

FACULTE DE PHARMACIE DE LYON

**TRAVAUX PRATIQUES
DE
TOXICOLOGIE**

Professeur CHAMBON

4ème Année

1994 - 1995

Association Amicale des Etudiants en Pharmacie de Lyon
8, Avenue Rockefeller - 69373 LYON Cedex 08
Tél. : 78.74.40.37 - Fax : 78.77.71.58

PROGRAMME

TP DE TOXICOLOGIE

1^{ère} semaine : T.P. PRELIMINAIRE : Diagnose de Malmy (Manip. G)

6 semaines : T.P. en manipulations tournantes:

- Manipulation A + G : ARSENIC : Dosage selon Martin-Floret
CHEVEUX : Minéralisation selon Geneuil
DIAGNOSE
- Manipulation B + G : SALICYLES: Dosage selon Trinder
PHENOTHIAZINES: Recherche
DIBENZOAZEPINES: Recherche
DIAGNOSE
- Manipulation C : ALCOOLEMIE: Recherche et dosage selon Cordebard
ALCOTEST
METHANOL, ETHANOL, ACETONE: Différenciation
- Manipulation D : TOXIQUES ORGANIQUES: méthode de Clarke
C.C.M.
- Manipulation E : SO₂ : Dosage selon West et Gaeke
CO dans l'air: Tube Draeger
PESTICIDES dans l'eau: C.P.G.
- Manipulation F : DETERGENTS dans l'eau: selon Van den Tonkelaar
CANNABIS: Recherche dans le tabac, C.C.M.

CONSIGNES GENERALES

RECOMMANDATIONS IMPORTANTES

Etant donné la présence en quantité importante de solvants dans la salle et la manipulation de produits très toxiques, il est strictement INTERDIT DE FUMER. Le port de LUNETTES est vivement recommandé, voire même indispensable dans certaines manipulations (A et C).

Attention aux becs Bunsen. Ne pas les utiliser pour l'évaporation de solvants organiques !

En cas d'INCENDIE ↗ Extincteurs
↘ Couvertures

MANIPULATIONS

Les Travaux pratiques se composent de 6 manipulations tournantes d'une durée totale de 5 heures maximum, d'une manipulation de Diagnose et d'une séance d'examen. Chaque manipulation comportera :

- une FICHE TECHNIQUE : à rédiger avant les T.P. ✓
- un exposé du principe de la manipulation à rédiger sans documents en un quart d'heure (interrogation écrite tournante).
- des recherches et dosages de toxiques.
- ou une diagnose : identification d'alcaloïdes et produits assimilés. La méthode de recherche se trouve à la fin du fascicule (p. 50 et suivantes).

Les tubes contenant les solutions pour diagnose porteront un numéro propre à chaque étudiant et qui demeurera le même jusqu'à la fin des Travaux Pratiques.

COMPTE-RENDUS

Les résultats de manipulation devront être rendus à la fin de chaque séance.

Il est indispensable d'inscrire sur les feuilles de compte-rendu, en plus des Nom et Prénom, le jour et la date de la manipulation. En l'absence de cette précision, la copie ne pourra être corrigée.

La copie devra également porter les n° d'échantillon. Lorsque ce numéro sera oublié, inversé ou faux, le dosage ou la recherche ne seront pas notés.

Commenter les résultats obtenus.

Les C.R. seront corrigés et remis aux étudiants d'une semaine sur l'autre. Ceux dont la note moyenne des 6 C.R. sera supérieure à 12 sur 20 seront exemptés d'examen de TP.

NETTOYAGE

Ne jamais remettre les pipettes sales dans les portoirs (contamination!).

Le matériel et les paillasses devront être laissés propres et en ordre.
Toute négligence sérieuse entraînera une diminution de 5 points dans la note.
Dans le cas particulier des manipulations D et F, faisant appel à la C.C.M.,
il est indispensable de nettoyer soigneusement le matériel et surtout
les pulvérisateurs faute de quoi les copies du groupe responsable ne seront
pas corrigées.

CASSE

Tout objet cassé sera immédiatement réglé au tiers de sa valeur.

Prendre particulièrement soin des :

- Appareils pour alcoolémie : réfrigérant (500 F) ballon (50F).
- Pipettes et cuves à chromatographie (30 F et 2016 F).
- Ampoules à décanter 250 ml (.400 F)

(PRIX 1994)

MANIPULATION A

- I - MINERALISATION DES CHEVEUX PAR LA METHODE DE GENEUIL .
- II - DOSAGE DE L'ARSENIC DANS LES CHEVEUX PAR LA METHODE DE MARTIN J. FLORET A. , Bull. Soc. Chim. Fr. , 1965, 2 , 404-410.

ORDRE DES MANIPULATIONS :

- 1- Faire chauffer le four à moufle et le bain de sable.
- 2- Dosage de l'arsenic selon MARTIN-FLORET dans un minéralisat correspondant à 500 mg de cheveux.
- 3- Minéraliser selon GENEUIL les 500 mg de cheveux contenus dans une capsule.
- 4- Diagnose selon MALMY

PRINCIPE :

- 1- Minéralisation nitromagnésienne de GENEUIL:
destruction des matières organiques et transformation de l'arsenic en acide arsénique AsO_4H_3 (état As^{5+}).
- 2- Réduction de As^{5+} en As^0 par SnCl_2 .
- 3- Réduction par l'hydrogène naissant en hydrogène arsénié AsH_3 (état As^{3-}) volatil.
- 4- Caractérisation de l'hydrogène arsénié par réaction avec le diéthylthiocarbamate d'argent, en solution dans la pyridine, qui donne un complexe rouge-brun soluble, photométrable à 545 nm.

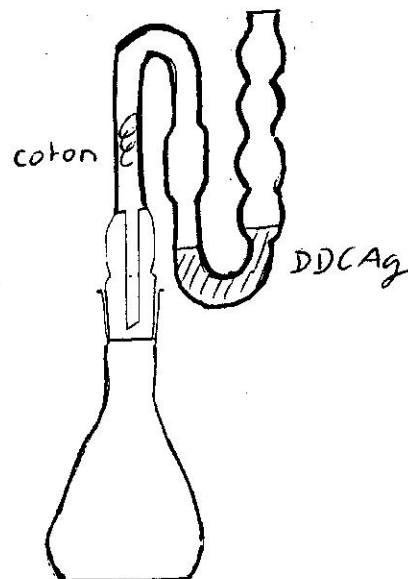
REACTIFS

- 1- Coton réactif à l'acétate de plomb
Immerger le coton dans une solution d'acétate de plomb à 100 g/L d'acide acétique au 1/20.
Laisser égoutter et sécher à l'obscurité .
A CONSERVER AU SEC ET A L'OBSCURITE.
- 2- Solution étalon concentrée d'arsenic à 1 g/L
Peser 4,165 g d'arséniate de sodium ($7H_2O$) et faire dissoudre dans de l'eau distillée qsp 1000 mL.
- 3- Solution étalon diluée d'arsenic à 10 mg/L
Diluer au 1/100 la solution précédente dans de l'eau distillée.
Bien agiter.
- 4- Solution d'acide sulfurique à 20 g/100 mL (11 mL%)
Dans un erlen pyrex de 2 litres, refroidi sous l'eau, contenant 1780 mL d'eau distillée, verser prudemment, à l'entonnoir, 220 mL de H_2SO_4 pur pour toxicologie.
- 5- Solution de chlorure de platine 1% en flacon compte gouttes
- 6- Zinc platiné préparé extemporanément (le platinage est destiné à activer l'attaque du zinc par l'acide sulfurique).
Dans un verre à pied, introduire 16 pastilles de zinc électrolytique pur et 50 mL d'eau contenant 5 gouttes de solution de chlorure de platine 1%. Agiter à l'aide d'un agitateur en verre, puis au bout de 10 minutes, décantier le liquide, laver le zinc avec un peu d'eau distillée.
Décantier à nouveau au moment de l'emploi.
- 7- Solution d'iodure de potassium à 15% dans l'eau distillée .
A faire extemporanément: 15 g dans 100 mL d'eau distillée
(une seule fois pour les 4 groupes)
- 8- Acide nitrique concentré, pur pour toxicologie.
- 9- Carbonate de magnésie.
- 10- Solution de $SnCl_2$, chlorure stanneux à 10% dans H_2SO_4 20%.
- 11- Solution de D.D.C. Ag: diéthylthiocarbamate d'argent à 1% dans la pyridine (à conserver au REFRIGERATEUR).

MATERIEL ET VERRERIE

- 1- 8 appareils de Martin-Floret (pour 2 sous-groupes)
l'appareil est constitué par:
 - un erlen générateur d'hydrogène de 150 mL où se produit la réduction par le zinc de l'acide sulfurique.
 - une colonne en S contenant un morceau de coton imprégné d'acétate de plomb (retient H_2S) et le DDC pour piéger AsH_3 .
- 2- 1 bain de sable.
- 3- 1 four à moufle.
- 4- 8 fioles jaugées de 5ml
- 5- 1 verre à pied de 100 mL.
- 6- 1 éprouvette de 50 mL.
- 7- 1 pipette de 10 mL

1	"	"	5 mL
1	"	"	2 mL
1	"	"	1 mL

MODE OPERATOIRE1- Minéralisation (NECESSITE DE LUNETTES)

- Ajouter dans la capsule à fond rond contenant 500 mg de cheveux (lavés au préalable à l'eau distillée et décantés) 2 mL d'acide nitrique concentré, en suivant les parois de la capsule.
- Chauffer au bain de sable jusqu'à dissolution, (rajouter HNO_3 si besoin) puis ajouter lentement 0,2 g de carbonate de magnésie pur.
- Lorsque le contenu de la capsule est presque complètement sec, placer la capsule dans le four à moufle (environ $550^\circ C$) jusqu'à cendres blanches, afin d'obtenir une minéralisation complète et une dissociation totale du carbonate de magnésie (laisser la capsule 1H30 à 2 heures au four).
- Laisser refroidir, sur le sommet du four à moufle. Numéroté Les cendres seront reprises ultérieurement par H_2SO_4 20%.

2- Dosage

- Dans chaque colonne en S placer au-dessus du bouchon un petit morceau de coton imprégné d'acétate de plomb et introduire 2 ml de DDC Ag dans la colonne à boules.
- Platiner le zinc à l'avance
- Verser la totalité du minéralisat à doser complété à 25 ml avec H₂O dans l'erlen Essai (E)
- Préparer les 6 erlens correspondant à la gamme d'étalonnage en **AGITANT** bien après chaque addition de réactif.

	0	5	10	E	15	20	30	E
Solution As 10 mg/l	0	0,5	1	Echant. + H ₂ O	1,5	2	3	Echant. + H ₂ O
Eau distillée	25	24,5	24	QSP 25	23,5	23	22	QSP 25
H ₂ SO ₄ 20%	17	17	17	17	17	17	17	17
KI 15%	5	5	5	5	5	5	5	5
SnCl ₂ 10%	1	1	1	1	1	1	1	1

- Ajouter rapidement dans chaque erlen 4 pastilles de zinc platiné et adapter immédiatement la colonne en S
- Laisser réagir pendant 20 mn au Bain de Sable
- Recueillir la solution de DDC Ag dans des fioles jaugées 5 ml
- Rincer la colonne en S avec du DDC Ag QSP 5 ml
- Photométrer à 545 nm
- Etablir la courbe d'étalonnage : DO en fonction de la quantité d'arsenic en µg

CALCUL

L'échantillon à doser correspond au produit de minéralisation de 500 mg de cheveux.

Le résultat sera exprimé en mg/kg.

RESULTAT

Normal < 1 mg/kg

Utilisateur de dentifrice arsenical (Sanogyl*, Pyorex): 3-10 mg/kg

Intoxication certaine \geq 20 mg/kg.

MANIPULATION B

OBJET :

- I SALICYLES : dosage dans un échantillon d'urine
- II DIBENZOAZEPINES : recherche dans deux échantillons d'urine
- III PHENOTHIAZINES : recherche dans deux échantillons d'urine

ORDRE DES MANIPULATIONS

- 1 - Préparer les dilutions et effectuer le dosage des SALICYLES.
- 2 - Préparer extemporanément les réactifs F.N.P. et F.S. utilisés pour la recherche des phénothiazines, et le réactif S.N.P.B. pour la recherche des dibenzoazépines, dans les petits flacons prévus à cet usage.
- 3 - Extraire les DIBENZOAZEPINES
- 4 - Faire évaporer les capsules correspondant aux extractions des dibenzoazépines.
- 5 - Extraire les PHENOTHIAZINES
- 6 - Faire les réactions d'identification des phénothiazines et dibenzoazépines
- 7 - Ne pas vider les flacons d'urine : à remettre au FRIGO

I - SALICYLES : dosage dans les urines

(D'après la technique de TRINDER P. Rapid determination of salicylate)
(in biological materials. Biochem. J. 1954, 57, 301-303, modifié par
(Bourdon R., Toxicologie clinique et analytique, Flammarion, 1971, p.236)

PRINCIPE :

En solution acide, les salicylates forment avec le fer trivalent un complexe de couleur pourpre, photométrable en présence d'une gamme-étalon.

REACTIFS :

- 1 - Solution de nitrate ferrique (cf. remarque 1)

Mesurer dans un ballon de 1000 ml :

. HCl concentré.....	10 ml
. Eau distillée.....	110 ml
. Nitrate ferrique (9 molécules d'eau)	40 g
. Chlorure mercurique	40 g

Agiter pour faire dissoudre.

Compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Ce réactif est stable indéfiniment à la température du laboratoire.

- 2 - Acide phosphorique d = 1,71
- 3 - Etalon salicylé concentré à 2000 mg d'acide salicylique par litre. (FRIGO)

Dans un ballon jaugé de 250 ml, introduire :

. salicylate de sodium	580 mg
. Eau distillée	200 ml

Agiter pour dissoudre le sel.

Puis compléter à 250 ml avec de l'eau distillée.

Ajouter 4 à 5 gouttes de chloroforme pour améliorer la conservation de la solution : cette solution est stable 6 mois à + 4°.

MATERIEL ET VERRERIE

- 1 pipette double trait 5 ml
- 1 pipette double trait 1 ml
- 1 pipette de 2 ml graduée au 1/10
- 2 pipettes de 1 ml
- 1 pipette de 5 ml
- 12 tubes à centrifuger coniques de 10 ml
- 3 fioles jaugées bouchées émeri (25 ml, 10 ml, 10 ml)
- photolorimètre
- centrifugeuse

PRELEVEMENT

Echantillon de 50 ml d'urine (débarassé de corps cétoniques éventuels par ébullition et refroidissement)

L'échantillon fourni aux T.P. est prêt à l'emploi.

MANIPULATION : Vérifier la propreté des fioles et des tubes coniques.

- 1 - Commencer par préparer 25 ml solution fille salicylés (400 µg/ml) par dilution très précise de l'étalon salicylé concentré, dans la fiole jaugée étiquetée. Bien agiter.
- 2 - Diluer soigneusement les urines au 1/2 et au 1/10 dans des fioles jaugées de 10 ml. Utiliser des pipettes à double trait. Bien agiter. On travaillera aussi sur l'urine pure, au cas où les teneurs en salicylés seraient faibles.
- 3 - Effectuer la réaction colorée dans 12 tubes à centrifuger coniques, en conduisant simultanément les dosages et la gamme d'étalonnage (0 à 400mg/l) Bien agiter entre chaque addition de réactif. Repos 5 minutes.

DOSAGE (6 tubes)	BU	U	GAMME ETALON (6 tubes)	BR	1	2	3	4	5
Urine pure ou 1/2 ou 1/10	1	1	solution fille salicylés	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
H ₃ PO ₄	0,1								
Eau distillée		0,1	Eau distillée	1,1	0,9	0,7	0,5	0,3	0,1
Nitrate ferrique	5	5	Nitrate ferrique	5	5	5	5	5	5

- 4 - Centrifuger environ 5 minutes si besoin. Vérifier la limpidité
- 5 - Lecture immédiate des D.O. à 540 nm en faisant le zéro :
 - . sur les BU pour les urines
 - . sur le BR pour la gamme
 Faire un tableau des D.O. en fonction des concentrations (à justifier)
- 6 - Construire la courbe d'étalonnage : D.O. (Absorbance) en fonction de la concentration en Salicylés (mg/l).
La loi de BEER-LAMBERT est suivie jusqu'à 1500 mg/l

CALCULS

- Se reporter à la courbe d'étalonnage, en choisissant la dilution d'urine dont la D.O. rentre le mieux dans la gamme.
- Multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution pour obtenir la concentration en mg d'acide salicylique/1000 ml d'urines.

RESULTATS :

- 1 - Sujet non traité aux salicylés : en principe on ne doit pas retrouver de salicylés, mais des artéfacts donnent une coloration correspondant à un taux de 20 mg d'acide salicylique par litre de sang et 45 mg d'acide salicylique par litre d'urine.
- 2 - Sujet traité aux salicylés : une concentration sanguine entre 200 et 500 mg%. d'acide salicylique apparaît 60 minutes après l'ingestion d'une dose thérapeutique, soit entre 800 et 2000 mg/l.
- 3 - Sujet intoxiqué : les premières manifestations d'intoxication (polypnée, agitation) apparaissent pour des taux sanguins de 200 à 1000 mg%, correspondant à des taux urinaires compris entre 1 et 4 g/litre. C'est pourquoi le dosage des salicylés dans l'urine implique des dilutions préalables.

Ces taux représentent précisément les concentrations qu'il faut s'efforcer d'atteindre lors de l'emploi des salicylés dans certaines maladies comme le rhumatisme articulaire aigu par exemple. La marge de sécurité est donc assez faible.

REMARQUES :

- 1 - La solution de nitrate ferrique réalise dans la même phase la défécation (acide chlorhydrique et chlorure mercurique) et la réaction colorée (Fe^{3+}).
L'inhibition de la coloration, qui peut être produite par des phosphates et oxalates, se trouvant en quantité importante dans les urines, est levée par l'utilisation d'une dose élevée de nitrate ferrique.
- 2 - Des techniques de dosage plus fines recommandent de commencer par extraire les salicylates du milieu biologique à l'aide du dichloroéthylène en milieu acide (10 ml de dichloroéthylène pour 5 ml de sang hépariné acidifié par 0,2 ml d'acide chlorhydrique concentré) (Routh J.I. et Dryer R.L. - Standard Methods of clinical Chemistry - Volume 3 - 1961, page 194 - Academic Press).
- 3 - L'acide salicylique et l'acide acétylsalicylique s'éliminent principalement sous forme d'acide salicylurique (combinaison avec le glycochrome).

Cette forme d'élimination conserve les principales propriétés analytiques des acides initiaux, en particulier la formation de complexe ferrique. On trouve en outre dans les urines de l'acide salicylique (sous forme conjuguée surtout), de l'acide gentisique (OH-salicylique) et très peu d'acide acétylsalicylique (qui ne réagit pas au FeCl_3).

Après une prise unitaire de 1 g d'acide salicylique, on retrouve dans les 24 heures suivantes 60 à 70 % de la dose administrée sous forme de dérivés salicylés urinaires (LEVY G., J. Pharm. Sci., 1965, 54, 959-962).

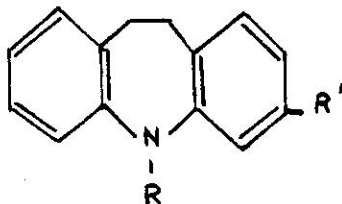
- 4 - La teneur en salicylés varie en fonction du temps séparant l'ingestion de la drogue et la prise de sang ou la collecte des urines : 3 à 6 heures après l'ingestion, le taux de salicylés dans le sang commence à diminuer.

II - DIBENZOAZEPINES : Recherche dans les urines des médicaments dérivés de la dibenzoazépine

FORREST I.S., FORREST F.M. et MASSON A.S. ,
Ann. Psychiat. 1960, 116, 1021.

PRINCIPE

- Extraction par un solvant organique (Heptane) en milieu alcalin (NaOH)
- Par oxydation sulfonitroperchlorochromique apparition d'une coloration variant du vert pâle au bleu-vert intense.



	R	R'
IMIPRAMINE	$-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{cases} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{cases}$	-H
ANAFRANIL	$-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{cases} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{cases}$	-Cl
PERTOFRAN	$-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{cases} \text{H} \\ \text{CH}_3 \end{cases}$	-H
SURMONTIL	$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{N} \begin{cases} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{cases}$	-H

REACTIFS :

- 1 - Bichromate de potassium à 2 %
- 2 - Solution d'acide sulfurique à 30 % (v/v)
- 3 - Solution d'acide nitrique à 50 % (v/v)
- 4 - Solution d'acide perchlorique à 20 % (v/v)
Diluer au tiers la solution d'acide perchlorique à 66 %, de densité 1,61.
- 5 - Mélange extemporané à parties égales des réactifs 1-2-3-4 :
réactif sulfo-nitro-perchlorique-bichromate (S.N.P.B.). Préparer 4 ml.
(valable pour les quatre sous-groupes)
- 6 - Heptane
- 7 - Lessive de soude à 40 g % ml
- 8 - Papier \uparrow H universel
- 9 - Sulfate de sodium anhydre

MATERIEL

- 2 ampoules à décantation de 100 ml
- 2 capsules de porcelaine de 50 ml
- 1 éprouvette de 50 ml
- 1 pipette de 10 ml

PRELEVEMENT

Urines : 30 ml

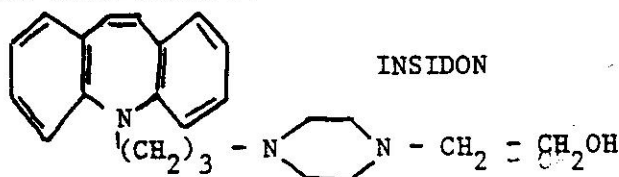
MODE OPERATOIRE : Faire la recherche dans deux échantillons d'urine :

- Mesurer dans une ampoule à décantation :

. Urine	30 ml	}	contrôlé par essai à la touche au moyen d'un agitateur, sur de petits carrés de papier réactif.
. Lessive de soude q.s.p.	pH 10		
. Heptane ...;.....	10 ml		
- Agiter énergiquement d'un mouvement circulaire régulier. séparer puis Deshydrater la phase organique sur Na_2SO_4 anhydre. Décanter soigneusement la phase organique dans une capsule très propre et évaporer sous infra-rouge.
- Faire tomber sur le résidu sec et froid une goutte de réactif S.N.P.B.
- Apparition, en cas de recherche positive, d'une coloration bleu-intense pour l'Imipramine ; le Pertofran R, et le Surmontil^R, donnant une coloration verte.

L'Insidon^R donne une coloration jaune-vert fugace (voir remarques 1 et 2)

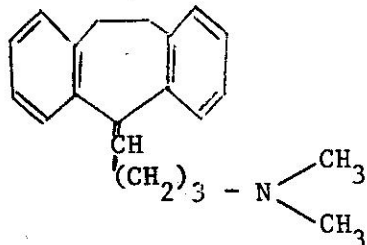
L'Anafranil^R donne une coloration bleue.

RESULTATS

La réaction est très sensible : elle décèle 10 microgrammes de substance dans la prise d'essai. L'ingestion de doses thérapeutiques (de 25 à 50 mg d'Imipramine par jour), fait apparaître une réaction positive dans les urines.

REMARQUES

- 1 - la présence de phénothiazine est révélée par l'apparition d'une couleur pourpre fugace, à moins que leur concentration ne dépasse 50 microgrammes par ml d'urine.
- 2 - Les métabolites de l'Amitriptyline (Laroxyl^R, Elavil^R) donnent dans ces conditions une coloration verte, nette au bout de 15 minutes, et s'intensifiant avec le temps.



LAROXYL

- 3 - Les troubles toxiques apparaissent pour une prise de 1 g et la dose mortelle est de 2,5 g (troubles cardiovasculaires).

III - PHENOTHIAZINES : recherche dans les urines

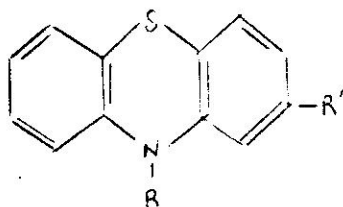
(FORREST I.M. et FORREST F.M. - Clin. Chem. 1960, 6, 11 et 362)

Les phénothiazines utilisées en thérapeutique pour leurs propriétés psychotropes sont toutes des 10-dialcoylaminophénothiazines, parfois substituées sur le noyau.

PRINCIPE

Extraction des phénothiazines par un solvant organique (Ether de Pétrole) en milieu alcalin (NaOH).

Oxydation de la phase organique : apparition d'une coloration allant du rose au bleu violet, qui se développe en moins de 10 secondes et qui semble liée à la présence du noyau phénothiazine.



	R	R'
PHENERGAN	$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	-H
LARGACTIL	$-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	-Cl
NOZINAN	$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	$-\text{OCH}_3$
MODITEN	$-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{---} \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$	$-\text{CF}_3$
MELLERIL	$-(\text{CH}_2)_2-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	$-\text{S}-\text{CH}_3$

REACTIFS :

- 1 - Ether de pétrole
- 2 - Solution de soude à 30 %
- 3 - Solution de chlorure ferrique à 5 % : (F)
- 4 - Solution d'acide nitrique à 50 % (v/v) : (N)
- 5 - Solution d'acide perchlorique à 20 % : (P)

Diluer au tiers la solution d'acide perchlorique à 66 %, de densité 1,61.

- 6 - Réactif "F.N.P." = ferro-nitro-perchlorique

Préparer extemporanément le mélange suivant : (pour les quatre sous-groupes)

FeCl ₃	5%	(F)	1,2 ml
HNO ₃	50%	(N)	12 ml
HClO ₄	20%	(P)	12 ml

- 7 - Solution d'acide sulfurique à 30 % (v/v) : (S)

- 8 - Réactif "F.S." = ferro sulfurique

Préparer extemporanément le mélange suivant : (pour les quatre sous-groupes)

FeCl ₃	5%	(F)	0,5 ml
H ₂ SO ₄	30%	(S)	24,5 ml

- 9 - Na₂SO₄ anhydre

PRELEVEMENT

Urines : échantillon de 30 ml

MATERIEL ET VERRERIE

- 2 ampoules à décanner de 100 ml
- 2 capsules de porcelaine de 100 ml
- 2 pipettes de 5 ml
- 2 " " 2 ml
- 2 " " 1 ml

MODE OPERATOIRE : Effectuer la recherche et l'identification dans deux échantillons d'urines.

- I - Extraction : (remarque 1)

Introduire dans une ampoule à décanner de 100 ml

. urine	10 ml
. Solution de soude à 30 %	4 ml
. éther de pétrole	6 ml

Agiter énergiquement comme précédemment. Déshydrater la phase orga/Na₂SO₄
Décanner et conserver la phase organique.

- II - Réaction colorée (sur plaque de porcelaine)

A 1 ml de la phase organique, ajouter 1 ml du réactif F.N.P. ou
1 ml du réactif F.S.

Apparition en moins de 10 secondes d'une coloration fugace allant du rose au bleu violacé suivant la concentration et la nature du dérivé phénothiazinique en cause. (comparer aux TEMOINS)

RESULTATS

- L'extrême sensibilité de la réaction permet de détecter 0,5 microgramme de phénothiazine (voir remarques 2 et 3).
- Les nuances obtenues avec les réactifs "F.N.P." et "F.S." permettent dans certains cas de préciser la nature de la phénothiazine. Aux T.P. on identifiera l'un des 4 composés soulignés ci-dessous :

Coloration rose :	Prométhazine	(<u>Phénergan</u> ^R)
	Thiazinamine	(<u>Multergan</u> ^R)
	Alimémazine	(<u>Théralène</u> ^R)
	Acépromazine	(<u>Plégicil</u> ^R)
	Diéthazine	(<u>Diparcol</u> ^R)
Coloration rouge :	Chlorpromazine	(<u>Largactil</u> ^R)
	Prochlorpémazine	(<u>Stémétil-Témentil</u> ^R)
Coloration orangée :	Trifluméthazine	(<u>Moditen</u> ^R)
	Trifluopérazine	(<u>Terfluzine</u> ^R)
Coloration violette :	Levomépromazine	(<u>Nozinan</u> ^R)
Coloration verte :	Triéthylpérazine	(<u>Torecan</u> ^R)
	Thioridazine	(<u>Melleril</u> ^R)

REMARQUES

- 1 - FORREST fait agir le réactif "F.N.P. directement sur les urines sans extraction préalable, cette méthode a l'avantage d'être très rapide, mais présente l'inconvénient de donner des réactions faussement positives avec le P.A.S.l'acide phénylpyruvique, les salicylés, les pigments biliaires.
- 2 - Les phénothiazines sont très rapidement métabolisées à l'état de sulfoxydes (oxydation sur l'atome de soufre) et de phénols sulfo-conjugués, si bien que leur recherche et leur dosage sans hydrolyse dans les liquides biologiques ne permettent de mettre en évidence qu'un faible pourcentage du produit (environ 20 % de la fraction excrétée).
- 3 - La quantité totale de phénothiazine éliminée par 24 heures est de l'ordre de 25 mg lorsque la posologie journalière dépasse 200 mg.

MANIPULATION C

- OBJET :
- I - Mesure du taux d'ALCOOL dans deux échantillons de sang par la méthode officielle de CORDEBARD.
 - II - Réactions de caractérisation de l'ETHANOL, METHANOL, ACETONE.
 - III - Mesure du taux d'ALCOOL dans l'air expiré au moyen de l'ALCOTEST

ORDRE DES MANIPULATIONS

- 1 - Mise en route des deux distillations (cf. p.23)
- 2 - Rechercher dans une liqueur aqueuse, la présence d'acétone, éthanol ou méthanol par la réaction de LEGAL, la formation d'iodoforme, et la réaction à l'acide chromotrope.
Opérer comparativement à des solutions témoins d'acétone, méthanol et éthanol à 1/1000.
- 3 - Préparer la solution d'iodure de potassium à 5 %
- 4 - Dosage du pouvoir réducteur des deux distillats et du témoin.
- 5 - Utilisation de l'ALCOTEST.
- 6 - Ne pas vider les flacons de sang: à remettre au FRIGO.

I - MESURE DU TAUX D'ALCOOL DANS L'AIREXPIRE AU MOYEN DE L'ALCOTEST

La plupart des auteurs sont d'accord pour admettre qu'il existe un rapport constant entre le taux d'alcool dans le sang et celui de l'air expiré (2160 ml d'air alvéolaire à 33° renferment autant d'alcool qu'un ml de sang). En partant de cette notion, plusieurs appareils ont été réalisés. Ils permettent de fournir avec une plus ou moins grande précision la teneur en alcool de l'air expiré, et d'en déduire le taux d'alcoolémie. L'alcotest de DRAEGER est l'appareil le plus simple et le plus utilisé.

PRINCIPE

Passage de l'air alvéolaire du sujet à travers un tube contenant un mélange de bichromate de potassium, de gel de silice et d'acide sulfurique. Le dégagement de chaleur consécutif à l'hydratation de l'acide sulfurique par l'humidité de l'air provoque une augmentation suffisante de la température pour que l'alcool réduise le bichromate de potassium jaune en sels de chrome de couleur verte sur une certaine longueur, et ce, en fonction de la teneur en alcool.

MATERIEL : Alcotest DRÄGER*

- Tube réactif alcotest à conserver en boîte fermée à l'abri de la lumière (stockage possible pendant 3 ans). Vérifier avant l'emploi que le tube présente une coloration jaune homogène.
- Embouchure buccale à usage unique.
- Poche de mesure (voir remarque 1).

PRELEVEMENT

- Faire souffler le sujet par l'embout buccal à travers le tube dans la poche de mesure jusqu'à ce que celle-ci soit complètement gonflée, et ceci si possible en une seule expiration. Cette opération doit durer entre 10 et 20 secondes.
- Ne faire le test que \geq 15 minutes après l'absorption de boissons alcoolisées ou aromatisées. En effet, immédiatement après l'absorption de la boisson, l'échantillon d'air expiré ne contient que l'alcool dissout dans une quantité de salive limitée, et il n'existe alors pas de rapport entre la teneur en alcool de l'air expiré et l'alcoolémie.
- Ne pas faire le test chez un sujet venant de fumer (aldéhydes réducteurs dans la fumée)
Attendre également \gg 5 minutes.

MODE OPERATOIRE :

- Effectuer 2 mesures; l'une dans des conditions normales, l'autre après avoir déposé une goutte d'éthanol au bout de la langue (utiliser le même tube réactif et la même poche)?
- Prélever un tube de la boîte alcotest.
- Le saisir le plus près possible des pointes à ouvrir, casser les pointes à l'aide d'une petite scie.
- Adapter le tube sur l'orifice de la poche de mesure vide, c'est à dire aplatie, la flèche imprimée sur le tube étant dirigée vers la poche.
- Ajuster l'embout buccal à usage unique sur l'extrémité libre du tube à alcotest. Enfoncer soigneusement le tube dans l'embouchure.
- Souffler dans la poche.
- Effectuer la lecture au bout de 5 minutes.

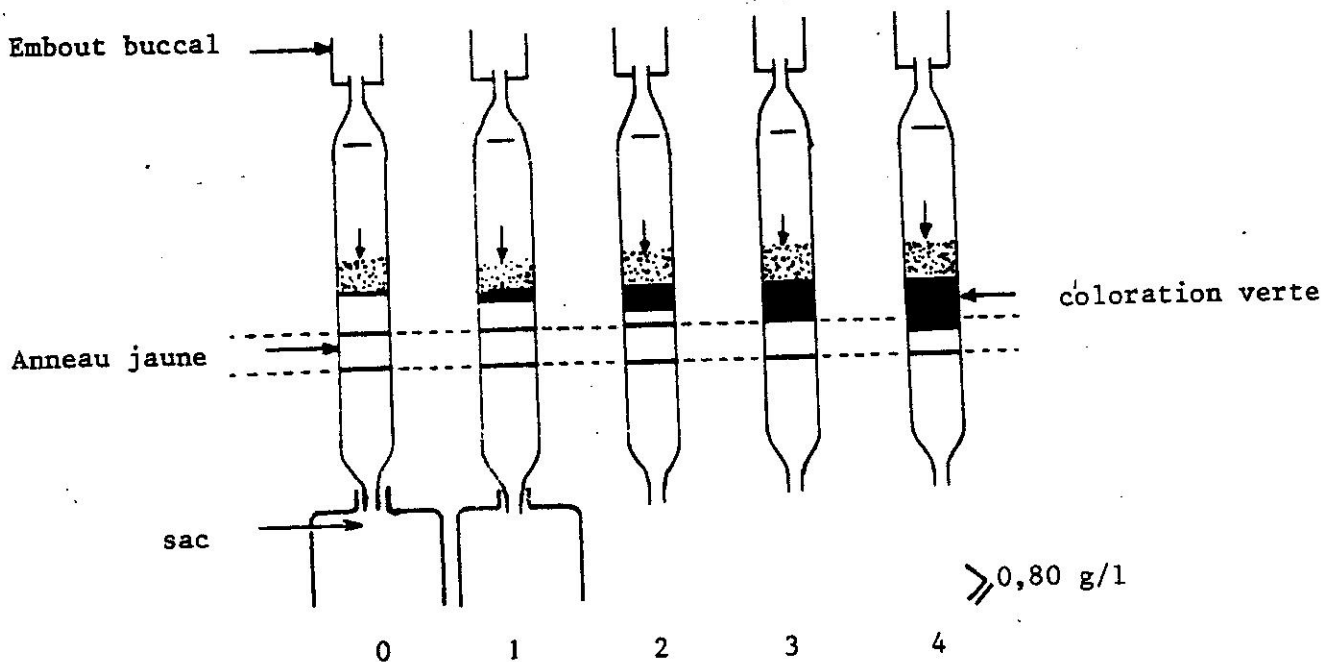
RESULTATS

- Les résultats sont appréciés en fonction de la longueur du tube coloré en vert (voir schéma). Si la coloration verte atteint ou dépasse l'anneau jaune imprimé sur le tube, la teneur en alcool du sang est supérieure à 0,70 g/litre.

* DRÄGER / BRANDT - 3c, route de la Fédération 67100 STRASBOURG.

Le fabricant prévoit 5 cas : (cf. Tableau et schéma ci-dessous).

Cas	Coloration	Taux d'alcoolémie en g/litre
0	pas de coloration verte	$< 0,30$
1	coloration verte \pm étendue mais n'atteignant pas l'anneau jaune	Légèrement $> 0,30$
2		$< 0,70$
3	coloration verte atteignant l'anneau jaune	environ $0,70$
4	coloration verte dépassant l'anneau jaune	$\geq 0,80$



Il est indispensable, lors d'un résultat positif (cas 3 et 4) de compléter l'analyse par un dosage de l'alcoolémie selon la technique officielle.

REMARQUES :

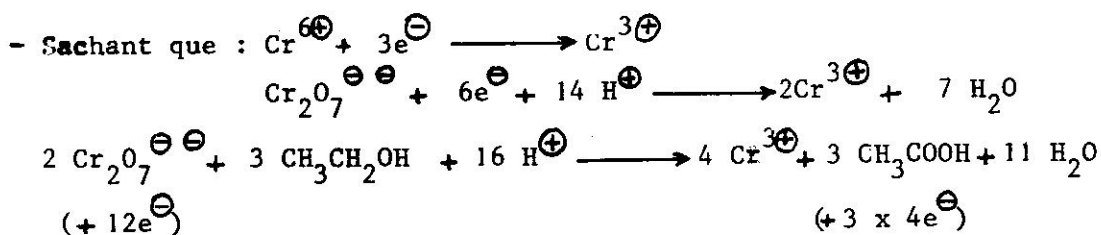
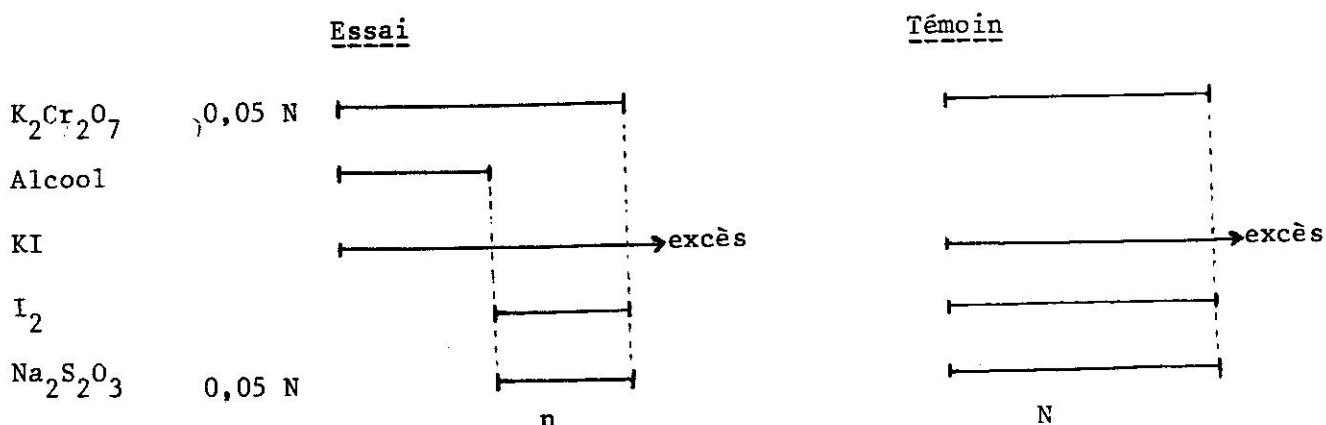
- 1 - La poche de mesure peut resservir une dizaine de fois.
- 2 - Dans le cas où le tube alcotest utilisé doit être conservé comme pièce à conviction, il est indispensable de le préserver de l'air et de la lumière en le stockant dans un récipient étanche, ou en le scellant à ses 2 extrémités avec de la paraffine.

II - ALCOOL ETHYLIQUE : Dosage dans le sang

- Méthode officielle parue au Journal Officiel du 5 décembre 1955 page 11798 (conditions d'application du décret n° 55 807 du 18 juin 1955).
- Modifiée suivant les propositions de CORDEBARD H. Bull. Soc. Pharm. Nancy, 1957, 33, 14-21.
- Modifiée : J.O. 30 Novembre 1972.

PRINCIPE :

- Distillation en présence d'acide picrique utilisé comme déféquant.
- Dosage de l'alcool contenu dans le distillat par l'utilisation des propriétés réductrices de l'alcool vis-à-vis d'une solution nitrique de bichromate de potassium à froid et en excès, exactement mesurée.
- L'excès de bichromate est dosé par iodométrie : après addition d'une quantité suffisante d'iodure de potassium, l'iode libéré est dosé par une solution titrée de thiosulfate de sodium 0,05 N.
- On opère parallèlement et de façon identique sur un témoin constitué par un volume de solution de bichromate égal à celui qui avait été utilisé pour l'essai.
- On aura donc le schéma suivant :



Chaque molécule d'éthanol est oxydée par 4 équivalents de bichromate : par conséquent, 4 litres de solution N de bichromate de potassium oxydent 46 g d'éthanol, d'où, 1 ml de sol. de $K_2Cr_2O_7$ 0,05 N oxyde 0,575 mg d'éthanol.

REACTIFS :

- 1 - Solution saturée d'acide picrique dans l'eau distillée.
 - Dissoudre à chaud 15 g d'acide picrique dans un litre d'eau distillée.
 - Faire bouillir 15 minutes sous reflux pour chasser les matières réductrices volatiles.
 - Laisser refroidir et décanter la solution saturée.

2 - Réactif nitrochromique 0,05 N exact (N/20)

{ Bichromate de potassium pur 2,451 g
 { Acide nitrique pur Q.S.P. 1000 ml

- L'acide nitrique utilisé doit être exempt de vapeurs nitreuses : le préparer en faisant barboter pendant 15 minutes un courant d'air filtré sur un tampon de coton.
- Faire cette solution quelques heures à l'avance. La titrer à l'aide d'une solution de thiosulfate 0,05 N exacte.
- La solution se conserve pratiquement indéfiniment.

3 - Iodure de potassium pur :

Pour les 4 sous-groupes, on pèse 12,5 g KI et on prépare extemporanément 250 ml de solution à 5 %.

4 - Solution de thiosulfate de sodium 0,05 N (N/20)

Le titre doit être exactement connu. Conserver au FRIGO, en présence de quelques gouttes de chloroforme.

5 - Antimousse type silicone Rhodorsil RP 426MATERIEL ET VERRERIE :

- 2 appareils à distiller de 300 ml avec colonne de Vigreux et réfrigérant. Tous les rodages sont en verre et normalisés.
- 2 ballons jaugés de 50 ml bouchant à l'émeri
- 1 cristalliseur de 200 ml
- 3 erlenmeyers de 250 ml bouchant à l'émeri.
- 1 petit entonnoir
- 1 burette de 20 ml graduée au 1/10 ml
- 1 éprouvette de 100 ml
- 1 " de 20 ml
- 2 pipettes à boule de 10 ml
- 1 " " 5 ml
- 1 pipette de 10 ml
- 2 " 5 ml
- 1 " 1 ml

PRELEVEMENT :

- 1 - 15 ml de sang recueilli sur fluorure de sodium (5 mg/ml)
 - n'utiliser pour l'aseptie ni alcool, ni alcool iodé, ni antiseptique volatil et réducteur (éther)
 - boucher soigneusement le tube
 - effectuer le dosage dans les plus brefs délais.
- 2 - Lorsque la détermination de l'alcoolémie a lieu à des fins médico-légales, répartir le sang au moment du prélèvement, dans 2 tubes de 10 ml : un tube est destiné au dosage et l'autre est conservé à + 4° pour une contre-expertise éventuelle.
 (Les tubes sont scellés en présence du médecin et de l'intéressé.)

MODE OPERATOIRE :

Effectuer le dosage sur les deux échantillons de sang.

I - Distillation :

- Placer dans le ballon à distiller 20 ml d'eau distillée.
- Ajouter très lentement et en agitant 10 ml de sang exactement mesurés à l'aide d'une pipette jaugée entre 2 traits (hémolyse).
- A l'aide d'un entonnoir, afin de ne pas souiller le col du ballon, introduire 70 ml de la solution d'acide picrique mesurés à l'éprouvette.
- Ajouter 2 gouttes d'antimousse. Homogénéiser.
- Attendre 10 minutes. Pendant ce temps, préparer le montage suivant :
- Monter l'appareil à distiller en veillant à ce que l'extrémité du réfrigérant plonge dans environ 5 ml d'eau distillée introduits au fond d'un ballon jaugé de 50 ml baignant dans de l'eau glacée (contenue dans un cristalliseur de 200 ml). Bien fixer les rodages à l'aide de pinces spéciales. Placer le ballon sur la plaque d'amiante du bec Bunsen.
- Porter rapidement à ébullition. Observer le passage des premières gouttes de distillat. Chauffer doucement pour éviter l'entraînement d'acide picrique (si distillat jaunâtre = à rejeter), mais suffisamment pour obtenir une distillation et éviter l'aspiration du distillat dans le ballon. En cas d'aspiration, augmenter légèrement le chauffage.
- Lorsqu'on a recueilli environ 40 ml de distillat, on abaisse d'abord la fiole jaugée, puis on arrête le chauffage.
- Compléter immédiatement le distillat à 50 ml avec de l'eau distillée, bien agiter, boucher.
- Rechercher l'éthanol dans le distillat par réaction de l'iodoforme (p. 23) avant d'entreprendre le dosage
- Lorsque l'appareil a refroidi, inverser le réfrigérant pour

RINCAGEII - Dosage :

Effectuer parallèlement un TEMOIN et deux ESSAIS par distillat.
Dans des erlens de 250 ml, bouchant à l'émeri, on introduit :

ESSAI

TEMOIN

Réactif nitrochromique ...	10 ml (double trait)	Réactif nitrochromique ...	10 ml
Distillat	5 ml (double trait)	Eau distillée	5 ml

- Boucher
- Agiter par rotation à la main, sans que le liquide touche le bouchon.
- Laisser reposer 10 minutes à la température du laboratoire.
- Ajouter dans chaque erlen :

Eau distillée	100 ml	(voir remarque 1)
Solution d'iodure de potassium à 5 % ...	10 ml	
- Attendre 1 minute après l'addition de l'iodure et titrer l'iode libéré par du thiosulfate de sodium N/20 versé à la burette jusqu'à disparition de la coloration jaune et apparition de la coloration bleu pâle des sels de chrome (voir remarques 2 et 3)
- Soit E ml de thiosulfate N/20 pour l'ESSAI, et T ml pour le TEMOIN.
- Laver abondamment le ballon à distiller. Si besoin, le laisser rempli d'eau de Javel.

III - Calculs :

On doit trouver normalement $T = 10$ ml pour le témoin.

Dans le cas inverse, sachant que le réactif nitrochromique est stable, on en déduit que le titre de thiosulfate a varié. On fera la correction nécessaire, sachant que :

- . 1 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,05 N) = 1 ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0,05N) = 0,575 mg alcool éthylique
- . T ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (faux) \leftrightarrow 10 ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0,05N) exact.
- . (T - E) ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (faux) \leftrightarrow X ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0,05 N) : faire une règle de trois afin de calculer la valeur de X.

On aura donc (0,575 . X) mg d'alcool éthylique dans 5 ml de distillat.

Exprimer le résultat en g/l sachant que 50 ml de distillat \equiv 10 ml de sang.

RESULTATS :

1 - Résultats normaux :

Jusqu'à 0,50 g/litre : pas de signes cliniques appréciables. Un sang normal peut contenir jusqu'à 0,10 g/litre de substances volatiles réductrices exprimées en alcool.

2 - Résultats anormaux :

Entre 0,50 et 1 gramme par litre : ébriété chez les sujets sensibles ou hypoglycémiques.

Entre 1 g et 1,5 g/litre : 70 % des individus présentent des signes d'ivresse.

Entre 1,5 et 2 g/litre : 83 % " "

Entre 2 et 2,5 g/litre : 92 % " "

Aut-dessus de 2,5 g/litre : 95 % " "

- Il n'y a pas de parallélisme entre la dose d'alcool absorbée et l'alcoolémie en raison de nombreux facteurs qui influent sur le degré d'alcoolémie (fatigue, insuffisance hépatique, accoutumance). Cependant, on a traditionnellement l'habitude de dire que la teneur en alcool par litre de sang est proportionnelle à la quantité d'alcool ingérée, par kg de poids corporel, 3 heures auparavant (règle de Balthazard).

Ainsi chez un homme de 70 kg, une alcoolémie à 2 % signifierait qu'il aurait absorbé trois heures auparavant 140 g d'alcool absolu, soit 2 litres de vin à 11°.

- On doit interpréter les résultats, non pas en fonction de la quantité d'alcool ingérée, mais de l'alcoolémie au moment du délit.

La limite légale d'alcoolémie dans le sang des conducteurs d'automobile est fixée 0,80 g/litre (article L 1° du code de la route, Loi du 9 juillet 1970).

REMARQUES

- 1 - Il est fondamental d'ajouter l'iodure après l'eau distillée, sinon il se produit une libération massive d'iode sous l'influence de l'acide nitrique concentré du milieu.
- 2 - Ne pas prolonger le temps de contact au-delà du temps prescrit, sinon il se produit une libération supplémentaire d'iode par oxydation à l'air et à la lumière de l'acide iodhydrique.
- 3 - Il est recommandé de ne pas employer d'empois d'amidon comme indicateur, car le virage du bleu foncé au bleu clair est plus difficile à saisir que le virage du jaune au bleu-vert des sels de chrome.

III - RECHERCHE D'ETHANOL, METHANOL, ACETONE

- Il est possible de caractériser l'acétone et l'éthanol par la formation d'iodoforme.
- L'acétone seule donne la réaction de LEGAL au nitroprussiate.
- Le méthanol, après oxydation, donne la réaction à l'acide chromotropique.

Ⓐ - Formation d'iodoforme :

ACETONE et ETHANOL se transforment dans les conditions opératoires décrites en iodoforme CHI_3 .

REACTIFS :

- 1 - Lessive de soude.
- * 2 - Solution d'iodure de potassium à 5 % (préparée précédemment, cf. p. 20 à préparer extemporanément)
- 3 - Solution d'hypochlorite de sodium à 5%
- 4 - Ammoniaque
- * 5 - Ethanol 1 % (à diluer extemporanément au 1/10)
- * 6 - Acétone 1 % (" " ")
- 7 - Acide acétique cristallisable.
- 8 - Nitroprussiate de sodium.

MODE OPERATOIRE :

Opérer en même temps sur des solutions témoins d'éthanol et d'acétone diluées à 1% (témoins ⊕) et sur de l'eau distillée (témoin ⊖)

- Mélanger dans un tube à essai :

- . distillat 0,5 ml
- . lessive de soude 2 gouttes
- . solution d'iodure de potassium 1 ml
- . solution d'hypochlorite de sodium 4 gouttes

Chauffer à 80 °, apparition de l'odeur caractéristique de l'iodoforme (comparer l'odeur avec celle des témoins + et -)

L'acétone donne la même réaction. Pour différencier acétone et éthanol, refaire la réaction, en remplaçant la soude par l'ammoniaque.

Dans ces conditions, l'éthanol ne donne pas d'iodoforme à l'opposé de l'acétone (+)

ⓑ- Réaction de LEGAL : (technique de IMBERT-BONAMOUR)

REACTIF : { Acide acétique 10 ml
 { Sol. nitroprussiate Na (1/10) extemporanée 10 ml

Mélanger dans un tube à essai :

- . distillat 5 ml
- . R.LEGAL 7 gouttes

Puis ajouter délicatement, à l'aide d'une pipette effilée, à la surface :

- . NH₄OH 1 ml

A la zone de séparation de l'ammoniaque et du distillat, il se forme un disque violet, plus ou moins foncé, en présence d'acétone. Un disque blanc-gris correspond à une réaction négative.

Limite de sensibilité de la réaction : 0,05 g/litre (50 ppm).

ⓒ- Réaction avec l'acide chromotropique :

- oxydation du METHANOL en aldéhyde formique (HCHO) par le permanganate de potassium en milieu acide phosphorique.
- Détruire l'excès de permanganate par du bisulfite.
- Caractérisation de l'aldéhyde formique formé par la coloration rouge-violet donnée avec l'acide chromotropique, à chaud.

REACTIFS :

- 1 - Solution phosphorique (40 g/litre) de permanganate de potassium normale (31,6 g/l)
 Faire dissoudre 15,8 g de permanganate de potassium dans 100 ml d'eau distillée.
 Ajouter prudemment 14 ml d'acide phosphorique à 85 %
 Compléter avec de l'eau distillée q.s.p 500 ml
 Garder cette solution en flacon jaune. Conservation excellente.
- 2 - Solution de bisulfite de sodium : à environ 30 % en SO₂
- 3 - Acide phosphorique concentré (85%) densité = 1,71

- * 4 - Solution d'acide chromotropique : (acide 1,8-dihydroxynaphtalène 3,6-disulfonique à 1,5 g % ml.) . Pour les 4 sous-groupes, dissoudre extemporanément 300 mg du sel de sodium de l'acide chromotropique dans 20 ml d'eau distillée, dans le flacon prévu à cet usage.
- * 5 - Méthanol à 1 % (à diluer extemporanément au 1/10).
- 6 - Acide sulfurique concentré (95 %)

Il faut utiliser de l'acide sulfurique exempt de produits nitreux qui donnent une coloration brun-violet avec l'acide chromotropique (voir remarque 1).

MATERIEL

- 3 erlens de 150 ml
- 4 pipettes de 1 ml
- 2 " 5 ml
- 1 " 10 ml

MODE OPERATOIRE : (avec des LUNETTES)

- Effectuer la réaction sur :
- la liqueur: ESSAI
 - une solution de méthanol diluée : TEMOIN ⊕
 - eau distillée : TEMOIN ⊖

1 - Oxydation en formaldéhyde :

Mesurer dans 3 erlenmeyers de 150 ml à col rodé :

	ESSAI	TEMOIN ⊖	TEMOIN ⊕
Distillat	1 ml	0	0
Solution méthanol 1 %.	0	0	1 ml
Eau distillée	0	1 ml	0
Solution phosphorique de permanganate	5 ml	5 ml	5 ml

- Agiter énergiquement par un mouvement circulaire .
- Attendre 10 minutes à la température du laboratoire (=oxydation) .
- Ajouter 2,5 ml de solution de bisulfite de sodium et immédiatement après 0,5 ml d'acide phosphorique concentré.
- Agiter énergiquement par un mouvement circulaire jusqu'à décoloration complète (ajouter au besoin du bisulfite de sodium afin d'éliminer totalement l'excès de $KMnO_4$ dont la coloration serait gênante ultérieurement.
- 2 - Réaction colorée (à pratiquer sur les témoins et sur la réaction)
Mesurer dans 3 tubes à essai vissés pyrex :

- . Mélange réactionnel 1 ml
- . Solution d'acide chromotropique extemporanée .. 1 ml

Faire couler avec soin au fond du tube à essai 8 ml d'acide sulfurique concentré. (LUNETTES indispensables)

Mélanger prudemment avec un agitateur en verre.

Porter 5 minutes au bain-marie bouillant.

Apparition d'une coloration violet-pourpre indiquant la présence d'alcool méthylique (voir remarque 1).

RESULTATS :

- La réaction est extrêmement sensible et pratiquement spécifique (voir remarque 2).
- Elle permet de détecter 0,1 g d'alcool méthylique par litre (100 ppm).

REMARQUES :

- 1 - Le blanc réactif peut donner une coloration violette intense si le test est réalisé dans un laboratoire où l'on manipule du formol : une bouteille d'acide sulfurique ouverte a une très grande affinité pour le formol se trouvant dans l'atmosphère. Pour faire la preuve que la réaction est due au formol, supprimer l'addition de permanganate : le test demeure positif, alors que le méthanol dans ces conditions reste négatif.
- 2 - Seules des concentrations très importantes d'éthanol peuvent interférer dans la caractérisation du méthanol.
- 3 - En cas de mise en évidence d'alcool méthylique, il est indispensable de surveiller l'équilibre acido-basique du sujet : c'est le degré d'acidose qui est à considérer en premier lieu pour la mise en oeuvre du traitement (perfusion de soluté de bicarbonate).
- 4 - Cette technique est applicable à la caractérisation de l'alcool méthylique dans les atmosphères après captage par passage de l'air dans des barboteurs d'eau distillée refroidie.

- OBJET :
- I - EXTRACTION DES TOXIQUES à partir des milieux biologiques par la méthode de CLARKE-NICKOLLS (1969)
 - II - IDENTIFICATION DES TOXIQUES par C.C.M.

PRINCIPE :

I - Extraction

La méthode de CLARKE permet l'extraction rapide des toxiques organiques contenus dans un milieu biologique.

- Après déprotéinisation par l'acide chlorhydrique à chaud et relargage par $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, on sépare le coagulum obtenu par filtration sous vide.
- L'extraction des substances organiques est effectuée :

- 1 - Par l'éther éthylique en milieu acide qui permet de recueillir les toxiques à caractère acide ou neutre (barbituriques - glucosides salicylés). Les alcaloïdes, alors sous forme de sels, demeurent en solution dans la phase aqueuse.
- 2 - Par la chloroforme en milieu alcalin pH 8.
Les alcaloïdes passent alors à l'état de bases insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques.

II - Identification

Se reporter à la manipulation F pour les notions générales concernant la chromatographie sur couches minces.

Les toxiques sont déposés sur plaques de SILICAGEL GF 254 (fluorescentes)

Les plaques de Silice ayant une réaction légèrement acide retiennent au point de départ les substances basiques en phase mobile neutre. C'est pourquoi, les mélanges solvants destinés à déplacer les alcaloïdes-bases sur silicagel contiennent le plus souvent un composé basique : diéthylamine, pyridine, ammoniacque ; aux T.P. : acétone, chloroforme, ammoniacque, (75 : 15 : 10)

On pourrait également utiliser des plaques d'Alumine avec un solvant neutre, tel que : chloroforme - éthanol à 95° (80 : 2)

REACTIFS :

- 1 - Acide chlorhydrique 2 N
- 2 - Sulfate d'ammonium P.A.
- 3 - Sulfate de sodium anhydre
- 4 - Ammoniacque officinale
- 5 - Perchlorure de fer officinal à 1 % ou Nitrate Ferrique (cf.p. 8)

- 6 - Ether éthylique
- 7 - Chloroforme rectifié
- 8 - Cyclohexane
- 9 - Acide acétique
- 10 - Méthanol
- 11 - Ethanol à 95°
- 12 - Acétone
- 13 - Nitrate mercureux en solution aqueuse saturée à 1 %, à renouveler chaque semaine (flacon verre brun, rodé, FRIGO)
- 14 - Permanganate de potassium à 0,1 %
- 15 - Réactif de DRAGGENDORF (cf. manipulation G)
- 16 - Iodoplatinate de potassium (flacon verre brun, rodé, FRIGO)
 - Acide hexaplatinique à 10 % 3 ml
 - H₂O distillée 97 ml
 - Iodure de potassium à 6 % 100 ml
- 17 - Solutions témoins à 0,5 % dans l'éthanol à 95 °

(5 µg / µl) :	Barbital	Acide Salicylique
	Butobarbital	Strychnine-base
	Sécobarbital	Brucine-base
	Penthiobarbital	Quinine-base
- 18 - Papier pH universel (1 - 10)
- 19 - Plaques C.C.M. de Silicagel GF 254 (préparation manuelle à chaque séance, par les étudiants.)
- 20 - Nitrate de cobalt à 3 % dans l'éthanol absolu. Répartir le réactif en ampoules scellées de 5 ml pour le conserver ANHYDRE.
- 21 - Diéthylamine au 1/3 dans l'éthanol absolu. Répartir le réactif en ampoules scellées de 2 ml, car cette solution ne se conserve pas plus de 8 jours.

MATERIEL :

. Pour chaque sous-groupe :

- 1 pipette de 10 ml
- 2 pipettes de 5 ml
- 1 pipette de 2 ml
- 3 pipettes de 1 ml
- 1 pipette de 0,5 ml
- 1 petit entonnoir

- 1 agitateur de verre
- 2 erlens de 100 ml
- 2 béciers de 50 ml
- 2 ampoules à décanter de 125 ml avec support
- 1 fiole à vide + büchner + filtres ronds
- 1 bain-marie + 1 thermomètre
- 5 capsules de porcelaine hautes de 50 ml
- 2 éprouvettes de 60 ml

. Pour l'ensemble du groupe D :

- 3 cuves C.C.M. (pour : Barbituriques, Salicylés, Alcaloïdes)
- 4 gabarits plexiglas
- 2 éprouvettes de 60 ml (pour : Ether, Cyclohexane)
- 2 éprouvettes de 125 ml (pour : Chloforme, Acétone)
- 2 pipettes de 10 ml
- 1 pipette de 1 ml
- 4 micropipettes de 20 μ l (pour C.C.M.)
- 4 tubes à essai de 20 ml (pour Alcool de rinçage des μ - pipettes)

ECHANTILLON :

10 ml de sang, prélevé sur anticoagulant (fluorure de sodium)

MODE OPERATOIRE :

1 - Déprotéinisation

Dans un bécier de 100 ml ajouter successivement :

Sang dilué 1/2	5ml
HCl 2 N	5ml
Sulfate d'ammonium	3 g

Agiter jusqu'à obtention d'une bouillie fluide.

Porter au B.M. 80°C pendant 20 minutes, en le fixant à l'aide d'une pince.

Agiter à nouveau pour remettre en suspension. **verser sur un agitateur**

Filtrer prudemment sur Büchner, sous vide, avec un papier filtre à 4 épaisseurs humecté d'eau distillée chaude. Rincer le filtre avec 10ml d'eau chaude.

Le filtrat total (environ 15ml) est versé dans une ampoule à décanter de 125ml.

2 - Extraction par l'ETHER ACIDE (Barbituriques, Salicylés)

Extraire la phase aqueuse avec 2 x 20 ml d'Ether éthylique.
Conserver la phase aqueuse (inférieure) dans l' autre ampoule pour
alcalinisation ultérieure.

Réunir les extraits étherés dans un b cher SEC de 100 ml.

Sécher soigneusement par addition d'une pincée de Na_2SO_4 anhydre. Décanter ou
filtrer sur papier et recueillir dans (3) petits creusets de porcelaine (E).

Evaporer à sec dans l'évaporateur I.R. sans surchauffer.

→ Conserver 1 creuset E pour la C.C.M.

3 - Extraction par le CHLOROFORME ALCALIN (Alcalo ides)

La phase aqueuse précédente est alcalinisée par 1 ml d'ammoniaque
concentrée. Vérifier le pH (8 - 10).

Verser dans une ampoule à décanter de 125 ml.

Extraire par 2 x 20 ml de chloroforme. (Eprouvette).

Réunir les extraits chloroformiques dans un b cher SEC de 100 ml.

Sécher soigneusement comme précédemment sur Na_2SO_4 anhydre. Décanter ou
filtrer et recueillir dans (2) petits creusets de porcelaine (C).

Evaporer à sec dans l'évaporateur I.R. sans surchauffer.

→ Conserver 1 creuset C pour la C.C.M.

4 - Réactions d'orientation

a- SALICYLES : reprendre l'extrait sec E par 1 ml d'eau chaude, en
grattant les parois de la capsule avec un agitateur de verre.
Ajouter 1 goutte de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$   1%. En présence d'acide
salicylique, il se développe une coloration violette.

b- BARBITURIQUES : On pratiquera la réaction de PARRI.

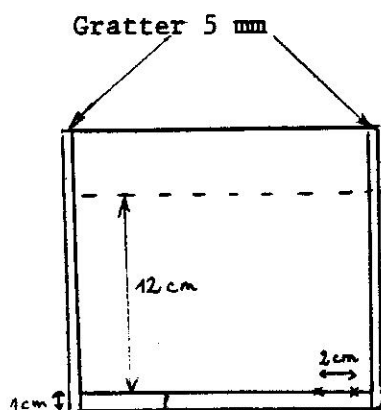
Reprendre l'extrait sec E par 0,5 ml de nitrate de cobalt à 3 %
en grattant bien les parois de la capsule avec un agitateur de verre.
Alcaliniser par 0,1 ml de diéthylamine au 1/3. En milieu ANHYDRE strict,
l'apparition d'une coloration violette indique la présence de
barbituriques.

c- ALCALOIDES : reprendre l'extrait sec C par 4 gouttes HCl au 1/10,
en grattant bien les parois de la capsule à l'agitateur. Ajouter doucement
2 gouttes de réactif de Draggendorf. En présence d'alcalo ides il
apparaît un précipité orangé stable.

5 - Séparation chromatographique :

En fonction des résultats des tests d'orientation, on réalisera une C.C.M., sur plaque de SILICAGEL GF 254, activée à 120°C, 30 mn.

- . Le solvant choisi devra être préparé aussitôt, afin que la cuve puisse se saturer. On obtient une saturation plus rapide en tapissant la paroi arrière de la cuve d'un papier filtre humecté dans le solvant. Bien ajuster le couvercle rodé de la cuve.
- . Les chromatogrammes seront préparés de la façon suivante :



- Vérifier la nature de la couche adsorbante et la qualité de l'étalement des plaques de silice.
 - A l'aide du chevalet en plexiglas, pointer ligne de départ et ligne d'arrivée, distances de 12 cm, sur le bord de la plaque (ne jamais rompre la surface de la couche adsorbante par un trait continu).
 - La ligne de départ doit se trouver à environ 1 cm du bord inférieur de la plaque et les aires de départ des différentes pistes seront pointées tous les 2 cm.
- Lorsqu'on utilise des cuves rainurées, il est nécessaire d'enlever sur les deux côtés verticaux des plaques, environ 5 mm de la couche adsorbante afin d'éviter les effets de "bord".
 - Marquer en clair, à l'aide d'une pointe fine, au-dessus de la ligne d'arrivée, la nature des témoins déposés et les références de l'échantillon.
 - Déposer à l'aide de la micropipette (spots de ≤ 1 mm de diamètre) :
 - . Solutions témoins : 2 microlitres (par capillarité= pointe de la micropipette).
 - . Echantillon évaporé à sec et repris par minimum alcool (0,1-0,2ml en grattant), à déposer en totalité.
- Vérifier la qualité des dépôts en observant la plaque sous U.V. 254 nm. avant la migration.
- Bien rincer la micropipette, par aspiration répétée d'alcool, au moins 7 fois entre chaque spot.

. Le développement des plaques sera réalisé ainsi :

- Les trois sous-groupes veilleront à synchroniser leurs dépôts, afin de faire migrer simultanément leurs plaques dans un solvant donné.
- Placer les chromatogrammes dans la cuve contenant le mélange solvant approprié. Ne pas ouvrir la cuve pendant toute la durée de la migration. (Risque de désaturer la cuve.)
- Pendant le temps de migration, préparer des plaques de SILICAGEL - GF 254 pour la séance suivante.
- Quand le front du solvant atteint la hauteur finale, retirer les plaques, et noter le front du solvant en pointillé. Placer 10 minutes à l'étuve à 100° pour obtenir l'évaporation complète du solvant.

. La révélation des plaques sera précédée d'un examen sous UV (254 nm) puis (366 nm). Repérer les spots à l'aide d'un pointillé au crayon sur la plaque.

	SALICYLES	BARBITURIQUES	ALCALOIDES
Support	Silicagel GF 254 1 plaque 10x20 cm	Silicagel GF 254 2 plaques 20x20 cm	Silicagel GF 254 1 plaque 20x20 cm
Solvant	Cyclohexane 60 Ether 30 Acide acétique .. 9 Méthanol 0,5	Chloroforme 85 Acétone 15	Acétone 75 Chloroforme 15 Ammoniaque off... 10
Révéléateur	Perchlorure de fer à 1 % → spot violet	<u>1ère plaque</u> : Nitrate mercureux à 1 % → spots blancs, fond gris clair (sauf Barbital, gris foncé) <u>2ème plaque</u> : $KMnO_4$ à 0,1 % → spots jaunes sur fond rose pour Sécobarbital, Penthiobarbital.	Iodoplatinate de potassium → spots violets (sauf Brucine, bleu-noir)
Rf.	Ac. Salicylique = 0,67	Barbital (VERONAL) = 0,42 Butobarbital (SONERYL) = 0,53 Sécobarbital (IMMENOCAL) = 0,58 Penthiobarbital (PENTHOTAL) = 0,79	Brucine = 0,53 Strychnine = 0,62 Quinine = 0,66

RESULTATS

- Montrer les plaques aux chefs de travaux.
- Reproduire le schéma des chromatogrammes à l'échelle, avec l'aide des gabarits en plexiglas.
- Faire un tableau indiquant la nature, le Rf, la couleur de chaque spot.
- En déduire la nature du toxique recherché.

REMARQUES

- Les différents travaux concernant la chromatographie des BARBITURIQUES permettent de constater que les hauteurs de migration des différents composés sont proportionnelle à leur durée d'action. Plus l'action est rapide et brève, plus le Rf est élevé :

Barbital	<	Butobarbital	<	Sécobarbital	<	Penthiobarbital
(lent)		(demi-lent)		(rapide)		(très rapide)
0,42		0,53		0,58		0,79

- On sait que la valeur du Rf d'un produit donné dépend étroitement des conditions expérimentales. C'est pourquoi l'on fait toujours migrer, parallèlement à l'échantillon à expertiser, des témoins choisis parmi les substances recherchées.

RECOMMANDATIONS IMPORTANTES

A la fin de la manipulation D :

- 1 - Les CUVES seront vidées dans un bidon spécial, retournées sur un grand papier filtre.
- 2 - Les MICROPIPETTES rincées à l'alcool seront rendues en mains propres aux chefs de travaux.
- 3 - Les PLAQUES C.C.M. seront grattées qu-dessus d'une poubelle, puis lavées à grande eau et égouttées.
- 4 - Les REACTIFS à l'iodoplatinate (très coûteux) et au nitrate mercureux (polluant, coûteux) contenus dans les pulvarisateurs seront remis dans leurs flacons d'origine au FRIGO.
- 5 - Les PULVERISATEURS seront lavés à grande eau.

L'inobservation de ces consignes entraînera une baisse de 5 points de la note de T.P. pour tout le groupe.

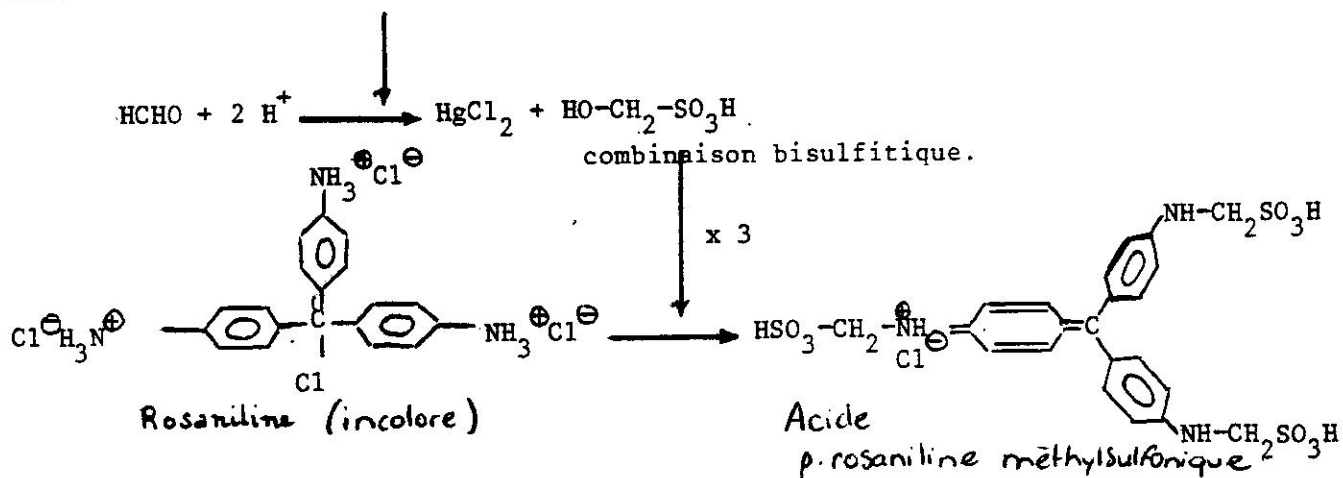
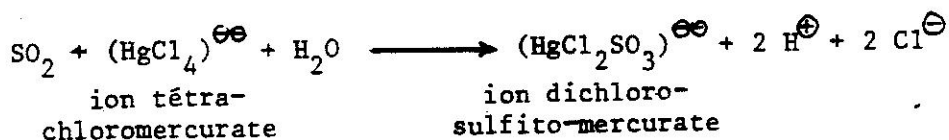
MANIPULATION	E
--------------	---

- OBJET :**
- I - DOSAGE du SO₂ dans l'air, par colorimétrie.
 - II - Détecteur de gaz DRAGER pour l'OXYDE de CARBONE dans l'air.
 - III - Dosage de PESTICIDES par C.P.G.

I - ANHYDRIDE SULFUREUX

PRINCIPE : application de la méthode de WEST et GAEKE.

- L'anhydride sulfureux de l'air est capté par barbotage dans une solution de tétrachloromercure de sodium (ion dichlorosulfito-mercure)
- Il va réagir avec le formol (combinaison bisulfite) puis avec la rosaniline (incoloré en milieu acide) pour former un composé à doubles liaisons conjuguées photométrable par rapport à une gamme étalon (coloration violette)



REACTIFS

- 1 - Tétrachloromercure de sodium : { HgCl₂ (TOXIQUE) 0,50 g
+ Propipette { NaCl 0,20 g
{ H₂O distillée QSP 1000 ml
- 2 - Anhydride sulfureux : on part de la solution de bisulfite de sodium, du commerce, qui renferme environ 300 g/l de SO₂. Une solution diluée au 1/500 (soit environ 600 mg/l) est conservée au FRIGO. - Solution de travail de SO₂ obtenue par dilution extemporanée au 1/100 de la précédente (soit environ 6 mg/l), destinée aux étudiants, se trouve au FRIGO. Le titre exact, mesuré par iodométrie (1 ml I₂ N/10 = 3,2 mg de SO₂) sera précisé sur le flacon.
- * 3 - Formol dilué : { Sol. officinale de formol (à 35 %) 1 ml
extemporané { Eau distillée QSP 100 ml

- 4 - Rosaniline : La solution-mère est obtenue par macération de 48 heures du mélange suivant :
- | | |
|--------------------------------------|--------|
| { Para-Rosaniline (fuchsine basique) | 500 mg |
| { Eau distillée | 100 ml |
- sui vie de filtration.

La solution-fille, destinée aux étudiants, renferme :

{ Sol. mère	2 ml
{ HCl concentré	5 ml
{ H ₂ O distillée	QSP 100 ml

MATERIEL

- 6 tubes à essai vissés de 15 ml
- pipettes : de 1 ml (2), de 2 ml (2), de 5 ml (2)

MODE OPERATOIRE

- Conduire en parallèle, l'étalonnage et l'essai.
- Dans des tubes à essai vissés, de 15 ml, ajouter les réactifs suivants, en AGITANT bien, entre chaque addition :

	Etalonnage					Essai	
	0	1	2	3	4	Pur	aul/2
Tétrachloromercurate	5 ml	4,8	4,6	4,2	3,8	5ml	5ml (sol. à doser)
Sol. travail SO ₂	0	0,2	0,4	0,8	1,2	0	0
Formol dilué	1 ml	1	1	1	1	1	1 ml
Sol. fille Rosaniline	1 ml	1	1	1	1	1	1 ml

- Laisser 45 minutes, à l'obscurité
- Photométrer à 540 nm. Tracer la courbe : D.O. = f. ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)

RESULTATS

Calculer la quantité de SO₂ contenue dans 50 ml de solution à doser, correspondant à un prélèvement de 1 m³ d'air.

Exprimer le résultat de SO₂ en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ d'air.

L'air d'une ville comme LYON, renferme un taux moyen annuel de SO₂ de 70 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, avec des minima à 10 μg (été) et des maxima à 1 mg (hiver).

REMARQUE

Le principe de cette technique a été appliqué à un dosage automatisé, en continu (appareillage TECHNICON).

Dans les ambiances de travail, limite tolérable (M.A.C.) SO₂ = 10 mg/m^3 .

C - DETECTEUR DE GAZ DRÄGER

- Les effets toxiques d'un liquide volatil ou d'un gaz dépendent de sa concentration dans l'air, de sa pression partielle, de la température et de la durée de séjour dans l'atmosphère dangereuse.
- La M.A.C. (Maximum Allowable Concentration) correspond à la concentration limite tolérable d'un corps nocif dans l'atmosphère d'un lieu de travail pour une durée d'exposition quotidienne de 8 heures.
- On peut avoir soit à rechercher la nature du gaz toxique, soit à contrôler la M.A.C.. D'où l'intérêt des méthodes rapides de détection dans les locaux professionnels.

PRINCIPE

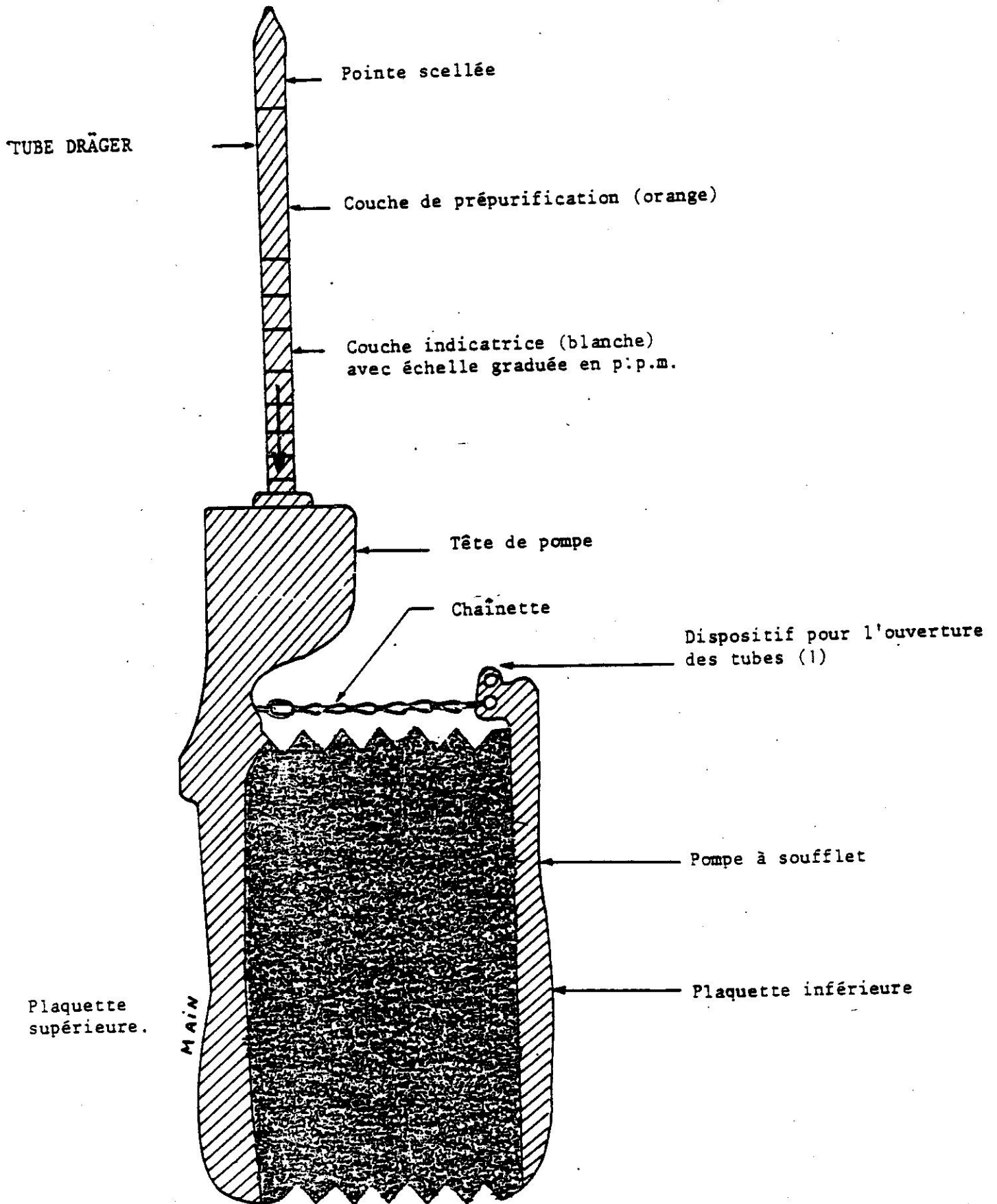
- Le détecteur de gaz DRÄGER se compose d'une pompe à soufflet et d'un tube réactif spécifique du gaz ou de la vapeur à identifier.
- une "couche indicatrice" composée d'un matériel granuleux imprégné de réactif et pourvue d'une graduation se colore sur une certaine longueur en présence du toxique recherché.
- Pour un nombre de coups de pompe donné, variable suivant les tubes réactifs, la longueur de la zone colorée obtenue permettra de connaître la concentration en p.p.m. (partie par million) ou en pourcentage, en se rapportant à l'échelle graduée de la couche indicatrice.
- Dans certains cas, on effectue une évaluation par comparaison en amenant la couche indicatrice à la même intensité de coloration qu'une couche de comparaison fixe.
Le nombre de coups de pompe donnés correspond alors directement à la concentration (benzène).
- Un coup de pompe donné suivant la méthode prescrite correspond à un volume d'air aspiré de 100 ml.

MATERIEL ET REACTIFS

- Une pompe à détection (voir schéma)
- Tubes réactifs DRÄGER CO 10/b (conservation au réfrigérateur).
- Chauffe-eau à gaz

MODE OPERATOIRE

- 1 - Maniement de la pompe :
 - Briser les deux extrémités du tube réactif à l'aide du dispositif prévu à cet effet.
 - Placer le tube sur la pompe, la flèche imprimée sur le tube doit être dirigée vers la pompe.
 - Serrer le corps de la pompe, plaquette supérieure contre la paume de la main. Comprimer à fond le soufflet et placer l'extrémité du tube à gaz au-dessus du chauffe-eau à gaz, d'abord à froid, puis à chaud.
 - Relâcher la pression, l'aspiration de la pompe commence et l'air afflue à travers le tube Dräger dans le soufflet.
 - Attendre que le soufflet ait repris son volume initial et que la chaînette soit tendue.



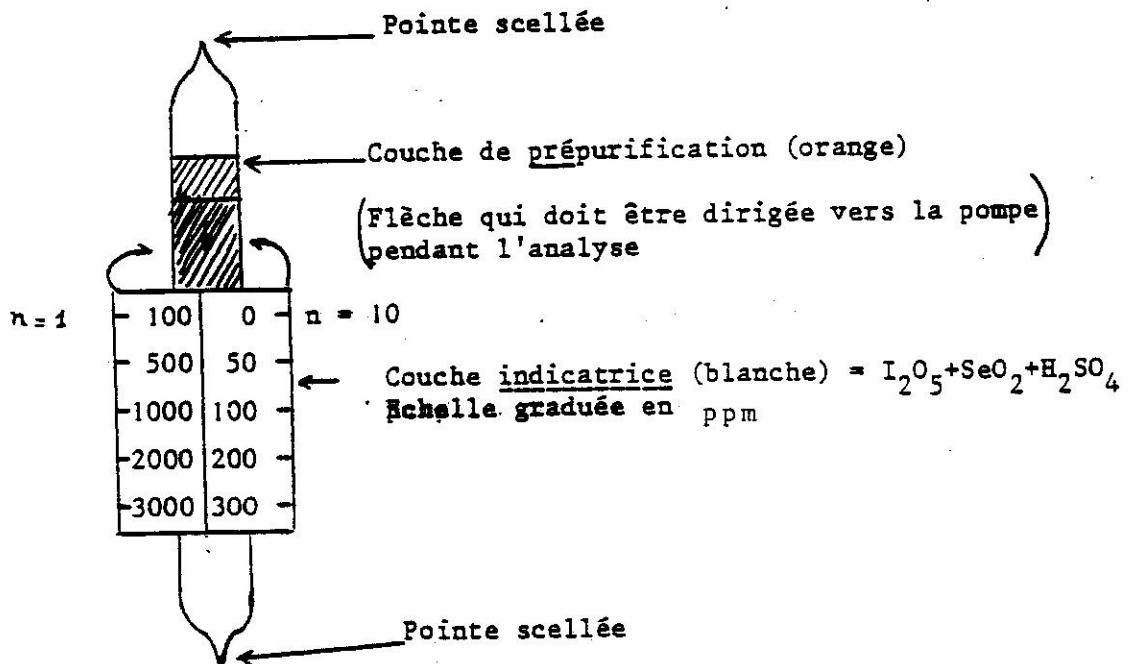
- Il peut être ajouté des dispositifs complémentaires à ce détecteur : tuyau de rallonge pour l'analyse en des lieux difficilement accessibles ou sonde d'analyse pour le contrôle des gaz d'échappement.

2 - Lecture du résultat

- Pour ce tube, la limite inférieure de mesure est égale à 10 p.p.m. soit 0,001 % < M.A.C. CO=50 p.p.m.
- Il comporte 2 échelles de mesures graduées en p.p.m.
- n correspond au nombre de coups de pompe à effectuer.
- On fera un prélèvement gazeux au-dessus d'un chauffe-eau à gaz en marche afin de stigmatiser le danger de ce type d'appareils. (CO inodore)
- En présence de CO, la couche indicatrice se colore par zones sur une plus ou moins grande étendue, ce qui donne des colorations allant du brun au gris-vert. La concentration est donnée par la longueur de la zone colorée.
- Si après un seul coup de pompe, la valeur lue est inférieure à 300 p.p.m. un contrôle plus précis doit être effectué avec 9 coups de pompe supplémentaires.
- Après résultat négatif, le tube Dräger peut être réutilisé jusqu'à 10 fois le même jour.

Tube réactif
pour oxyde de
Carbone

10/b°

Remarques :

- La couche de prépurification retient les gaz perturbateurs (essence, C_6H_6 , H_2S). De ce fait, cette couche se colore de l'orange au brun clair et vert. Si sa capacité est insuffisante, lors de concentrations élevées d'hydrocarbures, il faut utiliser le tube réactif CO 5/c précédé d'un tube préliminaire à charbon DRÄGER.
- La couche indicatrice est un mélange de pentoxyde d'iode, de bioxyde de sélénium et d'acide sulfurique.

CO dans l'air	CO dans le sang	Effets toxiques
100 ppm	2,4%	Céphalées, malaises
500 ppm	8,6%	Faiblesse musculaire, chutes
1000 ppm	12,9%	Cyanose, Syncope
2000 ppm	17%	Coma mortel en 3H

EXTRACTION ET DOSAGE DE PESTICIDES ORGANOCHLORES
DANS UNE EAU PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE
COUPLEE A UN DETECTEUR A CAPTURE D'ELECTRONS

I RAPPEL SUR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

PRINCIPE

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation applicable à des composés gazeux ou susceptibles de le devenir par chauffage. Elle permet l'analyse de mélanges complexes dont les constituants diffèrent par leur polarité et leur volatilité. La séparation se fait entre deux phases:

- la phase mobile (gaz) parcourt un tube en verre ou en acier renfermant un support solide inerte.
- la phase stationnaire (liquide) est fixée sur ce support solide. L'affinité de chacun des constituants de l'échantillon pour la phase stationnaire conditionne leur temps de rétention dans la colonne. Les constituants ayant la moins grande affinité pour la phase stationnaire sortiront donc les premiers tandis que les constituants ayant la plus grande affinité seront les derniers à sortir de la colonne.

APPAREILLAGE

Le chromatographe en phase gazeuse utilise donc un gaz vecteur sous pression permettant de faire migrer une substance sous forme vapeur depuis l'injecteur, à travers une colonne où se fera la séparation et jusqu'à un détecteur où son passage se traduira par un signal électrique, mesuré sur un enregistreur.

L'INJECTEUR

L'injecteur permet d'introduire l'échantillon dans le flux du gaz vecteur qui va passer ensuite dans la colonne. Cet injecteur est chauffé afin de vaporiser les échantillons non gazeux. Sa température est réglable.

Le système d'échantillonnage le plus fréquemment utilisé est la seringue de 10 microlitres à travers une pastille de caoutchouc ou de silicone appelée septum.

LE GAZ VECTEUR

Il doit être inerte, sec et pur. On utilise couramment l'hélium, l'hydrogène, l'azote et l'argon. La considération la plus importante dans le choix de celui-ci, est la nature du détecteur:

Ex: argon-méthane pour le détecteur à capture d'électrons.

LA COLONNE

La colonne est la partie la plus importante d'un chromatographe. Elle se compose de 3 éléments:

- le conteneur de remplissage
- le support solide
- la phase stationnaire

LE DETECTEUR

Il existe plusieurs types de détecteurs :

- conductivité thermique (catharomètre)
- ionisation de flamme
- capture d'électrons * (utilisé aux TP)
- photométrie de flamme
- thermoionique (flamme alcaline)

Le détecteur à capture d'électrons* est un détecteur sélectif et très sensible. En raison de sa haute sélectivité son domaine d'application est très limité. Il ne répond qu'aux composés capables de capter des électrons tels que les composés halogénés, ceux ayant un groupement nitro et ceux ayant des doubles liaisons conjuguées.

Une source radioactive (Ni^{63} ou tritium), émettant des particules β est utilisée pour ioniser le gaz vecteur traversant la cellule. Dans celle-ci sont placées deux électrodes (anode et cathode) qui créent un champ électrique. Si un composé ayant une forte affinité pour les électrons est élué de la colonne, il va

capter des électrons au passage, ce qui entraîne une diminution du courant, qui est enregistré après amplification (figure 1). L'application la plus intéressante est la détection des pesticides organochlorés.

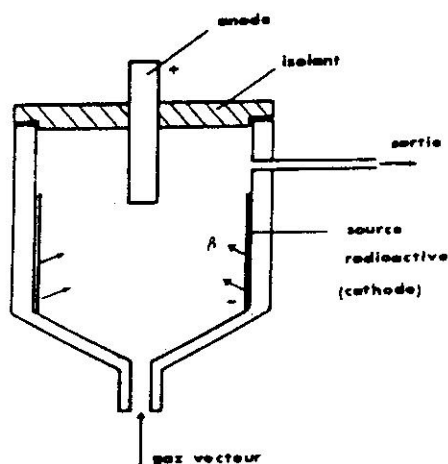


Figure 1. Schéma d'un détecteur à capture d'électrons

II. EXTRACTION ET DOSAGE DE PESTICIDES ORGANOCHLORES DANS UNE EAU

PRINCIPE

- Extraction par l'hexane du Lindane et de l'Aldrine susceptible de se trouver dans une eau.
- Analyse de la phase hexanique par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à capture d'électrons.

REACTIFS

- 1- Solution étalon de Lindane (2 mg/L) et d'Aldrine (1 mg/L) dans l'hexane.
- 2- Eau de référence contenant du Lindane (40 µg/L) et de l'Aldrine (20 µg/L).
- 3- Hexane Pestipur* SDS.
- 4- Acétone technique pour rinçage.
- 5- Na₂ SO₄ anhydre.

APPAREILLAGE

Chromatographe Hewlett Packard 5710A muni d'un détecteur à capture d'électrons (source Ni⁶³).

- Colonne SE 30/chromosorb W de 5 mètres.
- Gaz vecteur : argon-méthane , débit : 40 - 50 mL/mn.
- Température injecteur : 250°C.
- Température colonne : 230°C.
- Température détecteur : 300°C.
- Volume d'échantillonnage : 2 µL

Enregistreur-intégrateur Hewlett Packard 3390A.

MATERIEL

- 3 fioles jaugées bouchées de 1 litre.
- 1 agitateur magnétique.
- 2 barreaux aimantés.
- 1 éprouvette de 10 mL.
- 3 tubes bouchés rodés de 20 mL.
- 1 erlen de 50 mL.
- 1 seringue Hamilton de 10 µL. (ATTENTION = Fragile!!!)
- pipettes Pasteur

MODE OPERATOIRE

- Fiole jaugée de 1 litre :

Eau à analyser.....500 mL
 Hexane Pestipur..... 10 mL précis
 Barreau magnétique..... 1

Boucher et placer sur agitateur magnétique 15 mn.

- Ajouter :

Eau distillée..QSP faire monter la phase hexanique
 dans le col de la fiole.

- Tube de verre rodé :

Phase hexanique..... 1 à 2 mL
 (à la pipette Pasteur)
 Na₂ SO₄ anhydre..... une pincée

Boucher soigneusement et agiter.

- Injecter dans le chromatographe :

Phase hexanique deshydratée.... 2 µL précis
 à l'aide d'une seringue Hamilton.

- Conduire simultanément l'extraction d'un BLANC (500 mL d'eau distillée) et d'une EAU de REFERENCE (500 mL d'eau renfermant 40 µg/L de Lindane + 20 µg/L d'Aldrine).
- On aura donc 4 injections :
 - l'étalon
 - le blanc
 - l'eau de référence
 - l'eau à analyser

RESULTATS

- Interpréter les résultats en comparant la surface des pics par rapport à la solution étalon .
- Déterminer le rendement d'extraction en comparant la surface des pics obtenue après extraction de 500 mL d'eau à concentrations connues en Lindane et Aldrine par rapport à celle de la solution étalon.
- Déterminer les concentrations en Lindane et Aldrine dans votre échantillon d'eau.

REMARQUE

Dans les conditions chromatographiques citées , le temps de rétention du Lindane se situe entre 4 et 4,5 minutes et celui de l'Aldrine entre 6,4 et 6,8 mn.

DOSAGE DES PESTICIDES PAR C.P.G.
(surface des pics/10⁷)

	LINDANE	ALDRINE
Blanc B		
Etalon ET		
Eau de référence REF		
Eau à analyser ANAL		
CALCULS	LINDANE	ALDRINE
RENDEMENT D'EXTRACTION		
RESULTATS EAU N° (µg/l)		

MANIPULATION F

OBJET

1. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES. PREPARATION DES PLAQUES.
2. EXTRACTION ET IDENTIFICATION du CANNABIS dans du tabac.
3. DOSAGE DES DETERGENTS ANIONIQUES dans l'eau.

I - C . C . M .PRINCIPE

- La chromatographie sur couches minces (C.C.M.) est avant tout basée sur le phénomène d'adsorption .
- On étale une couche mince et régulière de préparation adsorbante aqueuse sur des plaques de verre.
- Après dessiccation, cette couche - le plus souvent minérale - adhère suffisamment pour constituer le support de chromatographie d'adsorption.
- Le déplacement, plus ou moins important, des substances déposées résultera d'un équilibre entre l'affinité de la substance :
 - pour le support (phase fixe) d'une part
 - pour le solvant (phase mobile) d'autre part
- L'affinité pour le support se traduit par l'intensité de fixation sur la couche adsorbante, qui dépend :
 - de la nature du support : Silice > Alumine > Kieselgur
 - de l'état de division du matériau
 - de la présence ou de l'absence d'eau entre les particules de la couche : d'où l'intérêt de l'activation = séchage intense des plaques à 120°C, 1 heure, qui élimine la totalité de l'eau.
 - du caractère acide ou alcalin de la couche :
Silice (légèr^t acide), Kieselgur (neutre), Alumine (légèr^t alcaline)
- L'affinité pour le solvant se traduit par la solubilité de la substance dans le solvant, qui est fonction de sa polarité.

Les principaux solvants utilisés sont, dans l'ordre de polarité croissante :

0	Hexane
	Tétrachlorure de carbone
	Benzène
	Chlorure de méthyle
	Chloroforme
	Ether
	Acétate d'éthyle
	Acétone
	Propanol
	Ethanol
▼	
+++	Méthanol

- Le choix de la couche adsorbante doit être inspiré par les réactions acido-basiques des substances à faire migrer.

- Le choix du solvant est fonction de la structure chimique et du caractère plus ou moins hydrophile de ces substances.

MATERIEL

- A - Un appareil DESAGA pour C.C.M. analytique comprenant :
- 1 - Un support spécial en matière plastique pouvant recevoir 5 plaques de 200 x 200 mm, encadrées par 2 plaques de 50 par 200 mm
 - 2 - Un dispositif d'étalement à fente réglable pour l'obtention de couches de 0 à 2 mm d'épaisseur
 - 3 - Un jeu de plaques calibrées en verre de :
 - 200 x 50 mm
 - 200 x 200 mm
 - 4 - Un chevalet transparent pour dépôt régulier des liquides à chromatographier
 - 5 - 2 paniers support
 - 6 - 2 cuves
 - 7 - 2 micropipettes
 - 8 - Etuves
 - 9 - 1 séchoir électrique
 - 10 - Lampe Miniuvivis 366 et 254 nm (220 v)
 - 11 - 1 pulvérisateur pour chaque réactif
 - 12 - 1 mortier et son pilon
- B - VERRERIE
- 1 éprouvette de 100 ml
 - 1 " " 60 ml
 - 1 pipette de 10 ml
 - 1 " " 5 ml
 - 2 erlens 250 ml
 - 1 bécher 50 ml
 - 1 ampoule à décanter de 250 ml
 - 1 capsule de porcelaine

MODE OPERATOIRE

Pour préparer 5 plaques de 200 x 200 mm

- 1- Placer le support plastique de 1,10 mètre sur une surface plane petit côté bordé, à droite de l'opérateur
- 2- Disposer contre l'extrémité bordée et en allant de droite à gauche
 - 1 plaque de 200 x 50 mm (petite)
 - 5 plaques de 200 x 200 mm (normales)
 - 1 plaque de 200 x 50 mm (petite)

Ces plaques doivent être propres et leur surface sèche.

Après manipulation, les dégraisser en frottant leur surface à l'aide d'un tampon imbibé d'éther sulfurique.

- Monter l'étaleur en ajustant la cuvette cylindrique à l'intérieur du parallélépipède métallique. Le levier destiné à faire pivoter la cuvette dans son logement doit se trouver du même côté que la barre guide du parallélépipède. Fixer le tout à l'aide du bouton moleté.
- Vérifier le bon réglage de l'épaisseur de l'étalement. (trait rouge sur 250 microns).

- Placer l'étaleur sur la plaque terminale de gauche, guide à l'arrière, flèche à l'avant, ouverture de remplissage vers le haut.
- 2 - A ce MOMENT SEULEMENT, PREPARER LA MASSE ADSORBANTE.
 - Pour 5 plaques de 200 x 200 mm
 - peser 30 g de silice ou d'alumine
 - mesurer 60 ml d'eau pour la silice (ou 40 ml d'eau pour l'alumine)
 - dans un mortier, verser la totalité de l'eau en une seule fois sur la poudre et malaxer rapidement en éliminant bulles d'air et granulations.

N.B. Les gels G pour C.C.M. contiennent un liant minéral (SO₄Ca) dont la prise s'effectue au bout de 4 minutes après l'addition d'eau. Il est donc nécessaire d'opérer rapidement pour éviter la prise en masse du mélange dans l'appareil.
- 3 - Verser la préparation dans l'étaleur quand elle a la consistance d'un lait fluide et procéder à l'étalement,
 - à vitesse moyenne pour la silice
 - à vitesse rapide pour l'alumine (plus liquide)

en tirant l'étaleur régulièrement de gauche à droite après avoir fait pivoter le levier de 180° pour amener l'ouverture de la cuvette vers le bas.
- 4 - Nettoyer immédiatement l'étaleur : le démonter et passer chaque partie sous l'eau.

N.B. Le décrochement qui délimite l'épaisseur de l'étalement ne doit être ni rayé, ni heurté.

 - Laisser sécher les plaques sur le support jusqu'à prise en masse complète (2 mm). Les marquer : S pour silice, A pour alumine dans le coin supérieur droit, en regardant le sens de l'étalement

Les placer sur un panier dans le sens de l'étalement.
Faire sécher à l'étuve à 100°.

III. CANNABIS

PRINCIPE

Un échantillon de "tabac de saisie" susceptible de contenir de la Résine de du Cannabis est traité par une petite quantité d'éther de pétrole. Le résidu d'évaporation est repris par l'éthanol 95°.

- La migration s'effectue dans un mélange :
 - Ether de pétrole - Ether
- La révélation se fait au moyen d'ortho-dianisidine tétrazotée. (révélateur des phénols).

REACTIFS

- 1 - Ether de Pétrole
- 2 - Ether
- 3 - Ethanol 95°
- 4 - O-dianisidine tétrazotée : solution à 0,1 % dans NaOH 3N (FRIGO).
- 5 - Témoin : Résine de chanvre indien en solution à 10 % dans l'éther de pétrole.

MODE OPERATOIRE1 - Extraction

- Triturer soigneusement, mais rapidement, l'échantillon de Tabac dans 5 ml d'éther de pétrole (environ 2 mn).
- Décantier prudemment le liquide dans une capsule, sans entrainer de débris végétaux.
- Evaporer dans l'évaporateur I.R. (Pendant ce temps, on prépare le solvant)
- Refroidir et reprendre par le minimum d'éthanol à 95°, en raclant bien les parois de la capsule (0,1-0,2ml) puis en la posant incliné sur la paillasse.

2 - Préparation du chromatogramme

- Préparer le mélange solvant

Ether de pétrole - Ether 80 / 20

et le verser dans une cuve sèche. Appliquer une feuille de papier filtre sur la face postérieure de la cuve, afin d'obtenir une saturation plus rapide de la cuve. Fermer soigneusement la cuve après avoir légèrement graissé les rodages et vérifié l'étanchéité.

- Faire les dépôts sur une plaque de silice 6F 254 (spots de 1 mm de diamètre) par capillarité :

Essai	Totalité
Témoin	2 µl (pointe de micropipette)

Suivre le mode opératoire décrit pour la C.C.M. des alcaloïdes dans la méthode de CLARKE.

- Migration : 30 minutes environ . Noter le front du solvant en pointillé sur la plaque. Sécher à l'étuve.

3 - Révélation

- Observer aux U.V. à 254 nm : encercler les spots légèrement, au crayon fin
- Pulvériser légèrement (sans mouiller) la plaque avec la solution d'ortho-dianisidine-tétrazotée.
- La résine de Cannabis donne deux spots principaux :

T.H.C. (tétrahydrocannabinol)..... mauve

C.B.D. (cannabidiol)..... orangé

4 - Interprétation

Calculer les Rf. Reproduire le schéma du chromatogramme.

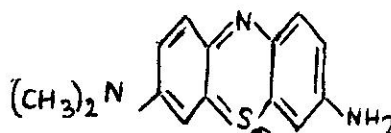
L'apparition d'une tache de T.H.C. signe la présence de chanvre indien dans la prise de tabac.

III - DETERGENTSPRINCIPE

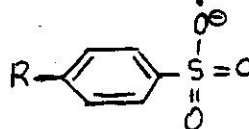
Application de la technique au Bleu Azur (W. DEN TONKELAAR, Wat. Res., 1969.3,31)
 Les détergents anioniques forment avec un colorant, le Bleu Azur, un complexe extractible, quantitativement, par le chloroforme, que l'on photomètre.
 NB. : Le Bleu Azur diffère du Bleu de Méthylène par 2 groupements $-CH_3$ en moins sur l'azote.

MECANISME REACTIONNEL

Bleu Azur

 Cl^{\ominus}

Détergent

 Na^{\oplus} MATERIEL

- (préalablement rincé à l'acide nitrique dilué, puis à l'eau distillée)
- 1 éprouvette de 50 ml
 - 3 pipettes : 1 ml, 5 ml, 10 ml
 - 4 petits entonnoirs
 - 4 ampoules à décantation de 250 ml
 - 7 tubes à essais vissés de 20 ml

REACTIFS

- 1 - Détergent anionique : sol. mère de lauryl-sulfate Na, à 1g/l (FRIGO)
 * conservable 1 mois ; sol. fille (dil. extemporanée 1/100) à 10 mg/l
- 2 - H_2SO_4 dilué 0,1 N (3 % en volume)
- 3 - Bleu Azur (40 mg) + H_2SO_4 0,1 N (5 ml), dissoudre avec un agitateur magnétique, et compléter à 100 ml avec H_2O distillée.
- 4 - Chloroforme pur P.A.
- 5 - Sulfate de sodium anhydre

MODE OPERATOIRE

Conduire parallèlement étalons et dosages, dans des ampoules à décantation, en AGITANT entre chaque addition de réactif.

	GAMME - ETALON					50 ml eau à doser
	50 ml	49,8	49,6	49	48	
Eau distillée	50 ml	49,8	49,6	49	48	50 ml eau à doser
Sol. fille détergent	0	0,2	0,4	1	2	0
H_2SO_4 dilué	5	5	5	5	5	5
Bleu Azur	1	1	1	1	1	1
Chloroforme (mesurer à l'éprouvette)	10	10	10	10	10	10

Agiter énergiquement 2 fois 2 minutes. Laisser reposer. Déshydrater sur Na_2SO_4 la couche chloroformique, dans un tube vissé. Photométrer à 623 nm

CALCUL

- : Rendre les résultats en $\mu g/l$ de détergent dans l'eau.
 La concentration maxima admissible pour l'eau de boisson est de 200 $\mu g/l$; la sensibilité de la méthode proposée est dix fois supérieure.
 Construire la courbe des $Do = f(C)$ en $\mu g/l$ litre

MANIPULATION G

METHODE DE DIAGNOSE SYSTEMATIQUEDES TOXIQUES ORGANIQUESd'après M. MALMYPRINCIPE

- Cette méthode fait appel à un certain nombre de réactions colorées qu'il est essentiel de réaliser dans l'ordre indiqué et sans en omettre aucune.
- Il est également important d'opérer très minutieusement. Une réaction négative parce que mal effectuée fera conclure à l'absence du produit et poursuivre la recherche. On risquera ensuite d'obtenir des réactions faussement positives, conduisant à un résultat erroné.
- La technique peut être appliquée :
 - dans le cas d'identification du produit à l'état pur sur 0,005 g du produit sec ou sur quelques dixièmes de ml d'une solution aqueuse ou alcoolique de ce produit après évaporation.
 - dans le cas d'identification du produit après extraction, sur le résidu des solutions extractives étherées ou chloroformiques, après évaporation.
- on devra identifier par cette méthode :
 - des alcaloïdes,
 - des composés organiques de synthèse ayant un comportement analogue à celui des alcaloïdes (anesthésiques locaux, antipyrétiques)
 - des hétérosides.

ORDRE DES OPERATIONS

- 1 - Effectuer les essais préliminaires d'orientation.
- 2 - Entreprendre la recherche systématique indiquée dans les tableaux I, II, III.
- 3 - Compléter le diagnostic en effectuant les réactions caractéristiques du produit supposé.

MATERIEL ET VERRERIE

- 10 verres de montre
- Baguettes de verre
- Tubes à essai petit modèle (hémolyse)
- 1 pipette de 5 ml
- Pipettes Pasteur
- Bain-marie
- 2 pipettes de 1 ml

REACTIFS

- 1 - Acétone pure
- 2 - Acide acétique
- 3 - Acide chlorhydrique conc.
- 4 - Acide chlorhydrique au 1/10
- 5 - Acide oxalique à 5 %
- 6 - Acide iodique 1 %
- 7 - Acide nitrique fumant
- ⑧ - Acide nitrique nitreux (extemp.)
 - acide nitrique concentré (d = 1,332) 60 ml
 - eau distillée 40 ml
 - nitrite de potassium 0,50 g

Mélanger. On obtient ainsi un acide légèrement nitreux de conservation suffisante (1 mois).

- 9 - Acide picrique à saturation
 - acide picrique cristallisé 15 g
 - eau distillée 1000 ml

Dissoudre à chaud et faire bouillir 15 minutes pour chasser les matières reductrices volatiles. Laisser refroidir et décanter la solution saturée.

- 10 - Acide sulfurique conc.
- 11 - Ammoniaque
- 12 - Ammonium carbonate à saturation
- 12 bis - Ammonium sulfure
- 13 - Argent nitrate 10 %
- 14 - Chloroforme rectifié
- ⑮ - Eau de brome à saturation
- 16 - Eau oxygénée officinale
- ⑰ - Etain chlorure (extemp.)
 - { Chlorure stanneux R.P. 10 g
 - { Eau distillée QSP 100 ml (conservation 4 h.)

- 18 - Ethanol à 95°
 19 - Fer perchlorure off. (26 %)
 20 - Fer perchlorure 1/1000 (= officinal dilué 1/25)
 ②1 - Naphtol- β en solution extemporanée à 1 % dans l'ammoniaque diluée au 1/10
 22 - Potassium bichromate cristaux
 23 - " ferricyanure 10 %
 24 - " ferrocyanure 10 %
 ②5 - " hydroxyde en solution méthanolique à 5 %
 26 - " iodate cristaux
 27 - " iodure 10 %
 28 - " nitrate cris.
 29 - " permanganate crist.
 30 - " permanganate 1 %
 31 - Sodium borate 5 %
 32 - " chlorure sec
 33 - " hydroxyde lessive 33° B
 34 - " hypochlorite 10°
 35 - " nitrite crist.
 36 - " phosphate trisodique 10 %

REACTIFS

37 - R. d'ALOY-VALDIGUIÉ

- | | |
|---|--------|
| - Formol off. dilué au 1/30 | 1 gtte |
| - FeCl ₃ off. dilué au 1/10 | 1 ml |
| - H ₂ SO ₄ pur (d = 1,83) | 100 ml |

38 - R. de BOUCHARDAT

- | | |
|-------------------------------|------------|
| - iode : bisublimé | 2 g |
| - iodure de K pur crist. | 25 g |
| - eau distillée | QSP 100 ml |

Dissoudre l'iodure de potassium, puis l'iode dans environ 5 ml d'eau distillée et compléter au volume.

39. R. de DRAGGENDORF

- Carbonate de bismuth 5g
- eau distillée 50 ml

Ajouter peu à peu en agitant :

- Acide chlorhydrique conc. pur 10 ml

Ajouter ensuite en agitant :

- Iodure de potassium en solution aqueuse à 25 % 100 ml

Filtrer. Conserver en flacons jaunes bouchés émeri, contenant 2 à 3 g de bismuth métal.

40 - R. de FRÖHDE (sulfo-molybdique)

- Molybdate de sodium pur 0,10 g
- Acide sulfurique pur 100 ml

41 - R. de KELLER

- Acide acétique cristallisable 100 ml
- Sulfate ferrique 5 % 1 ml

42 - R. de KILLIANI

- Acide sulfurique dilué à 35 % 100 ml
- Sulfate ferrique 5 % 1 ml

43 - R. de LAFON (sulfo-sélénieux)

- Sélénite d'ammonium crist. 5 g
- Acide sulfurique pur 100 ml

44 - R. de MANDELIN

- Vanadate d'ammonium 1 g
- Acide sulfurique pur 100 ml

45 - R. de MARQUIS

- Formol off. à 35 % 10 ml
- Acide sulfurique pur 100 ml

46 - R. de MAYER : : : .

- Iodure de potassium 10 g
- Eau distillée QSP 100 ml
- Ajouter de l'iodure mercurique jusqu'à saturation. Filtrer.

47 - R. de MILLON

- Mercure 20 g
- Acide nitrique pur 40 g

Faire dissoudre, mesurer le volume.

Ajouter :

- Eau distillée : 2 volumes

Mélanger. Laisser décanter 24 heures.

Prélever la solution limpide.

48 - R. de MOREL et MARTHOUD

- Méta-dinitro benzène	1	g
Ethanol à 95° ... QSP	100	ml

49 - R. au P.D.A.B. (FRIGO)

- Para-diméthyl-amino-benzaldéhyde	1	g
- Ethanol à 95°	200	ml
- Acide sulfurique	2	ml

50 - R. de WASICKY dilué

- Para-diméthyl-amino-benzaldéhyde	30	g
- Acide sulfurique pur	50	ml
- Faire dissoudre puis ajouter lentement :		
- Eau distillée	45	ml

51 - Acide nitrique

52 - Thiocyanate de Cobalt 2 %

MODE OPERATOIRE

RECOMMANDATIONS IMPORTANTES :

- 1 - Respecter impérativement les quantités indiquées dans le mode opératoire des réactions. Tout excès de réactif peut modifier, gêner ou empêcher l'apparition d'un précipité ou d'une coloration.
- 2 - Les évaporations à sec doivent être complètes, les traces d'eau pouvant empêcher la formation des complexes colorés.
- 3 - Il est essentiel de bien remettre en solution les résidus secs dans l'eau ou les acides avant l'addition des réactifs.
- 4 - Lorsque la réaction doit être effectuée à froid, il est important d'attendre le temps suffisant au refroidissement du verre de montre avant d'entreprendre la réaction.
- 5 - Certaines colorations n'apparaissent pas dans la masse du mélange résidu-réactif, mais uniquement sur le bord des cristaux ou sous forme d'un liseré au front du réactif. En tenir compte.
- 6 - Lorsqu'un précipité est dit stable, il ne doit pas disparaître ou diminuer d'opacité quand on agite le verre de montre.

Essais préliminaires : AGITER le tube d'échantillon puis :

A - Examiner la fluorescence de la solution initiale. Parmi les substances à rechercher, sont fluorescentes à 366 nm.

- quinine	F +++	bleue en milieu sulfurique
- yohimbine	F ++	verdâtre
- émétine	F ++	jaune-bleuté
- morphine	F ±	jaune

N.B. - Certaines fluorescences sont modifiées par le milieu de dissolution. C'est ainsi que la fluorescence de la quinine disparaît en milieu chlorhydrique pour apparaître à nouveau après addition de quelques gouttes d'acide sulfurique.

- La fluorescence oriente la recherche, mais il est cependant nécessaire de suivre la méthode systématique de diagnose et d'effectuer les réactions caractéristiques pour identifier le produit.

B - Essais de précipitations en milieu acide par les réactifs généraux des alcaloïdes et analogues. Sur 2 verres de montre, au B.M. bouillant, évaporer environ 0,5 ml (1 mg) de la solution. Observer et noter l'aspect du résidu. REFROIDIR sur la pailleasse, puis DISSOUDRE ce résidu par 4 gouttes d'HCl au 1/10.

Ajouter à l'un 2 gouttes de R. de Draggendorf (solution d'iodobismuthite de K) à l'autre 2 gouttes de R. de Mayer (solution d'iodomercurate de K).

Trois cas peuvent se présenter :

a) Précipité stable avec les 2 réactifs :

- R. de Draggendorf	→ ↓ orangé-rouge	} présence d'ALCALOÏDE ou analogue
- R. de Mayer	→ ↓ blanc-crème	

Suivre la technique de recherche indiquée dans les tableaux I, II, III. et confirmer avec les Réactions d'Identité (p. 59-65)

b) Précipité avec 1 réactif :

- R. de Draggendorf	+
- R. de Mayer	-

Recommencer la réaction de Mayer sur un résidu + important. Si l'on n'obtient toujours pas de précipité stable, rechercher la CAFEINE (réaction de la Murexide p 59).

c) Pas de précipité :

- R. de Draggendorf	-	Rechercher les hétérosides toxiques
- R. de Mayer	-	<u>DIGITALINE</u> ou <u>OUABAIN</u>

En l'absence de fluorescence dans solution initiale, prélever 0,5 ml de cette solution, dans un petit tube, diluer au 1/2 par de l'eau distillée, ajouter 1 goutte H₂SO₄ concentré. La fluorescence bleue de la quinine apparaît.

T A B L E A U I

- Evaporer au B.M. bouillant sur verre de montre 0,5 ml de la solution initiale. Il est essentiel d'obtenir un résidu SEC, la présence d'eau gênant les réactions ultérieures.
LAISSER REFROIDIR

- Ajouter au résidu [sec] et [froid] 1 goutte d'acide nitrique nitreux.

Coloration	- orangée	porter 15 sec. au B.M. bouillant Ajouter 1 goutte de <u>chlorure stanneux</u>	- coloration violette	BRUCINE
	- + mauve sur le bord des cristaux ou nulle	Prendre à nouveau 0,5 ml de sol. Evaporer à sec. Ajouter 4 gouttes d'eau + 1 goutte <u>AgNO₃</u> Réaction à faire <u>systématiquement</u>	- coloration violette	PYRAMIDON
à froid	- jaune-vert	Ne pas en tenir compte et chauffer au B.M. bouillant.		
	- dès le début du chauffage col. violette	Ajouter 1 gtt de <u>lessive de soude</u> .	- coloration rouge-orange	COLCHICINE
Coloration	- col. violet pourpre plus tardive	+ 1 goutte de <u>lessive de soude</u> .	- pas de col. rouge-orange	ANTIPYRINE
	à chaud	- pas de col. sensible ou coloration jaune - foncée Evaporer à sec.	- col. orange-jaune (gélatineux)	STRYCHNINE YOHIMBINE
		Refroidir avant d'ajouter 1 goutte de solution <u>KOH méthanolique</u> .	- Pas de coloration. Faire la réaction de Vitali. Réaction positive Coloration violette.	ATROPINE

T A B L E A U II

REACTIONS PRECEDENTES NEGATIVES. Evaporer à nouveau à SEC au B.M. bouillant 0,5 ml de solution. initiale. Ajouter 3 gouttes H_2SO_4 pur ($d = 1,84$). Chauffer au B.M. bouillant 30 secondes.

<p>Pas de col. ou col. violette ou jaune serin à peine sensible.</p> <p>LAISSER REFROIDIR</p> <p>Ajouter 3 gouttes <u>eau de brome.</u></p>	<p>- coloration rouge devenant orangée</p> <hr/> <p>- précipité jaune clair stable</p> <hr/> <p>- Ni coloration, ni précipité (°)</p> <p>Ajouter 2 gouttes d'eau de brome:</p> <p>Chauffer 30 secondes au B.M.</p> <p>Ajouter 1 goutte HNO_3 + 5 gouttes d'eau →</p> <p>Coloration rouge cerise</p>	<p>CODEINE</p> <hr/> <p>QUININE</p> <hr/> <p>EMETINE</p>
---	--	--

° Dans certains cas, un précipité jaune-brun peut se former. Il diminue d'importance à l'agitation mais peut ne pas disparaître entièrement. N'en pas tenir compte et poursuivre la réaction de recherche de l'émétine.

REACTIONS DES TABLEAUX PRECEDENTS NEGATIVES.

→ Sur [4] verres de montre; évaporer à SEC sur chacun 0,5 ml de la solution initiale, en présence de 2 gouttes de HCl au 1/10°. Reprendre le résidu par 2 gouttes d'eau pour le solubiliser :

	- précipité net blanc	Ajouter au v. de m. n° ② 1 goutte de sol. phosphate de Na au 1/10°	- Précipité net	STOVAINE
	- précipité à peine perceptible ou pas de précipité	Ajouter au v. de m. n° ③ dans la GLACE + 2 gttes NaNO ₂ 1%. + 3 gttes β naphtol ammoniacal à 1% color. rouge	- Néant	COCAINE
Au verre de montre n° ①, ajouter 1 gtte de sol. Borate de Na 5 Z	- pas de précipité	Ajouter au v. de m. n° ④ qq. cristaux de bichromate de K. Verser dans un très petit tube à essai contenant 0,5 ml de CHCl ₃ (rincer le v. de m. avec 4 gttes d'eau). Ajouter 0,5 ml H ₂ O ₂ . Agiter FORTEMENT ET IMMEDIATEMENT. Respecter impérativement les quantités indiquées.	-CHCl ₃ violet clair	PILOCARPINE
			-CHCl ₃ incolore rechercher : SPARTEINE	Evaporer à nouveau à SEC 0,5 ml de solution initiale. Ajouter 1 gtte de sulfure d'NH ₄ . Une coloration ROUGE se développe sur le bord de la gtte en contact avec les cristaux d'alcaloïde;

REACTIONS D'IDENTITE DE QUELQUES ALCALOIDES ET ANALOGUES

Les réactions marquées d'un astérisque sont les plus sensibles et les mieux visibles.

- ANTIPYRINE *
- La réaction donnée par l'antipyrine en présence d'acide nitrique nitreux est caractéristique, mais ne se forme pas en présence d'un excès d'acide. On peut lui ajouter les trois réactions suivantes :
 - * Nitroso-antipyrine verte = résidu sec + goutte H₂O + quelques gouttes NaNO₂ (1 %) + 1 goutte H₂SO₄ $\xrightarrow{\quad}$ vert qui s'intensifie en présence d'eau
 - * FeCl₃ off. (n° 19) 1 goutte + résidu SEC repris par l'eau : coloration rouge intense se décolorant par addition de H₂SO₄.
 - Réactif de MANDELIN (1 goutte) : coloration verte.

- ATROPINE *
- Réaction de VITALI. Ajouter au résidu sec 3 gouttes HNO₃ fumant. Evaporer à sec au B.M. bouillant. REFROIDIR. Ajouter 1 à 2 gouttes de KOH méthylique. Belle coloration violette. La coloration serait due aux composés dinitrés résultant de la nitration du cycle benzénique de l'acide tropique. N.B. La réaction de VITALI est positive avec la VERATRINE. Avec la STRYCHNINE, il se produit une coloration violet-rouge, mais plus rouge que dans le cas de l'atropine.
 - Réaction de WASICKI. Ajouter au résidu sec 2 gouttes de R. dilué et chauffer légèrement au B.M. bouillant \rightarrow rouge-violacé intense.
 - Réaction de GUERBET (cf. p. 60)

- BRUCINE
- Alcaloïde à noyau indolique. Meilleur solvant : chloroforme.
- Réaction de la cacothéline*
- * Oxydée à froid avec HNO₃, elle donne une o-nitroquinone de l'acide brucinique (cacothéline³) colorée en rouge intense. Cette coloration vire lentement à froid, plus rapidement à chaud, à l'orangé puis au jaune.
 - A ce stade, l'addition d'un réducteur, chlorure stanneux ou sulfure d'NH₄ donne une coloration violette.
 - * Réaction caractéristique utilisée dans le tableau I.

- CAFEINE
- Base purique extraite en milieu acide ou alcalin. Ne précipite pas avec le R. de MAYER. Meilleur solvant : chloroforme.
- * Réaction de la murexide. Due au noyau purique. Sous l'action d'oxydants divers, HNO₃, eau de chlore et de préférence eau de brome à saturation et après évaporation au B.M. bouillant, le résidu se colore en rouge-violacé sous l'action des vapeurs ammoniacales (la murexide proprement

dite est formée dans les mêmes conditions à partir de l'acide urique.)
M.O. Ajouter au résidu d'un verre de montre 1 ml d'eau de brome à saturation. Renouveler l'addition d'eau bromée, 2 à 3 fois et évaporer chaque fois à sec. On doit se développer une coloration jaune. Après refroidissement, ajouter 1 goutte de NH_4OH → coloration violette ; ou bien 1 goutte de lessive NaOH → coloration bleue.

COCAINE et anesthésiques locaux synthétiques (cf. Tableau p. 62)

COCAINE : alcaloïde dérivé du tropane.

STOVAINE : chlorhydrate d'amyléine.

NOVOCAINE : procaïne = p.amino.benzoate de diéthylamino-éthanol.

* - Réaction au KMnO_4 (réaction générale à faire en présence d'un témoin anesthésique)

M.O. Au résidu d'anesthésique, ajouter 1 à 2 gouttes d' HCl à 0,5 %
 Evaporer au B.M. bouillant.
 Reprendre par 1 goutte d'eau distillée et ajouter une goutte de solution KMnO_4 1 %. Comparer les résultats obtenus avec ceux du tableau, au verso.

* - Réaction de GUERBET

En présence de HNO_3 fumant et chaud, le noyau benzénique de la cocaïne est nitré. Après réduction de $-\text{NO}_2$ en $-\text{NH}_2$ par le chlorure stanneux, puis diazotation, le sel de diazonium est copulé en milieu ammoniacal avec le β -naphtol en donnant un colorant azoïque insoluble rouge-orangé. Le précipité est soluble dans H_2SO_4 en donnant une coloration rouge-violacée.

M.O. Au résidu anesthésique, ajouter 2 gouttes de HNO_3 fumant.
 Evaporer à sec au B.M. Ajouter au résidu une goutte de solution de SnCl_2 au 1/10 et chauffer au bain-marie 2 à 3 minutes. Refroidir dans la GLACE. Ajouter 2 gouttes de NaNO_2 0,1 % puis après 2 à 3 minutes, 3 à 4 gouttes d'une solution extemporanée de β -naphtol à 1 % dans NH_4OH au 1/10 : précipité rouge orangé + H_2SO_4 conc. 1 ml : dissolution du précipité et solution rouge-violacée.

* La Novocaïne donne une réaction positive par diazotation directe :
 résidu sec + HCl au 1/10 (1 goutte) dans la glace, puis ajouter NaNO_2 et β naphtol → coloration rouge, spécifique dans le cadre des T.P.

N.B. Cette réaction très sensible n'est pas spécifique de la cocaïne. Elle est donnée par tous les composés susceptibles de fournir de l'acide nitrobenzoïque, en particulier la STOVAINE, la NOVOCAINE et les esters de l'acide tropique.

On ne peut tirer de conclusions du tableau suivant que lorsque toutes les réactions indiquées ont été effectuées, et en examinant l'ensemble des résultats.

- Réaction de FERREIRA DA SILVA : résidu sec + quelques gouttes H_2SO_4 . Chauffer au B.M. à 100° , puis ajouter quelques gouttes H_2O → odeur suave de benzoate de méthyle (en présence de COCAINE).

* Réaction au thiocyanate de cobalt : résidu sec + V gouttes de solution 2 % Thiocyanate Co \longrightarrow bleu ; + II gouttes HCl conc. \longrightarrow rose ; transvaser dans un petit tube à essai + V gouttes CHCl_3 , agiter \longrightarrow bleu en phase CHCl_3 , en présence Cocaïne.

RESULTATS :

	STOVAÏNE	COCAÏNE	NOVOCAÏNE
Aspect du résidu sec	sec blanc	Huileux	Huileux
Borate de Na 5 %	Précipité blanc net stable après agitation	peu de précipité	pas de précipité ou précipité disparaissant totalement après agitation
Phosphate de Na 10 %	Précipité blanc net ↓ ↓ ↓	précipité léger ↓	pas de précipité ou précipité disparaissant totalement après agitation
Réaction de GUERBET	⊕	⊕	⊕⊕⊕ et diazotation directe ⊕⊕⊕
KMnO_4 1 %	Réduction en <u>quelques minutes</u> . Après agitation, <u>quelques cristaux noirs</u> surnagent.	Précipité violet rose de permanganate de cocaïne.	réduction <u>immédiate</u> avec précipité marron de bioxyde de Mn.

CODEINE Alcaloïde à noyau phénanthrénique.

* Réaction de LAFON. Au résidu d'alcaloïde sec et froid, ajouter 1 goutte de réactif au sulfosélénite d'ammonium. On obtient une très belle coloration vert émeraude (dans les mêmes conditions, la morphine donne une coloration vert olive.)

N.B. La codéïne ne donne aucune des réactions réductrices de la morphine.

COLCHICINE Alcaloïde dérivé de la tropolone.

Base très faible dont les sels sont facilement dissociables par l'eau. Elle peut donc être extraite en milieu acide ou alcalin. Meilleur solvant : chloroforme. Éliminée par l'urine.

* Elle résiste bien à la putréfaction.

- * - En plus de la réaction caractéristique proposée dans le tableau I, on peut examiner l'action de :
- H_2SO_4 L'acide sulfurique (1 à 2 gouttes) donne avec la colchicine une coloration jaune foncé virant au bleu indigo par addition d'une goutte d'acide nitrique. Cette dernière coloration n'est pas stable et passe au vert, violet, rouge vineux, enfin au jaune.
 - $FeCl_3$: 1 goutte de la solution aqueuse à 1 % donne une coloration verte.
 - HNO_3 : 1 goutte d'acide nitrique pur donne une coloration violette immédiate.
 - Hétérosides extraits en milieu acide.

DIGITALINE
OUABAIN

- * - Réaction de MOREL et MARTHOUD : Résidu sec + 2 gtttes de m.dinitro-benzène (n° 48) + 1 gttte lessive NaOH (n° 33) On obtient une coloration bleu foncé persistant quelques minutes à la température ordinaire et immédiatement détruite par la chaleur. Réaction très sensible et fidèle.

- Réaction de KELLER-KILLIANI

Plus difficile à réaliser, elle caractérise les hétérosides tonicardiaques par leur glucide commun.

M.O. Ajouter au résidu d'un verre de montre 1 ml de R. acéto-ferrique de KELLER et dissoudre. Verser cette solution au fond d'un petit tube à essai dans lequel on a déjà mis 1 ml de R. sulfo-ferrique de KILLIANI Ne pas mélanger.

En présence des glucosides digitaliniques, il se produit une coloration brun foncé à la zone de séparation des réactifs et, peu à peu l'acide acétique supérieur se colore en bleu tandis que la couche inférieure sulfurique reste incolore.

* - Réaction au p-diméthylaminobenzaldehyde (PDAB)

M.O. Résidu sec + 1 ml de R. PDAB : une coloration jaune-orange fait supposer la présence d'OUABAIN.

On évapore à sec : coloration brune : OUABAIN
coloration bleu-noir : DIGITALINE

+ 1 goutte acide acétique. On chauffe :

coloration violette : OUABAIN
coloration verte : DIGITALINE

La coloration violette donnée par l'OUABAIN s'intensifie en présence d'eau.

Les colorations données par H_2SO_4 conc. peuvent servir à identifier les différents glucosides.

M.O. Résidu sec + 2 gouttes H_2SO_4 pur et conc.

col. brune, devenant brun-rougeâtre sale : DIGITALINE
col. vieux rose faible, passant au brun : OUABAINÉ

EMÉTINE

Alcaloïde à noyau isoquinoléique.

Après examen de la fluorescence et la réaction donnée par l'eau de brome au tableau II, on peut effectuer les réactions suivantes :

- Au résidu sec dissout dans 4 gouttes d'eau, ajouter 1 goutte HCl conc. + 2 gouttes KI. On obtient un précipité blanc d'iodhydrate d'émétine.

* Mélangier sur le verre de montre, à côté du résidu sec, 1 cristal de $KMnO_4$ avec 2 gouttes H_2SO_4 conc. Mettre en contact le mélange verdâtre obtenu avec le résidu d'alcaloïde. On obtiendra une coloration violette très vive.

MORPHINE

Alcaloïde à noyau phénantrénique.

Meilleurs solvants : acétate d'éthyle et alcool amylique.

N'est sol. dans l'éther que lorsqu'elle vient d'être précipitée.

Sa fonction phénol lui confère une solubilité dans les alcalis avec lesquels elle donne des morphinates. Elle ne peut donc être précipitée.

* Réaction de LAFON

Résidu sec + 1 goutte de R. de LAFON : coloration vert olive (voir différence avec CODEINE)

* Réaction de MARQUIS

Résidu sec + 1 goutte de R. de MARQUIS : col. pourpre virant au violet puis au bleu.

- Réaction de FROEHDE

Résidu sec + 1 goutte de R. de FROEHDE : col. violet lilas virant peu à peu au bleu, vert-jaune, rose, par suite d'une réduction progressive de l'acide molybdique par la morphine.

- Propriétés réductrices

La morphine réduit l'acide iodique, avec libération d'iode qui confère au liquide une coloration jaune. Cette coloration vire au brun par addition d'ammoniaque. L'iode peut également être extrait par le chloroforme ou le tétrachlorure, qu'il colore en violet.

M.O. Au résidu sec, ajouter 1 goutte HCl 10 % + 4 gouttes d'eau. Transvaser dans un petit tube à essai. Ajouter 1 cristal KIO_3 et agiter. Observer l'apparition d'une coloration jaune due à l'iode.

Ajouter 2 gouttes NH_4OH : coloration brune.

Les propriétés réductrices de la morphine peuvent aussi être mises en évidence par réduction au ferricyanure de K en ferrocyanure.
(ferricyanure de K : 3 gouttes de sol. au 1/10) + (1 goutte FeCl_3 au 1/100 : précipité bleu de Prusse)

NOVOCAINE Voir COCAINE

OUABAIN Voir DIGITALINE

PILOCARPINE Dérivé de l'imidazole.

Facilement oxydable. Extraite après alcalinisation faible par NaHCO_3 .

- * La réaction donnée dans le tableau III est caractéristique ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{CHCl}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$). Respecter impérativement les quantités indiquées. Ne pas tenir compte d'une coloration bleue éventuelle du CHCl_3 (=Strychnine, Antipyrine)

PYRAMIDON Diméthylaminoantipyrine.

Dans la réaction donnée par l'acide nitreux on observe, quand on déplace la goutte de cet acide sur le résidu sec, une coloration verdâtre puis violet fugace, accompagnée d'un très léger dégagement gazeux.

- * La coloration donnée par AgNO_3 est caractéristique. (Tableau I)

QUININE Noyau quinoléique + noyau quinuclidique reliés par une fonction alcool secondaire.

Sol. éther, alcool, chloroforme, benzène, acétate d'éthyle.

- * Fluorescence en milieu SO_4H_2 dilué.

- Réaction de la Thalléquinine.

En solution très diluée et en milieu légèrement acide (H_2SO_4 0,1 % ou acide acétique) et après oxydation ménagée par l'eau de Brome puis alcalinisation par l'ammoniaque, la quinine donne une coloration verte.

M.O. Résidu sec + 10 gouttes d'eau + 1 goutte d'acide sulfurique. Ajouter goutte à goutte, jusqu'à faible coloration jaune, une dilution au 1/10 d'eau de brome saturée. Agiter 20 à 30 secondes. Ajouter X gouttes d'ammoniaque. Coloration VERTE + HCl peu à peu \longrightarrow rouge.

- * Réaction de l'érythroquinine.

Variante de la réaction précédente. Elle en diffère par addition de ferrocyanure de K après l'oxydation par l'eau de brome. L'alcalinisation par l'ammoniaque donne alors une coloration rouge extractible par le chloroforme.

M.O. Résidu sec + 10 gouttes d'eau + 1 goutte d'acide acétique.
Transvaser dans un petit tube à essai contenant 0,5 ml de CHCl_3 .

Ajouter goutte à goutte l'eau de brome jusqu'à obtention d'une coloration jaune, puis du ferrocyanure de K au 1/10 à raison d'une goutte pour 5 gouttes de brome utilisées (QSP \longrightarrow dissolution du \downarrow).

Agiter 20 à 30 secondes. Ajouter 1 goutte d'ammoniaque au 1/10°.
 Agiter énergiquement.
 La couche chloroformique est colorée en ROUGE.

N.B. Dans les mêmes conditions, la BRUCINE donne aussi une coloration rose intense passant aussi dans le chloroforme.

SPARTEINE Alcaloïde dérivé du nor-lupinane.

* Réaction au sulfure d'ammonium donnée dans le tableau III est caractéristique.

- R. GRANT : évaporer à sec 0,5 ml de solution de spartéine sur une bandelette de papier filtre.

Puis vapeurs Br ₂	—————>	jaune
+ vapeurs NH ₃	—————>	incolore
puis à l'étuve	—————>	rose-orangé

(Erreur = CODEINE)

STOVAINE Voir COCAINE

STRYCHNINE Alcaloïde à noyau indolique.
 Meilleur solvant : chloroforme.

* Réaction d'oxydation en milieu sulfurique.

H₂SO₄ ne détermine en présence de strychnine aucune coloration.

Mais après addition de bichromate de K, il apparaît une coloration violette fugace virant au rouge cerise, au jaune, puis disparaissant. Ces variations de teinte sont liées au degré d'hydratation de l'acide utilisé et accélérées par addition de traces d'eau (apportées par l'air ambiant).

M.O. Au résidu sec ajouter 2 à 3 gouttes d'H₂SO₄ conc. Faire tomber un petit cristal de bichromate de K que l'on déplace à l'aide d'un agitateur.

Observer l'apparition de stries violettes caractéristiques virant au rouge cerise, au jaune, puis disparaissant.

{ N.B. La YOHIMBINE peut donner la même coloration violette, mais qui ne vire pas au cerise. En outre, ses solutions sont fluorescentes à 366 nm.

YOHIMBINE Alcaloïde à noyau indolique.
 Solutions fluorescentes à 366 nm.

* Résidu sec + 2 gouttes de R. de WASICKY : coloration rouge-orangé qui devient violette après quelques heures.

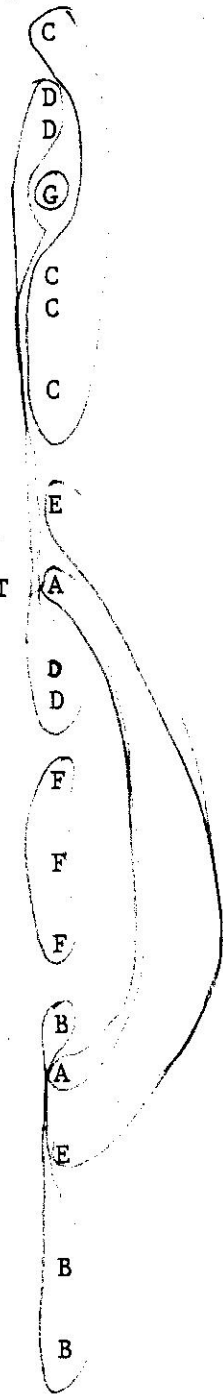
En cas de recherche négative, insister sur les réactions de

Pyramidon
 Antipyrine
 Novocaïne
 Quinine (fluorescence en milieu sulfurique)

N.B. * Les réactions marquées d'un astérisque sont les plus sensibles et les mieux visibles.

TABLE DES MATIERES

	Manipulation	Page
Acétone	C	23
Alcaloïdes et analogues		32
- caractérisation par C.C.M.	D	30
- extraction par la méthode de CLARKE-NICKOLLS	D	
- identification par la technique de diagnose systématique de MALMY	G	50
Alcool éthylique		18
- recherche dans l'air alvéolaire	C	
- dosage dans le sang	C	19
Alcool méthylique		24
- recherche	C	
Anhydride sulfureux		34
- dosage dans l'air	E	
Arsenic		3
- recherche et dosage par la méthode de MARTIN-FLORET	A	
Barbituriques		30
- recherche dans le sang par la réaction de PARRI	D	
- caractérisation par C.C.M.	D	32
Chanvre indien		47
- identification par C.C.M.	F	
Chromatographie sur couche mince		46
- Préparation des plaques	F	
Détergents anioniques		49
- dosage dans l'eau	F	
Dibenzoazépine		11
- recherche	B	
Minéralisation par voie sèche (Méthode de GENEUIL)	A	5
Oxyde de Carbone		36
- recherche dans l'atmosphère (tube DRÄGER)	E	
Phénothiazines		13
- recherche	B	
Salicylés		8
- dosage	B	



A₄
B₄
.
.
.