

Recherche et dosage du β -carotène dans les denrées grasses = Determination of β -carotene in fatty foods

Autor(en): **Etournaud, A. / Beaud, P. / Aubort, J.-D.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **80 (1989)**

Heft 3

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983608>

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.

Recherche et dosage du β -carotène dans les denrées grasses

Determination of β -Carotene in Fatty Foods

A. Etournaud, P. Beaud et J.-D. Aubort
Laboratoire cantonal, Epalinges-Lausanne
Assistance technique: J. Maire

Introduction

La recherche du β -carotène dans une denrée alimentaire présente deux intérêts principaux: la mise en évidence d'une adjonction de colorant à titre d'additif d'une part, et celle d'une éventuelle falsification d'autre part. Son dosage permet, de plus, d'évaluer la teneur en provitamine A de la denrée examinée.

L'adjonction de β -carotène de synthèse (E 161a, C. I. 40800) est une pratique courante pour renforcer la coloration des denrées grasses (1, 2). Cependant, bien que non limitée quantitativement, l'utilisation de cet additif est réservée, en Suisse, à certaines catégories d'aliments (3).

La présence de β -carotène dans un produit laitier désigné «pur chèvre» est un indice certain de falsification (4). En effet, le lait de chèvre ne contient pas de β -carotène, alors que ce colorant est toujours naturellement présent dans le lait de vache (5).

Jusqu'à présent, le β -carotène a été recherché dans les denrées grasses par chromatographie sur couche mince (CCM) de l'insaponifiable (6). Son dosage spectrophotométrique a été réalisé, soit directement (7), soit après chromatographie d'absorption sur colonne (8), ou encore après saponification de la matière grasse et purification de l'insaponifiable par chromatographie sur colonne (4). Cette dernière technique était souvent appliquée au dosage simultané du β -carotène et de la vitamine A (9–12).

Plus récemment, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) s'est révélée être une technique beaucoup plus efficace pour le dosage de telles substances. Il a été ainsi possible de doser le β -carotène naturel ou ajouté en tant que provitamine A, après saponification de la matière grasse et extraction de l'insaponifiable (13, 14), ou après séparation du β -carotène et des lipides par perméation de gel (15) ou directement, sans isolation du colorant (16).

Le présent travail propose une méthode simple et rapide pour séparer le β -carotène de la matière grasse en vue d'une identification par CCM ou d'une analyse par HPLC en phase inversée avec élution en régime isocratique.

Partie expérimentale

Réactifs

Alcool (éthanol) 94% Ph. H. VI, sans adjonction
Solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 60 g/100 g
Méthanol p. a. (Merck n° 6009)
Acétone Ph. H. VI, distillée
Sulfate de sodium anhydre p. a. (Merck n° 6649)
Hexane fraction purum (Fluka n° 52790)
Acétone pour la chromatographie liquide (Merck n° 20)
Acétonitrile pour la chromatographie liquide (Romil chemicals n° H049)
Méthanol pour la chromatographie liquide (Romil chemicals n° H410)
Dichlorométhane p. a. (Merck n° 6050)
Cyclohexane pour la spectroscopie (Merck n° 2822)
Colorants de référence: β -carotène de synthèse (Hoffmann-La Roche, Bâle), α -carotène (Sigma n° C-0251) et lycopène (Roth n° 4168).

Equipement

Evaporateur rotatif
Tubes à centrifuger de 15 ml et centrifugeuse de table
Colonne de chromatographie, diamètre 20 mm, longueur 20 à 30 cm avec fritte P1 et robinet
Agitateur type «vortex»
Colonne d'extraction en phase solide «SEP-PAK» C₁₈ (Waters Associates n° 51910)
Cuve rectangulaire à fond plat et fermeture étanche pour le développement de plaques de CCM de 20 x 20 cm ou 10 x 10 cm
Micropipettes à usage unique de 5 ou 10 μ l
Plaques de CCM: voir sous *Identification du β -carotène par CCM*
Filtres à usage unique 0,45 μ m, diamètre 3 mm (Millipore «HV» ou Schleicher & Schuell «Spartan»)
Spectrophotomètre Kontron, modèle «Uvikon 810»
Chromatographe HPLC: pompe Merck-Hitachi, modèle 655 A12 avec contrôleur modèle L-5000, injecteur Rheodyne modèle 7125 avec «loop» de 20 μ l, détecteur spectrophotométrique Pye Unicam, modèle LC3 avec lampe tungstène-halogène (380–600 nm), enregistreur-intégrateur Merck-Hitachi, modèle D-2000
Colonne de HPLC: voir sous *Identification et dosage du β -carotène par HPLC*

Préparation de l'échantillon

Fromages et autres denrées grasses complexes pour lesquels l'extraction préalable de la matière grasse est nécessaire:

- peser dans un mortier 5 g d'échantillon, au besoin finement coupé, râpé ou pulvérisé
- pour les produits solides non pâteux, ajouter quelques gouttes d'eau et broyer jusqu'à obtention d'une pâte homogène
- mélanger soigneusement cette pâte avec 15 g de sulfate de sodium anhydre
- transvaser la poudre obtenue dans une colonne de chromatographie contenant déjà une couche de 1 cm de sulfate de sodium
- éluer avec 50 ml d'hexane, recueillir l'éluat dans un ballon «cœur» de 100 ml
- évaporer totalement le solvant sous vide à l'évaporateur rotatif.

Les denrées grasses telles que mayonnaises et produits dérivés, sauces à salade grasses et crèmes glacées peuvent être en général saponifiées directement. Au cas où une extraction de la matière grasse se révélerait cependant nécessaire, procéder comme décrit ci-dessus.

Beurre, margarine, minarine, huiles et graisses: une préparation préalable de l'échantillon n'est pas nécessaire.

Saponification

- Peser 0,3 g à 0,5 g d'échantillon ou 0,3 g de matière grasse extraite dans un tube à centrifuger, ajouter 2,5 ml d'alcool et 0,15 ml de solution de KOH
- chauffer au bain-marie bouillant quelques minutes, en agitant de temps en temps, jusqu'à obtention d'une phase liquide homogène
- ajouter 2,5 ml d'eau distillée et refroidir sous un courant d'eau froide
- centrifuger si nécessaire.

Isolation du β -carotène par extraction en phase solide (SPE)

- Conditionner la colonne «SEP-PAK» C₁₈ en faisant passer goutte à goutte successivement 2 ml de méthanol et 5 ml d'eau distillée
- faire passer la totalité du mélange réactionnel de saponification
- laver la colonne avec 2 x 10 ml d'eau distillée puis 5 ml de mélange acétone-eau 70:30 (v/v)
- éluer le β -carotène avec 2 ml d'acétone, récupérer l'éluat dans un ballon «cœur» de 5 ml
- évaporer immédiatement à sec à l'évaporateur rotatif à 30 °C
- reprendre le résidu avec quelques gouttes d'acétone pour l'identification par CCM, ou par 1,0 ml d'éluant HPLC pour l'identification et le dosage par HPLC. *Ces opérations doivent être effectuées sans délai.*

Identification du β -carotène par CCM

Plaques de CCM:

- gel de silice 60 sans indicateur de fluorescence sur feuille plastique (Merck n° 5748)

Eluants:

- hexane-acétate d'éthyle 85:15 (v/v) (R_f approximatif du β -carotène: 0,7)
- éther diéthylique-hexane 70:30 (v/v) (R_f approximatif du β -carotène: 0,8)
- hexane-benzène 85:15 (v/v) (R_f approximatif du β -carotène: 0,4)

Exécution de la CCM:

- déposer sur la feuille de CCM quelques microlitres des solutions d'échantillons et du standard de référence (β -carotène env. 0,1% dans l'acétone ou le chloroforme)
- développer *dans l'obscurité* et sécher le chromatogramme à température ambiante également dans l'obscurité
- observer les plaques *immédiatement* après séchage (les carotènes et caroténoïdes sont photolabiles et les taches disparaissent rapidement).

Identification et dosage du β -carotène par HPLC

Colonne de HPLC:

- Spherisorb ODS-2, 5 μ m, longueur 250 mm, diamètre intérieur 4,6 mm.

Longueur d'onde de détection: 455 nm

Eluants:

- acétone-eau 95:5 (v/v), débit de 1,5 ml/min (temps de rétention approximatif du β -carotène: 5,3 min)
- acétonitrile-dichlorométhane-méthanol 70:20:10 (v/v/v), débit de 1,5 ml/min (temps de rétention approximatif du β -carotène: 9,5 min)

Standard de travail à 1 μ g de β -carotène/ml:

- peser environ 10 mg de β -carotène cristallisé dans un jaugé de 20 ml et compléter au trait de jauge avec du cyclohexane (solution stock qui ne se conserve que quelques semaines au congélateur)
- diluer 100 μ l de la solution stock à 10 ml (ballon jaugé) avec du cyclohexane (dilution 1:100)
- enregistrer le spectre d'absorption de la dilution 1:100 entre 350 et 600 nm dans une cuvette de 1 cm d'épaisseur (référence: cyclohexane), mesurer l'absorbance au maximum (A_{\max}) à 455–457 nm
- pour préparer le standard de travail à 1 μ g/ml, diluer x μ l de solution stock dans 10 ml d'éluant HPLC, avec x calculé selon la relation suivante (référence 2, p. 842):

$$x = \frac{25}{A_{\max}}$$

Remarque: La solution de travail doit être préparée avant chaque série d'analyse (ou chaque jour) à partir de la solution stock en mesurant à chaque fois l'absorbance de la dilution 1:100 de la solution stock pour calculer la valeur de x .

Exécution de la chromatographie HPLC:

- filtrer les extraits des échantillons sur filtre à usage unique $0,45 \mu\text{m}$
- injecter successivement les extraits des échantillons et le standard de travail dans le chromatographe HPLC dans les conditions décrites ci-dessus
- comparer le temps ou volume de rétention avec celui obtenu avec la solution de standard de référence
- quantifier par comparaison des surfaces des pics chromatographiques en utilisant, si nécessaire, des standards de travail de différentes concentrations.

Résultats et discussion

La saponification de la matière grasse en milieu alcoolique peut être effectuée sans isolation préliminaire pour la plupart des denrées alimentaires grasses. Seuls les produits complexes relativement solides et/ou pauvres en lipides, tels les fromages, nécessitent une isolation préalable de la matière grasse.

Le β -carotène est isolé, après la saponification *directement* du mélange réactionnel, dilué au moyen d'eau, par extraction en phase solide (SPE) sur une colonne C_{18} . L'utilisation de cette technique, déjà proposée (17–19) sous une forme différente, a l'avantage ici d'éviter l'étape particulièrement délicate de l'extraction liquide-liquide de l'insaponifiable. La fixation du β -carotène en tête de la colonne C_{18} est compacte. La plus grande partie des impuretés colorées ou non est éliminée par le lavage au moyen d'un mélange acétone-eau 70:30, à l'exception des substances de polarité comparable à celle du β -carotène telle que le lycopène. L'éluion des caroténoïdes non oxygénés est ensuite réalisée avec de l'acétone pure.

L'extrait obtenu par ce procédé est suffisamment purifié pour permettre une identification rapide et sûre du β -carotène par CCM avec les éluants proposés (20, 21), ou son dosage par HPLC en moins de 6 minutes, en régime isocratique, avec pour phase mobile un simple mélange acétone-eau (22), comme le montre la figure 1. La longueur d'onde de détection choisie (455 nm) correspond au maximum d'absorption du β -carotène dans les deux éluants proposés. Le taux de récupération, déterminé à partir d'échantillons d'huile de colza enrichis avec du β -carotène pur à raison de 5 mg/kg, est supérieur à 95% (4 essais).

La technique ainsi décrite a été appliquée à l'examen de 26 échantillons de denrées contenant de la matière grasse (tableau 1). Dans 9 produits (minarines et margarines principalement), l'adjonction de β -carotène déclarée sur l'emballage a été confirmée.

L'adjonction de β -carotène en tant que colorant est aisée à mettre en évidence lorsque il est absent à l'état naturel dans la denrée examinée. Elle n'est certaine dans les autres cas, que lorsque la teneur mesurée dépasse largement la concentration naturelle dans le produit en tenant compte, le cas échéant, de la proportion des ingrédients qui en contiennent.

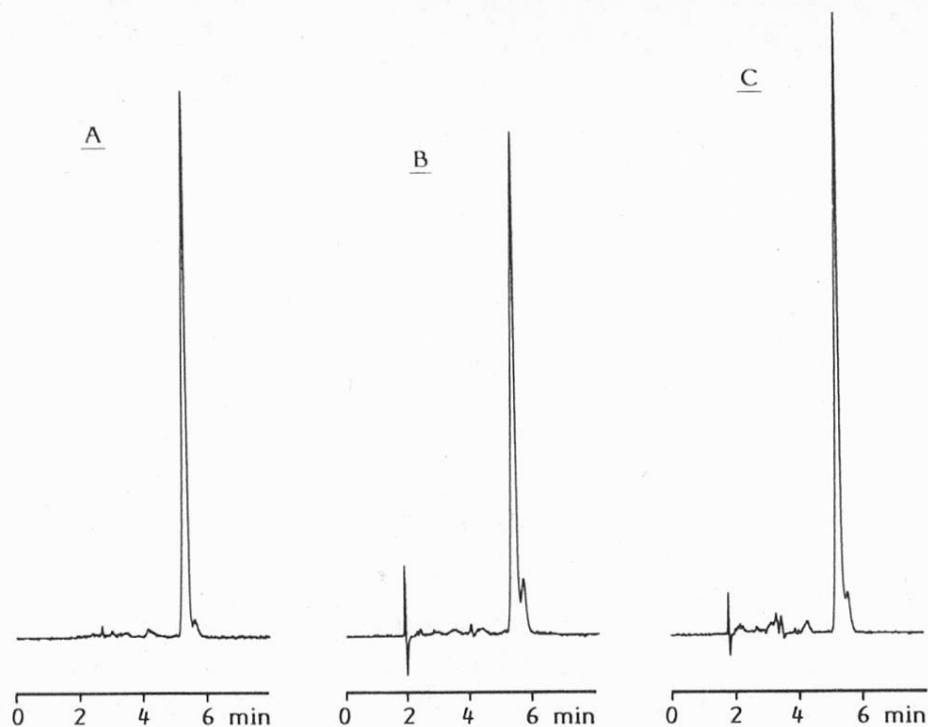


Fig. 1. Chromatogrammes HPLC du standard de travail à $1 \mu\text{g}$ de β -carotène/ml (A), de l'extrait d'une minarine (3,1 mg/kg de β -carotène ajouté) (B) et de l'extrait de la matière grasse d'un fromage au lait de vache (3,8 mg/kg mat. gr. de β -carotène d'origine naturelle) (C).

Eluant: acétone-eau 95:5 (v/v), débit 1,5 ml/min. Autres conditions chromatographiques: voir partie expérimentale

Tableau 1. Dosage du β -carotène dans des produits gras

Désignation du produit	Nombre d'échant.	Concentrations en β -carotène (mg/kg)
Minarines	5	2,6/2,8/3,2/3,4/3,6
Margarines	3	2,2/2,2/2,7
Sauces (type mayonnaise)	4	nd*/nd/nd/0,4**
Huiles et graisses végétales	3	nd/0,9/2,6
Mayonnaise	1	nd
Beurre	1	2,6
Crème glacée	1	0,6
Sauce à salade	1	nd
Fromage au lait de chèvre	4	nd/nd/nd/nd
Fromage au lait de vache	1	3,8 (sur matière grasse)
Jaune d'œuf	1	0,2***

* nd = non décelé (inférieur à 0,05 mg/kg d'échantillon ou de matière grasse)

** sauce contenant aussi 0,2 mg/kg d' α -carotène

*** contient aussi des traces d' α -carotène

La limite de détection pratique de la méthode est de 0,05–0,1 mg de β -carotène par kg d'échantillon ou de matière grasse. Cette limite est bien suffisante pour atteindre l'objectif fixé. Elle peut être encore abaissée en reprenant l'extrait évaporé avec un plus faible volume d'éluant HPLC. Ainsi, sur la base d'une teneur minimale en β -carotène dans la graisse de lait de vache d'environ 3 mg/kg (12), la présence de 5% de matière grasse d'origine bovine dans les fromages au lait de chèvre peut être aisément décelée (fig. 2). En pratique, tout lait de chèvre ou produit «pur chèvre» dont la teneur en β -carotène est supérieure à 0,05 mg/kg de matière grasse, peut être suspecté de falsification par adjonction de lait de vache.

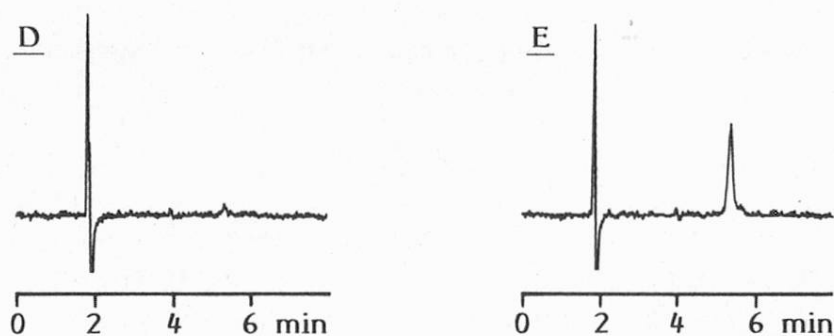


Fig. 2. Chromatogrammes HPLC de l'extrait de la matière grasse d'un fromage au lait de chèvre (D) et de l'extrait de la matière grasse d'un fromage au lait de chèvre enrichie avec 5% de graisse extraite d'un fromage au lait de vache (E).

Eluant: acétone-eau 95:5 (v/v), débit 1,5 ml/min. Autres conditions chromatographiques: voir partie expérimentale

Si la séparation chromatographique obtenue avec le mélange acétone-eau comme phase mobile est satisfaisante pour la recherche de l'adjonction de β -carotène en tant qu'additif alimentaire — il n'y a pas d'interférence avec le lycopène éventuellement présent — elle ne convient cependant pas pour un dosage précis de ce précurseur de la vitamine A, n'étant que partiellement séparé de ses isomères, notamment l' α -carotène. Par contre, la technique de la chromatographie liquide en phase inversée avec éluant non aqueux, proposée par Parris (23) pour la séparation des composés très peu polaires, permet d'atteindre aisément ce but. Parmi les différents mélanges de solvants non-aqueux utilisés dans le domaine des denrées alimentaires (15, 19, 24–29), celui développé par Nelis (30), à base d'acétonitrile, de dichlorométhane et de méthanol, permet avec la colonne proposée une séparation suffisante des isomères α et β du carotène en moins de 12 minutes (fig. 3). A relever qu'en pratique, le passage d'un éluant aqueux à un éluant non aqueux, sur la même colonne en phase inversée, nécessite un lavage intermédiaire soigneux de la colonne au moyen d'acétonitrile pur.

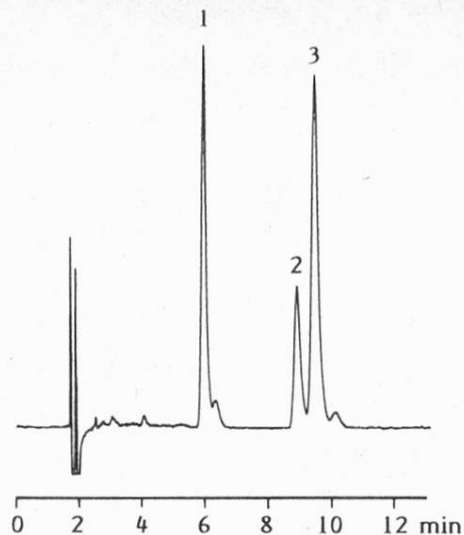


Fig. 3. Séparation par chromatographie HPLC d'un mélange de lycopène (1, 0,9 $\mu\text{g/ml}$), α -carotène (2, 0,4 $\mu\text{g/ml}$) et β -carotène (3, 1 $\mu\text{g/ml}$).
Eluant: acétonitrile-dichlorométhane-éthanol 70:20:10 (v/v/v), débit 1,5 ml/min.
Autres conditions chromatographiques: voir partie expérimentale

Résumé

Une méthode simple et rapide est décrite pour la recherche du β -carotène dans les denrées grasses. Après saponification de la matière grasse, le colorant est isolé directement du mélange réactionnel par extraction en phase solide sur une colonne C_{18} et identifié par CCM ou dosé par HPLC en phase inversée et régime isocratique, en moins de 6 minutes. Les résultats de l'examen de 26 échantillons de denrées grasses sont présentés.

L'emploi d'un éluant non aqueux permet de séparer le β -carotène de son isomère α et ainsi de doser avec précision cette provitamine A.

Zusammenfassung

Eine schnelle und einfache Methode zum Nachweis von β -Carotin in fetthaltigen Lebensmitteln wird beschrieben. Nach Verseifung des Fettes wird der Farbstoff direkt aus der Reaktionsmischung durch Festphasenextraktion auf einer C_{18} -Säule isoliert und durch Dünnschichtchromatographie identifiziert oder quantifiziert mittels isokratischer Umkehrphasen-HPLC in weniger als 6 Minuten. Die Resultate der Untersuchungen von 26 Proben fetthaltiger Lebensmittel werden vorgelegt.

Die Verwendung eines nicht wässrigen Eluents erlaubt die Trennung des β -Carotins von seinem α -Isomeren, so dass eine genaue Bestimmung dieses Provitamins möglich ist.

Summary

A simple and rapid method is proposed for the analysis of β -carotene in fatty foods. After saponification, the colouring agent is extracted directly from the reaction mixture on a C_{18} solid-phase extraction column and identified by TLC or quantitated using reverse-phase HPLC in isocratic conditions, within less than 6 minutes. The results of the investigation of 26 samples of fatty foods are presented.

The use of nonaqueous reverse-phase HPLC allows a separation of β -carotene from its α isomer so that an accurate determination of this provitamin A is possible.

Bibliographie

1. Kläui, H. and Raunhardt, O.: Colouring of foods with carotenoids. *Alimenta* **15**, 37–45 (1976).
2. Bauernfeind, J. C.: Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. *Technological and Nutritional Applications*. Academic Press, New York 1981.
3. Ordonnance sur les additifs dans les denrées alimentaires du 20 janvier 1982, Office central fédéral des imprimés et du matériel, Berne.
4. Kuzdzal-Savoie, S. et Kuzdzal, W.: La recherche du lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas du fromage. *Le Lait* **40**, 393–407 (1960).
5. Chanda, R. and Owen, E. C.: β -Carotene in goat liver and colostrum. *Biochem. J.* **51**, iv (1952).
6. Montag, A.: Dünnschichtchromatographischer Nachweis einiger fettlöslicher, synthetischer und natürlicher Farbstoffe in Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **116**, 413–420 (1961).
7. Luckmann, F. H., Melnick, D. and Vahlteich, H. W.: Estimation of vitamin A in margarine. IV. Assays procedures for yellow margarine made with and without carotene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **29**, 321–330 (1952).
8. Espoy, H. M. and Barnett, H. M.: The detection and determination of coloring materials in butter and margarine. *Food Technol.* **9**, 367–372 (1955).
9. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 43.001–43.007, William Horwitz Editor, 13th Ed, Washington 1980.
10. Parrish, D. B.: Modification of the method for vitamin A in foods and feeds for use with margarine and butter: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**, 468–475 (1980).
11. Usher, C. D., Favell, D. J. and Lavery, H.: A method for the determination of vitamin A, α - and β -carotene in margarine, including the results of a collaborative test. *Analyst* **93**, 107–110 (1968).
12. Fässler, Ch.: Untersuchungen über den Vitamin-A- und β -Carotin-Gehalt von Milch und Butter unter Berücksichtigung schweizerischer Verhältnisse. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **60**, 180–194 (1969).
13. Stancher, B. and Zonta, F.: High-performance liquid chromatographic determination of carotene and vitamin A and its geometric isomers in foods. Application to cheese analysis. *J. Chromatogr.* **238**, 217–225 (1982).
14. Thompson, J. N. and Maxwell, W. B.: Reverse phase high pressure liquid chromatography of vitamin A in margarine, infant formula, and fortified milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **60**, 766–771 (1977).
15. Landen, W. O. Jr and Eitenmiller, R. R.: Application of gel permeation chromatography and nonaqueous reverse phase chromatography to high pressure liquid chromatographic determination of retinyl palmitate and β -carotene in oil and margarine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **62**, 283–289 (1979).
16. Thompson, J. N., Hatina, G. and Maxwell, W. B.: High performance liquid chromatographic determination of vitamin A in margarine, milk, partially skimmed milk, and skimmed milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**, 894–898 (1980).

17. *Eskins, K. and Dutton, H. J.*: Sample preparation for high-performance liquid chromatography of higher plant pigments. *Anal. Chem.* **51**, 1885–1886 (1979).
18. *Metschies, M. und Schwedt, G.*: Vitamin-Analytik mittels HPLC in Lebensmitteln. Proben-Cleanup an chemisch modifizierten Kieselgelen. *Deut. Lebensm.-Rdsch.* **81**, 385–387 (1985).
19. *Fisher, J.-F. and Rouseff, R. L.*: Solid-phase extraction and HPLC determination of β -cryptoxanthin and α - and β -carotene in orange juice. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 985–989 (1986).
20. *Stahl, E.*: Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch, p. 224. Springer-Verlag, Berlin 1962.
21. *Manz, U.*: (F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel), travaux non publiés.
22. *Lange, K.*: Trennung von Carotinoiden mit Hilfe der HPLC. Dissertation an der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg 1976.
23. *Parris, N. A.*: Non-aqueous reversed-phase liquid chromatography. A neglected approach to the analysis of low polarity samples. *J. Chromatogr.* **157**, 161–170 (1978).
24. *Zakaria, M., Simpson, K., Brown, P. R. and Krstulovic, A.*: Use of reversed-phase high-performance chromatographic analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. *J. Chromatogr.* **176**, 109–117 (1979).
25. *Hsieh, Y.-P. C. and Karel, M.*: Rapid extraction and determination of α - and β -carotenes in foods. *J. Chromatogr.* **259**, 515–518 (1983).
26. *Quackenbush, F. W. and Smallidge, R. L.*: Nonaqueous reverse phase liquid chromatographic system for separation and quantification of provitamins A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**, 767–772 (1986).
27. *Bushway, R. J.*: Determination of α - and β -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 409–412 (1986).
28. *Simon, P. W. and Wolff, X. Y.*: Carotenes in typical and dark orange carrots. *J. Agric. Foods Chem.* **35**, 1017–1022 (1987).
29. *Khachik, F. and Beecher, G. R.*: Application of a C-45- β -Carotene as an internal standard for the quantification of carotenoids in yellow/orange vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 732–738 (1987).
30. *Nelis, H. J. C. F. and De Leenheer, A. P.*: Isocratic nonaqueous reversed-phase liquid chromatography of carotenoids. *Anal. Chem.* **55**, 270–275 (1983).

Dr A. Etournaud
 P. Beaud
 Prof. Dr J.-D. Aubort
 Laboratoire cantonal
 Les Croisettes
 CH-1066 Epalinges