

Extraction, dosage et stabilisation des caroténoïdes d'agrumes.

R. HUET*

EXTRACTION, DOSAGE ET STABILISATION
DES CAROTENOÏDES D'AGRUMES

R. HUET (IRFA)

Fruits, Juillet-août 1979, vol. 34, n° 7-8, p. 479-488.

RESUME - Après une description rapide de la composition et des propriétés des pigments caroténoïdes, carotènes et xanthophylles, contenus dans les écorces et les pulpes d'orange, on passe en revue les différentes méthodes d'extraction par solvants. Un schéma d'analyse complète d'un extrait brut est proposé avec de nombreuses variantes : saponification, séparation liquide-liquide, chromatographie sur colonne ou sur couche mince, chromatographie liquide à haute performance. La stabilité des extraits de caroténoïdes dans différentes conditions d'entreposage et les phénomènes de stéréoisométrie trans-, cis- et de peroxydation sont discutés.

Les caroténoïdes d'agrumes, pigments jaunes et rouges, se rencontrent dans la partie externe du péricarpe des fruits, le flavedo, et dans la pulpe. Ils sont dissous dans les globules lipidiques qui remplissent les chromoplastes, organites de la cellule végétale dérivés des chloroplastes.

GROSS et al (29) ont répertorié 110 caroténoïdes dans les Citrus. La composition qualitative de ces deux sources de pigments est pratiquement la même et CURL et BAILEY ont donné les proportions relatives de divers caroténoïdes (10). (tableau 1).

On distingue :

1. les hydrocarbures polyéniques de formule générale : $C_{40}H_{56}$, carotène, lycopène ...
2. les caroténoïdes oxygénés appelés xanthophylles. Ce sont des mono-alcools $C_{40}H_{56}O$, des dialcools $C_{40}H_{56}O_2$, des dialcools monoépoxydes $C_{40}H_{56}O_3$, des dialcools diépoxydes, $C_{40}H_{56}O_4$, des polyols. Les fonctions al-

cools des caroténoïdes se trouvent partiellement estérifiées par des acides gras, acide laurique ou acide myristique (21).

3. on a également montré la présence effective dans les agrumes d'apocaroténoïdes à 30 atomes de carbone, longtemps considérés comme des produits de dégradation, STEWART (30) a montré que la beta-citraurine $C_{30}H_{40}O_2$ apporte une contribution majeure à la coloration orangé brillante de l'écorce des oranges et des tangerines. Sa présence dans le jus est discutée. La teneur en beta-citraurine est sous la dépendance de la concentration en éthylène du fruit, et de la température. Au dessus de 30°C sa biosynthèse est interrompue (30) ; c'est pourquoi les climats secs à nuits fraîches favorisent la coloration.

Les proportions trouvées dans les fruits sont variables avec l'espèce et la variété, la maturité (25) et les conditions écologiques. D'autre part, il faut tenir compte du procédé d'extraction et de la pureté de l'extrait final. Enfin quand on parle de concentration en pigments dans l'écorce ou dans le jus, on s'exprime de façon imprécise ; car dans le premier

* - IRFA - B.P. 5035 - 34032 MONTPELLIER CEDEX

TABLEAU 1 - Composition en caroténoïdes de la pulpe et de l'écorce d'orange (10).

Caroténoïdes	p. 100 de pigments totaux	
	pulpe	écorce
Phytoène	4,0	3,1
Phytofluène	1,3	6,1
α -Carotène	0,5	0,1
β -Carotène	1,1	0,3
ζ -Carotène	5,4	3,5
OH- α -carotène like	1,5	0,3
Cryptoxanthin eposide like	-	0,4
Cryptoxanthin	5,3	1,2
Cryptoflavin-like	0,5	1,2
Cryptochrome-like	-	0,8
Lutein	2,9	1,2
Zeaxanthin	4,5	0,8
Capsanthin-like	-	0,3
Antheraxanthin	5,8	6,3
Mutatoxanthins	6,2	1,7
Violaxanthins	7,4	44,0
Luteoxanthins	17,0	16,0
Auroxanthins	12,0	2,3
Valencixanthin	2,8	2,2
Sinensixanthin	2,0	3,5
Trollixanthin-like	2,9	0,5
Valenciachrome	1,0	0,7
Sinenciachrome-like	-	0,2
Trollichrome-like	3,0	0,8

cas le chiffre annoncé va dépendre en partie de l'épaisseur de la partie blanche de l'écorce, l'albedo, et dans le second cas il sera influencé par la teneur en pulpe, support des caroténoïdes. KEW et BERRY (16) ont obtenu les rendements en extraits bruts suivants :

- orange Valencia	écorce	0,72 g/kg
	flavedo	2,10
Pineapple	écorce	1,14
Blood	écorce	0,47
Temple	écorce	0,50
Parson Brown	écorce	0,79
Hamlin	écorce	0,34
- tangerine Dancy	écorce	1,29

BRADDOCK et KESTERSON (4) ont obtenu après purification sur silicagel :

- tangerine Dancy	flavedo	0,695 g/kg carotènes
		0,268 g/kg monohydroxycaroténoïdes
		0,213 g/kg dihydroxycaroténoïdes
- orange Pineapple	flavedo	0,422 g/kg caroténoïdes
		0,374 g/kg monohydroxycaroténoïdes

0,200 g/kg dihydroxycaroténoïdes

I. STEWART a donné la composition détaillée en caroténoïdes des jus de divers cultivars d'agrumes. Les méthodes d'extraction et d'analyse très étudiées de cet auteur minimisent la formation d'artéfacts. Parmi les différents cultivars analysés, c'est un hybride de mandarine, le tangor Murcott qui est le plus riche en caroténoïdes ; la tangerine Dancy occupe une place moyenne et l'orange Hamlin se situe au niveau inférieur. Les caroténoïdes généralement présents en grande quantité sont la violaxanthine et la cis-anthéranthine colorées en jaune et la cryptoxanthine colorée en orange. (tableau 3).

Pour les jus de fruits, on exprime les résultats de dosage des caroténoïdes totaux en β -carotène. Les variations sont considérables. D'après TAYLOR et WITTE, rapportés par DI GIACOMO (7) :

- orange Valencia	Californie	1,65 mg/l en β -carotène	
	Floride	0,57	
	Navel	Californie	1,07
	Pineapple	Floride	0,34

D'après PENNISI (Italie), rapporté également par DI GIACOMO (7) :

- orange Blonde	16,00 à 21,47 mg/l
- orange Sanguinello	21,63 à 27,78
- orange Tarroco	19,66 à 27,10

D'après BENK et SEIBOLD, rapportés par DI GIACOMO (7) :

- clémentine	10,9 à 21,6 mg/l
- tangerine	14,1 à 18,0

Nous mentionnerons enfin les résultats que nous avons obtenus sur pomelos roses provenant du Texas :

- pomélo Ruby red	jus	0,88 mg/l en β -carotène
	écorce	2,2 mg/kg en carotènes
		5,0 mg/kg en lycopène
- pomélo Star Ruby	jus	8,36 mg/l en β -carotène
	écorce	8,0 mg/kg en carotènes
		22,5 mg/kg en lycopène

La concentration pondérale en caroténoïde n'explique pas à elle seule l'intensité de coloration de l'écorce ou de la pulpe. MACKINNEY constate (18) que les clémentines ont une coloration plus intense que les mandarines Satsuma. Or d'après CURL, l'écorce de Satsuma contient 176 mg/kg de caroténoïdes et l'écorce de clémentine seulement 117 mg/kg. La différence est aussi très importante dans la pulpe : 24 mg/kg pour la Satsuma et 18 mg/kg pour la clémentine. Les caroténoïdes absorbent les rayons lumineux dont la longueur d'onde correspond au vert ou au bleu et leur couleur est déterminée par la lumière qu'ils reflètent (11). L'absorption dépend du nombre de doubles liaisons conjuguées.

TABLEAU 2 - Formules développées de quelques caroténoïdes.

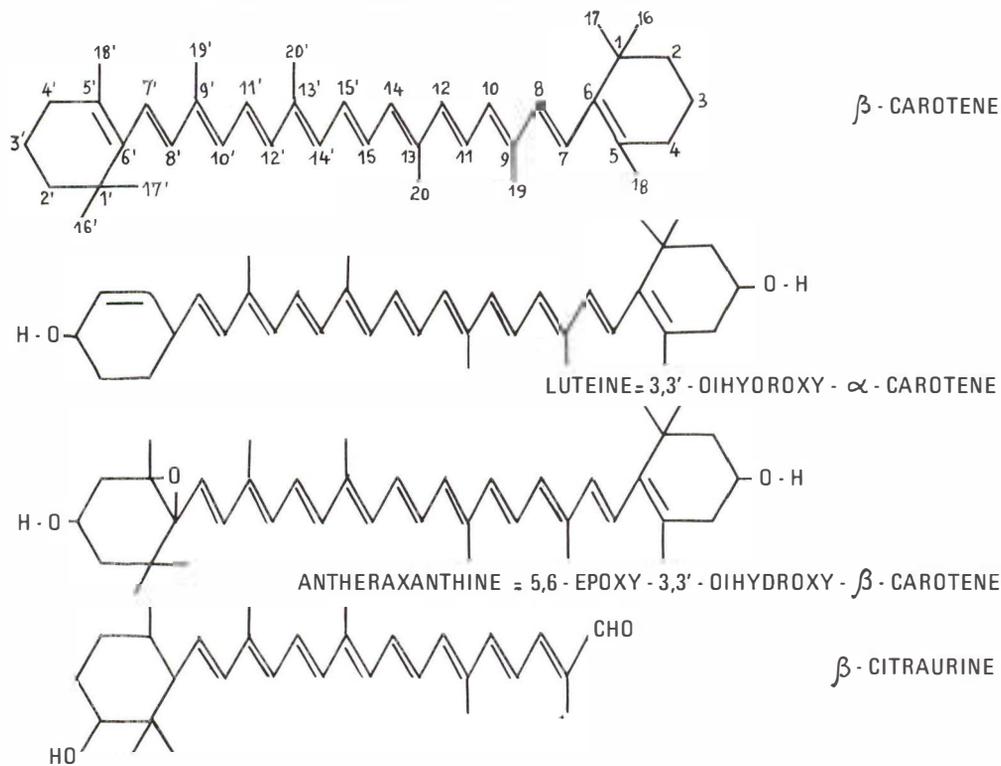


TABLEAU 3 - Composition des jus de trois cultivars de Citrus en caroténoïdes - $\mu\text{g p. } 100 \text{ ml jus}$ (Ivan STEWART, 28).

	Hamlin (orange)	Dancy (tangéline)	Orlando (tangelo)
α - carotène	0,7	9,6	4,4
β - carotène	1,6	28,7	6,0
ζ - carotène	3,7	94,5	15,7
α - cryptoxanthine	1,1	14,2	5,4
β - cryptoxanthine (1)	8,5	155,0	9,2
Lutéine	10,0	127,0	32,0
Anthéroxanthine	12,0	83,0	46,0
Violaxanthine	10,0	28,0	25,0
Cis-anthéroxanthine	33,0	205,0	74,0
Cis-violaxanthine	26,0	81,0	42,0

guées que contient la molécule. Il en faut au minimum sept pour qu'une couleur d'abord jaune orangé soit perceptible. Quand le nombre de doubles liaisons conjuguées augmente la couleur passe par l'orangé puis le rouge. Le β -carotène, rouge orangé en possède onze de même que le lycopène qui, lui est franchement rouge. Mais dans le β -carotène deux doubles liaisons font partie des cycles terminaux de la molécule et leur contribution à la couleur s'en trouve réduite de moitié. (tableau 4).

EXTRACTION

Préparation de la matière première.

On estime généralement que la matière végétale doit être desséchée avant l'extraction des pigments caroténoïdes (15). Cependant la dessiccation sera conduite de façon ménagée si l'on veut éviter la dégradation des pigments par oxydation ou par action enzymatique (voir paragraphe : La stabilité des caroténoïdes) - séchage dans un courant d'air à 40-50°C

TABLEAU 4 - Maxima d'absorption dans l'hexane de différents carotènes et degré de conjugaison dans leur molécule (18).

	doubles liaisons			maxima du spectre (nm)		
	nombre total	conjuguées	équivalents effectifs			
α -carotène	11	10	9,5	475	445	420
β -carotène	11	11	10	480	450	425
ζ -carotène	12	11	10,5	490	460	435
lycopène	13	11	11	502	472	445

ou bien submersion dans un solvant déshydratant, acétone, méthanol, éthanol.

Pour des raisons d'économie d'énergie, certains auteurs préfèrent l'extraction directe sur le végétal hydraté (15, 31). Dans ce cas, l'opération dure plus longtemps et risque d'être moins complète. Ce dernier inconvénient serait compensé par la réduction des risques d'oxydation provoquée par le séchage.

D'après notre expérience, le broyage de la matière première revêt une grande importance. Ce sujet est peu traité dans la littérature. En général, on se contente d'un broyage grossier de la matière fraîche : morceaux d'écorces de 3,2 mm pouvant aller jusqu'à 12,5 mm (16). On semble craindre qu'un broyage trop fin ne conduise à la formation d'une pâte se prêtant mal à la filtration des solvants. Sur la matière végétale desséchée, il est plus facile de procéder à une mouture très fine.

Extraction proprement dite.

L'extraction des pigments caroténoïdes se fait avec des solvants organiques, en prenant les précautions d'usage pour éviter toute trace de peroxyde.

On divise les extraits en deux groupes suivant leur partition entre deux solvants non miscibles : méthanol, éther de pétrole par exemple (13).

- les caroténoïdes hypophasiques à deux ou plusieurs groupes hydroxylés solubles dans le méthanol - phase lourde ;
- les caroténoïdes épiphases, hydrocarbures, solubles dans l'éther de pétrole - phase légère.

On peut ajouter un troisième groupe, intermédiaire, dont les constituants monohydroxylés se partagent entre l'hypophase et l'épiphasse (20).

Ont été utilisés les solvants et mélanges de solvants suivants :

- l'hexane ou l'éther de pétrole (16) qui permet de se passer de la déshydratation,
- le benzène, le sulfure de carbone, le chloroforme (12),

- l'acétone (5, 25), le dichlorométhane (26), le méthanol (20),

- le mélange : acétone-hexane 40/60 (1),

- le mélange : éthanol-hexane 80/60 (1),

- le mélange : toluène, acétate d'éthyle, éthanol, eau 150/150/150/22,5 (1) pour les poudres sèches

- le mélange : éther de pétrole, éther éthylique, éthanol 20/10/10 (24), pour les jus d'agrumes, ou bien éther de pétrole, isopropanol 1/3 (12).

DUFOUR (8) préconise l'emploi d'un solvant partiellement soluble dans l'eau (solubilité 33 p. 100) et de bas point d'ébullition (42°C). L'emploi judicieux de ce solvant « permet d'obtenir avec des rendements très élevés des huiles essentielles d'une grande finesse d'arôme, colorées et contenant les antioxydants naturels du fruit ».

RITZENTHALER G. (19) estime que l'extraction des caroténoïdes en milieu humide par un solvant apolaire ne peut être que très incomplète car « l'eau des cellules protège les plastes du contact du solvant ». Il propose l'usage d'un mélange de solvants polaire et apolaire ; le premier déshydratant les cellules végétales et facilitant l'extraction des pigments caroténoïdes par le solvant apolaire. L'usage d'un mélange éthanol-terpènes d'orange est suggéré car ces solvants sont peu coûteux, naturels et peu inflammables. Après extraction et séparation des phases, la phase hydroalcoolique peut être une source de citroflavonoïdes.

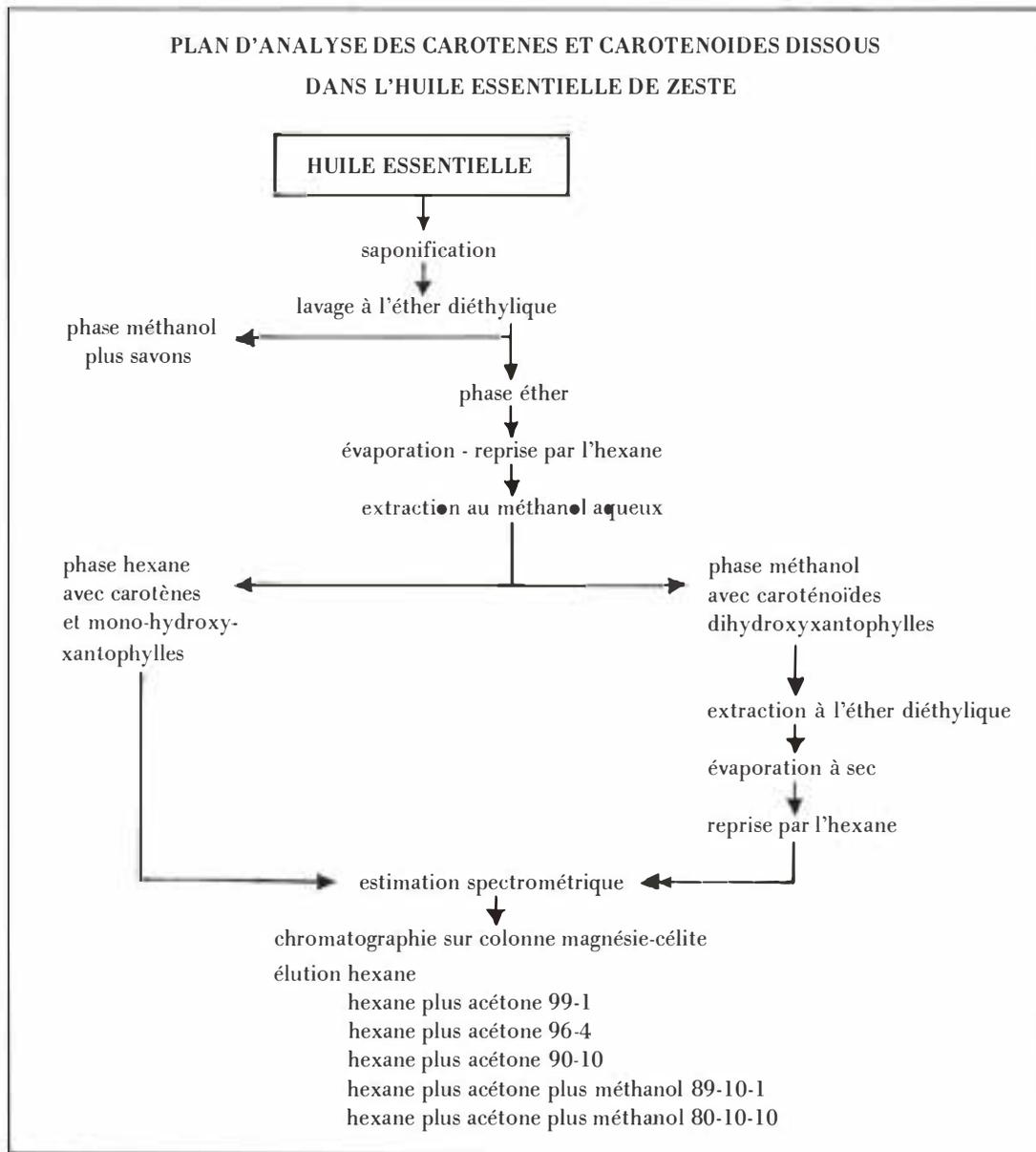
Saponification.

La saponification constitue un premier stade dans la purification des extraits. Elle répond à deux objectifs :

1. l'élimination des cires et l'obtention de xanthophylles sous la forme hydroxylée, à partir de leurs esters d'acides gras,
2. l'élimination des chlorophylles dont le noyau tétrapyrol perturbe la détermination spectrophotométrique des caroténoïdes.

Diverses techniques ont été utilisées :

- extraits acétoniques traités par une solution de potasse aqueuse à 15 p. 100 pendant 12 heures (20) ;



- solution éthéropétrolique, agitée 3 heures avec de la potasse méthanolique à 12 p. 100 (5, 13, 20) ;
- extraits amenés à sec et dissous dans la potasse méthanolique à 12 p. 100. Après 3 heures d'action, extraction des pigments à l'éther de pétrole (20) ;
- extraits éthéropétroliques évaporés au 1/3, lavés deux fois à la potasse méthanolique à 10 p. 100, puis lavés à l'eau jusqu'à pH 7,5 (15).

La saponification peut, dans certains cas, provoquer la formation d'artefacts. D'après I. STEWART, le β -citraurine ou le β -apo 8' caroténal se transforment par aldocondensation avec l'acétone ou d'autres cétones en arcticulaxanthine, citranaxanthine, ... (30).

Purification.

Les extraits bruts, tels qu'ils sont, ont pu être utilisés directement, par adjonction, pour renforcer les jus d'orange ou les concentrés de jus insuffisamment colorés. Cependant, même pour cet usage, on préfère recourir à une première purification, qui consiste à précipiter les pigments à partir d'une solution hydro-alcoolique. L'extrait brut est dissous dans le minimum de propanol - 30 ml/g - et la solution est diluée avec de l'eau 60/40. Les caroténoïdes précipitent. Récupérés par filtration ou en centrifugation, ils sont séchés sous vide, une heure à 40°C. Dans la solution hydro-alcoolique, on peut récupérer des citroflavonoïdes.

Pour des purifications ou séparations plus poussées, on a

recours aux transferts solvant-solvant ou à la perméation sur gel.

Transfert solvant-solvant.

On sépare grossièrement de cette façon hydrocarbures et xanthophylles (15). L'extrait brut se répartit entre deux phases de solvant : par exemple une phase légère d'éther de pétrole et une phase lourde de méthanol. Après séparation, la phase légère est lavée plusieurs fois au méthanol, puis à l'eau, séchée, et le solvant est extrait sous vide.

Les fractions méthanoliques sont ajoutées à la phase méthanol qui est lavée plusieurs fois à l'éther de pétrole. Les fractions éther de pétrole sont ajoutées à la phase éther de pétrole, avant le lavage à l'eau. La phase méthanolique est ensuite diluée avec de l'eau et extraite à l'éther. Après lavage à l'eau et séchage, le solvant est évaporé sous vide comme précédemment.

Perméation sur gel (33).

Cette méthode permet de séparer les pigments caroténoïdes extraits des écorces d'agrumes par un solvant, ou contenus dans l'huile essentielle.

Un extrait à l'hexane ou une huile essentielle concentrée vingt fois sont chromatographiés sur une colonne remplie de Sephadex LH 20 ou de «Bio-beads 3 x 2». On élue avec du tétrahydrofurane et l'on récupère les fractions.

Par perméation sur gel, la récupération des pigments est deux fois plus rapide que par les autres méthodes ; la consommation de solvants est réduite et l'on sépare les fractions aromatiques (huiles essentielles). Le coût élevé du Sephadex est compensé par le fait que l'on peut réutiliser plusieurs fois la colonne.

Analyse et dosage.

Séparation sur colonne.

L'absorbant le plus généralement utilisé est un mélange de magnésie activée et de terre de diatomée 1/1 pour les extraits de plantes fraîches, ou un mélange de silicagel G et de terre de diatomée 1/1 pour les extraits de plantes desséchées (1). D'après STEWART (30) la chromatographie sur silice provoque la transformation de la violaxanthine en auroxanthine, c'est-à-dire le réarrangement de l'époxyde 5,6 en furanoïde 5,8.

MOUTOUNET (20), sur extrait de prune, a utilisé une poudre de cellulose microcristalline ; DI GIACOMO (7), sur agrumes, préconise l'oxyde d'aluminium, la chaux ou la magnésie ; CABIBEL (5), dans une étude sur la tomate a utilisé l'alumine désactivée par 1 p. 100 d'eau.

L'éluant peut être un mélange acétone-hexane 1-9 (AOAC)

(1), ou bien un mélange acétone hexane à concentration croissante en acétone pour éluer en premier lieu les hydrocarbures, puis les monohydroxy et les dihydroxy et enfin le reste des xanthophylles.

COSTES, d'après MOUTOUNET (20), en chromatografiant sur poudre de cellulose, a donné les précisions suivantes :

1. éluant : éther de pétrole pur : on recueille le bêta-carotène ;
2. éluant : éther de pétrole-acétone 97-3 : on recueille la lutéine ;
3. éluant : éther de pétrole-acétone 93-7 : on recueille la violaxanthine, la lutéoxanthine, l'auroxanthine ;
4. éluant : éther de pétrole-acétone 90-10 : (néochrome ?).

Il semble donc que la poudre de cellulose retienne moins fortement les xanthophylles que le mélange magnésie-terre d'infusoire.

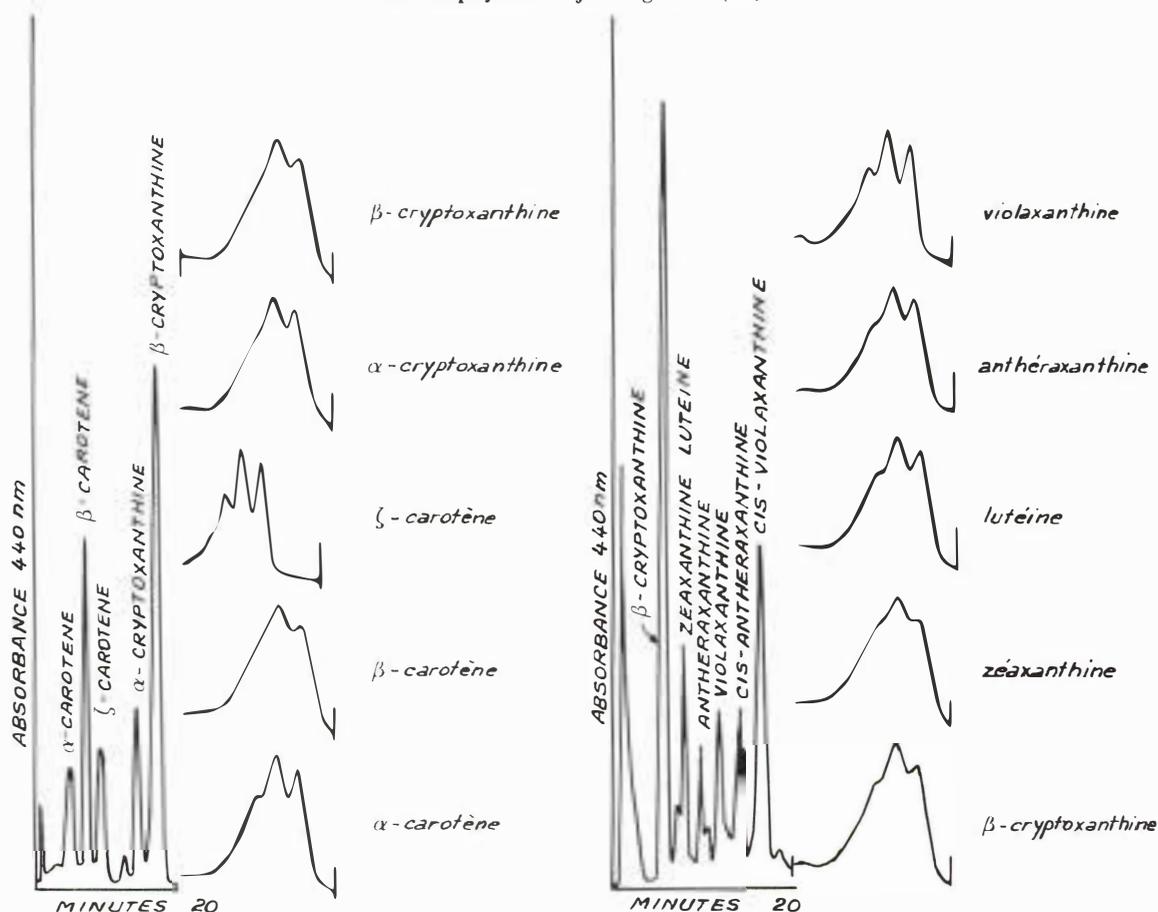
CABIBEL (5) citant KUSHWAHA et col., élue les carotènes retenus sur alumine avec un mélange éther éthylique-éther de pétrole dont les rapports varient de 3 à 100 p. 100 d'éther éthylique.

<u>éther éthylique/éther de pétrole</u>	<u>carotènes obtenus</u>
3 - 7 p. 100	Cisphytofluène
7 - 10	α -carotène
10 - 15	Transphytofluène
15 - 30	β -carotène
35 - 45	ϵ -carotène
50 - 65	ζ -carotène
70 - 75	ν -carotène
85 - 90	Neurosporène
95 - 100	Lycopène

On remarquera que l'élution du lycopène demande de l'éther éthylique pur. Les carotènes de l'orange Sarah ont été chromatographiés par MONSELISE et HALEVY (19), suivant la méthode AOAC. Cependant le lycopène, rouge, caractéristique de cette variété, n'a été décroché que par un mélange méthanol-hexane (5-95). Nous nous sommes inspirés de cette méthode pour caractériser le lycopène dans les oranges Vainiglia-Sanguigno et dans les citrons roses de Souihla-Maroc (13).

I. STEWART (28) a séparé carotène et xanthophylles du jus d'orange par chromatographie liquide à haute performance. Après avoir alcalinisé le jus pour éviter l'isomérisation des époxydes et extrait les caroténoïdes, l'auteur sépare les carotènes et la cryptoxanthine sur colonne de magnésie et les xanthophylles sur une colonne de silice à haute capacité (PELLOSIL). Pour le Phytofluène l'éluant est un mélange d'acétone et d'hexane 1/99 et pour les xanthophylles, un mélange gradient d'alcool amylique tertiaire et d'hexane.

Graphique : chromatogrammes HPLC et spectres d'absorption visible des principaux carotènes et xanthophylles des jus d'agrumes (28).



Séparation par chromatographie sur couche mince.

On peut détailler le contenu des diverses fractions d'éluant par chromatographie sur couche mince.

Dans une étude très complète des caroténoïdes de l'orange Shamouti, GROSS et col. (12) ont utilisé cette technique pour séparer et identifier carotènes et xanthophylles. Les supports et les éluants ont été choisis de la façon suivante, en fonction de la composition des éluants (tableau 5).

IDENTIFICATION

Si l'on possède les composés purs témoins, les identifications peuvent se faire par cochromatographie. On peut également procéder par comparaison des spectres d'absorption. Enfin quelques tests chimiques sont utilisables : test de réduction des groupes carbonylés (10), test des époxydes DAVIES (10). Dernièrement l'usage de la spectrométrie de masse à haute résolution et de la résonance magnétique nucléaire a grandement facilité l'identification de composés

difficiles à isoler (30).

Détermination quantitative.

La détermination quantitative des caroténoïdes s'effectue par spectrophotométrie de la solution de l'extrait dans le solvant ou le mélange de solvant.

Soit A : l'absorbance mesurée à la longueur d'onde du maximum d'absorption,

$$C = \frac{A}{E \frac{100}{1 \text{ cm}} \times L}$$

$E \frac{100}{1 \text{ cm}}$ le coefficient d'extinction du caroténoïde mesuré dans un solvant donné,
 C la concentration en gp. cent ml de solution
 L le trajet optique du rayon lumineux dans la solution en cm

Pour le carotène en solution dans l'hexane, le maximum d'absorption se situe à 452 nm et le coefficient d'extinction

TABLEAU 5 - Séparation des caroténoïdes de l'orange Shamouti d'après J. GROSS, M. GADAI et A. LIFSHITZ (12).

fractions	composants	éléments de la colonne MgO - Hyflosupercel	C C M	
			adsorbant	solvant
I	hydrocarbures	2 - 5 p. 100 acétone dans EP	Ca (OH) ₂ -Silicagel G 6 : 1	EP - benzène 98 : 2
		5-10 p. 100 acétone dans EP	Ca (OH) ₂ -MgO 1 : 1 Oxyde d'al.-G	EP EP
II	monols	10 p. 100 acétone dans EP		EP - acétone 98 : 2 EP - acétone 95 : 5
III	diols	10 p. 100 acétone dans EP plus Et OH - 97 : 3	Silicagel	EP - ac. d'éthyle - Isopropanol - 95-10-5 et EP acétone 80 : 20 EP.- ac. d'éthyle - Isopropanol - 95-10-5 et CH ₂ Cl ₂ - acét. éthyle 80 : 20
IV	polyols			EP - AE - IP - 95-10-5 et acét. - EP - 40-60

EP : éther de pétrole

$$E \frac{1 \text{ p. } 100}{1 \text{ cm}} = 2.560$$

Cependant ces données ne sont pas directement applicables à un mélange de caroténoïdes dont le maximum d'absorption et le coefficient d'extinction diffèrent (tableau 6).

L'AOAC, par exemple, exprime ainsi les résultats :

• Carotènes :

A : absorbance

b : trajet optique en cm dans la solution

d : facteur de dilution

f : facteur de déviation de l'instrument

$$C_{\text{mg/lb}} = \frac{A436 \times 454 \times f}{196 \times b \times d} \quad C_{\text{ppm}} = \frac{A436 \times 454 \times f \times 2,2}{196 \times b \times d}$$

• Xanthophylles

$$C_{\text{mg/lb}} = \frac{A474 \times 454 \times f}{236 \times b \times d} \quad C_{\text{ppm}} = \frac{A474 \times 454 \times f \times 2,2}{236 \times b \times d}$$

Le solvant étant un mélange acétone-hexane 1/9.

STABILITE DES CAROTENOIDES

D'une façon générale, les caroténoïdes sont instables à la lumière et en présence d'air. Les phénomènes de dégradation sont accélérés sous l'action de la température. Cependant, leur nature et leur intensité dépendent largement du type de caroténoïdes et du milieu dans lequel se trouve le pigment.

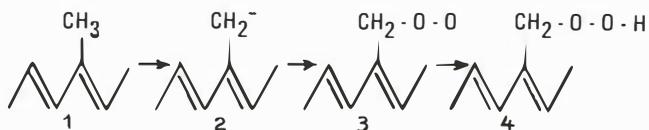
TABLEAU 6 - Coefficients d'extinction $E \frac{1 \text{ p. } 100}{1 \text{ cm}}$ des caroténoïdes à la longueur d'onde des maxima d'absorption respectifs (7).

Caroténoïdes	$E \frac{1 \text{ p. } 100}{1 \text{ cm}}$	solvants
Phytoène	1.220	Iso-octane
Phytofluène	1.350	Hexane
α -carotène	2.710	Hexane
	2.020	CS ₂
Néo- β -carotène U	2.520	Hexane
β -carotène	2.560	Hexane
	1.940	CS ₂
ζ -carotène	2.270	Hexane
γ -carotène	2.720	Hexane
Lycopène	3.470	Hexane
Mutatochrome	1.900	Ethanol
Cryptoxanthine	2.430	Benzène
	2.460	Hexane
Lutéine	1.910	CS ₂
	2.600	Ether
	2.550	Ethanol
Zéaxanthine	1.850	CS ₂
	2.480	Ethanol
	2.110	Benzène
Flavoxanthine	2.550	Benzène
Violaxanthine	2.550	Ethanol
Néoxanthine	2.270	Ethanol
Auroxanthine	1.850	Ethanol
Capsanthine	1.790	Benzène
Fucoxanthine	1.100	Hexane

A l'air et à la lumière, le bêta-carotène cristallisé perd 25 p. 100 de son absorbance maximale, à 20°C, en six semaines. Dans les mêmes conditions, à 45°C, la perte d'absorbance est totale (5).

L'oxydation peut se produire directement ou par l'intermédiaire du milieu dans lequel se trouvent les caroténoïdes.

Par exemple, l'oxydation photochimique qui fait intervenir l'oxygène excité (oxygène singulet), peut former un radical libre sur un groupe CH₃ en alpha d'une double liaison.



Ce radical (2) évolue vers un peroxyde (3) et aboutit à un hydroperoxyde (4).

Que ce soit par oxydation photochimique ou par tout autre processus d'oxydation, il se forme divers intermédiaires tels que époxydes, hydroperoxydes, endoperoxydes, qui sont instables et se dégradent rapidement. On explique de cette façon la formation de bêta-ionone au cours du séchage du thé ... Le bêta-carotène oxydé en solution benzénique donne naissance aux 5-6-mono-époxydes, aux 5-6, 5', 6'-diépoxydes et aux semicaroténones. Une oxydation plus énergique casse la molécule du bêta-carotène en acétaldéhyde, 2-méthylpropanol, butanol, diacétyle et pentanol. Mais l'attaque se produit le plus fréquemment sur les cycles en bout de chaîne (6).

En solution ou en suspension dans les huiles et graisses non oxydées, les caroténoïdes sont stables. Cependant l'oxydation de ces substances provoque la formation de peroxydes.

Un phénomène semblable peut se produire dans les huiles essentielles aérées et oxydées. Les huiles essentielles d'agrumes, extraites à froid, sont colorées par les caroténoïdes de l'écorce du fruit. L'oxydation par l'air, favorisée par des traces d'humidité, provoque une décoloration pratiquement totale en quelques semaines et le dégagement d'une odeur caractéristique.

Dans l'écorce des oranges, des mandarines, des citrons et des pomélos, les caroténoïdes sont bien protégés contre ces phénomènes par la présence de composants fortement réducteurs - acide ascorbique, orthodiphénols - le flavédo d'orange contient trois fois plus d'acide ascorbique que la pulpe. Cependant le séchage de la matière végétale à trop forte température peut provoquer une perte notable de caroténoïdes : plus de 50 p. 100 à partir de 100°C, de 80 à 95 p. 100 à 140°C (4). Pendant l'entreposage des écorces séchées, la stabilité des caroténoïdes est bonne si la température est suffisamment basse (moins 23°C). Mais à tempéra-

ture ambiante, des dégradations se produisent et l'addition d'anti-oxydants comme le BHA, le BHT, le PG, est peu efficace (4).

TING et HENDRICKSON (31) signalent qu'une action enzymatique de dégradation des caroténoïdes est à craindre entre les opérations de «désuilage» de l'écorce et le séchage. Cette remarque est à rapprocher de l'observation de ROVESTI (26) sur l'action des «moisissures et des ferments qui attaquent fortement la constitution des caroténoïdes (des écorces d'agrumes) en les oxydant», vraisemblablement par voie enzymatique. CHICHESTER (6), tout en minimisant cette action dans les tissus de fruits, précise que les agents de destruction catalytiques de caroténoïdes dans les fruits sont des oxydases de graisses insaturées et des peroxydases. Par oxydations couplées, les réactions aboutissent à la formation d'aldéhydes à longue chaîne.

Dans les jus d'agrumes, la coloration est stable et les opérations de pasteurisation ou de concentration sont pratiquement sans effet sur les caroténoïdes. Il convient cependant, pour éviter le brunissement non enzymatique destructeur d'acide ascorbique, d'entreposer les jus et concentrés à basse température. KEW et col. (16) ont étudié la stabilité de coloration des jus et concentrés d'orange enrichis en extraits de caroténoïdes. La coloration des jus est stable à plus 1°C pendant plus de dix semaines. Les concentrés congelés sont stables en coloration pendant plus de six mois à moins 20°C et à l'abri de la lumière. CURL et BAILY, 1959, cités par MOUTOUNET (20) indiquent que dans la préparation des poudres de jus d'orange une partie des caroténoïdes 5-6 époxydes qui composent les deux tiers des pigments, sont isomérisés en 5-8 et un stockage pendant six mois à 37°C entraîne pratiquement la disparition de tous les pigments 5-6 époxydes. La dessiccation de la matière végétale dans de bonnes conditions améliore la stabilité des pigments, jusqu'à un seuil critique, cependant, au-delà duquel la stabilité diminue (6). Un film d'eau rémanent agirait comme barrière au libre passage de l'oxygène.

Les phénomènes d'oxydation ne sont pas les seuls responsables de la décoloration des caroténoïdes.

Dans la nature les caroténoïdes se trouvent, assure-t-on généralement, sous la forme tout trans. Extraits et isolés de leur milieu naturel, soumis sans protection à l'action de la lumière ou de la température, une stéréomutation de la molécule se produit conduisant à l'apparition d'isomère cis. Cette isomérisation s'accompagne d'un affaiblissement de la couleur, les maxima d'absorption du spectre se déplaçant vers les courtes longueurs d'onde (11, 18). Il apparaît en outre un pic «cis» supplémentaire situé à 143 nm du maximum le plus élevé en longueur d'onde, pratiquement le pic «cis» est situé au début de l'ultra-violet.

Nous avons fait dans notre laboratoire l'observation suivante (14): Des extraits d'huile essentielle d'orange riches

en caroténoïdes, fraîchement préparés, présentent deux maxima d'absorption : l'un à 464 nm, l'autre à 434 nm. Entreposés au froid à 3°C ou même à température ambiante mais à l'obscurité, les maxima d'absorption ne subissent pas de variation de longueur d'onde pendant au moins sept mois.

A température ambiante, mais à la lumière du jour, ces maxima s'estompent au bout de six mois et font place à trois autres maxima situés respectivement à 443, 422 et 399 nm. A l'obscurité mais à 40°C un déplacement identique des maxima est atteint au bout de trois mois.

BIBLIOGRAPHIE

1. AOAC
Official Methods of Analysis.
11e ed. 1970 - Carotenes in fresh plant materials and silage, p. 769.
Carotenes and xanthophylls in dried plant materials, p. 770-771.
2. BERRY (R.E.), BISSETT (O.W.) et KEW (T.J.).
Orange peel color extract.
J. of Food Science, 1971, vol. 36, p. 367-369.
3. BERRY (R.E.), WILSON III (C.W.) and BISSETT (O.W.).
Recovery of natural orange pigments : an improved method applied to Citrus processing wastes.
J. of Food Science, 1972, vol. 37, p. 804-811.
4. BRADDOCK (R.J.) and DESTERSON (J.W.).
Stabilization of carotenoids in dried Citrus flavedo.
J. of Food Science, 1974, vol. 39, p. 712-714.
5. CABIBEL (M.).
Evolution de la teneur en caroténoïdes de la tomate en fonction de la maturation et des conditions culturales.
D.E.A. Sciences alimentaires, ENSAM-INSIAT-USTL, 1976.
6. CHICHESTER (C.) and Mc FEETERS (R.).
Pigment degeneration. II. - Carotenoids - in the Biochemistry of fruits and their products.
A.C. HULME, vol. II, p. 708-711.
7. DI GIACOMO (A.I.).
Carotenoidi degli Agrumi.
Stazione sperimentale per l'industria delle essenze e dei derivati agrumari, Reggio Calabria, 1970.
8. DUFOUR (M.).
Brevet n° 73 23836, du 29.6.1973, n° publication 2.235.190.
9. FURIA (T.A.).
Handbook of food additives, 1968.
Color additives in food - The carotenoids, p. 36-38.
Antioxydants and food stabilizers, p. 213 et 217.
10. GOODWIN (T.W.) and GOAD (L.J.).
Carotenoids and triterpenoids in Biochemistry of fruits and their products. Chap. 12.
A.C. HULME, vol. 1, p. 312-315.
11. GROSS (J.).
Carotenoid pigments in Citrus
in *Citrus Science and Technology*, 1977, vol. I, chap. 8, p. 302-354.
12. GROSS (J.), GADAI (M.) and LIFSHITZ (A.).
Carotenoids in juice of Shamouti orange.
J. of Food Science, 1971, vol. 36, p. 466-473.
13. HUET (R.) et CHAPOT (H.).
Oranges et citrons roses.
Al Awamia, avril 1974, n° 11, p. 21-29, Rabat.
14. HUET (R.).
Obtention à partir d'agrumes, d'huiles essentielles riches en caroténoïdes.
Compte rendu de recherche financée par la DGRST. Décision d'Aide 77.7.0597, fev. 1979
15. KARRER (P.) and JUCKER (E.).
Carotenoids. chap. III.
The isolation of carotenoids - Elsevier Publishing Co. Inc., 1950.
16. KEW (J.) and BERRY (R.E.).
Citrus product color enhancement using extracts of peel of different varieties.
J. of Food Science, 1970, vol. 35, p. 436-439.
17. KLAUI (H.) and RAUNHARDT (O.).
Colouring of foods with carotenoids.
Aliments, 1976, vol. 15, n° 2, p. 37-45.
18. MACKINNEY (G.).
Coloring matters.
in : *The orange*, ed. W.B. Sinclair, 1961, chap. 10, p. 302-327.
19. MONSELISE (S.P.) and HALEVY (A.H.).
Detection of lycopene in pink orange.
Fruit Science, may 1961, vol. 133, n° 3463, p. 1478.
20. MOUTOUNET (M.).
Les caroténoïdes de la prune d'Ente et du pruneau d'Agen.
Ann. Technol. Agric., 1976, 25 (1), p. 73-84.
21. PHILIP (T.).
The nature of carotenoid esterification in tangerines.
J. of Food Science, 1973, vol. 38, p. 1032-1034.
22. QUACKENBUSH (F.W.), DYER (M.A.) and SMALLIDGE (R.L.).
Analysis for carotenes and xanthophylls in dried plant materials.
J. of AOAC, 1970, vol. 53, n° 1, p. 181-185.
23. RITZENTHALER (G.).
Brevet n° 75 21310 du 2.7.1975 - déposant : Centrale d'Achats coopératifs - n° publication 2.316.323.
24. ROCHE.
Le béta-carotène «Roche»
Bulletin technique F. Hoffmann La Roche et Cie, 1968
25. ROTHER (H.).
Sur la détermination du carotène et des caroténoïdes dans les jus d'oranges.
Zick-Zack Werke - Rudolf Wild - Heidelberg.
26. ROVESTI (P.).
Extraction des caroténoïdes d'orange au moyen de chlorure de méthylène.
Rivista italiana Essenze, Profumi, Piante Officinali, juni 1976, vol. 58 (6), p. 294-304.
27. SCHNEIDER (H.).
The Anatomy of Citrus.
in : *The Citrus Industry*, vol. II, p. 17 edit. by W. Reuther, L.D. Bachelot et H.J. Webben.
28. STEWART (Ivan).
High performance liquid chromatographie determination of provitamin A in orange juice.
J. of the AOAC, 1977, vol. 60, n° 1, p. 132-135.
29. STEWART (I.) and WHEATON (T.A.).
Carotenoid in Citrus.
Florida Agricultural Exp. Sta., Journal series n° 4887.
30. STEWART (I.).
Citrus color. A review.
Proc. Int. Soc. Citriculture, 1977, vol. 1.
31. TING (S.V.) and HENDRICKSON (R.).
Enhancing color of orange juice with natural pigments from orange peel.
Florida Agric. Exp. Station, Journal series n° 3111, 1968.
32. WILSON III (C.W.), BISSETT (O.W.) and BERRY (R.E.).
Three types of Citrus peel wastes as source of color.
J. of Food Science, 1971, vol. 36, p. 1033-1035.
33. WILSON III (C.W.), SCHAW (P.E.) and KIRKLAND (C.L.).
Improved method for purifying crude Citrus pigments.
Florida State Horticultural Society, 1975, p. 314-318.