

Recherche des colorants riboflavine et phosphate de riboflavine dans les denrées alimentaires = Determination of riboflavin and riboflavin phosphate colours in foods

Autor(en): **Etournaud, A. / Aubort, J.-D. / Maire, J.**

Objektyp: **Article**

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

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

Heft 2

PDF erstellt am: **13.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982412>

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.

Recherche des colorants riboflavine et phosphate de riboflavine dans les denrées alimentaires

Determination of Riboflavin and Riboflavin Phosphate Colours in Foods

A. Etournaud et J.-D. Aubort
Laboratoire cantonal, Epalinges-Lausanne
Assistance technique: J. Maire

Introduction

La riboflavine peut être ajoutée dans une denrée alimentaire soit pour augmenter sa teneur en vitamine B₂, soit à titre de colorant jaune (E106). Dans ce dernier cas, l'utilisation de cet additif, bien que non limitée quantitativement, est réservée en Suisse à certaines catégories d'aliments (1).

La riboflavine a été recherchée, en tant qu'agent de coloration, dans les pâtes alimentaires (2-4) et dans les articles de boulangerie et de confiserie (5), la technique d'identification utilisée étant principalement la chromatographie sur papier.

Le présent travail propose une technique rapide pour extraire la riboflavine et le phosphate de riboflavine des denrées alimentaires en vue d'une identification par chromatographie sur couche mince (CCM), avec possibilité de confirmation de l'identité et éventuellement de dosage des colorants extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Partie expérimentale

Réactifs

Acétone, Ph. H. VI, redistillée

Acide formique, 98-100 g/100 g (Merck n° 264)

Methanol, p. a. (Merck n° 6009)

Acétonitrile, pour la chromatographie liquide (Romil Chemicals n° H049)

Acide phosphorique, min. 85 g/100 g, p.a. (Merck n° 573)

Dihydrogénophosphate de potassium, p.a. (Merck n° 4873)

Colorants de référence: riboflavine pure (Siegfried n° 167720) et sel monosodique du phosphate-5' de riboflavine (Fluka n° 83810 ou Merck n° 7608).

Équipement

Évaporateur rotatif

Tubes à centrifuger de 15 ml et centrifugeuse de table

Agitateur type «Vortex»

Colonne d'extraction en phase solide «SEP-PAK» C₁₈ (Waters Associates n° 51910)

Cuve rectangulaire à fond plat et fermeture étanche pour le développement de plaques de CCM de 20 x 20 cm ou 10 x 10 cm

Micropipettes à usage unique de 5 ou 10 µl

Plaques de CCM: voir sous «Identification des colorants par CCM»

Filtres à usage unique 0,45 µm, Ø 3 mm (Millipore «HV» ou Schleicher et Schuell «Spartan»)

Chromatographe HPLC: pompe Merck-Hitachi, modèle 655 A12 avec contrôleur modèle L-5000, injecteur Rheodyne modèle 7125 avec «Loop» de 20 µl, détecteur spectrophotométrique Pye Unicam, modèle LC 3 avec lampe tungstène-halogène (380–600 nm), enregistreur intégrateur Merck-Hitachi, modèle D-2000

Colonne HPLC: voir sous «Confirmation de l'identité des colorants par HPLC».

Mode opératoire

Extraction des colorants

- Peser environ 1 g d'échantillon (homogénéisé, si nécessaire) dans un tube à centrifuger
- ajouter 5 ml de mélange acétone-eau 1:1
- agiter soigneusement 1 à 2 minutes et centrifuger
- transvaser le surnageant coloré dans un ballon cœur de 25 ml
- réextraire de la même manière le culot de centrifugation, réunir les extraits
- évaporer totalement l'acétone à l'évaporateur rotatif (température: 30 °C) ou au moyen d'un courant d'azote.

Purification de l'extrait

- Diluer l'extrait aqueux restant après élimination de l'acétone avec 2 à 3 ml d'eau
- ajouter 3–4 gouttes d'acide formique (centrifuger, si nécessaire)
- conditionner une colonne «SEP-PAK» C₁₈ en faisant passer goutte à goutte successivement 2 ml de méthanol et 5 ml d'eau distillée
- faire passer la totalité de l'extrait acidifié
- laver la colonne avec 2 x 5 ml d'eau distillée
- éluer les colorants avec 2 ml de mélange acétone-eau 1:1, récupérer l'éluat dans un ballon cœur de 5 ml
- évaporer à très petit volume (température: 30 °C), reprendre le résidu avec quelques gouttes de mélange acétone-eau 1:1.

Identification des colorants par CCM

Plaques de CCM:

- gel de silice 60 sans indicateur de fluorescence sur feuille plastique (Merck n° 5740) ou équivalent.

Eluants:

- butanol-1 – éthanol 96% – eau 20:10:20 (R_f approximatifs de la riboflavine: 0,6, du phosphate de riboflavine: 0,4)
- isobutanol – pyridine – acide acétique 96% – eau 33:33:1:33 (R_f approximatifs de la riboflavine: 0,8, du phosphate de riboflavine: 0,5).

Exécution de la CCM:

- déposer sur la feuille de CCM quelques μ l des solutions d'échantillons et des standards de référence (riboflavine et phosphate de riboflavine env. 0,1% chacun dans le mélange acétone-eau 1:1)
- développer dans l'obscurité et sécher le chromatogramme à température ambiante également dans l'obscurité
- observer les plaques immédiatement à la lumière blanche et à l'UV à 366 nm, comparer les valeurs de R_f , les couleurs et les fluorescences des taches pour les échantillons et les standards.

Confirmation de l'identité des colorants par HPLC

Colonne de HPLC:

- Sphérisorb ODS-2, 5 μ m, longueur 250 mm, diamètre intérieur 4,6 mm

Température de la colonne: 30 °C

Longueur d'onde de détection: 445 nm

Eluant:

- acétonitrile – solution aqueuse de KH_2PO_4 0,1 mol/l 18:85 (v/v), mélange ajusté à pH 2,9 avec H_3PO_4 1,5 mol/l
- débit de 1 ml/min

Solutions de standards de référence à environ 20 μ g/ml d'éluant: à préparer lors de chaque série d'analyse (ou chaque jour).

Exécution de la chromatographie HPLC:

- évaporer à sec les solutions d'échantillons utilisées pour l'identification par CCM et reprendre le résidu par 1 ou 2 ml d'éluant
- filtrer les extraits sur filtre à usage unique 0,45 μ m
- injecter successivement les extraits des échantillons et les solutions de standards de référence dans les conditions décrites ci-dessus (temps de rétention approximatifs du phosphate de riboflavine: 3,3 min et de la riboflavine: 5,1 min)
- comparer les temps ou volumes de rétention avec ceux obtenus avec les solutions de standards de référence.

Résultats et discussion

L'utilisation du mélange acétone – eau 1:1 permet d'extraire de manière pratiquement quantitative les colorants recherchés et conduit, notamment en éliminant une partie des protéines présentes dans l'échantillon, à des extraits suffisamment «propres». Ainsi pour certaines denrées (condiments en poudre par exemple), l'identification des colorants par CCM est déjà possible directement à partir des extraits obtenus, sans purification.

Pour les autres denrées, l'identification n'est effectuée qu'après une purification de l'extrait par passage sur une colonne d'extraction en phase solide de type C₁₈. Cette technique, déjà proposée (6–10) pour la concentration et la purification des extraits de vitamine B₂, est appliquée ici sur un extrait aqueux acidifié, afin de permettre également la fixation en tête de colonne du phosphate de riboflavine qui n'est pas fixé en milieu neutre. Après lavage de la colonne avec de l'eau, les colorants sont élués au moyen d'un mélange acétone – eau 1:1, l'acétone pure ne permettant d'éluier que la riboflavine.

L'extrait obtenu par ce procédé est suffisamment purifié pour permettre une identification aisée des colorants par CCM avec les éluants proposés (3, 11) et, si nécessaire, une confirmation de l'identité des colorants par HPLC. Parmi les nombreux systèmes d'éluion HPLC proposés dans la littérature (12–14), celui préconisé par *Bilic et Sieber* (15) permet de séparer les deux colorants en moins de 6 minutes en régime isocratique comme le montre la figure 1. La détection photométrique dans le domaine du visible, bien que moins sensible que la détection par

Tableau 1. Recherche et dosage des colorants riboflavine et phosphate de riboflavine dans quelques denrées alimentaires

Désignation du produit	Nombre d'échantillons analysés	Echantillons avec ajout de riboflavine		Echantillons avec ajout de phosphate de riboflavine	
		nombre d'échan.	concentrations (mg/kg)	nombre d'échan.	concentrations (mg/kg)
Crèmes glacées et glaces *	19	12	12 à 32 moy. : 20	6	10 à 23 moy. : 18
Poudres pour la préparation de crèmes * et poudings	11	5	35 à 24 moy. : 72	2	128 et 300
Crèmes * et poudings	4	0	–	3	19, 21 et 65
Sauces à salade	4	1	35	0	–
Sauces à la minute	2	1	33	0	–
Articles de biscuiterie	2	1	38 **	0	–

* principalement à l'arôme vanille

** dans la masse à fourrer

fluorimétrie utilisée pour le dosage de traces de vitamine B₂, présente l'avantage d'éviter de nombreuses interférences. La longueur d'onde choisie (445 nm) correspond au maximum d'absorption des deux colorants dans l'éluant proposé.

La confirmation de l'identité des colorants par HPLC permet, le cas échéant, d'en effectuer un dosage semi-quantitatif. Il suffit alors de reprendre l'extrait purifié par un volume déterminé d'éluant et d'utiliser des solutions de standards de référence de concentrations connues.

La technique ainsi décrite a été appliquée à l'examen de 42 échantillons de denrées alimentaires du commerce, choisies pour leur coloration jaune et l'indication de l'adjonction de «colorants alimentaires» sur l'emballage. La présence de riboflavine a été décelée sans difficulté par CCM dans 20 cas, et celle du phosphate de riboflavine dans 11 cas. Les concentrations des colorants ajoutés ont été ensuite déterminées par HPLC. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1.

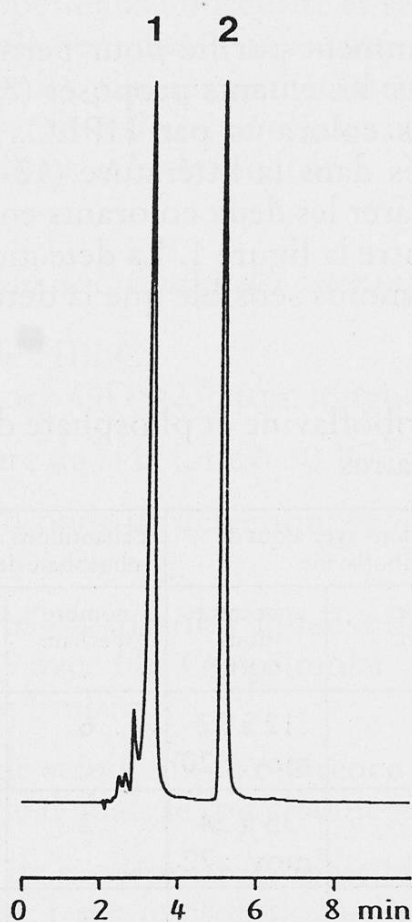


Fig. 1. Chromatogramme HPLC d'une solution standard de phosphate de riboflavine (1) à 36 mg/ml et de riboflavine (2) à 18 µg/ml
Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale

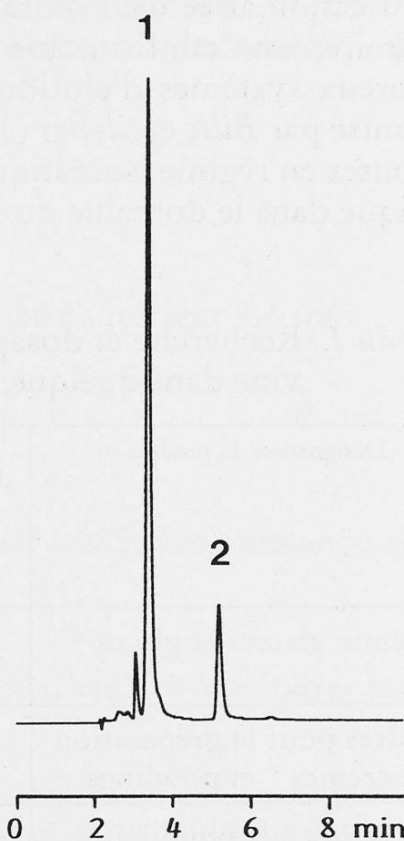


Fig. 2. Chromatogramme HPLC de l'extrait d'un échantillon de crème glacée contenant du phosphate de riboflavine (1; 23 mg/kg) et de la riboflavine (2; 2 mg/kg)
Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale

La figure 2 présente le chromatogramme obtenu avec un extrait purifié d'une crème glacée à l'arôme vanille contenant 23 mg/kg de phosphate de riboflavine et environ 2 mg/kg de riboflavine (probablement impureté du phosphate).

La limite de détection pratique de cette technique est inférieure à 1 mg/kg, elle est largement suffisante pour le but recherché. L'adjonction de riboflavine en tant que colorant est aisée à mettre en évidence lorsqu'il est absent à l'état naturel dans la denrée examinée. Elle n'est certaine dans les autres cas, que lorsque la teneur mesurée dépasse largement la concentration naturelle dans le produit (16) en tenant compte, le cas échéant, de la proportion des divers ingrédients qui en contiennent.

Résumé

Une méthode simple et rapide est décrite pour la recherche de la riboflavine et du phosphate de riboflavine dans les denrées alimentaires. Après extraction au moyen du mélange acétone – eau, la solution résultante est purifiée par extraction en phase solide sur une colonne C₁₈. Les colorants sont identifiés par CCM et leur identité peut être confirmée par HPLC.

Les résultats de l'examen de 42 échantillons de denrées alimentaires sont présentés.

Zusammenfassung

Eine schnelle und einfache Methode zum Nachweis der Farbstoffe Riboflavin und Riboflavinphosphat in Lebensmitteln wird beschrieben. Nach Extraktion mit einem Aceton-Wasser-Gemisch wird die Lösung durch Festphasenextraktion auf einer C₁₈-Säule gereinigt. Die Farbstoffe werden durch Dünnschichtchromatographie identifiziert und können mittels Umkehrphasen-HPLC bestätigt werden.

Die Resultate der Untersuchungen von 42 Lebensmittelproben werden vorgelegt.

Summary

A simple and rapid method is proposed for the analysis of riboflavin and riboflavin phosphate colours in foods. After extraction using an acetone–water mixture, the resulting solution is purified by solid-phase extraction on a C₁₈ column. The colouring agents are identified by TLC and their identities can be confirmed using reversed-phase HPLC.

The results of the investigation of 42 samples of foods are presented.

Bibliographie

1. Ordonnance sur les additifs dans les denrées alimentaires du 20 janvier 1982. Office central fédéral des imprimés et du matériel, Berne.

2. *Di Stefano, F. e Renzi, D.*: Sul riconoscimento della riboflavina nelle paste alimentari artificialmente colorate. *Rend. Ist. sup. Sanità* **19**, 294–297 (1956).
3. *Muntoni, F. e Di Carlo-Malagodi, M.G.*: Identificazione diretta per via cromatografica della riboflavina usata come colorante nelle paste alimentari. *Rend. Ist. sup. Sanità* **25**, 563–566 (1962).
4. *Ludwig, M.*: Identifizierung des Riboflavins in den Teigwaren. *Gordian* **63**, 801–802 (1963).
5. *Hildenbrand, K.*: Zur Identifizierung von Lactoflavin in Back- und Süßwaren. *Dtsch. Lebensmittel-Rdsch.* **63**, 372–373 (1967).
6. *Fellman, J. K., Artz, W. E., Tassinari, P. D., Cole, C. L. and Augustin, J.*: Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by high-performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* **47**, 2048–2050, 2067 (1982).
7. *Wimalasiri, P. and Wills, R. B. H.*: Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **318**, 412–416 (1985).
8. *Ferre, J. and Jacobson, K. B.*: Use of reversed-phase C₁₈ Sep-Pak cartridges for the purification and concentration of sepiapterin and other pteridines. *J. Chromatogr.* **350**, 389–398 (1985).
9. *Ashoor, S. H., Knox, M. J., Olsen, J. R. and Deger, D. A.*: Improved liquid chromatographic determination of riboflavin in milk and dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 693–696 (1985).
10. *Lavigne, C., Zee, J. A., Simard, R. E. and Gosselin, C.*: High-performance liquid chromatographic-diode-array determination of ascorbic acid, thiamine and riboflavine in goats' milk. *J. Chromatogr.* **410**, 201–205 (1987).
11. *Airaud, Ch. B., Cerri, V., Gayte-Sorbier, A. et Andrianjafiniony, J.*: Chromatographie sur couches minces de colorants naturels. *J. Chromatogr.* **261**, 273–285 (1983).
12. *Stancher, B. and Zonta, F.*: High performance liquid chromatographic analysis of riboflavin (vitamin B₂) with visible absorbance detection in italian cheeses. *J. Food. Sci.* **51**, 857–858 (1986).
13. *Finglas, P. M. and Faulks, R. M.*: Critical review of HPLC methods for the determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. *J. Micronutr. Anal.* **3**, 251–283 (1987).
14. *Reyes, E. S. P., Norris, K. M., Taylor, C. and Potts, D.*: Comparison of paired-ion liquid chromatographic method with AOAC fluorometric and microbiological methods for riboflavin determination in selected foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 16–19 (1988).
15. *Bilic, N. and Sieber, R.*: Determination of flavins in dairy products by high-performance liquid chromatography using sorboflavin as internal standard. *J. Chromatogr.* **511**, 359–366 (1990).
16. *Souci, S. W., Fachmann, W. and Kraut, H.*: Food composition and nutrition tables 1986/87, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1986.

Dr A. Etournaud
 Prof. Dr J.-D. Aubort
 Laboratoire cantonal
 Les Croisettes
 CH-1066 Epalinges