

167. Ultramicrodosage de l'azote total des polypeptides et des acides aminés, isolés de chromatogrammes ou d'électrophorogrammes sur papier par Pierre Baudet et Emile Cherbuliez.

En hommage au Prof. T. Reichstein à l'occasion de son 60^e anniversaire.

(29 V 57)

Le dosage de l'azote total des polypeptides et des acides aminés, obtenus en faible quantité par élution de chromatogrammes et d'électrophorogrammes sur papier, doit s'adresser à une ultramicrométhode : en effet, il s'agit de travailler avec de très faibles volumes et avec des quantités d'azote à doser, voisines du microgramme. Elle doit en outre se prêter aux déterminations en série.

Dans les travaux de séparation des polypeptides et des acides aminés que nous réalisons dans notre laboratoire, nous recueillons des éluats de 0,5 à 0,7 ml contenant 25 à 350 µg d'azote. Pour perdre un minimum de substance par l'analyse, il est souhaitable qu'on puisse effectuer le dosage de l'azote total, dans chacun des éluats obtenus dans des séries de 16 à 48 échantillons, avec des prises de 10 µl représentant donc 1,5 à 2 % du volume des éluats et contenant 0,5 à 8 µg d'azote total.

Les ultramicrométhodes qui existent déjà donnent satisfaction en ce qui concerne la précision et la sensibilité. On procède toujours à une désagrégation sulfurique. Les conditions de cette désagrégation ont été étudiées. L'azote ammoniacal formé est dosé par titrimétrie après séparation par diffusion.

D. Brüel et collab.¹⁾ décrivent une excellente méthode (désagrégation en tube ouvert).

E. R. Tompkins & P. L. Kirk²⁾ déterminent 1 à 20 µg d'azote après une désagrégation en tube ouvert à environ 300°. Un ultramicrodosage de l'azote a été réalisé par *P. J. Grunbaum et coll.³⁾* après une désagrégation de la substance organique en tube scellé, comme le préconisaient déjà *L. M. White & M. C. Long⁴⁾*, dans de l'acide sulfurique sans catalyseur.

Aucune des méthodes citées ne nous parut pouvoir être appliquée aux dosages en série de l'azote total des polypeptides et des acides aminés isolés par chromatographie et par électrophorèse : quoique bien élaborées et précises, elles exigent trop de temps et de travail. C'est pourquoi nous avons mis au point le procédé suivant.

¹⁾ *D. Brüel, H. Holter, K. Linderström-Lang & K. Rozitz*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **25**, 289 (1946).

²⁾ *E. R. Tompkins & P. L. Kirk*, J. biol. Chemistry **142**, 477 (1942).

³⁾ *P. J. Grunbaum, F. L. Shaffer & P. L. Kirk*, Anal. Chemistry **24**, 1487 (1952).

⁴⁾ *L. M. White & M. C. Long*, Anal. Chemistry **23**, 303 (1951).

Son principe repose sur la digestion de la substance organique dans 10 μl d'acide sulfurique 1:1 dans un capillaire à 450° durant 30 min. et sur le dosage colorimétrique (ninhydrine) de l'ammoniac formé.

Les volumes très réduits avec lesquels nous opérons demandent des manipulations très étudiées, car il est essentiel de réduire les pertes avant et après la désagrégation. Nous y parvenons, d'une part, à l'aide d'une ultramicropipette (voir fig. 1) de 10 μl , en polyéthylène, que l'on doit à *M. Sanz*⁵⁾ et qui permet des prélèvements rapides avec une précision de $\pm 0,3\%$ et, d'autre part, au moyen d'une standardisation de toutes les manipulations effectuées avec les tubes capillaires⁶⁾.

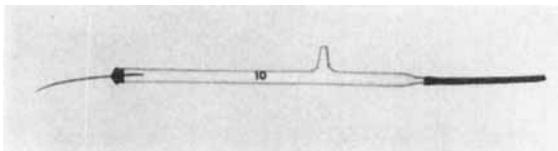


Fig. 1.

Micropipette de *Sanz*⁵⁾ ($\frac{1}{4}$ grandeur naturelle).
Le tube capillaire en polyéthylène (à gauche, en noir)
est calibré pour contenir 10 μl ($\pm 0,3\%$).

I. Désagrégation.

Réactifs: 1^o Réactif de désagrégation: on dissout 1 g de chlorure mercurique puriss. dans 250 cm³ d'eau distillée et l'on introduit dans cette solution, à froid, en agitant, 250 cm³ d'acide sulfurique pro analysi *Merck*, d = 1,89. Pour protéger ce réactif des contaminations atmosphériques, on le tient sous une cloche de verre dans laquelle se trouve un cristallisoir contenant de l'acide sulfurique concentré.

2^o NaOH 0,1-n.

Appareillage. Capillaires en pyrex de 0,6—0,7 mm de Ø int., 5 mm de Ø ext. et de 120 mm de long, étirés d'un côté en une pointe fine, ouverts aux deux extrémités.

Le four de désagrégation est rectangulaire, 43 × 15 × 15 em. Le corps de chauffe est constitué par deux bobinages d'une résistance donnant chacune 450 W à 190 V. La régulation de la température est assurée par la dilatation d'une barre d'acier de 50 cm de long et de 1,2 cm de Ø, dans laquelle est placée une barre de quartz de même longueur et de 1 cm de Ø, qui déclenche ou enclenche un microrupteur (Miltac XOND). La température peut être réglée à 450° $\pm 2^\circ$. Un plateau en matière incombustible peut recevoir 50 capillaires.

Ultramicropipette de 10 μl , de *Sanz*⁵⁾ (fig. 1).

Tubes à centrifuger, en pyrex, de 15 × 180 mm, sans bord.

Support en aluminium pour 50 tubes.

Mode opératoire: 10 μl de l'éluat, prélevés avec l'ultramicropipette de *Sanz*, sont introduits dans un godet de verre de 8 mm de diamètre intérieur. On rend le milieu 0,05-n. en NaOH en y introduisant 10 μl de NaOH 0,1-n., et évapore les 20 μl sous un vide de 15 Torr par séjour sur de la potasse, ce qui dure environ 15 min. Ce traitement est destiné à dégager les amines volatiles telles que l'ammoniac contaminant de l'atmo-

⁵⁾ *M. Sanz*, Clinical Chemistry, New York 1957.

⁶⁾ *M. Sanz* (communication personnelle) a déjà préconisé des manipulations semblables de capillaires.

sphère ou la pyridine provenant des tampons utilisés en électrophorèse sur papier. Pour la désagrégation, le résidu dans le godet est repris par 10 μl de réactif de désagrégation (1^o). Pour éviter tout danger de contamination de cette solution acide par des bases volatiles dont les vapeurs pourraient être présentes dans l'air, cette solution est aussitôt aspirée, par le seul effet de la capillarité, dans un capillaire dont on introduit la pointe étirée dans l'angle du godet tenu incliné (voir fig. 2, a). Comme les résultats des dosages l'indiquent (tableau 1), la quasi totalité des dits 10 μl de la solution se trouvent ainsi introduits dans le capillaire où ils forment une colonne d'environ 25 mm. Pour pousser la colonne vers le milieu du capillaire, on retourne ce dernier et le tape verticalement sur une plaque de polyéthylène par de légères secousses (fig. 2, b). Ensuite on peut fermer l'extrémité non effilée du capillaire au chalumeau à l'oxygène (pyrex!) sans que le contenu du capillaire sorte. Il faut naturellement éviter de chauffer le reste du tube. Pour pouvoir fermer ensuite l'extrémité effilée sans perte de substance, il est nécessaire de repousser le liquide vers l'autre extrémité. On y parvient par une centrifugation de quelques secondes du capillaire dans une centrifugeuse à main (résultat, voir fig. 2, c). La pointe est alors

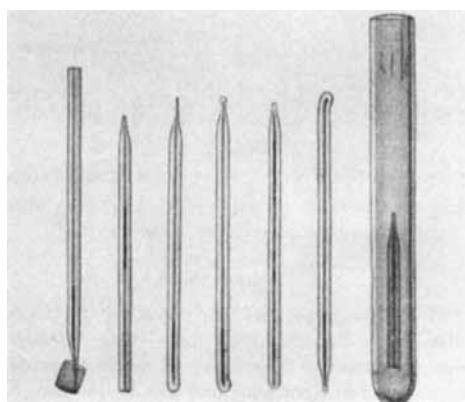


Fig. 2.

Diverses phases du maniement de la prise dans le capillaire de désagrégation.
(Dans la fig. 2g, le capillaire n'a pas été glissé jusqu'au fond du tube,
en vue de l'obtention d'une image photographique plus nette.)

soudée (fig. 2, d). Le capillaire est introduit dans le four de désagrégation porté à 450° ± 2° et y est maintenu durant 30 min. La réaction terminée, le contenu des tubes est incolore. Si ce n'est pas le cas, la désagrégation à 450° peut être prolongée sans inconvenient (voir plus bas «Discussion»). Sous l'effet de la chaleur, la colonne de liquide s'est fragmentée (fig. 2, e). Ayant d'ouvrir le capillaire par son extrémité arrondie, il est nécessaire de repousser tout le liquide à l'extrémité effilée, ce qu'on réalise, comme plus haut, par une centrifugation manuelle de quelques secondes (fig. 2, f). Pour débarrasser extérieurement le capillaire des sels d'ammonium pouvant provenir des poussières de l'air, il est plongé dans une solution de soude caustique 0,01-n., puis roulé sur une feuille de papier à chromatographie. Ensuite le capillaire est coupé en biseau par un trait de lime oblique, à une distance de la pointe effilée des $\frac{2}{3}$ environ de sa longueur, puis le tronçon contenant le liquide est glissé, l'ouverture en bas, dans un tube à centrifuger lavé préalablement par de la soude caustique 0,01-n. et soigneusement égoutté (fig. 2, g). Le tout est centrifugé 3 min. à 1500 t/min dans une centrifugeuse angulaire. Le liquide sort ainsi quantitativement du capillaire et se trouve déposé sur le fond du tube sans en toucher les parois latérales. Grâce à la coupe en biseau, le liquide ne remonte pas dans le capillaire.

Ce n'est qu'en respectant soigneusement tous les détails ci décris qu'on obtient des résultats corrects.

Pour le dosage, les tubes sont placés dans le support.

II. Dosage colorimétrique de l'ammoniac.

Réactifs: 1^o Ninhydrine puriss. *Dougherty*⁷⁾.

2^o Hydrindantine puriss. préparée à partir de la ninhydrine selon le procédé de *Moore & Stein*⁸⁾.

3^o Tampon de pH 5,4 préparé en dissolvant 1088 g d'acétate de sodium crist. puriss. dans 800 cm³ d'eau et 200 cm³ d'acide acétique glacial pour analyse. Ce mélange est dilué à 3 litres par de l'eau distillée. Le tampon acétate ainsi préparé est env. 2,7-m. en acétate.

4^o Mélange d'éthanol à 96% et d'eau 1:1 en vol.

5^o Methylcellosolve puriss. sans peroxyde.

6^o Mélange ninhydrine-hydrindantine: on dissout 500 mg de ninhydrine et 25 mg d'hydrindantine dans 17,5 cm³ de méthyléthyl-cellosolve; lorsque tout est dissous, on ajoute 7,5 cm³ du tampon acétate: la solution devient rouge cerise. A préparer extemporairement.

Appareillage: Capuchons en aluminium⁹⁾. Bain-marie fermé par un couvercle muni d'une cheminée refroidie par une circulation d'eau et servant à condenser la vapeur d'eau.

Bain à circulation d'eau courante pour refroidir les solutions après la réaction.

Mode opératoire: Dans chaque tube ayant reçu le contenu d'un capillaire on introduit 2 cm³ du réactif à la ninhydrine à l'aide d'une burette de 50 cm³; après avoir coiffé les tubes d'un capuchon en aluminium pour les protéger des poussières, on plonge le support dans le bain-marie bouillant dans lequel il séjournera 15 min. Ensuite on plonge le support 10 min dans le bain à eau froide circulante. On dilue alors chacune des solutions colorées, par l'addition de 5 cm³ du mélange éthanol-eau (1:1), à l'aide d'une burette ou d'une pipette automatique¹⁰⁾; on homogénéise le mélange et détermine sa densité optique à 540 mμ au photocolorimètre (p.ex. le *Klett-Summerson*). La correction nécessaire pour la valeur du blanc caractéristique du réactif et pour la faible quantité d'ammoniac qui a pu se fixer sur l'acide sulfurique 1:1 utilisé comme agent de désagrégation, est déterminée sur la moyenne de deux prises de 10 μl portées en tube capillaire et soumises au même traitement que les autres prises. Nous avons basé nos calculs sur des moyennes de chaque fois 4 prises, mais l'excellente reproductibilité des résultats (voir tableaux 3 et 4) autorise à diminuer ce nombre de moitié.

L'ensemble de toutes les opérations peut être exécuté en 5 h avec un lot de 50 capillaires.

Discussion: L'avantage de la désagrégation en capillaire fermé sur la désagrégation en tube ouvert pour un ultramicrodosage d'azote tient à plusieurs facteurs:

1^o en tube capillaire fermé, le milieu est à l'abri des contaminations atmosphériques par les sels d'ammonium durant toutes les manipulations;

2^o le travail avec de très faibles volumes est possible sans pertes appréciables;

3^o la désagrégation est particulièrement rapide parce que les prises atteignent très vite les températures désirées.

⁷⁾ *Dougherty Chemicals*, 131st St., Richmond Hill, N. Y., USA.

⁸⁾ *S. Moore & W. Stein*, J. biol. Chemistry **211**, 907 (1954).

⁹⁾ *Lüdi Metallwarenfabriken*, Flawil, SG.

¹⁰⁾ *J. E. Gerber*, Ausstellungsstrasse 88, Zurich.

4^o le contrôle de la température dans le four peut se faire avec une grande précision, ce qui est très important puisqu'au-delà de 470^o il se produit des pertes en ammoniac³⁾.

Les caractéristiques des capillaires ont été choisies en fonction des 10 μl qu'ils doivent contenir pour les dosages. Au diamètre intérieur de 0,6 à 0,8 mm correspond une force capillaire telle que par son seul effet la totalité des 10 μl est aspirée; le diamètre extérieur de 5 mm leur assure une solidité suffisante sans qu'il en résulte aucune gêne pour la fermeture des tubes au chalumeau; leur longueur de 120 mm permet d'éviter toute transmission de la chaleur au liquide, lors de la fermeture de leurs extrémités (fig. 2, b). L'emploi de verre au borosilicate (pyrex) supprime pratiquement tout danger d'éclatement à la température de désagrégation et permet d'obtenir des résultats reproductibles et corrects.

La température de la désagrégation est un facteur critique des méthodes de destruction de la matière organique pour le dosage de l'azote. Une température trop peu élevée ne permet pas une destruction suffisamment rapide de la matière; une température trop élevée conduit à des pertes en ammoniac, vraisemblablement par suite de formation d'azote élémentaire. *J. P. Grunbaum*³⁾ constate une perte croissante en ammoniac après élévation progressive de la température au-dessus de 470^o, lorsqu'il chauffe quelques μg de sulfate d'ammonium dans 25 μl d'acide sulfurique pur, en tube scellé. Par ailleurs, il ne remarque aucune destruction de l'ammoniac lors de la chauffe à 470^o de sulfate d'ammonium en présence de saccharose. Pour éviter tous risques de pertes semblables, nous avons choisi une température de désagrégation de 450^o \pm 2^o, soit de 20^o inférieure à la température qui, d'après les expériences de *Grunbaum*, serait tout juste admissible. Effectivement, nous ne constatons aucune perte de NH₃, ni en présence, ni en absence de substances organiques (voir tableau 1).

Tableau 1.
Dosage de l'azote de sulfate d'ammonium, en μg ,
avant et après les opérations de désagrégation.

$\mu\text{g N}$ mis en œuvre	$\mu\text{g N trouvés}$	Valeurs individuelles	Moyenne
2		2,04; 1,97; 2,00; 1,97	1,99
4		3,91; 4,08; 3,99; 4,04	4,00
8		7,98; 8,07; 8,16; 7,90	8,03

Les amines volatiles, p. ex. la pyridine ou la pipéridine présentes dans les éluats de chromatogrammes de polypeptides, doivent être chassées de la prise par une alcalinisation temporaire. Nous devions

vérifier si ce traitement (voir I, « mode opératoire ») pouvait provoquer une perte de l'ammoniac des fonctions amides. Choisissant la glutamine comme substance de référence, nous ne constatons aucune perte d'azote après un tel traitement (voir tableau 2).

Tableau 2.

Innocuité du procédé d'élimination des amines volatiles, vérifiée dans le cas de la glutamine.

$\mu\text{g N}$ présents procédés	2		4		8	
	$\mu\text{g N}$ trouvé	moyenne	$\mu\text{g N}$ trouvé	moyenne	$\mu\text{g N}$ trouvé	moyenne
pas d'alcalinisation préalable de la prise	1,99		3,96		7,97	
	2,00	2,04	4,11	4,03	7,99	8,01
	2,12		4,01		8,07	
alcalinisation préalable de la prise.	1,99		3,90		7,95	
	1,96	2,03	3,90	3,92	7,98	7,96
	2,14		3,97		7,95	

Grâce à l'addition, à l'acide sulfurique, de chlorure mercurique comme catalyseur, on arrive à une libération complète de l'ammoniac de la matière organique par chauffe de 30 min à cette température (voir tableau 3). Sans catalyseur, la désagrégation à 450°, pendant 30 min, est tout à fait incomplète.

Les résultats des ultramicrodosages de l'azote total de différents acide saminés et de polypeptides de synthèse ainsi que de polypeptides naturels sont en bon accord avec les résultats du micro-*Kjeldahl*. Ces derniers dosages ont été effectués après un traitement préalable des prises des substances à tester, par de la magnésie en suspension aqueuse à ébullition. Cette opération avait pour objet d'éliminer les bases volatiles des prises considérées, rendant ainsi les deux méthodes comparables. La pureté des peptides de synthèse du tableau 3 a été déterminée non seulement par micro-*Kjeldahl* sans traitement alcalin préalable, mais encore par le dosage de leur azote α -aminé selon *Moore & Stein*⁸.

La reproductibilité de notre méthode a encore été établie sur un grand nombre de dosages effectués sur des éluats de chromato- et d'électrophorogrammes contenant des polypeptides de divers hydrolysats enzymatiques de caséine. Ces polypeptides étaient soit basiques soit neutres. Dans le tableau 4, nous montrons quelques exemples de ces dosages avec les lectures colorimétriques à l'électrophotomètre *Klett-Summerson*, montrant la bonne concordance des dosages individuels d'une même solution.

Tableau 3.

Résultats comparés du micro-Kjeldahl (effectué sur un total de 0,5-0,7 mg d'azote) et de l'ultramicrodosage (réalisé sur 1-8 µg d'azote).

Solution de:	µg d'azote présent d'après micro-Kjeldahl			µg d'azote			écart moyen % trouvé	écart moyen % trouvé	écart moyen % trouvé	écart moyen % trouvé	écart moyen % trouvé	écart moyen % trouvé	
	1	2	4	8									
sériste	{ 0,99 0,91 1,07 1,11	1,02	2	2,07 2,15 2,17 2,12	2,13	6	3,98 3,88 3,91	3,94	1,5	7,90 8,05 7,96	7,99	0,1	
alanine	{						4,06 3,98 3,90	3,96	1	8,05 8,25 7,96	8,05	0,6	
proline	{			2,15 1,99 2,17 1,99	2,07	3,5	3,98 3,81 4,01	3,96	1	8,13 8,13 7,96	8,04	0,5	
tryptophane . . .	{									7,94 7,98 7,95 8,04	7,99	0,15	
histidaine	{										7,95 7,97 7,85	7,92	1,0
glu(γ -CONH ₂).- asp(β -CONH ₂).- cys.pro.leu.- gly(CONH ₂)	{						4,04 3,99 4,20 4,29	4,13	3	7,85 7,92 7,92 7,92	7,90	1,2	
pro.leu.- gly(CONH ₂) . . .	{						4,10 4,05	3,99	0,3	8,00 8,00	7,97	0,4	
hydrolysat tryptique de caseïne	{			1,98 2,01 2,07 1,96	2	0	3,95 4,06 3,93 4,04	3,99	0,25	7,96 7,87 7,77 8,04	7,91	1,1	

Tableau 4.
Ultramicrodosages d'azote (prises de 10 μ l, électrophotomètre Klett-Summerson).

Substance	Densité optique (lecture)		Densité optique corrigée ^{a)}	N trouvé	
	Sol.	blanc		μ g N valeurs indiv.	μ g N moyenne
C ₀ R (peptides basiques)	555 560 590 560	90 90 (moyenne 90)	465 470 500 470	6,97 7,05 7,50 7,05	7,14
FG ₀ (peptides neutres)	340 350 330 330	90 92 (moyenne 91)	249 259 239 239	3,74 3,88 3,58 3,58	3,70
2PG ₀ (peptide neutre)	128 128 126	98 102 (moyenne 100)	28 28 26	0,42 0,42 0,39	0,410
C ₀₅ 4 (peptide basique)	430 435 430 432	98 102 (moyenne 100)	330 335 330 332	4,95 5,02 4,95 4,98	4,98
B ₀ R (peptides basiques)	630 632 635 630	108 106 (moyenne 107)	523 525 528 523	7,84 7,87 7,92 7,84	7,87

^{a)} Densité optique de la solution moins la moyenne des deux blancs.

En ce qui concerne le réactif colorimétrique de l'ammoniac, nous le devons à *Moore & Stein*⁸⁾. Cependant, nous avons réduit la quantité d'hydrindantine par rapport à celle de ninhydrine en adoptant le rapport 1:20 au lieu de 1:7 afin de diminuer les valeurs colorimétriques données par les blancs. Cet abaissement de la concentration de l'hydrindantine n'a pas d'influence sur l'intensité de la coloration provoquée par l'ammoniac. Nous avons également diminué la concentration du tampon acétate de sodium, de 4-m. en acétate à 2,7-m., afin d'éviter des cristallisations de celui-ci dans les tubes de dosages. Le méthyléthylcellosolve utilisé comme solvant pour le réactif à la ninhydrine doit être sans peroxyde pour éviter que la coloration violette caractéristique de la réaction ne devienne rougeâtre et que la loi de *Beer-Lambert* ne soit plus respectée. Le mélange final ninhydrine-hydrindantine n'est pas très stable, l'hydrindantine s'oxydant même sous une atmosphère d'azote. Pour cette raison, nous préparons extemporanément un volume de ce réactif, suffisant pour le nombre de dosages prévus. Quant au chlorure mercurique du réactif de désagrégation, il ne gêne pas dans les quantités utilisées (peut-être parce qu'il est réduit par l'hydrindantine).

Il est recommandé de vérifier toutes les semaines la qualité des réactifs par étalonnage, p. ex. avec une solution standard de sulfate d'ammonium (p. ex. 8 mg N/l).

Avec le photocalorimètre *Klett-Summerson* utilisé par nous, la quantité maximum d'azote dosable avec précision se situe aux environs de 8 µg par prise.

Quant à la précision, l'écart d'avec les valeurs calculées (sol. de sulfate d'ammonium) ou les résultats des micro-*Kjeldahl*, n'a jamais dépassé 2% pour 8 µg d'azote (voir tableaux 1 et 3).

L'un de nous (*P.B.*) remercie le *Fonds National de la Recherche scientifique* dont l'appui a permis la réalisation de ce travail.

SUMMARY.

After degradation at 450°C in sealed capillary tubes with sulfuric acid 1:1 (v:v) containing 0,2% mercuric chloride, the amino-acid and polypeptide nitrogen (1 to 8 µg) in 10 µl of eluate can be assayed by colorimetry with ninhydrine. The exact procedure used is described.

Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique
de l'Université de Genève.
