

ÉTUDE COMPARATIVE
DES DOSAGES COLORIMÉTRIQUES DU PHOSPHORE
III. — DOSAGE DE L'ORTHOPHOSPHATE
EN PRÉSENCE D'ESTERS PHOSPHORIQUES
(anciennes méthodes)

par

JEAN-LOUIS DELSAL et HAMID MANHOURI. (*)

Les méthodes que nous étudions dans la seconde partie du dosage du phosphore permettent de titrer l'orthophosphate en absence d'esters phosphoriques. En effet, ces dosages se font vers pH 1,0 et avec une telle acidité, l'hydrolyse de la créatine-phosphate, par exemple, est importante. Pour titrer l'orthophosphate en présence d'esters phosphoriques, il est nécessaire de faire le dosage à des pH moins acide ; ce sont ces méthodes que nous allons examiner maintenant.

A) MÉTHODE de LOWRY et LOPEZ :

Ces auteurs font le dosage de l'orthophosphate en présence de créatine-phosphate, acétyl-phosphate, ribose-1-phosphate en tampon acétique (0,1 N en acide acétique et 0,025 N en acétate de sodium) à pH4,0. Pour 1 volume de l'extrait tamponné (5 ml) contenant l'orthophosphate à doser, on ajoute 0,1 volume (0,5 ml) d'une solution d'acide ascorbique à 1 p. 100 et 0,1 volume (0,5 ml) d'une solution de molybdate d'ammonium à 1 p. 100. Les lectures, faites à 700 m μ en 5 et 10 minutes après l'addition du molybdate d'ammonium, sont extrapolées au temps zéro. Les auteurs signalent qu'entre 700 et 900 m μ les lectures sont voisines avec cependant un maximum à 860 m μ .

* Bul. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, Nos 7-8.

En traçant la courbe d'absorption en fonction de la longueur d'onde, nous constatons l'existence de deux maxima de densité optique à 320 et 860 m μ , en accord pour le visible avec Lowry et Lopez. Mais nous notons, en plus, que la sensibilité de la méthode est considérablement augmentée en faisant les lectures dans l'ultra-violet à 320 m μ (4,6 fois par rapport aux lectures à 860 m μ , 5,7 fois par rapport aux lectures à 650 m μ). Il y a donc un grand avantage à utiliser la longueur d'onde 320 m μ pour augmenter la sensibilité de la méthode. Ceci est valable pour la technique initiale de Lowry et Lopez; mais nous allons voir que pour supprimer l'inhibition due aux composés sulfurés, on est amené à ajouter des ions Cu. Nous allons donc examiner l'influence de ces ions cuivre et voir si les mesures en ultraviolet sont encore possibles.

Influence des ions Cu⁺⁺ dans la méthode de Lowry-Lopez :

a) *Sans inhibiteur :*

Dans leur mémoire de 1949, Lowry et Lopez signalent un ralentissement de la vitesse de coloration si on dose l'orthophosphate dans les extraits de tissu : cerveau, muscle, foie. Ils conseillent, pour supprimer cette inhibition, une dilution de l'extrait, une augmentation du taux en molybdate d'ammonium et en acide ascorbique et un second dosage fait parallèlement avec addition à l'extrait tissulaire d'une quantité connue d'orthophosphate.

D'après la publication de Furchgott et de Gubareff (16) l'emploi du sulfate de cuivre a été suggéré aux auteurs par le Dr C. R. Hanes, en 1952. Avant la description de la méthode par ces auteurs, le Dr O. H. Lowry avait déjà observé que le sulfate de cuivre augmentait la vitesse de développement de la coloration dans la méthode de Lowry-Lopez à pH 4,0 et également dans une modification de la méthode de Fiske-Subbarow à pH 2,0.

Peel, Fox et Elsdén (34) constatent que le dosage de l'orthophosphate dans les extraits bactériens est inhibé par le sulfure de sodium. Ils remarquent que cette même concentration en sulfure de sodium et sans effet sur le développement de la coloration dans la méthode de Fiske et Subbarow. L'addition d'ions Cu⁺⁺, à la concentration de 4×10^{-6} M, supprime cet effet inhibiteur dans la méthode de Lowry-Lopez.

Bruemmer et O'Dell (4) montrent que le glutathion et la cystéine retardent le développement de la coloration dans une modification de la méthode de Lowry-Lopez et que le sulfate de cuivre à la concentration de 7×10^{-5} M (0,5 μ mole pour 7,2 ml) supprime cette inhibition.

Peel et Loughman (35) ont complété leur première observation et indiquent que, dans la méthode de Lowry-Lopez, l'addition de 2×10^{-6} M d'ions Cu^{++} produit une accélération de la vitesse de coloration sans en augmenter l'intensité. Cependant avec une concentration de 2×10^{-5} M on observe une augmentation de la coloration finale (10 p. 100) et des effets secondaires commencent à apparaître. Avec une concentration de $1,7 \times 10^{-4}$ M une coloration apparaît dans le blanc. Tenant compte de ces faits, ces auteurs ont modifié la méthode de Lowry-Lopez en y ajoutant 0,5 ml d'une solution de sulfate de cuivre à 5×10^{-5} M (12,5 mg $\text{SO}_4 \text{ Cu}$, 5 $\text{H}_2 \text{O}$ par litre) pour un volume de 6 ml ce qui fait une concentration finale de : $4,16 \times 10^{-6}$ M et en respectant les proportions des autres réactifs.

Tout récemment, Liébecq et Louis (25) ont montré que dans la méthode de Lowry-Lopez la concentration optimum en ions Cu^{++} était voisine de 1×10^{-6} M. Avec cette teneur en cuivre, la réaction est accélérée sans augmentation de l'intensité finale, ni apparition de réactions secondaires. Il est certain que si l'on veut conserver à la méthode sa précision, il faut éviter l'apparition de ces réactions secondaires. Dans ce cas, la teneur en cuivre déterminée par Liébecq et Louis est du même ordre de grandeur que celle utilisée par Pell et Loughman. Liébecq et Louis signalent, en plus, que l'adénosine triphosphate interfère dans le dosage de l'orthophosphate selon Lowry-Lopez. En présence de grandes quantités d'adénosine triphosphate, il faut faire les lectures après 15 minutes ou augmenter la teneur en cuivre.

TABLEAU 1

Concentration en cuivre	320 m μ		650 m μ		700 m μ		860 m μ	
	5 mn	10 mn	5 mn	10 mn	5 mn	10 mn	5 mn	10 mn
0	0,638	0,638	0,113	0,113	0,128	0,128	0,137	0,137
1×10^{-6} M . .	0,638	0,630	0,113	0,113	0,128	0,128	0,138	0,138
4×10^{-6} M . .	0,630	0,630	0,116	0,116	0,131	0,131	0,155	0,155
1×10^{-5} M . .	0,638	0,638	0,123	0,123	0,137	0,137	0,174	0,174
1×10^{-4} M . .	0,569	0,520	0,201	0,220	0,229	0,252	0,409	0,426
1×10^{-3} M . .	0,462	0,444	0,284	0,284	0,328	0,319	0,668	0,668
$1,3 \times 10^{-3}$ M .	0,432	0,432	0,288	0,286	0,328	0,328	0,658	0,658
5×10^{-3} M . .	0,444	0,482	0,275	0,280	0,310	0,319	0,658	0,663
1×10^{-2} M . .	0,387	0,310	0,252	0,229	0,284	0,268	0,629	0,620

La méthode initiale de Lowry-Lopez a été effectuée avec des concentrations variables en cuivre. Nous avons vérifié que les deux maxima de densités optique se trouvent encore à 320 et 860 m μ . Le Tableau 1 indique les résultats obtenus pour 1 μ g de P par ml de solution, sous 1 cm, aux différentes longueurs d'onde après 5 et 10 minutes de réaction.

Si, à partir de ces résultats, on trace, pour chaque longueur d'onde, la courbe des densités optiques en fonction de la concentration en cuivre on peut distinguer deux stades dans la réaction :

Stade 1 :

A 320 m μ , pour une concentration en cuivre de 0 à 1×10^{-5} M la densité optique est sensiblement constante; le cuivre n'intensifie pas la réaction.

A 650 et 860 m μ le cuivre n'intensifie pas la réaction jusqu'à 1×10^{-6} M. Pour une concentration plus grande la densité optique est proportionnelle à la concentration en cuivre jusqu'à 1×10^{-4} M à 650 m μ et 1×10^{-3} M à 860 m μ (Fig. 1). Il en résulte que dans le visible, les lectures sont exactes avec une concentration optimum en cuivre de 1×10^{-6} M, en accord avec les résultats de Liébecq et Louis. Si on ajoute 4×10^{-6} M de cuivre, la coloration est déjà plus intense de 2,6 p. 100 à 650 m μ et de 13 p. 100 à 860 m μ . De plus, les inhibiteurs se combinant au cuivre, sa concentration diminuera et parallèlement la densité optique. Il ne semble donc pas que l'on puisse obtenir une grande précision dans le visible. Par contre dans l'ultra-violet, à 320 m μ , il existe un large palier où le cuivre n'a pas d'influence et on peut ajouter 1×10^{-5} M, pour supprimer les inhibitions, sans modifier la densité optique.

Stade intermédiaire :

La coloration s'intensifie en fonction de la concentration en cuivre mais il n'y a plus proportionnalité entre la densité optique et la concentration en cuivre et le blanc est coloré. Le maximum est atteint à 860 m μ vers 1×10^{-3} M. A 320 m μ , les lectures deviennent impossibles.

Stade II :

La réaction a atteint son maximum de coloration; il existe un léger palier où le cuivre a peu d'influence et ensuite la coloration diminue pour une concentration encore plus élevée en cuivre.

Nous montrons donc que, dans l'ultra-violet, à 320 m μ , on peut disposer d'une concentration en cuivre bien plus grande que dans le visible pour la suppression des inhibiteurs, sans modifier

l'intensité de la coloration et augmenter, du même coup, la sensibilité de la méthode. Cependant ces résultats sont obtenus en absence d'inhibiteurs, examinons maintenant ce qui se passe en présence d'inhibiteurs.

b) *Avec inhibiteurs :*

Peel et Loughman (35) indiquent que le sulfure de sodium à la concentration de $5 \times 10^{-7}M$ inhibe 100 p. 100 de la coloration. En présence de $4,2 \times 10^{-6}M$ de sulfate de cuivre l'inhibition due à $1,3 \times 10^{-6}M$ de sulfure de sodium est supprimée. Pour la cystéine, des concentrations de $1,7 \times 10^{-4}M$ et de $1,7 \times 10^{-3}M$ inhibent respectivement 68 et 87 p. 100 de la coloration.

Bruemmer et O'Dell (4) observent également une inhibition avec $8,3 \times 10^{-5}M$ de cystéine ou de glutathion réduit (le glutathion oxydé étant sans influence). Avec une méthode de Lowry-Lopez modifiée, ces auteurs suppriment ces inhibitions avec une concentration en cuivre de $7 \times 10^{-5}M$, sans augmentation finale de l'intensité de la coloration. Comme le constatent Liébeq et Louis (25) ce taux en cuivre est bien supérieur à celui nécessaire, dans la méthode originale de Lowry-Lopez, pour supprimer ces inhibitions.

Nous avons étudié la suppression des inhibiteurs due à : $1,3 \times 10^{-6}M$ de sulfure de sodium ; $0,6 \times 10^{-6}M$ de cystéine et $0,6 \times 10^{-6}M$ de glutathion réduit en présence de $4 \times 10^{-6}M$ de sulfate de cuivre. Les lectures en ultra-violet, à 320 m μ , sont correctes. Cependant, en présence d'inhibiteurs, la réaction n'a pas atteint tout à fait son maximum en 5 minutes de sorte que les lectures devront être faites en 10 et 15 minutes.

Nous avons essayé d'utiliser une concentration plus élevée en cuivre ($1 \times 10^{-3}M$) nous placant ainsi dans le stade II de la réaction. Dans ce cas, les lectures à 320 m μ ne sont plus possibles par suite de la divergence de densité optique entre le témoin et le dosage. Les lectures à 860 m μ sont possibles en 15-20 minutes, mais la sensibilité est plus faible qu'à 320 m μ avec une concentration en cuivre de $4 \times 10^{-6}M$. L'emploi d'une concentration plus élevée en cuivre n'apporte donc aucun avantage.

Influence du sulfate d'ammonium :

Dans le cas d'une déprotéinisation par le sulfate d'ammonium en solution saturée, nous avons étudié l'influence de ce sel sur le dosage. En présence de 1 ml de solution saturée de sulfate d'ammonium pour un volume de 6 ml, la teneur des autres réactifs n'étant pas modifiée, la réaction est retardée et n'a pas atteint son maximum en 5

minutes. Par contre, en ajoutant $4 \times 10^{-6}M$ de cuivre cette inhibition est supprimée et les lectures en 5 et 10 minutes à 320 m μ permettent d'utiliser la méthode avec le maximum de sensibilité.

Relation entre la force ionique du tampon et la concentration en cuivre :

Dans la méthode de Lowry-Lopez, le tampon à pH 4,0 est 0,1 N en acide acétique et 0,025 N en acétate de sodium. Nous avons réalisé des tampons en partant de solutions 0,1 N, N et 2 N en acide acétique. Nous ajoutons goutte à goutte une solution saturée d'acétate de sodium jusqu'à pH 4,0. Nous avons étudié l'influence de la concentration en cuivre sur la densité optique de 1 μg de P par ml à diverses longueurs d'onde. Il résulte de cette étude qu'un tampon 2 N en acide acétique ne convient pas. Avec un tampon N on diminue l'écart de densité optique, dans le visible, entre une réaction sans cuivre et avec $1 \times 10^{-5}M$ de cuivre. Dans l'ultra-violet les résultats sont bien plus irréguliers qu'avec un tampon 0,1 N en acide acétique. Il n'y a donc pas lieu de changer le tampon préconisé par Lowry-Lopez.

En conclusion la méthode de Lowry et Lopez à pH 4,0, en présence de $4 \times 10^{-6}M$ de cuivre permet de titrer l'orthophosphate en présence d'esters phosphoriques et de supprimer les inhibitions dues au sulfure de sodium, cystéine, glutathion réduit et sulfate d'ammonium. Les lectures faites à 320 m μ augmentent la sensibilité de la méthode.

Cependant, comme le conseillent Liébecq et Louis, il est utile, sur un extrait de tissu contenant l'orthophosphate à doser, de faire des essais préliminaires pour se rendre compte si l'inhibition est bien supprimée par l'addition de cuivre. On peut faire la réaction avec les trois concentrations suivantes en cuivre : $1 \times 10^{-6}M$; $4 \times 10^{-6}M$; $1 \times 10^{-5}M$. La méthode la plus correcte consiste à effectuer, pour chaque concentration en cuivre, deux dosages l'un sur l'extrait de tissu, l'autre après addition à l'extrait de x μg de P. La différence entre les deux dosages doit donner, aux erreurs d'expérience près, la densité optique des x μg de P si l'inhibition a bien été supprimée.

B) MÉTHODE de BRUEMMER et O'DELL :

Il est difficile de comparer cette méthode avec celle de Lowry et Lopez. Les modifications portent en effet à la fois sur le tampon utilisé (acide trichloracétique- acétate de sodium) et sur les concentrations en acide ascorbique et molybdate d'ammonium. La réaction

est réalisée avec 2 ml d'acide trichloracétique 10 p. 100 contenant l'orthophosphate à doser. On ajoute 4 ml de solution d'acétate de sodium 0,4 M, 0,6 ml de solution d'acide ascorbique à 2 p. 100 et 0,6 ml de solution de molybdate d'ammonium à x p. 100 (concentration omise). Les auteurs suppriment l'inhibition due à la cystéine et au glutathion réduit par addition de sulfate de cuivre : $0,5 \times 10^{-6}M$. dans 7,2 ml soit une concentration de $7 \times 10^{-5}M$. Comme l'ont fait remarquer Liébecq et Louis, ce taux en cuivre est bien plus élevé que celui qui convient dans la méthode original de Lowry et Lopez pour supprimer ces inhibitions.

Nous avons vérifié qu'avec des solutions à 1 p. 100 en acide ascorbique et en molybdate d'ammonium on ne supprimait pas l'inhibition avec l'addition de $7 \times 10^{-5}M$ de cuivre. Avec une solution à 2 p. 100 en acide ascorbique et 1 p. 100 en molybdate d'ammonium l'écart est de 5 p. 100 à 660 m μ , d'environ 12 p. 100 à 860 m μ et encore plus important dans l'ultra-violet. Avec des solutions à 2 p. 100 en acide ascorbique et en molybdate d'ammonium à 860 m μ la coloration est plus intense d'environ 25 p. 100 pour une concentration de $7 \times 10^{-5}M$ en cuivre que sans cuivre. Cependant à 660 m μ , l'écart est seulement de 4 p. 100. En comparant les résultats donnés par les auteures dans les Tableau I et II de leur mémoire, on en déduit qu'à 660 m μ et avec 10 μg de P dans un volume de 7,2 ml la densité optique est de 0,167 sans cuivre et également de 0,167 en présence de 0,6 $\mu mole$ de glutathion réduit de 0,6 $\mu mole$ de sulfate de cuivre. Si l'on double la concentration en cuivre la densité optique reste la même. L'influence de la concentration en cuivre a été étudiée avec 10 μg de P sans cystéine (T) et en présence de 170 μg de cystéine, HCl (T + C) dans un volume total de 10 ml. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau II suivant :

TABLEAU II.

Concentration en cuivre	325 m μ		660 m μ		860 m μ	
	T	T + C	T	T + C	T	T + C
0	0,602	—	0,134	—	0,161	—
$7 \times 10^{-5}M$. .	0,629	0,763	0,140	0,137	0,206	0,166
$1,4 \times 10^{-4}M$.	0,615	0,770	0,149	0,149	0,240	0,211
$5 \times 10^{-4}M$. .	0,602	0,782	0,184	0,190	0,357	0,357
$1 \times 10^{-3}M$. .	0,581	0,733	0,196	0,200	0,414	0,409

A 660 m μ , entre 0 et 5×10^{-4} M de cuivre la densité optique est proportionnelle à la concentration en cuivre. Avec $1,4 \times 10^{-4}$ M de cuivre la densité optique est plus élevée de 6 p. 100 par rapport à la densité optique obtenue 7×10^{-5} M de cuivre.

A 860 m μ , entre 0 et $1,4 \times 10^{-4}$ M de cuivre la densité optique est proportionnelle à la concentration en cuivre (Fig. 1).

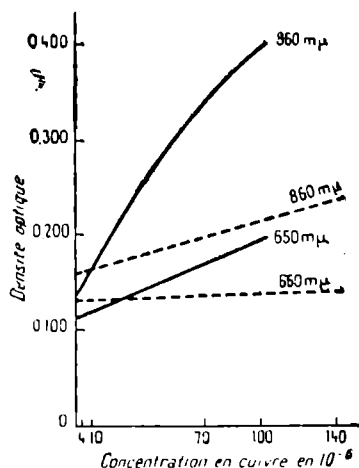


Fig. 1. — Relation entre la densité optique et la concentration en cuivre dans les méthodes de Lowry-Lopez (——) et Bruemmer et O'Dell (----).

Si on rapproche ces résultats de ceux obtenus avec la méthode de Lowry-Lopez, on en voit toute la différence et vérifie bien, qu'en effet, cette modification de la méthode de Lowry-Lopez, est moins sensible à l'influence du cuivre que la méthode originale.

Quant à l'inhibition, elle est bien supprimée avec 7×10^{-5} M et $1,4 \times 10^{-4}$ M de cuivre mais seulement à 660 m μ . En augmentant encore la concentration en cuivre (5×10^{-4} M et 1×10^{-3} M) l'inhibition est cette fois supprimée à 660 et 860 m μ . L'intensité de la coloration augmente de sorte que la sensibilité de la méthode sera augmentée si on ajoute 1×10^{-3} M de cuivre et effectue les lectures à 860 m μ . Comme on le voit sur le Tableau II, les lectures en ultra-violet sont, par cette méthode, impossibles.

C) MÉTHODE de FURCHGOTT et de GUBAREFF :

Ces auteurs décrivent une méthode de dosage de l'orthophos-

phate en présence de la créatine phosphate. Les tissus sont extraits par l'acide perchlorique 0,3 M ; à 0°, pendant 20 minutes. De l'eau distillée est ensuite ajoutée pour amener la concentration à 0,05 M en acide perchlorique. Le dosage est effectué par une modification de la méthode de Fiske et Subbbarow à pH 2,3. Pour le dosage de l'orthophosphate et pour accélérer la vitesse de la réaction afin qu'elle soit complète en 2 minutes, les auteurs ajoutent une concentration en cuivre de $1,5 \times 10^{-4}$ M. Le cuivre, comme nous l'avons vu dans le précédent mémoire, n'agit ici que sur la vitesse de réaction et n'a pas d'influence sur l'intensité de la coloration. Après avoir effectué les lectures en 2 et 5 minutes, de l'acide sulfurique 5 N est ajouté dans la cuve servant au dosage pour amener l'acidité vers 0,5 N ; le créatine-phosphate est dosé, après 30 minutes, par l'augmentation de la densité optique en tenant compte de l'augmentation du volume dû à l'addition de l'acide sulfurique. Le dosage de l'orthophosphate se faisant à pH 2,3 l'hydrolyse de la créatine phosphate n'est pas négligeable ; en extrapolant au temps zéro, les lectures faites à 660 m μ en 2 et 5 minutes, il est possible de compenser cette hydrolyse. En traçant le spectre d'absorption de la réaction pratiquée selon ces auteurs, on observe deux maxima de densité optique à 320 et 735 m μ . Dans le visible, il est préférable d'effectuer les lectures à 735 m μ au lieu de 660 m μ . Dans l'ultra-violet, le dosage à 320 m μ est 5 fois plus sensible.

RÉSUMÉ

Nous avons examiné le dosage de l'orthophosphate, en présence d'esters phosphoriques, par des méthodes connues.

La sensibilité de la méthode de Lowry et Lopez à pH 4,0 (en présence de 4×10^{-6} M de cuivre) a été augmentée en effectuant les lectures dans l'ultra-violet à 320 m μ .

Si la concentration en cuivre est de 1×10^{-3} M et si on effectue les lectures à 860 m μ , on augmente la sensibilité de la méthode de Bruemmer et O'Dell à pH 4,0 (modification de la méthode de Lowry et Lopez).

La méthode de Furchgott et de Gubareff (application de la méthode de Fiske et Subbbarow à pH 2,3 en présence de cuivre) a été examinée. Les mesures dans l'ultra-violet à 320 m μ augmentent la sensibilité ; cependant le pH 2,3 utilisé dans cette méthode en restreint son emploi.

SUMMARY

The determination of orthophosphate in the presence of phosphate esters by the usual methods was examined.

The sensibility of the Lowry and Lopez method at pH 4.0 (in the presence of $4 \times 10^{-6}M$ copper) was increased by carrying out readings in the ultra-violet at 320 m μ .

If copper concentration is $1 \times 10^{-3}M$ and readings are taken at 860 m μ , the sensitivity of the Bruemmer and O'Dell method (modification of the Lowry and Lopez method) is increased at pH 4.0.

The Furchgott and Gubareff method (application of the Fiske and Subbarow method at pH 2.3 in the presence of copper) was examined.

Ultra-violet readings at 320 m μ increase sensitivity but pH 2.3 used in this method limits its use.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir haben die Bestimmung des Orthophosphats in Gegenwart von Phosphorsäure-Estern durch Anwendung bekannter Methoden studiert.

Die Empfindlichkeit der Methode von Lowry und Lopez bei pH 4,0 (in Gegenwart von 4×10^{-6}) wurde durch Lesung im UV 320 m μ erhöht.

Wenn die Kupfer-Konzentration 1×10^{-3} beträgt und wenn die Bestimmungen bei 860 m μ ausgeführt werden, kann die Methode von Bruemmer und O'Dell bei pH 4,0 (Abänderung der Methode von Lowry und Lopez) empfindlicher gestaltet werden.

Die Methode von Furchgott und Gubareff (Anwendung der Methode von Fiske und Subbarow bei pH 2,3 in Gegenwart von Kupfer) wurde untersucht; UV.-Messungen bei 320 m μ erhöhen die Empfindlichkeit, — die Anwendung von pH 2,3 vermindert hingegen die Brauchbarkeit der Methode.

BIBLIOGRAPHIE

A la fin du 4^e mémoire.