

Dosage de l'acétone et de l'acétaldéhyde dans les jus de tomate par dilution isotopique.

Marie-Thérèse PIVA et J. CROUZET*

DOSAGE DE L'ACETONE ET DE L'ACETALDEHYDE DANS LES JUS DE TOMATE PAR DILUTION ISOTOPIQUE

Marie-Thérèse PIVA et Jean CROUZET

Fruits, dec. 1977, vol. 32, n°12, p. 753-758.

RESUME - La teneur en acétone et acétaldéhyde de jus de tomate a été déterminée en utilisant une technique de dosage par dilution isotopique. Le jus additionné de produits marqués au C^{14} est soumis à un entraînement à l'azote sous vide partiel. Le mélange 2,4 dinitro-phénylhydrazones formé à partir des composés volatils entraînés, est séparé par chromatographie en couche mince sur gel de silice puis sur alumine. Une détermination de la radioactivité et de la concentration des 2,4 dinitro-phénylhydrazones de l'acétone et de l'acétaldéhyde obtenues après séparation et élution permet de calculer la teneur du produit initial en ces deux composés carbonyles à partir d'un même échantillon. Cette technique peut être également utilisée pour le dosage du méthanol et de l'éthanol sous forme de 3,5 dinitrobenzoates.

INTRODUCTION

La détermination quantitative des constituants de l'arôme des produits alimentaires et plus particulièrement celle des composés les plus volatils (acétone, acétaldéhyde ...) pose des problèmes très difficiles à résoudre. Compte tenu de la grande volatilité de ces produits on note des pertes difficiles à chiffrer lors des étapes d'extraction et de concentration indispensables à la préparation des échantillons. Par ailleurs, le pic du solvant masque le plus souvent un certain nombre de pics correspondant à ces composés très volatils. C'est pourquoi différents auteurs : SCHWARTZ et al. (12), DINSMORE et NAGY (6), HALVARSON (8), BRADDOCK et KESTERSON (3), SMAGULA et BRAM-

LAGE (14), ont préconisé un piégeage chimique des composés volatils qui présente l'avantage d'être efficace et sélectif. Cependant, le dosage des composés caractéristiques formés est souvent très délicat, dans de nombreux cas il est nécessaire de régénérer les composés volatils en vue de leur analyse ultérieure par chromatographie en phase gazeuse (8), DINSMORE et NAGY (6). Une autre solution consiste à séparer le mélange de dérivés caractéristiques obtenus par chromatographie en couche mince et à doser les dérivés ainsi isolés par une méthode physicochimique, spectrophotométrie par exemple [SMAGULA et BRAMLAGE (14)]. En tout état de cause on ne peut espérer obtenir, dans un cas comme dans l'autre, que des résultats semi-quantitatifs.

Par contre, une méthode de dosage du benzaldéhyde par dilution isotopique proposée par COBB (5) permet de déterminer avec précision la quantité d'aldéhyde présente dans le produit en s'affranchissant des contraintes liées aux conditions de préparation de l'échantillon. Le principe de cette technique est le suivant : avant extraction des compo-

* - Marie-Thérèse PIVA. Adresse actuelle : Laboratoire de Biochimie médicale B, Faculté de Médecine Institut de Biologie, bld Henri IV, 34000 Montpellier.
Jean CROUZET. Laboratoire de Biochimie appliquée. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. place E. Bataillon 34060 Montpellier Cedex

sés volatils on ajoute au milieu une certaine quantité d'aldéhyde radioactif, on forme ensuite la 2,4 dinitrophénylhydrazone (2,4 D.N.P.) de ce constituant que l'on sépare par chromatographie en couche mince, une mesure spectrophotométrique et une mesure de radioactivité effectuées sur le composé ainsi isolé permettent de calculer la quantité d'aldéhyde non radioactif initialement présente dans le produit.

Dans le cadre d'une étude portant sur les variations des composés volatils de la tomate en fonction de différents paramètres : variété, traitement technologique, temps et température de stockage, nous nous sommes proposé d'adapter la méthode de COBB (5) au dosage de l'acétone et de l'acétaldéhyde dans les jus de tomate.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé du jus de tomate en boîte conservé en chambre froide à 4°C jusqu'au moment de l'emploi.

Nous avons utilisé des solvants décarbonylés, selon SANDERS et SCHUBERT (10).

La 2,4 dinitrophénylhydrazine (2,4 DNPH) a été recristallisée dans du méthanol décarbonylé.

L'acétone et l'acétaldéhyde UC14, utilisés dans cette étude, nous ont été fournis par le C.E.A. L'acétone possédait une activité de 10 mCi/mM et l'acétaldéhyde de 1 mCi/mM. Tous deux avaient une pureté radiochimique de 99 p. cent. Ils ont été dissous chacun dans 20 ml d'éthanol décarbonylé et conservés au congélateur à -20°C dans des fioles rodées et recouvertes de papier aluminium. Avant utilisation nous diluons ces solutions de façon à ce que l'ajout corresponde à 2,4 10⁵ dpm/mg pour l'acétone et à 2,1 10⁵ dpm/mg pour l'acétaldéhyde.

La séparation des constituants volatils a été réalisée sur 500 ml de jus ou de solution modèle à l'aide d'un appareil cyclone BARRERA et al (2) qui permet de travailler par entraînement avec un gaz inerte (azote, pression d'entrée 520 mm de Hg) sous pression réduite (20 mm de Hg). Le dispositif initial a été modifié de façon à limiter au maximum les quantités d'eau entraînées, afin de favoriser la formation ultérieure des 2,4 DNP en plaçant un réfrigérant entre le ballon et le train de pièges (fig. 1). Le premier piège, maintenu à température ambiante renferme une solution de 2,4 DNPH, les deux suivants sont refroidis à l'azote liquide. La solution de 2,4 DNPH est préparée de la façon suivante : 1 g de 2,4 DNPH recristallisée est dissous dans 70 ml de méthanol décarbonylé, 20 ml d'eau bidistillée, 10 ml d'HCl Merck (d 1,16). Cette solution est préparée juste avant emploi afin d'éviter toute contamination. Le contenu des trois pièges est réuni et placé au bain-marie à 70°C pendant une heure. Après réaction l'excès de 2,4 DNPH est éliminé par extraction des 2,4 DNP par la benzène.

Les 2,4 DNP des produits de référence ont été préparés selon SHRINER et FUSON (13).

La chromatographie en couche mince a été réalisée sur des plaques de verre de 20/20 cm, recouvertes de 0,5 mm de Silice Kieselgel G (type 60) Merck (solvant d'élution tétrachlorure de carbone-chloroforme 60:40) et d'alumine préparée à partir d'alumine G et GF254 (type E) Merck, célite et eau (50 : 8 : 79, P : P : V) (solvant d'élution hexane chloroforme 70/30). Les plaques sont activées à 110°C pendant une heure et conservées dans un dessiccateur. Pour la chromatographie en phase gazeuse, nous avons utilisé un appareil VARIAN AEROGRAPH modèle 1700 équipé de détecteurs à ionisation de flamme. Les colonnes en acier inoxydable, de 10 pieds de long et de 1/8 de pouce de diamètre intérieur, étaient garnies de :

- Carbowax 20 M à 5 p. cent sur Chromosorb W 80-100 mesh (utilisée en isotherme à 55°C)
- OV 17 à 10 p. cent sur Chromosorb W 80-100 mesh (utilisée en isotherme à 260°C).

Nous avons procédé soit à des injections directes de 2,4 DNP, soit à des injections après régénération des composés carbonylés à partir des 2,4 DNP. Dans le premier cas, le mélange de 2,4 DNP est dissous dans un minimum de solvant et injecté en tête de colonne. Dans le second cas, nous avons utilisé la technique décrite par STEPHENS ET TESZLER (15). Dans un tube capillaire monté sur une aiguille de seringue, on place un mélange intime des 2,4 DNP et d'une égale quantité d'acide oxalique et de paradiméthylaminobenzaldéhyde. L'ensemble est pyrolysé à 250°C et les vapeurs formées entraînées par le gaz vecteur.

Les mesures de radioactivité ont été effectuées sur un appareil PACKARD-TRICARB, nous avons utilisé le mélange scintillant suivant : diphényl 2,5 oxazole (P.P.O) 4 g, p. phénylène-cis (phényl-5 oxazole)-2'2 (POPOP) 0,4 g, toluène 500 ml. Les 2,4 DNP radioactives sont dissoutes dans 20 ml de mélange scintillant, placées dans une cellule et comptées pendant deux fois 20 minutes avec une erreur de comptage statistique de 1,5 p. cent.

La concentration en 2,4 DNP en solution dans le méthanol a été déterminée par spectrophotométrie à 354 nm à l'aide d'un appareil UNICAM SP 800.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les premières expériences d'extraction de l'arôme ont été réalisées à l'aide de l'appareil décrit par COBB (5) qui conduit à l'entraînement de quantités considérables d'eau. Des mesures de radioactivité effectuées sur le mélange de 2,4 DNP nous ont montré que dans ces conditions la formation de ces dérivés se faisait avec un rendement

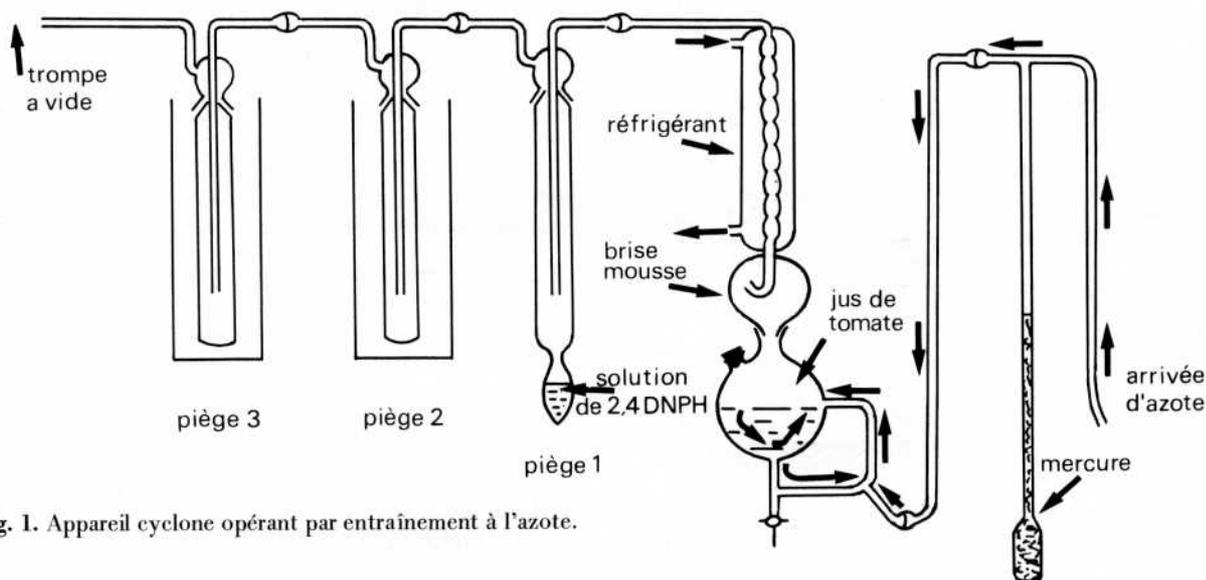


Fig. 1. Appareil cyclone opérant par entraînement à l'azote.

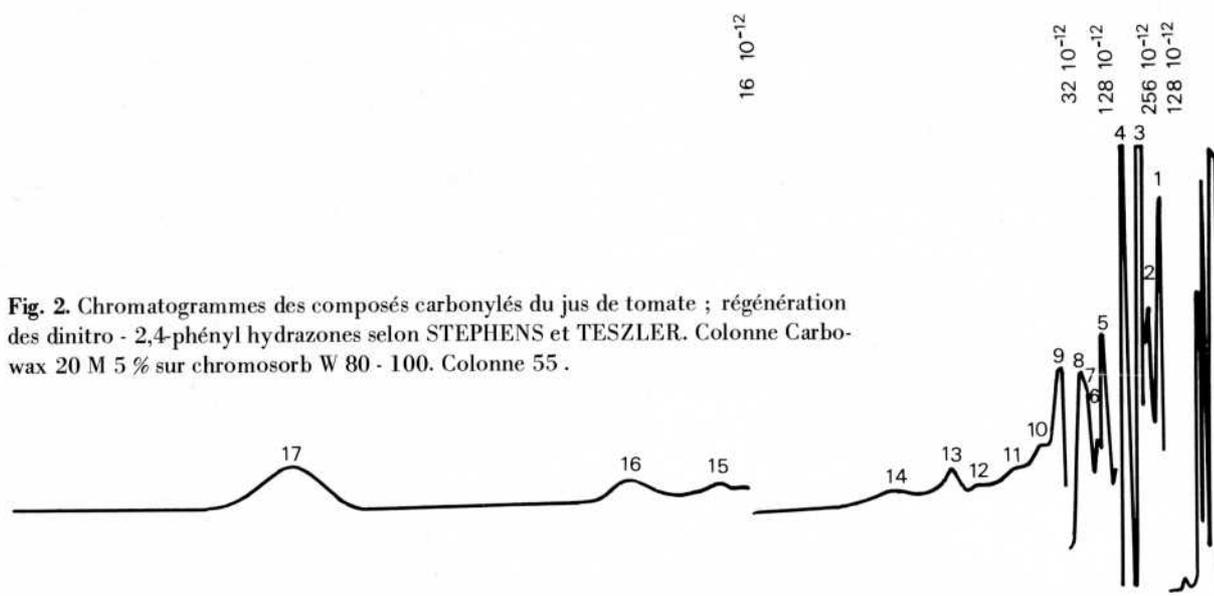


Fig. 2. Chromatogrammes des composés carbonylés du jus de tomate ; régénération des dinitro - 2,4-phényl hydrazones selon STEPHENS et TESZLER. Colonne Carbowax 20 M 5 % sur chromosorb W 80 - 100. Colonne 55.

insuffisant, nous avons attribué ce faible rendement à la dilution des composés volatils et c'est la raison pour laquelle nous avons adopté l'appareil décrit par BARRERA et al (2), modifié comme il est indiqué dans la partie expérimentale et la technique de piégeage dans le réactif de DINSMORE et NAGY (6). Par ailleurs, le fait que l'on travaille sous azote permet d'éviter l'oxydation des aldéhydes.

Différents solvants ont été utilisés pour l'extraction des

constituants volatils : chloroforme, acétate d'éthyle et benzène. L'utilisation de l'acétate d'éthyle [DINSMORE et NAGY (6)] permet d'obtenir une meilleure extraction (sur la base des mesures de radioactivité effectuées à ce stade) que celle que l'on a avec le chloroforme. Par contre, il forme avec l'excès de 2,4-DNPH, un complexe dont le spectre interfère avec celui des 2,4-DNP étudiées. Dans ces conditions, nous avons finalement retenu le benzène. Le mélange

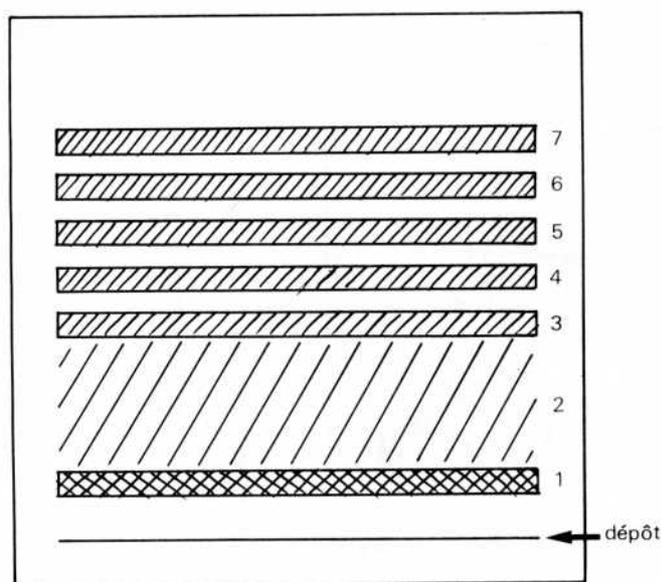


Fig. 3. Chromatographie en couche mince de silice des di-nitro 2,4-phényl hydrazones des composés carbonylés du jus de tomate, éluant $\text{CCl}_4\text{-CHCl}_3$ (60/40), temps d'élu-tion 2 heures

TABLEAU 1 - Composés carbonylés mis en évidence par chromatographie en phase gazeuse du mélange de 2,4 DNP

| pic n° (fig. 2) | composé |
|-----------------|--------------------------|
| 3 | acétaldéhyde |
| 4 | acétone |
| | isobutyraldéhyde |
| 5 | méthyl éthyl cétone |
| 6 | isovaléraldéhyde |
| 7 | méthyl propyl cétone |
| 9 | citral |
| 10 | n hexanal |
| 12 | p cinnamaldéhyde |
| 13 | méthyl-6 heptène-5-one-2 |
| 16 | benzaldéhyde |

de 2,4 DNP obtenu dans les conditions précisées ci-dessus a été dissous dans un minimum de benzène et injecté en tête de colonne OV 17. Dans les conditions précisées dans la partie expérimentale nous avons montré qu'il était possible de séparer 17 produits (figure 2) dont un certain nombre, déjà signalés par différents auteurs parmi les composés volatils de la tomate [BUTTERY et al (4)], ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux de produits de référence (tableau 1). Notre but n'était pas d'identifier tel ou tel composé nouveau mais de confirmer la

dans le mélange obtenu.

La chromatographie du mélange de 2,4 DNP sur oxyde de magnésium SCHWARTZ et al (11) ne donne pas une séparation très nette des différentes classes de composés carbonylés, et comme le signalent ces auteurs, l'acétone se déplace avec les aldéhydes saturés et l'acétaldéhyde avec les ène-2 als. Dans ces conditions, nous avons fait appel à d'autres supports : gel de silice et oxyde d'alumine.

Une première séparation a été réalisée sur couche mince de silice, avec comme éluant le mélange tétrachlorure de carbone - chloroforme (60/40) en utilisant la technique de chromatographie ascendante à répétition. Les résultats obtenus à partir des 2,4 DNP formées à partir d'un jus de tomate sont donnés (figure 3), nous notons sept bandes dont une diffuse. Par comparaison des R_f obtenus à ceux de substances de référence, nous constatons que l'acétaldéhyde et l'acétone migrent au niveau de la bande 3, que le R_f de l'isobutyraldéhyde est le même que celui de la bande 4 et que la méthyl propyl cétone, la méthyl-6 heptène-5 one-2, l'exanal, le citral, le benzaldéhyde et l'aldéhyde h cinnamique se regroupent dans le bande 5. Nous n'avons pas identifié les composés présents dans les bandes 1, 2, 6 et 7.

Une deuxième séparation sur couche mince d'alumine nous a permis de séparer les composés présents dans la bande 3. Après grattage les produits correspondant à cette bande ont été dissous dans un mélange chloroforme-méthanol (5/1), filtrés et déposés sur une plaque d'alumine. L'élu-tion par le solvant hexane-chloroforme (70/30) conduit à l'apparition de deux taches correspondant à l'acétone et l'acétaldéhyde. Ce résultat a été confirmé par chromatographie en phase gazeuse en utilisant la technique de régénération de STEPHENS et TESZLER (15), sur Carbowax 20 M on n'obtient à partir du mélange de composés correspondant à la bande 3 en CCM que deux pics dont les temps de rétention correspondent à ceux de l'acétaldéhyde et de l'acétone.

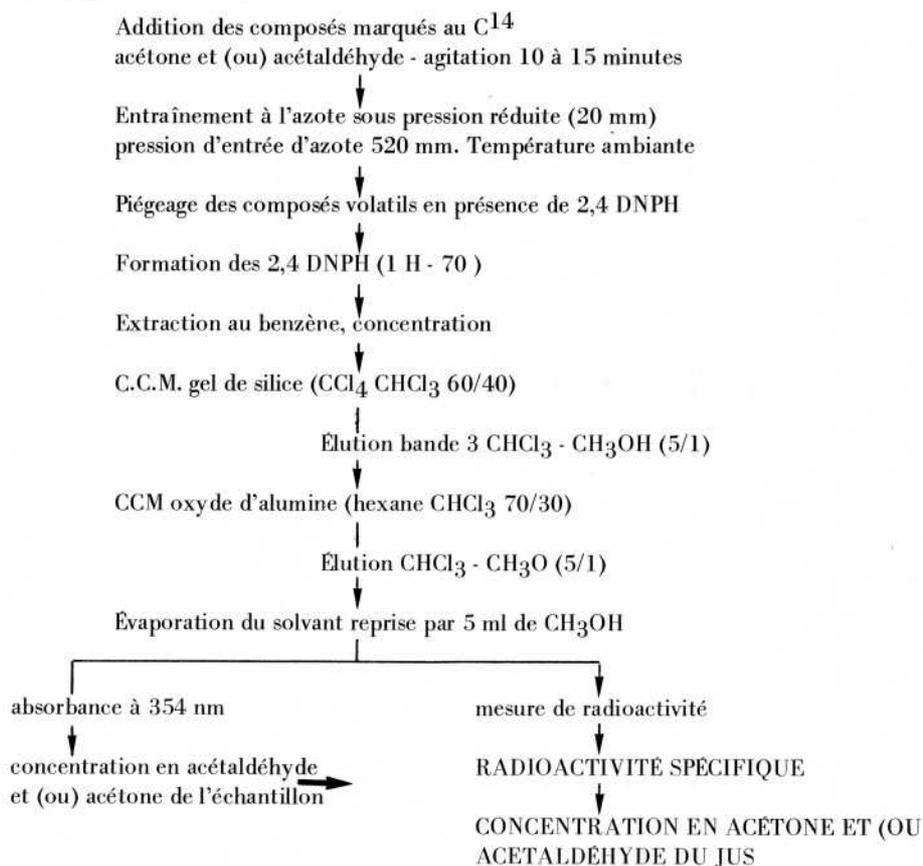
Dans ces conditions, nous avons utilisé pour le dosage de l'acétone et de l'acétaldéhyde à partir de modèles renfermant de l'acétone en solution dans l'eau ou de jus de tomates la technique résumée sur la figure 4. La quantité de composé carbonylé initialement présente dans le jus étudié (M_1) est obtenue en utilisant la formule d'ARONOFF

$$(1) M_1 = \frac{M^* (\delta^* - \delta_E)}{\delta_E}$$

M^* - poids de produit radioactif ajouté avant distillation
 δ^* - activité spécifique du produit radioactif
 δ_E activité spécifique du produit récupéré après purification.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 2.

Figure 4 - Schéma de la méthode de dosage de l'acétone et de l'acétaldéhyde par dilution isotopique.



99,7 p. cent avec l'acétone, en accord avec les données de COBB (5) qui trouve dans le cas du benzaldéhyde des pourcentages supérieurs à 100 p. cent. L'auteur explique ces rendements élevés par le fait que l'on a toujours une certaine oxydation du produit.

On observe également une bonne reproductibilité des résultats obtenus tant à partir des solutions modèles que des jus de tomate.

Les quantités d'acétaldéhyde et d'acétone mises en évidence en utilisant cette technique sont considérablement plus importantes que celles que l'on peut obtenir en utilisant une technique d'extraction, si minutieuse soit-elle, suivie de dosage par CPV et rendent mieux compte de la teneur réelle du jus en ces composés. NELSON et HOFF (9) trouvent seulement dans des jus de tomate de 0,32 à 1,03 ppm d'acétaldéhyde et de 1,22 à 5,17 ppm d'acétone.

La teneur plus élevée en acétone que nous notons dans l'échantillon J2 s'explique par le fait qu'il s'agit d'un jus conservé plusieurs jours au réfrigérateur après ouverture de la boîte.

Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de réaliser le dosage de deux (ou de plusieurs composés dans la mesure où l'on peut procéder à la séparation des 2,4 DNPH correspondantes) à partir d'une même expérience d'entraînement des composés volatils.

Cette technique, utilisable pour le dosage des composés carbonyles très volatils dans différents produits alimentaires peut être étendue à d'autres classes de composés. Des résultats préliminaires montrent que le méthanol et l'éthanol peuvent être dosés par cette technique sous forme de 3,5 dinitrobenzoates.

TABLEAU 2 - Résultats des dosages d'acétone et d'acétaldéhyde dans des solutions modèles et le jus de tomate.

| Échantillon | composé carbonyle ajouté dans 500 ml | | composé carbonyle recueilli | concentration en composé carbonyle du produit initial | p. cent de récupération |
|--|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|---|-------------------------|
| | poids (mg) | activité spécifique (dpm/mg) | activité spécifique (dpm/mg) | (mg/litre) | |
| M ₁ solution aqueuse d'acétone à 14,84 mg/l | 400 (acétone) | 244.520 | 85.796 | 14,8 | 99,7 |
| M ₂ solution aqueuse d'acétone à 14,90 mg/l | 4,00 (acétone) | 239.520 | 83.986 | 14,84 | 99,6 |
| J ₁ jus de tomate 1 | 4,02 (acétone) | 239.520 | 91.440 | 13,02 | - |
| J ₁₋₂ jus de tomate 1 | 4,03 (acétone) | 242.720 | 91.076 | 13,42 | - |
| J ₂ jus de tomate 2 | 4,05 (acétone) | 240.570 | 53.153 | 28,56 | - |
| | 2,90 (acétaldéhyde) | 288.191 | 162.594 | 4,48 | - |

BIBLIOGRAPHIE

- ARONOFF (S.).
Techniques of Radiobiocemistru Ames.
Iowa State College Press, 1956.
- BARRERA (R.), de la CRUZ (F.), GASCO (L.) et MANERO (J.).
Effects of irradiation on the volatile components of fruit juices I First results from apple and grape juices.
Seiderdsdorf project report, 1967.
- BRADDOCK (R.J.) et KESTERSON (J.W.).
Quantitative analysis of aldehydes, esters, alcools and acids from citrus oils.
J. Food Sci., 1971, 41, 1007.
- BUTTERY (R.G.), SEIFFERT (R.M.), GUADAGNI (D.G.) et LING (L.C.).
Characterisation of additional volatile components of tomato.
J. Agr. Food Chem., 1970, 19, 524.
- COBB (W.J.).
Qualification of flavorful food components using isotope dilution.
J. Food Sci., 1969, 34, 466.
- DINSMORE (H.L.) et NAGY (S.).
A rapid gas chromatographic method for studying volatile carbonyl compounds from orange juice and their changes during storage.
volatile carbonyl compound via DNPH derivative.
J. Chromatogr., 1971, 57, 406.
- NELSON (P.E.) et HOFF (J.E.).
Tomato volatiles : effect of variety, processing and storage time.
J. Food Sci., 1969, 34, 53.
- SANDERS (E.B.) et SCHUBERT (J.).
Spectrophotometric analysis of carbonyl compounds in the presence of carbohydrate without prior separation.
Anal. Chem., 1971, 43, 59.
- SCHWARTZ (D.P.), PARKS (O.W.) et KEENEY (M.).
Separation of 2,4 dinitrophenylhydrazone derivative of aliphatic monocarbonyls into classes on magnesta.
Anal. Chem., 1962, 34, 669.
- SCHWARTZ (D.P.), HALLER (H.S.) et KEENEY (M.).
Direct quantitative isolation of monocarbonyl compounds from fats and oils.
Anal. Chem., 1963, 35, 2191.
- SHRINER (R.L.) et FUSON (R.C.).
The systematic identification of organic compounds.
3e ed. J. Wiley and Sons, N. Y., 1948.
- SMAGLIA (I.M.) et BRAMLAGE (W.L.)