

Détection et dosage de résidus d'agents désinfectants dans les boissons et plus particulièrement dans la bière.

Ing. C. SAUSSEZ
Dr ir N. VELINGS
ISICHT-Mons

Ce projet, réalisé pour un partenaire industriel, consiste en la mise au point d'une méthode de détection et de quantification de sous-produits d'agents désinfectants (prioritairement chlore et dioxyde de chlore) dans la bière. Ce travail a été réalisé en deux parties ; une étude bibliographique des méthodes de dosage des chlorophénols dans les eaux de boissons, et ensuite la transposition d'une de ces méthodes au cas particulier qu'est la bière.

Mots clés : produits désinfectants, chlore, dioxyde de chlore, bière, chlorophénols, HPLC.

This project, realized for an industrial partner, consists of the development of a method of detection and quantification of by-products of disinfecting agents (firstly chlorine and dioxide of chlorine) in the beer. This work was realized in two parts ; a bibliographical study of the methods of dosage of chlorophenols in drinking waters, and next the transposition of one of these methods in the particular case of the beer.

Keywords : disinfecting products, chlorine, chlorine dioxide, beer, chlorophenols, HPLC.

Abréviations utilisées

CPs = Chlorophénols	HS-SPME = Headspace-Solid Phase Microextraction	MonoCp = monochlorophénols
DAD = Diode Array Detector	IARC = International Agency for Research on Cancer	MS = Mass Spectrometry
DCP = Dichlorophénols	ICPS –Inchem = International program on chemical safety – Chemical Safety Information from intergovernmental organizations	PCP = Pentachlorophénols
DL ₅₀ = Dose létale 50	INRS = Institut National de Recherche et de Sécurité en France	PDMS = Polydiméthylsiloxane
DLLME = Dispersive Liquid Liquid Microextraction	L-L = Extraction Liquide Liquide	SBSE = Stir Bar Sorpitive Extraction
EC = Electrochemical Detection	LC/ MS-MS = Liquid Chromatography / Mass Spectrometry – Mass Spectrometry	SPE = Solid Phase Extraction
EC ₅₀ = Half maximal effective concentration	LPME = Liquid Phase Microextraction	SPME = Solid Phase Microextraction
ECD = Electron Capture Detector	MASE = Membrane Assisted Solvent Extraction	TCP = Trichlorophénols
EPA = US Environmental Protection Agency	MIP-AES = Microwave Induced Plasma – Atomic Emission Spectrometry	TeCP = Tétrachlorophénols
FID = Flame Ionization Detector		USE = Ultrasonic Extraction
GC = Gas Chromatography		XAD = Amberlite d'échange ionique
HF-LPME = Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction		
HPLC = High Performance Liquid Chromatography		

1. Introduction

L'industrie alimentaire a pour exigence l'utilisation d'équipements correctement nettoyés et désinfectés. L'étape de nettoyage a pour objectif d'ôter la salissure présente sur les équipements mis au contact des aliments. La désinfection, quant à elle, a pour objet de ramener la population microbienne sous un seuil acceptable au regard du processus alimentaire concerné.

Les désinfectants sont généralement des solutions aqueuses contenant un ou plusieurs agents biocides qui sont autorisés par la législation européenne sur les biocides, appelées BPD pour « Biocidal Product Directive ». Une liste de molécules acceptées par le législateur européen est en cours d'élaboration et à chaque molécule sera associé l'ensemble des applications autorisées telles que l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique,

Tout naturellement, l'industrie de la boisson faisant partie intégrante de l'industrie alimentaire utilise des solutions désinfectantes lors des étapes de nettoyage et désinfection de leurs équipements tels que cuves, conduites ou encore soutireuses.

En Belgique, la brasserie est l'une des industries de la boisson la mieux implantée et fait très logiquement appel aux désinfectants depuis ses débuts car, nous pouvons imaginer aisément les dégâts occasionnés par la présence d'un germe non voulu lors de la fermentation du moût, de la garde (maturation) de la jeune bière voire même après la mise en bouteille. Certaines bactéries Gram positives ainsi que quelques levures sauvages peuvent être responsables de réels désastres en brasserie.

Les molécules désinfectantes couramment utilisées en industrie brassicole sont l'acide monobromoacétique, les acides gras à courtes chaînes (octanoïque et décanoïque), le mélange acide peracétique et eau oxygénée, les oxydants halogénés tels que acide hypochloreux et dioxyde de chlore et les ammoniums quaternaires.

En plus de la BPD, l'industrie alimentaire est soumise à une analyse des risques et une étude des points critiques (HACCP). Cette analyse tend à réduire les risques de contamination physique (morceaux de verre,

limailles), chimique (pesticides, désinfectants, ...) et microbiologique (pathogènes, moisissures, ...) des aliments.

Dans ce contexte, à la demande d'un producteur de produits de nettoyage et désinfectant pour l'industrie de la boisson implanté en Wallonie, SOPURA SA, le laboratoire de chimie analytique de l'ISICHT (Institut Supérieur Industriel Catholique du Hainaut) s'est penché sur la détection et le dosage de résidus d'agents désinfectants principalement dans la bière.

Très vite, une distinction entre deux grandes familles de molécules désinfectantes a dû être réalisée ; les molécules relativement stables qui devraient se retrouver comme telles dans le produit fini (acide monobromoacétique, acides gras, ammonium quaternaires, ...) et celles dont le mode d'action est basé sur une oxydation et qui dès lors mèneront à la formation de sous-produits (acide peracétique et eau oxygénée, acide hypochloreux, dioxyde de chlore, ...).

Le présent article ne portera que sur la détection et le dosage de sous-produits provenant de l'utilisation de l'acide hypochloreux ou du dioxyde de chlore. En effet, SOPURA SA souhaitait, dans un premier temps, se focaliser essentiellement sur les dérivés d'une contamination au chlore ainsi que sur l'acide monobromoacétique.

2. Revue bibliographique

2.1 Identification des sous produits

Les sous-produits formés lors d'une contamination de l'eau par un agent désinfectant chloré ont été largement étudiés. Par contre, en ce qui concerne la bière, la littérature offre peu d'éléments. Il est donc nécessaire de s'inspirer de ce qui a été observé dans l'eau pour imaginer quels sous-produits seront potentiellement formés dans la bière.

Les sous-produits connus de la désinfection aux agents oxydants chlorés de l'eau sont [5] : les trihalométhanes, les acides haloacétiques, les haloacétonitriles, les halocétones, les chlorophénols, les hydrates de chloral, les chloropicrines.

Il nous est paru opportun de sélectionner les chlorophénols comme sous-produits cibles car ils sont connus pour apporter un faux goût à la bière. Les chlorophénols ont donc un double intérêt dans le cas de la détection d'une contamination par le chlore de la bière, à savoir :

- Détecter une contamination au chlore de la bière ;
- Prévenir l'apparition de faux goûts dans la bière finie.

La formation des chlorophénols serait due à la réaction entre le chlore actif libre du produit de désinfection et les phénols présents naturellement dans la bière.

Dans l'eau, la vitesse de chloration des phénols varie avec le pH. Ceci s'explique par le fait que la vitesse est proportionnelle à la production d'acide hypochloreux et à la concentration en ions phénolates [4].

Il est à noter qu'une fraction appréciable de la réaction entre le chlore aqueux et le dichlorophénol procède par l'oxydation directe plutôt que par la substitution en trichlorophénols suivie par une oxydation. La nature exacte de ces produits d'oxydation est de faible intérêt pour nous puisqu'ils ne contribuent pas aux propriétés organoleptiques [4].

Les différentes sources potentielles de chlorophénols dans la bière sont [1] :

- Réaction entre le chlore et les phénols contenus dans la bière ;
- Les chlorophénols présents dans l'eau de brassage elle-même traitée au chlore ou au dioxyde de chlore ;
- La présence de pentachlorophénols dans les bois traités ;
- La présence de chlorophénols dans le packaging.

2.2 Généralités concernant les chlorophénols

Les chlorophénols sont des composés organiques dans lesquels un ou plusieurs atomes d'hydrogène du noyau phénolique sont remplacés par des atomes de chlore. On dénombre 19 chlorophénols :

Les monochlorophénols (CP) : 2-CP ; 3-CP et 4-CP

Les dichlorophénols (DCP) : 2,3-DCP ; 2,4-DCP ; 2,5-DCP ; 2,6-DCP ; 3,4-DCP et 3,5-DCP

Les trichlorophénols (TCP) : 2,3,4-TCP ; 2,3,5-TCP ; 2,3,6-TCP ; 2,4,5-TCP ; 2,4,6-TCP et 3,4,5-TCP

Les tétrachlorophénols (TeCP) : 2,3,4,5-TeCP ; 2,3,4,6-TeCP et 2,3,5,6-TeCP

Le pentachlorophénol = PCP

Tous les chlorophénols sont solides à température ambiante excepté les 2-chlorophénol, 4-chlorophénol et 3-chlorophénol qui sont des liquides. Les mono et dichlorophénols sont les plus volatils.

Le tableau n°1 résume les caractéristiques principales de 4 chlorophénols. Le 2-CP, le 4-CP et le 2,4-DCP sont probablement trois des chlorophénols les plus rapidement formés lors d'une contamination au chlore de la bière.

Caractéristiques	2-CP	4-CP	2,4-DCP	2,4,5-TCP
Synonymes	2-CP, 2 chloro-1-hydroxybenzene, 2 hydroxy-chlorobenzene, o-chlorophénol,	4-CP, 4-chloro-1-hydroxybenzene, 4-hydroxy-chlorobenzene, p-chlorophénol	2,4-DCP, 2,4-dichlorohydroxy-benzene	2,4,5-TCP
Formule chimique	C ₆ H ₅ ClO	C ₆ H ₅ ClO	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	C ₆ H ₃ Cl ₃ O
Numéro CAS¹	95-57-8	106-48-9	120-83-2	95-95-4
Poids moléculaire	128,56 g/mol	128,56 g/mol	163,00 g/mol	197,46 g/mol
Couleur	Orange clair	Blanc	Blanc	Gris
Etat physique	Liquide	Liquide	Solide	Solide
Point de fusion	9,3°C	43,2 à 43,7°C	45°C	67°C
Point d'ébullition	174,9°C à 760 mmHg	220°C	210°C	235°C
Densité	1,2634	1,2238	1,383	1,678
Odeur	Odeur médicale, désagréable	Odeur médicale	Odeur médicale forte	Forte odeur phénolique
Seuil d'odeur : Eau Air	0,33 µg/L 0,0189 mg/m ³	0,33 µg/L 0,0189 mg/m ³	0,35 µg/L 1,40 mg/m ³	11 µg/L Pas de données
Solubilité : Eau à 25°C Solvant organique Et autre solvant	20000 ppm acétone, alcool, benzène hydroxyde de sodium	27000 ppm alcool, glycérol, éther, chloroforme, huile volatile ou non volatile, benzène	4500 ppm Ethyl alcool, tétrachlorure de carbone, éthyl éther, benzène, chloroforme	948 ppm Acétone, benzène, tétrachlorure de carbone, éther, alcool dénaturé, méthanol, toluène
pKa	8,49	8,85	7,68	7,43
Pression de vapeur (à 25°C) : Liquide solide	0,99 mmHg 0,99 mmHg	0,23 mmHg 0,15 mmHg	0,14 mmHg 0,09 mmHg	0,05 mmHg 0,02 mmHg
Point éclair	64°C	121°C	114°C	Pas de données

¹ : chemical abstract service

Tableau n°1. Identité chimique et propriétés physico-chimiques des chlorophénols

L'ensemble de ces caractéristiques nous sera utile lors du développement de notre méthode d'analyse.

Nous utiliserons notamment les données concernant la solubilité.

De nombreuses utilisations des chlorophénols sont indiquées dans la littérature :

- Formes polychlorées utilisées comme agents de préservation (bois, peinture, cuir, ...), fongicides, pesticides, désinfectants ... ;
- Composés moins chlorés entrant dans la composition de produits pharmaceutiques, de colorants, de dérivés de chlorophénols.

2.3 Toxicité des chlorophénols

Tout d'abord, notons qu'il n'existe pas d'études connues sur la toxicité d'un mélange de chlorophénols.

Les études toxicologiques réalisées concernent essentiellement des travailleurs exposés à de hautes concentrations en chlorophénols (par exemple dans une scierie). Ces études ne sont donc pas tout à fait transposables à la présence de traces de ces molécules dans la bière.

La toxicité des chlorophénols dépend du pH, du nombre d'atomes de chlore et de leur position dans la molécule. La plupart des chlorophénols sont classés par l'US EPA (United States Environmental Protection Agency) et par l'Union Européenne comme des polluants prioritaires. La limite standard de concentration des chlorophénols totaux dans l'eau de boisson est de 0,5 µg/l. Chaque phénol pris séparément ne peut excéder 0,1 µg/l.

Les chlorophénols sont rapidement absorbés par ingestion, par inhalation ou par contact avec la peau. Ils s'accumulent surtout dans le foie et les reins des animaux de laboratoire et, à un degré moindre, dans le cerveau, les muscles et les tissus adipeux. S'ils s'accumulent plus dans les reins et dans le foie c'est parce que ceux-ci participent à la détoxification et à l'élimination de composés de ce type. Ils sont fixés par les glucuronides et les sulfates dans le foie. Ces liaisons ainsi que la déchloration et la méthylation concourent à la détoxification des chlorophénols (Informations obtenues sur le site « Santé Canada »).

Le 2,3,5,6-tétrachlorophénol est métabolisé en une substance plus toxique, la tétrachloro-p-hydroquinone. Cette substance est capable de se lier de manière covalente aux protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN.

Les chlorophénols sont éliminés soit à l'état libre soit en s'associant avec d'autres molécules sous forme de composés principalement dans l'urine (pour les tri- et tétra - CPs, il y a association à des sulfates), et une proportion beaucoup plus faible est éliminée dans les matières fécales. La vitesse d'élimination est plus rapide pour certains tissus, elle peut aller d'un à plusieurs jours. Les monochlorophénols ne restent pas longtemps dans le corps. Ils sont métabolisés en produits moins toxiques et se retrouvent dans les urines après 24 heures. Les di-, tri- et tétra-chlorophénols quittent également le corps via les urines mais ils peuvent y séjourner plusieurs jours.

La plupart des chlorophénols vont avoir le même effet qualitativement mais pas quantitativement. Chez les rats exposés à des chlorophénols peu chlorés, la dose létale entraînant la mort chez 50% de la population testée (LD₅₀) va de 130 à 4000 mg/kg de masse corporelle.

Lorsque les composés sont administrés oralement ou par injection sous-cutanée, leur toxicité évolue de la manière suivante : TeCP > monoCP > DCP > TCP. (Informations provenant de IPCS Inchem)

Si l'on considère une exposition aux CPs hors d'un cadre de travail (tel que dans une scierie), de faibles niveaux de CPs sont trouvés dans le sérum, les urines et les tissus adipeux de la population générale (Informations provenant du site de l'IPCS Inchem).

Un homme lambda qui a comme sources principales de contamination l'eau de boisson et la nourriture ne subirait donc pas l'effet toxique des CPs (trop petites doses).

Les CPs ont une lipophilicité, affinité d'une substance pour les solvants apolaires tels que les lipides, moyennement haute. Ce sont des acides organiques faibles avec une valeur de pKa allant de 5,4 à 8,9 (cfr tableau N°1). En conséquence, l'absorption peut être favorisée dans l'estomac et les intestins. L'absorption à travers le tractus gastro-intestinal se fait par simple diffusion et est aussi rapide que complète.

Le principal mode d'action des CPs est l'inhibition de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries. L'intensité de cette inhibition dépend du degré de chloration des CPs, plus il y a de molécules de chlore, plus l'inhibition est importante. Certains CPs sont également capables de se lier aux protéines mitochondriales (Informations provenant du site de l'ICPS Inchem).

Le 2,4-DCP et le 2,4,6-TCP s'attachent fortement aux globulines et à l'albumine.

Chez l'homme, l'unique étude publiée estime une dose létale orale minimum pour tous les chlorophénols de 29 mg/kg de masse corporelle c'est-à-dire environ deux grammes pour une personne moyenne (de 68 à 103 kg) [6].

La IARC (International Agency for Research on Cancer) a classé les polychlorophénols dans la catégorie 2B c'est-à-dire potentiellement cancérogènes pour l'homme.

Nous pouvons donc considérer les chlorophénols comme des substances toxiques. Cependant, la modification organoleptique qu'ils confèrent à la bière empêcherait le consommateur d'en ingérer de trop grandes quantités [1].

Il faut bien comprendre que la dose de chlorophénols conduisant à une modification des propriétés organoleptiques de la bière est de loin inférieure à celle présentant une toxicité quelconque pour la bière.

2.4 Influence des chlorophénols sur les propriétés organoleptiques de la bière

Les chlorophénols sont bien connus pour apporter un goût phénolique, pharmaceutique ou encore médicamenteux à la bière.

Le seuil de perception des chlorophénols est égal ou inférieur à 1 µg/l. De très petites quantités de cette substance altèrent la saveur de la bière [1].

Le tableau n°2 reprend les informations utiles au point de vue de l'odeur développée par quelques types particuliers de chlorophénols mais également leur niveau de perception olfactive et gustative [19].

Type de CPs	Sensation olfactive	Niveau de perception olfactif ppb ou µg/l	Niveau de perception gustatif ppb ou µg/l
2-CP	Iode/médical	0,36 - 2	0,1 - 0,14
4-CP	Iode/médical	20 – 60	39
2,4-DCP	Iode/médical	0,4 – 29	0,3 – 0,98
2,6-DCP	Iode/médical	3,5	0,0062 – 0,2
2,4,6-TCP	Iode/médical	300	2 - > 12
PCP	Phénolique	23 - 1600	8 – 30

Tableau n°2. Informations concernant l'influence de différents CPs sur le profil gustatif et olfactif.

2.5 Techniques analytiques

Il existe peu d'études concernant le dosage des chlorophénols dans la bière. En effet, seules deux références traitant le sujet ont été relevées [21] [10].

Par contre, les chlorophénols ont largement été étudiés dans l'eau de consommation, les sédiments, le vin et les bouchons de liège car ils sont considérés comme des polluants prioritaires. Par ailleurs, ils sont considérés comme responsables de l'odeur de « moisi » ou de « goût de bouchon » du vin.

Les méthodes développées pour ces matrices sont nombreuses. Les différents protocoles distinguent les étapes d'extraction, de concentration, de dérivatisation et de séparation/détection. Quelques exemples sont succinctement présentés dans le tableau ci-dessous.

Le tableau n°3, ci-dessous synthétise les informations essentielles des méthodes recensées dans la littérature pour le vin. Le tableau 4 résume les deux méthodes d'analyse des chlorophénols répertoriées dans la littérature pour la bière.

Composés analysés	Extraction	Dérivatisation	Séparation/ Détection	LOD	Référence
	L-L	Anhydride acétique	GC/ECD GC/MS		Nicholls C.R., 2004
2,4,6-TCP 2,3,4,6-TeCP PCP	SPE (OASIS HLB)	Anhydride acétique	GC/MS-MS	0,5 ng/l et 2,4 ng/l (TCA)	Martinez-Urunuela A., 2005
2,4,6-TCP 2,3,4,6-TeCP PCP	SPE (OASIS HLB)	Tests avec diazométhane, pentafluorobenzyl bromide, méthyl iodide, anhydride acétique	GC/ECD	0,8 à 1,5 ng/l	Insa S., 2004
2,4,6-TCP 2,3,4,6-TeCP PCP	SPE (OASIS HLB)	Tests avec diazométhane, pentafluorobenzyl bromide, méthyl iodide, anhydride acétique	GC/ECD	0,8 à 2,5 ng/l	Insa S., 2006
2,4,6-TCP PCP 2,6-DCP 2,3,4,6-Te CP	DLLME	Anhydride acétique	GC/MS	0,005 à 0,063 ng/l (pour échantillon de vin rouge)	Campillo N., 2010
PCP 2,3,4,6-TeCP 2,4,6-TCP	HS-SPE (Oasis HLB)	Pentafluorobenzoyl chloride ou anhydride acétique	GC/ECD	0,003 à 0,020 µg/l	Martinez-Urunuela, 2004
TCP	SPE (C18)		GC/MS	0,7 à 4 ng/l	Soleas J.G., 2002
TCP TeCP PCP	DLLME	Anhydride acétique	GC/ECD	2,2 à 5,3 ng/l	Pizarro C., 2010
2,4,6-TCP 2,3,4,5-TeCP PCP	HS-SPME (PDMS)	Anhydride acétique	GC/ECD	0,58 à 0,93 ng/l	Insa S., 2007
2,4,6-TCP 2,3,4,5-TeCP PCP	SBSE (PDMS)		GC/MS	7,56 à 61,56 pg/l dans le vin rouge	Zalacain A., 2004
2,4,6-TCP 2,3,4,6-TeCP PCP	SBSE (PDMS)		GC/MS	Jusqu' à 23,03 ng/g pour le 2,3,4,6- TeCP	Callejon R.M., 2007

Tableau n°3. Méthodes d'extraction et d'analyse de CPs sur vin (rouge ou blanc) et bouchons de liège

L'extraction est réalisée sur phase solide, par « solid phase microextraction » SPME ou plus récemment par « stir bar sorptive extraction » SBSE. Certaines techniques telles que la « dispersive liquid liquid microextraction » DLLME sont également envisagées mais restent des cas plus isolés. Dans le vin, toutes les méthodes font appel à une détection par chromatographie gazeuse couplée avec une spectrométrie de masse ou un ECD. Ces méthodes semblent particulièrement adaptées à la détection de traces dans des matrices complexes comme le vin.

Composés détectés	Extraction	Dérivatisation	Séparation/ Détection	LOD	Réf.
CPs mais pas plus de précisions	Distillation et ampoule à décanter		Réaction colorimétrique avec 4-aminoantipyrine	Moins d'1 μ /l	West D.B., 1965
4-CP	Distillation et puis SPE (cyclohexyl)		RP-HPLC (isochratique)	μ g/l	Jones R.D., 1988

Tableau n°4. Méthodes d'extraction et d'analyse de CPs sur bière finie

Seulement deux articles concernant la détection des chlorophénols dans la bière ont été trouvés [21] [10].

Le premier implique une réaction colorimétrique. Les auteurs emploient la 4-aminoantipyrine comme indicateur coloré après distillation de la bière. Ils ajoutent une quantité standard de chlorophénol et par l'intermédiaire d'un calcul retrouve la quantité de chlorophénol initiale.

Dans le second article [10], les auteurs développent une analyse des phénols dans la bière après distillation. 500 ml de bière sont ajustés à pH 5,2 pour minimiser la codistillation ultérieure des acides. Les 500 ml sont transférés dans un ballon (d'un litre) contenant des pierres ponce. Un condenseur (30 cm) avec une double gaine est connecté et la distillation à la vapeur peut commencer. En début de distillation, il faut faire attention à l'excès de mousse. Après la disparition de la mousse (après 30 minutes), il faut chauffer vigoureusement.

La distillation est poursuivie jusqu'à atteindre un volume de 250 ml. Le distillat obtenu est clair et dépourvu de coloration brune. Cinquante ml du distillat sont ajustés à pH 6 avec de l'acide sulfurique (2M) et du chlorure de sodium (12,5 gr) est ajouté. Le distillat ainsi traité est extrait avec une cartouche Bondelut (SPE). Cette cartouche est préalablement conditionnée avec 10 ml de méthanol suivis par 30 ml d'eau.

Une solution de standard interne de 2,4-DCP est préparée dans le méthanol (16 mg/l). 50 μ l de ce standard sont ajoutés au distillat traité avant analyse.

Pour l'analyse HPLC, l'éluant est composé de méthanol, acétonitrile, tampon acétate (pH 6) contenant du perchlorate de sodium en proportion 38 :8 :56. La vitesse du flux est de 1,5 ml/min et le détecteur électrochimique est réglé à + 0,9 V. Ils obtiennent un bon taux de récupération pour le 4-chlorophénols mais passent ensuite à l'analyse d'autres composés. L'article ne donne que très peu de précisions sur le temps de rétention du 4-chlorophénol et sur ce qu'il en est des autres chlorophénols.

Les publications discutant de la détection des chlorophénols dans la bière ne paraissent pas adaptées à la détection de traces.

La suite du présent travail présentera la méthode développée par le laboratoire de chimie analytique de l'ISICHT. Nous avons comme contrainte l'utilisation exclusive de l'HPLC. En effet, la société SOPURA SA possédant déjà ce matériel, elle désirait que nous développions une méthode utilisant l'HPLC.

3. Matériel et méthode

Comme il a été précisé dans la revue bibliographique, la mise en évidence des chlorophénols dans la bière demande trois étapes principales :

- La préparation de l'échantillon par extraction en phase solide
- La séparation des différents constituants par chromatographie en phase liquide
- La détection dans l'UV

L'extraction en phase solide est une technique préparative largement utilisée. Son principe est simple, elle se base sur l'affinité entre une phase stationnaire contenue dans une cartouche (ayant la forme d'une seringue) et un composé d'intérêts présent dans un liquide et qui va passer à travers cette phase stationnaire. Les composés d'intérêts sont retenus sur cette phase stationnaire tandis que les autres percolent à travers la cartouche sans s'y adsorber. On élimine donc ainsi une grande partie des substances indésirables. Il existe une grande variété de phases stationnaires des plus générales aux plus spécifiques. Trois grandes catégories sont à retenir : l'extraction en phase normale, en phase inverse ou par échange d'ions. Cette technique nous semblait adaptée à un travail de routine. De plus, elle utilise

très peu de solvants (contrairement à l'extraction liquide/liquide) ce qui est un bon point écologiquement parlant.

Cette étape préparative est déterminante, elle est une des principales sources d'erreurs entachant le résultat de l'analyse. Elle aura une influence sur la limite de détection, la reproductibilité et la répétabilité ainsi que sur la fiabilité.

Pour la percolation des différents solvants, nous avons eu recours à un « manifold » qui nous permettait d'ajuster correctement le vide et d'obtenir un débit d'élution des solvants plus ou moins constant.

Le choix de la colonne dépend du volume de l'échantillon à traiter, de sa concentration en analytes et du type d'échanges recherchés. L'adsorbant sélectionné doit bien entendu avoir une excellente affinité pour le composé cible et présenter un minimum d'affinités pour les interférents de la matrice, dans notre cas, la bière de type « Pils ».

Le choix s'est porté sur une cartouche SPE Chromabond C18 octadecyl silice modifiée avec un diamètre de pores de 60 nanomètres et une taille moyenne des particules de 45 µm de chez Macherey Nagel (réf 739 004).

L'extraction en phase solide comporte elle-même plusieurs étapes. D'abord le conditionnement de la cartouche, il s'agit de l'activer et d'en éliminer les substances contaminantes tout en favorisant les échanges avec l'adsorbant. Cette étape est souvent réalisée au moyen d'un solvant organique. Dans notre cas, en référence à l'article sur base duquel nous avons décidé de travailler, nous n'appliquons pas d'étape de conditionnement de la cartouche [11].

La deuxième étape consiste en l'application de l'échantillon sur la cartouche, qui sera dans le présent cas, la première étape. Des échantillons de 50 ml de bière préalablement contaminée par une quantité définie de chlorophénol ont été préparés. Ces échantillons ont été ajustés à un pH de 8,5 au moyen d'ammoniac à 28%, car il est établi qu'à ce pH la sorption est maximale. L'ajustement de pH provoque une précipitation des protéines et des polyphénols de la bière. Ce précipité risque de boucher les cartouches d'extraction, il nous est donc apparu judicieux de centrifuger l'échantillon avant de l'appliquer sur la cartouche. Avant l'ajustement de pH et l'extraction, nous ajoutons également un standard interne dans notre solution. Le choix d'employer le pentachlorophénol, le 2,5-dichlorophénol,

qui est moins formé naturellement, ou le 4-bromophénol s'est avéré possible. Le 4-bromophénol a été sélectionné car il offre un pic caractéristique bien visible à un temps de rétention d'environ 16 minutes, sans interférer avec les temps de rétention des autres chlorophénols, excepté le 2,6-DCP, et ce, sans alourdir inutilement le chromatogramme. De plus, les chances de rencontrer des bières contaminées en bromophénols sont très faibles voire inexistantes. Afin d'obtenir une meilleure résolution, il faut d'après l'article de référence ajouter un ammonium quaternaire, nous employons le chlorure de didécylidiméthylammonium à raison de 0,25 mM .

Le vide est ajusté de manière à ce que l'échantillon puisse passer à travers la cartouche à un débit d'environ 2 ml/min.

Aucun séchage de la cartouche n'est nécessaire. Après passage de l'échantillon, nous réalisons un lavage de la cartouche avec 1 ml d'eau déminéralisée afin d'éliminer une partie des constituants qui auraient été adsorbés par la cartouche mais qui n'auraient aucun intérêt pour nous. La dernière étape est celle de l'élution de l'échantillon. Elle consiste en théorie à récupérer 100% des chlorophénols présents au départ dans la bière.

Le solvant ou le mélange de solvants employé doit avoir le maximum d'interactions avec les analytes et le moins possible avec les autres interférents qui peuvent rester adsorbés. Son volume doit être faible afin d'obtenir une pré-concentration maximum. Dans notre cas, 5 ml de méthanol sont utilisés [11].

Une étape de concentration supplémentaire aurait pu être envisagée, mais les chlorophénols sont des constituants semi-volatils, il est dès lors difficile d'utiliser des techniques de concentration traditionnelles tel que l'évaporation par « rotavapor ».

Notre expérience a en effet indiqué qu'ils quittaient bel et bien la solution en employant un appareil de ce type.

Une fois l'échantillon préparé, il reste à aborder les étapes de séparation et de détection. Pour la chromatographie en phase liquide nous nous sommes également directement inspirés de l'article qui a servi de base à la mise au point [11]. Nous avons donc opté pour une colonne « GraceSmart RP 18 5 μ » de 150 mm x 4,6 mm et pour un mode d'élution par gradient.

La chaîne HPLC utilisée dans le cadre de ce travail est de marque Merck Hitachi. Elle est constituée d'une interface de type D-7000, d'un détecteur UV L-7400 et d'un système de pompe L-7100.

Le gradient est réalisé entre du méthanol pour HPLC et une solution de phosphate ajustée à pH 3,5.

De 0 à 3,5 minutes : méthanol 35% et tampon phosphate 10 mM 65%

De 3,5 à 27 minutes : gradient croissant jusqu'à 100 % en méthanol

De 27 à 32 minutes : 100 % méthanol

De 32 à 62 minutes : méthanol 35 % et tampon phosphate 10 mM 65% (équilibration de la colonne)

Un volume d'injection de 30 microlitres, un débit de 0,6 ml/min ont été sélectionnés. La détection a été réalisée à deux longueurs d'onde proches : 280 et 284 nm.

4. Résultats

Dans un premier temps, la détermination des temps de rétention de chacun des mono- et dichlorophénols sélectionnés a été réalisée. Pour cela, des échantillons de 50 ml de bière ont été dopés d'une concentration suffisamment importante en chlorophénol pour que la détermination du temps de rétention ne laisse aucun doute.

Ci-après un exemple de chromatogramme obtenu sachant que l'ensemble de la procédure a été appliquée à savoir : préparation de l'échantillon (ajustement du pH), extraction en phase solide sur cartouche, séparation par chromatographie en phase liquide haute pression et détection UV. Il s'agit du chromatogramme du 2,4-DCP dont la concentration dans l'échantillon de départ était de 1.10^{-1} g/l. Le chromatogramme a été enregistré à 280 nm dans cet exemple. Le chromatogramme représente l'intensité d'absorbance en fonction du temps de rétention :

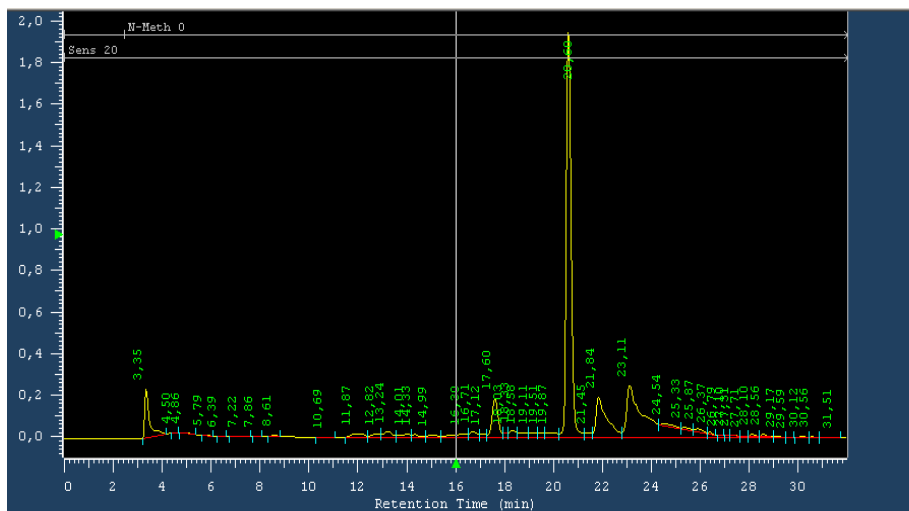


Figure 1. Chromatogramme du 2,4-DCP à 280 nm. Concentration de l'échantillon de départ 1.10^{-1} g/l.

Le pic caractéristique du 2,4-DCP à 20,60 minutes est bien visible ainsi que le pic caractéristique du standard interne à 17,60 minutes. Les autres pics présents sont ceux provenant des constituants de la bière.

Ci-dessous, dans le tableau n°5, sont repris l'ensemble des temps de rétention pour les mono- et dichlorophénols sélectionnés à une longueur d'onde de 280 nm qui est un bon compromis entre les maxima d'absorption

des différents chlorophénols. Toutefois, pour le 2,4-DCP une longueur d'onde de 284 nm sera sélectionnée car elle permet l'obtention de meilleurs résultats.

	RT (280)	Aire (280)
2-CP	13.07	7660458
3-CP	14.92	6799682
4-CP	14.40	7602726
2,4-DCP	19.34	8067948
2,3-DCP	17.91	2586402
2,5-DCP	18.52	2123817
2,6-DCP	15.30	505373

Tableau n°5. Détermination des temps de rétention des différents chlorophénols.

Ces temps de rétention dépendent de la température de travail et de la colonne utilisée, ils sont caractéristiques d'un composé. En possédant cette information, il sera possible de déterminer la présence de chlorophénol dans la bière : il suffira de vérifier si le chromatogramme présente un pic au temps de rétention caractéristique d'un ou plusieurs chlorophénols.

Pour chacun des chlorophénols une droite de calibration a été réalisée. Celle-ci permet également d'avoir une première idée de la limite de détection pour chacun d'entre eux. Le protocole décrit dans « matériel et méthode » a été appliqué.

Quatre échantillons de concentrations différentes ont été préparés afin de réaliser ces droites de calibration :

- Pour les monochlorophénols et pour le 2,4-dichlorophénols : 1.10^{-1} g/l ; 5.10^{-2} g/l ; 1.10^{-3} g/l et 1.10^{-4} g/l dans 50 ml de bière au départ. Echantillons préparés par dilution à partir d'une solution mère à 1 g/l
- Pour les autres dichlorophénols : 1.10^{-2} g/l ; 5.10^{-3} g/l ; 1.10^{-3} g/l et 1.10^{-4} g/l dans 50 ml de bière au départ. Echantillons préparés à partir d'une solution mère de 0,1 g/l (limite de solubilité de ces chlorophénols ne permettent pas de commencer à 1 g/l)

Les tableaux n°6 à 11 ci-dessous reprennent, à chaque fois, les concentrations de départ dans la bière des échantillons, les quantités de chlorophénol qui sont réellement injectées sur la colonne de chromatographie et enfin les aires réduites. Il est à noter que l'aire réduite est le rapport entre l'aire obtenue pour le pic de chlorophénol concerné et l'aire du pic du standard interne, le 4-bromophénol.

Pour chaque courbe de calibration, une figure permettra de visualiser les résultats obtenus dont les équations des courbes et les coefficients de régression linéaire ou non.

Concentration de l'échantillon de départ (g/l)	Quantité sur la colonne (g)	Aire réduite à 280 nm
1.10^{-1} g/l	3.10^{-5}	3,78
5.10^{-2} g/l	$1,5.10^{-5}$	1,91
1.10^{-3} g/l	3.10^{-7}	0,46
1.10^{-4} g/l	3.10^{-8}	0,39

Tableau n°6. Résultats obtenus pour le 2-chlorophénol :

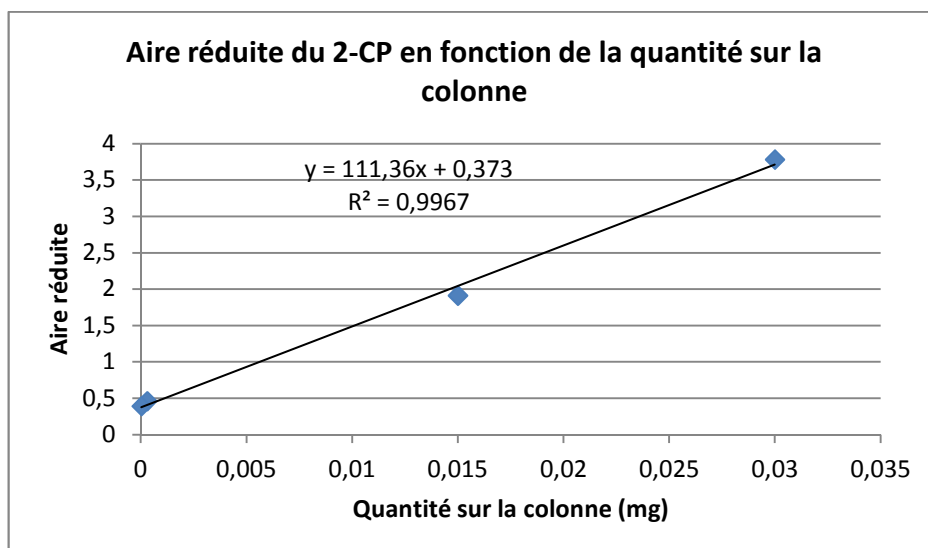


Figure 2. Représentation de l'aire réduite du 2-CP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

Une régression linéaire présente une droite dont le R^2 de 0,9967 confirme la pertinence du choix linéaire de cette régression.

Il est possible d'estimer une limite de détection de la méthode ; le pic obtenu pour l'échantillon le moins concentré (1.10^{-4} g/l) est encore plus de 20 fois supérieur au bruit de fond de la méthode.

Concentration de l'échantillon de départ (g/l)	Quantité sur la colonne (g)	Aire réduite à 280 nm
1.10^{-1} g/l	3.10^{-5}	6,67
5.10^{-2} g/l	$1,5.10^{-5}$	3,49
1.10^{-3} g/l	3.10^{-7}	0,59
1.10^{-4} g/l	3.10^{-8}	0,35

Tableau n°7. Résultats obtenus pour le 3-chlorophénol :

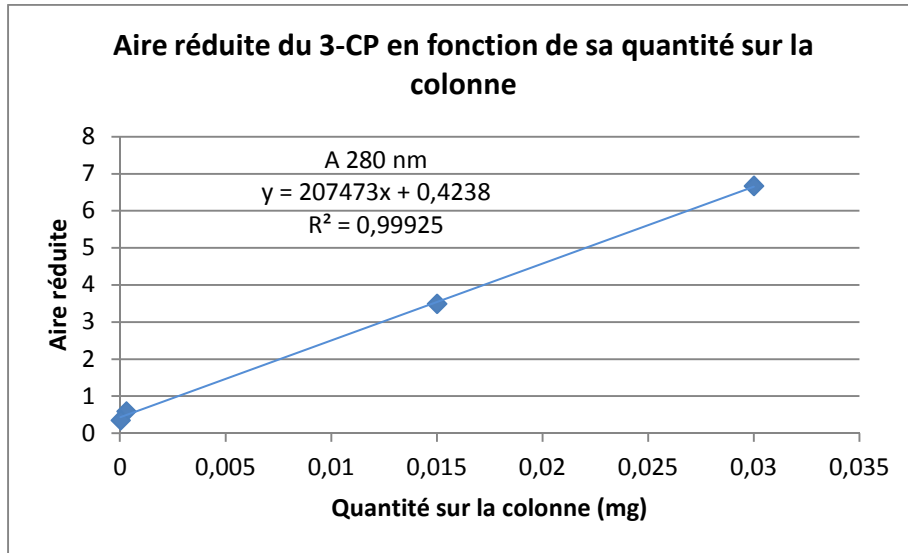


Figure 3. Représentation de l'aire réduite du 3-CP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

Une régression linéaire présente une droite dont le R^2 de 0,9993 confirme la pertinence du choix linéaire de cette régression.

A nouveau, il est possible d'estimer une limite de détection de la méthode ; le pic obtenu pour l'échantillon le moins concentré (1.10^{-4} g/l) est encore plus de 20 fois supérieur au bruit de fond de la méthode.

Concentration de l'échantillon de départ (g/l)	Quantité sur la colonne (g)	Aire réduite à 280 nm
1.10^{-1} g/l	3.10^{-5}	5,27
5.10^{-2} g/l	$1,5.10^{-5}$	2,88
1.10^{-3} g/l	3.10^{-7}	0,34
1.10^{-4} g/l	3.10^{-8}	0,24

Tableau n°8. Résultats pour le 4-chlorophénol

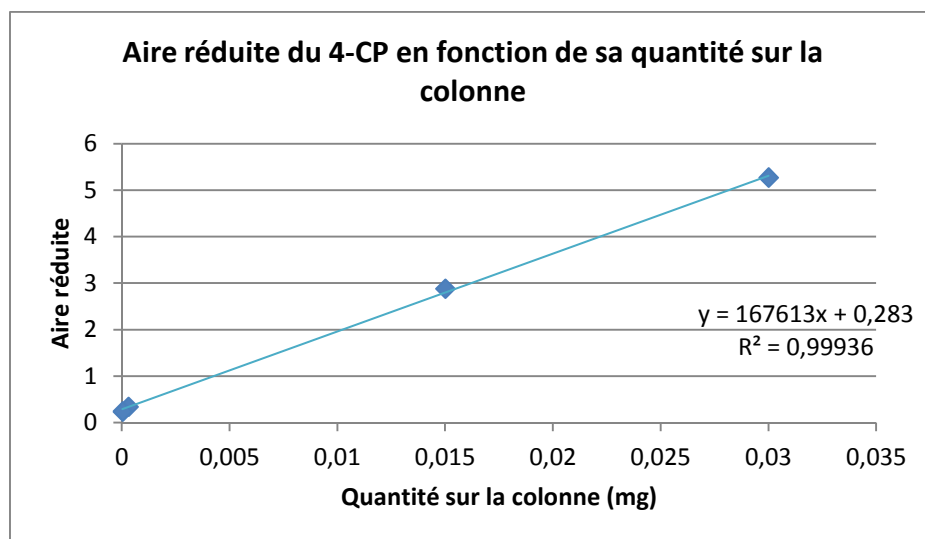


Figure 4. Représentation de l'aire réduite du 4-CP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

Une régression linéaire présente une droite dont le R^2 de 0,99936 confirme la pertinence du choix linéaire de cette régression.

Une fois de plus, il est possible d'estimer une limite de détection de la méthode ; le pic obtenu pour l'échantillon le moins concentré (1.10^{-4} g/l) est encore plus de 20 fois supérieur au bruit de fond de la méthode.

Concentration de l'échantillon de départ (g/l)	Quantité sur la colonne (g)	Aire réduite à 280 nm
1.10^{-2} g/l	3.10^{-6}	0,95
5.10^{-3} g/l	$1,5.10^{-6}$	0,75
1.10^{-3} g/l	3.10^{-7}	0,27
1.10^{-4} g/l	3.10^{-8}	0,023

Tableau n°9. Résultats obtenus pour le 2,3-dichlorophénol :

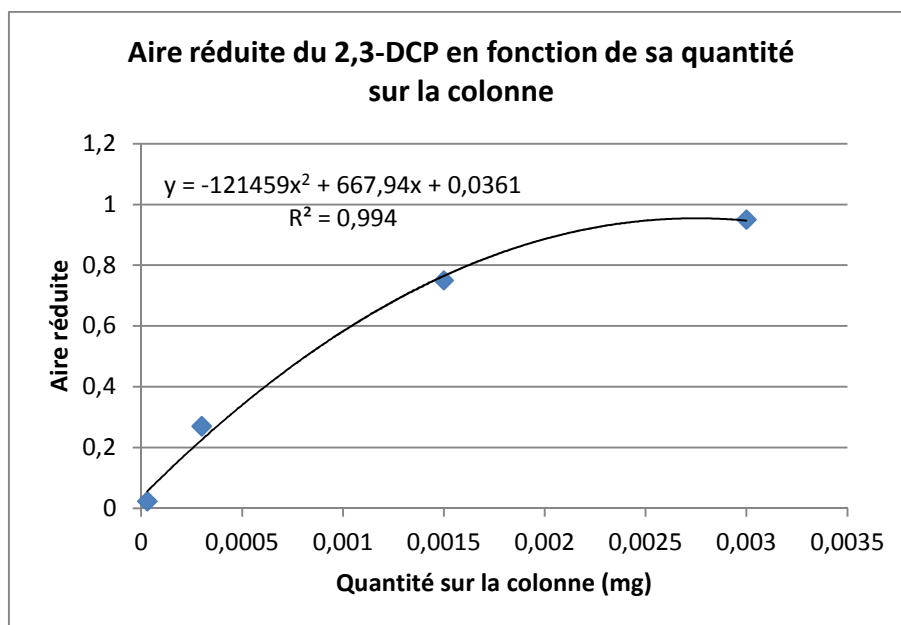


Figure 5. Représentation de l'aire réduite du 2,3-DCP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

Dans ce cas, la régression linéaire ne donne pas de résultats satisfaisants. La courbe de calibration est une courbe polynomiale du second degré qui présente un R^2 satisfaisant de 0,994.

Encore une fois, il est possible d'estimer une limite de détection de la méthode ; le pic obtenu pour l'échantillon le moins concentré (1.10^{-4} g/l) est encore plus de 20 fois supérieur au bruit de fond de la méthode.

Concentration de l'échantillon de départ (g/l)	Quantité sur la colonne (g)	Aire réduite à 284 nm
1.10^{-1} g/l	3.10^{-5}	5,27
5.10^{-2} g/l	$1,5.10^{-5}$	2,88
1.10^{-3} g/l	3.10^{-7}	0,34
1.10^{-4} g/l	3.10^{-8}	0,24

Tableau n°10. Résultats pour le 2,4-dichlorophénol :

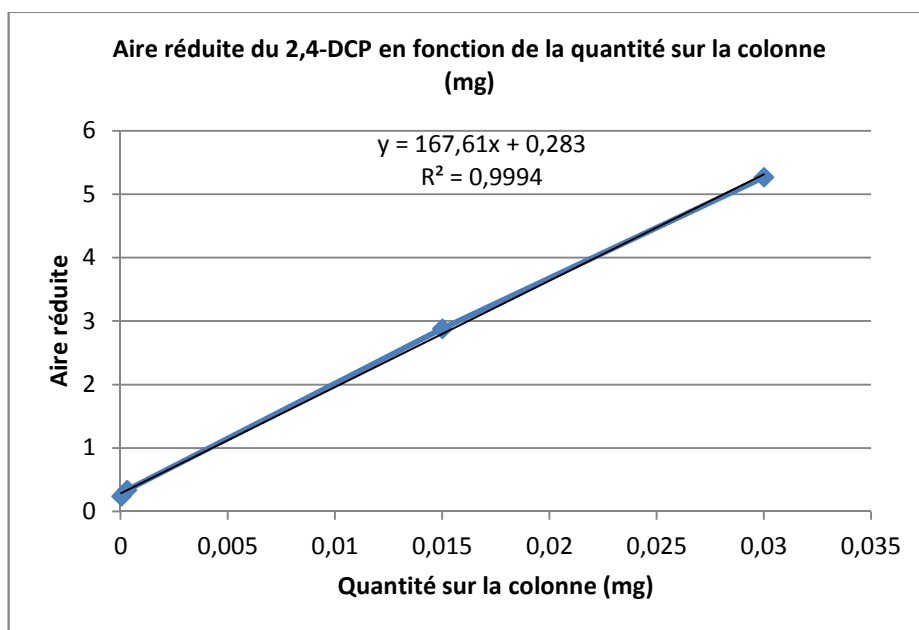


Figure 6. Représentation de l'aire réduite du 2,4-DCP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

Une régression linéaire présente une droite dont le R^2 de 0,9994 confirme la pertinence du choix linéaire de cette régression.

Une fois de plus, il est possible d'estimer une limite de détection de la méthode ; le pic obtenu pour l'échantillon le moins concentré (1.10^{-4} g/l) est encore plus de 20 fois supérieur au bruit de fond de la méthode.

Concentration de l'échantillon de départ (g/l)	Quantité sur la colonne (g)	Aire réduite à 280 nm
1.10^{-2} g/l	3.10^{-6}	0,53
5.10^{-3} g/l	$1,5.10^{-6}$	0,43
1.10^{-3} g/l	3.10^{-7}	0,19
1.10^{-4} g/l	3.10^{-8}	0,17

Tableau n°11. Résultats pour le 2,5-dichlorophénol :

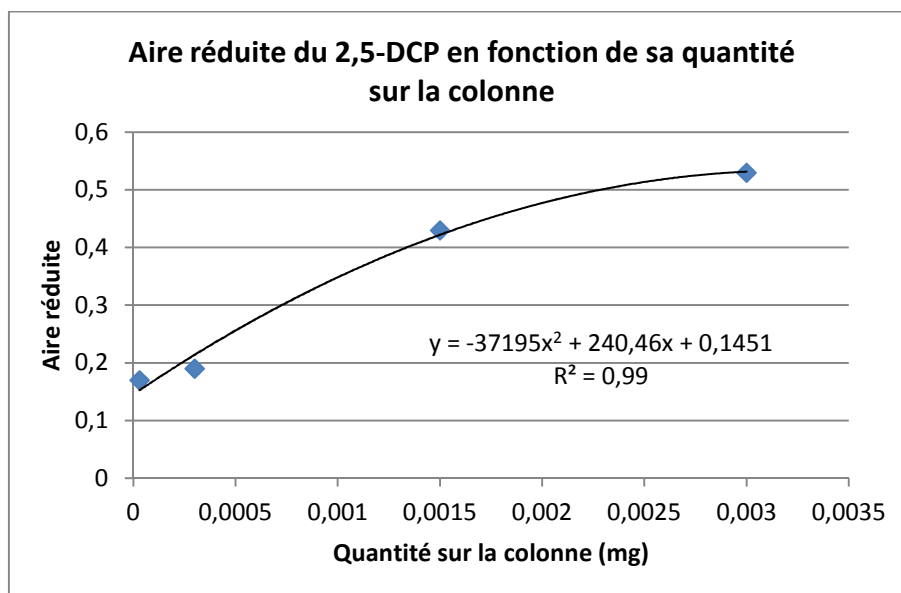


Figure 7. Représentation de l'aire réduite du 2,5-DCP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

A nouveau, dans le cas présent, la régression linéaire ne donne pas de résultats satisfaisants. La courbe de calibration est une courbe polynomiale du second degré qui présente un R^2 satisfaisant de 0,99.

Encore une fois, il est possible d'estimer une limite de détection de la méthode ; le pic obtenu pour l'échantillon le moins concentré (1.10^{-4} g/l) est encore plus de 20 fois supérieur au bruit de fond de la méthode.

Enfin, pour le 2,6-DCP, il n'a pas été possible de fournir une droite de calibration. En effet, le 2,6-DCP et le standard interne sélectionné ont des temps de rétention très proches et dès lors coéluent. Il n'a pas été possible de trouver un standard interne qui permette l'analyse de l'ensemble des chlorophénols sans coélution avec au moins un des différents chlorophénols à quantifier. Dès lors, si l'analyse du 2,6-DCP s'avérait indispensable, il faudrait alors choisir un autre standard interne pour celle-ci.

5. Conclusion et perspectives

Ce présent travail a permis de répondre aux attentes du partenaire industriel, à savoir disposer d'une méthode de détection et de quantification de différents chlorophénols dans la bière. Ces derniers, responsables d'un goût caractéristique et désagréable sont souvent présents suite à une contamination de la bière par un agent oxydant chloré tel que l'hypochlorite de sodium ou encore le dioxyde de chlore.

La méthode doit maintenant être prise en main par le partenaire industriel et adaptée à ces propres équipements de chromatographie tels que chaînes, colonnes, ...

Toutefois, dans le but d'augmenter la robustesse de la méthode, nous suggérons au partenaire industriel de pratiquer quelques essais complémentaires tels que : dupliquer les droites de calibration sur ses propres installations, confirmer et dupliquer les limites de détection, Valider la méthode (reproductibilité, robustesse, ...) au regard de ses propres besoins.

De plus, il nous semblerait intéressant, si le temps le permet, de déterminer le taux de récupération des cartouches, d'augmenter le volume de bière prétraités afin d'abaisser encore la limite de quantification quitte à sélectionner des cartouches possédant une plus grande quantité d'adsorbant, de tester différents volumes d'élution dans le méthanol lors de l'étape de récupération (SPE), de vérifier l'utilité du lavage par l'eau déminéralisée, le faire avec un volume plus ou moins important ou avec un autre type de solvant pour éliminer le maximum de pics interférents, tester un débit de phase mobile plus important afin de réduire sensiblement le temps d'analyse.

Enfin, il serait utile de réaliser une contamination de la bière par du chlore actif libre afin de vérifier la formation de chlorophénols au cours du temps, et ce, en appliquant la méthode mise au point. La pertinence de la technique de dosage serait alors définitivement démontrée.

6. Sources

- [1] BAMFORTH C., RUSSEL I., STEWARD G., 2008, *Beer : a quality perspective (Handbook of alcoholic beverages)*, Academic Press, 287 p
- [2] CALLEJON R.M., TRONCOSO A.M., MORALES M.L., 2007, *Analysis for chloroanisoles and chlorophenols in cork by stir bar sorptive extraction and gas chromatography–mass spectrometry*, *Talanta*, volume 71, numéro 5, pp 2092-2097
- [3] CAMPILLO N., VINAS P., CACHO J.I, PENALVER R., HERNANDEZ-CORDOBA M, 2010, *Evaluation of dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography–mass spectrometry*, *Journal of chromatography A*, Novembre, volume 1217, pp 7323-7330
- [4] FRED LEE G., CARREL MORRIS J., 1962, *Kinetics of chlorination of phenol – Chlorophenolic tastes and odors*, *Int. J. Air Watt Poll.* Pergamon Press, Volume 6, pp 419-431
- [5] HRUDEY E. Steve, 2008, *Les sous-produits de la désinfection (SPD) par chloration dans l'eau potable et la santé publique au Canada*, Centre de collaboration nationale en santé environnementale, Revue documentaire, Université de l'Alberta
- [6] IPCS INCHEM, *Chlorophenols other than pentachlorophenols, 1989*
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc093.htm>
- [7] INSA S., SALVADO V. , ANTICO E. , 2004, *Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples*, *Journal of Chromatography A*, volume 1047, pp 15–20
- [8] INSA S., BESALU E., IGLESIAS C., SALVADO V., ANTICO E., 2006, *Ethanol/ water extraction combined with solid-phase extraction and solid-phase microextraction concentration for the determination of chlorophenols in cork stoppers*, *Journal of agricultural and food chemistry*, volume 54, numéro 3, pp 627-632

- [9] INSA S., BESALU E., SALVADO V., ANTICO E., 2007, *Assessment of the matrix effect on the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) analysis of chlorophenols in wines*, Journal of separation science, volume 30, numéro 5, pp 722-730
- [10] JONES R.D, KAVANAGH T.E., CLARKE CARLTON B.J., 1988, *Determination of carbaryl residues in malt and beer and their impact on beer quality*, Journal of the american society of brewing chemists, volume 46, issue 2, pp 43-50
- [11] KOSTRHOUSOVA R., HRDLICKA A., SOMMER L., 2003, *Solid phase extraction of phenol and chlorophenols on octadecylsilica and amberlite XAD 2 sorbents in the presence of cationic surfactant*, Microchimica Acta, 142, pp 95-99
- [12] MARTINEZ VIDAL J.L., BELMONTE VEGA A., SANCHEZ LOPEZ F.J., GARRIDO FRENICH A., 2004, *Application of internal quality control to the analysis of quaternary ammonium compounds in surface and groundwater from Andalusia (Spain) by liquid chromatography with mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, volume 1050, pp 179–184
- [13] MARTINEZ-URUNUELA A., GONZALEZ-SAIZ M., PIZARRO C., 2004, *Optimisation of the derivatisation reaction and subsequent headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chlorophenols in red wine*, Journal of chromatography A, volume 1048, issue 2, septembre, pp 141-151
- [14] MARTINEZ-URUNUELA A., RODRIGUEZ I., CELA R. , 2005, *Development of a solid-phase extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in red wine using gas chromatography–tandem mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta, volume 549,1-2, pp 117-123
- [15] NICHOLLS C.R. (2004), *At line testing of chlorophenols and chloroanisole contaminants in commercial wine production*, Thèse de doctorat, Université de Cranfield

- [16] PIZARRO C., SAENZ-GONZALEZ C., PEREZ-DEL-NOTARIO N., GONZALEZ-SAIZ J.M., 2010, *Optimisation of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the simultaneous determination of halophenols and haloanisoles in wines*, Journal of chromatography, volume 1217, numéro 49, pp 7630-7637
- [17] RODRIGUEZ I., TURNES M.I., MEJUTO M.C., CELA R., 1995, *Determination of chlorophenols at the sub-ppb level in tap water using derivatization, solid-phase extraction and gas chromatography with plasma atomic emission detection*, Journal of chromatography, volume 721, issue 2, janvier, pp 297-304
- [18] SOLEAS G.J., YAN J., SEAVER T., GOLDBERG D.M., 2002, *Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint*, Journal of agricultural and food chemistry, volume 50, numéro 5, pp 1032-1039
- [19] WELLS D., 2007, *Organohalogen taints in food*, Food Australia, volume 59, numéro 3,
- [20] WEST D. B. , LAUTENBACH A. F. , BRUMSTED D. , 1965, *Phenolic Characteristics in Brewing. I*, J.E Siebel Sons' Company, Inc., Chicago, <http://www.probrewer.com/resources/library/42-phenolic.pdf>
- [21] WEST D.B., LAUTENBACH A.F., BRUMSTED D.B., 1965, *Phenolic characteristics in brewing II the role of water*, Adresse URL : <http://www.probrewer.com/resources/library/43-phenolic.pdf>
- [22] ZALACAIN A., ALONSO G.L., LORENZO C., INIGUEZ M. et Al., 2004, *Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint*, Journal of chromatography, volume 1033, issue 1, avril, pp 173-178