

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

①1 N° de publication :

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 635 384

②1 N° d'enregistrement national :

89 10823

⑤1 Int Cl⁵ : G 01 N 30/02, 33/48.

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 11 août 1989.

③0 Priorité : DE, 12 août 1988, n° P 3827 449.3.

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : BOP1 « Brevets » n° 7 du 16 février 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *SKW Trostberg Aktiengesellschaft.* — DE.

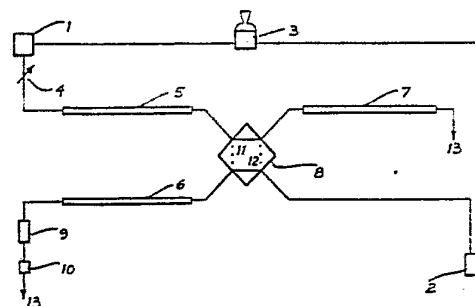
⑦2 Inventeur(s) : Ulrich Rust.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Plasseraud.

⑤4 Procédé pour la détermination analytique de l'acétylcyanamide.

⑤7 L'invention concerne un procédé pour la détermination de l'acétylcyanamide dans des solutions aqueuses de matières biologiques. On alcalinise les solutions, on les purifie avec du charbon activé et au besoin on les acidifie par addition d'un acide minéral. On extrait l'acétylcyanamide de la phase aqueuse en utilisant un extractant insoluble dans l'eau et on l'en extrait avec un alcali aqueux dilué. On sépare l'acétylcyanamide par chromatographie liquide haute performance et on le détermine par spectrophotométrie. Le procédé analytique qui est très spécifique convient à la détermination de traces d'acétylcyanamide, en particulier pour l'étude du métabolisme du cyanamide dans les produits métaboliques de l'homme et des animaux et dans les tissus des végétaux, des animaux et de l'homme.



FR 2 635 384 - A1

D

PROCEDE POUR LA DETERMINATION ANALYTIQUE DE L'ACETYLCYANAMIDE

5

L'invention concerne un procédé analytique pour la détermination de l'acétylcyanamide dans une matrice et/ou dans un extrait que l'on obtient à partir de cette matrice. Le procédé de l'invention est utilisé pour déterminer l'acétylcyanamide dans des matières ou mélanges de matières désirés quelconques, la détermination s'appliquant de préférence à des matières d'origine biologique.

10 L'acétylcyanamide peut être produit lors du métabolisme du cyanamide dans l'organisme des personnes qui sont traitées à des fins thérapeutiques avec du cyanamide ou du cyanamide calcique ou qui, pour des raisons professionnelles, viennent au contact du cyanamide. Dans l'organisme animal, c'est un produit métabolique qui est excrété par exemple par les animaux de laboratoire que l'on a spécifiquement alimentés avec du cyanamide. Le cyanamide est de plus en plus utilisé en agriculture. En dehors de l'application du cyanamide calcique comme engrais, on peut utiliser le cyanamide selon la demande de brevet allemand DOS n° 3 150 404 pour supprimer la dormance des bourgeons de la vigne ou d'autres plantes fruitières.

25

Pour des raisons d'hygiène et de protection de l'environnement, il est souhaitable de mettre au point des procédés analytiques pour la détermination de l'acétylcyanamide à l'état de traces chez l'homme et les animaux. Les procédés analytiques connus à ce jour (Shirota et coll., Drug Metabolism and Disposition 12, 337-344 (1984)) reposent sur la mesure de la radioactivité de l'acétylcyanamide marqué au ^{14}C ou de son dérivé de type N-benzyl ou N-(4-nitrobenzyl) par spectrographie de masse avec ionisation chimique et par mesure ultraviolette des composés marqués ou non marqués correspondants. La détermination directe de traces d'acétylcyanamide non marqué n'a pas été décrite à ce jour.

35

Le but de l'invention est de mettre au point un procédé analytique sensible et très spécifique pour la détermination quantitative ainsi que pour la détection de l'acétylcyanamide, qui tient compte en particulier du métabolisme du cyanamide chez l'homme et les animaux, et qui permet également la détermination du cyanamide dans des tissus végétaux, dans des microorganismes et dans des produits métaboliques biologiques.

Selon l'invention, pour atteindre ce but, on sépare l'acétylcyanamide dans une matrice et/ou dans un extrait obtenu à partir de la matrice par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en utilisant une phase échangeuse d'ions ou une phase inverse et on le détermine par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 220 nm.

Il s'est révélé pratique d'utiliser des produits métaboliques facilement accessibles pour la détermination de l'acétylcyanamide dans l'organisme de l'homme et des animaux. L'utilisation de l'urine s'est révélée particulièrement appropriée pour l'analyse quantitative, car l'urine ne nécessite pas de préparation de l'échantillon autre que l'alcalinisation et le traitement avec du charbon activé, et peut donc être utilisée pour la détermination analytique selon l'invention. L'enrichissement de l'acétylcyanamide par extraction de sa solution peut également être nécessaire lorsque la concentration est faible. Si l'on vise à déterminer le cyanamide dans des plantes ou des microorganismes selon le procédé de l'invention, on peut, après la macération habituelle du matériau cellulaire et après séparation en une fraction solide et en une fraction liquide, effectuer une acétylation dans le liquide pour transformer tout cyanamide qui y est présent en acétylcyanamide. L'acétylcyanamide peut être déterminé dans la solution échantillon ainsi préparée.

La dérivatisation du cyanamide, dans des solutions provenant de plantes ou de microorganismes ou d'un tissu de cellules humaines ou animales, est effectuée selon des procédés connus en solution alcaline avec de l'anhydride acétique en phase aqueuse/éthérée. Bien entendu, on peut également appliquer le procédé analytique à des

solutions d'autres origines contenant de l'acétylcyanamide.

Selon l'invention, une matrice, qui peut être par exemple le produit métabolique qu'est l'urine, telle quelle, ou qui a été soumise à un traitement pour produire une solution aqueuse de l'acétylcyanamide, est ajustée à un pH de 7,5 à 13 par addition d'un alcali aqueux. Un mode de réalisation préféré du procédé de détermination comprend l'ajustement à un pH de 11 à 11,5 avec une solution à 20 % d'hydroxyde de sodium ou d'hydroxyde de potassium. Pour la purification et la clarification, on traite la solution alcaline avec du charbon activé et on élimine les solides par filtration à travers une membrane filtrante. Si la concentration de l'acétylcyanamide dans la solution est supérieure à 1 mg/kg, elle convient directement à la détermination analytique par chromatographie liquide haute performance et détection spectrophotométrique, ou sinon elle peut être ajustée à la concentration analytique désirée par dilution avec de l'eau. Les solutions dont la teneur en acétylcyanamide est inférieure à 1 mg/kg sont acidifiées à un pH de 0,5 à 3,5 avec un acide minéral. Pour le traitement ultérieur de l'échantillon analytique, on ajuste de préférence le pH entre 1,0 et 2,0 par addition d'acide sulfurique ou d'acide phosphorique. Bien entendu, l'acide chlorhydrique et d'autres hydracides halogénés conviennent pour l'acidification. Les échantillons analytiques dont la concentration en acétylcyanamide est inférieure à 1 mg/kg sont soumis à une extraction liquide/liquide pour être enrichis. Comme solvant pour cette extraction, on peut utiliser des solvants organiques qui sont insolubles dans l'eau et dans lesquels l'acétylcyanamide est facilement soluble. Des esters, tels que l'acétate d'éthyle, ou des éthers, tels que l'éther diéthylique, se sont révélés avantageux à cet égard. L'extraction peut être effectuée par simple extraction répétée par agitation ou en continu dans un appareil d'extraction.

On peut, pour assurer un enrichissement complémentaire en acétylcyanamide, extraire le solvant organique avec une solution aqueuse faiblement alcaline. L'extraction peut être effectuée selon les procédés habituels par extraction répétée par agitation. En

pratique, pour transférer l'acétylcyanamide de la phase organique dans la phase aqueuse, non seulement les hydroxydes de métaux alcalins aqueux, mais également les solutions aqueuses de sels de métaux alcalins d'acides faibles, tels que par exemple le carbonate de sodium ou le bicarbonate de sodium, se sont révélés particulièrement appropriés. Pour effectuer l'ajustement à une concentration appropriée à la détermination, on évapore l'extrait aqueux à sec dans des conditions modérées et on dissout dans une quantité déterminée d'eau, de façon à ce que la concentration de l'acétylcyanamide soit d'environ 1 mg/kg. La phase mobile utilisée dans la séparation ultérieure par chromatographie liquide, utilisant une phase échangeuse d'ions, de préférence une colonne de séparation AS-3 commercialisée par Dionex, est une solution de sels d'acide carbonique. Pour la séparation de l'acétylcyanamide sur une phase échangeuse d'ions, on utilise de préférence un mélange aqueux de carbonate de sodium et de bicarbonate de sodium. Cependant, on peut également effectuer la chromatographie liquide de l'acétylcyanamide sur une phase inverse. Un exemple d'une colonne de séparation appropriée est le Nucleosil 5 μ C-18, 250 x 4,6 de Macherey et Nagel. Un tampon phosphate habituel à pH 6,8 avec de l'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium dans un mélange de méthanol et d'eau convient comme phase mobile.

Pour déterminer l'acétylcyanamide dans une matrice complexe, telle que par exemple l'urine, il est nécessaire d'utiliser deux colonnes de séparation (5 et 6) raccordées en série. Pour la séparation, on utilise de préférence une technique de commutation de colonnes comme illustré par la figure 1. Sur la figure 1, (3) représente un réservoir qui contient la phase mobile. La pompe (1) conduit dans la position (11) de la vanne de commutation (8) la phase mobile et l'échantillon analytique qui a été injecté avec la vanne d'injection (4) à travers la colonne de séparation (5) via le dispositif de contre-pression (7) à la sortie (13). Dans la position (12) de la vanne de commutation (8), l'alimentation s'effectue à travers les colonnes de séparation (5) et (6) via l'amortisseur (9) au détecteur (10) et à la sortie (13). La pompe (2) sert à conduire

la phase mobile du réservoir (3) dans à la position (12) de la vanne à travers le dispositif de contre-pression (7) et dans la position (11) de la vanne à travers la colonne de séparation (6), l'amortisseur (9) et le détecteur (10).

5 Pour déterminer les temps de commutation de la colonne, initialement, on raccorde uniquement la colonne de chromatographie (5) au chromatographe ionique et on charge avec un standard d'acétylcyanamide sodique. On détermine les temps au début (t_1) et à la fin (t_2) du signal de l'acétylcyanamide. Pour l'analyse, on monte
10 les colonnes de séparation (5) et (6) et le dispositif de contre-pression (7) selon la disposition de la figure 1 et on injecte les échantillons préparés ou des solutions standard. On commute la vanne de commutation (8) à chacun des temps (t_1) et (t_2).

15 Si une matrice ne contient que de petites quantités de substances gênantes, la détermination peut être effectuée avec une seule colonne de séparation.

20 La figure 2 représente des chromatogrammes ioniques de l'acétylcyanamide enregistrés à une longueur d'onde de 220 nm qui montrent la forte sensibilité du procédé analytique selon l'invention.

25 Le pic X du chromatogramme 1 provient d'un standard d'acétylcyanamide, l'échantillon blanc du chromatogramme 2 montre l'absence virtuelle de signal de l'acétylcyanamide et le chromatogramme 3 montre le résultat de l'analyse d'un échantillon d'urine humaine selon le procédé de l'invention.

30 Le procédé analytique très spécifique et sensible s'est révélé satisfaisant, même en présence de substances gênantes détectables par des pics importants dans les chromatogrammes 2 et 3. La limite inférieure de détermination pour l'acétylcyanamide est au-dessous de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La limite inférieure de détermination a été calculée en utilisant 10 fois l'écart-type des signaux d'échantillons d'urine additionnés de 20×10^{-9} g/g d'acétylcyanamide. Conditions pour la chromatographie :

35 A) Phase échangeuse d'ions

Disposition de la colonne comme sur la figure 1

- Colonne de séparation (5, 6) : AS-3 Dionex
Chromatographe ionique : Dionex 2010 i
Amortisseur pour la chromatographie anionique (9) : Dionex
Intégrateur : SP 4290 ou équivalent
5 Détecteur (10) : UV Kontron Uvikon 720 LC ou équivalent
Longueur d'onde : 220 nm
Phase mobile : carbonate de sodium aqueux 0,0044 mol/l,
bicarbonate de sodium aqueux 0,0056 mol/l
dans le rapport de 1/1 en volume
- 10 Volume d'injection : 10 - 100 µl
Débit : 2,0 à 2,3 ml/min.
- B) Phase inverse
CLHP : Beckmann System Gold ou équivalent
Colonne de séparation : Nucleosil 5 µ C-18, 250 x 4,6 ;
15 Macherey & Nagel ou équivalent
Intégrateur : SP 4290 ou équivalent
Détecteur (10) : UV Kontron Uvikon 720 LC ou équivalent
Longueur d'onde : 220 nm
Phase mobile : 120 ml de méthanol, 600 ml d'eau, 80 ml de tampon
20 phosphate à pH 6,8, 220 mg de bisulfate de
tétrabutylammonium
Injection : 10 à 100 µl
Débit : 0,8 à 1,2 ml/min.
- L'invention est illustrée par les exemples non limitatifs
25 suivants.
- Exemple 1
Détermination de l'acétylcyanamide à des concentrations > 1 mg/kg.
On dilue un échantillon d'urine avec de l'eau désionisée à
environ 1 mg/l d'acétylcyanamide. On ajuste 150 ml de cette solution
30 à un pH de 11 à 11,5 avec une solution à 20 % d'hydroxyde de sodium.
On ajoute 2,5 à 3 g de charbon activé. On agite l'échantillon
analytique à la température ambiante pendant 30 minutes et on sépare
d'avec le charbon activé par filtration à travers une membrane
filtrante de 0,45 µm. On lave le charbon activé avec 25 ml d'une
35 solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium, on combine le filtrat et les

liquides de lavage et on ajuste à 200 ml avec de l'eau désionisée.
Détermination des temps de commutation de la colonne pour l'analyse chromatographique ionique.

On utilise comme solution de référence un standard d'environ
5 20 mg du sel de sodium de l'acétylcyanamide dans 1 000 ml d'eau. On dilue ce standard au 1/10 avec de l'eau et on en injecte 50 µl sur la colonne de séparation (5) qui est raccordée au chromatographe ionique. On mesure les temps au début (t_1) et à la fin (t_2) du signal de l'acétylcyanamide.

10 Mesure de l'échantillon.

Pour l'analyse d'un échantillon d'urine, on raccorde tous les constituants illustrés par le schéma de commutation (figure 1). On injecte 50 µl de l'échantillon d'urine préparé et on commute la vanne de commutation aux temps (t_1) et (t_2). Le débit de la phase
15 mobile est de 2,0 à 2,3 ml/min. On mesure la concentration de l'acétylcyanamide à la longueur d'onde de 220 nm.

On répète plusieurs fois la mesure en injectant alternativement les échantillons du standard et de l'urine.

Calcul :

20 On calcule la concentration de l'acétylcyanamide à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{ppm Acy} = \frac{\text{CS} \times 0,793 \times \text{F} \times \text{HPr}}{\text{HS}}$$

25 ppm Acy = concentration de l'acétylcyanamide

CS = concentration de l'acétylcyanamide sodique dans le standard

F = facteur de dilution ou de concentration de la solution échantillon

30 HPr = hauteur du pic ou surface du pic de l'échantillon

HS = hauteur du pic ou surface du pic du standard.

Exemple 2

Détermination de l'acétylcyanamide à des concentrations < 1 mg/kg.

35 On ajuste 150 ml d'un échantillon d'urine à un pH de 11 à 11,5 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 20 %. On néglige tout

précipité blanc formé. On agite la solution avec 2,5 à 3 g de charbon activé pendant 30 minutes, puis on sépare d'avec le charbon activé par filtration à travers une membrane filtrante de 0,45 µm. On répète deux fois le traitement avec le charbon activé, puis on
5 lave deux fois ce dernier, chaque fois avec 5 ml d'une solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium et on ajuste le pH des filtrats combinés entre 1,3 et 1,4 avec de l'acide sulfurique. On extrait exactement 100 ml de cette solution trois fois avec 100 ml d'acétate d'éthyle dans chaque cas.

10 On extrait trois fois les phases d'acétate d'éthyle combinées avec chaque fois 5 ml d'une solution aqueuse 0,05 M de carbonate de sodium, on combine les solutions aqueuses et on évapore à sec sous vide avec un évaporateur rotatif à une température maximale de 40°C.

15 On dissout le résidu dans 10 ml d'eau désionisée et au besoin on dilue avec de l'eau désionisée à une concentration en acétylcyanamide d'environ 1 mg/l. On injecte 50 ml de cette solution sur le système de chromatographie ionique. On effectue la détermination et le calcul de la même façon que dans l'exemple 1.

20 Exemple 3

Dérivatisation du cyanamide en acétylcyanamide.

On alcalinise environ 10 ml d'une solution contenant du cyanamide en utilisant 4 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 40 % et on dépose 10 ml d'éther diéthylique sur la solution. On
25 ajoute 1 ml d'anhydride acétique dans 10 ml d'éther diéthylique et on agite le mélange à la température ordinaire pendant 1 heure. On chasse l'éther diéthylique avec un évaporateur rotatif et on agite la solution aqueuse restante dont le pH doit être d'environ 11,5 avec 2 g de charbon activé pendant 30 minutes. On sépare par
30 filtration le charbon activé, on lave deux fois, chaque fois avec 5 ml de solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium, et on ajuste le pH des phases aqueuses combinées à 1 avec de l'acide sulfurique concentré à 50 %.

35 On traite la solution acide comme décrit dans l'exemple 2 et on chromatographie, par exemple en utilisant des conditions de CLHP

en phase inverse et on effectue une détermination spectrophotométrique à la longueur d'onde de 220 nm.

5

10

15

20

25

30

35

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la détermination analytique de l'acétylcyanamide, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 a) la séparation de l'acétylcyanamide d'avec une matrice et/ou un extrait qui est obtenu à partir de la matrice en utilisant une chromatographie liquide haute performance (CLHP) employant une phase échangeuse d'ions ou une phase inverse et
- b) la détermination de l'acétylcyanamide par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 220 nm.

10 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la matrice ou son extrait est épuré par traitement avec du charbon activé à un pH de 7 à 13.

15 3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'acétylcyanamide est extrait de la matrice ou de son extrait épurés à un pH de 0,5 à 3,5 par extraction liquide-liquide.

20 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'extraction liquide-liquide de l'acétylcyanamide est effectuée à l'aide d'un solvant organique insoluble dans l'eau.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le solvant organique est l'acétate d'éthyle ou l'éther diéthylique.

25 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on extrait l'extractant organique insoluble dans l'eau avec une solution alcaline aqueuse.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on utilise l'extrait alcalin aqueux dans la séparation par chromatographie liquide haute performance.

30 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la matrice est constituée de matières biologiques et/ou de produits métaboliques.

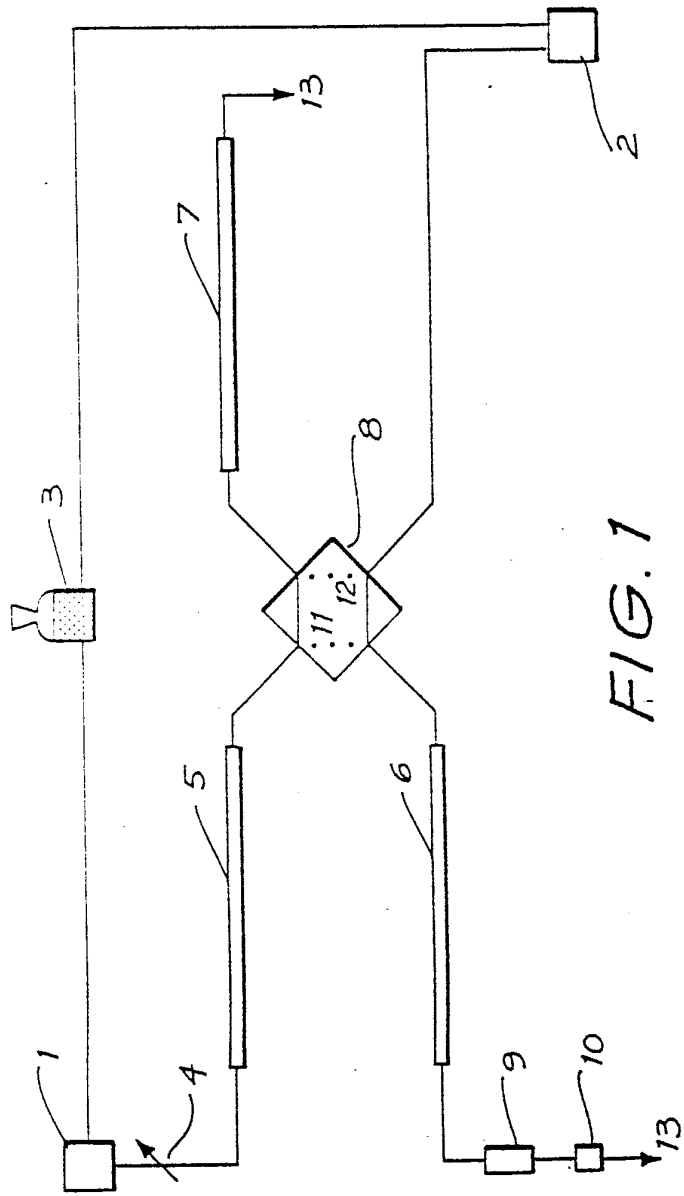


FIG. 1

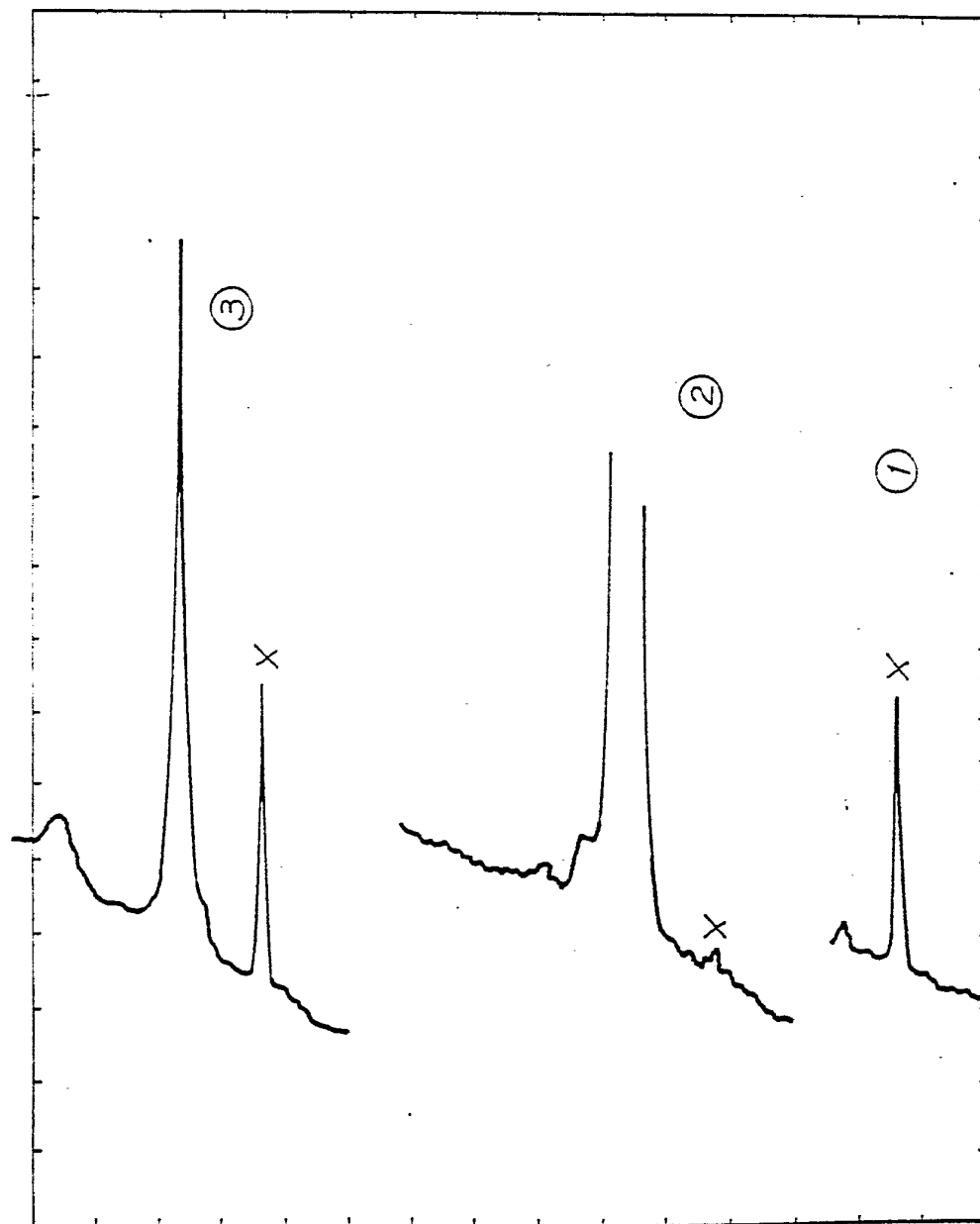


FIG. 2