

TRAVAUX

PRATIQUES

DE TOXICOLOGIE

TP 01 : Dosage de l'alcool dans le sang

TP 02 : Recherche toxicologique des drogues

TP 03 : Dosage du fluor

TP 04 : Dosage du phénol

TP 05 : Dosage des salicylés

TP 06 : Dosage du paracétamol

TP 07 : Recherche des pesticides dans eau

TP 08 : Dosage des nitrites dans l'eau usée

Recommandations aux étudiants

- Chaque étudiant **doit préparer sa fiche technique avant d'arriver au TP**
- **Le polycopie de TP et le téléphone portable sont strictement interdits au moment de TP.**
- Les TP commencent à **12H30**
- **Un retard de 5 minutes entraîne l'exclusion** de la séance.
- Il est impératif de respecter la répartition des groupes de TP (binôme, la position sur la paillasse et le TP à préparer)
- Chaque étudiant **avant de quitter le laboratoire doit nettoyer sa paillasse ainsi que le matériel utilisé.**
- Le compte rendu doit comporter toutes les indications mentionnées faute de quoi le TP est annulé.
- Le port de la blouse blanche est obligatoire pendant toute la séance.

DOSAGE DE L'ALCOOL ETHYLIQUE DANS LE SANG

(METHODE DE CORDEBARD-TECHNIQUE MODIFIEE PAR TRUHAUT

1. Principe :

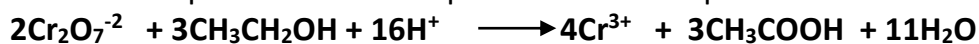
Le dosage de l'alcool éthylique dans le sang repose sur deux propriétés fondamentales :

- L'une physique : sa volatilité.
- L'autre chimique : sa propriété réductrice.

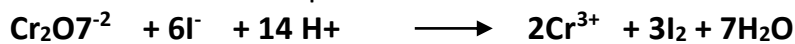
Le sang débarrassé des matrices albuminoïdes (défécation à l'acide picrique) est soumis à une distillation.

L'alcool, éventuellement présent dans le distillât, est oxydé en acide acétique à froid au moyen d'une liqueur nitrochromique titrée, utilisée en quantité exactement mesurée.

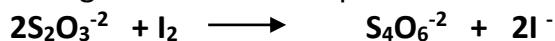
L'excès de liqueur nitrochromique est déterminé par iodométrie :



Addition d'iodure de potassium:



Dosage de l'iode libéré par une solution titrée de thiosulfate de sodium :



2. Mode Opératoire :

Distillation :

- Introduire dans le ballon de l'appareil 5 ml de sang
- Ajouter 60 ml d'acide picrique saturé.
- Ajouter des fragments de pierre ponce pour régulariser l'ébullition.
- Adapter le raccord de verre.
- Disposer à l'extrémité du réfrigérant, un Becher dans lequel on a préalablement introduit 2ml d'eau distillée.
- Chauffer et maintenir une ébullition douce (afin d'éviter tout entrainement d'acide picrique) jusqu'à obtention de 40 ml environ du distillât.

2-Dosage :

- Dans un Erlen Mayer du dosage, mettre 5 ml de distillât ;
- Ajouter 10 ml de la solution nitrochromique N/20.
- Agiter et laisser à l'obscurité pendant 10mn, puis ajouter 100ml d'eau distillée
- Ajouter 10 ml d'iodure de potassium.
- Titrer avec le thiosulfate de sodium N/20 la coloration initialement brune passe au jaune puis à la verte pale.
- Le point équivalent est atteint lors du virage de la coloration de la verte pale à l'incolore
- Dans la fiole témoin, mettre 5ml d'eau distillée au lieu de 5 ml du distillât, ensuite procéder de la même façon que pour la fiole du dosage.

III. Interprétation et calcul :

$$\text{Alcoolémie (g/l)} = \frac{(\text{Nb}-\text{N x}) \times 0,575 \times 8}{\text{P}}$$

Nb : Volume de thiosulfate de Na obtenu pour le blanc.

N x : Volume de thiosulfate de Na obtenu pour l'échantillon.

P : prise d'essai du sang

Norme législatives : A<0.2g/l.

DOSAGE DES NITRITES DANS L'EAU USEE

I-Principe :

En milieu acide, l'acide nitreux se combine avec la sulfanilamide pour former un sel de diazonium qui réagit quantitativement avec le N-1-Naphtyle Ethylène Di Chlorhydrate et forme un complexe coloré en rose évaluée à 520 nm dont l'intensité est proportionnelle à la concentration

II-Mode opératoire :

1. Dosage :

	Blanc	0.2 mg/l	0.4 mg/l	0.6 mg/l	0.8mg/l	Ech
Solution de nitrite de sodium à 1mg/l	-	QSP 2ml	QSP 2ml	QSP 2ml	QSP 2ml	-
Eau distillée	2ml	-	-	-	-	-
Ech	-	-	-	-	-	2 ml
Réactif de GRIESS	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2ml	2 ml

- Laisser reposer 5 minutes
- Lire au spectrophotomètre à 520 nm
- Tracer la courbe d'étalonnage et extrapoler la concentration de l'échantillon

DOSAGE DU PARACÉTAMOL

I. PRINCIPE :

C'est une méthode basée sur la formation d'un dérivé par action de l'acide nitreux sur le paracétamol après défécation par l'acide trichloroacétique

La concentration du dérivé nitreux est déterminée par spectrophotométrie

II. MODE OPÉRATOIRE :

1. Dosage :

- La solution de travail doit être préparée à partir de la solution mère 250mg/l.
- La gamme de travail doit varier de 50 à 200mg/l

	BLANC	ÉTALON	ÉCHANTILLON
Eau distillée	2 ml	-	-
Solution étalon du paracétamol	-	2 ml	-
Échantillon	-	-	2 ml
H Cl (6 N)	1 ml	1 ml	1 ml
Nitrite de Na (6N)	2 ml	2 ml	2 ml
Mélanger et laisser reposer pendant 2-3 minutes			
sulfamate d'ammonium	2 ml goutte à goutte	2 ml goutte à goutte	2 ml goutte à goutte
Ajouter sulfamate goutte à goutte pour éliminer l'excès de l'acide nitreux (attention aux mousses abondantes)			
Na OH (6N)	2 ml	2 ml	2 ml
Agiter rapidement pour éliminer les bulles de gaz			
Mesurer la DO à 450 nm			

2. Résultat :

- Calculer la concentration du paracétamol

DOSAGE DU FLUOR URINAIRE

I.Principe :

En présence d'alizarine complexone, le nitrate de lanthane donne une coloration rouge en milieu aqueux.

En présence d'ion fluor, il se forme un complexe bleu soluble dans l'acétone dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration en fluor.

II.Mode Opérateur:

Dans des tubes en plastiques, mettre successivement

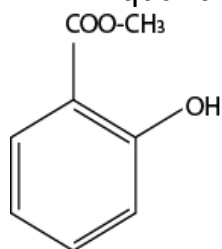
	BLANC	ECHANTILLON	ETALON 1 ppm
Echantillon	/	5ml	
Etalon 1 ppm	/	/	5 ml
Eau distillée	5ml	/	/
Alizarine complexone	1ml	1ml	1ml
Nitrate de lanthane	1ml	1ml	1ml
Bien mélanger le contenu des tubes			
Acétone	2.5ml	2.5ml	2.5 ml
Eau distillé	0.5ml	0.5ml	0.5 ml
Laisser reposer 10mn			
lire au spectrophotomètre à 618nm contre le blanc réactif			

Calculer la concentration du fluor

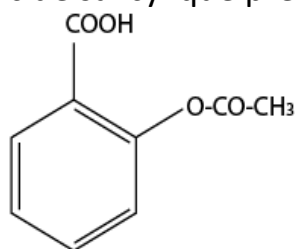
DOSAGE DES SALYCYLES

I. Principe :

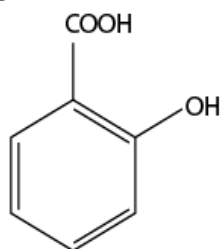
En milieu chlorhydrique et en présence de chlorure mercurique, l'acide salicylique va réagir par hydroxyle phénolique sur les ions ferriques en développant une coloration violette, évaluée à 535 nm, proportionnelle à la quantité d'acide salicylique présente.



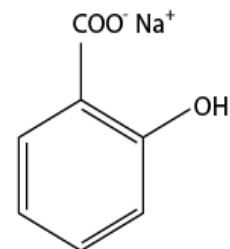
Methyl L Salicylate



Ac. Acétyl Salicylique



Ac. Salicylique



Salicylates de Sodium

II. Mode opératoire:

1. Dosage :

	Balanc	50mg/l	100 mg/l	125 mg/l	150mg/l	200 mg/l	Ech
H2O	1 ml	/	/	/	/	/	/
Solution de salicylate de Na à 250 mg/l	/	Q s p 1 ml	Q s p 1 ml	Q s p 1 ml	Q s p 1 ml	Q s p 1 ml	/
Ech	/	/	/	/	/	/	1 ml
Réactif de Trinder	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

Lire l'absorbance à 535 nm

Tracer la courbe d'étalonnage

Calculer la concentration

RECHERCHE DES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES/CARBAMATES

I. Principe :

Il repose sur le pouvoir anti-estérasique des esters organophosphorés et/ou carbamates

Après migration des extraits à étudier dans le solvant approprié ; une première pulvérisation se fera par un extrait aqueux riche en estérase ; la deuxième pulvérisation se fera avec un mélange d'acétate **α -naphtyl** et de **Fast bleu** après une incubation.

L'enzyme coupe l'ester en donnant une teinte violette (le **α -naphtyl** qui réagit avec le colorant **Fast bleu**).

La présence de zone blanche sur fond violet caractérise la présence des inhibiteurs des estérases

II. Mode opératoire :

1. Activation de la plaque CCM à l'étuve une heure à 120°C.

2. Extraction :

Dans une ampoule à décanter ; mettre 10ml de l'échantillon ajouter 4ml de mélange chloroforme-acétone (1V-3V).

Agiter doucement, ajouter 2.5ml d'eau distillée saturée en Na Cl et 5ml de chloroforme.

Agiter et laisser décanter, récupérer la phase organique et la concentrer dans une capsule en porcelaine jusqu'à 1.5ml.

3. Séparation : elle se fait par CCM (solvant de migration : Hexane-Acétone : 3-1).

La plaque est ensuite pulvérisée par l'extrait enzymatique du foie de bœuf jusqu'à l'imprégnation totale.

La plaque est remise à l'étuve à 37°C pendant 15-30 min puis pulvérisée par le mélange réactif (acétate α -naphtyl et de Fast bleu).

Remettre à l'étuve pendant quelques minutes.

III. Interprétation :

-La présence de zone d'inhibition indique la présence de pesticide type organophosphoré ou carbamate.

LA RECHERCHE TOXICOLOGIQUE DES DROGUES

(METHODE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE)

A/ Principe :

L'analyse toxicologique permet la détection et l'identification d'un certain nombre de toxiques dans les différents prélèvements biologiques (urines, sang, viscères ...) ou différents produits suspects (fragments de comprimé, plantes, solutions ...)

Cette recherche se fait en deux étapes :

B/ Etape d'extraction :

En général liquide-liquide par un solvant organique approprié.

On distingue en fonction du pka des molécules recherchées deux types d'extraction :

- Extraction alcaline (molécules à pka élevé)
- Extraction acide (molécules à pka faible)

Dans ce TP, on s'intéresse uniquement à la recherche des drogues alcalines.

Mode opératoire :

B.1 . Alcalinisation :

- Dans une ampoule à décanter mettre : 5ml d'urine
- Quelques gouttes (2-3) de soude 1N « NaOH », bien mélangé.

B.2. Extraction:

- Ajouter 10ml de chloroforme, agiter énergétiquement pendant 5 minutes.
- Laisser décanter pendant 3minutes
- Recueillir la phase organique dans une capsule en porcelaine.
- Evaporer à sec
- Récupérer avec 1ml d'éthanol (solvant de dilution)

C/ Phase de migration :

- Tracer légèrement une ligne à environ 1cm du bas de la plaque (front de dépôt) et graver une ligne horizontale à 10 cm de l'origine (front de migration).
- Delimiter deux couloirs sur la plaque en gravant ces traits verticaux à l'aide d'un embout.
- Procéder au dépôt de l'éluât éthanolique sur les deux couloirs sur le front de départ (environ 80µl).
- Lancer l'étape de migration dans la cuve appropriée (type T1) .
- Retirer la plaque et la sécher ;

D/ Phase de révélation:

- Pulvériser sur chaque partie les réactifs indiqués dans le tableau ci-dessous.
- Noter pour chaque spot la couleur et la forme et calculer le Rf.

Substances	Révélateurs	
	Forrest	Ninhydrine 2% + Chauffage
Prégabaline	/	Violet
Chlorpromazine	Rose	/
Levomepromazine	Violet	/
Imipramine	Bleu	/