

UNIVERSITE MOHAMMED V

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE RABAT

2ème ANNEE DE PHARMACIE

# **TRAVAUX PRATIQUES. TOXICOLOGIE I**

**Pr. Y. CHERRAH**

**Pr. A. ZELLOU**

**Pr. S. SERRAGUI**

Laboratoire de Pharmacologie –  
Toxicologie 2007-2008

## ***Remerciements***

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **L. EL IDRISSI** pour sa collaboration scientifique et pour son aide en matériel dans un climat de confiance et d'amitié.

## **RECOMMANDATIONS AUX ÉTUDIANTS**

- . Il est impératif de respecter la répartition des groupes de TP*
- . Le port de la blouse blanche est obligatoire pendant les séances.*
- . Chaque étudiant avant de quitter la salle doit nettoyer sa paillasse ainsi que le matériel utilisé.*

## **SOMMAIRE**

RECHERCHE ET DOSAGE DE L'ETHANOL.....	1
RECHERCHE DES BENZODIAZEPINES.....	7
RECHERCHE ET DOSAGE DES SALICYLES.....	11
DOSAGE DU PARACETAMOL SÉRIQUE EN CAS D'INTOXICATION	
METHODE DE GLYNN ET KENDAL-1975.....	14
ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE.....	16
RECHERCHE TOXICOLOGIQUE DES ANTICOAGULANTS.....	20
RECHERCHE ET DOSAGE DES BARBITURIQUES.....	23
RECHERCHE ET DOSAGE DES PHENOTHIAZINES	
ET DES IMIPRAMINES.....	27

# RECHERCHE ET DOSAGE DE L'ETHANOL

## I/Recherche

### A/ Test de Curry

#### 1- Principe

La recherche de l'alcoolémie par le test de Curry peut être effectuée sur sang total prélevé sur fluorure de sodium. On utilise des cellules de Conway.

#### 2- Réactifs:

- Solution saturée de carbonate de potassium dans l'eau distillée ( $K_2CO_3$ )
- Réactif A: Acide sulfurique pur ( $d=1,83$ )
- Réactif B : Solution 0,1 N de bichromate de potassium

Bichromate de potassium.....4,90 g

Eau distillée q.s.p .....1000ml

- Réactif sulfochromique préparé extemporanément

Mélanger 100 ml de A et 1000 ml de B.

#### 3- Matériel :

- Cellule de Conway.
- Table oscillante de Dale.

#### ***4-Mode opératoire :***

Dans le compartiment central d'une cellule de Conway, placer 1ml de réactif sulfochromique. Dans le compartiment latéral, placer 1ml de sang et, à l'opposé, 1ml de solution saturée de carbonate de potassium.

Fermer la cellule , l'étanchéité étant assurée, mettre en contact le sang et la solution saturée de  $K_2CO_3$  par un doux mouvement de rotation.

Placer la cellule sur la table oscillante pendant quinze minutes

Faire un témoin dans les mêmes conditions, ezn remplaçant le sang par un millilitre d'eau distillée (ou 1ml de sang frais ne contenant pas d'alcool).

#### ***5- Résultats et interprétation:***

Après quinze minutes, placer la cellule sur fond blanc et examiner le compartiment central après avoir homogénéisé le contenu à l'aide d'un petit agitateur en verre « très important » Comparer la coloration de la solution avec celle du témoin .

- Si la coloration reste jaune sans aucun changement :

Alcoolémie  $<0,5$  g par litre .

- Si la coloration jaune virera au vert ou bleu :

Alcoolémie  $>0,5$  g par litre.

« le changement de la teinte de la coloration n'est que pour des taux voisins ou supérieurs à 1 gramme par litre » .

Dans ce dernier cas, il est nécessaire d'effectuer un dosage selon la méthode habituelle ,de façon à préciser le taux d'alcool dans le sang.

## **B/ Alcotest**

### ***1- Principe :***

L'ALCOTEST permet de détecter la présence d'alcool dans le sang à partir de l'air expiré.

Elle est utilisée par la prévention routière.

Le principe de cette technique est basé sur le fait qu'environ 2 L d'air alvéolaire contiennent la même quantité d'éthanol qu'un ml de sang.

### ***2-Description du matériel Alcotest:***

Les boîtes ALCOTEST contiennent 10 tubes réactifs, 10 embouchures stérilisées et un poche en matière plastique. Les tubes ALCOTEST, scellés aux deux extrémités, contiennent une masse réactive jaune qui se colore en vert en présence de vapeurs d'alcool.

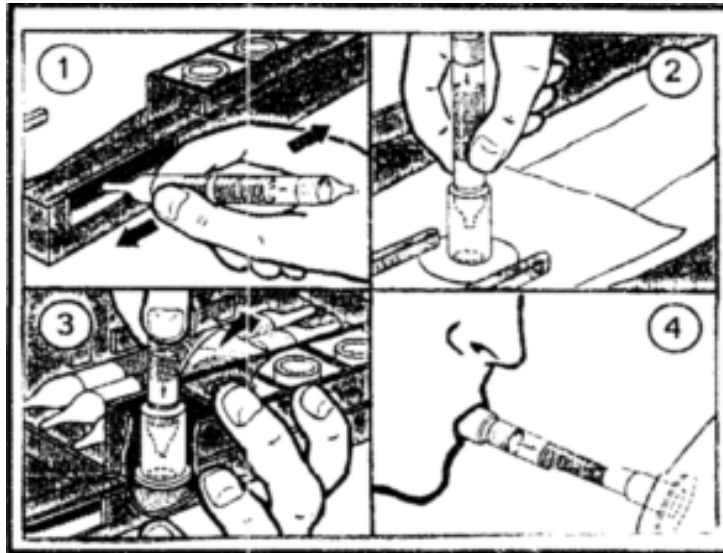
Sur le tube ALCOTEST sont imprimés:

- a) une flèche indiquant le sens dans lequel doit être expulsé l'air expiré;
- b) un anneau repère blanc, qui divise la coluche réactive jaune en deux parties égales.

### ***3- Conditions de conservation et d'utilisation:***

Les tubes Alcotest peuvent être stockés pendant 3 ans, à la condition d'être conservés sous emballage fermé à l'abri de la lumière et à une température inférieure à 30°C.

Toutefois avant utilisation, on s'assurera que le contenu des tubes ALCOTEST est toujours d'un jaune pur.



#### ***4-Mode d'emploi:***

a) - Prélever un tube de la boîte Alcotest ;

- Saisir ce tube le plus près possible de la pointe à ouvrir;
- Entamer la pointe en l'appuyant légèrement sur la petite scie se trouvant sur le côté de la boîte;
- Briser la pointe dans l'ouverture prévue à cet effet;
- Casser de même l'autre pointe (voir fig.1).

b)Placer le tube dans l'orifice de la poche en matière plastique vide, c'est-à-dire aplatie, de telle sorte que la flèche imprimée sur le tube soit dirigée vers la poche (voir fig.2).

c) Après avoir enlevé le papier recouvrant une embouchure (voire fig.3):

- Faire entreR en force le tube Alcotest dans cette embouchure, en tenant le tube entre le pouce et l'index et en évitant soigneusement de toucher l'embouchure;

- L'embouchure peut alors être retirée de la boîte dans laquelle elle est placée (voir fig.3)
- Pour procéder à une épreuve, le sujet doit remplir complètement et dans toute la mesure du possible en une seule expiration, la poche en matière plastique par l'intermédiaire de l'embouchure et du tube ALCOTEST;
- Cette opération doit durer au minimum 10 secondes et au maximum 20 secondes (voire fig.4);
- Après usage séparer le tube de la poche en tenant celle-ci par son embout!

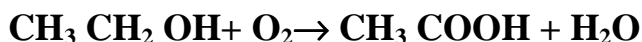
### ***5-Résultats:***

- Sera considérée comme positive toute épreuve dans laquelle la masse réactive jaune virera au vert;
- L'épreuve de L'ALCOTEST doit faire au plus tôt 15 minutes après l'absorption de boissons alcoolisées ou aromatiques (jus de fruit).
- Ce temps d'atteinte est également nécessaire après utilisation d'un vaporisation buccale;
- De plus, la personne à tester ne doit pas fumer ou sucer de bonbons alcoolisés, ni immédiatement dans les 15 minutes précédant l'épreuve, ni pendant le test. La coloration brune résultat d'une forte proportion de fumée de tabac, peut altérer la coloration réactive initiale. Dans ce cas le contrôle doit également être répété après 15 minutes.

## II/ DOSAGE PAR LA MÉTHODES DE CORDEBARD

### *1/Principe:*

Extraction de l'alcool par distillation en présence d'acide picrique et oxydation à froid le bichromate de potassium en solution azotique, selon le principe indiqué par CORDEBARD.



### *2-Matériel :*

- Appareil de SCHLOESING-AUBIN .....1
- Ballon jaugé de 250 ml.....1
- Chauffe ballon .....1
- Réfrigérant .....1
- Cristallisation de 500ml.....1
- Erlenmeyers de 250 ml bouché émeri.....2
- Burette graduée en 1/20ème de ml.....1
- Billes de verre lavée au sulfochromique
- Bêchers de 100ml.....;.....2
- Eprovettes de 50 ml.....3
- Pipettes graduées
- Pissette.....1
- Entonnoir .....1

### *3-Réactifs :*

- Solution saturée d'acide picrique à 1,5%  $\text{HO} \text{C}_6 \text{H}_2 (\text{NO}_2)_3$  : 15g environ d'acide picrique sont dissous à chaud dans 800ml d'eau bidistillée. Porter la solution à ébullition durant 10 minutes pour chasser les matières volatiles éductrices. Après refroidissement compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée. Utiliser la solution saturée surnageante.

➤ Solution nitro-chromique N/10:

- Bichromate de potassium pur et sec .....4g.

- Acide nitrique pur  $d = 1,39$  (exempt de vapeurs nitreuses préparant, barboter pendant 15 minutes un courant d'air filtré sur tampon de coton).....q.s.p.  
1000ml

➤ Thiosulfate de sodium N/10.

➤ Iodure de potassium pur.

**4- Mode opératoire:**

**a) Extraction :**

Avant de faire l'extraction, il est nécessaire de nettoyer très soigneusement les différentes pièces de l'appareil au mélange sulfochromique et de les laver ensuite plusieurs fois à l'eau distillée.

Compléter le nettoyage en distillant dans l'appareil monté , 400 à 500 ml d'eau distillée dont on recueille 250 à 300 ml qui serviront à rincer le ballon distillatoire et la verrerie.

Introduire 10 ml de sang récolté sur oxalate ou sur fluorure de sodium, en agitant constamment, dans le ballon de l'appareil d'Aubin renfermant 60 ml de solution saturée d'acide picrique, et quelques billes de verre.

Distiller 20 à 30 ml dans une éprouvette jaugée de 50 ml refroidie par de la glace et préalablement garnie de 15 ml d'eau distillée en ayant soin que le tube terminal de l'appareil plonge jusqu'au fond de l'éprouvette jaugée dans cette eau distillée .

La distillation terminée, rincer le tube et compléter à 50 ml à l'aide d'eau distillée, agiter.

### b) Dosage :

Introduire successivement dans un erlenmeyer B.E de 250 ml : 10 ml de solution nitro-chromique N/10 et 5 ml de distillat. Boucher, agiter en tournant pendant 5 minutes. Ajouter alors 40 ml d'eau distillée. Introduire 1g d'iodure de potassium et 100 ml d'eau distillée « préparé à l'instant » .Après une minute de contact, verser à la burette le thiosulfate de Na N/10 = « X1 » jusqu'à disparition de la coloration jaune et virage au bleu des sels de Cr. Faire le même essai témoin en remplaçant le distillat par 5 ml d'eau distillée soit « X<sub>2</sub> ».

### c)Taux de l'alcoolémie:

$(X_2\text{ml}-X_1\text{ml}) \times 1,15 = \text{poids d'alcool /litre de sang.}$

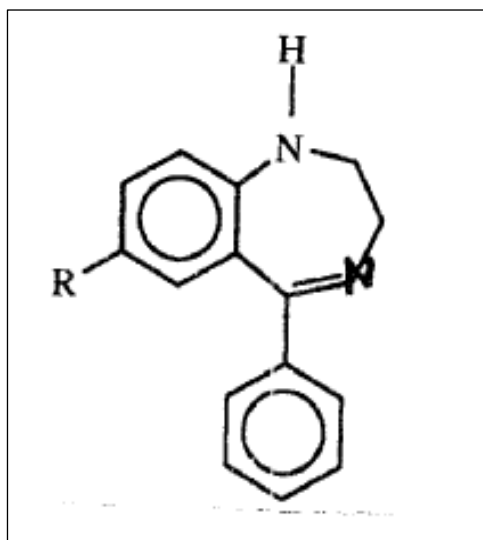
Gr d'alcool / litre de sang.

<b>Alcoolémie</b>	<b>Clinique</b>
Inférieur ou égale à 0,50g/l	Pas de signes cliniques appréciables
0,50-1g/l	Pas de symptômes apparents Diminution du pouvoir de concentration. Tout sujet sensible ou hypoglycémique présente un état d'ébriété.
1-1,50g/l	Ebriété. A 1,50 g/L, L'ivresse est caractérisée
2g/l	Perte de l'attention et incoordination motrice.  L' ivrese peut rester inapparente chez une petite minorité.
3-4g/l	Coma éthylique
5g/l	Seuil des concentrations mortelles
8-10g/l	Mort quasi-certaine

# RECHERCHE DES BENZODIAZEPINES

## I- Par réaction de coloration:

### 1-Principe : Recherche des benzodiazépines



Après hydrolyse acide à partir d'urines

### 2-Réactifs :

- Acide chlorhydrique 6N.
- Nitrite de sodium.
- Sulfamates d'ammonium.
- Réactif de Tréfouël (Sol.aqueuse de chlorhydrate de N-alpha-Naphtyl N, N diethylpropylène à 0,1%)

### 3-Matériel :

- Tubes à essais
- Porte tubes à essais
- Pipettes
- Eprouvettes de 10ml

#### **4- Technique :**

Mettre dans trois tubes à essai 1ml d'urine et 1 ml d'acide chlorhydrique 6N. Introduire les deux derniers au bain marie bouillant pendant 10 minutes, refroidir ces derniers sous un courant d'eau froid puis ajouter dans chaque tube 0,5 ml de sulfamates d'ammonium et 0,5 ml du réactif de Tréfouël.

La présence des benzodiazépines se traduit par l'apparition d'un spot violet.

#### **II- Par spectrophotométrie:**

**1-Principe :** Les benzodiazépines sont extrait à partir du sang en milieu acide à PH=6,7 par l'éther. Le dosage consiste à rechercher le maximum d'absorption.

#### **2- Réactifs:**

- Ether.
- Solution tampon à pH =6,7.
- Soude 0,1N.
- Acide chlorhydrique 2N.

#### **3-Matériel:**

- Tubes à essais
- Porte Tubes à essais.....1
- Ampoule à pied..... 1
- Verre à décantation.....1
- Micropipettes de 1 ml .....1
- Pipettes

#### **4-Technique : Mélanger :**

- 6,5 ml d'éther.
- 1 ml de la solution tampon à pH =6,7.

- 0,5 ml d'eau distillée.
- 1 ml du sang

Agiter au vortex pendant 3 secondes, centrifuger.

Mettre le mélange dans une ampoule à décantation, récupérer la phase étherée puis rincer cette phase avec:

1<sup>er</sup> avec 3 ml de Na OH 0,1N

2<sup>ème</sup> avec 2 ml d'eau distillée.

Faire un spectre d'absorption dans L'U.V entre (200-400) nm contre HCl 2N.

### **5- Résultats:**

- a) Chercher le maximum d'absorption.
- b) Calculer le coefficient d'extinction molaire.

## **III- Par CCM:**

### **1-Principe :**

Les dérivés benzodiazépiniques et leurs métabolites présents dans les urines conduisent, par l'action hydrolysante de l'acide chlorhydrique et à 100°C, à la formation de dérivés qui, séparés par chromatographie sur couche mince, permettent l'identification partielle des benzodiazépines mais, surtout, le classement du composé absorbé en fonction de son activité thérapeutique.

### **2-Réactifs:**

- Acide chlorhydrique pur (d=1,18).
- Ether éthylique.
- Acide chlorhydrique N.
- Sulfate de sodium anhydride.

- Ethanol à 95°.
- Nitrite de sodium à 0,5%.
- Réactif de tréfouel (solution aqueuse à 0,1% de chlorhydrate de N-alpha-naphtyl N,N diethylpropylène).

### 3 - Matériel :

- Erlenmeyers de 250 ml B.E.....2
- Bêchers de 250 ml .....2
- Bêchers de 100ml.....2
- Ampoules à décantation .....2
- Pipettes (types pasteur) .
- Plaques recouvertes de silicagel.
- Lampe ultraviolette.
- Entonnoirs.....2

### 4- Mode opératoire :

#### - Préparation des dérivés d'hydrolyses :

Dans un erlenmeyer de 250 ml bouchant émeri, placer 5 ml d'urines et 2 ml d'acide chlorhydrique (d= 1,18).

Porter le mélange pendant 5 minutes au bain marie à 100°C. Après refroidissement ,extraire les produits d'hydrolyse par 10ml d'éther éthylique .

Après séparation, la phase étherée est lavée deux fois avec 5ml de solution aqueuse d'acide chlorhydrique N, puis deux fois avec 5 ml d'eau distillée.

Après déshydratation par agitation avec du sulfate de sodium anhydre, l'extrait étheré est évaporé.

La solution dans L'éthanol à 95° du résidu d'évaporation est soumise à l'analyse chromatographique.

## **5-Analyse chromatographique :**

a-Absorbant : Couche mince d'oxyde d'aluminium F<sub>254</sub> ; type F, Merk

n° 5713/0025 « plaque prêtes à l'emploi conservées en dessiccateur ».

b-Substance de référence : Benzophénone :3/1.

c-Solvant de migration : - Benzène-chloroforme : 3/1.

- Migration : 10 à 12 cm.

## **6-- Révélation :**

**- Sous lampe ultraviolette à 254 nm**

**- Réaction de diazocopulation :**

Pulvériser sans excès une solution de nitrite de sodium à 0,5% dans l'acide chlorhydrique (d=1,18) au 1/10 (préparée extemporanément). Attendre cinq minutes. Sécher la plaque sous un courant d'air tiède. Pulvériser enfin le réactif de Tréfouel « solution aqueuse à 0,1% de chlorhydrate de N-alpha naphtyl N, N-diéthylpropylène diamine ». Les spots correspondant aux amines aromatiques primaires apparaissent en quelques minutes colorés en violet.

La coloration s'intensifie plus rapidement en plaçant les chromatoplaques à +50°C.

# RECHERCHE ET DOSAGE DES SALICYLES

## 1-Principe :

Dosage colorimétrique de l'ion salicylique en présence de sels ferriques donne la formation d'un complexe chélaté pourpre.

## 2-Réactifs :

### a) Réactif de Trinder (réactif I):

chlorure mercurique .....40g

Eau distillée.....850 ml

Chauffer pour dissoudre. Après refroidissements, ajouter :

Nitrate ferrique  $(\text{NO}_3)_3\text{Fe}, 9\text{H}_2\text{O}$ .....40g

HCl N .....120 ml

Ce réactif est stable indéfiniment.

### b) Solution aqueuse étalon de salicylate de sodium (réactif II):

- Salicylate de sodium.....580mg

- Eau distillée.....250 ml

- Chloroforme.....1 ml

la concentration de cette solution en acide salicylique est de 2g/l.

Elle se conserve plusieurs mois à 4°C au réfrigérateur.

### 3-Matériel :

- -Ampoules à décanter.....2
- Verres à pied de 100ml .....2
- Bêchers de 100 ml .....2
- Tubes à essais
- Porte tubes à essais.....1
- Porte ampoule à décanter .....1
- Micropipette de 1 ml ..... 1
- Entonnoirs ..... 2

### 4- Mode opératoire :

#### a) Extraction et réaction colorée

10 à 20 g d'échantillon sont épuisés par de l'Ether en milieu acide, la phase organique recueillie est évaporée à sec, puis additionnée de quelques gouttes du réactif de Trinder. Si l'addition de ce réactif se traduit par une coloration violette, on en conclut à la présence des salicylés.

#### b) Etalonnage :

La solution étalon de salicylate de sodium est diluée au 1/5 dans l'eau distillée (réactif III). La concentration en acide salicylique est alors de 400 mg/l.

Préparer comme suit une gamme étalon:

<b>Réactif III</b>	00	0,2	0,4	0,6	0,8	1
<b>Eau distillée</b>	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
<b>Réactif I</b>	5	5	5	5	5	5
<b>Concentration</b>	0	80	160	240	320	400
<b>d'acide salicylique en mg/L</b>						

- Agiter;
- Attendre 5 min;
- Centrifuger;
- Attendre 20 min;
- Lire les DO au spectrophotomètre à 530 nm.
- Déduire la courbe d'étalonnage.

**c) Dosage des salicylates:**

\* A partir de la courbe d'étalonnage.

Recueillir le sang sur héparine. Opérer sur le plasma ou le sang total.

Dans un tube à centrifuger introduire:

- Plasma ou sang total.....1 ml
- Réactif de Trinder .....5 ml

- Agiter;
- Attendre 5 min;
- Centrifuger;
- Attendre 20 min;
- Centrifuger;
- Prélever le liquide surnageant;
- Lire au spectrophotomètre à 530 nm ;
- Déduire d'après la courbe d'étalonnage la concentration en mg/l de votre échantillon.

\* A partir de la méthode des trois points.

Dans des tubes à centrifuger de 10 ml, placer:

	<b>Tube n°1</b>	<b>Tube n°2</b>	<b>Tube n°3</b>
<b>- Eau distillée</b>	2ml	1ml	-
<b>-Plasma ou urine</b> (éventuellement diluée)	-	1ml	1ml
<b>- Solution étalon</b>	-	-	1ml
<b>Réactif de Trinder</b>	5ml	5 ml	5ml

- Agiter;
- Attendre 5 min;
- Centrifuger;
- Attendre 20 min;
- Prélever le liquide surnageant;
- Mesurer rapidement les Do au spectrophotomètre à 530 nm (Zéro de Do à faire sur le tube N°1)

#### **5- Résultats:**

Sachant que la concentration en mg d'acide salicylique /l est :

$$(400 * DO2) / (DO3 - DO2)$$

**(DO: Densité optique)**

a) Déterminer la concentration en mg/l des salicylés de votre échantillon.

b) Comparer les résultats des deux méthodes.



4- Solution aqueuse de sulfamate d' $\text{NH}_4$  «  $\text{NH}_4 \text{SO}_3 \text{NH}_2$  » à 30%.

5- Solution de Na OH à 25%

6- Solution étalon de paracétamol à 1mg/ml dans l'eau distillée.

### III-Matériel:

1- Tubes à centrifuger de 10 ml en plastique

2-Cuve photométrique.

### IV- Mode opératoire:

A partir d'une solution de paracétamol à 1mg/ml, préparer une gamme d'étalonnage dans des tubes à centrifuger de 10 ml.

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	50	100	200	Echan
Serum témoin (ml)	1	1	1	1	-
Solution Paracétamol ( $\mu\text{l}$ )	-	50	100	100	-
Eau distillée ( $\mu\text{l}$ )	200	150	100	100	200
Actrichloroacétique (ml)	2	2	2	2	2

- Agiter au vortex pendant 1 minute

- Mettre 2 ml du liquide dans un autre tube

- Ajouter 0,5 ml d'HCl pur et 1 ml  $\text{NaNO}_2$  20%

- Agiter à la main et attendre 2 minutes

- Ajouter très doucement 1 ml de sulfamate d' $\text{NH}_4$  à 30% et 2ml de NaOH 25%

- Agiter au vortex 15 secondes

- Lire l'absorbance à 430nm

- Tracer la courbe d'étalonnage et en déduire la concentration du paracétamol dans votre échantillon X

-Sachant que le taux sérique toxique est supérieur à 50mg/l après 10 heures d'ingestion ou 200mg/l après 2 heures, qu'en concluez-vous ?

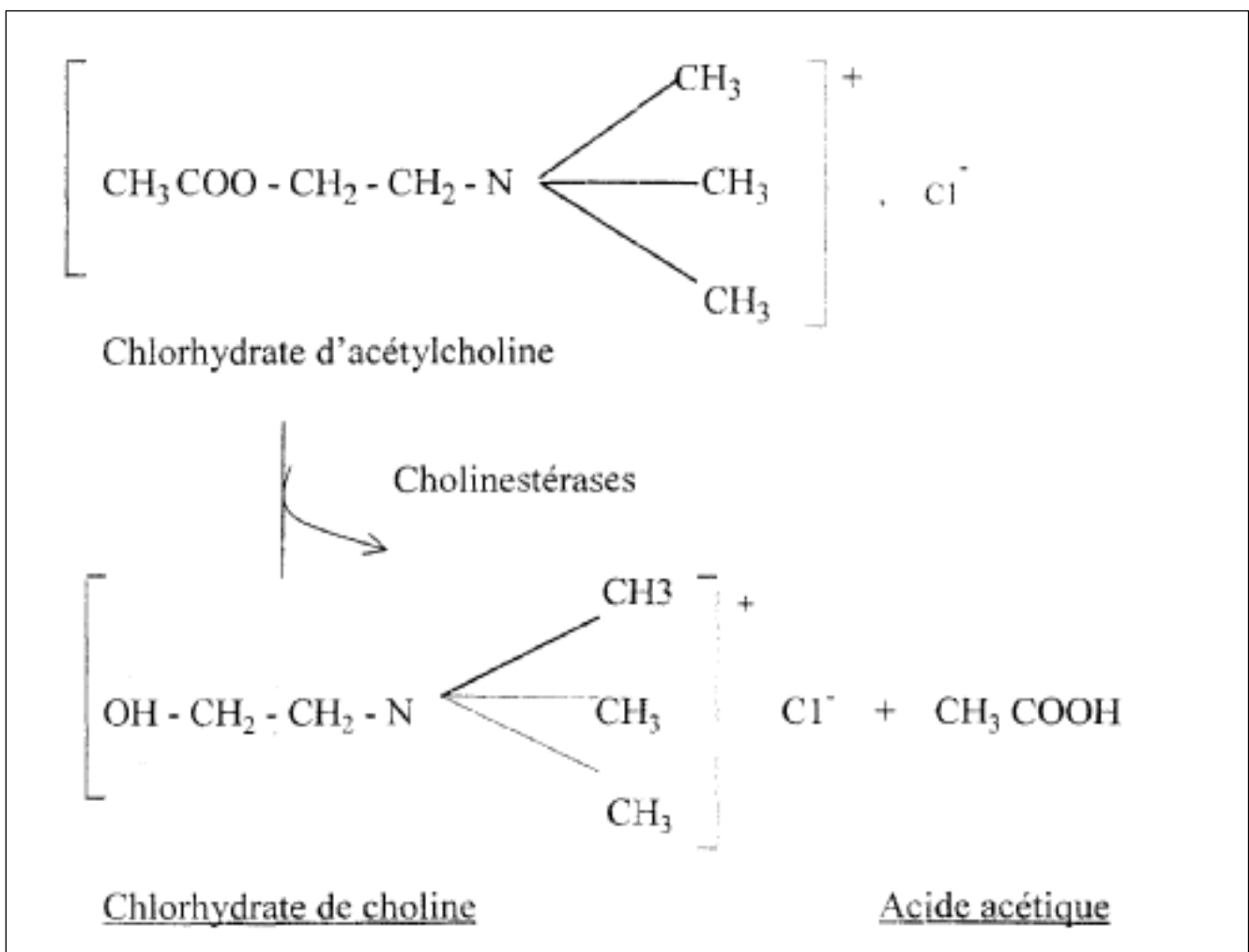
Remarque : L'emploi du sulfamate d'ammonium pour but de détruire l'excès de  $\text{NaNO}_2$  qui pourrait gêner le développement de la coloration, ce qui conduit à un dégagement d'azote.

# ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE

## 1- Principe:

Certains insecticides comme les organo-phosphorés ou les carbamates sont des inhibiteurs de la cholinestérase qui est un enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine en acide acétique et choline.

Au laboratoire, l'activité cholinestérasique est évaluée en mesurant la variation de pH due à la libération de l'acide acétique à partir du substrat « acétyl-choline » pendant un temps déterminé.



## 2- Réactifs:

1- Eau distillée exempte de CO<sub>2</sub> (Sans CO<sub>2</sub>) faire bouillir 500 ml d'eau distillée pendant 10mn et la laisser à l'abri de l'air. Cette eau servira à la préparation des réactifs 1 et 2.

### 2- Réatif 1: Solution de Bleu de Bromothymol (B.B.T)

- Bleu de Bromothymol.....100mg
- NaOH 0,05 N.....3,2 ml
- Eau distillée exempte de CO<sub>2</sub> .....100ml

Vider les tubes du contenu de B.B.T et du NaOH dans une fiole de 100 ml et la remplir à moitié avec de l'eau distillée exempte de CO<sub>2</sub> Boucher tout de suite la fiole. Mélanger légèrement et la laisser reposer 1heure.

Ensuite compléter avec l'eau distillée exempte de CO<sub>2</sub> jusqu'à 100ml. Cette solution peut se conserver plusieurs mois à l'abris de la lumière et de la chaleur.

### 3- Réactif 2: Solution de substrat

- Chlorhydrate d'acétylcholine .....une pincée
- Eau distillée exempte de CO<sub>2</sub> .....50 ml

Remplir l'extrémité de la spatule de substrat (le chlorhydrate d'acétylcholine). L'introduire dans le flacon marqué " substrat"

Ajouter 50 ml d'eau distillée exempte de CO<sub>2</sub>.

La solution de substrat doit être préparée chaque jour. Il faut la déposer à l'abri de la chaleur.

### 3- Mode opératoire

Suivant le nombre de personnes qui seront soumises à l'évaluation de l'activité cholinestérasique, prendre une série de petits tubes du kit lovibond mis à votre disposition. Numéroté les 2 premiers tubes de la façon suivante:

- 1<sup>er</sup> tube: Témoin Blanc (T.B)

- 2<sup>ème</sup> tube : Témoin Réaction (T.R)

Les autres tubes serviront pour les personnes à tester

La réaction se fera de la façon suivante:

	<b>Tube Blanc (T.B)</b>	<b>Tube Témoin (T.R)</b>	<b> Tubes malades ou personnes à tester</b>
Sang du sujet non exposé au pesticides	10µl	10µl	-
Sang des malades ou personnes à tester	-	-	-
Eau distillée sans CO <sub>2</sub>	1ml	-	-
Indicateur « B.B.T »	-	0,5ml	0,5ml

- Bien mélanger le contenu de tube blanc avec la micropipette et le transférer dans la cuve de 2,5 mm. La placer dans le compartiment gauche du comparateur.

Les étapes ci-dessus doivent être exécuté à la minute près .

- Ajouter 0,5 ml du substrat dans le tube témoin . boucher et mélanger par retournement. Transférer dans la cuve de 2,5 mm et le placer dans le compartiment droit du comparateur.

- Noter l'heure à la minute près : c'est le temps zéro. Lire immédiatement dans le compartiment droit. Le résultat doit être inférieure ou égal à 12,5%.
- A intervalle d'une minute, ajouter 0,5 ml de la solution de substrat dans le tubes " personnes à tester" en prenant la précaution de respecter l'intervalle de 1 minute entre les 2 tubes.
- Attendre que l'échantillon contrôle atteigne 100% d'activité cholinestérasique en lisant contre l'échantillon blanc dans le compartiment gauche. Le temps d'incubation dépend de la température ambiante et varie en général entre 18 et 30 minutes.
- Lire chaque échantillon des personnes à tester à 1 minute d'intervalle.
- Noter le pourcentage d'activité cholinestérasique.

### **Interprétation des résultats**

<u><b>% Activité cholinestérasique</b></u>	<u><b>Interprétation et mesure à prendre</b></u>
100% -75%	<b>Aucune action à prendre</b>
75% - 50%	Refaire ultérieurement l'analyse dans un proche avenir <b>Exposition probable</b>
50% - 25%	Si le taux est confirmé, écarter le sujet exposé de tout travail en contact avec les pesticides <b>Surexposition grave :</b> Refaire le test si confirmé, suspendre impérativement tout travail en contact avec les pesticides, un suivi médical et éventuellement un traitement sera instauré.
25%- 0%	<b>Surexposition sévère et dangereuse</b>  Refaire le test, si confirmé :Arrêt impérativement immédiat de tout contact avec les pesticides. Envoi immédiat du sujet dans un centre hospitalier.

# RECHERCHE TOXICOLOGIQUE DES ANTICOAGULANTS

Les anticoagulants utilisés comme raticides sont susceptibles d'entraîner des intoxications chez les animaux domestiques et sauvages. Certains composés peuvent être utilisés chez l'homme pour leurs propriétés anticoagulants.

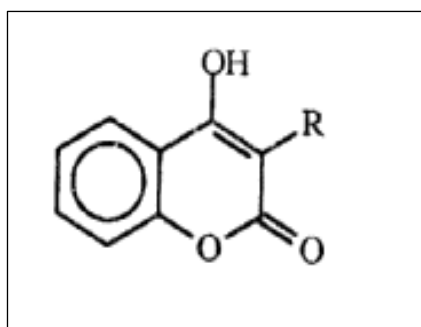
La recherche toxicologique de ces composés est longue et délicate. Elle nécessite après extraction et purification, l'analyse soit par chromatographie en phase gazeuse, soit par spectrophotométrie ultraviolette. Cependant lorsque les quantités recherchées sont relativement importantes une méthode simple et rapide par chromatographie sur couches minces peut être mise en œuvre.

## 1- Principe:

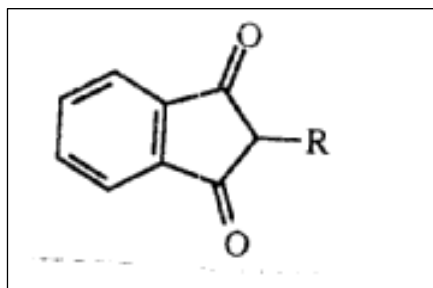
Après extraction par le chloroforme, on effectue une séparation et une purification de l'extrait par chromatographie sur couches minces. L'identification de l'anticoagulant se fait par comparaison avec des solutions étalons ayant subi la même chromatographie.

## 2-Formules générales:

a) **les coumariniques:** Dicoumarol, Coumafène, Coumachlore



b) **Indanèdiones** : Chlorophacinone.



**3- Matériel :**

- Plaques de verre recouvertes de silicagel.....2
- Pipette (types Pasteur).
- Ampoules à décanter de 125ml.....2
- Bêchers de 100ml.....2
- Bêchers de 250ml.....2
- Eprouvette de 100ml.....1
- Pipette graduée(1 de 2 ml), (1 de 10ml)
- Pissette.....1
- Papier filtre
- Etuve.
- Lampe ultraviolette .
- Cuve de développement.....1

**4- Réactifs:**

- Gel de silice HF. Au cours de cette séance de TP les plaques sont fournis recouverts du silicagel (épaisseur de la couche 0,2mm).
  - Ether.
  - Benzène.
  - Chloroforme.

- Acétone.
- Iode (en cristaux).
- Solutions étalons d'anticoagulants soit dans le chloroforme soit dans la l'acétone.

- - Coumaphène                      - Fassouk.
- - Coumachlore                      - Brodifacoum
- - Dicoumarol                      - 4- Hydroxycoumarin 3.(A .Acetonylbenzyl).
- - Chlorophacinone                -Racumin

### **5- Extraction:**

- Opérer sur le prélèvement d'appât suspect ou sur le contenu stomacal du chien.
- Extraire 10 g d'échantillon broyé par 50 ml de chloroforme, dans une ampoule à décanter (agiter pendant 10 minutes)
- Recueillir la phase chloroformique dans un bêcher de 100ml
- Concentrer à sec au bain-marie.
- Reprendre le résidu
- Préparer les plaques de verre recouvertes de silicagel HF en disposant sur chaque plaque une tâche de chacun des étalons et une tâche de chacun des deux extraits.

### **6- Technique:**

- Préparer l'éluant:
- Cet éluant contient

Ether: 60 ml.

Benzène:30 ml.

Acétone : 20 ml.

- Verser l'éluant dans la cuve de développement préparé pour travailler en atmosphère saturée.
- Attendre 15 minutes.
- Mettre la plaque dans la cuve.
- Laisser se développer sur 12 cm environ.
- Retirer la plaque, la mettre à l'étuve à 70°C pendant 5 minutes.
- Faire un examen direct sous lampe ultraviolette. Repérer les spots. Déterminer les Rf.
- Révéler ensuite chaque plaque avec de l'iode, pour cela chauffer légèrement quelques cristaux d'iode dans un bêcher de 100ml.
- Tenir les plaques au dessus du Becher en contact avec les vapeurs d'iode.

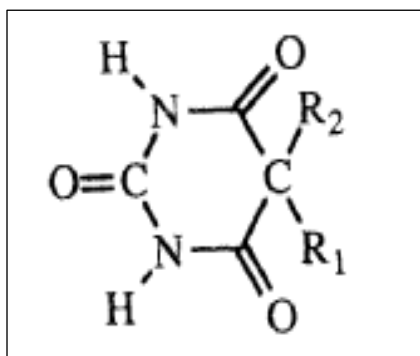
**ATTENTION:** Ne pas respirer les vapeurs d'iode : Opérer sous hotte.

- Repérer les spots, déterminer les Rf.
- Comparer les résultats obtenus par révélation en ultra violet avec ceux obtenus par l'iode.

Qu'en concluez – vous?

# RECHERCHE ET DOSAGE DES BARBITURIQUES

## I- Formule général:



## II- Propriétés physico – chimiques:

L'absorption Ultra-violette des solutions aqueuses des barbituriques est intimement liée à leur pH, les formes non ionisées n'absorbent que très faiblement.

A pH 10, l'absorption est maximale à 238nm. Ceci est du à l'ionisation de la première fonction acide . A pH 13, on voit apparaître une deuxième bande d'absorption présentant un maximum vers 260 nm et qui témoigne de l'ionisation de la seconde fonction acide.

### A- Par spectrophotométrie – UV

#### I. Principe :

La méthode de dosage prévoit une extraction en milieu acide par le dichlorométhane, ou le chloroforme un passage en phase aqueuse alcaline par NaOH 0,45 N et une photométrie différentielle avec lecture à 260 nm.

## 2-Réactifs:

Acide chlorydrique concentré .

Dichlorométhane.

Sulfate de sodium anhydre.

Soude 0,45N.

Tampon borate0,6M

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.....37,2g

KCl.....4,2 g

Eau distillée q.s.p 1000ml

Solution mère de phénobarbital à 2g/l

## 3- Mode opératoire

A partir d'une solution mère de phénorabital à 2g/l, préparer une gamme étalon comme suit:

<b>Tube N°</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>X</b>
<b>Solution PB(2g/l)ml</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>-</b>
<b>Plasma(ml)</b>	<b>4,9</b>	<b>4,8</b>	<b>4,7</b>	<b>-</b>
<b>Volume final(ml)</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>Dichlorométhane(ml)</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>HCl concentré(gouttes)</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

➤ Agiter pendant 3 minutes.

- Filtrer sur un papier filtre contenant 10g de sulfate de sodium anhydre.
- Dans une ampouler à décanter, mettre 30 ml du filtrat.
- Ajouter 6 ml de soude 0,45N.
- Agiter pendant 3 minutes.
- Centrifuger la phase sodique (Phase supérieure).
- Pour chaque concentration, préparer les solutions suivant le protocole ci-dessous:

pH10.....1,5ml de L'extrait

1,5ml de tampon borate

pH13.....1,5ml de L'extrait

1,5ml de soude 0,45N

- Faire la lecture à 260nm à pH10(blanc:1,5ml NaOH 0,45N+ 1,5 ml Tampon borate) et à pH 13 (blanc : soude 0,45N)
- Faire la différence des DO.
- Tracer la droite d'étalonnage.
- Déterminer la concentration inconnue de l'échantillon.

## **B- Par réaction de Parri**

### **1- Réactifs**

- Ether éthylique.
- Acide chlorydrique (d=1,18).
- Sulfate de sodium anhydre.
- Alcool absolu.
- Solution alcoolique de nitrate de cobalt à 3%o.
- Solution alcoolique de diethylamine à 3%.

## **2- Mode opératoire:**

10 à 20g d'échantillon sont épuisés par l'éther en milieu acide, la phase organique recueillie est évaporée à sec , puis additionnée de 1 ml d'éthanol, 1 ml de solution alcoolique de nitrate de cobalt à 3% et 1 ml de la solution de diéthylamine à 30%o. La présence de barbituriques se traduit par une coloration violette et stable.

## **C- Par C.C.M**

### **1-Réactifs:**

- Chloroforme.
- Acétone.
- Diéthylamine.
- Chlorure mercurique.
- Diphénylcarbazone.

### **2- Analyse chromatographie:**

\* Absorbant : Gel de silice.

\* Eluant: Chloroforme / Acétone : 90/10.

\* Révélateur :

- Sous lampe ultra-violette à 254 nm

- Pulvériser avec le diéthylamine pur, sécher puis pulvériser avec un mélange de volume égal de chlorure mercurique et de diphényl carbazone.

### **3- Interprétation :**

La présence de barbituriques se traduit par un spot rose sur fond violet.

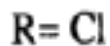
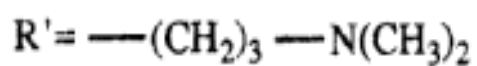
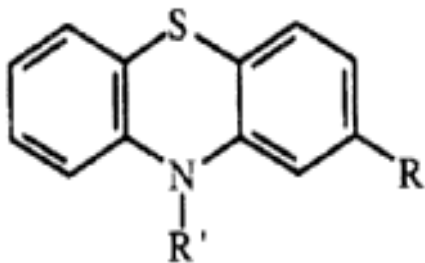
# IDENTIFICATION DES PHENOTHIAZINES ET DES IMIPRAMINES

## I- INTRODUCTION

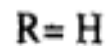
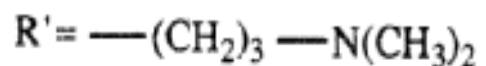
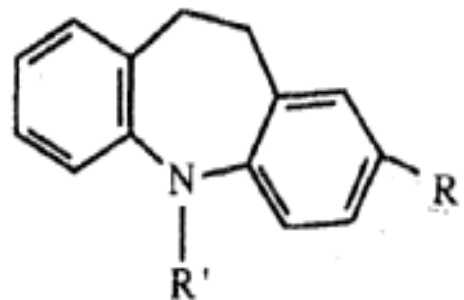
La très grande utilisation des dérivés phénothiaziniques et des antidépresseurs (type imipramine) et leur grande diffusion en thérapeutique ambulatoire font que ces médicaments sont fréquemment absorbés à des fins suicidaires ou accidentellement.

De plus l'association fréquente de ces médicaments psychotropes conduit à un grand nombre d'intoxication mixte, ce qui justifie leurs recherche en toxicologie d'urgence.

## II- RECHERCHE DES PHENOTHIAZINES ET IMIPRAMINE :



Chlorpromazine



imipramine

## **A – Par Réaction colorée**

### **1. Phénothiazines :**

\* Réactif : « FPN » ou « universel »

- Solution aqueuse d'acide nitrique ( $d = 1,38$ ) à 50% en volumes **50 ml**
- Solution aqueuse d'acide perchlorique ( $d=1,67$ ) à 20% en volume **45 ml**
- Solution aqueuse de chlorure ferrique à 5 g/100ml **5 ml**

Une réaction colorée en rouge apparaît en moins de dix secondes par le mélange d'un volume d'urine à un volume de réactif , traduit la présence de dérivés phénothiaziniques.

### **2. Imipramine:**

\* Réactif : Forrest ;

- - Solution aqueuse d'acide sulfurique ( $d = 1,83$ ) à 30% en volumes **50 ml**
- - Solution aqueuse d'acide nitrique ( $d=1,38$ ) à 50% en volume **50 ml**
- - Solution aqueuse de bichromate de potassium à 0,2g/100ml **50 ml**
- -Solution aqueuse d'acide perchlorique ( $d=1,67$  à 20% en volume **50 ml**

le mélange de deux volumes de réactif à un volume d'urine conduit, en présence d'imipramine, à l'apparition en 20 secondes d'une coloration bleu vert plus au moins intense.

## **B- Par CCM :**

Absorbant: Gel de silice

Migration :10 à 12 cm à partir de la ligne de dépôt et après saturation de la cuve durant une heure.

Eluant : Toluène/acétone (80/20)+ un bécher d'ammoniaque

Dépôt des solutions étalons : Chlorpromazine, Largartil\* (pour phénothiazine)  
Tofranil\* (pour imipramine)

Révélateurs : Acide phosphorique , puis après séchage, pulvérisation du réactif au chlorure ferrique.

Interprétation : Présence des phénothiazines : Spot rouge

Présence des imipramines : spot bleu.

# DOSAGE DES PHETHIAZINES

## 1- Réactifs

- Le Largartil\* contient 25mg/5ml.
- Dichlorméthane;
- Solution de quinhydrone  $10^{-3}$  M dans le dichlorométhane (1) ;
- Solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 40 grammes pour 100ml;
- Acide ortho-phosphorique (d = 1,71).

## II- MODE OPERATOIRE

### A/ URINE

« Applicable également aux liquides gastriques ».

1-Extraction :

Dans des ampoules à décantation placer respectivement comme suit:

Ampoules	Urine	NaOH	Dichlorometh	Phenothiazine
B	25ml	1	25	-
1	25ml	1	25	30
2	25ml	1	25	60
3	25ml	1	25	90

Agiter énergiquement durant dix minutes. Après décantation, centrifuger à grande vitesse la phase organique. Eliminer par aspiration la totalité de la couche

aqueuse surnageante. « Il est inutile de laver l'extractum organique et de déshydrater par agitation avec du sulfate de sodium anhydre » .

**\*Traiter la solution inconnue de la même manière que les solutions standards.**

## **2- Réaction :**

Dans l'ampoule à décantation placer:

- Extractum organique .....10ml
- Solution  $10^{-3}$  M de quinhydrone .....1ml
- Acide ortho-phosphorique (d=1,71).....4ml

Agiter énergiquement « avec précaution au début en raison de la grande volatilité du dichlorométhane » durant une minute.

Après décantation, la plus grande partie de la phase organique supérieure est éliminée. Le liquide restant est centrifugé. Après élimination « par aspiration » du solvant surnageant, la phase aqueuse acide colorée est soumise à l'analyse spectrophotométrique « après dilution éventuelle par un volume connu d'acide phosphorique pur de la phase acide si celle-ci trop intensément colorée ».

Lire l'absorbance à 527 nm de tout les tubes

Tracer la courbe d'étalonnage et en déduire la concentration des phénothiazines dans l'échantillon.