

CHROM. 10,531

UNE MÉTHODE SIMPLE DE SÉPARATION ET D'ESTÉRIFICATION DES ACIDES AMINÉS EN VUE DE LEUR PASSAGE EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Y. PEGON, Cl. QUINCY et D. DERUAZ

*Laboratoire de Chimie Analytique, U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques, 69 008 Lyon (France) et
Laboratoire de Biochimie, Hôpital Neurologique, 69 394 Lyon (France)*

(Reçu le 2 août 1977)

SUMMARY

An easy method of separation and esterification of amino acids prior to their mass spectrometric analysis

An easy method for the identification of amino acids in a mixture by mass spectrometry (MS) without using a gas chromatography-MS apparatus is described. After separation on a classical amino acid analyzer without prior purification, amino acids are esterified using dimethoxypropane at ambient temperature and analyzed by MS.

INTRODUCTION

Si l'on veut trouver ou confirmer la structure des acides aminés d'un mélange par spectrométrie de masse, il faut deux étapes préliminaires: l'obtention de dérivés volatils et la séparation des constituants du mélange. Dans le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS), les deux étapes sont réalisées dans cet ordre.

Si l'on ne dispose pas de l'appareillage nécessaire à cette technique, on peut opérer en sens inverse en réalisant d'abord une séparation sur résine échangeuse d'ions en tampons volatils puis l'estérification de chaque acide aminé avant passage en MS.

Mais, après chromatographie, on obtient des acides aminés contaminés par des produits relargués par la résine et par des sels non volatils formés entre la base contenue dans le tampon et les anions présents dans l'échantillon.

D'autre part, les techniques d'estérification sont souvent délicates à mettre en oeuvre. Aussi, nous avons étudié une méthode simple qui permet de résoudre ces différents problèmes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les produits chimiques utilisés sont des produits purs pour analyse sauf le

diméthoxypropane (Merck, pour synthèse). Seule la pyridine est purifiée par distillation. Les esters méthyliques témoins sont des produits Fluka et Cyclochemical.

Estérfication

Dans des tubes de verre bouchés émeri de 150×17 mm, on introduit l'acide aminé, le méthanol, la solution d'acide chlorhydrique ($d = 1.19$) et le diméthoxypropane. Après réaction à température ordinaire, le mélange est évaporé par un courant d'azote et repris par 3 ml d'eau. Cette solution est extraite successivement par 10 ml d'éther, 5 ml de dichloréthane et deux fois 2 ml d'éther.

Chaque extraction est faite directement dans le tube par agitation modérée pendant 1 min et aspiration de la phase organique avec une pipette reliée au vide. La phase aqueuse qui contient l'ester méthylique est ensuite évaporée ou lyophilisée.

Purification complémentaire

Dans le cas où l'acide aminé est contaminé par une importante quantité de sels non volatils, on ajoute dans le tube où se trouve le résidu d'évaporation 2 ml de dichloréthane et l'on fait barboter de l'ammoniac pendant 5 min; on filtre; on chasse l'excès d'ammoniac par un courant d'azote; on ajoute 0.2 ml d'acide acétique et on évapore la solution pour obtenir l'ester méthylique sous forme d'acétate.

Dosage des esters méthyliques

Au cours de l'étude de la réaction d'estérfication, le dosage des esters est réalisé par colorimétrie en les transformant en acides hydroxamiques. Ceux-ci donnent des complexes ferriques dont le maximum d'absorbance est situé vers $520 \text{ nm}^{1,2}$. La concentration de chaque ester est proportionnelle à la densité optique lue.

Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques

Les esters méthyliques des amino-acides ont été analysés en GC dans les conditions expérimentales suivantes: appareil Carlo Erba Fractovap 2.200 muni d'un détecteur à ionisation de flamme; colonne de verre (0.3×200 cm) remplie de Chromosorb W AW DMCS (80–100 mesh) contenant 2.4% de OV-225; la colonne a été conditionnée à 210° ; la température de l'injecteur et du détecteur est de 310° ; la température de la colonne est programmée pour un palier de 8 min à 90° puis une augmentation de $5^\circ/\text{min}$ jusqu'à 160° .

Spectrométrie de masse des esters méthyliques

Les spectres de masse ont été réalisés dans les conditions suivantes: appareil type AEI MS-902; énergie des électrons 70 eV; courant d'émission du filament $100 \mu\text{A}$; température du bloc source 110° ; température de la sonde d'introduction entre 30° et 80° .

Séparation des acides aminés sur résines échangeuses d'ions

Elle est effectuée au moyen d'un appareil Carlo Erba modèle 3A27. Les acides aminés acides et neutres sont séparés sur une colonne Carlo Erba AN-55 de 550×9 mm I.D. remplie avec une résine Carlo Erba 3AR4A25. Les acides aminés basiques sont séparés sur une colonne Carlo Erba AN-15 de 150×9 mm I.D. remplie avec une résine Carlo Erba 3AR2A25. Les colonnes sont thermostatées à 50° .

Avant d'être mises dans les colonnes, les résines sont transformées en sels de pyridinium. Les tampons servant à l'élution sont exprimés en concentration de pyridine. Ils sont préparés en milieu aqueux en ajustant le pH par de l'acide acétique³. On utilise: tampon pH 2.70, 0.1 M; tampon pH 2.90, 0.1 M; tampon pH 4.10, 0.8 M; tampon pH 5.00, 1 M. Avant d'être posé, l'échantillon est acidifié par un tampon 0.1 M (pH 2.20) préparé en ajoutant une quantité convenable d'acide formique au tampon pH 2.70.

Un appareil LKB Ultrograd est utilisé pour la préparation des gradients. Pour la séparation des acides aminés acides et neutres, on équilibre la colonne avec le tampon pH 2.70. Après la pose de l'échantillon, on élue avec le gradient donné Fig. 1. Pour la séparation des acides aminés basiques, on équilibre la colonne avec le tampon pH 2.90 et après pose de l'échantillon, on élue avec le gradient donné Fig. 2. Après chaque séparation, les colonnes sont régénérées par du tampon pH 5.00.

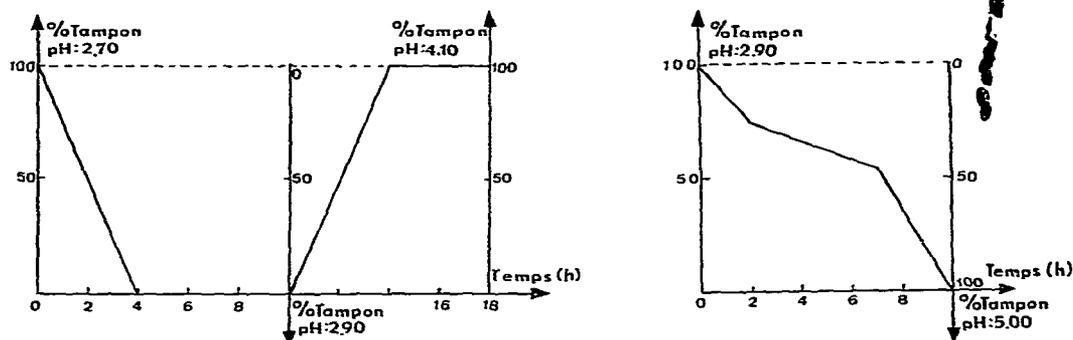


Fig. 1. Gradient d'élution des acides aminés acides et neutres: pourcentage en volume du tampon pH 2.7 par rapport au tampon pH 2.9 puis du tampon pH 2.9 par rapport au tampon pH 4.1 en fonction du temps (h).

Fig. 2. Gradient d'élution des acides aminés basiques: pourcentage en volume du tampon pH 2.9 par rapport au tampon pH 5 en fonction du temps (h).

Tous les tampons sont pompés à une vitesse de 60 ml/h. En sortie de colonne, l'éluat est divisé en deux parties: l'une est collectée au moyen d'un collecteur LKB Minirac en fraction d'une durée de 5 min, l'autre est diluée dans de l'eau et envoyée par une pompe Technicon P1 dans le réacteur du chromatographe pour mettre en évidence la présence des acides aminés par réaction avec la ninhydrine (Fig. 3).

Au moment où on collecte dans le premier tube, on pompe une solution de nitrate d'ammonium 10^{-4} M à la place de l'eau avec la pompe P1. Le pic obtenu sur le tracé permet, en tenant compte de la vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur et de la durée de collection dans chaque tube, de savoir à quels tubes correspond chaque partie du tracé.

Après séparation, on réunit les tubes correspondant à chaque fraction. On amène le pH de ces fractions à la neutralité en ajoutant une solution concentrée d'ammoniaque de façon à déplacer la pyridine, puis on lyophilise.

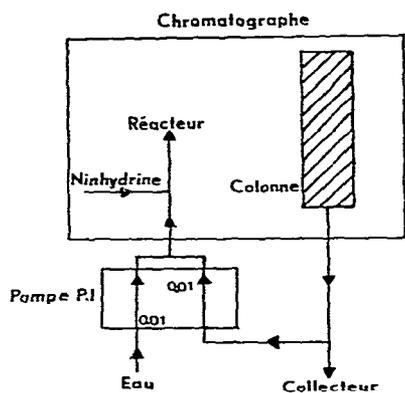


Fig. 3. Schéma du système utilisé pour collecter et détecter les acides aminés (diamètre interne des tuyaux de pompe, 0.01 pouce).

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Choix de la méthode d'estérification

Comme il est particulièrement intéressant de pouvoir utiliser une méthode d'estérification ayant lieu à température ordinaire et ne nécessitant pas la manipulation de réactifs très toxiques ou difficiles à préparer et à conserver, nous avons repris le principe proposé par Rachele⁴ pour l'estérification à l'échelle préparative de quelques acides aminés par le mélange diméthoxypropane, solution aqueuse d'acide chlorhydrique. Nous avons cherché quelles étaient les meilleures conditions de réaction et de purification de l'ester méthylique formé.

Nous avons observé que l'adjonction de méthanol diminue la polymérisation du diméthoxypropane, ce qui facilite la purification.

En faisant varier la quantité de diméthoxypropane et en gardant constantes les quantités d'acides aminés ($10 \mu M$), de solution d'acide chlorhydrique (0.1 ml; soit environ 24 mM HCl) et de méthanol (0.5 ml) dans le mélange réactionnel, on détermine quelle doit être la proportion entre les quantités de diméthoxypropane et de solution d'acide chlorhydrique ajoutées. Pour des temps de réaction de 3, 6 et 24 h, la quantité de diméthoxypropane doit être comprise entre 0.7 et 2.8 ml (5.5 et 22 mM environ) (Fig. 4). Une quantité trop faible de diméthoxypropane ne permet

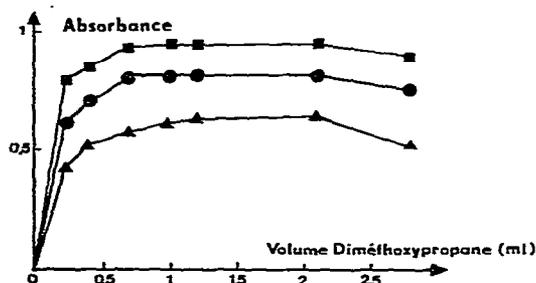


Fig. 4. Quantité d'ester formé, exprimée en unité d'absorbance, en fonction du volume (ml) de diméthoxypropane ajouté pour un temps de réaction de 3 h (▲), 6 h (●) et 24 h (■). Dosage par formation d'hydroxamate ferrique.

pas de transformer toute l'eau ajoutée avec la solution d'acide chlorhydrique, une quantité trop forte a un effet de dilution préjudiciable à la cinétique de la réaction. On a choisi un rapport entre les quantités de diméthoxypropane et de solution d'acide chlorhydrique de 10:1.

Si l'on ajoute des quantités croissantes du mélange diméthoxypropane-solution d'acide chlorhydrique 10:1 à une quantité fixe d'acide aminé ($10 \mu M$) et de méthanol (0.5 ml), le meilleur rendement correspond à un volume de 2.2 ml du mélange (Fig. 5). Les courbes tracées Figs. 4 et 5 correspondent à la formation de l'ester méthylique de l'alanine. Des résultats analogues ont été obtenus pour d'autres acides aminés.

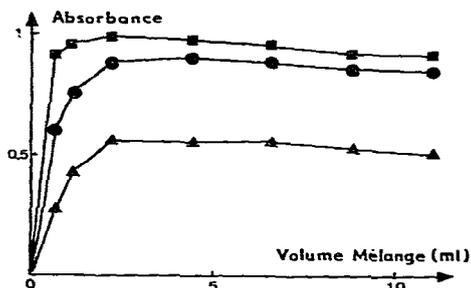


Fig. 5. Quantité d'ester formé, exprimée en unité d'absorbance, en fonction du volume du mélange (ml) diméthoxypropane-solution d'acide chlorhydrique (10:1), pour un temps de réaction de 3 h (▲), 6 h (●) et 24 h (■). Dosage par formation d'hydroxamate ferrique.

Si l'on ajoute à $10 \mu M$ d'un acide aminé, 0.5 ml de méthanol, 0.2 ml de solution d'acide chlorhydrique et 2 ml de diméthoxypropane et si l'on étudie la cinétique de la réaction pour différents types d'acides aminés, on voit que l'équilibre est pratiquement atteint après 12 h (Figs. 6 et 7).

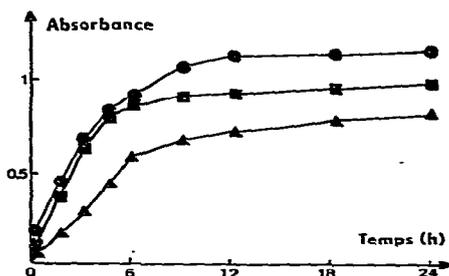
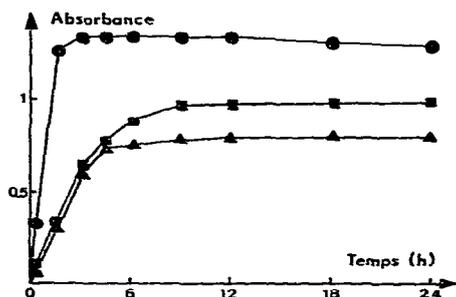


Fig. 6. Quantité d'ester formé, exprimée en unité d'absorbance, en fonction du temps (h) pour la lysine (▲), l'alanine (■) et l'acide aspartique (●). Dosage par formation d'hydroxamate ferrique.

Fig. 7. Quantité d'ester formé, exprimée en unité d'absorbance, en fonction du temps (h) pour la sérine (▲), la proline (■) et la phénylalanine (●). Dosage par formation d'hydroxamate ferrique.

En se basant sur ces résultats, nous utilisons pour estérifier les acides aminés, les conditions expérimentales suivantes: méthanol 0.5 ml, solution d'acide chlorhydrique 0.2 ml, diméthoxypropane 2 ml, temps de réaction 24 h.

Les solvants d'extraction ont été choisis pour permettre l'élimination des produits secondaires de la réaction et de certains des contaminants dus au passage sur résine. Le procédé retenu est simple et rapide.

Dans le cas où l'échantillon posé en chromatographie sur résine échangeuse d'ion est très chargé en sels non volatils, une quantité importante de ces sels peut être éluée avec certains des acides aminés. Pour pouvoir estérifier, ceux-ci, il faut ajouter un volume de solution d'acide chlorhydrique et de diméthoxypropane suffisant pour que l'acide chlorhydrique soit en excès et puisse jouer de rôle de catalyseur. Il faut également opérer une étape de purification complémentaire pour éliminer tous les sels.

Étude des esters en chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse

Pour les identifier et déterminer leur pureté, les esters méthyliques préparés et purifiés en une étape et en deux étapes à partir des acides aminés suivants: acide aspartique, acide glutamique, thréonine, sérine, proline, glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, méthionine, cystéine, phénylalanine, tyrosine, lysine et histidine, sont analysés en GC et en MS.

En GC chaque ester donne un seul pic, identique à celui obtenu avec l'ester méthylique témoin, sauf pour l'ester de l'histidine qui est décomposé sur la colonne⁵.

En MS, ces esters donnent un spectre proche de celui décrit par Biemann *et al.*⁶ pour les esters éthyliques compte tenu des différences de masse des ions ayant le groupement ester. Pour identifier rapidement un acide aminé, nous utilisons le Tableau I où sont indiquées la masse du pic de base ainsi que la masse de deux ions caractéristiques avec leur pourcentage par rapport au pic de base.

TABLEAU I

PIC DE BASE ET PICS CARACTÉRISTIQUES DES ESTERS MÉTHYLIQUES DES ACIDES AMINÉS

<i>Acide aminé</i>	<i>Pic de base</i>	<i>Autres pics</i>
Glycine	30	89 (8%)
Alanine	44	88 (3%), 103 (2%)
Sérine	60	88 (45%), 42 (30%)
Méthionine	61	56 (75%), 104 (37%)
Proline	70	129 (1%)
Valine	72	88 (35%), 53 (28%)
Cystéine	76	88 (70%), 59 (51%)
Histidine	82	110 (26%)
Glutamique	84	116 (61%), 56 (41%)
Lysine	84	56 (25%), 101 (17%)
Leucine	86	88 (27%), 30 (14%)
Isoleucine	86	88 (44%), 30 (22%)
Phénylalanine	88	120 (71%), 91 (21%)
Thréonine	89	74 (84%), 57 (75%)
Aspartique	102	70 (30%), 88 (20%)
Tyrosine	107	88 (36%), 195 (11%)

Application

Nous utilisons couramment cette méthode dans l'étude des acides aminés libres ou résultant de l'hydrolyse de peptides séparés à partir de culture de mycelium de champignons supérieurs (*Lacaria Lacata* Scop. ex Fr). A titre d'exemple, l'identification des acides aminés de deux hydrolysats est donnée Fig. 8. Ces hydrolysats correspondant à des fractions séparées sur DEAE-Sephadex en tampon phosphate, ont des concentrations très importantes en ions phosphates et en ions chlorures. Néanmoins, ils sont posés directement en chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Après adjonction d'ammoniaque, les fractions sont lyophilisées, estérifiées et purifiées en deux temps. Les spectres de masse obtenus sont analogues à ceux des composés purs et permettent une identification immédiate.

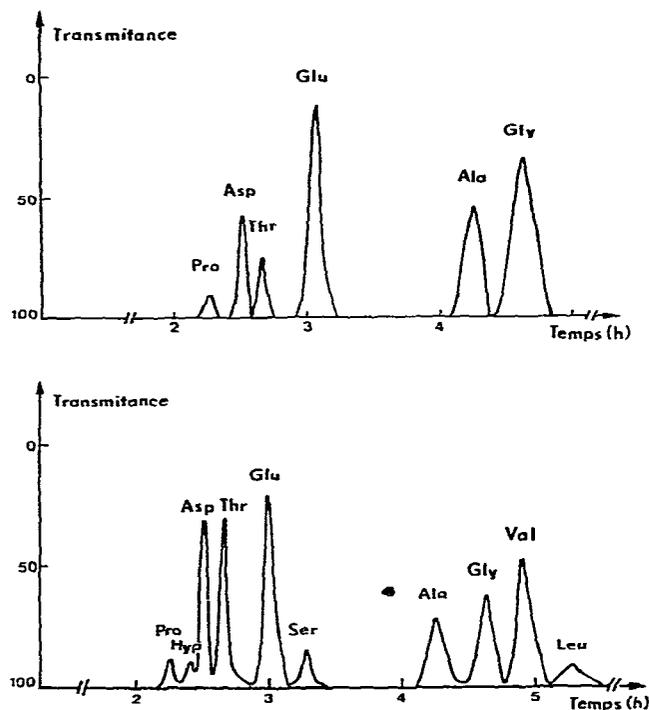


Fig. 8. Chromatographies des acides aminés acides et neutres résultant de l'hydrolyse de deux fractions séparées sur DEAE-Sephadex en tampon phosphate. L'identification a été faite par spectrométrie de masse. Hyp = Hydroxyproline

CONCLUSION

Le procédé proposé est plus long que celui basé sur le couplage GC-MS; mais il nécessite seulement l'emploi d'un appareillage classique de chromatographie d'acides aminés sur résine échangeuse d'ions sans purification préalable de l'échantillon. De plus, les techniques à mettre en oeuvre sont simples. Seuls des réactifs faciles à manipuler sont utilisés.

REMERCIEMENT

Nous remercions Mademoiselle Salandre pour sa collaboration technique.

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent un procédé simple à mettre en oeuvre permettant de séparer les acides aminés sur un appareillage classique de chromatographie sur résine échangeuse d'ions puis de les estérifier par une nouvelle méthode utilisant le diméthoxypropane à température ordinaire. Après purification, les esters méthyliques des acides aminés ainsi obtenus sont étudiés par spectrométrie de masse.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. F. Goddu, N. F. Leblanc et C. M. Wright, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1251.
- 2 F. D. Snell et C. T. Snell, *Colorimetric Methods of Analysis*, Vol. III, Van Nostrand, New York, 1953, p. 315.
- 3 P. Padiou et N. Malkenia, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 493.
- 4 J. R. Rachele, *J. Org. Chem.*, 28 (1963) 2898.
- 5 C. H. Nicholls, S. Makisumi et H. A. Saroff, *J. Chromatogr.*, 11 (1963) 327.
- 6 K. Biemann, J. Seibl et F. Gapp, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83 (1961) 3795.