

Le dosage de l'urée

Méthode enzymatique

Jean-Cyrille Hierso, Edmond Collange et Dominique Lucas

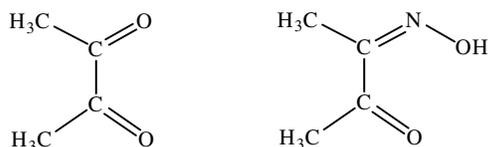
La manipulation de travaux pratiques présentée ici fait partie de l'enseignement de chimie analytique proposée en maîtrise de sciences et techniques contrôle et analyse chimiques [1] à l'université de Bourgogne. Elle s'adresse à des étudiants de second cycle universitaire, pour lesquels la chimie analytique et l'analyse quantitative de manière générale prendront une place essentielle dans leur projet professionnel final. Outre un rappel des notions de dosage direct et dosage en retour et la comparaison de leur exactitude respective, l'intérêt pédagogique réside dans l'utilisation de la pHmétrie pour sélectionner un indicateur coloré adéquat qui servira lors du dosage final par volumétrie. L'introduction à la notion de réaction enzymatique est également intéressante aussi bien du point de vue scientifique que du point de vue de l'histoire de la chimie. La manipulation ne présente pas de difficulté particulière et ne nécessite pas de verrerie ou d'équipement spécifiques. Les conditions de sécurité sont les conditions standards des travaux pratiques de chimie : la manipulation d'acides et de bases impose le port de lunettes de protection et d'une blouse. La durée moyenne du TP est comprise entre 4 et 6 heures mais la réduction de ce temps est possible par des modifications mineures des protocoles opératoires.

L'urée de formule $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ est un solide incolore, inodore, cristallisé en prismes quadratiques, soluble dans l'eau ou l'éthanol et fond à 132 °C. Elle est présente chez l'Homme comme le produit azoté final majoritaire issu de la dégradation des acides aminés. Cette substance organique existe normalement dans le sang à raison de 0,20 à 0,50 g.L⁻¹ et dans l'urine (environ 2,5 g.L⁻¹). Sa synthèse par voie chimique menée par Wöhler en 1828 a montré pour la première fois qu'un constituant organique des êtres vivants pouvait être obtenu indépendamment de tout principe vital, une révolution dans les concepts scientifiques de l'époque. En tant que substance déchet dans le métabolisme humain, son dosage est une indication précieuse de l'état de santé d'un sujet. Différentes méthodes de dosage de l'urée sont connues :

(i) la *méthode gazométrique* consiste à mesurer le volume de diazote dégagé lors de la décomposition de l'urée par l'hypobromite de sodium :



(ii) les *méthodes colorimétriques directes* s'appuient sur le fait que l'urée donne des dérivés colorés avec des réactifs tels que le diacétyl $\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$ ou le diacétylmonoxime $\text{CH}_3\text{COCNOHCH}_3$:



(iii) la *méthode enzymatique*, dont une utilisation est proposée ici, fait intervenir une enzyme végétale, l'uréase (ou urée amino hydrolase), pour hydrolyser l'urée en carbonate d'ammonium [2-3].

Au début du XIX^e siècle, on savait déjà que certaines substances étaient capables d'accélérer des réactions chimiques sans être elles-mêmes modifiées par la réaction. Ces catalyseurs reconnus, pour la plupart des métaux tels que le platine, nul n'en avait trouvé chez les êtres vivants. Deux chimistes français, Payen et Persoz, démontrèrent alors, en 1830, qu'une substance extraite de l'orge germée est capable d'induire la dégradation de l'amidon dans des conditions compatibles avec la vie à une vitesse largement supérieure à celle obtenue classiquement en présence d'un acide fort à plus de 100 °C. Ce fut la première identification d'une enzyme, nommée à l'époque « diastase ». Les découvertes d'enzymes se multiplièrent, puis on comprit en particulier que chacune d'entre elles ne catalyse, en général, qu'une seule réaction chimique. En conséquence, il s'agit de catalyseurs très spécifiques. Les enzymes sont des macromolécules protéiniques constituées d'un enchaînement seulement réduit d'acides aminés. Cependant, elles permettent des réactions chimiques aussi complexes que la fermentation ou la digestion. La première cristallisation d'enzyme eut lieu dans les années 20, et ce fut la cristallisation de l'uréase qui présente deux atomes de nickel au sein de son site actif [4]. L'uréase est produite par de nombreux êtres vivants : bactéries, levures ou même des organismes plus élaborés comme des végétaux et animaux. Les deux sources d'extraction de l'uréase les plus répandues sont le *Canavalia ensiformis* dit « jack bean », une légumineuse de la famille des pois, et le *Bacillus pasteurii* [5].

Principe

L'urée étant une base beaucoup trop faible pour être directement titrable en solution aqueuse (pKa = 0,3), l'action enzymatique de l'uréase permet une hydrolyse totale de l'urée en carbonate d'ammonium (*figure 1*), lequel peut être titré par pHmétrie.

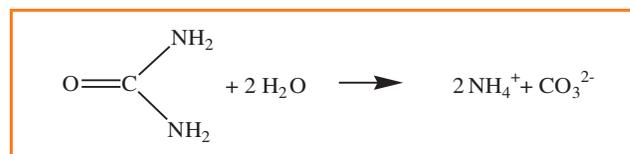


Figure 1 - Hydrolyse de l'urée.

Deux méthodes de dosage sont alors envisageables : (i) le carbonate d'ammonium est dosé directement par un acide fort ; (ii) une quantité déterminée d'acide fort qui réagit avec le carbonate d'ammonium est ajoutée en excès, et

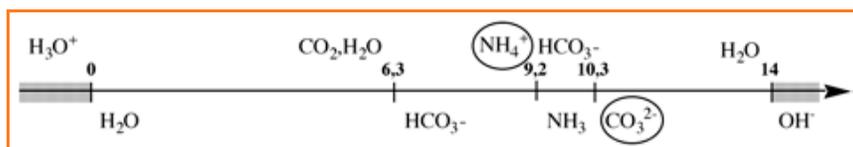


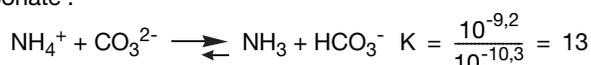
Figure 2 - pH des couples acido-basiques mis en jeu.

l'excédent est dosé en retour par une base forte. La manipulation consiste, en conséquence, à établir la courbe de pH en fonction du volume, $pH = f(v)$, résultant de l'application de chaque méthode. Les étudiants peuvent alors déduire quelle méthode est la plus précise, puis choisir l'indicateur coloré adapté pour, finalement, réaliser le dosage volumétrique d'une solution de titre *inconnu* en urée.

Titration directe

Considérons le titrage d'une solution aqueuse de 25 mL de carbonate d'ammonium $(NH_4)_2CO_3$ de titre $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ par un acide fort de concentration $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Le positionnement sur une échelle de pH des couples acido-basiques auxquels participent les espèces introduites (figure 2) fait apparaître qu'il se produit, avant l'introduction du réactif titrant, une réaction acide-base quantitative conduisant à la formation d'ammoniac et d'hydrogencarbonate :



L'état initial est donc équivalent à un mélange équimolaire de NH_4^+ , NH_3 et HCO_3^- sur lequel l'addition de l'acide fort provoque successivement les deux réactions quantitatives décrites figure 3.

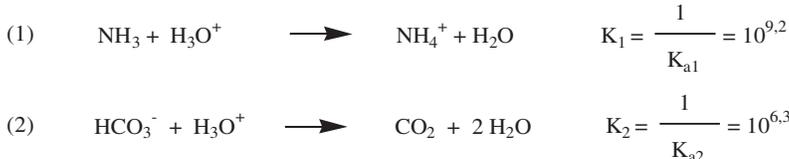


Figure 3.

Elles sont caractérisées par l'obtention de volumes à l'équivalence que l'on peut relier à la quantité d'urée initialement introduite, soit 25 mL d'une solution $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (figure 4).

$$V_{(1)} = \frac{25 \times 0,04}{0,1} = 10 \text{ mL} \quad V_{(2)} = V_{(1)} + \frac{25 \times 0,04}{0,1} = 20 \text{ mL}$$

Figure 4.

La courbe de titrage $pH = f(v)$ obtenue par simulation est représentée sur la figure 5.

Titration en retour

Dans cette partie, on ajoute, après hydrolyse enzymatique de l'urée, 30 mL d'un acide fort de concentration $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, ce qui conduit aux réactions (1) et (2) précédemment décrites et laisse en solution un excès

d'acide fort. Dans le mélange, on a alors $n_{H_3O^+} = n_{CO_2} = 10^{-3} \text{ mol}$ et $n_{NH_4^+} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$. Après avoir chassé le CO_2 par bullage d'azote, la solution est dosée par une base forte de concentration $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, suivant les deux réactions quantitatives présentées figure 6.

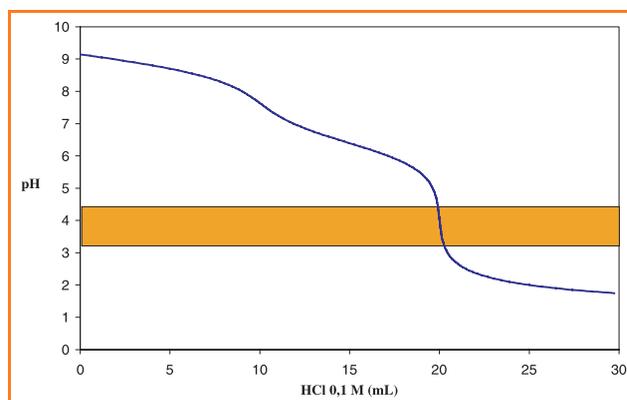
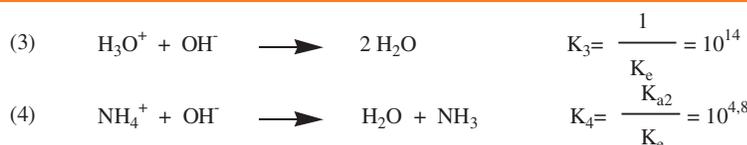
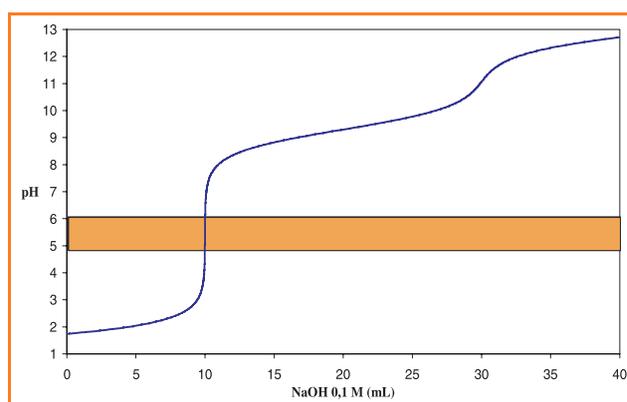
Figure 5 - Titrage par l'acide chlorhydrique $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de 25 mL d'urée $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ après hydrolyse enzymatique.

Figure 6.

Les équivalences interviennent à $V_{(3)} = 10 \text{ mL}$ et $V_{(4)} = 30 \text{ mL}$. La courbe de titrage présentée figure 7 montre que la première équivalence est à l'origine du saut de pH le plus net.

Par la simple comparaison des deux graphes issus des titrages, on retient préférentiellement la méthode du dosage en retour. Elle permet une détermination plus précise de l'équivalence de par la grande amplitude et le faible « étalement » en volume du saut de pH obtenu comme terme du dosage. L'indicateur coloré le plus adapté apparaît être le rouge de

Figure 7 - Titrage par la soude $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de 25 mL d'urée $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ après hydrolyse et ajout de 30 mL d'acide chlorhydrique $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

méthyle dont la zone de virage de pH comprise entre 4,8 et 6,0 est exactement centrée sur le pH équivalent calculé égal à 5,4 (le vert de bromocrésol avec une zone de virage de 3,8 à 5,4 peut également convenir). L'interception de la courbe de titrage avec les valeurs de pH 4,8 et 6,0 permet de prévoir pour le dosage volumétrique avec un indicateur coloré une incertitude relative environ égale à 1‰ alors que, pour le dosage direct, dans des conditions identiques, on trouve une valeur d'incertitude vingt fois supérieure avec l'indicateur coloré hélianthine (zone de virage comprise entre 3,2 et 4,4 pour une valeur de pH de 3,9 à l'équivalence).

En complément, on pourra demander aux étudiants de calculer, pour chacune des deux méthodes, le pH aux points remarquables de la courbe pHmétrique (pH initial, équivalents et final).

Expérience

Matériel et réactifs

Solutions et réactifs à fournir aux étudiants

- urée solide
- solution d'urée de titre inconnu (compris entre 2,0 et 2,5 g.L⁻¹)
- solution d'uréase dans le glycérol à 554 unités.L⁻¹ (1 unité libère 1 μmole de NH₃ par minute à pH 7 et à 25 °C)
- alcool octylique
- hydroxyde de sodium étalon à 0,1 mol.L⁻¹
- acide chlorhydrique étalon à 0,1 mol.L⁻¹
- indicateurs pH rouge de méthyle et/ou vert de bromocrésol, hélianthine

Verrerie et matériel pour un étudiant

- 3 béchers de 100, 150 et 200 mL
- 1 fiole jaugée de 200 mL
- 2 erlenmeyers de 150 mL avec bouchons de liège
- 2 barreaux aimantés et un agitateur magnétique
- 2 verres de montre
- 1 sabot de pesée
- 2 pipettes à 2 traits de 25 et 30 mL
- 1 pipette graduée de 1 mL
- 1 burette graduée de 50 mL

Matériel commun

- balance de précision au mg
- pH-mètre ; électrode de verre et électrode au calomel saturé
- dispositif de barbotage de diazote N₂ (bouteille et distribution)

Dosage direct d'une solution d'urée de titre connu

Peser, à l'aide d'un sabot de pesée, exactement la quantité nécessaire d'urée à dissoudre dans une fiole de 200 mL pour obtenir une solution environ 0,04 mol.L⁻¹. Pipeter 25 mL de la solution d'urée dans un bécher de 150 mL de forme haute, ajouter 0,5 mL de solution d'uréase. Agiter quelques secondes à l'aide d'un barreau aimanté, couvrir d'un verre de montre et laisser réagir 30 min. La température doit avoisiner 20 à 25 °C pour que la réaction d'hydrolyse s'effectue dans le temps prévu. Le pH du milieu devient progressivement basique, l'action de l'uréase optimale à pH neutre n'est cependant pas entravée jusqu'à une valeur de

pH de 10. La solution résultante est titrée par pHmérie à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1 mol.L⁻¹ distribuée à la burette : la courbe de variation de pH en fonction du volume d'acide ajouté présente deux points d'inflexion correspondant à 10 et à 20 mL de réactif titrant.

Questions posées aux étudiants

1. Représenter la courbe $pH = f(v)$ et l'expliquer. A partir des volumes équivalents, retrouver la concentration de la solution étalon d'urée.
 2. Pour effectuer ce dosage, peut-on envisager l'utilisation d'un indicateur coloré ?
 3. Quelle critique pourrait-on apporter à cette méthode de titrage direct avec indicateur ?
- On devra fournir aux étudiants une liste de divers indicateurs colorés avec leur zone de virage.

Dosage en retour d'une solution d'urée de titre connu

Préparer et hydrolyser un nouvel essai en opérant comme pour le dosage direct mais dans un bécher large de 200 mL. Ajouter ensuite exactement 30 mL de la solution d'acide chlorhydrique 0,1 mol.L⁻¹ au mélange hydrolysé. Puis agiter à l'aide d'un barreau aimanté tout en dégazant la solution de son CO₂ par barbotage de diazote durant 5 min. On aura pris soin d'ajouter préalablement quelques gouttes d'octan-1-ol pour limiter la formation de mousse. On titre la solution résultante par une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 mol.L⁻¹ distribuée à la burette. La courbe de variation de pH en fonction du volume d'hydroxyde de sodium ajouté présente deux points d'inflexion correspondant à 10 et à 30 mL de réactif titrant.

Questions posées aux étudiants

4. Représenter et interpréter la courbe de dosage, et retrouver la concentration initiale en urée.
5. Montrer que, dans le cas de ce titrage en retour, il est possible d'utiliser un indicateur coloré, en proposer un ou plusieurs.

Application au dosage d'une solution d'urée de titre inconnu

En utilisant la méthode du dosage en retour, l'étudiant proposera un protocole permettant le dosage volumétrique à l'aide d'un indicateur coloré de la solution d'urée de titre inconnu. Une fois le protocole validé par l'enseignant (conditions d'expérimentations semblables aux précédentes *vide supra*), deux essais concordants seront menés : avec des prises d'essais dans des erlenmeyers de 150 mL que le manipulateur prendra soin de boucher pendant la durée de l'hydrolyse.

Résultats pour une classe

Erreur constatée sur le dosage de l'inconnue d'urée	Nombre d'étudiants	Écart moyen à la valeur réelle
< 1 % d'erreur	8	1 %
1 à 2 % d'erreur	8	
2 à 10 % d'erreur	4	

Références

- [1] Champion E., Bléneau S., *L'Act. Chim.*, septembre 2001, p. 32.
 [2] Fox E.J., Geldard W.J., *Ind. Eng. Chem.*, 1923, 15, p. 743.
 [3] Roche M., Desbarres J., Colin C., Jardy A., Bauer D., *Chimie des solutions*, Tech & Doc, Lavoisier, Paris, 1990, p. 92.
 [4] Ciurli S., Benini S., Rypniewski W.R., Wilson K.S., Miletti S., Mangani S., *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 190-192, p. 331.
 [5] Varner J., *The Enzymes*, 2nd Ed., Boyer P., Lardy H., Myrback K. (éds.), Academic Press, NY, 1960, p. 247.



J.-C. Hierso

Jean-Cyrille Hierso, Edmond Collange et Dominique Lucas sont maîtres de conférences dans le Laboratoire de synthèse et électrosynthèse organométallique-LSEO*.



D. Lucas



E. Collange

* UMR-CNRS 5632, Université de Bourgogne, 6 boulevard Gabriel, 21000 Dijon.
 Tél. : 03 80 39 61 07. Fax : 03 80 39 61 00.
 E-mails : Jean-Cyrille.Hierso@u-bourgogne.fr
 Edmond.Collange@u-bourgogne.fr
 Dominique.Lucas@u-bourgogne.fr

Information aux annonceurs

Rejoignez notre **CLUB PARTENAIRES** dès **Janvier 2003**

Faites apparaître votre **LOGO**, vos **COORDONNÉES**
 et vos **COMPÉTENCES**

pendant **6 mois** consécutifs pour **530 €**



Z.A. de Courtabœuf
 17, avenue du Hoggar
 BP 112
 91944 LES ULIS Cedex A
 Tél. : 01.69.18.75.75
 Fax : 01.69.86.07.65
 www.edpsciences.org

Compétences : Éditeur scientifique international
 (astronomie, chimie, électricité & électronique,
 sciences de la vie, mathématiques, physique,
 radioprotection)

Contact publicitaire : Céline HOARAU
 hoarau@edpsciences.org

Pour toute adhésion
 avant **novembre 2002**,
 soyez **en plus** présent sur
 le site **WEB** de la **SFC**
 pendant un mois
www.sfc.fr