

# Identification par couplage CG/SM des sous-produits de chloration de deux acides aminés libres, la proline et la méthionine

Identification of chlorination by-products of two free  
amino acids, proline and methionine, using GC/MS

L. HURÉÏKI<sup>1</sup> et J.P. CROUÉ<sup>1</sup>

Reçu le 25 octobre 1995, accepté le 20 juin 1996\*.

## SUMMARY

The objective of our work was to identify the chlorination by-products of two amino acids, proline and methionine, structures that were found to be very reactive with chlorine showing high chlorine demand and high total organo-halogenated compounds (TOX) and chloroform formation potentials.

Concentrated solutions of each amino acids were prepared in MilliQ water buffered with phosphate at pH 8 and chlorinated at a dose equal to 8 moles of chlorine per mole of amino acid. Chlorinated solutions were stored at 20°C (obscurity) for 72 hours before developping our extraction procedure. Two different solvents were used, pentane first, followed by diethyl ether at acidic and basic pH.

After concentration (rotatory evaporation, nitrogen flow) and derivatization (a few drops of diazomethane were added to the diethyl ether extracts prior to analysis), the different extracts were analysed by gaz chromatography/mass spectrometry.

Most of the by-products that were identified were analysed from the diethyl ether extracts obtained at acidic pH. A large number of structures were detected in the extracts of the chlorinated proline solution, and only a few in the methionine one. Most of the identified compounds are chlorinated structures including a carboxyl function. Trichloroacetic acid and dichloroacetic acid were identified as common chlorination by-products of the two amino acids studied. The two intermediates of the formation of these two acids,  $\text{CCl}_3\text{CONH}_2$  and  $\text{CHCl}_2\text{CONH}_2$  were also found.

The N-chlorodichloroaldimine and the N-chlorotrichloroaldimine have been identified as chlorinated proline by-products. The chlorination of this amino

1. Laboratoire Chimie de l'Eau et des Nuisances URA CNRS 1468, École Supérieure d'Ingénieurs de Poitiers, Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France.

\* Les commentaires seront reçus jusqu'au 31 décembre 1997.

acid also leads to the formation of chloroacids compounds which present an aldehyde or a nitrile function as a terminal group.

A pyrrole structure was also proposed. The chlorination of methionine have been shown to produce several chlorosulfured compounds. The structures that were identified in the chlorinated methionine solution are,  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ ,  $\text{H}_2\text{CCISO}_2\text{Cl}$ ,  $\text{HCCl}_2\text{SO}_2\text{Cl}$  and  $\text{HCCl}_2\text{CONH}_2$ . Molecular sulfur (S8) was also obtained.

**Key-words:** *proline, methionine, chlorination, GC/MS analysis, chlorinated and chlorosulfured byproducts.*

## RÉSUMÉ

L'objectif de ces travaux a consisté en l'identification des sous-produits de chloration de deux acides aminés libres, la proline et la méthionine, structures reconnues pour leur grande réactivité avec le chlore.

Les expériences ont été conduites à pH 8 pour un taux de chlore fixé à 8 moles de chlore par mole d'acide aminé et un temps de contact de 72 heures. Les sous-produits de chloration ont été extraits successivement par le pentane et le diéthyléther (pH acide et pH basique, extraction suivie d'une dérivation au diazométhane) et identifiés par couplage CG/SM.

L'essentiel des sous-produits de chloration identifiés a été observé dans l'extrait étheré obtenu à pH acide, que ce soit pour la proline ou la méthionine. Les acides dichloroacétique et trichloroacétique, composés retrouvés dans les eaux de surface désinfectées au chlore, ont été détectés pour les deux molécules étudiées.

Les travaux effectués avec la proline ont permis d'identifier également la N-chlorodichloroacétamide et la N-chlorotrichloroacétamide. On peut noter également la formation de quelques chloroacides présentant un groupement terminal aldéhyde ou nitrile caractéristique, ainsi que des composés à structure pyrrole.

En ce qui concerne la méthionine, les analyses par couplage CG/SM ont permis d'identifier quelques composés organiques chlorosoufrés comme le chlorure de méthyle sulfonyle, le chlorure de chlorométhyle sulfonyle et le dichloro-1,1 diméthyle sulfonyle, ainsi que du soufre moléculaire S8.

**Mots clés :** *proline, méthionine, chloration, couplage CG/SM, sous-produits chlorés et chlorosoufrés.*

## 1 – INTRODUCTION

L'origine des composés organohalogénés formés lors de la chloration des eaux naturelles est principalement attribuée aux substances humiques qui constituent une fraction importante du carbone organique dissous (environ 50 % du COD des eaux de surface). Les nombreux travaux de chloration effectués à partir des substances humiques isolées d'eaux naturelles ont en effet permis d'identifier un grand nombre de structures également observées dans les eaux potables désinfectées au chlore (CROUÉ, 1987 ; RECKHOW *et al.*, 1990).

Les substances humiques et en particulier les fractions de plus hautes masses moléculaires sont en grande partie éliminées au niveau des étapes de clarification (VIK *et al.*, 1985 ; SEMMENS et STAPLES, 1986) et d'ozonation (LEGUBE *et al.*, 1989) des filières de traitement.

Les travaux réalisés par JADAS-HÉCART (1989) ont montré que les acides aminés peuvent alors englober au niveau des eaux traitées une part importante des sites consommateurs de chlore. Les résultats publiés par HUREIKI *et al.* (1994) ont de plus mis en évidence la forte réactivité vis-à-vis du chlore de certains acides aminés libres. On obtient alors des potentiels de formation de trihalométhanes (PFTHM) et de composés organohalogénés totaux (PFTOX) élevés.

L'action du chlore sur les acides aminés se traduit par la formation des chloramines minérales, des aldéhydes et des nitriles correspondants (ALOUINI, 1987 ; LE CLOIREC et MARTIN, 1984) et notamment des sous-produits organochlorés (PEREIRA *et al.*, 1973 ; DE LEER *et al.*, 1986,1990 ; TREHY *et al.*, 1986 ; HORTH, 1989 ; BENABDESSALEM *et al.*, 1990).

Toutefois, seules quelques structures ont été appréhendées dans la littérature, comme l'acide aspartique, la tyrosine, la phénylalanine et la lysine (TREHY *et al.*, 1986 ; DE LEER *et al.*, 1986 ; HORTH, 1989) ou encore la proline (DE LEER *et al.*, 1990).

L'objectif de cette étude a consisté en l'identification des sous-produits de chloration de deux acides aminés ; un acide aminé secondaire, la proline et un acide aminé soufré, la méthionine. Si le premier a déjà fait l'objet de quelques travaux, en revanche, très peu des données sont disponibles pour la molécule soufrée. Notons que ces deux composés sont caractérisés par des potentiels de formation de chloroforme (PFTHM) et de composés organohalogénés totaux (PFTOX) importants (HUREIKI, 1993 ; HUREIKI *et al.*, 1994).

## 2 – MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Généralités

La verrerie utilisée lors des expériences de chloration est préalablement lavée à l'acide sulfochromique, puis rincée à l'eau Milli-Q produite par une unité Millipore (Milli RO et Milli Q), présentant une résistivité de  $18 \cdot 10^6 \Omega \text{ cm}^{-1}$  et une teneur en COD inférieure à  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ . Elle est ensuite stockée pendant au moins deux heures sous solution de chlore ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), puis rincée à l'eau Milli-Q juste avant utilisation.

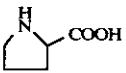
La solution mère de chlore est préparée au laboratoire par action de l'acide chlorhydrique sur le permanganate de potassium, le chlore libéré étant piégé dans une solution de soude à pH 13. La concentration en chlore de la solution obtenue varie entre 20 et  $25 \text{ mg Cl}_2 \text{ l}^{-1}$ . Le titre des solutions filles obtenues par dilution pour les expériences est vérifié par iodométrie avant chaque utilisation, après avoir ramené le pH à 9. Les solutions tampons sont préparées dans de l'eau Milli-Q par neutralisation de l'acide phosphorique avec de la soude.

### 2.2 Caractéristiques des acides aminés libres étudiés

Le tableau 1 présente quelques caractéristiques physico-chimiques des deux acides aminés libres étudiés dans ce travail.

**Tableau 1** Structures et potentiels de réactivité avec le chlore des acides aminés libres étudiés (d'après HUREIKI *et al.*, 1994).

**Table 1** Structures and chlorine reactivity potentials of the studied free amino acids (data from HUREIKI *et al.*, 1994).

Acides Aminés	Masse moléculaire	Chlore appliqué mg/mg C	Demande en chlore mg/mg C	PFTOX $\mu\text{g Cl}^-/\text{mg C}$	PFCHCl <sub>3</sub> $\mu\text{g Cl}^-/\text{mg C}$	Structure
Méthionine (mét)	149,21	9,4	7,1	80,5	< 0,2	$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Proline (pro)	115,13	9,4	6,3	189	< 0,2	

Les expériences ont été conduites avec des solutions d'acides aminés concentrées ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), préparées avec un tampon phosphate pH 8 de force ionique  $10^{-2} \text{ M}$ . La chloration a été réalisée sur un volume de 1 000 ml, en flacon rodé à un taux de  $9,4 \text{ mg/mg C}$  (à l'obscurité, à  $20^\circ \text{C}$ ). La réaction a été stoppée après 72 heures de temps de contact par ajout d'un excès de métaarsénite de sodium ( $0,77 \text{ mol l}^{-1}$ ). En parallèle, la solution tampon a été chlorée puis déchlorée dans les mêmes conditions (quantité de chlore équivalente et réducteur en excès).

Un blanc a été réalisé à chaque expérience par chloration d'eau Milli-Q tamponnée (pH 8, phosphate  $10^{-2} \text{ M}$ ) avec une dose de chlore appliquée équivalente à celle de l'échantillon d'acide aminé étudié.

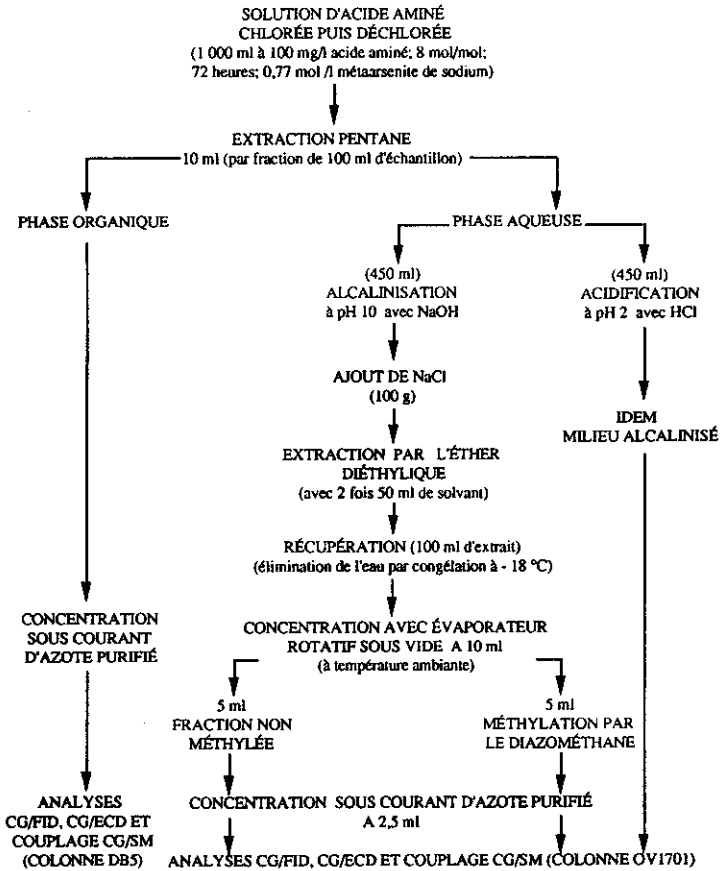
Les solutions d'acides aminés chlorées puis déchlorées ainsi que les blancs, ont alors fait l'objet d'un protocole expérimental d'extraction identique. Il comprend plusieurs phases d'extraction liquide/liquide réalisées avec des solvants de polarité différente et pour des conditions de pH variables. Les extraits obtenus ont été purifiés et suivis éventuellement d'une dérivatisation chimique par le diazométhane.

Les solvants utilisés ont été contrôlés par analyse chromatographique avant toute phase d'extraction. Les différentes étapes du protocole d'identification sont présentées dans la figure 1. Notons que les sels utilisés lors de cette expérience sont préalablement purifiés par extraction à l'éther diéthylique.

### 2.3 Identification par couplage chromatographie gazeuse /spectrométrie de masse

L'identification des sous-produits de chloration des acides aminés libres étudiés a été réalisée par couplage chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse. Le choix de l'équipement s'est porté sur l'ensemble chromatographique VARIAN 3300 couplé à un spectromètre de masse FINNIGAN ITS 40 (piège d'ions).

Le système par piégeage d'ions ou « ion trap » offre à la spectrométrie de masse une limite de détection, en spectre complet, nettement inférieure à celle



**Figure 1** Méthode d'extraction des sous-produits de chloration des acides aminés.  
*Extraction procedure for chlorination by-products identification.*

des systèmes traditionnels quadripolaires (10 ppb en spectre complet pour l'hexachlorobenzène). Ce seuil de sensibilité très faible, voisin de ceux observés en chromatographie gazeuse munie de détection spécifique (détecteurs à capture d'électrons ou thermoionique) est particulièrement intéressant pour l'identification de composés traces.

Le « piégeage d'ions » s'accompagne, en contrepartie, d'un inconvénient majeur, celui d'engendrer des phénomènes dits « d'autoionisation ». Ces phénomènes, qui sont reconnus par les scientifiques et qui peuvent virtuellement affecter les composés de toute nature, sont associés au temps de réaction et à la concentration en ions dans la source (MC LUCKEY *et al.*, 1988 ; PANNEL *et al.*, 1989). L'obtention d'un rapport  $(M + 1)^+ / M^+$  anormalement élevé engendre des difficultés d'interprétation des spectres. Les problèmes d'interprétation des spectres de masses obtenus ne peuvent être résolus que par la mise en œuvre des deux modes de fragmentation par impact électronique et par ionisation chimique.

Dans le cadre de ces travaux, tous les extraits obtenus avec le pentane et l'éther diéthylique qui ont fait l'objet d'une étude par couplage chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse, ont été préalablement analysés par chromatographie gazeuse (détecteurs à ionisation de flamme et à capture d'électrons). Ces opérations ont pour objectifs d'apprécier grossièrement la concentration des composés dans les extraits afin de limiter les phénomènes d'autoionisation dans "le piège d'ions" (dilution si nécessaire) et d'effectuer une identification préalable des composés de types organohalogénés connus.

Les composés extraits par le pentane ont été chromatographiés sur une colonne capillaire apolaire de type DB5 (JW Scientific, L = 30 m, DI = 0,32 mm). Les composés obtenus par extraction avec l'éther diéthylique ont subi une chromatographie sur une colonne sensiblement plus polaire de type OV 1701 (L = 25 m, DI = 0,25 mm). Les mêmes colonnes ont été utilisées lors des injections sur les systèmes CG/FID, CG/ECD et CG/SM.

Les analyses par couplage CG/SM ont été pratiquées, pour chaque extrait, en mode impact électronique et en mode ionisation chimique. L'isobutane a été retenu comme gaz réactant pour l'ionisation chimique. Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

Températures : Injecteur 250 °C (splitless)  
Four 40 °C (5 min) à 5 °C/min jusqu'à 220 °C (5 min)  
Source 220 °C impact électronique  
180 °C ionisation chimique

Gaz vecteur : Hélium

### 3 – RÉSULTATS – DISCUSSION

#### 3.1 Principaux sous-produits de chloration identifiés par couplage CG/SM : Chromatogrammes et spectres de masses

La détermination de structures organiques à partir de leur spectre de masse est toujours entachée d'un certain degré d'incertitude lorsque celui-ci ne peut pas être comparé à celui d'un étalon analysé dans les mêmes conditions. Cette rigueur dans le mode d'interprétation ne peut matériellement pas être appliquée en permanence.

Dans le cadre de ce travail, les produits identifiés à partir des spectres obtenus en CG/SM par impact électronique et ionisation chimique sont proposés sous deux rubriques :

- composés dont la structure proposée a été confirmée en comparant leur spectre de masse avec ceux d'une banque de données. Ils seront assignés de la lettre C ;
- composés dont la structure présentée est incertaine. Ils seront notés T pour tentative.

La valeur de  $(M + 1)^+$ , qui accompagne ces structures, a été déduite des résultats acquis en mode d'ionisation chimique.

### 3.1.1 La proline

Une recherche poussée a déjà été entreprise par DE LEER *et al.* (1990) sur l'identification des sous produits de chloration de la proline. Ce composé a toutefois été retenu pour cette étude pour deux raisons. La première, les données de la bibliographie ont été utilisées comme référence afin d'apprécier et de comparer la qualité des spectres de masse obtenus sur un spectromètre de masse à piège d'ions avec ceux provenant d'un système quadripôle plus classique. Le système à piège d'ions peut engendrer en effet des phénomènes d'autoionisation (MC LUCKEY *et al.*, 1988 ; PANNEL *et al.*, 1989), mais en contrepartie, ce type de spectromètre est reconnu comme beaucoup plus sensible en spectre complet. C'est cet avantage qui a justifié la seconde raison de ce choix dans le but de tenter d'identifier de nouvelles structures présentes à l'état de trace.

Seuls quelques composés ont été identifiés dans l'extrait pentane (tabl. 2). Les structures identifiées sont principalement issues des données obtenues avec l'extrait étheré à pH acide. La figure 2 présente le chromatogramme obtenu en mode impact électronique (courant d'ions total).

Les principaux composés identifiés sont reportés avec leur spectre de masse développé dans le tableau 3. L'essentiel des structures proposées correspond à des esters méthyliques chlorés, l'estérification est probablement due à l'action du diazométhane sur les acides correspondants.

### 3.1.2 La méthionine

Très peu d'informations sont disponibles sur la nature des sous-produits de chloration des acides aminés soufrés. Pour la méthionine, seul le chloroforme, le trichloro-1,1,1 éthane et le dichloroacétonitrile ont été identifiés (FIELDING and HORTH, 1986 ; HORTH, 1989). Néanmoins, les résultats présentés dans le tableau 1 ont montré que ce composé est un fort précurseur de TOX.

**Tableau 2** Spectres de masse des principaux composés de l'extrait pentane de la solution de proline chlorée.

**Table 2** *Mass spectra of the major chlorination byproducts of proline isolated with pentane.*

	Composés		M + 1 (IC)	Spectres de masse m / z (IR)
1	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> NCl	T	104	- 41 (400) - 39 (69,3) - 68 (49,3) - 76; 78 (39,3; 13,1) <b>104; 106</b> (6,25; 2,1) - 144; 146 (1,2; <1)
2	(C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> NCl)-CCl <sub>2</sub> CHO	T	212	<b>39</b> (100) - 41 (59,3) - 75; 77 (86,8; 25) - 102; <b>104</b> (30; 10,3) - 110; 112; 114 (41,8; 25; 4,3) - 67 (19,3) - 49; 51 (11,5; 5,3) - 138; <b>140; 142</b> (21,2; 13,7; 2,8) - 212; <b>214; 216</b> (4,3; 4,3; 1,5)
3	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> NCl	T	101 (M +)	<b>101; 103</b> (100; 30) - 39 (74,3) - 47; 49 (11,8; 3,7) - 66 (15) <b>73; 75</b> (21,8; 8,1)

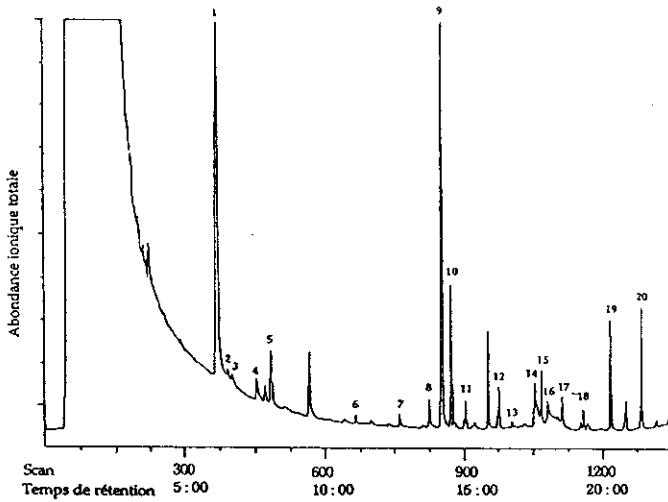
IR : Intensité relative du fragment par rapport au fragment de base ; IC : Ionisation chimique ; T : Tentative d'identification

**Tableau 3** Spectres de masse des principaux composés de l'extrait éthéré et méthylé avec le diazométhane (pH acide) de la proline chlorée.

**Table 3** Mass spectra of the major chlorination byproducts of proline isolated with ether and methylated with diazomethane at acidic pH.

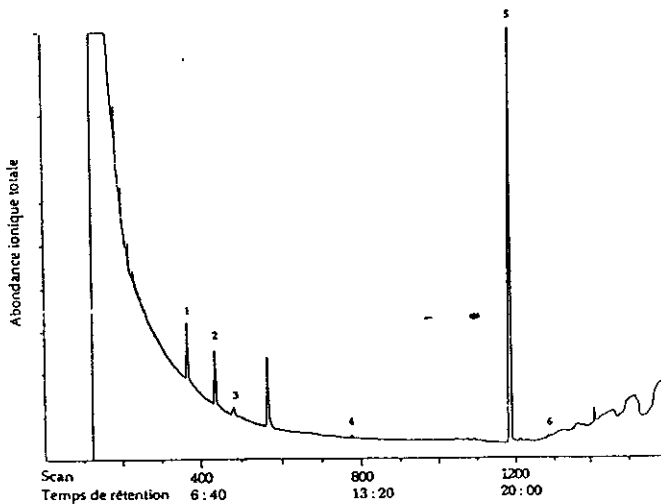
	Composés		M + 1 (IC)	Spectres de masse, m/z (IR)
1	<chem>CC(=O)OCCl</chem>	C	143	83; 85; 87 (100; 63; 9,3) - 59 (45) - 48; 50 (25; 8,1) 35 (10,6) - 143; 145; 147 (5; 3,1; <1)
2	<chem>CC(=O)OCClCCl</chem>	C	123	87 (100) - 63; 65 (55, 14) - 59 (35) 45 (36,8) - 49; 51 (9,3; 3,7) - 123; 125 (6,2; 3,1)
3	<chem>CC(=O)OCClCCl</chem>	T	138	39 (100) - 75; 77 (89; 29) - 41 (73) - 110; 112; 114 (40,6; 26,8; 4,3) - 67 (17,5) - 138; 140 (7,5, 1,2)
4	<chem>CC(=O)OCClCCl</chem>	C	176	58 (100) - 47; 49 (16,8, 6) - 82; 84; 86 (12,5, 8,1, 1,8) - 117; 117; 121 (7,5; 6,2; 2,1) - 113 (13,1) - 176; 178 (1,2; <1)
5	<chem>CC(=O)OCClCCl</chem>	C	177	59 (100) - 117; 119; 121 (59; 52; 6) - 82; 84; 86 (46,8; 28,8; 5) - 47, 49 (58,7; 19,3) - 35 (25) - 141; 143; 145 (13,7; 8,7; 1,5) - 177; 179; 181 (1; 1; <1)
6	<chem>CC(=O)OCClCCl</chem>	C	176	92; 94 (100; 31,8) - 83; 85; 87 (40,6; 25,6; 5) - 48; 50 (22,5; 7,5) - 110; 112; 114 (29,3; 20; 8,7) - 140; 142 (17,5; 8,1) - 176 (1)
7	<chem>CC(=O)OCClCCl</chem>	T	151	87 (100) - 55 (65) - 62, 64 (31,2; 10) - 83 (28,7) 119; 121 (25,6; 10,6) - 151; 153 (2,5; <1)
8	<chem>CC(=O)OCClCClCCl</chem>	C	147	115 (100) - 55 (83) - 59 (35) - 87 (27) - 42 (10) - 147 (<1)
9	<chem>CC(=O)OCClCClCCl</chem>	T	185	61; 63 (100; 38) - 117; 119 (96,8; 33) 96; 98; 100 (41,8; 26,8; 8,1) - 156; 158; 160 (33,7; 19,3; 3,4) - 59 (46) - 185; 187; 189 (65; 40; 6,3)
10	<chem>CC(=O)OCClCClCCl</chem>	T	114	54 (100) - 82 (81) - 42 (23) - 59 (14) - 86 (11) - 114 (30)
11	<chem>CC(=O)OCClCClCCl</chem>	C	210	92; 94 (100; 30,6) - 63; 65 (26,8; 8,1) - 117; 119; 121 (23; 19,4; 6) 82; 84; 86 (18,1; 11,2; 1,8) - 35 (16,8) - 144; 146; 148 (8,4; 8,4; 3,1) 174; 176; 178 (6,2; 6,2; 2,5) - 210 (<1)
12	<chem>CC(=O)OCClCClCClCCl</chem>	T	199	43 (100) - 131; 133 (9,3; 3,1) - 61; 63 (7,5; 3,1) 167; 169; 171 (3,7, 2,5, <1) - 199; 201 (<1, <1)
13	<chem>CC(=O)OCClCClCClCCl</chem>	C	134	55 (100) - 59 (75) - 41 (53) - 30 (57) - 46 (25) - 102 (11)
14	<chem>CC(=O)OCClCClCClCClCCl</chem>	T	207	33 (100) - 112; 114; 116 (45,6; 26,2; 4,4) - 83; 85; 87 (21,2; 13,7; 6,2) - 48; 50 (22,5; 7,5) - 59 (18,7) - 89 (32,5) - 127; 129; 131 (5,6; 3,7; 1) - 207; 209; 301 (2,5; 2,5; 1)
15	<chem>CC(=O)OCClCClCClCClCCl</chem>	T	207	30 (100) - 59 (57) - 61; 63 (80; 27,5) - 96; 98; 100 (12,5; 8,1; 1,5) - 155; 157; 159 (20; 12,5; 2,1) - 46 (12,5)
16	<chem>CC(=O)OCClCClCClCClCCl</chem>	C	128	44 (100) - 48; 50 (8,7; 2,8) - 83; 85; 87 (3,7; 2,5; <1) 128; 130; 132 (<1; <1; <1)
17	<chem>CC(=O)OCClCClCClCClCCl</chem>	T	148	68 (100) - 52 (47) - 59 (26) - 88; 90 (21; 6,8) - 42 (18) 148; 150 (2,5; 1)
18	<chem>CC(=O)OCClCClCClCClCClCCl</chem>	T	182	59 (100) - 102; 104 (100; 30,6) - 52 (83) - 40 (30) 122; 124; 126 (52; 33; 5,6) - 86; 88 (55; 19,3) - 46; 148 (8,7; 3,1) - 182; 184; 186 (3,7; 2,5; <1)
19	<chem>CC(=O)OCClCClCClCClCClCClCCl</chem>	T	169	105 (100) - 107 (31,2) - 55 (39,3) - 39 (33,7) - 30 (41,8) 42 (26,2) - 169; 171; 173 (5,6; 3,7; 1)
20	<chem>CC(=O)OCClCClCClCClCClCClCCl</chem>	C	162	44 (100) - 98; 100; 102 (6,2; 3,7; 1) - 117; 119; 121 (1,8; 1,8; <1) 82; 84; 86 (7,5; 3,7; 1) - 47; 49 (12,5; 3,7) - 35 (7,5) 162; 164; 166 (1,2; 1,2; <1)





**Figure 2** Chromatogramme reconstitué de l'analyse par couplage CG/SM (impact électronique) de l'extrait étheré (pH acide) de la solution chlorée de proline.  
*GC/MS chromatogram of chlorinated proline (ether extract, acidic pH).*

Le chromatographe obtenu à partir de l'analyse CG/SM, en impact électronique de l'extrait étheré acide, est présenté à titre d'exemple dans la figure 3. Les structures identifiées à partir des extraits pentane et étheré (pH acide) sont regroupées dans le tableau 4.



**Figure 3** Chromatogramme reconstitué de l'analyse par couplage CG/SM (impact électronique) de l'extrait étheré (pH acide) de la solution chlorée de méthionine.  
*GC/MS chromatogram of chlorinated methionine (ether extract, at acidic pH).*

**Tableau 4** Spectres de masse des principaux composés de l'extrait étheré et méthylyé par le diazométhane (pH acide) et de l'extrait pentane de la méthionine chlorée.

**Table 4** Mass spectra of the major chlorination byproducts of methionine identified in methylated ether extract at acidic pH and pentane extract.

Composés		M + 1 (IC)	Spectres de masse m / z (IR)				
1	Extrait étheré	C	143				
	HCCl <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>			-			
	2			CH <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> Cl	C	115	79; 81 (100; 4,6) - 64; 66 (7,5; <1) - 48; 50 (18,1; 1,2) 45 (17,5) - 35 (8,7) - 115; 117; 119 (3,7; 1,5; <1)
	3			CCl <sub>3</sub> COOCH <sub>3</sub>	C	177	-
	4			H <sub>2</sub> CClSO <sub>2</sub> Cl	T	149	49; 51 (100; 30) - 64; 66 (7,8; <1) - 35 (7,5) - 149 (1)
	5			HCCl <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	T	163	83; 85; 87 (100; 64; 10) - 48; 50 (11,5; 2,5) - 63; 65 (8,7; 1,3) - 45 (11,2) - 163; 165; 167 (1,2; <1; <1)
6	HCCl <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	C	128	-			
	Extrait pentane						
	HCCl <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	T	163	-			
	S <sub>8</sub>	C	257	64; 66 (100; 8,7) - 96; 98 (16,8; 3,8) - 128; 130 (21,8; 4,06) - 160; 162 (17,5; 4,06) - 192; 194 (11,5; 3,1) - 256; 258 (32,5; 11,2)			

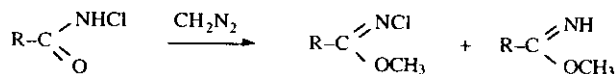
IR : Intensité relative du fragment par rapport au fragment de base ; IC : Ionisation chimique ; C : Structure confirmée ; T : Tentative d'identification

### 3.2 Discussion des spectres de masses des principaux composés chromatographiés

#### 3.2.1 La proline

L'étude effectuée avec la proline a permis de mettre clairement en évidence la formation des acides dichloroacétique (pic majoritaire, composé 1) et trichloroacétique (composé 5), composés organo-halogénés majoritaires analysés dans les eaux de surface chlorées et dans les solutions des substances humiques chlorées (RECKHOW, 1984 ; CROUÉ, 1987). De plus, il est intéressant de noter que quelques chloroacides identifiés présentent un groupement terminal aldéhyde ou nitrile caractéristique (composés 7, 9, 17, 18).

Le spectre de masse du composé 6 correspond parfaitement à celui de la N-chlorodichloro-acétimide identifié par PETERS *et al.* (1990). Ce produit résulte de la méthylation par le diazométhane de la N-chlorodichloroacétamide. D'après ces auteurs, la méthylation de ces composés N-chloroamides conduit à deux produits estérifiés, N-chloroimide et N-imide non substitué :



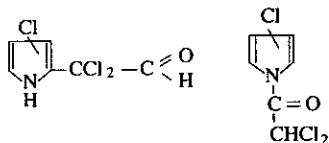
Le rapport entre la N-chloroimide et l'imide non substitué correspondant dépend de l'excès du diazométhane utilisé. Cependant, l'imide non substitué

correspondant à la N-chlorodichloro-acétimide n'a pas pu être détecté. Par contre, la présence de N-chlorotrichloroimide (composé 11) et de son imide correspondant non substitué (composé 4) a été mise en évidence dans cette étude.

La structure du composé 9, produit majoritaire au même titre que l'acide dichloroacétique (composé 1), si on se réfère à l'intensité de son pic chromatographique, n'a pas pu être parfaitement étudiée. L'analyse du spectre de masse obtenu en impact électronique nous a permis de mettre en évidence deux groupements importants  $(\text{CH}_2\text{CCl}_2)^+$  et  $(\text{COOCH}_3)^+$ . L'analyse par ionisation chimique a confirmé un pic de masse de  $(M + 1)^+ = 185$ , conduisant par déduction à la proposition de la structure suivante :  $\text{OHC}-\text{CH}_2-\text{CCl}_2-\text{COOCH}_3$ .

L'étude des extraits pentane et étheré (pH basique) a permis de mettre en évidence la présence de structure du type pyrrole ou pyrroline (tabl. 2). D'après la littérature, le groupement pyrrole non substitué se caractérise par un fragment d'ion moléculaire relativement important et un pic de base à  $m/z = 39$ .

Ainsi pour le composé 2, qui représente le sous-produit le plus abondant de l'extrait pentane si on se réfère à l'intensité du pic chromatographique, deux structures peuvent être proposées :



### 3.2.2 La méthionine

Outre les acides dichloroacétique (composé 1) et trichloroacétique (composé 3) et le dichloroacétamide (composé 6), sous-produits organohalogénés qui semblent classiques pour les acides aminés, la chloration de la méthionine conduit à la formation des produits chlorosoufrés. Les spectres de masse des trois composés listés : le chlorure de méthyle sulfonyle (composé 2), le chlorure de chlorométhyle sulfonyle (composé 4) et le dichloro-1,1 diméthyle sulfonyle (composé 5), présentent tous des fragments de faible intensité 64 et 66, caractéristiques des fragments sulfonyles ( $\text{SO}_2$ ), l'atome de soufre de masse 32 et son isotope de masse 34 (4 %).

D'autres composés chlorosoufrés ont été mis en évidence lors de l'analyse CG/SM de l'extrait pentane, leur structure n'étant pas présentée car trop incertaine. Néanmoins, outre les fragments 64 et 66, les fragments majoritaires analysés sont comparables à ceux observés pour les composés de type chloroalcane, avec des fragments caractéristiques  $(\text{CCl}_3\text{CCl}_2)^+$ ,  $(\text{CCl}_3)^+$ ,  $(\text{CCl}_2)^+$  et  $(\text{CHCl}_2)^+$ . Les composés analysés sont probablement des tri-, tétra-, penta et hexa chlorosoufrés.

On peut noter que le composé 5,  $\text{HCCl}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_3$  a été identifié dans les deux extraits étherés et pentane ; il ne provient donc pas d'une réaction secondaire liée au  $\text{CH}_2\text{N}_2$ .

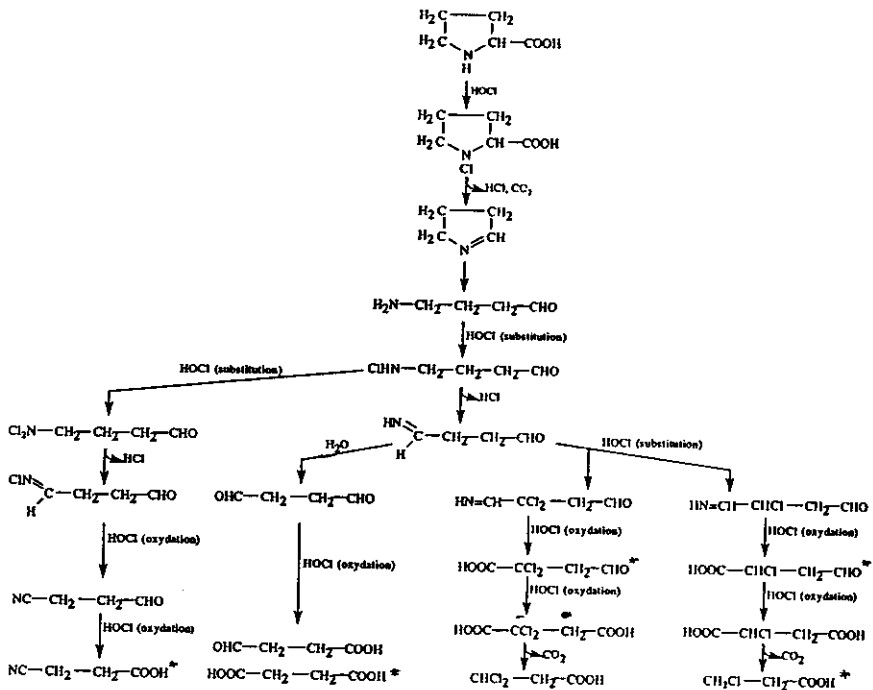
Enfin, l'analyse de l'extrait pentane a permis de mettre en évidence la présence de soufre moléculaire  $\text{S}_8$ . Ce sous-produit peut provenir de réaction de polymérisation en chaîne.

### 3.3 Proposition de mécanisme de chloration de la proline et de la méthionine

#### 3.3.1 La proline

Sur la base des différents sous-produits de réaction identifiés et en s'appuyant sur les mécanismes réactionnels déjà publiés sur la proline ou sur d'autres acides aminés, les figures 4 et 5 proposent des mécanismes de réaction permettant d'expliquer la formation des principales structures identifiées dans cette étude.

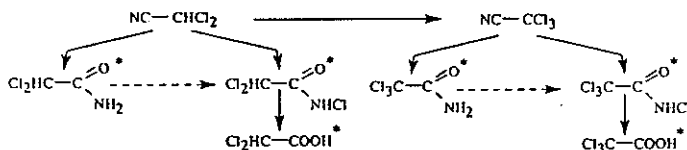
Les premières étapes intermédiaires de réaction proposées par DE LEER *et al.* (1990), conduisent à la destruction du cycle et à la formation d'un intermédiaire de réaction, l'amino-4 butanal. Les différentes voies possibles d'oxydation de ce composé (fig. 4) permettent d'expliquer la formation des principaux sous-produits listés dans le tableau 3 ainsi que certaines structures discutées par DE LEER *et al.* (1990).



**Figure 4** Chloration de la proline : schéma réactionnel basé sur la production de l'amino-4, butanal. Le mécanisme de ce dernier a été proposé par DE LEER *et al.* (1990). (\* Structures identifiées dans cette étude).

*Chlorination mechanism of proline based on the production of 4-aminobutanal. The formation of 4-aminobutanal was proposed by DE LEER *et al.* (1990). (\* Structures identified in this study).*

La production des acides dichloroacétique et trichloroacétique semble commune pour les acides aminés. La formation de ces deux composés pourrait être issue de l'oxydation des dichloro et trichloroacétonitriles (fig. 5), structures non détectées dans nos extraits compte tenu de nos conditions de travail (excès de chlore, temps de contact 72 heures), mais identifiées par d'autres auteurs (HORTH, 1989).

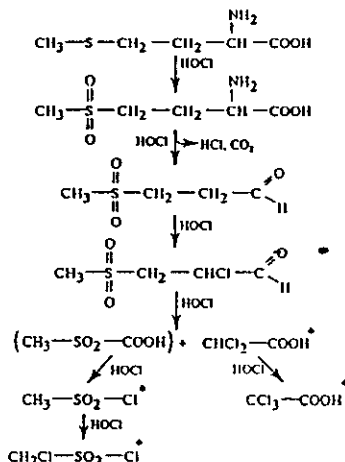


**Figure 5** Mécanisme de formation des acides dichloro et trichloroacétiques à partir des dichloro et trichloroacétonitrile, (\* structures identifiées dans cette étude).

*Dichloroacetonitrile and trichloroacetonitrile as intermediate structures of the production of dichloroacetic and trichloroacetic acids, (\* structures identified in this study).*

### 3.3.2. La méthionine

La réactivité des acides aminés soufrés avec le chlore est relativement importante comme en témoignent les valeurs de demande en chlore et le PFTOX (tabl. 1). La présence du groupement soufré au sein de la structure de la méthionine (et de la cystéine) est très certainement responsable d'une part importante de la consommation en chlore de cette molécule, le groupement aminé n'engendrant qu'une demande en oxydant de l'ordre de 2 moles par mole.



**Figure 6** Chloration de la méthionine : proposition d'un schéma réactionnel simplifié, (\* structures identifiées dans cette étude).

*Chlorination of methionine : proposition of a simplified reaction scheme, (\* structures identified in this study).*

Le schéma réactionnel proposé figure 6 met en évidence l'oxydation classique d'un thioéther en sulfoxide et en sulfone dans les premières étapes de la réaction. La grande réactivité de la fonction aminée conduit à la formation d'une structure présentant un groupement  $\text{SO}_2$  et une fonction aldéhydique en bout de chaîne. L'attaque de cette molécule par le chlore conduirait à la rupture de la liaison  $\text{C}_2\text{-C}_3$  pour donner l'acide dichloroacétique ainsi qu'un composé de structure  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{COOH}$ . Si ce dernier composé n'a pas été identifié, par contre, l'acide dichloroacétique et l'acide trichloroacétique ont été détectés dans l'extrait étheré de la solution de méthionine chlorée. Le dichloro-1,1 diméthyle sulfonyle, structure majoritaire identifiée, pourrait également être issu de cette rupture de la liaison  $\text{C}_2\text{-C}_3$ .

La formation hypothétique de la molécule  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{COOH}$  permet d'expliquer l'existence du chlorure de méthyle sulfonyle ( $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-Cl}$ ) et du chlorure de chlorométhyle sulfonyle ( $\text{CH}_2\text{Cl-SO}_2\text{-Cl}$ ).

## CONCLUSION

Les acides dichloroacétique et trichloroacétique, composés organochlorés majoritaires retrouvés dans les eaux de surface chlorées, ont été identifiés comme sous-produits de chloration de deux acides aminés ; la proline et la méthionine. Parmi les nombreux autres sous-produits de chloration de la proline, cette étude a permis d'identifier des composés du type N-chloroamide (N-chlorodichloroacétamide, N-chlorotrichloroacétamide), quelques chloroacides présentant ou non un groupement terminal aldéhyde ou nitrile caractéristique et des composés de structure pyrrole ou pyrroline. Les résultats obtenus avec la méthionine ont montré que ce composé soufré est précurseur de dérivés chlorosoufrés comme le chlorure de méthyle sulfonyle, le chlorure de chlorométhyle sulfonyle ou encore le dichloro-1,1 diméthyle sulfonyle, structures pour lesquelles il serait intéressant d'évaluer la toxicité. La présence de soufre moléculaire  $\text{S}_8$  dans les extraits de la méthionine chlorée souligne également l'existence de réactions de polymérisation.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALOUINI, Z. (1987). Contribution à l'étude des réactions du chlore avec les principales molécules azotées contenues dans les eaux. Thèse de Doctorat, Université de Rennes I, n° d'ordre 70.
- BENABDESSELAM, H., PONCIN, J., MARTIN, G. (1990). Inactivation of E. Coli suspension by chlorine : Implication of chlorination of  $\alpha$ -amino acids and uracil. *Water Chlorination : Environmental Impact and Health Effects*. Jolley R.L., Condie L.W., Johnson J.D., Katz S., Minear R.G., Mattice J.S. and Jacobs V.A., Eds. Ann Arbor, MI.: Ann Arbor Science Publishers, Inc., 6, 783-794.

- CROUÉ J.P. (1987). Contribution à l'étude de l'oxydation par le chlore et l'ozone d'acides fulviques naturels extraits d'eaux de surface. Thèse de Doctorat, Université de Poitiers, n° d'ordre 89.
- DE LEER, W.B., BAGGERMAN, T., VAN SCHALK, P. (1986). Chlorination of  $\omega$ -cyanoalkanoic acids in aqueous medium. *Environ. Sci. Technol.*, 20, 1218-1223.
- DE LEER, W.B., ERKELENS, C., DE GALAN, L. (1990). The influence of organic nitrogen compounds on the production of organochlorine compounds in the chlorination of humic material. *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*. Jolley R.L., Condie L.W., Johnson J.D., Katz S., Minear R.G., Mattice J.S. and Jacobs V.A., Eds. Ann Arbor, (MI.: Ann Arbor Science Publishers, Inc.), 6, 736-781.
- FIELDING, M., HORTH, H. (1986). Formation of mutagens and chemicals during water treatment chlorination. *Wat. Supply*, 4, 103-126.
- HORTH, H. (1989). Identification of mutagens in drinking water. *Aqua*, 38, 80-100.
- HUREIKI, L. (1993). Étude de la chloration et de l'ozonation d'acides aminés libres et combinés en milieu aqueux dilué. Thèse de Doctorat, Université de Poitiers, n° d'ordre 21.
- HUREIKI, L., CROUÉ, J.P., LEGUBE, B. (1994). Chlorination studies of free and combined amino acids. *Wat. Res.*, 28, n° 22, 2521-2531.
- JADAS-HÉCART, A. (1989). Contribution à l'étude de la demande en chlore à long terme d'une eau potable. Modélisation et identification de précurseurs organiques. Thèse de Doctorat, Université de Poitiers, n° d'ordre 282.
- LE CLOIREC, C., MARTIN G. (1984). Evolution of amino acids in water treatment plants and the effect of chlorination of amino acids. *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*. Jolley R.L., Brungs W.A., Johnson J.D. and Cumming R.B., Eds. Ann Arbor, (MI.: Ann Arbor Science Publishers, Inc.), 5, 821-834.
- LEGUBE, B., CROUÉ, J.P., DE LAAT, J., DORÉ, M. (1989). Ozonation of an extracted aquatic fulvic acid: Theoretical and practical aspects. *Ozone Science and Engineering*, 11, 1, 69-91.
- McLUCKEY, S.A., GLISH, G.L., ASANO, K.G., VAN BERKEL, G.J. (1988). Self chemical ionization in a ion trap mass spectrometer. *Anal. Chem.*, 60, 2312-2314.
- PANNEL, L.K., PU, Q.L., FALES, H.M., MASON, R.T., STEPHENSON, J.L. (1989). Intermolecular processes in the ion trap mass spectrometer. *Anal. Chem.*, 61, 2500-2503.
- PÉREIRA, W.E., HOYANO, Y., SUMMONS, R.E., BACON V.A., DUFFIELD, A.M. (1973). Chlorination studies: The reaction of aqueous hypochlorous acid with  $\alpha$ -amino acids and dipeptides. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 313, 170-180.
- PETERS, J.B., DE LEER, W.B., GALAN, L. (1990). Chlorination of cyanoethanoic acid in aqueous medium. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 81-86.
- RECKHOW, D.A. (1984). Organic halide formation and the use of pre-ozonation and alum coagulation to control organic halide precursors. Ph.D. Thesis, Department of Environmental Sciences and Engineering, CHAPEL HILL (N.C.).
- RECKHOW, D.A., SINGER, P.C., MALCOLM, R.L. (1990). Chlorination of humic materials: Byproduct formation and chemical interpretation. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 1655-1664.
- SEMMENS, M.J., STAPLES, A.B. (1986). The nature of organics removed during treatment of Mississippi river water. *J.A.W.W.A.*, 78, 2, 76-81.
- THURMAN, E.M. (1985). Developments in Biochemistry: Organic geochemistry of natural waters. NIJHOFF M. and JUNK W. Publishers, DORDRECHT.
- TREHY, M.L., YOST, R.A., MILLES, C.J. (1986). Chlorination byproducts of amino acids in natural waters. *Environ. Sci. Technol.*, 20, 1117-1122.
- Vik, E.A., CARLSON, D.A., EIKUM, A.S., GJESSING, E.T. (1985). Removing aquatic humus from norwegian lakes. *J.A.W.W.A.*, 77, 3, 58-66.