

DÉTECTION RAPIDE DE CONSERVATEURS DANS LES PRODUITS À BASE DE VIANDE PAR EXTRACTION THERMIQUE ET CHROMATOGRAPHIE DE COUCHE MINCE

J. FLORES, MC. MIRALLES et V. GINER

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, VALENCIA, Espagne

INTRODUCTION

La méthodologie utilisée normalement pour la détection des conservateurs chimiques dans les aliments comporte deux parties essentielles: extraction des conservateurs et leur identification (Schuller et Ven, 1967). L'extraction est faite à l'aide de solvants organiques ou par distillation avec entraînement à la vapeur; l'identification est réalisée par des techniques chromatographiques. La méthode espagnole officielle pour la recherche des conservateurs dans les produits à base de viande (B.O.E.I 1979) est fondée sur ce principe.

Actuellement les laboratoires de contrôle de la qualité des produits à base de viande s'intéressent à des méthodes rapides permettant l'analyse de nombreux échantillons dans le temps le plus bref possible alors que les méthodes traditionnelles précédemment citées sont longues laborieuses et pas adaptées à un contrôle de routine de ces additifs. Dans cet esprit, Stahl (1968) a mis au point un microfour dénommé TAS qui permet de supprimer la phase traditionnelle d'extraction. A l'aide de ce système les substances volatiles présentes dans les produits sont sublimées et récupérées directement sur les plaques de chromatographie. La technique du microfour TAS et ses applications les plus importantes ont été décrites par Hossenlopp (1972) et ultérieurement par Lanb et Woller (1976). Ces derniers ont utilisé cette technique pour la détermination de conservateurs dans les produits alimentaires comme le pain, la margarine, la mayonnaise et les fruits secs.

L'identification par chromatographie des conservateurs présents pose de grands problèmes notamment en ce qui concerne la séparation des acides benzoïque et sorbique qui sont largement utilisés dans l'alimentation. Ces problèmes ont été abordés par différents auteurs. Copius-Peereboom et Beckes (1964) indiquent que la séparation de ces deux acides est effective sur un support utilisant en mélange cellulose et gel de silice Kieselguhr-G avec de l'ultraphor WT comme indicateur dans l'ultra-violet et avec le mélange d'élution suivant: n-hexane: acide acétique (96:4). Certains laboratoires ont rencontré avec cette technique des difficultés de visualisation des conservateurs et pour cette raison, Gossalé (1971) propose un support à base de cellulose MN₃₀₀F₂₅₄ qui contient l'agent de fluorescence. D'autres auteurs, comme Nagasawa et col. (1969) ont fait une étude comparative entre les supports gel de silice et polyamide et indiquent qu'ils préfèrent ces derniers en raison de la plus grande résolution obtenue. Tjan et Kontar (1972) séparent les acides benzoïque et sorbique sur un support contenant un gel de silice et un silicagel GF avec un éluant ammoniacal. Stahl (1969) indique que dans tous les cas l'identification sera meilleure si on traite la zone où a migré le conservateur avec quelques gouttelettes de solution à 5% de brome. L'acide sorbique se transforme en acide bromocaproïque, se dédouble en deux taches alors que l'acide benzoïque n'est pas modifié par ce traitement.

Compte-tenu de ces résultats il a été considéré qu'il était intéressant de réaliser une étude en extraction thermique à l'aide du microfour TAS des conservateurs les plus couramment utilisés: acides benzoïque, salicylique, sorbique et esters méthylique, éthylique et propylique de l'acide parahydroxybenzoïque et d'étudier en même temps les meilleures conditions de séparation en couche mince. Le résultat de cette étude est la proposition de méthode suivante qui permet la détection rapide de ces additifs dans les produits à base de viande.

METHODE

Appareillage.

- a) Microfour TAS de la firme DESAGA GmbH, Heidelberg, RFA.
- b) Matériel de chromatographie en couche mince avec applicateur et support fabriqué par DESAGA GmbH, Heidelberg, RFA; plaques de verre de 20 x 20 cm; dessiccateur avec support de plaques; étuve à 110°C; microseringue de 10 microlitres; chambre de révélation et lampe UV 254 nm.
- c) Etuve sous vide de la firme Heraeus GmbH, Hanau, RFA.

Réactifs.

- a) Matériaux supports: Silicagel GF₂₅₄ Merck, Darmstadt, RFA et Cellulose MN 300 UV 254 de Macherey et Nagel Co, Düren, RFA.
- b) Mélanges d'élution 1: hexane, tétrachlorure de carbone, chloroforme, acide formique et acide acétique (50:40:20:8:2). Le mélange est secoué en ampoule de décantation. Seule la couche supérieure est retenue comme agent d'élution.
- c) Mélanges d'élution 2: hexane, éther éthylique et acide acétique (81:14:5).
- d) Solutions témoins: solutions alcooliques à 0,1% d'acides sorbique, salicylique et esters méthylique, éthylique et propylique de l'acide parahydroxybenzoïque. Solution alcoolique à 0,2% de l'acide benzoïque. Ces solutions sont déposées sur les plaques à raison de 5 microlitres.

Préparation des plaques.

On pèse 15 g de silicagel GF₂₅₄ et 7,5 g de cellulose MN₃₀₀UV₂₅₄ et on les homogénéise avec 70 ml d'eau distillée sous régime d'agitation pendant 20 secondes. Le mélange est déposé dans l'applicateur Desaga et on prépare cinq plaques préalablement dégraissées avec une couche de 250 microns. On laisse sécher complètement à l'air les plaques. Les plaques sont activées 1 heure à 110°C avant leur utilisation.

Préparation des échantillons.

Les essais sont effectués avec des produits à base de viande contenant des concentrations connues de conservateurs comprises entre 100 et 500 ppm de chacun des conservateurs visés par cette étude. On prend 10 g d'échantillon dépourvu de parties visibles de graisses et on les hache grossièrement en morceaux de 5 mm. Si les échantillons contiennent une quantité d'eau importante on les soumet à un séchage partiel de manière à leur faire perdre jusqu'à 50% de leur poids pendant 1 heure à 60°C.

Extraction thermique et détection des conservateurs.

Pour chaque produit à base de viande on prend trois tubes de verre du microfour TAS munis de laine de verre du côté de l'extrémité capillaire et on introduit approximativement 200 mg d'échantillon dans chacun de ces tubes. Le premier tube est placé dans le microfour TAS à la température de 200°C et les conservateurs sont transférés directement sur la plaque de chromatographie. On repère l'emplacement du dépôt en lumière UV et on répète l'opération avec les deux autres tubes. Le temps nécessaire à chaque extraction est de 90 secondes.

Identification des conservateurs.

Le développement des plaques de chromatographie se fait dans des cuves saturées avec le mélange éluant approprié à la température ambiante. On utilise le mélange éluant 1 pour séparer les acides sorbique, benzoïque et salicylique et le mélange éluant 2 pour les esters de l'acide parahydroxybenzoïque.

Le temps approximativement nécessaire pour la migration du front est de l'ordre de 25 minutes, soit une migration de 15 cm. Les chromatogrammes se lisent directement dans l'ultra-violet à 254 nm, le Rf des taches étant comparé au Rf des témoins.

RESULTATS ET RECOMMANDATIONS.

Les expériences préliminaires ont été conduites avec le microfour TAS pour déterminer le profil thermique d'extraction ou thermofractogramme (Hossenlopp, 1971) des agents conservateurs. Ces essais ont permis de montrer que l'extraction thermique des agents conservateurs est incomplète aussi longtemps que la température de 200°C n'est pas atteinte soit un temps de mise en fonctionnement de 90 secondes.

Ces essais ont également permis de suivre le comportement des produits à base de viande riches en humidité et en gras. Ces produits connaissent une sublimation très rapide et donnent lieu à des taches très déformées sur les plaques chromatographiques pour lesquelles la révélation est ensuite très perturbée. Dans de telles circonstances il est toujours préférable d'éliminer préalablement manuellement toutes les plus grosses inclusions de matières grasses contenues dans l'échantillon, de soumettre ces échantillons à un séchage partiel à l'étuve sous vide à 60°C.

Dans les tubes du microfour il convient de déposer de petites quantités d'échantillon voisines de 200 mg et de procéder à deux ou plusieurs extractions successives. Avec cette technique on peut déposer sur la plaque de chromatographie une plus grande quantité d'agents conservateurs et augmenter ainsi l'intensité de la coloration des agents conservateurs recherchés en fonction de leur propre concentration dans les produits à base de viande et en fonction du nombre d'extractions pratiqué, à condition de regarder les chromatogrammes dans l'ultraviolet immédiatement après l'extraction thermique. Comme on peut observer qu'à une concentration inférieure à 100 ppm les conservateurs ont pratiquement un effet nul tous les conservateurs recherchés peuvent être détectés dès la première extraction à l'exception de l'acide benzoïque qui nécessite trois extractions successives. A mesure qu'on augmente la concentration en agents conservateurs et le nombre d'extractions thermiques l'intensité de la coloration augmente considérablement (Tableau 1).

Pour révéler les plaques de chromatographie ont été essayés différents supports et mélanges éluants pour obtenir une séparation nette et permettre une identification facile de chaque conservateur. La séparation des acides sorbique et benzoïque se fait parfaitement avec le procédé décrit par Gossalé (1971) c'est à dire avec comme support un mélange Silicagel GF₂₅₄ et cellulose MN₃₀₀F₂₅₄ et comme mélange éluant hexane tétrachlorure de carbone, chloroforme, acide formique et acide acétique (50:40:20:8:2). Gossalé indique que l'humidité relative du support affecte la séparation des agents conservateurs; les acides se séparent mieux à humidité relative basse (35%) alors que les esters se séparent mieux à humidité relative plus élevée (60%) mais les différences ne sont pas très importantes. Notre travail a permis de constater l'importance de l'activation des plaques pour permettre la séparation des conservateurs acides. Au contraire la séparation des esters de l'acide parahydroxybenzoïque pose des problèmes aussi bien pour des plaques qui viennent d'être activées que pour des plaques stockées quelques jours en dessiccateur après activation que pour des plaques qui n'ont pas été activées. La séparation des esters est meilleure si on fait migrer en cuve en utilisant l'éluant de Stahl (1968) ayant comme formule hexane, éther éthylique et acide acétique (81:14:5).

En conséquence on doit considérer qu'il est préférable de préparer des chromatogrammes avec des plaques qui viennent d'être activées pour obtenir une bonne séparation des conservateurs acides, principalement acides sorbi-

que et benzoïque. En cas de présence d'esters, ceux-ci restent à la partie inférieure du chromatogramme et on peut les séparer à leur tour complètement en pratiquant une deuxième révélation avec le mélange éluant de Stahl (Stahl, 1968). Dans la figure N° 1 on peut observer la séparation après trois révélations successives des conservateurs acides avec le mélange éluant N° 1 de Gosselé (1971) et dans la figure N° 2 la séparation des esters avec le mélange éluant 2 de Stahl (1969). Dans la figure N° 3 on trouve sur la même plaque tous les agents conservateurs révélés successivement avec l'un ou l'autre des mélanges éluants.

Pour finir il convient d'indiquer que la séparation des acides sorbique et benzoïque est aussi effective quand on utilise la technique de bromation décrite par Stahl (1969). Cependant cette technique ne peut être utilisée en présence d'acide salicylique et des esters de l'acide parahydroxybenzoïque car en même temps que se produit leur bromation se multiplient les dédoublements correspondants (Pinella et al, 1966), ce qui donne lieu à un chromatogramme très confus.

Remerciements

Ce travail fait partie d'un programme de recherches financé par la Commission de Recherches scientifique et technique (Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica).

Les auteurs témoignent leur gratitude au Dr. Casas de cet Institut pour ses remarques et conseils en ce qui concerne les techniques de révélations chromatographiques et au Mr. Venduvre, du Centre Technique de la Salaison de Paris, pour son aimable collaboration.

BIBLIOGRAPHIE.

B.O.E. (1979). Métodos de análisis de productos cárnicos. Boletín Oficial del Estado n° 207, 20233, 29 agosto 1979.

Copius-Peereboom, J.W. et Beekes, H.W. (1964): Thin layer chromatographic separation of preservatives. *J. Chromatography*, 14, 417-423.

Gosselé, J.A.W. (1971): Modified thin layer chromatographic separation of preservatives. *J. Chromatography*, 63, 433-437.

Hossenlopp, M. (1972): Microfour TAS. Un dispositif simple et rapide pour l'extraction et la caractérisation par chromatographie sur couche mince des pesticides, conservateurs et autres substances étrangères. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 66, 17-28.

Laub, E. et Woller, R. (1976): Schnelle Analytik von Lebensmittelzusatzstoffen mit Hilfe des TAS-Verfahrens *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 72/8, 276-279.

Nagasawa, K., Yoshidoma, H. et Takeshita, G. (1969): Chromatography of food preservatives on polyamide layers and columns. *J. of Chromatogr.* 43, 473-479.

TABLEAU 1 Intensité de coloration des agents conservateurs en lumière UV en fonction du nombre d'extractions thermiques et de leur concentration dans les produits à base de viande.

TABLE 1 Intensity or color index of preservatives exposed to UV light as a function of the number of performed thermal extractions as well as their concentration in meat products.

Agent conservateur	Nombre d'extractions thermiques à 200°C	Concentration dans les produits à base de viande (en ppm)		
Preservative	Amount of performed thermal extractions at 200°C	100	300	500
Acide sorbique	1	++	+++	+++
Sorbic acid	2	++	+++	+
	3	++	+++	+
Acide benzoïque	1	-	+	+
Benzoic acid	2	-	+	++
	3	+	++	+++
Ester méthylique de l'acide parahydroxybenzoïque (PHB)	1	+	+	+++
PHB-methyl-ester	2	+	+++	+++
	3	++	+++	+++
Ester éthylique de l'acide parahydroxybenzoïque (PHB)	1	+	++	+++
PHB-ethyl-ester	2	++	+++	+++
	3	+++	+++	+++
Ester propylique de l'acide parahydroxybenzoïque (PHB)	1	+	++	+++
PHB-propyl-ester	2	++	+++	+++
	3	+++	+++	+++
Acide salicylique	1	+	+	++
Salicylic acid	2	+	++	+++
	3	+	++	+++

-: négatif/negative; +: peu intense/low intensity; ++: moyennement intense/medium intensity; +++: intense/intense;

+++ : très intense/very intense.

Pinella, S.J., Falco, A.D. et Schwartzman, G. (1966): Determination of benzoates and hydroxybenzoates in foods. J. of the A.O.A.C. 49/4, 829-834.

Schuller, P.L. et Veen, E. (1967): Preservatives: a review of methods of analysis. J. of the A.O.A.C. 50/5, 1127-1145.

Stahl, E. (1968). TAS, ein Thermomikroabtrenn- und Applikationsverfahren gekoppelt mit der Dünnschichtchromatographie. J. Chromatogr. 37, 99-102.

Stahl, E. (1969): Thin layer Chromatography A laboratory Handbook Ed. Springer Verlag, New-York 2nd edition.

Tjan, G.H. et Kontar, T. (1972): Thin layer chromatographic identification of preservatives in food. J. of the A.O.A.C. 55/6, 1223-1225.

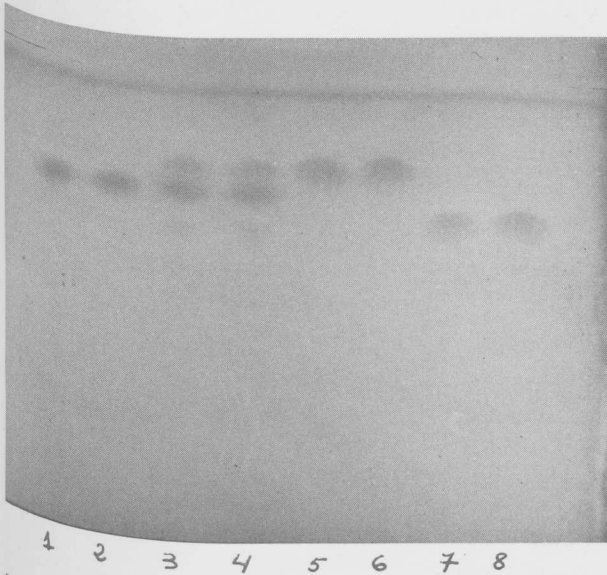


Fig. 1. Séparation des conservateurs acides avec le mélange éluant 1

1. acide sorbique (produit à base de viande)
2. idem (témoin)
3. acide salicylique, sorbique et benzoïque (pdt. à base de viande)
4. idem (témoin)
5. acide benzoïque (produit à base de viande)
6. idem (témoin)
7. acide salicylique (produit à base de viande)
8. idem (témoin)

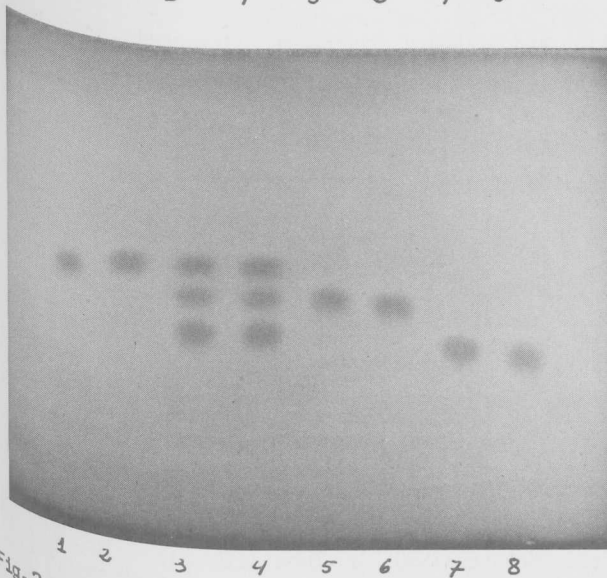


Fig. 2. Séparation des esters de l'acide parahydroxy benzoïque à l'aide du mélange éluant 2

1. ester propylique du PHB (produit à base de viande)
2. idem (témoin)
3. esters méthylique, éthylique et propylique du PHB (produit à base de viande)
4. idem (témoin)
5. ester éthylique du PHB (produit à base de viande)
6. idem (témoin)
7. ester méthylique du PHB (produit à base de viande)
8. idem (témoin)

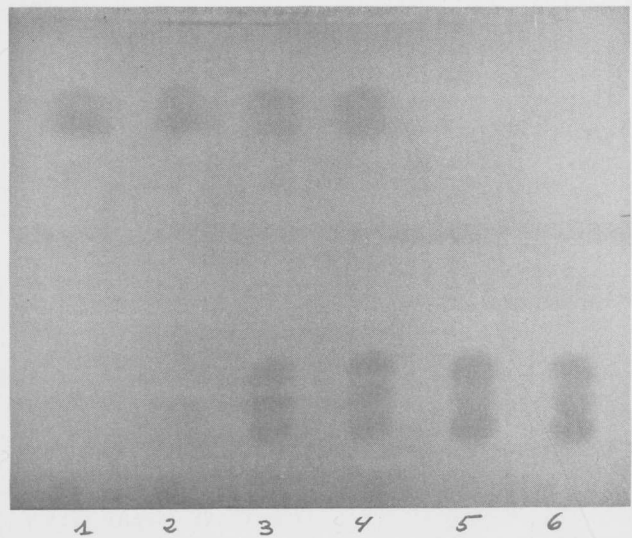


Fig. 3. Chromatogramme avec tous les agents conservateurs élués avec le mélange éluant 1 d'abord, avec le mélange éluant 2 ensuite

1. Acides salicylique, sorbique et benzoïque (produit à base de viande)
2. idem (témoin)
3. Esters méthylique, éthylique, propylique de l'acide PHB, acides salicylique, sorbique et benzoïque (produit à base de viande)
4. idem (témoin)
5. Esters méthylique, éthylique et propylique de l'acide PHB (produit à base de viande)
6. idem (témoin)