

248. Le dosage colorimétrique (réaction du biuret) de l'azote protéique

par P. Baudet et Cl. Giddey.

(4 VIII 48)

Le dosage des protides par colorimétrie à l'aide de la réaction du biuret a déjà fait l'objet de plusieurs travaux. Les premiers auteurs¹⁾ ont procédé par comparaison des colorations obtenues dans des conditions empiriques, avec celles que fournissait une solution de référence, préparée soit à l'aide de biuret soit à l'aide d'une solution standard de protides. *Lieben* et *Jesserer*²⁾ notamment on constaté que dans les conditions appropriées, l'intensité et la nuance de la coloration étaient identiques pour divers protides (contrôle gravimétrique) et pour leurs produits d'hydrolyse partielle (peptones) pourvu que ceux-ci fussent de poids moléculaire élevé (non dialysables). *Robinson* et *Hogden*³⁾ ont fait une étude très complète des conditions dans lesquelles on obtient une coloration stable et d'une intensité proportionnelle à la teneur en azote protéique. Dans ces études, les protides envisagés (protéines totales, albumine, globulines totales) étaient essentiellement ceux que contiennent le sang ou d'autres liqueurs physiologiques ou pathologiques (ascite), et le dosage était toujours basé sur la comparaison avec une solution de référence à concentration connue en azote protéique.

Examinant le dosage colorimétrique de l'azote protéique, nous avons constaté dans le cas de la réaction du biuret que la gamme des protides et de leurs produits d'hydrolyse partielle susceptibles de se prêter à ce dosage est bien plus étendue qu'on ne l'avait cru (voir tableau): en outre, il se trouve que la mesure de l'extinction (photomètre de *Pulfrich*, électrophotomètre de *Klett-Summerson*) permet, l'appareil une fois étalonné, de supprimer la comparaison avec une solution de référence, ce qui constitue une simplification opératoire très appréciable.

D'après les résultats dont nous disposons actuellement, les protides contenant une proportion appréciable d'azote non peptidique donnent au dosage colorimétrique des valeurs trop faibles. Cela est le cas par exemple pour des mucoides, et notamment pour les protamines. Cela n'est pas pour surprendre, puisque dans la réaction du

¹⁾ *Autenrieth* und *Mink*, Münch. med. Wschr. **62**, 1417 (1915); *Autenrieth*, ibid. **64**, 241 (1917).

²⁾ *Bioch. Z.* **285**, 36 (1936).

³⁾ *J. Biol. Chem.* **135**, 707 et 727 (1940).

Tableau

Protéines	Klett mgr. N/cm ³	Pulfrich mgr. N/ cm ³	Micro- Kjeldahl mgr. N/ cm ³	Ecart Klett- Kjeldahl en %	Ecart Pulfrich- Kjeldahl en %
α -Caséine	{ 0,259 1,05	0,240 1,10	0,255 1,06	+1,5 -0,9	-5,9 +3,8
β -Caséine	{ 0,360 0,360	0,365 0,365	0,371 0,369	-3 -2,4	-1,5 -1,0
Edestine	0,324	0,320	0,333	-2,7	+4,0
(Hoffmann-La Roche) .	0,329	0,329	0,335	-1,7	-1,7
Lysozyme crist.*)	0,301	0,296	0,308	-2,2	-3,8
(Armour, Chicago)	0,302	0,296	0,296	-1,6	0
Protéines de la phosphatase alcaline du rein de porc (selon Albers), précipités par l'acide trichlor acétique	{ 0,168 0,169	— 0,172	0,164 0,164	+2,3 +3,0	— +4,8
Papaïne brute, précipité trichloracét.	{ 0,345 0,345	0,345 0,345	0,341 0,338	+1,1 +2,0	+1,1 +2,0
Amylase crist. du pancréas de porc*), précipité trichloracétique	{ 0,130 0,130	— —	0,134 0,134	-2,9 -2,9	— —
Amylase du malt*) (pure au p. de vue protéique)	{ — —	0,885 0,590	0,903 0,573	— —	+2,0 +2,8
Amylase crist. de salive humaine*)	{ — — — —	0,174 0,129 0,435 0,112	0,178 0,132 0,425 0,113	— — — —	+2,3 +2,3 -2,3 +0,9
Pepsine (pharmacopée), protides purifiés par 3 précipitations trichloracétiques	{ — —	0,960 0,959	0,900 0,898	— —	+4,4 +6,4
Peptones de la soie (Hoffmann-La Roche)	{ 0,438 0,436	0,443 0,444	0,430 0,440	+2,3 -0,9	-2,3 +0,9
Peptones (Merck) dialysées 3 jours contre l'eau distillée	{ 0,530 0,530	0,560 0,560	0,548 0,548	-3,2 -3,5	+2,2 +1,8
Protéines de muqueuse intestinale du porc, après 2 précipitations trichloracét.	{ 0,617 0,630	— —	0,686 —	-8,8 —	— —
Protamine (sulfate*) . .	{ 1,03 1,03	1,01 1,01	1,95 1,93	+47 -47	-48 -48

*) Echantillons fournis très obligeamment par M. P. Bernfeld, privat-docent à l'Université, auquel nous renouvelons ici l'expression de nos remerciements.

biuret, ce sont essentiellement les liaisons peptidiques qui interviennent et non l'azote contenu dans les chaînons latéraux se greffant sur la chaîne polypeptique principale. Ce dosage très simple et rapide permet donc de vérifier par comparaison avec un dosage d'azote *Kjeldahl*, la présence éventuelle de protides contenant une proportion appréciable d'azote non peptidique.

Cette méthode est assez précise (écart d'avec le dosage *Kjeldahl* $\pm 2\%$) et très sensible. La limite de sensibilité avec l'appareil de *Klett-Summerson* est de l'ordre de 200 γ de matière protéique (30 γ d'azote protéique) pour la prise examinée dans le volume peut être de 9,6 cm³ au maximum (voir mode opératoire), ce qui représente alors une concentration de 0,002%. Avec le photomètre de *Pulfrich*, la sensibilité est environ 4 fois moindre.

Mode opératoire.

1° Préparation des solutions colorées.

a) *En absence de substances gênantes* (sels ammoniacaux, amines, acides aminés, polypeptides simples, produits colorés ou troubles).

Réactifs: NaOH à 15%; SO₄Cu, aq à 20%.

Dans un tube à centrifuger, on introduit n cm³ de la solution à doser (au maximum 9,6 cm³). Cette solution doit être neutre et contenir au maximum environ 10 mgr. de protides (environ 1,500 γ d'azote protéique) dans le volume mis en œuvre. Cette prise est portée à 9,6 cm³ par addition, d'une burette graduée, de 12 - (n + 2,4) cm³ d'eau distillée. D'une autre burette, on fait couler 2,4 cm³ NaOH 15%, ce qui amène la teneur en NaOH à 3%. Après avoir homogénéisé la liqueur par légère agitation, on ajoute 0,35 cm³ de solution de sulfate de cuivre à 20%. Le précipité d'hydroxyde de cuivre est agité $\frac{1}{2}$ minute avec une baguette de verre. Au bout de 10 minutes, la coloration a atteint pratiquement un niveau constant. Une centrifugation de 2 minutes à 2000 t/min. assure une sédimentation du Cu(OH)₂ en excès, telle qu'on peut décanter une liqueur absolument claire — ce qui est essentiel — dans la cuve du photomètre. Avec l'appareil de *Pulfrich*, nous avons utilisé une cuve de 30 mm. et le filtre S 53 vert, et avec l'électrophotomètre de *Klett-Summerson*, une cuve de 14,4 mm. et le filtre 54 vert. La détermination de l'extinction fournit la concentration de l'azote protéique de la solution photométrée en γ/cm^3 à l'aide de la droite d'étalonnage de l'instrument. L'azote protéique total de la prise vaut alors $\gamma \times 12,35$.

b) *En présence de substances gênantes.*

Réactifs supplémentaires: acide trichloracétique à 20%; NaOH à 3%.

Une prise convenable de solution, ne contenant pas plus de 10 mgr. de protides (soit environ 1,500 γ d'azote protéique) est précipitée dans un tube à centrifuger par addition de son volume d'acide trichloracétique à 20%. On centrifuge 10 minutes à 3000 t/min. Le centrifugat est filtré pour retenir le film de protides qui souvent se forme à l'interface air-solution; on égoutte soigneusement le culot et le porte quelques minutes à l'étuve à 60°, ce qui permet de négliger le volume du précipité. On verse quelques cm³ NaOH 3% sur le filtre qui retient le film, de manière à dissoudre ce dernier on prélève avec une pipette graduée la plus grande partie possible de ce filtrat qu'on verse sur le culot, on complète le volume à 12 cm³ avec cette même soude caustique et suspend le précipité dans le liquide à l'aide d'une baguette. Après dissolution intégrale (vérifier l'absence de particules gélatineuses qui restent parfois en suspension) on introduit les 0,35 cm³ de solution cuprique. La suite des opérations est la même que sous a).

Comme *Robinson et Hogden* l'ont déjà constaté, la centrifugation peut être remplacée par une filtration sur papier, mais seulement à la condition d'utiliser des filtres sans cendres; le papier ordinaire, comme le coton, diminue de façon perceptible l'intensité de la coloration.

2° Etalonnage.

Nous avons établi une courbe d'étalonnage avec une solution neutre de caséinate de sodium, préparée avec de la caséine précipitée au point isoélectrique. La solution est filtrée sur du Supercell pour éliminer un constituant donnant aux solutions un troubles gênant pour la photométrie. La teneur en azote de la solution a été dosée par semimicro-*Kjeldahl*.

En portant en abscisse l'azote protéique mis en œuvre selon le procédé a, et en ordonnée les coefficients d'extinction *K*, on obtient une droite (voir fig.), ce qui confirme que l'intensité de la coloration suit la loi de *Beer*. L'origine de cette droite n'est pas à zéro, mais à une valeur positive de *K* qui correspond à l'absorption de la solution de cuprite de sodium (ou de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ colloïdal), qui se forme indépendamment de la présence de complexes biurétiques. De petites variations dans la concentration de la soude caustique à 15% se traduisent par des variations perceptibles de l'absorption à blanc; celle-ci doit donc être déterminée toutes les fois qu'on utilise de nouvelles solutions de NaOH . En portant des étalonnages faits avec des solutions différentes de soude caustique dans le même graphique, on constate le parallélisme des diverses droites.

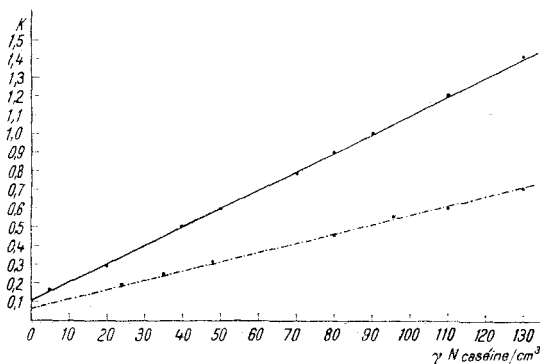


Fig. 1.

--- Droite établie avec le *Pulfrich* (cuve de 30 mm; filtre S. 53).

— Droite établie avec le *Klett-Summerson* (cuve de 14,4 mm; filtre S. 54).

3° Précision et sensibilité. Stabilité.

Dans nos conditions de travail, une erreur de lecture de 0,01 unité au *Klett-Summerson* correspond à un écart de $1 \gamma/\text{cm}^3$ d'azote protéique. Une erreur de lecture de 0,01 unité au *Pulfrich* entraîne une erreur de $\pm 2 \gamma/\text{cm}^3$ d'azote protéique. Les lectures sont bonnes jusqu'à une concentration maximum d'environ $120 \gamma/\text{cm}^3$ d'azote, soit 1500γ d'azote ou 10 mgr. de protides par prise.

On peut doser encore un minimum de $2,5 \gamma/\text{cm}^3$ d'azote protéique, avec le *Klett-Summerson*, soit pour le volume total de $12,35 \text{ cm}^3$ environ $31 \gamma \text{ N}$ ou 0,2 mgr. de protides (calculés avec le facteur 6,25). A condition de disposer de 10 cm^3 de liquide à examiner, on peut donc déceler encore 0,002% de matière protéique. Nous avons adopté le volume total de $12,35 \text{ cm}^3$ pour la solution terminée pour la colorimétrie parce qu'on dispose alors d'une quantité de liquide qui permet, dans les dosages en série, de rincer chaque fois la

cuve avec la nouvelle solution avant de procéder au remplissage pour la lecture. Si on prend soin de sécher la cuve avant chaque opération, on peut se contenter, par dosage, d'un volume de 7 cm³ (prise de 5,4 cm³; 1,4 cm³ NaOH 15%; 0,2 cm³ SO₄Cu, aq 20%); cela permet de doser en quantité absolue encore un minimum d'environ 0,1 mgr. de matière protéique.

Avec le photomètre de *Pulfrich*, la sensibilité est environ quatre fois moindre.

L'intensité de la coloration atteint pratiquement son maximum au bout de 10 minutes. Avec le *Klett-Summerson*, on constate après 2 heures une augmentation de l'extinction de 0,01 unité; l'extinction reste ensuite longtemps constante pour diminuer très lentement.

4^o Substances gênant le dosage direct.

Certains acides aminés tels que le tryptophane, la tyrosine, la méthionine, la leucine, l'arginine, ne donnent pas de coloration gênante dans nos conditions. D'autres par contre, tels que le glycocole ou l'asparagine, modifient nettement l'absorption optique. Il en est de même pour des peptides simples tels que la di- et la triglycylglycine. Les amines (co-lamine p. ex.) gênent également. Les sels ammoniacaux doivent être absents: 1 mgr. NH₃ présent dans la prise mise en œuvre augmente l'extinction autant que 1 γ d'azote protéique par cm³. Toutes les fois que de l'ammoniaque, des acides aminés, des amines ou des peptides simples peuvent être présents, il faudra donc recourir au dosage après précipitation trichloracétique.

5^o Quelques résultats.

Le tableau reproduit les résultats de toute une série de dosages individuels. On voit que les chiffres fournis par le dosage colorimétrique sont bons, à l'exception de ceux concernant les deux derniers produits. Les protides de la muqueuse de porc donnaient une forte réaction de *Molisch*; elles devaient contenir par conséquent des mucines, à azote non peptidique en proportion appréciable, ce qui explique l'écart en moins pour le dosage colorimétrique. Quant à la protamine, le résultat beaucoup trop faible du dosage colorimétrique était à prévoir, vu la forte proportion d'acides diaminés des protamines (24–32% N). — En faisant abstraction de ces deux derniers produits, la moyenne arithmétique des écarts des dosages colorimétriques par rapport aux *Kjeldahl* s'établit à -0,6% pour l'appareil de *Klett-Summerson*, et à +1,2% pour le *Pulfrich*. L'erreur pondérée moyenne, calculée selon la formule

$$e = \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n-1}},$$

s'établit à ± 2,4% pour le *Klett-Summerson* et à ± 3,3% pour le *Pulfrich*. — L'écart entre le dosage colorimétrique et l'azote *Kjeldahl* peut précisément révéler la présence de protides à teneur appréciable en azote non peptidique.

Nous remercions Monsieur le Professeur *E. Cherbuliez* de l'aide et de l'intérêt qu'il a apportés à ce travail.

RÉSUMÉ.

La méthode de dosage colorimétrique de l'azote protéique, telle qu'elle a été décrite, permet, le photomètre une fois étalonné, avec une protéine quelconque dont l'azote total varie entre 14 et 18%, d'effectuer des déterminations sans solution de référence. Grâce à la constance pratique du rapport entre azote protéique et azote peptidique chez la plupart des protides et leurs dérivés de poids moléculaire élevé, cette méthode est d'une application très générale. La com-

paraison de l'azote protéique trouvé par colorimétrie avec le résultat d'un dosage au *Kjeldahl* permet de déceler la présence de substances contenant une proportion appréciable d'azote non peptidique. La précision du dosage est de l'ordre de 2% et sa sensibilité de l'ordre de 0,1 mgr. de matière protéique.

Laboratoire de chimie pharmaceutique de l'Université
de Genève.

Bei der Redaktion eingelaufene Bücher:

(Die Redaktion verpflichtet sich nicht zur Besprechung der eingesandten Werke.)

Livres reçus par la Rédaction:

(La rédaction ne s'engage pas à publier des analyses des ouvrages qui lui sont soumis.)

Gli aminoacidi in biologia e in terapia, da *Francesco Vacirca*, docente di patologia generale, 17,5 × 25 cm, 590 pagine, *Istituto sieroterapico milanese Serafino Belfanti*, Milano, 1948.

Morphologie und Struktur von Holzfasern, von Dr. *Hans Bucher* und *Louis Pierre Widerkehr-Scherb*, 17 × 24 cm, 34 Seiten, 40 Kunstdrucktafeln. Untersuchungen aus dem Laboratorium der *Cellulosefabrik Attisholz AG. vorm. Dr. B. Sieber*, Attisholz bei Solothurn, 1948.

Gedanken über Aufgaben und Ziele der Schweizerischen Gesellschaft für das Studium der Motorbrennstoffe; Gemischbildung im schnellaufenden Dieselmotor; Die Leistungssteigerung von Diesel- und Gasmotoren mittels Abgasturboladern, insbesondere bei Schienen- und Strassenfahrzeugen; Über die neuere Entwicklung auf dem Gebiet der Motorenöle; Moderne Verfahren zur Herstellung klopffester Flugbenzine: Bericht Nr. 12 der *Schweizerischen Gesellschaft für das Studium der Motorbrennstoffe*, 16 × 23 cm, Selbstverlag, Bern, Bahnhofstrasse 5, 1948, Fr. 6.—.

Reiseerinnerungen aus Deutschland, von *Jacob Berzelius*, 10,5 × 16 cm, 71 Seiten, *Verlag Chemie GmbH.*, Weinheim/Bergstrasse — Berlin, 1948, DM 2,50 = sFr. 3,75.

Künstliche neue Elemente, von *Otto Hahn*, 15 × 23 cm, 50 Seiten, *Verlag Chemie GmbH.*, Weinheim/Bergstrasse — Berlin, 1948, DM 2.— = sFr. 2,50.
