

126. Méthode de dosage des uréido-acides. Dosage dans l'urine du chat après injection de la *d,l*-phénylalanine

par F. Leuthardt et R. Brunner.

(10 IV 47)

Différents auteurs ont isolé, après administration d'acides aminés, les uréido-acides correspondants dans l'urine concentrée des animaux. Or, il semble qu'il s'agisse, dans la plupart des cas, de produits artificiels, car les uréido-acides se forment facilement si l'on chauffe en solution aqueuse les acides aminés en présence d'urée (*Baumann et Hoppe-Seyler*¹), *Lippich*²), *Dakin*³), *Weiland*⁴)).

Seule une observation de *Dakin*⁵) permet de supposer que le dérivé de l'urée se trouvait déjà dans l'urine native. Après injection intraveineuse de grandes quantités de *d,l*-phénylalanine chez le chat, cet auteur observa une substance cristallisant spontanément et dont le point de fusion et la teneur en azote correspondent à la N-carbaminyloxyphénylalanine inactive, $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH(NHCONH_2) \cdot COOH$. Le seul uréido-acide dont on sait avec certitude qu'il peut être synthétisé par l'organisme, à partir de l'acide aminé correspondant, est la citrulline, que l'on trouve comme produit intermédiaire de la synthèse de l'urée dans le foie (*Krebs et Henseleit*⁶). La preuve de la formation de cette substance fut d'abord indirecte: On admit que la citrulline se formait comme produit intermédiaire, parce qu'elle accélère de façon semblable à l'ornithine la formation de l'urée dans les coupes de foie en survie. Récemment, *Gornall et Hunter*⁷) ont mis directement en évidence l'accumulation de la citrulline à l'aide d'une méthode colorimétrique suffisamment spécifique (réaction à la diacétyl-monoxime d'après *Fearon*⁸). Il serait très important, en vue de la synthèse de l'urée, de pouvoir étudier par un exemple indépendant la formation d'un composé renfermant le groupement carbamidique, qui serait semblable à celle de la citrulline. Le dosage des uréido-acides s'effectue par extraction de la solution acide avec de l'éther ou de l'acétate d'éthyle. La substance extraite est ensuite cristallisée et pesée (*Dakin*⁵), *Weiland*⁴), *Embden et Schmitz*⁹)). Il est évident que cette méthode en-

¹) *E. Baumann et F. Hoppe-Seyler*, B. **7**, 34 (1874).

²) *F. Lippich*, B. **39**, 2953, 2974 (1906).

³) *H. D. Dakin*, J. Biol. Chem. **8**, 25 (1910/11).

⁴) *W. Weiland*, Bioch. Z. **38**, 385 (1912).

⁵) *H. D. Dakin*, J. Biol. Chem. **6**, 235 (1909).

⁶) *H. A. Krebs et K. Henseleit*, Z. physiol. Ch. **210**, 33 (1932).

⁷) *A. G. Gornall et A. Hunter*, J. Biol. Chem. **147**, 593 (1943).

⁸) *W. R. Fearon*, Biochem. J. **33**, 902 (1939).

⁹) *G. Embden et E. Schmitz*, Bioch. Z. **38**, 393 (1912).

traîne des pertes considérables et que de faibles quantités ne se laissent pas déceler du tout, à cause des difficultés de faire cristalliser la substance dans les extraits d'urine. Si l'on veut poursuivre l'étude du problème de la formation physiologique des uréido-acides, des méthodes de dosage sensibles sont indispensables.

Après diverses expériences, nous sommes arrivés à un procédé qui permet de déterminer des acides urédés jusqu'à la quantité de 15—20 mgr., avec un rendement de 50—80 %. La méthode est basée sur les deux observations suivantes :

1° Les dérivés carbaminylés des mono- et di-carboxy-acides sont retenus quantitativement par la colonne d' Al_2O_3 acide (anionotrope) de *Wieland*¹); ils peuvent être élués par $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

2° Par oxydation à chaud avec du permanganate (ou H_2O_2) en solution acide, ces substances donnent lieu à la formation d'urée, avec un bon rendement.

Nous ne sommes pas parvenus à obtenir les quantités théoriques d'urée, mais il est possible que la méthode puisse encore être perfectionnée.

L'hydrolyse de l'urée en fonction du p_H a été étudiée récemment par *Warner*²). Les constantes d'hydrolyse évaluées par cet auteur permettent de conclure que les pertes par hydrolyse ne dépassent pas 10 % de l'urée totale dans les conditions de nos expériences. Pendant l'oxydation, qui correspond à celle des amino-acides (*Dakin*³), *Lang*⁴), il y a formation d'aldéhydes (et probablement d'acides carboxyliques), qui n'ont pas été examinés de près.

Pour les dosages dans l'urine, nous avons d'abord extrait les uréido-acides avec de l'éther. Cette extraction permet d'éliminer l'acide urique, qui est absorbé partiellement par la colonne acide d'oxyde d'aluminium.

La méthode est suffisamment spécifique pour les recherches que nous nous sommes proposé de faire. L'acide urique, qui donne de l'urée par oxydation par le permanganate de potassium, n'est pas extrait par l'éther et de plus, il ne serait que faiblement retenu par la colonne acide d' Al_2O_3 . On ne trouve dans l'extrait étheré que de petites quantités d'urée, mais cette substance n'est pas retenue par la colonne. Parmi les corps, extraits par l'éther, l'acide hippurique et ses homologues sont absorbés. L'acide hippurique, par oxydation avec le permanganate de potassium en solution acide, donne de faibles quantités d'urée. Mais l'urine des carnivores ne contient que très peu d'acide hippurique. Par conséquent, ce dernier n'entre pas en ligne de compte comme source d'erreur dans nos dosages portant sur l'urine

¹) *Th. Wieland*, Z. physiol. Ch. **273**, 24 (1942).

²) *R. C. Warner*, J. Biol. Chem. **142**, 705 (1942).

³) *H. D. Dakin*, J. Biol. Chem. **1**, 171, 271 (1906); **4**, 63 (1908); **5**, 409 (1909).

⁴) *K. Lang*, Z. physiol. Ch. **241**, 68 (1936).

du chat. Les analyses résumées dans le Tableau 1 montrent que l'urine de l'homme, du rat et du cobaye ne contient que des traces de substances fournissant de l'urée avec notre méthode.

Pour essayer la nouvelle méthode de dosage, nous avons répété l'expérience de *Dakin*¹⁾, en administrant toutefois des quantités de β -phénylalanine plus faibles (environ la moitié). Nous n'avons pas pu constater la présence d'acide uréido-phényl-propionique dans l'urine de chat.

Partie expérimentale.

Les expériences suivantes ont toutes été faites avec l'acide *d,l*- α -uréido- β -phénylpropionique.

1. *Adsorption des uréido-acides* par la colonne acide d'oxyde d'aluminium.

Méthode indiquée par *Wieland*²⁾. Diamètre du tube d'adsorption: 8 mm., vitesse de filtration 4–5 gouttes par minute.

5 cm³ d'une solution, contenant 5,05 mgr. d'acide *d,l*- α -uréido- β -phénylpropionique (correspondant à 0,675 mgr. de N), dissous par alcalinisation avec Na₂CO₃ et neutralisés par HCl, sont filtrés à travers la colonne, qui est ensuite lavée avec 40 cm³ d'eau. Le filtrat + l'eau de lavage sont portés à 50 cm³. L'acide adsorbé est ensuite élué par 40 cm³ de Ba(OH)₂, et le filtrat porté à 50 cm³. Dosage de N d'après *Kjeldahl*. Catalyseur: SeO₂.

La solution primitive contient	0,67 mgr. N/5 cm ³
Le filtrat + eaux de lavage	0,00 mgr. N/5 cm ³
Substance éluee	0,67 mgr. N/5 cm ³

Donc l'uréido-acide est complètement retenu par la colonne acide d'Al₂O₃ et peut être élué en milieu alcalin.

L'expérience est répétée en présence de NaCl (54,4 mgr. d'acide uréido-phénylpropionique dans 50 cm³ de NaCl à 1%).

La solution primitive contient	0,73 mgr. N/5 cm ³
Le filtrat + eaux de lavage	0,00 mgr. N/5 cm ³
La substance éluee	0,69 mgr. N/5 cm ³

2. Oxydation de l'uréido-acide.

19,2 mgr. de carbaminyl-phénylalanine sont dissous dans 20 cm³ d'eau, alcalinisée par 2 gouttes de Ba(OH)₂ saturé. Ensuite, nous acidulons avec H₂SO₄ dil. (rouge congo) et oxydons à chaud avec 1,66 cm³ de KMnO₄. Une odeur agréable, caractéristique, se fait sentir. Le MnO₂ formé est filtré et lavé avec de l'eau chaude. L'excès de l'oxydant dans le filtrat et dans les eaux de lavage est détruit avec de l'acide oxalique à chaud. L'acide minéral est neutralisé par addition d'acétate de sodium, jusqu'à disparition du virage du rouge congo. Le volume est ensuite porté à 25 cm³, dont 10 cm³ sont utilisés pour la précipitation de l'urée formée. On ajoute 10 cm³ d'acide acétique glacial + 5 cm³ de solution de xanthidrol à 10% dans du méthanol. La solution reste dans la glacière pendant la nuit. Elle est alors filtrée sur un filtre Iéna 1G3. Le précipité est lavé avec du méthanol saturé de dixanthylurée et avec 5 cm³ d'eau distillée, puis séché 1 heure à 110° et refroidi dans le dessiccateur évacué. Les 13,4 mgr. de précipité obtenus correspondent à 1,92 mgr. d'urée.

Quantité théorique d'urée: 2,22 mgr. Un dosage d'après la méthode de *Krebs* et *Henseleit*³⁾ (uréease) a donné le résultat de 1,83 mgr./10 cm³ de solution.

3. Adsorption de l'acide urique.

1 cm³ d'une solution de 100,9 mgr. d'acide urique/100 cm³ (dissous par alcalinisation et neutralisation avec HCl 0,1 n.) a été adsorbé par la colonne d'Al₂O₃. Colonne lavée

¹⁾ *H. D. Dakin*, J. Biol. Chem. **6**, 235 (1909).

²⁾ *Th. Wieland*, Z. physiol. Ch. **273**, 24 (1942).

³⁾ *H. A. Krebs* et *K. Henseleit*, Z. physiol. Ch. **210**, 33 (1932).

avec 40 cm³ d'eau et éluee avec 40 cm³ de Ba(OH)₂. Ba⁺⁺ précipité comme carbonate, etc., N dosé par la méthode de *Kjeldahl*. Résultat: 11,2 mgr.N/100 cm³ = 33,6 mgr. d'acide urique.

4. Méthode de dosage des uréido-acides.

L'urine est extraite à l'éther, après avoir été fortement acidifiée avec H₂SO₄ 1:1. L'extrait débarrassé de l'éther, qui a une réaction faiblement acide, est alcalinisé par quelques gouttes d'ammoniaque, dont l'excès est chassé par ébullition (volume env. 5 cm³; la quantité de l'uréido-acide ne doit pas dépasser 25 mgr.). Ensuite on filtre à travers une colonne d'oxyde d'aluminium «acide», d'après *Wieland*¹⁾ (10 gr. Al₂O₃ standardisé selon *Brockmann*, diamètre du tube 10 mm.). Elle est lavée avec 50 cm³ d'eau et ensuite traitée par une solution froide, saturée de Ba(OH)₂ qui élue les acides adsorbés. Dans la solution ainsi obtenue, les ions de barium sont précipités sous forme de carbonate, par un courant de CO₂. La solution est ensuite portée à l'ébullition et filtrée à travers un filtre de verre Iéna 1G3. Le précipité est repris dans quelques cm³ d'eau, la suspension portée à l'ébullition et filtrée. Les deux filtrats réunis sont acidifiés jusqu'à ce que le papier congo vire faiblement au bleu. A cette solution est ajouté goutte à goutte du KMnO₄ saturé à froid, jusqu'à coloration violette, persistante à l'ébullition. En même temps, la solution est réduite à un petit volume, qui est mesuré et additionnée de 1-2 volumes d'acide acétique glacial et d'un demi volume d'une solution de xanthidrol à 10%. Après quelques minutes, il se forme un précipité blanc que l'on laisse se déposer pendant la nuit dans la glacière. La dixanthylurée est filtrée et lavée tout d'abord avec 5 cm³ de méthanol saturé en dixanthylurée, puis lavée encore une fois avec 5 cm³ d'eau. Finalement le précipité est séché pendant 1 heure à 110°, refroidi dans le dessiccateur et pesé.

5. Sensibilité de la méthode:

5,4 mgr. de substance étaient dissous dans 30 cm³ d'urine de chat, durée d'extraction: 8 heures.

précipité	13,5 mgr.	13,0 mgr. (urine seule)
= urée	1,93 mgr.	1,86 mgr.
	= 0,64 mgr./10 cm ³	0,62 mgr./10 cm ³ d'urine

Il n'est donc pas possible de déceler avec certitude 5 mgr. de l'uréido-acide dans 30 cm³ d'urine.

Le fait que nous trouvons ici des valeurs tellement élevées pour l'urine non additionnée de substance, alors qu'antérieurement la quantité était négligeable (voir tableau 1) peut être dû au changement de nourriture (avant les premières expériences, pommes de terre; après, viande crue).

Tableau 1.

Urine de	cm ³	Subst. diss. mgr.	Durée d'extr. heures	Dixanthylurée mgr.	Urée	
					dosée mgr.	calculée mgr.
homme	10	0	13	0	0	0
homme	10	18,6	13	28,2	4,03	5,36
cobaye	10	0	12	0,2	0,03	0
cobaye	10	20,4	12	30,2	4,3	5,88
rat	10	0	12	0,5	0,07	0
rat	10	18,6	12	26,6	3,73	5,36
chat	10	0	9	1,2	0,17	0
chat	10	18,8	9	27,6	3,94	5,45

¹⁾ *Th. Wieland*, Z. physiol. Ch. **273**, 24 (1942).

6. *Application de la méthode à l'urine.*

Pour vérifier la méthode, nous avons dissous de l'acide α -uréido- β -phénylpropionique dans l'urine, à l'aide de 3-4 gouttes d' NH_4OH . Après dissolution complète, nous avons acidifié fortement avec H_2SO_4 1:1, extrait à l'éther etc. Résultat voir tableau I.

7. *Expériences sur le chat ayant reçu de la phénylalanine par voie intraveineuse:**Expérience 1:*

Poids de l'animal: 3,7 kg. Infusion dans la veine jugulaire droite. Durée $\frac{1}{2}$ heure. Volume de la solution saline: 200 cm^3 , contenant 3,75 gr. de *d,l*- β -phénylalanine.

La solubilité de la *d,l*- β -phénylalanine étant de 1,58 gr. dans 100 cm^3 de solution saline à 37,5°, des solutions aussi concentrées que celles citées par *Dakin* n'ont pas pu être préparées.

Comme narcotique, nous avons utilisé l'éther. L'urine a été recueillie pendant les 24 heures qui suivirent l'infusion. Aucune cristallisation n'a été observée. Durée de l'extraction resp. 6 et 9 heures. Il passe beaucoup de substance muqueuse dans l'éther. Il est nécessaire de filtrer l'extrait alcalinisé, avant l'adsorption. Nous obtenons 2,2 mgr. de précipité, correspondant à 0,3 mgr. d'urée. Le résidu de l'extraction est neutralisé et concentré au bain-marie. Aucune cristallisation ne peut être observée. Le résultat d'une titration au formol est donné plus loin.

Expérience 2:

Infusion dans l'autre veine jugulaire. Durée: 20 minutes. Volume de la solution: 170 cm^3 (NaCl à 0,9%), contenant 3,2 gr. de *l*- β -phénylalanine. Narcose avec de l'éther. Urine recueillie pendant les 30 heures qui suivirent l'infusion. Volume 420 cm^3 , réaction alcaline. Durée de l'extraction: 6 heures. Il passe beaucoup de substance muqueuse avec l'éther. Traitement de l'extrait comme dans la première expérience.

Précipité obtenu: 12,3 mgr. correspondant à 1,7 mgr. d'urée. Traitement de l'urine extraite comme dans la première expérience. Aucune formation de cristaux n'est observée. Une titration au formol a donné le résultat que voici:

100 cm^3 d'urine normale,	titrée avec 41,6 cm^3 NaOH 0,2-n = 116,5 mgr. N
100 cm^3 d'urine de la 1re Exp. titrée avec 49,3 cm^3 NaOH 0,2-n = 137 mgr. N	
100 cm^3 d'urine de la 2e Exp. titrée avec 40,1 cm^3 NaOH 0,2-n = 112 mgr. N	

Nous remercions vivement M. le Dr. *P. Andereggen*, qui a bien voulu nous prêter son assistance pendant les expériences sur le chat.

Nous remercions également M. le Dr. *H. J. Fahrländer* pour l'exécution d'un dosage d'urée.

Institut de Chimie physiologique de l'Université de Genève.