

CHROM. 13,376

MÉTHODE DE DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE DE L'ÉTHYLÈNETHIOURÉE DANS LES FORMULATIONS À BASE D'ÉTHYLÈNE-BIS-DITHIOCARBAMATES

J-C. VAN DAMME*, M. GALOUX et J. VERDIER

Station de Phytopharmacie de l'État, 11 Rue du Bordia, B-5800 Gembloux (Belgique)

(Reçu le 11 septembre 1980)

SUMMARY

Reversed-phase high-performance liquid chromatography determination of ethylenethiourea in ethylenebisdithiocarbamate formulations

The ethylenethiourea (ETU) contents of ethylenebisdithiocarbamate formulations have been determined by reversed-phase chromatography. The method is simple, rapid (25 min), and allows to control easily the analysis time in order to minimize the ETU formation from the intermediary degradation products in solutions. The analyzed products contain less than 0.2% ETU except for the more than three years old formulations. Samples stored under normal conditions have shown an ETU increase of 30 to 80% after two years.

INTRODUCTION

Les fongicides du groupe des éthylène-bis-dithiocarbamates (EBDC) sont probablement les fongicides les plus utilisés à l'échelle mondiale. Les recherches sur la toxicité des EBDC ont montré que cette toxicité était principalement due à l'éthylène-thiourée ou imidazolidine-2-thione (ETU). Ce composé est connu depuis longtemps comme agent cancérigène, tératogène et comme responsable de modifications de la fonction thyroïdienne. Les résidus d'ETU sur les végétaux peuvent provenir de la dégradation ou de la métabolisation des EBDC après les traitements et de l'ETU initialement présent dans les formulations commerciales. Afin de pouvoir évaluer les teneurs en ETU dans les formulations, il est indispensable de disposer d'une méthode de dosage spécifique et précise. De nombreuses méthodes ont été décrites dans la littérature. Elles sont basées sur différentes techniques: couche mince, électrophorèse, polarographie, chromatographie en phase gazeuse etc. Un relevé de ces méthodes a été publié dans le rapport sur l'éthylène-thiourée présenté par les experts de la "Commission on Terminal Pesticide Residues" du IUPAC¹.

En 1962, Johnson et Tyler² ont prouvé, en chromatographiant sur papier des extraits aqueux des divers dérivés dithiocarbamiques, que les fongicides éthylène-bis-dithiocarbamiques contenaient une impureté, identifiée comme étant de l'ETU. En 1972, Bontoyan *et al.*³, en appliquant une méthode de chromatographie en phase

gazeuse (GLC), ont décelé dans les formulations commerciales des teneurs en ETU variant de 0.1 % à plus de 2%. Et plus tard, Bontoyan et Looker⁴ ont prouvé que de l'ETU se formait au cours du stockage des EBDC, en fonction de la teneur en humidité, de la température et de la durée de stockage.

La méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), décrite dans le présent article, a été présentée au Symposium CIPAC en 1978 (bibl. 5) et comparée à une méthode de chromatographie en phase gazeuse après dérivatisation de l'ETU en S-benzyl ETU. La méthode GLC donnait des résultats systématiquement supérieurs. Cette différence avait été attribuée aux produits intermédiaires de décomposition qui peuvent former de l'ETU^{1,5-8}.

La méthode par chromatographie liquide a l'avantage d'opérer à température ambiante, d'être rapide et reproductible si le temps entre l'extraction et l'injection est strictement respecté car, dans ces conditions, la formation d'ETU en cours d'analyse est fortement limitée.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Matériel et réactifs

(1) Filtre Millipore de 0.45 μm de porosité (réf. HAWP 02500) ou équivalent; (2) tube à centrifuger de 100 ml, fond rond et bouchon à visser Sovirel no. 22 ou équivalent; (3) centrifugeuse (2900 g); (4) évaporateur rotatif sous vide; (5) bain thermostatique de précision; (6) ETU pur; (7) méthanol p.a.; (8) tétrahydrofurane Uvasol (Merck, Darmstadt, R.F.A., 8110 ou équivalent); (9) solution de stock: préparer une solution contenant 20 mg d'ETU dans 200 ml d'eau distillée; (10) solutions étalons: diluer la solution de stock de manière à obtenir des solutions étalons contenant 4, 10, 15, 20, 30 et 40 μg d'ETU par ml.

Appareillage et conditions de la chromatographie liquide

(1) Chromatographe liquide Tracor 990 équipé d'un détecteur à longueur d'onde variable Tracor 970, d'une vanne Rheodyne 7120 munie d'une boucle d'injection de 20 μl , d'un enregistreur et d'un intégrateur Infotronics CRS 304; (2) colonne de 200 \times 4.6 mm contenant du Nucléosil 50 C₁₈ de 5 μm ou colonne de 125 \times 4 mm contenant du LiChrosorb RP-18 de 5 μm ; (3) éluant: eau distillée contenant 0.05 % de tétrahydrofurane (agiter magnétiquement et chauffer à environ 40°C pour dégazer); (4) débit: 1.0 ml/min, pression: 1500 p.s.i. pour la colonne de Nucléosil et 1000 p.s.i. pour la colonne de LiChrosorb; (5) température ambiante; (6) longueur d'onde: 233 nm.

Mode opératoire

Dans le tube à centrifuger, peser à 0.1 mg près une prise d'essai (Pg) contenant environ 0.8 g d'EBDC. Ajouter, à la pipette, 50 ml de méthanol. Boucher hermétiquement et agiter pendant exactement 5 min. Centrifuger à 2900 g pendant 5 min. Prélever immédiatement 10 ml de surnageant dans un erlenmeyer de 50 ml à rodage normalisé. Évaporer à sec, sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif ($t = 35^\circ\text{C}$). Reprendre le résidu sec par addition, à la pipette, de 20 ml d'eau. Agiter 2 à 3 min pour dissoudre l'ETU. Filtrer sur filtre Millipore. Suivant la teneur en ETU, la solution filtrée peut être diluée (facteur de dilution = d). Injecter la solution finale exacte-

ment 15 min après le prélèvement dans les conditions décrites ci-dessous. Ne traiter qu'une prise d'essai à la fois. La température d'évaporation et les temps entre la mise en solution, le prélèvement et l'injection doivent être strictement respectés.

Détermination en HPLC

Injecter 20 μl d'une ou deux solutions étalons, injecter ensuite la solution à analyser, laisser le chromatogramme se développer pendant 15 min, puis injecter une ou plusieurs solutions étalons de concentrations voisines. Calculer la quantité d'ETU en $\mu\text{g/ml}$ (Q) dans la solution analysée en rapportant la hauteur du pic à celle du pic de la solution étalon de concentration la plus voisine. Teneur en ETU ($\% \text{ m/m}$) = $Q \cdot d/P \cdot 100$ où P est poids de la prise d'essai en g et d le facteur de dilution éventuelle après filtration.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'extraction de l'ETU soit par l'eau, soit par le méthanol donne des extraits contenant parfois un grand nombre de substances pouvant interférer avec l'ETU dans les conditions de la méthode. De plus, l'extraction par l'eau ou par un mélange eau-méthanol donne, même après centrifugation, un surnageant relativement trouble.

Les essais ont montré que la meilleure manière de procéder était d'extraire l'ETU par agitation de la prise d'essai dans du méthanol, de centrifuger, de prélever une partie aliquote de l'extrait méthanolique, d'évaporer le méthanol et de reprendre le résidu par de l'eau. La récupération dans l'eau possède l'avantage d'éliminer un certain nombre de substances extraites par le méthanol mais insolubles dans l'eau et d'éviter ainsi l'accumulation de ces substances sur la colonne. La filtration de l'extrait aqueux sur papier filtre ne permet pas d'obtenir des solutions limpides; par contre, après une filtration sur filtre Millipore, le filtrat est parfaitement clair. Au cours d'essais de reproductibilité, les résultats obtenus indiquaient une augmentation de la teneur en ETU en fonction du temps lors d'injections successives d'une même prise d'essai.

Le Tableau I montre qu'il est nécessaire de contrôler le temps d'analyse, de maintenir la prise d'essai aux environs de 0.8 g d'EBDC et de ne procéder qu'à une seule injection de l'échantillon car la teneur en ETU passe de: 0.096 à 0.123, soit une augmentation d'environ 30%, lorsque l'extrait méthanolique est conservé pendant deux heures avant de poursuivre l'analyse, et de 0.096 à 0.115, soit une augmentation de 20%, lorsque la solution aqueuse, après filtration, est conservée pendant trois heures avant d'être injectée.

TABLEAU I

TENEUR EN ETU EN %, MESURÉE EN FONCTION DU TEMPS DANS L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE ET EN SOLUTION AQUEUSE POUR L'ÉCHANTILLON NO. 1

Prélèvement de l'extrait méthanolique	Temps entre la mise en solution dans l'eau et l'injection (min)		
	20	100	180
Immédiatement	0.096	0.105	0.115
Après 1 h	0.114	0.125	0.135
Après 2 h	0.123	0.134	0.145

Des essais préliminaires sur des colonnes de gel de silice normal ou modifié chimiquement par des groupements $-\text{CN}$ ou $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ n'ont pas permis de séparer parfaitement l'ETU de nombreuses substances se trouvant dans l'extrait méthanolique sans utiliser un gradient d'éluant. Cependant, Farrington et Hopkins⁸ ont depuis publié une méthode utilisant une colonne de Sphérisorb CN de $5\ \mu\text{m}$ avec comme éluant 35% (v/v) d'éthanol absolu dans l'hexane. L'ETU étant polaire et soluble dans l'eau n'est pas ou peu retenu sur une colonne de "reversed-phase" si on utilise pour l'éluant un mélange tel que eau-méthanol. C'est pourquoi, l'éluant a été effectué avec de l'eau contenant 0.05% de tétrahydrofurane. Dans ces conditions, le temps de rétention de l'ETU est de 4 min 35 sec pour la colonne de Nucléosil C_{18} , mais n'est

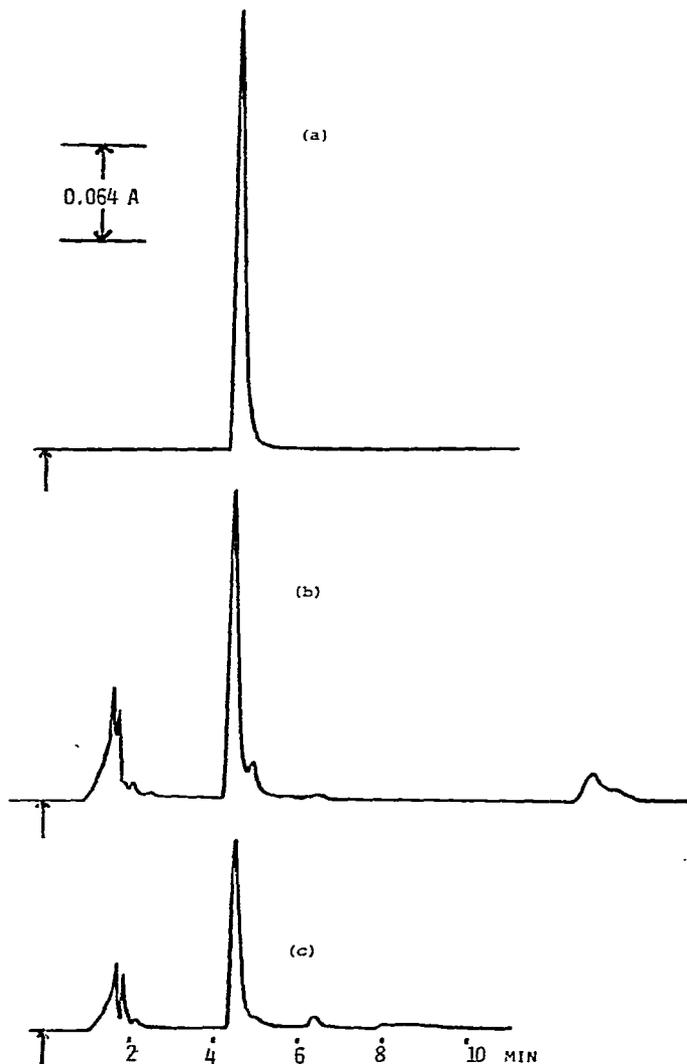


Fig. 1. (a) Chromatogramme d'une solution étalon contenant $20\ \mu\text{g}$ ETU par ml. (b) Chromatogramme de l'échantillon no. 5 (voir Tableau IV). (c) Chromatogramme de l'échantillon no. 9 (voir Tableau IV).

séparé que d'environ 30 sec d'une substance présente en faible quantité dans la plupart des formulations (Fig. 1). Pour cette raison, il est préférable de mesurer la hauteur des pics et non leur surface. Certaines des analyses de 1980 ont été effectuées sur une colonne LiChrosorb RP-18. Le temps de rétention est alors de 2 min 40 sec; le pic et la séparation obtenus sont également satisfaisants.

La reproductibilité obtenue pour neuf injections de solutions étalons de différentes concentrations est illustrée au Tableau II. Le coefficient de variation est de 0.17% et le rapport hauteur/concentration indique une bonne linéarité dans la gamme des concentrations utilisées.

TABLEAU II

REPRODUCTIBILITÉ ET LINÉARITÉ OBTENUES POUR NEUF INJECTIONS DE SOLUTIONS ÉTALONS

<i>Concentration en ETU (µg/ml)</i>	<i>Hauteur/Concentration*</i>
10	111.6
10	112.0
15	111.6
15	111.7
20	112.2
40	111.8
15	111.9
10	111.9
10	111.8
Moyenne	111.8
Ecart-type	0.19
Coefficient de variation	0.17%

* Unité arbitraire.

Les coefficients de variation de l'ordre de 2%, obtenus pour des prises d'essai croissantes d'une formulation de zirame dopée à 0.1 et 0.5% d'ETU, montrent que l'extraction est complète et la reproductibilité de la méthode est satisfaisante car sept répétitions sur l'échantillon no. 10 ont donné un coefficient de variation de 2.5% (Tableau III).

TABLEAU III

TAUX DE RÉCUPÉRATION ET REPRODUCTIBILITÉ DE LA MÉTHODE

<i>Zirame dopé à 0.1% d'ETU</i>		<i>Zirame dopé à 0.5% d'ETU</i>		<i>Répétitions sur l'échantillon no. 10</i>	
<i>Prise d'essai (g)</i>	<i>ETU (%)</i>	<i>Prise d'essai (g)</i>	<i>ETU (%)</i>	<i>Prise d'essai (g)</i>	<i>ETU (%)</i>
0.4982	0.104	0.3024	0.482	1.0358	0.104
0.6952	0.102	0.5031	0.493	1.0043	0.103
0.9849	0.105	0.7491	0.493	1.0043	0.101
1.5489	0.106	1.0010	0.505	1.0073	0.106
2.1174	0.101	1.5203	0.483	1.0330	0.100
2.6402	0.101	2.1738	0.501	1.0155	0.099
				1.0067	0.100
Moyenne	0.103		0.493		0.102
Coefficient de variation (%)	2.1		1.9		2.5

Les teneurs en ETU des formulations commerciales analysées en 1978 et en 1980 sont présentées au Tableau IV. Ces teneurs sont de l'ordre de 0.1% pour les échantillons de manèbe de fabrication récente (1977-1978); par contre, pour des produits plus anciens tels que l'échantillon no. 7 (1975) et l'échantillon no. 8 (1971), elles sont respectivement de 0.32 et de 0.63% et augmentent de 40 à 60% au cours de deux années supplémentaires de stockage dans des conditions normales. Les deux échantillons de mancozèbe ont des teneurs inférieures à 0.1% et, après deux années de stockage, ces teneurs sont de l'ordre de 0.1%. Les échantillons contenant du mancozèbe et du manèbe en mélange avec d'autres fongicides contiennent très peu d'ETU bien que ces échantillons aient été conservés pendant dix-huit mois au laboratoire avant d'être analysés.

TABLEAU IV
TENEURS EN ETU DANS LES FORMULATIONS*

No. Échantillon	Type de produit	Année de fabrication	ETU (%)	
			Résultats de 1978	Résultats de 1980
1	Zirame dopé à 3% ETU	—	2.95	—
2	Manèbe 85%	—	0.07	0.09
3	Manèbe 80%	1978	0.10	0.17
4	Manèbe 80%	1977	0.10	—
5	Manèbe 80%	1977	0.11	—
6	Manèbe 80%	—	0.12	—
7	Manèbe 80%	1975	0.32	0.43
8	Manèbe 80%	1971	0.63	0.89
9	Mancozèbe 83%	—	0.06	0.11
10	Mancozèbe 83%	1978	0.07	0.10
11	Mancozèbe 67% + carbendazime 8%	—	—	0.04
12	Mancozèbe 35.5% + carbenda- zime 3.3% + soufre 40%	—	—	0.01
13	Manèbe 60% + thiophanateméthyl 14%	—	—	0.03
14	Manèbe 25% + thiophanate- méthyl 7% + soufre 50%	—	—	0.02

* Moyenne d'au moins 3 déterminations.

CONCLUSION

La méthode décrite permet de doser avec une reproductibilité satisfaisante l'ETU dans les formulations d'EBDC; la durée d'analyse est courte et les conditions opératoires doivent être strictement contrôlées afin de limiter au maximum la formation d'ETU pendant les manipulations.

REMERCIEMENTS

Les auteurs ont grandement apprécié l'aide technique de Monsieur R. Luxen et de Madame J. Huybreck-Potvin. Ils remercient les firmes phytopharmaceutiques qui ont eu l'obligeance de leur fournir les formulations commerciales.

RÉSUMÉ

Les teneurs en éthylènthiourée (ETU) de formulations à base d'éthylène-bis-dithiocarbamates ont été déterminées par chromatographie liquide au moyen d'une colonne de Nucléosil C₁₈ de 5 µm ou de LiChrosorb RP-18 de 5 µm. La méthode est simple et rapide (25 min) et permet de contrôler aisément le temps d'analyse afin de limiter au maximum la formation d'ETU au cours des manipulations. Les teneurs trouvées sont inférieures à 0.2% sauf pour les formulations de plus de trois ans. Dans des conditions normales, les teneurs en ETU ont augmenté, en deux ans, de 30 à 80% dans les formulations stockées.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 *Pure and Appl. Chem.*, 49 (1977) 675-689.
- 2 E. I. Johnson et J. F. C. Tyler, *Chem. Ind. (London)*, (1962) 305-306.
- 3 W. R. Bontoyan, J. B. Looker, T. E. Kaiser, P. Giang et B. M. Olive, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 923-925.
- 4 W. R. Bontoyan et J. B. Looker, *J. Agr. Food Chem.*, 21 (1973) 338-341.
- 5 J.-C. van Damme et J. Verdier, *Symposium CIPAC, Versailles, 1978*, résultats non-publiés.
- 6 W. R. Benson, R. D. Ross, J.-Y. Chen, R. P. Barron et D. Mastbrook, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 44-46.
- 7 W. D. Marshall, *J. Agr. Food Chem.*, 25 (1977) 357.
- 8 D. S. Farrington et R. G. Hopkins, *Analyst (London)*, 104 (1979) 111-116.