Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. Partie 1, Possibilités et limites des techniques RP-HPLC = Contribution to oxidized cholesterol determination in milk and milk products. Part 1, Possibilities and limits of RP-...

Autor(en): **Sallin, Christine / Baumann, E. / Bütikofer, U.**

Objekttyp: **Article**

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

Band (Jahr): **84 (1993)**

Heft 1

PDF erstellt am: **30.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982129

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. **84**, 141–157 (1993)
Présenté le 28 octobre 1992. Accepté le 1er décembre 1992

Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers

I. Possibilités et limites des techniques RP-HPLC

Contribution to oxidized cholesterol determination in milk and milk products

I. Possibilities and limits of RP-HPLC techniques

Christine Sallin, E. Baumann, U. Bütikofer, R. Sieber et *J.O. Bosset*
Station fédérale de recherches laitières (FAM), Liebefeld-Berne

Introduction

Importance des produits d'oxydation du cholestérol du point de vue diététique et nutritionnel

Le cholestérol est un alcool insaturé. Il peut donc facilement être oxydé par voie enzymatique ou par auto-oxydation sous l'effet de l'oxygène ambient, de la lumière et de la chaleur. Il en résulte différents produits d'oxydation (fig. 1), couramment regroupés sous le terme générique d'«oxystérols», ainsi que d'autres dérivés oxydés (1, 2).

De tels composés se retrouvent aussi bien dans le plasma humain que dans divers produits agro-alimentaires, en particulier dans le lait et les produits laitiers ainsi que dans les oeufs et la viande (3, 4). L'incidence de la technologie (conditions de fabrication et de stockage, emballage) doit par conséquent être prise en ligne de compte pour prévenir ou du moins pour limiter dans toute la mesure du possible ces mécanismes de dégradation (auto-oxydation, photo-oxydation).

Les recherches entreprises au cours de ces 15 dernières années ont indiqué que ces oxystérols sont en fait beaucoup plus dangereux pour l'organisme que leur précurseur, le cholestérol. Ils pourraient même être à l'origine de certaines maladies telles que l'artériosclérose (5, 6) et le cancer (7) ou du moins favoriser leur développement. Des produits d'oxydation du cholestérol donnés à des lapins induisent par exemple une athérogénèse, alors que du cholestérol purifié n'a développé aucun athérome (8). Les oxystérols qui paraissent les plus athérogènes sont le 25-hydroxycholestérol et le cholestanetriol (9, 10). La teneur des aliments en produits d'oxydation du cholestérol est donc d'un grand intérêt. Afin d'être à même d'étu-

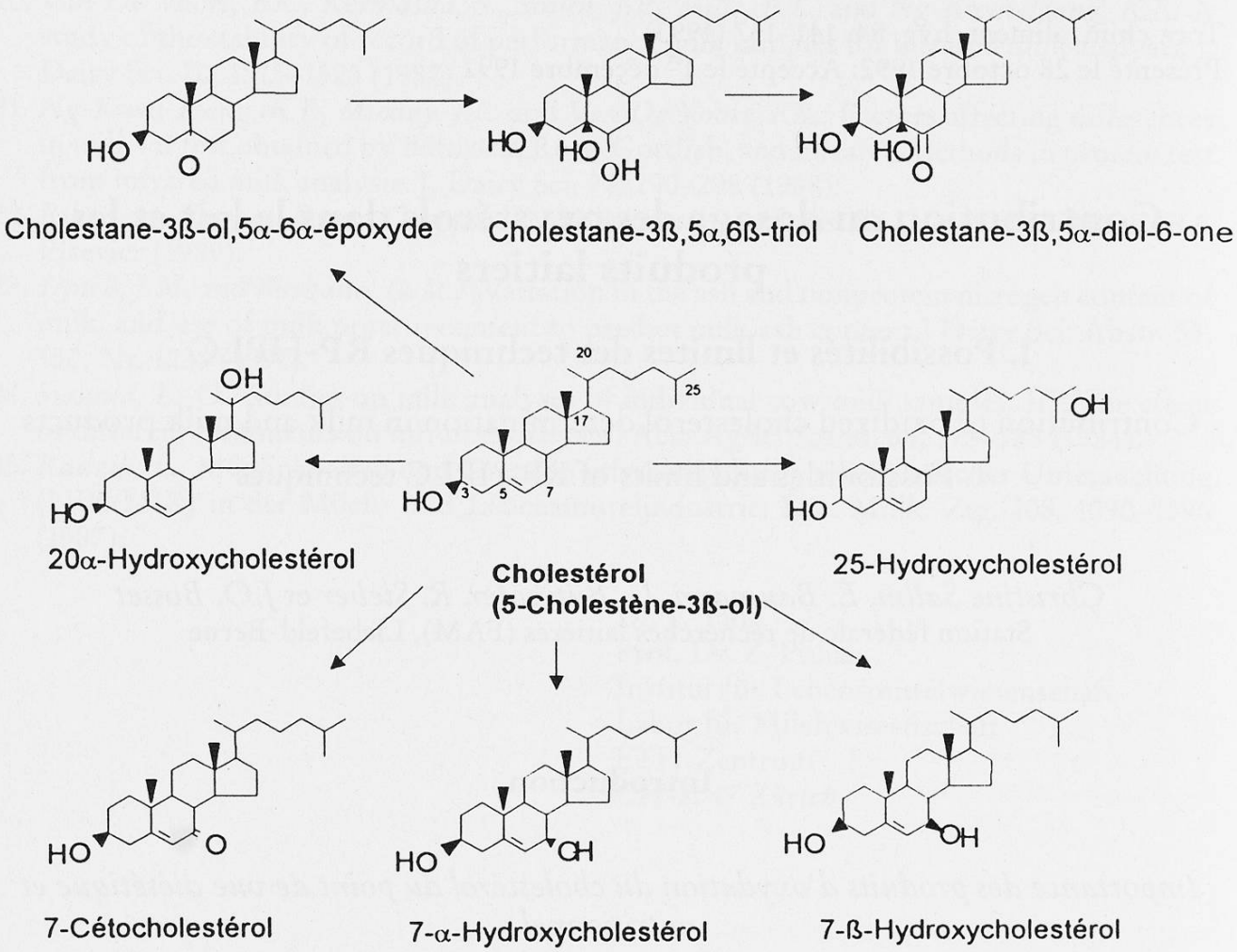

Fig. 1. Structure des produits d'oxydation du cholestérol

dier les conditions de formation de tels composés (influence d'oxydants et d'antioxydants, de la lumière, de la température; cinétique; mécanismes réactionnels etc.), il est nécessaire, dans une première étape, de tester, de comparer et, si nécessaire, d'améliorer les méthodes de dosage de ces substances.

Bref rappel des principales méthodes de dosage

Les oxystérols ne sont généralement présents qu'en traces dans les denrées alimentaires natives (11). On les trouve en revanche en quantités beaucoup plus importantes après traitements technologiques (échauffement, homogénéisation, etc.) et/ou après stockage. Ils requièrent des méthodes d'analyse à haute résolution et à basse limite de détection. Les meilleures méthodes actuellement utilisées sont la chromatographie en phase gaseuse (GC) et la chromatographie liquide/liquide à hautes performances (HPLC) (12, 13, 34). L'identification des fragments de stérol peut être effectuée par spectroscopie de masse. De telles analyses sont néanmoins compliquées en raison d'interférences et/ou d'artefacts dus à divers constituants des aliments, et requièrent de plus un appareillage relativement sophistiqué.

Des techniques d'analyse qualitative et semi-quantitative en couche mince (TLC) ont également été proposées (14, 15). Elles présentent l'avantage de ne nécessiter aucun équipement onéreux. Elles sont en outre relativement sensibles et faciles à maîtriser, d'où leur intérêt pour une analyse indicative préliminaire.

Quelle que soit la méthode d'analyse envisagée (TLC, HPLC ou GC), il est nécessaire d'isoler les oxystérols des corps gras présents dans l'échantillon. Cette étape est généralement effectuée en procédant à une saponification à chaud ou à froid des triglycérides et des phospholipides. A l'aide d'un solvant adéquat, on peut alors extraire le cholestérol oxydé sous la forme d'une fraction non saponifiée. Cette dernière est ensuite enrichie sur une précolonne ou par chromatographie sur couche mince. Durant toute cette phase de purification («clean-up»), aucun produit d'oxydation du cholestérol ne doit pouvoir se former ou se transformer en une autre substance. *Finocchiaro* (16) prévient toute auto-oxydation à l'aide de butylate d'hydroxytoluène (BHT) et de dilaurylthiodipropionate (TDP). Une autre technique consiste à extraire lesdits oxystérols sans saponification préalable en jouant sur les différences de polarité des solvants d'extraction. On évite ainsi tout risque de dénaturation du cholestérol et de ses produits d'oxydation (11).

Différentes méthodes ont été proposées pour doser les oxystérols. Le tableau 1 rappelle celles déjà utilisées pour le lait et les produits laitiers.

L'objectif de ce travail analytique en trois volets est de déterminer successivement les possibilités et limites des dosages par RP-HPLC, par TLC (partie II) et par GC (partie III) des oxystérols dans le lait et les produits laitiers.

Partie expérimentale

Réactifs

Les standards et les solvants utilisés comme éluants pour le dosage par RP-HPLC ainsi que pour la phase préparative d'extraction[1] sont indiqués dans les tableaux 2 et 3. Les standards purs sont dissous dans un mélange d'acétonitrile/éthanol dans le rapport volumique 80:20.

Choix des échantillons

Du beurre fondu (donc très pauvre en eau) provenant d'un commerce local a été utilisé pour les essais d'extraction et de dosage des oxystérols.

[1] Bien que précédant en fait la chromatographie, la phase préparative d'extraction des oxystérols sera traitée après l'optimisation des paramètres de ladite chromatographie.

Tableau 1. Résumé des méthodes utilisées pour la détermination des dérivés oxydés du cholestérol dans les produits laitiers

Produit	Préparation	Méthode d'analyse	Cholestérol oxydé	Limite de détection	Référence
Lait	Ex: Isopr, Hxn	TLC, GC	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10	inconnu	Cleveland et Harris 1987 (17)
Poudre de lait maigre, graisse de lait anhydre	Ex: Hxn	GC-MS	3, 7	inconnu	Flanagan et al., 1975 (18)
Poudre de lait, fromage, beurre	Ex: Isopr, Hxn	HPLC		0,3–1,3 mg/kg de produit	Bösinger, 1991 (19)
Poudre de lait, fromage, beurre	Ex: Hxn, Isopr Sc	TLC, GC-MS	9, 10	0,1 ppm ensemble des lipides	Nourooz-Zadeh et Appelqvist, 1988 (20), (21)
Fromage, beurre	Ex: CH_2Cl_2	GC-MS	1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10	0,1 µg/g d'extrait	Fischer et al., 1985 (22)
Fromage rapé, huile de beurre	Ex: MeOH, $CHCl_3$ Sc	TLC, HPLC	4, 5, 6, 8, 10	env. 3 µg/g d'huile	Finocchiaro et al., 1984 (16)
Fromage, beurre		TLC, GC		inconnu	Peng et Taylor, 1982 (23)
Fromage, poudre de fromage, huile de beurre	Ex, Sf	GC-MS	1, 4, 5, 6, 8, 9, 10	1 mg/kg	Sander et al., 1988, 1989 (24), (25), (26)
Beurre	Ex: Hxn	TLC, MS	3	inconnu	Parks et Schwartz, 1966 (27)
Beurre		HPLC		inconnu	Csiky, 1982 (28)
Beurre		TLC 2 dimensions	4, 5, 10	inconnu	Luby et al., 1986 (29), (30)

Produit	Préparation	Méthode d'analyse	Cholestérol oxydé	Limite de détection	Référence
Beurre	Sc	TLC, GC-MS		inconnu	Pie et al., 1990 (31)
Ghee	Sf	TLC, GC	1, 2, 4, 5, 8, 10	1 mg/kg	Kumar et Singhal, 1992 (32)
Ghee	Sc	TLC	1, 2, 4, 5, 8, 9	inconnu	Jacobson, 1987 (33)

Abréviations: Ex = extraction des lipides, Sc = saponification à chaud, Sf = saponification à froid, Hxn = Hexane, Isopr = Isopropanol, CH_2Cl_2 = chlorure de méthylène, MeOH = méthanol, $CHCl_3$ = chloroforme, TLC = Thin Layer plate Chromatography, HPLC = High Performance Liquid Chromatography, GC = Gas Chromatography, MS = Mass Spectrometry

Légende du tableau 1:

		nom fondamental	nom systématique
1	=	25-Hydroxycholestérol	5-Cholestène-3β,25-diol
2	=	20α-Hydroxycholestérol	5-Cholestène-3β,20α-diol
3	=	4-Cholestène-3-one	
4	=	7α-Hydroxycholestérol	5-Cholestène-3β,7α-diol
5	=	7β-Hydroxycholestérol	5-Cholestène-3β,7β-diol
6	=	7-Cétocholestérol	5-Cholestène-3β-ol-7-one
7	=	Cholestane-3,5-diène-7-one	
8	=	Cholestane-3β-ol,5α,6α-époxyde	5α-Cholestane-5,6α-époxy-3β-ol
9	=	Cholestane-3β-ol,5β,6β-époxyde	5β-Cholestane-5,6β-époxy-3β-ol
10	=	Cholestane-3β,5α,6β-triol	5α-Cholestane-3β,5α,6β-triol
11	=	Cholestane-3β,5α-diol,6-one	
12	=	Cholestane-3β-ol,6-one	
13	=	Cholestane-3,6-dione	
		Cholestérol	5-Cholestène-3β-ol

Tableau 2. Standards utilisés

Composé	N° de l'article	Fournisseur
7-Cétocholestérol	A284122	Aldrich
25-Hydroxycholestérol	H1015	Sigma
20α-Hydroxycholestérol	H6378	Sigma
7β-Hydroxycholestérol	H6891	Sigma
7α-Hydroxycholestérol	C6420	Steraloids
Cholestane-3β, 5α, diol-6-one	C4000	Steraloids
5,6-Epoxycholestérol	C2773	Sigma
Cholestane-3β, 5α, 6β-triol	C2523	Sigma
Cholestérol	2471	Merck

Tableau 3. Solvants utilisés

Solvant	Pureté	N° de l'article	Fournisseur
acétate d'éthyle	pro analysi	9623	Merck
n-hexane	pro analysi	4371	Merck
acétonitrile	HPLC	41731	Mächler
éthanol	lichrosolv.	11727	Merck
eau	Milli-Q		Millipore

Appareillage

Equipement de HPLC de base

Système Kontron modulaire (Kontron AG, CH-8010 Zürich) comportant une pompe à double piston (type 420), un passeur d'échantillons automatique (Autosampler type 360) à volume d'injection fixe de 20 µl, un four pour la colonne de séparation (type 480), un détecteur UV-visible à 2 longueurs d'onde (type 430) ainsi qu'un système (PC/IBM compatible) permettant le pilotage des modules, la saisie des données brutes et leur traitement à l'aide d'un logiciel adéquat (type MT 450).

Colonnes testées pour la séparation chromatographique

- précolonne à phase inverse: – Nucléosil 120-5 C_{18} 11 mm x 4 mm, 4 µm, de Macherey-Nagel AG, CH-4702 Oensingen.
- colonne à phase inverse: – Hypersil ODS 4 mm x 250 mm, 5 µm, de Hewlett Packard, Waldbronn BRD.

- μBondapak C_{18} 4,6 mm x 150 mm, 10 μm, de Waters, Milford MA, USA.
- *Nucléosil 120-5 C_{18} 4,6 mm x 250 mm, 5 μm, de Macherey-Nagel AG, CH-4702 Oensingen.* En définitive, c'est cette colonne qui a été choisie.

- colonne à phase normale:
  - μPorasil 3,9 mm x 300 mm, 10 μm, de Waters, Milford MA, USA.

Cartouches testées pour l'extraction des graisses

- cartouches à phase inverse-SPE:
  - cartouche SPE C_{18} (100 mg/ml), de J & W Scientific, Falsam CA, USA
  - cartouche SPE Cylobond II (γ-Cyclodextrine) chargée à raison de 200 mg/3 ml, de Astec, Whippany NJ, USA
- cartouche Extrelut 20 no 11738 de Merck, Darmstadt, BRD
- *cartouche SPE avec aminophase, Bond Elut LRC (500 mg/2,8 ml) de Varian, Sunnyvale CA, USA.* En définitive, c'est cette cartouche qui a été choisie.

Méthode de dosage optimisée

Conditions optimales de séparation chromatographique

Volume injecté:	20 μl
Phase mobile:	acétonitrile:éthanol:eau = 80:20:20 (rapport volumique) en mode isocratique
Débit de la phase mobile:	1 ml/min
Température de la colonne:	35 °C
Longueurs d'onde de détection:	*204*, 207, 220, *242* nm (*choix définitif*, cf. texte)
Temps de réponse:	0,5 s

Extraction préparative

A 40 °C, dissoudre 2 g de beurre fondu dans 3 ml d'hexane. Charger cette solution sur la cartouche SPE avec aminophase conditionnée au préalable avec 3 ml d'hexane. Eluer d'abord les triglycérides et le cholestérol à l'aide de 8 ml du mélange hexane:acétate d'éthyle (9:1). Eluer ensuite les oxystérols avec 8 ml d'acétone. Récupérer cette phase et évaporer le solvant sous pression réduite au Rotavapor. Dissoudre le résidu sec dans 0,5 ml d'un mélange acétonitrile/éthanol dans le rapport 80:20. Cette solution est alors prête pour l'injection.

Résultats et discussion

Choix de la colonne de séparation

Plusieurs colonnes en phase inverse (RP) et en phase normale (NP) ont été testées. Le cholestérol (utilisé seul) a servi de standard pour une étude préliminaire. Le tableau 4 indique les temps de rétention et le nombre de plateaux théoriques calculé pour ces différentes colonnes. Bien que relativement grossiers, ces deux types de critères suffisent néanmoins pour estimer et prédire les performances de ces diverses colonnes lors de la séparation d'un mélange d'oxystérols.

Sur les 3 colonnes RP testées, la Bondapak a été immédiatement abandonnée, le pic du cholestérol présentant un temps de rétention beaucoup trop court et un fort «tailing». On peut en déduire un pouvoir séparateur insuffisant pour les oxystérols, substances nettement plus polaires à quelques rares exceptions près (19). En revanche, le temps de rétention et le nombre de plateaux théoriques obtenus pour le cholestérol avec la colonne Nucléosil étaient suffisants pour envisager une bonne séparation des oxystérols.

Les avantages d'une RP sur une NP, soit un temps d'équilibrage de la colonne plus court, une sensibilité moindre à l'humidité, une meilleure translucidité des éluants dans l'UV (on peut entre autre renoncer à l'emploi de l'isopropanol nécessité par la colonne de type NP (19), ainsi qu'une meilleure standardisation de la qualité des phases inverses ont fait opter pour la colonne Nucléosil C_{18}, aux performances légèrement supérieures à celles de la colonne Hypersil.

Tableau 4. Choix de la colonne de séparation

Colonne	Temps de rétention pour le cholestérol (min)	Nombre de plateaux théoriques	Eluant
Bondapak (RP)	4,5	petit (tailing)	ACN
Nucléosil (RP)	14,8	11400	ACN/EtOH 80:20
Hypersil (RP)	13,4	9400	ACN/EtOH 80:20
µPorasil (NP)	5,2	8500*	Hxn/Isopr 93:7

Abréviations: ACN = acétonitrile, EtOH = éthanol, Hxn = hexane, Isopr = isopropanol
RP = Reverse Phase, NP = Normal Phase

* Nombre de plateaux théoriques calculé sur le chromatogramme donné par Bösinger (19) pour le 25-hydroxycholestérol.

Choix de l'éluant

Une solution contenant les 6 oxystérols (7-cétocholestérol, 25-hydroxycholestérol, 20α-hydroxycholestérol, 7β-hydroxycholestérol, 7α-hydroxycholestérol, cholestane-3β, 5α, diol-6-one) qui absorbent dans l'UV a été utilisée pour optimiser la composition de l'éluant.

De nombreux essais préliminaires ont été effectués, non rapportés ici dans le détail. On y constate que les mélanges acétonitrile/eau offrent des temps de rétention trop longs et causent de plus un important «tailing» des pics. Les mélanges acétonitrile/éthanol permettent de réduire ces temps de rétention (pour un rapport 80:20, on a un temps de rétention de 14 min pour le cholestérol), mais seuls 4 oxystérols sont séparés sur les 6 que contient la solution standard. L'introduction d'une composante aqueuse améliore la résolution. Le tableau 5 rapporte les résultats obtenus pour diverses compositions de ce mélange ternaire. L'optimum est atteint pour un mélange acétonitrile:éthanol:eau compris entre 80:20:15 et 80:20:20 en fonction de l'âge de la colonne utilisée. Ce mélange permet alors de séparer les 6 composants de la solution standard avec des temps de rétention admissibles en routine.

Tableau 5. Optimisation des éluants

Mélange	ACN (ml)	EtOH (ml)	H_2O (ml)	Nombre de pics résolus	Temps de rétention des pics (min)
binaire	80	20	–	4	5–6,5
ternaire	80	20	5	5	6,5–8,5
ternaire	80	20	10	5	8–12
ternaire	80	20	15	6	11–17

Abréviations: ACN = acétonitrile, EtOH = éthanol, H_2O = eau

Choix de la longueur d'onde

La plupart des oxystérols considérés ont leur maximum d'absorption situé en dessous de 200 nm, domaine correspondant pratiquement au «cut-off» des solvants utilisés comme éluant. Il est donc nécessaire de choisir une longueur d'onde supérieure située sur le flanc de leur pic d'absorption, aussi proche que possible de leur maximum. Les longueurs d'onde de 220, 207 et 204 nm ont été testées. La dernière longueur d'onde proposée représente un bon compromis entre le coefficient d'extinction des oxystérols à doser et celui de l'éluant (tableau 6). Seul le 7-cétocholestérol absorbe à une longueur d'onde supérieure dans l'UV. La figure 2 indique un maximum au voisinage de 242 nm.

Tableau 6. Limites de détection des oxystérols dans l'extrait organique à diverses longueurs d'onde

Composé	Limites de détection (µg/ml) à plusieurs longueurs d'onde[a)]			
	204 nm	207 nm	242 nm	204 nm[b)]
25-Hydroxycholestérol	1,0	7,0	–	0,3
20α-Hydroxycholestérol	1,0	5,7	–	–
Cholestane-3β, 5α, diol-6-one	4,9	13,2	–	–
7α-Hydroxycholestérol	1,3	5,2	–	1,3
7β-Hydroxycholestérol	0,6	4,0	–	1,1
7-Cétocholestérol	–	5,7	0,2	0,9
Bruit de fond	0,2 mV	0,15 mV	0,07 mV	

a) calculées pour un rapport signal/bruit de fond = 3
b) résultats obtenu par Bösinger (19) avec une colonne NP

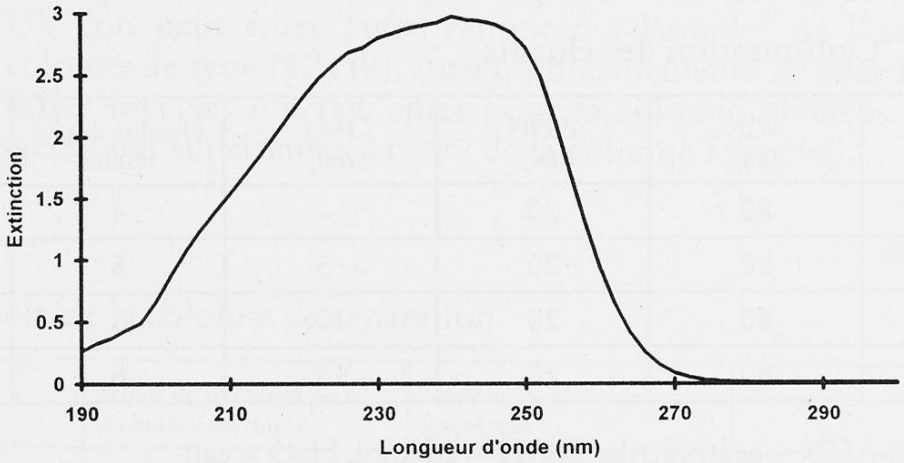

Fig. 2. Spectre d'absorption dans l'UV du 7-cétocholestérol

Légende: Solvant = hexane

Deux oxystérols (5,6-époxycholestérol, cholestane-3β, 5α, 6β-triol) ne présentent pas de chromophore dans l'UV.

Un autre avantage, indirect, offert par la colonne RP choisie est de permettre l'emploi d'un mélange de solvants plus transparent à 204 nm que le mélange exigé par les colonnes de type NP (fig. 3) (19).

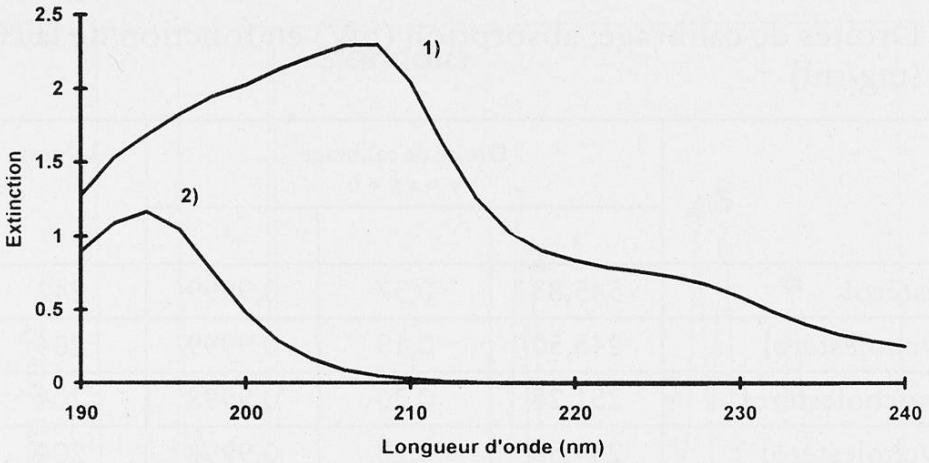

Fig. 3. Spectre d'absorption dans l'UV de 2 éluants

1) Mélange de hexane:isopropanol = 93:7, selon Bösinger (19)
2) Mélange de acétonitrile:éthanol:eau = 80:20:20, proposé

Limites de détection

Le tableau 6 donne encore les limites de détection calculées (seuil de détection = 3 x la largueur du bruit de fond) pour les 6 oxystérols considérés dans le cadre de ce travail. Ces limites sont comparables à celles calculées par Bösinger (19) avec le même critère. Elles sont comprises approximativement entre 0,6 et 1,3 µg/ml d'extrait organique, sauf pour le cholestane-3β, 5α, diol-6-one, dont la limite de détection n'est que de 5 µg/ml d'extrait organique.

Calibration et domaine de linéarité

La calibration et le domaine de linéarité obtenus pour les 6 oxystérols considérés ont été établis sur la base de 3 concentrations. Les valeurs obtenues sont indiquées dans le tableau 7.

Répétabilité

Le tableau 8 indique la répétabilité de déterminations à double des temps de rétention, des hauteurs et des surfaces des pics obtenus avec les 6 oxystérols considérés.

On constate une remarquable répétabilité des temps de rétention, avantage notoire des colonnes de type RP. Pour les 3 premiers pics, la répétabilité des hauteurs est nettement meilleure que celle des aires; pour les 3 derniers, on observe l'inverse, ce qui doit probablement s'expliquer par une résolution chromatographique inégale des pics correspondants. Dans le cas présent, on optera en pratique pour une évaluation des pics sur la base de leur hauteur plutôt que sur celle de leur aire.

Tableau 7. Droites de calibrage; absorption (mV) en fonction de la concentration (mg/ml)

Composé	Droite de calibrage y = a x + b			λ (nm)	Conc. max. testée (mg/ml)
	a	b	r^2		
7-Cétocholestérol	545,83	0,37	0,9999	242	0,198
25-Hydroxycholestérol	245,50	0,19	0,9999	204	0,202
20α-Hydroxycholestérol	251,28	0,20	0,9998	204	0,150
7β-Hydroxycholestérol	284,58	0,28	0,9998	204	0,158
7α-Hydroxycholestérol	254,88	0,13	0,9999	204	0,178
Cholestane-3β, 5α, diol-6-one	73,71	0,09	0,9997	204	0,172

λ: longueur d'onde d'absorption

Tableau 8. Répétabilité calculée sur deux mesures (moyenne et coefficients de variation, cv)

Composé	λ (nm)	temps de rétention moyenne		Hauteur du pic moyenne		Aire du pic moyenne	
		(min)	cv (%)	(mV)	cv (%)	(mVx min)	cv (%)
25-Hydroxycholestérol	204	13,20	0,05	49,73	0,61	18,03	1,57
20α-Hydroxycholestérol	204	13,56	0,05	37,84	0,48	11,21	4,16
Cholestane-3β, 5α, diol-6-one	204	17,58	0,08	12,74	0,72	5,85	2,05
7α-Hydroxycholestérol	204	18,46	0,07	45,46	1,19	20,9	0,33
7β-Hydroxycholestérol	204	19,25	0,15	45,17	0,79	21,31	0,20
7-Cétocholestérol	242	21,32	0,09	108,35	0,88	56,70	0,06

λ = longueur d'onde d'absorption

Application de la méthode au beurre (extraction)

La méthode de dosage ainsi optimisée a été testée avec du beurre fondu (fig. 4). On y constate la présence d'un nombre relativement important de constituants du lait susceptibles d'interférer avec le dosage des oxystérols. Ces derniers se présentent en outre sous la forme de pics très petits, ce qui indique qu'ils se situent peu au-dessus de leur limite de détection.

Des tests d'ajouts connus ont également été effectués, non reportés en détail. Ils montrent clairement que l'extraction proposée par Bösinger (19) – plus ménageante

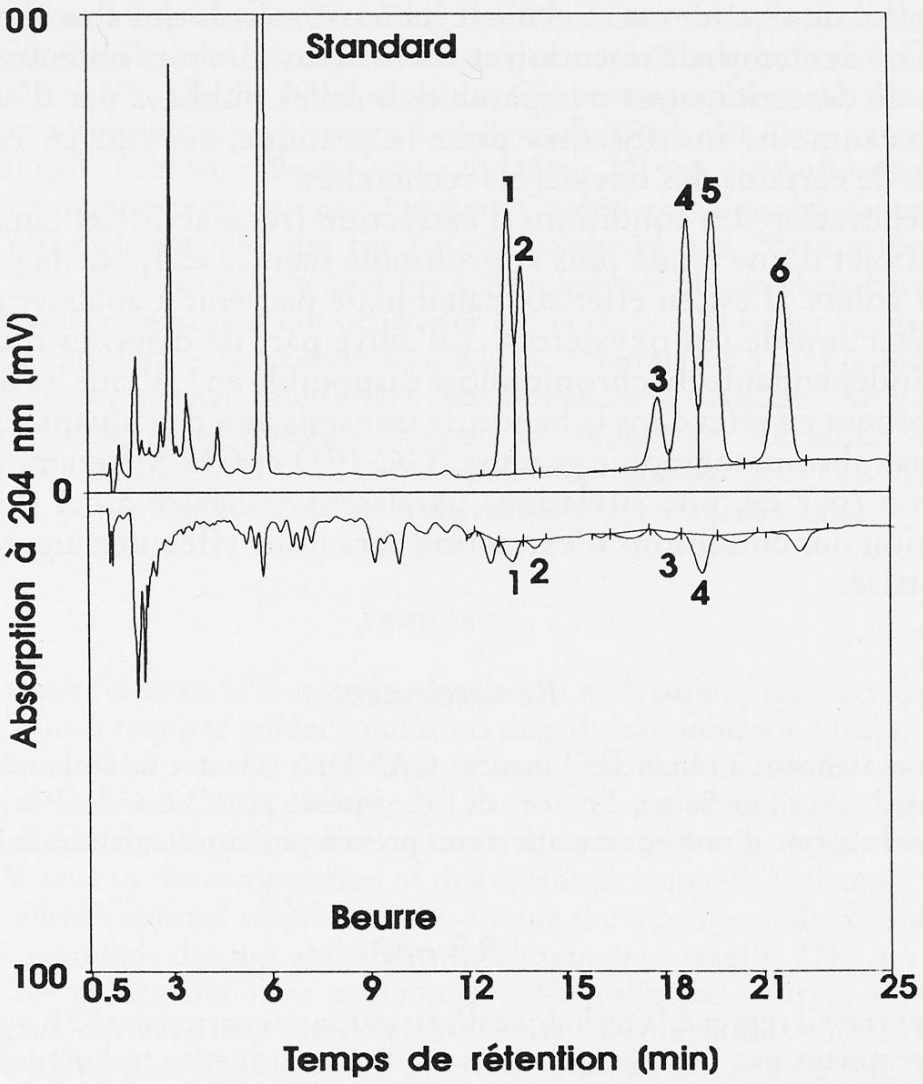

Fig. 4. Séparation par RP-HPLC de 6 oxystérols en solution pure (standard) et dans du beurre

1 = 25-Hydroxycholestérol
2 = 20α-Hydroxycholestérol
3 = Cholestane-3β, 5α-diol-6-one
4 = 7α-Hydroxycholestérol
5 = 7β-Hydroxycholestérol
6 = 7-Cétocholestérol

qu'une saponification – n'est pourtant pas quantitative: les hauteurs comme les aires des pics des standards sont plus grandes en solution pure qu'après addition dans le beurre. La différence est donc due à un effet de la matrice (solubilité dans les triglycérides du beurre).

Conclusion

La méthode de séparation par RP-HPLC proposée dans le présent travail est supérieure à d'autres déjà proposées, notamment avec des phases normales. Elle

permet en effet de séparer correctement les 6 oxystérols qui absorbent dans l'UV. La répétabilité des temps de rétention et des hauteurs des pics obtenus est suffisante. Les limites de détection sont comparables à celles publiées par d'autres auteurs. Elles sont néanmoins insuffisantes pour la pratique, surtout en raison du taux d'extraction de certains des oxystérols recherchés.

Une amélioration des conditions d'extraction (répétabilité et taux de récupération) fera l'objet d'une étude plus approfondie dans le cadre de la partie III de ce travail en 3 volets. Il est en effet souhaitable de parvenir à abaisser d'une part les seuils de détection de ces oxystérols et d'autre part de disposer d'une technique analytique indépendante du chromophore disponible en UV. Sur les 8 stérols testés, seuls 6 absorbent en effet dans la bande de transmission de l'éluant. Les techniques de dosage par chromatographie gazeuse (GC-FID et GC-MS en mode SIM) après dérivatisation (par ex. une silylation) paraissent satisfaire à ces deux exigences. L'optimisation des conditions d'extraction sera donc effectuée une fois ce type de dosage maîtrisé.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier l'institut CANDIA (Centre de recherche international André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France) de son intérêt pour ce travail et de son soutien financier sous la forme d'une bourse offerte au premier auteur, stagiaire à la FAM.

Résumé

Le présent travail reprend la technique d'extraction sur cartouche SPE avec aminophase, proposée récemment par Bösinger, car plus ménageante que les techniques procédant par saponification. Il propose en revanche une nouvelle méthode de séparation des oxystérols sur phase inverse (RP-Nucléosil C_{18}), plus répétable (cv compris entre 0,5 et 1,2% pour les diverses substances testées) que sur phase normale (NP) et recourt à un éluant moins absorbant dans l'UV lointain. La composition de cet éluant (acétonitrile:éthanol:eau = 80:20:15 à 20) permet une résolution optimale de 6 des 8 composés considérés dans ce travail, 2 oxystérols n'absorbant pas aux longueurs d'onde choisies (242 nm pour le 7-cétocholestérol et 204 nm pour les autres composés). Les droites de calibrage montrent un domaine de linéarité s'étendant au moins jusqu'à 0,2 mg/ml d'extrait organique (e.o.). Les limites de détection sont comparables à celles indiquées par Bösinger, soit 5 µg/ml (e.o.) pour le cholestan-3β, 5α-diol-6-one et environ 1 µg/ml (e.o.) pour les autres composés. La présence de nombreux constituants interférant et/ou d'artéfacts des produits laitiers, notamment du beurre, incite à comparer les performances obtenues par RP-HPLC avec celles d'autres méthodes telles que GC-MSD, GC-FID et TLC avant de proposer une méthode destinée à la routine.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit greift die von Bösinger vor kurzem vorgeschlagene SPE-Patronenextraktion mit Aminophase auf, die schonender ist als die Verseifungsmethoden. Gleich-

zeitig wird eine neue Methode zur Trennung der Cholesterinoxide mit «reversed phase» HPLC vorgestellt (Nucleosil C_{18}). Diese hat eine bessere Wiederholbarkeit (VK für die Testsubstanzen 0,5–1,2%) als die Normalphasen-Chromatographie, und das verwendete Eluent absorbiert weniger stark im fernen UV-Bereich. Dank der Zusammensetzung des Eluenten (Acetonitril : Ethanol : Wasser = 80 : 20 : 15 bis 20) war die Auflösung von 6 der 8 berücksichtigten Komponenten optimal. 2 weitere Cholesterinoxide absorbierten nicht bei der gewählten Wellenlängen (242 nm für 7-Ketocholesterol und 204 nm für die andern Verbindungen). Die Kalibrierkurven sind bis 0,2 mg/ml des organischen Extraktes (o.E.) linear. Die Nachweisgrenzen sind mit denen der Methode von Bösinger vergleichbar, d. h. 5 µg/ml (o.E.) für Cholestan-3β, 5α-diol-6-on und ca. 1 µg/ml (o.E.) für die andern Verbindungen. Wegen der zahlreichen interferierenden Bestandteile und/oder Artefakte bei den Milchprodukten, vor allem bei Butter, sollten die Leistungen der RP-HPLC und anderer Methoden wie GC-MSD, GC-FID und Dünnschicht-Chromatographie (TLC) miteinander verglichen werden, bevor eine Routinemethode vorgeschlagen werden kann.

Summary

The present work refers to SPE cartridge extraction with aminophase as recently proposed by Bösinger, which requires milder conditions than the saponification techniques. At the same time a new method for the separation of oxidized cholesterols by reversed phase chromatography (Nucleosil C_{18}) is presented; it has a better repeatability (cv 0,5 to 1,2% for the tested compounds) than normal phase chromatography and uses an eluant that absorbs less in the far UV. Due to the composition of this eluant (acetonitrile : ethanol : water = 80 : 20 : 15 to 20), it allows optimal resolution of 6 among the 8 compounds considered in this study. 2 other compounds did not absorb at the chosen wavelengths (242 nm for 7-ketocholesterol and 204 nm for the other compounds). The calibration curves are linear up to 0.2 mg/ml of organic extract (o.e.). The detection limits are comparable with those indicated by Bösinger, i.e 5 µg/ml (o.e.) for cholestan-3β, 5α-diol-6-one and approx. 1 µg/ml (o.e.) for the other compounds. Because of the numerous interfering constituents and/or artefacts of milk and milk products, particularly butter, it is advisable to compare the performances of RP-HPLC and other methods such as GC-MSD, GC-FID and TLC before proposing a routine method.

Bibliographie

1. *Smith, L.L.:* Cholesterol autoxidation. Plenum Press, New York 1981.
2. *Smith, L.L.:* The oxidation of cholesterol. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p. 7–31. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.
3. *Sieber, R.:* Oxidiertes Nahrungscholesterin – eine Primärursache der Arteriosklerose? Ernährung **10**, 547–556 (1986).
4. *Addis, P.B.* and *Park, P.S.W.:* Cholesterol oxide content of foods. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p. 71–88. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.
5. *Peng, S.-K., Sevanian, A.* and *Morin, R.J.:* Cytotoxicity of cholesterol oxides. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p. 147–166. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.

6. *Peng, S.-K., Hu, B.* and *Morin, R.J.:* Effects of cholesterol oxides on atherogenesis. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p.167–189. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.
7. *Morin, R.J., Hu, B.* and *Peng, S.-K.* and *Sevanian, A.:* Cholesterol oxidation and cancer. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p. 191–202. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.
8. *Imai, H., Werthessen, N.T., Taylor, C.B.* and *Lee, K.T.:* Angiotoxicity and arteriosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. Arch. Pathol. Lab. Med. **100,** 565–571 (1976).
9. *Addis, P.B.:* Occurrence of lipid oxidation products in foods. Food Chem. Toxic. **24,** 1021–1030 (1986).
10. *Peng, S.K., Taylor, C.B., Tham, P., Werthessen, N.T.* and *Mikkelson, B.:* Effect of autoxidation products from cholesterol on aortic smooth muscle cells. Arch. Pathol. Lab. Med. **102,** 57–61 (1978).
11. *Park, P.S.W.* and *Addis, P.B.:* Methods of analysis of cholesterol oxides. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p. 33–70. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.
12. *Fillion, L., Zee, J.A.* and *Gosselin, C.:* Determination of a cholesterol oxide mixture by a single-run high-performance liquid chromatographic analysis using benzoylation. J. Chromatogr. **547,** 105–112 (1991).
13. *Park, P.S.W.* and *Addis, P.B.:* Capillary column gas-liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. Anal. Biochem. **149,** 275–283 (1985).
14. *Bascoul, J., Domergue, N., Mourot, J., Debry, G.* and *Crastes de Poulet, A.:* Intestinal absorption and fecal excretion of 5, 6alpha-epoxy-5alpha-cholesta-3beta-ol by the male Wistar rat. Lipids **21,** 744–747 (1986).
15. *Bican, P.:* Communication personnelle (FAM, CH 3097-Liebefeld-Berne).
16. *Finocchiaro, E.T., Lee, K.* and *Richardson, T.:* Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butteroil. J. Am. Oil Chem. Soc. **61,** 877–883 (1984).
17. *Cleveland, M.Z.* and *Harris, N.D.:* Oxidation of cholesterol in commercially processed cow's milk. J. Food Protect. **50,** 867–871 (1987).
18. *Flanagan, V.P., Ferretti, A., Schwartz, D.P.* and *Ruth, J.M.:* Characterization of two steroidal ketones and two isoprenoid alcohols in dairy products. J. Lipid Res. **16,** 97–101 (1975).
19. *Bösinger, S.K.:* Zum Vorkommen von Cholesterinoxiden in Milchprodukten. Dissertation Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien 1991.
20. *Nourooz-Zadeh, J.* and *Appelqvist, L.-A.:* Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: milk powder products. J. Food Sci. **53,** 74–79 (1988).
21. *Nourooz-Zadeh, J.* and *Appelqvist, L.-A.:* Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: butter and cheese. J. Am. Oil Chem. Soc. **65,** 1635–1641 (1988).
22. *Fischer, K.-H., Laskawy, G.* und *Grosch, W.:* Quantitative Analyse von Autoxidationsprodukten des Cholesterols in tierischen Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **181,** 14–19 (1985).
23. *Peng, S.-K., Taylor, B.C., Mosbach, E.H., Huang, W.Y., Hill, J.* and *Mikkelson, B.:* Distribution of 25-hydroxycholesterol in plasma lipoproteins and its role in atherogenesis. Atherosclerosis **41,** 395–402 (1982).

24. *Sander, B.D., Smith, D.E.* and *Addis, P.B.:* Effects of processing stage and storage conditions on cholesterol oxidation products in butter and Cheddar cheese. J. Dairy Sci. **71,** 3173–3178 (1988).
25. *Sander, B.D., Addis, P.B., Park, S.W.* and *Smith, D.E.:* Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. J. Food Protect. **52,** 109–114 (1989).
26. *Sander, B.D., Smith, D.E., Addis, P.B.* and *Park, S.W.:* Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products. J. Food Sci. **54,** 874–879 (1989).
27. *Parks, O.W., Schwartz, D.P., Keeney, M.* and *Damico, J.N.:* Isolation of Δ^7-cholesten-3-one from butterfat. Science **210,** 416–417 (1966).
28. *Csiky, I.:* Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by adsorption high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **241,** 381–389 (1982).
29. *Luby, J.M., Gray, J.I., Harte, B.R.* and *Ryan, T.C.:* Photooxidation of cholesterol in butter. J. Food Sci. **51,** 904–907 (1986).
30. *Luby, J.M., Gray, J.I.* and *Harte, B.R.:* Effects of packaging and light source on the oxidation stability of cholesterol in butter. J. Food Sci. **51,** 908–911 (1986).
31. *Pie, J.E., Spahis, K.* and *Seillan, C.:* Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. J. Agr. Food Chem. **38,** 973–978 (1990).
32. *Kumar, N.* and *Singhaal, O.P.:* Effect of processing conditions on the oxidation of cholesterol in ghee. J. Sci. Food Agr. **58,** 267–273 (1992).
33. *Jacobson, M.S.:* Cholesteroloxides in Indian ghee: possible cause of unexplained high risk of atherosclerosis in Indian immigrant populations. Lancet **11,** 656–658 (1987).
34. *Coors, U.:* Components in foods with a high fat content. In: Matissek, R. and Wittkowski, R. (eds), High performance liquid chromatography in food control and research, p. 171–182. B. Behr's Verlag, Hamburg 1992.

Christine Sallin
Dr. J.O. Bosset
Station fédérale de recherches laitières
CH-3097 Liebefeld-Berne