

ÉTUDE COMPARATIVE DES DOSAGES COLORIMÉTRIQUES
DU PHOSPHORE
RECHERCHE D'UNE MÉTHODE DE HAUTE SENSIBILITÉ
APPLICABLE AU DOSAGE DU PHOSPHORE ORGANIQUE
DANS LES SPOTS APRÈS CHROMATOGRAPHIE.

par

J.-L. DELSAL et H. MANHOURI *

Les méthodes volumétriques de dosage du phosphore décrites par Macheboeuf (32); Javillier et Djelatidès (26); Thivolle (48) permettent de doser de 100 à 1.000 gamma avec une grande précision. Mais on peut avoir à doser seulement quelques gamma de phosphore; il faut avoir recours, dans ce cas, aux dosages colorimétriques dont l'intensité de la coloration est mesurée maintenant avec une très bonne précision en utilisant les spectrophotomètres modernes.

Nous allons examiner les diverses méthodes colorimétriques et rechercher comment on peut augmenter leur sensibilité en étudiant les facteurs suivants : chauffage, extraction par un solvant organique et choix de la longueur d'onde donnant le maximum d'absorption. La sensibilité dépendant également du choix du réducteur nous classerons les méthodes selon les principaux réducteurs utilisés; hydroquinone, acide amino-naphtol-sulfonique, chlorure stanneux, chlorhydrate d'hydrazine, sulfate ferreux, acide ascorbique.

Méthode de Fleury et Leclerc

Fleury et Leclerc (18) ont modifié et perfectionné la méthode nitro-vanado-molybdique de Misson. Elle permet de doser de 40 à 400 gamma de phosphore pour un volume total de 20 ml. Les fluoru-

* Bull. Soc. chim. biol. 1955, 37, 1041-1054

res, à la concentration de 0,4 p. 100. les glycérophosphates, les oxalates, les citrates, à la concentration de 1 p. 100, n'apportent aucune gêne. Les arsénates, même à forte concentration, n'ont pas d'influence; ce qui permet une solution élégante du dosage de l'ion phosphorique en présence de l'ion arsénique. La silice cependant est dosée en même temps que le phosphore.

Méthode de Bell-Doisy-Briggs

Bell et Doisy (3) ont utilisé l'hydroquinone comme réducteur Briggs (11) a perfectionné la méthode en l'effectuant en milieu sulfité et acide. Macheboeuf et Delsal (33) ont appliqué cette méthode au dosage du phosphore lipidique en présence de 0,3 ml d'acide sulfurique concentré; elle permet de titrer de 5 à 50 gamma de phosphore pour un volume de 10 ml. Le maximum d'absorption est à 830 millimicrons; le pourcentage de transmission à 700 millimicrons étant du même ordre de grandeur.

Méthode de Fiske et Subbarow.

Fiske et Subbarow (17) ont utilisé l'acide 1 amino 2 naphтол 4 sulfonique comme réducteur. Cette excellente méthode permet de titrer de 5 à 50 gamma de phosphore sous un volume de 10 ml en effectuant la réaction avec 0,2-0,3 ml d'acide sulfurique concentré, 1 ml de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et 0,5 ml de solution d'acide amino-naphтол-sulfonique à 0,2 p. 100 contenant 12 p. 100 de métabisulfite de sodium et 1,2 p. 100 de sulfite anhydre de sodium. Le maximum d'absorption est à 830 millimicrons et la sensibilité de cette méthode est sensiblement égale à celle de Bell-Doisy-Briggs. Les lectures à 700 millimicrons sont peu différentes de celles à 830 millimicrons.

Méthode de Berenblum et Chain

L'emploi du chlorure stanneux comme réducteur, signalé par Osmond (37), a été préconisé par Denigès (16) pour le dosage des phosphates. Cette réaction a été utilisée par: Kuttner et Cohen (28); Kuttner et Lichtenstein (29); Truog et Meyer (49); G. Youngburg et M. Youngburg (51); A. Bodansky (9); Berenblum et Chain (5); Shinowara, Jones et Reinhart (43); G. Gomori (20). Berenblum et

Chain ont étudié en détail la réduction du phosphomolybdate par le chlorure stanneux, rendant la coloration stable et permettant ainsi d'utiliser, avec précision, la grande sensibilité apportée par l'emploi du chlorure stanneux. Comme cette méthode semble peu connue en France nous allons la décrire.

Principe de la méthode. — L'acide phosphomolybdique est soluble dans les solvants organiques tels que l'alcool isobutylique. Cette propriété analytique importante permet d'extraire le phosphomolybdate et d'enlever ainsi le molybdate d'ammonium en excès qui n'est pas soluble dans ce solvant. De plus le lavage de la phase alcool par de l'acide sulfurique normal, avant la réduction par le chlorure stanneux, permet d'éliminer presque complètement les substances inhibitrices et évite le développement de colorations non spécifiques. La coloration bleue obtenue est franche et stable, elle n'est pas souillée par une coloration jaune parasitaire.

Réactifs. — Acide sulfurique normal.

Solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 (conservée dans un flacon en polyéthylène entouré de papier noir).

Solution concentrée de chlorure stanneux : 10 g de SnCl_2 , 2 H_2O dans 24 ml d'acide chlorhydrique concentré (conservation à la glacière). Solution faible de chlorure stanneux : Solution concentrée précédente diluée 200 fois dans l'acide sulfurique normal (à préparer extemporanément).

Alcool isobutylique ou butylique normal.

Solution de phosphate monopotassique anhydre à 0,4395 g par litre d'eau bidistillée (conservée dans un flacon en polyéthylène) 1 ml de cette solution correspond à 100 gamma de phosphore. A partir de cette solution préparer des solutions à 10 et 1 gamma de phosphore par dilution de la solution concentrée au $1/10^e$ et au $1/100^e$.

Technique du dosage. — Dans une ampoule à décanter de 30 ml on verse la solution neutre à doser et on complète à 7,5 ml avec de l'eau bidistillée. On ajoute 0,3 ml d'acide sulfurique concentré pur (si la solution à doser provient d'une minéralisation sulfurique il ne faut évidemment pas ajouter cette quantité d'acide sulfurique). On ajoute ensuite 2,5 ml de solution de molybdate d'ammonium et après mélange 10 ml de n-butanol. L'ampoule est agitée doucement pour extraire complètement le phosphomolybdate sans provoquer d'émulsions. Après séparation des deux phases on décante la phase aqueuse

inférieure. On lave la phase alcoolique deux fois avec 5 ml d'acide sulfurique normal et on décante chaque fois la phase aqueuse. La solution alcoolique est agitée doucement pendant 30 secondes avec 15 ml de la solution faible de chlorure stanneux. On laisse séparer les deux phases et on décante la phase aqueuse. Le n-butanol est transvasé dans une fiole jaugée de 10 ml, on lave l'ampoule avec 1 ou 2 ml d'éthanol à 95° et complète à 10 ml avec l'éthanol à 95°. La coloration bleue est lue au spectrophotomètre à 735 millimicrons (ou à 635 millimicrons si on possède un spectrophotomètre ne permettant pas les mesures au delà de 700 millimicrons). Un blanc effectué parallèlement permet de régler le spectrophotomètre à 100 p. 100 de transmission.

Remarques. — En opérant selon la technique décrite le blanc est presque incolore : en réglant le spectrophotomètre à 100 p. 100 de transmission avec de l'eau bidistillée le blanc mesure 97 p. 100.

La méthode permet de doser de 1 à 10 gamma de phosphore et la loi de Beer est satisfaite aussi bien à 735 qu'à 635 millimicrons. La droite obtenue peut servir de courbe d'étalonnage ; mais comme la réaction est sensible à la température il est préférable de faire parallèlement au dosage et au blanc un témoin de 10 gamma de phosphore.

La réduction du phosphomolybdate par le chlorure stanneux étant immédiate il n'est pas nécessaire d'attendre pour effectuer les lectures. De plus la coloration est stable : le pourcentage de transmission d'une solution à 10 gamma de phosphore a augmenté de 0,5 p. 100 en 1 heure, la loi de Beer étant encore vérifiée.

Le spectre d'absorption de la coloration bleue obtenue par la méthode de Berenblum et Chain présente deux maxima : à 635 et 735 millimicrons ; la différence de titrage entre ces deux longueurs d'onde étant seulement de 10 p. 100. .

La méthode de Berenblum et Chain est 4,6 fois plus sensible que les méthodes de Bell-Doisy-Briggs ou de Fiske et Subbarow.

Ce dosage utilisant le chlorure stanneux comme réducteur est sensible à la concentration en acide sulfurique : entre 0,05 et 0,5 ml d'acide sulfurique le pourcentage de transmission à 635 millimicrons ne diffère que de 2 p. 100, mais à partir de 0,6 ml la réaction est fortement inhibée comme d'ailleurs avec les autres réducteurs.

Le fluorure de sodium, l'oxalate de sodium, le citrate de sodium, le glycérophosphate de sodium, aux doses généralement em-

ployées, ne sont pas inhibiteurs par suite de l'extraction par l'alcool et des lavages. La méthode de Berenblum et Chain permet de doser l'activité phosphatasique d'un sérum avec une précision supérieure à la méthode employée par Bodansky (9) ou par Shinowara, Jones et Reinhart 43.

Cette méthode peut s'appliquer également au dosage du phosphore minéral en présence d'esters phosphoriques; il suffit d'ajouter l'acide sulfurique en dernier et de faire aussitôt l'extraction par le n-butanol avec le maximum de rapidité pour éviter l'hydrolyse des esters phosphoriques.

On peut évidemment augmenter la sensibilité de la méthode en utilisant un volume réduit de n-butanol et titrer ainsi de l'ordre de 0,5 à 4 gamma de phosphore.

Méthode simplifiée

Au lieu d'effectuer la réaction dans une ampoule à décanter on peut la simplifier en opérant dans des tubes à essai; ce procédé beaucoup moins précis, puisqu'il supprime les lavages, permet aussi de rassembler la coloration dans un volume réduit de n-Lutanol.

La solution neutre à doser est versée dans un tube à essai pyrex, jaugé à 10 ml et muni d'un rodage normalisé; le volume est complété à environ 7 ml avec de l'eau bidistillée. On ajoute 0,3 ml d'acide sulfurique et refroidit le mélange pour uniformiser la température entre les tubes d'une série de dosages. On verse ensuite 1 ml de la solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100; 1 ml de la solution faible de chlorure stanneux et complète le volume à 10 ml avec de l'eau bidistillée. La coloration bleue est ensuite rassemblée dans le volume minimum de n-butanol permettant les mesures colorimétriques. Le spectre d'absorption ne présente plus qu'un maximum à 735 millimicrons. Cependant les lectures effectuées à 700 millimicrons sont seulement 7,5 p. 100 moins sensibles; de préférence on fera donc les lectures à 735 millimicrons.

A titre d'exemple en rassemblant la coloration dans 2,5 ml de n-butanol et en effectuant les lectures à 700 millimicrons en cuves de 8×8 mm on peut titrer facilement de 0,5 à 4 gamma de phosphore; la loi de Beer étant vérifiée.

Méthodes employant d'autres réducteurs

Sumner (46) emploie le sulfate ferreux comme réducteur; Allen (1) l'amidol et Lowry et Lopez (31) l'acide ascorbique. Entre

nos mains ces diverses méthodes n'ont pas donné de résultats supérieurs à ceux obtenus par la méthode de Fiske et Subbarow (17). Dans le livre de F. D. Snell et C. T. Snell (45) on trouvera une bibliographie plus complète de cette question.

*Augmentation de la sensibilité par extraction
avec le n-butanol*

Nous venons de voir que l'extraction avec un volume réduit de n-butanol permet de concentrer la coloration et d'augmenter ainsi la sensibilité des méthodes colorimétriques.

De nombreux solvants organiques ont été préconisés: Copaux (13) dans son procédé rapide de dosage de l'acide phosphorique mesure le volume du complexe liquide éthéro-phosphomolybdique formé dans des conditions bien définies qui ont été précisées par Madame H. Hinglais (24).

Berenblum et Chain (5), Pons et Guthrie (39) ont utilisé l'alcool isobutylique.

Rainbow (40) l'alcool isoamylique; Sideris (44) l'alcool n-butylique; Schaffer, Fong et Kirk (42) l'alcool n-octylique.

Nous avons utilisé l'alcool n-butylique qui nous a donné de bons résultats; l'alcool isobutylique nous donnant des résultats sensiblement égaux. Quand à l'alcool n-octylique nous ne lui avons trouvé aucune supériorité et l'avons abandonné par suite de son odeur et de son prix élevé.

L'extraction par le n-butanol de la coloration bleue de molybdène obtenue avec les méthodes de Bell-Doisy-Briggs ou Fiske et Subbarow permet d'augmenter la sensibilité. Le maximum d'absorption qui était initialement de 830 millimicrons pour ces méthodes se déplace à 750 millimicrons; les lectures faites à 700 millimicrons étant d'ailleurs peu différentes. A titre d'exemple en utilisant 2,5 ml de n-butanol et en effectuant les lectures en cuves de 8×8 mm, à 700 millimicrons, on peut titrer facilement de 2 à 16 gamma de phosphore.

Augmentation de la sensibilité par chauffage

Benedict et Theis (4) pour la méthode de Bell-Doisy-Briggs; Horecker, Ma et Haas (25) pour celle de Fiske et Subbarow ont

augmenté la sensibilité par chauffage au bain marie bouillant. Il faut alors employer 0,5 ml d'acide sulfurique concentré pour obtenir une bonne réaction avec des blancs peu colorés en jaune. La sensibilité de ces deux méthodes étant identique nous préférons la méthode de Horecker, Ma et Haas avec 0,5 ml de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et 0,5 ml de solution d'acide amino-naphtol-sulfonique à 0,2 p. 100 pour un volume total de 10 ml. Le maximum d'absorption est à 830 millimicrons et on peut titrer ainsi de 1 à 10 gamma de phosphore. Les lectures faites à 700 millimicrons sont environ 2,5 fois moins sensibles qu'à 830 millimicrons. Le temps de chauffage n'est pas critique: de 15 à 30 minutes au bain-marie bouillant nous avons trouvé le même pourcentage de transmission. Un chauffage de 20 minutes, comme l'ont conseillé les auteurs, est donc convenable. Pour la méthode de Benedict et Theis nous avons trouvé que le temps de chauffage devait être aussi de 20 minutes.

Fontaine (9) a également préconisé le chauffage pour augmenter la sensibilité de la méthode employant le chlorure stanneux comme réducteur. Le maximum d'absorption est à 830 millimicrons ce qui indique une profonde modification de la réaction colorée puisqu'à froid le maximum d'absorption est à 735 millimicrons. Pour 10 gamma de phosphore nous n'avons trouvé aucun gain appréciable en sensibilité en opérant soit à froid avec 0,3 ml d'acide sulfurique concentré, 1 ml de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et 1 ml de solution faible de chlorure stanneux, soit après 20 minutes de bain-marie bouillant avec 0,5 ml d'acide sulfurique concentré, 1 ml de solution de molybdate et 1 ml de solution faible de chlorure stanneux. La réaction avec le chlorure stanneux étant presque immédiate on comprend ainsi pourquoi le chauffage ne peut en augmenter la sensibilité.

Beveridge et Johnson (6) ont préconisé l'emploi du sulfate d'hydrazine comme réducteur. Crowther (14) emploie le chlorhydrate d'hydrazine. La réaction est pratiquée avec 0,3 ml d'acide sulfurique concentré; 0,5 ml de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et 0,2 ml d'une solution aqueuse de chlorhydrate d'hydrazine à 0,6 p. 100 sous un volume total de 10 ml. Crowther recommande un chauffage de 10 minutes exactement à 100°; comme pour les autres réactions utilisant le chauffage nous avons trouvé que 20 minutes au bain-marie bouillant était préférable. Le maximum d'absorption est aussi à 830 millimicrons. La sensibilité de cette méthode étant égale à celle de Horecker, Ma et Haas nous préférons cette dernière.

*Augmentation de la sensibilité par chauffage
et par extraction par le n-Butanol*

Le chauffage permet d'augmenter la sensibilité de la méthode de Fiske et Subbarow de plus de 5 fois. Si après ce chauffage on extrait la coloration bleue par le minimum de n-butanol, soit n ml, on augmentera encore la sensibilité de 10/n fois. Le maximum d'absorption qui après le chauffage était de 830 millimicrons se déplace à 800 millimicrons après l'extraction par le n-butanol. La coloration jaune, plus ou moins accentuée, des blancs des diverses méthodes utilisant le chauffage ne passe pas dans le n-butanol ainsi non seulement on augmente la sensibilité mais purifie la coloration bleue de molybdène intégralement soluble dans le n-butanol. Remarquons cependant que cette coloration est moins pure que celle obtenue par la méthode de Berenblum et Chain dont le maximum d'absorption est à 735 millimicrons. Voici donc la méthode que nous avons adoptée, elle donne le maximum de sensibilité.

*Méthode de Horecker, Ma et Haas.
modifiée par extraction au n-butanol*

La solution à doser, neutre, est versée dans un tube à essai pyrex de 18 × 150 mm, jaugé à 10 ml et muni d'un rodage normalis 19/38 (n° 2); le volume est complété à environ 8 ml avec de l'eau bidistillée. On ajoute alors 0,5 ml d'acide sulfurique concentré, 0,5 ml de la solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et 0,5 ml de la solution d'acide amino-naphtol-sulfonique à 0,2 p. 100 (contenant 12 p. 100 de métabisulfite de sodium et 1,2 p. 100 de sulfite anhydre de sodium) et on complète le volume à 10 ml avec de l'eau bidistillée. Après un chauffage de 20 minutes au bain-marie bouillant et refroidissement dans un bain d'eau froide le volume sera complété à 10 ml avec de l'eau bidistillée.

A ce stade si la coloration était importante (dosage de 1 à 10 gamma de phosphore) on pourrait faire les lectures à 830 millimicrons. Si la coloration est faible on ajoutera 4 ml de n-butanol pur et après avoir muni le tube à essai du bouchon normalisé correspondant on agitera énergiquement. Après repos 3 ml de n-butanol seront nécessaires pour le remplissage correct des cuves de 10 mm du spectrophotomètre Beckman DU; les lectures seront faites alors à 800 millimicrons. Dans ces conditions nous obtenons les pourcentages de transmission suivants entre 0,5 et 4 gamma de phosphore :

0,5 gamma	75,5	2,5 gamma	23,5
1 »	56,5	3 »	17,5
1,5 »	42	3,5 »	13
2 »	31	4 »	10

La loi de Beer est donc rigoureusement vérifiée et la méthode est suffisamment sensible pour titrer avec précision 1 gamma de phosphore.

Le tableau suivant rassemble les résultats obtenus avec ces diverses méthodes et permet de se rendre compte de leur degré de sensibilité. Les lectures ont été faites au spectrophotomètre Beckman DU avec les cuves de 10 mm. Le volume était toujours de 10 ml soit en dosage direct soit après extraction par 10 ml de n-butanol. Le temps de chauffage pour les trois méthodes a été uniformisé à 20 minutes.

Le choix de la méthode dépendra du spectrophotomètre dont on dispose.

Tableau donnant le pourcentage de transmission pour les diverses méthodes de dosage du phosphore en fonction de la longueur d'onde utilisée

	635	700	735	750	800	830
A) 10 gamma de phosphore.						
Berenblum et Chain	26	30,5	22			
Dosage simplifié avec SnCl ₂ et extraction par le n-butanol		21,5	19			
Fiske et Subbarow, chauffage selon Horecker, Ma et Haas.		48				15
Bell-Doisy-Briggs, chauffage selon Benedict et Theis		48,5				15,5
Chlorhydrate d'hydrazine, chauffage selon Crowther		45,5				14
Fiske et Subbarow, chauffage, extraction par le n-butanol		48			14,5	
Bell-Doisy-Briggs, chauffage, extraction par le n-butanol		49			15,5	
Chlorhydrate d'hydrazine, chauffage, extraction par le n-butanol.		45			15	
B) 40 gamma de phosphore.						
Fiske et Subbarow		28				24
Bell-Doisy-Briggs		30				29
Fiske et Subbarow, extraction par le n-butanol		27		24		
Bell-Doisy-Briggs, extraction par le n-butanol		23		21		

A) *Spectrophotomètre permettant les lectures entre 400
et 700 millimicrons*

Pour doser de 1 à 10 gamma de phosphore nous conseillons la méthode de Berenblum et Chain, les lectures seront faites à 635 millimicrons.

Pour doser de 0,5 à 4 gamma de phosphore la méthode simplifiée avec le chlorure stanneux comme réducteur et extraction par le volume minimum de n-butanol est à recommander; les lectures seront faites à 700 millimicrons.

B) *Spectrophotomètre permettant les lectures entre 400
et 900 millimicrons*

La méthode de choix, donnant le maximum de sensibilité est celle de Horecker, Ma et Haas modifiée en y ajoutant, après le chauffage, une extraction par le volume minimum de n-butanol. On peut ainsi doser, avec précision de 0,5 à 4 gamma de phosphore. En utilisant des microcuvettes de 25 mm de longueur il est possible d'abaisser encore la limite supérieure. Les lectures seront faites à 800 millimicrons.

Toutes les méthodes que nous venons d'étudier se rapportent au dosage du phosphore minéral. Pour le dosage du phosphore organique il faut faire subir à l'échantillon une minéralisation. Celle-ci doit se faire avec d'autant plus de soins que nous dosons seulement des traces de phosphore et qu'une légère perte conduirait alors à des erreurs importantes. Nous allons donc passer en revue les diverses méthodes de minéralisation employées et conseiller celle qui nous a donné des résultats parfaitement reproductibles.

Choix d'une méthode de minéralisation

a) *Acide sulfurique-acide nitrique :*

La méthode utilisant l'acide sulfurique et l'acide nitrique, décrite dans notre publication de 1943 (33) est difficile à réaliser sans pertes pour une teneur aussi faible en phosphore. Martland et Robinson (34) ont montré que si le chauffage n'est pas assez poussé la combustion est incomplète et qu'au contraire si on chauffe trop

il se produit une combinaison de l'acide phosphorique avec le verre. Dans les deux cas les résultats sont par défaut. Si de plus, dans le cas d'une combustion difficile, on est obligé d'ajouter beaucoup d'acide nitrique celui-ci doit être chassé et le départ des vapeurs nitreuses peut entraîner des traces de phosphore. Cette méthode n'a pas été retenue.

b) *Acide perchlorique :*

King (27) a recommandé l'emploi de l'acide perchlorique et Berenblum et Chain (5) effectuent la minéralisation avec cet acide. R. J. Robinson (41) a montré que dans la méthode au chlorure stanneux l'excès d'acide nitrique gêne alors qu'un excès d'acide perchlorique ne gêne pas; cependant l'excès d'acide perchlorique est neutralisé pour avoir une teneur en acide convenable. Lorsque l'on emploie l'acide perchlorique seul, la minéralisation est lente et on doit chauffer assez longtemps pour avoir une décoloration parfaite tout en évitant le départ d'acide. Entre nos mains nous avons trouvé, par cette méthode, des résultats par défaut. L'addition d'acide nitrique favorise la destruction, mais nous préférons employer un réactif à base d'acide sulfurique. Un autre inconvénient est que l'acide perchlorique fait augmenter le volume final du n butanol et produit ainsi une cause d'erreur supplémentaire. Nous ne conseillons donc pas l'emploi de l'acide perchlorique soit seul, soit associé à l'acide nitrique.

c) *Acide sulfurique-acide perchlorique :*

Par contre l'addition à l'acide sulfurique concentré de une ou deux gouttes d'acide perchlorique permet une destruction facile à réaliser et rapide. On doit arrêter le chauffage dès que la solution est incolore; en prolongeant le chauffage la solution devient vert à chaud par décomposition de l'acide perchlorique et formation de vapeurs de peroxyde de chlore qui se dégagent. A froid la solution devient incolore. De plus malgré cette faible teneur en acide perchlorique il y a une légère augmentation du volume du n-butanol. Cette méthode donne de bons résultats lorsque l'on dose le phosphore selon la méthode de Fiske et Subbarow ou de Bell-Doisy-Briggs; mais elle a cependant quelques inconvénients lorsque l'on emploie le chlorure stanneux comme réducteur.

d) *Acide sulfurique-eau oxygénée :*

Baumann (2) a préconisé l'emploi de l'acide sulfurique avec

l'addition d'eau oxygénée à 30 p. 100 (*) (sans phosphore). L'emploi de 0,3 ml (Fiske et Subbarow) ou de 0,5 ml d'acide sulfurique concentré (Horecker et al.) et d'une goutte d'eau oxygénée à 10 p. 100 (eau oxygénée à 30 p. 100 diluée au 1/3 avec de l'eau bidistillée) est suffisant pour assurer une destruction rapide et complète. Voici la technique employée pour la minéralisation des lipides de 0,1 ml de sérum :

La solution chloroformique des lipides est mesurée dans un tube à essai pyrex de 18 × 150 mm, jaugeé à 10 ml, auquel a été soudé un rodage normalisé 19/38. Le chloroforme est évaporé. On ajoute 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. On bouche le tube en maintenant le bouchon de façon à laisser seulement un léger interstice. On chauffe légèrement jusqu'à calcination en évitant tout départ de fumées d'acide sulfurique. Ceci est facile à réaliser car lorsque l'on voit les fumées dépasser la moitié du tube il suffit de boucher le tube et de laisser refroidir pour que les fumées se condensent. On ajoute alors une goutte d'eau oxygénée à 10 p. 100 et chauffe légèrement. La destruction est très rapide; cependant bien que la solution soit incolore il faut chauffer encore quelques instants pour décomposer complètement l'eau oxygénée en excès. On ajoute ensuite 8 ml d'eau bidistillée en rinçant le bouchon et porte au bain-marie bouillant 20 minutes pour transformer l'acide pyrophosphorique (qui aurait pu se former au cours d'un chauffage trop violent) en acide orthophosphorique seul dosé. Arrivé à ce stade si on pratique le dosage du phosphore selon la méthode de Horecker, Ma et Haas, avec ou sans extraction par le n-butanol, les faibles traces d'eau oxygénée restantes ne gênent pas en présence du métabisulfite et sulfite de sodium de la solution d'acide amino-naphtol-sulfonique. Par contre si on emploie le chlorure stanneux comme réducteur on doit s'assurer que l'eau oxygénée a bien été complètement détruite. Celle-ci donnerait en effet, avec le molybdate d'ammonium, qui sera ajouté ensuite, une coloration jaune perturbatrice. Pour tester l'absence d'eau oxygénée on ajoute une goutte de solution centinormale de permanganate de potassium (pur et sans phosphate); s'il n'y a plus d'eau oxygénée, comme c'est généralement le cas, avec une minéralisation bien conduite, la solution est rose. Par contre si le chauffage n'a pas été assez poussé il

(*) L'eau oxygénée américaine A.C.S. dont le taux en phosphates (PO_4) est de 0,0005 p. 100 convient très bien pour cette minéralisation. L'eau oxygénée anglaise «Analar» contenant 0,001 p. 100 de phosphates est également correcte. Les eaux oxygénées françaises contenant souvent des phosphates doivent être contrôlées avant leur emploi comme agent de minéralisation; on doit utiliser une eau oxygénée contenant seulement des traces de phosphates.

reste encore des traces d'eau oxygénée et on ajoutera goutte à goutte du permanganate jusqu'à coloration rose. La solution redevient incolore par addition d'une goutte de solution centinormale d'oxalate de sodium. L'excès d'eau oxygénée aura bien été totalement détruit; mais en général on acquiert très vite l'habitude du chauffage pour n'avoir plus d'excès d'eau oxygénée. Le chauffage devra cependant rester modéré sans aucun départ de fumées d'acide sulfurique dont la concentration restera ainsi constante. Le dosage du phosphore sera effectué selon la méthode de Horecker, Ma et Haas, modifiée par extraction au n-butanol, dans le tube même ayant servi à effectuer la minéralisation.

La méthode de minéralisation par l'acide sulfurique-eau oxygénée a de plus un autre avantage; elle permet, en plus du phosphore, de doser l'azote, comme l'ont montré Damle et Krishnan (15). La même minéralisation peut servir pour les deux dosages effectués sur des parties aliquotes.

Dosage du phosphore des lipoprotéines après électrophorèse du sérum sur papier

L'électrophorèse sur papier du sérum permet, après coloration, le dosage rapide des diverses fractions protéiniques. Pezold et Peiser (38) recommandent la coloration par le bleu de bromophénol pour les mesures colorimétriques de l'éluat et par l'amidoschwarz 10 B pour la colorimétrie directe du papier rendu transparent par immersion dans un liquide d'indice de réfraction convenable, selon Grassmann, Hannig et Knedel (21).

Les lipoprotéines sont dosées de la même façon après coloration par le soudan noir, selon Swahn (47), soit après élution du colorant et colorimétrie de l'éluat, soit par mesure photométrique directe.

On peut également, après l'électrophorèse, découper le papier, non traité par un colorant, en bandes de 1 cm de largeur en se servant comme guide de l'électrophorèse du dosage des protéines. Les bandes de papier sont éluées par l'alcool-éther (3/1) selon Nikkilae (36) ou par l'acétone-éthanol (1/1) selon Boyd (10) ou par tout autre mélange de solvants des lipides tel que méthylal-méthanol (4/1) ou chloroforme-éthanol (1/2). Sur l'éluat on peut doser le cholestérol comme l'a effectué Boyd par une réaction colorée avec le mélange acide acétique-anhydride acétique-acide sulfurique ou mieux par une réaction plus sensible basée sur la méthode de Zlatkis, Zak et Boyle (52).

Le phosphore lipidique sera dosé, après minéralisation acide sulfurique-eau oxygénée selon la méthode de Horecker, Ma et Haas modifiée par une extraction finale par le n-butanol. Nikkilae effectue le dosage du phosphore par la méthode de Fiske et Subbarow; on aura une sensibilité maximum en appliquant la méthode que nous avons recommandée.

En effectuant trois électrophorèses parallèles il est possible de doser les protéines, le cholestérol et le phosphore des lipoprotéines et de déterminer ainsi le rapport cholestérol/phosphatides des fractions lipoprotéines du sérum. L'emploi de la méthode de dosage du phosphore que nous décrivons permettra une détermination bien plus précise de ce rapport.

Dosage du phosphore des phosphatides

La méthode de dosage du phosphore peut également être appliquée pour le dosage des phosphatides du sérum après leur séparation par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique selon la méthode de Lea et Rhodes (30) ou par chromatographie sur papier suivie d'une «électrorhéophorèse» selon Blass, Macheboeuf et Rebeyrotte (7) ou d'une «-chromatoionophorèse» selon Blass, Lecomte et Polonovski (8). Les spots repérés sur un chromatogramme parallèle par la méthode de Hanes et Isherwood (23) ou par celle de Wade et Morgan (50) sont élués par le chloroforme dans le tube à essai rodé jaugé à 10 ml. Le solvant est évaporé et la minéralisation effectuée avec 0,5 ml d'acide sulfurique et une goutte d'eau oxygénée à 10 p. 100 (ou par une quantité réduite si le volume final est réduit dans les mêmes proportions). Le dosage du phosphore est effectué dans le tube selon la méthode de Horecker, Ma et Haas modifiée. De la teneur en phosphore on en déduit la concentration en divers phosphatides en appliquant pour chaque phosphatide: phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et sphingomyéline son coefficient particulier calculé.

De plus la sérine, l'éthanolamine et la choline peuvent être dosées quantitativement après chromatographie sur papier de l'hydrolysât. La choline peut aussi être dosée quantitativement par la méthode de Chargaff, Levine et Green (12).

Pour le dosage direct de la sphingomyéline on dispose de la méthode de Hack (22) ainsi modifiée pour la rendre quantitative. Lorsque la chromatographie est terminée on soumet deux chromatogrammes à l'action de la potasse 0,1 N à la température du laboratoire

pendant 20 heures. On sait que dans ces conditions la sphingomyéline résiste à l'hydrolyse tandis que les autres phosphatides sont hydrolysés. Les produits d'hydrolyse sont éliminés par lavage abondant à l'eau distillée puis à l'acétone. Sur un des chromatogrammes on révèle l'emplacement du spot sphingomyéline, sur le second chromatogramme le spot ainsi localisé est découpé, élué par le chloroforme et le dosage du phosphore est effectué, après minéralisation sulfurique-eau oxygénée.

Toutes ces microméthodes permettent une détermination des divers phosphatides du sérum humain, surtout dans les cas pathologiques pour lesquels on dispose seulement d'un échantillon réduit de sérum.

Conclusions :

Après avoir effectué une étude critique de la sensibilité des diverses méthodes pour le dosage du phosphore, nous sommes arrivés aux conclusions suivantes :

a) Si le spectrophotomètre ne permet les lectures que jusqu'à 700 millimicrons la méthode de Berenblum et Chain permettra de doser de 1 à 10 gamma de phosphore en effectuant les lectures à 635 millimicrons. Pour doser de 0,5 à 4 gamma de phosphore on utilisera la méthode simplifiée avec le chlorure stanneux comme réducteur et on fera une extraction avec le volume minimum de n-butanol compatible avec le volume nécessaire pour le remplissage des cuves utilisées; les lectures seront faites à 700 millimicrons.

b) Si on dispose d'un spectrophotomètre permettant les mesures jusqu'à 900 millimicrons, on effectuera le dosage selon la méthode de Horecker, Ma et Haas, modifiée, en y ajoutant, après le chauffage, une extraction par le volume minimum de n-butanol. Dans ces conditions on titre, avec le maximum de sensibilité, de 0,5 à 4 gamma de phosphore en effectuant les lectures à 800 millimicrons. On conserve ainsi la grande précision de la méthode de Fiske et Subbarow tout en augmentant considérablement la sensibilité: c'est la méthode de choix que nous conseillons.

Le dosage du phosphore organique peut ainsi être effectué, après une minéralisation acide sulfurique-eau oxygénée selon une technique évitant toute perte de phosphore.

Ce dosage du phosphore, de sensibilité maximum, peut être appliqué facilement pour déterminer le rapport cholestérol/

phosphatides dans les lipoprotéines après électrophorèse sur papier du sérum et pour doser les phosphatides purifiés du sérum après leur séparation par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Allen (R.J.L.). — *Biochem. J.*, 1940, *34*, 858.
2. Baumann (E.J.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1922, *20*, 171.
3. Bell (R.D.) et Doisy (E.A.). — *J. Biol. Chem.*, 1920, *44*, 55.
4. Benedict (S.R.) et Theis (R.C.). — *J. Biol. Chem.*, 1924, *61*, 63.
5. Berenblum (I.) et Chain (E.). — *Biochem. J.*, 1938, *32*, 286 et 295.
6. Beveridge (J.M.R.) et Johnson (S.E.). — *Can. J. Res.*, 1949, *27 E*, 159.
7. Blass (J.), Macheboeuf (M.) et Rebeyrotte (P.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, *35*, 953.
8. Blass (J.), Lecomte (O.) et Polonovski (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, *36*, 627.
9. Bodansky (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1932, *99*, 197.
10. Boyd (G.S.). — *Biochem. J.*, 1954, *58*, 680.
11. Briggs (A.P.). — *J. Biol. Chem.*, 1922, *53*, 13.
12. Chargaff (E.), Levine (C.) et Green (C.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, *175*, 71.
13. Copaux (H.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1921, *173*, 656.
14. Crowther (J.). — *Anal. Chem.*, 1954, *26*, 1383.
15. Damle (S.P.) et Krishnan (P.S.). — *Anal. Chim. Acta*, 1954, *11*, 225.
16. Denigès (G.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1920, *171*, 802 et *C. R. Soc. Biol.*, 1921, *84*, 875.
17. Fiske (C.H.) et Subbarow (Y.). — *J. Biol. Chem.*, 1925, *66*, 375.
18. Fleury (P.) et Leclerc (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, *25*, 201.
19. Fontaine (T.D.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1942, *14*, 77.
20. Gomori (G.). — *J. Lab. Clin. Med.* 1942, *27*, 955.
21. Grassmann (W.), Hannig (K.) et Knedel (M.). — *Dtsch. med. Wschr.*, 1951, *76*, 333.
22. Hack (M.H.). — *Biochem. J.*, 1953, *54*, 602.
23. Hanes (C.S.) et Isherwood (F.A.). — *Nature*, 1949, *164*, 1107.
24. Hinglais (M^{me} H.). — *Bull. Soc. Chim. Chim. biol.*, 1927, *9*, 540.
25. Horecker (B.L.), Ma (T.S.) et Haas (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1940, *136*, 775.
26. Javillier (M.) et Djelatides (D.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, *10*, 342.
27. King (E.J.). — *Biochem. J.*, 1932, *26*, 292.
28. Kuttner (T.) et Cohen (H.R.). — *J. Biol. Chem.*, 1927, *75*, 517.

29. Kuttner (T) et Lichtenstein (L.). — *J. Biol. Chem.*, 1930, 86, 671.
30. Lea (C.H.) et Rhodes (D.N.). — *Biochem. J.*, 1955, 59, V.
31. Lowry (O.H.) et Lopez (J.A.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, 162, 421.
32. Macheboeuf (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, 464.
33. Macheboeuf (M.) et Delsal (J.-L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, 25, 116.
34. Martland (M.) et Robinson (R.). — *Biochem. J.*, 1926, 20, 847.
35. Molines (J.) et Desnuelle (P.). — *Bull. Mens. ITERG*, 1948, n° 2, 1.
36. Nikkilae (E.). — *Scand. J. Clin. Lab. Inv.*, 1953, 5, supplementum 8.
37. Osmond (F.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1887, 745.
38. Pezold (F.A.) et Peiser (U.). — *Klin. Wschr.*, 1953, 31, 982.
39. Pons (W.A.) et Guthrie (J.D.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1946, 18, 184.
40. Rainbow (C.). — *Nature*, 1946, 157, 268.
41. Robinson (R.J.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1941, 13, 465.
42. Schaffer (F.L.), Fong (J.) et Kirk (P.L.). — *Anal. Chem.*, 1953, 25, 343.
43. Shinowara (G.Y.), Jones (L.M.) et Reinhart (H.L.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, 142, 921.
44. Sideris (C.P.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1942, 14, 762.
45. Snell (F.D.) et Snell (C.T.). — *Colorimetric Methods Analysis*. 3^e édition, 1949, vol. II, 630, 681.
46. Sumner (J.B.). — *Science*, 1944, 100, 413.
47. Swahn (B.). — *Scand. J. Clin. Lab. Inv.*, 1953, 5, supplementum 9.
48. Thivolle (L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, 17, 1427.
49. Truog (E.) et Meyer (A.H.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1929, 1, 136.
50. Wade (H.E.) et Morgan (D.M.). — *Nature*, 1953, 171, 529.
51. Youngburg (G.E.) et Youngburg (M.V.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1930, 16, 138.
52. Zlatkis (A.), Zak (B.) et Boyle (A.J.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1953, 41, 486.