

CHROM. 11,765

## MÉTHODE SENSIBLE DE DÉTECTION EN CONTINU DES PEPTIDES ET DES PROTÉINES PAR LA RÉACTION DU BIURET UTILISANT UN REACTEUR CUIVRE-SEPHADEX

R. LATER et C. QUINCY

*Département de Chimie Analytique, Laboratoire de Chimie Analytique Générale, Faculté de Pharmacie, 8 Avenue Rockefeller, 69 373-Lyon Cédex 2 (France)*

(Reçu le 18 décembre 1978)

---

### SUMMARY

*Sensitive method for continuous detection of peptides and proteins using the biuret reaction and a copper-Sephadex reactor*

We describe a detection method relying both on the copper displacement from a Sephadex gel by peptides and proteins, and on the subsequent colorimetric determination of the complexed copper.

The system described is fully automated and it permits a continuous analysis of column effluents. The choice of cuprizone as a detecting reagent for copper, enables one to bring the detection limit down to 200 ng for albumin and 60 ng for alanyl-glycylglycin.

The specificity of the method is the same as the biuret reaction. Some examples of the possible applications are given.

---

### INTRODUCTION

La détection des peptides et des protéines en sortie de colonne à chromatographie fait appel soit à leur absorbance propre à 280 nm, soit à leur réactivité, avec le réactif de Folin-Ciocalteu<sup>1</sup>, avec les ions cuivriques (réaction du biuret), avec la ninhydrine après hydrolyse alcaline<sup>2</sup> ou avec des réactifs donnant des composés fluorescents tels que la fluoescamine<sup>3</sup> ou l'*o*-phthalaldéhyde<sup>4</sup>.

Les méthodes basées sur la mesure directe de l'absorbance des complexes cuivriques se heurtent à deux difficultés: un certain manque de sensibilité et une variabilité du maximum d'absorption en fonction de la nature du peptide ou de la protéine. Ces deux difficultés disparaissent si l'on dose le cuivre lié aux peptides et aux protéines. Ceci peut être obtenu soit en isolant du cuivre en excès les complexes formés<sup>5</sup>, soit en réalisant la formation des complexes à partir de cuivre inclus dans une matrice insoluble<sup>6-8</sup>. C'est ce qu'avaient fait Gräsbeck et Karlsson<sup>9</sup> en 1963 en utilisant du <sup>64</sup>Cu fixé à un gel de dextran. La mesure de la radioactivité permettait une détermination particulièrement sensible.

A partir de ce principe de réaction mettant en oeuvre une phase solide, nous

proposons une méthode de détection en continu des peptides et des protéines utilisant un réacteur cuivre-Séphadex et la cuprizone comme réactif du cuivre. Tout en évitant l'utilisation d'un isotope radioactif, nous conservons les avantages d'une détection en continu et une grande sensibilité.

## MATERIEL ET MÉTHODES

### *Réactifs*

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des réactifs et des phases éluantes en chromatographie sont des produits purs pour analyse: soude, 0.2 et 0.25 *M*. La formule du réactif du biuret est voisine de celle du réactif de Gornall *et al.*<sup>10</sup> concentré dix fois: sulfate de cuivre pentahydraté 0.06 *M*, tartrate double de sodium et de potassium 0.21 *M*, soude 1 *M* et iodure de potassium 0.06 *M*. Acide borique, 0.3 *M*. Cuprizone, bis(cyclohexanone)oxalyldihydrazone 0.01 *M* dans l'éthanol à 50°.

La soude et l'acide borique sont additionnés de 0.5 ml d'une solution de Brij 25 à 30% comme mouillant.

Les acides aminés et le glucagon ont été obtenus de Calbiochem (Los Angeles, Calif., É.U.), les di- et tripeptides de National Biochemicals (Ohio, É.U.) et l'albumine humaine de Koch-Light (Colnbrook, Angleterre).

L'angiotensine II amide 5 valine et le lysozyme sont des produits pharmaceutiques des laboratoires Ciba (Bâle, Suisse) et Ronchese (Meudon, France), respectivement.

L'immunoglobuline G a été préparée par séparation sur DEAE-Séphadex A-25 selon la méthode décrite par Baumstark *et al.*<sup>11</sup> à partir d'un pool de sérums humains. Sa pureté a été contrôlée par immunoélectrophorèse et son titre déterminé par mesure d'absorbance à 280 nm.

La mise en solution est faite dans l'eau distillée pour tous les composés sauf le glucagon qui est dissous dans la soude 0.01 *M*.

Le Sephadex G-25 et le DEAE-Sephacrose CL6B sont des produits Pharmacia (Uppsala, Suède).

### *Préparation du réacteur cuivre-Séphadex*

Une colonne de verre de 15 cm de longueur et de 3 mm de diamètre intérieur fermée à une extrémité par un tampon de laine de verre est remplie de Sephadex G-25 medium préalablement gonflée dans la soude 0.2 *M* pendant 2 h.

Le réactif du biuret est introduit dans la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique à la vitesse de 1 ml par minute. Une coloration bleue uniforme du Sephadex indique sa saturation. La colonne est alors rincée à l'aide de la pompe par la soude 0.2 *M* pour éliminer l'excès de cuivre. Ce réacteur peut alors être introduit dans le système de mesure. Il peut être conservé plusieurs jours à l'abri de la lumière sans modification de ses propriétés.

### *Description et fonctionnement du système de détection*

Le système de détection basé sur le principe de l'analyse en flux continu est représenté sur la Fig. 1.

L'effluent de la colonne chromatographique dilué et alcalinisé par la soude 0.25 *M* traverse le réacteur cuivre-Séphadex. A sa sortie, le flux qui contient les com-

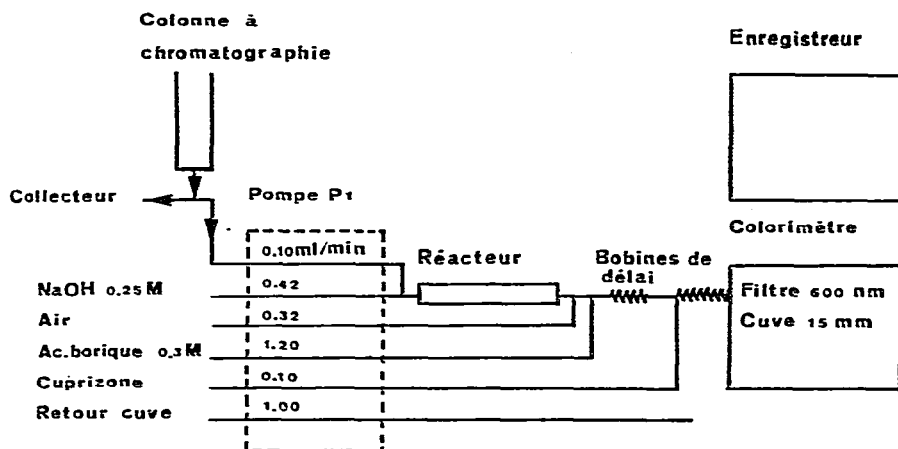


Fig. 1. Schéma du système de détection en continu.

plexes cuivriques formés par les peptides et les protéines est segmenté par de l'air et amené à un pH voisin de 8.7 par l'acide borique 0.3 M, puis mélangé avec la cuprizone. Il se forme un complexe bleu dont l'absorbance mesurée à 600 nm à l'aide d'un colorimètre à filtre interférentiel muni d'une cuve à circulation de 15 mm est enregistré.

Si l'effluent a un pouvoir tampon vis à vis du pH, les concentrations de la soude et de l'acide borique sont modifiées de manière à obtenir un pH voisin de 8.7 avant addition de la cuprizone.

Pour déterminer les caractéristiques de la méthode, les différentes solutions de peptides et de protéines sont pompées directement à la place de l'effluent.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Caractéristiques de la méthode

**Linéarité.** Des solutions de peptides et de protéines de concentration croissante sont pompées en continu pendant cinq minutes chacune, ce qui permet d'obtenir une absorbance constante. Celle-ci est directement proportionnelle à la concentration des solutions. La Fig. 2 montre les résultats obtenus avec l'alanyl-glycyl-glycine, l'angiotensine II et l'albumine humaine.

**Répétabilité.** Pour tester la répétabilité, une même solution est pompée 10 fois de manière discontinue pendant cinq minutes. Avec une solution d'alanyl-glycyl-glycine à 0.1 g/l, la moyenne des absorbances est égale à 0.355 et le coefficient de variation de 1.3%.

**Sensibilité.** La concentration d'alanyl-glycyl-glycine, dans la solution colorée finale, donnant une absorbance de 1.0 est égale à 15.4 mg/l. Avec le système tel qu'il est décrit, ceci correspond à une concentration de 280 mg/l dans l'effluent de chromatographie. Avec l'albumine humaine, ces valeurs sont respectivement de 47 et 80 mg/l.

Compte tenu de la stabilité de la ligne de base, une variation d'absorbance de  $2 \cdot 10^{-3}$  sera facilement décelable. Elle correspond à une quantité d'alanyl-glycyl-glycine de 56 ng et d'albumine humaine de 172 ng traversant le détecteur en 1 min.

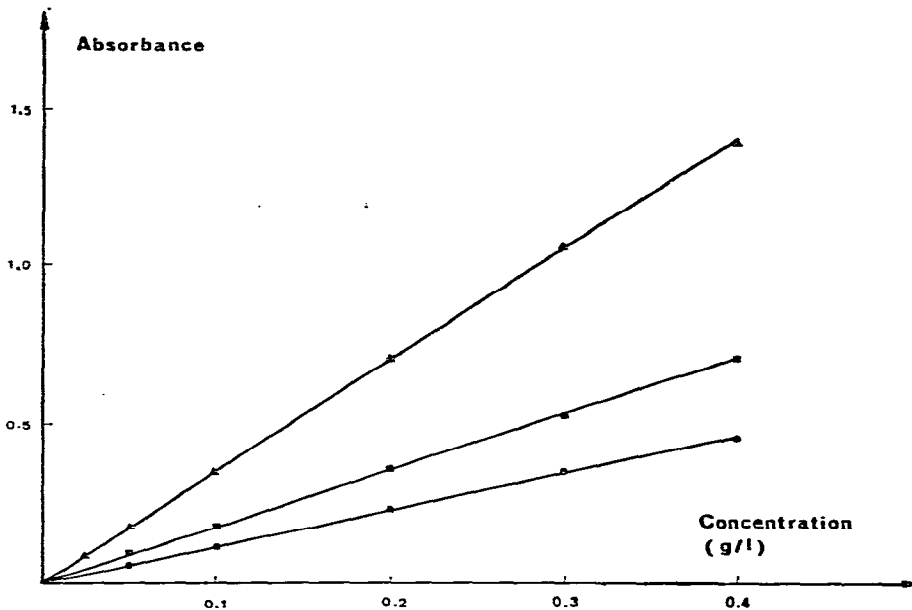


Fig. 2. Absorbance en fonction de la concentration de l'alanyl-glycylglycine (▲), de l'angiotensine II (■) et de l'albumine humaine (●).

Avec le cuivre radioactif, Gräsbeck et Karlsson<sup>9</sup> enregistraient une déflexion notable pour 120 ng d'albumine bovine dans un volume de 1 ml, soit compte tenu des conditions opératoires, 40 ng environ en 1 min.

La sensibilité est d'autre part liée aux conditions opératoires et ceci à deux niveaux : à celui de la réaction protéine cuivre et à celui de la réaction cuivre cuprizone.

La Fig. 3 montre les absorbances trouvées en fonction du volume du réacteur. Les réacteurs sont de diamètre identique mais de longueur variable. On constate que l'absorbance maximale est obtenue avec des volumes de réacteurs différents selon les composés étudiés. L'augmentation du volume du réacteur permet d'allonger le temps de réaction entre les peptides ou les protéines et le cuivre. Les résultats indiquent que les réactions sont plus ou moins rapides selon les composés. Le choix d'un réacteur de 1 ml résulte d'un compromis entre deux nécessités : obtenir un degré d'avancement de la réaction suffisant pour les composés qui réagissent le plus lentement et éviter une perte de résolution par remélange dans le réacteur des composés séparés.

La concentration en soude à l'intérieur du réacteur est voisine de 0.2 M. Elle permet d'obtenir la sensibilité maximale. Pour une solution d'albumine humaine à 0.400 g/l, nous avons noté des absorbances de 0.31, 0.43, 0.46 et 0.47 pour des concentrations en soude de 0.05, 0.1, 0.2 et 0.3 M.

Différents auteurs<sup>12,13</sup> ont montré que la zone de pH optimum varie avec le temps de développement de la réaction cuivre-cuprizone. Plus celui-ci est court, plus la zone de pH est étroite. Après 5 min, nous avons trouvé une zone optimale comprise entre pH 8.2 et 9.0. Elle s'élargit vers les pH alcalins lorsque les temps d'incubation augmentent. L'inconvénient d'une étroite dépendance du pH aurait pu être évité en utilisant comme réactif du cuivre, le diéthylthiocarbamate de sodium qui donne des complexes en milieu fortement alcalin.

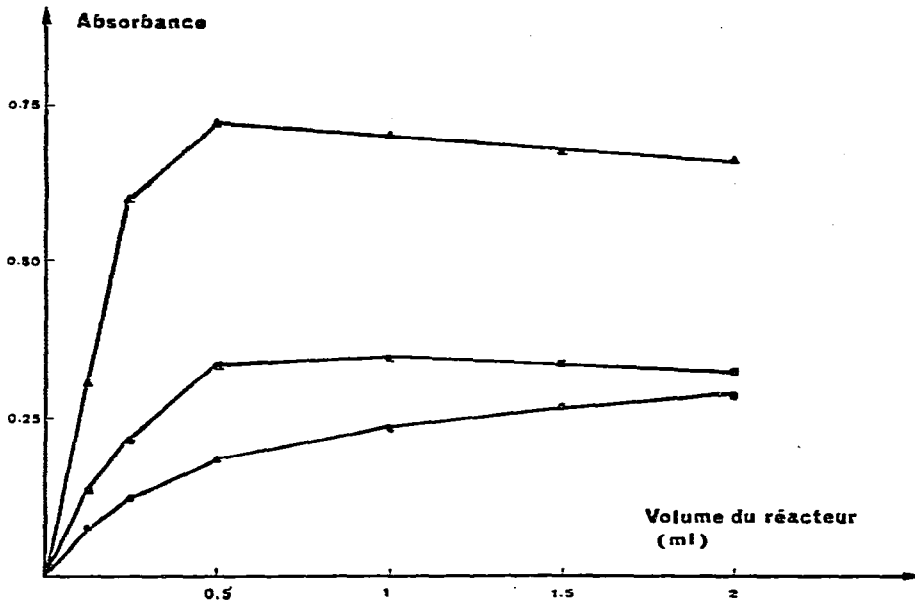


Fig. 3. Absorbance en fonction du volume du réacteur cuivre-Sephadex pour des solutions à 0.200 g/l d'alanyl-glycylglycine (▲) d'angiotensine II (■) et d'albumine humaine (●).

Nous avons choisi la cuprizone parce que le coefficient d'absorptivité molaire du complexe est deux fois plus grand que celui du diéthyl-dithiocarbamate<sup>12</sup>. Nous l'avons vérifié dans nos conditions expérimentales. La Fig. 4 montre les résultats obtenus avec des solutions d'un même peptide avec ces deux réactifs. De plus, à con-

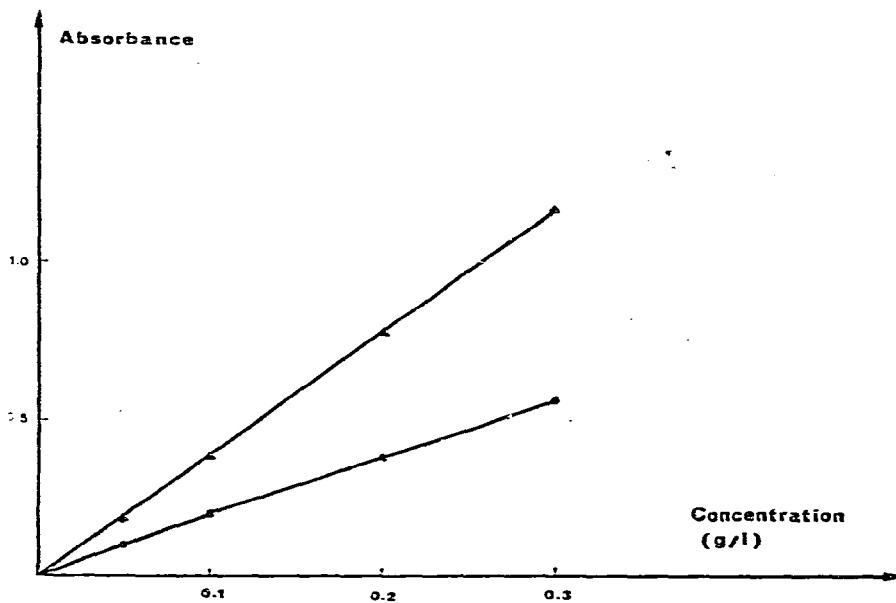


Fig. 4. Absorbance en fonction de la concentration de solutions d'alanyl-glycylglycine avec la cuprizone (▲) et le diéthyl-dithiocarbamate (●).

centration élevée, les complexes formés avec le diethyldithiocarbamate sont peu solubles et ont tendance à précipiter.

La Fig. 5 montre l'influence de la durée de réaction cuivre-cuprizonne mesurée à l'aide de solutions pures de sulfate de cuivre pompées à la place de l'effluent chromatographique après avoir supprimé le réacteur. On constate qu'un délai trop court a pour conséquence une perte de sensibilité et de linéarité. Un délai de 7 min environ permet d'obtenir une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration en cuivre. Nous avons retenu ce temps de réaction pour éviter un allongement excessif du dosage. Le maximum d'intensité de coloration n'est obtenu qu'après 15 min. Dans nos conditions, la perte de sensibilité est de 8%.

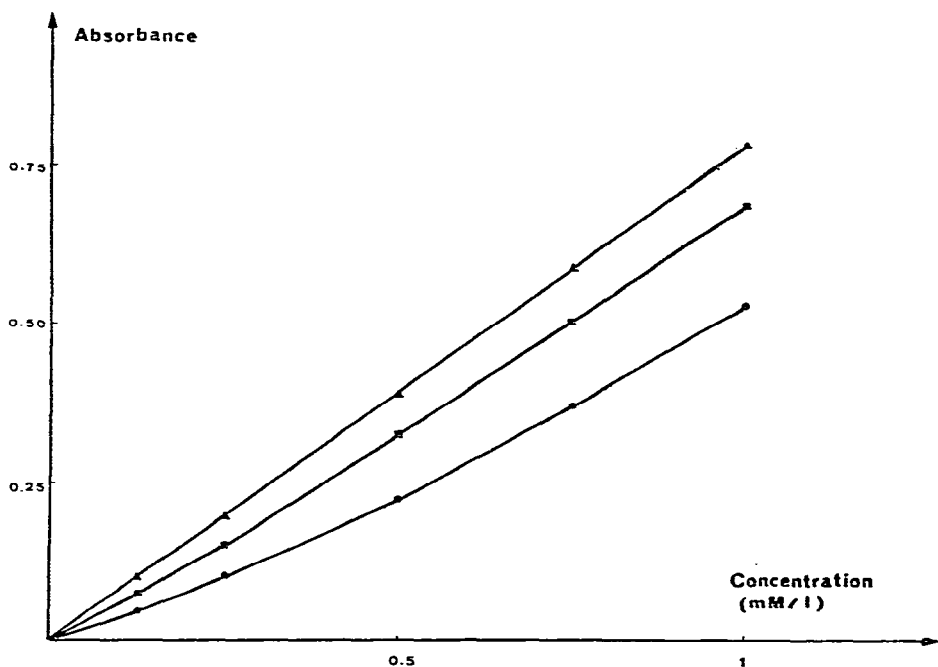


Fig. 5. Absorbance en fonction de la concentration des solutions de cuivre pour un temps de réaction de 140 sec (●), 280 sec (■) et 420 sec (▲) soit 1, 2 et 3 bobines de délai.

*Stoechiométrie de la réaction cuivre-protéines.* L'intérêt de la réaction du biuret est qu'elle se produit avec tous les composés comportant des enchaînements polypeptidiques. Cependant, il existe des différences de comportement selon la taille de la molécule. C'est ce que nous avons précisé en étudiant le nombre de N peptidique par atome de cuivre pour des composés allant de dipeptides à l'immunoglobuline G.

Des solutions de peptides et de protéines de concentration connue sont pompées en continu jusqu'à l'obtention d'une absorbance constante. Après avoir ôté le réacteur, une gamme d'étalonnage de sulfate de cuivre est pompée dans les mêmes conditions. La comparaison des solutions de peptides et de protéines avec celle de la gamme d'étalonnage permet de calculer les quantités de cuivre déplacé. Le Tableau I indique l'absorbance des différentes solutions pour une concentration de 1 mmole/l.

TABLEAU I

QUANTITÉ DE CUIVRE DÉPLACÉ PAR MOLÉCULE DE PEPTIDES ET DE PROTÉINES ET NOMBRE D'AZOTE PEPTIDIQUE PAR ATOME DE CUIVRE

Masses moléculaires et azotes peptidiques retenus: glucagon 3483 et 28, lysozyme 14, 400 et 128, albumine 69,000 et 610 et immunoglobuline G 160,000 et 1555.

	<i>Absorbance d'une solution à 1 mmol/l</i>	<i>Cuivre par molécule de peptides ou protéines</i>	<i>N peptidique par molécule de cuivre</i>
Sulfate de cuivre	0.80		
Glycylglycine	0.83	1.04	0.97
Glycylalanine	0.88	1.10	0.91
Alanylglycine	0.87	1.09	0.92
Alanylglycylglycine	0.74	0.93	2.15
Leucylglycylglycine	0.90	1.13	1.77
Phénylalanylglycylglycine	0.78	0.97	2.06
Alanylleucylglycine	0.94	1.17	1.71
Angiotensine II	1.86	2.32	3.02
Glucagon	5.23	6.53	4.29
Lysozyme	23.4	29.2	4.38
Albumine	79.3	99	6.16
Immunoglobuline G	256	320	4.86

le nombre de molécule de cuivre déplacée par molécule de peptide ainsi que le nombre d'azote peptidique par molécule de cuivre.

Ces résultats ne peuvent prétendre être une mesure absolue de la quantité de cuivre complexée par un peptide ou une protéine puisque le temps de réaction dans le réacteur ne permet une réaction complète que pour certains d'entre eux et qu'en outre nous n'avons pas contrôlé la pureté des produits essayés.

Ces rapports sont cependant en bonne concordance avec ceux trouvés par différents auteurs<sup>14,15</sup> et sur lesquels sont actuellement basés les schémas de la structure de ces complexes. La seule divergence notable concerne les dipeptides. Tous ceux que nous avons essayés éluent du cuivre alors que Gräsbeck et Karlsson<sup>9</sup> ne notaient aucune élution de radioactivité pour la glycylglycine et la glycytyrosine. La plus forte alcalinité du réacteur (3 N) est la seule différence susceptible d'expliquer ces résultats.

Globalement, la méthode décrite présente les avantages de comportement voisin des méthodes du biuret, quelles que soient les protéines, en opposition aux méthodes de Lowry *et al.*<sup>1</sup> ou de mesure à 280 nm dont les résultats sont très dépendants de la présence de quelques aminoacides seulement.

*Spécificité du détecteur.* Nous avons étudié l'interférence éventuelle des acides aminés et de composés variés qui peuvent entrer dans la composition de solutions éluantes utilisées en chromatographie.

Pompées en continu, les solutions à 0.200 g/l des acides aminés suivants: glycine, alanine, valine, leucine, acide aspartique, acide glutamique, asparagine, glutamine, arginine, histidine, lysine, méthionine, proline, phénylalanine, tyrosine et tryptophane ont entraîné un déplacement de la ligne de base d'une valeur correspondant à une absorbance de 0.005. Leur réponse est donc environ 50 fois plus faible que celle de l'albumine.

La cystéine, la sérine et la thréonine éluent des quantités de cuivre plus importantes. Pour ces trois acides aminés, l'absorbance de solutions à 0.200 g/l est voisine de 0.100, soit au moins vingt fois supérieure à celle des autres acides aminés.

Pour tester l'influence des composés qui peuvent entrer dans la préparation de solutions éluantes, nous avons préparé des solutions 0.1 M de ces composés que nous avons pompées en continu à la place de l'effluent. L'augmentation de la ligne de base par rapport à l'eau distillée indique les substances susceptibles d'éluer le cuivre sans empêcher la formation du complexe cuivre-cuprizone. Pour rechercher les composés susceptibles d'inhiber la formation du complexe cuivre-cuprizone, nous avons préparé des solutions d'albumine à 0.200 g/l dans les différentes solutions précédentes et noté les modifications d'absorbance par rapport à une solution d'albumine dans l'eau.

Les ions chlorure, phosphate, acétate, borate et l'urée ne modifient pas la ligne de base et sont sans influence sur l'absorbance de la solution d'albumine.

Les ions ammonium, citrate et le barbital entraînent une augmentation légère de la ligne de base qu'il est possible de compenser, et une augmentation équivalente de l'absorbance de la solution d'albumine,

Le tris(hydroxyméthyl)aminométhane, la glycine, l'éthylènediamine éluent le cuivre en quantité importante.

L'EDTA empêche la formation du complexe cuivre-cuprizone.

### *Applications*

Cette méthode de détection des protéines et des peptides est utilisée au laboratoire pour suivre la séparation des immunoglobulines G du liquide céphalorachidien (LCR) et des peptides des urines.

La chromatographie des protéines du LCR est faite sur une colonne de 0.9 × 30 cm de DEAE-Sephadex CL6B équilibrée dans un tampon phosphate 0.01 M, pH 6.5.

La Fig. 6 montre l'enregistrement d'une telle séparation avec détection en UV à 280 nm à l'aide d'un appareil Uvicord I (LKB) et par la méthode proposée. Les immunoglobulines G qui apparaissent dans le premier pic sont éluées par un tampon phosphate 0.01 M, pH 6.5.

Un millilitre d'un LCR, à 1.2 g/l de protéine a été déposé au sommet de la colonne. L'élution a été faite à la vitesse de 0.3 ml/min. Un tiers de l'effluent sert à la détection, la somme des protéines mises en évidence représente 400 µg.

On constate une bonne superposition des deux modes de détection qui indique l'absence d'un remélange du fait du détecteur cuivre-Sephadex des composés séparés. De plus, on peut se rendre compte de la sensibilité de la méthode proposée par rapport à une méthode très classique de détection des protéines.

La chromatographie des urines sur Sephadex G-25 est faite dans le but d'isoler les peptides des protéines et des composés de faible poids moléculaires à partir des urines de malades souffrant d'insuffisance rénale. La séparation est réalisée sur une colonne de Sephadex G-25 fine de 0.9 × 60 cm. Les urines préalablement lyophilisées sont reprises par de l'eau distillée.

Une quantité correspondante à 5 ml d'urines fraîches est déposée au sommet de la colonne. L'élution est réalisée à l'aide d'un tampon acétate d'ammonium 0.02 M, pH 7.4 à la vitesse de 0.3 ml/min.



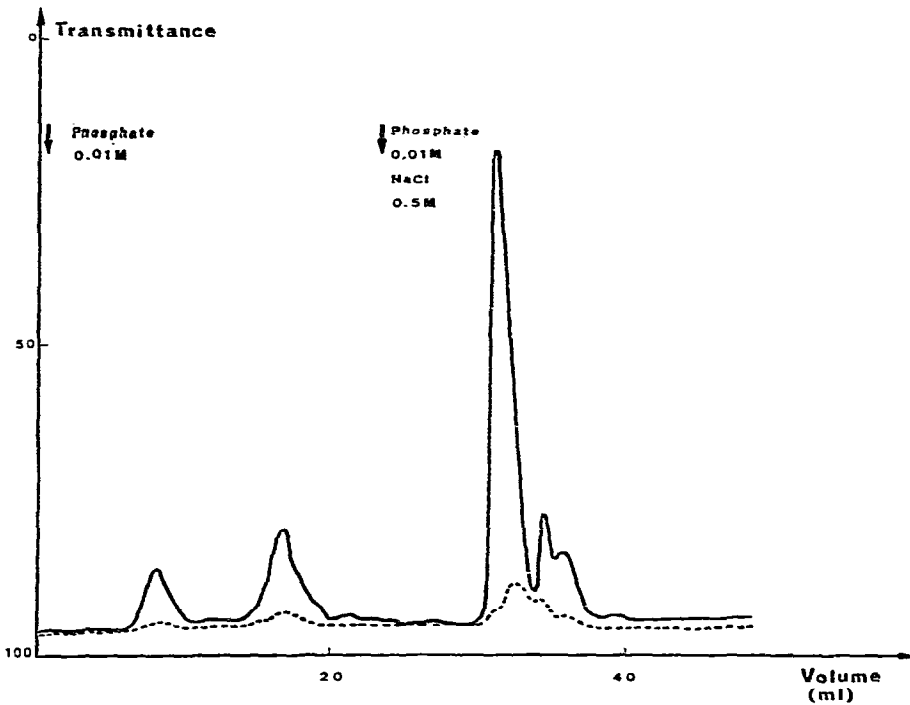


Fig. 6. Chromatogramme de 1 ml de LCR à 1,200 g/l sur DEAE-Sepharose CL6B avec détection UV à 280 nm (---) et détection proposée (—). Un tiers de la quantité totale de protéines, soit 400 µg, traverse les détecteurs.

Un tiers de l'effluent est dirigé vers le système de détection, les deux autres vers le collecteur de fractions.

L'effluent fait également l'objet d'une double détection. Le tracé de la Fig. 7 correspondant à la méthode proposée montre 3 pics principaux. Le premier correspond aux composés exclus du gel. Nous avons pu y mettre en évidence des protéines par immunoélectrophorèse. Le second contient des composés qui, après hydrolyse acide, donne des acides aminés. Dans le troisième, on constate la présence des acides aminés urinaires qui doivent vraisemblablement contribuer de manière non négligeable à la transmittance constatée.

La détection UV à 280 nm montre seulement deux pics. Des composés de nature non peptidique absorbant à 280 nm contribuent pour une large part à l'importance du deuxième pic. La spécificité obtenue avec le réacteur cuivre-Sephadex s'est ainsi révélée particulièrement intéressante pour isoler les peptides urinaires.

Nous avons enfin réalisé la chromatographie d'un mélange synthétique de peptides sur Sephadex G-25 fine. La séparation utilise une colonne de  $0.9 \times 100$  cm, l'élution est réalisée à l'aide d'acétate d'ammonium 0.02 M, pH 7.4 à la vitesse de 0.3 ml/min. Le mélange analysé est composé d'alanyl-glycyl-glycine, d'angiotensine II et de lysozyme. La Fig. 8 montre le résultat de la séparation. L'ordre de sortie est le suivant: lysozyme, alanyl-glycyl-glycine et angiotensine II. Ce dernier peptide est retenu sur le gel de Sephadex dans les conditions de l'expérience. La différence con-

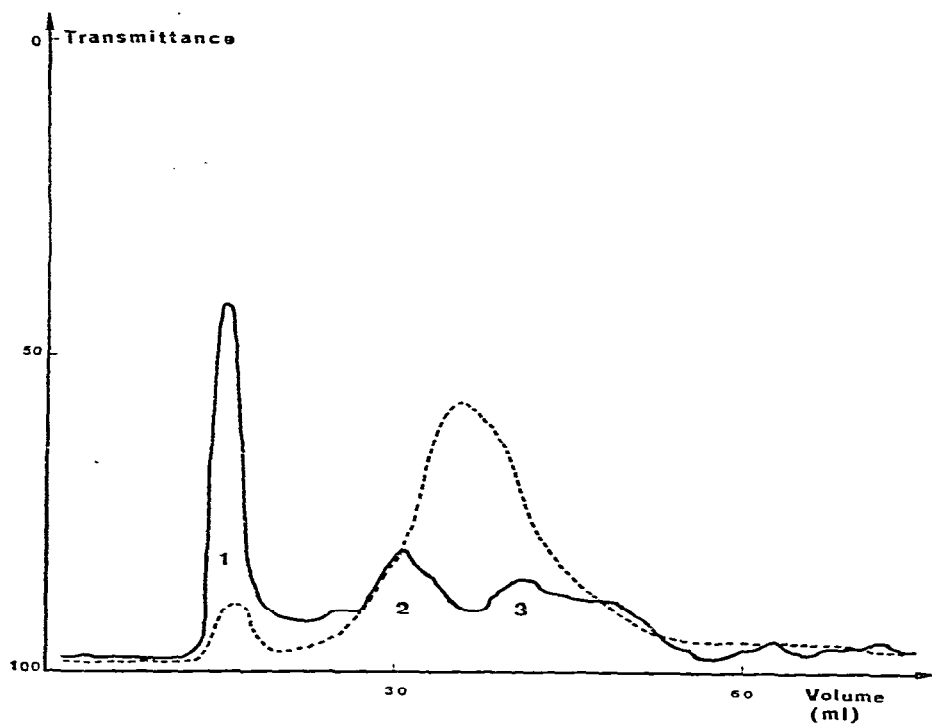


Fig. 7. Chromatogramme des urines sur Sephadex G-25 avec détection UV à 280 nm (---) et détection proposée (—).

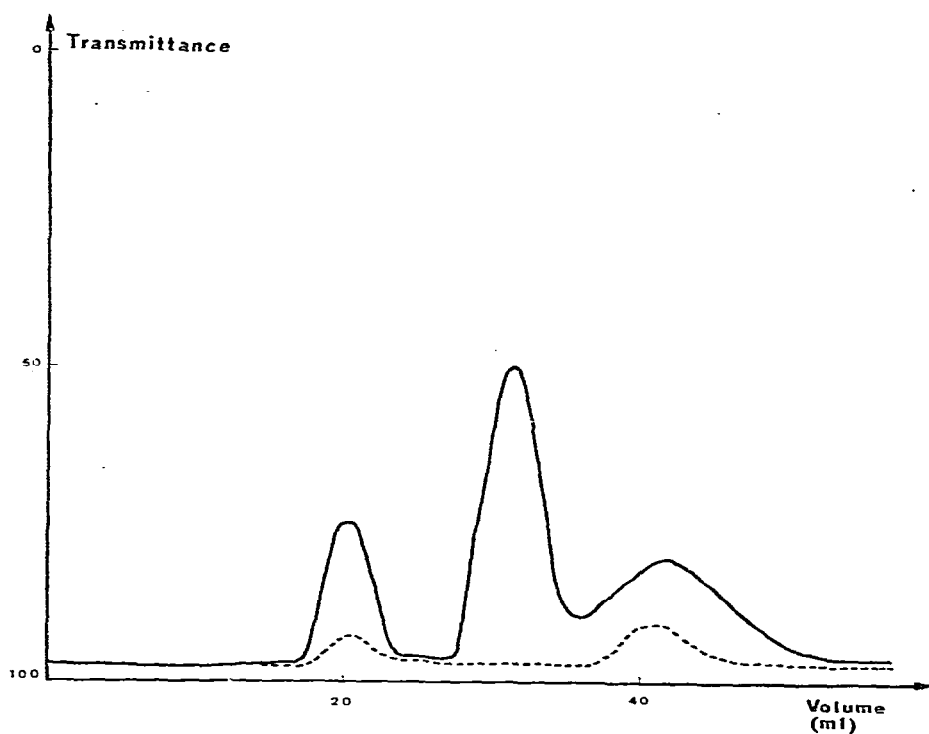


Fig. 8. Chromatogramme d'un mélange synthétique de peptides sur Sephadex G-25 avec détection UV à 280 nm (---) et détection proposée (—).

statée entre le tracé de détection UV à 280 nm et celui du détecteur proposé montre l'intérêt de la méthode pour des composés tel que l'alanyl-glycylglycine qui ne possèdent pas d'acides aminés aromatiques susceptibles d'absorber à 280 nm.

### CONCLUSION

La méthode proposée permet une détection en continu des peptides et des protéines dans les éluats chromatographiques. Elle est simple à mettre en oeuvre et ne nécessite que des réactifs chimiques courants. Elle est sensible et reproductible. Elle détecte tous les composés de nature peptidique tout en présentant la spécificité de la réaction du biuret.

### REMERCIEMENT

Nous remercions Mademoiselle J. Salandre pour sa collaboration technique.

### RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent une méthode de détection basée à la fois sur le déplacement du cuivre lié à un gel de Sephadex par les peptides et les protéines et sur la détermination colorimétrique du cuivre des complexes formés.

Le système est entièrement automatique et permet une détection en continu en sortie de colonne chromatographique. L'utilisation de la cuprizone comme réactif du cuivre rend possible la mise en évidence de quantité d'albumine de l'ordre de 200 ng et d'alanyl-glycylglycine de 60 ng.

La méthode possède la spécificité de la réaction du biuret. Des exemples d'application sont donnés.

### BIBLIOGRAPHIE

- 1 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 2 G. N. Catravas, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1146.
- 3 P. Böhlen, S. Stein, W. Dairman et S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.*, 155 (1973) 213.
- 4 M. Roth, *Anal. Chem.*, 43 (1971) 880.
- 5 L. Klungsoyr, *Anal. Biochem.*, 27 (1969) 91.
- 6 H. A. Stiff, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 179.
- 7 H. Nielsen, *Acta Chem. Scand.*, 12 (1958) 38.
- 8 M. Kekki et P. Siltanen, *Scandinav. J. Clin. Lab. Invest.*, 12 (1960) 235.
- 9 R. Gräsbeck et R. Karlsson, *Acta Chem. Scand.*, 17 (1963) 1.
- 10 A. G. Gornall, C. J. Bardawill et M. M. David, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751.
- 11 J. S. Baumstark, R. J. Laffin et W. A. Bardawill, *Arch. Biochem. Biophys.*, 108 (1964) 514.
- 12 R. E. Peterson et M. E. Bollier, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1195.
- 13 A. Badinand et J. J. Vallon, *Chim. Anal.*, 48 (1966) 396.
- 14 J. W. Mehl, E. Posovska et R. J. Winzler, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 13.
- 15 R. D. Strickland, M. L. Freeman et F. T. Gurule, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 545.