

CHROM. 4629

## Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour la détermination quantitative de l'acide oxalique

De nombreuses et récentes méthodes ont été décrites pour le dosage de l'acide oxalique dans les urines par des techniques plus ou moins complexes: colorimétrique, polarographique, isotopique, enzymatique et fluorimétrique<sup>1-5</sup>. Nous avons pensé que la chromatographie en phase gazeuse pourrait être un moyen rapide et quantitatif pour doser cet acide dans les urines. En chromatographie gazeuse des études ont été faites pour l'analyse des acides du cycle de Krebs<sup>6-11</sup> mais aucun travail n'a encore été réalisé sur l'acide oxalique dans les milieux biologiques. Les auteurs se sont heurtés aux problèmes de sa volatilité et de sa méthylation. Reprenant les travaux de ZAREMBSKI ET HODGKINSON<sup>6</sup> sur l'extraction de l'acide oxalique par le tributylphosphate nous avons pu mettre au point une méthode rapide de dosage de cet acide.

### Matériel et méthode

**Réactifs.** Les réactifs suivants étaient utilisés: tri-*n*-butylphosphate (Merck) distillé sous vide; méthanol (Merck); diazométhane (préparation suivant la méthode d'ARNDT<sup>12</sup>); acide oxalique cristallisé (R. P. Prolabo); [<sup>14</sup>C]acide oxalique fabriqué par le C.E.A., d'activité spécifique 20 mCi/mmôle.

**Appareils.** Les appareils sont les suivants: Lyophilisateur Serail. L'appareil de chromatographie gazeuse est un F & M (Modèle 402) équipé de deux colonnes en verre de 1.20 m de long et de diamètre intérieur de 3.4 mm et de deux détecteurs à ionisation de flamme. Les phases stationnaires sont constituées par du Chromosorb 102 (Hewlett-Packard), Porapak Q (Girdel) et Polypark 2 (Hewlett-Packard). Le gaz porteur est l'azote U avec un débit de 40 ml/min. La température de la colonne est de 190° maximum. La température du détecteur est de 230° et celle du point d'injection est de 250°.

**Mode opératoire.** À 10 ml d'urine acidifiée par HCl concentré (2 ml/100 ml d'urine) on ajoute environ 10000 c.p.m. de [<sup>14</sup>C]acide oxalique. L'échantillon est ensuite lyophilisé pendant une nuit. Le lyophilisat est repris par 2 ml d'eau.

**Extraction.** L'urine concentrée est extraite par 0.4 ml de tributylphosphate pendant 5 min par agitation manuelle dans des tubes à hémolyse. On centrifuge 10 min, on prélève ensuite le tributylphosphate et on le recueille sur sulfate de sodium anhydre dans des petits tubes rodés.

**Méthylation.** Sur l'extrait tributylphosphate on ajoute 0.1 ml de méthanol qui favorise la méthylation et 0.4 ml de diazométhane en solution étherée. On laisse en contact 30 min à la température de la pièce. On évapore le méthanol et l'éther. On mesure dans une pipette de précision le volume restant. On prélève une partie aliquote pour le comptage de la radioactivité qui permettra de calculer le pourcentage de récupération.

**Injection de l'extrait sur chromatographie gazeuse.** On injecte 1 à 2  $\mu$ l de l'extrait tributylphosphate. On méthyle de la même façon l'acide oxalique de référence. On mesure la hauteur du pic pour calculer la quantité présente dans l'urine.

### Résultats

L'étude du méthyloxyalate sur différentes phases stationnaires nous a montré que les meilleures sont le Porapak Q et le Chromosorb 102. Ces phases ont un grand intérêt car elles s'utilisent sans préparation. Le conditionnement se fait en une nuit à 210°. On peut utiliser les phases stationnaires comme le DEGS à 15 % sur Gas-Chrom Q. La température de la colonne doit être de 115° ainsi que sur Apiezon L à 20 %.

*Courbe d'étalonnage du méthyloxyalate.* La linéarité du méthyloxyalate en chromatographie gazeuse est parfaite entre 0.05 et 2 µg.

*Récupération.* Après extraction au tributylphosphate la récupération est de l'ordre de 60 à 80 %.

*Fidélité.* Une même urine analysée quatre fois donne une moyenne de 11.56 mg par 24 h avec une erreur de  $\pm 1.4$  mg.

*Spécificité.* On étudie une même urine sur deux phases différentes, Porapak Q et Chromosorb 102. Les résultats donnés sur les deux colonnes concordent. La quantité d'acide oxalique trouvée chez seize hommes et femmes est en moyenne de 16 mg par 24 h; les écarts se situent entre 9 et 25 mg. Chez dix lithiasiques nous avons trouvé une moyenne de 44 mg par 24 h; les écarts se situent entre 23 et 116 mg.

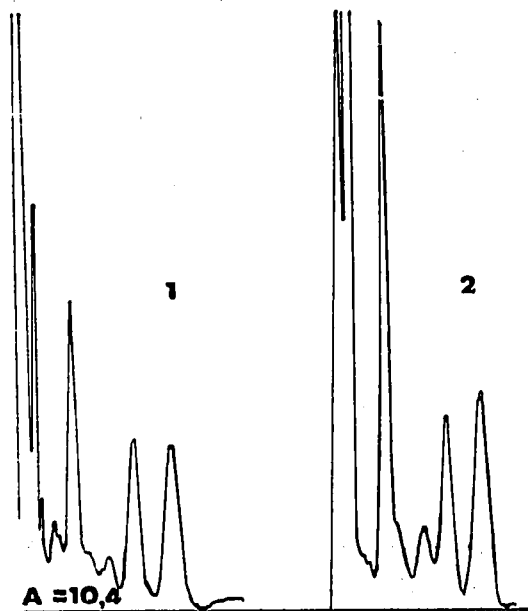


Fig. 1. Dosage de méthyloxyalate dans l'urine par la chromatographie en phase gazeuse. 1 = Méthyloxyalate de référence; injection de 1 µl de méthyloxyalate dans le tributylphosphate correspondant à 0.5 µg. 2 = Méthyloxyalate dans 10 ml d'urine; injection de 2 µl de l'extrait tributylphosphate urinaire. Colonne: Chromosorb 102, temp. 190°.

### Discussion

La difficulté d'analyse de l'acide oxalique dans les urines réside premièrement dans son mode d'extraction. Le tributylphosphate est le meilleur solvant en pH fortement acide. Nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats en présence d'acide formique comme mentionné par ZAREMSKI ET HODGKINSON<sup>5</sup>. Ce solvant présente l'inconvénient d'être très peu volatil. Nous avons été amenés à réduire le volume

urinaire afin d'extraire par une faible quantité de solvant, permettant d'injecter directement, après méthylation, le tributylphosphate. La méthylation est complète et rapide dans ce solvant. La deuxième difficulté est la très grande volatilité du méthyloxyalate formé. Il faut évaporer avec beaucoup de précaution l'éther et le méthanol.

Le tributylphosphate ne gêne pas l'analyse chromatographique malgré sa faible volatilité, mais il est recommandé d'injecter des volumes de l'ordre de 1 à 2  $\mu$ l seulement. Au-delà il y a une saturation de la colonne, ce solvant ne sortant que vers 240°.

Malgré ces quelques inconvénients, cette méthode par chromatographie gazeuse permet une analyse quantitative rapide de plusieurs échantillons urinaires. Aucune purification urinaire n'a été nécessaire. Le profil chromatographique d'une solution témoin et urinaire est comparable. Aucun produit urinaire n'interfère sur ces colonnes qui analysent les petites molécules (voir Fig. 1).

Laboratoire de Biochimie Médicale,  
Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière,  
91, Bd. de l'Hôpital, Paris 13e (France)

G. CHARRANSOL  
P. DESGREZ

- 1 J. L. PERNET ET A. PERNET, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 23 (1965) 1189.
- 2 C. VITTU ET J. CL. LEMAHIEU, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 23 (1965) 913.
- 3 T. D. R. HOCKADAY, J. E. CLAYTON, E. W. FREDERICK ET L. H. SMITH, *Medicine*, 43 (1964) 315.
- 4 J. C. CRAWHALL ET R. W. E. WATTS, *Clin. Sci.*, 20 (1961) 357.
- 5 P. M. ZAREMBSKI ET A. HODGKINSON, *Biochem. J.*, 96 (1965) 717.
- 6 J. J. BAILEY, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1485.
- 7 F. L. ESTES ET R. C. BACHMANN, *Anal. Chem.*, 38 (1966) 1178.
- 8 N. E. HOFFMAN ET T. A. KILLINGER, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 162.
- 9 M. G. HORNING, E. A. BOUCHER, A. M. MOSS ET E. C. HORNING, *Anal. Letters*, 1 (1968) 713.
- 10 T. S. RUMSEY ET C. H. NOLLER, *J. Chromatog.*, 24 (1966) 325.
- 11 P. G. SIMMONDS, B. C. PETTIT ET A. ZLATKIS, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 163.
- 12 F. ARNDT, *Org. Syntheses, Collective Vol.*, 2 (1943) 165.

Reçu le 9 décembre 1969

*J. Chromatog.*, 48 (1970) 530-532

CHROM. 4656

### Nitration of aromatic compounds during development of silver nitrate-impregnated silicic acid columns with carbon tetrachloride

Chromatography on silver nitrate-impregnated silicic acid has proved to be a valuable device for olefin separations<sup>1,2</sup>. Relatively few cases of destructive chemical reactions of silver nitrate/silicic acid with the sample are known. One instance of olefin epoxidation has been reported<sup>3</sup>. Alkyl bromides react<sup>4</sup>. Olefins have been destroyed deliberately by silver nitrate/silicic acid at 300° in gas chromatography<sup>5</sup>. WENKERT *et al.*<sup>6</sup> have recently communicated results on nitration of phenols in ca. 10% yield by silver nitrate/silicic acid in benzene at 25-80°.

We wish to warn chromatographers of another, more serious nitration reaction occurring on silver nitrate/silicic acid in the presence of carbon tetrachloride. This results from rapid chemical reaction of carbon tetrachloride with silver nitrate to

*J. Chromatog.*, 48 (1970) 532-534