

Séparation, identification et dosage de la coumarine dans les arômes à base d'huiles essentielles d'agrumes

Autor(en): **Martin, E. / Berner, Ch.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **62 (1971)**

Heft 4

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983583>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

benzoic, salicylic, *o*-chlorobenzoic, sorbic, formic and *m*-chlorobenzoic acids. On the other hand the following compounds reduce the biosynthesis of RNA and DNA in animal cells significantly: *p*-hydroxybenzoic acid, its methyl, ethyl, and propyl esters, sodium salts of these esters, and *p*-chlorobenzoic acid. All compounds tested do not significantly influence the protein content of animal cells under the stated experimental conditions.

The incorporation of ^{32}P , fed as Na_2HPO_4 to whole cells, into RNA and DNA was studied. Ethyl *p*-hydroxybenzoate, added to the culture medium (0,2 g/l), clearly interfered with the incorporation of ^{32}P . The observations with isotopes confirm the results obtained from a culture without added ^{32}P .

The esters of *p*-hydroxybenzoic acid raise reservations with hygienists because of their local anesthetic properties and of their interfering influence on the biosynthesis of RNA and DNA, as described in this paper.

Literatur

1. *Parker R. C.*: Methods of Tissue Culture. Paul B. Hoeber, New York (1950).
2. *Morzycki J.*: Postepy Hig. Med. Dośw. **9**, 87 (1955).
3. *Schneider W. C.*: J. Biol. Chem. **161**, 293 (1945).
4. *Ramachandran L. K.* und *Fraenkel-Conrat H.*: Arch. Bioch. Bioph. **74**, 224 (1958).
5. *Ishihara H.*: Analyt. Biochem. **3**, 186 (1962).
6. *Burton K.*: Bioch. J. **62**, 315 (1956).
7. *Rees K. R.*, *Rowland C. F.* und *Varcoe J. S.*: Brit. J. Cancer **19**, 72 (1965).
8. Joint *FAO/WHO* Expert Committee on Food Additives 1966, p. 23, Toxicological Evaluation of Some Antimicrobials, Antioxidants, Emulsifiers, Stabilizers, Fluor Treatment Agents, Acids and Bases.
9. *Bubnoff M.*, *Schnell D.* und *Vogt-Moykoff J.*: Arzneimitt.-Forsch. **7**, 340 (1957).

Séparation, identification et dosage de la coumarine dans les arômes à base d'huiles essentielles d'agrumes

E. Martin et Ch. Berner
Laboratoire Cantonal de Chimie, Genève

1. Introduction

La coumarine est présente dans de nombreux végétaux. La fève de Tonka (*Dipterix odorata*) en contient jusqu'à 4 %. Elle est aussi préparée par synthèse. La coumarine est utilisée dans l'industrie des arômes en tant que stabilisateur, renforçateur et fixateur.

Sa toxicité aux concentrations dans les aliments est discutée. Ainsi aux Etats-Unis, la coumarine n'est pas admise. En revanche dans d'autres pays elle est

tolérée à raison de 5 ppm dans les denrées et de 10 ppm dans les boissons alcooliques. Son utilisation en Suisse n'est pas réglementée si ce n'est qu'il est recommandé de lui substituer des dérivés.

M. Nicolli (1) a décrit une réaction colorée qui permet de détecter sa présence. Elle peut être mise en évidence également par chromatographie sur papier (2), par chromatographie sur couche mince (3, 4) et par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de succinate d'éthylène glycol (polyester) (5).

L'acide correspondant de cette lactone absorbe dans l'ultra-violet à 270 nm. Cette propriété permet son dosage (6).

Dans un arôme destiné à la préparation d'articles de boulangerie, arôme composé principalement d'huiles essentielles d'agrumes, nous avons mis en évidence la présence de coumarine. Il nous a paru intéressant d'effectuer le dosage de cette lactone au moyen d'un équipement particulier.

2. Principe

La coumarine est séparée par extraction liquide-liquide puis purifiée par chromatographie sur couche mince. L'identification est effectuée par spectrophotométrie infra-rouge et chromatographie en phase gazeuse.

Le dosage est effectué directement sur l'arôme chromatographié sur couche mince. Après migration la coumarine est transformée en acide coumarique fluorescent. L'intensité de la fluorescence est enregistrée au moyen d'un lecteur de plaque.

3. Appareillage

- Entonnoirs à décanter de 250 ml;
- Pipettes Drummond «Microcaps» 1 μ l;
- Evaporateur rotatif;
- Spectrophotomètre Beckman IR-8;
- Dispositif «Carle» pour fabriquer les pastilles de KBr;
- Chromatographe en phase gazeuse Perkin-Elmer 900 avec enregistreur Perkin-Elmer 165;
- Spectrophotomètre Zeiss PMQ II avec lampe de mercure Zeiss st 41;
- Lecteur de plaque Camag «Z Scanner»;
- Enregistreur Perkin-Elmer 165 avec alimentation;
- Lampe Camag Repro Star;
- Etaleur pour couches minces Shandon;
- Chromatocharger Camag;
- Cuve pour le développement des couches minces; cette cuve est recouverte intérieurement d'une feuille de papier; on verse dans cette cuve 120 ml de chloroforme;
- Cuve pour le développement rapide: il s'agit d'un poudrier de 6 cm de diamètre et 10 cm de hauteur dans lequel on verse 10 ml de chloroforme;
- Plaques de verre de 20 cm \times 20 cm pour chromatographie sur couche mince;

- Feuilles d'aluminium CCM gel de silice F₂₅₄ Merck (épaisseur de couche 0,25 mm), 60 mm × 40 mm;
- Tube de verre effilé aux deux extrémités et dans lequel un tampon de laine de verre a été introduit avant la formation du deuxième effilement (fig. 1a): diamètre extérieur du tube de verre 7,5 mm; diamètre intérieur 5,0 mm; longueur totale (y compris les deux effilements) 150 mm.

4. Réactifs

- Chloroforme rectifié par distillation;
- Hexane purum rectifié par distillation;
- Ether diéthylique purifié: à 2 litres d'éther ajouter 1 ml de solution de Fehling I, 20 g de zinc en poudre, 20 ml d'eau distillé. Laisser reposer 24 heures à l'obscurité. Rectifier par distillation et sécher sur Sikkon;
- Solution à 10 % de KOH dans le méthanol (révélateur de la coumarine);
- Solution à 10 % de Na₂CO₃ dans l'eau;
- Solution à 5 % de NaOH dans l'eau;
- H₂SO₄ (1+4);
- Gel de silice Merck F₂₅₄;
- KBr Merck pro anal.

5. Mode opératoire

5.1. Séparation et identification de la coumarine

5.1.1. Séparation de la coumarine par extraction liquide-liquide

Dissoudre 5,0 g d'arôme dans 100 ml d'hexane (solution A). Extraire A 2 fois avec chaque fois 20 ml de solution de Na₂CO₃. Séparer les phases aqueuses E₁. Laver A avec 2 fois 10 ml d'eau distillée et additionner ces eaux de lavage à E₁ et extraire le mélange avec 10 ml d'hexane. Ajouter cette phase organique à A. E₁ contient les sels sodiques des acides. La phase A totale est extraite avec 2 fois 20 ml de solution de soude caustique. Séparer les phases aqueuses P₁. Laver A jusqu'à neutralité avec H₂O. Les eaux de lavage sont additionnées à P₁. Extraire le phase P₁ totale avec 10 ml d'hexane. Ajouter cette phase organique à A. La phase P₁ acidifiée est extraite 4 fois avec chaque fois 20 ml d'éther. L'extrait étheré est séché sur Na₂SO₄ anhydre. Filtrer, évaporer à basse température sous pression réduite; le résidu contient la coumarine. Une chromatographie sur couche mince sur feuille d'aluminium de 60 mm × 40 mm permet de le vérifier. La migration est effectuée avec du chloroforme dans la cuve à développement rapide.

5.1.2 Purification de la coumarine par chromatographie sur couche mince préparative

Le résidu est déposé quantitativement sous la forme d'une solution chloroformique sur une couche mince de gel de silice F₂₅₄ (0,5 mm d'épaisseur). La bande a une longueur de 15 cm. Elle est disposée à 2,5 cm du bas de la plaque. A côté de la bande on dépose 1 µl de solution contenant 10 µg de coumarine / ml

de chloroforme. Une ligne d'arrêt est tracée à l'aide d'une pointe à 12.5 cm du bas de la plaque. La distance de migration est de 10 cm. La cuve étant saturée, placer la plaque dans la cuve maintenue en position inclinée (à l'aide de 2 cales placées sous la cuve) de telle façon que le bas de la plaque ne trempe pas dans le chloroforme. Attendre 15 minutes. Sans ouvrir la cuve enlever les cales et remettre doucement la cuve en position verticale. Le solvant migre jusqu'à la ligne d'arrêt. Sortir la plaque, la laisser 15 minutes à l'air puis refaire une deuxième migration en introduisant le bas de la plaque directement dans le chloroforme. Laisser à l'air 30 minutes. Pulvériser le révélateur de telle façon que seules, l'extrémité de la bande et la tache témoin soient révélées. Pour cela protéger la plus grande partie de la bande avec une plaque de verre de 20 cm \times 20 cm.

Sous un éclairage de 366 nm la fluorescence de l'acide coumarique est visible. Pour marquer la bande de la coumarine examiner la couche mince à 254 nm. Prélever la bande au moyen d'un tube de verre effilé aux 2 extrémités. Relier au vide l'extrémité du tube contenant la tampon de laine de verre et gratter avec l'autre extrémité la bande de silicagel (figure 1a). Le silicagel est aspiré dans le tube et retenu sur le tampon de laine de verre. Quand la bande est entièrement récoltée on place le tube comme indiqué dans la figure 1b. Eluer avec 10 ml de chloroforme en imposant une légère surpression si le débit est trop lent.

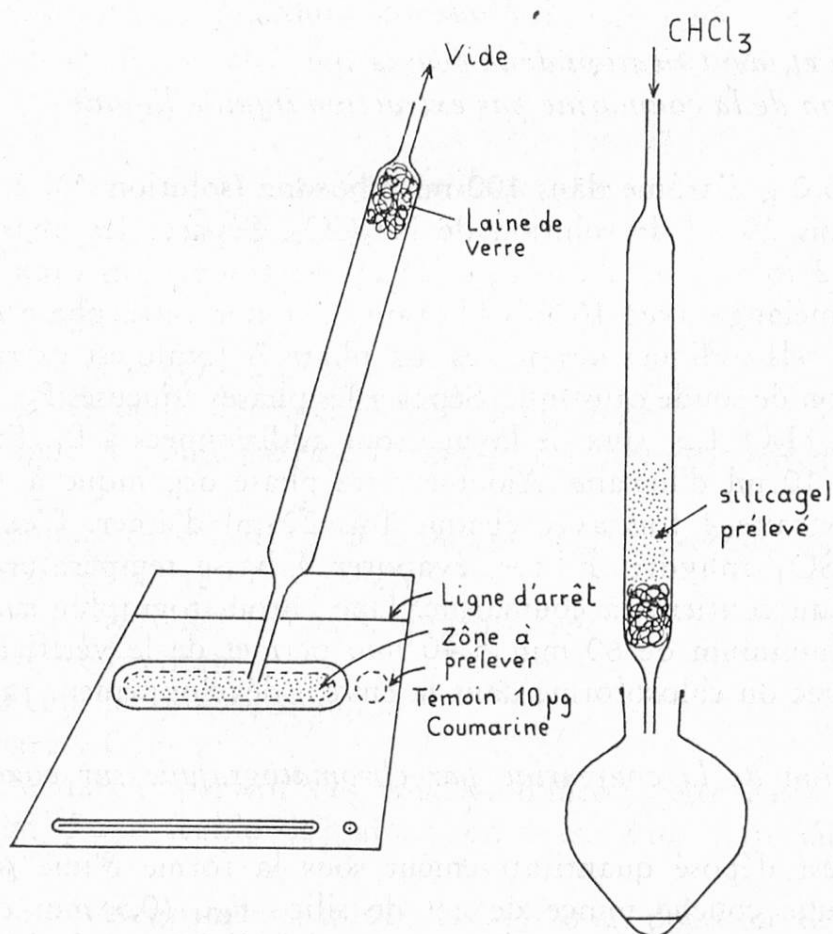


Figure 1a

Figure 1b

La coumarine se trouve dans l'éluat que l'on concentre à quelques gouttes pour la spectrophotométrie infra-rouge.

5.1.3. Spectre infra-rouge de la coumarine

Avec le dispositif de Carle faire une micropastille de KBr de 5 mm de diamètre. Pour cela prendre 2 mesures de KBr (prendre la grande mesure) et les verser dans le petit mortier en agathe. Ajouter la solution chloroformique de coumarine. Sécher 5 minutes à l'étuve à 103—105 ° C. Introduire dans le mortier 2 billes d'agate. Fermer le mortier et l'agiter mécaniquement pendant 15 minutes. Ouvrir le mortier et prélever une mesure du mélange, la déposer dans la presse à l'aide du petit entonnoir. Mettre le piston en place et refermer la presse. Serrer à l'étau à l'aide d'une clef.

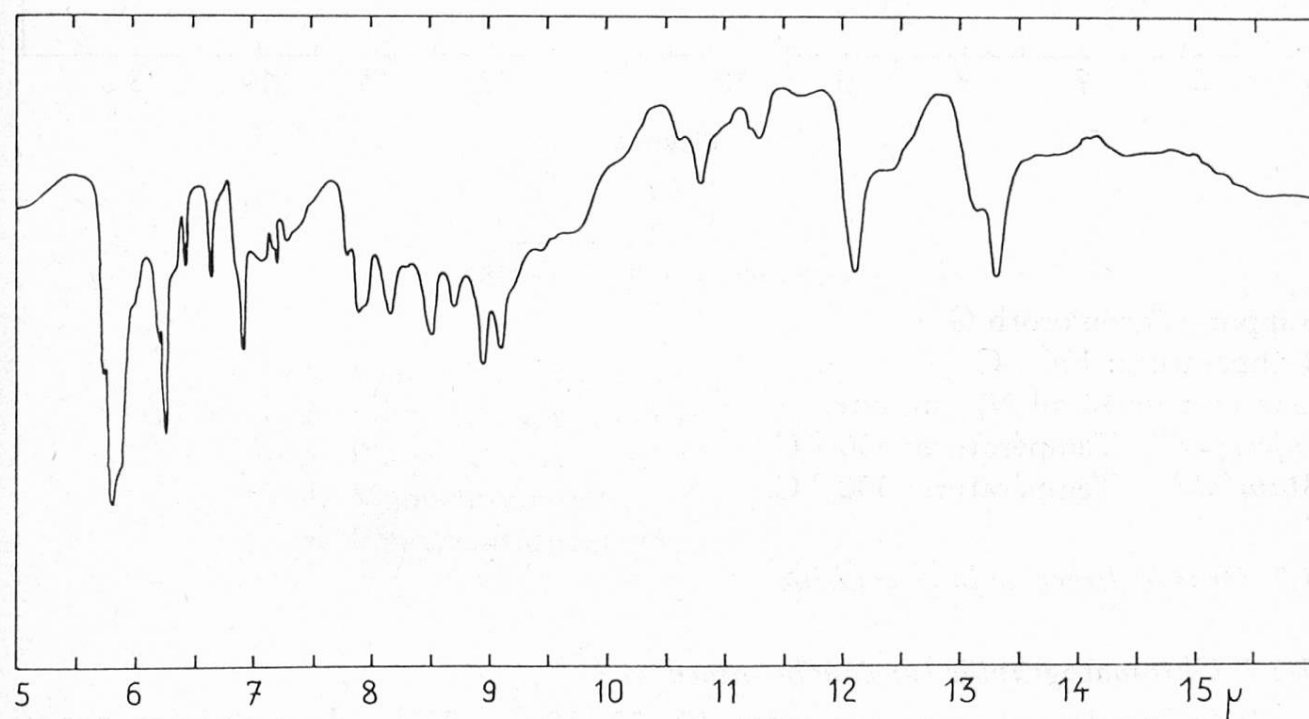


Figure 2

Attendre 1 minute. Défaire le dispositif et placer la pastille dans le spectrophotomètre. Enregistrer le spectre. Sur la figure 3 nous avons reproduit le spectre d'un échantillon de coumarine et sur la figure 2 celui du produit isolé. L'examen de ces spectres montre que le produit isolé est bien de la coumarine.

5.1.4. Chromatographie en phase gazeuse

Colonne Longueur: 2 m

Diamètre: $\frac{1}{8}$ "

Phase stationnaire: SE 52—2,5 %

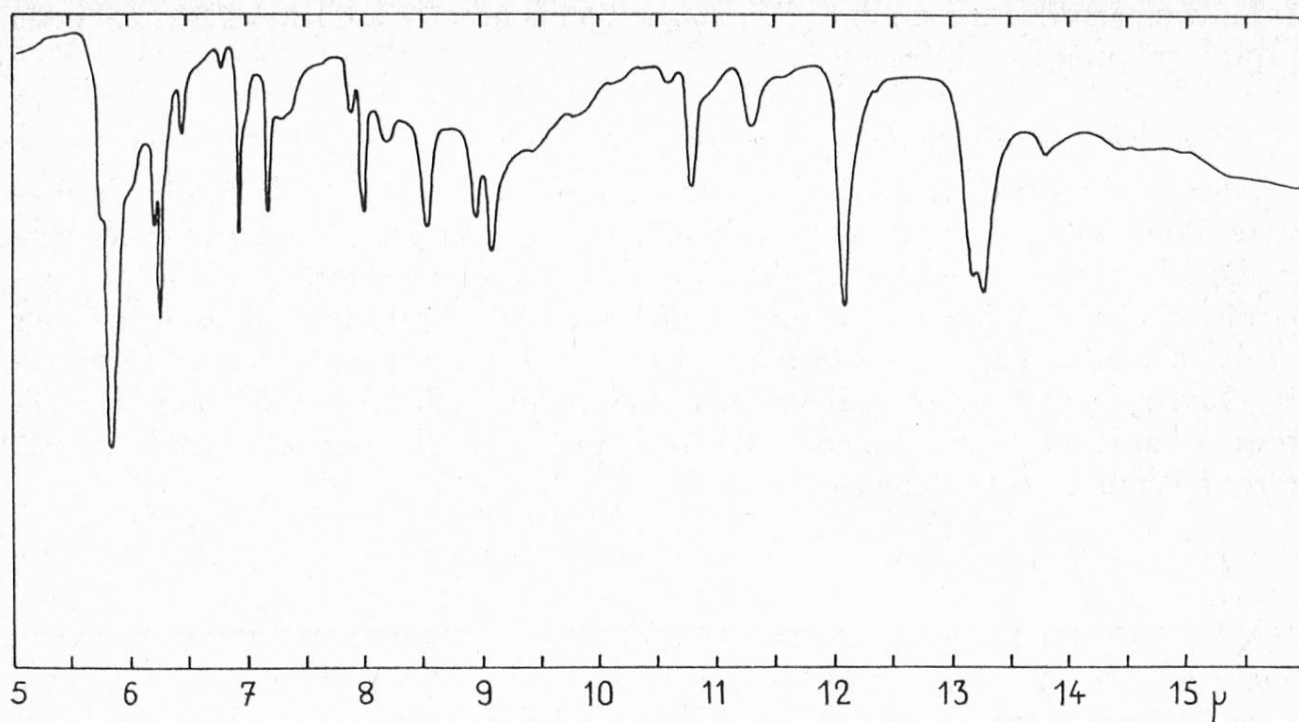


Figure 3

Support: chromosorb G

Température: 150 ° C

Gaz vecteur 30 ml N₂ / minute.

Injecteur Température: 300 ° C.

Manifold Température: 300 ° C.

5.2. Dosage direct de la coumarine

5.2.1. Chromatographie sur couche mince

Préparer des solutions contenant 10, 20, 30, ... 70 ng de coumarine par μ l de chloroforme. Sur une plaque de gel de silice de 20 cm \times 20 cm faire des dépôts distincts de 10, 20, 30, ..., 70 ng de coumarine. Ces dépôts doivent être équidistants les uns des autres. Déposer 1 μ l de chaque solution. Utiliser pour cela les capillaires étalonnés de 1 μ l. Déposer également 1 μ l d'arôme. Les dépôts sont effectués à 2,5 cm du bas de la plaque et une ligne d'arrêt est tracée à l'aide d'une pointe à 12,5 cm du bas de la plaque. La distance de migration est de 10 cm. Pour la migration le mode opératoire suivi est celui qui a été décrit sous 5.1.2.

5.2.2. Montage du lecteur «Z Scanner»

Le lecteur de plaque est monté comme indiqué dans la figure 4. Dans ce schéma les éléments suivants sont représentés:

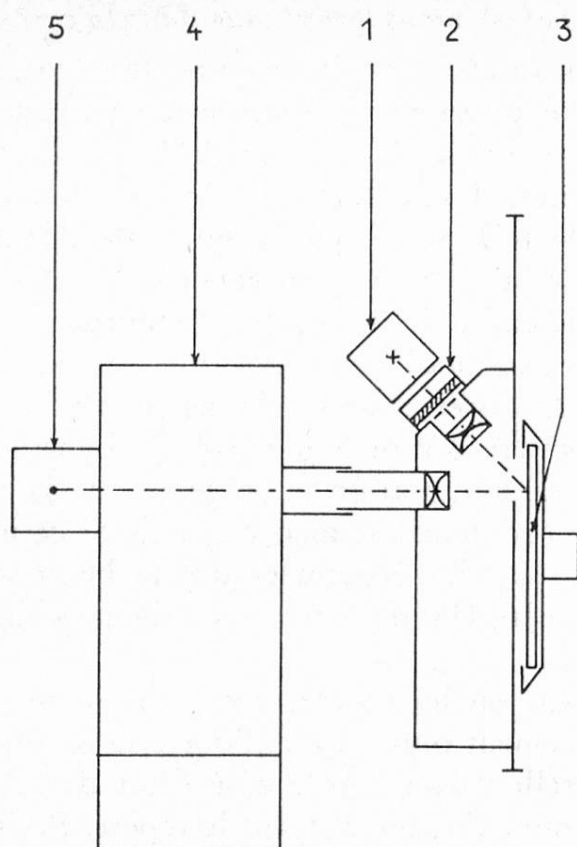


Figure 4 Montage du lecteur

1. Source lumineuse (lampe de mercure);
2. Filtre primaire (366 nm);
3. Plaque CCM;
4. Monochromateur;
5. Photomultiplicateur.

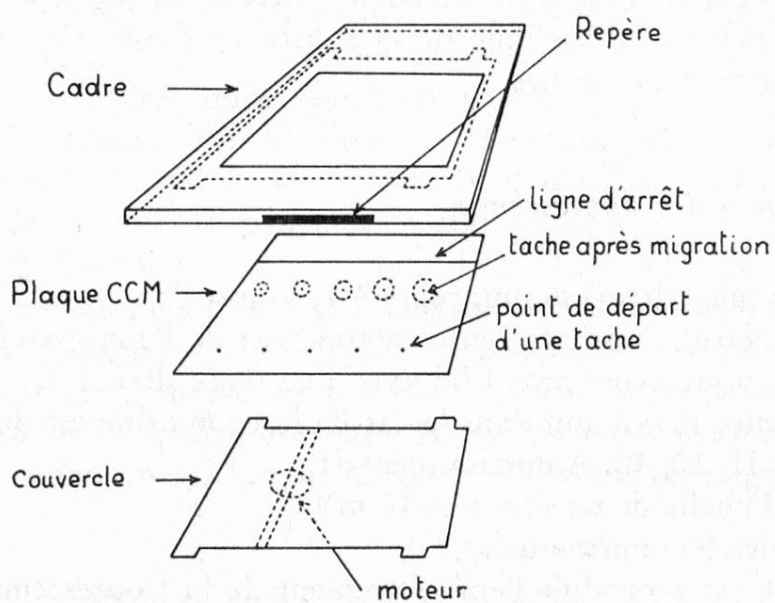


Figure 5 Fixation de la plaque CCM

5.2.3. Fixation de la plaque chromatographique dans la cassette

Fixer la plaque dans le cadre de la cassette de telle façon que le bas de la plaque se trouve du côté portant une marque caractéristique pour faciliter les opérations (figure 5). Opérer sur le plateau de la lampe Repro Star. Examiner la tache fluorescente numéro 1 sous lumière UV de 366 nm et déplacer la plaque à l'intérieur du cadre de telle sorte que le point de départ d'une tache (avant migration) et le centre de la tache à mesurer aient la même ordonnée lue sur les échelles se trouvant sur le cadre de la cassette. Retourner alors l'ensemble cadre et plaque en veillant à ne pas modifier la position de l'un par rapport à l'autre. Déposer le couvercle de la cassette sur la plaque et le verrouiller. Retourner l'ensemble et vérifier sous lumière UV de 366 nm que l'alignement du point de départ de la tache numéro 1 avant migration et le centre de la tache à mesurer après migration sur une même ordonnée est bien respecté. Si ce n'est pas le cas, refaire l'alignement. Relever ensuite les ordonnées des taches numéro 2, 3, 4, etc. . . . Repérer toujours sous lumière UV de 366 nm les abscisses limites pour l'enregistrement.

Remarque: Dans le cas où les centres des taches à mesurer ont le même R_F on peut rendre l'enregistrement plus rapide. Pour cela on dispose la plaque dans le cadre de la cassette de telle façon que le côté droit de la plaque (quand on regarde la migration) se trouve du côté portant le repère. Positionner la plaque dans le cadre de façon à ce que les centres des taches aient tous la même ordonnée. Noter cette ordonnée et vérifier qu'elle est toujours la même après avoir fermé la cassette. Relever également les abscisses limites pour l'enregistrement. Mettre la cassette en place et effectuer l'enregistrement.

5.2.4. Détermination du maximum de fluorescence

Mettre la cassette dans le lecteur et placer la cassette sur le centre d'une tache. Faire varier la longueur d'onde du monochromateur de façon à repérer le maximum de fluorescence caractéristique de la substance dosée. On peut ensuite procéder à l'enregistrement des taches.

5.2.5. Enregistrement des fluorescences

Conditions

- Lecteur de plaque: filtre 366 nm; fente 4/I; vitesse 2;
- Spectrophotomètre: choisir la fente en fonction de l'analyse effectuée. Dans le cas particulier nous avons travaillé avec une fente de 0,3. La longueur d'onde de la fluorescence maximum dans le cas de la coumarine est de 510 nm.
Amplificateur II, 10, 10. Amortissement II.
- Enregistreur: Echelle de tension 5 et 10 mV;
vitesse du papier 60 mm/minute.

Sur la figure 6 est reproduit l'enregistrement de la fluorescence correspondant à 40 ng de coumarine.

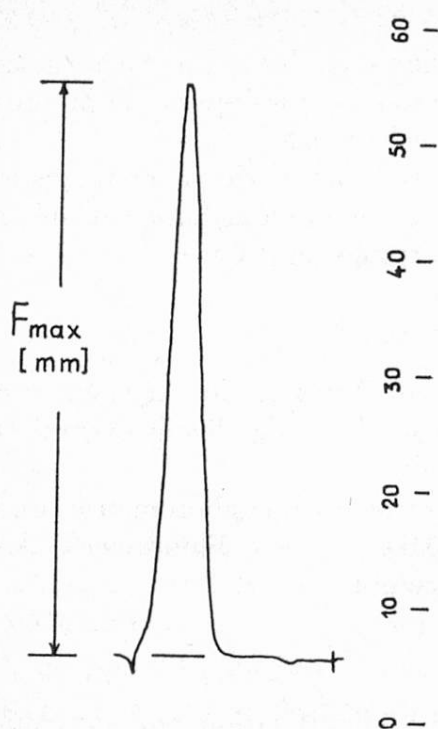


Figure 6

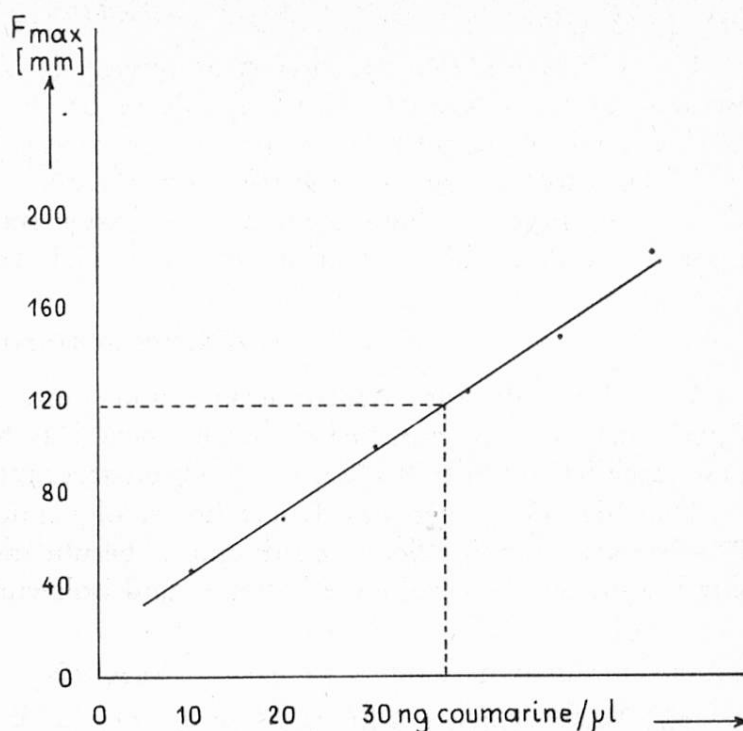


Figure 7

5.2.6. Courbe d'étalonnage (figure 7)

Nous avons porté en abscisse les différentes concentrations de coumarine en $\text{ng}/\mu\text{l}$ et en ordonnée les valeurs correspondantes de F_{max} en mm.

5.2.7. Résultats

Pour calculer la teneur en coumarine de l'arôme analysé il suffit de reporter sur la courbe d'étalonnage la valeur de F_{max} correspondant à $1\mu\text{l}$ d'arôme et de lire en abscisse la concentration correspondante en $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Dans le cas particulier nous avons enregistré pour $1\mu\text{l}$ d'arôme la valeur suivante: $F_{\text{max}} = 117\text{ mm}$. On lit alors sur la courbe d'étalonnage la concentration correspondante soit $37,5\text{ ng de coumarine}/\mu\text{l}$ d'arôme. Si l'on tient compte de la densité de l'arôme la teneur exprimée en ppm est de 42,5.

Remarque: La méthode peut être simplifiée. Pour cela on remplace le dépôt de $1\mu\text{l}$ d'arôme par un dépôt de $1\mu\text{l}$ d'une solution de cet arôme dans du chloroforme. Dans ces conditions il n'est plus nécessaire de déterminer la densité de l'arôme. La teneur en ppm est donnée par la formule suivante dans laquelle A est la prise d'arôme en g dissoute dans 10 ml de chloroforme et C la concentration en $\text{ng de coumarine}/\mu\text{l}$ lue sur la courbe d'étalonnage (figure 7).

$$\text{ppm de coumarine} = \frac{(C) \times 10}{A}$$

Résumé

Une méthode d'identification et de dosage de la coumarine dans les arômes d'agrumes est décrite de manière très détaillée. Elle repose sur l'extraction liquide-liquide de la coumarine, suivie d'une purification par chromatographie sur couche mince.

L'identification de la coumarine est effectuée par spectrophotométrie infra-rouge et chromatographie en phase gazeuse. Son dosage repose sur la mesure de l'intensité de la fluorescence de l'acide coumarique obtenu et isolé par un traitement approprié.

Zusammenfassung

Eine Methode zur Identifizierung und Bestimmung von Kumin in Aromen von Zitrusfrüchten wird ausführlich beschrieben. Das Kumin wird flüssig-flüssig extrahiert und anschließend mittels Dünnschichtchromatographie gereinigt.

Die Identifizierung des Kumins erfolgt mittels Infrarot-Spektrophotometrie und Gaschromatographie. Seine Bestimmung beruht auf der Messung der Fluoreszenz der durch geeignete Behandlung erhaltenen und isolierten Kumarsäure.

Summary

The authors give a full description of a method for the identification and determination of coumarin in citrus fruit flavors. The method is based on the liquid-liquid extraction of coumarin, followed by a purification by thin layer chromatography.

The identification of the coumarin is accomplished by infrared spectrophotometry and gas chromatography. Its determination is based on the measurement of the fluorescence of the coumaric acid obtained and isolated by a suitable treatment.

Bibliographie

1. E. Gildemeister, Fr. Hoffmann: Die ätherischen Öle, **III d**, 597 (1966).
2. D. P. Chakraborty et P. K. Bosc: J. Indian Chem. Soc., **33**, 905 (1956).
3. E. Sundt, A. Saccardi: Food Technol., **16**, 89 (1962).
4. E. Stahl: Thin Layer Chromatography, 1969.
5. S. A. Brown et J. P. Shyluk: Anal. Chem., **34**, 1058 (1962).
6. *Methods of Analysis* 19009—19011 AOAC (1965).