Spot = 0.4µL

→ Les 5 AA du BIM6 sont séparés.



Conclusions

Sur les méthodes et nos projets



Conclusions

→ Sur les peptides : (exemple du BIM6)

- bonne séparation avec plaque cellulose/ élution horizontale à l'envers
- Limite de Quantification $\cong 0.4\text{mg/mL}$ (solution 1mg/mL , spot de $0.4\mu\text{L}$)
- Pas d'interaction entre la plaque et le peptide non hydrolysé
- Ok après hydrolyse et reprise à pH 8

→ Sur la méthode :

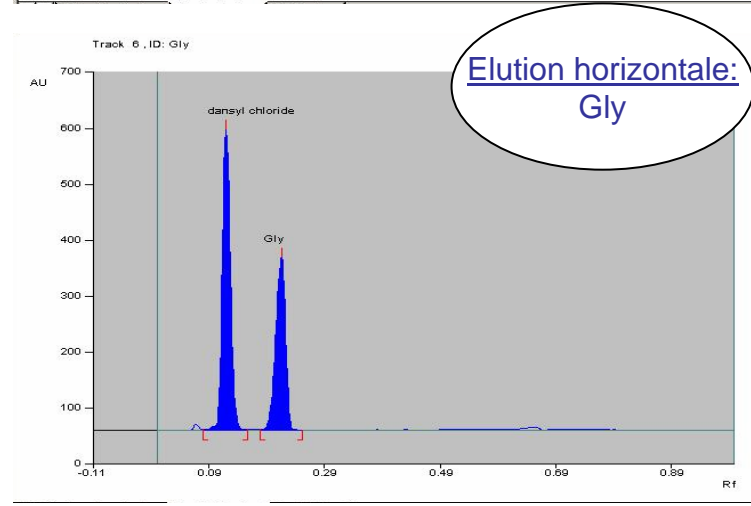
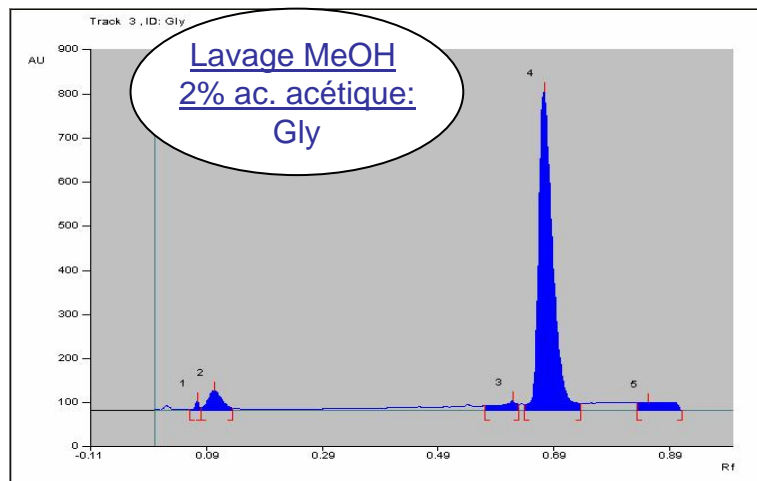
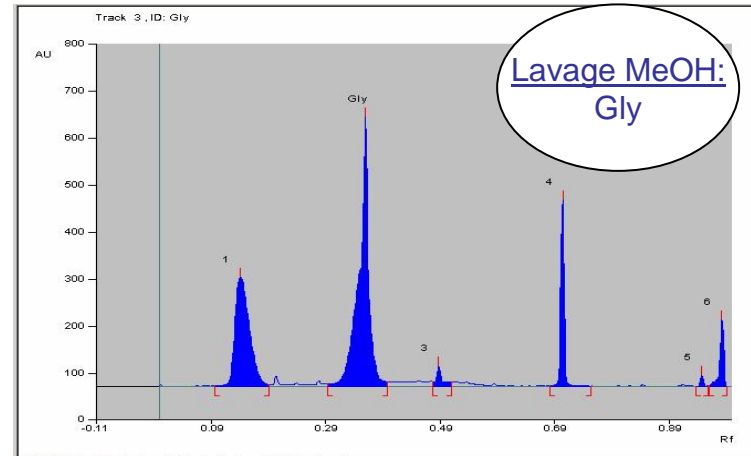
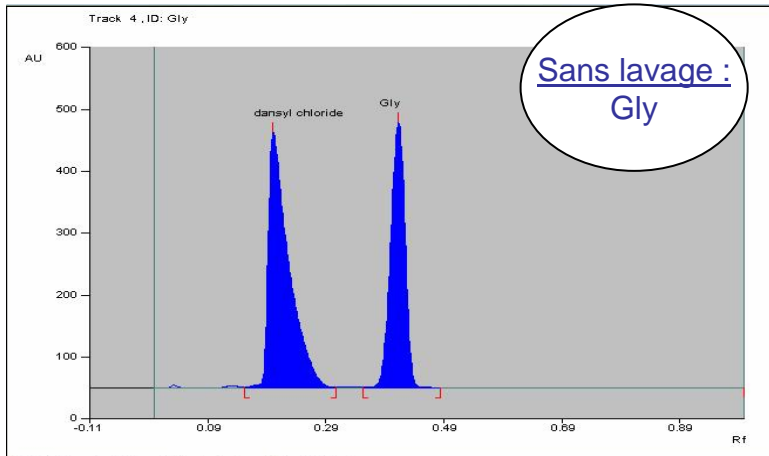
- Le passage de l'analyseur d'acides aminés à l'HPTLC nécessite une mise au point importante car les principes de séparation sont complexes (phases mobiles exotiques).
- Ce passage est possible pour l'identification des acides aminés. L'HPTLC + scanner permet de diminuer la quantité spotée. Cela permettra peut être de rechercher les acides aminés libres et de doser les acides aminés stables à l'hydrolyse.

Conclusions

→ Sur l'HPTLC

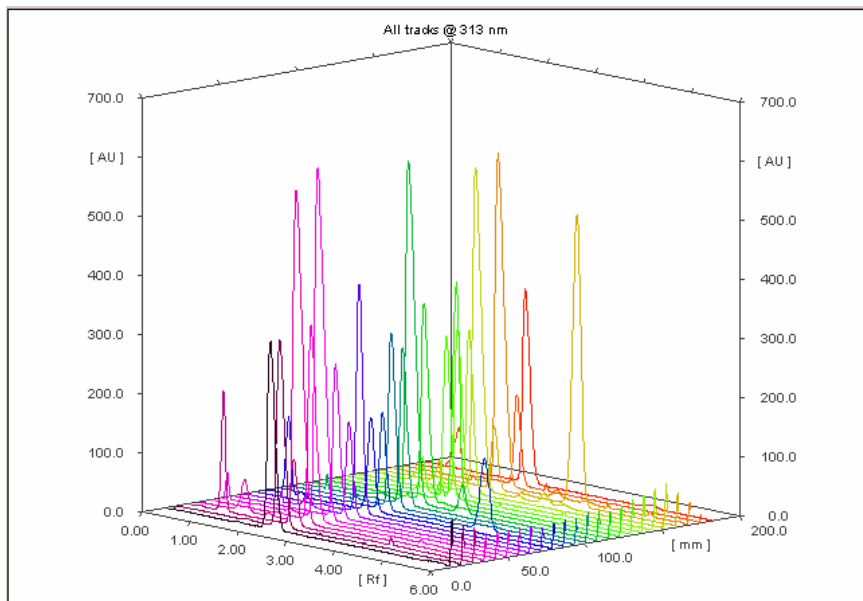
- Cette méthode est rapide \cong 2 jours pour un résultat avec hydrolyse (avec l'analyseur \cong 1 semaine)
- Elle est peu coûteuse et permet l'utilisation en routine par la possibilité de tester de nombreux échantillons en même temps.
- L'utilisation du matériel et du logiciel est simple.
- Après la formation théorique de Pierre-Bernard Savary, le développement est simplifié même s'il nous reste à expliquer le mystère des phases mobiles exotiques.
- Cette technologie permet de faire des essais « non décrits »
Ex : horizontal à l'envers
- Merci à Gerda MORLOCK pour ses conseils lors de notre formation pratique et son soutien pour cet objectif très ambitieux.

Essais d'optimisation de la méthode Camag

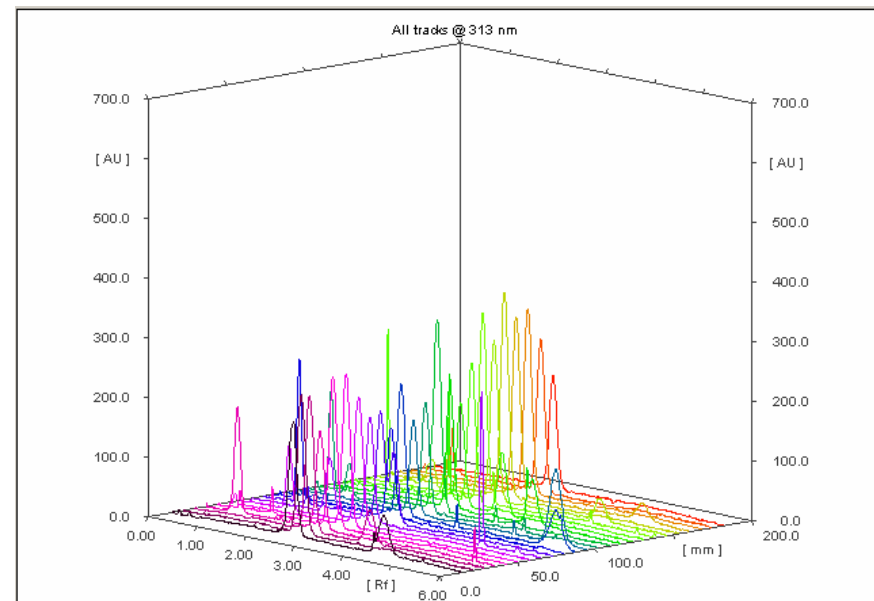


Essais d'optimisation de la méthode Camag

24 AA avec Dansyl chloride en **excès**

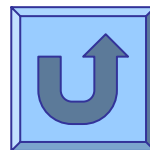


24 AA avec Dansyl chloride **équimolaire**

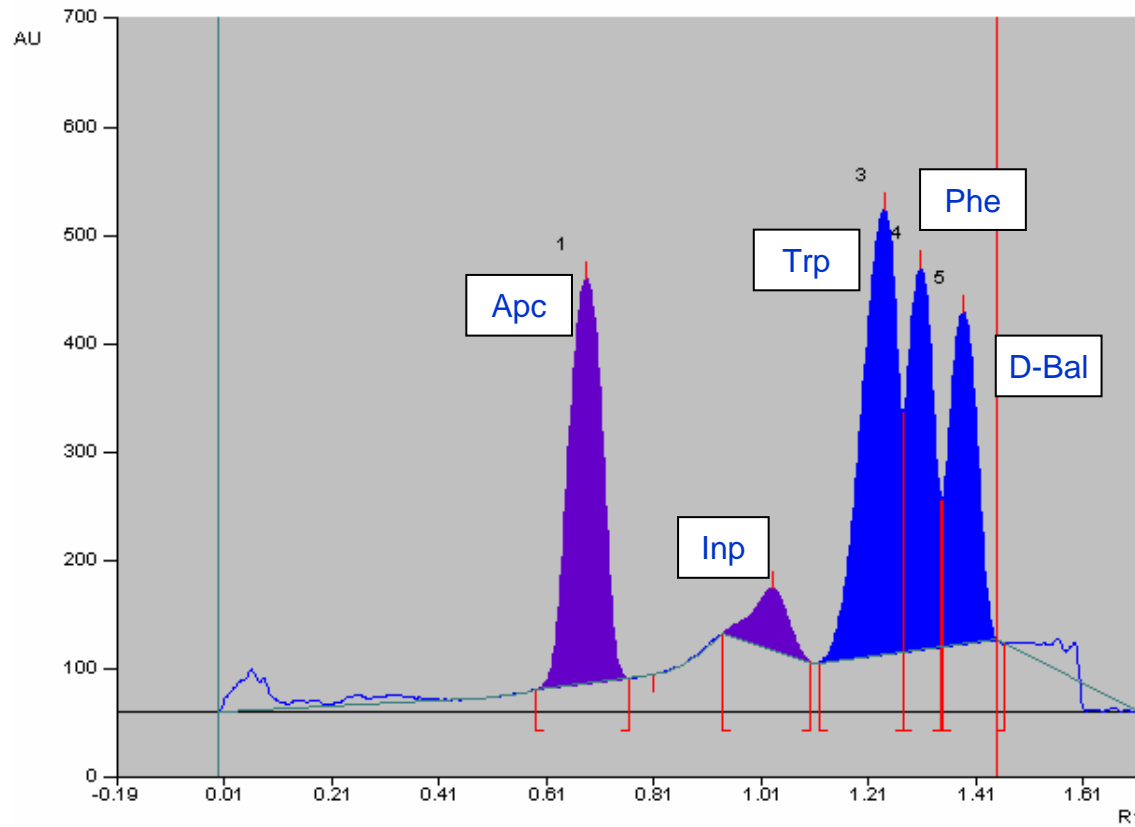


La comparaison donne :

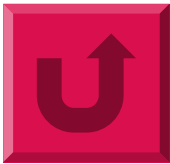
- les AA ne réagissant pas avec la dansyl : Aib, Thr et Inp
 - les AA coélués avec le dansyl : Ala, Cys, Gly(mal séparé), Nal, Tyr, D-Bal
- Dans la publi : ils quantifient avec Leu et dosent Arg, Glu, Gly et Ser



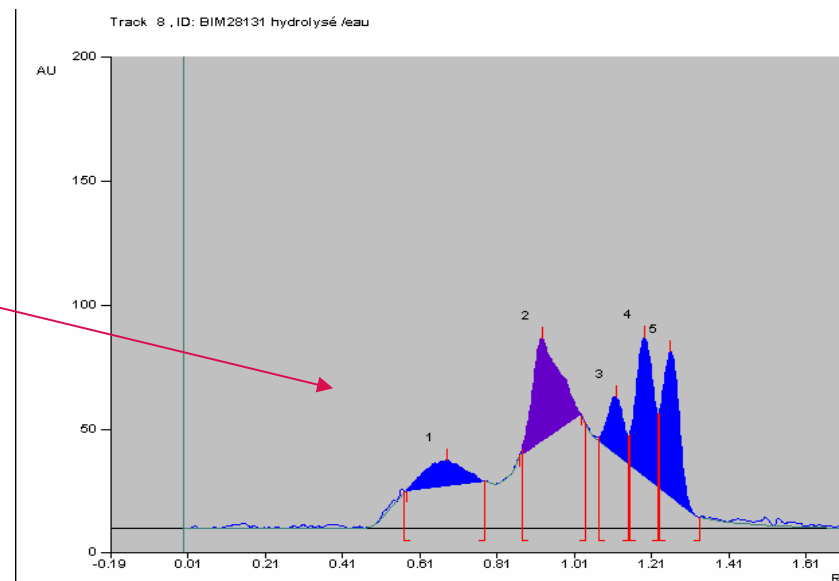
Application IPSEN : méthode Merck Cellulose, élution horizontale à l'envers



BIM6, mélange de spots



Application IPSEN : méthode Merck élution horizontale et hydrolyse



- Reprise de l'hydrolysate dans l'eau, ajustement du pH à 8 avec Na_2CO_3 à 2%
- Spot de 100 μL car concentration finale après reprise à 0.015mg/mL !
- Résolution acceptable des 5AA du BIM6 hydrolysé
- ➔ Concentration initiale du peptide avant hydrolyse à augmenter pour pouvoir spoter moins (et éviter la détérioration de la cellulose)

