

Mise au point et validation du dosage d'acides aminés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) dans des poches de nutrition parentérale pédiatrique

C. Serre, J. Fayard, J. Boisrame, AL. Yailian, L. Roussel, F. Falson, C. Pivot, F. Pirot

ISPB Lyon 1

Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle, UMR 5305, Plateforme FRIPHARM, Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1, 8, avenue Rockefeller, F-69373 Lyon cedex 08, France.

Service Pharmaceutique, Plateforme FRIPHARM, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, 5, Place d'Arsonval, F-69437 Lyon cedex 03, France.

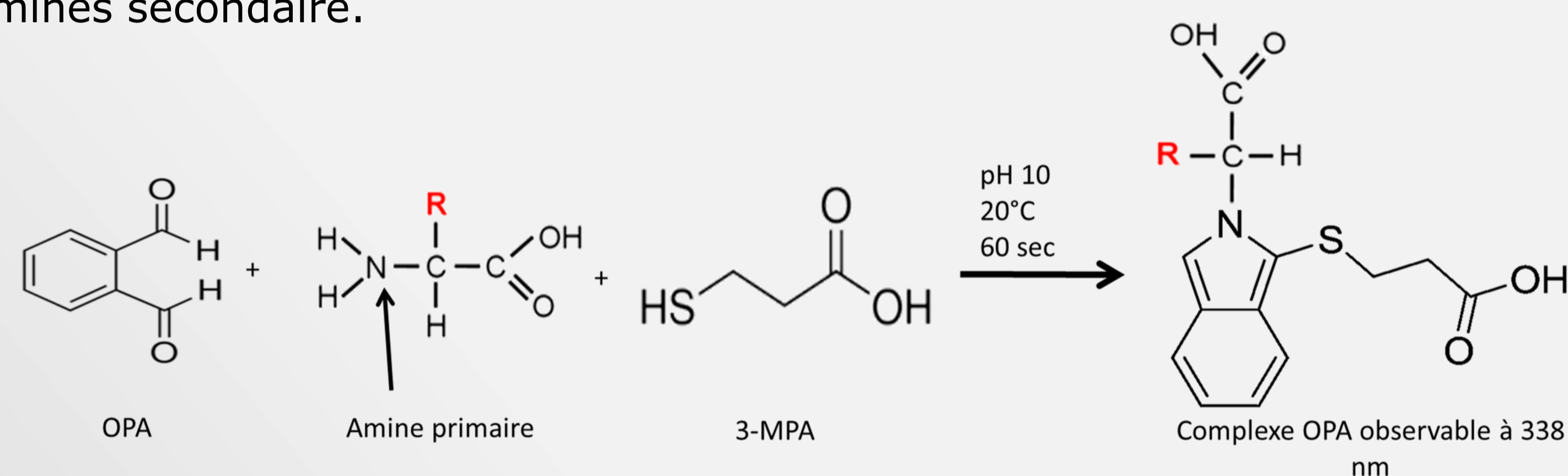
Les réserves énergétiques des bébés prématurés sont très limitées, ils possèdent peu de masse grasse et maigre. C'est pourquoi ils nécessitent un apport nutritionnel important pour assurer le bon fonctionnement des organes et des muscles, le développement du système immunitaire mais aussi la croissance. Les services pédiatriques utilisent la nutrition parentérale (NP), sous forme de poche de nutrition, permettant un apport contrôlé de tous les nutriments nécessaires dont les acides aminés (AA).



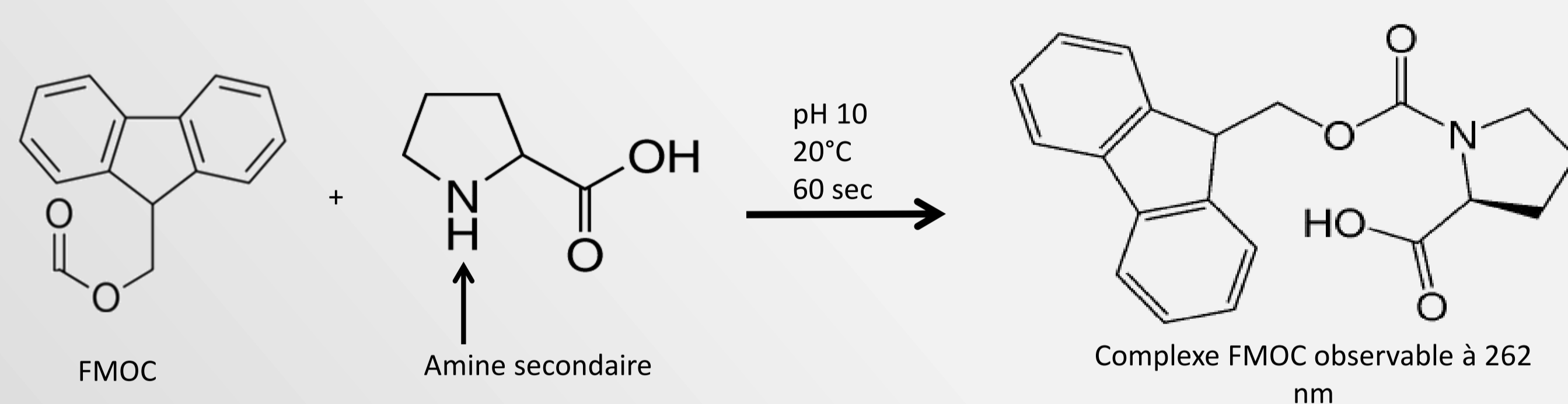
Cependant la NP est un mélange complexe de plus de quarante constituants pouvant agir les uns avec les autres et se dégrader. Les AA peuvent être dégradés par la réaction de Maillard qui se produit naturellement en présence de glucose et certains AA sont sensibles à l'oxydation. Afin de s'assurer que les poches de NP possèdent la bonne quantité d'AA, nous avons mis au point et validé une nouvelle méthode de dosage par CLHP. Elle permet de doser simultanément les acides aminés (AA) suivant : acide aspartique (ASP), acide glutamique (GLU), sérine (SER), histidine (HIS), glycine (GLY), thréonine (THR), arginine (ARG), alanine (ALA), taurine (TAU), tyrosine (TYR), cystine (CY2), valine (VAL), méthionine (MET), tryptophane (TRP), phénylalanine (PHE), isoleucine (ILE), ornithine (ORN), leucine (LEU), lysine (LYS), proline (PRO). En plus de connaître la quantité initiale en AA, ce dosage permettra de suivre leur stabilité au cours du temps.

Dérivatisation

Les AA ne possédant pas de groupement chromophore nécessitent au préalable une réaction de dérivatisation pré-colonne avant de pouvoir être détectés en ultraviolet (UV). En présence d'acide 3-mercaptopropionique (3-MPA), l'ortho-phthalaldehyde (OPA) réagit avec les fonctions amines primaire et le 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC) avec les fonctions amines secondaire.



Réaction de dérivatisation avec l'OPA



Réaction de dérivatisation avec le FMOC

Conditions chromatographiques

La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne (Poroshell HPH-C18 3.0X150mm 2,7 μ), précédée d'une colonne de garde (UHPLC guard poroshell HPH-C18) thermostatée à 40° C. De part la polarité très variée des AA il est nécessaire d'effectuer un gradient afin de pouvoir les séparer. Le gradient, composé d'une phase aqueuse A (tampon Na₂HPO₄ 10mM, Na₂B₄O₇ 10mM, NaN₃ 5mM à pH 8,2) et d'une phase organique B (acétonitrile 45/méthanol 45/eau 10) se déroule selon le tableau suivant:

Temps (min)	% B	% A
0,00	2	98
0,53	2	98
20,10	57	43
20,25	100	0
23,55	100	0
23,70	2	98
27,00	2	98

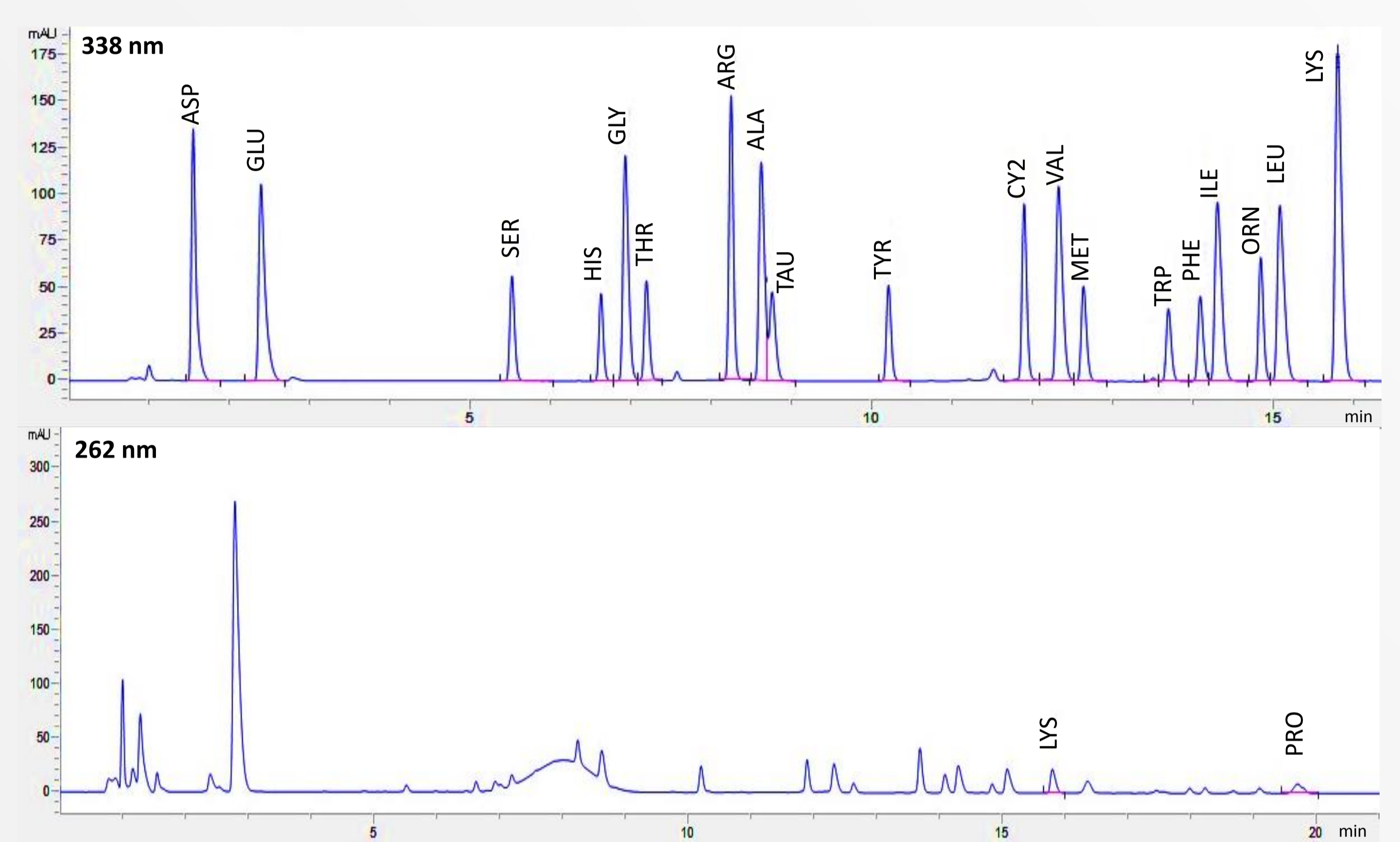
Gradient d'élution.

Le débit est fixé à 0,64 ml/minute avec un volume d'injection de 12 μ l. La détection se fait en UV simultanément à 338 nm et 262 nm.

Validation analytique

La validation analytique a été conduite selon les recommandations des International Conference on Harmonisation (ICH), dans un intervalle de concentrations théoriques différentes selon l'AA en fonction de la concentration de chacun dans les poches de NP. Une fois la séparation réalisée, les AA ont été identifiés un par un grâce à une méthode par ajout. La spécificité, la linéarité, la fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire), l'exactitude, la limite de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été déterminées.

Chromatogrammes à 338 et 262 nm



Résultats

La méthode de dosage a montré une bonne linéarité pour les 20 AA avec des coefficients de corrélation compris entre $0,991 \leq r \leq 0,999$ et une exactitude avec des taux de recouvrement situés entre 95 et 105%. Les temps de rétentions des 20 AA ont été stables pour toutes les injections à $\pm 5\%$. La bonne séparation chromatographique des différents AA et l'absence d'interférence du blanc réactif a permis de valider le critère de spécificité.

	Répétabilité	Fid. intermédiaire	LD (pmol/ μ l)	LQ (pmol/ μ l)
ASP	3,11%	1,61%	8,74	26,48
GLU	3,20%	1,71%	14,03	42,52
SER	4,56%	2,39%	5,24	15,87
HIS	3,77%	1,79%	9,70	29,40
GLY	3,65%	2,10%	6,12	18,55
THR	0,87%	3,07%	5,12	15,51
ARG	4,00%	1,54%	11,98	36,29
ALA	4,58%	2,63%	14,15	42,88
TAU	2,68%	4,54%	1,72	5,21
TYR	3,92%	1,85%	2,80	8,47
CY2	3,29%	1,08%	7,36	22,23
VAL	3,27%	1,03%	13,01	39,41
MET	3,51%	2,58%	3,91	11,85
TRP	2,93%	2,01%	5,14	15,58
PHE	4,66%	2,91%	7,74	23,45
ILE	3,61%	1,85%	10,69	32,38
ORN	3,52%	5,39%	18,59	56,32
LEU	3,23%	1,24%	13,42	40,61
LYS	2,72%	2,15%	20,35	61,68
PRO	3,00%	1,46%	9,51	28,83

La fidélité intermédiaire et la répétabilité sont conformes aux spécifications car les coefficients de variation sont inférieurs à 10%.

Conclusion

Au vu des résultats, cette méthode a été validée selon les ICH. Elle permettra la mise en place d'un dosage rapide, précis et simultanée de 20 AA dans les poches de NP ainsi que l'étude de stabilité de ces AA dans le temps.