

MÉTHODES DE DOSAGE DES MONOMÈRES RÉSIDUELS DES RÉSINES ÉPOXYDIQUES DANS DES SIMULANTS DU VIN

M. LARROQUE, L. VIAN*, A. BLAISE et S. BRUN

Laboratoire de Chimie Analytique et Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Avenue Charles Flahaut, 34060 Montpellier Cedex (France)

(Reçu le 29 février 1988)

SUMMARY

Chromatographic determination of residual monomers of epoxy resins in wine simulants

Wine is widely stocked in epoxy resin vats. These bisphenol A epoxy resins are cured with methylenedianiline hardener. The residual monomers are able to migrate through the polymer matrix into the wine. So, migration studies were undertaken in order to prevent human health hazard.

In this paper specific chromatographic methods for the determination of the residual monomers in simulants of wine are described. Liquid chromatographic methods were developed for the determination of methylenedianiline and bisphenol A, and a gas chromatographic method for the determination of epichlorhydrin. The procedures described proved to be sensitive, reproducible and efficient.

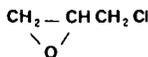
INTRODUCTION

L'utilisation des matériaux plastiques dans l'industrie alimentaire s'est fortement développée ces dernières années. Les cuves vinicoles connaissent également cette évolution puisque les résines époxydiques sont actuellement très employées comme revêtement intérieur. Certaines odeurs et goûts anormaux se manifestent quelquefois dans les vins, aussi, dans le but de protéger le consommateur, l'étude de l'inocuité des plastiques vis à vis de l'aliment est rapidement apparue comme indispensable.

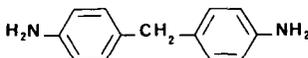
Les formulations de résine que nous avons étudiées à base d'épichlorhydrine et de bisphénol A étaient réticulées par une amine aromatique, la méthylènedianiline. Ces monomères n'étant pas dénués d'une certaine toxicité¹, il était important de pouvoir évaluer leur migration dans le vin².

Notre travail a eu pour but essentiel de mesurer ces migrations³. Afin de faciliter les analyses des composés migrants, les recherches ont été menées, selon les directives de la CEE⁴, sur des simulants dont la composition est supposée représenter le vin. Pour chacun des monomères constitutifs de la résine (Fig. 1), nous avons mis au point une méthode de dosage sensible, reproductible et spécifique. Ces méthodes sont décrites dans cet article.

EPICHLORHYDRINE



METHYLENEDIANILINE



BISPHENOL A

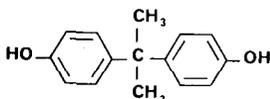


Fig. 1. Monomères constitutifs des résines époxydiques.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique (Merck). Les liquides utilisés en chromatographie liquide haute performance (HPLC) sont filtrés sur une membrane Millipore 0.45 μm puis dégazés par sonication avant l'utilisation.

*Matériels**Chromatographie liquide haute performance*

L'appareil utilisé est un chromatographe en phase liquide Varian série 5000 équipé d'une vanne d'injection à boucle de 10 μl et d'un détecteur fluorimétrique Shimadzu RF530 de capacité de cellule 12 μl . Les chromatogrammes sont enregistrés et intégrés par le modèle Varian CDS401 de la série Vista.

Analyse de la méthylènedianiline. Nous utilisons une colonne Merck RP-18 (250 \times 4 mm I.D., 7 μm) protégée par une précolonne Merck RP-18 18-GU. La phase mobile est constituée par un mélange acétonitrile-tampon phosphate 0.05 M à pH 8.15-eau (37:20:43). L'analyse est effectuée à 30°C.

Analyse du bisphénol A. Deux colonnes LiChrospher 100 RP-8 (Merck, 250 \times 4 mm I.D., 5 μm) sont montées en série. Elles sont protégées par une précolonne LiChrocart 100 RP-8 (Merck, 5 μm). La phase mobile est constituée par un mélange eau-acétonitrile (55:45). L'analyse est effectuée à 20°C.

Chromatographie en phase gazeuse (CPG), détecteur à ionisation de flamme

Le dosage est effectué à l'aide d'une chromatographe en phase gazeuse Dani 3800 HR 2CH équipé d'un enregistreur Servotrace type P.E. La séparation est réalisée par une colonne Carbowax 1540 à 10% sur Chromosorb W AW 60, 80 mesh (7.5 m \times 3 mm I.D.). Le gaz vecteur est de l'azote avec un débit de 60 ml/min. La température de la colonne est de 130°C. L'injecteur est porté à une température de 180°C et le détecteur à 150°C.

TABLEAU I
CARACTÉRISTIQUES DES ÉPROUVETTES

Surface des éprouvettes enduites (m ²)	0.046
Masse de résine appliquée (g)	104.00
Épaisseur moyenne de la résine (μm)	1000
Volume de simulant (l)	0.700

Expérimentation

Les expériences ont été menées sur des éprouvettes enduites de résines époxydiques et mises au contact de simulants. Les caractéristiques de ces éprouvettes sont données dans le Tableau I. Les simulants utilisés sont répertoriés dans le Tableau II. Les éprouvettes immergées dans les simulants sont conservées à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les analyses des monomères ont été effectuées au cours du temps, pendant plusieurs mois.

Méthodes

Méthylènedianiline (MDA)

Nous avons utilisé plusieurs méthodes d'analyse pour le dosage de la MDA. Les méthodes colorimétriques^{5,6} sont peu sensibles et surtout ne sont pas spécifiques de ce composé. Plusieurs systèmes de chromatographie sur couche mince ont été proposés dans la littérature pour la séparation et l'identification des amines⁷⁻¹⁰ (Tableau III). Parmi les révélateurs proposés, la fluoescamine a montré, après extraction^{6,7,11}, la meilleure sensibilité. Mais, cette technique ne nous permet pas d'atteindre une sensibilité supérieure à 2 ppm.

De même, nous n'avons pas retenu CPG après injection directe des simulants avec les détecteurs classiques (ionisation de flamme) la sensibilité atteinte n'est pas suffisamment élevée¹²⁻¹⁵ (Tableau IV).

HPLC permet une bonne séparation des amines, et dans les conditions opératoires choisies, une injection directe des solutions sans extraction préalable, est

TABLEAU II
COMPOSITION DES SIMULANTS ÉTUDIÉS

Alcool éthylique 10% (v/v)	} dans l'eau
Alcool éthylique 12.5% (v/v)	
Alcool éthylique 15% (v/v)	
Alcool éthylique 20% (v/v)	
Alcool éthylique 25% (v/v)	
Acide tartrique à 3 g/l dans l'eau	
Acide tartrique à 3 g/l dans l'alcool éthylique à 15%	
Glycérol à 7 g/l dans l'eau	
Acide tartrique à 3 g/l et glycérol à 7 g/l dans l'alcool éthylique à 15%	
Sucre à 20 g/l dans l'eau (fructose à 10 g/l et glucose à 10 g/l)	
Glycérol à 7 g/l et sucre à 2 g/l dans l'alcool éthylique à 15%	
Acide acétique à 3 g/l dans l'eau	

TABLEAU III
ANALYSES DES AMINES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

<i>Bibl.</i>	<i>Solvant de migration</i>	<i>Révélateur</i>	<i>Sensibilité</i>
7	Benzène-acétone (10:6) Acétate de méthyle-chloroforme (1:1 ou 2:1) Acétate de méthyle-toluène- <i>n</i> -hexane (2:1:1) Acétate de méthyle-toluène-chlorure de méthyle (2:1:1)	Réduction par SnCl ₂ puis pulvérisation de fluorescamine. Lire en fluorescence (excitation: 405 nm, émission: 495 nm).	5 ng/spot de flunitrazepam
8	Non indiqué	SeO ₂ à 3% dans l'eau, sécher 15 min à 120°C, puis pulvériser du phénol à 1% dans Na ₂ CO ₃ à 20%, sécher 20 min à 120°C, pulvériser HCl. Changement de couleur jusqu'à 48 h.	1 à 2 µg d'aniline
9	Hexane-méthyl tertiobutyl éther (1:1)	Fluorescamine dans le 1,2-dichloroéthylène. Lire en fluorescence.	50 ng d'amine primaire
10	Benzène-acide acétique (9:1) Benzène-acide acétique-méthanol (8:1:1) Acide acétique-acétate d'éthyle-isopropyl éther (4:5:5) Benzène Benzène-cyclohexane (5:5)	Exposition aux vapeurs nitreuses puis pulvérisation de 1-naphthylamine. ou pDMAB dans du méthanol acétique.	Non indiqué

TABLEAU IV
ANALYSES DES AMINES PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE

<i>Bibl.</i>	<i>Colonne</i>	<i>Technique</i>	<i>Sensibilité</i>
12	10% en poids de Dexsil 300GC sur ABS Anachrom 80-90 mesch, 0.3 m × 2.5 mm I.D., colonne siliée	Colonne: 200°C Injecteur: 265°C Gaz vecteur: hélium Débit: 35 ml/min Ionisation de flamme	2 ppm
13	3% OV-1 sur Gas Chrom Q 100-120 mesch, 1.9 m × 3.5 mm I.D., colonne en verre	Colonne: 240°C Injecteur: 250°C Gaz vecteur: hélium Débit: 60 ml/min Ionisation de flamme	50 ppm
14	3% OV-17 sur Chromosorb W AW DMCS 100-120 mesch, 2 m × 2 mm I.D.	Colonne: 200°C Injecteur: 250°C Argon-méthane (95:5) Débit: 20 ml/min Capture d'électron	0.1 ppm
15	Phase non polaire SP-2100, capillaire 25 m × 0.2 mm I.D. ou Phase non polaire SE-30 capillaire 30 m × 0.25 mm I.D.	Colonne: 60 à 270°C (20°C/min) puis 270°C Injecteur: 200°C Gaz vecteur: hélium Débit: 20 p.s.i. Spectrométrie de masse	200 ppt

possible. La détection électrochimique¹⁶⁻¹⁸, si elle est efficace et sensible (1 ppb), n'est pas spécifique des amines, ainsi des molécules à groupement phénols peuvent être détectés simultanément¹⁷. La dérivation des amines I et II par le phénylisocyanate permet aussi d'avoir une bonne sensibilité par une détection UV, mais l'eau et les alcools produisent des interférences¹⁹. C'est pourquoi, nous nous sommes tournés vers la technique de dérivation de l'amine par la fluorescamine^{9,20,21}. La réactivité de la fluorescamine est importante à l'égard des amines primaires, mais aussi pour d'autres composés nucléophiles; seules les amines primaires donnent des complexes fluorescents^{20,21}. La spécificité de la réaction, sa facilité de mise en oeuvre et la

TABLEAU V
INFLUENCE DU pH SUR LA FLUORESCENCE DU COMPLEXE MDA-FLUORESCAMINE

<i>pH</i>	<i>% de MDA retrouvé</i>
3	38
6	94
7	99
8	100
9	100
10	57

sensibilité obtenue, nous ont fait opter pour cette méthode d'analyse: dérivation précolonne par la fluorescamine puis HPLC avec détection fluorimétrique.

La réaction de dérivation d'une amine par la fluorescamine est dépendante du pH. Pour la MDA, la réaction est optimale aux alentours de pH 8 (Tableau V).

En milieu aqueux, la réaction de formation du dérivé entre la fluorescamine et l'amine primaire étant compétitive avec la réaction de désactivation hydrolytique²⁰, nous avons vérifié sur des concentrations de MDA comprises entre 10 et 150 ppb que l'addition de 10–100 μ l de la solution de fluorescamine à 2 mg/ml n'entraînait pas de variation de la fluorescence. De plus, nous avons contrôlé que le complexe MDA–fluorescamine était stable plus d'une heure.

Technique. La dérivation s'effectue comme suit: 2 ml de la solution à analyser + 0.4 ml de tampon pH 8 (tampon phosphate *M*/1.5) + 20 μ l d'une solution de fluorescamine à 2 mg/ml dans l'acétone (stable 12 semaines²⁰); 30 s d'agitation mécanique et 5 min de temps de réaction. Le complexe MDA–fluorescamine ainsi formé, est détecté pour une longueur d'onde d'émission de 510 nm et une longueur d'onde d'excitation de 399 nm.

Le temps de rétention de la MDA est de 6 min (Fig. 2). Des impuretés de la MDA sont détectées, mais à l'heure actuelle, seule l'aniline a été identifiée (t_R 4.4 min). Le dosage est effectué par un étalonnage externe.

Épichlorhydrine (ECH)

CPG est une méthode de choix pour doser l'épichlorhydrine en raison de sa grande volatilité. Le Tableau VI regroupe les principales données de quelques méthodes CPG proposées dans la littérature^{22–24}. Pour notre part, nous avons utilisé une technique par CPG avec un détecteur à ionisation de flamme après injection directe de nos simulants.

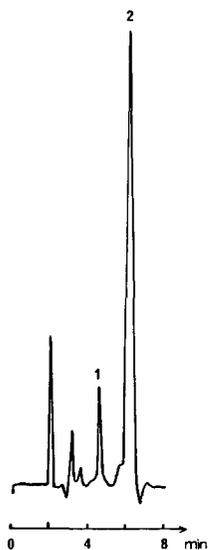


Fig. 2. Chromatogramme (HPLC–détection fluorimétrique) d'une solution contenant. 1 = Aniline, 2 = méthylènedianiline.

TABLEAU VI

ANALYSES DE L'ÉPICHLORHYDRINE PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE

<i>Bibl.</i>	<i>Colonne</i>	<i>Technique</i>	<i>Sensibilité</i>
22	3% OV-17 sur Gas Chrom Q, 100-120 mesh, 2 m × 4 mm I.D.	Colonne: 60°C Injecteur: 150°C Ionisation de flamme Spectrométrie de masse	5 ppm (sang) 50 ppb (sang)
23	PEGs UltraBond, 100-120 mesh, 3 m × 2 mm I.D.	Colonne: 80°C 8 min puis 32°C/min Injecteur: 200°C Ionisation de flamme	2 ppm
24	0.2% Carbowax 1500 sur Carbopack C, 80-100 mesh, 1.5 m × 0.3 mm I.D.	Colonne: non indiqué Injecteur: 100°C Spectrométrie de masse	3 ppb

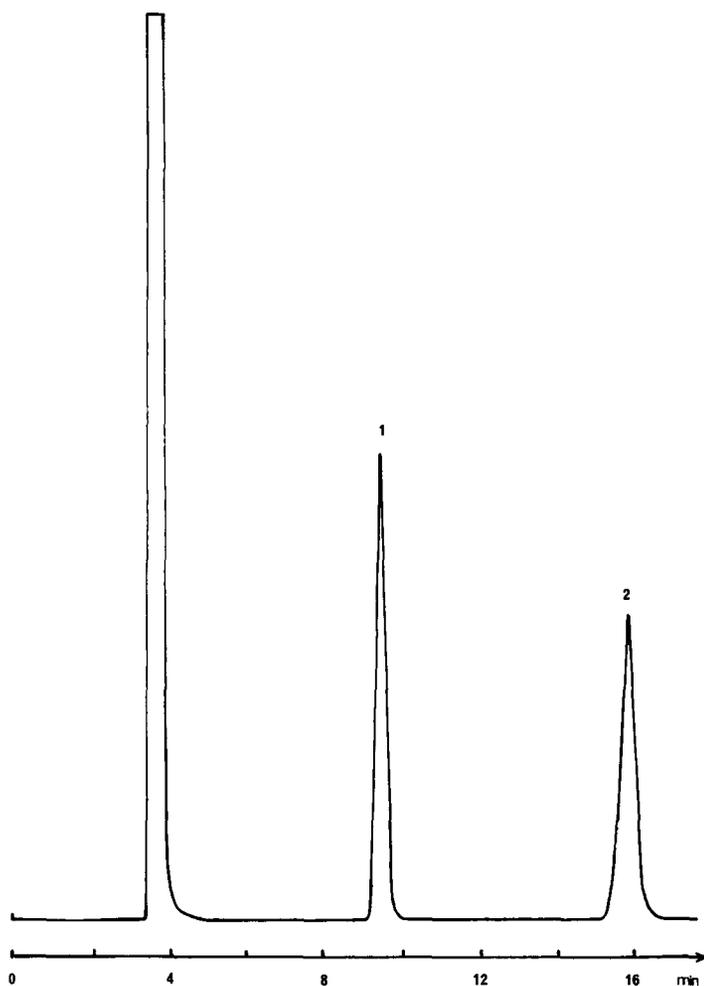


Fig. 3. Chromatogramme (CPG-ionisation de flamme) d'une solution contenant. 1 = Épichlorhydrine; 2 = cyclohexanonc.

Technique. Le dosage est effectué grâce à un étalon interne: la cyclohexanone. Dans les conditions opératoires décrites, le temps de rétention de l'ECH est de 9.6 min et celui de l'étalon interne 15.9 min (Fig. 3).

Bisphénol A (BPA)

De très nombreuses techniques pour le dosage des phénols ont été décrites dans la littérature. Revillon²⁵ et Tesarova et Pacakava²⁶ passent en revue de nombreuses techniques chromatographiques utilisées à l'heure actuelle. Nous avons appliqué au BPA une technique de dosage dérivée de celle du dosage du phénol dans un vin²⁷. Dans le cas particulier des simulants, l'extraction préalable est inutile. En effet, HPLC avec une détection fluorimétrique assure un dosage sensible après injection directe. De plus, cette méthode d'analyse nous permet de mettre en évidence la présence d'autres molécules à groupements phénols telles que le phénol et les crésols (tous impuretés de synthèse du BPA).

Technique. Le dosage est effectué par un étalonnage externe. La fluorescence du BPA est détectée pour une longueur d'onde d'émission de 300 nm et d'excitation de 275 nm.

La Fig. 4 représente le chromatogramme obtenu après injection d'un mélange de phénol, crésols et bisphénol A. Les temps de rétention sont les suivants: Phénol, 4.3 min; *m,p*-crésol, 5.3 min; *o*-crésol, 5.6 min; BPA, 6.9 min.

RÉSULTATS

Méthylènedianiline

La sensibilité est de 2 ppb pour la MDA et de 1 ppb pour l'aniline. La linéarité de la variation de la réponse du détecteur (aire des pics) en fonction de la variation des concentrations en MDA a été vérifiée pour des concentrations comprises entre 2 et 150 ppb. La droite de régression linéaire a pour équation:

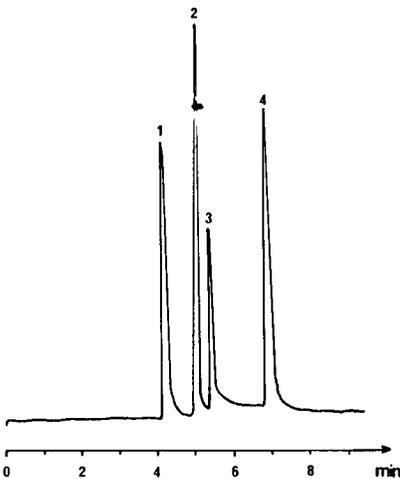


Fig. 4. Chromatogramme (HPLC-détection fluorimétrique) d'une solution contenant. 1 = Phénol; 2 = *m,p*-crésols; 3 = *o*-crésol; 4 = bisphénol A.

TABLEAU VII
RÉPÉTABILITÉ DES DIFFÉRENTES MÉTHODES PROPOSÉES

<i>Monomère</i>	<i>Teneur</i>	<i>Coefficients de variation (%)</i>
MDA	13 ppb	15
	26 ppb	4
	130 ppb	1
ECH	7 ppm	4.5
	70 ppm	5
	450 ppm	1
BPA	15 ppb	3
	100 ppb	2.5
	300 ppb	5

$$S \text{ (unité de surface)} = 65.26 C \text{ (ppb)} - 51.45$$

Le coefficient de corrélation est de 0.9994.

La répétabilité de la méthode proposée a été étudiée sur cinq analyses à différents points de la gamme. Nous donnons dans le Tableau VII quelques valeurs des coefficients de variation.

Épichlorhydrine

La sensibilité de la méthode est de 0.2 ppm. La linéarité a été testée jusqu'à 500 ppm. La droite de régression linéaire a pour équation:

$$H \text{ (rapport des hauteurs de pics ECH/étalon interne)} = 0.8767 C \text{ (ppm)} - 0.0149$$

Le coefficient de corrélation est de 0.9998. La répétabilité est indiquée dans le Tableau VII. Elle a été testée sur cinq analyses.

Bisphénol A

La sensibilité est de 2 ppb pour le BPA et de 10 ppb pour le phénol et les crésols. La linéarité a été testée jusqu'à 400 ppb. La droite de régression linéaire a pour équation:

$$S \text{ (unité de surface)} = 19.093 C \text{ (ppb)} + 0.6093$$

Le coefficient de corrélation est de 0.9999. La répétabilité est acceptable (Tableau VII).

APPLICATIONS

Les techniques décrites ci-dessus, nous ont permis d'analyser les simulants que nous avons mis au contact de différentes résines époxydiques dans des conditions expérimentales précises³. Nous rapportons, à titre d'exemple, les valeurs extrêmes que nous avons retrouvées dans les simulants pour chacun des monomères. les con-

centration retrouvées dans les simulants ont toutes été exprimées en mg de monomères libérés par kg de résine mise en oeuvre.

Méthylènedianiline

Les quantités de MDA libre retrouvées dans les simulants vont de 0 à 7.6 mg/kg de résine. Les analyses des simulants par la méthode proposée ont permis, en outre, de mettre en évidence la présence de l'aniline (valeur maximale mesurée: 0.65 mg/kg) et de quatre autres amines non encore identifiées à ce jour.

Epichlorhydrine

Nous n'avons pas retrouvé ce monomère dans les simulants, vraisemblablement en raison de son temps de demi-vie faible²⁸ que nous avons confirmé par nos propres essais³ [7.5 jours en milieu alcoolique à 10% (v/v) et 4.5 jours en milieu acide acétique à pH 3].

Bisphénol A

Les concentrations varient entre 0 et 30 mg/kg de résine mise en oeuvre. De la même façon que pour la MDA, des impuretés telles que le phénol (retrouvé jusqu'à 15 mg/kg de résine) et les crésols (jusqu'à 400 mg/kg) ont été mises en évidence.

Ainsi, des quantités non négligeables de monomères peuvent migrer dans les simulants. Ceci montre bien l'importance de l'étude de ces migrations pour prévenir des accidents toxicologiques ou des problèmes d'altération des vins.

RÉSUMÉ

Dans notre région, le vin est souvent stocké dans des cuves revêtues de résines époxydiques, à base de méthylènedianiline, d'épichlorhydrine et de bisphénol A. Afin d'étudier la migration éventuelle des monomères résiduels dans le vin, nous avons mis au point une technique d'analyses chromatographiques pour le dosage, dans les simulants du vin, de chacun des trois monomères de base utilisés. La méthylènedianiline et le bisphénol A ont été dosés par chromatographie liquide haute performance et l'épichlorhydrine par chromatographie gazeuse. Les méthodes proposées sont sensibles et reproductibles.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 N. I. Sax, *Dangerous Properties of Industrials Materials*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1979.
- 2 J. R. Bell, *Food Chem.*, 8 (1982) 157.
- 3 M. Larroque, *Thèse Doct. Sc. Pharmac.*, Université de Montpellier I, Montpellier, 1988, en préparation.
- 4 G. Haesen et A. Schwarze, *Commission of European Communities, EUR 5979 EN*, Community Reference Bureau in Luxembourg, 1978.
- 5 E. Rinde et W. Troll, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 542.
- 6 S. K. Dangwal, V. T. Kadam et B. M. Jethani, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 39 (1978) 1019.
- 7 P. Haefelfinger, *J. Chromatogr.*, 111 (1975) 323.
- 8 S. C. Mitchell et R. H. Waring, *J. Chromatogr.*, 151 (1978) 249.
- 9 H. G. Nowicki, *J. Chromatogr.*, 211 (1981) 304.
- 10 K. Yasuda, *J. Chromatogr.*, 60 (1971) 144.
- 11 J. Breiter, R. Helger et H. Lang, *Forensic Sci.*, 7 (1976) 131.
- 12 S. K. Yasuda, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 283.

- 13 J. Schulze, C. Ganz et D. Parkes, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 171.
- 14 F. K. Kawahara, J. R. Dunn, R. A. Fiutem et P. J. McCullough, *Anal. Chim. Acta*, 138 (1982) 207.
- 15 R. E. Hurst, R. L. Settine, F. Fish et E. C. Roberts, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 2175.
- 16 R. M. Riggan et C. C. Howard, *Anal. Chem.*, 51 (1979) 210.
- 17 D. N. Armentrout et S. S. Cutie, *J. Chromatogr. Sci.*, 18 (1980) 370.
- 18 P. J. Vantulder, C. C. Howard et R. M. Riggan, *ACS Symp. Ser.*, 149 (1981) 413.
- 19 B. Björkqvist, *J. Chromatogr.*, 204 (1981) 109.
- 20 S. DeBernado, M. Weingele et V. Toone, *Arch. Biochem. Biophys.*, 163 (1974) 390.
- 21 J. V. Castell, M. Cervera et R. Marco, *Anal Biochem.*, 99 (1979) 37.
- 22 L. DePetrocellis, M. Tortoreto, S. Paglialonga, R. Paesani, L. Airoidi, E. Ramos Castaneda et C. Pantarotto, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 218.
- 23 A. H. Ullman et R. Houston, *J. Chromatogr.*, 211 (1981) 398.
- 24 J. B. H. VanLierop, *J. Chromatogr.*, 166 (1978) 609.
- 25 A. Revillon, *Spectra 2000*, 68 (1981) 11.
- 26 E. Tesarova et V. Pacakova, *Chromatographia*, 17 (1983) 269.
- 27 M. Larroque, L. Vian et A. Blaise, *J. Chromatogr.*, 407 (1987) 384.
- 28 O. Von Piringer, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 76 (1980) 11.