

APPLICATION DE LA MÉTHODE DE NESSLER AU MICRODOSAGE DE L'AZOTE ALPHA-AMINÉ EN MILIEU BIOLOGIQUE

M. C. MICHEL

Avec la collaboration technique de Simone BOCHE
*Service de Biochimie et de Nutrition,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

1° La réaction de NESSLER, pour le dosage de quantités d'azote ammoniacal de l'ordre de 10 γ /ml, a été étudiée quant à la préparation du réactif et la formation du dérivé coloré (influence de la température, de la dilution, etc.)

2° Les acides aminés, dégradés par la ninhydrine en milieu sulfurique, fournissent de l'azote ammoniacal qui est dosé après microdiffusion. Les résultats obtenus sont voisins de la valeur théorique, sauf pour la proline (39 p. 100), le tryptophane (53 p. 100) et l'acide aspartique (88,6 p. 100). La cystine fournit des résultats aberrants.

3° Le groupement amidé de l'asparagine et de la glutamine n'est pas dégradé dans ces conditions.

4° Les peptides fournissent des valeurs faibles (de 10 à 30 p. 100).

5° Cette méthode a été comparée, sur des mélanges de produits purs et des extraits de sang, à la méthode de dosage potentiométrique.

Dans une étude antérieure, nous avons décrit une méthode de dosage de l'azote aminé dans les milieux biologiques par dégradation à la ninhydrine et mesure titrimétrique, après microdiffusion, de l'ammoniac formé. Ce procédé est plus spécifique que celui de VAN SLYKE à l'acide nitreux, en particulier à l'égard des amides et de certains peptides (MICHEL 1960). Toutefois ces deux méthodes offrent l'inconvénient de manquer de sensibilité : certains produits biologiques, tels que le sang, contiennent peu d'acides aminés libres ; en outre, on ne peut en prélever que de faibles quantités sur l'animal vivant pour éviter de perturber son métabolisme.

La technique que nous décrivons a pour but d'améliorer à la fois la spécificité et la sensibilité de la réaction à la ninhydrine. Elle a été comparée, sur des substances pures et des extraits de produits biologiques, à la méthode antérieurement décrite et à un procédé de dosage potentiométrique (VIGNERON 1960). Ce dernier permet de doser l'ensemble des groupements aminés libres sans dégradation des substances labiles. Le principe de chacune de ces méthodes est le suivant :

1° *Méthode à la ninhydrine.* — Par ébullition en milieu sulfurique dilué, et en

présence de ninhydrine, le groupement alpha-aminé est dégradé. L'ammoniac formé, obtenu en solution sulfurique par microdiffusion, est dosé colorimétriquement par le réactif de NESSLER.

2° *Méthode potentiométrique.* — La solution à doser est débarrassée des sels minéraux par passage sur résine échangeuse d'ions. L'éluat séché est solubilisé dans l'acide acétique anhydre. Dans ces conditions, le groupement aminé se comporte comme une base quantitativement titrable par l'acide perchlorique.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

a) Réactifs

H_2SO_4 N/100

Perhydrol 100 volumes

Ninhydrine (solution à 1 p. 100 dans H_2SO_4 N/100)

Tampon de pH 6,6

H_2PO_4K	31 g
$H_2PO_4K_2$	27 g
H_2O q. s.	1 000 ml

Réactif de Nessler

Dans 200 ml de NaOH à 20 p. 100 (Poids/volume), on ajoute successivement, sous agitation :

Hg I₂ 20 g

K I 13 g

On ajoute à cette solution de l'iode, environ 2 g, jusqu'à réaction positive à l'amidon. Elle est placée dans un flacon jaune, laissée 2 jours à température ambiante, puis décantée.

Avant le dosage, on dilue cette solution à raison de 3 p. 100, dans H_2SO_4 N/100 refroidi à 15°. Le réactif dilué est placé au bain-marie à 35°.

$HClO_4$ N/10 (préparé d'après VIGNERON 1960),

Acide acétique R. P.,

Acide formique pour analyse « Prolabo » :

b) Matériel

Tubes de 14/140 mm jaugés à 5 et 10 ml ;

Tubes de 16/160 mm calibrés au même diamètre.

Photomètre ERAL, muni d'un filtre interférentiel de longueur d'onde 440 m μ .

PH mètre Radiometer Type 22 — équipé d'électrodes à distance type 202 K ;

Agitateur magnétique ;

Seringue automatique ;

Bain-marie réglé à 35°C \pm 0,1.

c) Extraction des acides aminés à partir du sang

Dès le prélèvement, 5 ml de sang sont dispersés dans 75 ml d'alcool à 85°. Après 1 heure à température ambiante, on filtre sur verre fritté à l'aide de supercel. Le résidu est rincé par 50 ml d'alcool à 80°. Le filtrat est ensuite évaporé sous un courant d'air. Après séchage on reprend le résidu par 10 ml de la solution de ninhydrine.

On effectue la dégradation dans des tubes jaugés de 14 \times 140 mm, contenant 4 ml de solution (en double exemplaire). Après 15 minutes à 100°C, on ajoute 0,5 ml d'eau oxygénée et porte de nouveau 5 minutes au bain-marie. Après refroidissement, le volume est amené à 5 ml avec le tampon concentré. On effectue la micro-diffusion dans des cellules de CONWAY, avec 1 ml de solution (en double exemplaire), le compartiment intérieur contient 2,5 ml de H_2SO_4 N/100. On déplace par 1 ml de solution de K_2CO_3 , pendant 2 heures, puis on prélève deux fois 1 ml dans le compartiment intérieur. Cette solution contenue dans des tubes calibrés de 16 \times 160 mm, est placée au bain-marie.

La réaction colorée s'effectue en injectant 5 ml de réactif dilué par tube. Après agitation, on laisse développer 15 minutes au bain-marie. La densité optique est lue à 440 m μ , sur un témoin H_2O distillée, ceci afin de contrôler la valeur des réactifs.

d) Dosage potentiométrique

L'échantillon à doser, contenant environ 1 mg d'azote aminé, est débarrassé des impuretés cationiques par passage sur Permutite P 50 sous forme hydrogène. L'éluat, $(\text{NH}_4\text{OH}, 4\text{N})$ séché sous vide, est repris par 2 ml d'acide formique, auquel on ajoute 40 ml d'acide acétique. On dose d'après VIGNERON (1960). Le titrage est effectué à l'aide d'une burette de 2 ml au 1/100, dont la pointe plonge dans le liquide. Au voisinage de la zone de virage, les quantités d'acide ajoutées sont de 25 μl .

RÉSULTATS OBTENUS

1° Mesure colorimétrique de $(\text{NH}_4)^+$: étude de la réaction de Nessler.

Dans les conditions indiquées, avec différentes concentrations de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en solution sulfurique, la densité optique obtenue est la suivante : (Tableau 1 et fig. 1).

TABLEAU 1

N en γ par tube (6ml)	Densité optique à 440 m μ $\times 10^3$	Moyenne
0	11-12-10-12	11,66
5	117-121-108-107	113,25
10	233-226-216-215	222,5
15	317-313-336-333	323,25

La coloration se développe en 10 minutes environ et reste stable pendant plusieurs heures. L'addition de réactif plus concentré (de 3 à 5 p. 100), n'a pas d'effet sur la valeur maximum de la coloration, mais on peut observer un louche avec les

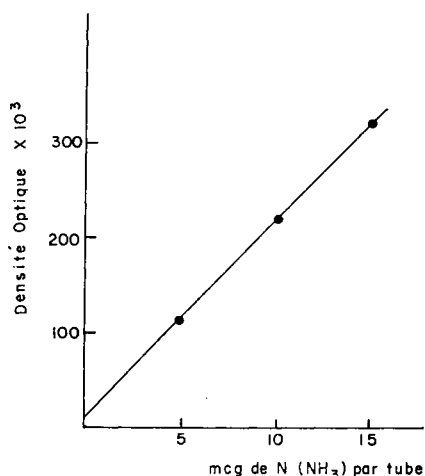


FIG. 1. — Dosage colorimétrique direct.

fortes concentrations. En revanche, la température des solutions joue un rôle important aux différents stades du dosage. La préparation du réactif dilué doit être effectuée à une température de l'ordre de 15°C, ceci afin de diminuer la valeur du blanc. Cette action s'exerce aussi au cours de la réaction colorée : le maximum obtenu est fonction de la température (fig. 2).

Les valeurs obtenues après microdiffusion sont égales ou légèrement supérieures à celles du dosage direct, vraisemblablement à cause de contaminations extérieures. Pour annuler cette cause d'erreur, une gamme étalon, obtenue après diffusion, est préparée pour chaque série de dosages (fig. 3). A 20°C la diffusion requiert environ 2 h pour être quantitative (fig. 4). Enfin la reproductibilité des résultats, obtenus par diffusion de solutions à 10 et 20 γ /ml d'azote ammoniacal, est reportée dans le tableau II.

TABLEAU 2

Coefficient de variation mesuré sur 6 essais successifs dans chaque série.

	Série 1	Série 2
10 γ /ml	1,3 p. 100	1,0 p. 100
20 γ /ml	0,75 p. 100	1,3 p. 100

2° *Dégradation du groupement aminé par la ninhydrine et mesure de NH_3 formé.*

Le tableau 3 résume les résultats obtenus. Les substances à doser, à la concentration M/1000, ont été traitées de la manière indiquée, le pourcentage de dégradation est exprimé par rapport à un groupement aminé par molécule.

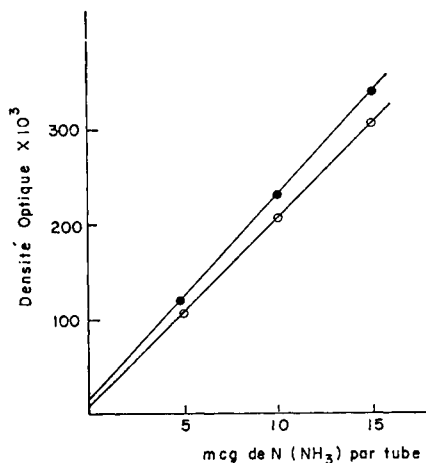


FIG. 2. — *Influence de la température sur le développement de la coloration ;*

○ 20°C
● 40°C

3° *Dosage de l'azote aminé du sang après extraction alcoolique. Comparaison avec un mélange d'acides aminés purs de concentration voisine.*

Divers extraits alcooliques de sang, soit de porc, soit de poulet, ont été dosés : 1), par la méthode antérieurement décrite, 2) par la présente méthode, et 3), par potentiométrie après passage sur résine. Les valeurs moyennes (5 déterminations dans chaque cas), ont été comparées à celles obtenues avec un mélange d'acides

TABLEAU 3

Dégradation de diverses substances par la ninhydrine :
Pourcentage d'ammoniac obtenu par rapport à un groupement aminé par molécule.

Acides aminés	P. 100 obtenu	Amides et peptides	P. 100 obtenu
Glycine	99,9	Glutamine	100,8
Alanine	99,8	Asparagine	101,0
Sérine	100,0	Glycyl glycine.....	31,1
Thréonine	99,6	Glycyl-L-Leucine	30,5
Valine	101,1	Glycyl-L-Tyrosine	25,1
Leucine	99,0	Diglycyl-glycine	34,6
Isoleucine	99,0	Leucyl-Glycine	5,2
Acide Glutamique	101,0	Leucyl-glycyl-glycine	9,8
— Aspartique	88,6	Carnosine	17,0
Arginine	99,5	Histidyl-Histidine	31,7
Lysine	107,1	Glutathion	105,5
Phénylalanine.....	99,7		
Tyrosine	98,0		
Méthionine	100,1		
Histidine	110,5		
Tryptophane.....	53		
Proline	39,1		
Cystine *	132		
Cystéine *.....	76		

* Résultats non reproductibles.

aminés traité de la même manière. Ce mélange contient les acides aminés du tableau 3, plus la glutamine, à l'exclusion de l'acide aspartique, de la cystine et de la cystéine.

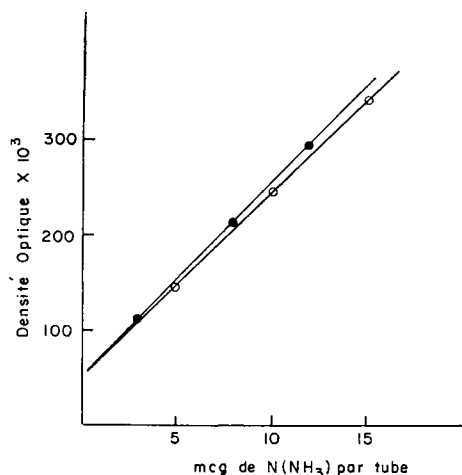


FIG. 3. — ○ dosage direct
● dosage après diffusion.

Ces substances sont diluées en proportions équimoléculaires, puis leur concentration en azote aminé est amenée à 7,85 mg par 100 ml (valeur intermédiaire entre celle du sang des oiseaux et des monogastriques). Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 4.

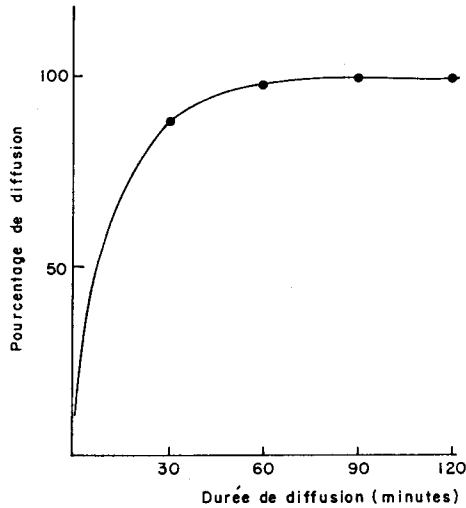


FIG. 4. — Vitesse de diffusion N (NH_3) : 10 mcg/ml.

TABLEAU 4

*Dosage de l'azote aminé du sang et d'un mélange standard
(Valeur exprimées en mg d'azote aminé dans 100 ml).*

Méthode employée

	Ninhydrine titrimétrie	Ninhydrine Nessler	Potentiométrie
Mélange standard * ...	7,4	7,5	8,7
Sang de porc	6,66	5,86	7,82
Sang de poulet	12,0	9,0	18,4

* Par rapport à la théorie, la valeur expérimentale attendue est de 97 p. 100 pour la ninhydrine. Elle est de 112 p. 100 pour la potentiométrie (2 fonctions aminées dosables pour l'arginine, la lysine et la cystine).

DISCUSSION

La réaction de NESSLER (1856), a été étudiée et utilisée par FOLIN (1912), pour le dosage de l'azote ammoniacal dans des produits biologiques. Elle a été appliquée ensuite à la détermination directe de faibles quantités d'azote organique, après minéralisation par la méthode de KJELDHAL. (KOCH 1924 ; YUEN et POLLARD 1952. SHAFFER et SPRECHER 1957, LANG 1958 ; BURCK 1960 ; RAO 1960). Les causes d'erreurs sont nombreuses. HETRICK et WHITNEY (1949) THOMPSON et MORRISON (1951), HERBAIN (1953) ont montré l'influence du pH de la réaction, de sa température et de divers cations sur la formation du complexe coloré. La présence d'un louche ou d'un précipité est fréquemment rencontrée. Ceci est dû au fait que la réaction est fonction des proportions relatives des ions $(\text{Hg I}_4)^{-}$, $(\text{OH})^{-}$ et $(\text{NH}_4)^{+}$, (SARKAR et GHOSH, 1956).

L'obtention d'une coloration dont l'intensité est une fonction linéaire de la

concentration en $(\text{NH}_4)^+$ dépend dans une large mesure de la quantité d'iode présente dans le réactif. En effet, les formules à teneur faible en cet élément (CONWAY 1957, BURCK 1960) fournissent une courbe qui s'infléchit rapidement pour des taux de $(\text{NH}_4)^+$ supérieurs à 5 γ/ml . L'inverse se produit avec des teneurs plus élevées en iode (RAO 1960). Dans ce dernier cas, l'apparition d'un trouble est fréquente.

La méthode que nous proposons a pour but d'éliminer la plupart de ces causes d'erreurs. Les proportions relatives des différents réactifs, la température, sont exactement déterminées pour toute une série de dosage. La microdiffusion de $(\text{NH}_4)^+$ en solution sulfurique permet d'éliminer l'interférence possible des autres cations.

Cette méthode a été appliquée au dosage de $(\text{NH}_4)^+$ libéré par l'action de la ninhydrine sur les acides aminés. Les conditions de dégradation en milieu sulfurique dilué, puis de microdiffusion, ont été modifiées afin d'obtenir une réaction plus spécifique. Les résultats obtenus, pour la presque totalité des acides aminés, isolés ou en mélange, sont proches de la théorie. En revanche, les amides et peptides sont nettement moins dégradés que par la méthode antérieurement décrite et à fortiori par le procédé VAN SLYKE à l'acide nitreux. Ces différences se retrouvent dans le dosage de la fraction aminée du sang. La comparaison avec la méthode potentiométrique permet de mettre en évidence dans certains cas (sang de poulet), la présence d'une importante fraction peptidique ; celle-ci est absente du sang du monogastrique, ainsi que l'ont montré STEIN et MOORE (1954).

En résumé, la méthode proposée permet de doser avec une spécificité et une précision satisfaisante des quantités d'azote aminé de l'ordre de 10 γ par ml.

Reçu en juillet 1961.

SUMMARY

APPLICATION OF THE NESSLER METHOD TO THE ALPHA-AMINONITROGEN MICRO-DETERMINATION IN BIOLOGICAL MEDIUM

1° The NESSLER reaction for the determination of quantities of ammoniacal nitrogen for the bracket of 10 γ/ml has been studied as to the preparation of the reagent and the formation of a colored derivative (influence of temperature, dilution etc.).

2° The amino acids degraded by the ninhydrin in a sulfuric medium give ammoniacal nitrogen which is rated after microdiffusion. The results obtained are close to the theoretical values except for proline (30 p. 100), tryptophan (53 p. 100) and aspartic acid (88,6 p. 100). Cystine gives aberrant results.

3° The amide groups of asparagine and glutamine are not degraded under these conditions.

4° The peptides give low rations (from 10 to 30 p. 100).

5° This method has been compared on mixtures of pure produces and on blood extracts with the potentiometric method of determination.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BURCK H. C. 1960. Kolorimetrische Mikro-Kjeldahl-Methode mit direkter Nesslerisation zur routinemässigen Stickstoffbestimmung (Nitro- und Nitrosogruppen ausgenommen). *Mikrochem Acta.*, 200-203.
 CONWAY E. J., 1957. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. 4th ed., Crosby Lockwood, London.
 FOLIN O., FARMER G. J., 1912. Total Nitrogen Determination. *J. Biol. Chem.*, 11, 493.
 HERBAIN M., 1953. Sur l'adaptation analytique de la réaction de Nessler. Application aux milieux biologiques. I. Le dosage de 25 à γ 100 d'azote. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35, 1031-1039.
 HETRICK J. H., WHITNEY R. M., 1949. Determination of nitrogen in milk by direct nesslerization of the digested sample. *J. Dairy Sci.*, 32, 111-122.

- KOCH F. C., Mac MEEKIN T. L., 1924. A new direct nesslerization micro Kjeldahl method and a modification of the Nessler — Folin reagent for ammonia. *J. Amer. Chem. Soc.*, **46**, 2066.
- LANG C. A., 1958. Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. *Anal. Chem.*, **30**, 1692-1694.
- MICHEL M. C., 1961. Dosage de l'azote aminé dans quelques liquides biologiques. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 248-255.
- RAO M. B., WHITNEY R. M., 1960. An Improvement in the Direct Nesslerization Method for the Determination of Total Nitrogen in Sto-Sterile Milk. *J. Dairy Sci.*, **43**, 563-565.
- SARKAR P. B., GHOSH N. N., 1956. Studies on Nessler's reagent and Nessler's precipitate. *Anal. Chim. Acta.*, **14**, 209-212.
- SHAFFER F. L., SPRECHER J. C., 1957. Routine determination of Nitrogen in the microgram Range with Sealed Tube digestion and direct Nesslerization. *Anal. Chem.*, **29**, 437-438.
- STEIN W. H., MOORE S., 1954. The free amino acids of human blood plasma. *J. Biol. Chem.*, **211**, 915-926.
- THOMPSON J. F., MORRISON G. R., 1951. Determination of organic nitrogen. *Anal. Chem.*, **23**, 1153.
- VIGNERON M., 1960. Détermination par titrage potentiométrique de l'azote aminé libre de quelques amino acides, peptides et protéines. *Ann. Pharm. franç.*, **18**, 404.
- YUEN S. H., POLLARD A. G., 1952. The determination of nitrogen in agricultural materials by the NESSLER Reagent. *J. Sci. Food. Agric.*, **3**, 441-447.