

2m 11.2614.1

Université de Montréal

**Étude chromatographique des analogues peptidiques
de l'hexaréline par électrophorèse capillaire et par
chromatographie liquide à haute performance**

par

Avedis Panoyan
Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences pharmaceutiques

Décembre, 1997

© Panoyan Avedis, 1997



11/11/98

QV

705

U58

1998

v.002

Université de Montréal

Étude chromatographique des analogues peptidiques
de l'hexaréline par électrophorèse capillaire et par
chromatographie liquide à haute performance

par

Avadis Fanous
Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences (M.Sc.)
en Sciences Pharmaceutiques



Déposé le 1998

à Paris, France, 1998

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Étude chromatographique des analogues peptidiques
de l'hexaréline par électrophorèse capillaire et par
chromatographie liquide à haute performance**

Présenté par:

Avedis Panoyan

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Jean-Guy Besner	président-rapporteur
Albert Adam	directeur de recherche
Huy Ong	codirecteur de recherche
Jean-Louis Brazier	membre du jury

Mémoire accepté le: 21.05.1998

SOMMAIRE

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique de séparation qualitative ou de quantification d'introduction récente. Elle résulte de l'union du puissant mécanisme de séparation électrophorétique avec les concepts d'instrumentation et d'automatisation chromatographiques. Si, au début, l'EC était utilisée pour la séparation de substances ioniques, la mise en oeuvre de différents mécanismes de séparation a permis l'apparition de plusieurs modes d'EC dont la chromatographie électrocinétique micellaire (CECM), l'électrophorèse capillaire de gel (ECG), la focalisation isoélectrique (FIE) et l'isotachophorèse capillaire (ITP). Ces méthodes ont permis l'analyse de grandes variétés de substances, comme les oligonucléotides, les vitamines, les pesticides, les composés chiraux, les acides aminés, les protéines et les peptides. Elles ont permis également la séparation de cellules entières et de particules virales.

Dans le but de pousser plus à fonds l'analyse fine des peptides par EC, nous avons appliqué l'électrophorèse de zone (ECZ) et la CECM à la séparation des analogues peptidiques de l'hexaréline. L'hexaréline est un nouveau sécrétagogue de l'hormone de croissance. Les analogues choisis diffèrent par leur structure, leur charge et leur hydrophobie.

Nous avons mis au point les conditions optimales de séparation qui ont permis la séparation entre sept analogues de l'hexaréline. En ECZ, une concentration du tampon phosphate de triethylammonium de 200 mM, à pH 3.50, sous voltage de 16 KV, nous a permis une séparation efficace en un temps d'analyse inférieur à 30 min. L'effet de solvants organiques sur la résolution a été évalué. L'acétonitrile diminue le temps de migration et le méthanol l'augmente, sans améliorer la résolution. Dans les conditions ainsi

définies, la reproductibilité des temps de migration montrait un coefficient de variation inférieur à 3.9 %. L'analyse des différents paramètres mis en jeu nous a permis d'établir un modèle semi-empirique reliant le temps de migration d'un peptide au rapport de sa charge sur sa masse.

Des tensioactifs non-ioniques ont été employés pour le développement de la CECM. Les conditions idéales de séparation ont été obtenues par l'optimisation des concentrations des tensioactifs neutres testés tels: Tween 20 (20 mM), Triton X-100 réduit (10 mM) et octylglucoside (40 mM). Dans ce cas, nous avons obtenu une relation linéaire entre le temps de migration des analogues et leurs indices d'hydrophobie.

Finalement, les analogues peptidiques de l'hexaréline ont été séparés par chromatographie liquide à haute performance en phase inversée (RP-HPLC). Dans ce cas on observait une co-élution entre l'hexaréline et l'un de ses analogues de même indice d'hydrophobie. Cependant, l'ordre d'élution en CECM était semblable à celui du HPLC.

En conclusion l'ECZ semble la méthode la plus efficace pour la séparation des analogues chargés de l'hexaréline. L'ECZ possède un pouvoir de résolution supérieur à HPLC et des conditions opératoires plus aisées.

Mots-clés: électrophorèse capillaire de zone, chromatographie électrocinétique micellaire, hexaréline, analogues peptidiques, chromatographie liquide à haute performance.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations et des symboles	xii
Remerciements	xv
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1. L'électrophorèse capillaire	2
1.1. L'électrophorèse capillaire: sa place dans les techniques électrophorétiques	2
1.2. L'électrophorèse capillaire: instrumentation et fonctionnement	3
1.2.1. Le capillaire de séparation	3
1.2.2. L'alimentation électrique	4
1.2.3. L'injection de l'échantillon	5
1.2.4. La détection	5
1.2.5. La migration électrophorétique	6
1.3. L'électrophorèse capillaire: bases physico-chimiques	7
1.3.1. L'électro-migration	7
1.3.2. L'électro-osmose	11
1.4. L'électrophorèse capillaire: paramètres analytiques	17
1.4.1. Le temps de migration et la mobilité électrophorétique ..	17
1.4.2. L'efficacité de la séparation électrophorétique	22
1.4.3. La résolution	24
1.4.4. La capacité des pics	25
1.5. L'électrophorèse capillaire: les variantes	25
1.5.1. L'électrophorèse capillaire de zone	25

1.5.2. La chromatographie électrocinétique micellaire	27
1.5.3. L'électrophorèse capillaire sur gel	29
1.5.4. Focalisation isoélectrique capillaire	30
1.5.5. Isotachophorèse	32
1.5.6. L'électrochromatographie capillaire	33
1.6. Application de l'EC	34
1.6.1. L'EC : les avantages et les limitations	35
1.6.2. L'EC face à la chromatographie liquide à haute performance pour l'analyse des peptides	36
1.6.3. Place de l'EC dans l'analyse des peptides	38
1.6.3.1 Étude de la pureté des peptides	38
1.6.3.2 Cartographie des peptides	39
1.6.3.3 Caractérisation des peptides	40
1.6.4. Paramètres importants dans la séparation des peptides par EC	40
1.6.4.1 Optimisation du pH	41
1.6.4.2 Optimisation de la force ionique	41
1.6.4.3 Effets des solvants organiques	42
1.6.4.4 Effets des tensioactifs	43
1.6.5 Relation caractérisant la migration des peptides par EC	44
2. L'hexaréline	47
2.1. Structure de l'hexaréline	47
2.2. Action physiologique de l'hexaréline	47
2.3. Les analogues de l'hexaréline	49
2.4. Le but du travail	51

CHAPITRE 2: PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.

COMPARISON OF SELECTIVITIES OF CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS, MICELLAR CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND REVERSED-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN THE SEPARATION OF HEXARELIN ANALOGS AS PEPTIDIC GROWTH HORMONE SECRETAGOGUES	53
Abstract	54
1. Introduction	55
2. Experimental	56
2.1. Chemicals	56
2.2. Equipment	56
2.2.1. CE apparatus	56
2.2.2. HPLC apparatus	57
2.3. Buffer / sample preparations	57
2.3.1. TEAP buffer preparation	57
2.3.2. Peptide sample preparation	58
2.3.3. Effect of buffer concentration and pH	58
2.3.4. Effect of organic modifiers	58
2.4. Effect of surfactant nature and concentration	58
3. Results	59
3.1. Optimization of separation conditions	59
3.1.1. Effect of buffer concentration for CZE.	59
3.1.2. Effect of buffer pH for CZE	59
3.2. Effect of organic solvents	60
3.3. Reproducibility assays	61
3.4. Effect of Tween 20 in MECC.	61
3.5. Effect of Triton X-100 R in MECC.	62
3.6. Effect of octylglucoside in MECC	62

3.7. Chromatographic separation of the peptides	63
4. Discussion	64
5. References	74
CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE	77
BIBLIOGRAPHIE	82

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Tableau I. Application d'EC à l'analyse des peptides	36
Tableau II. Les analogues de l'hexaréline sélectionnés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.	50

CHAPITRE 2: PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Table I. Chemical structure, charge, and hydrophobicity index of hexarelin analogs	71
Table II. Resolution values of the peptides by MECC and HPLC systems	72
Table III. Migration times of hexarelin analogs and coefficient of correlation with different separation systems	73

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Figure 1	Représentation schématique d'un système d'électrophorèse capillaire	4
Figure 2	Représentation schématique du phénomène de l'électromigration	8
Figure 3	Représentation schématique du principe de séparation électrophorétique des cations selon charge et taille	10
Figure 4	Représentation schématique du développement de l'électro-osmose	12
Figure 5	Représentation graphique de la variation du flux électro-osmotique en fonction du pH du solvant	14
Figure 6	Représentation schématique de la migration des substances chargées et neutres en électrophorèse capillaire	16
Figure 7	Représentation schématique de l'électrophorèse capillaire de zone	26
Figure 8	Représentation schématique de la chromatographie électrocinétique micellaire	28
Figure 9	Représentation schématique de l'électrophorèse capillaire sur gel	30
Figure 10	Représentation schématique de la focalisation isoélectrique capillaire	31
Figure 11	Représentation schématique de l'isotachophorèse anionique	33
Figure 12	Représentation schématique de l'électrochromatographie capillaire	34

Figure 13	Représentation structurale des molécules de l'hexaréline et de GHRP-6	48
CHAPITRE 2: PRÉSENTATION DE L'ARTICLE		
Figure 1	Optimization of the separation conditions of hexarelin analogs A- Influence of TEAP concentration on migration time B- Influence of TEAP pH on migration time	68
Figure 2	Electrophoregram of the seven peptides under the optimized separation conditions	69

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES

ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
CECM	chromatographie électrocinétique micellaire
CMC	concentration micellaire critique
CTAB	bromure de cétyle triméthyle ammonium
CD	cyclodextrine
EC	électrophorèse capillaire
ECC	électrochromatographie capillaire
ECG	électrophorèse sur gel
ECZ	électrophorèse capillaire de zone
EZHP	électrophorèse de zone à haute performance
FIC	focalisation isoélectrique capillaire
GHRP-6	growth hormone releasing peptide-6
HEX	hexaréline
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
ITP	isotachophorèse
MeOH	méthanol
PFTE	polytétrafluoréthylène
RP-HPLC	chromatographie liquide à haute performance en phase inversée
SDS	sodium dodécyl sulfate
SiO ⁻	groupement silanol
TEA	triéthylammonium
TEAP	phosphate triéthylammonium
Trp	tryptophane
UV	ultraviolet

α	sélectivité ou facteur de séparation
$^{\circ}\text{C}$	degré celcius
cm	centimètre
D	coefficient de diffusion du soluté
Δt_m	différence de temps de migration
E	champ électrique
ε	constante diélectrique du solvant
ε_0	permittivité du vide
F_E	force électrique
F_F	force de friction
fM	femtomolaire
g	gramme
H	hauteur de plateau théorique
K	coefficient de distribution du soluté entre les deux phases
K'	facteur de capacité
KV	kilovolt
L_d	longueur du capillaire du point d'injection au détecteur
L_t	longueur totale du capillaire
M	molaire
MM	masse moléculaire
m	milli
mg	milligramme
mL	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
min	minute
μ	micron
μA	microampère
μ_{app}	mobilité apparente
μ_{eo}	mobilité électroosmotique

μ_{ep}	mobilité électrophorétique
μm	micromètre
N	nombre de plateau théorique
n	nombre de pic
nL	nanolitre
η	viscosité
pH	potentiel hydrogène
pI	point isoélectrique
pK_a	potentiel de constante de dissociation
%	pourcent
q	charge électrique d'un ion
r	rayon ionique
R_s	facteur de résolution
σ	déviati on standard autour de la vitesse de migration
t_{app}	temps de migration apparente
t_{eo}	temps de migration du marqueur
t_m	temps de migration
t_{mic}	temps de migration des micelles
t_s	temps de migration des solutés
t_s^*	temps de migration des solutés en présence de micelles
ζ	potentiel zé ta
V	voltage appliqué
V_{app}	vitesse apparente
V_{aq}	volum e de phase aqueuse
V_{eo}	vitesse électroosmotique
V_{ep}	vitesse électrophorétique
V_m	vitesse de migration
V_{mic}	vitesse des micelles
V_{mic}	volum e de la phase micellaire
ω_b	largeur du pic à la base

REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer ma reconnaissance à mon directeur de recherche, le Docteur Albert Adam pour sa confiance, son soutien, et surtout, pour sa très grande patience tout au long de ce travail. Je tiens aussi à remercier mon codirecteur, le Docteur Huy Ong pour son aide et son soutien dans la réalisation de ce projet.

Qu'il me soit permis de remercier sincèrement le Docteur Karen Waldron pour les discussions relatives à mon travail de recherche.

Ma gratitude va également à mes collègues de laboratoire, et, plus particulièrement Marie Roumi, Mélanie Dubuc, Marie-Josée Dumoulin et Jean-Jacques Rondeau pour leurs encouragements.

Enfin, j'aimerais remercier la compagnie Europeptides qui nous a fourni l'hexaréline et ses analogues nécessaires à nos recherches.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1 - L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

1.1 L'électrophorèse capillaire: sa place dans les techniques électrophorétiques

L'électrophorèse, définie comme une migration différentielle des substances chargées sous l'effet d'un champ électrique, a été réalisée pendant très longtemps et encore actuellement, sur différents types de supports: papier, acétate de cellulose, gel d'agarose ou gel d'acrylamide (1). Elle a été introduite pour la première fois par Tiselius en 1937 (2). Les phénomènes de convection et de diffusion thermique en ont longtemps limité les performances de séparation. En plus, les supports comme le papier ou la cellulose peuvent interagir avec les espèces à séparer, et donc interférer dans les phénomènes électrophorétiques (3). En outre, le temps de séparation est variable et dépend du support utilisé. Dans sa forme classique, l'électrophorèse est difficilement automatisable (4).

Différentes solutions ont été proposées pour améliorer l'électrophorèse classique: introduction de tubes plutôt que de gels sur plaque par Martin en 1942 (5), isotachophorèse ou électrophorèse de déplacement avec la détection directe par absorption UV des zones séparées décrite par Everaerts en 1964 (6), migration électrophorétique réalisée dans un capillaire de 200 à 500 μm effectuée par Virtenan en 1974 (5). Cette dernière méthode de séparation a été couplée à un mode de détection par potentiométrie.

En 1980, Mikkers a décrit une "électrophorèse de zone à haute performance" (EZHP). Il a réalisé la séparation de 16 acides aminés dans un tube en polytétrafluoréthylène (PTFE) de 200 μm de diamètre. La détection des espèces séparées était également obtenue par absorption en UV (7).

D'autre part, Jorgenson et Lukac en 1981, ont employé les tubes capillaires en silice fondue de 75 μm de diamètre interne, avec une détection par fluorescence (8,9). Ces derniers auteurs ont ainsi lancé les bases analytiques et instrumentales de l'électrophorèse capillaire (EC) telle que nous la connaissons actuellement.

La miniaturisation d'EZHPC s'est effectuée parallèlement à celle de la chromatographie à haute performance. Ces développements techniques ont abouti à des méthodes hybrides. Ainsi, en 1984, Térabé a proposé la chromatographie électrocinétique micellaire (CECM) pour la séparation des espèces chargées et neutres en utilisant les micelles comme pseudo-phases (10). De même d'autres auteurs comme Knox et Grant (11) ont introduit la notion d'électrochromatographie capillaire (ECC) en utilisant comme support les capillaires remplis de microparticules de silice.

1.2 L'électrophorèse capillaire: instrumentation et fonctionnement

Un système d'électrophorèse capillaire est composé principalement d'un capillaire de séparation, d'une alimentation électrique, d'un dispositif d'injection et d'un détecteur (12). (figure 1)

1.2.1 Le capillaire de séparation

Les capillaires de séparation ont un diamètre intérieur compris entre 25 et 200 μm , et une longueur variant de 20 à 100 cm. Le matériau le plus utilisé est la silice fondue (13). Les tubes en verre borosilicaté et les polymères (polytétrafluoréthylène et fluoréthylènepropylène) sont rarement employés (14).

Le capillaire est rempli avec l'électrolyte de séparation. Les extrémités sont immergées dans deux récipients contenant le même électrolyte, et recevant les électrodes à haut voltage (15). Les électrodes sont généralement en platine.

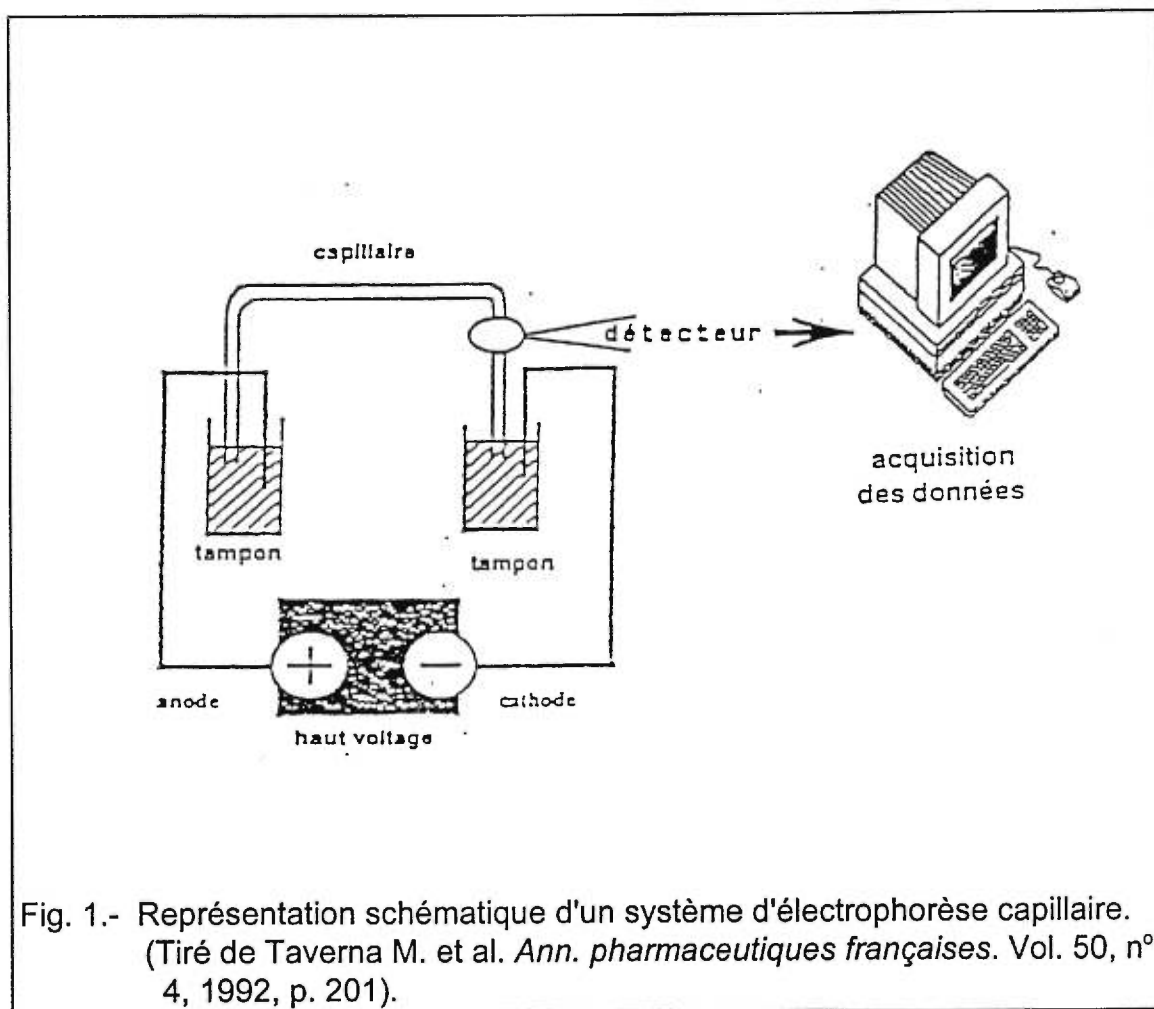


Fig. 1.- Représentation schématique d'un système d'électrophorèse capillaire.
(Tiré de Taverna M. et al. *Ann. pharmaceutiques françaises*. Vol. 50, n° 4, 1992, p. 201).

1.2.2 L'alimentation électrique

L'alimentation électrique génère une différence de potentiel pouvant atteindre jusqu'à 30 KV, et des courants de 100 à 200 μ A (10,16,17).

1.2.3 L'injection de l'échantillon

L'injection de l'échantillon (1-20 nL) peut être effectuée soit de façon mécanique (par gravité ou injection pneumatique), soit par électro-injection (18).

a) *Injection par gravité*

Dans ce type d'injection, l'échantillon est injecté en surélevant le récipient contenant l'échantillon à un niveau supérieur à celui du réservoir de l'électrolyte de séparation, situé à la sortie du capillaire (19,20,21).

b) *Injection pneumatique*

L'introduction de l'échantillon est réalisé en appliquant une suppression de gaz inerte au niveau du récipient contenant l'échantillon, ou une dépression sur le réservoir du tampon de travail à la sortie du capillaire (22).

c) *Électro-injection*

Cette méthode d'injection se déroule comme suit : l'électrode et l'extrémité d'entrée du capillaire sont retirées du tampon d'analyse et immergées dans l'échantillon. Une tension est appliquée pour une durée déterminée. Après interruption de cette tension, l'extrémité du capillaire et l'électrode sont retirées de l'échantillon et immergées de nouveau dans l'électrolyte de travail (8,9,17,23).

1.2.4 La détection

a) *Absorptiométrie*

La mesure de l'absorption (UV-visible) est effectuée directement à travers le capillaire. La cellule de détection est formée par combustion après retrait de la gaine souple entourant le capillaire, sur une section de 1 cm de longueur et située à environ 15 cm de l'extrémité du capillaire (10,24).

b) *Fluorimétrie*

La détection par fluorescence implique l'utilisation d'un fluorimètre à source laser. Les faisceaux d'excitation et d'émission sont acheminés par des fibres optiques (25,26).

c) *Conductimétrie*

Dans ce mode de détection, le signal obtenu est proportionnel à la différence de conductivité entre l'échantillon et l'électrolyte (27).

d) *Réfractométrie*

La détection est fondée sur la mesure de l'angle de déviation d'un faisceau laser, résultant d'une variation d'indice de réfraction(28).

e) *Électrochimie*

L'extrémité du capillaire constitue la cellule de détection. Celle-ci est transformée en une cellule électrochimique. Le capillaire de détection est séparé du capillaire de séparation par une jonction poreuse (fracture dans la paroi du capillaire). La cellule électrochimique est constituée principalement d'une électrode de travail (fibre de carbone), d'une électrode de référence, d'une lame microscopique, et d'un micromanipulateur (29).

f) *Spectrométrie de masse*

Le couplage de l'EC avec un spectromètre de masse est relativement aisé dû à l'utilisation des capillaires et l'existence d'un écoulement électroosmotique. L'introduction de l'échantillon se fait par électro-nébulisation (30,31).

1.2.5 La migration électrophorétique

L'échantillon à séparer est injecté à l'extrémité opposée du détecteur (du côté de l'anode). L'application d'un champ électrique à travers le capillaire

produit une migration des différentes espèces chimiques au sein de l'électrolyte. Les divers constituants se séparent en fonction de leurs vitesses de migration à un pH déterminé (32).

Chaque substance est détectée à proximité de l'extrémité du capillaire opposée au site d'injection (cathode). La réponse du détecteur en fonction du temps fournit un électrophorégramme composé de pics (33). Les espèces chimiques sont identifiées par leurs temps de migration.

La surface sous la courbe des différents pics est quantitativement proportionnelle à la quantité injectée.

1.3 L'électrophorèse capillaire : bases physico-chimiques

1.3.1 L'électro-migration

a) Définition

Sous l'application d'un champ électrique, toute espèce chimique électriquement chargée (anion ou cation), se déplace avec une vitesse linéaire appelée vitesse de migration électrophorétique, donnée par la relation (32) :

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E$$

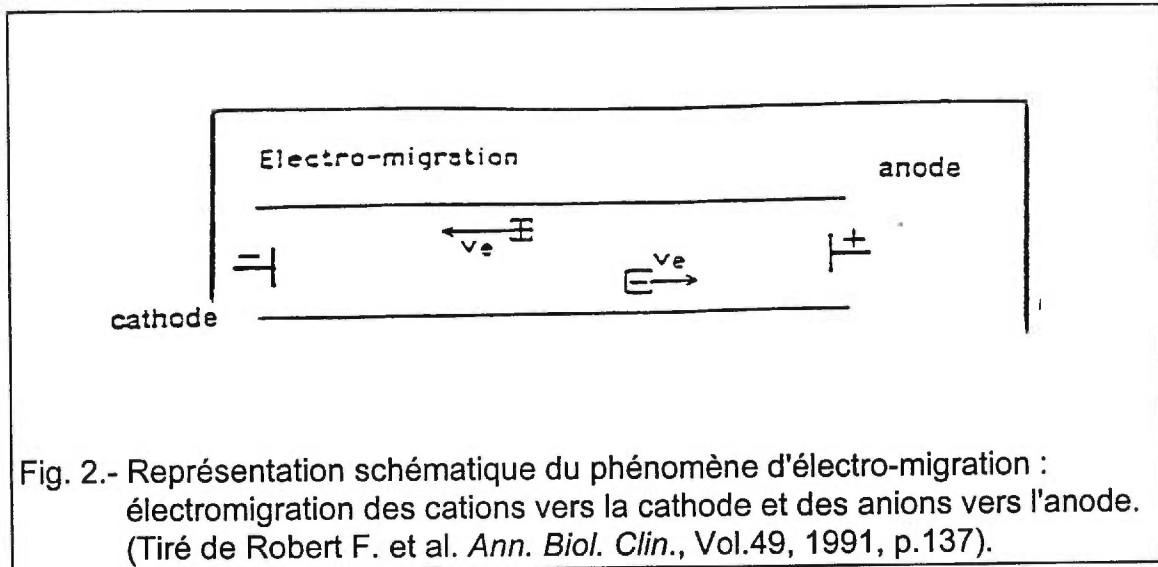
(Eq . 1)

où : v_{ep} = vitesse de migration électrophorétique de l'ion (cm/sec.)

μ_{ep} = mobilité électrophorétique (cm²/volt.sec).

E = champ électrique (Volt/cm.)

Chaque ion migre vers l'électrode de charge opposée. Ce mouvement s'effectue dans le sens du champ électrique E pour les cations (vers la cathode) et dans le sens opposé pour les anions (vers l'anode) (Figure 2).



b) *La mobilité électrophorétique*

La mobilité électrophorétique (μ_{ep}) est une constante caractéristique de chaque ion dans un milieu à pH donné . Elle est déterminée par la force électrique de l'ion et la force de friction du milieu :

$$\mu_{ep} = \frac{\text{Force électrique (F}_E\text{)}}{\text{Force frictionnelle (F}_F\text{)}} \quad (\text{Eq .2})$$

La force électrique et la force de friction se définissent respectivement comme:

$$F_E = q \cdot E \quad (\text{Eq .3})$$

$$F_F = -6\pi\eta r v \quad (\text{Eq .4})$$

où q = charge de l'ion

η = viscosité du milieu

r = rayon ionique

v = vitesse de l'ion

Pendant l'électrophorèse un équilibre s'établit entre la force électrique et la force de friction, les forces de sens opposé s'équilibrent ainsi:

$q \cdot E = 6 \pi \eta r v$ donc:

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \pi \eta r} \quad (\text{Eq. 5})$$

Portant la vitesse (v) dans l'équation 1, on obtient la valeur de la mobilité électrophorétique (33) :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 \pi \eta r} \quad (\text{Eq. 6})$$

c) *Caractéristiques de la mobilité électrophorétique*

La mobilité électrophorétique possède plusieurs caractéristiques: elle est proportionnelle à la charge du composé et inversement proportionnelle à sa taille. Ainsi, les molécules les plus chargées de petites tailles possèdent une mobilité électrophorétique plus importante que les molécules de grandes tailles. Ces dernières migrent lentement et sont détectées en dernier (figure 3) (32).

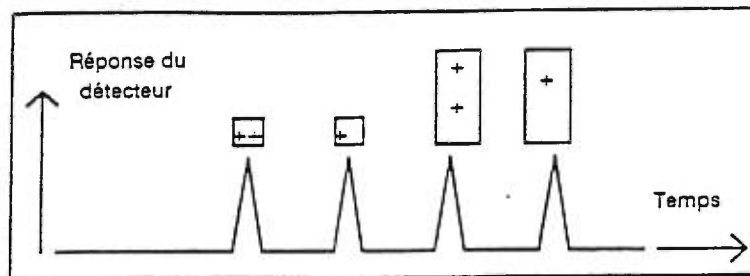


Fig.3 .- Représentation schématique du principe de séparation électrophorétique des cations selon leur charge et leur taille. (Tiré de Methods In Molecular Biology; Vol 52: *Capillary Electrophoresis Guidebook*. Altria KD. ed. Copyright Humana Press Inc., Totawa, NJ. 1996, p. 5)

La mobilité électrophorétique est une constante physique déterminée lorsque la substance possède une charge définie à dilution infinie. Cette *mobilité absolue* diffère de celle déterminée expérimentalement, appelée *mobilité effective*.

Lorsqu'une espèce en solution existe sous plusieurs formes ioniques avec différentes mobilités absolues, la mobilité effective se déduit par la somme de ses mobilités absolues. En fait, la mobilité électrophorétique effective dépend du pH, de la présence d'agents complexants, de la force ionique du milieu et de la nature du solvant (viscosité, solvation). Elle est indépendante du voltage appliqué et de la longueur de la colonne (34).

1.3.2 L'électroosmose

a) Définition

L'électroosmose est un phénomène de transport des molécules de solvants. Les parois internes des capillaires en silice sont chargées négativement due à l'ionisation des groupements silanols (SiO^-) situés à l'intérieur de la paroi du capillaire. Les charges négatives attirent les cations présents dans le solvant provoquant ainsi la formation d'une couche cationique stagnante adjacente à la paroi du capillaire. La double couche de charges respectivement négatives et positives formée à la surface de la paroi du capillaire présente une différence de potentiel appelée potentiel zéta (9,35,36).

À la couche cationique stagnante, liée aux groupements silanols de la paroi, se superpose vers le centre du capillaire une deuxième couche cationique diffuse et mobile. Lors de l'application d'un champ électrique, cette deuxième couche cationique diffuse se met en mouvement vers la cathode, entraînant des molécules de solvant avec elle. Cette migration cathodique de la couche cationique diffuse est appelée flux électroosmotique (figure 4).

Le flux électroosmotique possède une vitesse linéaire appelée vitesse électroosmotique qui est proportionnelle au champ électrique appliqué (E), et à la mobilité électroosmotique (μ_{eo}).

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E$$

(Eq. 7)

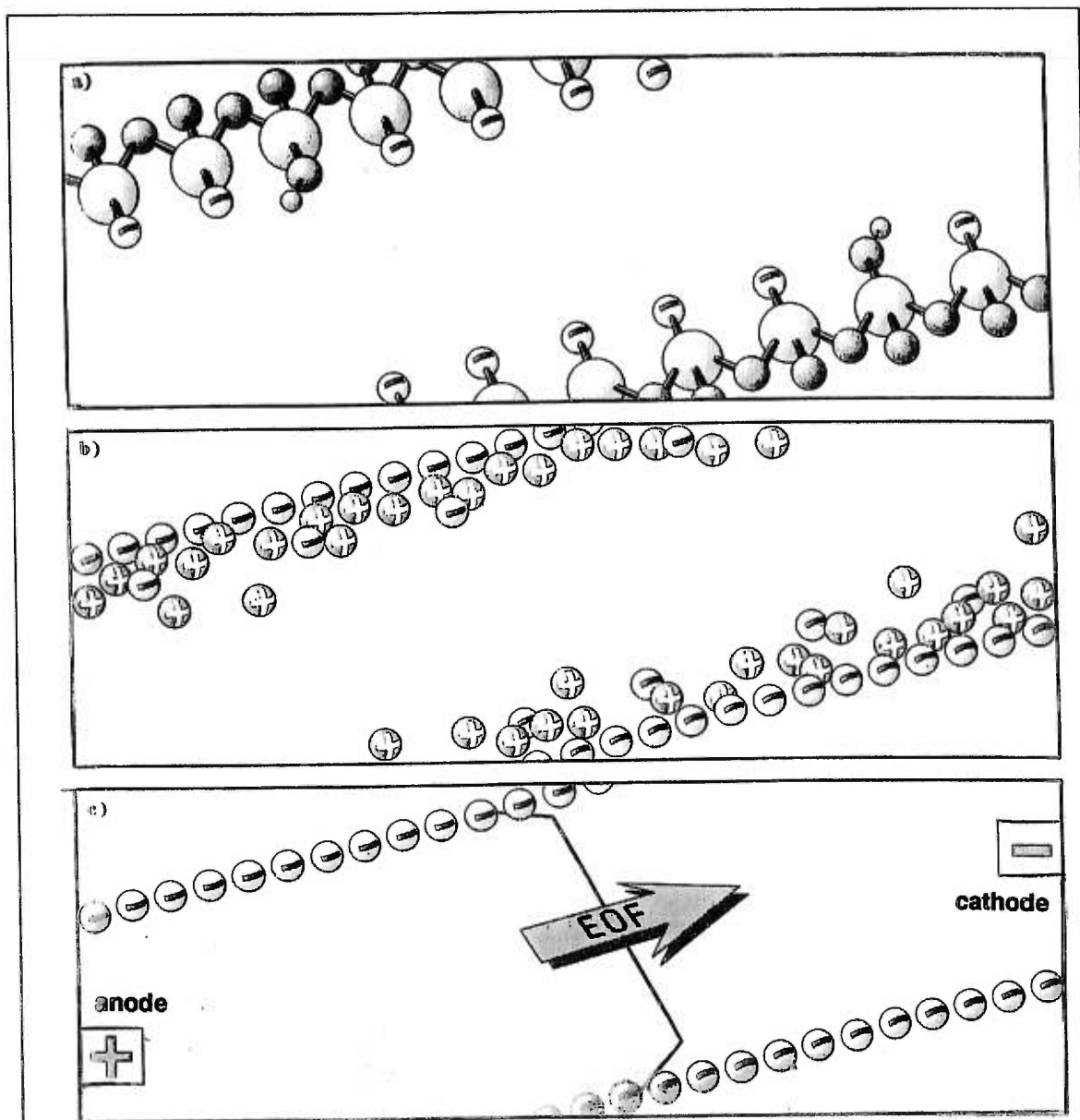


Fig. 4.- Représentation schématique du développement de l'électro-osmose:
 a) Ionisation des groupements silanols à l'intérieur de la paroi du capillaire et formation de charges négatives
 b) Formation d'une couche cationique stagnante adjacente à la paroi du capillaire
 c) Mouvement des cations excédentaires de la couche diffuse du solvant en direction de la cathode

(Tiré de *High Performance Capillary Electrophoresis: An Introduction*. 2nd edition. Hewlett-Packard Company. 1992, p.17).

b) *La mobilité électroosmotique*

La mobilité électroosmotique est directement proportionnelle au potentiel zéta (ζ), à la constante diélectrique du solvant (ϵ), et à la permittivité du vide (ϵ_0) dont la valeur est égale à $8.85 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \text{m}^{-2}$. La mobilité électroosmotique est inversement proportionnelle à la viscosité du solvant (η) (37).

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta \epsilon_0}{\eta}$$

(Eq.8)

c) *Caractéristiques de la mobilité électroosmotique*

Différent paramètres influencent la mobilité électroosmotique:

- i) Le pH : la μ_{eo} est dépendante du pH de l'électrolyte car le potentiel zéta est essentiellement déterminé par l'ionisation des groupements silanols. À pH élevé les groupements silanols sont ionisés et le flux électroosmotique augmente fortement. À pH inférieur à 4, l'ionisation est faible et le flux électroosmotique non-significatif (figure 5) (38,39).

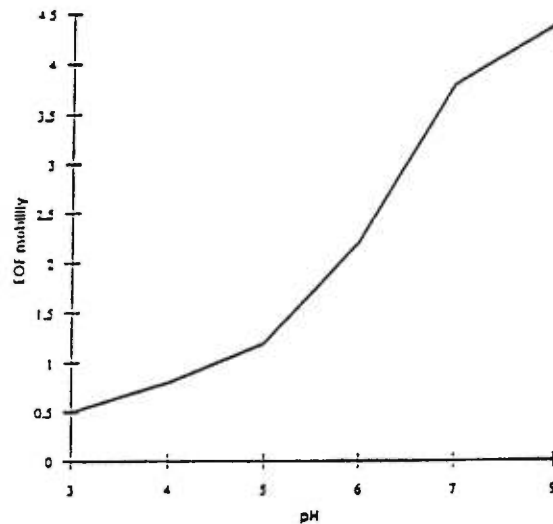


Fig. 5.- Représentation graphique de la variation du flux électroosmotique en fonction du pH du solvant de migration.
(Tiré de *Methods In Molecular Biology*; Vol 52: *Capillary Electrophoresis Guidebook*. Altria KD. ed. Copyright Humana Press Inc., Totawa, NJ.1996, p. 5).

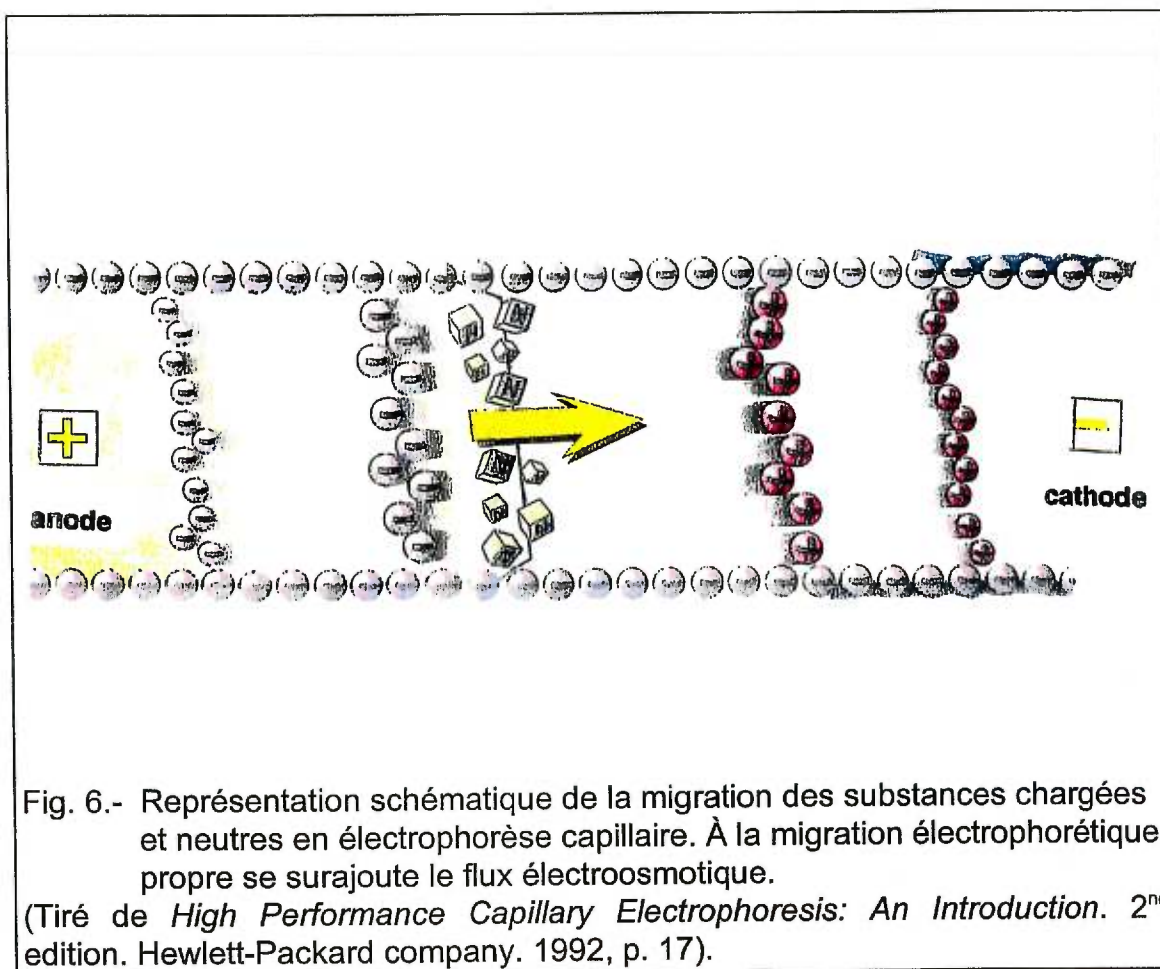
- ii) La nature et la concentration des ions de l'électrolyte de travail : lorsque la force ionique augmente, le potentiel zéta et la mobilité électroosmotique diminuent (38,40).
- iii) La température: le flux électroosmotique est proportionnel à la température (41).
- iv) L'addition de solvants organiques: les solvants organiques modifient la viscosité, le potentiel zéta, et la constante diélectrique du milieu. Le flux électroosmotique est donc diminué (39).
- v) L'état chimique de la surface interne du capillaire: l'électroosmose est spécifique aux capillaires de silice fondue. Le traitement interne de la paroi du capillaire par différents agents comme le polyacrylamide ou le polyéthylèneglycol peut diminuer, même supprimer le flux électroosmotique.

Les agents cationiques comme le bromure de cétyle triméthyle ammonium inversent le flux électroosmotique (42,43).

Le flux électroosmotique entraîne le mouvement des différentes espèces chimiques dans la même direction indépendamment de leur charge. Donc, sous l'influence du flux électroosmotique les espèces chimiques chargées positivement et négativement migrent dans la même direction.

Dans le cas où le capillaire est chargé négativement le flux électroosmotique migre vers la cathode. Les anions vont ainsi migrer vers la cathode car la mobilité électroosmotique (μ_{eo}) est supérieure à leur propre mobilité électrophorétique (μ_{ep}). Donc les cations, anions et les particules neutres vont migrer dans une seule direction.

Les cations migrent en premier car ils sont chargés positivement, les substances neutres accompagnent le flux électroosmotique. En dernier, arrivent les anions chargés négativement, emportés malgré eux, car la μ_{eo} est supérieure à la μ_{ep} (figure 6) (44) .



Ainsi la migration apparente d'un soluté est la somme de la mobilité électrophorétique du soluté et de la mobilité électroosmotique (15) :

$$\mu_{\text{apparente}} = \mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{eo}} \quad (\text{Eq. 9})$$

La mobilité électroosmotique peut être calculée expérimentalement en mesurant le temps de migration que met un traceur neutre comme l'oxyde de mesytle (45), la pyridine, ou le benzène (14). La migration de celle-ci est égale à la mobilité électroosmotique.

1.4 L'électrophorèse capillaire : paramètres analytiques

Les paramètres analytiques fondamentaux caractérisant l'EC trouvent leur origine dans la théorie caractérisant la séparation par chromatographie sur colonne. La discussion qui suit s'applique tant à l'ECZ qu'à la CECM.

1.4.1 Le temps de migration et la mobilité électrophorétique

Le temps de migration (t_m) est le temps nécessaire pour qu'un soluté migre du point d'injection au point de détection. Dans le cas de séparation électrophorétique en présence d'un flux électroosmotique on peut définir une vitesse globale de migration (v_m) :

$$v_m = v_{eo} + v_{ep} = (\mu_{eo} + \mu_{ep}) \cdot E \quad (\text{Eq. 10})$$

où v_{eo} = vitesse du flux électroosmotique (cm/sec.)

v_{ep} = vitesse effective du soluté (cm/sec.)

Ainsi le temps de migration sera égal à :

$$t_m = \frac{L_d}{v_m} \quad (\text{Eq. 11})$$

où L_d est la distance du capillaire de l'injecteur au détecteur (cm).

En remplaçant v_m par sa valeur on obtient:

$$t_m = \frac{L_d}{(\mu_{eo} + \mu_{ep}) \cdot E} \quad (\text{Eq.12})$$

Or $E = \frac{V}{L_t}$ où V représente le voltage appliqué et L_t la longueur totale du capillaire.

Ainsi t_m s'écrit :

$$t_m = \frac{L_d \cdot L_t}{(\mu_{eo} + \mu_{ep}) \cdot V} \quad (\text{Eq.13})$$

Comme on l'a vu, la μ_{eo} peut être déterminée expérimentalement en utilisant un marqueur neutre:

$$\mu_{eo} = \frac{V_{eo}}{E} \quad (\text{Eq.14})$$

La *vitesse électroosmotique* (v_{eo}) est donnée par la relation :

$$v_{eo} = \frac{L_d}{t_{eo}}$$

où t_{eo} est égal au temps de migration du marqueur. Donc:

$$\mu_{eo} = \frac{L_d \cdot L_t}{t_{eo} \cdot V} \quad (\text{Eq.15})$$

La mobilité apparente (μ_{app}) est déterminée de la façon suivante:

$$\mu_{app} = \frac{V_{app}}{E} \quad (\text{Eq.16})$$

La vitesse apparente (v_{app}) est égale à :

$$V_{app} = \frac{L_d}{t_{app}}$$

où t_{app} est égal au temps de migration observé pour la substance à séparer.

Donc:

$$\mu_{app} = \frac{L_d \cdot L_t}{t_{app} \cdot V} \quad (\text{Eq.17})$$

Connaissant les paramètres expérimentaux de L_d , L_t , t_{eo} , t_{app} , μ_{eo} et μ_{app} , on peut calculer la mobilité effective (μ_{ep}) (46,47) :

$$\mu_{ep} = \mu_{app} - \mu_{eo} = \frac{L_d \cdot L_t}{V} \left(\frac{1}{t_{app}} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \quad (\text{Eq.18})$$

Dans le cas de la CECM, le temps de migration (t_s^*) d'un soluté neutre est représenté par :

$$t_s^* = \frac{L_d}{V_s^*} \quad (\text{Eq.19})$$

avec la vitesse de migration (v_s^*) donnée par:

$$v_s^* = \frac{1}{1+K'} \cdot v_{eo} + \frac{K'}{1+K'} \cdot v_{mic}^* \quad (\text{Eq. 20})$$

où : v_{mic}^* est égale à la vitesse de migration des micelles, tandis que K' représente le facteur de capacité, c'est à dire le rapport entre la quantité de soluté incorporée dans la phase micellaire et la quantité présente dans la phase aqueuse.

$$K' = K \cdot \frac{V_{mic}}{V_{aq}} \quad (\text{Eq. 21})$$

K = coefficient de distribution du soluté entre les 2 phases.

V_{mic} = volume de la phase micellaire.

V_{aq} = volume de la phase aqueuse.

Le temps de migration des micelles (t_{mic}^*) est donné par:

$$t_{mic}^* = \frac{L_d}{v_{mic}^*} \quad (\text{Eq. 22})$$

En remplaçant v_s^* , v_{eo} , et v_{mic}^* par leurs valeurs, on obtient la relation suivante: (48,49).

$$t_s^* = \frac{(1+K') \cdot t_{eo}}{1 + \frac{t_{eo}}{t_{mic}^*} \cdot K'} \quad (\text{Eq. 23})$$

Pour un soluté chargé, la vitesse de migration globale (v^{*}) s'écrit:

$$v_s^{*'} = \frac{1}{1+K'} \cdot (v_{eo} + v_{ep}) + \frac{K'}{1+K'} \cdot v_{mic}^* \quad (\text{Eq. 24})$$

On obtient ainsi (50) :

$$t^{*'}_s = \frac{(1 + K') t_s}{1 + \frac{t_s}{t^{*}_{mic}} \cdot K'} \quad (\text{Eq. 25})$$

où t_s représente le temps de migration du soluté en absence de tensioactif, donné par la relation : $t_s = L_d/v_m$.

L'équation (25) qui représente *le temps de migration d'un soluté chargé* ($t^{*'}_s$) est identique à l'équation (23) qui *donne le temps de migration d'une substance neutre* (t^*_s), si l'on remplace t_{e0} par t_s .

Quand le soluté n'interagit pas avec les micelles, $K'=0$, le temps de migration du soluté sera donc égal à t_{e0} . Au contraire, quand le soluté est totalement incorporé dans la micelle, K' est égal à l'infini et le temps de migration sera donné par $t^*_s = t^*_{mic}$.

Par contre, quand l'électroosmose est supprimée, t_{e0} est égal à l'infini et t^*_s devient :

$$t^*_s = \left(1 + \frac{1}{K'}\right) \cdot t^*_{mic} \quad (\text{Eq. 26})$$

Dans ce cas, la phase aqueuse reste dans la colonne et les micelles migrent par leur mobilité électrophorétique propre.

Finalement, pour t_{mic}^* infini (phase micellaire immobile), la valeur absolue de la vitesse du flux électroosmotique est identique à celle de la phase micellaire en sens opposé, t_s^* s'écrit ainsi:

$$t_s^* = (1+K') \cdot t_{eo} \quad (\text{Eq. 27})$$

Cette situation est identique à la chromatographie traditionnelle à haute performance (51).

1.4.2 L'efficacité de la séparation électrophorétique

L'efficacité caractérise les phénomènes de dispersion rencontrés dans le processus de séparation. La séparation en EC est basée sur la différence de mobilité des solutés. Ces espèces chimiques migrent sous forme de zones, et le processus de dispersion est représenté par la largeur de ces zones. Cette dispersion résulte d'une différence de vitesse de migration à l'intérieur d'une zone (52).

Pour un pic gaussien on peut définir la dispersion comme suit :

$$\omega_b = 4 \sigma \quad (\text{Eq. 28})$$

où ω_b mesure la largeur du pic à la base, et σ représente la déviation standard autour de la vitesse de migration de la zone considérée.

L'efficacité de la séparation électrophorétique est évaluée au moyen du nombre de plateaux théoriques (N) et de la hauteur (H) de ces plateaux théoriques. ces paramètres sont respectivement définis par (33):

$$N = \left(\frac{L_d}{\sigma} \right)^2 \quad \text{et} \quad H = \frac{1}{N} \quad (\text{Eq. 29})$$

Lorsque la séparation capillaire est réalisée sous des conditions idéales, la dispersion de zone consiste en une diffusion longitudinale. L'efficacité peut ainsi être reliée à la diffusion moléculaire à partir de la loi d' Einstein:

$$\sigma^2 = 2 D t_m \quad (\text{Eq. 30})$$

où D = coefficient de diffusion du soluté (cm^2/sec)

t_m = temps de migration du soluté (sec)

L'expression fondamentale du nombre de plateaux théoriques devient donc (44,52):

$$N = \frac{L_d^2}{2 D t_m} = \frac{L_d^2}{2D(L_d^2/(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \cdot V)} = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \cdot V}{2D} \quad (\text{Eq. 31})$$

Le nombre de plateaux théoriques d'un électrophorégramme peut plus simplement être calculé par mesure de la déviation standard d'un seul pic (σ) et la largeur à la base (ω_b) (33) :

$$N = \frac{t_m^2}{\sigma^2} = 16 \left(\frac{t_m}{\omega_b} \right)^2 \quad (\text{Eq. 32})$$

Cependant d'autres facteurs que la diffusion longitudinale influencent l'efficacité de la séparation. Ainsi, la hauteur de plateaux théorique est la somme de plusieurs paramètres tels : la diffusion axiale, la résistance au transfert de masse, le gradient de température, l'interaction éventuelle avec la

paroi du capillaire, et les effets de l'injection et de détection qui correspondent respectivement aux volumes d'injection de l'échantillon et de la cellule de détection (53,54). Dans le cas de la CECM, il faut ajouter la résistance au transfert de masse en phase pseudo-stationnaire, en phase intermicellaire et la polydispersité des micelles qui correspond aux fluctuations de leur nombre d'agrégation (55).

1.4.3 La résolution

Le *facteur de résolution* (R_s) exprime l'efficacité de séparation entre deux composés. Le facteur de résolution est défini par le rapport entre la différence des temps de migration (t_1 et t_2) de deux espèces chimiques, et la moyenne des largeurs des pics à la base ($\omega_1 + \omega_2$). Celle-ci est égale à quatre fois σ :

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{1/2 (\omega_1 + \omega_2)} = \frac{\Delta t_m}{4\sigma_t} \quad (\text{Eq. 33})$$

$$\text{avec } \sigma_t^2 = \frac{t_m^2}{N} \quad (\text{Eq. 34})$$

La *résolution* peut être déterminée également par la formule :

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{\Delta\mu_{ep}}{\mu_{ep} + \mu_{eo}} \right) \cdot N^{1/2} \quad (\text{Eq. 35})$$

En CECM, la résolution R_s est définie de la façon suivante:

$$R_s = \frac{N^{1/2}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{K'_2}{1 + K'_2} \right) \cdot \left(\frac{1 - t_{eo}/t^*_{mic}}{1 + (t_{eo}/t^*_{mic}) \cdot K'_1} \right) \quad (\text{Eq. 36})$$

α = sélectivité ou facteur de séparation défini par le rapport entre k'_2 et k'_1 .

k'_1 et k'_2 sont les facteurs de capacité des composés 1 et 2 représenté par la formule ($k' = K \cdot V_{mic} / V_{aq}$) (Eq. 21) (50,56).

1.4.4 La capacité des pics

Le nombre de pics (n) qu'on peut séparer dans un intervalle de temps donné avec une résolution maximale, est défini comme la capacité de pics. En CECM, ce terme est intéressant pour déterminer le nombre de pics séparés dans un interval de temps entre t_{eo} et t^*_{mic} . Le nombre de pics correspond à (52,57):

$$n = 1 + \frac{N^{1/2}}{4} \log_e \left(\frac{t^*_{mic}}{t_{eo}} \right) \quad (\text{Eq.37})$$

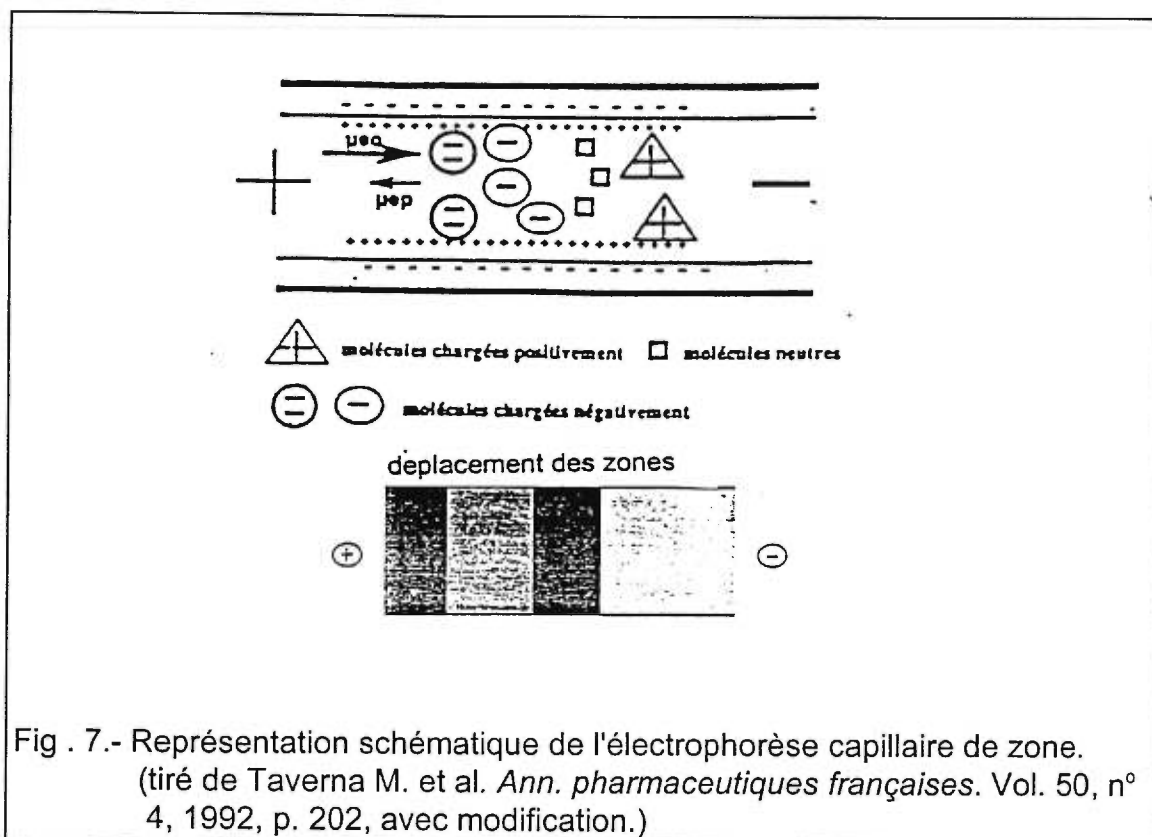
1.5 L'électrophorèse capillaire : les variantes

Il existe plusieurs variantes de l'EC. Les principales peuvent être résumées de la façon suivante.

1.5.1 L'électrophorèse capillaire de zone (ECZ)

a) Définition

L' électrophorèse capillaire de zone est la technique la plus simple d'EC (12,58). Elle permet la séparation des substances chargées (34). Les espèces chimiques migrent sous forme de zones distinctes à des vitesses différentes en fonction du rapport charge sur masse (figure 7).



b) Mécanisme de séparation

Dans ce type d'EC, il faut tenir compte du flux électroosmotique. Ainsi, si le tampon est à pH acide, les molécules chargées positivement migreront vers la cathode; leur vitesse sera proportionnelle à leur charge. Par contre si le pH est basique, les molécules seront chargées négativement et attirées vers l'anode. Comme le flux électroosmotique est supérieur à la vitesse électrophorétique de chaque molécule (8,59), ces dernières se déplaceront vers la cathode et la séparation sera alors fonction de la résistance au flux électroosmotique. Cette résistance est proportionnelle à l'importance des charges négatives de ces molécules.

c) Limitations de l'ECZ

La principale limitation de l'ECZ est qu'elle ne permet pas la séparation des espèces non-chargées, car quelque soit le pH de l'électrolyte les molécules ne

seront pas chargées et migreront ensemble sous l'effet du flux électroosmotique (12,33).

1.5.2 La chromatographie électrocinétique micellaire (CECM)

a) *Définition*

Ce type d'EC a été introduit pour la séparation des molécules non-chargées. En effet, elle permet de séparer non seulement les molécules chargées mais aussi les substances non-chargées en fonction de leur hydrophobie (10).

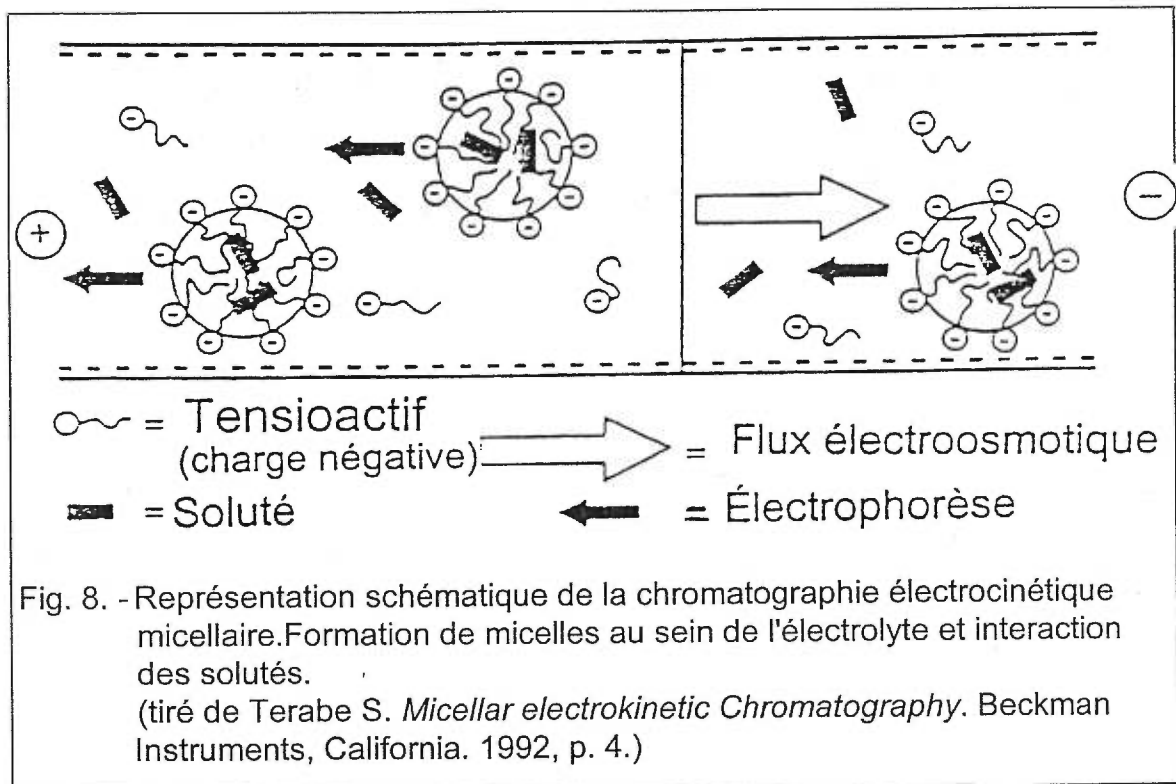
b) *Les micelles*

Des tensioactifs sont ajoutés au tampon de migration à une concentration supérieure à leur concentration micellaire critique (CMC). À une telle concentration, les molécules de tensioactif forment des micelles. Les chaînes hydrophobes du tensioactif sont orientées vers l'intérieur de la micelle, tandis que les groupements chargés sont tournés vers l'extérieur. Les micelles se désagrègent et se reforment en fraction de seconde, ce qui permet aux substances hydrophobes d'être enfermées à l'intérieur des micelles (34). Les composés neutres réagissent avec les micelles en fonction de leur hydrophobie.

c) *Mécanisme de séparation*

Au sein de l'électrolyte de séparation, on a ainsi deux phases : l'une aqueuse, l'autre micellaire. Les micelles se déplacent, en fonction de leur charge, soit en direction de la cathode soit vers l'anode. Étant donné l'importance du flux électroosmotique, les deux phases aqueuse et micellaire se déplacent vers la cathode, avec cependant une différence de vitesse de migration. La phase aqueuse possède une migration rapide et la phase micellaire une migration lente. Cette dernière est considérée comme une phase pseudo-stationnaire (10,53,56).

L'ordre d'élution correspond donc au caractère hydrophobe croissant des solutés. Les composés qui n'ont aucun contact avec la phase pseudo-stationnaire migrent simplement avec le flux électroosmotique. Pour les espèces chargées, l'interaction électrostatique joue un rôle dans la séparation (figure 8).



d) Les tensioactifs anioniques

Avec les tensioactifs anioniques comme le SDS (sodium dodécyl sulfate), les anions sont détectés en premier. Plus la charge des anions est élevée plus l'élution est rapide, due à la répulsion avec les micelles. Ainsi les anions migrent avec la phase aqueuse, tandis que les cations migrent lentement et sont élués en dernier car l'interaction est grande avec les micelles chargées négativement (60).

e) *Les tensioactifs cationiques*

Avec les tensioactifs cationiques tel le bromure de cétyle triméthyle ammonium (CTAB), les mobilités électrophorétiques et électroosmotiques changent de signes, il suffit alors d'inverser la polarité des électrodes pour détecter la molécule. L'ordre d'élution est inversé également, les cations étant détectés en premier, les anions en dernier (10,61).

f) *Les tensioactifs neutres*

Finalement, avec les tensioactifs neutres comme le tween-20 ou le triton X-100, la séparation des espèces dépend exclusivement de leur hydrophobie. Les composés migrent avec une vitesse située entre la mobilité électroosmotique et la mobilité des micelles (62).

g) *Séparation chirale*

La séparation des espèces chirales par EC est à son début. Elle s'effectue en ajoutant un sélecteur chiral au tampon de migration de l'EC. Le sélecteur le plus souvent employé est la cyclodextrine (CD), un oligosaccharide cyclique nonionique composé de 6 à 8 unités de glucose (63).

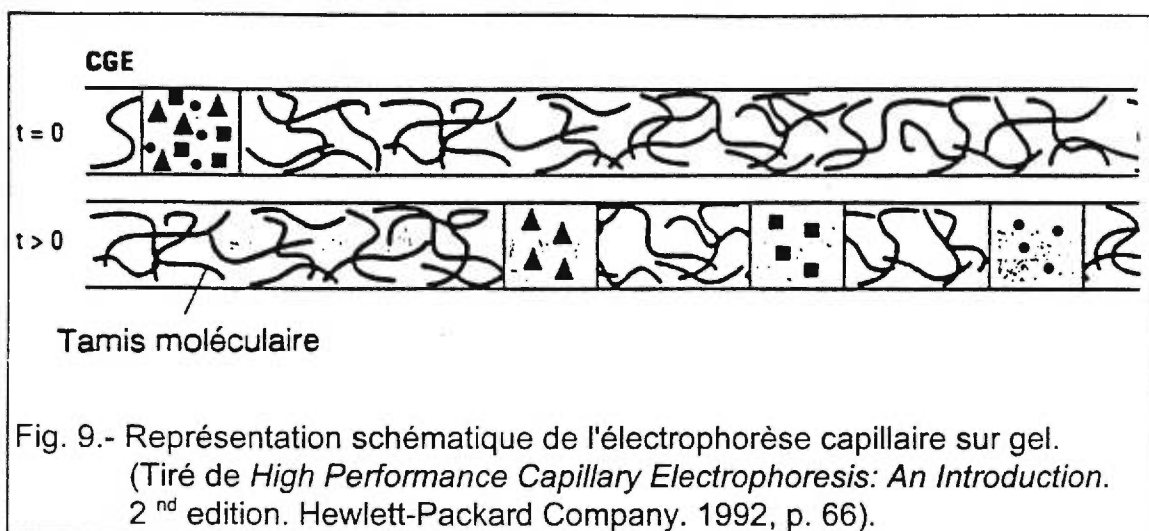
1.5.3 L'électrophorèse capillaire sur gel (ECG)

a) *Définition*

L'ECG est utilisée pour la séparation des protéines ou des acides nucléiques. L'utilisation d'un gel de polyacrylamide dans les capillaires introduit un facteur de séparation supplémentaire, car il joue le rôle de tamis moléculaire (64).

b) *Mécanisme de séparation*

La séparation des molécules se fait en fonction de leur masse moléculaire. Ainsi, les molécules de petites tailles migrent plus vite que les substances de grandes tailles à travers le tamis (figure 9).



L'ECG offre un avantage sur l'électrophorèse traditionnelle sur plaque: la résolution est nettement supérieure due à une diffusion faible et à un nombre élevé de plateaux théoriques.

Les gels utilisés peuvent être de deux types soit de polyacrylamide pour la séparation des protéines avec des mailles étroites, soit d'agarose pour les acides nucléiques avec des pores plus larges (34). Ainsi les substances qui possèdent un rapport charge sur masse identique sont séparées en fonction de leur masse moléculaire.

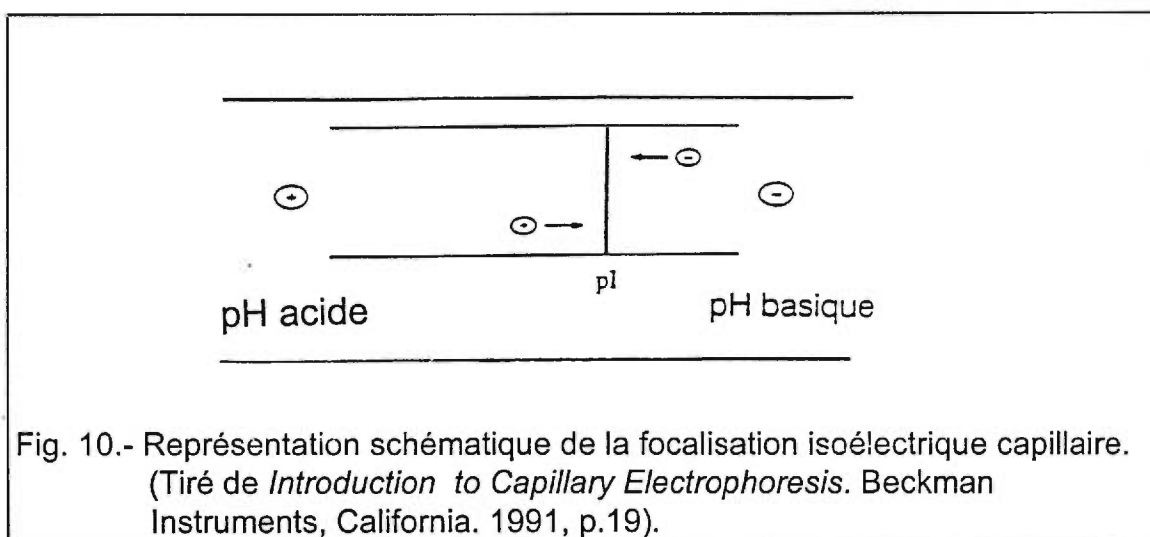
1.5.4 Focalisation isoélectrique capillaire (FIC)

a) Définition

La FIC est effectuée en présence d'un gradient de pH de l'anode vers la cathode au sein du capillaire. Ce gradient de pH est obtenu au moyen d'ampholytes. Toute molécule chargée migre à travers le capillaire tant qu'elle possède une charge. La migration arrête lorsque la molécule a atteint son point isoélectrique (pI).

b) Mécanisme de séparation

Après avoir rempli le capillaire avec le mélange d'ampholytes, le voltage est appliqué et les ampholytes chargés positivement vont migrer vers la cathode où le pH est élevé. Tandis que les ampholytes négatives se déplacent vers l'anode où le pH est faible. Donc le pH augmente au niveau cathodique et diminue au niveau anodique. Le mouvement des ampholytes cesse quand ils atteignent leur pI, où ils ne sont plus chargés (figure 10).



Initialement, un mélange de soluté et d'ampholytes est injecté. Après application du champ électrique et du gradient de pH, le soluté avec une charge totale négative migre vers l'anode où il entre en contact avec le tampon de pH

faible. Ce soluté rencontre ensuite un pH où sa charge nette devient zéro, c'est à dire le pI, et la migration cesse (phénomène de focalisation). Après focalisation les solutés et les ampholytes sont immobilisés (collectés) et les zones ainsi détectées (65).

La FIC est surtout utilisée pour la détermination de pI des protéines et la séparation des immunoglobulines.

1.5.5 Isotachophorèse (ITP)

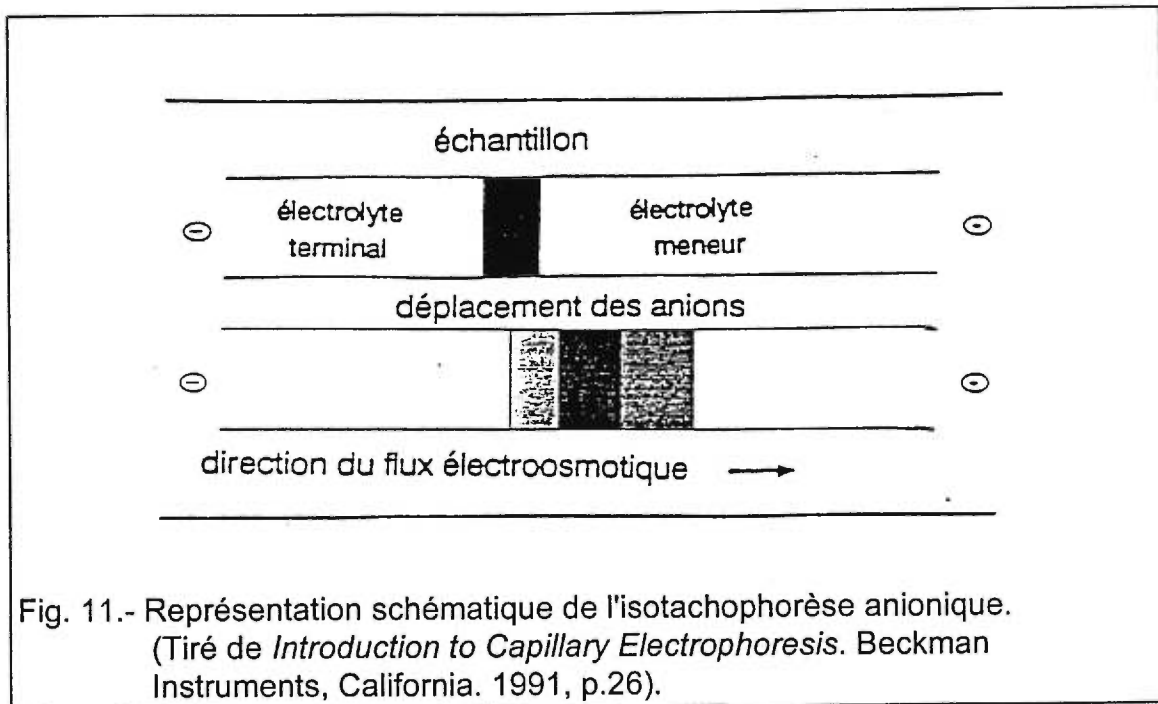
a) *Définition*

Dans le cas d'ITP les substances à séparer sont intercalées entre deux solutions d'électrolytes. L'une appelée électrolyte meneur contenant un ion de mobilité électrophorétique élevée, l'autre électrolyte terminateur avec un ion qui possède la mobilité électrophorétique la plus basse.

b) *Mécanisme de séparation*

La séparation se produit entre l'électrolyte meneur et l'électrolyte terminateur en fonction de la mobilité électrophorétique propre de chaque espèce chimique. Par exemple, pour l'analyse des anions, l'électrolyte meneur doit renfermer un anion qui a une mobilité plus élevée que celles des autres substances à séparer présentes dans le solvant. L'électrolyte terminateur par contre, doit renfermer un anion de mobilité très basse.

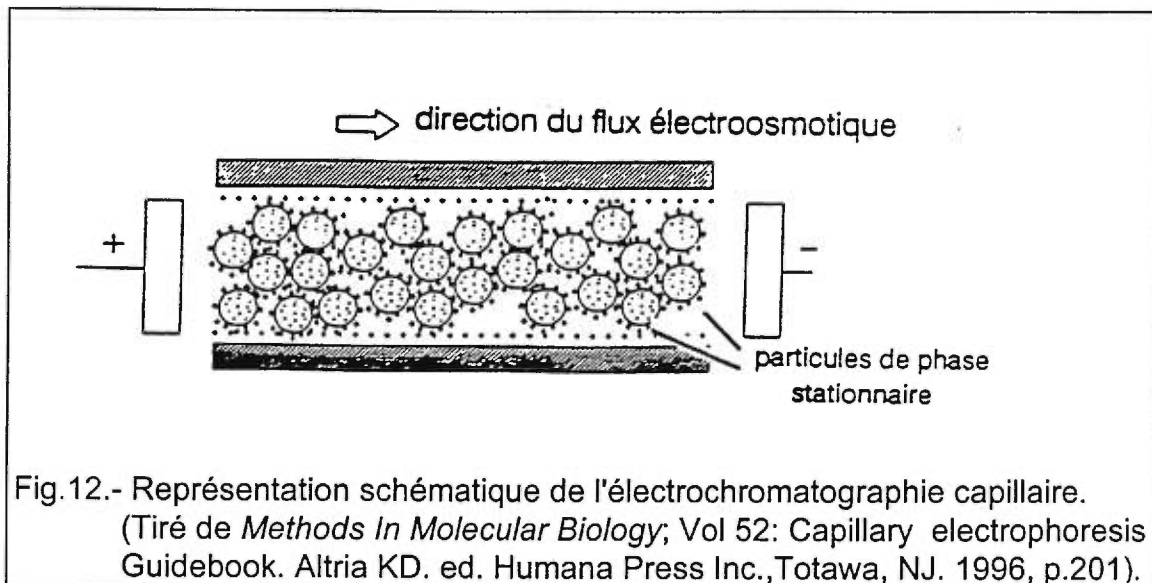
Suite à l'application d'un champ électrique, les anions migrent vers l'anode par ordre de mobilité décroissante. L'anion de l'électrolyte meneur vient en premier, suivi des solutés dépendant de leurs mobilités décroissantes, et finalement l'anion de l'électrolyte terminateur. Ainsi les anions se déplacent sous forme de zones discrètes, tous à la même vitesse au sein d'un gradient de potentiel discontinu (figure 11)(66).



1.5.6 Électrochromatographie capillaire (ECC)

a) Définition

Cette technique récente est en voie de développement. C'est une méthode hybride entre l'EC et l'HPLC. Dans le cas d'ECC, le capillaire en silice fondue est rempli par un support généralement utilisé en HPLC (figure 12).



b) Mécanisme de séparation

Les molécules sont séparées par partition entre la phase mobile et stationnaire. La migration des particules se fait par le flux électroosmotique à travers le capillaire. Les espèces chargées migrent également en fonction de la force électroosmotique. Ainsi la séparation se fait par électrophorèse et partage entre la phase mobile et stationnaire (11).

1.6 Application de l'EC

Le champ d'application de l'EC est vaste dans les domaines pharmaceutiques, biotechnologiques, alimentaires et chimiques. Des molécules d'intérêt pharmaceutique et leurs métabolites sont analysés par EC (67,68,69). Cette technique est utilisée pour la séquençage de l'ADN et l'analyse des oligonucléotides (70). Des études sur les ions inorganiques et les constantes physico-chimiques sont effectuées par EC (27,71). L'EC est devenue la technique de choix pour l'analyse des peptides. Cependant, L' ECZ et la CECM sont les modes les plus utilisés à cause de la facilité du développement de ces méthodes de séparation (24,25).

1.6.1 Électrophorèse capillaire: les avantages et les limitations

a) *Les principaux avantages* de l'EC sont:

- i) Le nombre de plateaux théoriques est très élevé pouvant atteindre jusqu'à un million. La dispersion efficace de la chaleur permet d'utiliser des tensions élevées. Ceci permet d'avoir une résolution supérieure (34).
- ii) Le volume de l'échantillon nécessaire est faible et la quantité injectée est de l'ordre du nL (2-10 nL). Ce faible volume d'échantillon est très important dans le cas où la préparation à tester est coûteuse. Ceci permet également de faire plusieurs analyses avec un seul échantillon. En plus, en raison de l'absence de phase stationnaire solide et l'utilisation de solvant aqueux l'échantillon est exempt de dénaturations biochimiques (72).
- iii) Le temps de séparation, le lavage et l'équilibrage du système de séparation sont courts. Le ré-équilibrage de la colonne entre chaque analyse est absent (44).
- iv) L' appareillage est simple, les capillaires ne sont pas chers, et la maintenance du système est très facile.
- v) Un mode d'EC peut être converti facilement en un autre dépendamment du type d 'échantillon et de la sélectivité requise. Ainsi si certains composés co-éluent par un mode d'EC ils peuvent être séparés par un autre mode d'EC.

b) *Les désavantages* de l'EC sont:

- i) L'échantillon doit être concentré pour pouvoir être détecté. La teneur en sels doit être faible par rapport à l'électrolyte d'analyse pour ne pas avoir de distorsions de pics dues à une variation de champ électrique.

- ii) L'inconvénient majeure de l'EC réside dans la sensibilité de détection. La technique souffre d'une manque de sensibilité pour les faibles concentrations. Par détection UV, le seuil de sensibilité est de l'ordre de 10^{-6} M. Tandis que la fluorescence induite par laser permet de détecter des concentrations de l'ordre de 10^{-9} M (73). Pour augmenter cette sensibilité, différentes solutions ont été proposées: augmentation du trajet optique en utilisant les "bubble cells" (capillaire avec élargissement du diamètre interne au point de détection); concentration de l'échantillon d'emblée sur le capillaire par différents mécanismes, soit par "sample stacking" technique (différence de concentration entre le tampon d'injection et le tampon de migration), isotachophorèse, "switching valves" (enrichissement du soluté avant injection par un dispositif d'injection à six sorties), ou "solid-state extraction" (concentration de l'échantillon avant injection soit par un paquet de capillaires ou par une colonne remplie de particules d'anticorps). Ces techniques augmentent la limite de détection permettant ainsi l'usage de l'EC pour l'analyse des éléments au niveau de traces. Le couplage de l'EC avec des détecteurs sensibles connaît de nouveaux développements comme la spectrométrie de masse.

1.6.2 L'EC face à la chromatographie liquide à haute performance pour l'analyse des peptides

La chromatographie liquide à polarité de phase inversée est la technique analytique communément employée dans l'analyse des peptides. Cette technique présente *les avantages* suivants:

- i) Une récupération facile des produits.
- ii) Une sensibilité supérieure aux méthodes électrophorétiques.
- iii) Une adaptabilité variable de la méthode chromatographique selon les paramètres étudiés. Le choix de la phase stationnaire et mobile varie selon l'hydrophobie, la charge, et la grandeur du peptide.

Cependant les *inconvenients* majeurs sont:

- i) Dilution de l'échantillon et présence d'autres substances associées aux peptides dans les milieux biologiques qui peuvent gêner l'analyse.
- ii) Perte de peptides soit par absorption sur les récipients en verre et sur l'ensemble des équipements utilisés, due à l'activité de surface des peptides.
- iii) Présence de pics larges produit par l'interaction forte entre les silanols et les peptides qui peuvent saturer ces sites, et entraîner une surcharge de la colonne ou élargissement de pics.

- iv) Apparition de pics fantômes ou plusieurs pics après avoir injecté un seul produit suite à la dénaturation de ce peptide soit dans la phase stationnaire ou la phase mobile (74).

Cependant, comme les séparations par HPLC et EC sont basées sur des principes physico-chimiques différents, certaines substances peuvent co-éluer en EC alors qu'elles sont bien séparées en HPLC, ou l'inverse, co-élution en HPLC et séparation en EC. Ainsi plusieurs études considèrent l'EC complémentaire à l'HPLC (75,76,77).

1.6.3 Place de l'EC dans l'analyse des peptides

Les principaux types d'application d'EC aux peptides sont résumés dans le tableau I :

1.6.3.1 Étude de la pureté des peptides

L'EC est un outil puissant pour confirmer la pureté des peptides synthétiques et vérifier leur homogénéité (78). Plusieurs études ont démontré le potentiel de l'EC comme technique de détection d'impuretés des produits isolés par HPLC (79,80). Idei et coll. (81) ont rapporté l'application de l'EC à l'analyse des analogues peptidiques de somatostatine. La première méthode étant supérieure et préférable à l'HPLC. La détermination de la pureté des peptides est importante dans le cas de la synthèse des peptides par recombinaison génétique qui nécessite une purification ultérieure pour la synthèse d'échantillons destinés à une analyse de séquence (82).

Tableau I : Application de l'EC à l'analyse des peptides

1. Études de pureté	<ul style="list-style-type: none"> • contrôle de qualité dans la synthèse des peptides • quantification du produit final • quantification des contaminants ou excipients • sélection d'échantillons avant séquençage de protéine
2. Études structurales	<ul style="list-style-type: none"> • cartographie des peptides
3. Études de stabilité	<ul style="list-style-type: none"> • pH , température et environnement
4. Caractérisation des peptides	<ul style="list-style-type: none"> • mesure de mobilité • modèle semi-empirique pour prédire la migration des peptides
5. Application clinique et diagnostique	<ul style="list-style-type: none"> • neuropeptide • taux sanguin ou urinaire des médicaments peptidiques • complexe immuns

1.6.3.2 Cartographie des peptides

L'une des applications majeures et la plus difficile dans l'analyse des peptides est leur cartographie (peptide mapping). Il est couramment utilisé dans les domaines biotechnologiques et pharmaceutiques pour caractériser les protéines synthétisées par recombinaison génétique ou pour étudier leur structure après digestion enzymatique. Il est devenu une étape standard avant le séquençage de protéines inconnues (82,83).

Compte tenu de l'efficacité très élevée que l'EC permet d'atteindre, des mélanges complexes de peptides sont séparés après digestion des protéines soit de façon enzymatique par trypsine (78) ou chymotrypsine, soit par bromure de cyanogène (84). L'analyse des séquences peptidiques permet d'identifier la structure primaire de protéine à partir de leur hydrolysats.

Des échantillons obtenus d'ovalbumine de poulet (85,86), de lysosyme de blanc d'oeuf (87), d'hormone de croissance humaine (82) ont été analysés. Les variantes structurales de l'hémoglobine ont été évaluées pour fin de diagnostic et étude clinique. L'EC dans ce domaine est supérieure à l'électrophorèse traditionnelle et l'HPLC qui s'avèrent impuissants à résoudre complètement les hydrolysats (87,88).

1.6.3.3 Caractérisation des peptides

La séparation des peptides par l'EC présente un domaine d'application attractif. Plusieurs études ont été décrites pour la séparation de nombreux peptides par ECZ et CECM tels: l'angiotensine (89), la vasopressine (90), et la motiline (91). Des séparations performantes ont été obtenues par ces techniques pour des peptides homologues qui ne diffèrent que par un ou deux acides aminés (79). Également, l'EC s'avère efficace dans la séparation des peptides qui diffèrent par la charge, la masse ou l'hydrophobie. Ainsi l'EC est considérée souvent supérieure à l'HPLC dans ces études (92).

1.6.4 Paramètres importants dans la séparation des peptides par EC

L'optimisation des paramètres de séparation permet de différencier un peptide de ses analogues ou de ses produits de dégradation. L'optimisation de

la résolution a pour but de maximiser la différence de mobilité électrophorétique ou la sélectivité. Les paramètres à considérer sont essentiellement le pH, la force ionique du tampon, la présence de solvants organiques et de tensioactifs (24).

1.6.4.1 Optimisation du pH

Le pH est le paramètre le plus important car quand le choix du pH est incorrect la résolution est réduite dramatiquement (15). La séparation des peptides analogues est attribuable à la différence des pK_a de leurs acides aminés; ainsi, la faible différence de pK_a est la base de séparation des espèces chimiques très apparentées (92). Le pH de séparation optimal se situe en général, dans la zone des pK des couples acide-base des espèces à séparer (93).

Les espèces chimiques cationiques sont mieux séparées en milieu acide, tandis que les composés anioniques, à pH plus élevés. Le contrôle de la charge du peptide par le biais du pH de l'électrolyte, minimise l'interaction peptide-paroi du capillaire et permet une meilleure séparation (93). Le pH modifie également le flux électroosmotique; à faible pH la vitesse électroosmotique est réduite (fig. 5) et les peptides sont mieux séparés en fonction de leur propre mobilité électrophorétique (Eq. 9) (94,95).

1.6.4.2 Optimisation de la force ionique

La force ionique peut être utilisée comme un outil pour améliorer la résolution, l'efficacité et la sensibilité (15).

À faible concentration du tampon on observe une co-élution et élargissement de bandes. Avec l'augmentation de la concentration, le nombre

de plateaux théoriques augmente, la forme des pics s'améliore et la sensibilité devient meilleure (phénomène de focalisation) (96,97). D'autres effets de l'augmentation de la force ionique à discuter sont:

Une réduction du potentiel zéta. Ceci est dû à la diminution de la mobilité électroosmotique (Eq. 8). En effet, la viscosité du solvant augmente, la constante diélectrique change, et l'épaisseur de la double couche cationique sur la paroi diminue.

À une concentration élevée du tampon, les solutés rencontrent une charge réduite sur la paroi du capillaire; en même temps, les molécules du solvant occupent les sites d'échange d'ion du paroi, ce qui diminue l'interaction soluté-paroi. Ainsi, l'affaiblissement ou l'élimination de l'interaction soluté-paroi permet aux peptides de migrer en fonction de leur propre mobilité électrophorétique (charge, grandeur...).

Quand la concentration du tampon est élevée, la charge que possède le peptide est protégée des interactions électroosmotiques de l'environnement ionique qui l'entoure. Ainsi, la possibilité d'avoir des espèces de différentes charges est réduite (94).

1.6.4.3 Effets de solvants organiques

L'addition de solvants organiques aux électrolytes permet de modifier favorablement la sélectivité. Les solvants les plus utilisés sont: le méthanol, l'acétonitrile et l'isopropanol-2 à des concentrations variant entre 0 et 30 %.

Les solvants organiques influencent le temps de migration et la solvation des solutés. L'acétonitrile diminue le temps d'analyse, tandis que le méthanol

directement proportionnelle à la viscosité. La viscosité de l'électrolyte diminue avec l'acétonitrile et augmente avec le méthanol (15,81).

D'autres effets des agents organiques soit sur le pH, soit sur la précipitation des solutés doivent être considérés également. Une augmentation de sélectivité par modification du tampon de séparation a été démontrée par plusieurs auteurs. Idei et al. ont observé une variation du temps de migration, d'ordre d'éluion et de sélectivité en ajoutant de solvants organiques au tampon (81).

1.6.4.4 Effets des tensioactifs

Les milieux micellaires permettent d'améliorer la séparation par EC ou de changer l'ordre d'éluion des solutés. La solubilisation des composés est influencée par plusieurs modes d'interactions hydrophobiques, électrostatiques et lien hydrogène avec les micelles. Ainsi, les composés de structure identique peuvent être séparés par solubilisation différentielle (98).

Différents types de tensioactifs sont employés en fonction de la nature des molécules à séparer. En général, pour les substances de poids moléculaire élevé, des tensioactifs cationiques sont employés. Les tensioactifs anioniques sont appliqués pour les substances peu solubles dans l'eau. Les tensioactifs neutres ou zwitterioniques augmentent la sélectivité de séparation par ECZ (10,63). Dans le cas de mélange d'espèces chimiques ioniques, les paramètres les plus importants à optimiser sont la concentration micellaire critique et le pH. Tandis que dans le cas de substances neutres, l'addition d'agents organiques ou complexants accroît favorablement la sélectivité (99).

1.6.5 Relations caractérisant la migration des peptides par EC

Pour caractériser le comportement électrophorétique des peptides il est nécessaire d'établir une relation entre les propriétés physico-chimiques de ces molécules et leur comportement en électrophorèse capillaire (100). Un tel lien permettrait :

- i) d'établir une relation entre les caractéristiques de migration et la structure.
- ii) de choisir le pH et le tampon approprié pour l'analyse des peptides afin d'optimiser la résolution en fonction de leur propriétés physico-chimiques.
- iii) de détecter la présence des impuretés.
- iv) de distinguer un peptide de ses analogues semblables ou une protéine de ses produits de dégradation.
- v) de comprendre le comportement électrophorétique des peptides durant la séparation.

En général, pour les petits peptides, la migration électrophorétique peut être reliée à deux caractéristiques: charge et masse. La charge peut être déterminée par les valeurs individuelles de pK_a de chaque acide aminé.

Pour les peptides plus complexes, le calcul de la charge n'est pas aisé et cette dernière ne peut être calculée par le pK_a des acides aminés. D'autres facteurs que la charge sur masse influencent la mobilité tels: l'hydrophobie, la séquence primaire, la différence conformationnelle et la chiralité des acides aminés.

Des modèles semi-empiriques et théoriques ont été décrits pour prédire la mobilité électrophorétique des peptides.

La première équation qui relie la mobilité des peptides à leur charge sur masse moléculaire à la puissance 2/3, a été proposée à partir de données électrophorétiques sur papier (101):

$$\mu = A \cdot \frac{q}{M^{2/3}} \quad (\text{Eq. 38})$$

Où A est une constante de proportionnalité.

Les travaux effectués en ECZ par Dyel (83) et Rickard (102) sur la mobilité des peptides, ont démontré que la mobilité est proportionnelle à la charge et inversement proportionnelle à leur masse moléculaire à la puissance 2/3 (voir Eq.38). Auparavant, Grossman avait proposé une équation qui liait le logarithme de la charge à la mobilité (103):

$$\mu = A \cdot \frac{\log(q+1)}{n^{0.43}} \quad (\text{Eq. 39})$$

où n représente le nombre d'acides aminés.

Les recherches de Hilser et al. (104) ont démontré que les résultats obtenus par Grossman était plus appropriés que ceux de Rickard. Ceci est dû au fait que la proportionnalité entre μ et $\log(q+1)$ est moins sensible aux erreurs produits par le calcul de pK_a que μ et q . Cette observation a été confirmée par Castagnola et al. (105) qui ont trouvé une simple relation de proportionnalité entre μ et q . Cifuentes (106) a proposé une forme modifiée de l'équation de

Grossman, en tenant compte de la charge moyenne des peptides représentée par la valeur B dans la formule:

$$\mu = A. \frac{\log(1 + Bq)}{n^{0.41}} \quad (\text{Eq. 40})$$

Finalement, Compton et O'grady ont adopté une approche plus théorique et plus appropriée pour l'étude de la mobilité des peptides (107,108). En considérant les propriétés physico-chimiques des molécules et la force ionique du solvant, ils ont abouti à l'équation suivante:

$$\mu = A. \frac{q}{BM^{1/3} + CM^{2/3}} \quad (\text{Eq. 41})$$

où B et C sont respectivement les constantes de la force ionique de la solution et le rapport de friction entre soluté et solvant. Cette dernière relation explique pourquoi différents modèles semi-empiriques donnent les mêmes résultats, reliant ainsi les différentes approches.

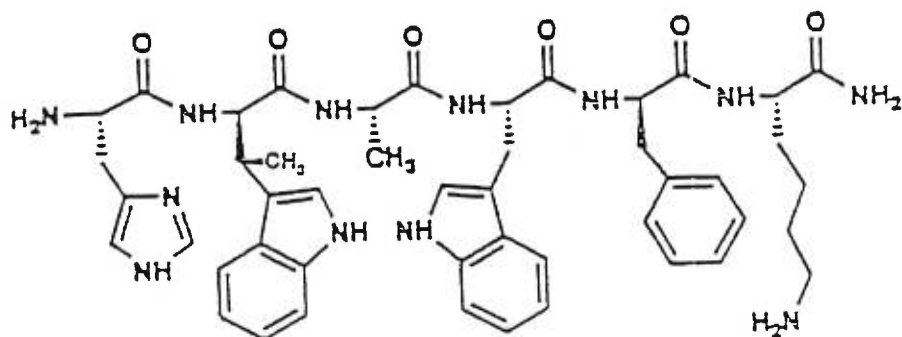
2 - L'HEXARÉLINE

2.1 Structure de l'hexaréline.

L' hexaréline est un hexapeptide nouvellement synthétisé dont la séquence est illustrée à la figure 13. Il s'agit d'un analogue de GHRP-6 (growth hormone releasing peptide) dont la substitution de D- Trp à la position 2 par 2- Methyl-D- Trp donne à la molécule plus de stabilité contre la dégradation enzymatique, chimique et oxydative. En plus l'hexaréline possède plus d'efficacité et moins de toxicité que la molécule d'origine qui est le GHRP (109,110).

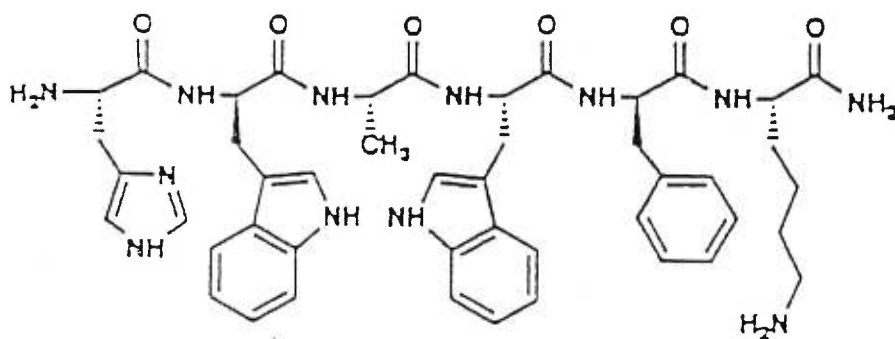
2.2 Action physiologique de l'hexaréline

L'hexaréline est un puissant sécrétagogue de l'hormone de croissance chez l'animal et l'humain. Les recherches indiquent qu'il agit directement sur des récepteurs au niveau de la glande pituitaire et indirectement sur l'hypothalamus (111).



His¹-D2MeTrp²-Ala³-Trp⁴-DPhe⁵-Lys⁶-NH₂

hexaréline



His¹-DTrp²-Ala³-Trp⁴-DPhe⁵-Lys⁶-NH₂

GHRP-6

Fig. 13.- Représentation structurale des molécules d'hexaréline et de GHRP-6.

Actuellement en recherche préclinique, l'hexaréline représente un agent thérapeutique potentiel dans le traitement des patients souffrant de déficience en hormone de croissance dû à un dysfonctionnement de l'hypothalamus.

2.3 Les analogues de l'hexaréline

Différents analogues peptidiques de l'hexaréline ont été synthétisés. Leur pouvoir sécrétagogue sur l'hormone de croissance a été étudié in vivo et in vitro.

À partir de la séquence de l'hexaréline, des modifications de structure ou de configuration ont été apportées. L'efficacité, la stabilité, et la toxicité de chaque analogues a été clairement définie. Ces études ont démontré l'importance de certains acides aminés dans la structure et l'activité de l'hexaréline. Le changement ou l'altération de ces acides aminés essentiels à la structure modifiait l'efficacité de l'hexaréline. Les acides aminés essentiels à l'activité de l'hexaréline sont: le tryptophane en position 4, le phénylalanine en position 5, et la présence de lysine en N-terminal. Également, la structure linéaire est primordiale pour la liaison aux récepteurs (112). La seule molécule avec une activité similaire à l'hexaréline est l'heptapeptide Ala-hexaréline (113).

Pour notre travail de maîtrise, les analogues présentés au tableau II ont été sélectionnés en fonction de leur différence de charge à pH 3.5. L'hydrophobie de ces peptides a été modifiée par addition de groupements méthyles. L'indice d'hydrophobie est calculé selon Kyte and Doolittle (114).

Tableau II : Les analogues de l'hexaréline sélectionnés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

Peptides	Séquences d'acides aminés	Charge	Masse	Hydrophobie
Hexaréline	His- D-2MeTrp- Ala- Trp- D-Phe- Lys- NH ₂	+3	887.1	-6.259
Analogue 3	His- D-2MeTrp- D-Lys - Trp- D-Phe- Lys- NH ₂	+4	944.22	-7.759
Analogue 2	His- D-2MeTrp- D-Lys- 2Me Trp - D-Phe- Lys-NH ₂	+4	958.21	-7.232
Analogue 1	His- Ala - D-Trp - Ala- 2 Me Trp- D-Phe- Lys- NH ₂	+3	958.21	-6.235
Analogue 5	His- D-2MeTrp- Ala- Trp- D-Phe- Lys- Thr - NH ₂	+3	988.24	-6.979
Analogue 6	Ala- Trp- D-Phe- Lys- NH ₂	+2	549.71	-2.939
Analogue 4	Trp- D-Phe- Lys- His- D-2MeTrp- Ala (Cyclique)	+2	870.1	-0.463

2.4 Le but du travail

L'EC est une technique analytique de plus en plus utilisée pour l'analyse des peptides. Le but de ce travail est de développer une méthode électrophorétique de séparation des analogues peptidiques de l'hexaréline par ECZ et par CECM. Les analogues peptidiques de l'hexaréline analysés diffèrent très légèrement par leur charge ou par leur hydrophobie.

Les différents facteurs (la nature, le pH, et la force ionique du tampon de séparation) susceptibles d'influencer la résolution électrophorétique sont analysés. L'effet de solvants organiques et de tensioactifs est aussi étudié.

Le comportement électrophorétique des analogues de l'hexaréline sera évalué en établissant une relation entre la mobilité de ces peptides et leur charge dans le cas de ECZ, et leur indice d'hydrophobie dans le cas de CECM.

Enfin, le développement d'une méthode de séparation chromatographique liquide à haute performance permettra de comparer les résolutions obtenues par les méthodes d'EC et par HPLC.

CHAPITRE 2

PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Comparison of selectivities of capillary zone electrophoresis, micellar capillary electrophoresis and reversed phase high performance liquid chromatography in the separation of hexarelin analogs as peptidic growth hormone secretagogues.

Avedis Panoyan^a, Karen Waldron^b, François Boutignon^c, Romano Deghenghi^c, Albert Adam^a, and Huy Ong^{a*}.

- a: University of Montreal, Faculty of Pharmacy, Montreal, Quebec Canada.
- b: University of Montreal, Department of Chemistry, Montreal, Quebec, Canada.
- c: Europeptides, 95100 Argenteuil, France.

This manuscript was submitted to *the Journal of Chromatography B: Biomedical applications*

* : To whom correspondance should be addressed:
Huy Ong, PhD, Faculty of Pharmacy, University of Montreal,
Succ. Centre-ville P.O.Box 6128, Montreal, H3C 3J7

Tel: (514) 343-2026

Fax: (514) 343-2102.

ABSTRACT

In the design of an approach for the separation of hexarelin, a new hexapeptide growth hormone secretagogue and its analogs, capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MECC) were performed. The separation of the peptides was optimized by varying several parameters. With CZE, the optimal resolution was obtained at the following operating conditions: triethylamine phosphate (TEAP) buffer at a concentration of 200 mM, pH 3.50, a voltage of 16 KV, and detection at 214 nm. In contrast to acetonitrile as organic modifier, methanol increased the migration times in a concentration dependent manner without improving the resolution. A linear relationship was found between the migration times of the peptides and the mass to charge ratios. In MECC conditions, nonionic detergents were tested for the separation of the peptides. The resolution between the hexarelin analogs was optimized by varying the concentrations of the detergents. The optimal conditions were: Tween 20 (20 mM), reduced Triton X-100 (10 mM), and octylglucoside (40 mM). The migration times of the peptides were correlated with their hydrophobicity index. The separation pattern and resolution power obtained by CZE and MECC were compared with HPLC. The separation between the analogs was incomplete with latter technique. Hence, CZE appears to be the most efficient approach in the separation of Hexarelin and its analogs.

Key words: Capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, reversed-phase high-performance liquid chromatography, hexarelin.

1- Introduction

Capillary electrophoresis (CE) is becoming the technique of choice as a high resolution method for the separation of peptides [1-3]. Among the different modes of separation by CE, free solution capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) appear to be the most extensively used [4-6]. CZE has been applied to the separation of charged peptides. The importance of the parameters influencing the selectivity and efficiency of the separation in CZE has been documented previously [7-8]. Besides CZE, MECC, which uses micellar solutions of typically ionic surfactants, has become a popular technique for the separation of neutral molecules [9]. It has been successful in the separation of peptides of similar charge to mass ratio [10-13].

Growth hormone releasing peptides (GHRPs), which consist of a family of small synthetic hexapeptides have been recently developed as growth hormone secretagogues [14-16]. Among these derivatives, hexarelin (His -D-2-Methyl- Trp- Ala - Trp- D-Phe -Lys - NH₂) displays potent activity in the release of growth hormone in humans following its oral, nasal, and subcutaneous administration [17-18]. Different hexarelin analogs have been synthesized. The present work aims to document how the chromatographic mobilities of hexarelin analogs relative to their structural difference would be affected by the analytical conditions in CZE and MECC. The correlation of charge and hydrophobicity index with the order of elution of hexarelin analogs will be established. The performance of the separation of these analogs by MECC is compared to that obtained by HPLC.

2- Experimental

2.1 Chemicals

Hexarelin and its analogs were provided by Europeptides (Argenteuil, France). Triethylamine was purchased from Anachemia (St-Pierre, Quebec, Canada). 1-Naphtyl isocyanate was obtained from Eastman Kodak Company (Rochester, NY, USA) and o-phosphoric acid from Fisher Scientific (Montreal, Quebec, Canada). Tween-20 was obtained from ICN Pharmaceutical Inc. (Aurora, OH, USA). Triton X -100 (reduced) and 1-o-octyl- β -D-glucopyranoside were purchased from Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, USA). HPLC grade acetonitrile and methanol were supplied by Burdick & Jackson Division (Muskegon, MI, USA). Distilled deionized Milli-Q water (Millipore, Milford, MA, USA) was used for all experiments. Unless otherwise specified, all other reagents used were of analytical grade.

2.2 Equipment

2.2.1 CE apparatus

CZE and MECC were carried out on a Waters Quanta 4000E capillary electrophoresis system using uncoated fused silica capillary, 75 μ m I.D X 60 cm (52.5 cm effective length), all obtained from Waters (Milford, MA, USA). The detection was carried out at 214 nm. The sensitivity of the detector was set at 0.005 a.u.f.s. for all the experiments. Data were collected and processed by Millennium 2010 chromatography software (Millipore, Milford, MA, USA). Under the optimal conditions, the voltage was set at 16 KV and the current was at 120 μ A. The temperature of the column was maintained at 27 °C.

Before each new set of separations, the capillary was conditioned by flushing with 0.1 N NaOH for 10 min, then washed for 10 min with distilled degazed water, and finally for 15 min with TEAP buffer. Between runs the capillary was rinsed successively with 0.1 N NaOH, water, and running buffer for 5 min. The sample introduction was performed by hydrostatic injection (-23 mm Hg) from the cathodic reservoir for 30 sec to give an injection volume of 10 nL.

2.2.2 HPLC apparatus

The chromatographic separation was carried out on a HPLC system which consists of a model 600 multisolvent delivery system (Waters Associates, Milford, MA, USA) and a reverse phase HPLC column (Vydac C₁₈, 5 μ , 4.6 X 250 mm; Hesperia, CA, USA). The detection was carried out with a 484 detector (Waters Associates, Milford, MA, USA) set at 214 nm. The data was captured by Shimadzu integrator (Shimadzu corporation, Kyoto, Japan). The mobile phase consists of 25 mM triethylamine phosphate buffer pH 3.50 (phase A) and acetonitrile in 0.25 M TEAP buffer (90:10).

The chromatographic conditions consisted of an acetonitrile gradient from 15 % to 65 % of B at 1%B/min, at a constant flow rate of 1 ml/min.

2.3 Buffer/sample preparations

2.3.1 Triethylammonium phosphate (TEAP) buffer preparation

Triethyl amine was purified by distillation at 60 °C following addition of 1-Naphtyl isocyanate (4ml/200ml of triethylamine). Stock solutions of

TEAP buffer were prepared by titrating phosphoric acid with TEA to final pH of 2.7 to 4.5.

2.3.2 Peptide sample preparation

Stock solutions of hexarelin at 10^{-3} M in 0.2 M acetic acid were diluted with 25 mM TEAP buffer at pH 3.5 to a final concentration of peptide of 2×10^{-4} M. For CZE and MECC, 10 nL of the sample were injected. For HPLC, stock solutions of peptides were diluted to 10^{-4} M with 25 mM TEAP buffer, pH 3.5. The injected volume was 30 μ L.

2.3.3 Effect of buffer concentration and pH

TEAP buffer at concentrations of 5, 25, 50, 100, 150, and 200 mM were prepared by titrating phosphoric acid with TEA to the indicated pH from 2.7 to 6.5. The resulting buffers were filtered by applying on preactivated Sep-Pak C₁₈ cartridges (Millipore, Milford, MA, USA) before chromatography.

2.3.4 Effect of organic modifiers

The effect of acetonitrile (ACN) or methanol (MeOH) on the migration times of hexarelin analogs in CZE were investigated at concentrations of organic solvents of 5, 10 and 15 % (v/v) in 200 mM TEAP buffer at pH 3.5.

2.4 Effect of surfactant nature and concentration.

Weighed amounts of detergents were dissolved in 200 mM TEAP buffer pH 3.5, and the resulting solutions were filtered through a 0.45 μ m filter (Millipore, Milford, MA, USA) before use. For Tween 20, buffers containing 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 mM surfactant were

prepared. For Triton X-100R, buffers at concentrations of 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 mM were used. For octylglucoside, solutions at concentrations 25, 40, 60, 80, and 100 mM in TEAP buffer were prepared.

3 - RESULTS

3.1 Optimisation of separation conditions

3.1.1 Effect of buffer concentration for CZE

In order to separate the mixture of hexarelin analogs (table I), different TEAP concentrations were tested ranging from 5 to 200 mM. As shown in figure 1(A), an increase in TEAP running buffer concentration resulted in an increase of the migration times for all the peptides, as expected. At the lower TEAP concentrations, the peptides possessing similar charges eluted at the same time resulting in a cluster of peaks. The decrease in electroosmotic flow with increasing TEAP concentration lengthens the migration window and results in better resolution. At 150 mM, hexarelin and its analogs could be resolved. At 200 mM TEAP, the best separation was obtained with little cost in the analysis time (< 25 min). Thereafter, a TEAP concentration of 200 mM was used as the background running buffer for CZE and MECC.

3.1.2 Effect of buffer pH for CZE

The migration times of the seven analogs as a function of pH is shown in figure 1 (B). The optimal pH for the separation of all the analogs tested was near 3.5. The peaks were sharper and more symmetrical at

pH values between 3 and 4 than at other pH values. However, at pH 4.0 analogs 4 and 6 coeluted. Hence, the pH of the running buffer was set at 3.50.

Figure 2 shows a representative CZE electrophoregram of hexarelin and its analogs following the injection of a sample containing a mixture of the hexarelin analogs. The position of elution of each peptide was assessed by injecting standard solutions of individual peptide.

The pattern of the elution is in accordance with the decreasing charge to mass ratio of each peptide. Given the structures presented in Table I, the effect of charge is dominant on the electrophoretic migration behaviour of the hexarelin analogs tested. For peptides with the same charge, mass is a very important factor as seen in the resolution between analogs 3 and 2 that differ by a single methyl group. The plot of the migration times of the hexarelin analogs tested versus the $M^{2/3}/q$, $M^{1/2}/q$, and M/q displays a linear correlation with a coefficient of correlation of 0.93, 0.96, and 0.75 respectively. The outlying point in the later correlation was the analog 6 which possess a small mass.

3.2 Effect of organic solvents

The influence of ACN and MeOH on the migration times of the peptides was documented. An increase in migration times of all the peptides tested was observed with the increase of the percentage of MeOH in the running buffer. In contrast, a decrease of the migration times was observed with increasing percentage of ACN. The presence of both organic modifiers did not affect the elution order. However, a loss of the resolution appears to occur in presence of more than 10 % of both organic modifiers in the running buffer.

3.3 Reproducibility assays

Within the same day (intra-assay), four injections were made of the same mixture at the optimized separation conditions. TEAP 200 mM, pH 3.50, and a separation voltage of 16 KV. This procedure was repeated for 3 consecutive days (inter-assay). For day one, the mean standard deviation of the migration times was 0.68 (mean CV 3.9%), 1.18 for day two (mean CV 6.6%), and 0.60 for day three (mean CV 3.48%).

3.4 Effect of Tween 20 in MECC

With 1 and 5 mM Tween 20 in the optimized background running buffer, the order of elution of the hexarelin analogs was similar to CZE. At 10 mM and higher Tween 20, the elution order changed, with analogs 1 and 6 being the most affected. However, at 20 mM and above Tween 20, the elution order is hydrophobicity dependent. The optimum resolution of the analogs was achieved at 20 mM Tween 20 as shown in Table II, where analog 6 eluted first with a migration time (t_m) of 14.7 min, followed by analogs 3 and 2 at 14.9 min and 15.8 min respectively. The elution of hexarelin, analog 5, and 1 followed with migration times of 19.1, 19.4, and 19.7 min respectively. Analog 4 eluted at 33.2 min. At Tween 20 concentration of 40 and 60 mM, the coelution (resolution <1) of analog 5 and hexarelin was observed. With 80 and 100 mM Tween 20, there was a lost of resolution between hexarelin, analog 5 and 1. The 3 analogs co-eluted at 34.5 min (80 mM) and 39.0 min (100 mM) respectively.

3.5 Effect of Triton X-100R in MECC

At detergent concentrations from 1 to 8 mM no resolution between hexarelin and analog 5 could be observed (table II). At 10 mM Triton X-100R the resolution was optimal, as the separation of the seven peptides could be observed. The order of elution of the peptides was different to that observed with Tween 20 at 20 mM. Analogs 3, 2 and 6 eluted at 14.4, 14.8, and 15.9 min. respectively. Hexarelin, analogs 5, 1, and 4 eluted with migration times of 18.5, 20.0, 21.3, and 33.9 min. respectively. At a concentration of 12 mM Triton X-100R a loss in the resolution between hexarelin and analog 5 occurred as shown in table II. We looked briefly at the effect of voltage on the separation of hexarelin analogs at 10 mM concentration of Triton X-100R. At 10 KV, the elution profile in Triton X-100R was similar to that obtained in 20 mM Tween 20 at 16 KV.

3.6 Effect of octylglucoside in MECC.

The effect of octylglucoside on the separation of hexarelin analogs was documented at 25, 40, 60, 80, and 100 mM concentration of detergent. At the CMC of octylglucoside (25 mM) in 200 mM TEAP, pH 3.50, the separation of analog 6 and hexarelin was not complete as shown by the resolution values shown in table II. The best separation of the peptides tested was found to be at 40 mM octylglucoside. The order of elution of analogs 3, 2 and 6 were 19.8, 20.4 and 23.3 min. respectively. At higher concentration of detergent, 60 and 80 mM, a loss of resolution between hexarelin and analog 5 was observed. At 100 mM octylglucoside a loss of resolution was seen between hexarelin, analog 5 and 1 (table II). At operating voltage of 14 KV, the pattern of elution of the

peptides obtained in presence of 40 mM octylglucoside is similar to that obtained with Tween 20 and Triton X-100R.

3.7 Chromatographic separation of the peptides.

In order to compare the results obtained by CE, we determined the RP-HPLC parameters for the hexarelin analogs. The separation was optimized by studying the effect of the mobile phase gradient whereby the slopes of the gradient elution varied by 0.35, 0.70 and 1.0 %B/min. At 1.0 %B/min, total resolution of the peptides tested was not achieved because hexarelin and analog 5 co-eluted. Lowering the slope of the gradient did not improve the resolution between these 2 peptides. An increase in retention time was observed at 0.35%B/min. In addition, modifying the flow rate to 0.5 ml/min did not help to resolve these 2 peptides (Table II).

The order of elution of the peptides by RP-HPLC was identical to MECC at the ideal conditions of separation (20 mM Twen 20 16 KV, 10 mM Triton X-100R 10 KV, and 40 mM octylglucoside 14 KV). The hydrophobicity index was a dominant factor in RP-HPLC. The coefficient of correlation between the migration times at the ideal conditions and the hydrophobicity index was 0.98. This value in the optimal MECC conditions was 0.78 (Tween 20), 0.80 (Triton X-100R) and 0.90 (octylglucoside) (Table III).

4 - DISCUSSION

The merit of CE in the field of peptide separation is mainly due to its rapidity, its ease of application, and its high resolving power in discriminating between subtle structural differences in a homologous series (8,20). It has been successfully applied for the separation of somatostatin analogs (21), for the purity analysis of tetrapeptidic derivatives of growth hormone releasing peptides (22,23) and for documenting the degradation profiles of growth hormone releasing factors (23).

In the present work, we have documented the effects of variables on the separation of hexarelin analogs in order to optimize the separation of these peptides by CE. The change of the ionic strength of the buffer results primarily in a change of electrophoretic velocity which improves the separation of the peptides. At higher concentrations of TEAP, peptide-wall and peptide-peptide interactions are reduced (24,25,26).

Along with TEAP buffer concentrations the effect of pH of the running buffer was also assessed. At pH of 3.5, separation of the analogs tested was achieved. This acidic pH confers to each side chain and N-terminus of the peptides a maximum charge because pK_a values are more than 2 pH units higher (27).

The selectivity and the elution order of the peptides can be influenced by modifying the composition of the running buffer in CE. Different buffer additives have been explored in CE such as organic modifiers (21,28), metal ions (8), or surfactants (29). Effectively, increase of the migration times of hexarelin analogs was observed in the presence of methanol in the running buffer which contrasts with the use of acetonitrile as a modifier. These results demonstrate the complex nature of organic

modifiers on zeta potential, viscosity and dielectric constant in CZE. Both MeOH and ACN have been shown to decrease the electroosmotic velocity at pH > 5 thus leading to longer migration times (30). However at pH <4, Schwer and Kenndler showed that electroosmotic velocity increased for 10 % MeOH (30). Since these effects are opposite to what we observed for the peptides tested, the nature of the background electrolyte and the influence of solvent on the peptide structure must also play an important role. No better resolution can be obtained with the presence of both solvents in the running buffer. The elution order of hexarelin analogs was not affected neither by these organic modifiers. The hydrophobic interactions of the hexarelin analogs was not altered by both organic modifiers.

The effect of neutral surfactants on charged hexarelin derivatives was advantageously documented in this work. The complete resolution between the hexarelin analogs (table II) is obtained with the non-ionic detergents tested at concentrations above their CMC values. The optimal concentrations were 20 mM Tween 20, 10 mM Triton-X100R and 40 mM octylglucoside. With Triton and octylglucoside, a lowering of the voltage was necessary to have an elution similar to Tween 20 and by RP-HPLC, although the migration times were longer.

With the micellar system tested, the interaction of the hexarelin analogs was expected to be mainly hydrophobic (31). The order of elution was correlated to the hydrophobicity index of each peptide tested except for analog 6. Several factors contribute to the separation in MECC, such as the partitioning of the solute between the aqueous phase and the micellar phase, the free solution electrophoretic mobility of the analyte, and the increased viscosity (11,32). The results obtained in this work show the separation charged peptides according, for the most part,

to their hydrophobicity using non-ionic detergents as buffer modifiers. The separation of charge in the peptide backbone plays an important role in micellar and HPLC interactions. The positive charge of the analogs 2 and 3 in the middle of the chain lowers the micellar interaction, whereas the peptides with alanine group in the middle possess enough hydrophobic region for micellar interactions.

The pattern of elution observed in MECC at the optimal conditions is in good agreement with the one observed by RP-HPLC. However, with the later technique there was a co-elution between analog 5 and hexarelin which possess essentially the same hydrophobicity. A change in solvent pH, gradient, and flow rate by HPLC did not improve the resolution of the hexarelin analogs. These observations confirm the potential of CZE and MECC to separate peptide analogs of similar charges or hydrophobicity.

The correlation study in our case reveals a simple linear relationship between the peptide migration times and the charge to mass ratio by CZE. While in MECC the migration times of hexarelin analogs was correlated to the hydrophobicity indexes, which are also charge related. The study of the non-ionic surfactants interaction with the charged peptides reveals the importance of small changes in charge or hydrophobicity in peptide-receptor recognition.

In conclusion, CE appears as an efficient approach for the separation of hexarelin analogs compared to HPLC. Although the separation of these analogs in presence of non-ionic detergents can be obtained, CZE appears as the interesting alternative for the separation of hexarelin analogs.

Figure legends.

Figure 1 : Optimization of the separation conditions of hexarelin analogs.

A) influence of TEAP concentration on migration time

B) influence of TEAP pH on migration time.

Conditions: untreated fused -silica capillary 75 μm I.D X 60 cm (52.5 cm to detector); electrolyte, TEAP; sample injection hydrosatic 30 s ; running voltage, 16 KV detection, 214nm; temperature, 27 ± 2 °C.

Symbols:

- analog 3
- analog 2
- △ hexarelin
- ▼ analog 1
- ◆ analog 5
- ⬡ analog 6
- analog 4

Figure 2 : Electrophoregram of the seven peptides under the

optimized separation conditions; TEAP 200 mM, pH 3.50.

Other conditions as in figure 1. Peaks: 1: analog 3,

2 : analog 2, 3 : hexarelin, 4 : analog 1, 5 : analog 5,

6 : analog 6, 7 : analog 4.

Figure 1

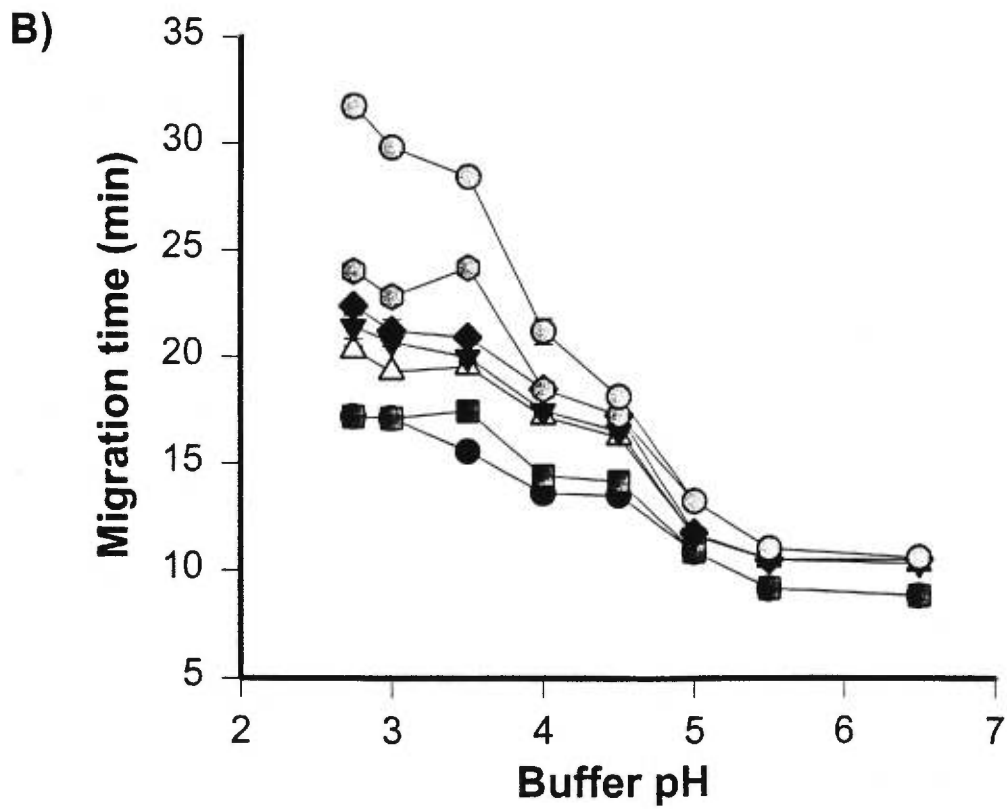
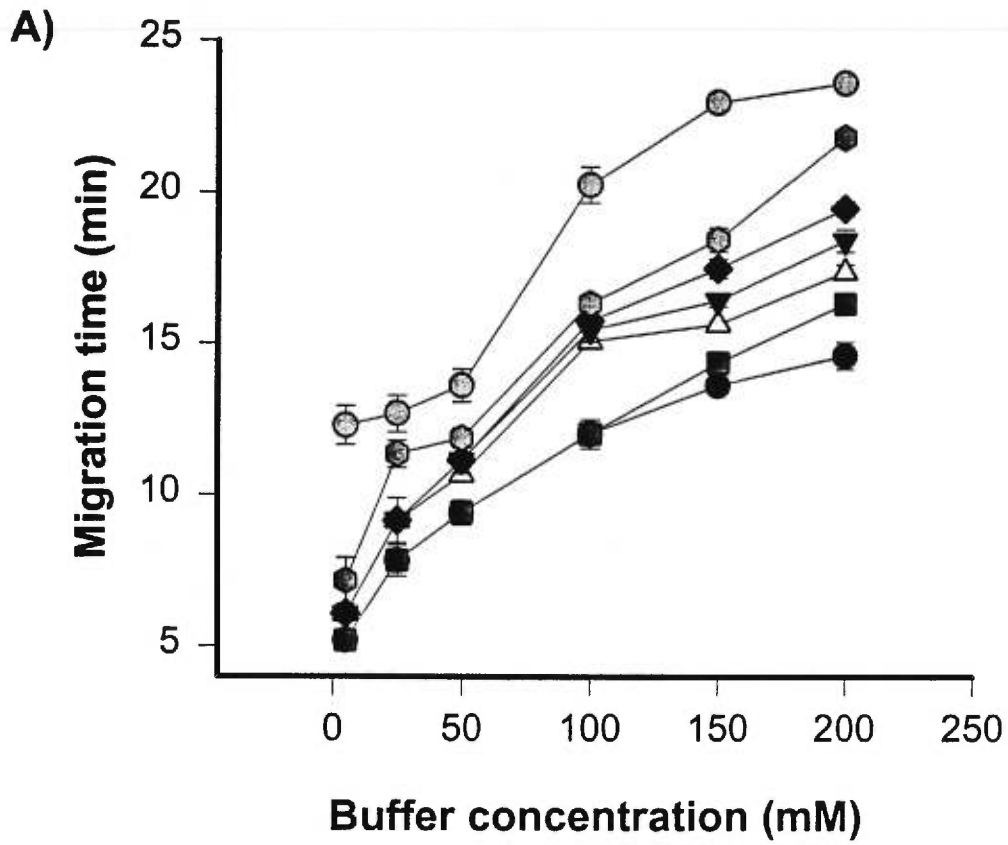
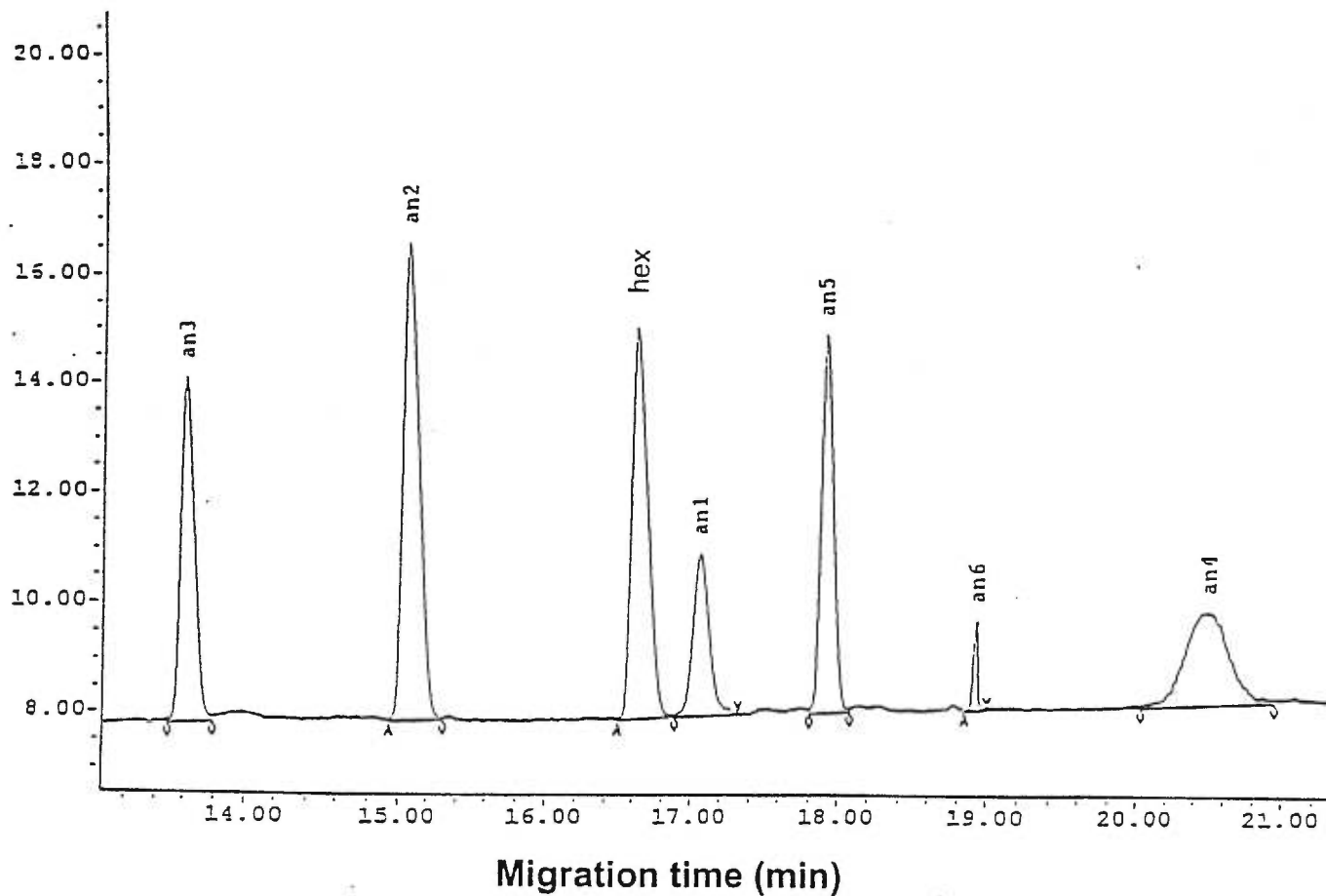


Figure 2



Tables

Table I : Chemical structure, charge, and hydrophobicity index of hexarelin analogs.

Table II : Resolution values of the peptides by MECC and HPLC systems.

Table III : Migration times of hexarelin analogs and coefficient of correlation with different separation systems.

Table I : Chemical structure, charge, and hydrophobicity index of hexarelin analogs

Peptides	Structure ^a	Charge ^b	Hydrophobicity index ^c
Hexarelin	His-D-2MeTrp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	+ 3	-6.259
analog 3	His-D-2MeTrp- D-Lys -Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	+ 4	-7.759
analog 2	His-D-2MeTrp- D-Lys-2Me Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	+ 4	-7.232
analog 1	His- Ala-D-Trp -Ala- 2Me Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	+ 3	-6.235
analog 5	His-D-2MeTrp-Ala-Trp-D-Phe-Lys- Thr -NH ₂	+ 3	-6.979
analog 6	Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	+ 2	-2.939
analog 4	Trp-D-Phe-Lys-His-D-2MeTrp-Ala (cyclic)	+ 2	-0.463

a: bold type indicates modified or substituted residues with respect to hexarelin.

b: charge of the peptides determined at pH 3.50

c: hydrophobicity index calculated from Kyte and Doolittle values [30].

Table II : Resolution values of the peptides by MECC and HPLC systems.

Resolution between hexarelin and its analogs by MECC system ^a						
Tween	an 3, an 2	an 2, hex	hex, an 1	an 1, an 5	an 5, an 6	an 6, an 4
1 mM	1.69	3.01	0.82	1.05	3.08	1.67
5 mM	2.06	4.15	1.13	0.84	6.14	3.05
10 mM	an 3, an 6	an 6, an 2	an 2, hex	hex, an 5	an 5, an 1	an 1, an 4
0.34	2.66	5.84	1.67	5.27	10.29	
20 mM	an 6, an 3	an 3, an 2	an 2, hex	hex, an 5	an 5, an 1	an 1, an 4
1.07	3.17	11.42	0.84	1.725	22.76	
40 mM	0.68	1.26	5.56	0.64	0.64	0.773
60 mM	1.26	1.12	17.1	0.56	0.56	3.38
80 mM	1.6	2.92	15.56	15.56	15.56	4.82
100 mM	1.83	4.42	18.07	18.07	18.07	4.99

Triton	an 3, an 2	an 2, an 6	an 6, hex	hex, an 5	an 5, an 1	an 1, an 4
1 mM	0.86	1.98	0.31	1.32	1.32	3.22
2 mM	1.71	2.05	0.46	0.89	0.89	3.45
4 mM	2.8	1.2	1.18	1.45	1.45	8.77
6 mM	3.8	4	0.73	1.6	1.6	14.38
8 mM	5.35	6.56	2.13	1.12	1.12	19.42
10 mM	0.91	3.32	9.03	1.55	1.67	21.91
12 mM	1.44	2.13	16.37	3.64	3.64	32.84

Octyl	an 3, an 2	an 2, an 6	an 6, hex	hex, an 5	an 5, an 1	an 1, an 4
25 mM	1.05	9.03	9.03	1.17	5.1	5.88
40 mM	1.32	5.7	2.17	2.59	0.7	3.88
60 mM	1.41	7.52	1.49	1.49	1.39	6.81
80 mM	1.66	10.24	1.31	1.31	2.37	8.32
100 mM	1.67	11.28	3.15	3.15	3.15	11.97

Resolution between hexarelin and its analogs by HPLC system ^b					
	an 6, an 3	an 3, an 2	an 2, hex+an 5	hex+5, an 1	an 1, an 4
gradient					
0.3 %B/min	17.5	3.58	12.85	6.16	17.12
1.0%B/min	10.91	1.29	16.76	3.15	15.35
isocratic					
A :80;B :20 ^c	9.02	2.96	11.83	6.59	17.48
B:1%,60 mM ^d	15.78	3.87	11.26	3.83	10.93

a : for experimental details see section 2.5

b : for experimental conditions see section 2.2.2

c : A, TEAP 25 mM (80 %); B, 90 % ACN + 10 % TEAP 250 mM (20%).

d : A, TEAP 10 mM ; B, 74 % ACN + 24 % TEAP 250 mM at 1 % B/min.

Table III : Migration times of hexarelin analogs and coefficient of correlation with different separation systems^a

Systems	$t_m \pm$ SD of the peptides (min)							r^2 ^b
	analog 3	analog 2	hexarelin	analog 1	analog 5	analog 6	analog 4	
A	13.9±0.6	15.3±0.7	16.6±0.6	17.0±0.5	17.7±0.4	18.9±0.5	21.3±0.8	0.85
B	14.9±0.3	15.8±0.4	19.1±0.2	19.7±0.4	19.4±0.1	14.7±0.4	33.2±0.4	0.75
C	30.7±0.2	32.9±0.4	39.9±0.2	43.3±0.4	41.7±0.4	30.5±0.1	64.6±0.2	0.8
D	30.9±0.9	31.4±0.6	33.6±0.1	47.1±0.8	38.7±0.1	30.1±0.4	52.9±0.4	0.9
E	20.4±0.1	21.3±0.1	25.0±0.1	26.3±0.1	25.0±0.1	16.7±0.2	29.6±0.1	0.98

a) **A**:CZE TEAP 200 mM, pH 3.50, 16 KV; **B**:MEKC Tween 20 mM, pH 3.50, 16 KV; **C**: MEKC Triton 10 mM, pH 3.50, 10 KV; **D**: MEKC Octyl 40 mM, pH 3.50, 14 KV; **E**: HPLC A:TEAP 25 mM, B:TEAP 60 mM+ACN, pH 3.50.

b) Coefficient of correlation of the migration time with q/MW with CZE and with hydrophobicity index with systems B,C,D,E determined from linear regression analysis by the least-square method.

References

- [1] B.L. Karger, *Nature* 339 (1989) 641-642.
- [2] J.W. Jorgenson and K.D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1298.
- [3] P.D. Grossman, K.J. Wilson, G. Petrie and H.H. Lauer, *Anal.Biochem.*, 173 (1988) 265.
- [4] R.M.McCormick, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2322.
- [5] P.D. Grossman, J.C. Colburn and H.H. Lauer, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 1186.
- [6] D.N. Heiger, P. Kaltenbach, and H.J.P. Sievert, *Electrophoresis*, 15 (1994) 1234.
- [7] R.P.Oda, B.J. Madden, J.C. Morris, T.C. Spelsberg and J.P. Landers, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 341.
- [8] H.J. Issaq, G.M. Janini, I.Z. Atamina, G.M. Muschik and J. Lukszo, *J. Liq. chromatogr.*, 15 (6&7) (1992) 1129.
- [9] S.Terabe, K. Otsuka and T. Ando, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 834.
- [10] T.Yashima, A. Tsuchiya, O. Morita and S. Terabe, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2981-2984.
- [11] C.P.Ong, C.L.Ng, H.K. Lee and S.F.Y. Li, *J.Chromatogr.*, 559 537.
- [12] H.K. Kristensen and S.H. Hansen, *J Chromatogr.*, 628 (1993) 309.
- [13] H.K. Kristensen and S.H. Hansen, *J. Liq. Chtomatogr.*, 16 (14) (1993) 2961.
- [14] L.K. Conley, J. Teik, R. Deghenghi, B.P. Imbimbo, A. Giustina, V. Locatelli and W.B. Wehrenberg. *Neuroendocrinology*, 61 (1995) 44.
- [15] E. Arvat, L. Gianotti, L.Di Vito, B.P. Imbimbo, V. Lenaerts, R. Deghenhi, F. Camanni and E. Ghigo, *Neuroendocrinology*, 61 (1995) 51.

- [16] S.Loche, P. Cambiaso, D. Carta, S. Setzu, B. Imbimbo, P. Borelli, C.Pintor and M.Cappa, *J. of Clin. Endoc. and Metab.*, 80 (2) (1995) 674.
- [17] R. Deghenghi, M.M. Cananzi, A. Torsello, C. Battisti, E.E. Muller and V. Locatelli, *Life Sci.*, 54 (18) (1994) 1321.
- [18] E. Ghigo, E. Arvat, L. Gianotti, B.P. Imbimbo, V. Lenaerts, R. Deghenghi and F. Camanni, *J. Clin. Endoc. and Metab.* 78 (3) (1994) 693.
- [19] F. Baumann, in N. Hadden, F. MacDonald, M.Munk, R. Stevenson, D. Gere, F. Zamaaroni, R. Majors (editors). *Basic Liquid Chromatography*, Varian Aerograph, U.S.A. 1971, Ch.3, p. 3-1.
- [20] H.J. Issaq, G.M. Janini, I.Z. Atamina and G.M. Muschik, *J. Liq. Chromatogr.*, 14 (1991) 817.
- [21] M. Idei, I. Mezo, Z.S. Vadasz, A. horvath, I. Teplan and G.Y. Keri. *J. Liq. Chromatogr.*, 15 (18) (1992) 3181.
- [22] Z. Prusik, V. Kasicka, P. Mudra, J. Stepanek, O. Smekal and J.H. Lavacek, *Electrophoresis*, 11 (1990) 932.
- [23] V. Kasicka, Z. Prusik, O. Smekal, J.H. Lavacek, T. Barth, G. Weber and H. Wagner, *J. Chromatogr. B*, 656 (1994) 99.
- [24] J. Bongers, T. Lambros, A. M. Felix and P. Heimer, *J. Liq. Chromatogr.*, 15 (6&7) (1992) 1115.
- [25] N.A. Guzman, J. Moschera, K. Iqbal and A. W. Malick, *J. Chromatogr.*, 608 (1992) 197.
- [26] H.H. Lauer and D. McManigill, *Anal. Chem.*, 58 (1996) 166.
- [27] H.T. Chang and E.S. Yeung, *J. Chromatogr.*, 608 (1992) 65.
- [28] M. Idei, I. Mezo, Z.S. Vadasz, A. horvath, I. Teplan and G.Y. Keri. *J. Chromatogr.*, 648 (1993) 251.
- [29] A. Emmer, M.Janssen and J. Roeraade. *J. Chromatogr.*, 547 (1991) 544.

-
- [30] C. Schwer and E. Kenndler, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1801.
- [31] N. Matsubara and S. Terabe, *J. chromatogr. A*, 680 (1994) 311.
- [32] S. Hjerem, L. Vatcheva, K. Elenbring and D. Eaker, *J. Liq. Chromatogr.*, 12 (13) (1989) 2471.

CHAPITRE 3

DISCUSSION GÉNÉRALE

Traditionnellement, la séparation des peptides est réalisée par HPLC. Récemment, cependant l'EC grâce à ses caractéristiques propres est devenue une technique puissante pour l'analyse des molécules douées d'un potentiel thérapeutique (115).

Dans ce projet de maîtrise, nous démontrons pour la première fois le potentiel de l'EC comme technique analytique de séparation et d'analyse des analogues peptidiques de l'hexaréline. Nous établissons également une relation fondamentale entre le comportement électrophorétique des peptides et leurs propriétés physico-chimiques.

Jusqu'à présent, et malgré le succès croissant de l'EC, aucune technique électrophorétique n'a été proposée pour la séparation de l'hexaréline de ses analogues ou de ses produits de dégradation.

Pour définir le comportement électrophorétique de l'hexaréline et de ses analogues en EC, nous avons d'abord dû définir les paramètres instrumentaux: la longueur d'onde du détecteur, le temps et le mode d'injection de l'échantillon, le voltage et la température de la colonne.

La résolution en ECZ dépend de plusieurs facteurs. Dans le but d'optimiser cette méthode de séparation nous nous sommes principalement focalisés sur la nature du tampon de migration, son pH, sa force ionique et l'ajout d'additifs (15, 115). Nous avons montré que le tampon phosphate de triéthylammonium s'avère le plus approprié lorsque comparé aux tampons d'acide acétique, d'acide borique et d'acide phosphorique. En augmentant la concentration du tampon phosphate de triéthylammonium jusqu'à 200 mM

concentration du tampon phosphate de triéthylammonium jusqu'à 200 mM nous obtenons une meilleure résolution et des pics plus symétriques. Ceci est dû particulièrement à :

- 1- la réduction de l'interaction des peptides chargés positivement avec les groupements silanols de la paroi du capillaire;
- 2- l'empêchement des interactions des peptides entre eux (34, 104, 106);
- 3- l'effet de «focusing» qui consiste à injecter l'échantillon dans un tampon à une concentration moins élevée et l'analyser dans un milieu à concentration plus élevée (105).

L'optimisation du pH à une valeur de 3.5 est fondamentale pour la séparation en EC. L'hexaréline est une molécule dont le pI est de 6.8. À pH 3.5 l'hexaréline et ses analogues sont chargés positivement et la séparation se fait en vertu de leurs différences de mobilité électrophorétique. À ce même pH, le flux électroosmotique est négligeable (103).

Une variation de résolution peut être obtenue par l'addition de solvants organiques au tampon de migration. Ces derniers produisent une solvation des solutés ou des groupements SiO^- de la paroi du capillaire (15, 75). Dans la séparation des analogues de l'hexaréline, l'addition de méthanol au tampon de migration entraîne une augmentation du temps d'analyse, tandis qu'avec l'acétonitrile on observe une diminution. Ni la résolution, ni l'ordre d'élution des peptides n'est affecté pour des concentrations de solvant organique allant jusqu'à 5 % (v/v). À partir de 10 % de solvant organique, la résolution entre les sept peptides est perdue.

Les conditions optimales de séparation ont permis de définir une relation linéaire entre la charge de chaque analogue et le temps de migration. Les peptides de charge élevée migrent d'abord, ils sont suivis par les autres peptides dans l'ordre de charge décroissante. Les analogues de l'hexaréline

qui possèdent la même charge se différencient par le rapport de charge sur masse.

L'optimisation de la séparation par CECM réside dans la variation de la concentration du tensioactif. Le changement du pH ou de la force ionique, ou l'ajout de solvant organique n'apporte aucun changement à la résolution.

L'utilisation de tensioactifs non-ioniques permet la séparation des analogues chargés selon leur hydrophobie sans variation de la nature du tampon ou du pH. L'interaction peptide-micelle détermine l'ordre d'élution. Cependant, plusieurs facteurs influencent également la séparation (116,117) :

- 1- le partage des peptides entre la phase aqueuse et les micelles;
- 2- l'interaction des micelles avec la phase aqueuse;
- 3- la mobilité électrophorétique des peptides.

Nous avons observé un changement de l'ordre de migration des analogues de l'hexaréline avec les tensioactifs neutres testés soient : le Tween 20, le Triton X-100 et l'octylglucoside. Une diminution du voltage était nécessaire en présence de Triton X-100 et l'octylglucoside pour obtenir un ordre de séparation identique à celui obtenue en présence de Tween 20 ou par HPLC. Ce phénomène est dû à une variation de la viscosité du milieu de séparation. Dans les conditions optimales, nous avons obtenu une relation linéaire entre le temps de migration des analogues de l'hexaréline et leur indice d'hydrophobie.

En RP-HPLC, la séparation complète des peptides s'est avérée plus délicate. Une coélution entre deux peptides de même indice d'hydrophobie a été observée. La variation des paramètres tels : le pH, le débit ou la nature du gradient sont sans influence sur la résolution.

En conclusion, ces travaux nous montrent l'efficacité de l'EC dans la séparation des analogues peptidiques de l'hexaréline. La simplicité et la rapidité de la méthode électrophorétique permet l'optimisation aisée de la résolution. L'ajout de tensioactifs non-ioniques au tampon de migration permet la séparation des analogues de l'hexaréline selon leur hydrophobie. Cependant, pour les espèces chimiques chargées, l'ECZ semble plus efficace comparé à la CECM. Les équations de corrélation entre le temps de migration et la charge d'une part, et d'autre part entre l'indice d'hydrophobie, permettent de prédire le temps de migration à partir de la structure d'un peptide.

La méthode électrophorétique développée dans ce projet de maîtrise ouvre plusieurs perspectives. Dans un premier temps, la quantification rapide de l'hexaréline dans les milieux biologiques (sang, urine, bile) sera possible dans les études pharmacocinétiques. Ultérieurement, la collection des fractions séparées sera utilisée pour déterminer la structure des produits de dégradation.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- 1) Hjerten S. Free zone electrophoresis. *Chromatogr Rev* 1967; 9(2): 122-219.
- 2) Tiselius A, Hjerten S, Jerstedt S. Electrophoretic "particle sieving" in polyacrylamide gels as applied to ribosomes. *Annal Bioch* 1965 11(2): 211-218.
- 3) Jorgenson JW, Lukacs KD. Capillary zone electrophoresis. *Science* 1983; 222: 266-272.
- 4) Jorgenson JW. Electrophoresis. *Anal Chem* 1986; 58:743A-760A.
- 5) Campos CC, Simpson CF. Capillary electrophoresis. *J Chromatogr Sci.* 1992; 30: 53-58.
- 6) Everearts FM, Verheggen ThPEM. Isotachophoresis electrophoretic analysis in capillaries. *J Chromatogr* 1970; 53: 315-328.
- 7) Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen ThPEM. High-performance zone electrophoresis. *J Chromatogr* 1979; 169: 11-20.
- 8) Jorgenson JW, Lukacs KD. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal Chem* 1981; 53: 1298-1302.
- 9) Jorgenson JW, Lukacs KD. High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. *J Chromatogr* 1981; 218: 209-216.
- 10) Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Tsuchiya A, Ando T. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal Chem* 1984; 56: 111-113.
- 11) Dittmann MM, Wienand K, Bek F, Rozing GP. Theory and practice of capillary electrochromatography. *LC-GC* 1995; 13(10): 800-814.
- 12) Taverna M, Baillet A, Baylocq-Ferrier D, Pellerin F. Contribution de l'électrophorèse capillaire dans l'analyse des molécules d'intérêt pharmaceutique et biotechnologique. *Annal pharmaceutiques françaises* 1992; 50(4): 199-214.

- 13) Gareil P. L'électrophorèse de zone et la chromatographie électrocinétique capillaire II: Mise en oeuvre expérimentale et applications. *Analysis* 1990; 18: 447-468.
- 14) Tsuda T, Nomura K, Nakagawa G. Separation of organic and metal ions by high voltage capillary electrophoresis. *J Chromatogr* 1983; 264: 385-392.
- 15) Mc Laughlin GM, Nolan JA, Lindahl JL, Palmieri RH, Anderson KW, Morris SC, Morrison JA, Bronzert TJ. Pharmaceutical drug separations by HPCE: practical guidelines. *J Liq Chromatogr* 1992; 15(6 & 7): 961-1021.
- 16) Cohen AS, Paulus A, Karger BI. High-performance capillary electrophoresis using open tubes and gels. *Chromatographia* 1987; 24: 15-24.
- 17) Burton DE, Sepaniak MJ, Maskarinec MP. The effect of injection procedures on efficiency in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Chromatographia* 1986; 21: 583-586.
- 18) Gordon MJ, Huang X, Pentoney SL, Zare RN. Capillary electrophoresis. *Science* 1988; 247: 224-228.
- 19) Otsuka K, Terabe S, Ando T. Quantitation and reproducibility in electrokinetic chromatography with micellar solutions. *J Chromatogr* 1987; 396: 350-354.
- 20) Fujiwara S, Honda S. Determination of cinnamic acid and its analogues by electrophoresis in a fused silica capillary tube. *Anal Chem* 1986; 58 : 1811-1814.
- 21) Prusik Z, Kasicka V, Stanek S, Kuncova G, Hayer M, Vrkoc J. Experimental device for electrokinetic micellar chromatography exploiting some components of capillary isotachopheresis instrumentation. *J Chromatogr* 1987; 390: 87-96.
- 22) Grossman PD, Wilson KJ, Petrie G, Lauer HH. Effect of buffer pH and peptide composition on the selectivity of peptide separations by capillary zone electrophoresis. *Anal Biochem* 1988; 173: 265-270.
- 23) Rose DJ, Jorgenson JW. Post-capillary fluorescence detection in capillary zone electrophoresis using o-phthalaldehyde. *J Chromatogr* 1988; 447: 117-131.

- 24) Guttman A, Paulus A, Cohen AS, Grinberg N, Karger BL. Use of complexing agents for selective separation in high-performance capillary electrophoresis. Chiral resolution via cyclodextrins incorporated within polyacrylamide gel columns. *J Chromatogr* 1988; 448: 41-53.
- 25) Nickerson B, Jorgenson JW. High speed capillary zone electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *J High Resolution Chromatogr & Chrom Commun* 1988; 11(7): 533-534.
- 26) Gassman E, Kuo JE, Zare RN. Electrokinetic separation of chiral compounds. *Science* 1985; 230: 813-814.
- 27) Huang X, Pang TKJ, Gordon MJ, Zare RN. On-column conductivity detector for capillary zone electrophoresis. *Anal Chem* 1987; 59: 2747-2749.
- 28) Chen CY, Demana T, Huang SD, Morris MD. Capillary zone electrophoresis with analyte velocity modulation. Application to refractive index detection. *Anal Chem* 1989; 61: 1590-1593.
- 29) Wallingford RA, Ewing AG. Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Anal Chem* 1987; 59: 1762-1766.
- 30) Mück WM, Henion JD. Determination of leucine enkephalin and methionine enkephalin in equine cerebrospinal fluid by microbore high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr* 1989; 495: 41-59.
- 31) Smith RD, Olivares JA, Nguyen NT, Udseth HR. Capillary zone electrophoresis mass spectrometry using an electrospray ionisation interface. *Anal Chem* 1988; 60: 436-441.
- 32) Altria KD. Fundamentals of capillary electrophoresis. In: Altria KD ed. *Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation and applications*. New Jersey: Humana Press Inc., 1996: 3-13.
- 33) Heiger DN. Principles of capillary electrophoresis. In: *High performance capillary electrophoresis-An introduction*. France: Hewlett-Packard Company. 1992: 12-39.
- 34) Robert F, Bouilloux JP, Donoroy L.L'électrophorèse capillaire : principe et applications. *Ann Biol Clin* 1991; 49: 137-148.

- 35) Pretorius V, Hopkins Bt, Schieke JD. Electroosmosis. A new concept for high-speed liquid chromatography. *J Chromatogr* 1974; 99: 23-30.
- 36) Tsuda T, Nomura K, Nakagawa G. Open-tubular microcapillary liquid chromatography with electroosmosis flow using a UV detector. *J Chromatogr* 1982; 248: 241-247.
- 37) Knox JH. Terminology and nomenclature in capillary electroseparation systems. *J Chromatogr A* 1994; 680: 3-13.
- 38) Altria KD, Simpson CF. High voltage capillary zone electrophoresis operating parameters effects upon electroosmotic flows and electrophoretic mobilities. *Chromatographia* 1987; 24: 527-530.
- 39) Lukacs KD, Jorgenson JW. Capillary zone electrophoresis. effect of physical parameters on separation efficiency and quantitation. *J High Resolution Chromatogr* 1985; 8: 407-411.
- 40) Van Orman BB, Liversidge GG, McIntyre GL, Olefirowicz TM, Ewing AG. Effects of buffer composition on electroosmotic flow in capillary electrophoresis. *J Microcolumn Sep* 1990; 2: 176-180.
- 41) Grushka E, McCormick RM, Kirkland JJ. Effect of temperature gradients on the efficiency of capillary zone electrophoresis separations. *Anal Chem* 1989; 61: 241-246.
- 42) Swedberg SA. Characterization of protein behavior in high performance capillary electrophoresis using a novel capillary system. *Anal Bioch* 1990; 185: 51-56.
- 43) Maa YF, Hyver KJ. Impact of wall modifications on protein elution in high-performance capillary electrophoresis. *J High Resolution Chromatogr* 1991; 14: 65-67.
- 44) Carchon H, Eggermont E. Capillary electrophoresis. *American Laboratory* 1992; January: 67-72.
- 45) Lauer HH, McMangill D. Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing. *Anal Chem* 1986; 58: 166-170.
- 46) Walbroehl Y, Jorgenson JW. Capillary zone electrophoresis of neutral organic molecules by solvophobic association with tetraalkylammonium ion. *Anal Chem* 1986; 58: 479-481.

- 47) Fujiwara S, Honda S. Effect of addition of organic solvent on the separation of positional isomers in high-voltage capillary zone electrophoresis. *Anal Chem* 1987; 59: 487-490.
- 48) Terabe S, Otsuka k, Ando T. Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Anal Chem* 1985; 57: 834-841.
- 49) Cohen AS, Terabe S, Smith JA, Karger BL. High-performance capillary electrophoretic separation of bases, nucleosides, and oligonucleotides: Retention manipulation via micellar solutions and metal additives. *Anal Chem* 1987; 59: 1021-1027.
- 50) Otsuka K, Terabe S, Ando T. Electrokinetic chromatography with micellar solutions. Retention behavior and separations of chlorinated phenols. *J Chromatogr* 1985; 348: 39-47.
- 51) Terabe S. Separation: principle/fundamentals. In: *Micellar electrokinetic chromatography*. California: Beckman Instruments Inc., 1992: 4-6.
- 52) Giddings JC. Generation of variance, 'theoretical plates' resolution, and peak capacity in electrophoresis and sedimentation. *Sep Sci* 1969; 4: 181-189.
- 53) Sepaniak MJ, Cole RO. Column efficiency in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal Chem* 1987; 59: 472-476.
- 54) Foret F, Deml M, Bocek P. Capillary zone electrophoresis. Quantitative study of the effect of some dispersive processes on the separation efficiency. *J Chromatogr* 1988; 452: 601-613.
- 55) Terabe S, Otsuka K, Ando T. Band broadening in electrokinetic chromatography with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal Chem* 1989; 61: 251-260.
- 56) Terabe S, Ozaki H, Otsuka K, AndoT. Electrokinetic chromatography with 2-o-carboxymethyl- β -cyclodextrin as a moving "stationary" phase. *J Chromatogr* 1985; 332: 211-217.
- 57) Burton DE, Sepaniak MJ, Maskarinec MP. Analysis of B₆ vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography with laser excited fluorescence. *J Chromatogr Sci* 1986; 24: 347-351.

- 58) Arcelloni C, Fermo I, Banfi G, Pontiroli AE, Paroni R. Capillary electrophoresis for protein analysis separation of human growth hormone and human insuline molecular forms. *Anal Bioch* 1993; 212: 160-167.
- 59) Olechno JD, Tso JMY, Thayer J, Wainright A. Capillary electrophoresis: A multifaceted technique for analytical chemistry. Part I: separations. *American Laboratory* 51: 51-58.
- 60) Saitoh T, Hoshiho H, Yotsuyanagi T. Separation of 4-(2-pyridylazo)resorcinolato metal chelates by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr* 1989; 469: 175-181.
- 61) Otsuka K, Terabe S, Ando T. Electrokinetic chromatography with micellar solutions: separation of phenylthiohydantoin- amino acids. *J Chromatogr* 1985; 312: 219-226.
- 62) Terabe S. Selectivity manipulation. In: *Micellar electrokinetic chromatography*. California: Beckman Instruments Inc., 1992: 20-37.
- 63) Berthod A, Dorsey JG. Les phases mobiles micellaires. *Analysis* 1988; 16 (2): 75-89.
- 64) Hjerten S, Zhu MD. Micropreparative version of high-performance electrophoresis. The electrophoretic counterpart of narrow-bore high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1985; 327: 157-164.
- 65) Modes of capillary electrophoresis. In: *Introduction to capillary electrophoresis*. California: Beckman Instruments Inc., 1991:12-36.
- 66) Heiger DN. Modes of operation. In: *High performance capillary electrophoresis-An introduction*. France: Hewlett-Packard Company. 1992: 42-75.
- 67) Swaile DF, Burton DE, Balchunas AT, Sepaniak MJ. Pharmaceutical analysis using micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr Sci* 1988; 26: 406-409.
- 68) Nishi T, Tsumagari N, Kakimoto T, Terabe S. Separation of β -lactam antibiotics by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr* 1989; 477: 259-270.
- 69) Maskarinek MP, Row KH, Griest WH. Separation of modified nucleic acids constituents by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr* 1987; 409: 193 -203.

- 70) Yin HF, Lux JA, Schomburg G. Production of polyacrylamide gel filled capillaries for capillary gel electrophoresis (CGE): influence of capillary surface pretreatment on performance and stability. *J High Resolution Chromatogr* 1990; 13: 624-627.
- 71) Verheggen ThPEM, Beckers JL, Everaerts FM. Simple sampling device for capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr* 1988; 452: 615-622.
- 72) Wheat TE. Principles and practice of peptide analysis with capillary zone electrophoresis. In: Dunn BM, Pennington MW. eds. *Peptide analysis protocols*. New Jersey: Humana Press Inc., 1994: 65-83.
- 73) Burgi DS, Chien RL. Application and limits of sample stacking in capillary electrophoresis. In: Altria KD. ed. *Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation and applications*. New Jersey: Humana Press Inc., 1996: 211-225.
- 74) Gonnet C, Gonot G. Comportement des proteines dans un système chromatographique. Aspect physicochimique et chromatographique à polarité de phases inversé des proteines. *Analysis* 1990; 18: 381-398.
- 75) Kasicka V, Prusik Z, Smekal O, Hlavacek J, Barth T, Weber G, Wagner H. Application of capillary and free-flow zone electrophoresis and isotachopheresis to the analysis and preparation of the synthetic tetrapeptide fragments of growth hormone-releasing peptide. *J Chromatogr B* 1994; 656: 99-106.
- 76) Heiger DN, Kaltenbach P, Sievert HJP. Diode array detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1994; 15: 1234-1247.
- 77) Nielsen RG, Riggan RM, Rickard EC. Capillary zone electrophoresis of peptide fragments from trypsin digestion of biosynthetic human growth hormone. *J Chromatogr* 1989; 480: 393-401.
- 78) Grossman PD, Colburn JC, Lauer HH, Nielsen RG, Riggan RM, Sittampalam GS, Richard EC. Application of free solution capillary electrophoresis to the analytical scale separation of proteins and peptides. *Anal Chem* 1989; 61: 1186-1194.
- 79) Ludi H, Gassmann E, Grossenbacher H, Marki W. Capillary electrophoresis for the analysis of peptides synthesized by recombinant DNA technology. *Anal Chim Acta* 1988; 213: 215-219.

- 80) Klyushmichenko VE, Koulich DM, Yakimov SA, Maltsev KV, Grishina GA, Nazimov IV, Wulfson AN. High-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis control in the analysis of step-by-step production of recombinant human insulin. *J Chromatogr A* 1994; 661: 83-92.
- 81) Idei M, Mezo I, Vadasz ZS, Horvath A, Teplan I, Keri GY. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis in the analysis of somatostatin analogue peptides. *J Chromatogr* 1993; 648: 251-256.
- 82) Frenz J, Wu SL, Hancock WS. Characterization of human growth hormone by capillary electrophoresis. *J Chromatogr* 1989; 480: 379-391.
- 83) Deyl Z, Rohlicek V, Struzinsky R. Some rules applicable to capillary zone electrophoresis of peptides and proteins. *J Liquid Chromatogr* 1989; 12: 2515-2526.
- 84) Green JS, Jorgenson JW. Variable-wavelength on-column fluorescence detector for open-tubular zone electrophoresis. *J Chromatogr* 1986; 352: 337-343.
- 85) Kathryn MDC, Phyllis A, Brown R, Cheng YF, Cohen SA. Analysis of derivatized peptides by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1994; 661: 279-285.
- 86) Hjerten S, Valtcheva L, Clenbring K, Eaker D. High-performance electrophoresis of acidic and basic low-molecular weight compounds and of proteins in the presence of polymers and neutral surfactants. *J Liquid Chromatogr* 1989; 12(13): 2471-2499.
- 87) Herold M, Ross GA, Grimm R, Heiger DN. Separation of peptides and protein digests by capillary electrophoresis. In: Altria KD. ed. *Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation and applications*. New Jersey: Humana Press Inc., 1996: 285.
- 88) Rudnick S, Hilser V, Jr, Worosola GD. Comparison of the utility of capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography in peptide mapping separation. *J Chromatogr A* 1994; 672: 219-229.
- 89) Stover FS, Haymore BL, McBeath RJ. Capillary zone electrophoresis of histidine containing compounds. *J Chromatogr* 1989; 470: 241-250.

- 90) Kathryn MDC, Phyllis A, Brown R, Chung YF, Cohen SA. analysis of derivatized peptides by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1994; 661: 279-285.
- 91) Hjerten S, Valtcheva CL, Eaker DL. High-performance electrophoresis of acidic and basic low-molecular weight compounds and of proteins in the presence polymers and neutral surfactants. *J Liq Chromatogr* 1984; 12 (13): 2471-2499.
- 92) Lottspeich F. HPLC and electrophoresis - competitors or partners. *Chromatographia* 1989; 28: 89-91.
- 93) Kirkland JJ, McCormick RM. Liquid phase separation methods: HPLC, FFF, electrophoresis. *Chromatographia* 1987; 24:58-76.
- 94) Fujiwara S, Iwase S, Honda S. Analysis of water soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr* 1988; 447: 133-140.
- 95) Nielson RG, Rickard EC. Method optimization in capillary zone electrophoresis analysis of hGH tryptic digest fragments. *J Chromatogr* 1990; 516: 99-114.
- 96) Schwartz HE, Palmieri RH, Nolan JA, Brown R. Separation of peptides. In: *Introduction to capillary electrophoresis of proteins and peptides*. California: Beckman Instruments Inc., 1993: 10-26.
- 97) Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen ThPEM. Concentration distributions in free zone electrophoresis. *J Chromatogr* 1979; 169: 1-10.
- 98) Beckers JL, Everaerts FM. Isotachophoresis with two leading ions and migration behaviour in capillary zone electrophoresis II. Migration behaviour in capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr* 1990; 508: 19-26.
- 99) Janini GM, Haleen JI. Micellar electrokinetic capillary chromatography: Basic considerations and current trends. *J Liq Chromatogr* 1992; 15(6&7): 927-960.
- 100) Schwartz HE, Palmieri RH, Nolan JA, Brown R. Electrophoretic migration of peptides and proteins. In: *Introduction to capillary electrophoresis of proteins and peptides*. California: Beckman Instruments Inc., 1993: 5-9.
- 101) Offord RE. Electrophoretic mobilities of peptides on paper and their use in the determination of amide groups. *Nature* 1996; 211: 591.

- 102) Rickard EC, Strohl MM, Nielsen RG. Correlation of electrophoretic mobilities from capillary electrophoresis with physicochemical properties of proteins and peptides. *Anal Bioch.* 1991; 197: 197-207.
- 103) Grossman PD, Colburn JC, Lauer HH. A semi-empirical model for the electrophoretic mobilities of peptides in free solution capillary electrophoresis. *Anal Bioch.* 1989; 179: 28-33.
- 104) Hilser VJ Jr, Worosila GD, Rudnick SE. Protein and peptide mobility in capillary zone electrophoresis. A comparison of existing models and further analysis. *J Chromatogr* 1993; 630: 329-336.
- 105) Castagnola M, Cassiano L, Messana I, Nocca G, Rabino R, Rossetti DV, Giardina B. Capillary zone electrophoresis of peptides. Prediction of the electrophoretic mobility and resolution. *J Chromatogr B* 1994; 656: 87-97.
- 106) Cifuentes A, Hans P. Simulation and optimization of peptide separation by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1994; 680: 321-340.
- 107) Compton BJ, O'Grady EA. Role of charge suppression and ionic strength in free zone electrophoresis of proteins. *Anal Chem* 1991; 63(22): 2697-2602.
- 108) Compton BJ. Electrophoretic mobility modeling of proteins in free zone capillary electrophoresis and its application to monoclonal antibody microheterogeneity analysis. *J Chromatogr* 1991; 559: 357-366.
- 109) Deghenghi R, Cananzi MM, torsello A, Battisti C, Muller EE, Locabelli V. GH-releasing activity of hexarelin, a new growth hormone-releasing peptide, in infant and adult rats. *Life Sci* 1994; 54(18): 1321-1328.
- 110) Arvat E, Gianotti L, Grottoli S, Imbimbo BP, Lenaerts V, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E. Arginine and growth hormone-releasing hormone restore the blunted growth hormone-releasing activity of hexarelin in elderly subjects. *J Clin Endoc & Metab* 1994; 79(5): 1440-1443.
- 111) Arvat E, Gianotti L, DiVito L, Imbimbo B, Lenaerts V, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E. Modulation of growth hormone-releasing activity of hexarelin in man. *Neuroendocrinology* 1995; 61: 51-56.
- 112) Loche S, Cambiaso P, Carta D, Setzu S, Imbimbo B, Borrelli P, Pinto C, Cappa M. The growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide in short normal and obese children, and in hypopituitary subjects. *J Clin Endoc & Metab* 1995; 80(2): 674-678.

-
- 113) Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Hong A, Newlander K. Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides. *Endocrinology* 1984; 114(5): 1531-1536.
- 114) Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 1982; 157: 105-132.
- 115) Holland LA, Chetwyn NP, Perkins MD, Lunte SM. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Pharm Research* 1997; 14(4): 372-387.
- 116) Altria KD. Method development/ optimization. In: Altria KD. ed. *Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and applications*. New Jersey: humana Press Inc., 1996: 29-48.
- 117) Ong CP, Ng CL, Lee HK, Li SFY. Separation of Dns-amino acids and vitamins by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr* 1991; 559: 537-545.