ZV000 1120

INSTITUT D'ÉLEVAGE ET DE MÉDECINE
VÉTÉRINAIRE DES PAYS TROPICAUX

REVUE D'ÉLEVAGE

ET DE

MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

DES PAYS TROPICAUX

Utilisation d'une montmorillonite, la terre de Bezenet, dans le dosage sélectif de la créatinine sanguine des ruminants domestiques

par CL. LABOUCHE

Tome XVI (nouvelle série) Supplément au N° 1 — 1963

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS
23, rue de l'École-de-Médecine, PARIS-VI^e

Utilisation d'une montmorillonite, la terre de Bezenet, dans le dosage sélectif de la créatinine sanguine des ruminants domestiques

par Cl. LABOUCHE

Au cours d'une étude de la filtration glomérulaire rénale chez des ruminants domestiques, nous avons dosé la créatinine du sérum sanguin selon JAFFE. Par cette méthode, une molécule de créatinine sanguine s'unit à une molécule d'acide picrique ainsi qu'à un nombre variable de molécules de soude et d'eau pour donner des composés de couleur rouge.

La réaction n'est pas spécifique. L'acétone, l'acide acétylacétique, le méthylglyoxal, l'acide glycuronique, l'acide ascorbique, certains glucides et divers protides peuvent la fournir. Des techniques de destruction de ces chromogènes ont été proposées, mais le plus souvent on préfère extraire la créatinine en l'adsorbant sur une substance appropriée (réactif de LLOYD, bentonites commerciales) (1) (2). La créatinine éluée subit alors la coloration, à l'abri des interventions parasites.

Les agents adsorbants classiques nous faisant défaut, nous avons pensé qu'une argile montmorillonite, la terre de BEZENET (Allier) ou Jagolithe, dont MEUNIER avait autrefois proposé l'utilisation pour classer les huiles de poisson suivant leur richesse en vitamine A (3) pourrait peut-être les remplacer.

Cette terre, de couleur grise, est formée de grains de taille variable ainsi que le montre l'essai de tamisage résumé ci-dessous.

Rev. Elév. Méd. vét. Pays trop., 1963, nº 1
Reçu pour publication : juillet 1962.

Traversant le tamis Nº	Arrêté par le tamis Nº	p. 100 du poids total de l'argile tamisée
—	—	—
	45	0,06
45	60	2,7
60	80	46,8
80	100	30,4
100	190	16,9
190	—	3,2

La Jagolithe est colorée en bleu par la benzidine en solution acétique, en vert clair par l'aniline et en brun rouge par la paraphénylènediamine. La réaction est acide en présence d'une solution aqueuse d'hélianthine.

Avant de l'utiliser pour le dosage de la créatinine, nous avons envisagé les points suivants :

— pouvoir adsorbant et influence de la granulation
— action sur les spectres d'absorption lumineuse
— action sur la couleur des solutions alcalines d'acide picrique
— vérification de la loi de BEER-LAMBERT
— essais de récupération des surcharges de créatinine
— sélectivité de l'adsorption

I. — Etude du pouvoir adsorbant de la Jagolithe

On évalue le pouvoir adsorbant de l'argile en mesurant la plus petite quantité capable de

fixer un poids donné de créatinine en présence d'acide sulfurique et de tungstate de sodium, agents déféquants habituellement préconisés dans le dosage de la créatinine sanguine. (1)

Dans des tubes à centrifuger coniques, on place successivement :

Solution de créatinine (6 ou 10 γ/cm³)	2 ml
Eau distillée	3 ml
Na tungstate (solution à 10 p. 100)	1 ml
H_2SO_4 (0,67 N)	2 ml

Après homogénéisation du mélange, on ajoute des quantités variables de terre de Bezenet. On agite trois fois en dix minutes à l'aide d'une baguette de verre, puis on centrifuge à grande vitesse pendant dix minutes. Le surnageant est enlevé et les tubes sont retournés sur du papier filtre afin de réaliser un égouttage aussi parfait que possible du culot. Pendant ce temps on prépare un tube témoin contenant seulement deux centimètres cubes de la solution de créatinine et un « blanc » constitué par deux centimètres cubes d'eau distillée.

On ajoute ensuite à tous les tubes 7,5 cm³ de réactif picro-sodé ainsi que 2 cm³ d'eau distillée à ceux contenant de l'argile afin de rétablir l'égalité de volume avec le tube témoin et le blanc. Après agitation et dix minutes de contact, on centrifuge pendant dix minutes. La densité optique des surnageants est mesurée au spectrophotomètre Beckman à 520 mμ et exprimée en pourcentage de la densité optique du témoin.

a) Pouvoir odsorbant de *la Jagolithe* non tamisée.

La solution de créatinine utilisée contenait 6γ/cm³

Quantité d'argile (g)	Densité optique du surnageant (p. 100 de la densité optique du témoin)
0	100
0,1	75
0,2	111
0,4	109

L'adsorption est complète à partir de 0,2 g. L'activité est donc inférieure à celle du réactif de Lloyd ou à celle des bentonites pour lesquels la quantité maximale fixée est de 1 p. 100 du poids de l'adsorbant. On remarquera également que lorsque l'adsorption est complète, la densité optique est supérieure à celle du témoin d'environ 10 p. 100.

b) Pouvoir odsorbant et granulation de *la Jagolithe*.

Nous avons vérifié l'influence de la grosseur des grains d'argile sur le pouvoir adsorbant par un protocole identique au précédent mais en utilisant des solutions à 10 μg de créatinine au ml. L'argile est passée à travers une série de tamis en bronze de numérotation : 60, 80, 100 et 190. On a ainsi obtenu les fractions suivantes :

A : traverse la maille 190

B. : traverse la maille 100 et est retenue par la maille 190

C : traverse la maille 80 et est retenue par la maille 100

D : traverse la maille 60 et est retenue par la maille 80

E : est retenue par la maille 60

Les pourcentages moyens de créatinine fixée en fonction du poids de l'argile et de la grosseur du grain de Jagolithe sont réunis dans le tableau suivant.

Fraction	Poids d'argile en centigrammes. 5	10	20	40	60	80	100
A	86	95	101	56			
B	54	74	96	103	105		
C	34	50	71	97,5	108		
D		40	51	80	85	85	60
E			55	85	81	86	74

On remarquera :

1° Que la quantité d'argile nécessaire pour adsorber 20 μg de créatinine est de 20 cg pour A, de 20 à 40 cg pour B, de 40 à 60 cg pour C.

2° Que les fractions les plus grossières (D et E) ne semblent pas permettre une fixation complète.

3° Qu'un excès d'argile se traduit par une diminution du pourcentage de rétention (A, D, E,).

4° Que lorsque la récupération de lacréatinine est complète, elle est légèrement supérieure à 100 p 100.

Nous avons alors essayé de confirmer (2°) et (3°) de la manière suivante : Le surnageant de la première centrifugation est recueilli et on y ajoute 20 cg de la fraction A, quantité que nous venons de vérifier comme suffisante pour adsorber la créatinine qui n'aurait pas été retenue. On opère ensuite comme précédemment. En aucun cas, nous n'avons pu mettre en évidence la présence de créatinine dans les surnageants lorsqu'on utilise 40 cg de A, 60, 80, 100 cg de D ou de E.

L'adsorption est donc dans tous les cas complète, mais les capacités d'absorption lumineuse ont été sans doute modifiées.

2. — Influence de la Jagolithe sur les spectres d'absorption des complexes créatinine-acide picrique

La coloration a été développée à partir d'une solution pure de créatinine sans utilisation de l'argile (coloration témoin) et après action de quantités variables de Jagolithe (fractions A, D, E,)

La densité optique est déterminée pour des lumières de longueur d'onde comprise entre 450 et 560 mμ. Pour chaque spectre, on égale la densité optique maximale à 100, les autres D. 0. étant alors exprimées en pour cent du maximum d'absorption.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau figuré à la page suivante :

Les spectres correspondants sont représentés dans les figures 1, 2, et 3.

On remarquera que le maximum d'absorption lumineuse situé à 480 mμ pour le témoin se déplace vers les grandes longueurs d'onde en présence de l'argile. On note ainsi, suivant les cas, des maxima d'absorption à 495, 500, 505, 510 mμ tandis que l'absorption vers les courtes longueurs d'onde diminue.

Ces déformations spectrales permettent d'expliquer que les récupérations de créatinine puissent être supérieures à 100 p. 100.

En conséquence nous pouvons déjà dire que lors d'un dosage éventuel de la créatinine au moyen de Jagolithe, les solutions étalons devront être traitées par les mêmes quantités d'argile de même qualité que les échantillons soumis aux dosages.

3. — Influence de la Jagolithe sur la coloration de la solution alcaline d'acide picrique

Au cours de l'élution de la créatinine et du développement de la coloration, un excédent de réactif picro-sodé reste inemployé. On peut se demander, par conséquent, si sa couleur propre ne pourrait pas être modifiée par contact avec l'argile.

Nous avons donc comparé l'absorption lumineuse du réactif avant et après contact avec la Jagolithe (20 cg de fraction A pour 7,5 cm³ de réactif) le réactif étant séparé ensuite de l'argile par centrifugation. On note alors une légère intensification de la couleur, la solution ne laissant alors passer que 98 p. 100 de la lumière traversant le réactif seul.

Il sera donc nécessaire de traiter les blancs de la même manière que les échantillons à doser.

4. — Vérification de la loi de BEER-LAMBERT avec des solutions pures de créatinine

La technique suivante à été suivie. Des gammes de concentrations croissantes sont ainsi réalisées

	tube 0	tube 1	tube 2	tube 3
solution de Créatinine à 10 μg/ml, ml	0	1	2	3
Eau distillée, ml	3	2	1	0
Na tungstate 10 p. 100, ml	1	1	1	1
SO_4H_2 (0,67 N), ml	2	2	2	2

Suivant les cas, on utilise les quantités suivantes d'argile

Fraition A	20 cg
Fraction B	40 cg
Fraction C	40 cg
Fraction D	60 cg
Fraction E	60 cg

On vérifie que l'adsorption est complète pour les concentrations les plus élevées de créatinine, par la méthode exposée en (2, b)

λ mμ	témoin	Fraction A		Fraction B				Fraction E		
		20 cg	40 cg	40 cg	60 cg	80 cg	100 cg	60 c g	80 cg	100 cg
450	60	66	46	-	-	-	-	56	51	6
460	82	94	72	-	65	56	11	64	52	2
465	84	-	-	-	68	58	11	66	56	-
470	93	95	78	63	71	60	10	71	56	4
475	98	98	81	68	73	60	13	74	58	-
480	100	97	77	74	79	69	27	81	68	21
485	99	95	69	86	89	83	57	89	82	51
490	96,5	99	87	95	96	93	78	96	93	74
495	93,5	100	90	99	99	99,5	91	99	97	88
500	89,5	99	95	100	100	100	98,5	100	100	96
505	84	98	99	97	97	99	100	98	99	100
510	78	95	100	93	94	95,5	98,5	94	96	99
515	71	88	96	-	98	90,5	93	88	89	94
520	61	80	90	76	78	80	84	78	80	88
525	52	-	-	-	68	70	73	-	-	-
530	43	61	72	56	57	59	61	57	58	66
535	34	-	-	-	47	49	51	-	-	-
540	26	40	51	37	37	38	41	38	38	46
545	19	-	-	-	30	31	33	-	-	-
550	14,5	26	37	24	24	25	26	24	24	32
560	8	-	-	15	15	16	17	8	16	22

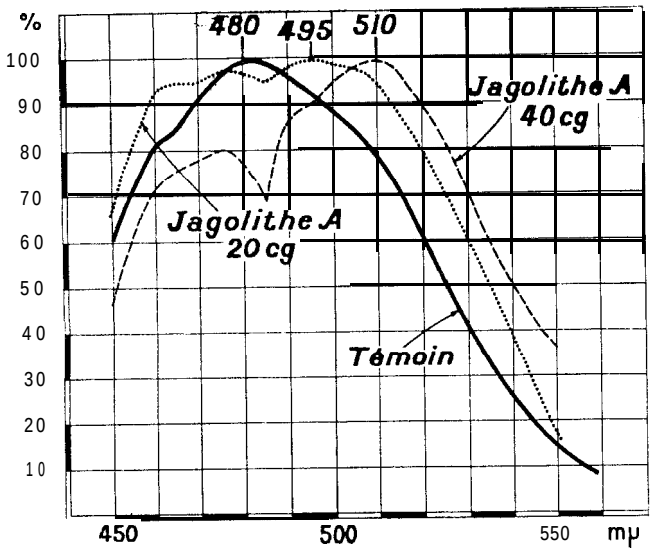

Fig. 1. — Modification du spectre d'absorption lumineuse du complexe acide picrique-créatinine sous l'influence de quantités variables de Jagolithe A.

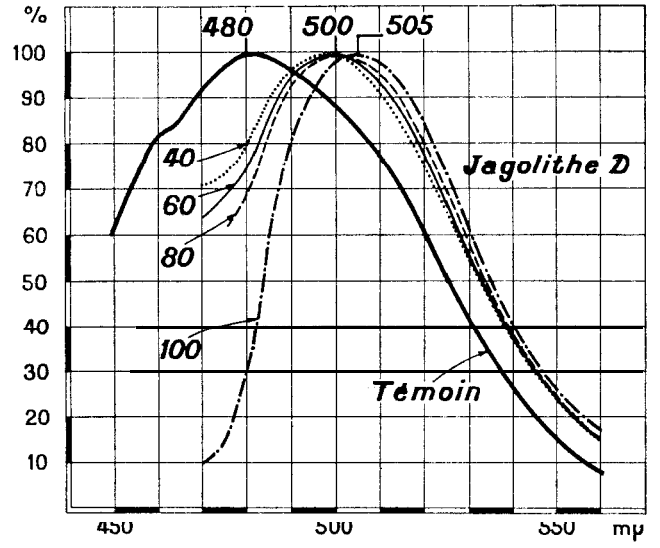

Fig. 2. — Modification du spectre d'absorption lumineuse du complexe acide picrique-créatinine sous l'influence de quantités variables de Jagolithe E.

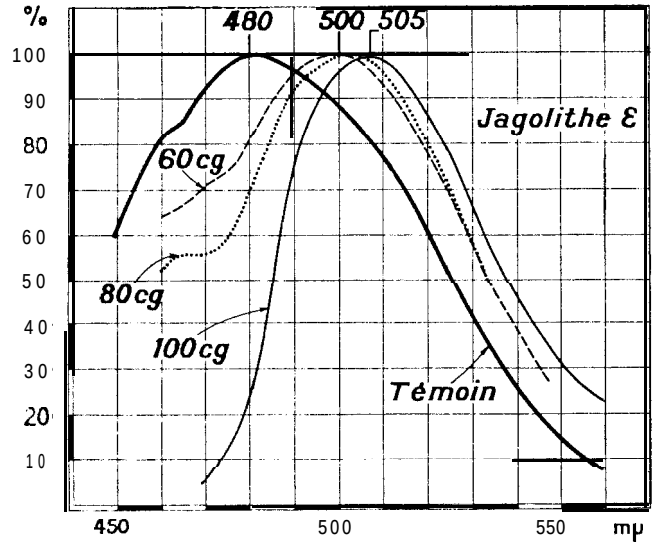

Fig. 3. — Modification du spectre d'absorption lumineuse du complexe acide picrique-créatinine sous l'influence de quantités variables de Jagolithe E.

Les densités optiques sont mesurées à différentes longueurs d'onde et la droite de régression concentration = f (densité optique) est calculée par la technique des moindres carrés. Les valeurs calculées sont alors comparées aux concentrations réelles et l'erreur relative est évaluée.

A titre indicatif, nous reproduisons ici les résultats obtenus avec la Jagolithe A (20 cg).

La précision est bonne à toutes les longueurs d'onde et la droite de régression passe très près de l'origine des axes de coordonnées.

Par contre la concordance est moins satisfaisante entre les valeurs calculées et les valeurs réelles pour les granulations plus fortes et l'erreur augmente avec la grosseur des grains, ainsi que le montre le tableau ci-dessous obtenu pour une λ = 470 mμ.

λ mμ.	Equation de régression μg Créatinine =f. (D.O.)	Quantité de créatinine par tube à essai, en μg					
		10		20		30	
		quantité calculée μg	Erreur relative %	quantité calculée μg	Erreur relative %	quantité calculée μg	Erreur relative %
470	Cr =-0,12 + 82,7 D.O.	10,05	0,5	19,97	0,15	30,02	0,06
480	Cr =-0,09 + 71,7 D.O.	10,09	0,9	20,12	0,6	29,88	0,4
490	Cr =-0,05 + 70,5 D.O.	10,03	0,3	20,11	0,5	29,91	0,3
500	Cr =-0,10 + 73,6 D.O.	10,05	0,25	20,21	1	29,85	0,45
510	Cr =-0,02 + 84,5 D.O.	9,95	0,5	20,17	0,85	29,9	0,33

Fraction	Equation de régression μg Créatinine =f.(D.O.)	Quantité de créatinine par tube à essai, en μg					
		10		20		30	
		quantité calculée μg	Erreur relative %	quantité calculée μg	Erreur relative %	quantité calculée μg	Erreur relative %
A Cr	= -0,12 + 82,7 D.O.	10,05	0,5	19,97	0,15	30,02	0,06
B Cr	= +0,15 + 80,6 D.O.	9,33	6,7	21,02	5,1	29,49	1,5
C Cr	= +0,32 + 99,9 D.O.	9,1	8,9	21,1	5,5	29,5	1,5
D Cr	= -0,91 +105 D.O.	11,1	10,6	20,9	4,6	28,9	3,3
E Cr	= -1,11 + 97 D.O.	11,5	14,8	20,98	5	28,67	4,4

5. — Vérification de la loi de BEER-LAMBERT avec du sérum sanguin

Au cours de cette vérification, des quantités croissantes de sérum déféqué ont été mises en œuvre, la déprotéination étant conduite de la manière suivante :

Sérum sanguin	2 ml
Eau distillée	3 ml
Na tungstate à 10 p. 100	1 ml
H_2SO_4 (0,67 N)	2 ml

On récupère le surnageant obtenu par centrifugation et on le soumet à l'action de 20 cg de Jagolithe A, puis à celle du réactif picro-sodé.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Sérum sanguin utilisé, ml	quantité calculée ml
1	1,02
1,25	1,28
1,50	1,50
1,75	1,72
2	1,98

Par conséquent, qu'il s'agisse de solutions pures de créatinine ou de sérum sanguin déféqué, il existe une proportionnalité entre la densité optique et les quantités de créatinine mises en jeu.

6. — Essais de récupération de surcharges de créatinine

Avant défécation, on ajoute au sérum des quantités croissantes de créatinine. Nous reproduisons ici des résultats d'un essai qui montrent une récupération satisfaisante des surcharges ainsi réalisées.

Surcharge réalisée µg Créatinine	Surcharge récupérée µg Créatinine
0	0
2,5	2,6
5	5,1
7,5	7,4
10	10,2
15	15,1

La déprotéination du sérum ne se traduit donc pas par une perte de Créatinine.

7. — Sélectivité de l'adsorption

Parmi les nombreuses substances qui peuvent donner une réaction Jaffe positive, nous avons testé le comportement de l'acétone et du glucose.

En solution, ces substances ne sont pas adsorbées par la Jagolithe. Ajoutées à des solutions pures de créatinine ou aux sérums, elles ne modifient pas les résultats des dosages.

8. — Technique de dosage adoptée pour la créatinine sanguine

A. — *Réactifs* :

1) *Solution mère* de créotinine :

Créatinine pure Merck ..... 0,250 g
HCl 0,1 N .....qs 250 ml

conserver en flacon teinté sous toluène.

2) *Solution de* créafinine *à 10* µg/cm³ :

Préparer extemporanément à partir de la solution mère par dilution au 1/100.

3) *Acide picrique recristallisé* de l'acide acétique :

Dissoudre 100 g d'acide picrique dans 150 ml d'acide acétique glacial dans un Erlenmeyer, en chauffant. Poursuivre le chauffage jusqu'à ébullition. Filtrer sur filtre à plis dans un entonnoir sec et chaud. Recueillir le filtrat dans un flacon sec. Recouvrir d'un verre de montre et laisser une nuit à la température ambiante. Filtrer sous vide sur verre fritté, laver avec de l'acide acétique glacial froid. Continuer l'aspiration jusqu'à disparition de l'odeur d'acide acétique et sécher à 80-90° en maintenant un courant d'air.

4) *Solution saturée d'acide picrique* :

Acide picrique recristallisé 1,2 g
Eau distillée ..... 100 ml

5) *Réactif picro-sodé* :

Solution saturée d'acide picrique 55 ml
NAOH (2,5 N) ..... Qs 11 ml
Eau distillée ..... Qs 200 ml

6) *Acide sulfurique* 0,67 *N*

7) *Sodium tungstate*, ***solution aqueuse 10*** p. 100 à préparer extemporanément.

8) Préparation de *la Jagolithe* A

Placer l'argile pendant une nuit à l'étuve à 100-105° C. Broyer finement au **mixer. Tamiser** et conserver la Jagolithe traversant la maille de bronze n° 190.

B. — Technique :

a) défécation du sérum :

Introduire dans un tube à centrifuger conique :

Sérum	2 ml
Eau distillée	3 ml
Na tungstate 10 %	1 ml
H_2SO_4, 0,67 N	2 ml

Mélanger avec un agitateur. Centrifuger 10 minutes. Décanter le surnageant.

b) Préparation de la gamme étalon :

Introduire dans trois tubes à centrifuger coniques :

	tube0	tube1	tube2
Solution créatinine à 10 µg/cm³	0	1 ml	2 ml
Eau distillée, ml	5	4	3
Na tungstate 10 p. 100	1	1	1
H_2SO_4, 0,67 N, ml.	2	2	2

c) **Extraction** de *la* **créatinine.**

Introduire dans un tube à centrifuger conique 4 ml du liquide de centrifugation des sérums déprotéinés.

Ajouter dans tous les tubes (sérums déproteinés et gamme étalon), 25 cg de Jagolithe A (une mesure peut être confectionnée à cet effet).

Agiter avec une baguette de verre trois fois en dix minutes. Rincer l'agitateur. Centrifuger pendant 10 minutes. Rejeter le liquide surnageant, laisser égoutter les culots de centrifugation.

d) Développement de *la* coloration.

Ajouter dans chaque tube 7,5 ml de réactif picro-sodé. Agiter pour remettre le culot en suspension trois fois en dix minutes. Centrifuger pendant dix minutes et recueillir le surnageant dont on détermine la densité optique à 520 mµ.

e) Calculs :

A l'aide de la gamme étalon, établir la formule de régression donnant la concentration en fonction de la densité optique, (méthode des moindres carrés). Utiliser cette formule pour le calcul des concentrations sanguines.

Laboratoire national de *recherches* véférinaires de Dakar-Hann-Sénégal
Laboratoire de biochimie.

RÉSUMÉ

La créatinine sanguine peut être électivement adsorbée sur une argile montmorillonite, la terre de BEZENET (Jagolithe). Après élution, la créatinine peut être soumise à un dosage colorimétrique basé sur la réaction de JAFFE. La méthode proposée repose sur les points expérimentaux suivants :

1° Le pouvoir adsorbant de l'argile est d'autant plus fort que la taille des grains est plus faible. Il est inférieur à celui du réactif de Lloyd.

2° Les spectres d'absorption lumineuse des complexes colorés créatinine-acide picrique dépendent de la quantité et de la granulation de la Jagolithe utilisée. Avec une argile grossière le maximum d'absorption se déplace vers les grandes longueurs d'onde tandis que l'intensité de cette absorption diminue pour les courtes longueurs d'onde.

3° La coloration propre du réactif picro-sodé s'intensifie légèrement au contact de l'argile.

4° Les complexes colorés obtenus après élution suivent de très près da loi de BEER-LAMBERT lorsqu'on utilise une argile traversant les tamis n° 190. Avec des granulations plus fortes, les résultats sont moins bons.

5° Avec le sérum sanguin déprotéiné (Na tungstate-SO_4H_2) on note également une bonne proportionnalité entre coloration et concentration.

6° Les surcharges de créatinine ajoutées au sérum sont quantitativement récupérées.

SUMMARY

Use of montmorillonite (the clay of Benezet)
in the selective dosage of the blood oreatinine of the domestic ruminants

The blood creatinine can be electively adsorbed upon a montmorillonite, the clay of Benezet (Jagolithe). After elution, the creatinine can be estimated by the colorimetricdosage based on the reaction of Jaffe. The proposed method is based on the following experimental points :

1º The adsorbing capacity of the clay is the higher as the size of the grains is small. It is inferior to one of the Lloyd's reagent.

2º The spectra of luminous absorption of the coloured complexes creatinine-picric acid, are dependent on the quantity and the granulation of the Jagolithe used. When a coarse clay is used, the maximum absorption is seen with the long wave-lengthes whereas the intensity of absorption decreases for the short wave-lengthes.

3º The colouration itself of the reagent picro-sodic increases slightly by contact with the clay.

4º The coloured complexes obtained after elution follow very closely the law of Beer-Lambert when the clay filtered through sieves nº 190 is utilized. The results are not so good when bigger granulations are used.

5º With the proteinless blood serum (Na tungstate-H_2SO_4), there is a good proportionality between colouration and concentration.

6º The added overcharges of creatinine to the serum are quantitatively recovered.

RESUMEN

Utilización de una montmorillonita, la tierra de Bezenet,
en la dosificación selectiva de la creatinina sanguina de los rumiantes domésticos

La creatinina sanguina puede quedar electivamente absorbida por una arcilla montmorillonítica, la tierra de Benezet (Jagolithe). Previa elución, la creatinina puede quedar sometida a una dosificacion colorimétrica fundada en la reaccion de Jaffe. El método propuesto toma apoyo en los puntos experimentales siguientes :

1º El poder adsorbente de la arcilla es tanto mas fuerte cuanto mas reducida es la dimension de los granos, siendo inferior al del reactivo de Lloyd.

2º Los espectros de absorcion luminosa de los complejos coloreados creatinina-Qcido pícrico dependen de la cantidad y de la granulación de la Jagolithe utilizada. Con una arcilla basta, la absorción maxima se desplaza hacia las grandes longitudes de onda, mientras que la intensidad de esta absorcion disminuye para las cortas longitudes de onda.

3º La coloración propia del reactivo picro-sodado se intensifica ligeramente al entrar en contact0 con la arcilla.

4º Los complejos coloreados obtenidos después de la elución son muy semejantes a las condiciones de la ley de Beer-Lambert cuando se utiliza una arcilla que pasa por la malla 190. Cuando se opera con granulaciones mas fuertes, los resultados son menos buenos.

5º Con el suero sanguineo desproteinado (Na Tungstato-SO_4H_2) se pone de manifiesto, asimismo, una buena proporcionalidad entre coloración y concentración.

6º Las sobrecargas de creatinina añadidas al suero quedan cuantitativamente recuperadas.

BIBLIOGRAPHIE

KAYSER, (F.), MOLITOR, (A). — Annales *Pharm. Franc. (1956)* 14,197. 208.

KAYSER, (F.), MOLITOR, (A). — Ann. *Biol. Clin.*, (1956) **14**, 224-228.

MEUNIER, (P.), VINET, (A). — Bull. Soc. *Chim. Biol.*, (1943) 25, 327-331.