

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

Autor(en): **Sallin, Christine / Sieber, R. / Bosset, J.O.**

Objektyp: **Article**

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

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

Heft 5

PDF erstellt am: **09.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982149>

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.

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

II. Possibilités et limites des techniques TLC*

Contribution to Oxidized Cholesterol Determination in Milk and Milk Products

II. Possibilities and Limits of TLC Techniques

Christine Sallin, R. Sieber et J.O. Bosset
Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne

R. Tabacchi
Institut de chimie, Université de Neuchâtel, Neuchâtel

Introduction

La partie I de cette étude en quatre volets avait pour objectif de déterminer les possibilités et limites des techniques de RP-HPLC (1). Cette deuxième partie propose une étude semblable pour les méthodes chromatographiques en couche mince (TLC). Cette technique d'analyse qualitative et semi-quantitative présente en effet l'avantage d'être simple et rapide et de ne nécessiter aucun matériel onéreux, conditions à remplir pour être utilisable par tous les laboratoires de contrôle.

Comme l'indique la partie I (1), il est nécessaire dans une première étape d'isoler les oxystérols des corps gras présents dans l'échantillon. A cette fin, différents traitements sont possibles tels que saponification ou chromatographie sur colonne ou sur cartouche. Une simple saponification n'est souvent pas suffisante pour l'étape d'enrichissement en produits d'oxydation du cholestérol. La fraction insaponifiable peut ou doit être encore séparée sur couche mince (PTLC: preparative thin layer chromatography) (2-7). Les oxystérols récupérés par grattage de la plaque, sont alors suffisamment purs pour être analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC) ou par chromatographie liquide/liquide à hautes performances (HPLC).

Comme technique de préparation de l'échantillon, la chromatographie sur colonne ou sur cartouche est une méthode beaucoup plus ménagère (1, 3, 4) que la saponification. La TLC permet en outre l'étude de la polarité des différents

* En hommage à G. Steiger à l'occasion de son 60^e anniversaire et de son départ à la retraite.

constituants de la matière grasse. *Park* et *Addis* (8) ont pu ainsi étudier divers solvants de migration en vue d'un «clean-up» sur colonne de gel de silice. Ordonnés par polarité croissante, on trouve successivement le cholestérol estérifié, les triglycérides, le cholestérol, les acides gras, les produits d'oxydation du cholestérol et les phospholipides. Ces auteurs obtiennent une séparation optimale des triglycérides et des oxystérols avec le mélange hexane/acétate d'éthyle dans un rapport volumique 9:1.

Les produits d'oxydation du cycle A du cholestérol tels que les composés 3-cétoniques ont été relativement peu étudiés jusqu'à présent en raison de leur polarité inférieure au cholestérol, ce qui les rend difficilement séparables des lipides neutres. *Hwang* et *Maerker* (9) ont développé récemment une méthode d'analyse par GC très sensible pouvant détecter des oxystérols en trace dont plusieurs composés 3-cétoniques dans la viande à 10 ng/kg. L'étape d'enrichissement en oxystérols est néanmoins assez complexe et laborieuse, nécessitant – après l'extraction des lipides – 2 «clean-up» successifs sur cartouche de gel de silice et une PTLC avec séparation des oxystérols polaires des non polaires, avant de procéder à l'analyse GC proprement dite.

Comme méthode d'analyse quantitative, une chromatographie sur couche mince évaluée par planimétrie digitalisée, précédée d'une saponification et d'une PTLC, a permis d'analyser certains oxystérols avec une limite de détection d'env. 3 µg/g d'huile (2). *Bascoul* et al. (10) proposent une méthode en TLC couplée à une détection FID qui est applicable en routine, mais avec une résolution trop faible pour permettre l'analyse d'une vaste palette d'oxystérols.

Ces divers travaux mettent en évidence l'importance de la TLC, souvent utilisée conjointement à une autre méthode analytique comme le montre le tableau 1. L'objectif de cette deuxième partie est double: tester d'abord les possibilités et limites des techniques de TLC pour l'analyse qualitative, éventuellement semiquantitative, des oxystérols dans le beurre fondu; disposer ensuite d'un outil simple et rapide pour tester le «clean-up» de l'échantillon qui fera l'objet de la partie IV. Entre-temps la partie III sera consacrée à une étude des possibilités et limites des techniques GC (GC-FID, GC-MS).

Partie expérimentale

Réactifs

Les standards disponibles, les révélateurs et les solvants utilisés comme phases mobiles pour l'analyse en TLC ainsi que pour l'étape préparative d'extraction sont indiqués dans les tableaux 2, 3 et 4. Les standards purs sont dissous dans l'acétone.

Tableau 1. Résumé des méthodes utilisées en TLC pour la détermination des produits d'oxydation du cholestérol

Référence: auteurs, année	Type de plaque: silica gel (fournisseur)	Solvant de migration utilisé (rapport volumique)	Standards étudiés (cf. lég.)	Révélateur utilisé	Echantillons analysés	Préparation de l'échantillon	Remarques/autres méthodes analytiques utilisées
<i>Ansari and Smith, 1979 (11)</i>	type HF254, 0,25 mm (Merck)	benzène/AcOEt (1:3 ou 3:1), heptane/AcOEt (4:1)		$\lambda = 254$ nm, ac. sulfurique à 50%	cholestérol stocké à l'air	clean-up sur gel de silice	analyse par HPLC
<i>Finocchiaro et al., 1984 (2)</i>	type Polygram Sil G, 0,25 mm (Brinkman Ins.)	3 x AcOEt/heptane (1:1) ou 2 x acétone/heptane (1:1)	4-6, 8, 9, 10	acide p-toluène sulfonique	fromage, beurre, fondu blanchi	extraction des lipides puis saponification à froid	PTLC couplée à une analyse par HPLC; dosage par TLC
<i>Park and Addis, 1985 (8)</i>	type H, 0,25 mm (Supelco)	divers solvants	1, 10, 15	ac. sulfochromique	pommes de terre, poulet frit, gâteaux, hamburger, boeuf (foie/cerveau)	extraction des lipides puis clean-up sur gel de silice	analyse par HPLC
<i>Luby et al., 1986 (12)</i>	type G (Fisher Inc.)	bidimens.: AcOEt/heptane (1:1) benzène/AcOEt (3:2)	4-8, 10	ac. sulfurique à 50%	beurre	extraction des lipides puis saponification	analyse par GC
<i>Maerker and Unruh, 1986 (3)</i>	type G, GHL, 0,25 mm (Analtech)	heptane/AcOEt (1:1)		10% sulfate de cuivre + 8,5% ac. phosphorique	huile d'olive, huile d'arachide	saponification	TLC couplée à une analyse par GC
<i>Maerker and Bunick, 1986 (4)</i>	type G, GHL, 0,25 mm (Analtech)	benzène/AcOEt/ac. acétique (60:40:1)	4, 5 (6 et 8)*, 10, 15, 19, 20	ac. sulfurique à 50%	dispersions aqueuses		TLC couplée à une analyse par GC
<i>Bascoul et al., 1986 (10)</i>	type F254 (Merck)	inconnu	1, 2, 4, 5 (8 et 9)*, 15	ac. sulfurique à 50%	suif de boeuf	saponification à chaud	analyse par TLC-FID, GC
<i>Cleveland and Harris, 1987 (5)</i>	type SI-HPF, 0,2 mm (J.T. Baker Chemicals)	chlorure de méthylène (17 cm), AcOEt (5 cm)	1-8, 10, 15, 17	$\lambda = 266, 254$ nm, ac. sulfurique à 50%	laits	extraction des lipides	PTLC couplée à une analyse par GC

Référence: auteurs, année	Type de plaque: silica gel (fournisseur)	Solvant de migration utilisé (rapport volumique)	Standards étudiés (cf. lég.)	Révélateur utilisé	Echantillons analysés	Préparation de l'échantillon	Remarques/autres méthodes analytiques utilisées
<i>Teng</i> , 1990 (13)	type HF254, 0,25 mm (Merck)	diéthyléther ainsi que benzène/AcOEt (17:8) pour les peroxydes	1, 2, 4-6, 14, 15, 17-21		beurre âgé de 15 ans	crystallisations	dose aussi les peroxydes dérivés du cholestérol; analyse par HPLC
<i>Nourooz-Zadeh</i> , 1990 (14)	type 60, 0,25 mm (Merck)	toluène/méthanol (1:1) 5 cm, toluène 16 cm		ac. sulfurique à 50%	oeufs, poudre d'oeufs	extraction des lipides puis clean-up	analyse par GC, HPLC
<i>Pie et al.</i> , 1990 (6) <i>Pie et al.</i> , 1991 (7)	type 60, 0,25 mm (Merck)	hexane/éther (7:3), hexane/diéthyléther/AcOEt (5:5:5) (13)	4-6, 8-10, 14-16	rhodamine	beurre, oeufs en poudre, biscuits, gâteaux	saponification à 40 °C pour le beurre, extraction et saponification pour les autres échantillons	PTLC couplée à une analyse par GC
<i>Kumar and Singhal</i> , 1992 (15)	type G, 0,25 mm	heptane/AcOEt (1:1)	1, 2, 4-6, 8, 10, 15	ac. sulfurique à 50%	crème, beurre, gelée	saponification à froid et extraction	analyse par GC

Abréviations

GC = Gas Chromatography; HPLC = High Performance Liquid/Liquid Chromatography; TLC = Thin Layer Chromatography; PTLC = Preparative Thin Layer Chromatography; AcOEt = acétate d'éthyle

Légende

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

8 = Cholestane-3 β -ol, 5 α , 6 α -époxyde
9 = Cholestane-3 β -ol, 5 β , 6 β -époxyde
10 = Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol
11 = Cholestane-3 β , 5 α -diol, 6-one
12 = Cholestane-3 β -ol, 6-one
13 = Cholestane-3,6-dione
14 = 26-Hydroxycholestérol

15 = Cholestérol
16 = 19-Hydroxycholestérol
17 = 24-Hydroxycholestérol
18 = Cholest-6-ène-3 β , 5 α -diol
19 = 7 β -Hydroperoxycholestérol
20 = 7 α -Hydroperoxycholestérol
21 = 5 α -Hydroperoxycholestérol
* taches non séparées

Tableau 2. Stérols utilisés

Standard	N° de l'article	Fournisseur
7-Cétocholestérol	A284122	Aldrich
25-Hydroxycholestérol	H1015	Sigma
20 α -Hydroxycholestérol	H6378	Sigma
7 β -Hydroxycholestérol	H6891	Sigma
7 α -Hydroxycholestérol	C6420	Steraloids
Cholestane-3 β , 5 α , diol-6-one	C4000	Steraloids
Cholestane-3 β -ol, 5 α , 6 α -époxyde	C2773	Sigma
Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol	C2523	Sigma
Cholestérol	2471	Merck
4-Cholestène-3-one	C6250	Steraloids

Tableau 3. Révélateurs utilisés

Réactif	N° de l'article	Fournisseur
Acide sulfurique	84718	Fluka
Acide phosphomolybdique	814302	Macherey-Nagel
Iode	57650	Fluka

Tableau 4. Solvants utilisés

Solvant	Pureté	N° de l'article	Fournisseur
Acétate d'éthyle	pro analysi	9623	Merck
n-Hexane	pro analysi	4371	Merck
Toluène		8317	Merck
Acétone	pro analysi	299	Merck
Chlorure de méthylène	LiChrosolv	6044	Merck

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 d'analyse des oxystérols. Une portion de ce beurre a été porté à env. 180 °C pendant env. 15 min (beurre noisette) afin de l'enrichir artificiellement en oxystérols.

Un autre échantillon a été prélevé dans un beurre fondu stocké 2 ans en chambre froide (env. 7 °C).

Appareillage

Applicateur automatique Linomat IV (Camag, Muttenz, Suisse),
 Seringue Linomat 100 µl (Camag, Muttenz, Suisse),
 Lampe UV Cabinet II, λ = 254 nm et 366 nm (Camag, Muttenz, Suisse),
 Rotavapor (Büchi, Flawil, Suisse),
 Cartouche SPE avec aminophase Bond Elut LRC (500 mg/2,8 ml) (Varian, Sunnyvale CA, USA)

Les plaques chromatographiques testées sont décrites dans le tableau 5.

Tableau 5. Plaques TLC utilisées

Type de plaque	Epaisseur (mm)	Dimension (cm)	N° de l'article	Fournisseur	Utilisation
NH ₂ F ₂₅₄ s	0,2	5 x 10	15647	Merck	Essais préliminaires
Polygram Sil G/UV254	0,25	4 x 8	805021	Macherey-Nagel	
RP-8 F ₂₅₄ s	0,25	5 x 10	15684	Merck	
Silgur-25		20 x 20	810013	Macherey-Nagel	
Gel de silice 60 F ₂₅₄	0,2	20 x 20	5554	Merck	Méthode proposée
Gel de silice 60 F ₂₅₄ pour HPTLC		20 x 20	5548	Merck	Méthode proposée

Méthode d'analyse optimisée

Extraction préparative (1)

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 500 µl d'acétone. La solution obtenue, appelée extrait de beurre, est prête pour l'application sur la plaque chromatographique.

Conditions d'analyse par TLC

Type de plaque: Feuille en aluminium pour HPTLC avec gel de silice 60 F₂₅₄ pour la séparation des oxystérols.

Solution standard:	Dissoudre 1 mg de chacun des 9 oxystérols à disposition et 1 mg de cholestérol (cf. le tableau 2) dans 10 ml d'acétone.
Application sur la plaque:	Appliquer 20 µl de la solution standard, resp. de l'extrait de beurre (réglage: 4 s/µl) sur une bande de 0,8 cm de large. Maintenir un flux constant d'azote lors de l'application pour sécher la tache.
Phases mobiles:	i) Chlorure de méthylène/toluène/acétone = 2:1:1 pour les standards. ii) Hexane/acétate d'éthyle = 9:1, puis, après séchage de la plaque, mélange i) pour l'extrait de beurre, sans changement de la direction de migration.
Saturation:	env. 2 h (avec un buvard).
Développement:	A température ambiante dans une chambre saturée pendant env. 1 h (chemin de migration: 17 cm).
Révélation:	Sous UV ($\lambda = 254$ nm) pour le 7-cétocholestérol et le 4-cholestène-3-one. Après application d'un spray d'acide sulfurique (500 g/kg) puis chauffage à 120 °C pendant 10 min pour les autres standards. Les taches colorées sont visibles en lumière blanche usuelle. Elles ressortent plus intensément à 366 nm.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus correspondent à 2 séries d'essais différents, soit:

- ceux destinés à optimiser la séparation d'un mélange de 10 standards purs, soit 9 oxystérols et le cholestérol non oxydé (cf. tableau 2);
- ceux destinés à tester la séparation sur couche mince des oxystérols et du cholestérol dans le beurre fondu sans/avec «clean-up» préliminaire sur cartouche.

Essais de séparation sur couche mince d'un mélange de 9 oxystérols et de cholestérol (standards purs)

Sur plaque de gel de silice avec indicateur de fluorescence (gel de silice 60 F₂₅₄ pour HPTLC) et en recourant au mélange de solvants chlorure de méthylène/acétone/toluène dans le rapport volumique 2:1:1, il a été possible de séparer le cholestérol ainsi que chacun des 9 oxystérols étudiés. Seuls le 7-cétocholestérol et le 4-cholestène-3-one sont visibles sous UV à 254 nm. Les autres composés peuvent être révélés à l'aide de l'acide phosphomolybdique ou de l'acide sulfurique. Le second révélateur cité présente un net avantage sur le premier: il permet de colorer de façon différenciée le cholestérol et ses divers produits d'oxydation, ce qui facilite donc grandement le travail d'identification. La figure 1 montre un exemple d'une

telle séparation sur couche mince avec indication des R_f et des couleurs correspondants dans la légende.

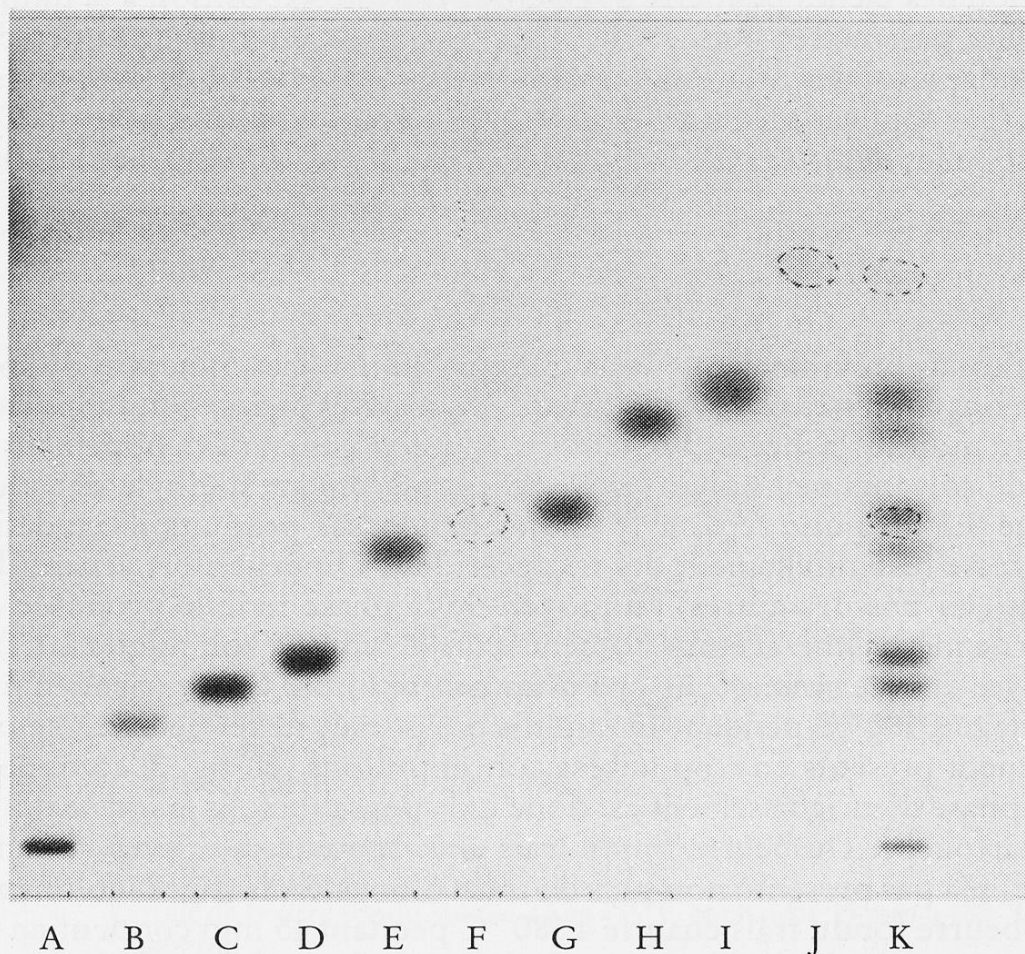


Fig. 1. Séparation du cholestérol et de ses produits d'oxydation par TLC

Légende:

Standard	R_f	Couleur après révélation	Couleur à 366 nm après révélation
A = Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol	0,05	jaune-brun	blanc-beige
B = Cholestane-3 β , 5 α , diol-6-one	0,20	jaune	bleu
C = 7 α -Hydroxycholestérol	0,23	bleu	brun
D = 7 β -Hydroxycholestérol	0,27	bleu	brun
E = Cholestane-3 β -ol, 5 α , 6 α -époxyde	0,39	brun-beige	blanc-beige
F = 7-Cétocholestérol	0,42	*	*
G = 25-Hydroxycholestérol	0,44	brun	beige
H = 20 α -Hydroxycholestérol	0,54	brun	vert
I = Cholestérol	0,58	mauve	rose-mauve
J = 4-Cholestène-3-one	0,72	*	bleu
K = Mélange des standards A à J			

* Tache visible à 254 nm avant la révélation à l'acide sulfurique.

Lors de la révélation à l'acide sulfurique, le temps de chauffage (10 min) et la température (120 °C) sont importants pour obtenir des couleurs bien différenciées. Une température trop élevée donne des taches uniformément brunes. L'intensité de la coloration des taches peut être augmentée par une exposition à la lumière UV à 366 nm. Ces paramètres permettent d'accroître la sensibilité de la détection. On peut atteindre ainsi des limites de détection de l'ordre de 0,1 µg avec des solutions standards (par application d'une tache ronde), soit des quantités environ 10 fois plus faibles que celles détectées par la méthode RP-HPLC décrite précédemment dans la partie I (1).

Analyse du beurre fondu

Lors d'essais préliminaires, plusieurs types de couches minces et de solvants de migration ont été testés pour l'analyse du beurre. Ces essais, non rapportés dans le détail, ont montré la nécessité d'effectuer un premier développement avec un mélange de solvants peu polaire tels que hexane/acétate d'éthyle dans le rapport volumique 9:1 (8) pour séparer le cholestérol et ses produits d'oxydation de la matière grasse (essentiellement des triglycérides). On peut alors séparer les divers oxystérols (les uns des autres) au moyen de la phase mobile proposée ci-dessus (chlorure de méthylène/acétone/toluène dans le rapport volumique 2:1:1).

L'analyse directe sans «clean-up» d'un beurre fondu frais enrichi en oxystérols par chauffage à 180 °C pendant 15 min n'a pas permis de les détecter, ceux-ci étant probablement présents en trop faibles concentrations (cf. fig. 2, colonne A). Une première phase d'enrichissement est donc indispensable sous la forme d'un «clean-up» sur cartouche. Du beurre fondu frais ainsi traité (c.-à-d. avec «clean-up» sur cartouche) n'a pas présenté non plus de trace d'oxystérols (fig. 2, colonne B), mais ce même beurre fondu frais chauffé à 180 °C pendant 15 min contient en revanche des quantités appréciables de 7-cétocholestérol, de 7 α -hydroxycholestérol ainsi que de 7 β -hydroxycholestérol (fig. 2, colonne C). Du beurre fondu stocké à l'air pendant 2 ans à 7 °C contient ces mêmes oxystérols, toutefois en quantités nettement inférieures, l'évaluation semi-quantitative étant effectuée sur la base de l'intensité et de la grosseur des taches obtenues (fig. 2, colonne D). Ce vieux beurre fondu porté à 180 °C pendant 15 min présente des teneurs encore plus importantes en ces 3 oxystérols (fig. 2, colonne E) que le beurre fondu frais chauffé dans les mêmes conditions.

La traînée brunâtre accompagnant la migration du beurre fondu stocké et/ou chauffé, est beaucoup plus intense que celle obtenue avec le beurre fondu frais non chauffé. Elle est certainement due à la lipolyse de la matière grasse qui résulte d'une longue conservation et/ou d'un chauffage intense. Ce bruit de fond gêne sensiblement la détection des oxystérols par couche mince puisqu'il élève les seuils de détection (les taches sont moins visibles et moins bien colorées).

Diverses méthodes d'analyse ont été mises en oeuvre pour tenter d'élucider l'origine de cette traînée brunâtre: la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie liquide/liquide à hautes performances avec détection par diffraction de lumière

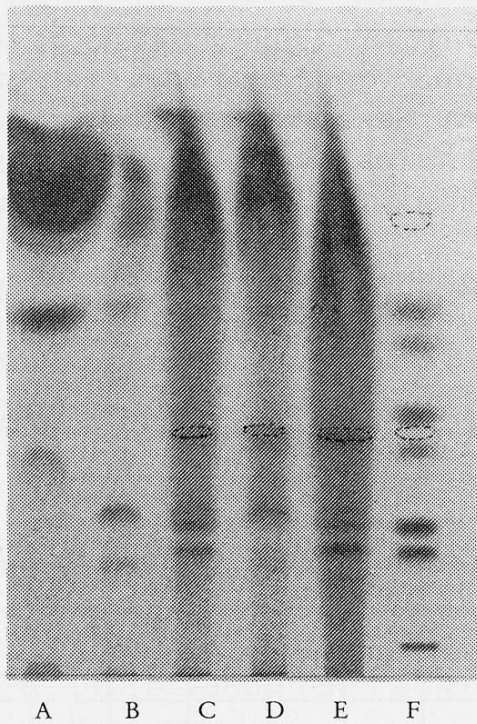


Fig. 2. Analyse d'un beurre fondu sur couche mince

Légende: 1^{er} développement avec hexane/acétate d'éthyle (9:1); séchage; 2^e développement avec chlorure de méthylène/acétone/toluène (2:1:1) dans le même axe de migration. Révélation à l'acide sulfurique.

A = Beurre fondu chauffé 15 min à 180 °C;

B = Extrait de beurre fondu frais;

C = Extrait de beurre fondu frais chauffé 15 min à 180 °C;

D = Extrait de beurre fondu stocké 2 ans à 7 °C;

E = Extrait de beurre fondu stocké 2 ans à 7 °C et chauffé 15 min à 180 °C;

F = Standards

N.B.: Tous les chromatogrammes obtenus avec les extraits de beurre fondu montrent la présence de 2 taches bien résolues ($R_f = 0,17$ et $0,25$) dont l'origine demeure encore inconnue

(HPLC-LSD) (cf. partie IV). Toutes ces méthodes semblent indiquer que cette traînée brunâtre doit être attribuée aux mono- et diglycérides formés par l'hydrolyse des triglycérides du beurre fondu, éventuellement aussi à certains produits d'oxydation de la matière grasse. Le beurre frais contient d'ailleurs aussi 1 à 3% de glycérides partiels. A cause de ce bruit de fond il est indispensable d'observer la plaque à 366 nm après la révélation à l'acide sulfurique pour parvenir à distinguer les couleurs et éviter ainsi toute confusion avec d'autres substances ayant un R_f comparable. Une analyse (semi-)quantitative par intégration des pics à l'aide d'un densitomètre n'est donc pas envisageable dans de telles conditions. En conséquence, le «clean-up» proposé dans la partie I et utilisé pour ce travail devra donc être amélioré avant d'envisager la chromatographie sur couche mince comme méthode de routine. Ce développement méthodologique fera l'objet d'une étude particulière dans la partie IV.

A titre comparatif, le tableau 6 rapporte encore quelques résultats récemment publiés. On peut y remarquer l'importance de l'auto-oxydation du cholestérol par

suite d'un stockage prolongé ou d'une élévation de température. De nombreux oxystérols y sont mentionnés, dont les 3 cités ci-dessus. Les oxystérols détectés dans le beurre, notamment dans le beurre frais, varient d'un auteur à l'autre. Plusieurs facteurs peuvent l'expliquer:

- Les conditions de fabrication, d'emballage et d'entreposage du beurre ne sont pas les mêmes.
- Les méthodes d'analyse employées sont fort différentes.

Tableau 6. Oxystérols détectés (+) dans divers beurres

Type de beurre	Oxystérols									Auteurs, année
	α -ép	β -ép	7-one	7 α -OH	7 β -OH	4 β -OH	25-OH	20 α -OH	triol	
Frais Chauffé 10 min à 180 °C			+	+	+	+	+			<i>Csiky</i> , 1982 (16)
Salé Salé, 8 jours sous lumière fluorescente				+	+					<i>Luby et al.</i> , 1986 (12)
Frais Sans sel 6 mois à -26 °C 6 mois à 4 °C	+		+		+					<i>Sander et al.</i> , 1988, 1989 (17, 18)
Frais 4 mois à 4 °C Chauffé 10 min à 180 °C Beurre fondu	+	+	+	+	+		+	+		<i>Nourooz-Zadeh et Appelqvist</i> , 1988 (19)
Frais Chauffé 10 min à 180 °C 6 mois à -20 °C 6 mois à -20 °C et chauffé 10 min à 180 °C	+	+	+	+	+		+	+	+	<i>Pie et al.</i> , 1990 (6)
Frais				+	+					<i>Kumar et Singhal</i> , 1992 (15)

Légende:

α -ép = cholestane-3 β -ol,5 α ,6 α -époxyde

7-one = 7-cétocholestérol

4 β -OH = 4 β -hydroxycholestérol

triol = cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol

β -ép = cholestane-3 β -ol,5 β ,6 β -époxyde

7 α -OH et 7 β -OH = 7 α - et 7 β -hydroxycholestérol

25-OH et 20 α -OH = 25-hydroxycholestérol et

20 α -hydroxycholestérol

En caractère gras et encadré, les 3 oxystérols trouvés lors de cette étude dans le beurre fondu stocké 2 ans et/ou chauffé 15 min à 180 °C

Conclusion

Le présent travail montre qu'il est possible de séparer par chromatographie sur couche mince les composants d'un mélange standard contenant le cholestérol et 9 de ses produits d'oxydation. En l'absence d'effets de matrice, les limites de détection obtenues se situent au voisinage de 0,1 µg.

L'analyse du beurre fondu nécessite toutefois un «clean-up» préliminaire comme phase d'enrichissement des oxystérols et d'élimination des triglycérides. Le «clean-up» repris de la partie I a permis de détecter 3 oxystérols dans du beurre fondu stocké 2 ans à 7 °C et/ou chauffé 15 min à 180 °C. Cette étape préparative permet en effet d'éliminer la majeure partie des triglycérides, mais pas la fraction polaire comprenant les mono- et les diglycérides (formation d'une traînée brunâtre sur tout le chemin d'élution), ce qui limite donc l'application de la méthode par TLC proposée à la seule analyse qualitative des oxystérols. Il ne permet pas non plus l'analyse d'oxystérols moins polaires que le cholestérol comme le 4-cholestène-3-one par exemple. Vu le travail de mise au point qu'il requiert encore, le «clean-up» des échantillons de beurre fondu fera l'objet d'une étude plus approfondie dans le quatrième volet de ce travail.

En résumé, une comparaison des deux premières techniques chromatographiques développées et testées jusqu'ici indique que:

- l'avantage principal de la méthode RP-HPLC testée (partie I) réside dans son caractère quantitatif. Cette méthode présente en revanche d'assez médiocres limites de détection et de nombreux artefacts et/ou interférences. En outre, elle n'est applicable qu'aux seuls composants qui présentent un chromophore aux longueurs d'onde de détection utilisées ($\lambda = 204$ et 242 nm);
- l'avantage principal de la méthode TLC testée (partie II) est sa simplicité et son faible coût de mise en oeuvre. La TLC permet en outre la détection univoque des oxystérols grâce à leur coloration spécifique (avant et après révélation à l'acide sulfurique et sous divers éclairages: 254 et 366 nm). Son défaut majeur actuel est un important bruit de fond (traînée brunâtre) en présence de mono- et diglycérides libérés par lipolyse des triglycérides. Cette limitation devra être revue après l'étude des possibilités et limites des techniques de purification des échantillons (partie IV).

Remerciements

Le présent travail fait partie d'une thèse de doctorat actuellement en cours. Les auteurs tiennent à remercier l'Institut *Candia* (Centre de recherche international André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France) ainsi que la Fédération des coopératives Migros (Zurich) de leur intérêt pour ce travail et pour leur soutien financier accordé sous la forme d'une bourse offerte au premier auteur, stagiaire à la FAM. Les auteurs remercient également le Dr A. *Dieffenbacher* de Nestlé, Vevey, ainsi que le Dr P. *Marchon* de Crema, Fribourg, pour leur lecture critique du manuscrit.

Résumé

Le présent travail étudie les possibilités et limites de l'application de la chromatographie en couche mince à l'analyse du cholestérol et de 9 de ses produits d'oxydation (oxystérols) dans des beurres fondus (frais, stocké et/ou chauffé). La technique de «clean-up» a été reprise de la partie I (méthode RP-HPLC), suivie d'une migration sur couche mince (gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence, pour HPTLC) avec d'abord un mélange d'hexane/acétate d'éthyle (9:1), puis dans la même direction avec le mélange chlorure de méthylène/acétone/toluène (2:1:1). La méthode proposée permet de séparer les 10 substances d'un mélange standard avec une limite de détection très basse (env. 0,1 µg) et avec une coloration très spécifique des taches (avant et après révélation à l'acide sulfurique; à 254 et 366 nm). Avec des beurres fondus partiellement lipolysés (stockage, chauffage) apparaît néanmoins une traînée brunâtre, due probablement aux mono- et diglycérides, éventuellement aux produits d'oxydation de la matière grasse, qui limite l'application de cette technique à une analyse qualitative. Trois oxystérols ont pu être ainsi être mis en évidence dans le beurre fondu chauffé, resp. stocké sur une longue période.

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit den Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Analyse von Cholesterin und 9 Oxidationsprodukten (Oxycholesterine) in eingesottener Butter (frisch, gelagert oder erhitzt). Es wurde das in Teil I (Methode RP-HPLC) beschriebene Reinigungsverfahren (Clean-up) verwendet, gefolgt von einer Trennung auf Dünnschichtplatten (Silikagel 60 mit einem Fluoreszenzindikator für die HPTLC), zuerst mit dem Fliessmittel Hexan/Ethylacetat (9:1), dann mit dem Fliessmittel Methylenchlorid/Aceton/Toluol (2:1:1). Die vorgeschlagene Methode erlaubt es, die erwähnten 10 Substanzen in einem Standardgemisch mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze (ungefähr 0,1 µg) und einer sehr spezifischen Färbung der Flecken (vor und nach dem Besprühen mit Schwefelsäure; bei 254 und 366 nm) zu trennen. Bei teilweise lipolysierten Butterproben wurde infolge der Lagerung und Erhitzung auf den Dünnschichtplatten ein bräunlicher Streifen festgestellt, bei dem es sich um Mono- und Diglyzeride handeln dürfte, eventuell um Oxidationsprodukte des Milchfettes, was eine quantitative Analyse erschwert. Drei Oxycholesterine konnten in erhitzten sowie in gelagerten Butterproben nachgewiesen werden.

Summary

The present work describes the possibilities and limits of the application of the thin layer chromatography to the analysis of cholesterol and of 9 of its oxidation products in butter oils (fresh, stored or/and heated). The clean-up technique described in part 1 (RP-HPLC method) is followed by a TLC analysis (plate silica gel 60 with a fluorescence indicator, for HPTLC). The development of the thin layer plate is performed in 2 steps. The first mobile phase is hexane/ethylacetate (9:1). The plate is dried and developed in the same direction with a second mobile phase: methylene chloride/acetone/toluene (2:1:1). This method allows the separation of 10 substances of a standard test mixture with very low detection limits (eg. 0.1 µg) and with specific coloring of spots (before and after revelation with sulfuric acid, detection at 254 and 366 nm). Nevertheless with partly lipolysed butter oils (storage, heat treatment) a brown

streak appears, probably due to mono- and diglycerides, eventually to oxidation products of milk fat, limiting this technique to a qualitative analysis. Three oxidized cholesterols have been detected in heated or stored butter oils.

Bibliographie

1. Sallin, Christine, Baumann, E., Bütikofer, U., Sieber, R. et Bosset, J.O.: Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. Partie I: Possibilités et limites des techniques RP-HPLC. *Trav. chim. aliment. hyg.* **84**, 141–157 (1993).
2. 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).
3. Maerker, G. and Unruh Jr., J.: Cholesterol oxides I. Isolation and determination of some cholesterol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 767–771 (1986).
4. Maerker, G. and Bunick, F.J.: Cholesterol oxides II. Measurement of the 5.6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 771–777 (1986).
5. Cleveland, M.Z. and Harris, N.D.: Oxidation of cholesterol in commercially processed cow's milk. *J. Food Protect.* **50**, 867–871 (1987).
6. Pie, J.E., Spabis, K. and Seillan, C.: Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 973–978 (1990).
7. Pie, J.E., Spabis, K. and Seillan, C.: Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 250–254 (1991).
8. Park, S.W. and Addis, P.B.: HPLC determination of C-7 oxidized cholesterol derivatives in foods. *J. Food Sci.* **50**, 1437–1441 (1985).
9. Hwang, K.T. and Maerker, G.: Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 371–375 (1993).
10. Bascoul, J., Domergue, N., Olle, M. and Crastes de Paulet, A.: Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID. *Lipids*, **21**, 383–387 (1986).
11. Ansari, G.A.S. and Smith, L.L.: High-performance liquid chromatography of cholesterol autoxidation products. *J. Chromatogr.* **175**, 307–315 (1979).
12. 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).
13. Teng, J.I.: Oxysterol separation by HPLC in combination with thin layer chromatography. *Chromatogram* 8–10 (Nov.) (1990).
14. Nourooz-Zadeh, J.: Determination of the autoxidation products from free or total cholesterol: a new multistep enrichment methodology including the enzymatic release of esterified cholesterol. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1667–1673 (1990).
15. Kumar, N. and Singhal, O.P.: Effect of processing conditions on the oxidation of cholesterol in ghee. *J. Sci. Food Agric.* **58**, 267–273 (1992).
16. Csiky, I.: Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by adsorption high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **241**, 381–389 (1982).
17. 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).

18. *Sander, B.D., Addis, P.B., Park, S.W. and Smith, D.E.*: Quantification of oxidation products in a variety of foods. *J. Food Protect.* **52**, 109–114 (1989).
19. *Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L.A.*: Cholesterol oxides in Swedish food ingredients: butter and cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1635–1641 (1988).

Prof. Dr R. Tabacchi
Institut de chimie
Université de Neuchâtel
CH-2000 Neuchâtel

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