**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 80 (1989)

**Heft:** 2

**Artikel:** Dosage rapide des antioxydants phénoliques par HPLC = Rapid determination of phenolic antioxidants in foods by HPLC

**Autor:** Dieffenbacher, A. / Trisconi, Marie-José / Durieux, Bernadette

**DOI:** https://doi.org/10.5169/seals-983603

**Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

**Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

**Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

**Download PDF:** 10.07.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch**

Trav. chim. aliment. hyg. **80**, 204–214 (1989)
Présenté le 26 janvier 1989. Accepté le 10 mars 1989

# Dosage rapide des antioxydants phénoliques par HPLC

Rapid Determination of Phenolic Antioxidants in Foods by HPLC

*A. Dieffenbacher, Marie-José Trisconi et Bernadette Durieux*
Département d'assurance de qualité, Nestec SA, Vevey

## Introduction

Les antioxydants les plus utilisés dans l'industrie alimentaire sont ceux de structure phénolique, tels que:

- le butyl-hydroxyanisole (BHA)[1]
  (2- et 3-tert-butyl-hydroxyanisole)
- le 3,5-di-tert-butyl-hydroxytoluène (BHT)[1]
  ou la famille des gallates comme les propyl-(PG), les octyl-(OG) et les dodecylgallates (DG)
- l'acide nor-dihydroguaïarétique (NDGA).

L'utilisation des antioxydants est généralement autorisée pour la stabilisation des corps gras à une teneur procurant un effet optimal (jusqu'à 200 mg/kg), soit seuls ou en combinaison avec d'autres.

Par contre, certains antioxydants ne sont pas acceptés dans certains pays, comme par exemple le tert-butyl-hydroxy-quinone (TBHQ). Son utilisation est autorisée aux Etats-Unis, mais pas en Europe. De plus, les autorités qui s'occupent de la législation alimentaire sont d'avis qu'il faut réduire les taux d'antioxydants BHA, BHT et TBHQ. C'est ainsi que dans les standards du Codex Alimentarius pour les corps gras qui ne sont pas couverts par des standards individuels (1), de nouvelles limites ont été fixées à 75 mg/kg pour BHT, à 120 mg/kg pour TBHQ et à 175 mg/kg pour BHA.

Les huiles et les graisses stabilisées introduisent des antioxydants dans les aliments que l'on prépare avec les corps gras en question. Puisque la législation alimentaire fait objet de la présence des antioxydants dans les différentes denrées alimentaires, le dosage de ces additifs est important pour le contrôle de leur présence ou de leur absence.

[1] Abréviations utilisées ensuite.

Le dosage des antioxydants dans les corps gras ne pose, en général, pas de problèmes. Beaucoup de méthodes analytiques ont été proposées, en se basant sur les différentes techniques de détection et de dosages, comme le démontre actuellement l'excellente revue de *Robards* et *Dilli* (2).

Le dosage des antioxydants dans les différents aliments est plus difficile. Les différentes denrées alimentaires forment des matrices très variées desquelles il faut isoler les antioxydants en question. De plus, ces antioxydants peuvent former des complexes avec les phosphatides et/ou avec les fractions d'amylose des produits à base d'amidon.

Donc, d'une certaine manière, nous devons considérer les antioxydants libres, extractibles avec un solvant lipophile et les antioxydants emprisonnés accessibles à une telle extraction uniquement après un prétraitement convenable du produit à examiner.

Il est évident qu'une extraction la plus complète possible est la base de chaque schéma d'analyse. Souvent, une extraction complète donne des extraits de lipides avec beaucoup de produits interférant dans l'étape suivante de dosage. Il faut donc purifier l'extrait, soit par une deuxième extraction au moyen d'un solvant, soit par chromatographie sur colonne ou soit par distillation à la vapeur.

*Gertz* a particulièrement étudié l'extraction des antioxydants des corps gras par différents systèmes de solvants d'extraction en une étape (3). Il a pu confirmer les résultats d'une étude faite par *Hammond* qui rapportait des taux de récupération acceptables pour BHT et BHA par une extraction avec le méthanol en une étape (4). Dans leur étude, ces auteurs dosaient d'ailleurs les antioxydants par HPLC.

Cette technique s'emploie aujourd'hui de plus en plus puisqu'elle est la technique de dosage la plus simple. Beaucoup de publications traitent des questions d'extraction suivie du dosage par HPLC. Par exemple, *Indyk* et *Woollard* décrivent l'extraction des antioxydants des huiles et graisses par l'éluant utilisé pour le dosage par HPLC (5). *Page* proposait le dosage simultané par HPLC des antioxydants phénoliques les plus utilisés, après une extraction des corps gras par l'hexane saturé à l'acétonitrile (6). La méthode a été reprise et standardisée par l'AOAC et l'UICPA (7).

Dans notre laboratoire, nous nous sommes aperçus que l'extraction des antioxydants avec le méthanol se prête bien pour un examen de l'extrait par chromatographie sur couche mince. Sur la base des expériences de dosage semi-quantitatif par CCM, nous avons ensuite testé la performance de l'extraction avec le méthanol par HPLC.

Nos investigations montrent que l'extraction avec le méthanol en une étape suivie par dosage direct par HPLC selon *Page* est rapide et simple. Elle permet de détecter non seulement la présence ou l'absence de certains antioxydants, mais aussi de faire un dosage quantitatif en exécutant une deuxième extraction.

De plus, la méthode se prête aussi au dosage des poudres de potages et des flocons de pommes de terre.

Une étude préliminaire d'un groupe de travail de l'AIIBP permettait de vérifier la performance de la méthode élaborée et de confirmer nos résultats. Ceci nous incite à présenter la méthode et les résultats obtenus.

### *Mode opératoire*

La méthode décrite ci-dessous est applicable à tous les aliments qui sont insolubles dans du méthanol et qui s'y laissent bien disperser. En général, les denrées alimentaires préparées avec du mélange simple (dry mix method) ne posent pas de problèmes.

Pour les produits déshydratés, le traitement suivant permet de rendre les antioxydants accessibles à l'extraction.

### *Réactifs*

Méthanol p. a.
Solvant d'élution A: solution aqueuse contenant 1% d'acide acétique.
Solvant d'élution B: solution d'acétonitrile contenant 1% d'acide acétique.

### *Solution standard d'antioxydants*

Préparer pour chaque antioxydant une solution de stock: Peser séparément environ 20 à 30 mg de chaque antioxydant phénolique (BHA, BHT, TBHQ, NDGA et les gallates), dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter le volume par du méthanol. Les solutions de stock se conservent seulement une semaine au réfrigérateur.

Pipeter chaque jour 1 ml de ces solutions dans une fiole jaugée de 50 ml et remplir jusqu'au trait avec du méthanol.

### *Appareillage*

Centrifugeuse, p. ex. Centaur 2 ex Zivy & Co. Therwil, diamètre du rotor: 30 cm.

Appareil HPLC permettant l'élution en mode gradient muni d'un détecteur UV qui mesure l'absorption des effluents entre 200 et 350 $\mu$m et d'un intégrateur électronique avec enregistreur.

Colonne pour la chromatographie liquide en acier inoxydable d'une longueur de 250 mm et d'un diamètre interne de 4 mm (RT cat 50377 Lichrosphor 100 CH-18/2 5 $\mu$m).

### *Préparation de l'échantillon*

Produits déshydratés tels que les flocons ou granules de pommes de terre: Ajouter 4 ml d'eau à la prise d'essai qui est d'exactement 5 g, et préparer ainsi une pâte homogène. Après congélation pendant une nuit, cette pâte est triturée avec

6 g de sulfate de sodium anhydre afin d'obtenir un mélange granuleux qui servira pour la suite des opérations.

Graisses: Les graisses sont fondues à une température d'approximativement 10 °C au-dessus du point de fusion.

### *Prise d'essai*

La prise d'essai s'oriente pour les corps gras d'après l'objet du dosage. Pour un dosage qualitatif ou semi-quantitatif, la prise d'essai est de 2 g. Pour un dosage quantitatif, la prise d'essai s'oriente d'après le tableau ci-après:

| | Teneur espérée en antioxydants mg/kg | Prise d'essai (g) |
|---|---|---|
| BHA, BHT | > 200 | 2,0 |
| PG, TBHQ, NDGA | > 200 | 0,5 |
| TOUS | 50–150 | 1,0 |
| | < 50 | 2,0 |

Pour les produits d'une teneur supérieure à 25% en graisse, la prise d'essai est d'env. 2,0 g et pour les produits d'une teneur inférieure à 25% en graisse, elle est d'environ 5 g.

### *Chromatographie liquide*

La prise d'essai est de 20 $\mu$l pour la solution des standards et pour les extraits méthanoliques.

Le programme HPLC pour l'élution de la prise d'essai commence par 30% du solvant d'élution B dans 70% du solvant A. Puis, on passe en 10 minutes de manière linéaire à 100% de solvant B à une vitesse d'élution de 1 ml/minute. On garde cette dernière condition d'élution pendant 10 minutes jusqu'à ce que la ligne de base commence à descendre (voir fig. 1 et 2).

Injecter les solvants d'élution sans antioxydants pour s'assurer que les solvants sont purs. Les impuretés présentes dans l'acide acétique glacial peuvent être éliminées en solidifiant ce dernier par réfrigération. Après réchauffement à température ambiante, les impuretés s'accumulent dans la fraction liquide que l'on décante afin de récupérer les cristaux purs.

### *Extraction*

Ajouter 10 ml de méthanol dans un tube à centrifuger et secouer vigoureusement pendant 5 minutes, puis centrifuger pendant 10 minutes à 2000 TRM, qui correspond à un nombre de 1850 g avec la centrifuge à disposition.

La phase surnageante est prête pour l'injection dans le système HPLC. Si nécessaire, on enlève au moyen d'une pipette *Pasteur* le surnageant le plus complètement possible et on rajoute à nouveau 10 ml de méthanol. Ensuite, on répète l'extraction décrite préalablement.

Les deux extraits sont réunis et prêts pour l'injection.

Les signaux d'antioxydants de la prise d'essai sont identifiés selon leur temps de rétention avec ceux des signaux du standard (voir fig. 1 et 2).

## Expression des résultats

La teneur en mg/kg de l'antioxydant à doser se calcule comme suit:

$$\text{Antioxydant (mg/kg)} = \frac{C_s \times R_x \times 10 \text{ ml}}{R_s \times M}$$

$C_s$ = concentration en $\mu$g/ml du standard externe
$R_s$ = surface du signal de l'antioxydant du standard
$R_x$ = surface du signal de l'antioxydant dans la prise d'essai
$M$ = masse de la prise d'essai (g)

## Résultats et discussions

La figure 1 montre le chromatogramme standard de 7 antioxydants. Dans la figure 2, nous présentons le chromatogramme d'un extrait de poudre de bouillon de bœuf contenant 50 mg/kg de BHA et BHT obtenu selon la méthode décrite.

La teneur en acide acétique du solvant d'élution B s'avère critique. Nous avons eu une ligne de base relativement constante et une résolution satisfaisante des signaux d'antioxydants uniquement en réduisant la teneur de 5% à 1%, comme le décrit *Page* (voir fig. 1 et 2).

Pour illustrer le mode opératoire de la méthode, nous avons collectionné dans les tableaux 1 à 3 quelques résultats du taux de récupération. Le tableau 4 présente quelques applications.

Le tableau 1 montre l'influence de la prise d'essai et de la concentration en antioxydants dans l'échantillon sur les taux de récupération.

Une teneur de 25 mg/kg dans la prise d'essai de 2 g de graisse pour 10 ml de méthanol donne un taux de récupération entre 95 et 105% pour les antioxydants testés, à l'exception du BHT dont le taux est voisin de 70%. L'observation surprenante d'une récupération bien supérieure à 100% pour PG, TBHQ et NDGA a pu être attribuée à une augmentation de la densité optique de l'extrait méthanolique par rapport à celle de la solution standard des dits antioxydants dans du méthanol pur.

*Tableau 1.* Taux de récupération en % de quelques antioxydants ajoutés à une huile tournesol

| Prise d'essai (g)<br>ajouts en mg/kg | 2,0<br>25 | 2,0<br>50 | 2,0<br>125 | 2,0<br>250 | 1,0<br>250 | 0,5<br>250 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antioxydants | | | | | | |
| PG | 102 | 112 | 122 | 128 | 113 | 101 |
| TBHQ | 98 | 125 | 161 | 172 | 136 | 115 |
| NDGA | 103 | 111 | 124 | 148 | 125 | 127 |
| BHA | 88 | 97 | 93 | 89 | 104 | 104 |
| OG | 95 | 97 | 97 | 98 | 103 | 105 |
| DG | 95 | 96 | 95 | 95 | 104 | 100 |
| BHT | 68 | 67 | 65 | 59 | 89 | 93 |

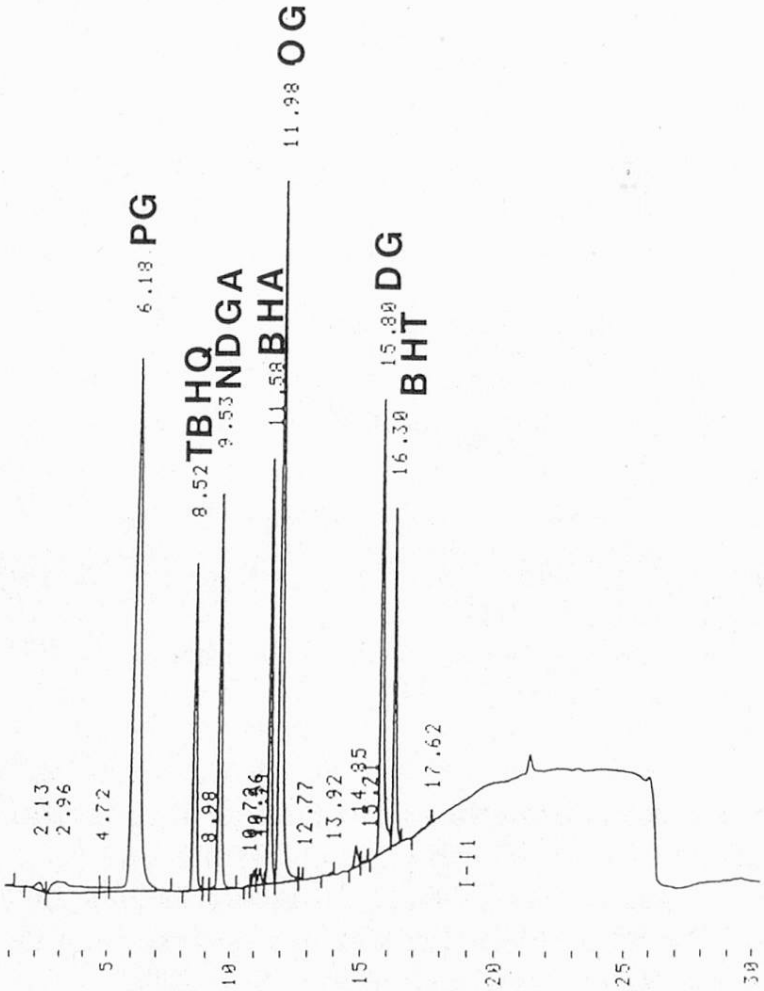


*Fig. 1.* Chromatogramme du standard des sept antioxydants dans le méthanol
Conditions de mesure voir texte

Une réduction de la prise d'essai de 2 g à 0,5 g, en gardant la quantité de méthanol utilisée pour l'extraction, ramène les taux de récupération de la plupart des antioxydants entre 95 et 105%, y compris BHT, mais à l'exception cette fois

de NDGA et TBHQ. Dans le mode opératoire, nous avons tenu compte de ce phénomène en prescrivant une prise d'essai selon les teneurs espérées.

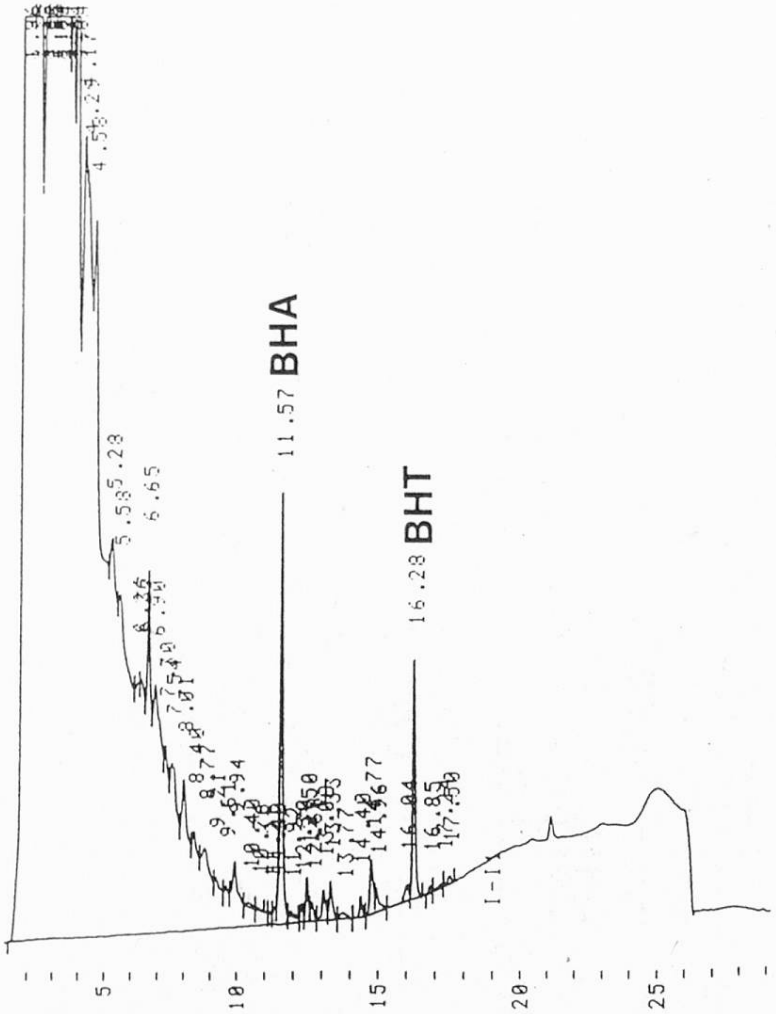


*Fig. 2.* Chromatogramme de BHA et BHT extrait d'une poudre de bouillon contenant 50 mg/kg de BHA et de BHT
Prise d'essai 5 g, extraction avec 10 ml de méthanol
Conditions HPLC voir texte

Dans le tableau 2, nous présentons des taux de récupération pour le BHA et BHT par deux extractions consécutives. Il en résulte que pour BHT la première extraction donne un taux de 71 à 74%, la deuxième de 24 à 28%. Ceci donne une récupération totale de 95 à 100%. Les chiffres correspondants pour BHA sont: 1ère extraction, 85 à 91%; 2ème extraction, 9 à 11%.

Compte tenu du fait qu'un faible taux dans la première extraction est toujours lié à un taux plus élevé dans la 2ème, la somme des deux chiffres (taux de récupération total) montre moins de variations que les chiffres correspondants des extraits se situant à 100%.

La présence de 1 à 3 mg/kg d'un antioxydant peut encore être détectée. Par contre, pour un dosage quantitatif, le seuil de détection se situe entre 3 et 6 mg/kg (voir tableau 2).

*Tableau 2.* Taux de récupération en % de BHT et BHA de la quantité d'un suif de bœuf (prise d'essai: 2 g)

| Teneur en BHT et BHA (mg/kg) | Extraction en une étape BHT | BHA | 2ème extraction | | Récupération totale BHA | BHT |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 60[1] | 180[1] | -- | | | |
| 6,2 | 48 | 160[1] | -- | | | |
| 6[2] | 83 | | | | | |
| 12,5 | 72 | 80 | -- | 2 | | 82 |
| 25 | 72 | 88 | -- | | | |
| 50 | 70 | 86 | | | | |
| 100 | 74 | 91 | 24 | 10 | 98 | 101 |
| 150 | 71 | 89 | | | | |
| 200 | 74 | 91 | 26 | 12 | 100 | 103 |
| 250 | 67 | 89 | | | | |
| 250 | 75 | 89 | 28 | 11 | 103 | 100 |

[1] Les chiffres montrent l'imprécision des mesures données en relation avec le rapport bruit de fond / hauteur du signal.

[2] Extraction selon *Gertz* (3) avec éthanol/2-propanol/acétronitrile 1:1:2 (v/v) stabilisé avec 200 mg acide oxalique par 1000 ml.

Les résultats du tableau 2 confirment aussi que les taux de récupération pour BHA et BHT – les deux antioxydants les plus importants – ne sont relativement peu influencés par la prise d'essai pour autant que la concentration dans l'échantillon ne se trouve pas à la limite fixée par les conditions du mode opératoire.

La répétabilité de la méthode est d'environ 3 mg/kg, pour deux dosages consécutifs (voir tableau 3).

*Tableau 3.* Taux de récupération en %
Répétabilité des mesures, trois dosages consécutifs

| Prise d'essai 0,5 g | ajouts 250 mg/kg | | |
|---|---|---|---|
| Antioxydant | moyenne | écart-type | |
| PG | 99,9 | 1,0 | |
| TBHQ | 96,6 | – | = une valeur abérrante |
| NDGA | 109,6 | 1,4 | |
| BHA | 101,6 | 0,8 | |
| OG | 96,8 | 1,1 | |
| DG | 93,9 | 3,4 | |
| BHT | 86,4 | 0,3 | |

*Tableau 4.* Quelques applications

| | Taux de récupération total (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | BHT | | BHA | |
| | en une étape | en deux étapes | en une étape | en deux étapes |
| poudre de bouillon | | | | |
| dopée à 25 mg/kg | 75 | | 102 | |
| à 50 mg/kg | 75 | | 92 | |
| suif de bœuf | | | | |
| dopé à 25 mg/kg | 77 | | 89 | |
| à 50 mg/kg | 73 | | 91 | |
| flocons de pomme de terre | 64 | 84[1] | | |
| prétraitement avec de l'eau | 60 | 95[2] | | |

[1] Extraits réunis
[2] Extraits mesurés consécutivement

Il est évident que par une prise d'essai identique d'un aliment ayant une faible teneur en graisse, le taux de récupération en BHT augmente. Pour les denrées alimentaires ayant une teneur en graisse très faible, tels les flocons de pommes de terre, la prise d'essai doit être augmentée.

La méthode présentée est simple et rapide, pour confirmer la présence ou l'absence de certains antioxydants, tels que les gallates, le BHA et le BHT. Puisque les antioxydants récupérés sont dosés directement dans l'extrait sans isolation préalable, il n'y a pas de pertes par oxydation, même pour le TBHQ.

La méthode permet aussi de détecter l'utilisation de graisses stabilisées par les antioxydants en question. Pour un dosage quantitatif du BHT spécialement, une deuxième extraction est nécessaire.

L'extraction avec le méthanol peut être appliquée aussi pour le dosage d'autres antioxydants tels l'éthoxyquine et l'ascorbyle palmitate en utilisant d'autres conditions chromatographiques. Les travaux correspondants sont en cours et seront publiés ultérieurement.

## *Résumé*

Une méthode rapide de dosage des antioxydants phénoliques dans quelques denrées alimentaires est ici décrite. Elle consiste en une extraction simple des antioxydants par méthanol suivie par un dosage direct de l'extrait par HPLC avec un standard externe. Le taux

de récupération pour la plupart des antioxydants phénoliques se situe entre 85 et 95%, sauf pour le BHT où l'on trouve un taux de 72%. Ce taux peut être amélioré en appliquant une deuxième extraction. La méthode présentée se prête pour tous les aliments préparés par mélange sec, comme par exemple les poudres de bouillon. Elle s'applique aussi pour le dosage des antioxydants dans les flocons de pommes de terre, après un prétraitement convenable.

D'autres applications de la méthode d'extraction présentée ici sont encore en étude.

## *Zusammenfassung*

Eine Schnellmethode zur Bestimmung von phenolischen Antioxidantien in Lebensmitteln wird beschrieben. Sie besteht aus einer einfachen Extraktion der Antioxidantien mit Methanol, gefolgt von der direkten Bestimmung im Extrakt mittels HPLC und externem Standard. Die Methode erlaubt in einer einfachen Extraktion, die meisten Antioxidantien in einer Wiederfindungsrate von 85–95% zu erhalten, ausser BHT, wo sie nur 72% beträgt. Sie kann jedoch durch einen anschliessenden weiteren Extraktionsschritt wesentlich verbessert werden. Die vorgeschlagene Bestimmung lässt sich für alle Lebensmittel einsetzen, die im Trockenmischverfahren hergestellt werden, z. B. Suppenpulver. Auch für Kartoffelflocken ist die Extraktion geeignet, vorausgesetzt, dass eine entsprechende Vorbehandlung des Musters mit Wasser und anschliessendes Tiefgefrieren durchgeführt wird.

Andere Anwendungen der beschriebenen Extraktionsmethode sind noch im Studium.

## *Summary*

A rapid method for the detection and determination of antioxidants in foods is described here. The method consists in a one step methanol extraction of antioxidants from foods followed by a direct HPLC determination with external standards. The recovery for most phenolic antioxidants is between 85–95%, except for BHT where it is 72%. This low recovery rate can be improved in applying a second extraction step. The presented method can be applied to all foods prepared in the dry mix procedure such as e. g. soup broth powders. It can further be used for the determination of antioxidants in potato flakes after a convenient pretreatment however, such as preparing a slurry with water which is then deep frozen before extraction.

Other applications of the presented method are still in study.

## *Bibliographie*

1. Codex Alimentarius Commission. Alinorm 87/17. Proposed draft standards for specified animal or mixed animal and vegetable fat products – Appendix II and III.
2. *Robards, K.* and *Dilli, S.:* Analytical chemistry of synthetic food antioxidants: Review Analyst **112**, 933–942 (1987).
3. *Gertz, Ch.* und *Hermann, K.:* Identifizierung und Bestimmung antioxidativ wirkender Zusatzstoffe in Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **177**, 186–192 (1983).
4. *Hammond, K. J.:* The determination of BHA, BHT and individual gallate esters in fats and oils by HPLC. J. Assoc. Publ. Analysts **16**, 17–24 (1978).

5. *Indyk, H.* et al.: Antioxidant analysis in edible oils and fats by normal phase high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **356**, 401–408 (1986).
6. *Page, B. D.:* High performance liquid performance. Determination of seven antioxidants in oil and lard: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66**, 727–744 (1983).
7. IUPAC Commissions on Oils, Fats and Derivatives, WG Antioxidants

Dr A. Dieffenbacher
Marie-José Trisconi
Bernadette Durieux
Département d'assurance de qualité
Nestec SA
*CH-1800 Vevey*