

COMPOSITION DE LA TROUSSE

Un bloc comparateur,
Un coin colorimétrique,
Quatre cuves de comparaison,
Deux ampoules.

REACTIFS :

2 ampoules contenant chacune 0,05 gr. de nitrite d'ammonium,
— — — 0,25 gr. de sulfamate.
— — — 0,05 gr. de réactif IV.
Ces réactifs sont en quantité suffisante pour effectuer 100 dosages.

SOCIÉTÉ GÉNÉRALE D'APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES

MAXIME VAILLANT, Pharmacien
Docteur de l'Université de Paris



98, Rue de Sèvres - PARIS (7^e)
Tél. : Ségur 13-10

R. Marchand - 1946

TROUSSE

pour le dosage du Septoplix libre
paraminophénylsulfamide ou H62 P
dans les liquides biologiques

PRINCIPE

Le Septoplix libre se dose dans les liquides biologiques par la méthode colorimétrique.
La technique utilisée est celle qui fut étudiée et mise au point par E. J. H. Marshall.

Elle a pour base l'obtention, à partir de la réaction amurée au 1162 F, d'un colorant azoïque résultant de la combinaison d'une molécule de 1162 F et d'une molécule d'un réactif spécial, le réactif IV (1)

L'intensité de la coloration obtenue est fonction de la concentration du 1162 F dans le milieu étudié

Le dosage du Septoxidix dans un liquide biologique comporte donc deux séries d'opérations :

- 1° Préparation du milieu et formatage au sein du milieu préparé de la coloration spécifique ;
- 2° Evaluation de l'intensité de cette coloration pour en déduire la concentration du 1162 F.

Nous allons décrire successivement chacune de ces deux séries d'opérations

(1). Pour des raisons de commodité, la fabrication du réactif nécessaire au Laboratoire de Chimie Thérapeutique de l'Institut Pasteur a été confiée au réactif IV (dichlorhydrate de N-(1-naphthyl éthylène diamine) employé par le réactif IV (monochlorhydrate de 1-naphthyl N-dééthyl p-aminobenzène) qui s'emploie dans les conditions identiques et donne exactement la même coloration

I. — PREPARATION DU MILIEU ET

FORMATION DE LA COLORATION SPECIFIQUE

REACTIFS NECESSAIRES

1° Acide trichloracétique à 15 0/0 (15 gr. dissous dans de l'eau distillée, compléter à 100 cc)

2° Solution de nitrite de sodium à 0 gr. 10 0/0 (0 gr. 05 dans 50 cc eau distillée). Cette solution doit être renouvelée dans les 15 jours au moins.

3° Solution de sulfamate d'ammonium à 0 gr. 5 0/0 (0 gr. 25 dans 50 cc eau distillée).

4° Solution aqueuse de réactif IV (0 gr. 05 dans 50 cc eau distillée). Cette solution doit être conservée dans une bouteille bouchée, ou à l'obscurité.

TECHNIQUE DU DOSAGE

La technique à employer est variable, selon le milieu envisagé : sang, liquide céphalo-rachidien, urine ou tissu.

A. — SANG

Deux cas, selon que l'on est en présence de sang total ou de sérum

1° Sang total :

Prendre 1 cc de ce sang oxalate ou citrate.

Ajouter 15 cc d'eau distillée ; agiter ; attendre 1 ou 2 minutes

Ajouter 4 cc d'acide trichloracétique à 15 0/0 ; agiter ; filtrer sur papier.

2° Sérum :

Prendre 1 cc de sérum.

Ajouter 15 cc d'eau distillée ; agiter ; attendre une ou deux minutes

Ajouter 4 cc d'acide trichloracétique à 15 0/0 ; agiter ; filtrer sur papier.

Prendre 10 cc de filtrat (qui contiennent 0 cc 5 de sang ou de sérum)

Ajouter 1 cc de nitrite de sodium à 1 0/0 ; agiter ; attendre 3 minutes

Ajouter 1 cc de sulfamate d'ammonium à 0,5 0/0 ; agiter ; attendre deux minutes.

Ajouter 1 cc de réactif IV ; agiter

Après une ou deux minutes, mesurer au comparateur. (Voir remarque 1).

B. — LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN

Prendre 1 cc de liquide céphalo-rachidien.

Ajouter 15 cc d'eau distillée ; agiter ; attendre une ou deux minutes.

Ajouter 4 cc d'acide trichloracétique à 15 0/0 ; agiter ; filtrer s'il y a un trouble.

Prélever 10 cc du filtrat (qui contiennent 0 cc 5 de liquide céphalo-rachidien)

Ajouter 1 cc de nitrite de sodium à 0,1 0/0 ; agiter ; attendre trois minutes

Ajouter 1 cc de sulfamate d'ammonium à 0,5 0/0 ; agiter ; attendre deux minutes.

Ajouter 1 cc de Réactif IV ; agiter

Après une ou deux minutes, mesurer au comparateur (Voir remarque 1)

C. — URINE

Diluer l'urine dix fois

Prendre 1 cc de cette urine diluée

Ajouter 2 cc d'acide trichloracétique à 15 0/0

Ajouter 7 cc d'eau distillée.

Ajouter 1 cc de nitrite de sodium à 0,1 0/0, agiter, attendre quatre minutes.

Ajouter 1 cc de sulfamate d'ammonium à 0,5 0/0, agiter, attendre deux minutes.

Ajouter 1 cc de Réactif IV, agiter.

Après une ou deux minutes, mesurer au comparateur (voir remarque 1)

D. — TISSU

Prendre 1 gr. environ du tissu à analyser. Peser exactement, mettre dans un mortier.

Ajouter une pincée de quartz pilé et 4 cc d'acide trichloracétique à 15 0/0

Broyer finement jusqu'à formation d'une pâte bien homogène

Ajouter 5 cc d'eau environ, mélanger soigneusement. Transvaser dans une fiole jaugée de 20 cc, compléter à 20 cc exactement avec de l'eau, filtrer

Prélever 10 cc du filtrat (suc tissulaire).

Ajouter 1 cc de nitrite de sodium à 1 0/0, agiter, attendre trois minutes.

Ajouter 1 cc de sulfamate d'ammonium à 0,5 0/0, agiter, attendre une ou deux minutes.

Ajouter 1 cc de réactif IV, agiter. Après une ou deux minutes, mesurer au comparateur (voir remarque 1)

Ramener le nombre trouvé à 100 gr d'organe frais.

II. — EVALUATION DE L'INTENSITÉ DE LA COLORATION

Cette évaluation se fait au moyen du « Comparateur Théraplix ». Avant d'indiquer le fonctionnement et la manière d'utiliser ce comparateur, une description sommaire de l'instrument nous paraît nécessaire.

DESCRIPTION DU COMPAREUR

Cet instrument a été conçu en vue de permettre d'effectuer tous les dosages colorimétriques quels qu'ils soient. Il se compose, essentiellement d'une gamme de comparaison constituée par un coin colorimétrique, d'un bloc comparateur proprement dit et de divers accessoires.

COIN COLORIMETRIQUE

Le coin colorimétrique est une lame prismatique colorée dans la masse et d'épaisseur croissant régulièrement d'une extrémité à l'autre (Voir Fig. 1).

On conçoit parfaitement comment un tel instrument peut servir de gamme de comparaison, car, regardant au travers du coin, il est évident qu'on perçoit en B une impression colorée plus intense qu'en A.

Le coin porte à sa partie inférieure une graduation permettant de repérer exactement la région utilisée pour la lecture. (Voir remarque 2).

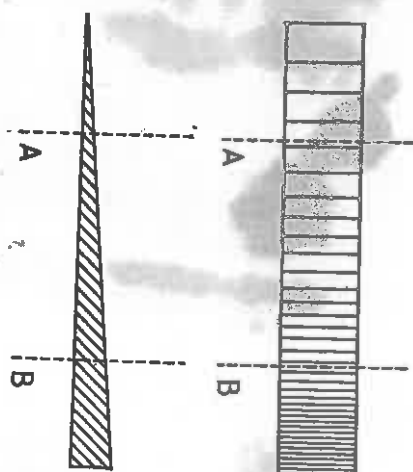


Fig. 1

BLOC COMPAREUR

Ce bloc comparateur comprend un bloc en bois, en forme de parallélépipède droit. Il est percé d'une fente de visée le traversant de part en part

de l'une à l'autre des deux faces opposées. L'une des extrémités de cette fente est garnie d'un diffuseur de lumière, en verre opale, l'autre est protégée contre l'éclairage direct de la lumière ambiante, au moyen d'un pare-soleil de forme cylindrique.

Tenant l'appareil en mains, à hauteur des yeux, le diffuseur tourné vers une fenêtre éclairée et regardant au travers du pare-soleil, l'observateur voit donc sur une surface vivement éclairée en lumière blanche.

Grâce à un cache perforé et placé convenablement, cette surface est subdivisée en deux plages de comparaison juxtaposées, situées l'une au-dessus de l'autre.

D'autre part, le bloc est également percé dans une direction perpendiculaire à la ligne de visée, d'un évidement cylindrique destiné à recevoir les cuves contenant le liquide à doser.

Une vis placée sous la face inférieure du bloc permet de faire varier à volonté la hauteur utile de l'évidement. Enfin, un

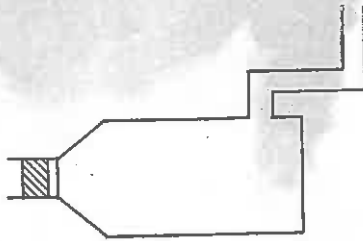


Fig. 2

dispositif de glissière soutient le coin qui peut ainsi défilier horizontalement devant la plage de comparaison inférieure.

ACCESSOIRES

Ils comprennent des cuves de comparaison cylindriques exactement calibrées, à fond plat et dressé et des ampoules spéciales ayant la forme ci-contre (Fig. 2).

FONCTIONNEMENT ET MODE D'EMPLOI

1° Remplir complètement l'ampoule spéciale avec de l'eau, boucher soigneusement, puis éliminer les dernières bulles d'air en les faisant sortir par le tube latéral (remarque 3).

2° Introduire l'ampoule ainsi remplie dans l'évidement cylindrique en plaçant le bouchon à la partie inférieure. Un évidement supplémentaire placé à côté de l'évidement principal permet de loger le tube latéral (Fig. 3).

L'ampoule ainsi introduite tombe d'elle-même au fond de l'évidement et repose par son bouchon sur la pointe de la vis de réglage.



Fig. 3

3° Agir sur la tête de vis pour faire monter ou descendre l'ampoule, jusqu'à ce que le fond de cette ampoule soit masqué par la séparation des deux plages.

4° Introduire de droite à gauche le coin dans les glissières en plaçant la graduation en bas. Le coin mis en place couvre entièrement la plage de comparaison inférieure de sorte que celle-ci éclairée par de la lumière diffusée par l'opale et ayant traversé successivement l'ampoule remplie d'eau et la région du coin placée devant la fente de visée, paraît colorée et cela d'autant plus que la région du coin située devant la fenêtre est plus épaisse. Quand on déplace le coin de la droite vers la gauche, l'intensité de la coloration de la plage de comparaison va en augmentant.

5° Mettre dans une cuve de comparaison quelques cc du liquide à doser et dans lequel on a réalisé préalablement la réaction chimique colorimétrique (1).

6° Placer la cuve contenant le liquide dans l'évidement cylindrique ; elle repose alors sur le fond de l'ampoule et se trouve située sur le trajet des rayons lumineux qui éclairent la plage supérieure. L'intensité de la coloration de cette plage dépend de la concentration du Septoplix dans le liquide étudié.

(1) Cette réaction peut être faite dans un tube à essai quelconque ou dans n'importe quel vase de laboratoire.

7° Faire la mesure en faisant coulisser le coin jusqu'à ce que les deux plages paraissent également colorées.

8° Lire le chiffre de la graduation du coin qui, dans cette position d'équilibre, se trouve en face de l'index.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La teneur en Septoplix du liquide étudié peut être déduite du nombre lu sur la graduation du coin, grâce à un tableau de correspondance livré avec l'appareil (remarques 4 et 5).

REMARQUES IMPORTANTES

1° L'intensité de la coloration de l'azocique formé ne reste constante que pendant une heure environ. Il est donc indispensable d'effectuer la mesure dans les soixante minutes qui suivent l'instant où la réaction chimique a été faite.

2° Bien que la matière colorante constituant le coin soit parfaitement stable à la lumière, il est expressément recommandé, pour la bonne conservation du coin, de ne pas le laisser inutilement exposé à la lumière ni surtout aux rayons directs du soleil. Remettre le coin dans sa boîte aussitôt après usage.

3° Le but de cette ampoule est de permettre l'examen des deux plages de comparaison dans les mêmes conditions optiques.

Quand le liquide où l'on désire doser le Septoplax est incolore, sérum, liquide céphalo-rachidien, par exemple, remplir l'ampoule avec de l'eau ; quand, au contraire, le liquide est coloré comme c'est le cas pour l'urine ou certains sucs tissulaires, pour maintenir l'identité des conditions optiques d'examen, remplir l'ampoule avec quelques cc du liquide même que l'on dose (avant formation, évidemment, de la coloration spécifique).

4° Les indications données par le tableau correspondent exactement aux dilutions décrites dans la première partie. Toutefois, en présence d'une solution très concentrée en Septoplax, il peut y avoir intérêt, pour la précision de la mesure, à diluer davantage.

La précision de la lecture est en effet plus grande pour les solutions faiblement colorées que pour les solutions fortement colorées. Dans la pratique, il y a intérêt à employer des dilutions telles que la lecture puisse se faire dans la région du coin comprise entre 2,5 et 6,5 environ.

Dans le cas où l'on est obligé d'employer une dilution plus forte que celle indiquée dans la méthode, il y a lieu de multiplier les indications du tableau par un coefficient égal au rapport de dilution.

Exemple :

Soit une urine que l'on a dû diluer, pour faire la lecture avec toute la précision voulue, 40 fois par exemple au lieu de 10 et pour laquelle la mesure a donné la concentration 3,5 0/0.

La concentration réelle du Septoplax est dans ce cas :

$$3,5 \times \frac{40}{10} = 14 \text{ mgrs } 0/0$$

5° Tous les coins utilisés dans les comparateurs Thérapiix sont numérotés et ont été étalonnés individuellement. Un tableau de correspondance déterminé ne doit donc être employé qu'avec le coin portant le même numéro.

6° Le comparateur Thérapiix permet également de doser le Dagénan 693 et le Sulfathiazol.

La technique du dosage est exactement la même que pour le Septoplax. Toutefois, le colorant formé avec l'un ou l'autre de ces deux corps est relativement peu soluble et peu stable. Il est alors recommandé :

1° D'opérer en solution plus gélifiée qu'avec le Septoplax ;

2° De faire la lecture dans les dix minutes qui suivent la réaction chimique.

Le même tableau de correspondance peut être employé, mais, en raison de la différence de poids moléculaire, dans le cas du Dagénan ou du Sulfathiazol, multiplier ses indications par le coefficient 1,5.

L'intensité de coloration correspondant à une concentration en Septoplax de 2 0/0 par exemple, correspond en Dagénan ou Sulfathiazol à une concentration de $2 \times 1,5 = 3$ 0/0.

TABLEAU DE CORRESPONDANCE DU COIN N° 194

Nombre lu sur la graduation du coin, en face de l'index	Teneur en Septoplax exprimé en mmgrs pour 100 cc. de liquide examiné	
	Sang, liquide céphalo-rachidien suc tissulaire	Urine
2,2	1	5
2,5	1,5	7,5
2,8	2	10
3,1	3	15
4,25	4	20
4,82	5	25
5,4	6	30
5,75	7	35
6,1	8	40
7,2	10	50
8,3	12	60