



INFORMATION - FAM

Jun 1992 / 244 W

Le dosage des acides ascorbique et déhydroascorbique du lait: Survol bibliographique et comparaison de quelques méthodes titrimétriques et chromatographiques par HPLC

**J.O. Bosset, U. Bütikofer
Doris Fuchs et Miroslava I. Imhof (1)
E. Tagliaferri (2)
Christel Marchiando et P. Bruttel (3)**

- 1) Station fédérale de recherches laitières (FAM)
3097 Liebefeld-Berne
- 2) Centre de recherches Nestlé, Division qualité
et sécurité alimentaire
Vers-chez-les Blanc, 1000 Lausanne
- 3) Metrohm AG, 9101 Herisau

Le dosage des acides ascorbique et déhydroascorbique du lait: Survол bibliographique et comparaison de quelques méthodes titrimétriques et chromatographiques par HPLC*

Overview and Comparison of some Titrimetric and HPLC Methods for the
Determination of Ascorbic and Dehydroascorbic Acid in Milk

J.O. Bosset, U. Bütikofer, Doris Fuchs et Miroslava I. Imhof
Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne

E. Tagliaferri
Centre de recherches Nestlé, Division qualité et sécurité alimentaire
Vers-chez-les-Blanc / Lausanne

Christel Marchiando et P. Bruttel
Metrohm AG, Herisau

Introduction

De nombreuses méthodes ont déjà été proposées pour le dosage de la vitamine C «totale» de diverses denrées alimentaires, analytiquement définie par maints auteurs comme la somme de ses deux formes biologiquement actives: les acides ascorbique et déhydroascorbique. Quelques articles de revue traitent de ces dosages de façon approfondie (1-7, 9, 36). Pour doser leur somme, certaines méthodes ramènent ces deux formes à une seule en procédant:

- soit à une oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique à l'aide d'oxydants ménagants comme le 2,6-dichlorophénolindophénol DCPIP (10), l'oxygène de l'air (en présence de charbon actif lavé à l'acide (11, 12)), l'ascorbate oxydase (13) et même l'eau de brome (14),
- soit à une réduction de l'acide déhydroascorbique en acide ascorbique à l'aide de réducteurs tels que la DL-homocystéine (15, 16), le dithiothréitol (17-20), l'hydrogène sulfuré (21) ou le 2,3-dimercapto-1-propanol (60).

* Conférence présentée sous forme de posters lors de la 103^e assemblée annuelle de la Société suisse de chimie analytique et appliquée, les 5 et 6 septembre 1991 à Engelberg

Des dosages effectués successivement avant et après de telles réactions d'oxydoréduction permettent également de déterminer, par différence, les deux formes initialement présentes.

Titrages

En ce qui concerne le dosage de l'acide ascorbique, on peut d'abord rappeler l'emploi de méthodes de titrage des plus variées recourant au pouvoir réducteur de sa fonction ène-diol, oxydé en acide déhydroascorbique par le DCPIP proposé par Tillmans dès 1927 (21–27; cf. aussi les nombreuses références bibliographiques mentionnées dans une récente revue bibliographique (28)), par la chloramine T (29), la N-bromosuccinimide (30), voire l'iode (31) pour ne citer que les oxydants les plus usuels. Les points d'équivalence de ces titrages peuvent à leur tour être déterminés par maintes voies telles que visuelle (21, 25), voltamétrique (23), potentiométrique (23, 26, 30), bivoltamétrique (23, 32) et biampérométrique (23). On peut aussi doser cette vitamine par polarographie (23).

Dosages photométriques

Au nombre des déterminations photométriques, on peut citer:

- les réactions colorimétriques telles que la réduction (par l'acide ascorbique) d'un sel de tétrazolium (par ex. le méthylthiazolyltétrazolium MTT) avec formation d'un MTT-formazan (33, 34, 58), celle du tungstène dans le complexe dit de valences mixtes de l'acide phosphotungstique (35), voire celle de l'ion ferrique en ion ferreux révélé dans le complexe coloré du Fe(II)- α , α' -dipyridyle (36);
- la formation – pour l'acide déhydroascorbique – de divers dérivés colorés comme une osazone colorée par réaction avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (21, 37, 38, 40).

Dosages chromatographiques

Nombre de méthodes de séparation telles que l'HPLC ont aussi été appliquées au dosage des acides ascorbique et déhydroascorbique. Ces méthodes présentent l'intérêt de ne pas nécessiter de détecteurs aussi spécifiques que les précédentes réactions destinées à la photométrie. Parmi ces détecteurs, on peut citer ceux basés sur l'absorption propre de l'acide ascorbique dans l'UV entre 214–225 nm (18, 20, 41), domaine spectral où absorbe aussi l'acide déhydroascorbique et où interfèrent également la plupart des réactifs tels que l'acide métaphosphorique (41) utilisé pour l'extraction et la protection de l'acide ascorbique. Aussi préfère-t-on souvent la détection de l'acide ascorbique entre 245 et 254 nm (19, 20, 41–43) en recourant soit à des détecteurs photométriques UV-visibles classiques, soit à des détecteurs à réseau de photodiodes (DAD: 16, 20, 42). Dans ce domaine spectral, l'acide déhydroascorbique n'absorbe plus.

Pour accroître tant la sélectivité que la sensibilité de la méthode, il est possible d'effectuer une dérivatisation en «pré- ou en post-colonne» avec la 1,2-phénylènediamine OPDA, dont le produit de réaction est une quinoxaline fluorescente (10–12, 42, 44–46). Dans ce cas, le détecteur fluorimétrique est réglé à environ 350 nm pour l'excitation et à environ 430 nm pour l'émission. Des dérivés substitués de l'OPDA comme la 4,5-diméthylphénylènediamine DMPDA (56) ou les méthoxy- et éthoxy-1,2-phénylènediamine (14) ont également été proposés pour effectuer cette «dérivatisation», mais présentent plus d'inconvénients que d'avantages. Ce dernier réactif doit en effet être préalablement synthétisé et purifié. De plus, les temps de réaction de ces 2 derniers composés sont particulièrement longs (45 min par «dérivatisation» (14)). Quant aux déterminations par chimiluminescence, on peut rappeler la «dérivatisation» en «post-colonne» de l'acide ascorbique avec la lucigénine en milieu alcalin (48).

Vu le fort pouvoir réducteur de l'acide ascorbique, on peut encore utiliser des systèmes de détection électrochimique. Il s'agit en général de détecteurs ampérométriques à électrode de référence à Ag/AgCl. Divers potentiels ont été proposés tels que $E = +400$ mV (20); $E = +700$ mV (15, 43); $E = +600$ à $+800$ mV (17); $E = +800$ mV (49), appliqués parfois en mode pulsé: $E_1 = +700$ mV/240 ms (mesure), $E_2 = +1250$ mV/60 ms (nettoyage) et $E_3 = -100$ mV/240 ms (régénération) (50). La détection coulométrique a également été utilisée avec une électrode de référence à hydrogène et à un potentiel $E_2 = +250$ mV (51, 52). En revanche, aucune méthode de dosage par réduction électrochimique directe de l'acide déhydroascorbique ne semble avoir vu le jour (60).

Les méthodes de séparation chromatographique appliquées au dosage de la vitamine C font appel principalement à des colonnes de type «phase inversée (2, 5, 6, 10, 11, 13–16, 18, 20, 28, 41, 42, 49, 52, 53, 56), parfois à des échangeurs d'ions (2, 5, 6, 17, 43, 46, 47, 48, 50), à paires d'ions (45, 51, 54) ou recourent à des phases liées de type NH_2 (2, 5, 6, 8, 19, 55).

Quelques auteurs ont tenté de doser les deux acides simultanément en une seule séparation chromatographique. *Finley* et *Duang* (54) ainsi que *Mimalasiri* et *Wills* (41) utilisent les absorptions susmentionnées à 254 et 210–214 nm. Cette dernière bande d'absorption est néanmoins peu spécifique de ces acides (nombreux artefacts et interférences) et insuffisamment sensible pour la détection de faibles concentrations d'acide déhydroascorbique. D'autres auteurs proposent une oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique en «post-colonne» (avec du chlorure de mercure (II) ou du sulfate de cuivre (II)) suivie d'une «dérivatisation» à l'OPDA avec détection fluorimétrique (46). D'autres utilisent des détections en série: UV à 254 nm pour la forme ascorbique et fluorimétrique (après condensation en «post-colonne» avec l'OPDA) pour la forme déhydroascorbique (55)). *Ziegler* et al. (20) séparent les acides ascorbique et déhydroascorbique par RP-HPLC et réduisent ce dernier en «post-colonne» avec le dithiothréitol en acide ascorbique qui est détecté à 267 nm. *Lopez-Anaya* et *Mayersohn* (56) dérivent ces 2 acides en «post-colonne» avec la DMPDA et mesurent les dérivés correspondants par fluorescence. Si ces diverses méthodes présentent l'intérêt de permettre l'analyse simultanée des 2 acides en une seule étape, et non par différence de 2 dosages consécutifs

comme indiqué ci-avant, elles nécessitent en revanche un équipement analytique nettement plus élaboré. Une technique de «dérivatisation» manuelle séquentielle des acides ascorbique et déhydroascorbique a également été développée (14), mais sa complexité la rend inutilisable en pratique, voire sujette à caution quant au dosage de l'acide ascorbique en raison de sa labilité.

Autres méthodes

Pour clore cette brève revue bibliographique introductive, on peut encore rappeler les dosages enzymatiques de l'acide ascorbique avec l'ascorbate oxydase (57), couplés parfois à des systèmes de détection déjà décrits (33, 34, 36), ainsi que les tests rapides à bandelettes proposés par Merck (Merckoquant art. no 10 023). Ces derniers sont néanmoins trop peu sensibles (limite de détection env. 50 mg/l) pour envisager des dosages dans le lait et les produits laitiers.

Objectif du travail

Maints auteurs ont déjà testé l'une ou l'autre de ces méthodes de dosage pour le lait et les produits laitiers (14, 16, 21, 24, 25, 32, 34, 37-39, 42-44, 47). L'objectif du présent travail est de comparer 4 des méthodes susmentionnées (titrages visuel et bivoltamétrique automatique, dosage par RP-HPLC avec détecteurs photométrique dans l'UV et coulométrique en série) pour la détermination de l'acide ascorbique du lait, afin de pouvoir choisir la plus adéquate pour mesurer les pertes en ce composé consécutives à des traitements technologiques (échauffement et homogénéisation) et au stockage à la lumière (28). Ce travail rapporte également les résultats obtenus avec une méthode de dosage par RP-HPLC de la vitamine C «totale» du lait après oxydation de la forme ascorbique avec le DCPIP, «dérivatisation» manuelle de la forme déhydroascorbique avec l'OPDA et détection fluorimétrique (excitation à 350 nm; émission à 430 nm).

Partie expérimentale

Origine, composition globale et préparation des échantillons de lait

Les échantillons utilisés proviennent de divers laits décrits de façon détaillée dans un autre travail (28). Il s'agit de laits entiers soumis à différents traitements thermiques (pasteurisation à 75, 82 et 89 °C pendant 16 s, traitement UHT direct à 150 °C pendant 2,4 s ou traitement UHT indirect à 140 °C) et mécaniques (homogénéisation à 60/30, 120/30 et 180/30 bar) et stockés dans différentes conditions d'exposition à la lumière (28).

Méthodes d'analyse (principes)

Après les étapes usuelles de défécation, de centrifugation, de filtration et/ou d'ultrafiltration qu'exige la préparation des échantillons de lait, les 4 méthodes susmentionnées pour le dosage de l'acide ascorbique ont été comparées, à savoir:

- I. Le titrage visuel au 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP); (n=2);
- II. Le titrage automatique par bivalentométrie avec le même oxydant, effectué avec une électrode à 2 feuilles de platine lisse, polarisée (+ 1 μ A); (n=3);
- III. Le dosage par RP-HPLC avec une détection photométrique dans l'UV à 245 nm; (n=2);
- IV. Le même dosage par HPLC avec une détection électrochimique (ESA Coulochem^R 5200: $E_1 = -100$ mV; $E_2 = +50$ mV). Par commodité, ces 2 détections ont été effectuées en série.(n=2).

Ces diverses méthodes sont décrites ci-après de façon plus détaillée.

En complément à ce travail, une méthode de dosage de l'acide déhydroascorbique, plus simple et plus rapide que celles mentionnées dans la littérature, est également présentée (V).

Réactifs

Méthodes correspondantes

1. *Pour les dosages de l'acide ascorbique*

Acide ascorbique L(+) p.A., Merck art. no 127	toutes
Acide métaphosphorique pur, Fluka art. no 79615	toutes
Sel de sodium du 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP) dihydraté p.A., Merck art. no 3028 ou Fluka art. no 36180	titrages
Hydrogénocarbonate de sodium p.A., Merck art. no 6329	titrages
Sulfate de cuivre(II) pentahydraté, p.A. Merck art. no 2790	titrages
Ascorbate oxydase (Cucurbita sp.), Fluka art. no 11136	titrages
Acide orthophosphorique p.A., Merck art. no 573	dosages HPLC
Dihydrogénophosphate de potassium p.A., Merck no 4873	dosages HPLC

2. *Pour les dosages de l'acide déhydroascorbique*

Acide déhydroascorbique, préparé au laboratoire (cf. texte) par oxydation de l'acide ascorbique à l'aide de DCPIP (cf. réactifs ci-dessus)	
1,2-phénylènediamine p.A., Merck art. no 7243	
Acétate de sodium trihydraté, Merck art. no 6267	
1-Pentanesulfonate de sodium monohydraté, puriss p.A., Fluka no 76953	
Méthanol Lichrosolv., Merck art. no 6018	
Acide acétique glacial p.A., Merck art. no 63	
Triéthylamine (für bioch. Zwecke), Merck art. no 8217	
Acétonitrile Lichrosolv., Merck art. no 30	

*Appareillages**Méthodes
correspondantes**1. Pour les dosages de l'acide ascorbique*

Dosimate 665	Metrohm 2.665.0010	visuel et bivoltamétr.
Unité interchangeable 5 ml	Metrohm 6.3006.153	visuel et bivoltamétr.
Titroprocesseur 686	Metrohm 2.686.0100	bivoltamétrique
Unité de contrôle 664	Metrohm 2.664.0010	bivoltamétrique
Passeur d'échantillons 673	Metrohm 2.673.0010	bivoltamétrique
Polariseur 585	Metrohm 2.585.0010	bivoltamétrique
Unité de rinçage 683	Metrohm 2.683.0024	bivoltamétrique
Electrode double à 2 feuilles de platine	Metrohm 6.0323.100	bivoltamétrique
Béchers à insertion, verre 20	Metrohm 6.1433.220	bivoltamétrique
Béchers à échantillon 250 PP	Metrohm 6.1434.320	bivoltamétrique
Centrifugeuse	Beckman modèle TJ-6	visuel et bivoltamétr.
Verres à centrifuger 100 ml, fermeture étanche		visuel et bivoltamétr.
Pompe	Kontron type 420	dosages par HPLC
Passeur d'échantillons	Kontron type 460	dosages par HPLC
Détecteur UV (1er détecteur)	Kontron type 430	dosages par HPLC
Détecteur ECD (2ème dét.), Coulochem II/5200, ESA		dosages par HPL
Unité d'évaluation (computer)	Kontron MTII	dosages par HPLC

2. Pour les dosages de l'acide déhydroascorbique

Pompe monopiston	Beckman 114
Passeur d'échantillons	Gilson 131
Détecteur de fluorescence	Shimadzu RF551

*Méthodes d'analyse**I. Titrage visuel de l'acide ascorbique**Standard*

Dans un flacon jaugé brun de 100 ml, préparer une solution de référence en dissolvant env. 100 mg d'acide ascorbique, pesés à 0,1 mg près, dans une solution aqueuse d'acide métaphosphorique à 30 g/l. Pipeter une aliquote de 100 µl, ajouter 9,9 ml de la solution d'acide métaphosphorique à 30 g/l et titrer pour déterminer le titre de la solution de DCPIP* jusqu'au virage au rose. La coloration doit rester stable pendant 15 s. Le titre ainsi obtenu doit encore être corrigé par un titrage à

* Préparation de la solution titrante de DCPIP: Dans un jaugé de 1000 ml, dissoudre env. 300 mg de DCPIP, pesés à 0,1 mg près, et 100 mg de monohydrogencarbonate de sodium dans de l'eau et compléter au trait de jauge. Agiter vigoureusement et filtrer sur filtre plissé (Schleicher & Schüll no 595 1/2). Cette solution reste stable pendant 8 jours au réfrigérateur. Le titre de cette solution doit être déterminé quotidiennement.

blanc (= témoin) effectué sur 10,0 ml de la même solution d'acide métaphosphorique à 30 g/l.

Echantillons

Dans un tube à centrifuger de verre brun de 100 ml, pipeter successivement 25,0 ml de lait et 75,0 ml d'acide métaphosphorique à 30 g/l. Fermer le tube de façon étanche. Secouer pendant 30 s et centrifuger pendant 20 min à 3000 tpm. Filtrer sur filtre rond (Schleicher & Schüll no 597 1/2). Pipeter 10,0 ml de filtrat et titrer dès que possible (solution à conserver au maximum une heure à l'obscurité et au froid). Chaque échantillon doit encore être corrigé pour tenir compte de sa propre valeur à blanc (une valeur à blanc moyenne n'est pas assez correcte pour corriger l'ensemble des échantillons). Deux méthodes ont été testées pour déterminer les témoins (valeurs à blanc) des échantillons avec addition soit de sulfate de cuivre, soit d'ascorbate oxydase, en procédant comme suit:

Témoins

A 30 ml de lait, ajouter 100 µl d'une solution saturée en sulfate de cuivre et 400 µl d'eau, respectivement 500 µl d'une solution d'ascorbate oxydase à 5 mg/25 ml. Laisser reposer plusieurs heures (minimum 2 h) à la lumière et à température ambiante. Pipeter 25,0 ml de la solution ainsi obtenue, ajouter 75,0 ml d'acide métaphosphorique à 30 g/l et poursuivre le dosage comme indiqué précédemment pour l'échantillon (centrifuger, filtrer et titrer).

II. Titrage bivoltamétrique de l'acide ascorbique

Standard, échantillons et témoins

La préparation du standard, celle des échantillons ainsi que celle des témoins sont les mêmes que celles décrites ci-dessus pour le titrage visuel. Le titrage automatique par bivoltamétrie est alors effectué sur 25,0 ml de filtrat (échantillons ou témoins correspondants) ou de solution standard, au lieu de 10,0 ml comme précédemment, et en réglant le Titroprocesseur 686 selon les indications du tableau 1. (N.B.: Un aplatissement de la courbe de titrage dû à l'accumulation de produits d'oxydation à la surface des doubles feuilles de Pt nécessite une régénération de celles-ci par électrolyse: polariser négativement à l'aide d'une batterie de 4,5 V.)

III. et IV. Dosage de l'acide ascorbique par HPLC avec détections photométrique dans l'UV et électrochimique montées en série

Standard

Dans un flacon jaugé brun de 50 ml, préparer une solution de référence en dissolvant env. 12 mg d'acide ascorbique, pesés à 0,01 mg près, dans de l'acide métaphosphorique à 20 g/l. Dans un jaugé brun de 100 ml, diluer 1,000 ml de cette solution avec la phase mobile utilisée pour la séparation chromatographique par HPLC et injecter 20 µl de la solution standard.

Tableau 1. Réglage des paramètres instrumentaux pour le titrage bivoltamétrique (Tiprocesseur 686 et Polariseur 585 de Metrohm):

- pour la solution témoin : méthode 1
- pour la solution standard : méthode 2
- pour la solution échantillon : méthode 3

686	MET U	: No de la méthode	1	2	3
686	prep. step	: pause (s) electr. input	15 1	15 1	15 1
686	parameters	: vol. step (ml) Δt (wait) (s) stop V (ml) temp. ($^{\circ}\text{C}$) EP crit. U (mV)	0,03 15 0,85 20,0 50	0,05 15 2,50 20,0 10	0,10 15 2,00 20,0 30
585	polarité	(+/-)	+	+	+
	I_{pol}	(μA)	1	1	1
585	U_{pol}	(mV)	non utilisé		

Explication des paramètres instrumentaux

- MET U : Monotonic Equivalence-point Titration
(Titration à dosage incrémentiel avec exploitation automatique du point d'équivalence)
- pause : Temps d'attente avant le début du titrage
- electr. input : Choix de l'entrée de mesure
- vol. step : Vitesse de dosage des incréments
- Δt (wait) : Temps d'attente fixé pour l'acquisition d'une valeur mesurée
- stop V : Volume d'arrêt (arrêt du titrage une fois qu'un certain volume est atteint)
- temp. : Température de titrage
- EP crit. U : Détermine la sensibilité de la reconnaissance des points d'équivalence

Echantillons

Dans un autre jaugé brun de 100 ml, pipeter successivement 50,00 ml de lait et 25 ml d'acide métaphosphorique à 100 g/l. Secouer pendant env. 30 s et compléter au trait de jauge avec de l'eau (dégazation). Filtrer sur filtre rond (Schleicher & Schüll no 597 1/2). Dans un jaugé brun de 10 ml, diluer 4 ml de filtrat avec la phase mobile utilisée pour la séparation chromatographique par HPLC. Filtrer sur acrodisc de 0,45 μm (Scan AG à Bale, art. no 4453), à jeter après usage. La solution est prête à être injectée.

Conditions chromatographiques

Volume injecté	20 µl
Colonne	Nucleosil C18, 5 µm, 250 x 4 mm, pores de 120 Å, de Macherey & Nagel à Oensingen, art. no 720 041
Phase mobile	solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium à 10 mmol/l (pH ajusté à 2,50 avec de l'acide orthophosphorique concentré). Dégazer et filtrer. Séparation en mode isocratique
Débit	1,0 ml/min
Détection	1 ^o) photométrique à 245 nm 2 ^o) électrochimique (ESA CoulochemII/5200, réglé (après optimisation des paramètres) comme suit: E ₁ = -100 mV; resp. time: 0,2 s; range: 100 µA; output: 1 V E ₂ = + 50 mV; resp. time: 0,2 s; range: 0,5 µA; output: 1 V

*V. Dosage par RP-HPLC de l'acide déhydroascorbique:**Standard d'acide ascorbique*

Dans un jaugé de 100 ml, dissoudre env. 100 mg, pesés à 0,1 mg près, dans 20 ml d'une solution aqueuse d'acide métaphosphorique à 100 g/l et compléter au trait de jauge avec de l'eau. Dans un second jaugé de 100 ml, diluer 10 ml de cette solution avec de l'eau. Ce standard sera oxydé en standard d'acide déhydroascorbique lors de l'étape suivante.

Echantillons et standard

Dans un second jaugé brun de 100 ml, pipeter successivement 70 g de lait, pesés à 0,1 mg près, et 20 ml d'acide métaphosphorique à 100 g/l. Secouer pendant 30 s et compléter au trait de jauge avec de l'eau (défécation). Filtrer sur filtre rond (Schleicher & Schüll no 597 1/2). Dans un jaugé brun de 10 ml, introduire 2 ml de filtrat ou de standard (ascorbique), ajouter un volume légèrement excédentaire d'une solution aqueuse de DCPIP à 500 mg/l* (volume variable en fonction de la concentration en acide ascorbique à oxyder) jusqu'à obtention d'une légère coloration rose persistante, 5 ml d'une solution aqueuse (fraîchement préparée) de OPDA à 1 g/l et 1 ml d'une solution aqueuse d'acétate de sodium à 500 g/l. Agiter. Chauffer à 40 °C pendant 10 min. Refroidir à température ambiante et compléter au trait de jauge avec de l'eau. Filtrer sur acrodisc de 0,45 µm (Scan AG à Bâle, art. no 4453), à jeter après usage. La solution est prête à être injectée.

* *Préparation du DCPIP à 500 mg/l:* Dans un jaugé de 200 ml, dissoudre à chaud 100 mg de DCPIP dans 20 ml d'eau, refroidir à température ambiante, compléter au trait de jauge et filtrer sur filtre plissé (Schleicher & Schüll no 595 1/2): Cette solution est stable pendant 8 jours au réfrigérateur.

Conditions chromatographiques

Volume injecté:	50 μ l
Colonne:	Sphérisorb ODS, 5 μ m, 250 x 4,6 mm, art. no 25461825 de Biscoff/Metrohm
Phase mobile:	dans un jaugé de 1000 ml, introduire successivement 6,06 g de pentanesulfonate de sodium, 650 ml d'eau, 158 ml de méthanol, 6,3 ml d'acide acétique glacial et 2,5 ml de triéthylamine, mélanger et compléter au trait de jauge avec de l'eau. Dans une bouteille de 1,5 l, ajouter et mélanger aux 1000 ml ainsi obtenus 200 ml d'acétonitrile, dégazer et filtrer sur Millipore «filtration kit xx 15 04700» avec des membranes FHUP 04700 de 0,5 μ m. La séparation est effectuée en mode isocratique.
Débit:	1,0 ml/min
Détection:	fluorimétrique à 350 nm (excitation) et à 430 nm (émission)

Résultats et discussion*I. et II. Titrages de l'acide ascorbique*

La figure 1 présente les courbes de titrage bivoltamétrique de l'acide ascorbique d'échantillons (*E*) de laits cru et UHT, d'un standard (*S*), d'un témoin (valeur à blanc) d'échantillon (*T_E*) et d'un témoin de standard (*T_S*).

La figure 2 montre un agrandissement de la courbe de titrage en «*S*» de la figure 1. On y constate que le *point de fin de titrage calculé* ($EP_{\text{calculé}}$) – défini dans l'algorithme de calcul du Titroprocesseur 686 comme le point d'inflexion de la courbe – ne correspond pas au *point de fin de titrage théorique* ($EP_{\text{théorique}}$) ou point d'équivalence situé à l'intersection des branches asymptotiques de ladite courbe de titrage. L'algorithme de calcul qu'utilise le Titroprocesseur 686 n'est pas conçu pour des graphes en «U» (que l'on retrouve d'ailleurs avec les titrages photométriques, conductimétriques et biampérométriques (59)), mais pour des sigmoïdes. L'erreur commise par excès est néanmoins compensée par le calibrage qui est effectué selon le même algorithme. Ces deux erreurs se compensent dans la mesure où les concentrations en acide ascorbique des échantillons et du standard sont comparables et où les milieux dans lesquels sont effectués ces titrages (matrice, solvant etc.) sont aussi identiques que possible.

Le tableau 2 (A et B) met en évidence l'importance des témoins pour les titrages tant visuel que bivoltamétrique. L'erreur commise en négligeant la «valeur à blanc» est de l'ordre de 30%, voire plus encore pour des échantillons à faible teneur en acide ascorbique (par ex. 50 à 100% pour l'échantillon no 13). La détermination des témoins après un ajout d'ascorbate oxydase serait en principe préférable. La spécificité de ce réactif à l'égard de l'acide ascorbique est supérieure, mais son emploi est particulièrement coûteux, de courte durée d'emploi une fois en solution et conduit

	témoin de standard [TS]	standard [S]	témoin d'échantillon [TE]	échantillon de lait cru [E]	échantillon de lait UHT [E]
Parameter report	MET U 1 # 10 pause 15 s electr. input 1 vol.step .03 ml dt(wait) 15 s stop V 1.50 ml temp. 20.0 °C EP crit.U 50 mV	MET U 2 # 12 pause 15 s electr. input 1 vol.step .05 ml dt(wait) 15 s stop V 1.50 ml start V .10 ml temp. 20.0 °C EP crit.U 10 mV	MET U 1 # 13 pause 15 s electr. input 1 vol.step .03 ml dt(wait) 15 s stop V 1.85 ml temp. 20.0 °C EP crit.U 50 mV	MET U 3 # 0 pause 15 s electr. input 1 vol.step .10 ml dt(wait) 15 s stop V 2.00 ml start V .10 ml temp. 20.0 °C EP crit.U 30 mV	MET U 3 # 17 pause 15 s electr. input 1 vol.step .10 ml dt(wait) 15 s stop V 2.00 ml start V .10 ml temp. 20.0 °C EP crit.U 30 mV
Formules et constantes	MET U 1 # 10 F1=EP1:3:ml	MET U 2 # 12 F1=C01/(EP1-C30):3:ml F2=C01/(EP2-C30):3:ml C01=.100 C30=.101	MET U 1 # 13 F1=EP1:3:ml	MET U 3 # 0 F1=(EP1-C30):3:ml F2=(EP2-C31+C30):3:ml F3=(EP2-C30):3:ml F4=(EP2-C31+C30):3:ml C02=.150 C30=.276 C31=.153	MET U 3 # 17 F1=(EP1-C30):3:ml F2=(EP2-C31+C30):3:ml F3=(EP2-C30):3:ml F4=(EP2-C31+C30):3:ml C02=.150 C30=.276 C31=.153
Rapport détaillé des résultats	date 91-11-22 time 10:49 MET U 1 # 11 Id.#1 3 Id.#2 14 U(limit) -822 mV EP1 .101 U/mV EP2 .253 -708 EP3 .730 -555 RS1 .101 ml -358	date 91-11-22 time 11:03 MET U 2 # 13 Id.#1 3 Id.#2 14 U(limit) -687 mV EP1 .753 U/mV RS1 .153 -324	date 91-11-22 time 11:19 MET U 1 # 14 Id.#1 3 Id.#2 14 U(limit) -709 mV EP1 .276 U/mV RS1 .276 ml -501	date 91-11-27 time 03:31 MET U 3 # 0 Id.#1 3 Id.#2 14 U(limit) -741 mV EP1 .541 U/mV RS1 .655 ml -233 RS2 16.331 mV	date 91-11-22 time 12:14 MET U 3 # 18 Id.#1 3 Id.#2 14 U(limit) -850 mV EP1 .412 U/mV RS1 .136 ml -540 RS2 5.322 mV
Courbes de titration	date 91-11-22 time 10:49 MET U 1 # 11 .50ml/div dU=100mV/div start V .000 ml	date 91-11-22 time 11:03 MET U 2 # 13 .50ml/div dU=100mV/div start V .100 ml	date 91-11-22 time 11:19 MET U 1 # 14 .50ml/div dU=100mV/div start V .000 ml	date 91-11-27 time 03:31 MET U 3 # 0 .50ml/div dU=100mV/div start V .100 ml	date 91-11-22 time 12:14 MET U 3 # 18 .50ml/div dU=100mV/div start V .100 ml

Fig. 1. Titration bivalent of ascorbic acid of a sample (E) of milk, of a standard (S), of a blank (TE) and of a standard (TS)

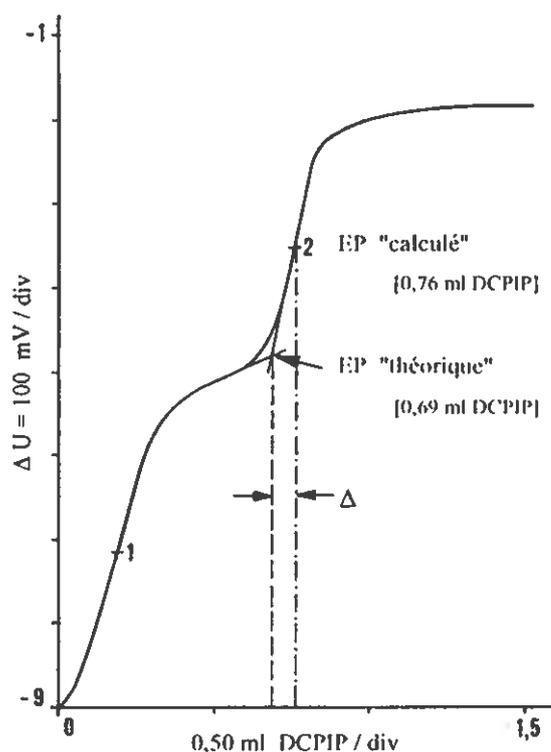


Fig. 2. Courbe de titrage bivoltamétrique situant les points de fin de titrage théorique (T) et calculé (C) par l'algorithme du Titroprocesseur 686 de Metrohm
Légende: Δ = erreur de titrage par excès (ici: $0,76 - 0,69 = 0,07$ ml) due à l'algorithme de calcul du titroprocesseur utilisé, mais compensée par l'emploi d'un standard

sensiblement aux mêmes résultats que le sulfate de cuivre, aux erreurs près du titrage. En pratique, on retiendra donc le sulfate de cuivre.

III. et IV. Dosages par chromatographie de l'acide ascorbique

La figure 3 montre le chromatogramme d'un dosage de l'acide ascorbique par RP-HPLC avec une colonne de type Nucleosil C18 avec des détecteurs UV à 245 nm et coulométrique montées en série. Des essais préliminaires effectués avec des colonnes à phase inversée de type C-18 sphérisorb et hypersil ont révélé des interférences qui rendent ces colonnes inadéquates pour une détection dans l'UV à 245 nm. Ces artefacts ne se produisent pas avec une détection de type coulométrique.

V. Dosage par chromatographie de l'acide déhydroascorbique

La figure 4 indique le chromatogramme d'un dosage de l'acide déhydroascorbique par RP-HPLC avec détection fluorimétrique du dérivé quinoxaline obtenu par «dérivatisation» manuelle avant injection.

Tableau 2 (A et B). Importance des témoins (obtenus par oxydation avec du sulfate de cuivre et avec de l'ascorbate oxydase) sur le résultat des titrages visuel (2A) et bivoltamétrique (2B). Comparaison avec les méthodes de dosage par HPLC (détecteurs UV et ECD)

2A) Titrage visuel

No échantillon	Echantillon non corrigé (mg/l)	Echantillon corrigé avec CuSO ₄ (mg/l)	Echantillon corrigé avec Λ -oxyd. (mg/l)	Différence* (CuSO ₄) (%)	Différence* (Λ -Oxydase) (%)	Echantillon par HPLC/ECD (mg/l)	Echantillon par HPLC/UV (mg/l)
1	17,7	12,5	13,8	41,6	28,3	10,3	10,6
2	19,4	15,0	15,8	29,3	22,8	13,8	14,4
3	18,4	14,0	15,0	31,4	22,7	12,0	12,4
4	13,3	9,0	10,2	47,8	30,4	6,9	6,8
5	10,2	6,3	6,7	61,9	52,2	2,7	3,2
6	20,1	16,2	15,9	24,1	26,4	14,3	14,8
7	18,7	14,7	14,7	27,2	27,2	12,2	12,7
8	14,5	10,6	10,4	36,8	39,4	8,0	8,0
9	10,9	7,2	6,1	51,4	78,7	3,8	4,0
10	19,3	15,1	15,2	27,8	27,0	14,3	14,8
11	18,3	14,6	14,6	25,3	25,3	12,7	13,2
12	13,6	9,6	9,4	41,7	44,7	8,2	8,2
13	9,9	5,7	6,0	73,7	65,0	3,9	4,3
Moyenne	15,7	11,6	11,8	40,0	37,7	9,5	9,8

2B) Titrage bivoltamétrique

No échantillon	Echantillon non corrigé (mg/l)	Echantillon corrigé avec CuSO ₄ (mg/l)	Echantillon corrigé avec Λ -oxyd. (mg/l)	Différence* (CuSO ₄) (%)	Différence* (Λ -Oxydase) (%)	Echantillon par HPLC/ECD (mg/l)	Echantillon par HPLC/UV (mg/l)
1	18,2	12,5	14,6	45,6	24,7	10,3	10,6
2	19,6	13,9	16,3	41,0	20,2	13,8	14,4
3	n.d.	n.d.	n.d.			12,0	12,4
4	13,3	7,5	9,7	77,3	37,1	6,9	6,8
5	9,0	2,8	5,7	221,4	57,9	2,7	3,2
6	20,8	14,8	17,3	40,5	20,2	14,3	14,8
7	18,3	12,0	14,8	52,5	23,6	12,2	12,7
8	13,6	7,6	9,9	78,9	37,4	8,0	8,0
9	10,4	4,7	7,0	121,3	48,6	3,8	4,0
10	20,3	15,3	16,7	32,7	21,6	14,3	14,8
11	18,2	13,5	14,3	34,8	27,3	12,7	13,2
12	13,1	8,4	9,2	56,0	42,4	8,2	8,2
13	9,1	4,5	5,2	102,2	75,0	3,9	4,3
Moyenne	15,3	9,8	11,7	75,4	36,3	9,5	9,8

* Différence (en %) = [(Ech. non corr. - Ech. corr.) * 100] / Ech. corr. n.d. = non déterminé

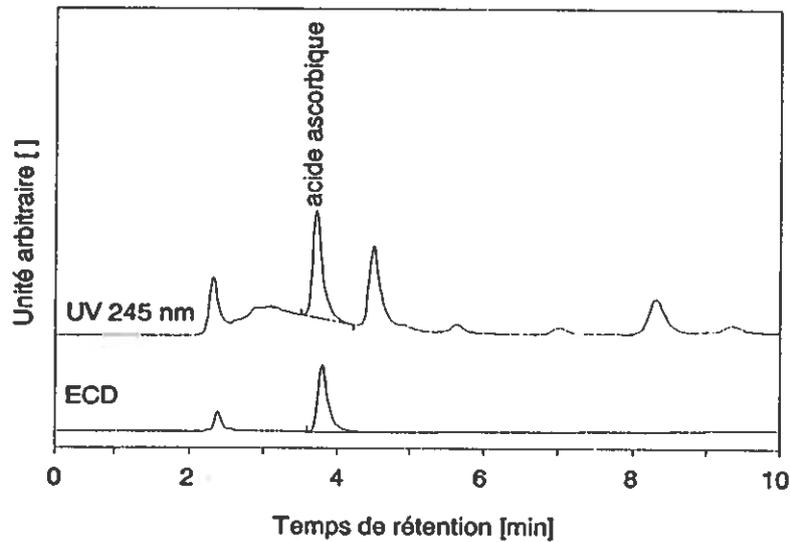


Fig. 3. Dosage de l'acide ascorbique d'un échantillon de lait par RP-HPLC avec détections UV à 245 nm et coulométrique ECD montées en série
Légende: Chromatogramme sans artefact dans l'UV (245 nm) si la séparation est effectuée avec une colonne nucléosil C-18

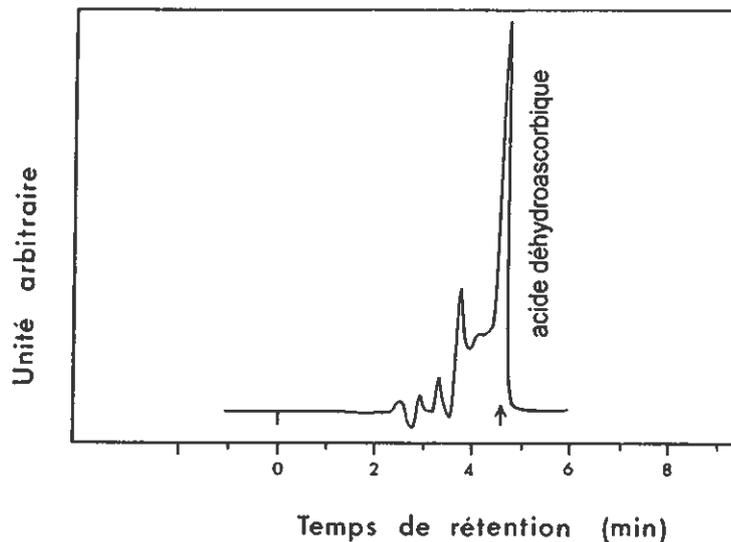


Fig. 4. Dosage de l'acide déhydroascorbique d'un échantillon de lait par RP-HPLC avec détection fluorimétrique du dérivé quinoxaline obtenu par «dérivatisation» manuelle avant injection

Comparaison des 4 méthodes de dosage de l'acide ascorbique dans le lait

Les tableaux 3 et 4 comparent les concentrations en acide ascorbique déterminées dans divers laits par les 4 méthodes d'analyse utilisées parallèlement, soit d'une part les titrages visuel (OPT) et bivoltagmétrique (BVT) – après correction par des témoins au sulfate de cuivre – et d'autre part les dosages par RP-HPLC avec détections photométrique à 245 nm (UV) et coulométrique (ECD) montées en série.

Tableau 3. Comparaison de 4 méthodes d'analyse* utilisées parallèlement pour doser la teneur en acide ascorbique de divers laits**

Code		Cru 0h/0d	Past. 75 °C 0h/0d	Past. 82 °C 0h/0d	Past. 89 °C 0h/0d	UHT dir. 0h/0d	UHT indir. 0h/0d
OPT	[mg/l]	15,6	17,2	15,8	16,3	16,3	14,7
BVT	[mg/l]	15,4	16,5	16,1	16,6	16,4	14,8
UV	[mg/l]	14,8	16,1	16,1	14,8	15,3	13,6
ECD	[mg/l]	15,6	17,1	15,8	15,3	14,6	11,6
\bar{x}		15,4	16,7	16,0	15,8	15,7	13,7
$s\bar{x}$		0,38	0,52	0,17	0,84	0,86	1,49
CV	[%]	2,5	3,1	1,1	5,3	5,5	10,9

Code		Cru 0h/1d	Past. 75 °C 0h/1d	Past. 82 °C 0h/1d	Past. 89 °C 0h/1d	UHT dir. 0h/1d	UHT indir. 0h/1d
OPT	[mg/l]	–	15,1	15,1	15,6	16,1	13,5
BVT	[mg/l]	–	15,0	14,8	15,2	13,3	11,1
UV	[mg/l]	–	14,1	14,7	14,5	14,7	12,2
ECD	[mg/l]	–	14,6	15,1	13,8	13,4	10,7
\bar{x}			14,7	14,9	14,8	14,4	11,9
$s\bar{x}$			0,45	0,21	0,79	1,31	1,26
CV	[%]		3,1	1,4	5,4	9,1	10,6

Code		Cru 2h/1d	Past. 75 °C 2h/1d	Past. 82 °C 2h/1d	Past. 89 °C 2h/1d	UHT dir. 2h/1d	UHT indir. 2h/1d
OPT	[mg/l]	–	13,8	14,5	14,5	15,5	13,3
BVT	[mg/l]	–	14,1	14,5	12,8	12,4	10,8
UV	[mg/l]	–	14,2	14,5	14,4	14,2	13,6
ECD	[mg/l]	–	13,8	12,5	12,3	11,5	9,8
\bar{x}			14,0	14,0	13,5	13,4	11,9
$s\bar{x}$			0,21	1,00	1,12	1,79	1,87
CV	[%]		1,5	7,1	8,3	13,4	15,7

Code		Cru 12h/1d	Past. 75 °C 12h/1d	Past. 82 °C 12h/1d	Past. 89 °C 12h/1d	UHT dir. 12h/1d	UHT indir. 12h/1d
OPT	[mg/l]	–	12,1	12,4	12,8	13,1	11,7
BVT	[mg/l]	–	11,9	12,0	10,6	10,3	9,0
UV	[mg/l]	–	12,6	12,4	12,0	12,4	9,9
ECD	[mg/l]	–	11,0	10,9	10,5	10,4	8,0
\bar{x}			11,9	11,9	11,5	11,6	9,7
$s\bar{x}$			0,67	0,71	1,12	1,42	1,57
CV	[%]		5,6	5,9	9,7	12,3	16,3

(à suivre)

Tableau 3. Suite

Code		Cru 20h/1d	Past. 75 °C 20h/1d	Past. 82 °C 20h/1d	Past. 89 °C 20h/1d	UHT dir. 20h/1d	UHT indir. 20h/1d
OPT	[mg/l]	-	10,7	11,0	11,2	11,9	10,2
BVT	[mg/l]	-	10,0	10,0	8,8	9,6	7,1
UV	[mg/l]	-	9,5	10,0	9,6	10,4	8,6
ECD	[mg/l]	-	9,1	8,7	8,2	8,7	7,5
\bar{x}			9,8	9,9	9,5	10,2	8,4
$s\bar{x}$			0,69	0,94	1,30	1,36	1,39
CV	[%]		7,0	9,5	13,8	13,4	16,6

Légende * Titrages visuel (OPT) et bivalentométrique (BVT) ainsi que dosages par RP-HPLC avec détecteurs photométrique à 245 nm (UV) et coulométrique (ECD) montés en série
 ** Le code indique successivement le traitement thermique appliqué (pasteurisation à 75, 82 ou 89 °C, UHT direct ou indirect), la durée de l'exposition à la lumière (0, 2, 12 et 20 h) ainsi que l'âge du lait (0 ou 1 jour).
 Tous les laits ont subi la même homogénéisation: 120 bar / 1 étage)

On constate l'équivalence des 4 méthodes de dosage testées, à la précision près de chaque méthode, de l'ordre de 5 à 15% selon la concentration de l'acide ascorbique contenu dans les échantillons analysés. On peut donc conclure à leur exactitude (absence d'interférence et d'artefact).

Le tableau 5 présente les rapports «signal/bruit de fond» (S/N) et les limites de détection déterminés pour l'acide ascorbique avec les 2 types de détecteurs testés. Il montre que le détecteur coulométrique utilisé est environ 30 à 50 fois plus sensible que le détecteur photométrique à 245 nm, ce qui en fait un instrument de choix pour le dosage de faibles concentrations.

Le tableau 6 indique les concentrations en vitamine C «totale» (acides ascorbique et déhydroascorbique, après oxydation de ce dernier en acide ascorbique à l'aide du DCPIP) des mêmes échantillons analysés par HPLC avec détection fluorimétrique du dérivé quinoxaline obtenu par «dérivatisation» manuelle avant l'injection.

La présentation, l'interprétation et la discussion de tous ces résultats du point de vue de la technologie laitière a fait l'objet d'une publication séparée (28).

Conclusion

La principale conclusion du présent travail est que, pour des dosages de l'acide ascorbique dans des laits pasteurisés ou traités par UHT – même indirect –, toutes les méthodes comparées dans ce travail sont pratiquement équivalentes. Leur précision est de l'ordre de 5 à 15% relatifs selon la teneur du lait en ce composé.

Tableau 4. Comparaison de 4 méthodes d'analyse* utilisées parallèlement pour doser la teneur en acide ascorbique de divers laits**

Code		Past. 82 °C			Code		Past. 82 °C		
		60/30 bar 0h/0d	120/30 bar 0h/0d	180/30 bar 0h/0d			60/30 bar 2h/1d	120/30 bar 2h/1d	180/30 bar 2h/1d
OPT	[mg/l]	15,0	16,2	15,1	OPT	[mg/l]	14,0	14,7	14,6
BVT	[mg/l]	13,9	14,8	15,3	BVT	[mg/l]	n.d.	12,0	13,5
UV	[mg/l]	14,4	14,8	14,8	UV	[mg/l]	12,4	12,7	13,2
ECD	[mg/l]	13,8	14,3	14,3	ECD	[mg/l]	12,0	12,2	12,7
\bar{x}		14,3	15,0	14,9	\bar{x}		12,8	12,9	13,5
$s\bar{x}$		0,55	0,82	0,43	$s\bar{x}$		1,06	1,24	0,80
CV	[%]	3,9	5,4	2,9	CV	[%]	8,3	9,6	6,0

Code		Past. 82 °C			Code		Past. 82 °C		
		60/30 bar 12h/1d	120/30 bar 12h/1d	180/30 bar 12h/1d			60/30 bar 20h/1d	120/30 bar 20h/1d	180/30 bar 20h/1d
OPT	[mg/l]	9,0	10,6	9,6	OPT	[mg/l]	6,3	7,2	5,7
BVT	[mg/l]	7,5	7,6	8,4	BVT	[mg/l]	2,8	4,7	4,5
UV	[mg/l]	7,1	8,0	8,2	UV	[mg/l]	3,2	4,0	4,3
ECD	[mg/l]	6,9	8,0	8,2	ECD	[mg/l]	2,7	3,8	3,9
\bar{x}		7,6	8,6	8,6	\bar{x}		3,8	4,9	4,6
$s\bar{x}$		0,95	1,38	0,67	$s\bar{x}$		1,71	1,56	0,77
CV	[%]	12,5	16,1	7,8	CV	[%]	45,7	31,8	16,8

Légende

* cf. légende correspondante du tableau 3

** Le code indique successivement l'homogénéisation appliquée (60/30 bar, 120/30 bar et 180/30 bar), la durée de l'exposition à la lumière (0, 2, 12 et 20 h) ainsi que l'âge du lait (0 ou 1 jour). Tous les laits ont subi le même traitement thermique: une pasteurisation à 82 °C

Tableau 5. Comparaison des sensibilités des détecteurs photométrique et coulométrique utilisés en série

Détecteur	Analyse	Signal (mV)	«Noise» (mV)	S/N	Limite de détection (pg)
UV 245 nm	Standard	0,3	0,1	3	2500
ECD (Coulochem)	Standard	33	0,33	100	80
UV 245 nm	Ech. lait	0,4	0,1	4	1900
ECD (Coulochem)	Ech. lait	40	0,2	200	40

Tableau 6. Teneur en vitamine C «totale» (mg/l) des mêmes laits** dosée sous la forme d'acide déhydroascorbique* par RP-HPLC avec détection fluorimétrique de la quinoxaline obtenue par «dérivatisation» manuelle

Age du lait [d]	Cru 0h/0d	Past. 75 °C 0h	Past. 82 °C 0h	Past. 89 °C 0h	UHT dir. 0h	UHT indir. 0h
1		18,6	19,0	19,4	19,2	16,3
2		17,9	17,9	20,0	18,7	n.d.
Moyenne		18,3	18,5	19,7	19,0	16,3

Age du lait [d]		Past. 75 °C 2h	Past. 82 °C 2h	Past. 89 °C 2h	UHT dir. 2h	UHT indir. 2h
1		18,6	17,6	19,2	18,2	15,9
2		18,5	18,7	18,5	17,1	15,6
Moyenne		18,6	18,2	18,9	17,7	15,8

Age du lait [d]		Past. 75 °C 12h	Past. 82 °C 12h	Past. 89 °C 12h	UHT dir. 12h	UHT indir. 12h
1		17,4	17,0	15,9	17,4	13,1
2		16,9	16,9	16,3	16,5	13,0
Moyenne		17,2	17,0	16,1	17,0	13,1

Age du lait [d]		Past. 75 °C 20h	Past. 82 °C 20h	Past. 89 °C 20h	UHT dir. 20h	UHT indir. 20h
1		15,2	14,6	14,3	15,6	11,0
2		12,8	14,7	14,7	15,0	10,8
Moyenne		14,0	14,7	14,5	15,3	10,9

Légende: * après oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique à l'aide de 2,6-dichlorophénolindophénol
** cf. légende correspondante du tableau 3

On peut donc choisir la méthode en fonction de ses avantages, de ses inconvénients et de contingences pratiques (équipement déjà disponible au laboratoire), soit:

1. La simplicité et la rapidité de l'exécution du titrage visuel ainsi que le coût modique de l'équipement nécessaire, avantage contrebalancé par la difficulté de la reconnaissance «de visu» du point de virage, surtout lors de grandes séries d'analyse (fatigue et subjectivité de l'oeil, influence des conditions d'éclairage etc.).
2. Le coût raisonnable de l'équipement de titrage automatique (par ex. Titroprocesseur 686 de Metrohm) par bivoltamétrie, avec la possibilité de recourir à un passeur d'échantillons automatique pour de grandes séries. Cet analyseur polyvalent peut en outre être utilisé pour effectuer maints autres titrages. Le principal inconvénient des titrages (tant visuel que bivoltamétrique) réside dans le travail relativement fastidieux qu'impliquent la préparation et le titrage proprement dit d'autant de témoins que

d'échantillons. La préparation desdits témoins par oxydation de l'acide ascorbique avec le sulfate de cuivre est moins spécifique que celle avec l'ascorbate oxydase, mais moins onéreuse aussi. Les résultats obtenus étant pratiquement les mêmes, on peut choisir le réactif le moins coûteux.

3. Les dosages par RP-HPLC sont relativement simples et ne requièrent pas de témoins. Ils sont particulièrement adéquats pour des analyses en grande routine, mais nécessitent un équipement plus sophistiqué que les titrages, mais à nouveau très polyvalent, donc utilisable pour d'innombrables autres analyses.
4. Quant à la détection, le détecteur par photométrie d'absorption dans l'UV à 245 nm donne entière satisfaction. Le détecteur ECD testé (coulométrique) est environ 30 à 50 fois plus sensible et sa ligne de base est très stable. Il est en revanche plus onéreux. Il se justifie donc surtout pour des dosages de traces ainsi que pour des laboratoires qui analysent également d'autres substances «rédox». Le dosage simultané des acides ascorbique et déhydroascorbique (donc des 2 formes biologiquement active de la vitamine C) *en une seule étape* ferait de ce détecteur un auxiliaire idéal, comme le montrent les nombreuses tentatives de détermination simultanée – plus ou moins satisfaisantes – citées dans la revue bibliographique du présent travail. Jusqu'à ce jour, aucun travail ne semble cependant avoir démontré l'utilité d'un tel détecteur pour doser l'acide déhydroascorbique sans réduction préalable en acide ascorbique (60).

L'équivalence des méthodes de dosage de l'acide ascorbique dans le lait semble néanmoins limitée aux laits crus, pasteurisés ou traités par UHT direct ou indirect, homogénéisés, photodégradés ou non. Un travail comparable (21) à celui-ci a en effet montré que les méthodes opérant par titrage avec le 2,6-dichlorophénolindophénol ne sont plus valables pour des laits qui ont subi des traitements thermiques plus dégradants tels que des stérilisations. Ce dernier travail recommande alors le recours à une analyse photométrique avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (après oxydation en acide déhydroascorbique), surtout en présence de réductones et d'acide dicétogulonique (40). Il ne donne aucune indication quant aux possibilités et aux limites des déterminations par HPLC.

Remerciements

Les auteurs tiennent à exprimer leur gratitude au Dr *M. van Schothorst*, chef du Département de qualité et sécurité alimentaire du CRN de Nestlé pour l'intérêt porté à ce travail, à Monsieur *O. Stabel*, directeur de la maison Stagroma à Wallisellen, pour l'aimable prêt du détecteur électrochimique Coulochem^R 5200 de ESA (USA) testé dans le cadre du présent travail, ainsi qu'à Messieurs Dr *R. Sieber* et *G. J. Steiger* de la FAM pour leur lecture critique du manuscrit.

Résumé

Après un bref survol de la littérature traitant des principales méthodes de dosage des acides ascorbique et déhydroascorbique, le présent travail compare 4 méthodes d'analyse de l'acide ascorbique: un titrage visuel et un titrage bivoltamétrique automatique (Titroprocesseur 686

et Polariseur 585 de Metrohm) au 2,6-dichlorophénolindophénol ainsi qu'un dosage par RP-HPLC avec détections photométrique à 245 nm et électrochimique (Coulochem^R-II/5200, ESA) montées en série. Quels que soient les traitements thermiques (pasteurisation à 75, 82 ou 89 °C, UHT direct ou indirect) et mécaniques (homogénéisation à 3 pressions différentes) et les durées de l'exposition à la lumière appliqués au lait, ces 4 méthodes de dosage sont équivalentes, exemptes d'interférence et d'artefact (colonne: Nucléosil C-18 pour la RP-HPLC/UV). Leur précision est de l'ordre de 5 à 15% selon la concentration de l'acide ascorbique présent dans l'échantillon. Le travail passe en revue les principaux avantages et inconvénients de chacune de ces méthodes d'analyse. Il mentionne également les résultats obtenus lors du dosage par RP-HPLC de l'acide déhydroascorbique de ces mêmes laits avec une détection par fluorescence du dérivé quinoxalique formé avec la 1,2-phénylènediamine.

Zusammenfassung

Nach einer kurzen Literaturübersicht über die Bestimmung der Ascorbin- und Dehydroascorbinsäure werden in der vorliegenden Arbeit 4 Analysenmethoden für die Bestimmung von Ascorbinsäure verglichen: eine visuelle und eine automatische bivoltametrische Titration (Titroprocessor 686 und Polarizer 585 von Metrohm) mit 2,6-Dichlorphenolindophenol als auch eine «reversed Phase»-HPLC-Bestimmung mit UV-Detektion bei 245 nm und elektrochemischer Detektion (Coulochem^RII/5200 von ESA) in Serie. Alle 4 Methoden zeigten übereinstimmende Werte bei Milchen, die unterschiedlich erhitzt (Pasteurisierung 75, 82 und 89 °C, UHT direkt oder indirekt), mechanisch behandelt (3 verschiedene Homogenisierungen) und unterschiedlich langen Belichtungszeiten ausgesetzt wurden. Bei keinen der geprüften Methoden (Anwendung einer Nucleosil C-18-Trennsäule für die UV-Detektion) konnten Artefakte oder Interferenzen festgestellt werden. Die Präzision der Methoden liegt bei 5–15%, je nach Konzentration der Ascorbinsäure in der Probe. Diese Arbeit zeigt die wichtigsten Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden. Auch sind die Resultate der Dehydroascorbinsäurebestimmung nach einer Derivatisierung mit 1,2-Phenylendiamin und «RP»-HPLC-Trennung mit anschließender Fluoreszenzdetektion der Quinoxalinderivate angegeben.

Summary

Papers on the determination of ascorbic and dehydroascorbic acid are briefly reviewed and four methods of analysis of ascorbic acid are compared, i.e. visual titration, automatic bivoltametric titration (Titroprocessor 686 and Polarizer 585 from Metrohm) with 2,6-dichlorophenolindophenol, RP-HPLC with serial UV detection at 245 nm and electrochemical detection (Coulochem^RII/5200, ESA). Each of these methods gave essentially the same results on milk samples previously submitted to various heat treatments (pasteurization at 75, 82 and 89 °C, UHT direct and UHT indirect), mechanical treatments (homogenization at three different pressures) and light exposure of different durations. They did not present any artefacts or interferences (a Nucleosil C-18 column being used for UV detection). The accuracy of the methods varied from 5 to 15% according to the ascorbic acid concentration of the sample. The principal advantages and disadvantages of the examined methods are listed. The study also indicates the results of dehydroascorbic acid determination by RP-HPLC after derivatization with 1,2-phenylenediamine and subsequent fluorescence detection of the quinoxaline derivative.

Bibliographie

1. *Jaffe, G.M.*: Vitamin C. In: Machlin, L. J. (ed.), Handbook of vitamins, p. 199–244. Marcel Dekker, New York, Basel 1984.
2. *Bui-Nguyễn, Mai H.*: Ascorbic acid and related compounds. In: De Leenheer, W. E. and De Ruyter, M. G. M. (eds), Modern chromatographic analysis of the vitamins, p. 267–301. Marcel Dekker, New York, Basel 1985.
3. *Bourgeois, C. F., Czornomaz, A. M., George, P., Belliot, J.-P., Mainguy, P. R. et Watier, B.*: Dosage spécifique de la vitamine C (acides ascorbique et déhydro-ascorbique) dans les aliments. *Analysis* 3, 540–548 (1975).
4. *Pachla, Lawrence A., Reynolds, D. L. and Kissinger, P. T.*: Review of ascorbic acid methodology. Analytical methods for determining ascorbic acid in biological samples, food products and pharmaceuticals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68, 1–12 (1985).
5. *Hasselmann, C. et Diop, P. A.*: Le dosage de l'acide L-ascorbique dans les aliments: une revue bibliographique (1976–1981). *Sci. alim.* 3, 161–180 (1983).
6. *Polesello, Andrea and Rizzolo, Anna*: Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods (A review 1981–1985). *J. Micronutr. Anal.* 2, 153–187 (1986).
7. *Brubacher, G., Müller-Mulot, W. and Southgate, D. A. T.*: Vitamin C (ascorbic and dehydroascorbic acids) in foodstuffs: 5. HPLC Method; 6. Modified Deutsch and Weeks fluorimetric method; 7. Sephadex Method. In: Methods for the determination of vitamins in food (recommended by COSR 91), p. 66–96. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York 1985.
8. *Archer, A. W., Higgins, V. R. and Perryman, D. L.*: Determination of ascorbic and erythorbic acids by high performance liquid chromatography. *J. Assoc. Publ. Anal.* 18, 99–103 (1980).
9. *Kissinger, P. T. and Pachla, Lawrence A.*: Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid using liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection. *Food Technol.* 41 (11), 108–111 (1987).
10. *Hayashi, H. and Miyagawa, A.*: Simultaneous fluorescence determination of total ascorbate and total erythorbate in foods by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 31, 44–50 (1990).
11. *Bognar, A.*: Bestimmung von Vitamin C in Lebensmitteln mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC). *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* 84, 73–76 (1988).
12. *Association of Official Analytical Chemists*: Official methods of analysis – Vitamins and other nutrients. 13th ed., p. 734–779. Washington DC 20044 1980.
13. *Speek, A. J., Schrijver, J. and Schreurs, W. H. P.*: Fluorometric determination of total vitamin C and total isovitamin C in foodstuffs and beverages by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization. *J. Agric. Food Chem.* 32, 352–355 (1984).
14. *Bilic, N.*: Assay for both ascorbic and dehydroascorbic acid in dairy foods by high performance liquid chromatography using precolumn derivatization with methoxy- and ethoxy-1,2-phenylenediamine. *J. Chromatogr.* 543, 367–374 (1991).
15. *Behrens, W. A. and Madère, R.*: A highly sensitive high performance liquid chromatography method for the estimation of ascorbic and dehydroascorbic acid in tissues, biological fluids, and foods. *Anal. Biochem.* 165, 102–107 (1987).
16. *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).

17. *Kim, H.-J.*: Determination of total vitamin C by ion exclusion chromatography with electrochemical detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72, 681–686 (1989).
18. *Lloyd, Linda L. and Warner, F. P.*: Quantitative reversed phase HPLC analysis of L-ascorbic acid (vitamin C) and identification of its degradation products. *Chromatographia* 24, 371–376 (1987).
19. *Sapers, G. M., Douglas, F. W. Jr, Ziolkowsky, M. A., Miller, R. L. and Hicks, K. B.*: Determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic acid-2-phosphate in infiltrated apple and potato tissue by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 503, 431–436 (1990).
20. *Ziegler, S. J., Meier, B. and Sticher, O.*: Rapid and sensitive determination of dehydroascorbic acid in addition to ascorbic acid by reversed-phase high performance liquid chromatography using a post-column reduction system. *J. Chromatogr.* 391, 419–426 (1987).
21. *Toothill, J., Thompson, S. Y. and Edwards-Webb, J.*: Observations on the use of 2,4-dinitrophenylhydrazine and of 2,6-dichlorophenolindophenol for the determination of vitamin C in raw and in heat-treated milk. *J. Dairy Res.* 37, 29–45 (1970).
22. *Tillmans, J.*: Über die Bestimmung der elektrischen Reduktions-Oxydations-Potentiale und ihre Anwendung in der Lebensmittelchemie. *Z. Unters. Lebensm.* 54, 33–43 (1927).
23. *Anonym*: Bestimmung von Ascorbinsäure (Vitamin C) und dessen Verbindungen. Application Bulletin Nr. 98/1 d. Metrohm AG, Herisau.
24. *Oamen, E. E., Hansen, A. P. and Swartzel, K. R.*: Effect of ultra-high temperature steam injection processing and aseptic storage on labile water-soluble vitamins in milk. *J. Dairy Sci.* 72, 614–619 (1989).
25. *Ford, J. E., Schröder, Monika J. A., Bland, M. A., Blease, K. S. and Scott, K. J.*: Keeping quality of milk in relation to the copper content and temperature of pasteurization. *J. Dairy Res.* 53, 391–406 (1986).
26. *Pongracz, G.*: Neue potentiometrische Bestimmungsmethode für Ascorbinsäure und deren Verbindungen. *Z. Anal. Chem.* 253, 271–274 (1971).
27. *Anonym*: Allgemeine potentiometrische Bestimmung von Vitamin C mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol-Lösung. Analysen-Vorschrift Nr. 32 (B-032/2242) der Firma «Deutsche Metrohm», Plattenhard, In den Birken, D-7024 Filderstadt.
28. *Bosset, J. O., Eberhard, P., Bütikofer, U., Sieber, R. et Tagliaferri, E.*: Evaluation de quelques critères d'altération du lait entier soumis à divers traitements thermiques et mécaniques ainsi qu'à diverses durées d'exposition à la lumière. Partie I: Etude de la vitamine C. *Trav. chim. aliment. hyg.* 82, 433–456 (1991).
29. *Verma, K. K. and Gulati, A. K.*: Determination of vitamin C with chloramine-T. *Anal. Chem.* 52, 2336–2338 (1980).
30. *Kohla, K.*: Beitrag zur Entwicklung potentiometrischer Vitamin-C-Bestimmungen. Österreich. Chemiker-Ztg. 59 (11/12), 151–154 (1958).
31. *Anonyme*: Jodometrische Gehalts-Bestimmung von Natriumascorbat. Analysen-Vorschrift Nr. B-97 der Firma «Deutsche Metrohm», Plattenhard, In den Birken, D-7024 Filderstadt.
32. *Anonym*: Vitamin C in UHT-Milch, titriert mit Dichlorphenolindophenol und indiziert am Titroprocessor 686 mit Hilfe polarisierter Elektroden (Applikations-Notizen). Metrohm Information 20 (2) 19, Metrohm AG, Herisau 1991.
33. *Beutler, H. O. und Beinstingl, G.*: Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln, *Deut. Lebensm.-Rundsch.* 76, 69–75 (1980).

34. *Manasterny, K. und Reuter, H.*: Stabilität von Vitamin C in Milch beim Erhitzen. *dmz Lebensmittelind. Milchwirt.* 111, 116–120 (1990).
35. *Fujita, A. und Ebihara, T.*: Kolorimetrische Bestimmung von Vitamin C mittels Phosphorwolframsäure. I.: Bestimmung der reduzierten Form von Vitamin C. *Biochem. Z.* 290, 182–191 (1937).
36. *Omaye, S. T., Turnbull, J. D. and Sauberlich, H. E.*: Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. In: McCormick, D. B. and Wright, L. D. (eds.). *Methods in enzymology*, Vol. 62 (vitamins and coenzymes), Part. D, p. 3–11, Academic Press, New York, San Francisco, London 1979.
37. *Hoppe, A., Reimerdes, E. H. und Reuter, H.*: Densitometrische Vitamin C-Bestimmung in Vollmilch. *Milchwissenschaft* 34, 263–266 (1979).
38. *Kylä-Siurola, Anna-Liisa und Antila, V.*: Der Einfluss von milchtechnologischen Prozessen auf den C-Vitamingehalt der Milch. *Suomem Kemistilehti* B45, 65–67 (1972).
39. *Ferretti, L., Lelli, M.E., Miuccio, C. e Ragni, C.*: Variazioni quantitative di alcune vitamine nel latte U. H. T. durante la conservazione. *Quad. Nutr.* 30, 124–133 (1970).
40. *Pelletier, O. and Brassard, R.*: Determination of vitamin C (L-ascorbic acid and dehydroascorbic acid) in food by manual and automated photometric methods. *J. Food Sci.* 42, 1471–1477 (1977).
41. *Wimalasiri, P. and Wills, R. B. H.*: Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 256, 368–371 (1983).
42. *Kneifel, W. und Sommer, Regina*: HPLC-Methode zur Bestimmung von Vitamin C in Milch, Molke und Molkegetränken. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 181, 107–110 (1985).
43. *Mannino, S. and Pagliarini, E.*: A rapid HPLC method for the determination of vitamin C in milk. *Lebensm.-Wiss.-Technol.* 21, 313–314 (1988).
44. *Haddad, G. S. and Loewenstein, M.*: Effect of several heat treatments and frozen storage on thiamine, riboflavin, and ascorbic acid content of milk. *J. Dairy Sci.* 66, 1601–1606 (1983).
45. *Keating, R. W. and Haddad, P. R.*: Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acid by reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography with pre-column derivatisation. *J. Chromatogr.* 245, 249–255 (1982).
46. *Vanderslice, J. T. and Higgs, Darla J.*: HPLC analysis with fluorometric detection of vitamin C in food samples. *J. Chromatogr. Sci.* 22, 485–489 (1984).
47. *Goussault, B., Gagnepain, M. F. et Luquet, F. M.*: Contribution à l'étude de quelques vitamines du lait pasteurisé en fonction du conditionnement et du mode de stockage. *Rev. Lait. Franç.* 361, 69–72 (1978).
48. *Veazey, R. L. and Nieman, T. A.*: Chemiluminescence high performance liquid chromatographic detector applied to ascorbic acid determinations. *J. Chromatogr.* 200, 153–162 (1980).
49. *Rückemann, H.*: Methoden zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC). II. Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Milchaustauschfuttermitteln. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 171, 446–448 (1980).
50. *Wagner, H. P. and McGarrity, M. J.*: The use of pulsed amperometry combined with ion-exclusion chromatography for the simultaneous analysis of ascorbic acid and sulfite. *J. Chromatogr.* 546, 119–124 (1991).
51. *Washko, P. W., Hartzell, W. O. and Levine, M.*: Ascorbic acid analysis using high performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Anal. Biochem.* 181, 276–282 (1989).

52. *Bode, Ann M. and Rose, R. C.*: Quantitation of ascorbic acid by liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *J. Micronutr. Anal.* 6, 55–61 (1991).
53. *Behrens, W. A. and Madère, R.*: Ascorbic and dehydroascorbic acid content of infant formula. *J. Food Compos. Anal.* 2, 48–52 (1989).
54. *Finley, J. W. and Duang, E.*: Resolution of ascorbic, dehydroascorbic and diketogulonic acids by paired-ion reverse-phase chromatography. *J. Chromatogr.* 207, 449–453 (1981).
55. *Kacém, B., Marshall, M. R., Matthews, R. F. and Gregory, J. F.*: Simultaneous analysis of ascorbic and dehydroascorbic acid by high performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and UV absorbance. *J. Agric. Food Chem.* 34, 271–274 (1986).
56. *Lopez-Anaya, A. and Mayersohn, M.*: Ascorbic and dehydroascorbic acids simultaneously quantified in biological fluids by liquid chromatography with fluorescence detection, and comparison with a colorimetric assay. *Clin. Chem.* 33, 1874–1878 (1987).
57. *Anonym*: Dehydroascorbinsäure/L-Ascorbinsäure, in: *Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik*, S. 17–18. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim 1984.
58. *Deneke, U., Michal, G. und Beutler, H. O.*: Neue Methode zur Bestimmung von Vitamin C in Lebensmitteln. *Dt. Lebensm.-Rundsch.* 74, 400–403 (1978).
59. *Richter, W. und Tinner, U.*: *Moderne Titrationstechnik*. Metrohm Monographien. Metrohm AG, Herisau 1988.
60. *Dhariwal, K. R., Washko, P. W. and Levine, M.*: Determination of dehydroascorbic acid using high performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Anal. biochem.* 189, 18–23 (1990).

E. Tagliaferri
Centre recherches Nestlé
Division qualité et
sécurité alimentaire
Vers-chez-les-Blanc
Case postale 44
CH-1000 Lausanne

Christel Marchiando
Metrohm AG
Elektr. Messgeräte
CH-9101 Herisau

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

