

CHROM. 22 614

## Application de la dérivation par l'isocyanate de phényle à l'analyse chromatographique de molécules phénoliques (antioxydants)

A. BAILLET\*, S. RAKOTOMANGA, D. FERRIER et F. PELLERIN

Centre d'Études Pharmaceutiques, Laboratoire de Chimie Analytique, Rue J. B. Clément, 92296 Chatenay-Malabry Cedex (France)

(Reçu le 30 janvier 1990; manuscrit modifié reçu le 6 juin 1990)

---

### ABSTRACT

*Application of derivatization with phenylisocyanate to chromatography of phenolic compounds (antioxydants)*

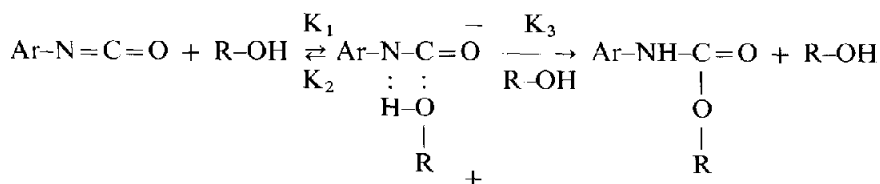
Phenylisocyanate reactivity towards compounds with mobile hydrogen (active hydrogen) has been applied to phenolic antioxidants, usually found in plastic polymers. The first part of this work studies the kinetics and the reaction mechanism in order to optimize its parameters. This method was then applied to the reversed-phase liquid chromatographic analysis of several phenolic antioxidants. The phenylcarbamates formed are detectable at 230 nm and the detection limit is lowered by a factor 5-10, depending on the compound, compared to direct detection at 280 nm.

---

### INTRODUCTION

Les uréthanes et les urées substituées, issus de la réaction d'addition entre l'isocyanate de phényle et les composés hydroxylés ou aminés, sont des dérivés stables et présentent un coefficient d'absorbance élevé dans le domaine de l'ultra-violet. Cette réaction a donc été appliquée à la détection et au dosage par chromatographie en phase liquide, d'amines aliphatiques [1,2], d'alcools [3-5], d'eau [6] et de sucres [7].

Baker et Holdsworth [8,9] ont été parmi les premiers à étudier le mécanisme d'addition des isocyanates d'aryle sur les alcools et ont déterminé l'ordre de la cinétique réactionnelle (ordre 2):



Plus récemment, Satchell et Satchell [10] ont explicité les mécanismes de réaction

entre les composés à hydrogène actif (alcools, acides, amines, eau ...) et le groupement carboxyle électrophile des isocyanates.

L'objet de ce travail a pour but le développement d'une méthode sensible pour la détermination de traces d'antioxydants phénoliques utilisés dans les matériaux plastiques: Irganox 1010, Irganox 1076, Ionox 330 et Goodrite 3114 (Fig. 1). Le travail comprend deux parties: la première consiste en l'étude de la cinétique et du mécanisme de la réaction qui aboutit, dans la deuxième partie, à la détermination des paramètres de la dérivation fixant les conditions optimales en vue de l'analyse chromatographique des dérivés formés.

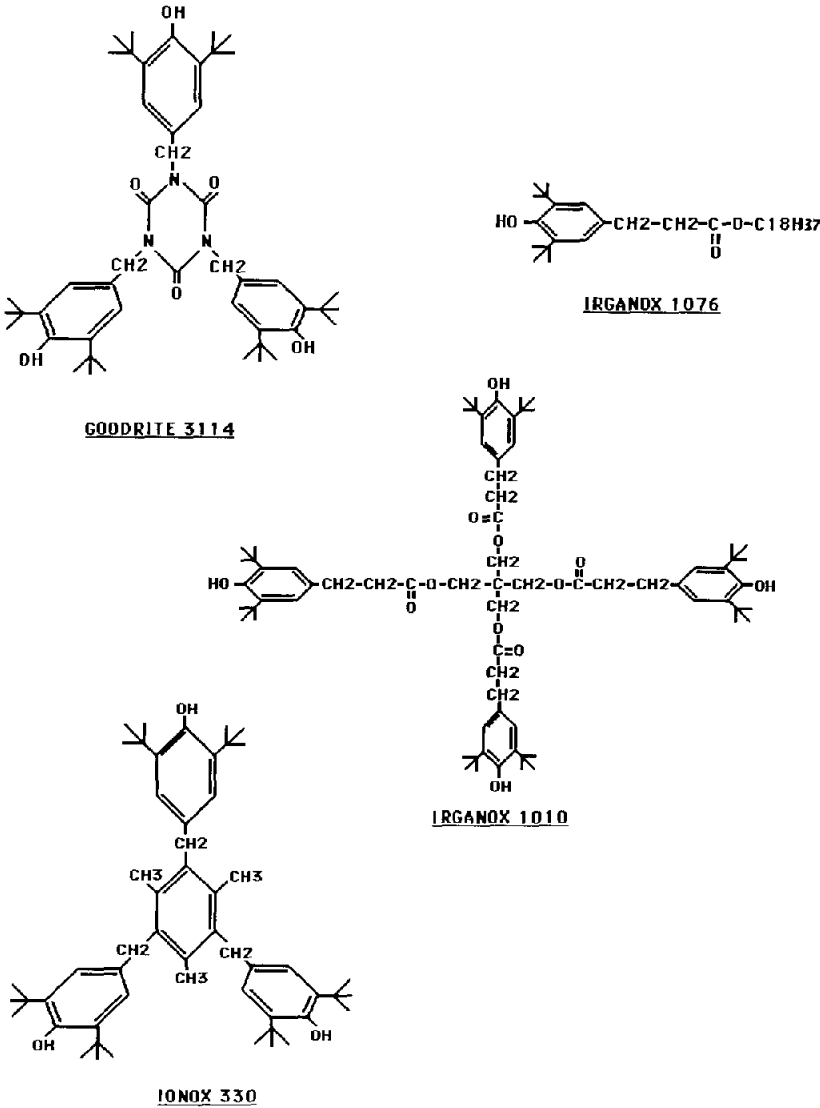


Fig. 1. Formules chimiques des antioxydants phénoliques étudiés.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Appareillage*

L'ensemble chromatographique est constitué d'une pompe Chromatem 380 (Touzart et Matignon, Vitry sur Seine, France) équipée d'un injecteur à boucle Rheodyne de 20  $\mu\text{l}$  (Touzart et Matignon), d'un détecteur spectrophotométrique UV Shimatzu SPD 2 (Touzart et Matignon) et d'un enregistreur Kipp & Zonen BD-40 (Cunow, Cergy St. Christophe, France).

La colonne chromatographique (250 mm  $\times$  4 mm I.D.) est remplie de silice greffée octadecyle LiChrosorb RP-18 (Merck, Nogent sur Marne, France) de 7  $\mu\text{m}$  de diamètre nominal.

La structure des phénylcarbammates d'aryle formés est analysée à l'aide d'un spectrophotomètre UV SP8-100 (Pye-Unicam, Cambridge, Angleterre) et d'un spectrophotomètre IR 295 (Perkin Elmer, ZI de Courtabœuf, France).

*Réactifs*

La phase éluante est un mélange d'acétonitrile (R.S. pour HPLC, Carlo-Erba, Milan, Italie), d'eau bidistillée filtrée sur filtre de 0.22  $\mu\text{m}$  de porosité (Millipore, St. Quentin en Yvelines, France) et de tétrahydrofurane (J. T. Baker Chemicals, Deventer, Pays-Bas).

L'isocyanate de phényle a été obtenu chez Prolabo (Paris, France).

Les antioxydants phénoliques ont été fournis par Ciba-Geigy (Rueil Malmaison, France) pour le Goodrite 3114, l'Irganox 1010 l'Irganox 1076 et l'Ionox 330.

*Synthèse des phénylcarbammates d'aryle témoins*

Dans des tubes scellés de 10 ml, mettre en contact chacun des antioxydants phénoliques en solution dans l'acétonitrile avec l'isocyanate de phényle, dans un rapport molaire 1: x dans lequel:

$x = 1.1$  pour les composés monophénoliques (Irganox 1076);

$x = 3.3$  pour les composés triphénoliques (Goodrite 3114-Ionox 330);

$x = 4.4$  pour les composés tétraphénoliques (Irganox 1010).

Laisser en contact pendant 12 h au bain marie à 50°C. Evaporer sous pression réduite jusqu'à sécheresse. Laver le résidu sec par 10 ml d'heptane puis sécher à l'étuve à 50°C. Reprendre le résidu sec par l'acétonitrile jusqu'à dissolution complète. Filtrer la solution ainsi obtenue sur filtre papier et concentrer à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite. Les phénylcarbammates d'aryle précipitent.

La formation des groupements phénylcarbammates a été vérifiée par spectrophotométrie UV et IR ainsi que par chromatographie en phase liquide: (i) disparition du maximum d'absorption UV à 280 nm caractéristique du noyau phénolique; (ii) disparition de la bande de vibration des hydroxyles phénoliques à 3650  $\text{cm}^{-1}$  et apparition de nouvelles bandes de vibration des fonctions C=O et NH respectivement vers 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  et 3400  $\text{cm}^{-1}$ ; (iii) diminution du temps de rétention chromatographique par rapport à celui du composé initial.

*Étude de la dérivation*

Dans une fiole jaugée de 25 ml, introduire 25 mg d'un antioxydant phénolique puis 24.5 ml d'acétonitrile. Après 10 min dans un bain marie thermostaté à 25°C (pour

TABLEAU I  
COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE EN FONCTION DE L'ANTIOXYDANT ÉTUDIÉ

Antioxydant	Composition de la phase mobile			Débit (ml/min)
	Acétonitrile (%)	Eau (%)	Tétrahydrofuranne (%)	
Irganox 1076	75	0	25	1.2
Goodrite 3114	95	5	0	1.8
Ionox 330	75	5	20	1.4
Irganox 1010	75	5	20	1.5

l'Irganox 1010, l'Ionox 330 et l'Irganox 1076) ou réglé à 50°C (pour le Goodrite 3114), ajouter 0.5 ml d'isocyanate de phényle puis replacer immédiatement la fiole au bain marie et déclencher le chronomètre. A chacun des temps fixés, prélever 0.5 ml du milieu réactionnel et l'introduire dans un tube à hémolyse contenant 0.1 ml de méthanol pour arrêter la réaction et détruire l'excès d'isocyanate de phényle. La solution est ainsi stabilisée et peut être conservée à +4°C pendant plusieurs jours.

#### *Conditions chromatographiques*

Les solutions ainsi obtenues sont injectées directement dans le système chromatographique, afin de suivre la cinétique de dérivation. La colonne chromatographique est maintenue à température ambiante. L'élution s'effectue en mode isocratique à l'aide d'une phase mobile dont la composition quantitative et le débit dépendent de chacun des antioxydants phénoliques étudiés et sont regroupés dans le Tableau I.

Les longueurs d'onde du spectrophotomètre sont fixées à 280 et 230 nm afin de suivre simultanément la disparition de l'antioxydant phénolique et la formation du ou des phénylcarbammates d'aryle formés.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### *Cinétique de la dérivation*

La cinétique de dérivation a tout d'abord été étudiée sur le composé le plus simple, monophénolique, l'Irganox 1076 (Fig. 2A). En présence d'un large excès de réactif, l'apparition du dérivé se fait à partir du composé initial selon une loi exponentielle. A température ambiante, la réaction se développe lentement et elle est totale au bout de 65 min de contact.

Plusieurs molécules polyphénoliques ont été ensuite étudiées:

*Le Goodrite 3114.* Il possède un noyau isocyanurate sur lequel sont greffés trois noyaux phénoliques substitués. La cinétique de dérivation est présentée dans Fig. 2B. L'apparition du produit final est précédée de la formation de deux composés intermédiaires mono- et di-dérivés. La réaction est totale au bout de 95 min de contact à température ambiante.

*L'Ionox 330.* La formule chimique est proche de celle du Goodrite 3114, le noyau cyanurate étant remplacé par un noyau triméthylbenzène. Lors de la dérivation, il

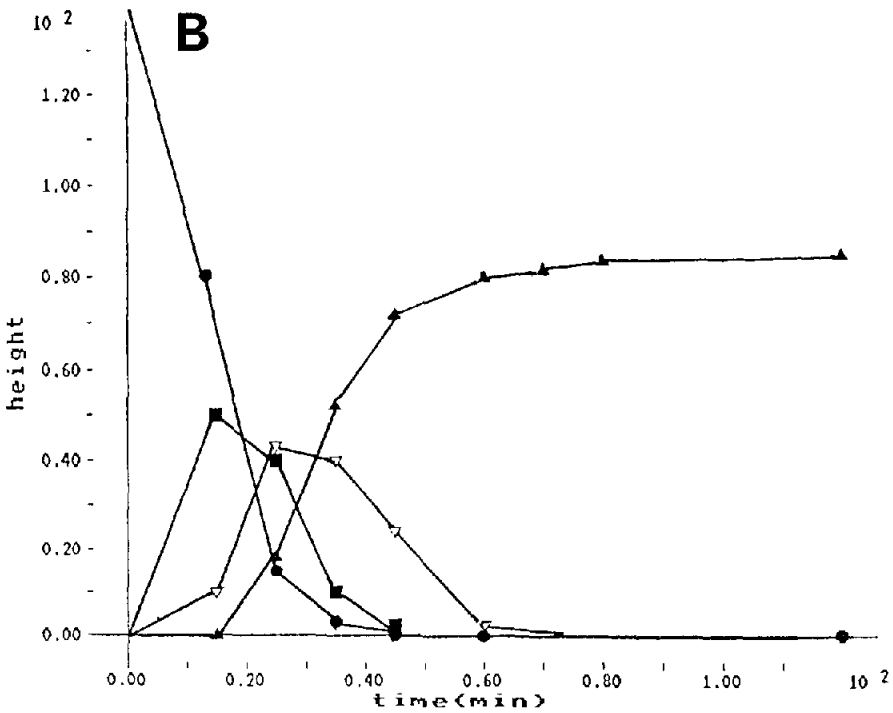
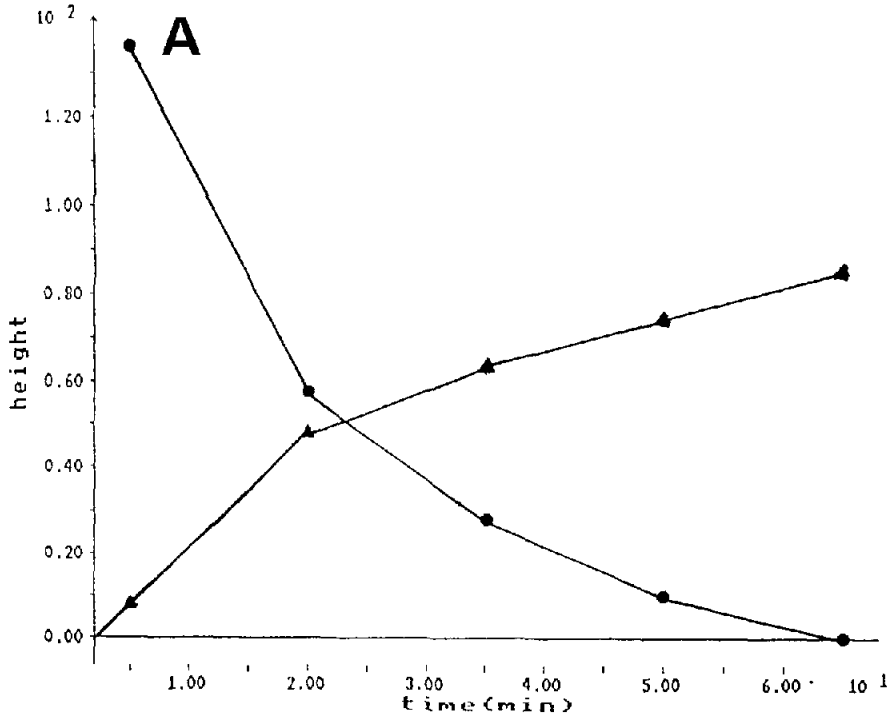


Fig. 2.

(Continué sur la p. 342)

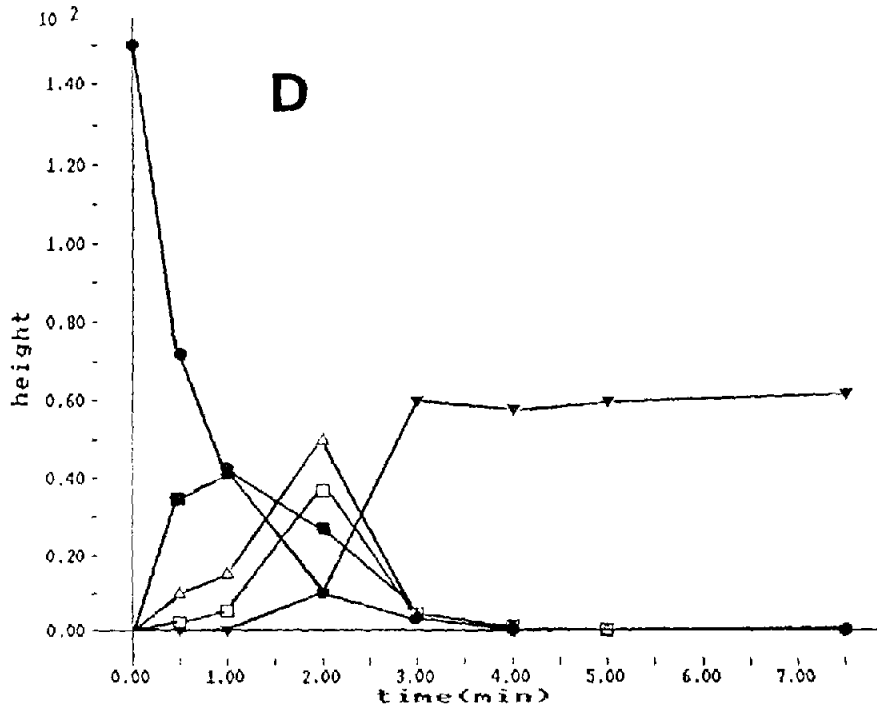
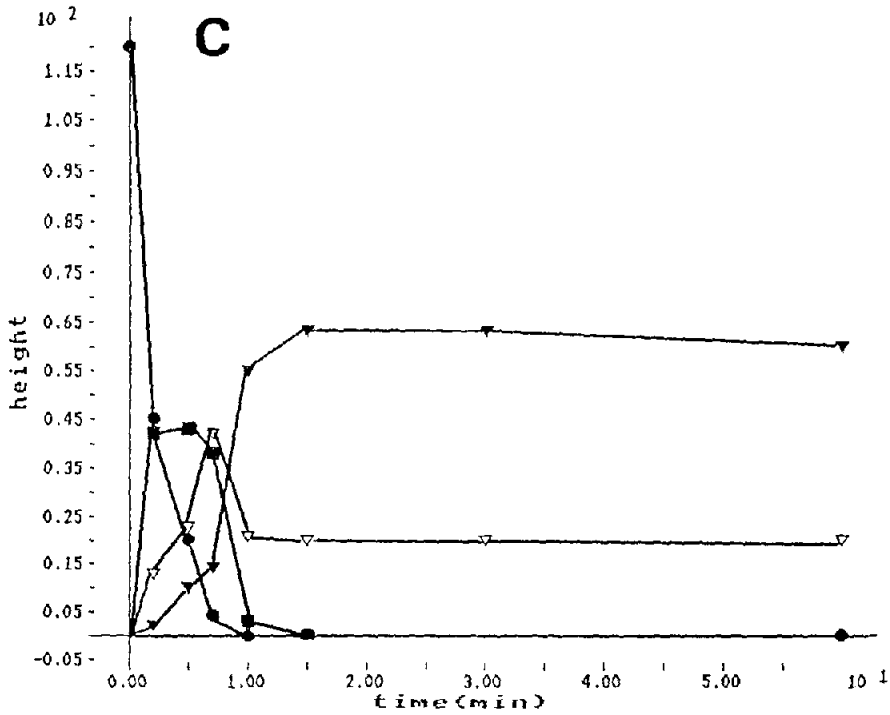


Fig. 2. Cinétique de la réaction de dérivaison des antioxydants à 280 nm. (A) ● = Irganox 1076; ▲ = Irganox 1076 dérivé. (B) ● = Goodrite 3114; ■ = Goodrite 3114 mono-dérivé; ▽ = Goodrite 3114 di-dérivé; ▲ = Goodrite 3114 tri-dérivé. (C) ● = Ionox 330; ■ = Ionox 330 mono-dérivé; ▽ = Ionox 330 di-dérivé; ▼ = Ionox 330 tri-dérivé. (D) ● = Irganox 1010; ■ = Irganox 1010 mono-dérivé; ▼ = Irganox 1010 di-dérivé; □ = Irganox 1010 tri-dérivé; △ = Irganox 1010 tétra-dérivé.

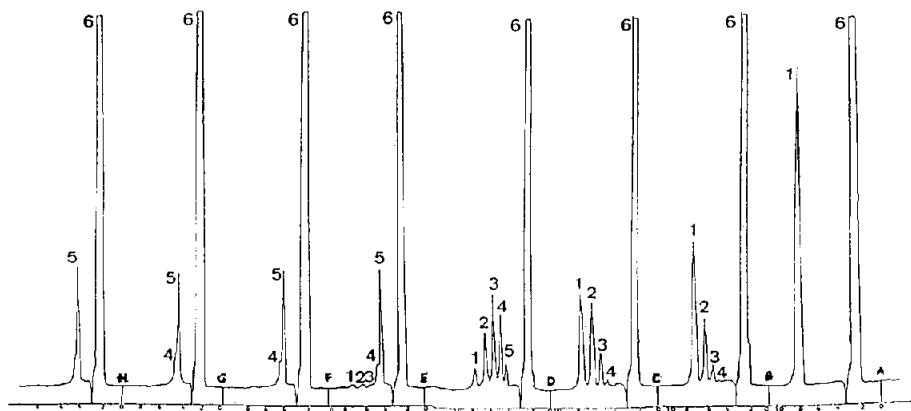


Fig. 3. Chromatogramme des dérivés formés successivement au cours de la réaction entre l'Irganox 1010 et l'isocyanate de phényle. Phase stationnaire: colonne  $C_{18}$  250  $\times$  4 mm I.D.; phase mobile: acétonitrile-tétrahydrofurane-eau distillée (75:20:5, v/v/v); débit 1.5 ml/min, 280 nm, atténuation 0.32, papier 5 mm/min. Temps de réaction: (A) 0 min; (B) 0.5 min; (C) 1 min; (D) 2 min; (E) 3 min; (F) 4 min; (G) 5 min; (H) 7.5 min. Pics: 1 = Irganox 1010; 2 = Irganox 1010 mono-dérivé; 3 = Irganox 1010 di-dérivé; 4 = Irganox 1010 tri-dérivé; 5 = Irganox 1010 tétra-dérivé; 6 = réactif en excès.

apparaît également deux composés intermédiaires mono- et di-dérivés. Cependant la réaction n'est pas totale à 25°C; il se produit un équilibre entre les formes di- et tri-dérivées et la réaction n'évolue plus après 15 min de contact (Fig. 2C).

*L'Irganox 1010.* Il est caractérisé par quatre groupements phénoliques. En moins de 5 min, le rendement maximal de la dérivation est atteint à température ambiante. Trois composés intermédiaires mono-, di- et tri-dérivés sont formés avant d'aboutir au composé final (Figs. 2D et 3).

Les cinétiques de dérivation ont été déterminées à température ambiante afin d'en définir toutes les étapes; les résultats montrent que les composés dérivés sur l'ensemble des groupements phénoliques peuvent être obtenus à 25°C après un temps de contact plus ou moins important selon la structure des composés étudiés.

#### Mécanisme de la dérivation

Deux facteurs régissent la cinétique de dérivation des composés phénoliques dérivés du di-*tert.*-butyl-3',5'-hydroxy-4'-benzène: facteur stérique et facteur électronique.

Pour les effets stériques considérés isolément, plus l'encombrement de l'hydrogène est grand (plus les groupements alkyles en *ortho* sont volumineux), plus la réaction est lente.

La contribution de l'effet électronique des groupements alkyles situés en *ortho*, en raison de leur effet inducteur +1, se traduit par une mobilité accrue de l'hydrogène du groupement phénolique. La vitesse de la réaction est d'autant plus rapide que l'effet électrodonneur est plus important.

Dans le cas des antioxydants phénoliques utilisés dans les matériaux plastiques, tous possèdent deux groupements *tert.*-butyl en position 3' et 5' et donc un encombrement stérique équivalent. Seul l'effet électronique du substituant en position 1' (en *para* du groupement phénolique) peut modifier la cinétique de la réaction.

L'isocyanate de phényle réagit avec l'Irganox 1076 selon une cinétique de 2ème ordre (Fig. 2A), probablement selon un mécanisme similaire à celui proposé par MacFarland et Gaskins [11].

Dans le cas des antioxydants polyphénoliques, l'isocyanate de phényle dérive successivement toutes les fonctions phénoliques. Ceci explique l'apparition de composés intermédiaires. La vitesse de la réaction évolue différemment selon la structure de l'antioxydant. En effet, pour le Goodrite 3114, il existe deux effets électroniques antagonistes; d'une part, les groupements *tert.*-butyl favorisent le départ de l'hydrogène du groupement phénolique, d'autre part, le noyau isocyanurate, par les effets électroattracteurs du carbonyle et de l'azote, tend à l'effet inverse. Au contraire, pour l'Ionox 330, les groupements *tert.*-butyl ainsi que le noyau triméthylbenzène favorisent la réactivité de l'hydrogène mobile. Cependant la réaction n'est pas totale à 25°C; un équilibre se forme entre les deux formes di- et tri-dérivées, qui peut être déplacé en faveur de la formation du composé terminal par augmentation de la température de contact.

Pour l'Irganox 1010, l'effet électronique est très intense car le substituant en *para* du groupement phénolique est important, ce qui augmente la mobilité de l'hydrogène du groupement phénolique et explique la cinétique rapide de la dérivaison.

#### *Analyse chromatographique et détection*

Afin d'homogénéiser les conditions opératoires d'une analyse de routine tout en assurant une dérivaison totale des antioxydants susceptibles d'être présents dans un matériau plastique, nous avons fixé les conditions de la dérivaison à: 0.5 mg/ml d'antioxydant + 0.5 ml d'isocyanate de phényle; température 70°C; temps de contact 30 min; addition de méthanol 0.5 ml.

L'analyse chromatographique, par comparaison avec les temps de rétention des substances témoins, montre que les conditions de dérivaison conduisent à la formation des composés totalement dérivés.

Les conditions chromatographiques proposées ont été mises en œuvre pour le suivi de dérivaison mais elles sont tout à fait adéquates à l'analyse chromatographique des antioxydants après dérivaison complète. Les produits secondairement formés dans le milieu réactionnel (issus des réactions de l'isocyanate de phényle avec le méthanol et les traces d'eau présentes dans les solvants utilisés) sont plus polaires et de masses

TABLEAU II  
QUANTITÉ MINIMALE DÉTECTABLE DES ANTIOXYDANTS ÉTUDIÉS

Antioxydant	Détection		
	Avant dérivaison 280 nm (ng)	Après dérivaison	
		280 nm (ng)	230 nm (ng)
Irganox 1076	50	80	3
Goodrite 3114	10	16	1
Ionox 330	6	12	0.4
Irganox 1010	8	20	1



moléculaires plus faibles que les antioxydants étudiés dérivés ou non; ces produits apparaissent sous forme d'un pic important au début du chromatogramme et n'altèrent donc pas la spécificité de l'analyse.

Les antioxydants phénoliques présentent deux maxima d'absorption en UV situés vers 230 et 280 nm. Après dérivation, les phénylcarbammates d'aryle correspondants présentent un maximum d'absorption situé vers 230 nm, avec augmentation du coefficient d'absorbance. En effet, si la dérivation n'améliore pas la selectivité de la détection, elle augmente la sensibilité d'un facteur 5-15 selon l'antioxydant considéré (Tableau II).

#### *Applications*

La technique analytique décrite, du fait de sa sensibilité et de sa fiabilité de mise en œuvre, trouve des applications dans la recherche de traces d'antioxydants phénoliques. A titre d'exemple, l'Irganox 1010 a été identifié dans du polyéthylène haute densité qui constitue le conditionnement primaire de nombreuses solutions

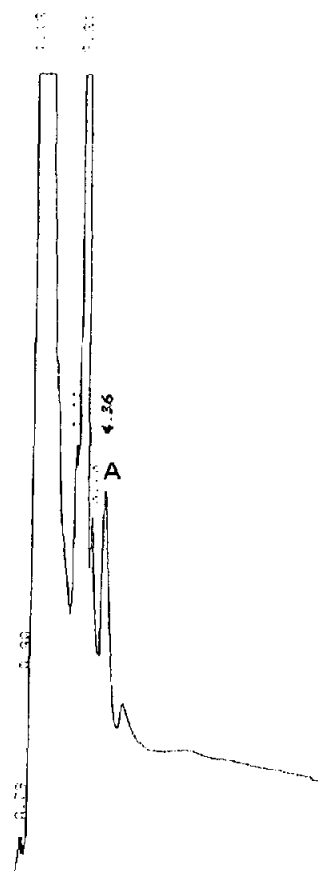


Fig. 4. Application à la recherche d'Irganox 1010 dans un conditionnement en polyéthylène haute densité. Conditions opératoires *cf.* texte. (A) Irganox 1010 tétra-dérivé.

d'intérêt pharmaceutique: après dissolution du matériau plastique par l'hexane au bain marie bouillant à reflux et précipitation par le méthanol, le surnageant contenant les additifs est filtré sur filtre papier et la solution obtenue est évaporée à sec. Le résidu est repris par 1 ml d'acétonitrile. La dérivation est ensuite réalisée selon les conditions opératoires précédemment décrites; le chromatogramme obtenu (Fig. 4) met en évidence l'Irganox 1010 tétradérivé correspondant à une teneur en Irganox 1010 voisine de 260  $\mu\text{g}$  par g de matériau. Ainsi le procédé permet de détecter des traces d'antioxydants phénoliques migrant des conditionnements plastiques vers les produits pharmaceutiques ou cosmétiques (interactions contenant-contenu).

En outre, l'étude de la cinétique de dérivation permet, en examinant le nombre de dérivés intermédiairement formés, de définir le nombre de groupements phénoliques présents après traitement chimique ou par irradiation des matériaux plastiques [12]: cette technique peut donc apporter une contribution à l'étude du mécanisme d'action des antioxydants phénoliques en tant qu'agents de protection.

## CONCLUSION

L'isocyanate de phényle, d'un emploi facile malgré une certaine toxicité, s'est ainsi révélé un réactif de dérivation particulièrement intéressant. Ce réactif, couplé aux techniques chromatographiques, est applicable à l'étude de nombreuses molécules: de façon similaire aux travaux entrepris sur les antioxydants phénoliques, la connaissance de la cinétique réactionnelle de l'isocyanate de phényle avec d'autres molécules peut permettre de moduler les paramètres entrant dans la réaction de dérivation en vue de diverses applications dont la détermination de groupements fonctionnels (en étudiant le nombre de dérivés intermédiairement formés) et le dosage chromatographique avec amélioration de la détection (ceci nécessitant soit une dérivation complète, soit la formation d'un dérivé majoritaire).

## RÉSUMÉ

La réactivité de l'isocyanate de phényle vis à vis de composés à hydrogène mobile a été utilisée sur les antioxydants phénoliques habituellement rencontrés dans les matériaux plastiques. La première partie de ce travail consiste en l'étude de la cinétique et du mécanisme de la réaction, afin d'en optimiser les paramètres. Cette méthode a ensuite été appliquée à l'analyse des antioxydants phénoliques par chromatographie en phase liquide à polarité de phases inversée. Les phénylcarbammates d'aryle obtenus sont détectables à 230 nm et la quantité minimale détectable est diminuée, selon les composés étudiés, d'un facteur 5 à 15 par rapport à la détection directe à 280 nm.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 B. Björkqvist, *J. Chromatogr.*, **204** (1981) 109–114.
- 2 K. Anderson, C. Hallgren, J. O. Levin and K. A. Nilsson, *J. Chromatogr.*, **312** (1984) 482–488.
- 3 B. Björkqvist and H. Toivonen, *J. Chromatogr.*, **153** (1978) 265–270.
- 4 P. Polge, *Dérivation avec les Réactifs Isocyaniques et Isothiocyaniques; Application au Dosage Chromatographique de Molécules Hydroxylées et Aminées*, DEA Pharmacochimie, Université Paris XI, Paris, 1985, p. 95.
- 5 C. Isfan, A. Isfan and D. Munteanu, *Rev. Chim.*, **36** (1985) 60–62.

- 6 B. Bjorkqvist and H. Toivonen, *J. Chromatogr.*, 178 (1979) 271–276.
- 7 B. Bjorkqvist, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 65–71.
- 8 J. W. Baker and J. B. Holdsworth, *J. Chem. Soc.*, (1947) 713–726.
- 9 J. W. Baker, *J. Chem. Soc.*, (1949) 9–24.
- 10 D. P. N. Satchell and R. S. Satchell, *Chem. Soc. Rev.*, 4 (1975) 231–250.
- 11 J. W. MacFarland and S. P. Gaskins, *J. Org. Chem.*, 37 (1972) 99–102.
- 12 C. Majcherczyk, P. Polge, D. Baylocq and F. Pellerin, *Talanta*, 33 (1986) 985–989.