

CHROM. 14,185

## Note

### Séparation des acides ascorbique et isoascorbique par chromatographie de paires d'ions sur phase inverse

J. M. COUSTARD et G. SUDRAUD\*

*Laboratoire Central de Recherches et d'Analyses du Service de la Répression des Fraudes et du Contrôle de la Qualité, 25 Avenue de la République, 91305-Massy (France)*

(Reçu le 26 juin 1981)

L'acide ascorbique et l'acide isoascorbique sont épimères au niveau de leur carbone 5. Ils ont des propriétés chimiques très comparables, notamment le groupe énediol-1,2 s'oxyde aisément en dione-1,2, conférant à ces acides des propriétés antioxydantes. Pour cette raison, ils sont largement utilisés dans les aliments. L'acide ascorbique qui se trouve dans de nombreux végétaux, possède une activité vitaminique antiscorbutique (vitamine C) 20 fois supérieure à celle de l'acide isoascorbique. Dans certains pays, en France notamment, seul l'acide ascorbique est autorisé comme additif alimentaire malgré son coût plus élevé et il est donc important de pouvoir le distinguer de l'acide isoascorbique.

Les méthodes usuelles de dosage utilisent les propriétés d'oxydo-réduction du groupement énediol-1,2 (volumétrie<sup>1</sup>, spectrophotométrie<sup>2</sup>, polarographie<sup>3</sup>, réactions enzymatiques<sup>4</sup>) mais ne permettent pas de différencier ces deux acides. La polarographie à courant alternatif<sup>5</sup>, l'isotachophorèse<sup>6</sup> et surtout les méthodes chromatographiques permettent de les séparer et de les doser. Ces acides sont séparés par chromatographie sur papier ou sur couche mince<sup>7</sup> mais les résultats les plus intéressants sont obtenus par chromatographie liquide à haute performance. Deux publications récentes très semblables, celle de Bui-Nygen<sup>8</sup> et de Geigert *et al.*<sup>9</sup> décrivent leur séparation sur colonne échangeuse d'anions faibles (silice greffée NH<sub>2</sub>, éluant: mélange eau-acétonitrile faiblement tamponné).

La chromatographie de paires d'ions a été utilisée pour doser l'acide ascorbique dans des mélanges multivitaminiques<sup>10,11</sup> et plus récemment Finlay et Duang<sup>12</sup> en séparant l'acide ascorbique de l'acide deshydroascorbique sur deux colonnes  $\mu$ Bondapak en série, séparent partiellement l'acide isoascorbique. Ce dernier a un facteur de capacité compris entre celui de l'acide ascorbique ( $k' \approx 0.50$ ) et celui de l'acide deshydroascorbique ( $k' \approx 0.75$ ).

La présente communication décrit une méthode de séparation de l'acide ascorbique et l'acide isoascorbique par chromatographie de paires d'ions sur une seule colonne de silice greffée octyle ou octodécyle en utilisant un éluant eau-méthanol (9:1, v/v) tamponné et contenant le contre-ion cétyltriméthylammonium. La détection est effectuée à 264 nm.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Matériel*

Pompe Varian 5020 (Palo Alto, CA, U.S.A.), équipée d'un injecteur de 10  $\mu$ l; spectrophotomètre ultra-violet Pye-Unicam opérant à 264 nm. Colonne en acier inoxydable de 150–200 mm  $\times$  4.6 mm I.D. remplie au laboratoire de LiChrosorb RP-8 ou RP-18, 5  $\mu$ m ou 7  $\mu$ m (Merck, Darmstadt, R.F.A.) par la méthode de la bouillie sous 400 bars de pression. Ensemble de filtration en inox de 13 mm I.D. adaptable sur seringue (1–10 ml), ainsi que des filtres en épaisseur et des membranes de 0.45  $\mu$ m de porosité (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.).

*Réactifs*

Bromure de cétyltriméthylammonium (Merck) méthanol, dihydrogenophosphate de potassium (Prolabo, Paris, France), acide ascorbique, acide isoascorbique, acide deshydroascorbique (Fluka, Buchs, Suisse), acide métaphosphorique (Carlo Erba, Milan, Italie).

*Phases mobiles*

Les solutions 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ou (0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0.05 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )  $5 \cdot 10^{-3}$  M cétyltriméthylammonium sont préparées dans un mélange eau-méthanol (9:1, v/v). Cette solution est filtrée avant usage sur membrane 0.45  $\mu$ m de 47 mm de diamètre. Cette opération a le double avantage d'éliminer les particules microscopiques en suspension et les gaz dissouts, notamment l'oxygène.

*Conditions opératoires*

La colonne est mise en équilibre avec la phase mobile pendant plusieurs heures, ou bien pendant la nuit à débit réduit. À la fin d'une série de mesures, la colonne est rincée à l'eau puis au méthanol et conservée dans ce même solvant.

*Préparation des échantillons*

Chaque échantillon est introduit dans la boucle d'injection au travers d'un filtre en épaisseur et d'une membrane de porosité 0.45  $\mu$ m.

*Jus de fruit.* Le fruit est pressé et le jus est injecté, éventuellement dilué avec une solution aqueuse d'acide métaphosphorique à 2 % (m/v).

*Mélange d'additifs.* L'échantillon est dissout dans de l'acide métaphosphorique à 2 % puis injecté après dilution convenable.

*Charcuterie (jambon).* L'échantillon ( $\approx$  30 g) est homogénéisé au mixer avec de l'acide métaphosphorique à 2 % (50–75 cm<sup>3</sup>). Après filtration sur coton de verre, la solution est injectée.

## RESULTATS ET DISCUSSION

La Fig. 1 montre la séparation de l'acide L-ascorbique et D-isoascorbique.

Le choix d'une phase mobile à force ionique et à pouvoir tampon élevés a pour but de limiter les variations des facteurs de capacité<sup>13</sup> en fonction des autres solutés coinjectés (sucres, sels) qui sont parfois en concentration très supérieures à celle de l'acide ascorbique ou isoascorbique.

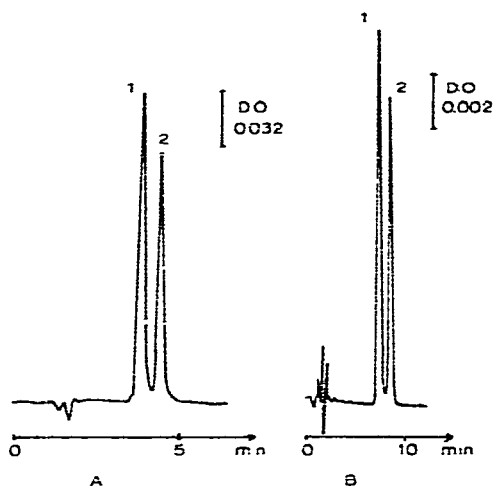


Fig. 1. (A) Colonne LiChrosorb RP-8, 7  $\mu\text{m}$  (200  $\times$  4.7 mm I.D.). Phase mobile: eau-méthanol (9:1, v/v), 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -0.05 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $5 \cdot 10^{-3}$  M cétyltriméthylammonium. Débit:  $1.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ; U.V.: 264 nm. 1 = acide ascorbique, 2  $\mu\text{g}$  injecté; 2 = acide isoascorbique, 2  $\mu\text{g}$  injecté. (B) Colonne LiChrosorb RP-8, 5  $\mu\text{m}$  (150  $\times$  4.7 mm I.D.) Phase mobile: eau-méthanol (9:1, v/v)-0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $5 \cdot 10^{-3}$  M cétyltriméthylammonium. Débit:  $1.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ; U.V.: 264 nm. 1 = acide ascorbique, 0.1  $\mu\text{g}$  injecté; 2 = acide isoascorbique, 0.1  $\mu\text{g}$  injecté.

En l'absence d'ion cétyltriméthylammonium (TMCA) l'acide ascorbique et isoascorbique ont un facteur de capacité nul. La présence de TMCA est nécessaire pour accroître la rétention et la sélectivité permettant de séparer ces deux acides.

Par chromatographie sur échangeur d'anions faibles (silice griffée  $\text{NH}_2$ ) l'acide

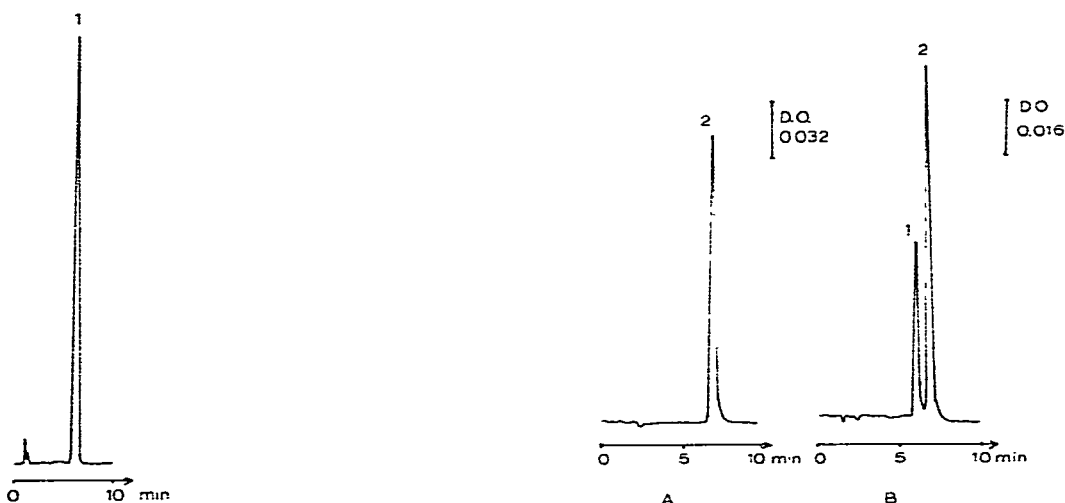


Fig. 2. Jus de citron contenant  $286 \text{ mg l}^{-1}$  d'acide ascorbique. Colonne LiChrosorb RP-18, 5  $\mu\text{m}$  (150  $\times$  4.7 mm I.D.). Phase mobile: eau-méthanol (9:1, v/v)-0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $3 \cdot 10^{-3}$  M cétyltriméthylammonium. Débit:  $1.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ; U.V.: 264 nm. 1 = acide ascorbique.

Fig. 3. Mélange d'additifs pour charcuterie contenant de l'acide isoascorbique. Mêmes conditions chromatographiques que sur la Fig. 2. 1 = acide ascorbique; 2 = acide isoascorbique. (A) Mélange d'additifs pour charcuterie; (B) Mélange d'additifs pour charcuterie additionnée d'acide ascorbique.

isoascorbique est élué en premier, par contre dans nos conditions chromatographiques, sur silice greffée octyle (ou octadécyle) cet ordre est inversé et l'acide ascorbique a un facteur de capacité inférieur à celui de l'acide isoascorbique, ceci est en accord avec les résultats de Finlay et Duang<sup>12</sup>. Cette propriété peut-être utilisée pour confirmer la présence de ces acides dans un mélange complexe.

La sensibilité de la méthode permet de détecter 0.01  $\mu\text{g}$  d'acide ascorbique dissout dans de l'acide métaphosphorique à 1–2 %, la réponse du détecteur reste linéaire pour des quantités injectées supérieures à 2  $\mu\text{g}$ . Le résultat est valable aussi bien pour l'acide ascorbique qu'isoascorbique car ils possèdent le même coefficient d'extinction moléculaire. Pour des chromatogrammes complexes, la sensibilité de la méthode est moindre, de plus l'acide deshydroascorbique n'est pas détecté à 264 nm et n'interfère donc pas.

Les Figs. 1–5 illustrent les séparations obtenues à partir de différents aliments par application de la méthode décrite ci-dessus.

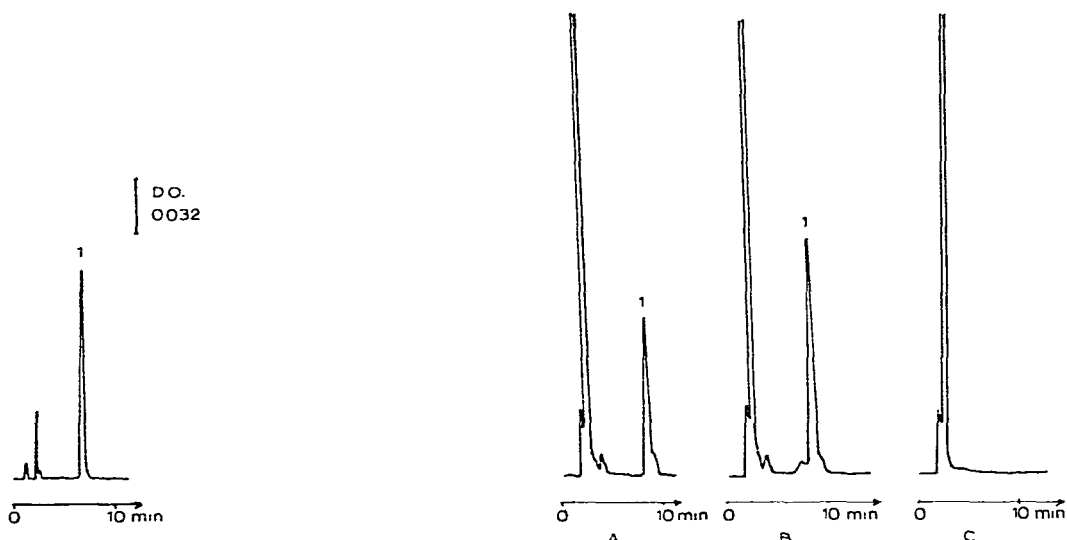


Fig. 4. Préparation multivitaminique en sirop. Colonne LiChrosorb RP-8, 5  $\mu\text{m}$  (150  $\times$  4.7 mm I.D.). Phase mobile: eau-méthanol (9:1, v/v)–0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – $5 \cdot 10^{-3}$  M cétyltriméthylammonium. Débit: 1.5  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ ; U.V.: 264 nm. 1 = acide ascorbique annoncé 7.5  $\text{g l}^{-1}$ , trouvé 7.7  $\text{g l}^{-1}$ .

Fig. 5. Acide ascorbique dans un jambon. Colonne LiChrosorb RP-8, 5  $\mu\text{m}$  (150  $\times$  4.7 mm I.D.). Phase mobile: eau-méthanol (9:1, v/v)–0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – $5 \cdot 10^{-3}$  M, cétyltriméthylammonium. Débit: 1  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ ; U.V.: 264 nm. 1 = acide ascorbique (40  $\text{mg kg}^{-1}$  de jambon). A = Extrait de jambon; B = après ajout d'acide ascorbique; C = après addition de quelques gouttes d'une solution d'iode.

Cette méthode chromatographiques est utilisée dans notre laboratoire depuis plusieurs mois. La colonne subit un vieillissement qui se traduit par un accroissement de la perte de charge, un tassement de la phase stationnaire et une diminution des facteurs de capacité sans modification notable de la sélectivité. Ces phénomènes qui s'observent surtout avec les phases de 5  $\mu\text{m}$  sont vraisemblablement dûs à une dissolution partielle de la phase stationnaire.

L'usage d'une précolonne garnie de silice, située entre la pompe et l'injecteur

(permettant de saturer l'éluant en silice<sup>14</sup>) ainsi que l'usage d'une phase stationnaire à granulométrie supérieure (7  $\mu\text{m}$ ), permettent d'allonger considérablement la durée de vie des colonnes.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 *Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.*, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 12th éd., 1975, p. 829.
- 2 K. L. Bajas et G. Kaur, *Analyst (London)*, 106 (1981) 117.
- 3 D. J. Cameron, *Proc. Nutr. Soc.*, 34 (1975) 7A.
- 4 H. O. Beutler et G. Beinstingl, *Deut. Lebensm. Rundsch.*, 76 (1980) 69.
- 5 C. Ratzkowski et J. Korol, *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, 10 (1977) 215.
- 6 A. Baldesten, S. G. Hjalmarsson et G. Newmann, *Z. Anal. Chem.*, 290 (1978) 148.
- 7 N. E. Bunton, J. Jennings et N. T. Crosby, *J. Ass. Public Anal.*, 17 (1979) 105.
- 8 M. H. Bui-Nguyen, *J. Chromatogr.*, 196 (1980) 163.
- 9 J. Geigert, D. S. Hirano et S. L. Neidleman, *J. Chromatogr.*, 206 (1981) 396.
- 10 S. P. Sood, L. E. Sartori, D. P. Wittmer et W. G. Haney, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 796.
- 11 B. B. H. Wills, C. G. Shaw et W. R. Day, *J. Chromatogr. Sci.*, 15 (1977) 262.
- 12 J. W. Finley et E. Duang, *J. Chromatogr.*, 207 (1981) 449.
- 13 J. H. Knox et R. A. Hartwick, *J. Chromatogr.*, 204 (1981) 3.
- 14 S. H. Hansen, *J. Chromatogr.*, 209 (1981) 203.