

CHROM. 21 028

Note

Dosage du dihydrosafrole dans le butoxyde de pipéronyle par chromatographie liquide haute performance

J. PASTOR*, A. M. PAULI et E. SCHREIBER-DETURMENY

Laboratoire de Chimie Analytique, UFR de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille (France)

(Reçu le 20 juillet 1988, manuscrit modifié reçu le 4 octobre 1988)

Le butoxyde de pipéronyle (BOP) est utilisé comme synergiste de nombreux insecticides entrant dans la composition de quelques préparations pharmaceutiques ou cosmétiques. Le BOP se prépare à partir du chlorométhyl-dihydrosafrole¹; le dihydrosafrole (DHS) est un produit intermédiaire de la synthèse et aurait des propriétés cancérigènes^{2,3}.

L'administration quotidienne de DHS per os à des rats, pendant plusieurs mois, a provoqué l'apparition de tumeurs de l'oesophage chez 75% des animaux; quelques tumeurs du foie ont également été observées, mais en trop petit nombre pour être significatives². Le même mode d'administration à des souris a induit des cancers du foie et des poumons chez plus de la moitié des animaux traités, les tumeurs du foie ne touchant que les mâles alors que les poumons étaient atteints de la même manière chez les mâles et les femelles³.

Beaucoup de travaux sont relatifs au dosage du safrole par chromatographie gazeuse (CPG) équipée d'un détecteur à ionisation de flamme^{4,5}, ou par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection en ultra violet à 289 nm⁶ ou à 282 nm⁷, ou encore par fluorimétrie avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 295 et 323 nm⁸, ou 290 et 325 nm⁹. Le plus souvent, le safrole est dosé dans les boissons alcooliques ou non^{4-6,9}, dans certains aliments^{5,7} ou dans les parfums⁸.

En revanche, les publications relatives au dosage du DHS sont peu nombreuses et traitent seulement de la CPG. Larry⁴ propose une détermination semiquantitative du DHS dans les boissons non alcooliques, avec détection en ionisation de flamme et étalonnage interne (*m*-tolyl-acétate). Decsy¹⁰ étudie les intermédiaires dans les synthèses du BOP et les sépare par CLHP. Leur dosage est effectué par CPG, et dans le cas du DHS, l'étalon interne utilisé est le Safrole.

Le but de notre travail est de proposer une méthode sensible pour le dosage du DHS dans le BOP. En effet, les teneurs en DHS varient beaucoup selon l'origine des butoxydes.

Il est donc utile pour les industriels de connaître la concentration en DHS dans cette matière première dont la qualité sera d'autant plus appréciée qu'elle contiendra moins de DHS.

Par ailleurs, il serait souhaitable d'établir des normes pour la dose maximale admissible (DMA).

La CLHP avec gradient d'élution et détection par fluorimétrie nous a permis d'atteindre une bonne sensibilité. Cette dernière peut être encore augmentée en procédant à un isolement préalable du DHS par passage de l'échantillon, en solution dans de l'hexane, sur Sep-Pak silice. Le BOP fortement retenu par la silice sera donc séparé du DHS que l'on retrouvera dans l'éluat accompagné de quelques impuretés du BOP. La prise d'essai initiale pourra donc être augmentée sans pour autant introduire dans la colonne du BOP dont l'élution totale demanderait trop de temps. La méthode proposée est une méthode par chromatographie de partage en phase inverse avec utilisation d'un étalon interne le saffrole.

EXPERIMENTATION

Appareillage et conditions opératoires

Les spectres de fluorescence du saffrole et du DHS en solution dans la phase mobile (méthanol à 35% d'eau bidistillée) ont été réalisés sur un spectrofluorimètre Aminco-Bowman, American Instrument Company.

L'isolement du DHS se fait par passage des butoxydes sur Sep-Pak silice (Waters, Réf. 51900). Le solvant d'élution est le mélange hexane-éther éthylique (95:5, v/v).

Le chromatographe est équipé de deux pompes (Beckman 114 M et 110 M), d'un mélangeur et d'une colonne μ Bondapak C₁₈ (Waters, Réf. 27334) de 30 cm \times 3,9 mm I.D. L'injecteur (Beckman 340 organizer) est muni d'une boucle de 20 μ l. La programmation du gradient d'élution est assurée par un microprocesseur (Altex 421 controller).

La phase mobile est obtenue par mélange de deux solvants: le solvant A (méthanol à 35% d'eau bidistillée) et le solvant B (méthanol pur). Dans la phase initiale, seul le solvant A est pompé (élution du Saffrole et du DHS) et dans la phase terminale seul le solvant B est pompé, (élution des impuretés du butoxyde) le débit étant constamment de 1 ml min⁻¹.

Le détecteur est un fluorimètre Shimadzu RF 530, la longueur d'onde d'excitation est réglée à 292 nm et celle d'émission à 325 nm, l'appareil étant utilisé au maximum de sensibilité.

L'enregistreur (Kipp & Zonen) est réglé à 10 mV pleine échelle. La vitesse de déroulement du papier est de 5 mm min⁻¹ lors de la sortie des pics intéressants et passe à 2 mm min⁻¹ lors de la phase d'élution des impuretés.

Réactifs

Nous avons utilisé alcool méthylique RS-ACS pour spectrophotométrie (UV) (Carlo Erba); *n*-hexane RPE (Carlo Erba); éther éthylique RPE (Carlo Erba); saffrole "purum" (Fluka, Buchs, Suisse, Réf. 84130); dihydrosaffrole, préparé par hydrogénation catalytique du saffrole; butoxyde de pipéronyle redistillé sous vide (2 mm de mercure). On ne retient que le produit de coeur.

Préparation de la gamme d'étalonnage

Toutes les solutions sont préparées à 20°C dans de l'hexane, à partir de deux solutions "mères" à 4 g l⁻¹, l'une de saffrole et l'autre de DHS. Elles sont préparées dans des ballons jaugés de 50 ml par pesées exactes de 200 mg de chacune des deux substances. Puis on prépare les solutions "stock" à 20 mg l⁻¹ par dilution au 1/200 des solutions "mères".

Enfin, les solutions "étalons" sont à $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ pour le DHS et à 2 mg l^{-1} pour le safrole. A partir de ces solutions, on prépare les points de gamme renfermant 50, 100, 200 et $300 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ de DHS et dans chaque cas, $200 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ de safrole.

Les solutions de BOP étant de 5 g l^{-1} , la solution "gamme" à $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ de DHS correspond donc à 10 ppm de DHS dans le butoxyde.

Préparation des échantillons de BOP

Des solutions renfermant le BOP seul ou avec l'étalon interne (safrole) sont préparées dans l'hexane. Elles contiennent, par litre, 5 g de BOP additionné ou non de $200 \text{ } \mu\text{g}$ de safrole. On prépare en général 50 ml de solution.

La solution contenant le butoxyde seul permet de contrôler l'absence d'impuretés de temps de rétention voisin de celui du safrole et d'avoir une première approximation de la teneur en DHS. Si celle-ci est trop élevée (hauteur de pic supérieure à celle du dernier point de gamme) des solutions moins concentrées en BOP sont préparées.

Toutes les solutions (DHS, Safrole et BOP) sont conservées au réfrigérateur dans des flacons bouchants émeri.

Mode opératoire

Séparation sur Sep-Pak. Les Sep-Pak sont chargés avec 1 ml des solutions de BOP ou de la gamme d'étalonnage précédemment préparées. L'éluion est faite avec 3 ml du mélange hexane-éther éthylique (95:5, v/v) à la vitesse de 1 ml min^{-1} . L'étude de l'éluat fractionné a montré que le DHS et le safrole se retrouvent dans le 3ème millilitre. La méthode consiste donc à éliminer les deux premiers millilitres et à injecter une fraction ($20 \text{ } \mu\text{l}$) du troisième millilitre. Cette injection est faite immédiatement après éluion. Dans le cas contraire, l'éluat est conservé au réfrigérateur dans des flacons bouchés émeri. Nous nous sommes assurés qu'en aucun cas le BOP n'est élué en même temps que le DHS ou le Safrole. Si l'on désire récupérer le BOP, il convient de procéder ultérieurement à une éluion par le méthanol.

Des essais préliminaires réalisés sur les solutions de la gamme d'étalonnage avec passage sur Sep-Pak ou sans passage nous ont montré que les rapports des hauteurs de pics du DHS à celles du Safrole étaient identiques. Il est toutefois indispensable de traiter les solutions étalons dans des conditions identiques à celles des solutions de BOP.

CLHP. Vingt microlitres du 3ème millilitre provenant de l'éluion des "Sep-Pak" sont injectés en tête de colonne.

Le gradient d'éluion est le suivant: solvant A pur, 18 min; passage du solvant A au solvant B, 5 min; solvant B, 20 min; retour au solvant A, 10 min; solvant A seul, 5 min. Puis nouveau cycle.

Le débit de la phase mobile est dans tous les cas de 1 ml min^{-1} . Dans les conditions opératoires précédemment décrites, le temps de rétention du safrole est de l'ordre de 600 s, celui du DHS de 780 s. Des exemples de chromatogrammes obtenus avec un point de gamme et avec un BOP sont reproduits Figs. 1 et 2.

La teneur en DHS est calculée par rapport à une droite d'étalonnage construite en portant en abscisse la concentration en DHS dans le butoxyde exprimée en ppm, et en ordonnées le rapport de la hauteur du pic de DHS à celle du pic de safrole.

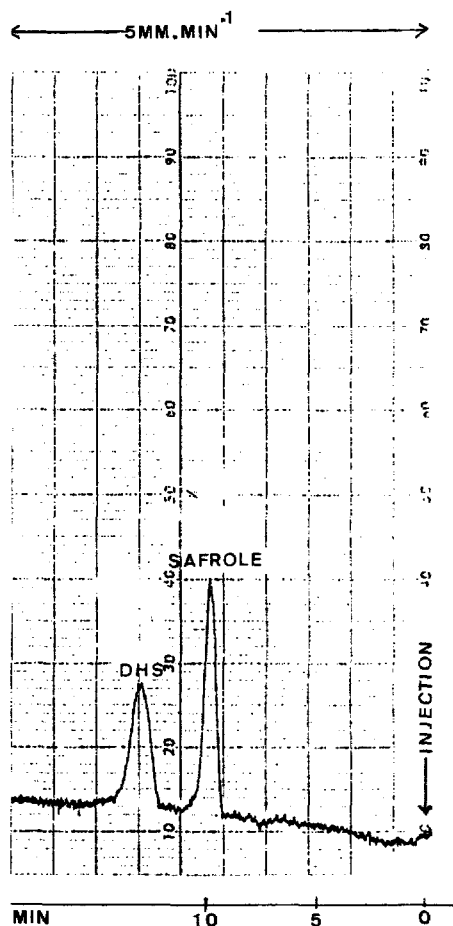


Fig. 1. Chromatogramme provenant de l'injection de 20 μ l de la solution dans l'hexane du point de gamme à 40 ppm (soit 4 ng de DHS et 4 ng de safrol dans 20 μ l d'hexane).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Choix de l'étalon interne

Nous avons choisi comme étalon interne le safrole car son affinité pour la silice du Sep-Pak est voisine de celle du DHS; de plus, ces deux composés en solution dans la phase mobile (méthanol à 35% d'eau bidistillée) présentent des spectres de fluorescence identiques. Nous avons constaté que tous les échantillons de BOP ne renfermaient pas de safrole. Comme nous l'avons dit ci-dessus, un essai préliminaire sur solution de butoxyde permet de s'assurer de l'absence de safrole.

Avantages du gradient d'éluion

Il serait tout à fait possible d'obtenir avec le solvant A, sans gradient d'éluion, une séparation convenable du safrole et du DHS. Mais l'éluion ultérieure des

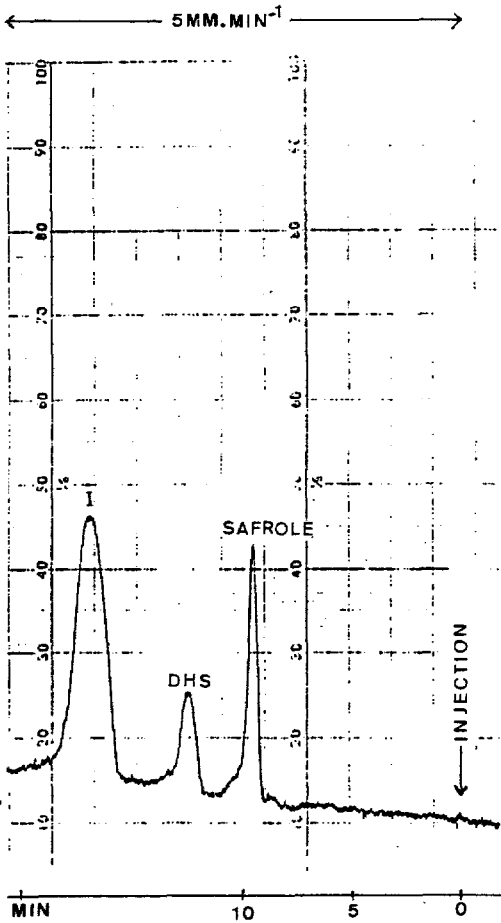


Fig. 2. Chromatogramme provenant de l'injection de 20 μ l du 3^{ème} millilitre d'éluat d'un Sep-Pak chargé avec 0,5 mg d'un BOP additionnée de 200 ng de safrole. Le pic "I" provient d'une impureté du butoxyde.

impuretés du butoxyde serait excessivement longue et rendrait la méthode peu intéressante par la durée d'une analyse. C'est pourquoi nous avons été amenés à utiliser un gradient d'élution conduisant très rapidement à un solvant ne renfermant que du méthanol, solvant permettant d'élucrer les impuretés précitées en une vingtaine de minutes, alors qu'avec le solvant initial, l'élution complète des impuretés demandait environ 2 heures.

Valeur de la méthode

Linéarité. La réponse est linéaire entre 10 et 80 ppm, l'équation de la droite de régression étant:

$$Y = 0,0125 X + 0,0271, \quad r = 0,9972, \quad p < 0,01$$

$$Y = \frac{\text{hauteur du pic DHS}}{\text{hauteur du pic safrole}}$$

$$X = \text{mg de DHS par kg de BOP}$$

Pourcentage de récupération. Nous avons procédé à des expériences de charge en ajoutant dans un BOP renfermant initialement 18 ppm de DHS, des quantités croissantes et connues de ce dernier. Nous donnons dans le Tableau I les résultats obtenus.

A l'exception de la charge à 10 ppm, le pourcentage de récupération est compris entre 97 et 103%. La marge d'erreur correspond sensiblement à la précision de la méthode.

Précision de la méthode. La reproductibilité a été étudiée à deux niveaux: celui de la reproductibilité des hauteurs de pics en injectant 10 fois successivement le même éluat après passage sur Sep-Pak (cet éluat provient d'un BOP contenant 33 ppm de DHS). Nous avons obtenu $m = 33,7$; $\sigma = 0,717$ et $CV\% = 2,13\%$. Puis, afin de juger de la reproductibilité de l'éluat sur Sep-Pak, nous avons fait passer sur onze Sep-Pak différents la même solution de butoxyde en procédant à une seule injection pour chaque éluat. Nous avons obtenu dans ce cas $m = 31,8$; $\sigma = 1,124$ et $CV\% = 3,42\%$.

Limite de détection. Pour déterminer la limite de détection nous avons calculé l'écart type des variations observées sur la ligne de base (après agrandissement photographique de cette dernière) et nous avons retenu comme limite de détection la valeur qui correspond à 3 fois l'écart type. Cette limite de détection est de 3 ppm.

Résultats

La méthode a été appliquée à la détermination de la teneur en DHS dans plusieurs BOP. Les résultats sont présentés dans le Tableau II; les concentrations en DHS, exprimées en ppm et en micromoles kg^{-1} , sont extrêmement variables et s'échelonnent de quelques ppm à plusieurs milliers.

Il est à remarquer que la distillation est un bon moyen de purifier les butoxydes présentant une forte teneur en DHS. Nous avons procédé à une distillation sous vide (2 mm de mercure) du butoxyde "A" qui renfermait 315 ppm de DHS. Le produit distillé ne renferme plus que 9 ppm de DHS.

TABLEAU I

ÉTUDE DU POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION EN AJOUTANT DANS UN BOP RENFERMANT INITIALEMENT 18 ppm DE DHS, DES QUANTITÉS CROISSANTES ET CONNUES DE CE DERNIER

Quantité de DHS ajoutée (ppm)	Quantité de DHS retrouvée (ppm)	Pourcentage de récupération
10	9	90
20	19,4	97
40	40	100
60	61,6	103

TABLEAU II
CONCENTRATIONS EN DHS DÉTERMINÉS DANS LES BOP ANALYSÉS

<i>BOP analysés</i>	<i>DHS en ppm</i>	<i>DHS en $\mu\text{mol kg}^{-1}$</i>
A distillé	9	55
B	16	98
C	27	165
D	55	335
E	128	780
F	305	1860
A	315	1920
G	3662	22 329

CONCLUSION

La technique que nous proposons permet de doser le DHS dans le butoxyde de pipéronyle avec une limite de détection égale à 3 ppm. La méthode est reproductible (CV% de l'ordre de 3,5%). Elle est relativement simple et permet d'effectuer une détermination en une heure environ.

Il est indispensable de procéder à un dosage avec étalon interne car il est impossible de concentrer les éluats par évaporation, car au cours de cette dernière, le DHS se volatilise.

L'utilisation simultanée d'une séparation préalable sur Sep-Pak et d'une détection spectrofluorimétrique permet d'évaluer très rapidement le DHS à des concentrations minimales de l'ordre de 5 ppm.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 O. Repasy, R. Csikos, R. Soos, G. Baktay, Z. Decsy, J. Bodor, J. Bathory, T. Varga et A. Starcsevics, *Hung. Teljes*, H434, 452, (Cl. C 07D317/54), 28 Mar. 1985, Appl. 83/388, 4 Feb. 1983.
- 2 E. C. Hagan, P. M. Jenner, W. I. Jones, O. G. Fitzhugh, E. L. Long, J. G. Brouwer et W. K. Webb, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7 (1965) 18.
- 3 J. R. M. Innes, B. M. Ulland, M. G. Valerio, L. Petrucelli, L. Fishbein, E. R. Hart, A. J. Pallota, R. R. Bates, H. L. Falk, J. J. Gart, M. Klein, I. Mitchell et J. Peters, *J. Nat. Cancer Inst.*, 42 (1969) 1101.
- 4 D. Larry, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 54 (1971) 900.
- 5 F. Grundschober, *Int. Flavours Food Addit.*, 8 (1977) 27.
- 6 G. Mazza, *Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment.*, 12 (1983) 159.
- 7 A. W. Archer, *J. Chromatogr.*, 438 (1988) 117.
- 8 H. H. Wisneski, R. L. Yates et H. M. Davis, *J. Chromatogr.*, 255 (1983) 455.
- 9 P. Curro, G. Micali et F. Lanuzza, *J. Chromatogr.*, 404 (1987) 273.
- 10 Z. Decsy, *Magy. Kem. Foly.*, 84 (1978) 420.