

CHROM. 18 344

CARACTÉRISATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES COMPOSÉS BENZOTHIAZOLIQUES ET DU β -SITOSTÉROL CÉDÉS PAR LES SERINGUES NON RÉUTILISABLES

Ch. B. AIRAUDO*

Laboratoire de Bromatologie, Diététique et Analyse Appliquée à l'Expertise, Faculté de Pharmacie, 27 Bd. Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5 (France) et Pharmacie du Centre Hospitalier Spécialisé Valvert, Bd. des Libérateurs, 13391 Marseille Cedex 11 (France)

A. GAYTE-SORBIER

Laboratoire de Bromatologie, Diététique et Analyse Appliquée à l'Expertise, Faculté de Pharmacie, 27 Bd. Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5 (France)

et

R. MOMBURG et P. LAURENT

Pharmacie du Centre Hospitalier Spécialisé Valvert, Bd. des Libérateurs, 13391 Marseille Cedex 11 (France)
(Reçu le 16 juillet 1985; manuscrit modifié reçu le 16 novembre 1985)

SUMMARY

Thin-layer chromatographic characterization of benzothiazole derivatives and β -sitosterol leached by disposable syringes

A thin-layer chromatographic study of 2-mercaptobenzothiazole, 2-(methylthio)benzothiazole, 2-(2-hydroxy-ethylthio)benzothiazole, 2-hydroxybenzothiazole, zinc 2-mercaptobenzothiazolate, mercaptobenzothiazole disulfide, and β -sitosterol with three developing solvents and eleven spray reagents is reported. A simple method is described which highlights the leaching of 2-mercaptobenzothiazole and 2-(2-hydroxy-ethylthio)benzothiazole from the rubber plunger-seals of disposable syringes: contact of rubber with bidistilled water, extraction of this liquid with chloroform, chromatography on silica gel with the solvents previously studied and spraying with N-chloro-2,6-dichloro-*p*-benzoquinone monoimine. The method may also be used to discriminate those syringes sterilized with ethylene oxide, the only ones able to leach 2-(2-hydroxy-ethylthio)benzothiazole, from those sterilized by irradiation. Owing to the β -sitosterol traces leached, it may also be used to investigate whether the plunger-seals are made of natural rubber. The toxic effects of the compounds leached are briefly reported.

INTRODUCTION

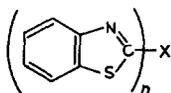
Les médicaments injectables sont administrés presque exclusivement à l'heure actuelle avec des seringues non réutilisables en matière plastique¹. Ce matériel d'autre

part n'est pas d'un emploi étroitement spécialisé, mais au contraire tout individu a reçu, ou recevra un jour, au moins quelques injections avec de telles seringues. Ces seules considérations suffiraient à expliquer l'intérêt des Pharmacopées et des organismes de normalisation pour le contrôle de la qualité de ces matériels et à justifier les travaux entrepris en ce sens.

La Pharmacopée française², notamment, prescrit que "les préparations injectables administrées à l'aide de seringues en matière plastique ne doivent subir au contact de celles-ci aucune modification de leurs propriétés physico-chimiques et toxicologiques". Cependant certains d'entre nous ont montré antérieurement³ que les têtes de piston en élastomère de seringues de bonne qualité⁴ cédaient très rapidement cinq composés de structure benzothiazolique (Tableau I). Le mercapto-2 benzothiazole (I) est un accélérateur de vulcanisation couramment utilisé et il a été établi que les composés III, IV et V prenaient naissance au sein de l'élastomère lors de la stérilisation par l'oxyde d'éthylène³. Cette réaction ne se produit cependant qu'à partir du mercapto-2 benzothiazolate de zinc (VI), également très employé, et non pas à partir du mercapto-2 benzothiazole. Mais en fait l'intérêt de cette distinction est surtout théorique, car en raison des réactions qui se produisent au cours de la vulcanisation, l'élastomère renferme finalement de l'oxyde de zinc, du mercapto-2 benzothiazole et du mercapto-2 benzothiazolate de zinc, quel que soit celui de ces deux composés qui a été utilisé⁵. Le mercapto-2 benzothiazole peut aussi se former à partir d'autres accélérateurs tels que le disulfure de benzothiazyle (VII), ou diverses benzothiazylsulfénamides qui libèrent en outre leurs amines respectives.

TABLEAU I

COMPOSÉS CÉDÉS PAR LES SERINGUES (I-V) ET PRODUITS DE RÉFÉRENCE (I-IV et VI-VIII)



No.	Composé	n	X
I	Mercapto-2 benzothiazole	1	-SH
II	Méthylthio-2 benzothiazole	1	-SCH ₃
III	(Hydroxy-2 éthylthio)-2 benzothiazole	1	-SCH ₂ CH ₂ OH
IV	Hydroxy-2 benzothiazole	1	-OH
V	(Hydroxy-2 éthoxy)-2 benzothiazole	1	-OCH ₂ CH ₂ OH
VI	Mercapto-2 benzothiazolate de zinc	2	-SZnS-
VII	Disulfure de benzothiazyle	2	-S-S-
VIII	β -Sitostérol		

Nous n'avons pu identifier les cinq produits cités qu'en recourant à la spectrométrie de masse. Il a paru utile d'élaborer en vue de contrôles de routine une méthode plus simple telle que la chromatographie sur couche mince (CCM). Ultérieurement, il a également paru intéressant de vérifier en même temps si l'élastomère des têtes de piston était à base de caoutchouc naturel, en mettant en évidence le β -sitostérol (VIII), qui n'est présent que dans le polymère d'origine végétale et n'est pas retrouvé dans les élastomères de synthèse⁶.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les essais ont été préparés selon deux méthodes, à partir de seringues stérilisées par l'oxyde d'éthylène (sept marques) ou par les rayonnements ionisants (une marque):

Essai A: une seringue de 5 ml a été maintenue remplie d'eau bidistillée pendant 24 h à la température ambiante, puis le liquide a été extrait trois fois par 0,5 ml de chloroforme, les extraits réunis constituant l'essai A.

Essai B: cent têtes de piston de seringues de 5 ml, séparées des corps de seringues et des tiges des pistons, ont été immergées pendant 24 h à la température ambiante dans 100 ml d'eau bidistillée, le liquide étant ensuite soumis à la même extraction que ci-dessus pour donner l'essai B.

Les solutions A et B ont été déposées sur des couches minces de silice ordinaires (Merck, réf. 5721) et avec zone de concentration (Merck, réf. 11845), éventuellement fluorescentes (Merck, réf. 5729 et 11798). Les dépôts étaient de 2 μ l pour les couches ordinaires et de 20 μ l ou 100 μ l pour celles à zone de concentration.

Les produits de référence suivants ont été retenus: mercapto-2 benzothiazole (I, Tableau I), qualité "pour analyses" (Prolabo, réf. 25.342.181); méthylthio-2 benzothiazole (II), qualité "reagent" (Eastman Kodak, réf. 4008); hydroxy-2 éthythio-2 benzothiazole (III), obtenu par synthèse à partir de I et du chloro-2 éthanol⁷. Son identité et/ou sa pureté ont été contrôlées par détermination du point de fusion⁷, par spectrométries UV³, de masse³ et de résonance magnétique nucléaire du proton; hydroxy-2 benzothiazole (IV), qualité "reagent" (Eastman Kodak, réf. 3993); mercapto-2 benzothiazolate de zinc (VI), qualité industrielle (Vanderbilt, réf. Zetax, agent de vente en France: Polyplastic); disulfure de benzothiazyle (VII), qualité industrielle (Société Landaise de Produits Chimiques, réf. MBTS); β -sitostérol (VIII), qualité "pour laboratoire" (Merck, réf. 3741).

Pour la partie qualitative, les produits de référence étaient généralement en solution à 0,5% (m/v) dans l'éthanol absolu, ou en solution saturée en cas de solubilité insuffisante (composés VI et VII). Les limites de détection ont été déterminées par dilutions progressives. Pour la partie quantitative, le composé III était en solution dans l'éthanol aux concentrations de 2,5, 5, 7,5 et 10 mg pour 100 ml.

Les chromatographies ont été développées sur 15 cm dans les mélanges: (a) benzène-acétate d'éthyle-acétone (100:5:1); (b) benzène-acétate d'éthyle-acétone (100:20:5); (c) dichlorométhane-cyclohexane-éthanol (50:30:20). Plusieurs réactifs ont été utilisés pour la révélation (les concentrations indiquées sont données en m/v):

*R*₁: Vaporiser une solution aqueuse de tétraborate de sodium à 2,34% et d'hydroxyde de sodium à 0,33%, puis une solution méthanolique de N-chloro dichloro-2,6 *p*-benzoquinone monoimine à 0,1%.

*R*₂: Vaporiser une solution chloroformique à 0,035% de N-bromosuccinimide et, après séchage, une solution obtenue par mélange de 3 ml de solution de fluorescéine à 0,33% dans la soude 0,1 *N* avec 97 ml d'éthanol.

*R*₃: Vaporiser un mélange de 3 ml de solution aqueuse d'acide hexachloroplatinique (IV) à 15,3%, 97 ml d'eau et 100 ml de solution aqueuse d'iodure de potassium à 6%.

*R*₄: Dissoudre 1,5 g de pentacyanonitrosylferrate de sodium dans 5 ml d'acide chlorhydrique 2 *N*, 95 ml de méthanol et 10 ml de solution d'ammoniaque à 25%.

Observer les taches apparues avec ce réactif, puis vaporiser une solution de cyanure de potassium à 2% dans un mélange eau distillée-méthanol (5:95). Porter les plaques à l'étuve à 100°C.

*R*₅: Vaporiser une solution de nitrate d'ammonium-cérium(IV) à 10% dans l'acide nitrique 0,125 *N*.

*R*₆: Vaporiser une solution de N-éthylmaléimide à 0,625% dans l'isopropanol absolu, puis après séchage à l'air une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à 1,40%.

*R*₇: Vaporiser une solution éthanolique de rhodamine B à 0,5%, puis après séchage une solution aqueuse à 10% de carbonate de sodium anhydre. Observer sur plaques fluorescentes à la lumière du jour et sous rayonnement de longueur d'onde 365 nm.

*R*₈: Vaporiser une solution extemporanée de nitrite de sodium à 0,5% dans l'acide chlorhydrique 1 *N* et porter les plaques à l'étuve à 100°C.

*R*₉: Vaporiser une solution acétonique de dithizone à 0,025%.

*R*₁₀: Dissoudre dans 400 ml d'eau 17 g d'acétate de sodium trihydraté, 6 g de tétraborate de sodium décahydraté et à chaud 2 g de thiosemicarbazide. Filtrer après refroidissement. Ajouter 50 ml de solution méthanolique de (thiazolyl-2 azo)-4 ré-sorcinol à 0,08%. Ajuster le pH à 7,5 et diluer à 500 ml (délai de conservation: 4 jours).

*R*₁₁: Vaporiser une solution d'acétate de cuivre(II) à 3% dans une solution aqueuse d'acide phosphorique à 8% et porter les plaques à 100°C pendant 15 min.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les Tableaux II et III présentent les résultats obtenus pour les produits de référence et les essais, respectivement. Les *R_F* sur plaques ordinaires et avec zone de concentration ne sont pas significativement différents. Le signe "—" signifie que le réactif considéré ne révèle pas la tache correspondante. Les changements de couleurs, spontanés ou provoqués par la chaleur, sont indiqués par le signe "→". Le signe "↓" signale les taches qui disparaissent à chaud, le signe "↑" celles qui n'apparaissent qu'à chaud ou les changements de couleurs observés après chauffage. L'adjectif "blanc" indique que les taches ne sont visibles que grâce à la différence de mouillabilité de la silice à leur niveau, par rapport au fond de la plaque.

Aucun solvant de développement, même non rapporté ici, n'a permis de distinguer le mercapto-2 benzothiazole (I) et le mercapto-2 benzothiazolate de zinc (VI). Les séparations parfois décrites avec des solvants très proches de certains de ceux utilisés⁸, ou très différents⁹, n'ont pas été retrouvées: il paraît probable que dans certains cas au moins ces comportements apparemment différents sont dus au fait que les produits n'ont pas été chromatographiés sur la même plaque. Les autres composés sont convenablement séparés par les solvants proposés, à l'exception cependant des produits IV et VIII dans le solvant (b) et des produits VII et VIII dans le solvant (c).

La N-chloro dichloro-2,6 *p*-benzoquinone monoimine (*R*₁), proposée pour la révélation du mercapto-2 benzothiazole¹⁰, met en évidence tous les dérivés benzothiazoliques considérés et le β-sitostérol, avec des différences de coloration permettant dans une certaine mesure de les distinguer (Fig. 1). Aucune modification des couleurs

n'a été notée en l'absence de prévapourisation de la solution tampon, préconisée dans le cas des phénols pour élargir l'éventail des couleurs^{11,12}. Le réactif R₂ a été décrit pour la révélation de certains insecticides organo-phosphorés soufrés^{13,14} et du mercapto-2 benzothiazole¹⁵. Il met en évidence tous les produits analysés. Réactif des alcaloïdes¹⁶ employé plus récemment pour la localisation de plusieurs adjuvants pour élastomères⁸, l'iodoplatinate de potassium (R₃) révèle également tous les produits analysés. Lui seul donne une coloration spécifique avec l'hydroxy-2 benzothiazole (IV), identique à celle que prend la zone de concentration lorsque de telles plaques sont utilisées. Son inconvénient pour des analyses répétées est son coût. La pentacyanonitrosylferrate de sodium (R₄) met en évidence les thiols¹⁷⁻¹⁹. Le cyanure de potassium coupe les disulfures organiques et les fait réagir à leur tour, ce qui permet de distinguer les composés I et VII. Néanmoins, et bien qu'il révèle tous les produits considérés, ce système de révélation ne présente que peu d'intérêt, car les colorations sont pâles et peu caractéristiques. Egalement décrit pour les thiols²⁰, le réactif R₅ révèle tous les produits analysés, avec une modeste possibilité de différenciation sur la base des colorations obtenues. La N-éthylmaléimide (R₆) permet en principe de distinguer les thiols des disulfures, qui ne réagissent pas¹⁹. Néanmoins, le produit VII a été révélé. Mais seule la différence de mouillabilité au niveau des taches permet de localiser les composés II et III, substitués sur le soufre, et le composé IV, non soufré en position 2. Ce réactif est par ailleurs lacrymogène. Employée comme réactif de certains lipides^{19,21,22}, la rhodamine B (R₇) a été retenue pour la mise en évidence de composés hétérocycliques sur plaques fluorescentes²³. Elle révèle de façon identique tous les composés analysés. Le nitrite de sodium (R₈), proposé pour les dérivés indoliques²⁴ et thiazoliques²⁵ ne présente pas d'autre intérêt que de localiser les taches par leur différence de mouillabilité. La tache du composé I ne reste jaune qu'une ou deux secondes et le composé VII n'est pas mis en évidence. D'abord retenue à cause de la présence de zinc dans le produit VI²⁶, la dithizone (R₉) permet en fait de révéler tous les produits considérés. La tache rose de R_F 0 sur plaques ordinaires, identique à celle observée avec un sel minéral de zinc, reste sur la ligne de dépôt dans le cas des plaques à zone de concentration, sans aucune migration vers la zone de chromatographie. Elle est cependant sans intérêt pour différencier les composés I et VI dans les essais en raison des réactions qui se produisent au cours de la vulcanisation. Le réactif R₁₀, proposé pour le dosage du zinc²⁷, n'a été essayé que pour tenter de distinguer ces deux composés, mais la même conclusion qu'avec le réactif précédent s'impose. L'acétate de cuivre en solution phosphorique (R₁₁), utilisé pour la révélation du β -sitostérol dans les extraits organiques de caoutchouc naturel⁶, donne aussi des colorations avec les composés I, VI et VII et inversement la plupart des autres réactifs testés réagissent avec le β -sitostérol. Enfin, avec des dépôts de 2 μ l sur couches ordinaires fluorescentes, tous les composés benzothiazoliques présentent au moins une tache sombre sous rayonnement de 254 nm. Toutefois, dans le cas du composé VII, c'est la tache du composé I, présent en tant qu'impureté, qui apparaît ainsi. Des taches secondaires sont également visibles dans ces conditions pour le β -sitostérol, mais non la tache principale correspondant aux R_F indiqués. Avec des dépôts de 20 μ l sur plaques fluorescentes à zone de concentration, apparaissent en outre à 254 nm la deuxième tache du composé I et la troisième du composé VII, et à 365 nm les premières taches des composés I et VII et celle du composé VI. Ces constatations sont en accord avec les caractéristiques d'absorption des divers produits que nous avons établies ailleurs³.

TABLEAU II
PRODUITS DE RÉFÉRENCE

Plaques ordinaires, fluorescentes pour l'observation sous UV, dépôts 2 μ l.

Composé	$R_F \times 100$ dans les solvants			Couleurs obtenues avec les différents réactifs (R)				
				R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>					
I	26	45	67	Orangé	Vert \rightarrow jaune	Jaune	Bleu \rightarrow mauve \uparrow	Blanc \rightarrow mauve \rightarrow jaune
	50	60	78	Jaune \rightarrow brun \uparrow	—	Jaune	mauve \uparrow	—
II	51	57	71	Jaune pâle \downarrow	Rose	Jaune pâle	Jaune sale	Blanc \rightarrow jaune
III	11	24	62	Jaune pâle	Rose	Jaune pâle	Jaune pâle	Mauve \rightarrow jaune halo mauve
IV	15	29	63	Beige	Vert \rightarrow jaune	Bleu argenté \uparrow	Beige	Brun
VI	0	0	0	—	—	—	—	—
	26	45	67	Orangé	Vert \rightarrow jaune	Jaune pâle	Bleu violacé \rightarrow mauve \uparrow	Blanc
VII	26	45	67	Orangé	Vert \rightarrow jaune	Jaune	Bleu \rightarrow mauve \uparrow	Blanc \rightarrow mauve
	32		72	Jaune \rightarrow gris	Vert \rightarrow jaune	Jaune*	—	Blanc \rightarrow mauve
	50	60	78	Jaune	Rose	Jaune	Mauve \uparrow	Blanc \rightarrow mauve
VIII	12	29	67	Bleu \rightarrow blanc	Vert \rightarrow jaune	Jaune	Blanc \rightarrow gris vert	Jaune \rightarrow mauve
Fond des plaques				Blanc	Rose pâle	Brique	Gris-vert	Jaune

* N'apparaît pas dans le solvant c.

Quoiqu'il s'agisse d'un produit de qualité "pour analyses", le mercapto-2 benzothiazole (I) utilisé contient du disulfure de benzothiazyle (VII), mais en proportion trop faible pour que certains des réactifs le mettent en évidence au sein du produit I (R_2 par exemple). Inversement, le disulfure de benzothiazyle est souillé de mercapto-2 benzothiazole, qui lui, est décelé par la plupart des réactifs. La nature d'une troisième tache de R_F intermédiaire n'a pas été élucidée, mais la présence d'impuretés est ici compréhensible, le produit n'étant destiné qu'à l'industrie. Enfin, tous les composés de référence montrent avec la dithizone (R_9) une légère tache rose, mais uniquement avec des dépôts de 20 μ l ou 100 μ l sur plaques à zone de concentration: elle traduit la présence de faibles quantités de zinc.

R_6	R_7	R_8	R_9	R_{10}	R_{11}	UV	
						254 nm	365 nm
Mauve	Rose violacé foncé	Jaune → blanc	Turquoise → violet jaune	Crème	Vert → jaune ↑	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-
Blanc	Rose violacé foncé	Blanc	Turquoise → violet		Blanc	+	-
Blanc	Rose violacé foncé	Blanc	Turquoise → jaune		Blanc	+	-
Blanc	Rose violacé foncé	Blanc	Turquoise → violet		Blanc	+	-
-	-	-	Rose Turquoise	Rose Crème ↓	- Jaune	+	+
Mauve pâle	Rose violacé foncé	Blanc	halo jauné → brun			+	-
Violet	Rose violacé	-	Turquoise		Vert → jaune ↑	+	-
Violet*	Rose violacé*	-	Blanc		-	-	-
Jaune pâle	Rose violacé	-	Jaune → blanc		-	-	-
Blanc	Rose violacé foncé	Blanc	Turquoise → jaune		Brun ↑	-	-
Blanc	Rose Violacé pâle	Blanc	Vert → gris vio- lacé	Blanc	Blanc		

Les composés II, IV, VI et VII n'ont été mis en évidence dans les essais dans aucune des conditions opératoires retenues, sur aucune marque de seringues et quel qu'ait été le mode de stérilisation. Les dérivés I, III et VIII ont par contre été retrouvés dans plusieurs cas (Tableau III). Ainsi, pour toutes les marques de seringues stérilisées par l'oxyde d'éthylène, le composé III a été caractérisé dans les extraits préparés à partir d'une seule unité (essai A), mais uniquement avec un dépôt de 20 μ l sur plaque à zone de concentration. Dans les extraits obtenus à partir de 100 têtes de piston (essai B), le composé III a été décelé même avec un dépôt de 2 μ l sur plaque ordinaire. Sur couche à zone de concentration, un dépôt de 20 μ l a en outre mis en évidence le composé I, mais la tache, petite, n'était révélée que par le réactif R_1 et disparaissait

TABLEAU III
ESSAIS

Stérilisation*		Essai		Plaque**		$R_F \times 100$ dans les solvants			Couleurs obtenues avec les différents réactifs (R)		
<i>o.e.</i>	<i>r.i.</i>	A	B	<i>ord.</i>	<i>z.c.</i>	(a)	(b)	(c)	R ₁	R ₂	R ₃
+		20 μ l			+	11	24	62	Jaune	Rose	—
+			2 μ l	+		11	24	62	Jaune	Rose	Jaune pâle
+			20 μ l	+		11	24	62	Jaune	Rose	Jaune pâle
						26	45	67	Orangé	—	—
+			100 μ l	+		12	29	67	—	—	—
	+		20 μ l	+		26	45	67	Orangé	Vert → jaune	—
	+		100 μ l	+		12	29	67	—	—	—

* Stérilisation: *o.e.* = oxyde d'éthylène; *r.i.* = rayonnements ionisants.

** Plaque: *ord.* = ordinaire; *z.c.* = avec zone de concentration.

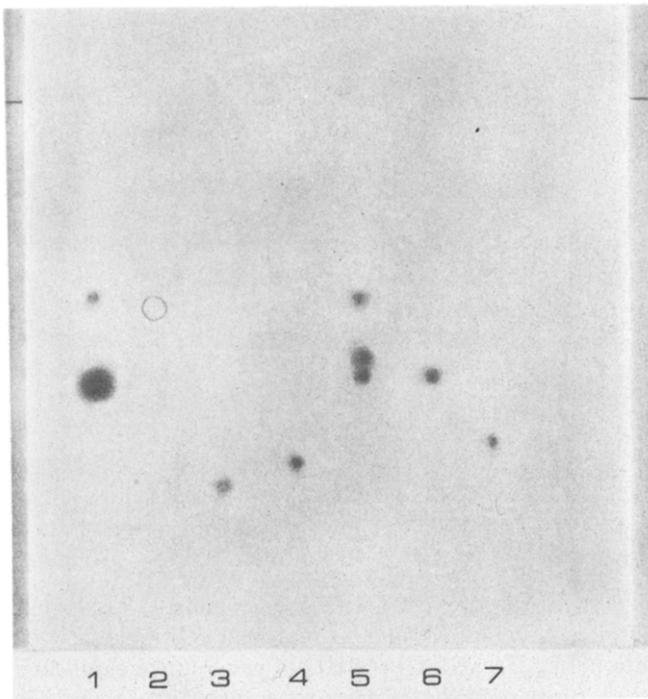


Fig. 1. Chromatographie des produits de référence. Plaque ordinaire; dépôts: 2 μ l de solutions éthanoliques à 0,5% (m/v) ou saturées (*cf.* texte); solvant (b); révélation par les réactifs R₁ et R₁₁ employés successivement. 1 = Mercapto-2 benzothiazole (I); 2 = méthylthio-2 benzothiazole (II) (la tache a été entourée avant sa disparition, due au chauffage nécessaire à la révélation du β -sitostérol); 3 = (hydroxy-2 éthylthio)-2 benzothiazole (III); 4 = hydroxy-2 benzothiazole (IV); 5 = disulfure de benzothiazyle (VII); 6 = mercapto-2 benzothiazolate de zinc (VI); 7 = β -sitostérol (VIII).

R_7	R_9	R_{11}	UV		Conclusion
			254 nm	365 nm	
Rose violacé	Turquoise	—	+	—	Composé III
Rose violacé	Turquoise	—	+	—	Composé III
Rose violacé	Turquoise	Blanc	+	—	Composé III
—	—	—	+	+	Composé I
—	—	Brun ↑	—	—	β -Sitostérol
Rose violacé	—	Vert →	—	—	
—	—	jaune ↑	+	+	Composé I
—	—	Brun ↑	—	—	β -Sitostérol



Fig. 2. Chromatographie des solutions essais et estimation de la migration du composé III. Plaque à zone de concentration; dépôts: 100 μ l (sauf composé I: 2 μ l); solvant (b); révélation par le réactif R_1 . 1, 2, 3 et 4 = composé III, en solution à 2,5, 5, 7,5 et 10 mg pour 100 ml, respectivement; 5 et 6 = seringues stérilisées par l'oxyde d'éthylène, essais B et A, respectivement; 7 = seringues stérilisées par irradiation, essai B; 8 = composé I en solution à 0,5% (m/v).

rapidement. Un dépôt de 100 μl a été nécessaire pour observer le composé VIII. Dans le cas des seringues stérilisées par irradiation, l'emploi d'une seule unité n'a mis en évidence aucune migration, malgré le recours à des plaques à zone de concentration et l'augmentation des volumes déposés. Pour les extraits préparés avec 100 têtes en revanche, un dépôt de 20 μl sur ce même type de plaques a montré la présence du composé I: la tache obtenue avec le réactif R_1 était ici plus grande et pouvait être révélée par d'autres réactifs sans intérêt dans le cas précédent. A nouveau, un dépôt de 100 μl a seul permis de caractériser le composé VIII.

Pour un essai donné (A ou B) et des conditions chromatographiques fixées, les différents procédés de révélation n'ont pas tous mis en évidence les mêmes produits: ce sont le réactif R_1 et l'observation à 254 nm qui ont permis le plus grand nombre de caractérisations. Les limites de détection avec le réactif R_1 ont été trouvées égales à 0,1 μg pour le composé I, 5 μg pour les composés III et IV, et 10 μg pour le composé II. En rapprochant ces valeurs des résultats du Tableau III, on voit que les seringues stérilisées par l'oxyde d'éthylène cèdent essentiellement le composé III et à un bien moindre degré seulement le composé I, puisque celui-ci n'a pu être caractérisé qu'avec un dépôt plus important alors qu'il est plus facilement décelable. Cette conclusion, logique puisqu'une grande part du composé I s'est transformée en composé III, est d'autre part en accord avec les résultats obtenus en spectrométrie UV³, les spectres observés étant superposables à celui du composé III (maximum à 280 nm) et très différents de celui du composé I (maximum à 320 nm). Au contraire, les seringues stérilisées par irradiation ne peuvent céder que le seul composé I puisqu'il n'a pas été transformé et celui-ci, présent en plus grande quantité que dans le cas précédent, migre de façon plus importante. Il est certain que les solubilités respectives des deux produits dans l'eau interviennent aussi, en plus de leur taux dans l'élastomère, dans le niveau de concentration atteint.

Ces conclusions sont illustrées par la Fig. 2, dans laquelle tous les dépôts ont été de 100 μl pour une meilleure visibilité, sauf celui du composé I, plus facile à déceler. Dans le cas de seringues stérilisées par l'oxyde d'éthylène, la tache du composé III dans l'essai A a une intensité comprise entre celles des solutions à 2,5 et 5 mg pour 100 ml, et très proche de cette dernière. En tenant compte de la concentration due à l'extraction chloroformique, cela signifie qu'une seringue de 5 ml cède à son contenu, en 24 h et à la température ambiante, près de 75 μg du composé III et que la concentration atteinte est donc voisine de 1,5 mg pour 100 ml. Ce résultat est très proche de celui déterminé antérieurement par spectrophotométrie, qui était de 1,34 mg pour 100 ml²⁸. La migration du composé I à partir des seringues stérilisées par l'oxyde d'éthylène ou par irradiation n'a pas été estimée, car elle n'est visible que dans l'essai B, dont les modalités de préparation sont éloignées des conditions habituelles d'emploi des seringues.

Les résultats présentés permettent de proposer pour le contrôle rapide du rechargement des seringues une méthode simple. L'essai sera préparé selon les modalités A dans le cas (le plus fréquent) de la stérilisation par l'oxyde d'éthylène, ou selon les modalités B en cas d'irradiation, et 20 μl de la solution essai seront déposés sur une plaque à zone de concentration. On emploiera les solvants (a) et (c), ou (b) et (c), et on localisera les taches par le réactif R_1 ou par observation à 254 nm si la plaque est fluorescente. Le composé III devant être synthétisé, il est à la rigueur possible pour des contrôles de routine de ne déposer que le composé I, et d'attribuer au composé

III la tache éventuellement observée qui aurait un R_F voisin de celui indiqué pour ce produit dans les mêmes conditions opératoires (Tableau II): la comparaison des rapports des R_F du composé I et de la tache considérée avec ceux observés ici permettrait tout de même d'affirmer la présence de l'(hydroxy-2 éthylthio)-2 benzothiazole. Si l'on souhaite vérifier l'origine de l'élastomère, on déposera sur une plaque à zone de concentration 100 μ l d'essai B et de solution de β -sitostérol et on utilisera le réactif R_{11} . Cela ne nécessite pas de chromatographie supplémentaire, car il est possible de vaporiser le réactif R_{11} sur la plaque déjà révélée par le réactif R_1 . La méthode peut être éventuellement utilisée pour déterminer le mode de stérilisation s'il est ignoré. Dans le cas d'un dépôt de 20 μ l de l'essai B sur plaque à zone de concentration, la mise en évidence du composé I permet d'affirmer l'emploi d'un système de vulcanisation mercaptobenzothiazolique et la migration du mercapto-2 benzothiazole au moins. Selon qu'on observe ou non une seconde tache correspondant au composé III, les seringues ont été stérilisées par l'oxyde d'éthylène ou par irradiation.

Le protocole proposé peut paraître critiquable en ce qui concerne le contact prolongé de l'eau avec les têtes de piston et la concentration que réalise l'extraction par un faible volume de chloroforme: on peut en effet penser que ces modalités ne reflètent pas les conditions habituelles d'utilisation des seringues. Mais le contrôle d'un objet ou d'un matériau se fait toujours dans des conditions plus draconiennes que celles de son emploi, de façon à préserver une marge de sécurité, et d'ailleurs dans la réalité, l'emploi de telles seringues est loin d'être extemporané. En milieu hospitalier, les injections sont trop souvent préparées à l'avance²⁹. Les diabétiques qui se soignent eux-mêmes à domicile placent fréquemment dès le matin au réfrigérateur toutes les seringues pleines d'insuline nécessaires pour la journée: une récente étude qui a montré l'absence de contamination bactérienne des seringues réutilisées pendant 7 jours n'a pu que les conforter dans cette habitude³⁰. Enfin dans les pousse-seringues et pompes portables actuellement de plus en plus utilisés, les temps de contact sont de plusieurs heures ou de plusieurs jours. Or, nous avons montré que la migration de l'(hydroxy-2 éthylthio)-2 benzothiazole commence dès les premières secondes et ne fait que croître ensuite²⁸.

Comme déjà dit, aucune migration dans les médicaments n'est admise actuellement. Cette prescription cependant pourra éventuellement apparaître trop stricte et il n'est pas absolument exclu que l'on en vienne à tolérer une migration "acceptable" de produits bien identifiés et reconnus atoxiques. En ajustant les conditions opératoires (nombre de têtes de piston, temps et température de contact, volumes d'eau et de solvant extracteur, volume déposé, nature des plaques) de façon à obtenir des résultats négatifs pour les relargages inférieurs à ceux qui seraient admis, la méthode constituerait un essai limite analogue à ceux fréquemment prescrits par les Pharmacopées. Avec le réactif R_1 , elle permettrait d'évaluer l'importance de la migration des composés benzothiazoliques. Avec d'autres réactifs ou des procédés de révélation non spécifiques (observation sous UV, vapeurs d'iode), elle pourrait être étendue à d'autres constituants des élastomères susceptibles de migrer.

Si la migration de traces de β -sitostérol reste probablement sans incidence toxicologique, celle des dérivés benzothiazoliques est plus préoccupante. En effet, bien que le mercapto-2 benzothiazole (I) soit autorisé, parfois d'ailleurs avec des restrictions, par la Food and Drug Administration et certains autres organismes dans les élastomères venant au contact des aliments³¹, il faut se souvenir que les effets

d'un produit peuvent être très différents suivant la voie d'administration. Le mercapto-2 benzothiazole a ainsi été rendu responsable de réactions dermatologiques³²⁻³⁴ et on a pu lui attribuer avec assez de vraisemblance des effets embryotoxiques et mutagènes chez l'animal^{35,36}. Des effets du même ordre et des modifications de l'activité des transférases et des oxydases ont aussi été rapportés à propos du dimère qu'est le disulfure de benzothiazyle (VII) en cas d'inhalation³⁷. L'(hydroxy-2 éthylthio)-2 benzothiazole (III) n'est pas utilisé dans l'industrie et la littérature toxicologique à son sujet est donc à peu près inexistante. Cependant, une étude chez la souris³⁸ a conclu que sa toxicité lors d'une seule administration était plus importante que celle du mercapto-2 benzothiazole, celui-ci étant au contraire plus néfaste en cas d'administrations répétées. Les effets les plus nets dans le cas d'une dose importante des deux composés étaient une stimulation du système nerveux central, une vasodilatation périphérique et une sialorrhée. En cas d'intoxication subaiguë, le mercapto-2 benzothiazole avait des effets hépatiques marqués, qu'on pouvait également observer à un moindre degré avec l'(hydroxy-2 éthylthio)-2 benzothiazole. Dans les études de toxicité aiguë, les deux composés se montraient plus toxiques par voie parentérale que par voie orale. Enfin, peut-être faut-il attribuer à l'(hydroxy-2 éthylthio)-2 benzothiazole, étant donné le nombre des marques dans lesquelles nous l'avons trouvé, les inhibitions de cultures de liquide amniotique constatées lorsque les amniocentèses étaient faites au moyen de seringues à usage unique^{39,40}.

CONCLUSION

La mise au point de la méthode proposée nous a amenés à étudier le comportement chromatographique de différents composés benzothiazoliques dans diverses conditions. En dépit de sa simplicité, le protocole présenté permet en une seule opération de contrôler la qualité des seringues du point de vue de la migration de leurs composants, de connaître leur mode de stérilisation et de préciser l'origine de leur élastomère. Il est utilisable aussi bien par le pharmacien hospitalier pour le choix d'une marque que par le fabricant de seringues pour le contrôle des têtes de piston qui lui sont livrées par l'industrie du caoutchouc. Il pourrait être utilisé comme méthode d'essai limite dans l'hypothèse où un taux acceptable de migration serait toléré. D'ores et déjà, il a permis de montrer la présence de mercapto-2 benzothiazole dans des médicaments présentés en seringues préremplies. Les données toxicologiques brièvement rapportées permettent de considérer que les résultats obtenus ne sont pas sans intérêt pour la sauvegarde de la santé publique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les firmes citées, qui ont mis à leur disposition les produits de référence VI et VII utilisés.

RÉSUMÉ

Le mercapto-2 benzothiazole, le méthylthio-2 benzothiazole, l'(hydroxy-2 éthylthio)-2 benzothiazole, l'hydroxy-2 benzothiazole, le mercapto-2 benzothiazolate de zinc, le disulfure de benzothiazyle et le β -sitostérol ont été étudiés en CCM avec

trois solvants de développement et onze réactifs de révélation. Une méthode simple est proposée pour la mise en évidence de la migration du mercapto-2 benzothiazole et de l'(hydroxy-2 éthylthio)-2 benzothiazole à partir des têtes de piston en élastomère des seringues à usage unique: contact de l'élastomère avec de l'eau bidistillée, extraction du liquide par le chloroforme, chromatographie sur gel de silice avec les solvants précédemment étudiés et révélation par la N-chloro dichloro-2,6 *p*-benzoquinone monoimine. La méthode permet aussi de distinguer les seringues stérilisées par l'oxyde d'éthylène, qui seules cèdent de l'(hydroxy-2 éthylthio)-2 benzothiazole, et celles stérilisées par irradiation. Elle est également utilisable pour préciser si les têtes de piston sont ou non en caoutchouc naturel, grâce aux traces de β -sitostérol cédées. Les effets toxiques des composés relargués sont brièvement rapportés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Ch. B. Airaudo, A. Gayte-Sorbier et M. Audibert, *Labo-Pharma, Probl. Tech.*, 27 (1979) 411.
- 2 *Pharmacopée française*, Maisonneuve S.A., Moulins-lès-Metz, 9ème éd., 1976, p. 212.1a.
- 3 Ch. B. Airaudo, G. Salmona, A. Assaf, A. Gayte-Sorbier et J. E. Vincent, *Anal. Chim. Acta*, 166 (1984) 221.
- 4 Ch. B. Airaudo et A. Gayte-Sorbier, *Labo. Pharma, Probl. Tech.*, 30 (1982) 719.
- 5 F. Scholl, *Atlas of Polymer and Plastics Analysis*, Vol. 3, *Additives and Processing Aids, Spectra and Methods of Identification*, Verlag Chemie, Weinheim, 2ème éd., 1981, p. 125.
- 6 G. P. McSweeney, *J. Inst. Rubber Ind.*, (1970) 243.
- 7 W. A. Sexton, *J. Chem. Soc.*, (1939) 470.
- 8 M. B. Millingen, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 746.
- 9 Yu. G. Chikishev, L. V. Slobodskikh et M. P. Kiryushkina, *Int. Polym. Sci. Technol.*, 3 (1976) T 45.
- 10 R. Amos, *Talanta*, 20 (1973) 1231.
- 11 J. G. Kreiner et W. C. Warner, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 315.
- 12 Ch. B. Airaudo, A. Gayte-Sorbier, P. Laurent et R. Creusevau, *J. Chromatogr.*, 314 (1984) 349.
- 13 J. W. Cook, *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, 37 (1954) 984.
- 14 J. W. Cook, *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, 37 (1954) 987.
- 15 A. Popov et V. Gădeva, *J. Chromatogr.*, 16 (1964) 256.
- 16 R. Munier, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 19 (1952) 852.
- 17 E. Walker, *Biochem. J.*, 19 (1925) 1082.
- 18 G. Toennies et J. J. Kolb, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 823.
- 19 I. M. Hais et K. Macek, *Handbuch der Papierchromatographie*, VEB Gustav Fischer, Jena, 1963, pp. 934, 935, 937.
- 20 M. Trop, M. Sprecher et A. Pinsky, *J. Chromatogr.*, 32 (1968) 426.
- 21 R. F. Witter, G. V. Marinetti, A. Morrison et L. Hecklin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 68 (1957) 15.
- 22 H. P. Kaufmann et J. Budwig, *Fette Seifen*, 53 (1951) 390.
- 23 E. Stahl, *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*, Springer-Verlag, Berlin, 2ème éd., 1969, p. 878.
- 24 D. von Denffer, M. Behrens et A. Fischer, *Naturwissenschaften*, 39 (1952) 258.
- 25 Révélateurs pour la Chromatographie en Couches Minces et sur Papier, E. Merck, Darmstadt (sans date), p. 80.
- 26 *Pharmacopée française*, Ordre Nat. Pharmaciens, Paris, 8ème éd., 1965, p. 1695.
- 27 W. H. Evans et G. S. Sayers, *Analyst (London)*, 97 (1972) 453.
- 28 C. Mole, J. Chabannes, Ch. B. Airaudo et A. Gayte-Sorbier, *Comptes-Rendus 16ème Congrès Intern. Soc. Pharm. Méditerranée latine, Marseille, 1984*, Société de Pharmacie de la Méditerranée Latine, Marseille, 1986, p. 150.
- 29 Ch. B. Airaudo et A. Gayte-Sorbier, *Labo-Pharma, Probl. Tech.*, 29 (1981) 673 et 779.
- 30 B. J. Collins, B. K. Spence, S. G. Richardson, J. Hunter et J. K. Nelson, *Lancet*, i (1983) 559.
- 31 *Accélérateurs et Peroxydes Organiques pour la Vulcanisation des Caoutchoucs*, Laboratoire de Recherches et de Contrôle du Caoutchouc, Montrouge (sans date).
- 32 P. Bonnevie et P. V. Marcussen, *Acta Derm. Venereol.*, 25 (1945) 163.
- 33 E. Cronin, *Br. J. Dermatol.*, 78 (1966) 617.

- 34 H. T. H. Wilson, *Br. Med. J.*, 81 (1969) 175.
- 35 S. E. Aleksandrov, *Tezisy Dokl., Nauchn. Sess. Khim. Tekhnol. Org. Soedin. Sery Sernistykh Neftei, 13th, 1974*, p.98; *C.A.*, 85 (1976) 117605x.
- 36 Yu. A. Revazova, *Toksikol. Nov. Khim. Veshchestv. Vnedryaemykh Rezin. Shinnuyu Promst. 1968 p. 196; C.A.*, 71 (1979) 47071e.
- 37 *Chem. Regul. Reporter*, 7 (1983) 736.
- 38 W. L. Guess et R. K. O'Leary, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 14 (1969) 221.
- 39 K. L. Garver, S. L. Marchese et E. G. Boas, *N. Engl. J. Med.*, 295 (1976) 285.
- 40 S. G. Purvis-Smith, M. A. Jones et W. Wertelecki, *Lancet*, i (1978) 993.