

**ETUDE COMPARATIVE DES DOSAGES COLORIMETRIQUES  
DU PHOSPHORE.**

**IV. — DOSAGE DE L'ORTHOPHOSPHATE  
EN PRESENCE D'ESTERS PHOSPHORIQUES  
(nouvelles méthodes),**

Par Jean-Louis DELSAL et Hamid MANHOURI.

---

Dans le troisième mémoire (9 bis), nous avons examiné en détail les méthodes connues de dosage de l'orthophosphate en présence d'esters phosphoriques. Nous allons étudier ici la mise au point de nouvelles méthodes qui constituent, nous le pensons, un progrès certain sur les anciennes.

A) Méthode de BERENBLUM et CHAIN, réalisée à PH 2,5, avec extraction par le I-butanol:

La méthode originale de BERENBLUM et CHAIN, très sensible, permet de doser l'orthophosphate en présence d'esters phosphoriques. Elle a été employée, entre autres par ERNSTER, ZETTERSTROM et LINDBERG (15) selon une modification de MARTIN et DOTY (31). Les tissus sont extraits par l'acide trichloracétique à 10 p. 100, à 0° et le dosage de l'orthophosphate est effectué immédiatement. Dans ces conditions, l'hydrolyse de la créatine phosphate est moins de 1 P. 100. La méthode de BERENBLUM et CHAIN est, en général, employée en ajoutant l'acide sulfurique en dernier at avec une acidité totale 0,5 à 1 N (PH voisin de 1,0).

L'extraction de l'acide molybdophosphorique sera faite le plus rapidement possible par le 1-butanol ou l'isobutanol-benzène (1/1). La phase organique sera lavée deux fois avec l'acide sulfurique N, l'acide molybdophosphorique sera réduit par le chlorure stanneux et les lectures seront faites à 735 m $\mu$  (maximum de sensibilité).

En présence d'esters phosphoriques, facilement hydrolysables, on a intérêt à diminuer le plus possible le pH de la réaction. C'est ce que nous réalisons dans la modification suivante de la méthode.

D'après Berenbulm et Chain, la concentration en acide sulfurique doit être comprise entre 0,05 et 1,5 N pour que le dosage soit possible. En tenant compte de ce que nous avons vu pour le dosage du phosphore sous forme d'acide molybdophosphorique, il est possible d'effectuer la réaction à pH 3,0. A ce pH, nous avons trouvé une relation linéaire entre la concentration en molybdate d'ammonium et la concentration en acide sulfurique. Cette relation est indiquée dans le tableau suivant donnant les teneurs à employer pour 10 ml de solution sans inhibiteurs:

1 ml molybdate d'ammonium 0,2 p. 100—0,30 ml acide sulfurique N/10

»	»	1	»	— 0,50	»	»
»	»	2	»	— 0,75	»	»
»	»	3	»	— 1,00	»	»
»	»	4	»	— 1,25	»	»
»	»	5	»	— 1,50	»	»

Dans ces conditions, le pH est toujours maintenu à 3,0. Il est donc possible d'appliquer la méthode de BERENBLUM et CHAIN avec une concentration en molybdate d'ammonium de 0,02 p. 100 et une concentration en acide sulfurique de 0,003 N; ce qui abaisse considérablement la limite inférieure de 0,05 N donnée par les auteurs.

#### **Influence de diverses substances:**

a) Composés sulfurés: La réaction étant faite à pH 3,0 en présence de 1 ml de molybdate d'ammonium 0,2 p. 100 et 0,3 ml d'acide sulfurique 0,1 N, la cystéine (400  $\mu$ g) et le glutathion (3 mg) n'ont aucune influence

sure le dosage de 10 ug de phosphore dans un volume de 10 ml. (ug=gamma gramme).

b) Ions cuivre: On peut ajouter des concentrations très élevées en sulfate de cuivre (nous avons ajouté jusqu'à  $3 \times 10^{-2} M$ ) sans modifier l'intensité de la coloration ni sa vitesse de formation.

c) Acide trichloracétique: Si l'on fait une déprotéinisation par l'acide trichloracétique 5 p. 100 à  $0^\circ$ , on peut immédiatement après la centrifugation, neutraliser l'extrait trichloracétique par la soude et amener le pH à 7,0. En présence de 1 ml d'extrait trichloracétique neutralisé, 1 ml de solution de molybdate d'ammonium 0,2 p. 100 et 1,50 ml d'acide sulfurique 0,1 N pour avoir le pH 3,0 il n'y a aucune inhibition apportée par l'acide trichloracétique.

d) Acide perchlorique: Les conclusions indiquées pour l'acide trichloracétique sont valables également après une déprotéinisation du tissu par l'acide perchlorique à 2 p. 100.

e) Sulfate d'ammonium: Pour éviter de déprotéiniser à pH trop acide, l'emploi d'une solution saturée de sulfate d'ammonium permet une déprotéinisation à pH 4,0 (LOWRY et LOPEZ). Cependant, à pH 3,0, le sulfate d'ammonium à la concentration de 1 ml de la solution saturée pour un volume total de 10 ml inhibe la réaction; celle ci étant pratiquée avec 1 ml de solution de molybdate d'ammonium 0,2 p. 100 et 2,50 ml d'acide sulfurique 0,1 N (pour tenir compte de l'effet tampon du sulfate d'ammonium). Par contre, à pH 2,5 avec 1 ml de solution de molybdate d'ammonium 0,2 p. 100 et 4 ml d'acide sulfurique 0,1 N, l'inhibition est supprimée. Avec également 1 ml de molybdate d'ammonium à 1 p. 100, le sulfate d'ammonium n'a pas d'influence. Dans ces conditions, il est donc possible de doser l'orthophosphate en présence d'esters phosphoriques sur 1 ml d'un extrait déprotéinisé par le sulfate d'ammonium en solution saturée ce que la méthode de LOWRY et LOPEZ ne peut faire.

f) Adénosine triphosphate: En présence de molybdate d'ammonium 0,2 p. 100, il n'est pas possible de supprimer l'inhibition due à 3 mg d'adénosine triphosphate (A.T.P.) dans 10 ml. Par contre, si on augmente la concentration en molybdate d'ammonium et emploie 1 ml d'une solution à 1 p. 100. il est possible avec 0,50 ml d'acide sulfurique 0,1 N et à pH 3,0

de supprimer cette inhibition. L'exemple suivant le démontre:

	Densité optique à 735 $\mu$ , Sous 1 cm.
Témoin 10 ug P dans 10 ml (contre blanc sans ATP)	0,678
Dosage de 10 ug P en présence de 450 ug ATP (contre blanc contenant 450 ug ATP)	0,678
Dosage de 10 ug P en présence de 450 ug ATP (contre blanc sans ATP)	0,796
Blanc contenant 450 ug ATP (contre blanc sans ATP)	0,115

Comme on le voit, l'inhibition est complètement supprimée et la méthode est particulièrement sensible pour titrer l'impureté orthophosphate contenue dans l'ATP. L'échantillon dont nous disposions contenait 0,37 p. 100 d'orthophosphate.

Pour uniformiser la méthode, nous avons adopté le pH 2,5 qui supprime les inhibitions de tous les composés examinés. Nous avons également adopté la concentration de 1 ml de molybdate d'ammonium à 1 p. 100 avec la quantité d'acide sulfurique 0,1 N nécessaire pour amener le pH de la phase aqueuse à 2,5. Cette quantité d'acide est fonction de l'extrait employé: avec 1 ml d'un extrait trichloracétique ou perchlorique neutralisé, elle est de 2,5 ml; avec 1 m d'un extrait obtenu avec le sulfate d'ammonium à saturation elle est de 4 ml. Le volume de la phase aqueuse est de 10 ml. L'extraction de l'acide molybdophosphorique est effectué à pH 2,5 par 10 ml de 1-butanol et la suite du dosage est pratiqué selon la méthode originale de BERENBLUM et CHAIN.

B) Méthode de BERENBLUM et CHAIN, réalisée à pH 4,0, sans extraction par le 1-butanol:

Le pH 2,5 de la méthode précédente est nécessaire pour effectuer l'extraction, par le 1-butanol, de l'acide molybdophosphorique avant sa réduction en bleu de molybdène par le chlorure stanneux. Nous allons voir que, si on supprime cette extraction, il est possible de doser l'orthophosphate à pH 4,0 en présence d'esters phosphoriques sans que gênent les substances qui inhibent dans la méthode de LOWRY et LOPEZ à pH 4,0.

Tout d'abord, pour 10 ml de solution, nous avons choisi les proportions de molybdate d'ammonium et de chlorure stanneux qui donnent le minimum de coloration des blancs. Ces proportions sont: 0,5 ml de molybdate d'ammonium 5 p. 100 et 0,2 ml de chlorure stanneux 0,2 p. 100. Cette solution de chlorure stanneux est préparée directement, au moment de l'emploi, en pesant 0,20 g de chlorure stanneux, 2 H<sub>2</sub>O et en l'introduisant dans un flacon jaugé de 100 ml au moyen de 10 ml environ d'eau distillée. On ajoute 5 gouttes d'acide acétique glacial pour obtenir une dissolution totale et complète à 100 ml avec de l'eau distillée. Nous avons évité l'emploi du réactif dilué en partant du chlorure stanneux dissous dans l'acide chlorhydrique concentré, après avoir constaté que l'acide chlorhydrique donnait des blancs plus colorés, pour rester en milieu acétique, le tampon utilisé étant acide acétique-acétate de sodium et pour avoir un pH de la solution moins acide (pH 3,0).

#### **Choix de la concentration du tampon et de son pH:**

La réaction est effectuée avec 5 ml de tampon dans le volume de 10 ml. Ce tampon a été réalisé en partant de solutions N, 2N et 4N en acide acétique. On ajoute de l'acétate de sodium cristallisé à 3 H<sub>2</sub>O et pur pour obtenir les pH 4,0, 4,5 et 5,0. L'acétate de sodium de spécification A.C.S. (American Chemical Society) que nous utilisons contient seulement 0,00013 p. 100 de P et donne des blancs presque incolores.

En étudiant le dosage de 10 ug de P dans les 10 ml avec 5 ml de tampon N, 2N et 4N aux pH 4,0 4,5 et 5,0 nous sommes arrivés aux conclusions suivantes: à pH 5,0 la réaction est incomplète et stable seulement au bout de 20 minutes. A pH 4,5 la réaction est immédiate mais après 5 minutes l'intensité diminue et celà quelque soit la concentration du tampon. A pH 4,0 avec un tampon 2N ou 4N la coloration est immédiate et stable 15 minutes. Nous avons choisi l'emploi de 5 ml d'un tampon 2 N à pH 4,0 nous donnant le maximum de stabilité et un pouvoir tampon suffisant. Pour réaliser ce tampon à pH 4,0, nous partons de 80 ml d'acide acétique 2N dans lesquels nous dissolvons 4,5 g d'acétate de sodium cristallisé et complétons à 100 ml avec l'acide acétique 2N.

### **Influence de diverses substances :**

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la cystéine et du glutathion qui inhibent dans la méthode de LOWRY et LOPEZ à pH 4,0. Ici, nous avons constaté au contraire une augmentation de la coloration de 15 p. 100 avec 200 ug de cystéine et de 11 p. 100 avec 1 mg de glutathion. Ceci est dû à une coloration parasite supplémentaire donnée par la cystéine et le glutathion seuls en présence des réactifs du dosage. Après divers essais, nous avons supprimé cette augmentation de coloration par addition de trois gouttes de solution de formaldéhyde à 40 p. 100. Le formol est sans action sur le dosage du phosphore, la coloration étant toujours immédiate et stable 15 minutes.

Nous avons également constaté que la présence de 1 mg d'adénosine triphosphate dans les 10 ml ne modifie pas la densité optique de 10 ug de P. Endosant, par cette méthode, l'impureté orthophosphate contenue dans l'adénosine triphosphate nous retrouvons le taux de 0,38 p. 100.

1 ml d'acide trichloracétique 5 p. 100; 1 ml d'acide perchlorique 2 p. 100 et 1 ml de sulfate d'ammonium à 90 p. 100 de saturation sont sans effet sur ce dosage.

Si on recueille 10 ml de sang sur 70 mg d'un mélange de fluorure de sodium 4 g et d'oxalate de potassium 6 g, après déprotéinisation au 1/10, ces sels sont sans influence.

Compte tenu de tous ces résultats, il est donc possible de doser l'orthophosphate, en présence d'esters phosphoriques, de la façon suivante :

### **Technique du dosage :**

Dans une fiole jaugée de 10 ml, on mesure 1 ml d'un extrait de tissu effectué à 0° soit avec l'acide trichloracétique 5 p. 100, l'acide perchlorique 2 p. 100 ou avec une solution saturée de sulfate d'ammonium à pH 4,0 dans la proportion de 9 ml de ces solutions pour 1 g de tissu ou 1 ml de sérum sanguin. On ajoute 5 ml de tampon acétique 2N pH 4,0, trois gouttes de solution de formaldéhyde 40 p. 100, 0,5 ml de molybdate d'ammonium 5 p. 100 et 0,2 ml de chlorure stanneux 0,2 p. 100, avec agitation après chaque addition. On complète à 10 ml avec de l'eau distillée, agite et

mesure immédiatement la densité optique à 735 mu. Un blanc et un témoin de 10 ug de P seront effectués parallèlement en incorporant évidemment l'acide ou le sulfate d'ammonium à la même concentration que dans l'extrait tissulaire. L'importance est grande surtout avec le sulfate d'ammonium qui, même recristallisé introduit des quantités appréciables de phosphore : 2 ug dans les 10 ml pour 1 ml de solution saturée de sulfate d'ammonium que nous utilisons.

Pour 1 ug de P par ml, sous 1 cm, à 735 mu, nous trouvons une densité optique de : 0,570. Cette méthode est donc plus sensible que les autres méthodes : 3,5 fois pour la méthode de Lowry et Lopez et 4,5 fois pour celle de Furchgott et De Gubareff.

Etant donné la rapidité de la mesure et le pH 4,0 employé, l'hydrolyse de la créatine phosphate est certainement négligeable. Les substances étudiées n'apportant aucune perturbation dans le dosage, nous pensons que cette méthode est d'un emploi plus général que celle de Lowry et Lopez (acide ascorbique à pH 4,0) et de Furchgott et DeGubareff (acide amino naphthol sulfonique à pH 2,3). Cependant, il est toujours possible que d'autres substances, non étudiées ici, apportent une perturbation dans le dosage de l'orthophosphate. Il sera donc prudent, en appliquant cette méthode, d'étudier spécialement l'extrait tissulaire à doser.

C) Dosage de l'orthophosphate à pH 4,0 avec l'acide amino naphthol sulfonique :

Pour accélérer la réaction, cette étude a été faite en présence de sulfate de cuivre. Nous avons tout d'abord déterminé la limite inférieure de la concentration en acide sulfurique permettant à la coloration de se développer. Nous avons trouvé une concentration de 0,01 N, nous démontrant qu'il était possible d'effectuer la méthode de Fiske et Subbarow à des pH beaucoup moins acides que dans la méthode originale (pH 1,0), ainsi que dans la modification apportée par Furchgott et De Gubareff (pH 2,3).

En étudiant l'influence du pH, en présence d'une concentration en cuivre de  $2 \times 10^{-4}M$ , avec 1 ml de molybdate d'ammonium 5 p. 100 et 0,5 ml d'acide amino naphthol sulfonique à 0,2 p. 100 pour un volume de

10 ml, nous avons obtenu les densités optiques suivantes, sous 1 cm, pour 10 ug de P :

pH	densité optique		maximum de la coloration en minutes
	830 mu	830 mu	
4,50	0,364	0,469	45
4,00	0,275	0,344	25
3,50	0,195	0,242	15
3,25	0,180	0,197	10
2,70	0,163	0,166	3
2,15	0,156	0,147	2
1,15	0,138	0,131	10
0,90	0,140	0,143	30

La vitesse de la réaction est maximum en 2 minutes pour un pH voisin de 2,2. En étudiant le spectre d'absorption, nous avons constaté qu'il existait un maximum de densité optique à 880 mu pour des pH supérieurs à 2,7. De plus, la densité optique est d'autant plus intense, à cette longueur d'onde, que le pH est moins acide.

L'étude que nous avons faite à pH 4,5 ne nous a pas permis d'accélérer suffisamment la réaction ; nous avons donc adopté le pH 4,0 et effectué une étude es conditions à réaliser pour avoir la meilleure réaction possible.

#### Concentration du tampon :

A pH 4,0, le tampon acide acétique-acétate de sodium est le meilleur. En partant de solutions d'acide acétique N. 2N et 4N et ajoutant de l'acétate de sodium pur, cristallisé, nous avons préparé des tampons de pH 4,0. Nous avons trouvé que la concentration finale du tampon devait être 0,5 à 1N en acide acétique pour que la réaction soit complète en 15-20 minutes. Nous avons adopté la concentration N de pouvoir tampon suffisant.

**Influence de la concentration en cuivre :**

Cette étude a été faite avec 10 ug de P pour un volume de 10 ml (1 ug. P/ml) avec 1 ml de molybdate d'ammonium 5 p. 100, 0,5 ml d'acide amino naphthol sulfonique 0,2 p.100, 5 ml du tampon 2N en acide acétique et des quantités variables de sulfate de cuivre.

Sans cuivre la réaction est beaucoup trop lente. Jusqu'à  $1 \times 10^{-5}M$  la réaction est accélérée, mais la densité optique est sensiblement la même que sans cuivre. Il faut atteindre une concentration de  $5 \times 10^{-3}$  pour que la vitesse de la réaction et l'intensité de la coloration soient maxima. C'est cette concentration que nous avons adoptée.

Concentration en cuivre	Densité optique à 880 mu
$1 \times 10^{-4}M$	0,200 à 30 minutes
$5 \times 10^{-4}M$	0,300 à 30 minutes
$1 \times 10^{-3}M$	0,385 à 30 minutes
$2,5 \times 10^{-3}M$	0,453 à 20 minutes
$5 \times 10^{-3}M$	0,482 à 15 minutes
$7,5 \times 10^{-3}M$	0,490 à 15 minutes
$1 \times 10^{-2}M$	0,495 à 15 minutes

En rapprochant ces résultats de ceux obtenus avec l'acide ascorbique à pH 4,0 on constate la similitude des réactions. La distinction que nous avons faite en deux phases et une phase intermédiaire s'applique également pour l'acide amino naphthol sulfonique.

**Effet Stabilisant de l'acide trichloracétique :**

En ajoutant 1 ml d'acide trichloracétique 5 p. 100 dans un volume de 10 ml, nous avons constaté une très nette stabilisation de la coloration qui, après 15 minutes, a atteint son maximum et reste stable une heure.

Cette méthode, à pH 4,0, peut donc être utilisée pour doser l'orthophosphate en présence d'esters phosphoriques sur un extrait trichlor-

acétique d'un tissu. Cependant étant donné que les lectures ne peuvent être faites avant 15 minutes, il pourra se produire une hydrolyse des esters phosphoriques labiles à la température du laboratoire.

Temps en minutes —	Sans acide trichloracétique —	Avec acide trichloracé- tique —
5	0,357	0,367
10	0,495	0,469
15	0,509	0,480
20	0,516	0,480
25	0,520	0,480
30	0,523	0,480
45	0,530	0,480
60	0,534	0,480

#### **Influence de diverses substances :**

Nous avons étudié l'influence de 200 ug de cystéine, 400 ug de glutathion et 500 ug d'adénosine triphosphate. Nous n'avons constaté aucune inhibition. Cependant avec la cystéine, il se produit un léger trouble et il est nécessaire de centrifuger la solution avant d'effectuer la lecture au spectrophotomètre. L'adénosine triphosphate ne ralentit pas la réaction comme dans le cas de la méthode de Lowry et Lopez à pH 4,0.

1 ml de solution saturée de sulfate d'ammonium ralentit la réaction qui n'est pas stabilisée par addition de 1 ml d'acide trichloracétique à 5 p. 100.

Avec 1 ml d'acide perchlorique 2 p. 100, la réaction n'est pas stable, mais elle est stabilisée par addition de 1 ml d'acide trichloracétique 5 p. 100.

#### **Dosage de l'orthophosphate à pH 4,0 avec le rhodol**

Avec l'acide amino naphthol sulfonique, il n'est donc pas possible d'obtenir une réaction immédiate et les lectures ne peuvent être faites

qu'après 15 minutes. Nous avons essayé d'éliminer cet inconvénient en employant un autre réducteur. Le sulfate de paraméthyl-aminophénol (métol génol, photol, pictol, rhodol) à déjà été utilisé a froid notamment par London et Hudon (28) ou après 2 heures au bain marie bouillant par Burton et Riley (5). Cependant la concentration en acide est élevée: 0,68 N et 0,72 N respectivement pour les auteurs cités. Nous avons essayé, en présence de cuivre, de réaliser la réaction à pH 4,0 en tampon acétate. Comme nous allons le voir celà est parfaitement possible et les résultats obtenus sont excellents. Nous avons utilisé le produit rhodol de la firme Rhône Poulenc, mais tout autre produit similaire peut convenir.

#### **Etude de la concentration optimum en rhodol et sulfite de sodium:**

Nous avons préparé une solution aqueuse de rhodol à 4 p. 100 et une solution aqueuse de sulfite neutre de sodium anhydre à 20 p. 100 (concentration double en partant du sel cristallisé à 7 H<sub>2</sub>O). Des essais préalables nous ont montré qu'à pH 4,0 en présence de 5 ml de tampon acétique 2 N, 1 ml de molybdate d'ammonium 5X100 et 5X10-3M de sulfate de cuivre pour un volume total de 10 ml, il était nécessaire d'avoir une concentration assez élevée en rhodol et une, concentration assez faible en sulfite de sodium. En faisant varier ces concentrations, nous avons obtenu de bons résultats avec 0,5 ml de rhodol à 4 p. 100 et 0,25 ml de sulfite de sodium anhydre à 20 p. 100. Mais le fait capital observé est que la réaction est complète en 2 minutes (temps nécessaire pour les mesures) et stable jusqu'à plus de 30 minutes. Le maximum de densité optique est obtenu également à 880 mu comme avec l'acide amino naphthol sulfonique. Voici les résultats d'une expérience, prise en exemple, parmi les nombreux essais effectués. Dans le volume de 10 ml nous avons 10 ug de P, 5 ml de tampon acétique 2 N à pH 4,0, 0,5 ml de solution de sulfate de cuivre, 5 H<sub>2</sub>O à 2,5 p. 100, 1 ml de molybdate d'ammonium 5 p. 100, 0,5 ml de rhodol 4 p. 100 et 0,25 ml de sulfite de sodium anhydre 20 p. 100. La densité optique mesurée avec une cuve de 1 cm d'épaisseur, à 800 mu (fente 0,02 mm) est de 0,482 en 2 minutes et reste inchangée jusqu'à 30 minutes.

Examinons maintenant l'influence de la concentration en cuivre sur la vitesse et la stabilité de la réaction.

**Influence de la concentration en cuivre:**

Concentration en Cuivre	3	4	5	10	15	20	25	30
0 .....	—	—	—	0,152	0,167	0,167	0,167	0,167
1×10 <sup>-6</sup> M .....	—	—	—	—	0,167	0,169	0,171	0,171
1×10 <sup>-5</sup> M .....	—	—	—	—	0,167	0,170	0,170	0,170
1×10 <sup>-4</sup> M .....	—	—	0,194	0,196	0,197	0,197	0,197	0,197
5×10 <sup>-4</sup> M .....	—	—	0,290	0,292	0,292	0,292	0,292	0,292
1×10 <sup>-3</sup> M .....	0,349	0,354	0,354	0,354	0,354	0,354	0,354	0,354
5×10 <sup>-3</sup> M .....	0,475	0,475	0,475	0,475	0,475	0,478	0,478	0,480
1×10 <sup>-2</sup> M .....	0,498	0,498	0,502	0,502	0,502	0,505	0,509	0,509
5×10 <sup>-2</sup> M .....	0,523	0,542	0,542	0,542	0,545	0,549	0,553	0,553

Les expériences résumées dans le tableau précédent ont été faites avec 10 ug de P, 5 ml de tampon acide acétique 2 N à pH 4,0, 1 ml de molybdate d'ammonium 5 p. 100, 0,5 ml de rhodol 4 p. 100, 0,5 ml de sulfite de sodium anhydre 10 p. 100 et des quantités variables de diverses solutions de sulfate de cuivre dans un volume total de 10 ml. Les densités optiques sont mesurées sous 1 cm à 880 mu en fonction du temps exprimé en minutes.

Un premier point à signaler est que, sans cuivre, le maximum de densité optique se trouve à 880 mu, comme dans toutes les autres expériences en présence de cuivre. Ce maximum est donc fonction du pH de la réaction et non de la teneur en cuivre. C'est ainsi qu'à pH 0,85, selon la méthode de LONDON et HUDSON, le maximum de densité optique est à 725-750 mu. On observe donc un déplacement du maximum de densité optique vers les plus grandes longueurs d'onde lorsque le pH devient moins acide.

Comme pour les autres réducteurs à pH 4,0, on peut distinguer deux stades et un stade intermédiaire. Dans le stade I de 0 à 1 X 10<sup>-5</sup>M de cuivre, l'intensité de la coloration n'est pas augmentée par addition de cuivre. Dans le stade intermédiaire de 1 X 10<sup>-4</sup>M à 1 X 10<sup>-3</sup>M, la densité optique est proportionnelle à la concentration en cuivre. De 1 X 10<sup>-3</sup>M à 1 X 10<sup>-2</sup>M la densité optique augmente pour atteindre le stade II voisin de l'optimum où une augmentation de la concentration en cuivre n'a plus que peu d'influence sur la densité optique.

Cependant en tenant compte de la stabilité de la coloration, nous avons choisi une concentration de  $5 \times 10^{-3}M$  en cuivre. Une concentration plus élevée donne bien une densité optique plus élevée mais la stabilité de la réaction est diminuée.

#### Préparation des réactifs:

Le tampon acide acétique-acétate de sodium, contenant cette concentration en cuivre, est préparé à partir de 80 ml d'acide acétique 2 N dans lesquels on dissout 4,5 g d'acétate de sodium cristallisé à 3 H<sub>2</sub>O et 0,25 g de sulfate de cuivre à 5 H<sub>2</sub>O. On complète à 100 ml avec de l'acide acétique 2 N et on utilise 5 ml de cette solution pour le dosage.

La solution de rhodol est stabilisée en y ajoutant la teneur optimum en sulfite de sodium qui a été déterminée expérimentalement. On dissout d'abord 2 g de rhodol dans environ 80 ml d'eau distillée puis 10 g de sulfite de sodium hydraté (correspondant à 5 g de sel anhydre). On complète à 100 ml avec de l'eau distillée. On a ainsi une solution à 2 p. 100 en rhodol et 5 p. 100 en sulfite de sodium anhydre. On prendra 1 ml de ce réactif par dosage pour un volume total de 10 ml.

#### Influence de la concentration en orthophosphate:

Cette courbe d'étalonnage est effectuée avec des quantités variables d'orthophosphate, 5 ml de tampon acétique 2 N à pH 4,0, contenant le cuivre, 1 ml de molybdate d'ammonium 5 p. 100, 1 ml du réactif rhodol-sulfite et complétant à 10 ml. Les lectures sont faites après 2 minutes, sous 1 cm, à 880 mu. Dans ces conditions, les densités optiques trouvées sont les suivantes:

0,2 ug P/ml	0,0915	1,2 ug P/ml	0,577
0,4 "	0,1855	1,4 "	0,678
0,6 "	0,284	1,6 "	0,770
0,8 "	0,380	1,8 "	0,870
1,0 "	0,478	2,0 "	0,969

La loi de Beer est donc vérifiée de 0,4 à 2 ug de P par ml; la méthode étant particulièrement précise dans l'intervalle 1,2-2,0 ug p par ml où l'erreur est inférieure à + 0,5 p. 100.

### **Influence de diverses Substances:**

Si on ajoute 1 ml d'acide trichloracétique 5 p. 100, la réaction est complète en 4 minutes et stable 30 minutes.

Avec 1 ml d'acide perchlorique 2 p. 100, la réaction est immédiate et stable 30 minutes. Avec le rhodol, une déprotéinisation par l'acide perchlorique est donc préférable à l'emploi d'acide trichloracétique.

Avec 1 ml de solution saturée de sulfate d'ammonium, la réaction est ralentie et instable : en 5 minutes la densité optique est de 0,485 et de 0,495 après 25-30 minutes.

En présence de 200 ug de cystéine et de glutathion, le dosage est possible; cependant avec des teneurs plus élevées, la présence du cuivre donne un précipité ou une coloration verdâtre.

1 mg d'adénosine triphosphate ne perturbe pas le dosage de 10 ug de phosphore.

Cette méthode, avec emploi du rhodol comme réducteur, est aussi sensible que celle avec l'acide naphthol sulfonique à pH 4,0. Elle a plusieurs avantages:

a) Le réactif rhodol-sulfite est stable beaucoup plus longtemps que le réactif avec l'acide amino naphthol sulfonique.

b) La réaction est complète en 2-3 minutes de sorte qu'à pH 4,0 l'hydrolyse des esters phosphoriques labiles à la température du laboratoire est évitée. Elle est aussi beaucoup plus stable qu'avec l'acide amino naphthol sulfonique et on n'observe jamais de coloration verdâtre après plusieurs heures.

c) La réaction est, comme avec l'acide amino naphthol sulfonique, moins sensible aux substances telles que la cystéine, le glutathion ou l'adénosine triphosphate qui inhibent dans la méthode de LOWRY et LOPEZ à pH 4,0.

### **Technique du dosage:**

Dans une fiole jaugée de 10 ml on mesure 1 ml de l'extrait perchlorique du tissu contenant l'orthophosphate à doser. On ajoute 5 ml du tampon acétique 2 N à pH 4,0 contenant le cuivre, 1 ml de molybdate

d'ammonium 5 p. 100 et 1 ml du réactif rhodol-sulfite. On agite après addition de chaque réactif, complète à 10 ml avec de l'eau distillée et mesure la densité optique, après 2 minutes, sous 1 cm à 880 mu. Un blanc et un témoin à 10 ug de phosphore sont effectués parallèlement.

#### **Applications de la méthode:**

Cette méthode peut être avantageusement employée pour le dosage de l'orthophosphate d'un tissu en présence d'esters phosphoriques. Mais elle peut aussi servir pour tout dosage d'orthophosphate, même sans esters phosphoriques, puisque cette méthode est beaucoup plus sensible et plus stable que la méthode de FISKE et SUBBAROW généralement employée.

Cette méthode peut être utilisée pour le dosage du phosphore inorganique du sérum après déprotéinisation par l'acide perchlorique.

Elle peut être également employée pour le dosage des phosphatases acide ou alcaline avec substrat phenylphosphate en tampon acétate 0,05 M à pH 4,9 pour la phosphatase acide et en tampon carbonatebicarbonate ou boraté à pH 9,8 pour la phosphatase alcaline après déprotéinisation et dosage de l'orthophosphate libéré par ces enzymes.

Remarque: Le remplacement de l'acide amino naphтол sulfonique ou du rhodol par l'hydroquinone ou l'amidol permet également de doser l'orthophosphate à pH 4,0. Le maximum de densité optique est toujours à 880 mu. Cependant la méthode au rhodol s'est révélée supérieure.

#### **Résumé**

Des quatre nouvelles méthodes de dosage de l'orthophosphate, en présence d'esters phosphoriques, décrites par les auteurs nous en retenons particulièrement deux, réalisées à pH 4,0.

L'une, avec le chlorure stanneux, peut s'effectuer sans cuivre en tampon acétique. La réaction est immédiate et stable 15 minutes; elle peut s'appliquer en présence de sulfate d'ammonium.

L'autre, avec le rhodol, est pratiquée en tampon acétique en présence d'une concentration en cuivre de  $5 \times 10^{-3}M$ . La réaction est complète en 2 minutes et stable 30 minutes surtout en présence d'acide perchlorique.

Les lectures spectrophotométriques de ces deux méthodes à pH 4,0 sont faites avec le chloure stanneux à 735 mu, avec le rhodol à 880 mu. Les substances qui inhibent dans la méthode de LOWRY et LOPEZ à pH 4,0 sont ici sans influence.

La méthode au rhodol à pH 4,0 peut avantageusement remplacer la méthode originale de FISKE et SUBBAROW étant 3,5 fois plus sensible et plus stable. Elle a son emploi dans le dosage du phosphore inorganique d'un tissu après déprotéinisation par l'acide perchlorique, ainsi que dans le dosage des phosphatases acide et alcaline avec substrat phenylphosphate ou B-glycérophosphate de sodium et dosage de l'orthophosphate libéré par l'enzyme après déprotéinisation perchlorique.

### SUMMARY.

Two of the four new methods for orthophosphate determination in the presence of phosphate esters described by the authors are dealt with in this paper, carried out at pH 4.0.

The first, stannous chloride, can be performed without copper in an acetate buffer. Reaction is immediate and stable for 15 minutes; it can be carried out in the presence of ammonium sulphate.

The second, using rhodol, is carried out in acetate buffer in the presence of  $5 \times 10^{-3}M$  copper. The reaction is complete in 2 minutes and stable for 30 minutes especially in the presence of perchloric acid.

Spectrophotometric readings of these two methods at pH 4.0 are taken with stannous chloride at 735 mu, with rhodol at 880 mu. Substances that inhibit in the Lowry and Lopez method at pH 4.0 have no influence in this case.

The rhodol method at pH 4.0 successfully replaces the original method by FISKE and SUBBAROW being 3.5 times more sensitive and stable. It can be used in the determination of the inorganic phosphate of a tissue after deproteinization by perchloric acid, in the determination of acid and alkaline phosphatases with phenylphosphate or sodium B-glycerophosphate as substrates and determination of orthophosphate released by the enzyme after deproteinization by perchloric acid.

### ZUSAMMENFASSUNG.

Von den vier neuen Methoden zur Bestimmung von Orthophosphat in Gegenwart von Phosphorsäure-Estern, wie sie von den Verfassern angegeben wurden, heben wir zwei hervor, die beide bei pH. 4,0 durchgeführt werden.

Die zweite, in der rhodol verwendet wird, kann in Azetat-Buffer in in saurem Puffer gemacht werden, Die Reaktion findet unmittelbar statt- und bleibt schlussendlich während 15 minuten stabil. Sie kann in Gegenwart von Ammonium-Sulfat ausgeführt werden.

Die zweite, in der rhodol verwendet wird, kann in Azetat-Buffer in Gegenwart einer Kupfer-Konzentration von  $5 \times 10^{-3}$  M ausgeführt werden. Die Reaktion ist nach 2 minuten vollständig und während 30 minuten stabil, hauptsächlich in Gegenwart von perchlorat.

Die spectrophotometrischen Bestimmungen der beiden Methoden bei pH 4,0 werden mit Zinn-Chlorid bei 735  $\mu$ , mit rhodol bei 880  $\mu$  gelesen. Die Substanzen die in der Methode von Lowry und Lopez bei pH 4,0 hemmen, sind hier ohne Einfluss.

Die Rhodol-Methode bei pH 4,0 kann die methode von Fiske und Subbarow ersetzen, denn sie ist 3,5 mal empfindlicher und stabiler. Sie findet ihre Verwendung bei Bestimmungen von Unorganischem Phosphor eines Gewebes nach Perchlorat-Enteiweissung, sowie in der Bestimmung saurer und alkalischer Phosphatasen mit Phenylphosphat oder b-Glycero-phosphat mit Abspaltung von Orthophosphat.

### BIBLIOGRAPHIE.

1. Ammon, R. et Hinsberg, K. — Z. Physiol. Chem., 1936, 239, 207.
2. Boltz, D. F. et Mellon, M. G. — Ind. Eng. Chem. Anal.Ed., 1947, 19, 873, 7.
3. Brown, W. D. — Austral. J. Exp. Biol., 1954, 32, 677, 688.
4. Bruemmer, J. H. et O'Dell, B. L. — J. Biol. Chem., 1956, 219, 283,
5. Burton, J. D. et Riley, J. P. — Mikrochim. Acta, 1956, 1350, 1365.
6. Carles, J. — Bull. Soc. Chim. biol., 1956, 38, 255, 7.

7. Chen, P. S. Jr, Toribara, T. Y. et Warner, H. — *Anal. Chem.*, 1956, 28, 1756, 8.
8. Consden, E. A. et Stanier, W. M. — *Nature*, 1951, 168, 298, 9.
9. Delsal, J. L. et Manhourri, H. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, 37, 1041, 1054.
- 9 bis. Delsal, J. et Manhourri, H. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1958, 40, 1169 et 1179.
10. Desesa, M. A. et Rogers, L. B. — *Anal. Chem.*, 1954, 26, 1381, 3.
11. Dryer, R. L., Tammes, A. R. et Routh, J.I.J. *Biol. Chem.*, 1957, 225, 177, 183.
12. Egsgaard, J. — *Acta Physiol. Scand.*, 1949. 16, 171, 179.
13. Ennor, A. H. et Stocken, L. A. — *Biochem. J.*, 1948, 42, 549, 557.
14. Ennor, A. H. et Stocken, L. A. — *Austral. J. Exp. Biol.*, 1950, 28, 647, 655.
15. Ernster, L., Zetterström, R. et Lindberg, O. — *Acta Chem. Scand.*, 1950, 4, 942, 7.
16. Furchgott, R. F. et De Gubareff, T. — *J. Biol. Chem.*, 1956, 223, 377, 388.
17. Ging, N. S. — *Anal. Chem.*, 1956, 28, 1330, 3.
18. Gomori, G. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1942, 27, 955, 960.
19. Griswold, B. L., Humoller, F. L. et Meintyre (A. R.). — *Anal. Chem.*, 1951, 23, 192, 4.
20. Harris, W. D. et Popat, P. — *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1954, 31, 124, 7.
21. Holden, M. et Pirie, N. W. — *Biochem. J.*, 1955, 60, 55.
22. Horwitt, B. N. — *J. Biol. Chem.*, 1952, 199, 537, 541.
23. Jean, M. — *Chim. Anal., M. G. Chim, Anal.*, 1956, 38, 37, 49.
24. Kitson,, R. E. et Mellon, M. G.—*Ind. Eng. chem. Anal; Ed. 1944*, 16, 466, 9
25. Liébecq, Cl. et Louis, M. — *Rull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 1085, 9.
26. Liébecq, Cl. — *Arch. Internat. Physiol. Biochimie*, 1957, 65, 141, 2.
27. Liébecq, Cl., Hunebelle, G. et Louis, M. ... *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, 39, 245, 263; 813, 818; 1227, 1232.
28. London, M. et Hudson, P. B. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, 46, 141, 153.

- 
29. Lowry, O. H., Roberts, N. R., Leiner, K. Y., Wu, M. L. et Fahr, A. L. — J. Biol. Chem., 1954, 207, 1, 17.
  30. Lueck, C. H. et Boltz,, D. F. — Anal. Chem., 1956, 28, 1168, 71.
  31. Martin, J. B. et Doty, D. M. — Anal. Chem., 1949, 21, 965, 7.
  32. McCune, D. J. et Weech, A. A. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1940, 45, 559, 562. — —
  33. Michelsen, O. B. — Anal. Chem., 1957, 29, 60, 62.
  34. Peel, J. L., Fox, M. et Elsdon, S. R. — Biochem. J., 1955, 60, XXXIII.
  35. Peel, J. L. et Loughman, B. C. — Biochem. J., 1957, 65, 709, 716.
  36. Petersen, V. P. — Scand. J. Clin. et Lab. Inv., 1950, 2, 14, 19 et 44, 47.
  - 37., Robbins, E. A., Stulberg, M. P. et Boyer, P. D. — Arch. Biochem. Bio. phys., 1955, 54, 215, 222.
  38. — Robins, E., Lowry, O. H., Eydt, K. M. et McCaman, R. E. — J. Biol. Chem., 1956, 220, 661, 675,
  39. Rockstein, M. et Herron, P. W. — Anal. Chem., 1951., 23, 1500, 1.
  40. Sperry, W. M. — Ind. Eng. Chem. Anal., Ed. 1942, 14, 88, 90.
  41. Stewart, C. P. et Hendry, E. B. — Biochem. J., 1935, 29, 1683, 9.
  42. Stoloff, L. S. — Ind. Eng. Chem. Anal., Ed. 1942, 14, 636, 7.
  43. Taussky, H. H. et Shorr, E. — J. Biol. Chem., 1953, 202, 675, 685.
  41. Stewart, C. P. et Hendry, E. B. — Biochem. J., 1935, 29, 1683, 9.
  45. Weil-Malherbe, H. et Green, R. H. — Biochem. J., 1951, 49, 286, 292.