

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA TOXICOLOGIE DU TRICHLORETHYLENE

I. DOSAGE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

PAR

RENÉ FABRE et RENÉ TRUHAUT

Du Laboratoire de Toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Paris

L'étude de la toxicologie du trichloréthylène, $\text{CHCl}_2\text{-CCl}_2$, constitue, du fait de l'extension toujours croissante des emplois de ce solvant (extraction des graisses, dissolution des peintures et vernis, dégraissage des pièces métalliques, nettoyage à sec des étoffes, etc.) un problème d'hygiène industrielle de grande actualité. Par suite de l'utilisation depuis quelques années, de ce dérivé chloré de l'acétylène comme anesthésique, une telle étude est devenue également fort importante dans le domaine thérapeutique. On avait cru tout d'abord qu'il s'agissait d'un produit dépourvu de toxicité. C'était là l'opinion d'Ullmann (1928) et aussi de Trillat (1937) dans son rapport au conseil supérieur d'hygiène publique de France. Dès 1915, toutefois, Plessner (1916) avait décrit plusieurs cas d'intoxication chronique et Brezina et Teleky (1921a, b, 1922) indiquaient que son action prolongée exerçait un effet nocif sur l'organisme.

De fait, de 1914 à 1931, 284 cas d'intoxication, dont 25 mortels, furent relevés en Allemagne par Stüber (1931) (202 intoxications aiguës, et 82 intoxications chroniques). En Angleterre, l'Inspection du Travail releva de 1923 à 1935 39 cas d'intoxication, dont trois mortels.

En France, Carrieu (1927) signala, en 1926, cinq cas mortels auxquels Vallée et Leclercq (1935) ajoutèrent un sixième en 1935.

Depuis cette époque, le trichloréthylène a continué, dans tous les pays, à provoquer des accidents. Il n'est pas étonnant, dans ces conditions, que les toxicologues et les hygiénistes lui aient consacré de nombreuses recherches. Elles ont conduit à préciser entre autres les transformations subies dans l'organisme par ce solvant chloré. Barrett en collaboration avec Cunningham et Johnston (1939) réussit à montrer que, chez le chien, une partie au moins du trichloréthylène était transformée, suivant un mécanisme d'ailleurs non élucidé, en acide trichloracétique :

$\text{CHCl}_2 = \text{CCl}_2 \rightarrow \text{CCl}_3 \text{CO}_2\text{H}$
trichloréthylène acide trichloracétique

qu'il isola sous forme de di (trichloracétate) de pipérazine. Powell (1945) démontra qu'il en était de même chez l'homme.*

Dans l'intoxication par le trichloréthylène, il faut donc, comme dans le cas de beaucoup d'autres substances toxiques (Fabre et Truhaut, 1949) rechercher et doser, non seulement le toxique intact, mais encore le produit de son métabolisme.

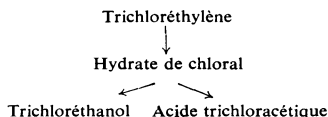
Nos efforts ont tendu tout d'abord à établir une méthode permettant de façon satisfaisante le dosage successif du trichloréthylène et de l'acide trichloracétique dans les produits biologiques. Son exposé constitue l'objet du présent article. Dans une prochaine publication, nous présenterons les résultats que nous avons obtenus en l'appliquant à l'étude de l'intoxication expérimentale aiguë ou chronique par le trichloréthylène.

Dosage du Trichloréthylène et de l'Acide Trichloracétique dans les Produits Biologiques

Dosage du Trichloréthylène : Méthode de R. Truhaut (1951).—La technique comporte trois phases successives.

Entraînement du Toxique par un Courant d'Air Chaud.—Ce principe a été appliqué par l'un de nous (Fabre, 1944) au dosage, dans les milieux biologiques, de solvants comme le benzène ou le sulfure de carbone qui, en raison de leur grande affinité pour les lipides, ne sont qu'incomplètement séparés par la vapeur.

Tout récemment, Butler (1949) a indiqué que dans l'urine de chien soumis à l'inhalation de trichloréthylène, on pouvait, par hydrolyse acide à chaud, obtenir du trichloréthanol en proportion plus importante que l'acide trichloracétique. D'après lui les deux métabolites pourraient dériver de l'hydrate de chloral préalablement formé à partir du trichloréthylène et l'on aurait, au moins chez le chien, le schéma suivant de transformation métabolique du solvant :



d'eau. La température du courant d'air doit être de 50°, c'est-à-dire inférieure à celle provoquant la coagulation des protéides du sang et des organes. Par ailleurs, pour que la totalité du solvant volatil soit entraînée, même si l'on part de milieux très riches en lipides, il faut diviser finement le courant gazeux. Dans ce but, on utilise l'appareillage spécial antérieurement décrit (Fabre, 1944). L'échantillon de sang ou d'organes exactement pesé est introduit dans un tube A d'environ 20 mm. de diamètre, limité à sa partie inférieure par une plaque de verre fritté B, sertie dans le tube. A la partie inférieure de ce tube est soudé un tube de très faible diamètre (2 à 3 mm.) C permettant l'accès de l'air qui devra traverser la plaque de verre fritté en fines bulles

dans le sang, il faut recueillir ce dernier sur fluorure de sodium (0,05 environ pour 10 cm.³ de sang). On dilue ensuite au demi avec de l'eau distillée. Pour éviter la formation de mousse lors du passage de l'air, il est bon, dans tous les cas, d'ajouter une goutte d'alcool octylique ou un peu de suspension à 10 p. 100 de stéarate de calcium dans l'huile de vaseline (1 cm.³ pour 10 cm.³ de sang dilué au demi ou de suspension d'organes).

Pour éviter l'interférence de vapeurs de solvants chlorés pouvant exister dans l'atmosphère du laboratoire où est pratiqué le dosage, il est recommandé de faire précéder le tube A d'une colonne G garnie de charbon actif.

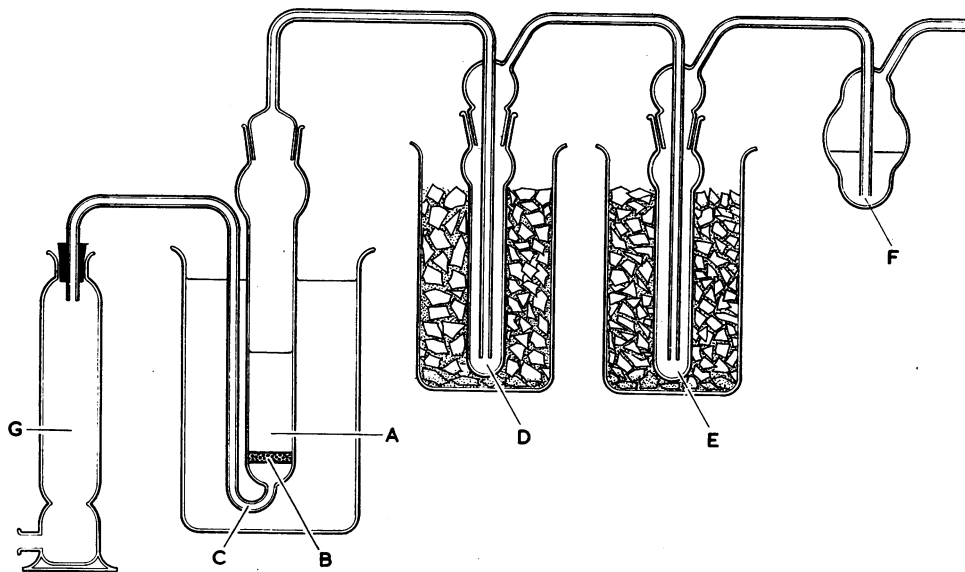


Fig. 1.—Appareil pour le dosage du trichloréthylène dans le sang et les organes.

gazeuses réparties sur toute la surface (Fig. 1).

L'ensemble des tubes A et C est plongé dans un thermostat maintenu à 50°. La partie supérieure du tube A est reliée par rodage à deux barboteurs D et E montés en série ; 10 cm.³ de pyridine sont introduits dans le premier et 5 cm.³ dans le second et chacun d'eux est plongé dans un cristalliseur contenant un mélange glace + sel. A la suite sont placés un barboteur de garde du type Maquenne F et un régulateur de *Jungfleisch*, lequel est relié à une trompe à eau dont on règle le débit grâce à une pince de Mohr de façon qu'il passe une ou deux bulles seulement par seconde, soit environ 10 litres par heure. L'entraînement est poursuivi pendant 2 heures 30. La prise d'essai de matériel biologique peut varier de 1 à 10 g. Quand il s'agit d'organes, il faut procéder au préalable à leur pulpe en opérant à basse température, de façon à éviter toute perte par volatilisation. La pulpe est ensuite mise en suspension dans du soluté physiologique (5 cm.³ pour 1 g. d'organe). Quand il s'agit d'un dosage

Captation du Trichloréthylène.—Les procédés proposés antérieurement faisaient appel, soit à l'adsorption sur charbons actifs ou sur silicagel, Fabre et Mlle. de Belvata Balasy (1949), avec élution ultérieure à l'aide d'un solvant convenablement choisi, soit à la dissolution directe dans certains solvants, par exemple : l'alcool éthylique (Barrett, 1936), le toluène (Habgood et Powell, 1945), ou l'anisol (Brain et Helliwell, 1949), étant donné le mécanisme de la réaction colorée utilisée, dont le premier stade est la formation d'un pyridinium par addition du composé halogéné sur l'azote de la pyridine (Truhaut, 1949), il nous a semblé logique d'essayer de retenir le solvant chloré par barbotage dans la pyridine remplaçant ainsi les deux phases d'adsorption et d'élution par une seule phase de captation. Pour que cette captation soit totale, il faut monter deux barboteurs en série et surtout les refroidir, non pas seulement dans la glace fondante mais dans un mélange glace + sel.

La pyridine utilisée doit être soumise à un essai à blanc ; certains échantillons de pyridine donnent en

effet directement une coloration par chauffage avec une solution alcaline. Il faut, dans ce cas, purifier la pyridine en la portant à l'ébullition au réfrigérant à reflux pendant une demi-heure avec 1/20^{ème} environ de son poids de potasse en pastilles et recueillant ensuite les fractions qui passent à la distillation à 114–115°.

Dosage Photométrique.—Il est basé sur la coloration rouge violacée que donne le trichloréthylène par chauffage avec la pyridine en milieu alcalin (Bruning et Schnetka, 1934). Il faut se souvenir que des colorations analogues ou voisines sont fournies dans les mêmes conditions par divers composés halogénés et, en particulier, dans la série des solvants chlorés, par le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, et le tétrachloréthane. Dans un travail antérieurement publié, l'un de nous (Truhaut, 1949), à la lumière de résultats personnels et de travaux antérieurs, a précisé le mécanisme et les limites de spécificité de cette réaction colorée alcalino-pyridinique signalée pour la première fois par Fujiwara (1914) dans le cas du chloroforme et considérée à tort, à la suite de Ross (1923), comme spécifique d'un groupement trihalogéné $R-C \equiv X_3$.

Elle a été appliquée par divers auteurs au dosage du solvant chloré, soit dans les atmosphères (Barrett, 1936 ; Brain, 1949), soit dans les milieux biologiques (Bruning et Schnetka, 1934 ; Barrett, Cunningham, et Johnston, 1939 ; Barrett et Johnston, 1939 ; Habgood et Powell, 1945 ; Forssman et Ahlmark, 1946 ; Fabre et de Balasy, 1949 ; Brain et Helliwell, 1949 ; Frant et Westendorp, 1950).

Toutes ces techniques sont basées sur le développement de la coloration en phase hétérogène. Aucune ne nous a donné entière satisfaction, surtout à cause de l'instabilité de la matière colorante formée et de la production, dans la couche pyridinique, d'une opalescence gênant l'évaluation photométrique. Cet inconvénient disparaît en pratiquant la réaction suivant le mode opératoire original, en phase homogène hydro-alcoolique, préconisé par Truhaut (1949), qui présente le double avantage d'atteindre une sensibilité beaucoup plus grande (ordre de γ par cm.3 de pyridine) et d'augmenter la spécificité (le chloroforme et le tétrachlorure de carbone ne gênent que pour des doses relativement élevées).

Voici les détails de la technique : on mélange avec soin le contenu des deux barboteurs. On prélève ensuite 5 cm.3 de solution pyridinique que l'on additionne de 1 cm.3 de solution de soude à 1 p. 100 dans l'alcool à 95°. On porte au bain-marie bouillant à 70° pendant trois minutes exactement, on refroidit sous un courant d'eau froide, on ajoute 3 cm.3 d'eau distillée et on mélange. Au bout d'une minute à une minute trente secondes et *sans attendre plus de trois minutes*, on doit effectuer la lecture photométrique car, à partir de la troisième minute, la coloration commence à décroître lentement. On se reporte ensuite à une courbe d'étalonnage obtenue à l'aide d'une solution pyridinique de trichloréthylène de concentration connue. Voici celle que nous avons établie en utilisant le photomètre de Pulfrich avec écran vert S 53 et cuve de 10 mm, la cuve témoin étant remplie avec un mélange de pyridine (5 vol.) + solution alcoolique de soude à 1 p. 100 (1 vol.) + eau (3 vol.). On voit que, entre 0 et 200 γ de

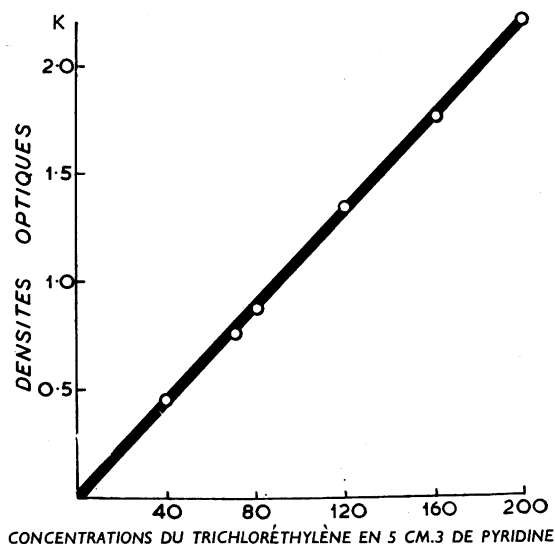


Fig. 2.—Courbe d'étalonnage établie pour le dosage du trichloréthylène (Photomètre de Pulfrich. Ecran vert S 53. Cuve de 10 mm.).

trichloréthylène dans 5 cm.3 de pyridine, la courbe est une droite (Fig. 2).

Dosage de l'Acide Trichloracétique.—Cette méthode a été préconisée par Powell (1945), pour le sang et appliquée aux organes par Fabre et de Balasy (1949). La technique comporte deux phases : défécation du résidu provenant de l'entraînement à l'air chaud ; et dosage photométrique sur le filtrat de défécation basée, comme celui du trichloréthylène, sur la réaction développée par chauffage avec la pyridine en milieu alcalin. La coloration diffère un peu qualitativement de celle fournie par le trichloréthylène et surtout elle se développe moins rapidement. Aussi, faut-il opérer à la température du bain-marie bouillant et augmenter le temps de chauffe.

Pour effectuer la défécation verser sur un filtre le résidu contenu dans le tube à entraînement. Prélever une portion aliquote du filtrat, soit 5 cm.3. Déféquer, dans le cas de pulpe d'organes, par addition de 0 cm.3 5 de tungstate de sodium à 10 p. 100 et 0 cm.3 5 de SO_4H_2N .

S'il s'agit de sang, la défécation demande une quantité plus grande de réactif et, pour le même volume, il faut ajouter 2 cm.3 de tungstate de sodium à 10 p. 100 et 2 cm.3 de SO_4H_2N . Filtrer.

Pour le dosage colorimétrique prélever 1 cm.3 de filtrat et ajouter successivement 10 cm.3 de pyridine ; 1 cm.3 de toluène ; et, après mélange, 5 cm.3 de soude à 35 p. 100. Agiter et porter au bain-marie bouillant 15 minutes en agitant fréquemment.

Apprécier l'intensité de la coloration au photomètre. Se référer à une courbe d'étalonnage établie au préalable à l'aide d'une solution aqueuse titrée d'acide trichloracétique et, en tenant compte des dilutions successives, en déduire la quantité d'acide trichloracétique contenue dans le poids du prélèvement.

Conclusions

Nous avons établi une méthode pour le dosage simultané dans les milieux biologiques du trichloréthylène et de l'acide trichloracétique. Après avoir entraîné le trichloréthylène par un courant d'air chaud et l'avoir capté dans la pyridine fortement refroidie, on effectue un dosage photométrique basé sur la réaction colorée alcalinopyridinique de Fujiwara, sensibilisée et rendue plus spécifique grâce à un mode opératoire original en phase hydro-alcoolique homogène. L'acide trichloracétique demeure dans le résidu d'entraînement du trichloréthylène et est dosé séparément après défécation tungstique par une technique photométrique dérivée de celle proposée par Powell dans le cas du sang.

English Summary

We have established a method for the simultaneous estimation of trichlorethylene and trichloroacetic acid in biological media. After having driven off the trichlorethylene by a current of warm air and having taken it up in pyridine which has been kept very cold, photometric estimation is carried out by the colour method of Fujiwara employing alkaline pyridine, sensitized and rendered more specific by an original method using a homogeneous water-alcohol phase. Trichloroacetic acid remains in the residue after getting rid of the

trichlorethylene and is estimated separately by a photometric technique, after precipitation by tungstic acid, derived from that proposed by Powell and used for estimating trichloroacetic acid in blood.

BIBLIOGRAPHIE

- Barrett, H. M. (1936). *J. industr. Hyg.*, **18**, 341.
 —, Cunningham, J. G., et Johnston, J. H. (1939). *Ibid.*, **21**, 479.
 —, et Johnston, J. H. (1939). *J. Biol. Chem.*, **127**, 765.
 Brain, F. H. (1949). *Analyst*, **74**, 555.
 —, et Helliwell, P. J. (1949). *Biochem. J.*, **45**, 75.
 Brezina, E., et Teleky, L. (1921 a). Internationale Übersicht über Gewerbekrankheiten nach den Berichten der Gewerbeinspektionen der Kulturländer über das Jahr 1913. Berlin.
 —, — (1921 b). *Idem.*, 1914–18.
 —, — (1922). *Idem.*, 1919.
 Bruning, A., et Schnetka, M. (1934). *Chemikerztg*, **88**, 156.
 Butler, T. C. (1949). *Fed. Proc.*, **8**, 278.
 Carrieu, M. F. (1927). *Revue d'Hygiène et de Médecine préventive*, **49**, 348.
 Fabre, R. (1944). *Ann. pharm. franç.*, **2**, 108.
 —, et de Balasy, M. (1949). Proceedings of the ninth international Belvata congress on Industrial Medicine, London, September 1948. Wright, Bristol, p. 546.
 —, et Truhaut, R. (1949). *Ann. Méd. lég.*, **29**, 233.
 Forssman, S., et Ahlmark, A. (1946). *Nord. Med.*, **30**, 1033.
 Frant, R., et Westendorp, J. (1950). *Arch. industr. Hyg. occup. Med.*, **1**, 308.
 Fujiwara, K. (1914). *S.B. naturf. Ges. Rostock*, **6**, 33.
 Habgood, S., et Powell, J. F. (1945). *British Journal of Industrial Medicine*, **2**, 39.
 Plessner, W. (1916). *Berl. klin. Wschr.*, **53**, 25.
 Powell, J. F. (1945). *British Journal of Industrial Medicine*, **2**, 142.
 Ross, J. H. (1923). *J. biol. Chem.*, **58**, 641.
 Stüber, K. (1931). *Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.*, **2**, 398.
 Trillat, A. (1937). *Ann. Hyg. publ., Paris*, N.S. **15**, 434.
 Truhaut, R. (1949). *Bull. Fédération int. pharm.*, **23**, 432.
 — (1951). *Ann. pharm. franç.*, **9**, 175.
 Ullmann, F. (1928). "Enzyklopädie der technischen Chemie." Berlin. 2^{ème} édit.
 Vallée, C., et Leclercq, J. (1935). *Ann. Méd. lég.*, **15**, 10.