



Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat  
Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie  
Pr. YAHYA CHERRAH



# **TRAVAUX PRATIQUES TOXICOLOGIE I 2ème ANNEE DE PHARMACIE**

**ANNEE : 2011-2012**

Pr. Y. CHERRAH  
Pr. A. ZELLOU  
Pr. S. SERRAGUI  
Pr. Y. BOUSLIMAN  
Pr. R. EL JAUDI  
Pr. M. AIT EL CADI



## 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.
- Les comptes rendus doivent être rédigés par binôme.



## SOMMAIRE

SCREENING TOXICOLOGIE D'URGENCE.....	4
RECHERCHE DES BENZODIAZEPINES.....	10
DOSAGE DES SALICYLES.....	13
DOSAGE DU PARACETAMOL SÉRIQUE PAR HPLC.....	16
RECHERCHE TOXICOLOGIQUE DES ANTICOAGULANTS.....	21
DOSAGE DES BARBITURIQUES.....	24
DOSAGE DES PHENOTHIAZINES .....	27



## SCREENING EN TOXICOLOGIE D'URGENCE

### **Introduction :**

La toxicologie d'urgence est basée sur la notion d'exploration d'un très vaste domaine de substances chimiques. Les méthodes colorimétriques et spectrophotométriques sont des méthodes de dépistage au champ d'application limité, dont l'intérêt est d'apporter rapidement une orientation sur l'origine de l'intoxication. Elles se placent dans un contexte d'urgence et ne nécessitent pas d'investissement spécifique en matériel ou en réactifs. Ce sont des techniques adaptables à toutes structures.

### **Principe :**

Le principe se base sur l'extraction des toxiques dans différentes matrices suivie de leur identification

**Extraction :** Il s'agit d'utiliser les propriétés basiques et acides des espèces chimiques à extraire. Ces espèces doivent pouvoir se présenter sous forme de sels (en milieu acide) et donc être solubles dans les solvants polaires, et sous forme basique (free base) et donc être solubles dans les solvants apolaires.

**Identifications :** Après évaporation du solvant de l'extraction, on procède à une batterie de tests pour identifier les toxiques suspects. Pour l'extrait acide, on procède à la recherche des salicylés par réaction de TRINDER, et des



barbituriques par réaction de PARRI et pour l'extrait basique on recherche les Imipramines par réactif de FORREST et les Phénothiazines par réactif FPN.

### **Matériel :**

- Ampoules à décanter
- Verres à pied de 100ml
- Bêchers de 100 ml
- Erlenmeyers
- Tubes à essais
- Porte tubes à essais
- Porte ampoule à décanter
- pipettes
- Entonnoirs

### **A) Extraction :**

#### **a- Extraction acide :**

Dans une ampoule à décanter de 250 ml on introduit :

- Urine: 5 ml
- Dichlorométhane : 15 ml
- HCl (d=1.18): Quelques gouttes

Agiter énergiquement pendant 2 min. Laisser décanter et éliminer de la phase aqueuse.

Récupérer la phase organique dans un erlenmeyer en filtrant sur un filtre contenant du sulfate de sodium anhydre.



Répartir la solution filtrée en 2 béchers, évaporer au bain marie le dichlorométhane. Effectuer les recherches sur les résidus d'évaporation.

### **b- Extraction basique :**

Dans une ampoule à décanter on introduit :

- Urine: 5 ml
- Na OH 40 %: 1 ml
- Dichloromethane: 15 ml

Agiter énergiquement pendant 2 min, laisser décanter et éliminer la phase aqueuse.

Filtrer la phase organique à l'aide du Sulfate de Na anhydre dans un erlenmeyer.

Répartir la solution en 2 béchers, évaporer l'extrait organique.

Effectuer les recherches sur les résidus d'évaporation.

### **B- Identification des toxiques acides**

Sur les béchers obtenus à partir de l'extraction acide, effectuer les recherches suivantes :

#### **1- Identification des Salicylés par la réaction de TRINDER**

*Principe :*

En présence de sels ferriques, l'ion salicylique forme un complexe chélaté de coloration violette.

*Réactif de Trinder (réactif I):*

Chlorure mercurique .....40g



Eau distillée.....850 ml

Chauffer pour dissoudre. Après refroidissements, ajouter :

Nitrate ferrique (NO<sub>3</sub>) 3Fe, 9H<sub>2</sub>O.....40g

HCl N .....120 ml

*Mode opératoire :*

Reprendre le résidu sec par 2 ml de méthanol, puis ajouter 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.

## **2- Identification des Barbituriques par la réaction de PARRI**

*Principe :*

En présence de réactif de Parri les barbituriques donnent une coloration violette stable.

*Réactifs :*

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

*Mode opératoire :*

Reprendre le résidu sec par 1 ml d'éthanol, ajouter 1 ml de solution alcoolique de nitrate de cobalt à 3% et 1 ml de la solution de diéthylamine à 3%.

La présence de barbituriques se traduit par une coloration violette et stable.



## D- Identification des toxiques basiques

Sur les béchers obtenus à partir de l'extraction basique, effectuer les recherches suivantes :

### 1- Identification des imipramines par la réaction de Forrest

*Principe :*

En présence de réactif de Forrest, les imipramines donnent en 20 secondes une coloration bleu verte plus au moins intense.

*Réactif :*

- 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**

*Mode opératoire :*

Sur le premier bécher en reprend le résidu sec par 2 ml de méthanol puis en additionne 4 ml de réactif Forrest. L'apparition en 20 secondes d'une coloration bleu vert plus au moins intense traduit la présence des imipramines.

### 2- Identification des Phénothiazines par la réaction de FPN

*Principe :*

En présence de réactif de FPN, les dérivés phénothiaziniques donnent un composé se traduisant par une coloration rouge en moins de dix secondes.

*Réactif : « FPN »*



- 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**

### *Mode opératoire*

Sur le deuxième bécher, reprendre le résidu sec par 2 ml de méthanol, ajouté 2 ml de réactif de FPN.

La présence des phénothiazines est révélée par l'apparition d'une coloration rouge.

### **3- INTERPRETER LES RESULTATS**

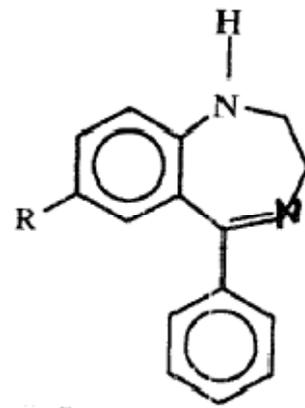


## RECHERCHE DES BENZODIAZEPINES

### I- Recherche des benzodiazépines par coloration

Les benzodiazépines constituent une famille de médicaments caractérisés par la présence à des degrés différents des propriétés anxiolytique, hypnotiques, anti convulsivantes et myorelaxantes.

Ce sont des médicaments très prescrits du part le monde ce qui augmente la fréquence des intoxications par ces molécules.



#### 1 -Principe :

Après hydrolyse acide à partir d'urines, les benzodiazépines forment avec le réactif de Tréfouël un anneau de coloration violette.

#### 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- Dosage des benzodiazépines Par spectrophotométrie:**

### **1-Principe :**

Les benzodiazépines sont extraites 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
- Ampoule à décantation
- Verre à pied
- Micropipettes de 1 ml
- Pipettes



#### 4-Technique :

Mélanger dans un tube à hémolyse:

- 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'UV entre 200nm -400 nm contre HCl 2N.

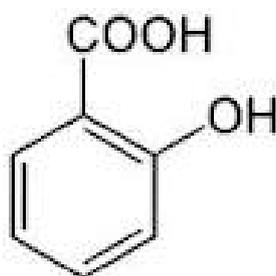
#### 5- Résultats:

- Tracer la courbe DO en fonction de la longueur d'onde
- Chercher le maximum d'absorption.
- Calculer le coefficient d'extinction molaire.



## DOSAGE DES SALICYLES

L'acide acétyle salicylique (Aspirine®) est un analgésique, antipyrétique, anti-inflammatoire et antiagrégants plaquettaire. Il occupe une place primordiale et il constitue le médicament le plus consommé au monde.



### 1-Principe :

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

### 2-Réactifs :

✓ *Réactif de Trinder (réactif I):*

Chlorure mercurique .....40g  
Eau distillée.....850 ml  
Chauffer pour dissoudre. Après refroidissements, ajouter :  
Nitrate ferrique (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Fe, 9H<sub>2</sub>O.....40g  
HCl N .....120 ml

Ce réactif est stable indéfiniment.



✓ *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 :**

- Porte tubes à essais.....1
- Porte ampoule à décanter .....1
- Micropipette de 1 ml ..... 1
- Entonnoirs ..... 2
- Tubes à essais

**4- Mode opératoire :**

✓ **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:

Réactif III	00	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Réactif I	5	5	5	5	5	5
Concentration d'acide salicylique (mg/l)	0	80	160	240	320	400

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



## 5- Résultats:

- a) Expliquer comment on a trouvé une concentration en ion salicylate de 2g/l en diluant 580 mg de salicylate de sodium dans 250 ml d'H<sub>2</sub>O ?
- b) Déterminer la concentration en mg/l des salicylés de votre échantillon et interpréter.



# DOSAGE DU PARACETAMOL SERIQUE PAR HPLC

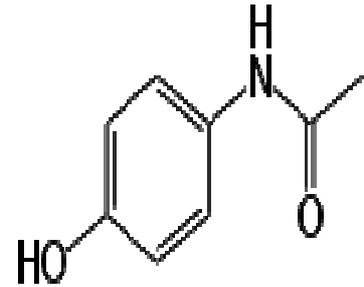
## 1- Introduction :

Le Paracétamol (N-acétyl para aminophénol) est un Analgésique antipyrétique. Administré par voie orale.

Il donne rapidement des taux plasmatiques élevés.

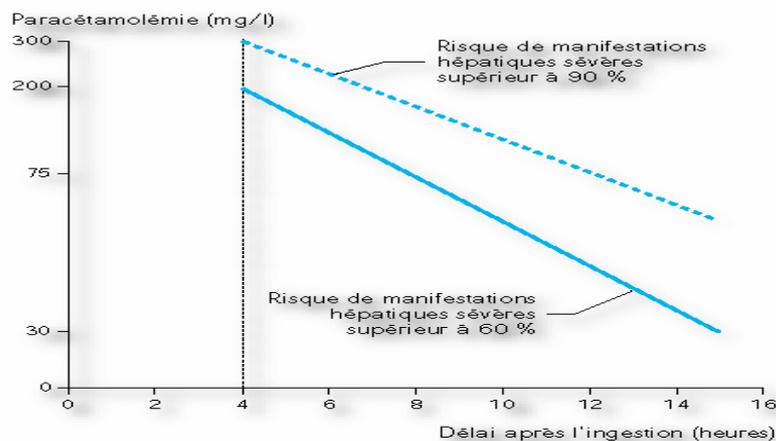
Les surdosages exposent à une intoxication aigue grave essentiellement hépatique.

Le pronostic de l'intoxication repose sur le dosage de paracétamolémie dans les heures qui suivent l'ingestion.



## 2- Principe :

Le dosage du paracétamol est fait par chromatographie liquide haute performance HPLC avec détection dans l'UV à 254nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée. La concentration déterminée est reportée sur le nomogramme de Rumack- Matthew.





### 3- Réactifs :

- Solution étalon du paracétamol à 1mg/ml dans l'eau distillée
- Méthanol (grade HPLC)
- Eau pour HPLC

### 4- Matériel :

- Tubes à hémolyse
- Micropipettes de 1ml réglable .....1
- Micropipette de 100  $\mu$ l .....1
- Agitateur type vortex.....1
- Colonne HPLC C8.....1
- Chaîne HPLC avec un détecteur UV à 254nm.....1
- Seringue de 100  $\mu$ l en verre .....1

### 5- Mode opératoire :

A partir de la solution étalon du paracétamol (1g/l), préparer une gamme d'étalonnage dans des tubes à hémolyse selon le tableau suivant :

Concentration $\mu$ g/ml	50	150	250	300
Solution du paracétamol ( $\mu$ l)	50	150	250	300
Eau distillée ( $\mu$ l) QSP 1ml	950	850	750	700

- Agiter au vortex pendant 1min



A partir de chaque solution, préparer des dilutions selon le tableau suivant :

Concentration de la Solution mère du paracétamol ( $\mu\text{g/ml}$ )	50	150	250	300	Echantillon
Solution du paracétamol ( $\mu\text{l}$ )	--	333	200	166	X
Eau distillée ( $\mu\text{l}$ ) QSP 1ml	--	667	800	834	--

- Agiter au vortex pendant 1min
- Rincer la seringue avec du méthanol
- Injecter les différents échantillons dans le chromatographe. L'élution est faite par un mélange Méthanol/eau 80/20 (v/v)
- Opérer de la même manière pour l'échantillon.
- Tracer la courbe d'étalonnage (air sous la courbe) AUC en fonction de la concentration et déduire la concentration du Paracétamol dans votre échantillon X
- Reporter la valeur trouvée sur le nomogramme de Rumack-Matthew et interpréter

### 6- Interprétation :

L'utilisation du nomogramme de Rumack-Matthew permet de prédire la gravité de l'intoxication, le pronostic de l'intoxiqué et la conduite à tenir.

Le nomogramme de Rumack- Matthew est valide dans les conditions suivantes :

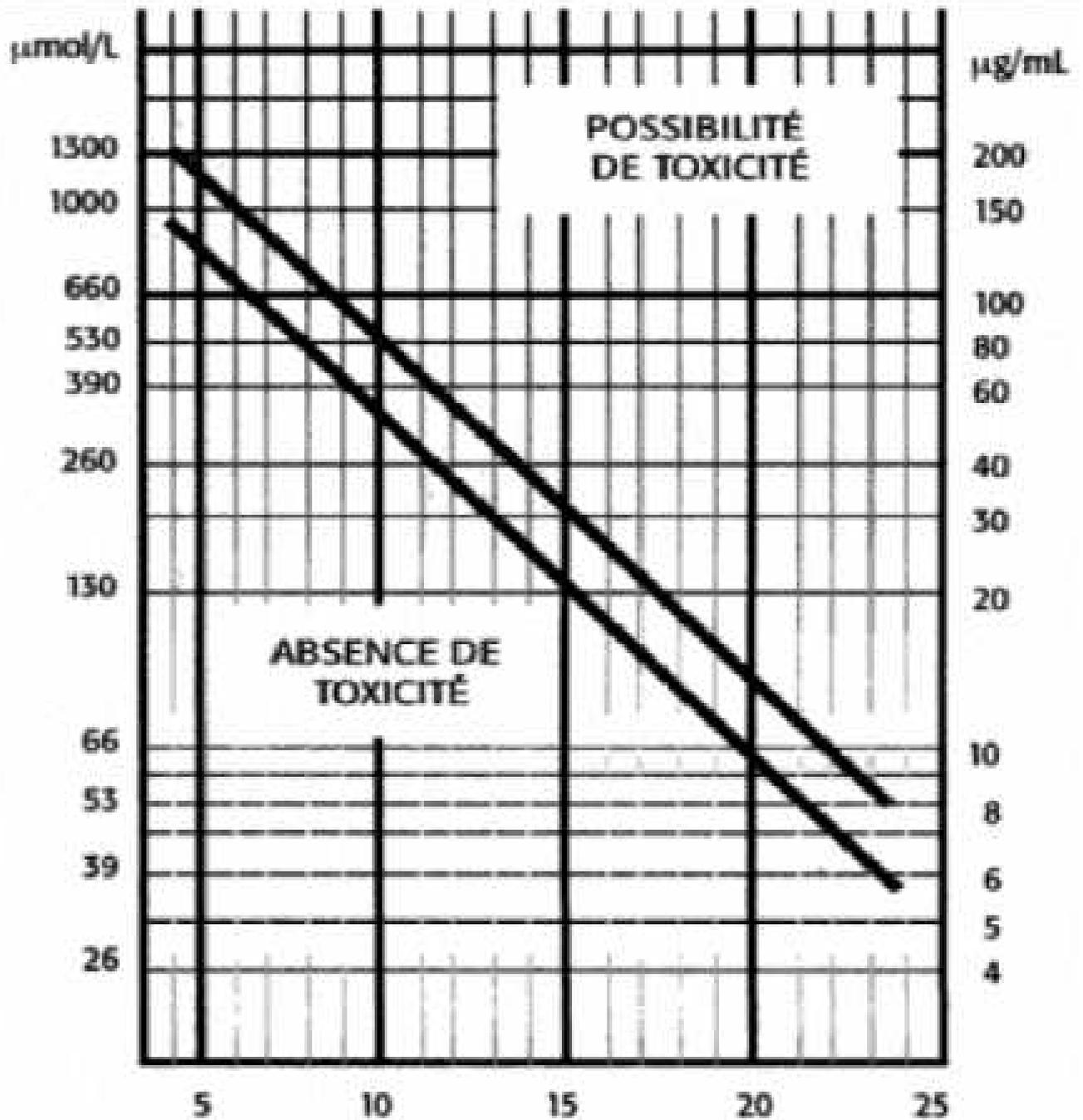
- Ingestion d'une dose unique
- Heure de l'ingestion connue
- Prélèvement sanguin effectué au delà de la 4<sup>ème</sup> heure post ingestion



- Méthode de dosage du paracétamol spécifique.

Risque toxique en fonction de la paracétamolémie

<b>Risque toxique</b>	<b>4<sup>ème</sup> heure</b>	<b>15<sup>ème</sup> heure</b>
Hépatite mortelle	> 300mg/l	> 45mg/l
Hépatite fulminante	> 200mg/l	> 30mg/l
Pas de risque	< 150 mg/l	< 25 mg/l





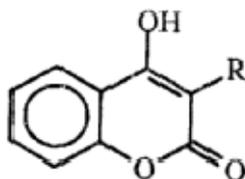
## RECHERCHE TOXICOLOGIQUE DES ANTICOAGULANTS

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 anticoagulantes.

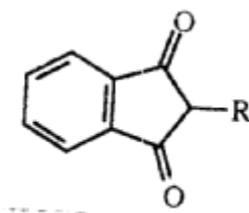
La recherche toxicologique de ces composés est longue et délicate. Elle nécessite après extraction et purification, l'analyse soit par chromatographie en phase gazeuse, soit par spectrophotométrie ultraviolette. Cependant lorsque les quantités recherchées sont relativement importantes une méthode simple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

### Formules générales:

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



b) **Les Indanèdiones :** Chlorophacinone.





### 1- Principe :

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

### 3- Matériel :

- Plaques de verre recouvertes de silicagel
- Cuve de développement
- Lampe ultraviolette
- Pipette (types Pasteur)

### 4- Réactifs:

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

- Préparer l'éluant en mélangeant :
  - Ether: 60 ml.
  - Benzene: 30 ml.
  - Acetone: 20 ml.

-Verser l'éluant dans la cuve de développement préparée pour travailler en atmosphère saturée.



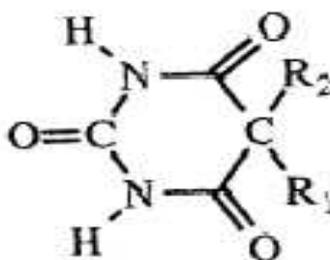
- Attendre 15 minutes.
- Mettre la plaque dans la cuve.
- Laisser se développer sur 12 cm environ.
- Retirer la plaque, la mettre à l'étuve à 70°C pendant 5 minutes.
- Faire un examen direct sous lampe ultraviolette. Repérer les spots.
- Déterminer les R<sub>f</sub> et déduire la nature de votre échantillon.



# DOSAGE DES BARBITURIQUES

## I- Introduction

Les barbituriques appartiennent à la catégorie des médicaments psychotropes. Ils sont utilisés pour leurs effets sédatifs et anesthésiques. La formule générale est comme suit :



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.

## 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 chlorhydrique concentré.
- Dichlorométhane.
- Sulfate de sodium anhydre.
- Soude 0,45N.
- Tampon borate 0,6 M

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

KCl.....4,2g

Eau distillée q.s.p 1000ml

- Solution mère de phénobarbital à 2g/l

## 3- Mode opératoire

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

Tube N°	1	2	3	X
Solution PB à 2g/ l (ml)	0.1	0.15	0.2	-
Plasma (ml)	2.4	2.35	2.3	-
Volume final (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5
Dichlorométhane	25	25	25	25
HCL concentré (gouttes)	3	3	3	3

- Agiter pendant 3 minutes.
- Filtrer sur un papier filtre contenant 1g de sulfate de sodium anhydre.
- Dans une ampoule à décanter, mettre 15ml du filtrat.
- Ajouter 3 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.....1ml de L'extrait

1 ml de tampon borate

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

1ml 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.



# DOSAGE DES PHETHIAZINES

## INTRODUCTION

La très grande utilisation des dérivés phénothiaziniques 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 des médicaments psychotropes conduit à un grand nombre d'intoxications mixtes, ce qui justifie leur recherche en toxicologie d'urgence.

### 1- Principe :

Les phénothiazines en présence du quinhydrone et en milieu acide forment un complexe coloré en rouge et dosé par spectrophotométrie à 527nm.

### 2- Réactifs :

- Solution de chlorpromazine (Largactil ®) à 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)



### 3- Mode opératoire :

Applicable aux urines et au liquide gastrique

✓ *Extraction :*

Dans des ampoules à décantation placer respectivement comme suit:

Ampoules	Urines	NaOH	Dichlorométhane	Phénothiazine
B	-	1	15	-
1	15	1	15	30
2	15	1	15	60
3	15	1	15	90

Agiter énergiquement durant dix minutes.

Après décantation, centrifuger à grande vitesse la phase organique.

Eliminer par aspiration la totalité de la couche aqueuse surnageant. « 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.**

✓ *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 tous les tubes

#### **4- Résultats :**

- ✓ Tracer la courbe d'étalonnage
- ✓ Déduire la concentration des phénothiazines dans l'échantillon.