

Journal of Chromatography, 228 (1982) 67-74

Biomedical Applications

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 1118

ÉTUDE DE L'EXTRACTION DES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES ÉTAPÉ PRÉALABLE À LEUR SÉPARATION EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

C. BOUJET*, C. DROUET, G. DECOUX et A. FAVIER

*Laboratoire de Biochimie des Maladies Métaboliques, Centre Hospitalier et Universitaire de
Grenoble, 38 043 Grenoble Cedex (France)*

(Reçu le 19 juin 1981; manuscrit modifié reçu le 25 août 1981)

SUMMARY

*Study of the extraction of organic acids from urine. Preliminary step to their
gas chromatographic separation*

Ten organic acids are extracted from urine. Two extraction methods are used: anion exchange on DEAE-Sephadex columns, and organic solvent extraction with five different solvents: diethyl ether, ethyl acetate, isopropyl chloride, light petroleum, and tetrahydrofuran.

In order to quantify the extractions, the corresponding ¹⁴C-labeled acids are added to standard acid solutions and extraction rates are measured by a liquid scintillation counting system.

The results show that:

- (1) The efficiency of anion exchange is generally good for all tested acids.
 - (2) The extraction efficiency is not identical for the different solvents, one solvent being more efficient for a certain acid than another: tetrahydrofuran, which is generally a good solvent, is too hygroscopic to be usable. Isopropyl chloride and light petroleum are too specific with the most apolar molecules. Ethyl acetate and diethyl ether are similar and usable because of their acceptable solubilisation power as to the most polar molecules, their good solubilisation reproducibility and their readiness of use.
 - (3) The solvent extraction method is not as time-consuming as the anion-exchange method which generally requires lengthy elution and extraction.
-

INTRODUCTION

De très nombreuses erreurs innées des métabolismes des acides aminés se traduisent par une élimination exagérée d'acides organiques. L'étude du profil de séparation des acides organiques urinaires en chromatographie en phase ga-

zeuse (CPG) est donc devenue une analyse essentielle du dépistage des acidémies [1-6]. Cette analyse est particulièrement délicate, notamment l'étape d'extraction qui est primordiale. La technique idéale doit être simple, rapide, aussi quantitative que possible et s'appliquer à l'ensemble des divers acides organiques, de structures donc de polarités très différentes.

Deux types de méthodes ont été décrits: des méthodes par fixation des acides sur un échangeur d'ions suivie d'une élution [3, 6-8], et des méthodes par extraction par un solvant organique [3, 5, 6, 8].

Nous présentons une étude comparative, en utilisant des molécules marquées au carbone 14, de ces méthodes.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillage et matériel

Compteur de mesure de la radioactivité par scintillation liquide et à amplification logarithmique: Intertechnique Abac SL 40.

Collecteur de fractions: Umracor type 7000, LKB (Stockholm, Suède).

Colonnes chromatographiques (Société Verre Labo Mula, Corbas, France). Les colonnes utilisées (9 cm X 0.7 cm I.D.) sont surmontées d'un réservoir cylindrique (8 cm X 2 cm I.D.). L'extrémité inférieure de la colonne est en biseau et présente un rétrécissement de 0.2 cm supportant une petite bourre de laine de verre ainsi que l'échangeur d'ions.

Tubes à vis de 20 ml; leur échantéité est assurée par une pastille en PTFE.

Produits chimiques

Acides benzoïque, citrique, glutarique, glycérique (hémisels de calcium), glycolique, indolyl-3-acétique, isovalérique, oxalique, parahydroxybenzoïque, propionique (sel de sodium), et échangeur d'anions DEAE-Séphadex A-25-120 (taille des particules: 40-120 μ m; capacité d'échange: 3.5 + 0.5 mequiv./g) (Sigma).

Acides organiques (les mêmes que les précédents) marqués au carbone 14 sur la fonction carboxyle (chaque échantillon présente une activité de 50 μ Ci). L'acide isovalérique et l'acide propionique sont sous forme de sel de sodium. [C.E.A. (Commissariat à l'énergie atomique, département des molécules marquées)].

Chlorure de sodium, acide chlorhydrique concentré, tétrahydrofurane, acide acétique glacial, sulfate de sodium anhydre (Merck).

Acétate d'éthyle, éther éthylique, éther de pétrole, pyridine (Prolabo).

Chlorure d'isopropyle (Fluka).

Réactif scintillant, Aqua Luma[®], Lumac Systems AG Basel.

Tous les produits chimiques utilisés sont de pureté analytique. Le tétrahydrofurane a été redistillé.

Réactifs

Les solutions d'acétate de pyridinium 1.5 M et 0.5 M sont préparées et utilisées comme le préconisent Chalmers et Watts [7].

Acétate de pyridinium 0.5 M: cette solution est préparée chaque semaine par dilution de 40.3 ml de pyridine et de 28.6 ml d'acide acétique glacial dans de

l'eau désionisée (à 1 l). La conservation n'excède pas une semaine (à 4°C).

Acétate de pyridinium 1.5 M: cette solution est préparée chaque semaine par dilution de 119 ml de pyridine et de 90 ml d'acide acétique glacial dans de l'eau désionisée (à 1 l). La conservation n'excède pas une semaine (à 4°C).

Solutions d'acides organiques ^{14}C à 5 $\mu\text{Ci/ml}$: chacun des échantillons, conservé préalablement à -20°C , est mis extemporanément en solution dans 10 ml d'eau.

Les solutions "froides" d'acides organiques sont préparées à la concentration de 100 mg/l dans de l'eau désionisée. (L'acide isovalérique a été dissous par addition d'une quantité équivalente d'équivalent soude.)

Methodologie

Extraction par un échangeur d'anions [7]. Le DEAE-Séphadex préalablement gonflé en milieu aqueux pendant 24 h est placé dans une colonne sous une hauteur de 4.5 cm, puis lavé successivement par 3 ml d'eau désionisée et 20 ml d'acétate de pyridinium 0.5 M.

Cinq ml de solution "froide" de chaque acide, additionnée de 100 μl de solution d'acide organique ^{14}C sont déposées au sommet de la colonne. Celle-ci est ensuite lavée à l'aide de 5 ml d'eau désionisée et l'élution des acides organiques est réalisée par 30 ml d'acétate de pyridinium 1.5 M. Le débit est de 4 ml/h (0.07 ml/min), le recueil de chaque éluat de 0.5 ml se fait sur le collecteur de fractions.

Des extractions identiques ont été réalisées sur des urines surchargées séparément avec des acides oxalique, isovalérique et glutarique. Les urines ont été choisies exemptes de glucides réducteurs et de protéines. La surcharge a été obtenue en mélangeant 3 ml d'urine, 2 ml de solution "froide" et 100 μl de solution du même acide marqué au carbone 14.

Extraction par les solvants organiques. Elles sont réalisées sur les mêmes volumes des solutions standards ou d'urine enrichies d'acides organiques marqués au carbone 14. Dans un tube à vis, chaque échantillon est additionné de chlorure de sodium et de 100 μl d'acide chlorhydrique concentré.

Le mélange est extrait sous une agitation mécanique, par 3 fois 5 ml de solvant. On prélève, à chaque extraction, 0.5 ml de la phase organique déshydratée sur sulfate de sodium anhydre et l'on en mesure la radioactivité.

Mesures de la radioactivité des solutions. À 0.5 ml d'éluat aqueux ou de solution organique d'extractions, sont ajoutés 5 ml de réactif scintillant Aqua Luma.

Après 10 min de comptage, la radioactivité réelle de l'échantillon (dpm) est déterminée à partir des mesures de radioactivité relative (ipm) et de la valeur de l'efficacité de comptage obtenue par la méthode de correction dite de standardisation externe [9, 10] du C.E.A.

Une courbe de correction de quenching traduisant l'efficacité du comptage (E) en fonction du rapport de standardisation externe (R) a été établie à l'aide de 20 échantillons radioactifs de propionate de sodium ^{14}C et de quantités variables de réactif quenchant (acétate de pyridinium 1.5 M) en utilisant le même réactif scintillant Aqua Luma. L'équation de la courbe obtenue est de la forme:

$$E = - 0.69 R^3 + 4.58 R^2 - 9.42 R + 6.53$$

Les résultats des mesures sur chaque fraction exprimés en désintégrations par minute (dpm) sont rapportés en pour cent de la moyenne des résultats en dpm obtenus à partir de 3 échantillons marqués par addition de 100 μ l d'acides organiques ^{14}C non quenchés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'extraction par échangeur

Cette méthode présente sur l'ensemble des acides testés une efficacité remarquable puisque les rendements exprimés en pour cent de la radioactivité totale initiale (Tableau I) augmentent avec le volume d'éluant, bien que par ailleurs ce rendement varie avec la nature de l'acide: avec 15 ml d'éluat, entre 63.5% (citrique) et 101.3% (propionique); avec 30 ml d'éluat, entre 73.4% (citrique) et 101.3% (propionique).

TABLEAU I

RENDEMENTS D'EXTRACTION EXPRIMÉS EN POURCENTAGE PAR RAPPORT À LA RADIOACTIVITÉ INITIALE (MÉTHODE ÉCHANGEUR D'ANIONS)

| Acide | Volume d'éluant acétate de pyridinium 1.5 M | |
|----------------------------|--|----------------|
| | 15 ml | 30 ml |
| Glycolique | 73.1 | 81.6 |
| Oxalique | 29.2 | 61.9 |
| | 68.9 (+ urine) | 91.3 (+ urine) |
| Propionique | 101.3 | 101.3 |
| Glycérique | 75.9 | 92.6 |
| Isovalérique | 86.4 | 88.5 |
| | 82.9 (+ urine) | 83.0 (+ urine) |
| Glutarique | 50.6 | 73.0 |
| | 90.3 (+ urine) | 96.3 (+ urine) |
| Citrique | 63.5 | 73.4 |
| <i>p</i> -Hydroxybenzoïque | 92.7 | 96.8 |
| 3-Indolyl acétique | 91.5 | 100.0 |

Même l'acide oxalique (dont le $pK_1 = 1.271$), dont l'éluant de l'échangeur est difficile (Fig. 1), est extrait avec un rendement acceptable 61.9% pour un volume d'éluant de 30 ml.

Remarque sur les urines surchargées: les résultats obtenus avec l'acide oxalique confirment les résultats de Chalmers et Watts [7]. Nous observons personnellement des résultats analogues dans le comportement de l'acide glutarique lui aussi un diacide. Quant à l'acide isovalérique il est extrait dans les mêmes proportions que dans une solution aqueuse pure.

L'extraction par les solvants

L'efficacité des extractions à l'aide des solvants organiques est précisée sur le

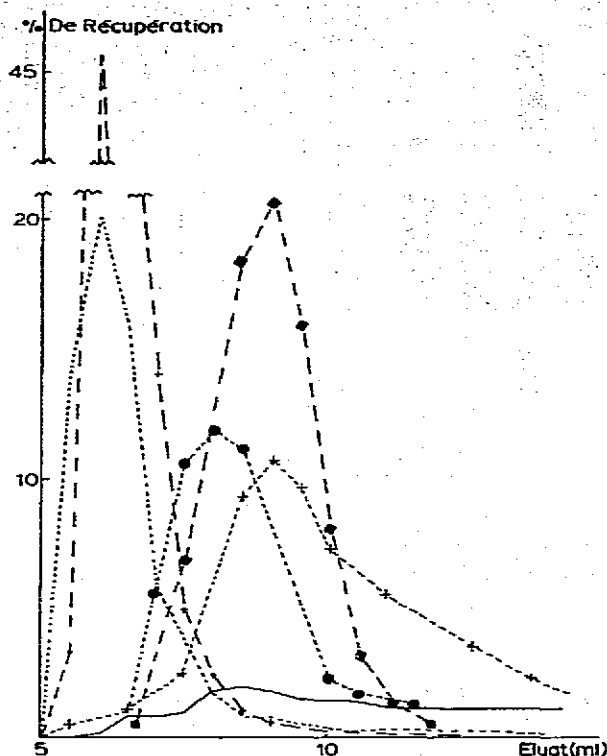


Fig. 1. Courbes d'éluion d'acides organiques séparés sur DEAE-Séphadex. - - -, acide glycérique; - + - + -, acide propionique; - ● - ● -, acide *p*-hydroxybenzoïque; - - - + - - - + -, acide isovalérique; - - - ● - - - ● - - -, acide citrique; ————, acide oxalique.

TABLEAU II

RENDEMENTS D'EXTRACTION PAR LES SOLVANTS EXPRIMÉS EN POURCENTAGE DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE

| Acide | Chlorure d'isopropyle | THF | Oxyde de diéthyle | Acétate d'éthyle | Éther de pétrole |
|----------------------------|-----------------------|------|-------------------|------------------|------------------|
| Glycolique | 2.2 | 87.5 | 24.7 | 41.5 | 0.6 |
| Oxalique | 32.9 | 99.7 | 65.4 | 54.9 | 5.9 |
| Propionique | 32.1 | 99.6 | 98.7 | 99.4 | 5.1 |
| Glycérique | 2.0 | 79.2 | 11.2 | 21.6 | 1.2 |
| Isovalérique | 77.0 | 99.5 | 93.4 | 96.6 | 69.7 |
| Glutarique | 0.7 | 99.8 | 87.1 | 95.8 | 0.25 |
| Citrique | 16.9 | 98.5 | 11.5 | 19.8 | 6.6 |
| Benzoïque | 98.7 | 99.2 | 99.8 | 99.7 | 92.0 |
| <i>p</i> -Hydroxybenzoïque | 13.8 | 99.9 | 99.9 | 99.8 | 0.7 |
| 3-Indolyl acétique | 91.4 | 99.8 | 99.4 | 99.8 | 2.8 |

Tableau II et la Fig. 2 où les rendements sont également exprimés en pour cent de la radioactivité totale initiale.

Les résultats obtenus sur des urines surchargées en acide glutarique ou isovalérique sont superposables aux résultats obtenus sur des solutions étalons pures (Tableau III).

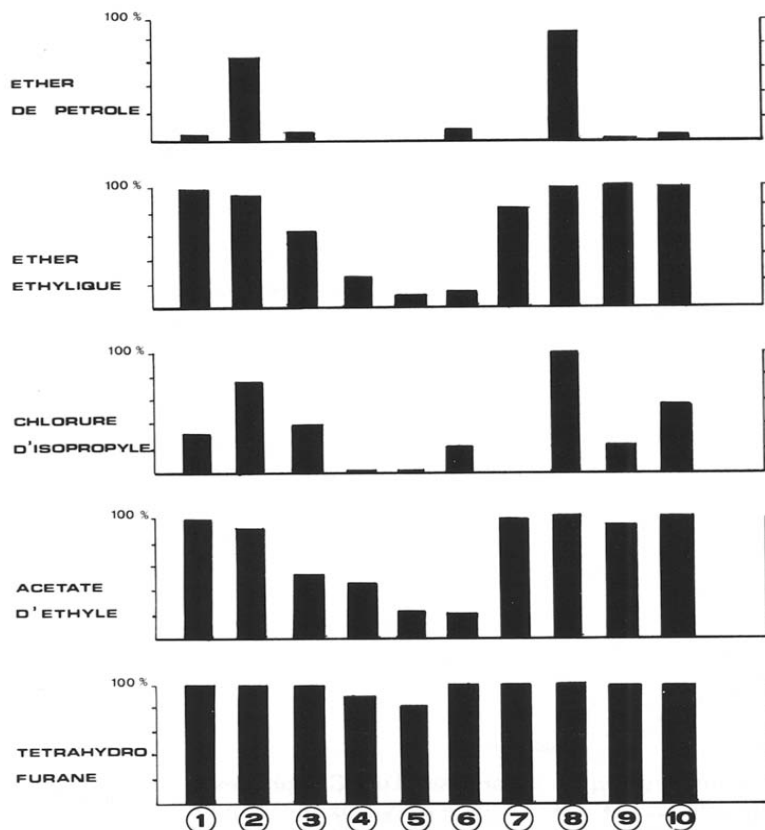


Fig. 2. Extraction des acides organiques: rendements en fonction de la nature des solvants organiques utilisés. 1, acide propionique; 2, acide isovalérique; 3, acide oxalique; 4, acide glycolique; 5, acide glycérique; 6, acide citrique; 7, acide glutarique; 8, acide benzoïque; 9, acide *p*-hydroxybenzoïque; 10, acide indolyl acétique.

TABLEAU III

COMPARAISON ENTRE L'EXTRACTION PAR SOLVANTS DE SOLUTIONS AQUEUSES PURES ET D'URINES SURCHARGÉES

| | Chlorure d'isopropyle | THF | Oxyde de diéthyle | Acétate d'éthyle | Éther de pétrole |
|----------------------------|-----------------------|------|-------------------|------------------|------------------|
| Acide glutarique | 0.7 | 99.8 | 87.1 | 95.8 | 0.25 |
| Urine + acide glutarique | 10.8 | 99.2 | 82.5 | 92.8 | 6.5 |
| Acide isovalérique | 77.0 | 99.5 | 93.4 | 96.6 | 69.7 |
| Urine + acide isovalérique | 74.6 | 99.4 | 95.0 | 96.4 | 71.6 |

Un solvant semble être très efficace: le tétrahydrofurane (THF). Tous les acides sont extraits avec un rendement supérieur à 98% sauf l'acide glycolique (87.5%) et l'acide glycérique (79.2%).

D'autre part le chlorure d'isopropyle [3] et l'éther de pétrole ne conviennent pas du tout: en effet ils ne dissolvent bien, dans les conditions d'extraction (pH acide), que les seules molécules les plus apolaires. Ces deux solvants sont donc

d'une action solubilisante beaucoup trop restreinte pour être choisis.

Deux solvants enfin semblent avoir des qualités acceptables et comparables quant à leur pouvoir de dissolution: l'acétate d'éthyle et l'oxyde de diéthyle. En effet ils dissolvent bien les acides aromatiques (le rendement d'extraction est de 99% pour les deux solvants vis à vis des trois acides aromatiques testés), ainsi que les acides non-hydroxylés tels que les acides propionique, isovalérique, glutarique (rendement 90%). L'acide oxalique est cependant légèrement moins bien extrait, l'extraction est meilleure avec l'oxyde de diéthyle.

Leur efficacité vis à vis des acides hydroxylés et des acides carbonylés est par contre plus faible. En effet l'oxyde de diéthyle extrait les acides glycérique et citrique avec des rendements très faibles d'environ 20%. Pour l'acide glycolique, avec l'oxyde de diéthyle le rendement d'extraction est de 24.7%, avec l'acétate d'éthyle il est de 41.5%.

Ces solvants, bien qu'encore imparfaits, sont cependant acceptables, l'acétate d'éthyle étant le plus favorable. Pour améliorer les rendements Fitch et al. [11] préconisent d'ailleurs le mélange acétate d'éthyle—oxyde de diéthyle.

Parmi les solvants testés, les plus intéressants sont donc dans l'ordre: (1) le THF; (2) l'acétate d'éthyle; (3) l'oxyde de diéthyle. Mais il faut dire que le THF est avide d'eau ce qui nécessite qu'il soit fréquemment redistillé, ce qui explique peut être que malgré cette précaution nous n'avons pas constaté une reproductibilité parfaite.

Les autres solvants par contre, bien que partiellement hydrosolubles sont d'une manipulation plus aisée et donnent des résultats plus reproductibles. La quantité d'eau qu'ils extraient doit rester limitée car une grande quantité d'eau: (a) entraîne avec les acides des molécules hydrosolubles amphotères neutres ou très faiblement basiques; et (b) allonge les durées de concentration des solutions par évaporation sous courant gazeux ce qui est peu propice à un dépistage rapide d'une maladie métabolique.

L'extraction par échangeur d'anions est très efficace et donne pour tous les acides des rendements très acceptables. Elle présente l'inconvénient d'être longue par la durée de l'éluat et celle de la concentration de l'éluat.

Les solvants organiques, dont l'action solubilisante n'est pas égale pour tous les acides, semblent cependant d'une utilisation plus adaptée au dépistage de routine, assez efficace. Ils se prêtent à des manipulations aisées et rapides. Cependant le THF doit être écarté et le choix porté sur l'acétate d'éthyle, l'oxyde de diéthyle ou le mélange acétate d'éthyle—oxyde de diéthyle, judicieusement utilisés.

RÉSUMÉ

L'extraction d'acides organiques est étudiée par deux méthodologies: échange d'anion sur colonne de DEAE-Séphadex, et extraction par solvants: oxyde de diéthyle, acétate d'éthyle, chlorure d'isopropyle, éther de pétrole, tétrahydrofurane.

Des solutions standards d'acides, surchargées par l'acide correspondant, marqué au carbone 14, permettent de mesurer les rendements d'extraction en scintillation liquide.

Les auteurs soulignent les avantages et les inconvénients de chacune des méthodes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A.M. Lawson, R.A. Chalmers et R.W.E. Watts, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 1283.
- 2 R.A. Chalmers, M.J.R. Healy, A.M. Lawson, J.T. Hart et R.W.E. Watts, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 1292.
- 3 E. Jellum, *J. Chromatogr.*, 143 (1977) 427.
- 4 K. Tanaka dans E. Gaul (Éditeur), *Biology of Brain Dysfunction*, Vol. 3, Plenum, New York, (1975) p. 145.
- 5 M. Duran, D. Gompertz, L. Bruinvis, D. Ketting et S.K. Wadman, *Clin. Chim. Acta*, 82 (1978) 93.
- 6 E.C. Horning et M.G. Horning, *Clin. Chem.*, 17 (1971) 802.
- 7 R.A. Chalmers et R.W.E. Watts, *Analyst (London)*, 97 (1972) 958.
- 8 J.A. Thompson et S.P. Markey, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1313.
- 9 R. de Wachter et W. Fiers, *Anal. Biochem.*, 18 (1967) 351.
- 10 I.T. Takahashi et F.A. Blanchard, *Anal. Biochem.*, 45 (1970) 411.
- 11 W.L. Fitch, P.J. Anderson et D.H. Smith, *J. Chromatogr.*, 162 (1979) 249.