

Analyse par chromatographie liquide du diamino-2,3 phénazine et de l'hydroxy-2 amino-3 phénazine dans les carbendazimes techniques et formulés

J.-C. VAN DAMME*, B. DE RYCKEL et M. GALOUX

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

(Reçu le 30 mars 1990; manuscrit modifié reçu le 22 juin 1990)

ABSTRACT

Determination by liquid chromatography of 2,3-diaminophenazine and 2-hydroxy-3-aminophenazine in technical and formulated carbendazims

2,3-Diaminophenazine (DAP) and 2-hydroxy-3-aminophenazine (HAP) are highly mutagenic compounds that can be formed during the synthesis of carbendazim. A method has been developed to determine the DAP and HAP contents of technical and formulated carbendazims. The method is simple, rapid (20 min) and minimizes the degradation of phenazines in solution. All of the analyzed technical products (14) contained DAP, but only three wettable powders, among the twelve formulations analyzed, gave a result above the detection limit. HAP could be detected in none of the samples.

INTRODUCTION

La génotoxicité de certains fongicides de la famille des benzimidazoles, et notamment celle du carbendazime, est discutée depuis de nombreuses années [1–3]; certaines études ont attribué un pouvoir mutagène élevé au carbendazime tandis que d'autres ne faisaient état d'aucune activité mutagène. Après une revue systématique des publications sur le sujet, Oesch [4] a conclu que ni le carbendazime ni ses précurseurs biologiques (bénomyl et thiophanate) n'ont de propriétés mutagènes et a émis l'hypothèse que l'activité mutagène mise en évidence par le test de Ames, est à mettre à l'actif d'impuretés contenues dans les carbendazimes techniques utilisés lors de ces essais [5–6]. Des études ultérieures ont montré que des molécules du type phénazine ont une activité mutagène, notamment le diamino-2,3 phénazine (DAP) et l'hydroxy-2 amino-3 phénazine (HAP) (Fig. 1). Le DAP est formé à partir de deux molécules d'orthophénylenediamine (OPD), produit utilisé pour synthétiser le carbendazime (Fig. 2), et le HAP est obtenu par oxydation du DAP [7–10].

Pour déterminer les teneurs en DAP et HAP des produits techniques et formulés et vérifier une limite maximale éventuelle, il est nécessaire de disposer d'une méthode d'analyse relativement simple et rapide. Les méthodes d'analyse proposées par des fabricants de benzimidazoles (BASF et Dupont de Nemours) font appel à la détection par fluorescence pour obtenir une sensibilité suffisante. Dans la méthode BASF,

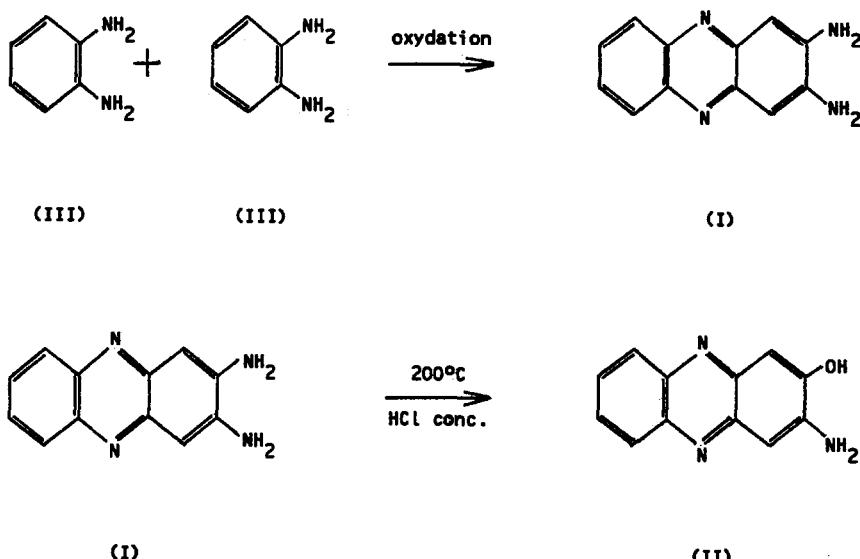


Fig. 1. Structure et formation des impuretés recherchées. I = DAP; II = HAP; III = QPD.

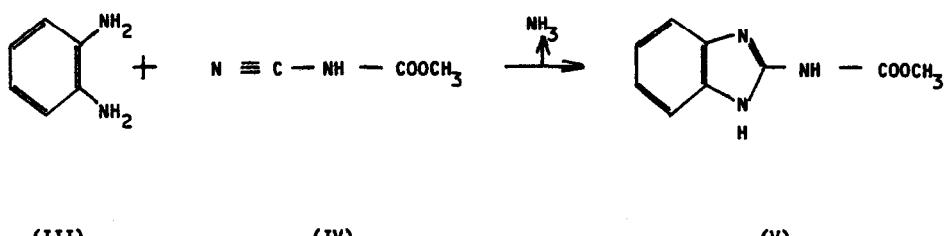


Fig. 2. Synthèse du carbendazime. III = OPD; IV = cyanocarbamate de méthyle; V = carbendazime.

l'étape d'extraction des phénazines, dans le cas des poudres mouillables, est assez longue et le taux de récupération est de 53%.

La méthode décrite a été mise au point pour permettre l'analyse de ces impuretés par chromatographie liquide avec un détecteur UV-visible. L'extraction est effectuée par une simple mise en solution et les taux de récupération dans les produits techniques et les formulations sont compris entre 95 et 100%.

MATERIEL ET MÉTHODE

Réactifs

Nous avons utilisé les réactifs suivants: méthanol pour chromatographie liquide (Alltech, 166170); acétonitrile pour chromatographie liquide (Alltech, 165690); acide sulfurique conc. min. 95%, pour analyse (Merck, 714); NaCl pour analyse (Merck, 6404); phase mobile: acétonitrile-méthanol à 0,1% H₂SO₄ (85:15 v/v); diamino-2,3-

phénazine et hydroxy-2 amino-3 phénazine de pureté supérieure à 99% synthétisés par le Dr. Türk (BASF, Ludwigshafen, R.F.A.).

Appareillage et conditions chromatographiques

L'appareillage et les conditions chromatographiques étaient: bain à ultrasons Bransonic 521; tubes à centrifuger de 100 ml, fonds plats et bouchons à visser Pirex No. 22; centrifugeuse (2000 g) Beckman J-6B; chromatographe liquide comprenant une pompe isocratique Tracor 990, une vanne d'injection Rhéodyne 7125 munie d'une boucle de 20 μl , un détecteur spectrophotométrique UV-visible Perkin-Elmer LC-95, un enregistreur Linear Modèle 255 et un intégrateur Infotronics CRS 304, ou chromatographe liquide Hewlett-Packard HP 1090 comprenant une pompe isocratique, un système d'injection automatique, un détecteur UV-visible à barette de diodes, un enregistreur et un intégrateur; colonne HS-3 Silica (Perkin-Elmer, 0258-0167) 83 \times 4,6 mm, diamètre des particules 3 μm ; débit 1,25 ml min $^{-1}$; longueurs d'onde 453 nm pour le détecteur à longueur d'onde variable, 453 nm et 270 nm pour le détecteur à barette de diodes; température ambiante.

Mode opératoire

Préparation des solutions étalons. Opérer à l'abri de la lumière. Peser, à 0,01 mg près, environ 10 mg de DAP ou de HAP dans un ballon jaugé de 100 ml. Dissoudre et porter au volume avec du méthanol. Prélever immédiatement des aliquotes de 2 ml de cette solution dans des flacons de 50 ml avec bouchons à visser. Évaporer rapidement à sec sous courant d'azote et conserver au réfrigérateur à 4°C.

Le résidu sec (environ 0,2 mg de phénazine) est remis en solution avec un volume déterminé de méthanol à 0,02% H₂SO₄ concentré, et dilué pour obtenir la ou les concentration(s) désirée(s).

Extraction de l'échantillon. Opérer à l'abri de la lumière. Peser, à 0,01 g près, environ 1 g d'échantillon dans un tube à centrifuger. Ajouter 50 ml de méthanol et extraire pendant 5 min dans un bain à ultrasons. Dans le cas des suspensions concentrées, ajouter 1 g de NaCl pour obtenir un surnageant limpide. Centrifuger à 2000 g pendant 10 min. Prélever immédiatement 20 ml de surnageant dans un erlenmeyer de 25 ml et acidifier au moyen de 0,4 ml de méthanol à 1% H₂SO₄ concentré.

Dosage. Vérifier la linéarité et la stabilité de la réponse chromatographique en injectant 20 μl des solutions étalons dans les conditions décrites ci-dessus. La surface des pics de deux injections successives ne doit pas différer de plus de 2%. Injecter ensuite deux fois la solution échantillon, suivie d'une injection d'une solution étalon de concentration voisine.

La quantité de phénazine (DAP ou HAP) est calculée par la formule suivante:

$$\text{teneur en DAP (ou HAP)} = \frac{hcP}{H_p} \cdot 0,51 \text{ mg kg}^{-1}$$

dans laquelle h = hauteur du pic de la solution échantillon (moyenne de 2 injections); H = hauteur du pic de la solution étalon (moyenne de 2 injections); p = prise d'essai (en g) de l'échantillon; c = concentration en DAP (ou HAP) dans la solution de référence (en $\mu\text{g ml}^{-1}$); P = pureté du DAP (ou HAP) de référence (en %).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Stabilité et extraction des phénazines

Le DAP et le HAP se présentent sous forme de poudres cristallines de couleur jaune pour le DAP et brun-rouge pour le HAP. Ils sont solubles dans le benzène et le dichlorométhane et très solubles dans l'eau et les alcools. Les solutions aqueuses et méthanoliques de couleur jaune prennent rapidement une coloration brunâtre. Cette décoloration montre que ces molécules sont instables et leur stabilité dépend de la lumière et du pH.

La décomposition du DAP et du HAP dans l'eau et le méthanol a été suivie en fonction du temps sur des solutions contenant $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 3). Les courbes montrent que les deux phénazines sont plus stables dans le méthanol et que, dans l'eau, la demi-vie du DAP n'est que de 80 min, celle du HAP de 3 h 35 min. Par contre, les solutions de phénazines conservées à l'abri de la lumière sont stables pendant plus de 2 h et après 6 h, la concentration en DAP dans le méthanol était encore égale à 95% de la concentration initiale. Ces deux phénazines sont stables en milieu acide pendant au moins 15 jours.

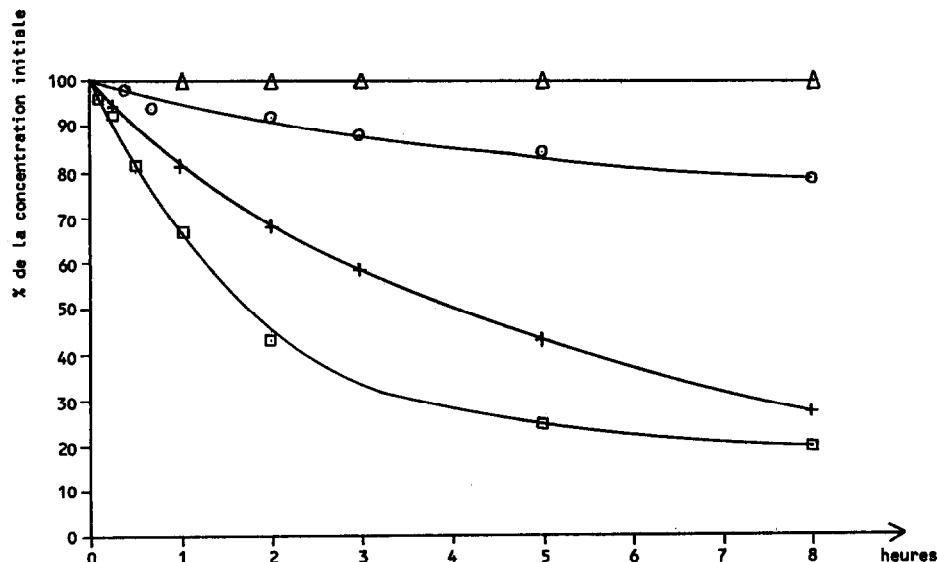


Fig. 3. Courbes de décomposition des phénazines. DAP dans l'eau (□) et dans le méthanol (○); HAP dans l'eau (+) et dans le méthanol (△).

Comme ces molécules sont solubles dans l'eau et stables en milieu acide, les premiers essais d'extraction ont été effectués avec de l'acide chlorhydrique 1 M, comme préconisé dans la méthode BASF, mais en milieu fortement acide, le HAP et le DAP s'adsorbent sur de nombreux substrats: le kaolin (matière de charge de certaines poudres mouillables), les particules de carbendazime non dissoutes, les filtres en polyéthylène des colonnes d'extraction en phase solide, qui ont été essayées comme moyen de concentration. Sur base de ces essais, il a été jugé préférable d'utiliser comme

solvant d'extraction le méthanol et, pour éviter au maximum la décomposition, d'opérer à l'abri de la lumière, d'acidifier le surnageant obtenu après centrifugation et d'injecter les solutions sans étape de concentration.

Chromatographie et détection

Pour améliorer la symétrie des pics, la phase mobile doit contenir une petite quantité d'acide fort ainsi que du méthanol dont le pourcentage permet de contrôler la séparation. Le mélange acétонitrile-méthanol à 0,1% H_2SO_4 (85:15 v/v) a été retenu, ainsi qu'une colonne contenant de la silice non modifiée. Dans ces conditions la réponse chromatographique est linéaire dans une gamme de concentrations allant de 30 à 4000 ng ml^{-1} avec un coefficient de corrélation de 0,99998 pour les deux phénazines; le DAP est séparé du carbendazime et des autres composés extraits, mais le HAP ne l'est pas (Fig. 6). Ce dernier peut cependant être analysé spécifiquement, car ces molécules ont des spectres d'absorption caractéristiques (Fig. 4) et la détection dans le visible à 453 (ou 409 nm) permet de mesurer le HAP (Figs. 5 et 6).

Au début de l'étude, une colonne de phase inverse à activité réduite (HS-3 CR C18, Perkin-Elmer, réf. 0258-0194) a également été utilisée avec la même phase mobile. Sur cette colonne, le DAP et le HAP sont séparés des autres composés, mais les temps de rétention sont relativement longs (de l'ordre de 3,4 min pour le HAP et de 4,6 min pour le DAP pour un débit de 1,25 ml min^{-1}). La colonne de silice a été finalement retenue, car la colonne de phase inverse s'est rapidement détériorée. Elle permet d'analyser le DAP en un temps plus court et le HAP qui n'est pas séparé peut être mesuré grâce à son absorption en lumière visible.

Les essais, la mise au point de la méthode et les chromatogrammes des Figs. 5 et 6, ont été réalisés avec un détecteur à barette de diodes qui offre l'avantage de mesurer simultanément à plusieurs longueurs d'onde et permet d'enregistrer l'ensemble du

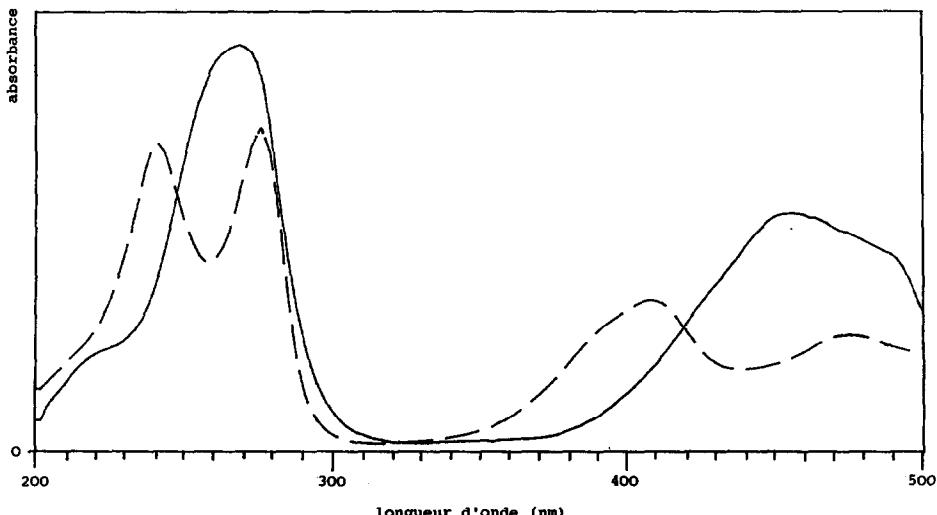


Fig. 4. Spectres d'absorption du DAP (—) et du HAP (---) dans le phase mobile.

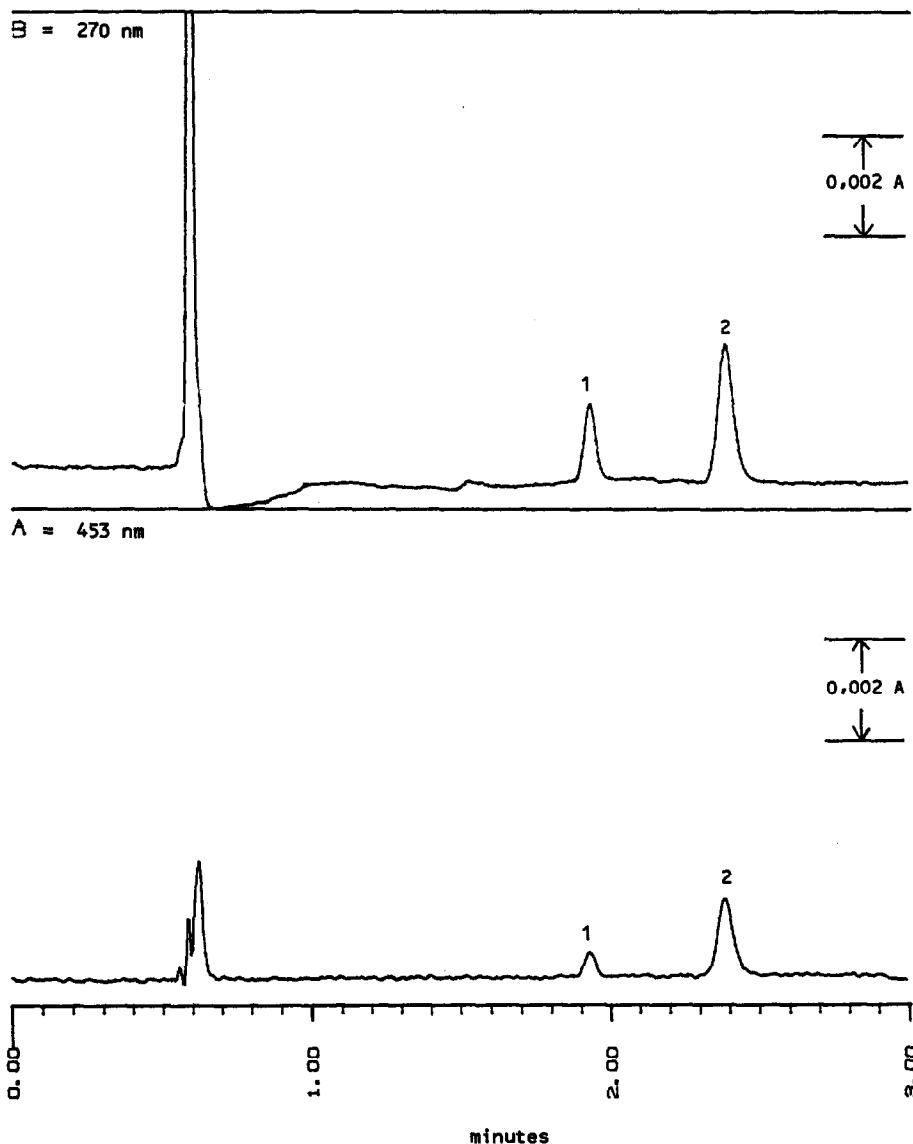


Fig. 5. Chromatogrammes à 270 et 453 nm d'une solution étalon contenant du DAP ($0,16 \mu\text{g ml}^{-1}$) et du HAP ($0,08 \mu\text{g ml}^{-1}$). Pics: 1 = HAP; 2 = DAP.

spectre du composé élué. Ce détecteur est cependant moins stable que le détecteur à longueur d'onde variable avec lequel ont été effectuées les analyses des échantillons et dont le seuil de détection dans le visible a été estimé à $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ pour le DAP et $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ pour le HAP. Si nécessaire, cette limite de détection peut encore être améliorée en augmentant la prise d'essai puisque les deux phénazines sont très solubles dans le méthanol.

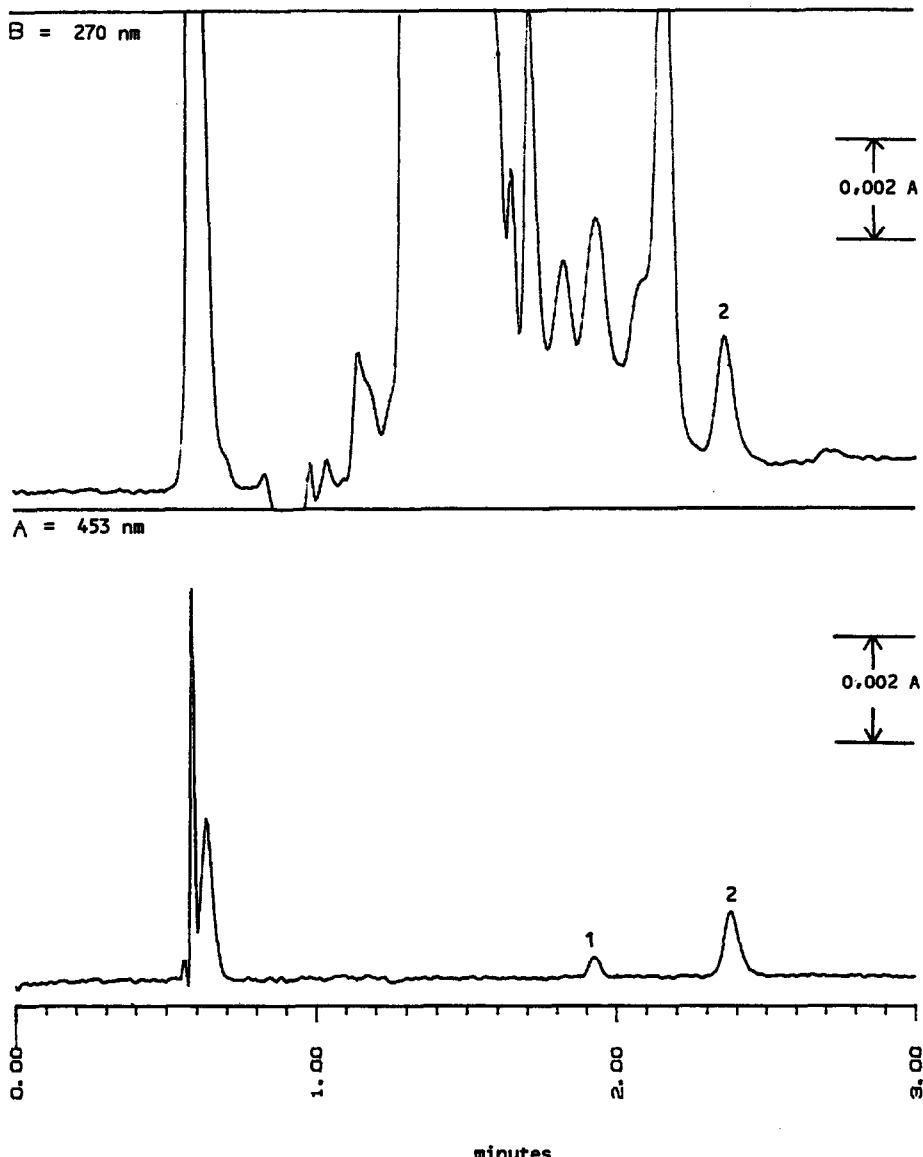


Fig. 6. Chromatogrammes à 270 et 453 nm du carbendazime technique TC 3 contenant du DAP ($6,5 \text{ mg kg}^{-1}$) et dopé par du HAP (4 mg kg^{-1}). Pics: 1 = HAP; 2 = DAP.

Reproductibilité et rendement analytique de la méthode

La reproductibilité de la méthode est illustrée au Tableau I. Pour le produit technique TC 10 et la poudre mouillable WP 4 dont les teneurs en DAP sont de l'ordre de 20 et 200 mg kg^{-1} , les coefficients de variation pour six répétitions sont inférieurs à 1%. Pour les échantillons TC 6 et WP 3 contenant entre 1 et 2 mg kg^{-1} , ils sont compris entre 5 et 10%.

TABLEAU I

REPRODUCTIBILITÉ DE LA MÉTHODE, MESURÉE SUR DEUX PRODUITS TECHNIQUES (TC) ET DEUX POUDRES MOUILLABLES (WP)

TC 6		TC 10		WP 3		WP 4	
Prise d'essai (g)	DAP (mg kg ⁻¹)	Prise d'essai (g)	DAP (mg kg ⁻¹)	Prise d'essai (g)	DAP (mg kg ⁻¹)	Prise d'essai (g)	DAP (mg kg ⁻¹)
1,0591	1,77	0,9901	20,03	0,9920	1,54	0,1176	226,3
1,0283	1,70	1,0076	20,40	0,9899	1,53	0,1055	228,3
1,0000	1,78	0,9367	20,37	1,0322	1,83	0,1217	224,8
1,0212	1,92	1,0178	20,23	1,0200	1,61	0,1043	226,8
		2,4620 ^a	19,96			0,9918	225,3
		5,0098 ^a	20,20			1,0071	227,1
Moyenne	1,79		20,19		1,63		226,4
Ecart-type	0,09		0,18		0,14		1,28
Coefficient de variation (%)	5,1		0,9		8,6		0,6

^a Extraction par 200 ml de méthanol.

Le rendement analytique a été déterminé en mélangeant 2 ml de méthanol contenant entre 1 et 20 µg de DAP à 1 g de technique TC 5 et à 1 g de poudre mouillable WP 1. Le méthanol est évaporé sous courant d'azote le plus rapidement possible et l'extraction est effectuée suivant la méthode décrite. Dans le cas de la suspension concentrée SC 1, peser 10 g de la formulation dans des tubes à centrifuger contenant des quantités croissantes de DAP, obtenues par évaporation de solutions méthanoliques, préalablement résolubilisées dans 0,5 ml d'eau pour faciliter le mélange avec la suspension aqueuse. Peser 1 g de suspension dopée et effectuer l'extraction en suivant le mode opératoire. Les résultats (Tableau II) sont compris entre 94 et 100% pour les 3 types d'échantillons. Les pourcentages moyens sont de 96 (\pm 2) pour la suspension concentrée, de 97 (\pm 3) pour le carbendazime technique et de 98 (\pm 1) pour la poudre mouillable.

TABLEAU II

RENDEMENT ANALYTIQUE

Résultats en % de DAP ajouté.

Référence	Quantité de DAP ajoutée (mg kg ⁻¹)				Moyenne	Coefficient de variation (%)
	20	8	4	1,6		
TC 5	95,7	97,9	100,4	94,4	97,1	2,7
WP 1	99,2	98,0	96,7	98,3	98,1	1,1
SC 1	97,9	96,7	94,2	93,7	95,6	2,1

TABLEAU III
TENEURS^a EN DAP ET EN HAP DANS LES PRODUITS TECHNIQUES

Référence	Année de fabrication	DAP (mg kg ⁻¹)	HAP (mg kg ⁻¹)
1	1988	74,4	n.d. ^b
2	1988	4,5	n.d.
3	1988	6,5	n.d.
4	1988	866	n.d.
5	1988	<0,5	n.d.
6	1988	1,8	n.d.
7	1988	4,8	n.d.
8	1987	137	n.d.
9	1988	23,7	n.d.
10	1988	20,2	n.d.
11	1989	3,1	n.d.
12	1989	3,1	n.d.
13	1989	26,0	n.d.
14	1989	8,5	n.d.

^a Moyenne d'au moins trois déterminations.

^b n.d. = Non détecté (limite de détection: voir discussion).

Résultats des analyses

Les résultats sont repris aux Tableaux III et IV. Les teneurs en DAP des échantillons de carbendazime technique (TC) vont de moins de 0,5 à près de 1000 mg kg⁻¹. En ce qui concerne les produits formulés (Tableau IV), seules trois poudres mouillables (WP) contiennent du DAP, parmi lesquelles l'échantillon WP 4, qui en contient 226 mg kg⁻¹.

Les deux types de formulations fabriquées en milieu aqueux: les suspensions concentrées (SC) et la formulation "granulés à disperser dans l'eau" (WG) ne

TABLEAU IV
TENEURS^a EN DAP ET EN HAP DANS LES PRODUITS FORMULÉS

Référence	Année de fabrication	DAP (mg kg ⁻¹)	HAP (mg kg ⁻¹)
WP 1	1985	n.d. ^b	n.d.
WP 2	1985	<0,5	n.d.
WP 3	1988	1,6	n.d.
WP 4	1985	226	n.d.
WP 5	1985	n.d.	n.d.
WG 1	1988	n.d.	n.d.
SC 1	1985	n.d.	n.d.
SC 2	1988	n.d.	n.d.
SC 3	1985	n.d.	n.d.
SC 4	1985	n.d.	n.d.
SC 5	1985	n.d.	n.d.
SC 6	1989	n.d.	n.d.

^a Moyenne d'au moins trois déterminations.

^b n.d. = Non détecté (limite de détection: voir discussion).

contiennent pas de DAP. Ce qui s'explique par la décomposition rapide des phénazines dans l'eau. Le HAP n'a été détecté dans aucun des produits analysés. Cette méthode a également été appliquée à des formulations de bénomyl et de thiophanate-méthyl avec comme résultat pour les deux phénazines "non détecté".

CONCLUSION

La méthode décrite permet d'analyser rapidement, avec une bonne précision et une sensibilité suffisante, les teneurs en DAP et HAP dans les carbendazimes techniques et formulés. Tous les carbendazimes techniques analysés (14 échantillons) contiennent du DAP en quantité parfois importante. Le DAP a été détecté dans trois poudres mouillables mais pas dans les suspensions concentrées à base d'eau, ni dans la formulation "granulés à disperser dans l'eau" fabriquée en présence d'eau. Le HAP n'est pas formé, en quantité mesurable par cette méthode, ni lors de la synthèse du carbendazime ni lors de sa formulation.

RÉSUMÉ

Le diamino-2,3 phénazine (DAP) et l'hydroxy-2 amino-3 phénazine (HAP) sont des impuretés fortement mutagènes formées lors de la synthèse du carbendazime. Une méthode a été étudiée pour déterminer les teneurs en DAP et HAP dans les carbendazimes techniques et formulés. La méthode est simple, rapide (20 min) et évite la dégradation des phénazines en solution. Tous les produits techniques analysés (14) contiennent du DAP, mais seules trois poudres mouillables, sur les douze formulations analysées, ont donné un résultat supérieur à la limite de détection. Le HAP n'a été détecté dans aucun des échantillons.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 RL S. Hammerschlag et H. D. Sisler, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 3 (1972) 42-54.
- 2 J. P. Seiler, *Mutat. Res.*, 32 (1975) 151-158.
- 3 I. M. Somlyay, *Meded. Fac. Landbouwvet. Rijksuniv. Gent.*, 52 (2 b) (1987) 699-702.
- 4 F. Oesch, *Evaluation of the Genotoxicity Studies on Carbendazim (MBC), Benomyl and Thiophanate-methyl*, Département of Toxicology and Pharmacology, Université de Mainz, Mainz, 1982.
- 5 J. P. Seiler, *Mutat. Res.*, 15 (1972) 273-276.
- 6 G. Ficsor, S. Bordas et S. J. Stewart, *Mutat. Res.*, 51 (1978) 151-164.
- 7 V. Grignard, G. Dupont et R. Locquin, *Traité de Chimie Organique*, Tome XXI, Masson, Paris, 1953, pp. 195-196.
- 8 V. V. Richter, R. Anschütz et H. Meerwein, *Traité de Chimie Organique*, Tome II, série cyclique, Librairie Polytechnique Ch. Béranger, Paris, Liège, 1910, pp. 130-134, 1076-1083.
- 9 R. C. Gupta et S. P. Srivastava, *Indian J. Chem.* 9 1971, 1303-1304.
- 10 *Merck Index*, Merck & Co., Rahway, NJ, 9th, ed., 1976, pp. 391, 948.