

Méthodes Chromatographiques Pour Le Dosage De La Phénylalanine Et La Tyrosine

Ounnoughi Chahrazed ¹, Derardja Meriem ³, Mezaache Nur El Houda ², Lalaouna Abd El Djallil ¹

- Laboratoire de chimie analytique, département de pharmacie, faculté de médecine, Université de Constantine 3
- Pharmacie centrale CHU de Sétif
- Service de pédiatrie, CHU de Sétif

1. Introduction

La phénylcétonurie (PCU) est un trouble métabolique autosomique récessif. Il se produit en raison de mutations dans le gène de la phénylalanine hydroxylase (PAH), ce qui rend la PAH incapable de convertir la phénylalanine (Phe) en tyrosine (Tyr). La Phe peut s'accumuler à des niveaux nocifs dans le corps, causant une déficience intellectuelle et d'autres problèmes de santé graves. Le dépistage néonatal systématique permet la mise en place d'un traitement précoce. Différentes méthodologies ont été utilisées pour surveiller les niveaux de Phe et de Tyr. Nous présentons dans ce travail un aperçu des nouvelles méthodes par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour la détermination de Phe et Tyr dans les échantillons biologiques.

2- Détermination de Ph et Tyr sur goutte de sang séché (DBS) par HPLC avec détecteur fluorimétrique:

- Du sang veineux périphérique sans anticoagulant et DBS d'un groupe de patients atteints de PCU (n = 25).
- Dérivatisation précolonne par l'acide o-phthalaldehyde-3-mercaptopropionique
- Colonne Zorbax C18; 150 x 4,6 mm; 5 µm

Intervalle min	Phase mobile A: Na ₂ HPO ₄ 40 mM	Phase mobile B: acétonitrile/méthanol/ eau 40:40:20, v/v/v	pH	T° (°C)	Débit ml/mn
0-10	75% → 54 %	25% → 46%	7,8	40	1,3
10-12	54% → 0%	46% → 100%			

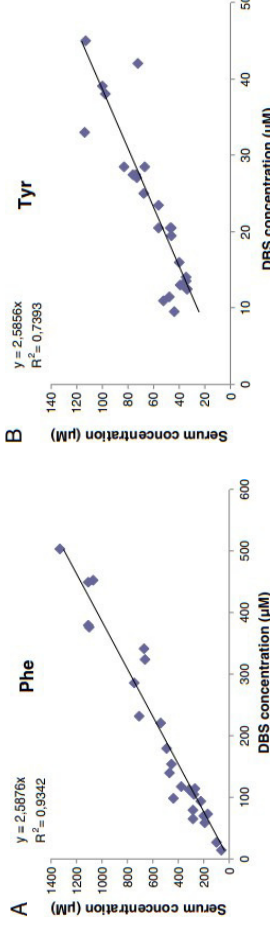


Fig. 1. Corrélation entre les concentrations de Phe et de Tyr dans le sérum et de DBS.

La méthode est **linéaire** (12 - 1200 µM) $R^2 \pm SD = 0.996 \pm 0.005$ (Ph); 0.997 ± 0.004 (Tyr); **sensible** avec LOD pour Phe et Tyr de 0,1 µM et 0,5 µM, respectivement, tandis que la LOQ est de 12 µM pour les deux AA.

3- Détermination de Ph et Tyr par HPLC avec détecteur dans Ultra Violet :

- 102 enfants (58 garçons et 44 filles, âgés de 2 mois à 7 ans et 32 nouveau-nés (19 garçons et 13 filles) sont inclus dans cette étude.
- Plasma, sérum et sang total capillaire ont été testés

Colonne C8; 6,0 mm x 300 mm, 10 µm
Phase mobile: 5% d'acétonitrile dans l'eau (v/v)
Température ambiante; débit 1,5 ml/min
Longueur d'onde de détection 210nm

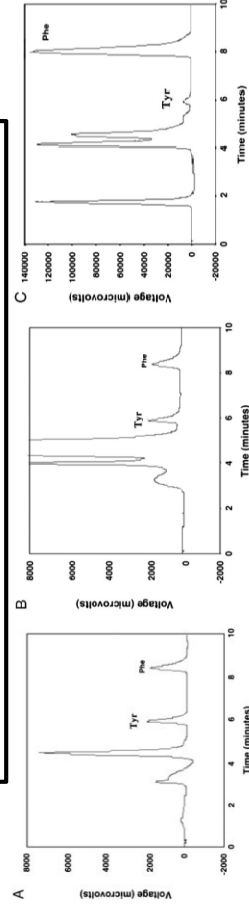


Fig. 2. Chromatogrammes: (A) Mélange de Tyr et Phe étalons. (B) Sang capillaire périphérique des enfants sains. (C) Sang capillaire périphérique de patients PCU.

La **linéarité** était de 6 à 1512 µM pour Phe et 5,5 à 1250 µM pour Tyr. La **LOD** de Phe et de Tyr était de 1,5 µM et de 1,0 µM respectivement. Bien que les taux de Phe et de Tyr des échantillons de sang périphérique étaient relativement inférieurs à ceux du sérum ou du plasma, les données ont montré une bonne corrélation entre eux.

4- Détermination de Ph et Tyr par chromatographie liquide avec détection par spectroscopie de masse en tandem LC-MS/MS:

Dans cette étude, une méthode par LC-MS/MS pour la quantification de Ph et Tyr dans DBS. Des étalonnage à un, à cinq et à six points de concentration ont été utilisés.

Name	Calibration type
CAL 1	6-Point calibration (0, 50, 100, 250, 500, and 1000 µmol/L)
CAL 2	5-Point calibration (0, 100, 250, 500, and 1000 µmol/L)
CAL 3	5-Point calibration (0, 50, 100, 250, and 500 µmol/L)
CAL 4	Single-point calibration (50 µmol/L)
CAL 5	Single-point calibration (100 µmol/L)
CAL 6	Single-point calibration (250 µmol/L)
CAL 7	Single-point calibration (500 µmol/L)
CAL 8	Single-point calibration (1000 µmol/L)

Phase mobile	Phase mobile A: NH ₄ HCO ₂ 2mM/ 0,1% HCOOH dans l'eau	Phase mobile B: NH ₄ HCO ₂ 2mM/ 0,1% HCOOH dans le MeOH
0-2,5mn	95% → 0 %	5% → 100%
2,5-3,5 min	0 %	100 %
Débit ml/mn	0,5	
Colonne	C18 (100 ×3.0 mm , 1.8 µm)	

Conclusion:

La méthode par HPLC avec détection fluorimétrique peut être utilisée dans le suivi de routine des patients atteints de PCU. La méthode par spectroscopie UV offre une solution rapide et peu coûteuse par rapport à celles qui utilisent la dérivation pré et post-colonne, et la LC-SM. La méthode par spectroscopie de masse reste la meilleure d'un point de vue sensibilité et précision des résultats. La détermination de Phe et Tyr sur DBS présente plusieurs avantages vue que l'échantillon peut être facilement obtenu même à la maison et envoyé par la poste, grâce à sa stabilité.

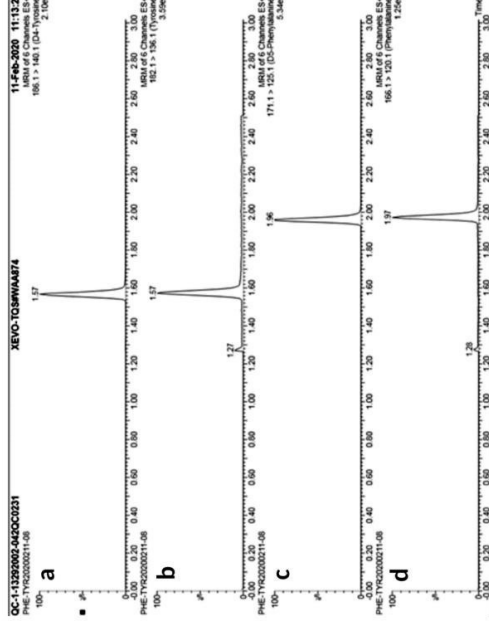


Fig. 3. Chromatogrammes de Tyr et de Ph. Les pics de Tyr-D4 (a) et de Tyr (b) sont à 1,57 min. Les pics de Ph-D5 (c) et de Ph (d) sont à 1,96 min. Les minuscules pics interférents à 1,27 min étaient bien séparés du pic des analytes d'intérêt.

La linéarité de la méthode était de 0 à 1800 µM pour Ph avec R²= 0,9954 et de 0 à 1600 µM pour Tyr avec R²= 0,9951. **LOQ** = 7 µM pour Ph et 7.8 µM pour Tyr. **Le temps d'analyse** était de 4,5mn. L'étalonnage à 6 points répond à l'exigence de précision dans toute la gamme analytique.

Références:

1. Pece R, Scolamiero E, Ingenito L, Parenti G, Ruoppolo M. Optimization of an HPLC method for phenylalanine and tyrosine quantization in dried blood spot. *Clinical Biochemistry*. déc 2013;46(18):1892-5.
2. Mo X ming, Li Y, Tang A guo, Ren Y ping. Simultaneous determination of phenylalanine and tyrosine in peripheral capillary blood by HPLC with ultraviolet detection. *Clinical Biochemistry*. août 2013;46(12):1074-8.
3. Yazdanpanah M, Yuan L. A highly accurate mass spectrometry method for the quantification of phenylalanine and tyrosine on dried blood spots: Combination of liquid chromatography, phenylalanine/tyrosine-free blood calibrators and multi-point/dynamic calibration. *Clinical Biochemistry*. mars 2022;101:35-41.