

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

Ing. Charlotte Saussez
Dr. Ir. Nicolas Velings
ISICHT-Mons

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 ».

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.

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 CERISIC (Centre d'Etude et de Recherche de l'Institut Supérieur Industriel Catholique

du Hainaut) s'est penché sur la détection et le dosage de résidus d'agents désinfectants principalement dans la bière.

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.

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 (Hrudey E.S., 2008) : les trihalométhanes, les acides haloacétiques, les haloacétonitriles, les halocétones, les chlorophénols, les hydrates de chloral, les chloropicrines.

Il nous a 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.

Les différentes sources potentielles de chlorophénols dans la bière sont (Bamforth C., 2008) :

- 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.

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

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-hydroxy-benzene, 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 CAS ¹	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	0,33 µg/L	0,33 µg/L	0,35 µg/L	11 µg/L
Air	0,0189 mg/m ³	0,0189 mg/m ³	1,40 mg/m ³	Pas de données
Solubilité :				
Eau à 25°C	20000 ppm	27000 ppm	4500 ppm	948 ppm
Solvant organique	acétone, alcool, benzène	alcool, glycérol, éther, chloroforme, huile volatile ou non volatile, benzène	Ethyl alcool, tétrachlorure de carbone, éthyl éther, benzène, chloroforme	Acétone, benzène, tétrachlorure de carbone, éther, alcool dénaturé, méthanol, toluène
Et autre solvant	hydroxyde de sodium			
pKa	8,49	8,85	7,68	7,43
Pression de vapeur (à 25°C) :				
Liquide	0,99 mmHg	0,23 mmHg	0,14 mmHg	0,05 mmHg
Solide	0,99 mmHg	0,15 mmHg	0,09 mmHg	0,02 mmHg
Point éclair	64°C	121°C	114°C	Pas de données

¹: chemical abstract service

2.3. 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 (Bamforth C., 2008).

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 (Wells D., 2007).

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

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

2.4. 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 (West D.B., 1965 et Jones R.D., 1988).

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.

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

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

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.

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

Composés détectés	Extraction	Dérivatisation	Séparation/ Détection	LOD	Référence
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)	µg/l	Jones R.D., 1988

3. Matériel et méthode

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'intérêt présent dans un liquide et qui va passer à travers cette phase stationnaire. Les composés d'intérêt 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.

Pour la percolation des différents solvants, nous avons eu recours à un « manifold ».

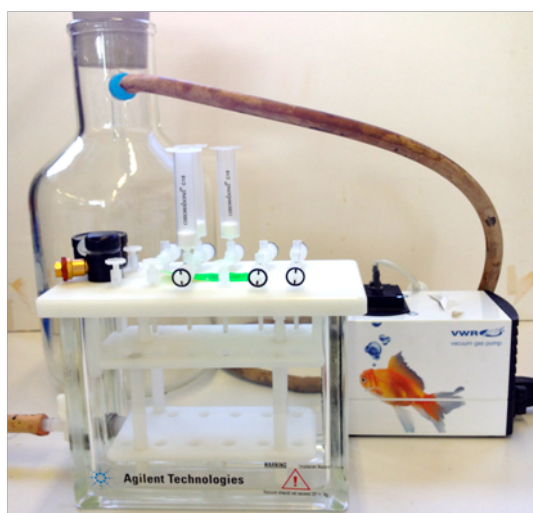


Photo 1. Dispositif « manifold »

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'affinité 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 (Kostrhounova R., 2003).

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 didécyldiméthylammonium à raison de à 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 (Kostrhounova R., 2003).

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 inspiré de l'article qui a servi de base à la mise au point (Kosthrounova R., 2003). 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.



Photo 2. Colonne GraceSmart RP 18.

La chaîne HPLC utilisée dans le cadre de ce travail est de marque Merch 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% (équilibre 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 dopé 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 :

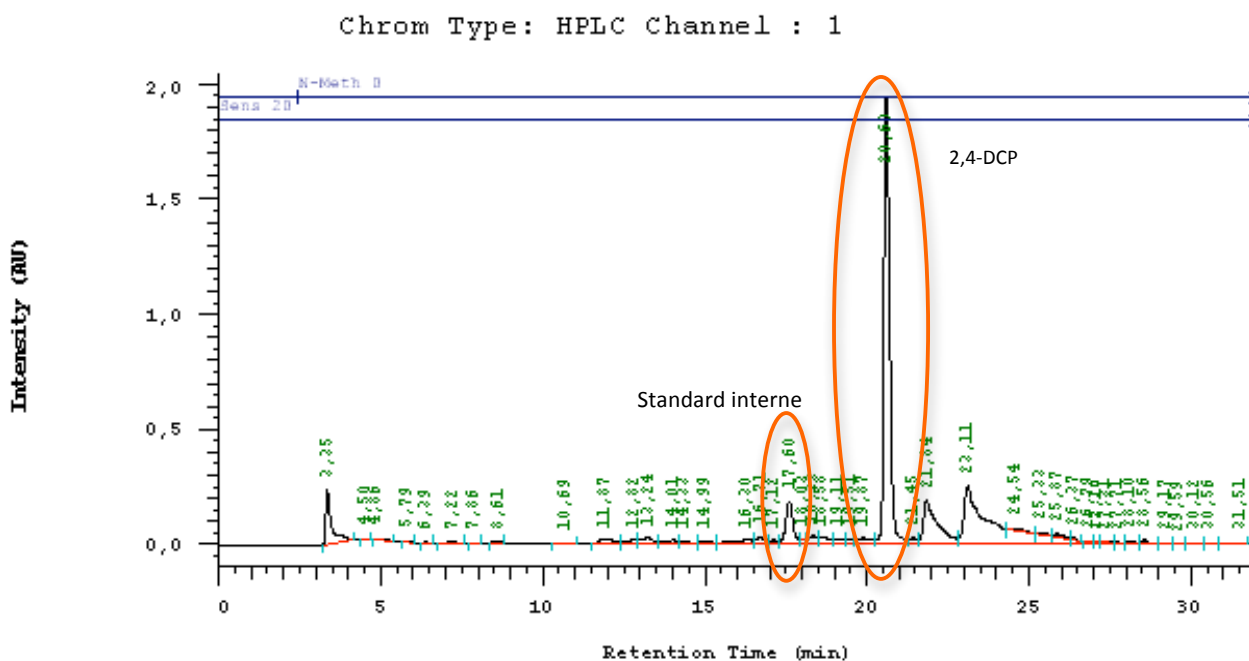


Figure 1. Chromatogramme du 2,4-DCP à 280 nm. Concentration de l'échantillon de départ 1.10^{-1} g/l.

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.

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

	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

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 préparé 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.

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

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

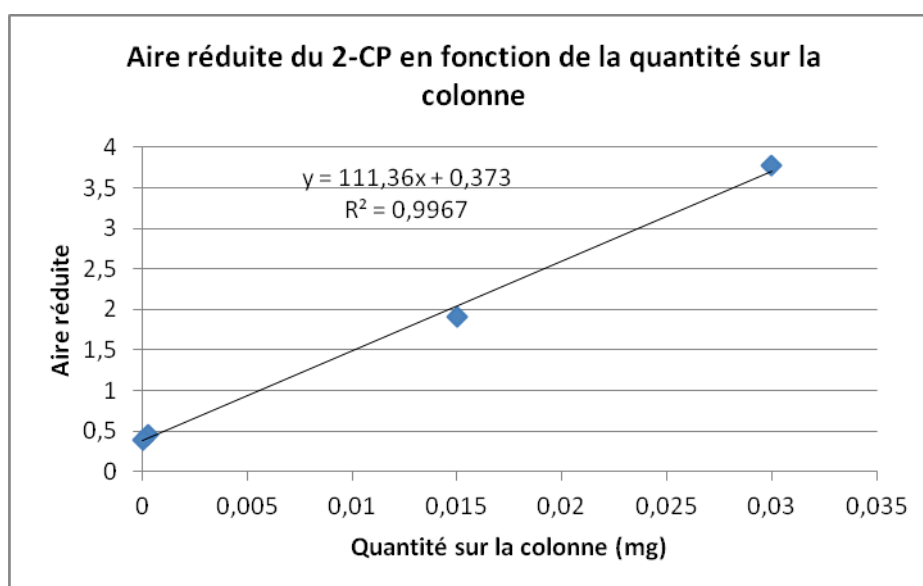


Figure 2. Représentation de l'aire réduite du 2-CP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

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.

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

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

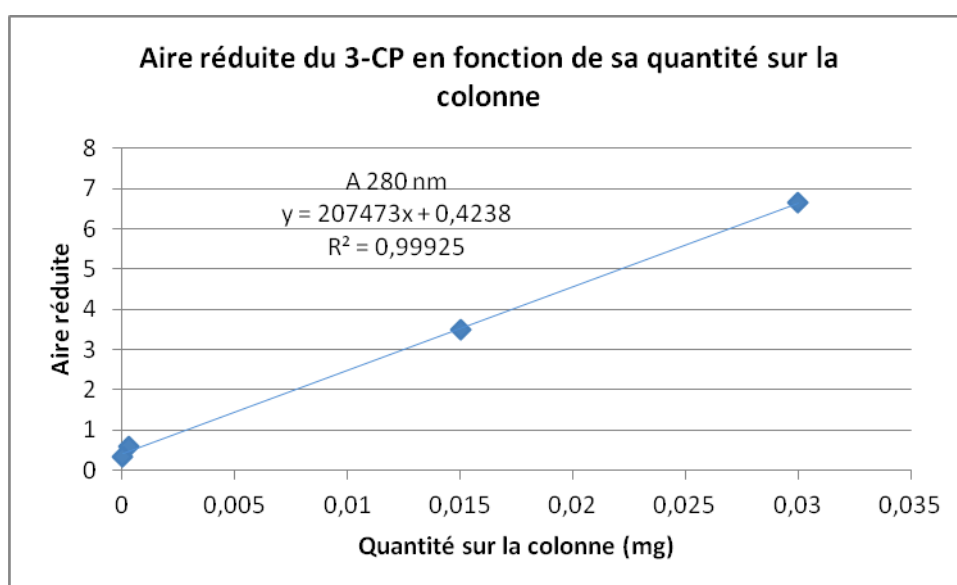


Figure 3. Représentation de l'aire réduite du 3-CP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

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.

• **Tableau n°8. Résultats pour le 4-chlorophénol :**

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

Graphique de l'aire réduite en fonction de la quantité de 4-chlorophénol (en grammes) réellement sur la colonne :

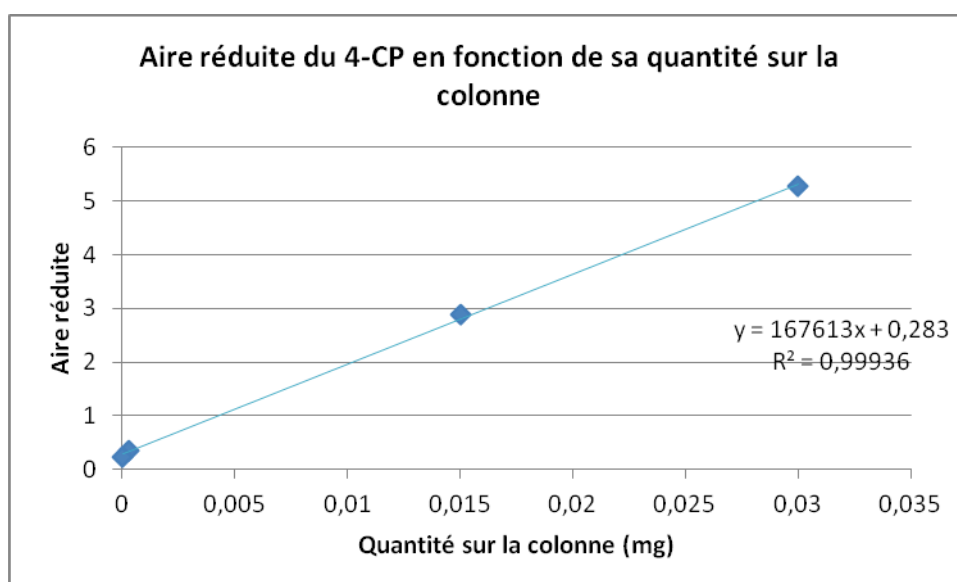


Figure 4. Représentation de l'aire réduite du 4-CP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

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.

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

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

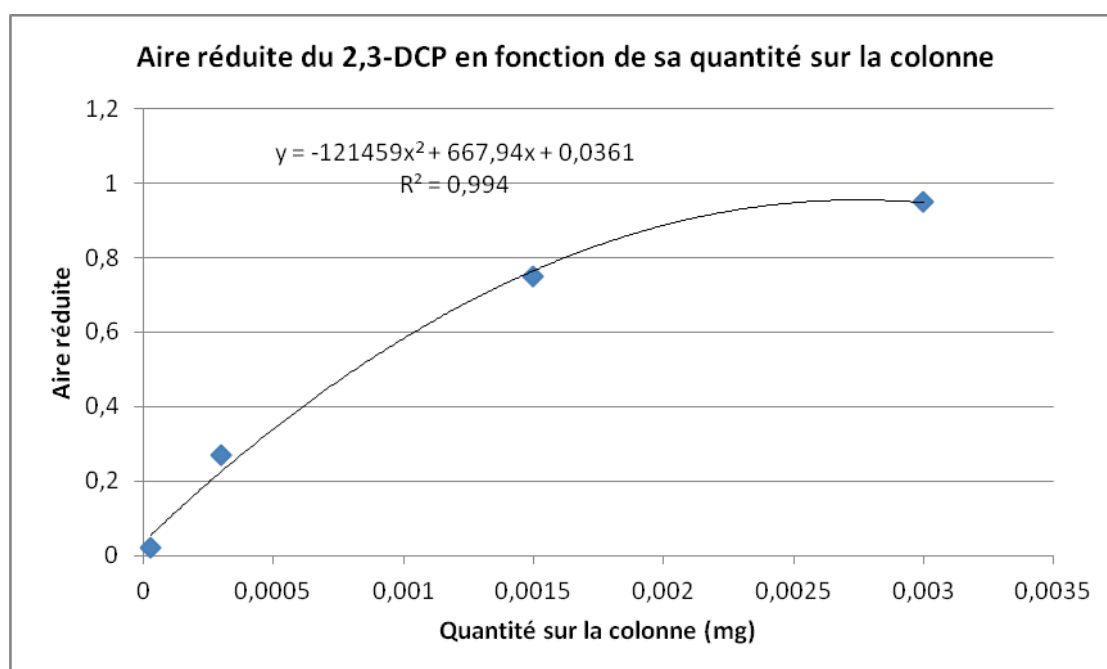


Figure 5. Représentation de l'aire réduite du 2,3-DCP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

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.

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

Concentration de l'échantillon de départ (g/l)	Quantité sur la colonne (g)	Aire réduite à 284 nm
$1 \cdot 10^{-1}$ g/l	$3 \cdot 10^{-5}$	5,27
$5 \cdot 10^{-2}$ g/l	$1,5 \cdot 10^{-5}$	2,88
$1 \cdot 10^{-3}$ g/l	$3 \cdot 10^{-7}$	0,34
$1 \cdot 10^{-4}$ g/l	$3 \cdot 10^{-8}$	0,24

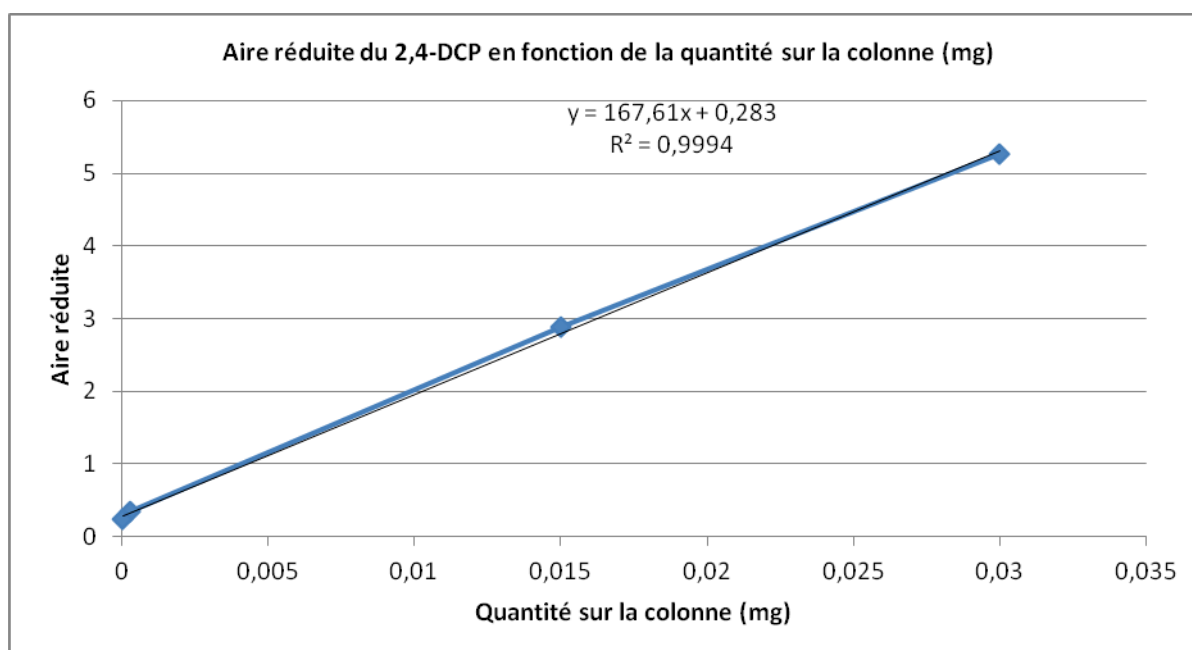


Figure 6. Représentation de l'aire réduite du 2,4-DCP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

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 ($1 \cdot 10^{-4}$ g/l) est encore plus de 20 fois supérieur au bruit de fond de la méthode.

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

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

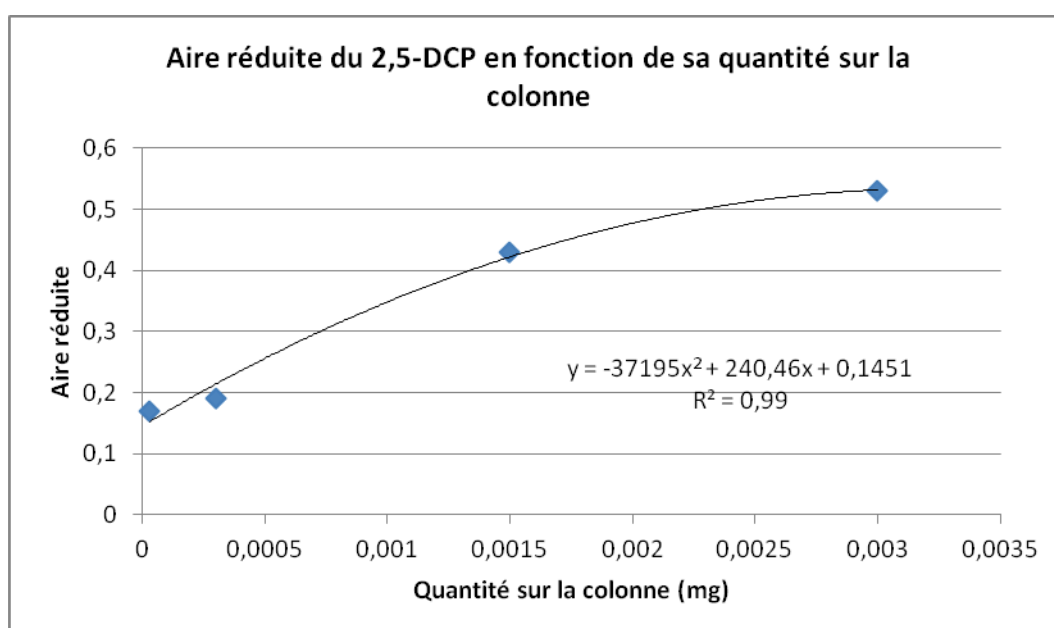


Figure 7. Représentation de l'aire réduite du 2,5-DCP en fonction de la quantité sur la colonne en mg.

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 une 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.

4. Conclusion et perspectives

Le 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.

5. Références

BAMFORTH C., RUSSEL I., STEWARD G., 2008, *Beer : a quality perspective (Handbook of alcoholic beverages)*, Academic Press, 287 p

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

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

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

IPCS INCHEM, *Chlorophenols other than pentachlorophenols*, Adresse URL : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc093.htm>

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

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

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

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

KOSTRHOUNOVA 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

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

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

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

NICHOLLS C.R. (2004), *At line testing of chlorophenols and chloroanisole contaminants in commercial wine production*, Thèse de doctorat, Université de Cranfield

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

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

Santé Canada, 1987, *Les chlorophénols*, Adresse URL : <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/chlorophenols/index-fra.php>

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

WELLS D., 2007, *Organohalogen taints in food*, **Food Australia**, volume 59, numéro 3,

WEST D.B. , LAUTENBACH A.F. , BRUMSTED D. , 1965, *Phenolic Characteristics in Brewing. I*, J.E Siebel Sons' Company, Inc., Chicago, Adresse URL : <http://www.probrewer.com/resources/library/42-phenolic.pdf>

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>

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

6. Liste des abréviations.

CPs = Chlorophénols

DAD = Diode Array Detector

DCP = Dichlorophénols

DL₅₀ = Dose létale 50

DLLME = Dispersive Liquid Liquid Microextraction

EC = Electrochemical Detection

EC₅₀ = Half maximal effective concentration

ECD = Electron Capture Detector

EPA = US Environmental Protection Agency

FID = Flame Ionization Detector

GC = Gas Chromatography

HF-LPME = Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction

HPLC = High Performance Liquid Chromatography

HS-SPME = Headspace-Solid Phase Microextraction

IARC = International Agency for Research on Cancer

ICPS -Inchem = International program on chemical safety - Chemical Safety Information from intergovernmental organizations

INRS = Institut National de Recherche et de Sécurité en France

L-L = Extraction Liquide Liquide

LC/ MS-MS = Liquid Chromatography / Mass Spectrometry - Mass Spectrometry

LPME = Liquid Phase Microextraction

MASE = Membrane Assisted Solvent Extraction

MIP-AES = Microwave Induced Plasma - Atomic Emission Spectrometry

MonoCp = monochlorophénols

MS = Mass Spectrometry

PCP = Pentachlorophénols

PDMS = Polydiméthylsiloxane

SBSE = Stir Bar Sorptive Extraction

SPE = Solid Phase Extraction

SPME = Solid Phase Microextraction

TCP = Trichlorophénols

TeCP = Tétrachlorophénols

USE = Ultrasonic Extraction

XAD = Amberlite d'échange ionique