

SOBRE LA PRESENCIA DEL METILGLIOXAL A L'ORINA

per

A. PI SUÑER

M. FARRAN

Des que Neuberg (1) i Dakin i Dudley (2), l'un independentment dels altres, demostraren l'existència d'un ferment en els teixits animals que dismuta el metilglixal en àcid làctic i observaren la importància metabòlica d'aquesta acció fermentativa, s'han portat a terme nombroses experiències, per tal d'investigar la importància fisiològica del metilglixal i les seves transformacions. Neuberg i Gorr (3) i Neuberg i Kobel (5) arriben a la conclusió que el metilglixal és un producte normal de la descomposició dels hidrats de carbon, tant en la vida animal com vegetal.

D'una banda són nombroses les cèl·lules animals de diversa classe (múscle, fetge), així com vegetals (llevat, bacteries làctiques) (4) que formen àcid làctic a partir del metilglixal; i, d'altra, pot obtenir-se aquesta substància en la descomposició de la glucosa pel llevat i les bacteries làctiques (6) (7), per òrgans vegetals (8), cèl·lules animals (9), etc. Ultimament, Case i Percival-Cook (10) han observat la formació de metilglixal i àcid pirúvic en el treball muscular. Tots aquests fets ens porten al convenciment que el metilglixal és un producte intermediari en la desmolisi dels glúcids (12).

Considerant la composició tan complexa de l'orina i el gran nombre i varietat dels seus components, cal sospitar que el metilglioxal es trobi entre ells. Si bé, segons M. Vogt (13), la presència de la dismutasa impedeix el normal acumulament d'aquell metilglioxal en els teixits animals, existeix sempre la possibilitat que, sobretot en certs estats patològics, una part d'ell no sigui transformada i s'elimini per l'orina.

Recordem, per exemple, que en l'orina normal existeixen petites quantitats de diversos hidrats de carbon (polisacàrids, sucres senzills), àcid glucurònic i àcid sàcric; que normalment s'hi troba àcid làctic; pensem en els diversos àcids grassos, en els àcids oxàlic i oxalúric, en la presència en l'orina d'alguns diabètics, a part de la glucosa, d'altres sucres, cossos cetònics i acetaldehid (Stepp i Feulgen) (14), una barreja de substàncies de tres àtoms de carbon, la quantitat del qual, en les vint-i-quatre hores, oscil·la entre 1 i 5 mgr.

Recordem, finalment, que per l'orina no tot el que s'elimina es resultat d'un metabolisme complet; tan sols la urea és un producte residual, totalment oxidat. En una combustió total, C i H formen CO_2 i H_2O , la via natural i exclusiva d'eliminació dels quals no és l'orina. Tal com remarquen Voit i Bouchard, gairebé la totalitat dels components de l'orina són produïts en diverses etapes d'un metabolisme incomplet; i això es dedueix de diversos fets coincidents: les oscil·lacions del carbon urinari i del quocient C/N que, en determinades circumstàncies, poden depassar de molt el normal (carbonúria disoxidativa de Bickel i Kaufmann-Kosla) (15); la quantitat d'àcids orgànics en l'orina, que ascendeix del valor normal de 20-50 miliequivalents fins a 100 i 200 (Widmark) (16); la relació de l'oxigen absent urinari segons Müller (17) i del quocient Oa/N, els valors del qual coincideixen pràcticament

amb eis del quocient calòric Cal/N de Rubner. És sabut que aquest valor arriba de vegades fins a 6, 5 i 9, o sigui més elevat que el valor teòric 5, 4, fet que cal atribuir a la presència en l'orina de diverses substàncies orgàniques, difícils de calcular exactament, i per la presència de les quals el quocient pot arribar fins a 11,9, segons Tangl (18), en casos de la disoxidació dels hidrats de carbon.

Entre les alteracions metabòliques que s'assenyalen per hipercarbonúria, cal comptar-hi la diabetis (prescindint del contingut en C del sucre, Bickel) (19) i l'avitaminosi B (Collazo i C. Pi-Suñer Bayo) (20), sense que siguin aquestes les úniques alteracions del metabolisme dels hidrats de carbon, greixos i proteïnes, que van acompanyades de l'aparició en l'orina de productes metabòlics intermediaris.

Ens semblà, doncs, d'interès investigar si entre aquests components de l'orina es trobava el metilglixal. La nostra primera idea fou que si aquesta substància existia realment en l'orina, el trobaríem sens dubte amb major freqüència i major quantitat en l'orina dels diabètics.

EXPERIÈNCIES

Com a orientació portàrem a terme una reacció fàcil i senzilla, que ens permetés de verificar gran nombre d'anàlisis. És ja sabut que des de Neuberg (21), són diverses les reaccions colorejades que s'usen per a identificar el metilglixal. Nosaltres seguirem la tècnica de Barrenscheen i Braun (22) : si s'afegeix a una solució de metilglixal una petita quantitat de pirrol i s'acidula el conjunt amb àcid clorhídric, s'obtenen ja coloracions característiques amb dilucions de metilglixal fins a 1 : 250.000. Posàvem en un tub d'assaig 1 cc. d'orina, ajuntàvem

dues gotes de pirrol pur, recentment destil·lat i totalment incolor, i de seguida dues gotes més d'àcid clorhídric concentrat, pur. Si la reacció és positiva, s'origina un color groguenc o groc taronja, groc rogenc : aquests diferents matisos depenen de la concentració en metilglioxal. No hi ha formació de precipitat i el líquid es manté transparent, fins al cap d'unes hores que comença a enterbolir-se, degut a la formació de corpuscles, primer líquids, sòlids després, pesats, obscurs, que s'adhereixen a les parets del tub i dificulten el netejar-lo. Mentre la solució es manté clara, la intensitat de la coloració roja va augmentant amb el temps, essent proporcional a la concentració de metilglioxal fins a una dilució d'un 1 : 32,000. Els autors sostenen que, a una concentració mitjana, el color groc passa a roig (quan s'alcalinitza amb sosa la solució) i que fins a dilucions d'un 1 : 16000 s'observa una neta fluorescència verdosa. Si bé ens ha estat possible remarcar aquestes variacions de color en solucions pures de metilglioxal, no fou així en l'orina. La reacció és específica i no la donen ni els sucres, ni les trioses, ni l'àcid pirúvic o l'acetaldehid.

En l'anàlisi de l'orina d'alguns diabètics hem obtingut resultat positiu, independentment del fet que fossin malalts glucosúrics o compensats, i sense relació amb el contingut de glucosa de l'orina. Algunes, contenint molta glucosa, donaven resultat negatiu i altres es comportaven a la inversa.

Per a comprovar si les coloracions obtingudes en l'anàlisi de les orines corresponien a les de les solucions pures de metilglioxal, obtinguérem una d'aquestes segons el mètode de Neuberg i Hoffman (24), per oxidació de la glicerina per l'aigua oxigenada en presència de sulfat de ferro i deshidratació del producte resultant (aldehid glicèric i dioxiacetona) per destil·lació amb àcid sulfúric

concentrat. La solució no s'altera per l'addició d'àcid tricloracètic fins a 8 per 100, ni en solució àcida; en canvi, desapareix el metilglioxal si es calenta a 100° una solució aquosa, o se l'alcalinitza en fred, transformant-se en àcid làctic (Denis) o en altres substàncies. Aquestes solucions control de metilglioxal donaven amb el pirrol i àcid clorhídric exactament la mateixa reacció que l'orina positiva, fet que ens féu suposar que, efectivament, en aquestes orines es trobava metilglioxal.

Intentàrem reforçar aquesta suposició amb altres mètodes qualitius i obtinguérem resultats poc satisfactoris, degut a diversos motius.

Alguns mètodes no poden usar-se en el nostre cas particular, per donar resultat positiu amb altres components de l'orina. Entre ells s'hi troba el de Denigés (25) proposat primer per a la investigació dels alcaloides i usat després per a la del metilglioxal (26). També assajarem el d'Ariyama (27). Per addició de cianur sòdic o potàssic a una solució de glioxal o metilglioxal s'obté un gran augment de la llur capacitat de reducció. Després d'assaigs amb diversos reactius, creu l'autor com el més indicat l'arseno-fosfor-wolfràmic de Benedict (usat també en la determinació de l'àcid úric), per oferir els avantatges de color intens en reaccionar, estabilitat i bona proporcionalitat entre el color obtingut i la quantitat de glioxal o metilglioxal presents.

Però aquest mètode tampoc no pot usar-se en l'orina, d'una banda per donar també resultat positiu amb l'àcid úric i molts d'altres components d'aquella — acetaldehid, glucosa — i, d'altra, perquè l'amoniac impedeix l'aparició del color característic i origina la formació de precipitats i corpuscles. Amb el mètode d'Ariyama no hem pogut obtenir res, ni intentant eliminar l'àcid úric amb acetat

de zinc, ni destilant, cosa que, per altra banda, impossibilitaria tota determinació quantitativa del metilgloxal. També en absència de l'àcid úric s'observen coloracions, enterboliments i precipitats, deguts principalment a l'existència de fosfats o altres substàncies que es troben normal o accidentalment en l'orina (glucosa, fructosa, acetaldehid). Tot i haver intentat portar a terme aquest mètode en diverses condicions i investigar les causes d'error, no ens ha estat possible d'obtenir resultats satisfactoris. Per al nostre objecte, o sigui en l'orina, tampoc no pot portar-se a terme la reacció de Neuberg, tan acreditada en l'estudi de les microfermentacions. Seguint la tècnica exposada per Tschugajeff i Tischtschenko (28) obteníem la níquel-metil-glioxima en la forma següent: a 1 cc. de la solució que s'investiga (orina) i 0,2 cc. de solució de clorhidrat d'hidroxilamina al 20 per 100 s'ajunten 0,1 cc. d'una solució de sulfat de níquel a 1,25 per 100, alcalinitzada lleugerament per addició d'unes gotes de NH_3 concentrat. A la temperatura del laboratori apareix de seguida una coloració taronjada, que en calentar-la guanya en intensitat i finalment es torna roja. Neuberg i Scheuer (29), operant amb solucions suficientment concentrades, aïllaven la metilglioxima per dissolució en èter, evaporació i pesada del residu sec. Deixant de banda la composició tan complexa de l'orina, tan sols el fet de la petita sensibilitat del mètode del níquel, ens deia ja la seva impossibilitat d'aplicació en el nostre cas. A més, degut al color particular de l'orina, no podia observar-se el producte pel metilgloxal en presència d'orines amb dilucions superiors a 1 : 1.000, i quan el metilgloxal existeix en l'orina, ho fa sempre en quantitats inferiors.

També intentàrem usar els mètodes basats en l'oxidació del metilgloxal, si bé amb poca confiança en el resultat, degut a la gran quantitat de components

de l'orina no totalment oxidats, i les experiències, en efecte, ens convenceren que eren ben justificades les nostres aprensions.

Assajàrem, així mateix, la tècnica de Kuhn i Heckscher (30), basada en què el metilglixal, degut a la seva qualitat d'aldehyd, s'oxida amb hipoiodit, mentre l'àcid làctic que l'acompanya no s'altera. Willstätter i Schudel (31) porten a terme aquesta oxidació amb iode en solució alcalina; Auerbach i Bodländer (32) aconsellen l'oxidació amb iode i la valoració amb tiosulfat, i després han millorat el seu mètode usant barreges equimoleculares de CO_3Na_2 2*n* i CO_3HaN 2*n* d'un pH 10,1-10,2, evitant d'aquesta manera la formació de iodoform.

Tots aquests mètodes, a part dels desavantatges de inseguretat i inexactitud, tenen l'inconvenient de no poder-se usar quan l'orina conté glucosa, o sigui en les orines dels diabètics. En presència d'ella s'obtenen resultats massa elevats, i la glucosa no pot eliminar-se per lletada de calç i coure, que destrueix aleshores, inclús en fred, gairebé la totalitat del metilglixal, per transformar-se en part en àcid làctic. Per això no pot usar-se cap d'aquelles reaccions en l'orina. Fürth i Charnass (33) oxiden el metilglixal amb permanganat potàssic, verificant la reacció en dues proves — abans i després de destil·lar, per a separar-lo de l'àcid làctic. És evident que la diferència entre ambdós valors ens donarà el del metilglixal; però cal tenir en compte que una part d'aquest pot transformar-se en àcid làctic per la mateixa destil·lació.

Friedemann (34) usa una solució de NaOH de pH superior a 12 i H_2O_2 ; a la solució a investigar se li adjunta aigua oxigenada totalment neutra amb unes gotes de fenoltaleïna i, amb una bureta, unes gotes de NaOH *n*/10. Després de cada addició ha d'agitar-se una mica i esperar

fins que desaparegui la coloració rosada; quan aquesta es mantingui inalterada, s'ha obtingut l'oxidació del metilglioxal fins a un 95-98 per 100. S'esperen encara cinc minuts, fins a acabar l'oxidació, i es valora l'excés d'àlcali amb àcid *n/10*. En fer els càlculs, cal tenir en compte que cada molècula de metilglioxal es transforma en dues d'àcid monovalent. També aquest mètode hem vist que no donava resultats satisfactoris aplicat a l'orina, entre altres motius, degut a la circumstància que el seu color dificulta l'observació exacta del viratge de la fenolftaleïna. Afegint a l'orina quantitats conegudes de metilglioxal, els resultats foren irregulars, i mai quantitativus. En canvi, operant amb solucions pures de metilglioxal, el mètode ens ha mostrat una gran exactitud.

DETERMINACIONS QUALITATIVES I QUANTITATIVES

Entre totes les reaccions que hem descrit tan sols dues ens semblaren aplicables : la del pirrol per a l'orina i la de Friedemann per a la solució de control. Però, al mateix temps, ens semblà necessari, a part de l'analogia d'ambdues reaccions, obtenir la seguretat que en el nostre cas esdevien efectivament a la presència del metilglioxal. I això encara era més necessari, perquè amb totes les altres reaccions no obteníem cap resultat prou satisfactori.

Per tant, buscarem de confirmar els nostres resultats per l'aïllament del metilglioxal en forma de la 2-4-dinitrofenilhidrazona, segons el mètode proposat per Neuberger i Kobel (35), insubstituïble per a la investigació del metilglioxal en una solució de substàncies orgàniques. Efectivament, Neuberger ha demostrat que el metilglioxal reacciona tan sensiblement amb la p-nitrofenilhidrazina i especialment amb la dinitrofenilhidrazina, que és gairebé

possible parlar d'especificitat. Amb ajuda d'aquesta reacció es pot determinar el metilglioxal fins en dilucions de l'1 : 50.000 i 1 : 100.000, o sigui d'unes 1-2 γ per centímetre cúbic. Si bé és veritat que altres compostos semblants formen amb les hidrazines, anàlogues hidrazones i osazones, cal tenir en compte que ho fan tan sols a molta major concentració. És més recomanable l'ús de la dinitrofenilhidrazina, perquè la bishidrazona es forma més fàcilment — la reacció posseeix una major sensibilitat i aquella és pràcticament insoluble en alcohol, a diferència de les dels aldehids acètic, fòrmic i glicèric i dels sucres en general, circumstància que facilita la seva separació i identificació. La bishidrazona del metilglioxal, tractada amb potassa en solució alcohòlica, dóna, segons Neuberg i Kobel (35), una intensa coloració blau-violeta característica, que apareix inclús en solucions molt diluïdes. Aquesta propietat ha estat usada posteriorment per Barrenscheen i Braun (37) per a la determinació, del metilglioxal, basant en ella un mètode colorimètric (38) que nosaltres provàrem per la seva senzillesa.

En les primeres experiències tractàvem l'orina amb solució al 2 per 100 de 2-4-dinitrofenilhidrazina en CIH 2*n*, calenta, rentàvem diferents vegades i separàvem el precipitat per centrifugació, després de tractar-lo amb CIH normal i alcohol al 30-50 i fins 75 per 100 contenint CIH fins a normalitat. El precipitat restant, després d'aquest tractament, consistia en la bishidrazona del metilglioxal — degut a la seva insolubilitat en alcohol — com demostrava el fet que, tractat amb potassa alcohòlica al 5 per 100, donava la coloració violeta característica.

Amb 10 cc. d'orina no obteníem bons resultats, perquè el petit residu resultant es perdia durant les centrifugacions. Aleshores operàrem amb 100 cc. d'orina

pirrol-positiva, amb l'esperança d'obtenir major èxit, i aconseguirem aïllar la bishidrazona amb totes les seves propietats característiques. Però és molt fatigós haver de treballar amb aquest volum d'orina i separar cada vegada el residu per centrifugació, i més encara tenint en compte que, per a obtenir solucions alcohòlico-clorhídriques incolores, havíem de portar a terme fins a cinquanta rentats, amb el perill corresponent que es trenqués el tub de la centrífuga i perdéssim en un moment el treball de tants de dies. Per tal d'estalviar-nos temps, actualment hem modificat el mètode en el sentit de verificar els rentatges, per a la determinació quantitativa, en un filtre de Schott.

La reacció colorejada per la potassa alcohòlica és útil per a la comparació colorimètrica en la determinació quantitativa amb la solució de control tractada d'igual manera. La potassa alcohòlica dóna també coloracions amb l'osazona de l'àcid pirúvic i la hidrazona de l'aldehid acètic, però llurs tonalitats són distintes: blau-rogenca amb l'àcid pirúvic i magrana amb l'acetaldehid. La solució de 2-4-dinitrofenilhidrazina, tractada amb aquesta potassa alcohòlica dóna una coloració molt semblant a la de la bishidrazona del metilglixal, però es diferencia d'aquesta en què el color desapareix amb un excés de potassa, mentre el d'ella es manté inalterable.

Ni la reacció del pirrol ni les propietats ja descrites de la bishidrazona obtinguda pel tractament amb la 2-4-dinitrofenilhidrazina, ens semblaren encara suficients per a afirmar la presència del metilglixal en l'orina, degut a la qual cosa intentàrem aïllar i cristal·litzar la bishidrazona, amb la intenció d'identificar-la pels seus cristalls i punt de fusió.

Com abans, tractàrem l'orina amb una solució ca-

lenta de dinitrofenilhidrazina en CIH *2n* (1 cc. de solució per a 10 cc. d'orina); esperàrem fins a la total precipitació, i abandonàrem el precipitat durant dotze hores a l'estufa. El separàrem per decantació i filtració i el dissolguérem de nou en piridina calenta. Refredant aquesta en la gelera, obteníem una substància d'apariència oliosa, que, vista al microscopi, apareixia en forma de cercles greixosos i gotes d'oli, a l'interior de les quals de vegades s'endevinaven cristalls de forma indefinida. Tan sols una vegada obtinguérem cristalls que es podien comparar als de la hidrazona de l'acetaldehid, però mai que fossin semblants als obtinguts per dissolució en piridina del precipitat resultant de tractar la solució control de metilglioxal amb la dinitro, cristalls petitets i poc característics, però totalment diferents dels amorfs de l'orina.

Intentàrem també dissoldre el precipitat en nitrobenzè calent, concentrar la solució per evaporació i precipitar els cristalls per refredament. Mentre operàrem amb la solució pura de metilglioxal, obtinguérem així cristalls fàcilment diferenciables, però en intentar aplicar el mètode a l'orina, resultaren les mateixes masses olioses del tractament amb piridina.

Aleshores intentàrem determinar el punt de fusió dels cristalls obtinguts d'ambdues maneres — amb piridina i amb nitrobenzè — i veiérem que fonien per sota de 100°, o sigui a temperatura massa baixa. Això ens convencé que la dinitrofenilhidrazina reaccionava simultàniament amb altres components de l'orina. Pucher (39), tractant orina normal amb fenilhidrazina, havia pogut obtenir una osazona cristal·litzada. En vista de tot això ens convencérem de la necessitat d'un aïllament sistemàtic de les substàncies principals que podien acompanyar el metilglioxal i reaccionar amb la dinitro; entre elles calia considerar en primer terme l'acetaldehid, la

presència del qual en l'orina és ben coneguda, i originant una hidrazona cristal·litzada, i potser també l'osazona de l'àcid pirúvic.

Per a la separació ens servirem de la tècnica de Simon i Neuberg (40), mitjançant la qual poden aïllar-se i determinar-se separadament el metilgloxal, àcid pirúvic, aldehid acètic i àcid làctic, quan es troben simultàniament en solució, tal com ocorre en l'orina.

Sempre treballàvem amb orina pirrol-positiva de diabètics compensats, la qual, per tant, es troba lliure de glucosa i cossos cetònics.

Les primeres experiències les efectuàrem amb 2-4 litres d'orina sense obtenir quantitats suficients de bishidrazona i osazona. Després dels nombrosos rentatges, quedava, bé un residu imponderable, bé una tan petita quantitat de substància, que no permetia de cap manera la seva identificació per solubilitat, cristal·lització i punt de fusió.

Reunírem 12 litres d'orina, la filtràrem i hi ajuntàrem carbó animal que, si bé veiérem que retenia part del metilgloxal, ens facilitava molt la prova qualitativa, per retenir encara en major proporció moltes altres substàncies. Neutralitzàvem exactament el precipitat, afegíem $\text{ClH } 2n$ fins a una concentració d'1 gr. d'àcid per 100 gr. d'orina, ja que la solució no ha de tenir mai menys de l'1 per 100 d'àcid clorhídric, si no es vol que la dinitro precipiti per si sola. Com sempre, cal usar la dinitro en solució en $\text{ClH } 2n$ a l'1 : 60, i en la relació d'1 cc. de reactiu per a 10 d'orina. La barreja l'abandonàvem durant setze hores a l'estufa, deixàvem refredar a la gelera fins a $8-10^{\circ}$, i filtràvem per un filtre de Schott 17 G4. Una volta separat el precipitat del filtre, es renta diferents vegades amb $\text{ClH } 2n$ calent, fins que la solució filtrant surt completament incolora, i aleshores dues vegades més amb aigua destil·lada freda. Després es deixa passar pel

filtre solució normal de carbonat sòdic freda que, degut a la presència de l'osazona de l'àcid pirúvic, pren una intensa coloració bruna fosca. El tractament amb carbonat — tot i agitant amb una vareta de vidre el contingut del filtre — ha de repetir-se tant com sigui necessari fins que el líquid filtri incolor, i aleshores es renta dues vegades amb aigua destil·lada calenta. Acidulant amb ClH el filtrat, pot obtenir-se l'osazona de l'àcid pirúvic, en forma de precipitat pulverulent groc-obscur.

El residu del filtre es tracta amb alcohol al 94 per 100 bullint, i així es dissol la hidrazona de l'acetaldehid. El tractament es repeteix fins que l'alcohol que al principi prenia un color bru, surti completament incolor. La hidrazona de l'acetaldehid pot separar-se de l'alcohol per evaporació d'aquest, al bany maria o al buit. Tractant així l'orina no s'obté una hidrazona pura de l'acetaldehid, perquè l'alcohol dissol també altres substàncies que encara no hem pogut definir.

La bishidrazona del metilglioxal que en aquest mètode queda en el filtre, s'hi troba en molt petita quantitat i és difícil de separar mecànicament. Nosaltres la dissolguérem en nitrobenzè en calent.

Operant de la manera descrita, obteníem tres líquids: *a)* la solució de carbonat sòdic contenint l'osazona de l'àcid pirúvic, juntament amb altres substàncies; *b)* l'alcohol amb la hidrazona impura de l'acetaldehid, i *c)* el nitrobenzè amb la bishidrazona del metilglioxal. Per a precipitar l'osazona de l'àcid pirúvic, ha d'acidular-se la solució *a* amb ClH; filtrant, s'obté un precipitat groc-obscur, que fon a temperatura molt més baixa que l'osazona pura de l'àcid pirúvic. Dessecant el precipitat a l'estufa i tractant-lo de nou amb alcohol al 94 per 100, no es dissol una gran part d'ell; decanti's la solució i centri's fins a uns pocs centímetres cúbics al bany maria.

En refredar, precipita una substància no cristallina, de punt de fusió 205° .

Ultimament obteníem l'osazona més pura: el precipitat obtingut per l'addició del CIH es renta en el filtre amb aigua destil·lada calenta i el residu insoluble amb àcid acètic també calent. En refredar-se, es separa una substància que fon a $215-216^{\circ}$ (segons Neuberg i Kobel (38) l'osazona pura de l'àcid piruvic fon a 216°). Amb potassa alcohòlica dóna la coloració roig-violeta característica de l'osazona. Serà tan sols l'anàlisi elemental el que ens podrà dir, definitivament, si es tracta en veritat de l'osazona de l'àcid piruvic, tal com nosaltres creiem.

Amb la solució *b* procedírem de la següent manera: la deixàvem evaporar, calentant suaument, fins a quedar reduïda a uns centímetres cúbics, refredar i dipositar; el precipitat, que cristal·litza molt difícilment, el disolem en piridina. Abandonant en la gelera, precipiten cristalls semblants als obtinguts de la hidrazona pura de l'acetaldehid, tractats de la mateixa manera. El punt de fusió d'aquells trobarem ésser 166° (p. f. teòric 165°), i amb potassa alcohòlica obteníem la coloració roig-taronja característica.

Solució *c*: El nitrobenzè s'evapora en calent fins a pocs centímetres cúbics i refreda en un tub d'assaig petit; poc a poc es separen petits cristalls que es centrifuguen i renten diferents vegades amb èter en el mateix tub de centrifuga, amb el que s'elimina el nitrobenzè. Evapori's l'èter, dessequin-se completament els cristalls i abandonin-se durant quatre dies en un dessecador al buid, amb pentaòxid de fòsfor. La forma dels cristalls obtinguts de l'orina és idèntica a la dels que separàvem de la solució control de metilglioxal. El professor Pardillo, catedràtic de Cristal·lografia a la Universitat de Barcelona, establí la identitat cristal·logràfica

dels cristalls obtinguts de les solucions *c* i *a* amb els de la bishidrazones del metilglioxal i l'osazona de l'àcid pirúvic, respectivament.

El punt de fusió era 296° i el de la bishidrazona pura 298° , tal com comprovà el professor Garcia Banús, catedràtic de Química orgànica de la nostra Universitat, conclouent que les substàncies resultants de les solucions *a*, *b* i *c* eren l'osazona de l'àcid pirúvic i les hidrazones de l'acetaldehid i el metilglioxal, respectivament. El cos obtingut per la separació amb èter, donava amb la potassa alcohòlica el color característic de la bishidrazona del metilglioxal : blau violeta intens.

Finalment, per a arribar a la seguretat plena de què el cos aïllat per nosaltres de l'orina era realment la bishidrazona del metilglioxal, encarregàrem el seu anàlisi elemental al doctor Mosquera, de la Universitat de Santiago, el qual ens donà els següents resultats:

Primera determinació. — 0,02375 gr. de substància donaven 0'00535 gr. de H_2O i 0'0369 gr. de CO_2 . $C = 42'38$ per 100, $H = 2'52$ per 100.

Segona determinació. — 0'02535 gr. de substància donaven 0'00625 gr. de H_2O i 0'0392 gr. de CO_2 . $C = 42'18$ per 100, $H = 2'75$ per 100.

0'02795 gr. de substància donaven 6,234 cc. de N. (19° ; 734'8 mm.). $N = 25'21$ per 100.

Trobat : $C = 42'28$, $H = 2'63$, $N = 25'21$ per 100.

Calculat : $C = 41'66$, $H = 2'80$, $N = 25'66$ per 100.

D'aquests resultats, juntament amb els indicats abans, es desprèn que entre les substàncies obtingudes en tractar l'orina amb 2-4-dinitrofenilhidrazina, hi existeix la bishidrazona del metilglioxal i que, en conseqüència, aquest es trobava en l'orina investigada.

*Institut de Fisiologia.
Facultat de Medicina. Barcelona.*

BIBLIOGRAFIA

1. *C. Neuberg*, *Bioch. Zeitschr.*, 49, 502, 1913; 51, 484, 1913.
2. *H. D. Dakin* i *H. W. Dudley*, *Journ. of biol. Chem.*, 14, 155, 1913; 15, 463, 1913; 16, 505, 1913.
3. *C. Neuberg* i *G. Gorr*, *Bioch. Zeits.*, 162, 490, 1925.
4. *C. Neuberg*, ídem, 51, 484, 1913.
5. *C. Neuberg* i *M. Kobel*, ídem, 203, 463, 1928; 210, 466, 1929.
6. *Els mateixos*, ídem, 207, 232, 1929.
7. *C. Neuberg* i *M. Scheuer*, *Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wis., Wegscheider-Festschrift* 1929.
8. *C. Pi-Suñer Bayo*, *Bioch. Zeits.* 213, 495, 1929.
9. *M. Vogt*, *Klin. Woch.*, 8, 793, 1929.
10. *Widmann*, ídem, 216, 479, 1929.
11. *E. M. Case* i *R. Percival-Cook*, *Bioch. Journ.*, 25, 1319, 1931.
12. *C. Pi-Suñer Bayo*, *Bioch. Zeits.*, 213, 489, 1929.
13. *M. Vogt*, ídem, 211, 17, 192.
14. *Stepp* i *Feulgen*, *Zeits. f. physiol. Chem.*, 119, 72, 1922.
15. *Bickel* i *Kauffmann-Cosla*, *Chem. Zentr.*, 2, 1187, 1926.
16. *Widmark*, *Bioch. Zeits.*, 215, 434, 1929.
17. *Muller*, ídem, 186, 451, 1927.
18. *Tangl*, *Münch. Med. Woch.*, 71, 1663, 1924.
19. *Bickel*, *Chem. Zentr.*, 1, 983, 1925.
20. *Collazo* i *Pi-Suñer Bayo*, *Bioch. Zeits.*, 238, 335, 1931.
21. *Neuberg*, ídem, 71, 150, 1915.
22. *Barrenscheen* i *Braun*, ídem, 223, 296, 1931.
23. *Witzemann*, *Chem. Zentr.*, 1, 782, 1915.
24. *Neuberg* i *Hoffmann*, *Bioch. Zeits.*, 224, 491, 1930.
25. *Deniges*, *Chem. Zentr.*, 1, 946, 1198, 1909.
26. *Fischer* i *Toennisen*, *Zeits. f. physiol. Chem.*, 161, 254, 1928.
27. *Ariyama*, *Jour. biol. Chem.*, 77, 359, 1928.
28. *Tschugajeff* i *Tischtschenko*, *Chem. Centralb.*, 1911, 1, 871.
29. *Neuberg* i *Scheuer*, l. c.
30. *Kuhn* i *Hechscher*, *Zeits. f. physiol. Chem.*, 160, 116, 1926.
31. *Willstätter* i *Schudel*, *Ber. Akad. d. Wiss. München*, 51, 780, 1918.
32. *Auerbach* i *Bodländer*, *Zeits. f. angew. Chem.*, 36, 602, 1923.
33. *Fürth* i *Charnass*, *Bioch. Zeits.*, 26, 199, 1910.
34. *Friedemann*, *Journ. biol. Chem.*, 73, 331, 1927.
35. *Neuberg* i *Kobel*, *Bioch. Zeits.*, 203, 463, 1928.
36. *Neuberg* i *Kobel*, ídem, 216, 495, 1929.
37. *Barrenscheen* i *Braun*, ídem, 233, 296, 1931.
38. *Barrenscheen* i *Dreguss*, ídem, 233, 305, 1931.
39. *Pucher*, *Soc. Exp. Biol.*, 23, 473, 1926.
40. *Simon* i *Neuberg*, *Bioch. Zeits.*, 232, 479, 1931.