

CHROM. 9002

## SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE RAPIDE DES DÉRIVÉS PHÉNYLTHIOHYDANTOÏNE DES AMINO-ACIDES RENCONTRÉS LORS DE LA DÉGRADATION D'EDMAN

CLAUDE BOLLET et MARCEL CAUDE

*Laboratoire de Chimie analytique, École Supérieure de Physique et de Chimie de Paris, 10, Rue Vauquelin, 75231 Paris Cédex 05 (France)*

(Reçu le 8 octobre 1975; manuscrit modifié reçu le 23 décembre 1975)

---

### SUMMARY

*Separation by high-performance liquid chromatography of phenylthiohydantoin derivatives of amino acids released by Edman degradation*

The separation by high-performance liquid chromatography of seventeen phenylthiohydantoin derivatives of amino acids released after Edman degradation of proteins is described. Sixteen phenylthiohydantoin derivatives of amino acids are differentiated within 40 min by liquid-liquid partition on a column packed with Micropak CN (moderately polar alkyl nitrile phase bonded on 10- $\mu$ m porous silica microparticles) and gradient elution with hexane-methylene chloride-isopropanol mixtures.

---

### INTRODUCTION

La détermination de la structure des protéines en vue de leur biosynthèse passe par l'identification des séquences d'acides aminés qui les constituent. La méthode la plus couramment employée est la dégradation d'Edman<sup>1</sup>, qui permet d'identifier l'acide aminé terminal sous la forme de son dérivé 3-phényl-2-thiohydantoïne (PTH amino-acide) après rupture de la liaison peptidique. L'identification de l'acide peut alors être faite soit par une méthode soustractive (détermination de la composition en acides aminés du reste polypeptidique et comparaison avec le produit de départ), soit par l'analyse directe du dérivé PTH de l'acide terminal. Cette méthode permet de reconstituer progressivement la séquence en acides aminés de la protéine. L'analyse chromatographique des PTH amino-acides a fait l'objet de nombreux travaux dont<sup>2</sup> donne une mise au point récente (209 références).

Toutes les méthodes utilisées dans le passé présentent cependant des inconvénients: La chromatographie sur papier et la chromatographie sur couche mince sont lentes et peu précises, la chromatographie en phase liquide classique est d'une mise en oeuvre très longue; quant à la chromatographie en phase gazeuse elle implique la préparation préalable des dérivés triméthylsilylés. De plus, toutes ces méthodes laissent souvent subsister des doutes quant à l'identification de certains acides. Il

était donc intéressant d'appliquer à la séparation des PTH amino-acides les nouvelles techniques de la chromatographie en phase liquide à haute performance.

Graffeo *et al.*<sup>3</sup> et Frank et Strubert<sup>4</sup> ont fait appel à la chromatographie d'adsorption tandis que Haag et Langer<sup>5</sup> ont proposé la chromatographie de partage à polarité de phases inversée. L'utilisation de la chromatographie liquide-solide est délicate dans la mesure où elle exige, pour obtenir des résultats reproductibles, un contrôle strict de la teneur en eau des solvants. L'utilisation de l'élution graduée est, de ce fait, peu commode car elle implique soit la mise en équilibre de chaque solvant avec le support<sup>6</sup>, soit d'effectuer en fin d'analyse une régénération qui peut être très longue. Or les différences de polarité importantes des PTH amino-acides rendent indispensable l'utilisation d'un gradient d'élution.

Ces difficultés ont amené certains auteurs à rechercher la séparation de ces acides par chromatographie de partage à polarité de phases inversée<sup>5</sup> sur phase stationnaire pelliculaire Corasil C<sub>18</sub> (Waters Assoc., Milford, Mass., U.S.A.). Quatorze amino-acides peuvent être ainsi identifiés en 40 min environ. Toutefois, les supports pelliculaires présentent l'inconvénient d'avoir une capacité faible, ce qui peut être très gênant dans le cas de l'analyse de traces. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier la séparation de dix-sept PTH amino-acides par chromatographie de partage sur des microparticules de silice entièrement poreuses greffées alkylnitrile (Colonne Varian Micropak CN). Ces amino-acides représentent l'ensemble de ceux rencontrés généralement dans les protéines d'origine humaine.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### *Appareillage*

Nous avons utilisé un chromatographe en phase liquide Varian (Palo Alto, Calif., U.S.A.) Type 8520 constitué de deux pompes de type seringue à débit constant et d'un programmeur de solvant. La détection est effectuée par absorptiométrie dans l'ultra-violet à 254 nm (cuve à circulation de 8  $\mu$ l), au moyen d'un détecteur Varian.

### *Colonne*

Toutes les séparations ont été effectuées sur une colonne Varian Micropak CN (phase greffée alkylnitrile sur silice poreuse de granulométrie nominale 10  $\mu$ m), d'une longueur de 25 cm et de diamètre intérieur 2.1 mm (1/8 in.).

### *Produits*

L'hexane de chlorure de méthylène et l'isopropanol sont de qualité Uvasol (Merck, Darmstadt, Allemagne Fédérale), No. de catalogue, respectivement: 953, 4372, et 993. Les dérivés 3-phényl-2-thiohydantoïne des différents acides aminés nous ont été fournis par le laboratoire de recherches de l'Unité des Protéines de l'Inserm à Lille, France.

Les échantillons étaient mis en solution dans du méthanol RP (Prolabo, Paris, France) à une concentration comprise entre 1 et 3 mg/ml pour chaque amino-acide. Les volumes injectés au moyen d'une seringue et d'un injecteur du type "Stop-flow" étaient de 3  $\mu$ l environ.

Toutes les séparations ont été effectuées à température ambiante.

## RÉSULTATS

Afin de faciliter le choix de la phase mobile et du profil du gradient, nous avons suivi la même démarche que celle utilisée en chromatographie sur couche mince, c'est-à-dire la séparation des dérivés PTH en trois groupes.

*Groupe I*

Il comprend la proline (Pro), la valine (Val), l'alanine (Ala) la glycine (Gly), la sérine (Ser) et l'asparagine (Asn). Une séparation totale de ces six PTH amino-acides est obtenue en 12 min environ (Fig. 1). Nous avons recherché ici l'obtention d'une résolution optimale, toujours dans le but de doser des traces de PTH amino-acides dans des mélanges complexes. Sur le plan strictement analytique, la durée de la séparation pourrait être réduite, soit en augmentant plus rapidement la polarité de l'éluant, soit en utilisant des solvants plus polaires.

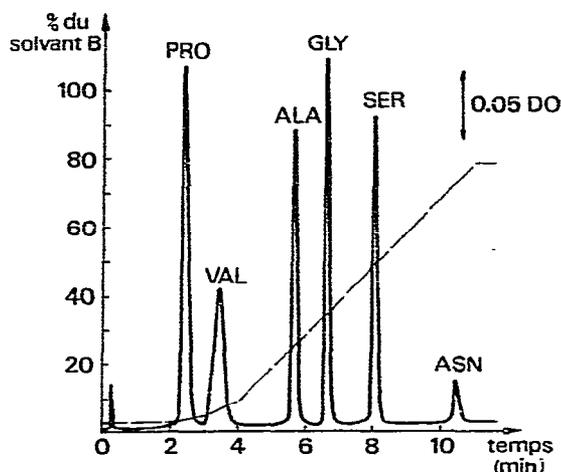


Fig. 1. Séparation des six PTH amino-acides du groupe I. Éluants: (A) hexane, (B) chlorure de méthylène-isopropanol (8:2); débit, 100 ml/h; pression, 90 bars.

*Groupe II*

Il comprend la leucine (Leu), la méthionine (Met), la thréonine (Thr), la tyrosine (Tyr), la lysine (Lys) et la glutamine (Gln). La séparation obtenue est représentée sur la Fig. 2. Nous avons cherché ici la durée d'analyse la plus faible tout en conservant une résolution suffisante pour une analyse quantitative précise. En modifiant la forme du gradient (en particulier en diminuant la polarité du mélange de départ), on peut évidemment augmenter notablement la résolution et obtenir un chromatogramme présentant une allure analogue à celui du groupe 1.

*Groupe III*

Il comprend l'isoleucine (Ile), la phénylalanine (Phe), le tryptophane (Try), l'acide glutamique (Glu) et l'acide aspartique (Asp). La Fig. 3 représente la séparation

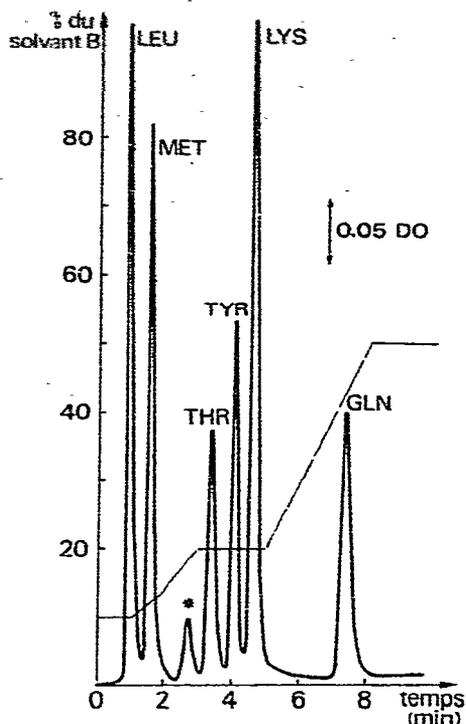


Fig. 2. Séparation des six PTH amino-acides du groupe II. Éluants: (A) hexane, (B) chlorure de méthylène-isopropanol (5:5); débit, 100 ml/h; pression, 100 bars. \*, Impureté non identifiée.

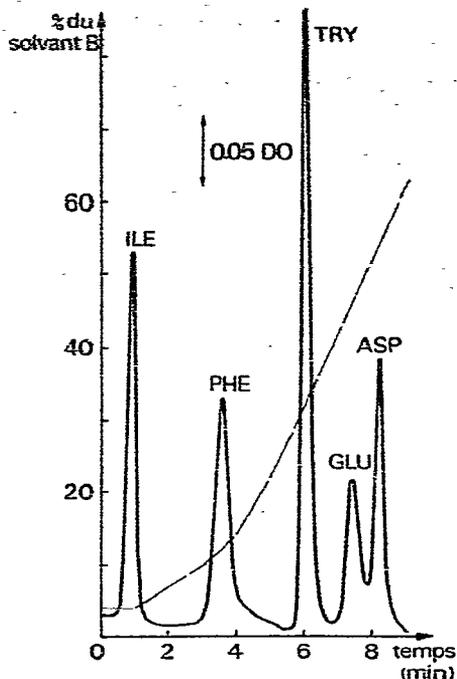


Fig. 3. Séparation des cinq PTH amino-acides du groupe III. Éluants: (A) hexane, (B) isopropanol; débit, 100 ml/h; pression, 90-300 bars.

des cinq PTH amino-acides correspondants. On remarquera l'augmentation de la pression entre le début et la fin de la séparation, ce qui s'explique par la grande différence de viscosité entre l'hexane (0.40 cP) et l'isopropanol (2.8 cP).

Nous avons ensuite cherché à séparer en une seule opération un plus grand nombre de PTH amino-acides. Nous avons tout d'abord rassemblé les groupes I et II.

#### Groupe I + Groupe II

La Fig. 4 représente la séparation de onze amino-acides sur les douze présents. En augmentant moins vite la polarité de l'éluant en fin d'analyse, ce qui se traduirait par un accroissement de la durée de l'analyse, on pourrait séparer la glutamine de l'asparagine, ce qui est confirmé par la Fig. 5 (voir plus loin).

#### Groupe I + Groupe II + Groupe III

La Fig. 5 représente le chromatogramme obtenu sur le mélange des dix-sept PTH amino-acides. On voit que seize d'entre eux sont séparés en 40 min environ. On peut ainsi identifier en une seule opération tout amino-acide provenant de la dégradation d'Edman. La méthode proposée est actuellement appliquée à la recherche de la structure d'une glycoprotéine salivaire parotidienne humaine. Les résultats seront publiés ultérieurement.

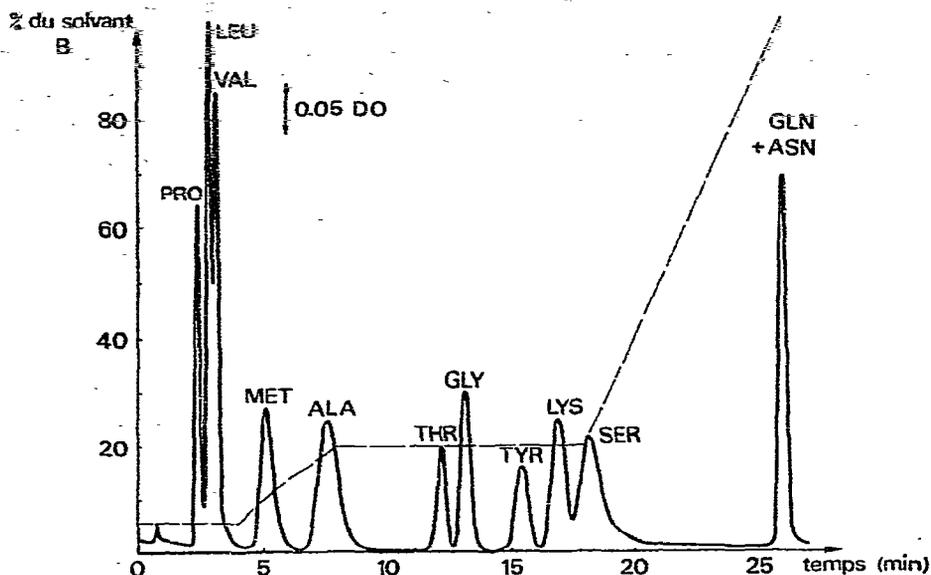


Fig. 4. Séparation des PTH amino-acides des groupes I et II. Éluants: (A) hexane, (B) chlorure de méthylène-isopropanol (5:5); débit, 50 ml/h; pression, 45-100 bars.

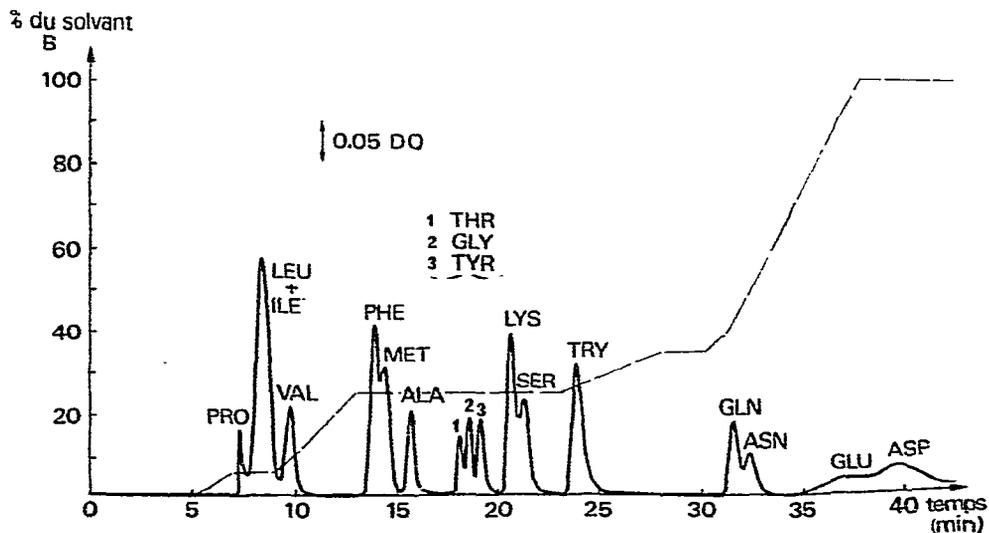


Fig. 5. Séparation des PTH amino-acides des groupes I, II et III. Conditions opératoires, cf. Fig. 4.

## CONCLUSIONS

La chromatographie de partage sur une colonne de 25 cm d'une phase stationnaire du type alkylnitrile greffée sur silice poreuse  $10\ \mu\text{m}$  permet de séparer en moins de 40 min et en une seule opération seize PTH amino-acides sur les dix-sept généralement rencontrés dans les protéines d'origine humaine. La méthode met en

oeuvre une élution graduée au moyen d'un mélange hexane-chlorure de méthylène-isopropanol sous une pression comprise entre 45 et 100 bars. Elle devrait permettre, par sa rapidité, une étude plus commode de la structure des polypeptides soumis à la dégradation d'Edman.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions MM. Degand et Boersma du Laboratoire de Recherches de l'Unité des Protéines de l'INSERM de Lille, qui nous ont fourni les dérivés phénylthiohydantoïne des amino-acides étudiés et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, ainsi que la Société ELF pour la bourse de thèse qu'elle a bien voulu accorder à l'un d'entre nous (C.B.).

#### RÉSUMÉ

Une séparation, par chromatographie en phase liquide à hautes performances, de dix-sept dérivés phénylthiohydantoïne des amino-acides rencontrés lors de la dégradation d'Edman des protéines est proposée. Seize dérivés phénylthiohydantoïne des amino-acides sont séparés en 40 min par chromatographie de partage sur colonne Micropak CN (phase moyennement polaire alkylnitrile greffée sur silice poreuse 10  $\mu\text{m}$ ) et élution graduée par des mélanges hexane-chlorure de méthylène-isopropanol.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. Edman, dans S. B. Needleman (Rédacteur), *Protein Sequence Determination*, Springer, New York, Heidelberg, Berlin, 1970, p. 211.
- 2 J. Rosmus et Z. Deyl, *J. Chromatogr.*, 70 (1972) 221.
- 3 A. P. Graffeo, A. Haag et B. L. Karger, *Anal. Lett.*, 6 (1973) 505.
- 4 G. Frank et W. Strubert, *Chromatographia*, 6 (1973) 522.
- 5 A. Haag et K. Langer, *Chromatographia*, 7 (1974) 659.
- 6 L. R. Snyder et D. L. Saunders, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 195.