ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DE L'URETHANE DANS LES VINS (*)

G. WALKER [1], W. WINTERLIN, H. FOUDA [2] et J. SEIBER

[1] Département de Toxicologie de l'Environnement, Université de Californie, DAVIS, Californie 95616 (U.S.A.)

[2] Drug Metabolism, Pfizer Inc., GROTON, Connecticut 06340 (U.S.A.).

INTRODUCTION

Le pyrocarbonate d'éthyle a été largement utilisé en tant qu'additif alimentaire dans un but de contrôle microbiologique des boissons, alcoolisées ou non (PAULI et GENTH, 1966 ; FISCHER, 1970 ; GEJVALL et LOFROTH, 1971). Récemment, cependant, LOFROTH et GEJVALL (1971) ont montré, au moyen de l'analyse par dilution isotopique de pyrocarbonate d'éthyle marqué par le tritium, que cet additif était susceptible de former de l'uréthane ou carbamate d'éthyle, substance cancérigène déjà connue (NETTLESHIP et **al.**, 1943 ; MIRVISH, 1968). Les essais poursuivis par LOFROTH et GEJVALL (1971) ont prouvé que, dans les conditions du laboratoire, les 5 à 128 mg d'azote ammoniacal par litre contenus dans les vins blancs et les bières étudiés (MUTH et MALSH, 1934 ; BISHOP, 1943) étaient susceptibles d'entrer en réaction avec le pyrocarbonate d'éthyle ajouté (de 280 à 560 mg par litre) ; on obtenait ainsi entre 1,3 et 2,6 mg d'uréthane par litre. Cette réaction est influencée par le pH du milieu. A la suite de ces résultats, les industriels ont arrêté tout emploi du pyrocarbonate d'éthyle dans l'attente de précisions sur les teneurs en uréthane formées au cours de l'élaboration des produits ; étant donné que l'on considère l'uréthane comme cancérigène, les moindres teneurs détectées sont susceptibles de tomber sous le coup de la clause Delaney et d'interdire l'emploi du pyrocarbonate d'éthyle dans les produits alimentaires aux Etats-Unis.

Le but du présent travail est le suivant : mettre au point une méthode de détection des faibles teneurs en uréthane pour les analyses en série et étudier quantitativement la formation d'uréthane dans diverses conditions (OUGH, 1974).

(*) Traduit et publié avec l'autorisation de **Journal of Agricultural and Food Chemistry, 22,** 944 (1974). Copyright by American Chemical Society.

PARTIE EXPERIMENTALE

REACTIFS.

Solvants : Soit au préalable distillés deux fois, soit achetés dans le commerce (niveau de pureté « qualité pesticide ») ; seul l'éther éthylique anhydre (Mallinkrodt) a été utilisé en l'état.

Uréthane : Eastman Kodak pF. 48-50 °C.

Florisil : Floridin Co., qualité PR 60-100 mesh, utilisé en l'état.

Antimousse : Hodag Chemical Corp., type FD62, dilué au 1/50 avec de l'eau désionisée.

Anhydride trifluoroacétique : Aldrich Chemical Co., utilisé en l'état.
Solution tampon pH 7 : Mallinkrodt, Buff AR, utilisé en l'état.

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

On couple un chromatographe Varian Aerograph Modèle 550 HyFI à un conductivimètre Coulson (Tracor Inc.) ; la modification à apporter à l'installation consiste à allonger la colonne de verre à l'extérieur du chromatographe pour la coupler au bloc de sortie chauffée du conductivimètre.

Le chromatographe est équipé d'un programmateur de température Varian Aerograph modèle 328 et d'une colonne en verre de 188 cm de long et de 3 mm de diamètre intérieur ; elle est remplie de gas-chrom Q de 80 à 100 mesh enrobé d'un mélange à 10 p. 100 de OV-17 et 5 p. 100 de Carbowax 1540, solubilisés dans le chloroforme.

Les températures de la colonne, de l'injecteur et du bloc de pyrolyse sont maintenues constantes, respectivement à 140, 200 et 800 °C.

La température du bloc de jonction colonne-bloc de pyrolyse, ainsi que celle du bloc de sortie chauffée est de 220 °C. Le gaz vecteur est l'hélium, avec un débit de 50 ml par minute, comme celui de l'hydrogène.

Pour l'étude des dérivés, on utilise un chromatographe Varian Aerograph modèle 1700, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme

alcaline doppée au sulfate de rubidium ; la colonne de verre, de 132 cm de long et de 2 mm de diamètre intérieur, est remplie de Chromosorb G, 100-120 mesh, lavé aux acides et traité par le DMCS, enrobé de 5 p. 100 de OV-225. Les températures de la colonne, de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 100, 188 et 210 °C. Le gaz vecteur est l'azote, avec un débit de 20 ml par minute ; les débits d'hydrogène et d'air sont respectivement de 25 et 200 ml par minute. De temps en temps on fait subir à ces valeurs de légères variations pour conserver la meilleure réponse à des injections de 100 nanogrammes de trifluoroacétyluréthane.

EXTRACTION.

On place 100 ml de vin blanc ou rouge dans une ampoule à décanter ; on ajoute 15 g de NaCl que l'on dissout par légère agitation et 0,5 ml d'anti-mousse. On ajoute alors 100 ml de chloroforme et, en évitant toute émulsion, on agite doucement pendant au moins deux minutes pour obtenir une extraction complète de l'uréthane ; le chloroforme est ensuite filtré à travers 30 g de sulfate de sodium. On répète l'extraction 2 à 3 fois avec, chaque fois, 50 ml de chloroforme. On rince enfin le sulfate de sodium avec 20 ml de ce même solvant.

L'ensemble des extraits, placé dans un ballon à fond rond, est concentré par ébullition sous colonne de Snyder à trois boules ; le volume est ramené à 10 ml, en évitant d'aller à sec. On refroidit ce concentrat, auquel on ajoute le chloroforme utilisé pour rincer la colonne de Snyder (5 fois 1 ml).

PURIFICATION DE L'EXTRAIT AU MOYEN DU FLORISIL.

On prépare une colonne à chromatographie de 15 mm de diamètre et de 10 cm de long dans laquelle on introduit 5 g de Florisil et 1,5 cm de sulfate de sodium anhydre ; on lave préalablement le tout par 25 ml de chloroforme que l'on élimine.

On procède alors à la percolation de l'extrait précédent, suivie par trois rinçages successifs de chloroforme de 5 ml chacun ; on termine par un dernier lavage avec 200 ml du même solvant. L'ensemble est collecté dans un ballon à fond rond ; on y ajoute 50 ml d'acétate d'éthyle et l'on concentre comme précédemment par évaporation à chaud sous colonne de Snyder à trois boules enveloppée d'aluminium jusqu'à obtention d'un volume supérieur ou égal à 5 ml.

On refroidit cet extrait auquel on ajoute les volumes d'acétate d'éthyle de rinçage (5 fois 1 ml) ; on le place ensuite, avec l'acétate d'éthyle de rinçage du ballon, dans un tube à concentration de 10 ml (Kontes K 569 251) ; on concentre, à chaud, jusqu'à 3 ml et par barbottage d'azote jusqu'à 0,5 ml. Il est indispensable de travailler avec le plus grand soin tout au long des diverses étapes de la concentration de l'extrait, car c'est au cours de cette phase que se produisent la plupart des pertes.

PREPARATION DES DERIVES EN VUE DE L'IDENTIFICATION.

Dans la fiole jaugée de 25 ml contenant une solution de 1 g d'uréthane dans 23 ml d'acétate d'éthyle, on ajoute 1,25 ml d'anhydride trifluoroacétique et 0,25 ml de pyridine. On agite rapidement et on place la fiole dans un bain thermostaté à 70 °C pendant 30 minutes. On refroidit et on procède à l'extraction, dans une ampoule à décanter, par trois fois 25 ml de solution tampon à pH 7. La couche d'acétate d'éthyle est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec par barbottage d'azote ; on obtient un liquide limpide et incolore qui cristallise spontanément.

On procède à deux recristallisations successives dans le mélange éther-pentane. On obtient finalement 0,7 g de trifluoroacétyluréthane, solide incolore fondant à 85 °C.

PREPARATION DES DERIVES A MICROÉCHELLE.

Dans une fiole jaugée de 10 ml on introduit 1 ml d'acétate d'éthyle contenant 1 mg d'uréthane, auquel on ajoute 25 µl d'anhydride trifluoroacétique et 0,25 ml de pyridine ; on laisse la réaction se poursuivre pendant 30 minutes dans un bain thermostaté à 70 °C ; on ajoute ensuite 4 ml de solution tampon à pH 7, on agite et on laisse décanter ; on verse alors ce mélange dans une ampoule à décanter de 30 ml avec l'acétate d'éthyle de rinçage (plusieurs fois 1 ml). La phase aqueuse inférieure est éliminée et le surnageant lavé une nouvelle fois avec la solution tampon ; on fait enfin passer la phase acétate d'éthyle à travers une petite quantité de sulfate de sodium anhydre et on le recueille dans une fiole jaugée ; l'acétate d'éthyle de rinçage subit le même traitement ; enfin, on ajuste le volume à 10 ml avec une nouvelle addition du même solvant.

Les extraits obtenus à partir de boissons sont traités de cette même façon ; l'extrait purifié, correspondant à 100 ml d'échantillon et mélangé à 1 ml d'acétate d'éthyle, est également placé dans une fiole jaugée de

10 ml et additionné de 25 µl d'anhydride trifluoroacétique ; le volume final, avant injection, est atteint en évaporant avec précaution le solvant dans un tube à sédimentation de Mc Naught et Mc Kay-Shevsky-Stafford par barbottage d'azote.

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

Après purification sur colonne de Florisil, les échantillons contenant de l'uréthane à l'état libre sont injectés directement dans le chromatographe équipé du conductivimètre Coulson, après les dilutions appropriées en fonction des teneurs des échantillons.

Le dosage est réalisé en mesurant, par planimétrie, la surface des pics et en la comparant à celle des pics témoins correspondants d'uréthane, dans la gamme de 5 à 40 nanogrammes et avec une atténuation de 2. Le pic correspondant à 40 nanogrammes, avec cette valeur d'atténuation, donne une réponse égale à 90 p. 100 de celle obtenue à pleine échelle.

Le dérivé trifluoroacétylé de l'uréthane est injecté directement dans le chromatographe équipé du détecteur à ionisation alcaline de flamme. On établit une courbe étalon de 20 à 160 nanogrammes (100 p. 100 de réponse à pleine échelle) avec l'atténuation de 2×10^{-12}.

Ces valeurs sont suffisantes pour détecter la présence d'uréthane à des concentrations de 100 microgrammes par litre ; l'extrapolation de la courbe étalon permet éventuellement de doser des teneurs inférieures.

L'utilisation d'un détecteur à capture d'électrons donne, pour le dérivé trifluoroacétylé recristallisé, une réponse linéaire dans la gamme de 1 à 10 nanogrammes. Bien que ce détecteur soit bien plus sensible que celui à flamme alcaline, le bruit de fond obtenu avec les échantillons traités est trop élevé pour qu'on puisse l'utiliser ici.

RESULTATS ET DISCUSSION

Parmi les facteurs qui conditionnement le seuil de détection dans le cas de l'analyse de traces, la bonne purification de l'échantillon à analyser constitue l'un des plus importants. La chromatographie sur colonne de Florisil permet d'obtenir une purification convenable dans le cas de l'injection de l'équivalent de 1 ml de vin. Il existe également un autre moyen de purification donnant de bons résultats : il consiste en l'utilisation de

silice, placée dans une pipette Pasteur (KADOUM, 1967) et d'un mélange d'élution composé d'acétate d'éthyle et de benzène (8 p. 100 v/v). La colonne de Florisil permet cependant de mieux éliminer les substances qui interfèrent ; c'est donc elle que nous avons choisi ; on a également utilisé les deux types de colonnes en série mais cela n'apporte aucun avantage supplémentaire.

On a également tenté d'utiliser des colonnes pour chromatographie gaz-liquide afin de mieux séparer l'uréthane des autres substances qui, dans le vin, interfèrent. Pour Réoplex 400, Versamid 900 et AN 600, une certaine sortie de phase stationnaire de la colonne entraîne un important bruit de fond dans le conductivimètre Coulson.

Certaines autres phases liquides telles que OV 101, DC 200, OV 225, PDEAS, Dexsil 300 GC, Apiezons L et N et le mélange commercial SP 2250 - SP 2401, permettent de « sortir » le pic de l'uréthane avec un tailing plus ou moins important. Le mélange OV 17 - Carbowax 1540 donne une bonne résolution et une réponse convenable avec un tailing minimum.

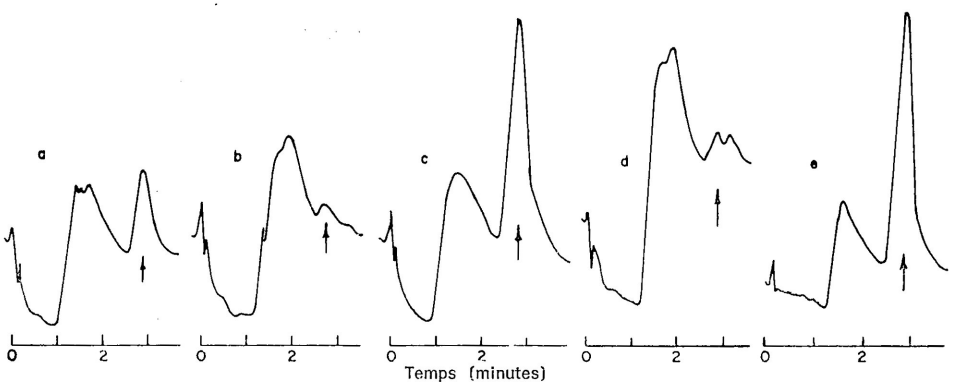


Fig. 1 .— Chromatogrammes en phase gazeuse avec utilisation du conductivimètre Coulson :
a - Injection de 5 nanogrammes d'uréthane.
b - Injection de 1 g de vin blanc témoin.
c - Injection de 1 g de vin blanc témoin additionné de 100 microgrammes d'uréthane.
d - Injection de 1 g de vin rouge témoin.
e - Injection de 1 g de vin rouge témoin additionné de 100 microgrammes d'uréthane.

On a testé plusieurs moyens de détection : ionisation de flamme, alcaline ou non, capture d'électrons, conductivimétrie Coulson ; seul ce dernier donne de bons résultats, dus principalement à sa spécificité vis-à-vis de composés azotés comme l'uréthane et à sa facilité de mise en œuvre (COULSON, 1966 ; PATCHETT, 1970). Les détecteurs non spécifiques tels que la capture d'électrons ont un seuil de détection plus faible avec les solutions d'uréthane témoin mais un bruit de fond trop élevé pour une utilisation courante dans le cas des vins.

Les figures 1 b et 1 d montrent des chromatogrammes caractéristiques de vins témoins (injection 1 µl avec une atténuation de 2). Le second petit pic correspond à une substance interférente qui, extraite en même temps que l'uréthane, n'est pas éliminée par la purification.

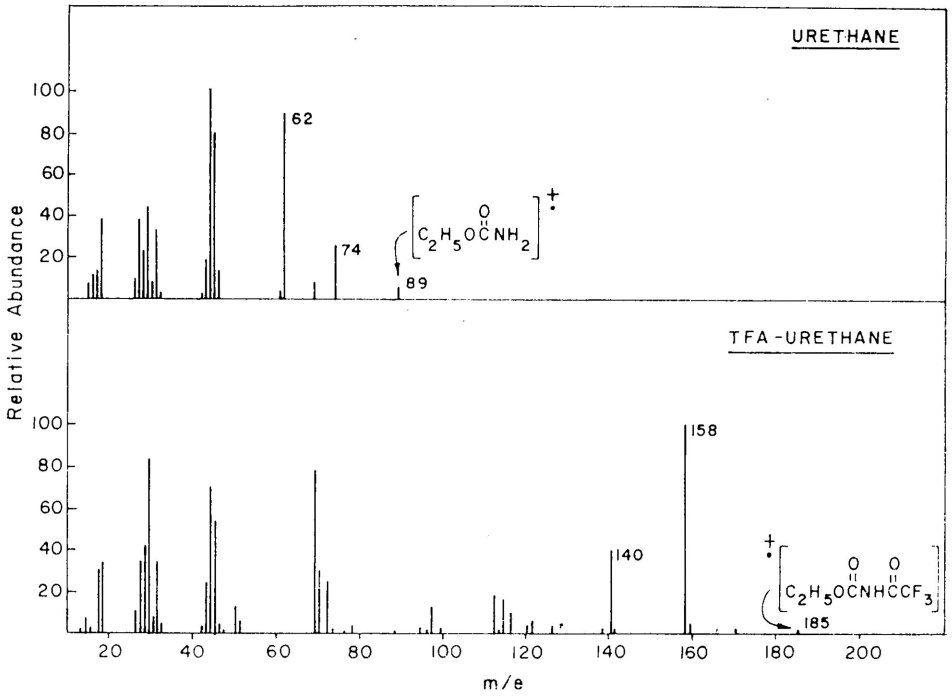


Fig. 2. — Spectres de masse d'uréthane témoin et de son dérivé trifluoroacétylé (le spectromètre utilisé est un Varian modèle M-66).

La limite inférieure de détection de l'uréthane est de 5 nanogrammes avec une atténuation égale à 2 ; dans ces conditions, on obtient un pic dont la hauteur est égale à 10 p. 100 de celle obtenue à pleine échelle (figure 1 a). Les figures 1 c et 1 e montrent les pics correspondants de vins additionnées de 100 microgrammes d'uréthane par litre ; dans ce cas, le recouvrement obtenu est compris entre 80 et 100 p. 100 ; tous les pourcentages de recouvrement ont été établis sur la base d'une courbe étalon réalisée en même temps que l'analyse elle-même. Il est toujours utile de confirmer les résultats obtenus au moyen d'une technique par la comparaison avec d'autres méthodes de détection. Dans ce but, nous avons essayé la spectrométrie de masse pour détecter, à l'état libre, l'uréthane ajouté à des vins ; dans ce cas cependant les substances interférentes présentes dans les extraits purifiés n'ont pas permis d'utiliser efficacement cette technique. Nous avons obtenu de meilleurs résultats avec la

spectrométrie de masse des dérivés trifluoroacétylés ; ils ont permis de confirmer la présence d'uréthane dans les échantillons qui en avaient préalablement reçu.

Les carbamates (SEIBER, 1972 ; SHAFIK et MONGAN, 1972 ; KHALIFA et MUMMA, 1972) et les urées (MILLER, 1971) réagissent avec l'anhydride trifluoroacétique pour donner des dérivés trifluoroacétylés utilisables pour la détection des traces. Ces dérivés sont moins polaires que les esters ou les urées ; ils sont également plus thermostables et plus sensibles à la capture d'électrons. L'avantage le plus important dans l'utilisation de ces dérivés consiste dans la modification, en chromatographie gaz-liquide, du temps de rétention. Avec notre méthode, les dérivés sont préparés à 70 °C dans l'acétate d'éthyle et en présence de pyridine puis analysés par chromatographie gaz-liquide avec détection à ionisation alcaline de flamme.

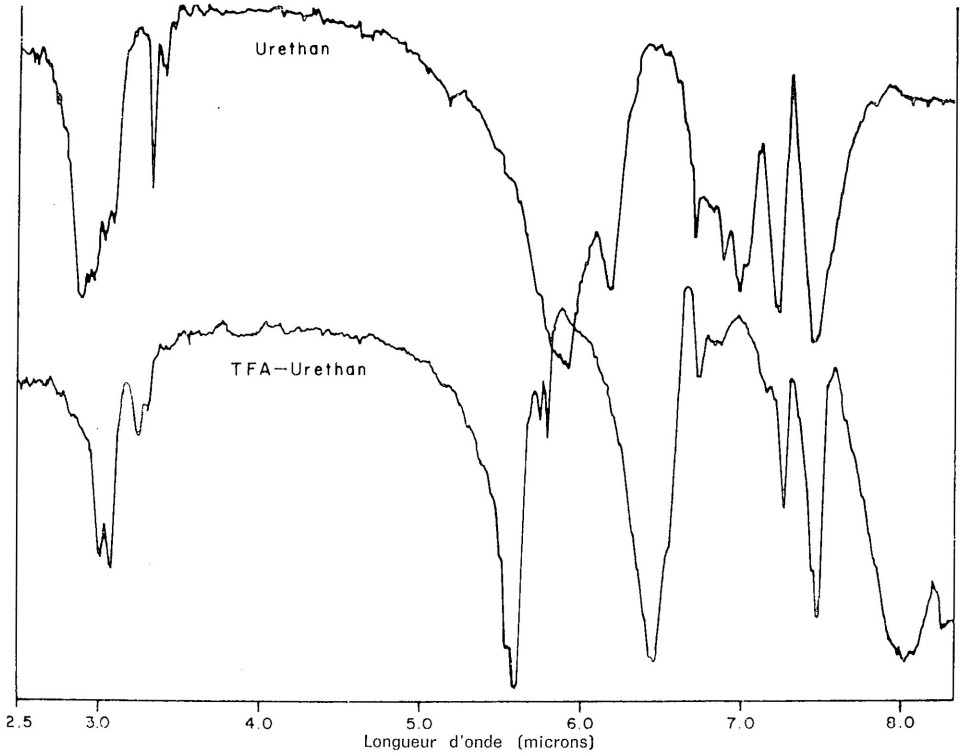


Fig. 3. — Spectres infra-rouges d'uréthane et de son dérivé trifluoroacétylé dans le bromure de potassium.

La structure du dérivé trifluoroacétylé de l'uréthane est confirmée par spectrométrie de masse (figure 2). On observe seulement un léger pic

de masse à m/e 185. De nombreux fragments peuvent être étudiés par analogie avec les spectres des N-alkylcarbamates (LEWIS, 1964). En se basant sur eux, la rupture de la liaison éthyl-CO avec transfert d'un proton donne un pic à m/e 158 ; elle est suivie d'une perte d'eau et donne une fragmentation du cation trifluoroacétylisocyanate protoné (m/e 140). La comparaison des spectres de l'uréthane libre et du dérivé trifluoroacétylé montre qu'il se produit de légères ruptures dans ce dernier par perte du groupement trifluoroacétyle et régénération de l'uréthane.

La comparaison des spectres infra-rouges de l'uréthane libre et de son dérivé trifluoroacétylé (figure 3) met en évidence des différences marquées.

La variation de l'absorption N-H, qui passe d'une bande large à 2,9 μ pour l'uréthane à un doublet aigu à 3,05 μ pour le dérivé TFA, confirme que la substitution a bien lieu sur l'azote. L'absorption caractéristique du carbonyle de l'ester, trouvée à 5,9 μ pour l'uréthane, se présente à 5,6 μ pour le dérivé. Ceci est qualitativement en accord avec les spectres de l'uréthane et du dérivé N-chloroacétylé publiés par d'autres auteurs (PIANKA et POLTON, 1960). En outre le dérivé possède une bande à 6,54 μ, absent pour l'uréthane, d'intensité presque égale à l'absorption du carbonyle. Nous l'attribuons à la vibration C = N due à la forme énolate dans le KBr, milieu dans lequel le spectre est obtenu (NAKANISHI, 1962). Le spectre IR du trifluoroacétyluréthane dans le chloroforme possède une paire de bandes d'absorption carbonyles à 5,5 μ (amide) et 5,7 μ (ester), mais aucune à 6,5 μ, ce qui indique une faible participation de la forme énolate en solution diluée.

La réaction de préparation du dérivé à microéchelle est, après 30 minutes dans les conditions précitées, pratiquement complète (98 p. 100). De plus, il n'y a aucune perte significative de dérivé au cours du lavage de la solution par le tampon à pH 7 qui élimine les excès de pyridine et d'anhydride trifluoroacétique.

Nous avons étudié deux méthodes de détection ; la capture d'électrons, à la dose limite inférieure d'environ 1 nanogramme, donne encore une réponse linéaire ; avec l'ionisation de flamme alcaline la dose limite inférieure susceptible d'être détectée est, dans le cas de solutions-témoins, d'environ 20 nanogrammes. Malgré cette différence, c'est cette dernière technique que l'on a choisie à la suite des interférences rencontrées avec la capture d'électrons.

La figure 4 montre les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse, après préparation des dérivés, d'un vin témoin et de vins additionnés de 100 microgrammes d'uréthane par litre, préalablement purifiés par passage sur Florisil. Malgré l'impossibilité d'un dosage précis, par suite d'une dérive de la ligne de base provenant d'une importante réponse du solvant, on arrive à séparer le pic du dérivé trifluoroacétylé de l'uréthane ; l'importance de ce pic est à peu près en accord avec les résultats obtenus à partir de l'uréthane libre et en utilisant, comme détection, le système chromatographie gaz-liquide — conductivimètre Coulson.

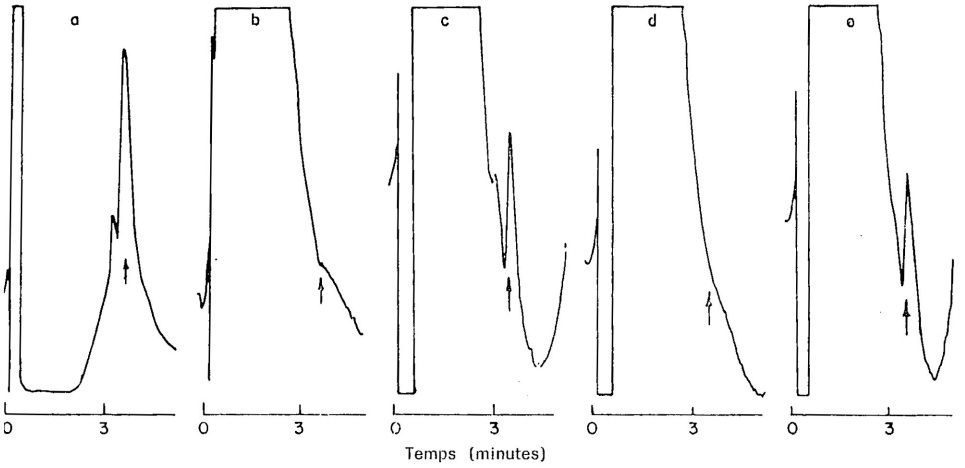


Fig. 4. — Chromatogrammes en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme alcaline de dérivés trifluoroacétylés :

a - Injection de 40 nanogrammes d'uréthane.
b - Injection de 300 mg de vin rouge témoin.
c - Injection de 300 mg de vin rouge témoin additionné de 100 microgrammes d'uréthane.
d - Injection de 300 mg de vin blanc témoin.
e - Injection de 300 mg de vin blanc témoin additionné de 100 microgrammes d'uréthane.

Les méthodes précédentes permettent de confirmer la présence d'uréthane dans les vins à des doses inférieures ou égales à 100 microgrammes par litre ; ces teneurs sont très inférieures à la fourchette de concentrations déterminée auparavant par dilution isotopique sur des boissons additionnées de pyrocarbonate d'éthyle (LOFROTH et GEJVALL, 1971). Les méthodes d'analyses que nous avons employées, comme les appareillages utilisés, facilement à la portée de ceux qui recherchent et dosent les résidus, ont été appliquées avec succès à l'analyse des vins. Avec de légères modifications cela pourrait l'être, de façon générale, à une grande quantité de boissons variées, en particulier les bières suspectes de contamination par l'uréthane.

Nous remercions M. Clay REECE qui nous a aidés à réaliser et à interpréter les spectres et M. Cornelius OUGH qui nous a procuré les vins nécessaires à cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BISHOP L.R., 1943. **J. Inst. Brew., London, 49,** 173.

COULSON D.M., 1966. **J. Gas Chromatogr., 4,** 285.

FISCHER E., 1970. **Z. Lebensm. Unters. Forsch., 142,** 31.

GEJVALL T., LOFROTH G., 1971. **Newslett. Environ. Mutagen Soc., 5,** 35.

KADOUM A.M., 1967. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2,** 264.

KHALIFA S., MUMMA R.O., 1972. **J. Agr. Food Chem., 20,** 632.

LEWIS C.P., 1964. **Anal. Chem., 36,** 1582.

LOFROTH G., GEJVALL, T., 1971. **Science, 174,** 1248.

MILLER P.W., 1971. **J. Agr. Food Chem., 19,** 941.

MIRVISH S.S., 1968. **Advan. Cancer Res., 11,** 1.

MUTH F., and MALSCH L., 1934. **Z. Lebensm. Unters. Forsch., 68,** 487.

NAKANISHI K., 1962. « Infrared Absorption Spectroscopy », Holden-Day, San Francisco, Calif., p. 46.

NETTLESHIP A., HENSHAW P.S., MEYER H.L., 1943. **J. Nat. Cancer Inst., 4,** 309.

OUGH C., 1974 University of California at Davis, résultats non publiés.

PATCHETT G., 1970. **J. Chromatogr. Sci., 8,** 155.

PAULI O., GENTH H., 1966. **Z. Lebensm. Unters. Forsch., 132,** 325.

PIANKA M., POLTON D.J., 1960. **J. Chem. Soc.,** 983.

SEIBER J.N., 1972. **J. Agr. Food Chem., 20,** 443.

SHAFIK M.T., MONGAN P.F., April 1972. 163 rd National Meeting of the American Chemical Society, Boston, Mass.