Dosage du palmitate d'ascorbyle dans le denrées alimentaires = Determination of ascorbyl palmitate by HPLC

Autor(en): **Dieffenbacher, A. / Trisconi, Marie-José**

Objekttyp: **Article**

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

Band (Jahr): **82 (1991)**

Heft 5

PDF erstellt am: **29.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982425

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Trav. chim. aliment. hyg. **82,** 475–486 (1991)
Présenté le 27 août 1991. Accepté le 2 septembre 1991

Dosage du palmitate d'ascorbyle dans les denrées alimentaires

Determination of Ascorbyl Palmitate by HPLC

A. Dieffenbacher et *Marie-José Trisconi*
Nestec SA, Vevey

Introduction

Dans une première étude nous avons décrit une méthode de dosage rapide d'antioxydants phénoliques dans les denrées alimentaires par HPLC (1). Cette méthode se base sur une extraction des antioxydants avec le méthanol. Vu les avantages qu'offre cette extraction nous avons essayé de l'appliquer aussi pour le dosage du palmitate d'ascorbyle (AP = Ascorbyl palmitate).

Le dosage classique de l'AP selon la méthode 08 du chapitre 44 du «Manuel suisse des denrées alimentaires : Agents conservateurs et antioxydants» se limite au corps gras. Elle se base sur une extraction de l'AP par un mélange chloroforme / acide acétique, suivi par des mesures photométriques du complexe coloré de l'AP avec le dichlorophenolindophénole (2).

Une autre possibilité qui représente une amélioration par rapport à la méthode susmentionnée consiste en une extraction des antioxydants par le méthanol suivie par l'identification des antioxydants récupérés par chromatographie sur couche mince (CCM). La CCM permet en effet d'identifier la plupart des antioxydants phénoliques y compris l'AP. Leurs migrations et leurs colorations spécifiques sont mises en évidence avec le révélateur dichloroquinonechlorimide (3).

Gertz et *Herrmann* ont étudié entre autre le comportement de l'AP lors de leurs investigations sur l'extractabilité des antioxydants (4). Ils ont vérifié l'efficacité de plusieurs solvants lors de l'extraction. Ils ont identifiés les antioxydants par CCM cependant ils ont déterminé les taux de récupération par HPLC. Pour l'AP ils ont trouvé des taux de récupération dans divers aliments allant de 87 à 109%.

Avec le progrès dans l'application de la technique de chromatographie liquide/liquide, de nombreux travaux ont été publiés démontrant l'utilité de cette technique pour le dosage des antioxydants et de l'AP en particulier. Parmi ces travaux, la méthode de *Vicente* et al. nous a semblé particulièrement intéressante (5) ainsi que celle *d'Archer* (6). Ces méthodes sont basées sur une extraction de l'aliment avec le méthanol suivie par le dosage de l'AP extrait par HPLC avec des éluants à base de méthanol et de l'acide acétique ou de tampon KH_2PO_4. La technique de Vicente utilise une élution isocratique, celle de Archer un gradient.

L'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction se prête bien à l'analyse des corps gras mais convient moins aux denrées alimentaires. En effet, on y rencontre souvent des produits qui sont extraits avec les antioxydants et qui peuvent perturber la détection du signal de l'AP. C'est le cas avec la méthode de Vicente pour certains produits lactés ou farines lactées (voir fig. 2A).

Récemment, *Grosset* et al. ont publié la possibilité de mesurer 12 antioxidants à la fois pour leur méthode HPLC avec gradient (7). Elle se base sur méthanol avec un tampon aqueux à pH 5,5 détection UV et électrochimique. Par contre ils ne reportent pas l'application de leur technique à des problèmes pratiques de dosage d'antioxydants dans les denrées alimentaires.

Le gradient d'éluant selon *Archer* (6) nous semblait prometteur. On commence par un mélange 1:1 v/v de méthanol avec du méthanol aqueux contenant 1% d'acide acétique pour terminer avec le mélange 9:1 v/v permettant de détecter la plupart des antioxydants phénoliques. Nous avons également appliqué cette technique pour le dosage de l'AP en remplaçant en même temps l'acide acétique par un tampon de pH 3,5 basé sur le dihydrogène phosphate de potasse (8). L'utilisation d'éluants à base de méthanol nous a posé quelques problèmes cependant les résultats se sont révélés encourageants. Les méthodes analytiques présentées ci-après sont le résultat de nos investigations.

Partie expérimentale

Méthode générale pour le dosage du palmitate d'ascorbyle dans les denrées alimentaires

La méthode décrite ci-dessous est applicable à tous les aliments qui sont insolubles dans du méthanol et qui s'y laissent bien disperser. Elle permet en plus la détection et le dosage des antioxydants phénoliques.

Réactifs

- Méthanol p. A.
- Tampon 0,02 m dihydrogénophosphate de potasse pH 3,5 : Dissoudre 1,32 g de dihydrogénophosphate dans de l'eau dans une fiole jaugée de 500 ml, compléter avec de l'eau distillée. Ajustement du pH à 3,5 avec de l'acide phosphorique.
- Solvant d'élution A : Mélange méthanol tampon 0,02 m de dihydrogénophosphate de potasse 1:1 (v/v).
- Solvant d'élution B : Méthanol
- Solution standard de l'AP : Préparer une solution de stock en pesant 20 à 30 mg dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter le volume par du méthanol. La solution de stock ne se conserve qu'un jour au frigo. Pipetter 1 ml de cette solution dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter jusqu'au trait avec du méthanol. Cette solution standard doit être mesurée dans l'heure qui suit sa préparation.

- Solution standard d'antioxydants : Pour d'autres antioxydants à mesurer, préparer des solutions de stock de manière analogue.
- Pipetter chaque jour 1 ml des solutions stocks d'antioxydants phénoliques 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 200–300 nm et d'un intégrateur électronique avec enregistreur. Il est souhaitable de disposer d'un détecteur UV programmable pour des mesures à différentes longueurs d'ondes au courant de l'analyse.
- Colonne pour la chromatographie liquide en acier inoxydable d'une longueur de 125 mm et d'un diamètre interne de 4 mm remplie avec Lichrospher 100 RP-18 (Merck no 90543).

Extraction

Peser exactement 2 g dans un tube à centrifuger et ajouter 10 ml de méthanol. Secouer vigoureusement pendant 5 minutes puis centrifuger pendant 10 minutes à 2000 RTM ce qui correspond à 1850 g avec la centrifugeuse à disposition. Injecter 10 ou 20 µl de la phase surnageante selon le volume de la boucle d'échantillonnage à disposition.

Chromatographie liquide

Le programme HPLC pour l'élution de la prise d'essai commence par 100% du solvant d'élution A. Après 2 minutes on passe de 12 minutes à 100% du solvant d'élution B à une vitesse d'élution de 1 ml/minute. On garde cette dernière condition d'élution pendant 4 minutes jusqu'à ce que la ligne de base commence à descendre. Injecter les solvants d'élution sans antioxydant pour s'assurer que les solvants sont purs.

Mesurer l'absorption UV à 255 nm en cas d'analyse de l'AP seule. En cas d'analyse d'autres antioxydants avec l'AP mesurer à 280 nm. Le signal de l'AP sort après 16 à 25 minutes selon la température dans le laboratoire.

Expression des résultats

La teneur en mg/kg de l'AP (ou des antioxydants à doser) se calcule comme suit

$$\text{AP (antioxydant)} = \frac{C_s \cdot R_x \cdot 10}{R_s \cdot M}$$

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

La limite de détection se situe à 5 mg/kg pour l'AP et à 3 mg/kg pour les antioxydants phénoliques.

Méthode rapide pour le dosage de l'AP dans les corps gras

La méthode présentée ici ne s'applique que pour l'AP mais suit les mêmes étapes d'analyse que la méthode générale. La prise d'essai est de 2,00 g d'huile ou de graisse fondue suivie par l'extraction de l'AP avec du méthanol. Dosage avec un standard externe également.

Conditions de chromatographie liquide

- Colonne pour la chromatographie liquide en acier inoxydable d'une longueur de 125 mm et d'un diamètre interne de 4 mm avec du Lichrospher 100 NH_2 5 µm (Merck 50824)
- UV détection à 255 nm
- Volume d'injection selon le volume de la boucle d'échantillonnage 10 ou 20 µl
- Phase mobile: isocratique
  méthanol / KH_2PO_4 0,02 m (à pH 3,5) 70:30 (v/v)
- Débit: 1 ml/minute

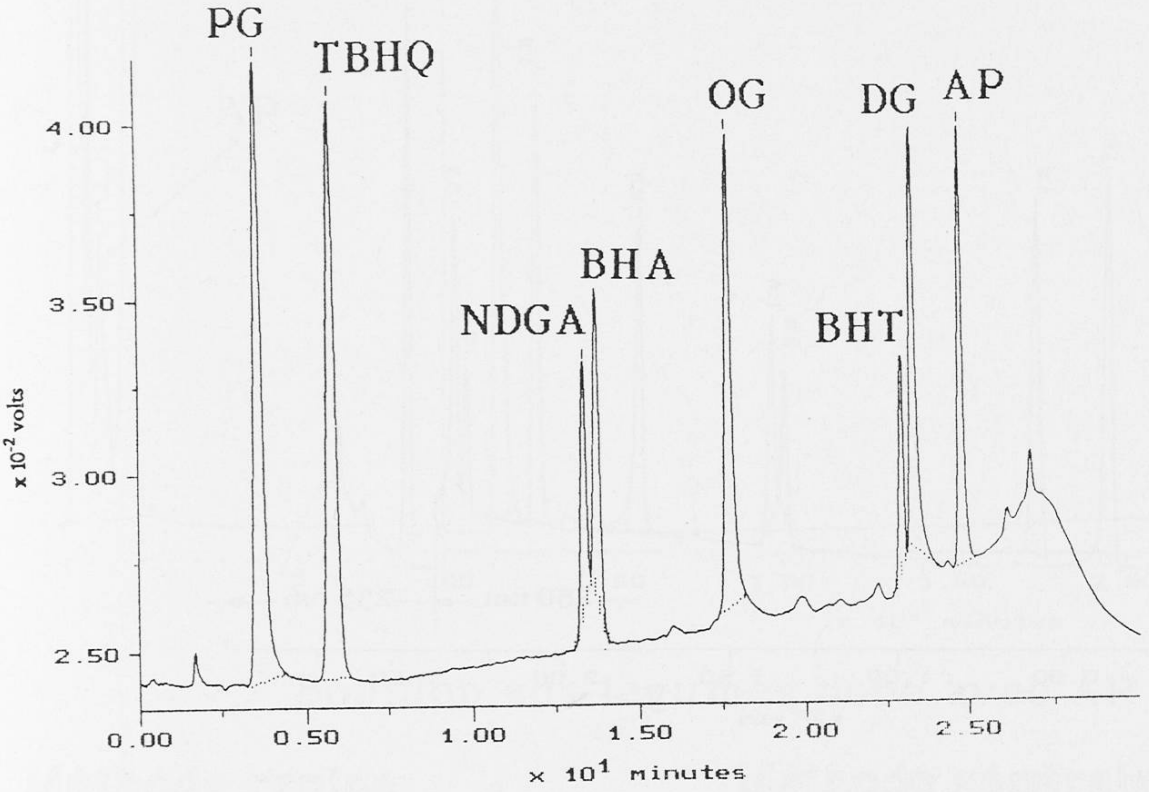
Sous ces conditions le signal de l'AP sort après 2 à 4 minutes. On laisse éluer pendant 10 minutes avant une nouvelle injection.

Puisque les conditions chromatographiques peuvent changer sans que l'on s'en aperçoive il est préférable d'injecter le standard AP pour chaque série d'analyses.

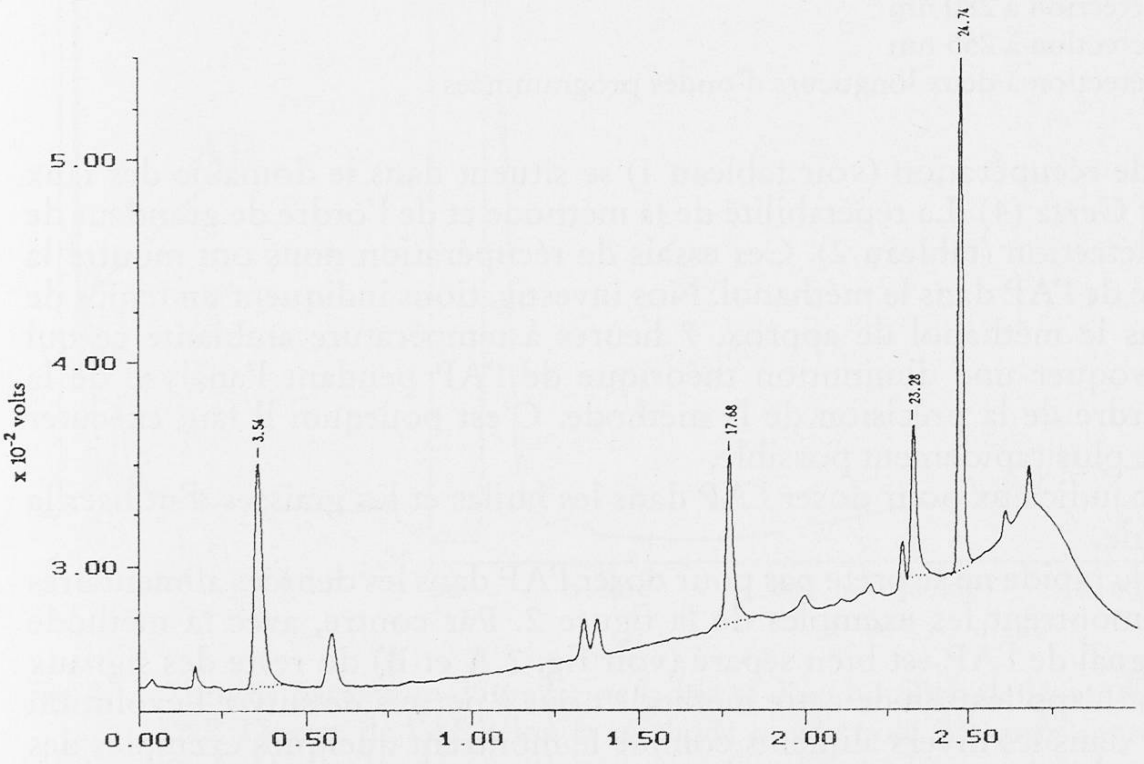
Résultats et discussion

La figure 1 montre les chromatogrammes d'un standard contenant 8 antioxydants selon la méthode générale. La longueur d'onde de mesure des effluents était à 280 nm pour la figure 1A et à 255 nm pour la figure 1B, tandis que la figure 1C montre le chromatogramme mesuré à 280 nm jusqu'à 24 minutes puis à 255 nm après ce laps de temps.

Pour le dosage de l'AP dans un aliment les mesures des effluents à 255 nm conviennent bien car c'est à cette longueur d'onde que se trouve le maximum d'absorption de l'AP. Par contre les maxima d'absorption des antioxydants phénoliques se trouvent près de 280 nm. L'AP absorbe encore suffisamment dans cette région de l'UV pour donner un signal bien visible dans le chromatogramme. La dernière technique est efficace dans les cas où l'on veut s'assurer de l'absence ou de la présence d'autres antioxydants. L'évaluation quantitative de l'AP avec les autres antioxydants peut se faire avec suffisamment de précision pour la plupart des problèmes analytiques. Cependant, la méthode rapide de dosage de l'AP dans les corps gras ne se prête que pour l'AP seul (fig. 2).


PG
TBHQ
NDGA
BHA
OG
BHT
DG
AP
4.00
3.50
3.00
2.50
x 10-2 volts
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
x 10¹ minutes

A


5.00
4.00
3.00
x 10-2 volts
3.54
17.68
23.28
24.74
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50

B

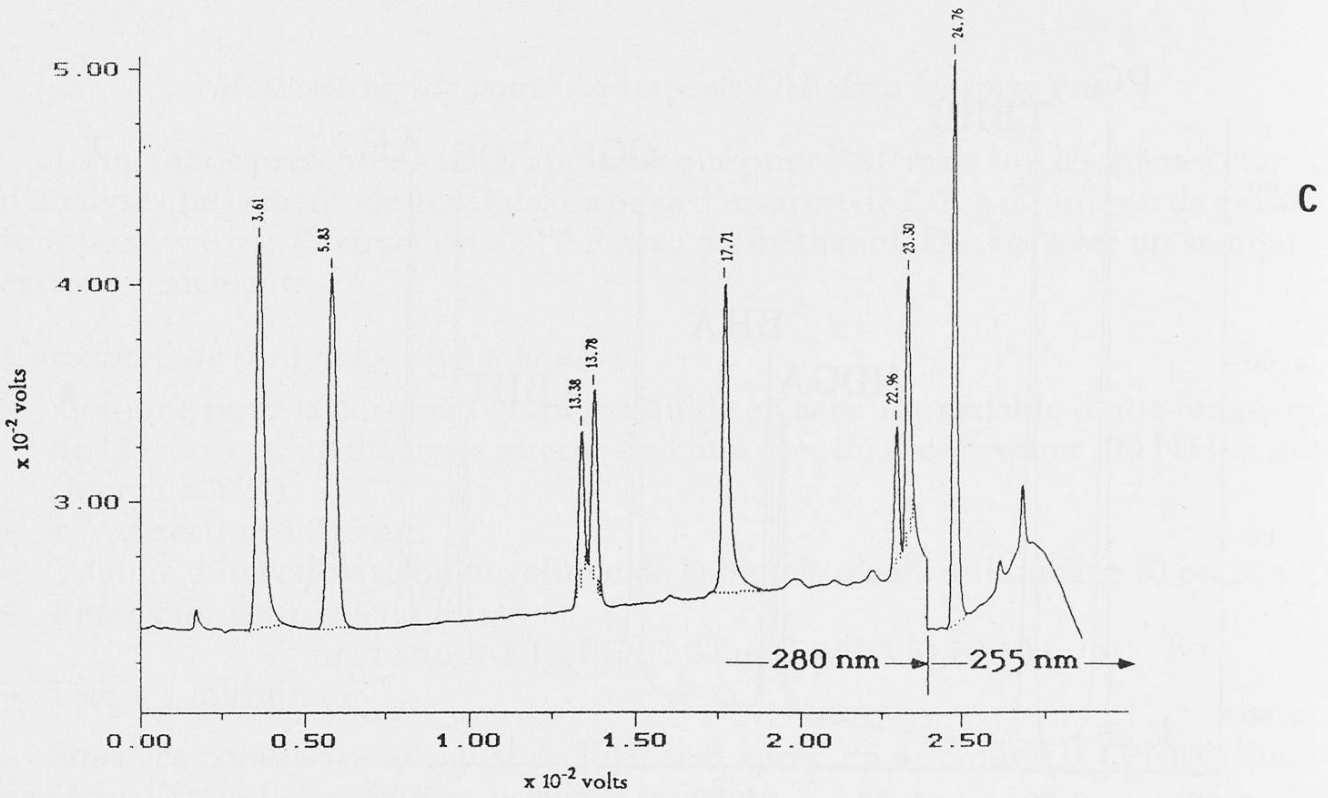


Fig. 1. Chromatogramme du standard des 8 antioxydants selon la méthode générale mesuré à différentes longueurs d'ondes
A Détection à 280 nm
B Détection à 255 nm
C Détection à deux longueurs d'ondes programmées

Les taux de récupération (voir tableau 1) se situent dans le domaine des taux rapportés par *Gertz* (4). La répétabilité de la méthode et de l'ordre de grandeur de la limite de détection (tableau 2). Ces essais de récupération nous ont montré la faible stabilité de l'AP dans le méthanol. Nos investigations indiquent un temps de demi-vie dans le méthanol de approx. 7 heures à température ambiante ce qui pourrait provoquer une diminution théorique de l'AP pendant l'analyse de la grandeur d'ordre de la précision de la méthode. C'est pourquoi il faut exécuter l'extraction le plus rapidement possible.

Il est donc judicieux pour doser l'AP dans les huiles et les graisses d'utiliser la méthode rapide.

La méthode rapide ne se prête pas pour doser l'AP dans les denrées alimentaires comme le démontrent les exemples de la figure 2. Par contre, avec la méthode générale le signal de l'AP est bien séparé (voir fig. 2 A et B) du reste des signaux perturbateurs. L'application de cette méthode nous a permis de suivre l'évolution du taux d'AP dans les divers aliments comme le montrent quelques exemples des tableaux 2 et 3.

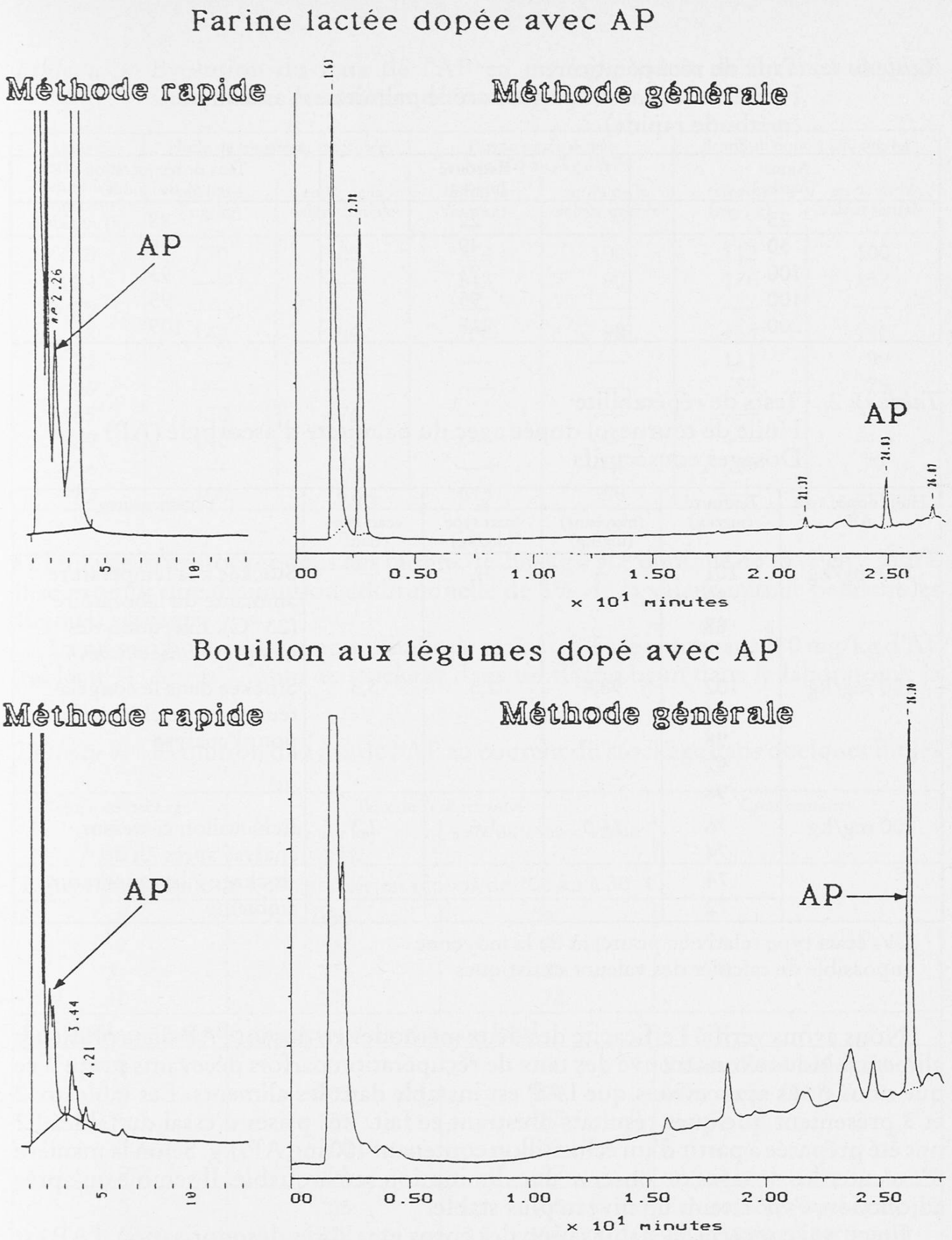


Fig. 2. Chromatogrammes d'une farine lactée et d'un bouillon de légumes dopés avec de l'AP. Dosage de l'AP selon la méthode rapide pour les corps gras et la méthode générale pour les denrées alimentaires. Conditions décrites dans le texte

Tableau 1. Taux de récupération
Huile de tournesol dopée avec le palmitate d'ascorbyle
(méthode rapide)

Ajouté (mg/kg)	Retrouvé (mg/kg)	Taux de récupération (en % de l'ajout)
25	22	88
50	49	98
100	93	93
100	95	95
200	218	109

Tableau 2. Tests de répétabilité
Huile de tournesol dopée avec du palmitate d'ascorbyle (AP)
Dosages consécutifs

Huile dopée avec AP	Retrouvé (mg/kg)	$\bar{x}$ (moyenne) (mg/kg)	s_r écart type (mg/kg)	CV_r écart type relatif[1]	Commentaires
100 mg/kg	101 89 88	–	–	–[2]	Stockée à la température ambiante du laboratoire (23 °C). Exécution des analyses consécutives
100 mg/kg	102 99 98 97 96	98,4	2,3	3,3	Stockée dans le congélateur et sortie chaque fois pour l'analyse
100 mg/kg	76 74 74 72	74,0	1,6	2,3	Echantillon ci-dessus analysé après 7h de stockage à la température ambiante

[1] CV_r écart type relativ en pourcent de la moyenne
[2] impossible de calculer des valeurs statistiques

Nous avons vérifié l'efficacité des deux méthodes en dosant l'AP dans plusieurs aliments. Nous avons trouvé des taux de récupération parfois décevants jusqu'à ce que nous nous apercevions que l'AP est instable dans les aliments. Les tableaux 2 et 3 présentent quelques résultats illustrant ce fait. Les prises d'essai du tableau 2 ont été préparée à partir d'un échantillon contenant 100 mg AP/kg. Selon la manière d'exécuter les dosages on observe une diminution remarquable. Il semble qu'après adjonction, l'AP atteint un niveau plus stable.

En ce qui concerne la stabilisation des corps gras après désodorisation, l'AP est ajouté pendant le refroidissement. Il se décompose ensuite partiellement jusqu'à atteindre un niveau stable aussi longtemps que le corps gras reste dans un emballage étanche. Les résultats du tableau 4 illustrent ce phénomène : la teneur en AP ajouté

Tableau 3. Evolution du taux de l'AP en mg/kg produit de diverses denrées alimentaires au courant du stockage

Temps de stockage en heures à la température ambiante (h)	Huile de tournesol stabilisée		Farine lactée dopée avec 800 mg/kg d'AP		Bouillon dopé à 200 mg/kg	
	retrouvé (mg/kg)	en % de la valeur initiale	retrouvé (mg/kg)	en % de la valeur initiale	retrouvé (mg/kg)	en % de la valeur initiale
0	170	100	714	100	112	100
24	—	—	643	90	176	157
29	—	—	—	—	—	—
48	147	86	700	98	164	146
72	—	—	—	—	111	99
96	—	—	—	—	89	79
165	130	76	—	—	—	—
189	140	82	—	—	—	—
336	—	—	—	—	89	79
480	106	62	615	86	—	—

à l'huile de maïs stockée dans des bidons de 200 kg à 30° diminue de 15% en 7 jours. Il se produit une diminution additionnelle de 6% de la valeur initiale pendant les 30 jours suivants.

La même chose se passe pour l'huile de maïs stabilisée contenant 180 mg/kg d'AP (tableau 3). Après 2 jours de stockage dans un flacon brun dans le laboratoire, la

Tableau 4. Evolution du taux de l'AP au courant du stockage dans quelques huiles

Temps de stockage en jours	Taux de l'AP retrouvé		Commentaires
	Teneur en (mg/kg)	en % de la valeur initiale	
Echantillon: Huile de maïs stockée en bidons de 200 kg à 30 °C			
0	350	100	
7	297	85	
31	293	84	
40	275	78	
Echantillon: Huile de tournesol d'un magasin local			
0	205	100	Echantillons laissés au laboratoire (23 °C)
1	205	100	
5	174	85	
5,3	170	83	
19,0	56	27	
0	205	100	Echantillons stockés au congélateur et sorti pour les mesures
0,8	227	111	
28	205	100	
124	98	48	
149	89	43	

teneur en AP diminue de 14% (en 48 heures) et de 38% après 480 heures de stockage. Par contre la teneur en AP d'un huile de tournesol d'un magasin local (tableau 4) a diminué fortement en 19 heures de 23% à 54% de la valeur de départ. Ces phénomènes pourraient provenir soit de l'oxygène dissous dans l'huile, soit des produits d'oxydation qui réagissent avec l'AP jusqu'à leur disparition tandis que le surplus de l'AP reste stable ensuite. Ces phénomènes doivent encore être discutés en termes de la fonction spécifique de l'AP comme antioxydant. Dans le tableau 4 les résultats supplémentaires de deux exemples de produits fabriqués avec l'huile de maïs dopée avec de l'AP indiquent un phénomène similaire.

Nos expériences nous ont montré en plus que dans certains aliments on peut parfois rencontrer un signal intense à la place de l'AP à 280 nm. Ceci peut arriver en analysant des aliments stockés ou qui sont déjà atteint dans leur fraîcheur. Dans ce cas, il est judicieux de confirmer la présence de l'AP en répétant les mesures à 255 nm la longueur d'onde de l'absorption maximale de l'AP. En effet, le produit interférant n'absorbe pas à cette longueur d'onde.

Conclusions

Les méthodes présentées ici permettent une analyse rapide et sans pertes lors de l'extraction de l'AP dans les denrées alimentaires en question. La méthode rapide convient pour le dosage de l'AP dans les corps gras. La méthode par HPLC avec gradient permet de doser les antioxydants phénoliques et l'AP en même temps. Pour confirmer la présence de l'AP il est recommandé de respecter les mesures à 255 nm la longueur d'onde du maximum d'absorption de l'AP. La méthode générale est applicable pour toutes les denrées alimentaires qui se laissent disperser dans le méthanol.

L'application de ces méthodes nous permet d'étudier les problèmes de stabilisation des huiles et des graisses pour nos produits. Elle nous permet également de mieux étudier le comportement de l'AP dans les denrées alimentaires. Nous sommes convaincus que les méthodes présentées permettent de résoudre un grand nombre de problèmes de détection de cet antioxidant dans les diverses denrées alimentaires.

Résumé

Les deux méthodes décrites ici se basent sur une extraction par le méthanol des denrées alimentaires suivie par un dosage du palmitate d'ascorbyle par HPLC. La méthode rapide pour les corps gras se base sur une élution isocratique par un mélange de méthanol avec un tampon d'hydrogénophosphate de potasse. La méthode générale pour les denrées alimentaires se base sur une élution par gradient qui part d'un mélange de méthanol avec du tampon dihydrogénophosphate de potasse pour terminer avec du méthanol pur. Dans ces conditions, on peut éliminer la plupart des produits co-extraits qui perturbent le chromatogramme. La méthode générale permet aussi de doser simultanément les autres antioxydants phénoliques. L'application des deux méthodes à des problèmes de stabilisation des produits alimentaires

permettra d'obtenir une meilleure compréhension de la fonction du palmitate d'ascorbyle comme antioxydant.

Zusammenfassung

Die zwei hier beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Ascorbylpalmitat basieren auf einer Methanolextraktion des Lebensmittels mit anschliessender Bestimmung mittels HPLC. Die Schnellmethode für Speisefette und -öle basiert auf isokratischer Elution des Methanolextraktes mittels eines Gemisches von Methanol mit Kaliumdihydrogenphosphatpuffer. Die allgemeine Methode für Lebensmittel basiert auf einer Gradientelution ausgehend von einem Phosphatpuffergemisch mit Methanol bis zu reinem Methanol. Unter diesen HPLC-Bedingungen können störende mitextrahierte Begleitssubstanzen eliminiert werden, so dass sich die Methode zum Nachweis und zur Bestimmung von phenolischen Antioxidantien ebenfalls eignet. Die Anwendung der beiden beschriebenen Methoden auf praktische Probleme der Stabilisierung von Fettstoffen und Lebensmitteln erlaubt es, ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von Ascorbylpalmitat als Antioxidans zu erhalten.

Summary

The two rapid methods for the determination of ascorby palmitate described here are based on a methanolic extraction of the food followed by a subsequent HPLC determination. The quick method for oils and fats is based on an isocratic elution of the methanolic extract with a mixture of methanol and potassium dihydrogen phosphate. The general method for foods, however, requires a gradient elution starting with a mixture of potassium dihydrogen phosphate buffer with methanol and methanol alone for the end. This technique allows to eliminate most of interfering compounds. By this way phenolic antioxidants can also be determined. The application of these two methods to practical problems of food stabilisation will give a better understanding of the specific function of ascorbyl palmitate as antioxidant.

Bibliographie

1. *Dieffenbacher, A.* et *Trisconi, Marie-José:* Dosage rapide des antioxydants par HPLC. Trav. chim. aliment. hyg. **80,** 204–214 (1989).
2. Manuel suisse des denrées alimentaire, chap. 44, Agents de conservation et antioxydants. Office central fédéral des imprimés et du matériel, Berne 1973.
3. *Van Peteghem, C.H.* and *Dekeyser, D.A.:* Systematic identification of antioxidants in lard, shortenings, and vegetable oils by thin layer chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **64,** 1331–1335 (1981).
4. *Gertz, Ch.* und *Herrmann, K.:* Identifizierung und Bestimmung antioxidativ wirkender Zusatzstoffe in Lebensmitteln. Z. Lebensm.-Unters. -Forsch. **177,** 186–192 (1983).
5. *Vicente, T.S., Waysek, T.H.* and *Cort, W.M.:* Determination of ascorbyl palmitate by high performance liquid chromatography. J. Amer. Chem. Soc. **62,** 745–747 (1985).

6. *Archer, A.W.:* The determination of phenolic antioxidants in edible oils and fats by high-performance liquid chromatography. Anal. Chim. Acta **125,** 235–237 (1981).
7. *Grosset, C., Cantin, D., Villet, A.* et *Alary J.:* HPLC analysis of antioxidants. Talanta **37,** 301–306 (1990).
8. Cheong Fook Choy, Private communication, Eastreco (Pte) Ltd., Singapore.

Dr. A. Dieffenbacher
Marie-José Trisconi
Nestec SA
CH-1800 Vevey