

THESE

présentée

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

par

Caroline PAKIN

LE DOSAGE DE VITAMINES DU GROUPE B (ACIDE PANTOTHENIQUE ET
COBALAMINES) DANS LES ALIMENTS APRES ISOLEMENT
CHROMATOGRAPHIQUE ET DETECTION FLUORIMETRIQUE

Soutenue le 26 novembre 2004 devant la Commission d'Examen

Mme	M. BERGAENTZLE	Examineur
MM.	C. BOURGEOIS	Rapporteur externe
	C. HASSELMANN	Directeur de thèse
	O. HEUDI	Examineur
	M. LEROY	Rapporteur interne
	A. NICOLAS	Rapporteur externe

Remerciements

Je remercie le Professeur Claude Hasselmann pour la façon dont il a dirigé ce travail. Je lui suis reconnaissante de sa disponibilité et de la rigueur qu'il a toujours essayé de me transmettre, en particulier lors de la rédaction de ce travail.

Je remercie également M. Claude Bourgeois, M. Maurice Leroy, M. Alain Nicolas et M. Olivier Heudi de l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ma thèse en acceptant de faire partie de ce jury.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Martine Bergaentzlé de sa disponibilité et de ses bons conseils qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse.

Je témoigne aussi ma reconnaissance à la société Nestlé et à l'ACTIA pour avoir financées cette étude et au Docteur Dalal Aoudé-Werner de l'AERIAL pour sa collaboration à ce travail.

Merci aussi et surtout à toute l'équipe du Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'aliment.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 Dosage de la vitamine B₅ dans les aliments après isolement chromatographique et dérivation post-colonne en composé fluorescent	6
1. INTRODUCTION	6
2. MATERIEL ET METHODES	10
2.1. LES COMPOSES CHIMIQUES	10
2.1.1. Les vitamines	10
2.1.2. Les enzymes	10
2.1.2.1. La phosphatase alcaline	10
2.1.2.2. La pantéthéinase	11
2.1.2.3. La pepsine	12
2.1.2.4. Les autres enzymes	13
2.1.3. Les autres composés chimiques	13
2.1.4. La préparation des échantillons alimentaires	13
2.2. LES PROTOCOLES D'EXTRACTION	14
2.2.1. L'extraction de l'acide pantothénique libre	14
2.2.2. L'extraction enzymatique de l'acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A	14
2.2.3. L'extraction enzymatique de la vitamine B ₅ totale	14
2.3. LA PURIFICATION DES EXTRAITS PAR EXTRACTION EN PHASE SOLIDE	15
2.4. L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE	15
2.4.1. L'appareillage chromatographique	15
2.4.2. La dérivation post-colonne	15
2.4.3. Les conditions chromatographiques utilisées	17
2.4.3.1. L'optimisation de la dérivation post-colonne (analyse de solutions étalons d'acide pantothénique)	17
2.4.3.2. L'analyse de la vitamine B ₅ dans les aliments	17
2.4.3.3. La séparation de la pantéthine, de la pantéthéine et de l'acide pantothénique	17
2.5. L'EXPRESSION DES RESULTATS	18
2.5.1. L'expression de la teneur en vitamine B ₅ et du taux de recouvrement de la méthode	18
2.5.2. L'analyse statistique des résultats	19
3. RESULTATS ET DISCUSSION	20
3.1. LA DERIVATION POST-COLONNE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE EN 1-(CARBOXY-ETHYL)THIO-2-(CARBOXYETHYL)ISOINDOLE FLUORESCENT	20
3.1.1. La dérivation post-colonne effectuée en deux étapes distinctes (configuration avec 2 pompes)	21
3.1.1.1. L'optimisation des conditions expérimentales	22
3.1.1.2. La validation du mode de dérivation proposé	29
3.1.1.3. Conclusions	30
3.1.2. La dérivation post-colonne en une seule étape (configuration avec une pompe)	31

3.1.2.1.	<i>L'optimisation du dispositif de dérivation à une pompe</i>	32
3.1.2.2.	<i>La validation du mode de dérivation proposé</i>	34
3.2.	LA DETERMINATION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE LIBRE	35
3.2.1.	La proposition d'une élution à gradient pour résoudre le problème des interférences chromatographiques	35
3.2.2.	La purification des extraits par extraction en phase solide	36
3.2.2.1.	<i>Le choix du type de purification</i>	36
3.2.2.2.	<i>L'utilisation d'une cartouche échangeuse de cations : les problèmes rencontrés lors de l'analyse d'échantillons alimentaires, leurs origines et leur résolution</i>	37
3.2.3.	Le dosage de l'acide pantothénique libre dans divers aliments	41
3.3.	LA DETERMINATION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE LIBRE ET LIE DANS LE COENZYME A	44
3.3.1.	L'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique	45
3.3.1.1.	<i>La préparation de la pantéthénase</i>	45
3.3.1.2.	<i>La mesure de l'activité de la solution de la pantéthénase</i>	45
3.3.1.3.	<i>L'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique à l'aide d'une solution étalon de coenzyme A</i>	47
3.3.1.4.	<i>L'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique en utilisant comme substrat un échantillon de foie de porc</i>	49
3.3.2.	Les problèmes analytiques rencontrés lors du dosage de l'acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A dans différents échantillons alimentaires d'origine végétale	51
3.3.2.1.	<i>Les origines des pertes en vitamine B₅ lors de l'application du protocole analytique proposé à des matrices végétales</i>	52
3.3.2.2.	<i>L'influence de la température d'incubation sur la teneur en acide pantothénique libre et lié</i>	54
3.3.2.3.	<i>L'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique pour une température d'incubation de 20°C</i>	55
3.3.3.	Le dosage de l'acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A dans divers aliments	56
3.4.	LA DETERMINATION DE LA VITAMINE B₅ TOTALE	59
3.4.1.	L'ajout d'une protéase dans le protocole d'extraction	59
3.4.1.1.	<i>Le choix de la protéase</i>	60
3.4.1.2.	<i>L'optimisation des conditions d'hydrolyse par la pepsine</i>	61
3.4.2.	Un traitement amylasique est-il nécessaire ?	63
3.4.3.	Le dosage de la vitamine B₅ totale dans divers aliments	63
3.4.4.	La comparaison des teneurs en acide pantothénique selon les différents protocoles d'extraction	66
3.4.5.	Les avantages de la méthode d'analyse chromatographique mise au point par rapport à ceux de la méthode microbiologique habituellement pratiquée	68
4.	CONCLUSION	70
5.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	71

CHAPITRE 2 Dosage de la vitamine B₁₂ dans les aliments par couplage chromatographie liquide - fluorimétrie après transformation pré-colonne en composé fluorescent	74
1. INTRODUCTION	75
2. MATERIEL ET METHODES	80
2.1. LES COMPOSES CHIMIQUES	80
2.1.1. Les vitamines.....	80
2.1.2. Les enzymes.....	80
2.1.3. Les autres composés chimiques.....	80

2.1.4.	La préparation des échantillons alimentaires.....	82
2.2.	LES PROTOCOLES D'EXTRACTION	82
2.2.1.	L'extraction de la vitamine B ₁₂ libre.....	82
2.2.2.	L'extraction enzymatique de la vitamine B ₁₂ totale.....	82
2.3.	LA PURIFICATION DES EXTRAITS PAR PASSAGE SUR UNE COLONNE D'IMMUNOAFFINITE	83
2.4.	LA LIBERATION DU PHOSPHATE DE RIBAZOLE ET DU RIBAZOLE	83
2.5.	L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE	84
2.5.1.	L'appareillage.....	84
2.5.2.	Les conditions chromatographiques.....	84
2.6.	L'EXPRESSION DES RESULTATS	84
3.	RESULTATS ET DISCUSSION	86
3.1.	LES LIMITES DU DOSAGE DE LA VITAMINE B₁₂ PAR CLHP/UV	86
3.1.1.	La séparation des différentes cobalamines.....	86
3.1.2.	La limite de quantification et la spécificité du dispositif d'analyse.....	89
3.2.	LE CHOIX D'UN MODE DE DETECTION PLUS SENSIBLE	91
3.3.	LA REDUCTION DE LA VITAMINE B₁₂ EN VITAMINE B_{12s}, PUIS LE GREFFAGE D'UN FLUOROPHORE SUR L'ATOME DE COBALT	92
3.3.1.	La réduction de la vitamine B ₁₂	93
3.3.2.	Le greffage d'un substituant sur la forme B _{12s}	95
3.3.2.1.	Les essais de greffage d'un fluorophore halogéné directement sur l'atome de cobalt (I).....	96
3.3.2.2.	Les essais de greffage d'un espaceur, puis d'un fluorophore sur l'espaceur.....	98
3.4.	LA LIBERATION DE MOLECULES FLUORESCENTES, OU SUSCEPTIBLES DE LE DEVENIR PAR DERIVATION, LORS D'UNE HYDROLYSE DE LA VITAMINE B₁₂ PAR UN ACIDE OU UNE BASE CONCENTRE(E)	106
3.4.1.	La libération de l'aminopropanol.....	107
3.4.1.1.	Les essais préliminaires.....	107
3.4.1.2.	L'optimisation des conditions d'hydrolyse acide.....	108
3.4.2.	La libération du phosphate de ribazole.....	111
3.4.2.1.	Les essais préliminaires.....	111
3.4.2.2.	L'optimisation des conditions d'hydrolyse chimique (avec isolement chromatographique ultérieur du phosphate de ribazole éventuellement formé).....	112
3.4.2.3.	Les problèmes posés par la séparation chromatographique des deux isomères.....	114
3.4.2.4.	Conclusions.....	118
3.4.3.	La libération du ribazole.....	118
3.5.	L'UTILISATION DU RIBAZOLE COMME MARQUEUR FLUORESCENT POUR LE DOSAGE DE LA VITAMINE B₁₂ AMELIORATION DE LA SPECIFICITE ET DE LA SENSIBILITE DU PROTOCOLE ANALYTIQUE	123
3.5.1.	La mise en évidence d'une présence naturelle de phosphate de ribazole et de ribazole dans un échantillon alimentaire.....	123
3.5.2.	Les essais de purification des extraits alimentaires par extraction en phase solide sur colonne d'affinité.....	125
3.5.3.	La purification des extraits alimentaires par passage sur colonne d'immunoaffinité.....	126
3.6.	LE DOSAGE DE LA VITAMINE B₁₂ LIBRE DANS DIVERS ALIMENTS	128
3.7.	LA DETERMINATION DE LA VITAMINE B₁₂ TOTALE DANS LES ALIMENTS	129
3.7.1.	L'optimisation des conditions d'hydrolyse par la pepsine.....	130
3.7.2.	L'optimisation des conditions d'hydrolyse du phosphate de ribazole en ribazole par la phosphatase alcaline.....	131

3.7.3. Les teneurs en vitamine B ₁₂ totale de divers aliments.....	132
3.8. <i>LES AVANTAGES DE LA METHODE D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE MISE AU POINT PAR RAPPORT A CEUX DE LA METHODE MICROBIOLOGIQUE HABITUELLEMENT PRATIQUEE</i>	134
4. CONCLUSION	136
5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	137
CONCLUSION GENERALE	140
ANNEXES.....	143

INTRODUCTION GENERALE

C'est en 1914 que Funk démontra l'implication d'un complexe aminé (identifié plus tard comme étant la thiamine) dans la guérison d'une pathologie nerveuse, le béri-béri, et utilisa pour définir ce complexe le terme de vitamine (amine nécessaire à la vie). Sous cette appellation sera regroupé par la suite un ensemble de substances indispensables, à faibles doses, au bon fonctionnement de l'organisme humain, substances que ce dernier est incapable de synthétiser et qu'il ne peut trouver que dans les aliments. Au fil des années et de l'isolement de telles substances, deux sous-groupes seront constitués pour les classer : les vitamines liposolubles, pouvant être stockées par l'organisme (A, D, E et K), et les vitamines hydrosolubles, rapidement éliminées par celui-ci (B et C).

Les vitamines du groupe B regroupent des molécules de classes chimiques très différentes, mais qui ont toutes pour fonction principale de participer au contrôle des activités enzymatiques au niveau de toutes les voies du métabolisme. Elles sont dénommées : thiamine (B₁), riboflavine (B₂), niacine (B₃), acide pantothénique (B₅), pyridoxine (B₆), biotine (B₈), folates (B₉) et cobalamines (B₁₂). Une carence en vitamines peut engendrer des troubles métaboliques, se manifestant par des symptômes plus ou moins caractéristiques. Les maladies carencielles les plus connues sont le béri-béri, déjà mentionné, résultant d'une carence en thiamine [atteinte du système nerveux (polynévrite) et du système cardiovasculaire (atrophie musculaire, œdème généralisé, dysfonctionnement cardiaque)], la pellagre, principalement liée à un déficit en niacine qui se traduit par des lésions cutanées (dermatose), des troubles digestifs (diarrhée) et nerveux (démence), l'anémie mégalo-blastique (carence en folates) et l'anémie pernicieuse (carence en cobalamines). Les symptômes d'éventuelles carences en riboflavine, en acide pantothénique, en pyridoxine et en biotine sont moins caractéristiques.

De telles maladies carencielles sévissent encore au sein de populations sous-alimentées ou malnutries, principalement en Afrique et dans certains pays asiatiques. Dans les pays développés, une alimentation équilibrée apporte généralement des quantités suffisantes de vitamines, sauf parfois chez certaines personnes dans un état physiologique particulier (femmes enceintes, personnes immunodéprimées, etc.). La prise médicamenteuse de vitamines, la consommation de compléments alimentaires ou d'aliments à teneurs garanties en vitamines permet généralement de remédier à ces états de pré-carence.

La mise au point de méthodes analytiques spécifiques et sensibles permettant le dosage des vitamines du groupe B dans les aliments s'est néanmoins révélée indispensable à la fois pour des raisons nutritionnelles (connaissance de l'apport vitaminique d'un régime alimentaire donné) et

réglementaires (contrôle de l'étiquetage de produits alimentaires manufacturés à teneur garantie en vitamines).

Les méthodes microbiologiques sont actuellement encore largement utilisées pour le dosage des vitamines du groupe B. Elles sont basées sur les besoins vitaminiques d'un microorganisme particulier à chaque vitamine, la croissance de ce microorganisme étant proportionnelle à la quantité de vitamine ajoutée dans le milieu de culture. Bien que ces méthodes soient très sensibles et puissent s'appliquer directement aux échantillons alimentaires, elles sont souvent d'une spécificité contestable. Des méthodes fluorimétriques et colorimétriques de dosage de ces vitamines, sans isolement chromatographique, ont été également proposées, mais, peu sensibles et très peu spécifiques en raison de la présence dans l'échantillon de nombreuses substances susceptibles d'interférer, elles ne sont plus guère utilisées.

Le développement de la chromatographie en phase liquide haute performance au cours de ces dernières années a en effet permis d'ouvrir de nouveaux horizons pour la conception de méthodes très spécifiques de dosage des vitamines du groupe B et a amené le laboratoire de Chimie analytique et Sciences des aliments (actuellement au sein de l'UMR 7512) à développer dès 1993 un ambitieux programme de recherche dans ce domaine. Associée à un système de détection par fluorimétrie, la chromatographie en phase liquide haute performance peut ainsi constituer une méthode de dosage présentant une limite de détection suffisamment basse pour estimer correctement les teneurs en vitamines habituellement présentes dans un aliment, quelle que soit sa nature. La mise au point d'un tel protocole peut cependant s'avérer très délicate dans la mesure où il est généralement nécessaire de proposer une transformation pré- ou post-colonne de la vitamine (non fluorescente) en composé fluorescent, mais aussi une hydrolyse enzymatique des échantillons afin de rompre les formes vitaminiques liées dans les aliments à d'autres constituants (protéines, phosphates, polysaccharides, NAD, coenzyme A), tout en ne dosant finalement que les formes vitaminiques biodisponibles. Les problèmes analytiques seront bien entendu d'autant plus complexes à résoudre que la vitamine existe dans l'aliment sous plusieurs formes chimiques et en faibles concentrations.

En dehors de la riboflavine, de la vitamine B₆ et de certaines formes de folates (vitamine B₉), aucune autre vitamine du groupe B n'est en effet fluorescente. Une détection par absorption UV est certes possible pour plusieurs d'entre elles, mais ce type de détection n'est jamais suffisamment sensible. Une transformation pré- ou post-colonne de ces vitamines en composés fluorescents a jusqu'à présent permis de résoudre ce problème de sensibilité. Ainsi la thiamine peut être oxydée en thiochrome fluorescent, avant ou après isolement chromatographique^{1,2}.

¹ Hasselmann C., Frank D., Grimm P., Diop P. & Soules C. (1989), *J. Micronutr. Anal.*, 5, 269-279.

² Arella F., Lahély S., Bourguignon J.B. & Hasselmann C. (1996), *Food Chem.*, 56, 81-86.

Lahély *et al.*^{3,4} ont également proposé une dérivation post-colonne de la niacine (irradiation UV en présence d'eau oxygénée et d'ions cuivriques) et de la biotine (formation d'un complexe avec l'avidine-FITC). Par ailleurs lorsqu'une vitamine est présente sous plusieurs formes dans un même aliment (cas de la vitamine B₆ et des folates), il est parfois très difficile de séparer ces vitamines lors de l'analyse d'une matrice complexe. Pour l'analyse de la vitamine B₆, Reitzer-Bergaentzlé *et al.*^{5,6} ont ainsi proposé une transformation des différentes formes de la vitamine B₆ (pyridoxal et pyridoxamine) en pyridoxol avant isolement chromatographique. Dans le cas des folates, Ndaw *et al.*⁷ ont également réussi à transformer les nombreuses formes de folates présentes dans les aliments en 5 méthyl-tétrahydrofolate naturellement fluorescent avant d'isoler ce folate par chromatographie liquide. Des protocoles d'hydrolyse enzymatique des échantillons alimentaires, permettant d'obtenir des teneurs vitaminiques les plus proches possibles des teneurs biodisponibles, ont également été proposés pour l'ensemble des vitamines déjà étudiées (B₁, B₂, B₃, B₆, B₈ et B₉)^{7,8,9}.

Pour achever cette vaste étude consacrée à la conception de méthodes chromatographiques de dosage des vitamines du groupe B, il restait à traiter deux cas très difficiles : celui de l'acide pantothénique (vitamine B₅) et celui des cobalamines (vitamine B₁₂). L'acide pantothénique est en effet une molécule chimique non fluorescente, absorbant très faiblement dans le domaine UV court et ne présentant aucun élément structural très caractéristique. Quant à la vitamine B₁₂, c'est une molécule (non fluorescente) de structure complexe, de masse molaire élevée et toujours présente dans les aliments à des teneurs très faibles (de l'ordre du ng.g⁻¹).

L'objectif de cette étude a été, pour le dosage de ces deux vitamines, d'élaborer un protocole analytique tout à fait original et complet applicable à n'importe quel échantillon alimentaire, comportant une hydrolyse enzymatique des formes liées, une purification de l'extrait, une transformation pré- ou post-colonne de la vitamine en composé fluorescent, un isolement par chromatographie liquide et une détection par fluorimétrie.

³ Lahély S., Bergaentzlé M. & Hasselmann C. (1999), *Food Chem.*, 65, 129-133.

⁴ Lahély S., Ndaw S., Arella F. & Hasselmann C. (1999), *Food Chem.*, 65, 253-258.

⁵ Reitzer-Bergaentzlé M., Marchioni M. & Hasselmann C. (1993), *Food Chem.*, 48, 321-324.

⁶ Bergaentzlé M., Arella F., Bourguignon J.B. & Hasselmann C. (1995), *Food Chem.*, 52, 81-86.

⁷ Ndaw S., Bergaentzlé M., Aoudé-Werner D., Lahély S. & Hasselmann C. (2001), *J. Chromatogr. A*, 928, 77-90.

⁸ Ndaw S., Bergaentzlé M., Aoudé-Werner D. & Hasselmann C. (2000), *Food Chem.*, 71, 129-138.

⁹ Ndaw S., Bergaentzlé M., Aoudé-Werner D. & Hasselmann C. (2002), *Food Chem.*, 78, 129-134.

CHAPITRE 1

**Dosage de la vitamine B₅ dans les
aliments après isolement
chromatographique et dérivation post-
colonne en composé fluorescent**

1. INTRODUCTION

La vitamine B₅, ou acide pantothénique, existe dans les aliments sous forme libre, mais aussi sous forme liée dans le coenzyme A (CoA) et l'acyl carrier protein (ACP) (Figure 1). Le CoA intervient comme activateur énergétique des résidus acétyles issus du métabolisme des glucides et des lipides et l'ACP participe à la synthèse des acides gras à longue chaîne. Ces deux formes de la vitamine B₅ sont biodisponibles. La détermination de la teneur en vitamine B₅ totale dans les aliments exige donc de libérer la vitamine de ses formes liées.

Les apports quotidiens conseillés en vitamine B₅ ont été estimés officiellement en France entre 7 et 10 mg. Aucun cas d'hypervitaminose n'a jamais été recensé. La vitamine B₅ se trouve dans la plupart des aliments à des concentrations comprises entre 1 et 200 µg.g⁻¹ (Tableau I). Pour la complémentation des aliments, l'acide pantothénique sous forme libre, très hygroscopique, est remplacé par du pantothénate de sodium ou de calcium.

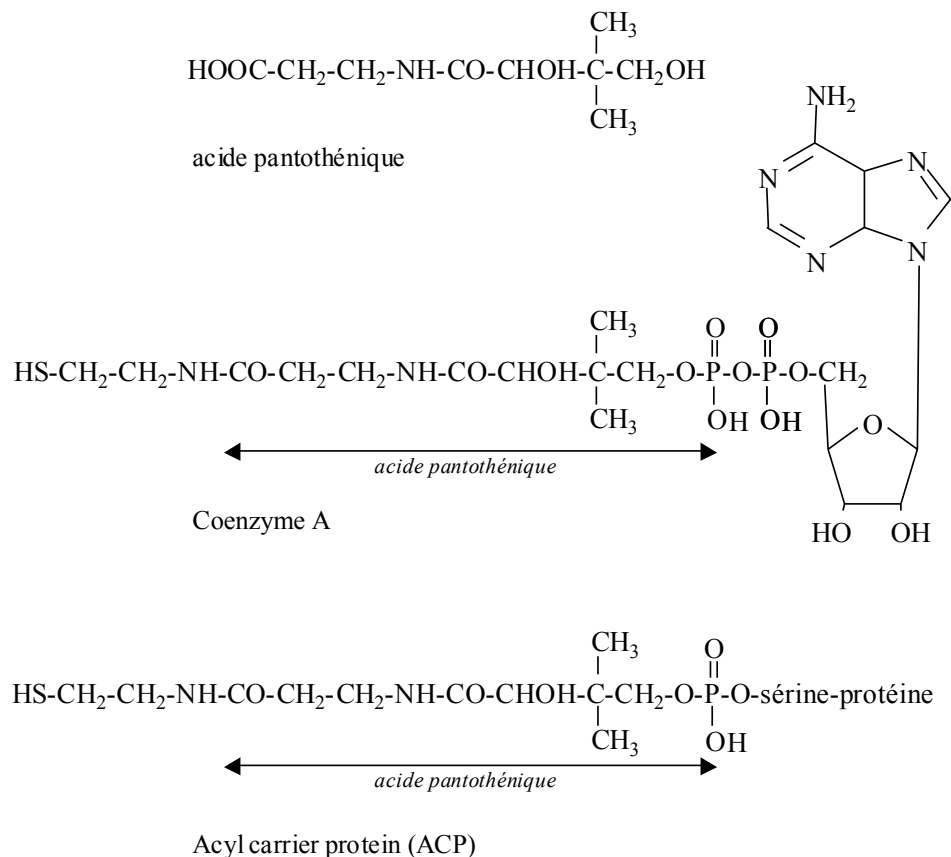


Figure 1. Structures de l'acide pantothénique, du coenzyme A et de l'acyl carrier protein.

Tableau I. Teneurs^a en vitamine B₅ de différents aliments (Souci *et al.*, 1994).

Aliment	Teneur ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
riz poli	6,2
levure de bière	72
lait de vache	2,8-4,2
avocat	11
carotte	2,7
épinards	1,9-3,1
haricots verts	5
lentilles	15,7
petits pois	7,2
tomate	2,8-3,4
cèpe	24,3-29,7
foie de porc	71-81
poulet	8,2-12,4
œuf de poule	11-18
saumon	10,2
hareng	93
cacao en poudre	11
thé	13

^a vraisemblablement obtenues par la méthode microbiologique (voir ci-dessous)

Pas plus une hydrolyse acide qu'une hydrolyse alcaline ne peut être utilisée pour hydrolyser les formes liées de la vitamine en acide pantothénique puisque l'acide pantothénique est dégradé par de tels traitements. La seule alternative reste une hydrolyse enzymatique. L'obtention d'acide pantothénique libre à partir du coenzyme A a été accomplie avec succès par l'action simultanée de la phosphatase alcaline et de la pantéthénase contenue dans du foie de pigeon (Novelli *et al.*, 1949). Même si ce traitement enzymatique (phosphatase et pantéthénase) ne permet pas la libération de l'acide pantothénique à partir de l'ACP (Majerus *et al.*, 1965 ; Wyse *et al.*, 1985), il est actuellement le plus couramment pratiqué pour le dosage de la vitamine B₅ totale dans les aliments, quelle que soit la technique de dosage de l'acide pantothénique utilisée par la suite (Walsh *et al.*, 1979 ; Tanner *et al.*, 1993 ; Gonthier *et al.*, 1998 b ; Rychlik, 2000). En effet, aucun analyste n'a jamais jusqu'à présent suggéré de méthode d'hydrolyse permettant de prendre en compte la participation de l'ACP dans la teneur en acide pantothénique.

La détermination de l'acide pantothénique dans les aliments est le plus souvent réalisée par voie microbiologique selon une méthode turbidimétrique utilisant *Lactobacillus plantarum* (Skeggs et Wright, 1944 ; Gonthier *et al.*, 1998 b). Cette méthode, recommandée par l'AOAC (Anon., 1997), présente une très bonne sensibilité (de l'ordre du pg). Ce dosage est cependant

fastidieux, long et finalement peu spécifique puisque la croissance du microorganisme peut être stimulée par d'autres substances issues de la matrice alimentaire telles que les acides gras. Sa précision est par ailleurs souvent relativement faible.

Les dosages radioimmunologiques (Walsh *et al.*, 1979 ; Walsh *et al.*, 1981) et de type ELISA (Morris *et al.*, 1988 ; Gonthier *et al.*, 1998 a et b) ont également été utilisés. Ils sont basés sur le même principe : la compétition pour des anticorps spécifiques de la vitamine B₅ entre la vitamine B₅ issue de l'échantillon et de la vitamine B₅ radiomarquée, dans le cas de la méthode radioimmunologique, ou liée à une protéine fixée sur un support solide, dans le cas de la méthode ELISA. Les résultats donnés par ces méthodes semblent concorder avec ceux obtenus par la méthode microbiologique (Walsh *et al.*, 1979 ; Gonthier *et al.*, 1998 b), même si cela ne peut être prouvé en raison de l'imprécision de cette dernière méthode. Par ailleurs, rien ne peut garantir leur spécificité en raison de la possibilité de réactions croisées, tout particulièrement dans les matrices alimentaires. Ces méthodes présentent de plus des inconvénients sur le plan pratique (utilisation de radioisotopes et comptage par scintillation pour les dosages radioimmunologiques, acquisition d'antisérums non disponibles commercialement pour les dosages par la technique ELISA).

Les méthodes colorimétriques et fluorimétriques sont nombreuses et variées : formation d'un sel de l'acide hydroxamique en présence d'hydroxylamine en milieu alcalin, puis d'un complexe coloré en présence d'ions ferriques, dosé par photométrie (Bergmann, 1952), réaction de la β -alanine (obtenue par hydrolyse acide ou basique de l'acide pantothénique) avec différents réactifs (Crokaert, 1949 ; Szalkowski *et al.*, 1951). Toutes ces réactions manquent de spécificité et nécessiteraient, dans le cas d'analyses de matrices alimentaires, l'élimination préalable des substances chimiques susceptibles de réagir avec les différents réactifs utilisés.

Les méthodes chromatographiques et par électrophorèse capillaire, beaucoup plus spécifiques que les précédentes, ont été fort peu développées jusqu'à présent en raison des propriétés physiques particulières de l'acide pantothénique, molécule très peu volatile, non fluorescente et absorbant très faiblement dans le domaine ultraviolet, à des longueurs d'onde inférieures à 210 nm.

Une méthode de dosage par électrophorèse capillaire en mode micellaire de l'acide pantothénique dans les compléments alimentaires multivitaminés a été développée par Schreiner *et al.* (2003). Par ailleurs, l'utilisation de l'électrophorèse capillaire et de l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine comme sélecteur chiral a permis de réaliser l'analyse chirale quantitative d'une boisson non alcoolisée contenant de l'acide pantothénique (Kodama *et al.*, 1998). La faible sensibilité du détecteur UV utilisé dans ces deux protocoles limite cependant leurs domaines d'application. Une méthode par isotachophorèse capillaire avec détection conductimétrique,

récemment proposée par Sadecka *et al.* (2003), serait par contre suffisamment simple et sensible pour effectuer en routine des analyses d'acide pantothénique en faibles concentrations. Ces auteurs n'ont cependant analysé que des produits complémentés à base de lait ou de céréales.

En raison de la faible volatilité de la vitamine B₅, les méthodes proposées pour l'isolement de cette vitamine par chromatographie en phase gazeuse nécessitent généralement une dérivation préalable de la fonction acide [par silylation (Prosser et Sheppard, 1971) ou méthylation (Banno *et al.*, 1991)]. Aucune application alimentaire n'a cependant été réalisée par ces auteurs. Une autre solution a consisté à doser la d-pantoyl lactone obtenue par hydrolyse de l'acide pantothénique en milieu acide concentré. Cette méthode a été utilisée pour doser la vitamine B₅ dans différentes matrices alimentaires [Tesmer *et al.* (1980) ; Davidek *et al.* (1985)]. Une étude réalisée dans le laboratoire a cependant montré les défauts de cette méthode : selon Lahély (1998), son taux de recouvrement n'est pas satisfaisant et sa répétabilité s'est avérée médiocre. Plus récemment, Rychlik (2000, 2001) et Rychlik et Freisleben (2002) ont conçu un dosage par dilution radioisotopique utilisant un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse. Cette méthode de dosage très sensible nécessite bien entendu une silylation préalable de l'acide pantothénique et apparaît complexe à utiliser. Elle requiert par ailleurs la synthèse d'un topoïsomère marqué de la vitamine (étalon interne), une synthèse également nécessaire dans l'élégante, mais néanmoins peu précise méthode utilisant le couplage chromatographie en phase liquide / spectrométrie de masse (Rychlik, 2003 a et b).

Quant à la chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) couplée à une détection par absorption UV, simple et rapide, elle est d'utilisation très limitée en raison de sa sensibilité insuffisante, l'acide pantothénique absorbant très faiblement dans l'UV ($\epsilon = 3000 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 205 nm et 20°C), et de sa spécificité médiocre puisque la mesure de l'absorbance doit être effectuée à une longueur d'onde très courte ($\lambda \leq 205 \text{ nm}$). De ce fait, seul le dosage de l'acide pantothénique dans du lait et des préparations pour enfants complémentés a pu être réalisé (Romera *et al.*, 1996 ; Woollard *et al.*, 2000).

L'objectif de ce travail a été, dans un premier temps, de proposer un mode de dérivation post-colonne de l'acide pantothénique en un composé fluorescent [hydrolyse alcaline à chaud de l'acide pantothénique en β -alanine, puis réaction de la β -alanine formée avec l'orthophthaldialdéhyde], inspiré du travail réalisé par Blanco *et al.* (1995) pour le dosage de l'acide pantothénique dans des solutions multivitaminées par injection de flux, et de concevoir ensuite une méthode complète, spécifique et sensible de dosage par CLHP-fluorimétrie de l'acide pantothénique libre et lié dans une grande variété d'aliments.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. LES COMPOSES CHIMIQUES

2.1.1. Les vitamines

L'acide pantothénique (sous forme de d-pantothénate de sodium), le coenzyme A (sel de lithium, 94 %) et la pantéthine ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

La pantéthéine a été synthétisée au laboratoire à partir de la pantéthine selon la méthode de Fisher et Szulc (1997). Deux cents μl d'une solution de pantéthine à $70 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ont été ajoutés à 2,4 ml d'une solution de tampon acétate 20 mM (pH 4,8) et à 400 μl d'une solution de Tris-(2-carboxyéthyl)-phosphine (TCEP) 1mM. Le mélange a été placé à 37°C pendant 1 h. La pantéthéine ainsi obtenue doit être utilisée dans les 2-3 jours suivant sa préparation. Au-delà de ce délai, elle se réoxyde en pantéthine.

Les solutions-mères des différents vitamères dans l'eau distillée ont été conservées à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation. Les solutions utilisées pour l'étalonnage ont été préparées à partir de solutions-mères d'acide pantothénique et de pantéthine à environ 1 g.l^{-1} et diluées avec de l'eau distillée. Pour obtenir des solutions étalons de pantéthéine, des solutions de pantéthine à des concentrations différentes ont été réduites.

2.1.2. Les enzymes

2.1.2.1. La phosphatase alcaline

Dix mille unités de phosphatase alcaline P6772 (Sigma) [EC 3.1.3.1] (poudre lyophilisée extraite de la muqueuse intestinale de veau) ont été mises en solution dans 50 ml d'une solution de tampon Tris 10 mM (pH 7).

Une étude comparative de l'activité de la phosphatase alcaline en fonction de la température d'incubation a été réalisée selon le protocole suivant : 5 U de phosphatase alcaline et 305 μg de coenzyme A ont été ajoutés à 15ml de tampon Tris 200mM (pH 8). Ce mélange a été mis à

incuber à la température choisie pendant 6h. Après incubation, cette solution a été transvasée dans une fiole jaugée de 50 ml, ajustée avec de l'eau distillée, filtrée sur membrane d'acétate de cellulose 0,45 µm (Chromafil, Macherey-Nagel, Hoerd, France) avant de procéder à l'analyse chromatographique de la pantéthéine et de la pantéthine dans les conditions précisées ci-dessous (voir § 2.4.3.3, p.17).

2.1.2.2. *La pantéthéinase*

La pantéthéinase, enzyme contenue dans le foie de pigeon, a été préparée selon deux protocoles différents.

Selon la méthode décrite par Rychlik (2000), 1 g de poudre acétonée de foie de pigeon (Sigma) a été dissous dans 5 ml d'une solution d'hydrogencarbonate de sodium à 20 mM et placé à 4°C. La solution obtenue a été transférée quantitativement dans un tube à centrifuger avec 5 ml de la solution d'hydrogencarbonate de sodium, puis centrifugée (à 4°C) à 10 000 g pendant 20 min. Le surnageant a été filtré sur une membrane d'acétate de cellulose 0,45 µm (Chromafil). Le filtrat obtenu a été versé sur 2,5 g d'échangeur d'ions Dowex 1X8-200 (Sigma) activé¹. L'ensemble a été mis sous agitation magnétique pendant 5 min à 4°C, puis centrifugé pendant 20 min à 4°C et 10 000 g et filtré sur une membrane d'acétate de cellulose 0,45 µm. Le filtrat obtenu a été versé à nouveau sur 2,5 g d'échangeur d'ions activé. L'ensemble a été agité pendant 5 min à 4°C, puis centrifugé une dernière fois à 10 000 g pendant 20 min à 4°C et filtré sur une membrane d'acétate de cellulose 0,45 µm. La solution purifiée a été congelée si elle n'était pas utilisée immédiatement (dans ce cas, cette solution sera mise à décongeler dans un bain eau - glace avant utilisation).

Selon le protocole de purification par dialyse mis au point dans le laboratoire, 1 g de la poudre acétonée de foie de pigeon a été dissous dans 10 ml d'une solution d'hydrogencarbonate de sodium 20 mM dans un bain eau-glace. La suspension a ensuite été centrifugée (à 4°C) à 3 000 g pendant 10 min. Le surnageant de la solution obtenu après centrifugation a été introduit dans un film de dialyse (SpectraPor 4, de diamètre 16mm, de largeur 25mm et de limite de masse molaire 12-14000, Bioblock, Illkirch, France), placé ensuite dans 3 l d'une solution d'hydrogencarbonate de sodium 20 mM pendant toute une nuit à 4°C. La solution a été aliquotée dans des flacons de 1

¹ Cinq grammes d'échangeur d'ions ont été mélangés à 50 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 1M et agités pendant 10 min. La solution a été filtrée sur verre fritté (porosité 3). Ces 3 étapes ont été répétées une fois avec 50 ml de la solution d'acide chlorhydrique et 10 fois avec 50 ml d'eau distillée. L'échangeur d'ions a été mis en suspension dans 50 ml d'eau dont le pH a été ajusté à 8 avec du tampon Tris 200 mM (pH 8). L'échangeur d'ions activé peut se conserver 2 jours à 4 °C.

ml et congelée lorsqu'elle ne devait pas être utilisée immédiatement (dans ce cas la solution de pantéthéinase sera mise à décongeler dans un bain eau-glace avant utilisation).

L'activité de la solution de pantéthéinase obtenue, définie en absence de norme officielle comme étant le nombre de μ moles de pantéthine hydrolysées en 1 h à 37°C et à pH 8 par ml de solution de pantéthéinase, a été déterminée de la façon suivante : 250 μ l de la solution de pantéthéinase ont été ajoutés à 100 μ l d'une solution de pantéthine à 1 g.l⁻¹ dans 10 ml de tampon Tris 10 mM (pH 7). Le mélange a été mis à incuber sous agitation à 37°C pendant 4 h. La solution a ensuite été transvasée quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml et ajustée à 50 ml avec de l'eau distillée. La solution a été centrifugée à 10 000 g pendant 10 min et le surnageant a été filtré sur membrane d'acétate de cellulose avant d'être analysé par CLHP (conditions chromatographiques précisées dans le paragraphe 2.4.3.3, p.17).

L'activité A de la solution de pantéthéinase (en U.ml⁻¹) est donnée par la formule (1) dans laquelle X représente la quantité d'acide pantothénique (en μ g) contenue dans 1 ml de la solution analysée, V le volume final de la solution (en ml), t la durée d'incubation (en h), M la masse molaire de l'acide pantothénique (en g.mol⁻¹) et v le volume de la solution de pantéthéinase utilisé (en ml).

$$A = \frac{V \cdot X}{2 \cdot t \cdot M \cdot v} = 0,114 \cdot X \quad (1)$$

2.1.2.3. La pepsine

La pepsine [EC 3.4.23.1], fournie par Sigma (P 7125), a été mise en solution dans de l'eau distillée avant d'être ajoutée à l'échantillon alimentaire.

La comparaison des activités de la solution de pepsine en fonction du pH a été directement effectuée sur l'une des matrices alimentaires étudiées, en l'occurrence le foie de porc. Cinquante ml d'eau distillée ont été utilisés pour la mise en solution de 0,8 g de foie de porc broyé (soit environ 16 mg.ml⁻¹). La solution a été centrifugée à 10 000 g pendant 5 min, puis filtrée. Un ml de filtrat a été ajouté à 3 ml de tampon acétate 50 mM (pH 4,5) ou de tampon phosphate 50 mM (pH 2 et 3). Le mélange a été incubé à 37°C pendant 10 min. Un ml de la solution de pepsine (environ 5 U.ml⁻¹) a été alors ajouté et le mélange a été à nouveau incubé à 37°C pendant exactement 10 min. Quinze ml d'une solution d'acide trichloroacétique à 5 % (m/v) ont été ajoutés pour arrêter la réaction enzymatique. Le mélange final a été laissé à 37°C pendant 5 min. Une fois la solution filtrée, le filtrat a été analysé par photométrie à 280 nm.

2.1.2.4. *Les autres enzymes*

L' α -amylase [EC 3.2.1.1], la papaïne [EC 3.4.22.2] et la pronase® [EC 3.4.24.31] (protéase de *Streptomyces griseus*) ont été fournies par Sigma.

2.1.3. **Les autres composés chimiques**

Les différents produits chimiques utilisés ont été les suivants : acétate de sodium (Riedel-de Haën, Saint-Quentin Fallavier, France), acide acétique glacial (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), acide chlorhydrique 36 % (Prolabo), acide 3-mercaptopropionique (MPA) (Sigma), acide orthophosphorique 85 % (Merck), β -alanine 99 % (Aldrich), hydroxyde de sodium (BDH Laboratory Supplies AnalaR, Fontenay-sous-Bois, France), hydrogénocarbonate de sodium (Merck), 2-mercaptoéthanol (ME) (Merck), méthanol pour CLHP (Prolabo), ortho-phaldialdéhyde (OPA) (Sigma), tris-(2-carboxyéthyl)-phosphine (TCEP) (Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France) et Tris base (Sigma).

Les réactifs préparés à partir de ces produits chimiques ont été mis en solution dans l'eau distillée ultrapure (Milli-Qplus, Millipore, Molsheim, France), à l'exception de l'OPA mis en solution dans du méthanol, aux concentrations indiquées dans le texte lors de leur usage.

2.1.4. **La préparation des échantillons alimentaires**

Les aliments étudiés (carottes, épinards, haricots verts et petits pois surgelés, lentilles, avocats, foie de porc, œufs, viande de poulet et saumon frais, lait en poudre et levure) ont été achetés localement. Seul le lait en poudre était complémenté en vitamine B₅. A l'exception des produits secs (lait en poudre, levure et lentilles) et des œufs frais, les aliments ont été conservés à l'état congelé jusqu'au moment de leur analyse. Les aliments solides ont été finement broyés avant de procéder à l'extraction.

L'œuf entier frais a été battu dans un bécher juste avant son analyse. Les prises d'essai utilisées [1 g pour la levure et le foie de porc ; 2 g pour le lait en poudre ; 5 g pour l'avocat, les lentilles, l'œuf, la viande de poulet et le saumon ; 7 g pour les autres matrices] ont tenu compte de l'estimation de la teneur en vitamine B₅ de ces aliments (voir tableau I, p.7).

2.2. LES PROTOCOLES D'EXTRACTION

2.2.1. L'extraction de l'acide pantothénique libre

L'échantillon a été pesé dans un flacon de 100 ml. Vingt-cinq ml d'eau distillée ont été ajoutés. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 5 min. Il a été ensuite transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml, ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée et centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. Le surnageant a été filtré sur membrane d'acétate de cellulose (0,45 µm) avant d'être purifié.

2.2.2. L'extraction enzymatique de l'acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A

L'échantillon a été pesé dans un flacon de 100 ml. Vingt-cinq ml de tampon Tris 200 mM (pH 8), 600 µl d'une solution de phosphatase alcaline (20 U.ml⁻¹) et 2,5 ml d'une solution de pantéthénase (80 mU.ml⁻¹) ont été ajoutés. Le mélange a été mis à incuber à 20°C pendant 18 h. Il a été ensuite transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml, ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée et centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. Le surnageant a été filtré sur membrane d'acétate de cellulose (0,45 µm) avant d'être purifié.

2.2.3. L'extraction enzymatique de la vitamine B₅ totale

L'échantillon a été pesé dans un flacon de 100 ml. Quinze ml de tampon acétate 50 mM (pH 4,5) et 1 ml d'une solution de pepsine [50 mg.ml⁻¹ (4500 U.ml⁻¹)] ont été ajoutés. Le mélange a été mis à incuber à 50°C pendant 3 h. Après refroidissement son pH a été ajusté à 8 avec une solution d'hydroxyde de sodium 5 M. Dix ml de tampon Tris 200 mM (pH 8) ont été ajoutés, ainsi que 600 µl d'une solution de phosphatase alcaline (20 U.ml⁻¹) et 2,5 ml d'une solution de pantéthénase (80 mU.ml⁻¹). Le mélange a été mis à incuber à 20°C pendant 18 h. Il a été ensuite transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml, ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée et centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. Le surnageant a été filtré sur membrane d'acétate de cellulose (0,45 µm) avant d'être purifié.

2.3. LA PURIFICATION DES EXTRAITS PAR EXTRACTION EN PHASE SOLIDE

Cinq ml d'extrait obtenu précédemment (§ 2.2.1, 2.2.2 ou 2.2.3) ont été passés sur une cartouche échangeuse d'anions (Chromafix 400-SB, Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) préalablement conditionnée avec 5 ml de méthanol, puis 5 ml d'eau distillée. Les 2 premiers ml ont été jetés. Les 3 ml suivants ont été récupérés. Deux de ces 3 ml ont été placés dans une fiole jaugée de 5 ml et 250 µl d'une solution d'acide chlorhydrique 250 mM ont été ajoutés. Le volume a été ajusté à 5 ml avec le tampon phosphate 300 mM (pH 3,0) [le pH final de la solution a toujours été compris entre 2,8 et 3,2, quelle que soit la nature de la matrice alimentaire analysée]. Les 5 ml d'extrait à purifier ont ensuite été passés sur une cartouche échangeuse de cations (Chromafix 400-SA, Macherey-Nagel) préalablement conditionnée avec 5 ml de méthanol, puis 5 ml d'eau distillée. Les 2 premiers ml ont été jetés. Les 3 ml suivants ont été récupérés pour analyse par CLHP.

Dans le cas des produits laitiers, les 5 ml d'extrait ont été centrifugés à 10 000 g pendant 10 min avant d'être passés sur la cartouche échangeuse de cations.

2.4. L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

2.4.1. L'appareillage chromatographique

Le système CLHP utilisé était constitué d'un distributeur de solvants 9012 (Varian, Les Ulis, France), d'un injecteur 9300 avec une boucle de 100 µl (Varian), d'un détecteur fluorimétrique modèle 363 (Varian) et d'un logiciel d'intégration Star chromatography. La colonne utilisée avait pour phase stationnaire de l'octadécylsilane (Lichrospher 100 RP 18 endcapped, 5 mm * 250 mm, granulométrie 5 µm ; Merck, Darmstadt, Allemagne) et était précédée d'une colonne de garde de même phase stationnaire (4 mm* 4 mm, granulométrie 5 µm, Merck).

2.4.2. La dérivation post-colonne

La dérivation post-colonne a été réalisée initialement avec un dispositif à deux pompes, puis avec un dispositif à une seule pompe.

Pour le dispositif à deux pompes (Figure 2), des pompes annexes Beckmann (modèle 110A, Beckmann-Coulter, Roissy, France) et Waters HPLC (modèle 515) ont été utilisées, ainsi que deux réacteurs en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de longueurs 40 m et 3 m, et de diamètre

interne 500 μm (Bioblock, Illkirch, France). La réaction post-colonne a eu lieu en deux temps. Pour la réaction d'hydrolyse, la phase mobile en sortie de colonne, à un débit de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, a été mélangée à une solution d'hydroxyde de sodium 200 mM également acheminée à un débit de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, ce qui a entraîné une dilution au demi de la concentration en hydroxyde de sodium dans le milieu réactionnel. Le mélange ainsi obtenu a circulé dans un réacteur de 40 m placé dans un four Crococil (Jasco, Nantes, France) à la température de consigne de 99°C [le tube a été enroulé autour de l'un des manchons métalliques du four]. Le débit étant de $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, le temps de présence de l'acide pantothénique dans le réacteur de 40 m a été de 4 min. La réaction de formation du dérivé fluorescent s'est ensuite effectuée dans le réacteur de 3 m à température ambiante. La solution de dérivation, composée d'OPA (1,5 mM) et de MPA (0,6 mM) a été ajoutée à un débit de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ au milieu réactionnel sortant du réacteur de 40 m, ce qui a entraîné une dilution au tiers des concentrations en OPA et en MPA dans le mélange réactionnel. Le débit étant alors de $3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, le temps de présence dans le réacteur de 3 m de la β -alanine formée lors de l'hydrolyse alcaline a été de 0,2 min.

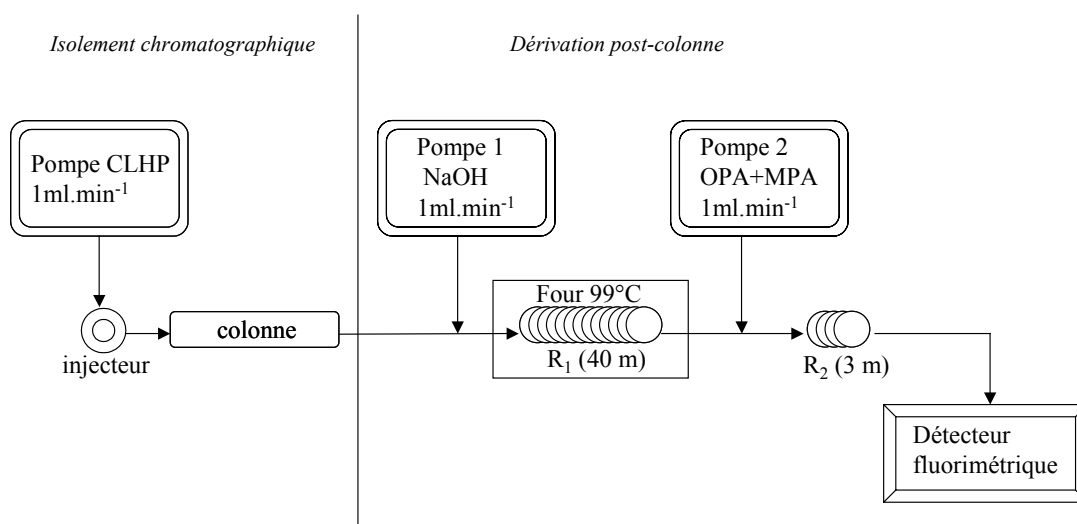


Figure 2. Schéma du montage CLHP/fluorimétrie utilisé pour la dérivation post-colonne de la vitamine B₅ avec une configuration à deux pompes.

Dans le dispositif à une seule pompe (Figure 3), la phase mobile sortant de la colonne avec un débit de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a été mélangée à la solution de dérivation composée d'hydroxyde de sodium (200 mM), d'OPA (1,0 mM) et de MPA (1,6 mM) acheminée par la pompe Beckman à un débit de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, ce qui a entraîné une dilution au demi des concentrations des réactifs dans le milieu réactionnel. Ce dernier a circulé dans le réacteur de 40 m placé comme précédemment dans un four Crococil à la température de consigne de 99°C . Le temps de séjour de l'acide pantothénique dans le réacteur a été de 4 min.

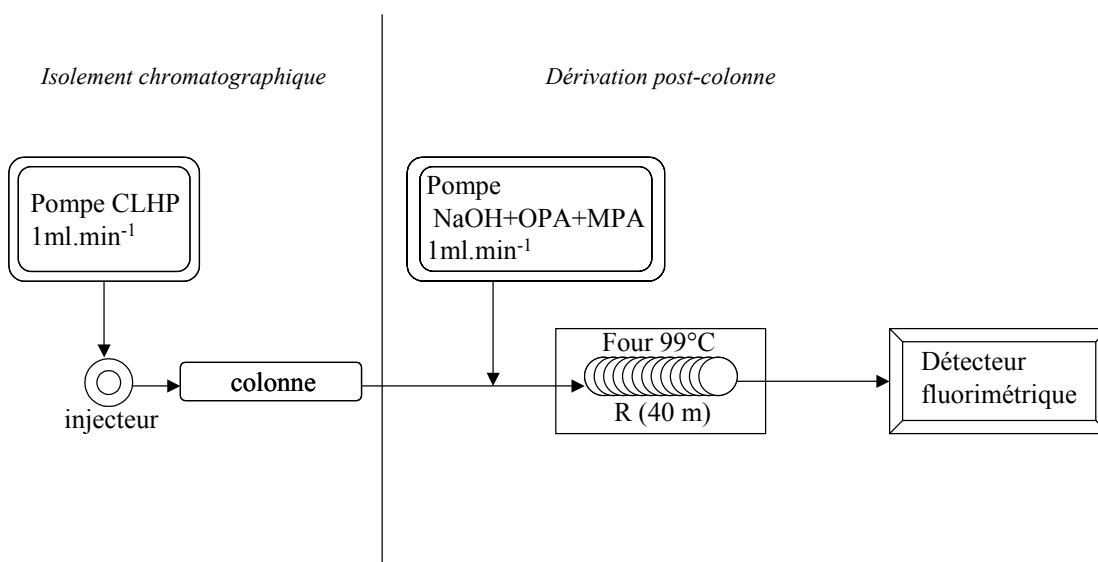


Figure 3. Schéma du montage CLHP/fluorimétrie utilisé pour la dérivation post-colonne de la vitamine B₅ avec une configuration à une seule pompe.

2.4.3. Les conditions chromatographiques utilisées

2.4.3.1. L'optimisation de la dérivation post-colonne (analyse de solutions étalons d'acide pantothénique)

La phase mobile utilisée a été un mélange tampon phosphate (33mM, pH 2,5) / méthanol 90/10 (v/v) en élution isocratique. La durée d'analyse a été de 20 min.

2.4.3.2. L'analyse de la vitamine B₅ dans les aliments

La phase mobile utilisée a été un gradient méthanol - tampon phosphate. L'éluant de départ était le tampon phosphate 33 mM (pH 2,5). La proportion de méthanol a été augmentée linéairement de 0 à 10 % en 25 min. La composition finale [90/10 (v/v)] a été maintenue pendant 8 min. La phase mobile a été ensuite ramenée immédiatement à sa composition initiale (tampon phosphate).

2.4.3.3. La séparation de la pantéthine, de la pantéthéine et de l'acide pantothénique

Pour permettre la séparation et le dosage de la pantéthine, de la pantéthéine et de l'acide pantothénique, nécessaires lors de l'appréciation des activités de la phosphatase alcaline et de la pantéthéinase (voir § 2.1.2.1, p.10 et 2.1.2.2, p.11), la phase mobile utilisée a été la suivante : la

proportion de méthanol dans le tampon phosphate pH 2,5, initialement de 10 %, a été augmentée linéairement de 10 à 45 % en 7 min. La composition finale [55/45 (v/v)] a été maintenue pendant 11 min. La phase mobile a ensuite été ramenée immédiatement à sa composition initiale [tampon phosphate / méthanol 90/10 (v/v)].

Dans tous les cas étudiés, le débit de la phase mobile a été de 1 ml.min⁻¹ et le volume d'injection de 100 µl. Les longueurs d'onde du détecteur fluorimétrique ont été fixées à 345 nm pour l'excitation et à 455 nm pour l'émission.

2.5. L'EXPRESSION DES RESULTATS

2.5.1. L'expression de la teneur en vitamine B₅ et du taux de recouvrement de la méthode

Le dosage de l'acide pantothénique présent dans les aliments a été effectué par étalonnage externe. Des dilutions de la solution-mère d'acide pantothénique (1g.l⁻¹) ont été réalisées dans de l'eau distillée de façon à obtenir des solutions étalons de concentrations comprises entre 0,05 et 2,00 µg.ml⁻¹.

La concentration C en vitamine B₅ présente dans l'aliment analysé (exprimée en µg.g⁻¹ d'acide pantothénique libre) est donnée par la formule (2) dans laquelle X est la concentration d'acide pantothénique (exprimée en µg.ml⁻¹) dans la solution analysée et m la masse de la prise d'essai (en g) :

$$C = \frac{125 \cdot X}{m} \quad (2)$$

Pour la détermination du taux de recouvrement de vitamine B₅ dans un aliment, deux séries d'essais ont été réalisées. Une première série de 3 mesures a été effectuée sans ajout d'acide pantothénique et a permis de déterminer la teneur moyenne en acide pantothénique \bar{C} (en µg.g⁻¹) dans l'aliment. Une deuxième série de 3 mesures a été effectuée en ajoutant à l'aliment une quantité Q d'acide pantothénique (en µg), correspondant environ à la moitié de la quantité d'acide pantothénique présente à l'origine dans l'aliment. Soit C_i la teneur en acide pantothénique (en µg.g⁻¹) dans l'échantillon i (i variant de 1 à 3). Le taux de recouvrement moyen \bar{T} de la méthode (en %) est donné par la formule (3) dans laquelle m_i désigne la masse de la prise d'essai de l'échantillon i (en g) :

$$\bar{T} = 100 \sum_{i=1}^3 \frac{m_i \cdot (C_i - \bar{C})}{3 \cdot Q} \quad (3)$$

2.5.2. L'analyse statistique des résultats

Le test de comparaison des moyennes de 2 essais (Miller, 1993) a été utilisé pour comparer les teneurs en acide pantothénique obtenues en utilisant différents protocoles d'extraction. Il s'agit de comparer deux séries de mesures de concentrations moyennes \bar{C}_1 et \bar{C}_2 et d'écart-types respectifs s_1 et s_2 .

Avant d'appliquer ce test, il a été vérifié que les écart-types n'étaient pas significativement différents. La valeur expérimentale F a été calculée par la formule (4) :

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}, \text{ avec } s_1^2 \geq s_2^2 \quad (4)$$

Si cette valeur expérimentale F est inférieure à la valeur théorique de 39, correspondant à 2 séries de 3 mesures et à un intervalle de confiance de 95 %, la différence entre les écart-types n'est pas significative.

La variance des 2 séries de mesures, s^2 , est alors donnée par la formule (5) dans laquelle n_1 et n_2 sont respectivement le nombre de déterminations de la 1^{ère} et de la 2^{ème} séries :

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (5)$$

Le test de comparaison des moyennes permet de rejeter ou non l'hypothèse selon laquelle ($\bar{C}_1 - \bar{C}_2$) diffère significativement de zéro. Pour cela une valeur expérimentale t, calculée par la formule (6), doit être comparée à une valeur théorique pour un intervalle de confiance fixé.

$$t = \frac{\bar{C}_1 - \bar{C}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (6)$$

Si la valeur expérimentale est plus grande que la valeur théorique, l'hypothèse initiale est acceptée : la différence entre les 2 moyennes est significative.

Pour les comparaisons effectuées dans cette étude (comparaison de 2 séries de 3 déterminations), la valeur tabulée de t pour un intervalle de confiance de 95 % est de 2,78.

3. Résultats et discussion

3.1. LA DERIVATION POST-COLONNE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE EN 1-(CARBOXYETHYL)THIO-2-(CARBOXYETHYL)ISOINDOLE FLUORESCENT

Pour procéder au dosage fluorimétrique de l'acide pantothénique dans des préparations multivitaminées par injection de flux (FIA), Blanco *et al.* (1995) avaient choisi d'automatiser la transformation de cette vitamine en un composé fluorescent, le 1-(éthyl)thio-2-(carboxyéthyl)isoindole [réaction de la β -alanine, formée par hydrolyse alcaline de l'acide pantothénique, avec l'ortho-phtaldialdéhyde (OPA) en présence de 2-mercaptoéthanol (ME)] (Figure 4). Ils avaient utilisé pour cela un dispositif à deux pompes, la première amenant une solution d'hydroxyde de sodium 600 mM avec un débit de 0,9 ml.min⁻¹, la seconde une solution de dérivation (OPA 0,2 mM, ME 0,02 mM et acide borique 210 mM) avec un débit de 1ml.min⁻¹. La réaction d'hydrolyse a eu lieu dans un réacteur de 10 m chauffé à 85°C¹ (durée de la réaction 2,2 min). La deuxième étape, formation de l'isoindole, a eu lieu dans un réacteur de 3 m (durée de la réaction 0,3 min) à température ambiante. La limite de détection indiquée par ces auteurs a été de 0,7 ng. Les rendements d'hydrolyse de l'acide pantothénique et de formation du dérivé indolique n'ont par contre pas été fournis.

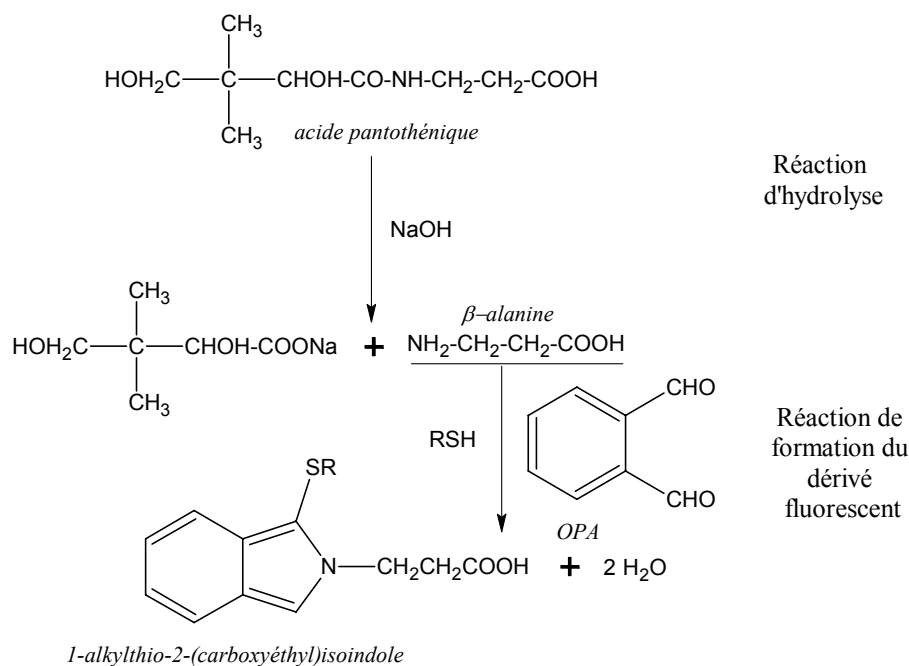


Figure 4. Réaction de transformation de l'acide pantothénique en composé fluorescent.

¹Les auteurs n'ont pas précisé le mode de chauffage utilisé, four ou bain-marie. Dans le cas de l'utilisation d'un four, il est évident que la température de consigne fixée sera plus élevée que la température effective du milieu réactionnel.

Blanco *et al.* (1995) avaient choisi d'utiliser un dispositif à deux pompes pour deux raisons. Tout d'abord, ils voulaient pouvoir abaisser le pH du milieu réactionnel entre la première et la deuxième réaction par ajout d'acide borique aux réactifs de la deuxième réaction (OPA et ME). En effet, lors de la première réaction, un pH très alcalin est nécessaire pour effectuer l'hydrolyse de l'acide pantothénique en β -alanine avec un bon rendement, alors que lors de la deuxième réaction la zone optimale de pH pour la formation du dérivé fluorescent est comprise entre 10,5 et 12,0. Ils souhaitaient par ailleurs effectuer la deuxième réaction à température ambiante (alors que la première réaction est effectuée à 85°C), ayant émis l'hypothèse, sans la vérifier néanmoins, que le composé fluorescent formé pourrait être dégradé par la chaleur.

Le mode de dérivation proposé par Blanco *et al.* (1995) ayant donné de bons résultats en analyse par injection de flux, encore fallait-il s'assurer qu'il était transposable en chromatographie liquide.

3.1.1. La dérivation post-colonne effectuée en deux étapes distinctes (configuration avec 2 pompes)

Les premiers essais de dérivation post-colonne en chromatographie liquide réalisés au cours de ce travail en utilisant les conditions préconisées par Blanco *et al.* (1995) (voir p. 20) n'ont pas été satisfaisants car la présence d'acide borique a engendré un très important bruit de fond lors de l'enregistrement du chromatogramme. La gêne a été telle qu'il a été nécessaire d'éliminer ce réactif du milieu réactionnel. Le pH de la solution à la sortie du premier réacteur (13,7) étant alors beaucoup trop élevé dans le deuxième réacteur, en dépit de la présence du tampon phosphate pH 2,5, il a donc fallu diminuer la concentration en hydroxyde de sodium dans le premier réacteur pour que le pH soit acceptable dans ce deuxième réacteur.

En abaissant la concentration en hydroxyde de sodium de 600 à 100 mM, et avec une température de consigne du four de 85°C, les rendements d'hydrolyse alcaline ont été malheureusement très médiocres (environ 50 %). Une optimisation de tous les paramètres de cette dérivation (concentrations en hydroxyde de sodium, en OPA et en ME, température, longueurs des réacteurs) s'est donc avérée nécessaire.

Lors de cette optimisation, deux grandeurs chromatographiques ont tout particulièrement été étudiées : l'aire du pic chromatographique correspondant au dérivé fluorescent de l'acide pantothénique et le rapport de la hauteur de ce pic chromatographique sur celle du bruit de fond. L'amplitude du bruit de fond a été déterminée sur une durée minimale de 2 min au voisinage du

pic chromatographique. Ce dernier paramètre est particulièrement important à prendre en compte lorsque les concentrations d'acide pantothénique à doser sont proches de la limite de quantification. Ainsi lors du choix des conditions optimales de dérivation, il apparaît plus important à considérer comme paramètre que la simple mesure de l'aire du pic chromatographique.

Le rendement de l'étape d'hydrolyse alcaline a été calculé de la façon suivante : deux solutions de concentrations molaires identiques (4,15 μM), l'une d'acide pantothénique, l'autre de β -alanine, ont été soumises à cette hydrolyse ; le rendement d'hydrolyse correspond alors au rapport des aires des pics chromatographiques obtenus après dérivation de ces solutions.

Tous les essais effectués lors de cette optimisation l'ont été en analysant par chromatographie une quantité de 0,415 nmol d'acide pantothénique. La phase mobile utilisée a été celle décrite dans le paragraphe 2.4.3.1 (p.17).

3.1.1.1. *L'optimisation des conditions expérimentales*

Les différents paramètres réactionnels à optimiser (voir figure 2, p.16) sont la concentration en hydroxyde de sodium ([NaOH]), la température du four (T), les concentrations en ortho-phthaldialdéhyde ([OPA]) et en mercaptoéthanol ([ME]) (ou en acide mercaptopropionique ([MPA])), les longueurs des réacteurs d'hydrolyse alcaline (R_1) et de formation du dérivé fluorescent (R_2).

Des essais préliminaires, dans des conditions proches de celles utilisées par Blanco *et al.* (1995), ont tout d'abord été réalisés en tubes à essai : 1 ml d'une solution d'acide pantothénique à 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a été ajouté à 4 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 600 mM. Cette solution a été placée dans un bain-marie à 85°C pendant 2 min, puis son pH a été ajusté entre 10,5 et 12 avec une solution d'acide chlorhydrique 6 M. Dix μl d'une solution de ME 12 mM et 100 μl d'une solution d'OPA 12 mM ont ensuite été ajoutés. Le volume final de la solution a été ajusté à 6 ml. Ces essais ont permis de constater que l'intensité de fluorescence obtenue était faible. En augmentant d'un facteur 10 la concentration en OPA (la concentration en ME dans la solution restant égale à 0,02 mM), cette intensité a certes augmenté, mais faiblement (facteur 1,3). En augmentant d'un facteur 10 la concentration en ME (la concentration en OPA dans la solution restant égale à 0,2 mM), l'intensité de fluorescence a par contre augmenté notablement (facteur 8). Pour pouvoir suivre dans les meilleures conditions l'évolution du signal de fluorescence lors de l'optimisation des différents paramètres expérimentaux de la dérivation post-colonne, la concentration initiale en ME a donc d'emblée été fixée à 0,2 mM.

- la concentration en hydroxyde de sodium

En absence d'acide borique, la concentration en hydroxyde de sodium à ne pas dépasser dans le réacteur pour que le pH du mélange réactionnel (phase mobile + hydroxyde de sodium) reste inférieur à 12,0 a été estimée à 200 mM [soit une valeur trois fois plus faible que celle proposée par Blanco *et al.* (1995)]. Cette concentration n'est pas cependant la concentration optimale. Il a en effet été montré que le rendement d'hydrolyse alcaline de l'acide pantothénique (Figure 5-a), ainsi que l'aire du pic chromatographique obtenu (Figure 5-b) avaient des valeurs optimales pour une concentration en hydroxyde de sodium de l'ordre de 100 mM, le pH dans le deuxième réacteur étant alors de 11,7.

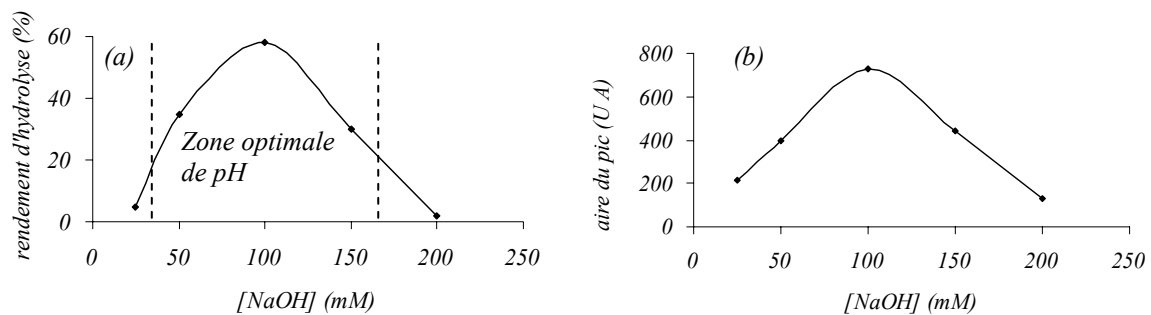


Figure 5. Effet de la concentration en hydroxyde de sodium dans le réacteur R₁ sur le rendement d'hydrolyse (a) et sur l'aire du pic chromatographique obtenu (b) [R₁ (40 m, 85°C), R₂ (3 m), ME 0,2 mM, OPA 0,2 mM].

Pour des concentrations en hydroxyde de sodium supérieures à 160 mM, le pH du mélange réactionnel était alors trop élevé (supérieur à 12,0), d'où une diminution importante de l'aire du pic chromatographique. Pour des concentrations en hydroxyde de sodium inférieures à 100mM, le pH du mélange réactionnel a rapidement diminué pour finalement être inférieur à 10,5, ce qui explique la nette diminution du rendement d'hydrolyse alcaline et donc de l'aire du pic chromatographique. La concentration en hydroxyde de sodium dans le réacteur doit donc être de 100 mM, ce qui impose, pour le réactif, une concentration de 200 mM.

- la température du four

Dans leur article, Blanco *et al.* (1995) ne donnaient malheureusement aucun détail sur le mode de chauffage du réacteur R₁. Au cours de ce travail, les premiers essais ont été réalisés avec un bain-marie car ce mode de chauffage permet d'obtenir une température du milieu réactionnel

beaucoup plus proche de la température de consigne qu'en utilisant un four. Malheureusement, le bruit de fond de l'enregistrement chromatographique obtenu avec un chauffage au bain-marie s'est avéré deux fois plus important que celui obtenu avec le four, vraisemblablement en raison d'une certaine perméabilité du réacteur à l'oxygène dissous dans l'eau ou, plus vraisemblablement, d'un début de formation de bulles dans la phase mobile. Pour obtenir la meilleure sensibilité possible avec ce mode de dérivation, il est donc apparu préférable de choisir le four comme mode de chauffage.

Plus la température de consigne du four a été élevée, meilleur a été le rendement d'hydrolyse alcaline (Figure 6-a) et plus l'aire du pic chromatographique a été grande (Figure 6-b). Le rendement le plus élevé ($83 \pm 5 \%$) a été obtenu pour une température de consigne du four de 99°C .

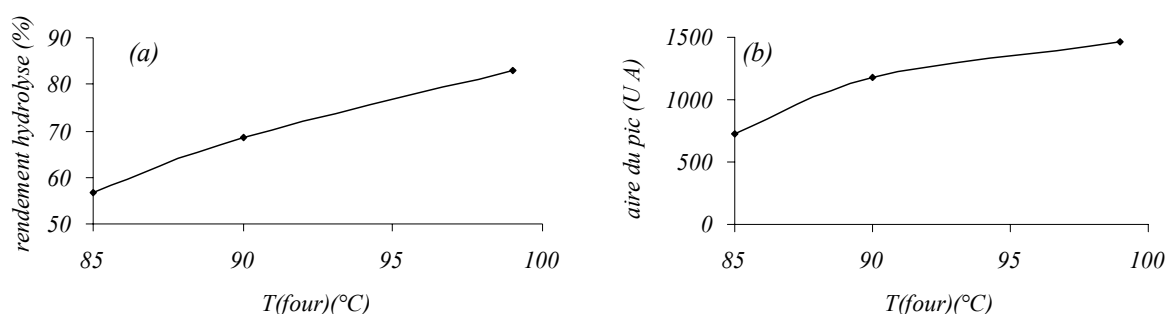


Figure 6. Effet de la température du four contenant le réacteur R_1 sur le rendement d'hydrolyse (a) et sur l'aire du pic chromatographique obtenu (b) [R_1 (40 m), NaOH 100 mM, R_2 (3 m), ME 0,2 mM, OPA 0,2 mM].

La température réelle du milieu réactionnel est techniquement difficile à mesurer, mais il est évident qu'elle sera dans ce cas bien inférieure à la température de consigne de 99°C , ce qui explique pourquoi aucune bulle d'air ne s'est apparemment formée dans le milieu réactionnel. Cela se serait certainement produit à des températures de four plus élevées. La température de consigne du four a donc été maintenue à 99°C , le rendement de l'hydrolyse alcaline étant tout à fait satisfaisant à cette température.

- la concentration en thiol

En utilisant, comme thiol, le 2-mercaptoéthanol ($\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$) proposé par Blanco *et al.* (1995), l'aire du pic chromatographique obtenu a tout d'abord augmenté avec la concentration en thiol, puis a ensuite atteint un palier à la concentration de 1,6 mM (Figure 7-a). Une évolution tout à fait similaire du rapport de la hauteur du pic chromatographique sur le bruit de fond a été observée (Figure 7-b).

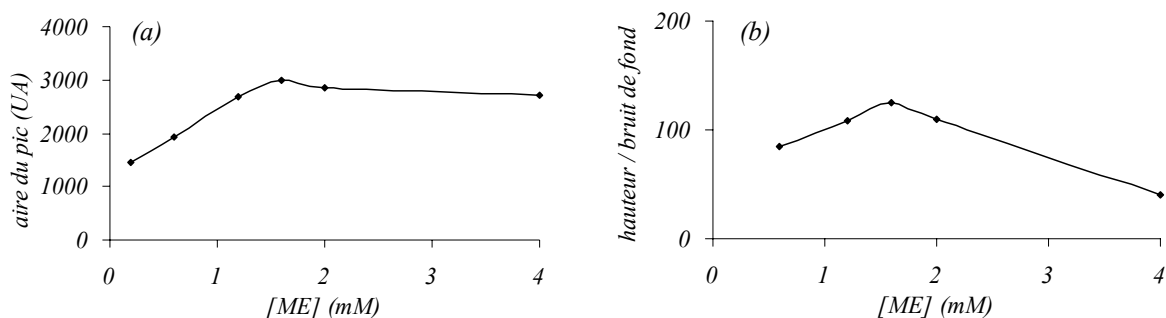


Figure 7. Effet de la concentration en 2-mercaptoéthanol dans le réacteur R₂ sur l'aire du pic chromatographique obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur du pic chromatographique sur le bruit de fond (b) [R₁ (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, R₂ (3 m), OPA 0,2 mM].

La réaction de dérivation par l'OPA en présence d'un thiol est très couramment utilisée, notamment pour l'analyse d'acides aminés. Molnar-Perl (2001), lors d'une étude détaillée des paramètres pouvant influencer la stabilité des dérivés formés, a, entre autres, testé trois thiols différents : le 2-mercaptoéthanol (ME), l'acide 3-mercaptopropionique (MPA) et l'éthanethiol. L'intensité de fluorescence obtenue avec l'acide 3-mercaptopropionique a été plus importante que celle obtenue avec le 2-mercaptoéthanol et l'éthanethiol. De plus, le dérivé fluorescent formé en présence de MPA a été particulièrement stable. Le MPA donnant, semble-t-il, de meilleurs résultats que le ME, des essais de dérivation post-colonne ont également été réalisés avec ce thiol. Les évolutions de l'aire du pic chromatographique obtenu et du rapport de la hauteur de ce pic sur le bruit de fond en fonction de la concentration en MPA (Figure 8) ont été très similaires à celles observées précédemment avec le 2-mercaptoéthanol (Figure 7). L'aire du pic chromatographique a atteint un palier pour une concentration de 0,6 mM en MPA. La valeur maximale du rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond n'a cependant pas été obtenue à cette concentration, mais à une concentration plus faible (0,2 mM). La diminution de ce rapport dès que la concentration en MPA a dépassé 0,2 mM a été provoquée par une augmentation inexplicée du bruit de fond (Figure 9).

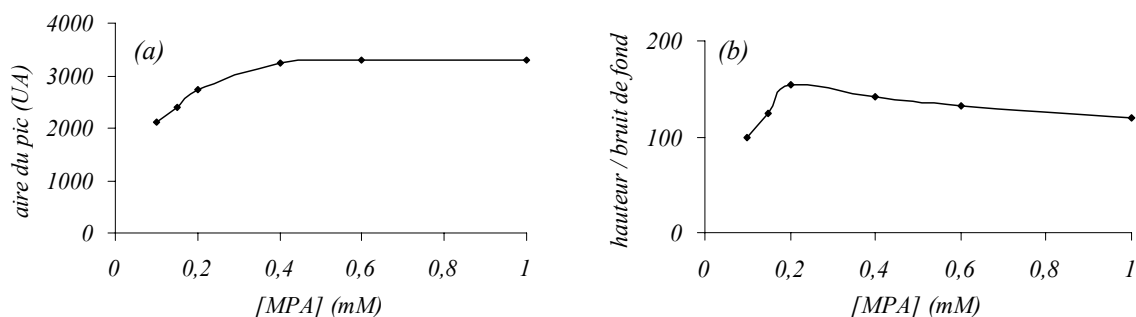


Figure 8. Effet de la concentration en MPA dans le réacteur R₂ sur l'aire du pic chromatographique obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond (b) [R₁ (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, R₂ (3 m), OPA 0,2 mM].

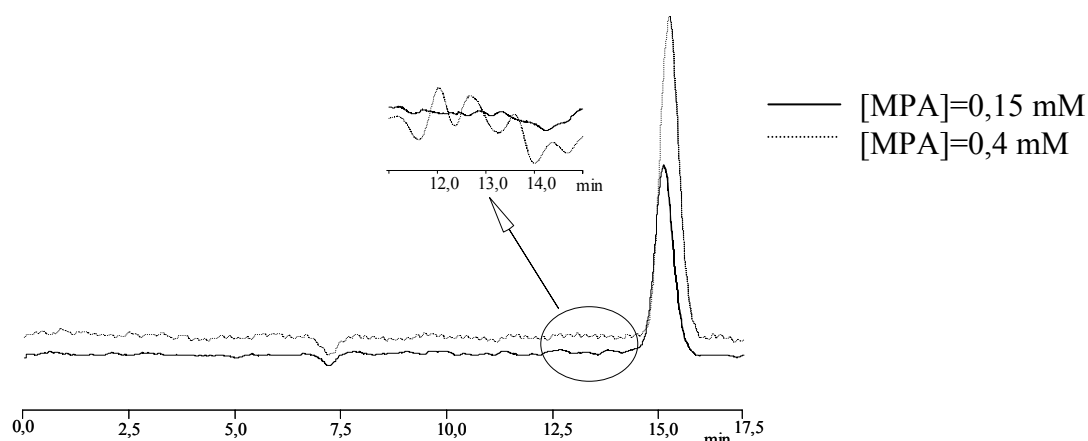


Figure 9. Chromatogrammes d'une solution étalon d'acide pantothénique à $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenus en choisissant deux concentrations différentes en MPA [R_1 (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, R_2 (3 m), OPA 0,2 mM].

Les valeurs maximales du rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond obtenues pour les deux concentrations optimales en thiol (0,2 mM pour le MPA et 1,6 mM pour le ME) n'apparaissent pas très différentes (155 pour le MPA et 125 pour le ME). Néanmoins la limite de quantification de l'acide pantothénique obtenue en utilisant le MPA (7,5 ng) s'est révélée sensiblement plus basse qu'en utilisant le ME (15 ng). Dans la suite de l'étude, c'est donc le MPA, en lieu et place du ME, qui a été choisi comme réactif dans la réaction de dérivation. La concentration optimale en MPA étant de 0,2 mM dans le réacteur, elle doit donc être, en raison de l'effet de dilution, de 0,6 mM dans le réactif de dérivation.

- la concentration en OPA

L'aire du pic chromatographique a tout d'abord augmenté avec la concentration en OPA, puis a atteint un palier pour une concentration de 1,0 mM (Figure 10-a). Comme précédemment, cependant, le rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond (Figure 10-b) a nettement diminué au-delà de 0,5 mM, en raison de l'augmentation du bruit de fond (Figure 11).

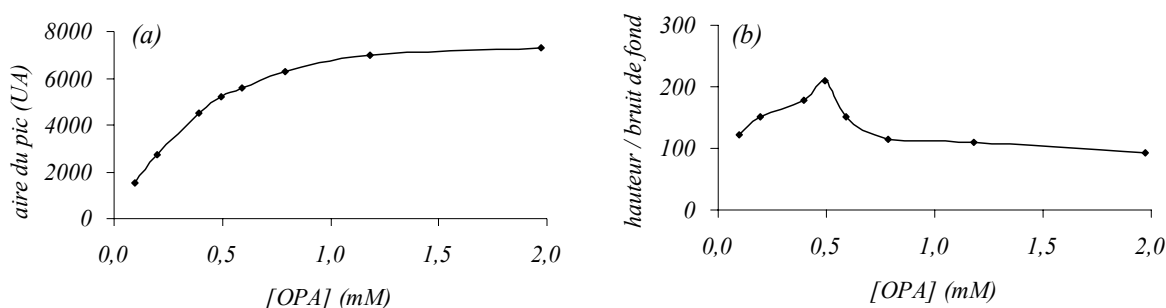


Figure 10. Effet de la concentration en OPA dans le réacteur R_2 sur l'aire du pic chromatographique obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond (b) [R_1 (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, R_2 (3 m), MPA 0,2 mM].

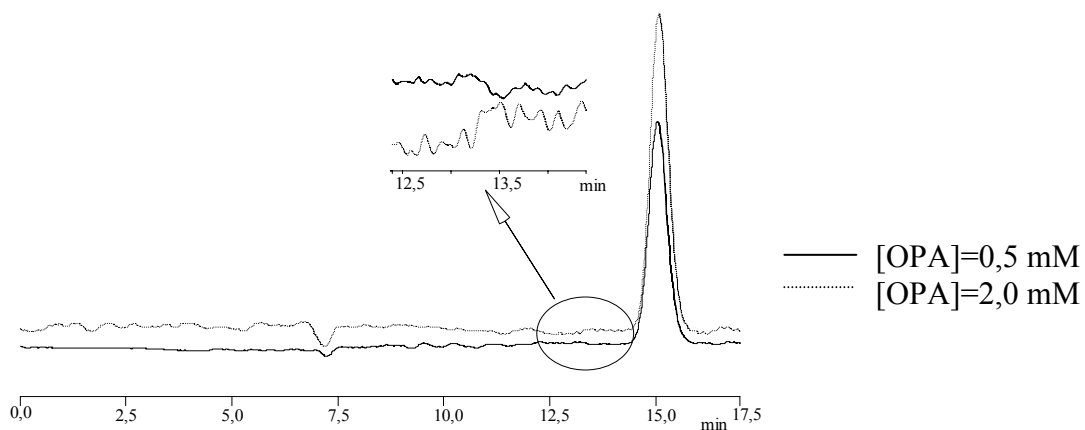


Figure 11. Chromatogrammes d'une solution étalon d'acide pantothénique à $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenus en choisissant deux concentrations différentes en OPA [R_1 (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, R_2 (3 m), MPA 0,2 mM].

La concentration en OPA dans le réacteur a donc été fixée à 0,5 mM. Cela correspond à une concentration de 1,5 mM dans le réactif de dérivation.

- la longueur du réacteur d'hydrolyse alcaline R_1

Plus la longueur du réacteur a été importante, meilleurs ont été les rendements d'hydrolyse alcaline (7 % pour 10 m, 83 % pour 40 m) (Figure 12-a) et le rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond (Figure 12-b). L'augmentation du rendement de l'hydrolyse alcaline est due bien évidemment à l'augmentation du temps de séjour de l'acide pantothénique dans le réacteur R_1 , qui est passé de 0,98 min (10 min) à 3,92 min (40 m) (dans le dispositif utilisé par Blanco *et al.* (1995), le temps de séjour n'était que de 2,2 min, mais il n'a cependant pas été possible de comparer les rendements d'hydrolyse obtenus dans les deux expériences car ces auteurs n'ont pas fourni de valeurs numériques). Le bruit de fond n'a pas varié lorsque le réacteur R_1 a été allongé. L'aire du pic chromatographique augmentant, comme le rendement d'hydrolyse, avec la longueur du réacteur R_1 , le rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond a continuellement augmenté lorsque la longueur du réacteur est passée de 10 à 40 m (Figure 12-b).

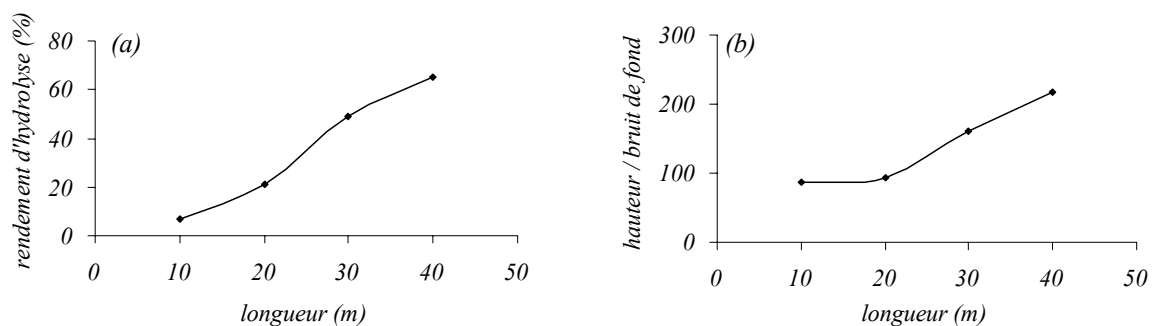


Figure 12. Effet de la longueur du réacteur R_1 sur le rendement d'hydrolyse (a) et sur le rapport de la hauteur du pic chromatographique obtenu sur le bruit de fond (b) [R_1 (99°C), NaOH 100 mM, R_2 (3 m), MPA 0,2 mM, OPA 0,5 mM].

L'allongement du réacteur a cependant provoqué un élargissement progressif des pics (augmentation des phénomènes de diffusion). Ainsi de 10 à 40 m, la largeur du pic à mi-hauteur a augmenté de 16 %. Il n'a donc pas été envisagé d'augmenter la longueur du réacteur R_1 au-delà de 40 m.

- la longueur du réacteur R_2

Selon Blanco *et al.* (1995), la réaction de formation de l'isoindole est très rapide, l'intensité du signal de fluorescence obtenu par ces auteurs en FIA n'ayant pas varié lorsque la longueur du réacteur R_2 a été portée de 1,5 m (durée de réaction de 0,15 min) à 3 m (durée de réaction 0,3 min). Dans le cas présent, ce résultat n'a pas été confirmé puisque l'aire du pic chromatographique a régulièrement augmenté (de 73 %) lorsque la longueur du réacteur est passée de 2 à 5 m (Figure 13-a). En fait, le rapport de la hauteur du pic chromatographique sur le bruit de fond n'a augmenté dans ces conditions que de 18 % (Figures 13-b et 14) en raison de l'élargissement sensible du pic chromatographique (25 %).

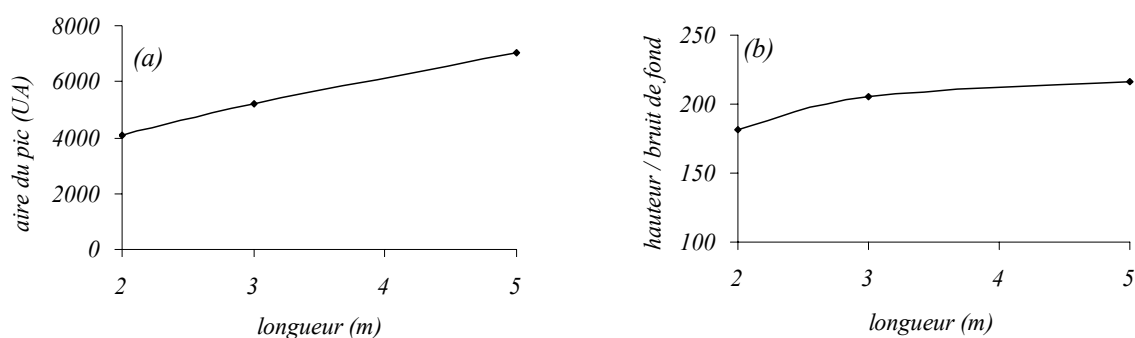


Figure 13. Effet de la longueur du réacteur R_2 sur l'aire du pic chromatographique obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond (b) [R_1 (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, MPA 0,2 mM, OPA 0,5 mM].

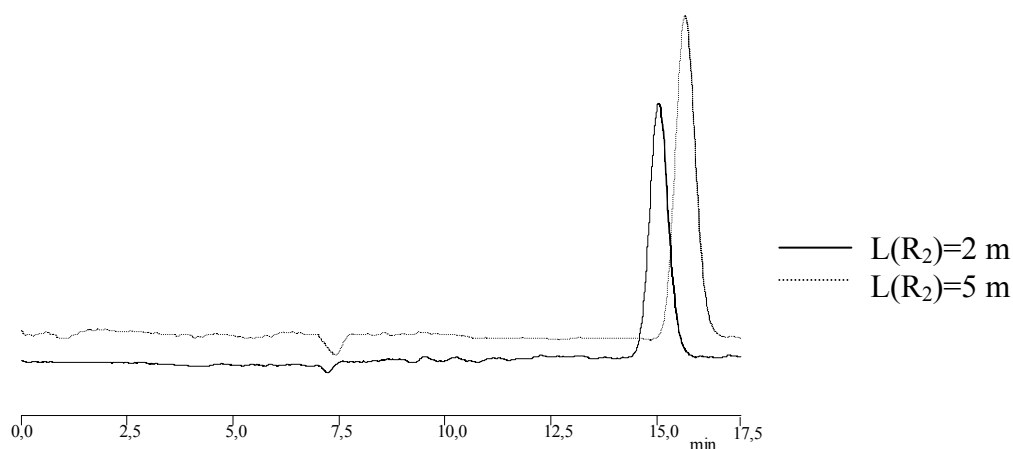


Figure 14. Chromatogrammes d'une solution étalon d'acide pantothénique à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenus pour deux longueurs différentes de réacteur R_2 [R_1 (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, MPA 0,2 mM, OPA 0,5 mM].

Comme l'augmentation du rapport de la hauteur du pic chromatographique sur le bruit de fond s'est avérée très faible (pas plus de 5 %) lorsque la longueur du réacteur R₂ est passée de 3 à 5 m, une longueur de 3 m a été retenue.

- Les conditions optimales finalement retenues pour la dérivation post-colonne (dispositif à deux pompes)

Le premier réacteur (R₁), d'une longueur de 40 m, est placé dans un four à la température de consigne de 99°C ; la concentration en hydroxyde de sodium dans ce réacteur est de 100 mM (réactif à 200 mM). Le deuxième réacteur (R₂), d'une longueur de 3 m, est à température ambiante ; les concentrations en OPA et en MPA dans ce réacteur sont respectivement de 0,5 mM (réactif à 1,5 mM) et de 0,2 mM (réactif à 0,6 mM).

3.1.1.2. La validation du mode de dérivation proposé

Une fois les paramètres expérimentaux fixés, les différents critères de validation du mode de dérivation (répétabilité, répétabilité « day-to-day », linéarité et limite de détection) ont été établis.

- Répétabilité et répétabilité « day-to-day »

La répétabilité, testée en effectuant six analyses consécutives d'une solution étalon d'acide pantothénique à 1 µg.ml⁻¹ le même jour, a été de 4,0 %. La répétabilité « day-to-day », déterminée en refaisant l'analyse d'une même solution étalon d'acide pantothénique à 1 µg.ml⁻¹ à six dates différentes, a été de 4,3 %. Ces résultats sont tout à fait acceptables.

- Linéarité et limite de détection

Un étalonnage a été effectué avec des solutions étalons d'acide pantothénique dont les concentrations variaient de 0,05 µg.ml⁻¹ à 2,00 µg.ml⁻¹. La courbe d'étalonnage (aire des pics chromatographiques en fonction de la concentration en acide pantothénique) obtenue après régression linéaire des points expérimentaux a présenté une bonne linéarité (coefficient de régression de 0,9993) (Figure 15).

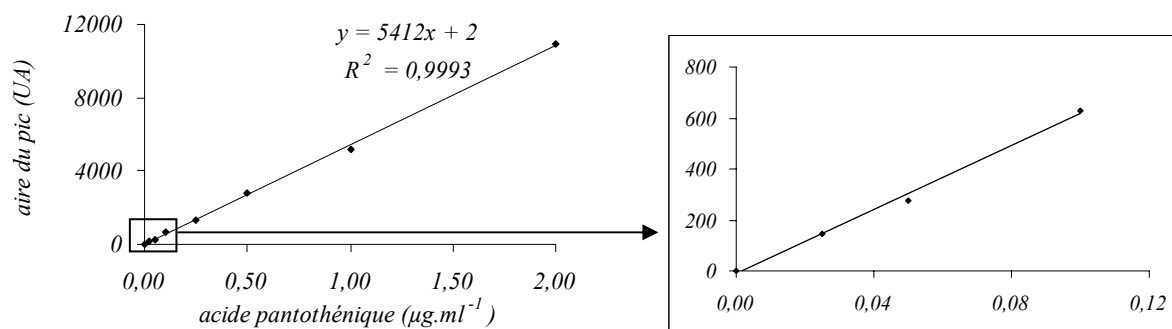


Figure 15. Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acide pantothénique

La limite de détection obtenue a été de 2,5 ng, soit une limite de quantification de 8 ng. En fixant le volume d'injection à 100 µl, cette limite de détection va correspondre à une concentration de la solution analysée de 25 ng.ml⁻¹. La prise d'essai moyenne d'un échantillon alimentaire, de l'ordre de 5 g, étant diluée dans 50 ml d'eau distillée, la teneur minimale quantifiable dans l'aliment serait de l'ordre de 0,8 µg.g⁻¹, ce qui est tout à fait satisfaisant, même pour l'analyse d'aliments à très faibles teneurs en acide pantothénique, comme la pomme par exemple (1 µg.g⁻¹) (Souci *et al.*, 1994).

3.1.1.3. Conclusions

La méthode de dérivation mise au point serait donc suffisamment sensible pour permettre le dosage de l'acide pantothénique dans les matrices alimentaires.

L'inconvénient majeur de cette configuration de dérivation post-colonne à deux pompes réside en fait dans la complexité technique du dispositif : l'immobilisation pour des analyses de routine de 2 pompes annexes n'apparaît en effet pas acceptable par des responsables de laboratoire de contrôle.

En fait, la principale raison pour laquelle Blanco *et al.* (1995) ont utilisé un tel dispositif tenait à la nécessité d'ajuster le pH du mélange réactionnel dans le deuxième réacteur par ajout d'acide borique. Or dans le cas présent, aucun ajustement du pH du milieu réactionnel n'étant effectué, le recours à un dispositif à deux pompes ne paraissait pas réellement indispensable. Un dispositif à une seule pompe (et un seul réacteur) pourrait alors être proposé, à condition bien sûr que la stabilité du dérivé fluorescent formé soit satisfaisante à la température requise pour effectuer l'hydrolyse alcaline, ce qui n'a pas encore été vérifié.

3.1.2. La dérivation post-colonne en une seule étape (configuration avec une pompe)

Une configuration plus simple, avec une seule pompe annexe délivrant à la fois l'hydroxyde de sodium, l'OPA et le MPA, a donc été proposée pour réaliser la dérivation post-colonne de l'acide pantothénique. Blanco *et al.* (1995) avaient suggéré, sans néanmoins le justifier, que la stabilité de l'isoindole fluorescent diminuait quand la température du milieu réactionnel était trop élevée. Il n'était donc pas impossible, *a priori*, pour des concentrations en acide pantothénique équivalentes, que cette configuration conduise à une émission de fluorescence moins intense que celle obtenue avec le dispositif à deux pompes étudié précédemment, et donc à une moindre sensibilité du protocole proposé.

L'efficacité de la configuration à une pompe a été testée dans un premier temps dans des conditions très voisines de celles retenues dans le dispositif précédent, avec néanmoins un seul réacteur (40 m), une température de consigne du four de 99°C et des concentrations en hydroxyde de sodium, en OPA et en MPA dans le réacteur respectivement de 100 mM (réactif à 200 mM), 0,5 mM (réactif à 1,0 mM) et 0,2 mM (réactif à 0,4 mM). Dans ce nouveau dispositif, comparé au dispositif à deux pompes, la deuxième réaction a donc lieu à chaud (et non à température ambiante) et en milieu plus alcalin (dilution de la solution d'hydroxyde de sodium au demi et non au tiers).

L'aire du pic chromatographique n'a en fait diminué que d'environ 10 % lors du passage d'un dispositif à deux pompes à un dispositif à une pompe (Figure 16), diminution modeste qui ne justifiait pas les craintes émises par Blanco *et al.* Le rapport de la hauteur du pic chromatographique sur le bruit de fond a également diminué, d'environ 20 %. Comme les conditions de l'hydrolyse alcaline n'ont pas été modifiées, les diminutions observées ne pouvaient être imputées qu'à une diminution du rendement de la deuxième réaction dans le nouveau milieu réactionnel (dégradation des réactifs) ou bien à une instabilité, modérée, du dérivé fluorescent formé, comme l'envisageaient Blanco *et al.*

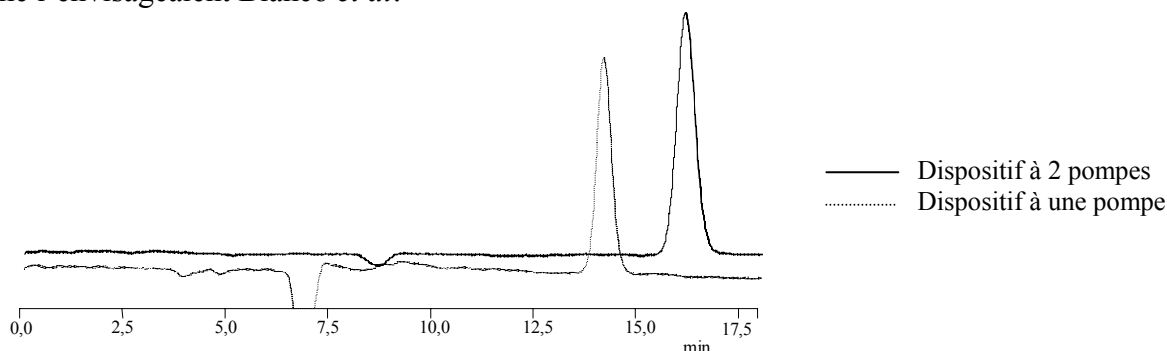


Figure 16. Chromatogrammes d'une solution étalon d'acide pantothénique ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) obtenus avec les deux dispositifs de dérivation (voir conditions retenues pour le dispositif à une pompe p. 31 et pour le dispositif à deux pompes p.28).

En fait, quelle que soit la cause effective de la diminution de la concentration du dérivé fluorescent dans le milieu réactionnel (instabilité des réactifs ou instabilité du dérivé), le seul moyen d'y remédier est de procéder à une nouvelle optimisation des concentrations en OPA et en MPA.

3.1.2.1. L'optimisation du dispositif de dérivation à une pompe

Avec ce dispositif à une pompe, les allures des courbes donnant respectivement l'aire du pic chromatographique obtenu et le rapport de la hauteur de ce pic sur le bruit de fond en fonction de la concentration en OPA ont été identiques à celles obtenues avec le dispositif à deux pompes (voir figures 10, p.26, et 17). Le meilleur rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond avec ce nouveau dispositif a toutefois été légèrement inférieur au meilleur rapport obtenu avec le dispositif à deux pompes (la baisse est de près de 20 %).

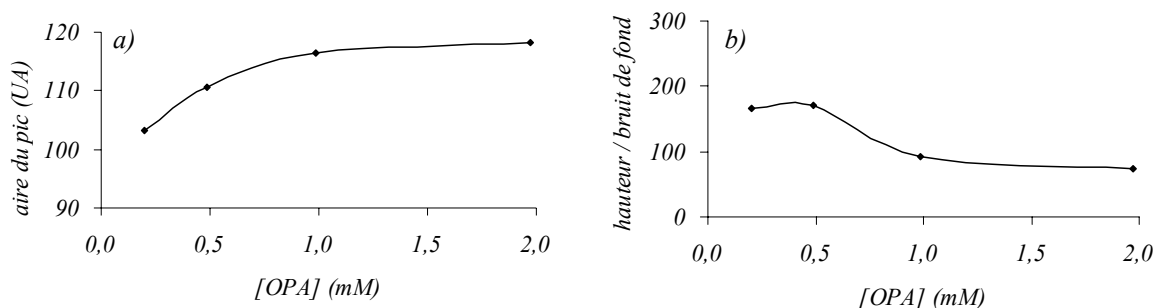


Figure 17. Effet de la concentration en OPA dans le réacteur sur l'aire du pic obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur de ce pic sur le bruit de fond (b) [R (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, MPA 0,2 mM].

La concentration optimale retenue (0,5 mM) (soit une concentration de 1,0 mM en OPA dans le réactif) a été identique à celle choisie dans la configuration à 2 pompes. La concentration en OPA ne semble pas être le facteur limitant de la réaction de formation du dérivé fluorescent puisqu'une augmentation de ce paramètre n'a pas permis d'obtenir un meilleur rapport hauteur du pic chromatographique sur bruit de fond.

Pour ce qui est du MPA, si les allures des courbes donnant respectivement l'aire du pic chromatographique et le rapport de la hauteur de ce pic sur le bruit de fond ont été identiques avec les 2 dispositifs (voir figures 8, p.25, et 18), une valeur maximale du rapport de la hauteur du pic chromatographique sur le bruit de fond a été obtenue avec le dispositif à une pompe pour une concentration en MPA de 0,8 mM, soit une concentration quatre fois plus élevée que celle utilisée en conditions optimales dans le dispositif à deux pompes. Il a cependant été impossible de savoir si la diminution des grandeurs chromatographiques observée lors du passage du dispositif à deux

pompe au dispositif à une pompe était effectivement due à la dégradation du MPA ou simplement à une instabilité plus importante du dérivé fluorescent formé.

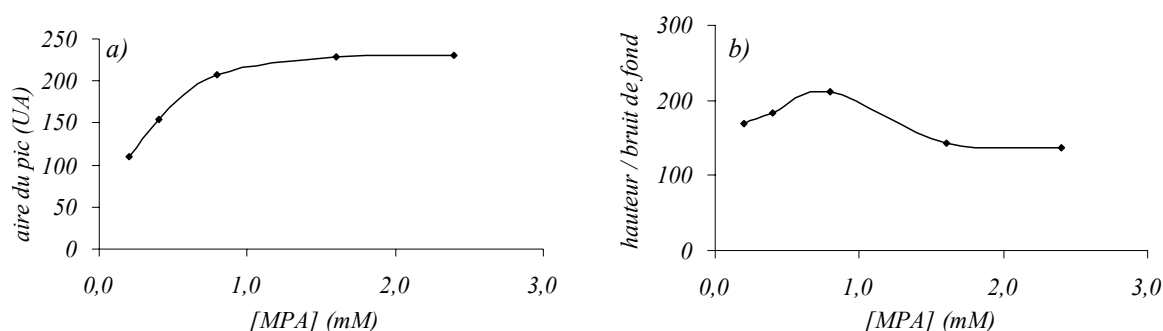


Figure 18. Effet de la concentration en MPA dans le réacteur sur l'aire du pic obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur de ce pic sur le bruit de fond (b) [R (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, OPA 0,5 mM].

Le rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond obtenu avec le dispositif à une pompe optimisé [OPA 0,5 mM ; MPA 0,8 mM] (210) a finalement été aussi bon que celui obtenu avec le dispositif à deux pompes (212) (Figure 19).

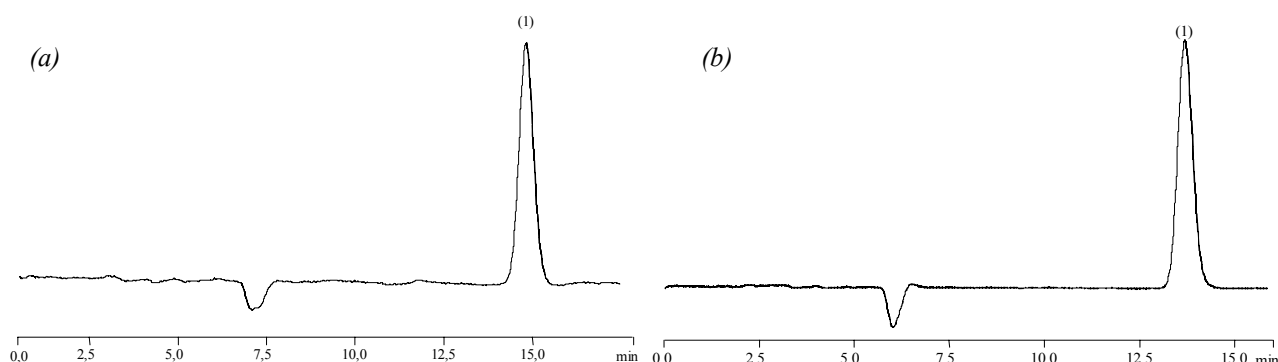


Figure 19. Chromatogrammes d'une solution d'acide pantothénique à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenus avec le dispositif à deux pompes (a) et avec le dispositif à une pompe (b) (1 : acide pantothénique).

Dans un deuxième temps, il a été vérifié que les conditions d'hydrolyse alcaline choisies lors de l'optimisation du dispositif à deux pompes (concentration en hydroxyde de sodium de 100 mM, température du four de 99°C et longueur du réacteur de 40 m) restaient toujours optimales avec le nouveau dispositif.

Les conditions optimales finalement retenues sont donc les suivantes: le réacteur (R), d'une longueur de 40 m, est placé dans un four à la température de consigne de 99°C ; les concentrations en hydroxyde de sodium, en OPA et en MPA dans ce réacteur sont respectivement de 100 mM (réactif à 200 mM), de 0,5 mM (réactif à 1,0 mM) et de 0,8 mM (réactif à 1,6 mM).

3.1.2.2. La validation du mode de dérivation proposé

- Répétabilité et répétabilité « day-to-day »

La répétabilité, testée en effectuant six analyses consécutives d'une solution étalon d'acide pantothénique à $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ le même jour, a été de 0,5 %. La répétabilité « day-to-day », déterminée en refaisant l'analyse d'une même solution étalon d'acide pantothénique à $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ à six dates différentes, a été de 2,9 %.

La répétabilité et la répétabilité « day-to-day » obtenues pour la configuration à une pompe ont donc été meilleures que celles obtenues pour la configuration à deux pompes, très certainement en raison d'une meilleure robustesse du dispositif de dérivation finalement proposé.

- Linéarité et limite de détection

Un étalonnage a été effectué avec des solutions étalons d'acide pantothénique dont les concentrations variaient de $0,025 \mu\text{g.ml}^{-1}$ à $2,00 \mu\text{g.ml}^{-1}$. La courbe d'étalonnage (aire du pic chromatographique en fonction de la concentration en acide pantothénique) obtenue après régression linéaire des points expérimentaux, a présenté une bonne linéarité (coefficient de régression de 0,9998) (Figure 20).

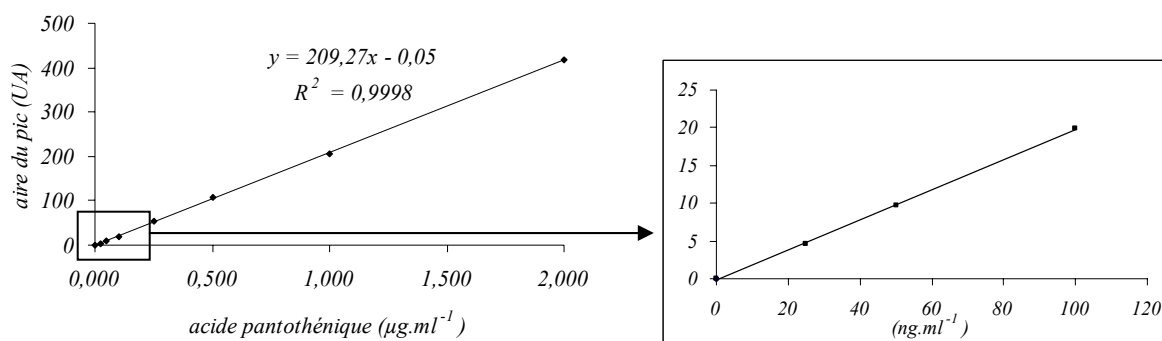


Figure 20. Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acide pantothénique

La limite de quantification atteinte a été de 8 ng, donc identique à celle atteinte avec le dispositif à 2 pompes, ce qui était prévisible (voir figure 19, p.33). Le dispositif de dérivation à une pompe, aussi sensible mais plus pratique et plus robuste que le dispositif à deux pompes, a finalement été retenu comme dispositif expérimental pour la transformation post-colonne de l'acide pantothénique en composé fluorescent.

3.2. LA DETERMINATION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE LIBRE

3.2.1. La proposition d'une élution à gradient pour résoudre le problème des interférences chromatographiques

Lors de l'analyse d'un échantillon de foie de porc [extraction de l'acide pantothénique par le tampon Tris (voir § 2.2.1, p.14) et élution chromatographique à l'aide de la phase mobile isocratique utilisée précédemment (voir § 2.4.3.1, p.17)], la teneur en acide pantothénique retrouvée a été très élevée ($791 \mu\text{g.g}^{-1}$) (Figure 21-a), très supérieure aux teneurs habituellement présentes dans cet aliment ($71\text{-}81 \mu\text{g.g}^{-1}$, voir tableau I, p.7). Un phénomène analogue a été observé lors du dosage d'un échantillon d'avocat [teneur en acide pantothénique retrouvée de $87 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Figure 22-a), près de 9 fois supérieure aux teneurs habituelles (voir tableau I, p.7)]. Ces résultats anormaux étaient en fait dus à une mauvaise résolution chromatographique (coélution d'une impureté). La mise en œuvre d'une phase mobile à gradient méthanol - tampon phosphate (voir § 2.4.3.2, p.17) a en effet permis d'obtenir dans ces échantillons des teneurs en acide pantothénique beaucoup plus raisonnables (Figures 21-b et 22-b).

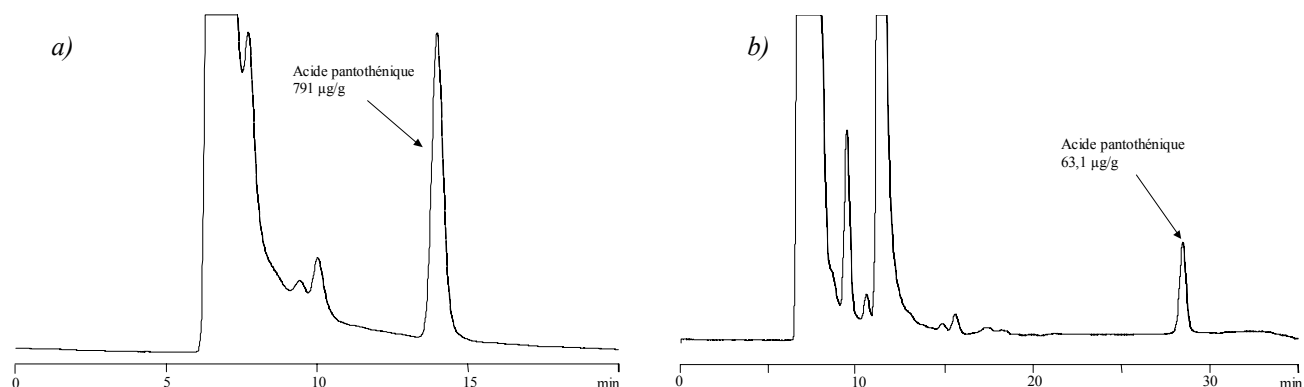


Figure 21. Isolement chromatographique de l'acide pantothénique contenu dans un échantillon de foie de porc avec une phase mobile en élution isocratique (méthanol / tampon phosphate (10/90 v/v)) (a) et un gradient de phase mobile (méthanol / tampon phosphate) (b).

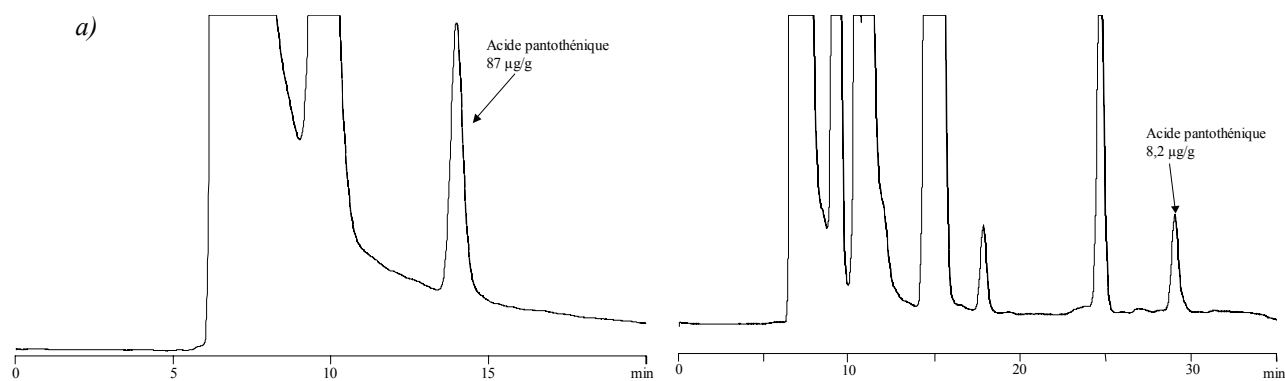


Figure 22. Isolement chromatographique de l'acide pantothénique contenu dans un échantillon d'avocat avec une phase mobile en élution isocratique (méthanol / tampon phosphate (10/90 v/v)) (a) et un gradient de phase mobile (méthanol / tampon phosphate) (b).

Pour l'analyse d'autres matrices alimentaires telles que les petits pois (Figure 23-a) et la levure (Figure 23-b), l'utilisation de cette élution à gradient de méthanol n'a cependant pas permis un isolement satisfaisant du pic de l'acide pantothénique. Il est donc clairement apparu indispensable d'effectuer une purification de l'échantillon alimentaire avant l'analyse chromatographique.

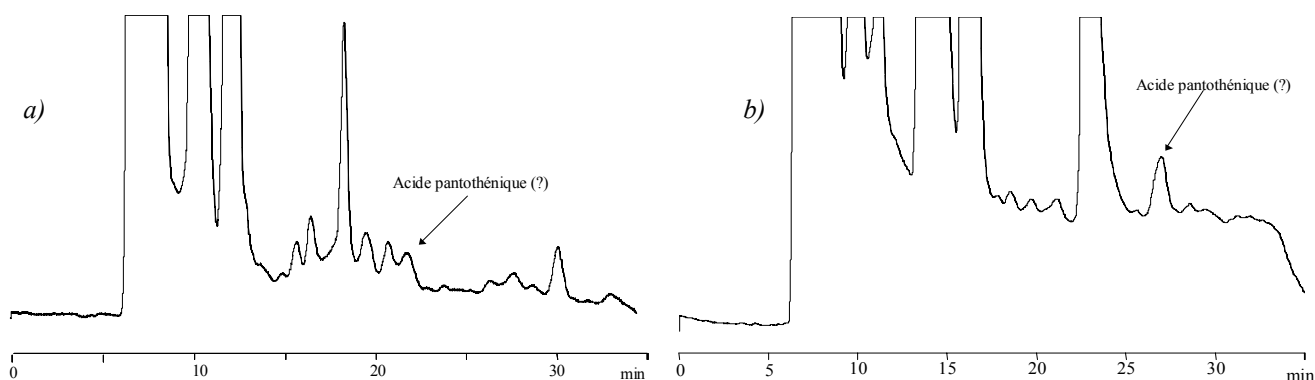


Figure 23. Isolement chromatographique de l'acide pantothénique contenu dans des petits pois (a) et dans de la levure (b) en utilisant comme phase mobile un gradient méthanol -tampon phosphate.

3.2.2. La purification des extraits par extraction en phase solide

3.2.2.1. Le choix du type de purification

Les techniques de purification par extraction en phase solide ont généralement pour principe de fixer la substance à doser sur une phase stationnaire, tout en éluant les impuretés, le composé à analyser étant ensuite élué grâce à une solution ayant un pH ou une polarité différente du pH ou de la polarité de la solution dans laquelle se trouvait initialement l'acide pantothénique. Cette molécule présente une fonction carboxylique (voir figure 1, p.6) dont le pK_a est de 4,4. Elle peut donc être majoritairement sous forme anionique à un pH supérieur à 5,4 ou sous forme neutre à un pH inférieur à 3,4. Différents essais ont été effectués en vue de fixer l'acide pantothénique sur une cartouche échangeuse d'anions (à un pH supérieur à 5,4) ou sur une cartouche C_{18} (Chromafix, Macherey-Nagel) (à un pH inférieur à 3,4).

L'acide pantothénique en solution dans de l'eau distillée (pH 7) a effectivement été retenu sur la cartouche échangeuse d'anions proposée (voir § 2.3, p.15). Cependant, dès que l'acide pantothénique a été mis en solution dans un tampon phosphate (pH 7) ou Tris (pH 8), même dans le cas où la force ionique de ce tampon était faible, les fractions recueillies après le passage de la solution étalon et le lavage de la cartouche par 5 ml d'eau contenaient de l'acide pantothénique. La vitamine n'a en fait été que partiellement retenue (60 % lorsqu'elle était en solution dans un

tampon Tris 2 mM) ou ne l'a pas été du tout (pour des concentrations en tampon Tris égales ou supérieures à 50 mM), l'affinité des anions du tampon pour la phase stationnaire de la cartouche n'étant, en l'occurrence, absolument pas négligeable. Ce type de cartouches ne présente donc aucun intérêt dans les conditions expérimentales choisies.

La cartouche C₁₈, préalablement conditionnée par passage de 5 ml de méthanol, puis de 5 ml d'eau, a été lavée avec 5 ml d'eau après passage de 5 ml de la solution étalon d'acide pantothénique. L'élution de la vitamine a été réalisée avec 5 ml de méthanol. Qu'il soit en solution dans l'eau ou dans le tampon Tris, l'acide pantothénique n'a jamais été retenu sur une telle cartouche, vraisemblablement en raison de sa polarité trop élevée.

Une autre approche, à l'inverse des techniques précédentes habituellement utilisées, a donc été envisagée : faire en sorte que l'acide pantothénique ne soit pas retenu sur la cartouche échangeuse d'ions, mais essayer de retenir sur celle-ci la majorité des impuretés qui seront présentes dans l'échantillon alimentaire. Les impuretés qui apparaissent dans les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse de matrices alimentaires sont sans doute des composés chimiques naturellement fluorescents, mais aussi, et vraisemblablement en plus grand nombre et en plus forte concentration, des composés chimiques possédant une ou plusieurs fonctions amines et devenant fluorescents après réaction avec l'OPA et le MPA. Comme ces fonctions amines sont protonables en milieu acide ($\text{pH} \leq 3$, si l'on veut protoner une majorité des acides aminés), il apparaît donc possible de fixer ces impuretés sur une cartouche échangeuse de cations en acidifiant au préalable l'extrait, l'acide pantothénique, neutre à un tel pH, étant quant à lui élué sans rétention.

3.2.2.2. L'utilisation d'une cartouche échangeuse de cations : les problèmes rencontrés lors de l'analyse d'échantillons alimentaires, leurs origines et leur résolution

Des essais de purification ont été effectués sur deux matrices alimentaires mises en solution dans un tampon Tris 200 mM (pH 8) : les petits pois et le lait en poudre. Le pH des solutions à purifier a tout d'abord été abaissé à 2 avec une solution d'acide chlorhydrique 250 mM, afin de protoner les groupements aminés. Comme cette baisse de pH a provoqué une précipitation des protéines, les solutions ont dû être centrifugées avant le passage sur la cartouche échangeuse de cations. Cinq ml du surnageant ont été passés sur la cartouche échangeuse de cations. Les 2 premiers ml ont été jetés. Les 3 ml suivants ont été récupérés pour analyse par CLHP. Ce protocole a permis d'obtenir dans les deux cas une bonne résolution du pic correspondant à

l'acide pantothénique (Figure 24), avec cependant une ligne de base très médiocre de l'enregistrement chromatographique lors de l'analyse de l'échantillon de petits pois (Figure 24-b). Les taux de recouvrement de l'acide pantothénique obtenus ont cependant été très médiocres dans les deux cas : 78 % lors de l'analyse des petits pois et 70 % lors de l'analyse du lait en poudre. L'étape de purification a donc entraîné une perte en vitamine B₅.

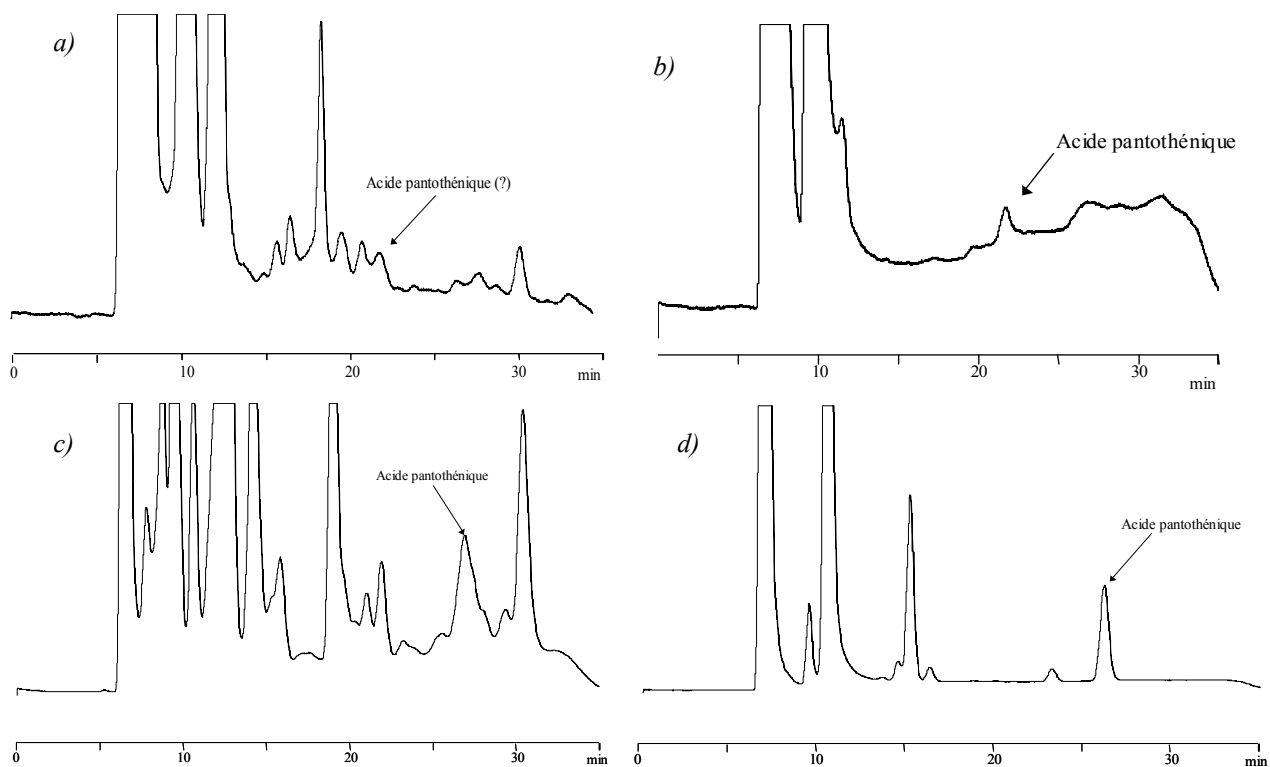


Figure 24. Isolement chromatographique de l'acide pantothénique contenu dans un échantillon de petits pois (a et b) et dans un échantillon de lait en poudre (c et d) : sans purification préalable des extraits (a et c), avec purification des extraits (abaissement du pH à 2, puis passage sur la cartouche échangeuse de cations) (b et d).

Il a tout d'abord été montré que l'application du protocole de purification proposé (acidification à pH 2, puis passage sur une cartouche échangeuse de cations) au dosage d'une solution étalon d'acide pantothénique [$1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans un tampon Tris 200 mM (pH 8)] a donné des résultats tout à fait identiques à ceux obtenus en supprimant soit l'acidification, soit le passage sur la cartouche échangeuse de cations, soit les deux étapes, ce qui prouve que l'acide pantothénique n'est ni partiellement détruit à pH 2 (ce qui n'est pas une surprise), ni partiellement retenu sur la cartouche et donc que les problèmes rencontrés précédemment lors du dosage de l'acide pantothénique dans les petits pois et le lait en poudre (taux de recouvrement médiocres) sont exclusivement imputables à la présence de la matrice alimentaire.

Une expérience similaire à celle effectuée précédemment a donc été menée sur un échantillon d'avocat, un des rares aliments dans lequel il est possible de doser l'acide pantothénique sans qu'il soit nécessaire de procéder à une purification des extraits (voir figure 22-

b, p.35). Quel que soit le protocole de purification choisi, de l'acide pantothénique (25 µg) a été ajouté dans l'extrait initial (tampon Tris, pH 8).

Lorsque le protocole complet de purification a été appliqué [Figure 25, expérience (a)], le taux de recouvrement de l'acide pantothénique n'a été que de 51 %, ce qui confirme les résultats peu satisfaisants obtenus auparavant lors de l'étude des échantillons de petits pois et de lait en poudre. Les valeurs des taux de recouvrement obtenus dans chacun des quatre cas envisagés (Figure 25) montrent par ailleurs très clairement que l'acidification à pH 2 est la principale cause de cette perte en acide pantothénique [39 %, expérience (b)], mais qu'il se produit également une légère rétention de ce vitamère sur l'échangeur de cations, que ce vitamère soit sous forme ionisée ou moléculaire [de l'ordre de 13 %, expérience (c)], alors qu'en absence de tout traitement de purification, le taux de recouvrement de l'acide pantothénique est excellent [expérience (d)].

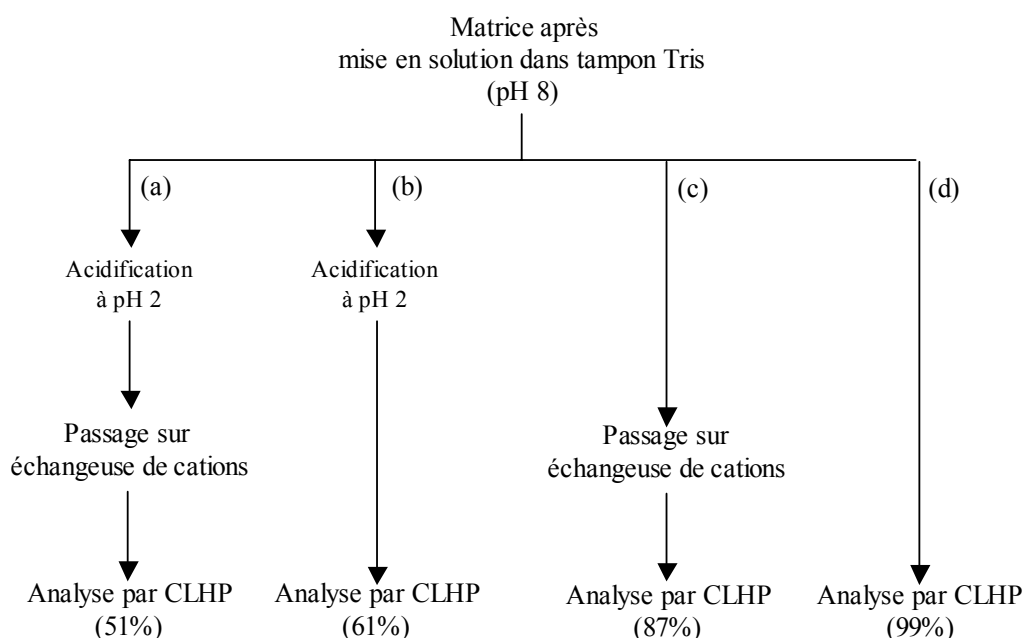


Figure 25. Détermination des taux de recouvrement de l'acide pantothénique lors de l'analyse d'un échantillon d'avocat en fonction du protocole de purification choisi : (a) acidification de l'extrait à pH 2, puis passage sur une cartouche échangeuse de cations, (b) acidification de l'extrait à pH 2, (c) passage sur une cartouche échangeuse de cations (à pH 8), (d) absence de purification.

Pour expliquer les pertes imputables à l'acidification, il a tout d'abord été envisagé qu'elles pouvaient résulter de la précipitation à pH 2 des protéines de l'échantillon alimentaire, l'acide pantothénique pouvant alors être partiellement inclus dans le précipité formé. En fait, lorsque le précipité a été remis en solution, filtré et analysé par CLHP, aucune trace d'acide pantothénique n'a été retrouvée. Cette hypothèse a donc été rejetée.

Il est par contre plus vraisemblable que l'acide pantothénique ait interagi avec d'autres constituants de l'échantillon lors de l'abaissement du pH de l'extrait à 2. Il a en effet été montré que la diminution du taux de recouvrement était directement liée à l'importance de l'acidification

de l'extrait analysé (Figure 26). Ce taux a ainsi diminué de 95 % à 60 % lorsque le pH de l'extrait a été abaissé de 7 à 1,5, la diminution étant plus marquée lorsque le pH devenait inférieur à 3.

Les résultats donnés dans cette figure indiquent aussi clairement que la perte en acide pantothénique résultant du passage ultérieur de l'extrait acidifié sur la cartouche échangeuse de cations (de l'ordre de 10 %) est, quant à elle, indépendante du pH de l'extrait analysé. Pour expliquer cette deuxième observation, l'hypothèse la plus plausible serait d'admettre une rétention de l'acide pantothénique sur la cartouche à la suite d'interactions de l'acide pantothénique avec des composés fixés sur l'échangeur, et ce quel que soit le pH de l'extrait. Cette hypothèse n'a pu cependant être étayée expérimentalement.

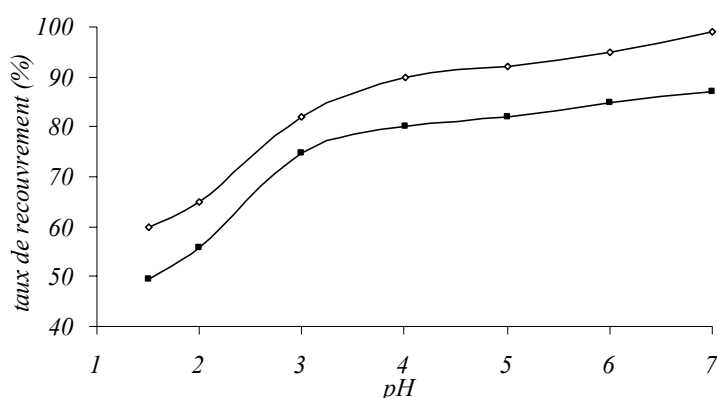


Figure 26. Influence du pH d'acidification sur le taux de recouvrement de l'acide pantothénique lors de l'analyse d'un extrait d'un échantillon d'avocat sans (△) et avec passage (■) sur une cartouche échangeuse de cations.

Pour tenter de remédier à ces difficultés analytiques, encore imparfaitement comprises, il a été envisagé d'éliminer au préalable (avant l'acidification) les constituants (inconnus) de l'aliment susceptibles d'interférer avec l'acide pantothénique (aussi bien lors de l'acidification que lors du passage sur l'échangeur de cations) et, pour cela, de faire passer l'extrait sur une cartouche en phase inverse ou échangeuse d'anions. Les résultats obtenus lors des différentes expériences réalisées sont résumés dans le tableau II.

Tableau II. Valeurs des taux de recouvrement^a obtenues lors de l'analyse d'un échantillon d'avocat selon la nature du protocole de purification pratiqué.

protocole de purification	taux de recouvrement (%)
pH 2 + cartouche échangeuse de cations	51 (5)
cartouche C ₁₈ + pH 2 + cartouche échangeuse de cations	69 (7)
cartouche échangeuse d'anions + pH 2 + cartouche échangeuse de cations	88 (7)
cartouche échangeuse d'anions + pH 3 + cartouche échangeuse de cations	95 (7)

^amoyenne de 3 déterminations (écart-type entre parenthèses)

L'extrait d'un échantillon d'avocat (pH 8) a tout d'abord été passé sur une cartouche C₁₈ (l'acide pantothénique, étant sous forme anionique à un tel pH, n'est pas retenu), avant d'être acidifié à pH 2 et passé sur une cartouche échangeuse de cations. L'amélioration observée a été relativement médiocre puisque le taux de recouvrement de l'acide pantothénique n'a augmenté, en moyenne, que de 18 % (Tableau II).

Lors d'un deuxième essai, l'extrait a été passé préalablement sur une cartouche échangeuse d'anions. Il a déjà été vu auparavant (voir p.36) que l'acide pantothénique en solution dans un tampon Tris (pH 8) à une concentration supérieure ou égale à 50 mM, donc sous forme anionique, n'était pas retenu sur ce type de cartouche. Il semblerait par contre que de nombreuses impuretés susceptibles d'interférer avec l'acide pantothénique aient été retenues sur cette cartouche, en dépit de la présence du tampon Tris, puisque le taux de recouvrement de l'acide pantothénique a été fortement augmenté et s'est situé à 88 %.

L'étude de l'influence du pH d'acidification sur le taux de recouvrement a par ailleurs précédemment montré que la diminution de ce taux était surtout forte à un pH inférieur à 3 (voir figure 26, p.40). Il a donc été proposé de remonter le pH d'acidification de 2 à 3, ce qui a finalement permis d'atteindre des taux de recouvrement de l'acide pantothénique tout à fait satisfaisants (95 ± 7 %), sans pour autant entraîner une déprotonation des impuretés aminées (aucune altération des chromatogrammes n'a été observée). Ces résultats semblent par ailleurs confirmer les hypothèses faites précédemment concernant les causes de l'abaissement du taux de recouvrement lors de l'acidification de l'extrait et du passage de la solution obtenue sur la cartouche échangeuse de cations (voir p.39-40)

Le protocole de purification finalement retenu a donc été le suivant : passage de l'extrait sur une cartouche échangeuse d'anions, acidification de l'extrait à pH 3, puis passage sur une cartouche échangeuse de cations.

Tous ces essais de purification des extraits ont en fait été réalisés sur un échantillon d'avocat qui ne nécessitait aucune purification. L'efficacité du protocole proposé (taux de recouvrement satisfaisant et bonne résolution du pic chromatographique de la vitamine), devait donc être vérifiée en utilisant d'autres échantillons alimentaires.

3.2.3. Le dosage de l'acide pantothénique libre dans divers aliments

Le protocole analytique proposé [mise en solution de l'acide pantothénique dans un tampon Tris, purification par passage sur une cartouche échangeuse d'anions, acidification à pH 3, purification par passage sur cartouche échangeuse de cations, chromatographie liquide avec

dérivation post-colonne] a permis d'obtenir un isolement et un dosage corrects de l'acide pantothénique contenu dans toutes les matrices alimentaires testées (Figures 27 et 28).

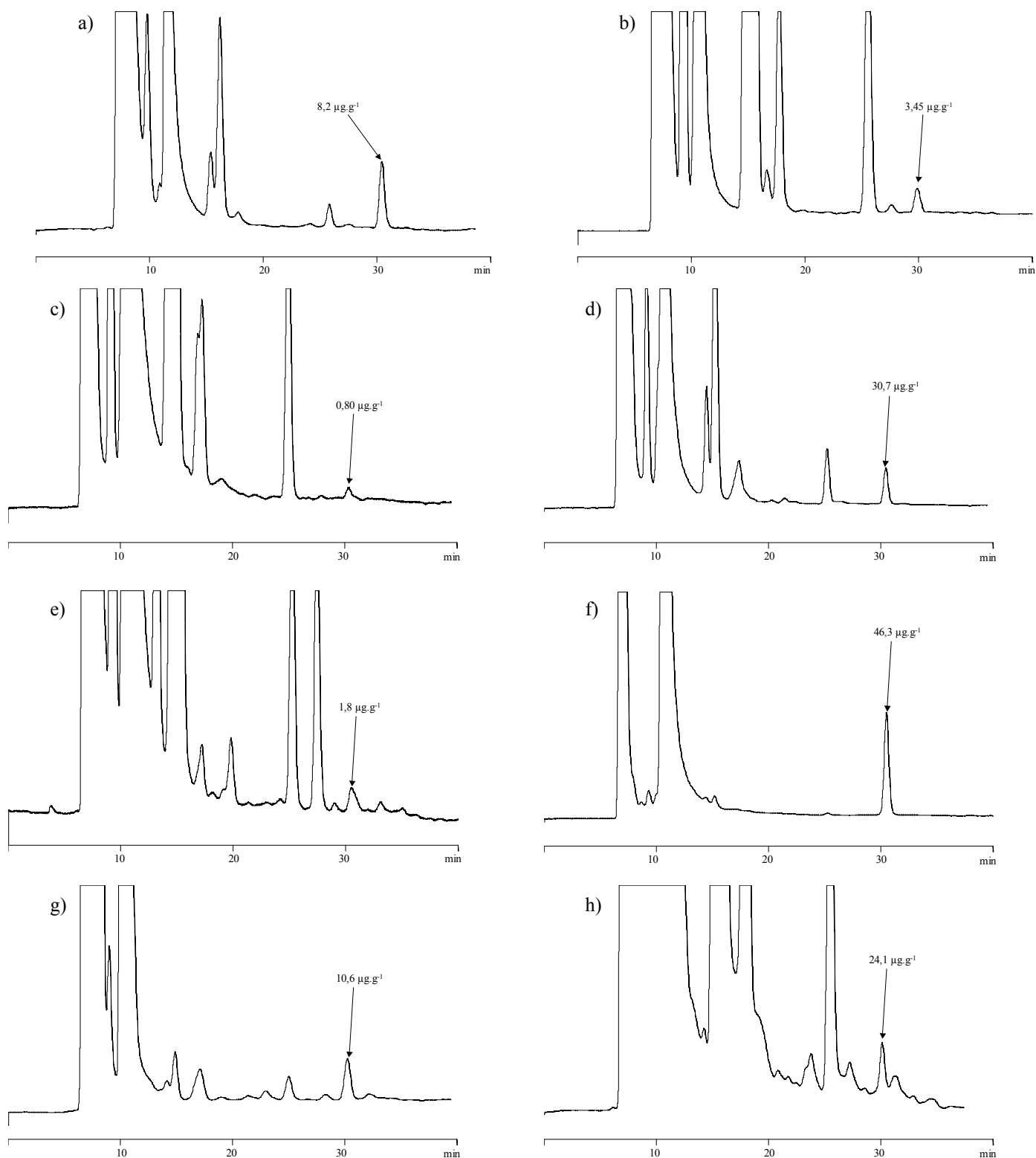


Figure 27. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de l'acide pantothénique libre dans l'avocat (a), la carotte (b), les épinards (c), le foie de porc (d), les haricots verts (e), le lait en poudre (f), les lentilles (g) et la levure (h).

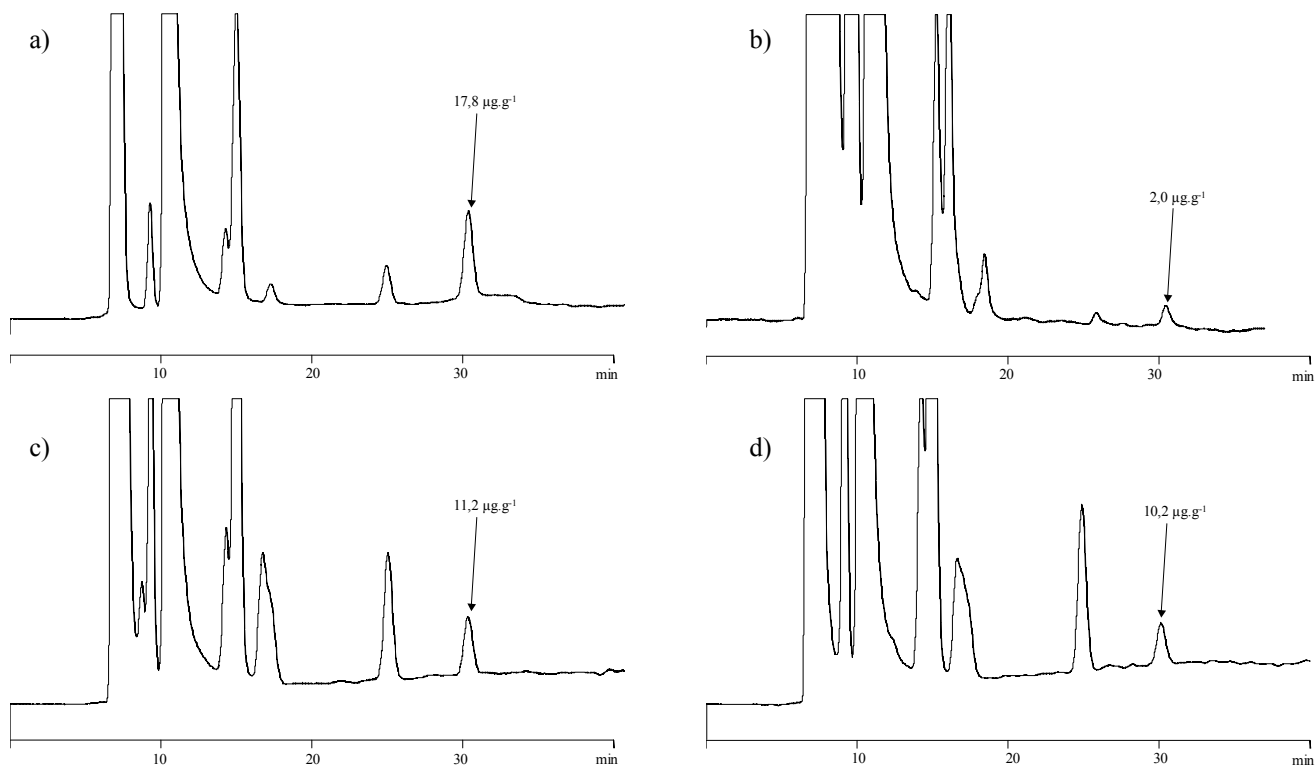


Figure 28. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de l'acide pantothénique libre dans l'œuf (a), les petits pois (b), le saumon (c) et la viande de poulet (d).

Les teneurs en acide pantothénique libre et les taux de recouvrement obtenus sont présentés dans le tableau III.

Tableau III. Détermination des teneurs^a en acide pantothénique libre dans différents aliments.

aliment	teneur ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	écart-type ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	taux de recouvrement (%)
foie de porc	30,7	0,1	98
viande de poulet	10,2	0,2	nd ^b
saumon	11,2	0,5	nd
œuf	17,8	0,2	nd
lait en poudre	46,3	0,7	101
levure	24,1	0,7	102
avocat	8,2	0,2	101
carotte	3,45	0,05	102
épinards	0,80	0,08	nd
haricots verts	1,8	0,2	nd
lentilles	10,6	0,4	nd
petits pois	2,0	0,2	96

^a moyenne de 3 déterminations

^b non déterminé

Les taux de recouvrement de l'acide pantothénique ont été satisfaisants, de 96 à 102 %, ce qui atteste de l'efficacité de l'étape de purification. Les aliments d'origine végétale sont les matrices contenant le moins d'acide pantothénique libre (teneurs inférieures à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Les teneurs des autres aliments sont comprises entre 10 et 31 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. L'aliment le plus riche en acide pantothénique libre est bien entendu le lait en poudre complétementé (46,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.3. LA DETERMINATION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE LIBRE ET LIE DANS LE COENZYME A

Pour déterminer les teneurs en acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A dans les différentes matrices alimentaires, il est nécessaire de procéder à une hydrolyse enzymatique de l'extrait, préalablement à l'étape de purification. Un mélange de phosphatase alcaline et de pantéthéinase, proposé dès 1949 par Novelli *et al.* (1949) et toujours couramment utilisé (Gonthier *et al.*, 1998 a ; Rychlik, 2000), permet de libérer l'acide pantothénique libre contenu dans le CoA. Les rôles respectifs de la phosphatase alcaline et de la pantéthéinase dans cette hydrolyse sont présentés dans la figure 29.

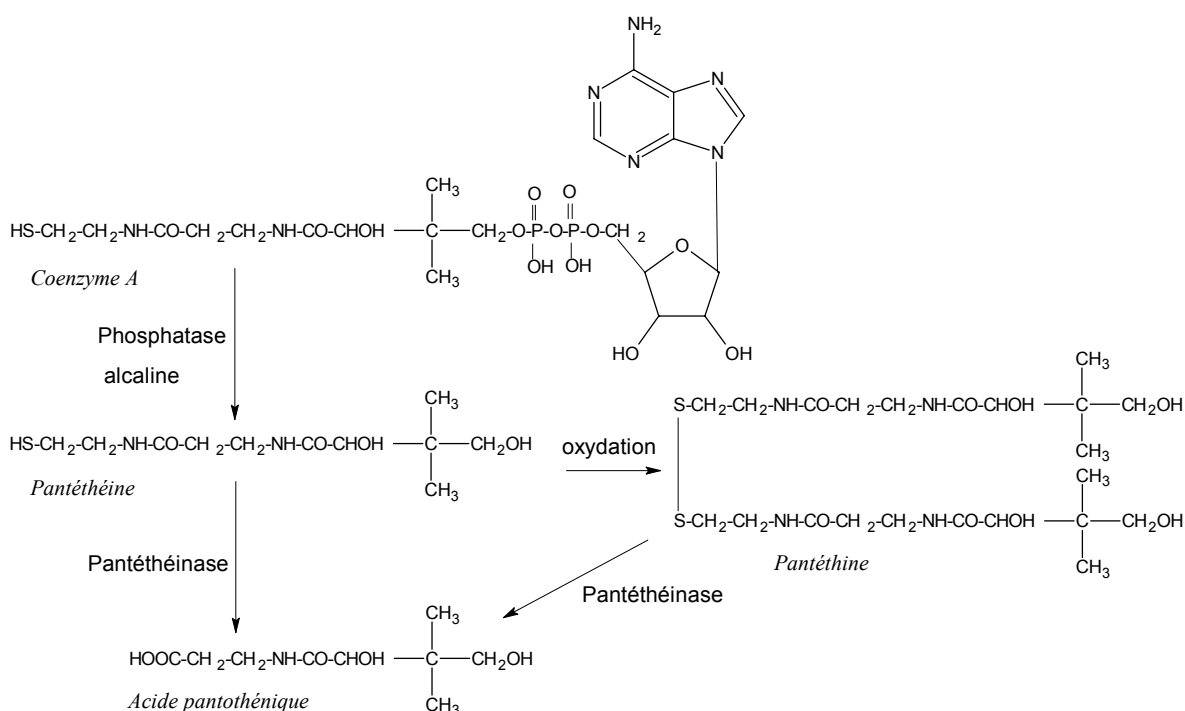


Figure 29. Action de la phosphatase alcaline et de la pantéthéinase sur le coenzyme A.

La phosphatase alcaline permet d'obtenir la pantéthéine à partir du CoA et la pantéthéinase hydrolyse la pantéthéine en acide pantothénique. La pantéthéine est un composé chimique qui peut s'oxyder très facilement en pantéthine. Mais la pantéthéinase peut également hydrolyser la pantéthine en acide pantothénique.

3.3.1. L'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique

3.3.1.1. La préparation de la pantéthéinase

Si la phosphatase alcaline disponible dans le commerce peut être d'une grande pureté, il n'en est pas de même pour la pantéthéinase. Cette enzyme ne peut être achetée que sous forme de poudre de foie de pigeon. Cette poudre contient cependant des quantités importantes d'acide pantothénique et doit donc être purifiée avant toute utilisation. La méthode de purification initialement recommandée par Novelli et Schmetz (1951) [traitement par passage sur une résine échangeuse d'anions] est encore couramment utilisée (Gonthier *et al.*, 1998 b ; Rychlik, 2000). Longue et fastidieuse, nécessitant notamment de nombreuses filtrations lors de l'activation de la résine, elle laisse par ailleurs dans la solution enzymatique purifiée une teneur résiduelle en acide pantothénique importante (de l'ordre de $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans la solution de pantéthéinase utilisée au cours de ce travail).

Une nouvelle méthode de purification de cette enzyme par dialyse (voir § 2.1.2.2, p.11) a donc été proposée. Cette méthode consiste simplement à placer la solution de pantéthéinase dans une membrane de dialyse sous agitation à 4°C pendant une nuit. La détermination des teneurs résiduelles en acide pantothénique a permis de montrer que ce mode de purification, très facile à mettre en œuvre, était plus efficace que la purification par passage sur résine échangeuse d'anions [teneur résiduelle de l'ordre de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et activité enzymatique supérieure (voir paragraphe suivant)].

3.3.1.2. La mesure de l'activité de la solution de la pantéthéinase

Pour pouvoir optimiser les quantités d'enzymes, il est absolument nécessaire de pouvoir apprécier l'activité pantéthéinasique de la solution obtenue après purification. Or aucune méthode officielle de détermination de cette activité n'existe actuellement. Des protocoles ont été mis au point par Dupré *et al.* (1970) (mesure par radioactivité du pantothénate issu de pantéthine ou de pantéthéine marquée) et par Dupré *et al.* (1984) (mesure indirecte par absorption UV du S-cystéamine-3-pyruvate cyclisé provenant de l'hydrolyse de la S-pantéthéine-3-pyruvate). L'utilisation d'une molécule marquée rend cependant la première méthode difficilement

applicable en routine. En ce qui concerne la deuxième, l'utilisation d'un substrat enzymatique qui n'est pas présent dans les matrices alimentaires peut fausser la valeur de l'activité trouvée.

Dans le protocole de détermination de l'activité enzymatique de la pantéthénase mis au point au cours de ce travail, la pantéthine a été utilisée comme substrat et l'acide pantothénique formé a été dosé directement par CLHP et fluorimétrie. La pantéthéine aurait pu également être choisie comme substrat, mais en raison de son instabilité, sa forme oxydée (la pantéthine), beaucoup plus stable, lui a été préférée. L'activité enzymatique a été définie comme étant le nombre de μmoles de pantéthine hydrolysées en 1 h à 37°C et pH 8 par ml de solution de pantéthénase. Pour pouvoir s'assurer que le degré d'avancement de la réaction d'hydrolyse n'était pas maximal, il a été nécessaire de trouver des conditions chromatographiques permettant d'isoler et de doser les différents produits susceptibles d'être présents dans le milieu réactionnel (pantéthine résiduelle, acide pantothénique et éventuellement pantéthéine). Pour réaliser cette séparation chromatographique, la phase mobile finalement proposée a été un gradient de tampon phosphate (33 mM, pH 2,5) et de méthanol (voir § 2.4.3.3, p.17), mis au point à partir des travaux réalisés par Fisher et Szulc (1997) et par Herrmans-Lokkerbol *et al.* (1996). Les temps de rétention de l'acide pantothénique, de la pantéthéine et de la pantéthine ont été respectivement de 9,6 min, 11,9 min et 15,0 min (Figure 30).

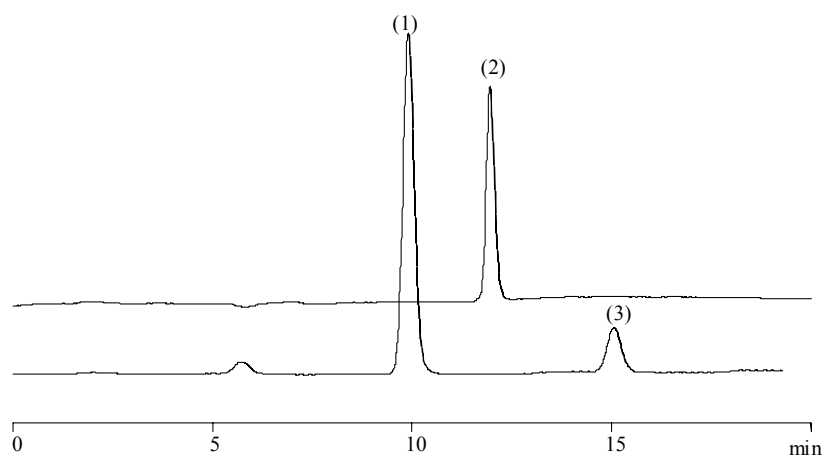


Figure 30. Chromatogrammes de l'acide pantothénique (1) ($2,1 \cdot 10^{-5}$ M), de la pantéthéine (2) ($1,7 \cdot 10^{-5}$ M) et de la pantéthine (3) ($0,9 \cdot 10^{-5}$ M).

Les activités pantéthéinasiqes trouvées dans les différentes solutions dialysées ont varié de 55 à $85 \text{ mU} \cdot \text{ml}^{-1}$ et ont été nettement plus élevées que celles des solutions traitées sur résine échangeuse d'ions (de 22 à $60 \text{ mU} \cdot \text{ml}^{-1}$).

3.3.1.3. L'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique à l'aide d'une solution étalon de coenzyme A

Dans un premier temps, l'action des enzymes a été testée sur une solution étalon de CoA. Après avoir mis en présence la phosphatase alcaline et une solution étalon de CoA pendant 18h à 37°C, la solution analysée par CLHP/fluorimétrie a présenté 2 pics : l'un de pantéthéine et un autre, beaucoup plus petit, de pantéthine résultant de l'oxydation de la pantéthéine (Figure 31). Le CoA résiduel n'a pu être détecté, cette molécule n'étant pas naturellement fluorescente et ne formant pas de composé fluorescent après hydrolyse alcaline en présence d'OPA et de MPA. Comme cela était attendu, la phosphatase alcaline a bien hydrolysé la liaison phosphate du CoA, mais n'a pas permis, seule, d'obtenir de l'acide pantothénique.

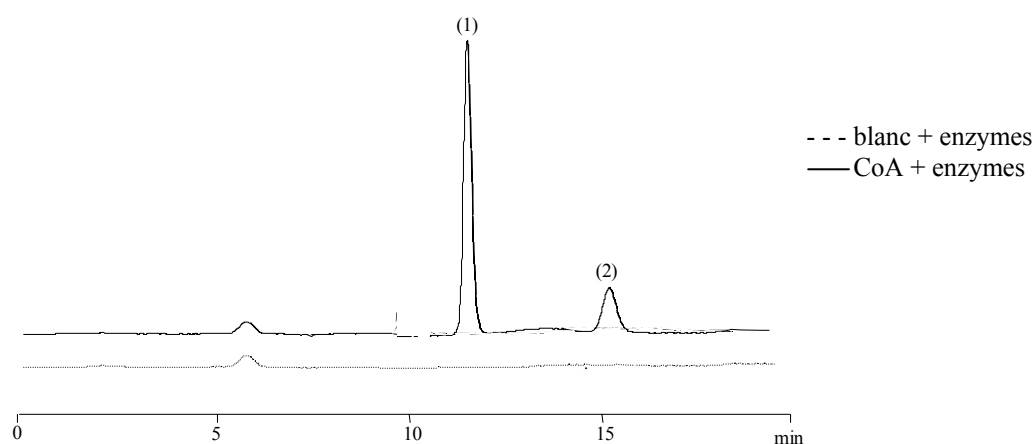


Figure 31. Chromatogrammes obtenus après action de la phosphatase alcaline sur du coenzyme A [(1) : pantéthéine, (2) : pantéthine] (conditions chromatographiques voir § 2.4.3.3).

Il aurait peut-être été possible de n'utiliser que de la phosphatase alcaline lors de l'analyse de matrices alimentaires, à condition d'ajouter un antioxydant dans le milieu réactionnel afin d'empêcher la conversion de la pantéthéine en pantéthine. Dans ces conditions, le chromatogramme aurait alors comporter 2 pics intéressants : l'un d'acide pantothénique correspondant à la forme libre de la vitamine B₅ et l'autre de pantéthéine correspondant à la forme liée dans le CoA de cette vitamine, ce qui aurait alors permis un dosage simultané de ces 2 formes. En définitive, cette expérience n'a pas été tentée car la sensibilité de la mesure pour le dosage de la pantéthéine après dérivation post-colonne est bien moindre que celle obtenue pour l'acide pantothénique.

Pour des raisons similaires, l'utilisation de la seule pantéthéinase ne devrait donc pas permettre la libération de l'acide pantothénique contenu dans le CoA. La poudre de foie de pigeon contenant la pantéthéinase étant cependant très impure, il n'était pas impossible que la solution de

pantéthéinase utilisée présentât une activité phosphatasique secondaire. Dans ce cas, une partie ou même la totalité de l'acide pantothénique aurait pu être libérée à partir du CoA. Après avoir fait agir la pantéthéinase sur ce composé chimique pendant 18 h à 37°C, aucun pic correspondant à l'acide pantothénique n'a cependant pu être mis en évidence, ce qui prouve simplement que la solution de la pantéthéinase utilisée n'avait aucune activité phosphatasique.

En présence des deux enzymes (100 U de phosphatase alcaline et 30 mU de pantéthéinase), et après incubation pendant 18h à 37°C, le CoA (130 µg) a bien été partiellement hydrolysé avec formation exclusive d'acide pantothénique (Figure 32). Les 2 pics observés avant celui de l'acide pantothénique correspondent à des impuretés apportées par les enzymes, très vraisemblablement par la solution de pantéthéinase. Du point de vue qualitatif, chaque enzyme a bien effectué son travail spécifique, la phosphatase alcaline permettant l'hydrolyse du CoA en pantéthéine et la pantéthéinase celle de la pantéthéine en acide pantothénique. Il restait néanmoins à optimiser les quantités d'enzymes à utiliser pour obtenir un rendement d'hydrolyse le plus proche possible de 100 %.

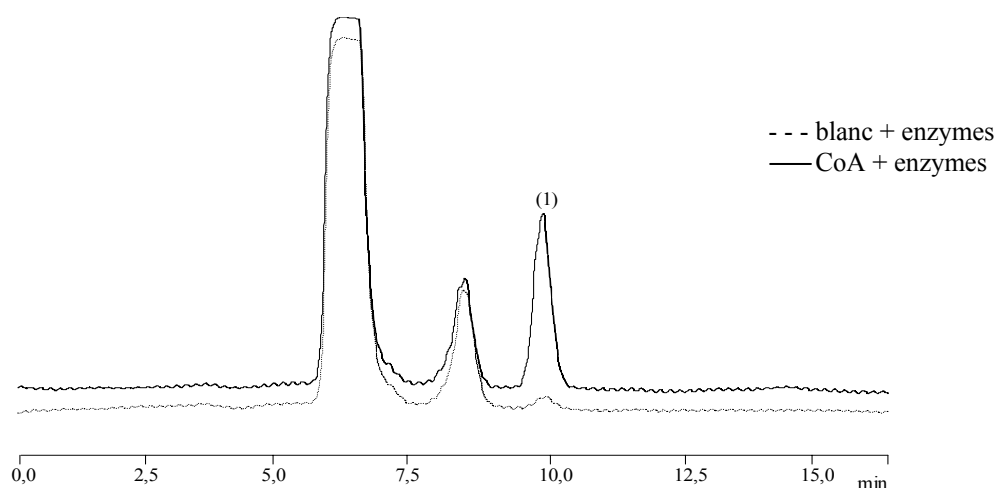


Figure 32. Chromatogrammes obtenus après action de la phosphatase alcaline et de la pantéthéinase sur du coenzyme A [(1) : acide pantothénique].

Cette optimisation a été réalisée en utilisant toujours 1 ml d'une solution étalon de CoA à 305 µg.ml⁻¹, ce qui correspondrait sensiblement à une teneur en acide pantothénique lié dans le CoA dans l'aliment de l'ordre de 95 µg.g⁻¹ (selon Souci *et al.* (1994), l'aliment le plus riche en vitamine B₅ serait le foie de porc avec une teneur en acide pantothénique (libre et lié) de 79 µg.g⁻¹). La quantité d'une des 2 enzymes a été fixée en très large excès, pendant que la quantité de l'autre variait.

En ce qui concerne la phosphatase alcaline, le nombre d'unités a été porté successivement de 0 à 15 par mg de CoA, le nombre de mU de pantéthéinase étant quant à lui fixé à 120 par mg de CoA. Le rendement d'hydrolyse (quantité d'acide pantothénique effectivement obtenue sur la

quantité d'acide pantothénique qui aurait dû être obtenue si 100% du CoA avait été transformé) a augmenté rapidement avec le nombre d'unités de phosphatase alcaline, pour atteindre une valeur maximale très proche de 100 % pour une activité phosphatasique de 3 U par mg de CoA (soit 1 U pour 305 μg de CoA) (Figure 33-a).

Pour ce qui est de la pantéthéinase, le nombre de mU a varié progressivement de 0 à 250 par mg de CoA, le nombre d'unités de phosphatase alcaline étant fixé à 31 par mg de CoA. L'évolution du rendement d'hydrolyse en fonction de la concentration de pantéthéinase a également permis de montrer qu'un palier correspondant à un rendement de 100 % pouvait être atteint, et ce pour un ajout de 65 mU par mg de CoA (Figure 33-b).

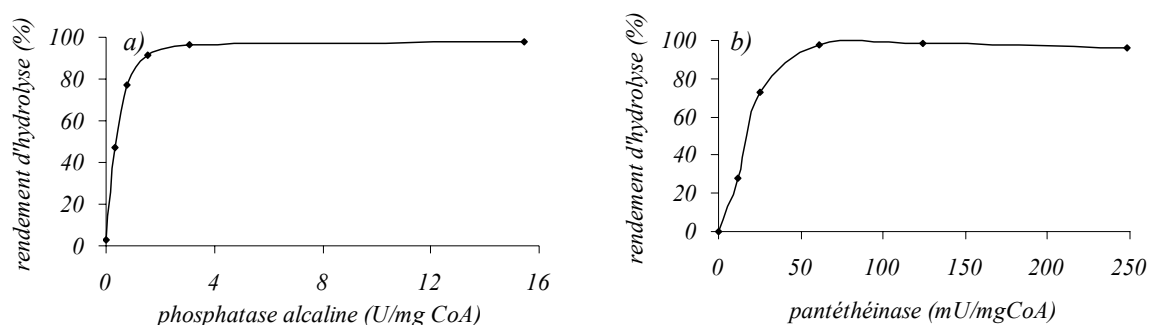


Figure 33. Optimisation des concentrations d'enzymes à utiliser pour hydrolyser 1 ml d'une solution étalon de CoA à 305 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Effet sur le rendement d'hydrolyse du nombre d'unités de phosphatase alcaline (a) et du nombre de milliunités de pantéthéinase (b).

Les quantités optimales d'enzymes à utiliser pour une prise d'essai de 1 g d'un échantillon alimentaire contenant 95 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d'acide pantothénique lié dans le CoA (soit 305 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de CoA) seraient donc de 1 U de phosphatase alcaline et 20 mU de pantéthéinase. Ce n'est en fait qu'une estimation assez grossière, tout d'abord parce que dans aucun des aliments analysés par la suite, la teneur en acide pantothénique lié dans le CoA n'a représenté plus de 70 % de la teneur totale en vitamine B₅ (voir tableau IX, p.67), mais aussi, et cela joue dans l'autre sens, parce qu'une part plus ou moins importante des enzymes ajoutées à un échantillon alimentaire agira sur d'autres constituants chimiques que le CoA. Il apparaît donc tout à fait indispensable, pour réaliser une optimisation plus rigoureuse, d'effectuer ce travail sur un échantillon alimentaire, et non sur une solution étalon de CoA.

3.3.1.4. *L'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique en utilisant comme substrat un échantillon de foie de porc*

L'optimisation des quantités d'enzymes à utiliser a été réalisée sur un échantillon de foie de porc, une des matrices les plus riches en vitamine B₅, et tout particulièrement en CoA (environ 45

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d'acide pantothénique lié dans le CoA, soit 50% de la vitamine B₅ totale présente dans cet aliment, selon Gonthier *et al.*, 1998 b). Cet échantillon alimentaire a préalablement subi un traitement thermique au bain-marie à 95°C pendant 15 min afin de détruire ses enzymes endogènes. L'étude a été réalisée, comme précédemment, en fixant la quantité d'une des 2 enzymes (en large excès) et en faisant varier la quantité de l'autre.

Le nombre d'unités de phosphatase alcaline a tout d'abord été porté de 0 à 10 unités pour une prise d'essai de 1 g de foie de porc, le nombre d'unités de pantéthéinase étant maintenu à 100 mU. La concentration d'acide pantothénique retrouvée dans cette matrice a augmenté avec le nombre d'unités de phosphatase jusqu'à atteindre un palier pour 4 U de phosphatase (Figure 34-a).

Le nombre d'unités de phosphatase étant maintenant fixé à 15, le nombre d'unités de pantéthéinase a été progressivement augmenté de 0 à 70 mU pour la même prise d'essai de foie de porc. Un palier a été atteint pour 35 mU de pantéthéinase (Figure 34-b).

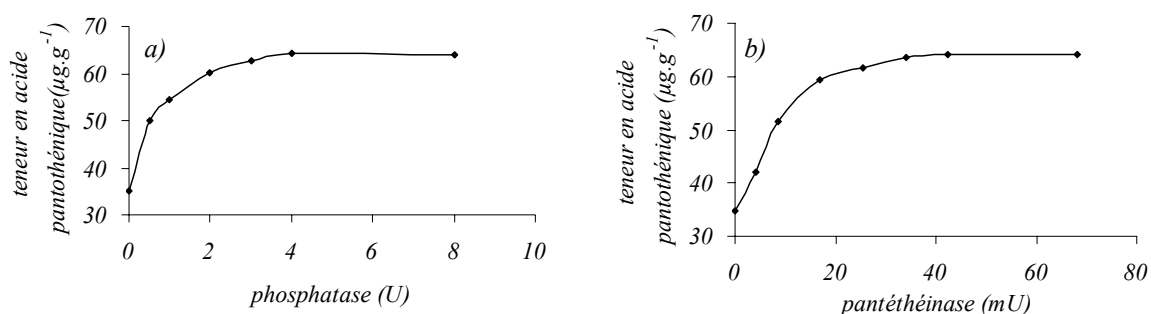


Figure 34. Teneur en acide pantothénique (libre et lié dans le CoA) ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) dans un échantillon de foie de porc (prise d'essai de 1 g) en fonction de la quantité de phosphatase alcaline (a) ou de pantéthéinase (b) utilisée par échantillon lors d'une incubation à 37°C pendant 18h dans un tampon Tris (pH 8) en présence d'un excès de l'autre enzyme [100 mU de pantéthéinase (a) ou 15 U de phosphatase (b)].

Pour libérer l'acide pantothénique du CoA dans cet aliment, il a donc fallu 4 U de phosphatase alcaline et 35 mU de pantéthéinase, alors que la concentration d'acide pantothénique lié dans le CoA n'était que de $32 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (valeur obtenue en faisant la différence des ordonnées au niveau du palier et à l'origine dans la figure 34), soit $132 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de CoA, soit près de 3 fois moins que dans la solution étalon de CoA utilisée dans le paragraphe précédent. Ces résultats indiquent donc clairement, ce qui était prévisible, qu'une très grande partie des quantités d'enzymes ajoutées a été utilisée par d'autres constituants alimentaires que le CoA.

En définitive, il a été proposé de tripler les quantités d'enzymes ainsi définies (soit 12 U de phosphatase et 100 mU de pantéthéinase par prise d'essai) pour s'assurer d'une hydrolyse complète du CoA dans n'importe quel échantillon alimentaire analysé, quelle que soit la nature de sa matrice.

La quantité de phosphatase alcaline proposée reste néanmoins environ 9 fois plus faible que celle préconisée par Gonthier *et al.* (1998 b). Pour ce qui est de la pantéthénase, aucune comparaison n'a été possible avec des quantités d'enzymes utilisées dans des travaux antérieurs puisqu'aucune mesure de l'activité de cette enzyme n'a été effectuée par les auteurs de ces travaux.

3.3.2. Les problèmes analytiques rencontrés lors du dosage de l'acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A dans différents échantillons alimentaires d'origine végétale

Le protocole d'analyse élaboré [extraction enzymatique par la phosphatase alcaline et la pantéthénase, purification par passage de l'extrait sur cartouches échangeuses d'ions et analyse de l'extrait purifié par CLHP avec élution à gradient (§ 2.4.3.2, p.17) et fluorimétrie] a été testé sur un certain nombre de matrices alimentaires représentatives des différentes catégories d'aliments. Les chromatogrammes présentés dans la figure 35 montrent que l'isolement du pic chromatographique de l'acide pantothénique a toujours été satisfaisant.

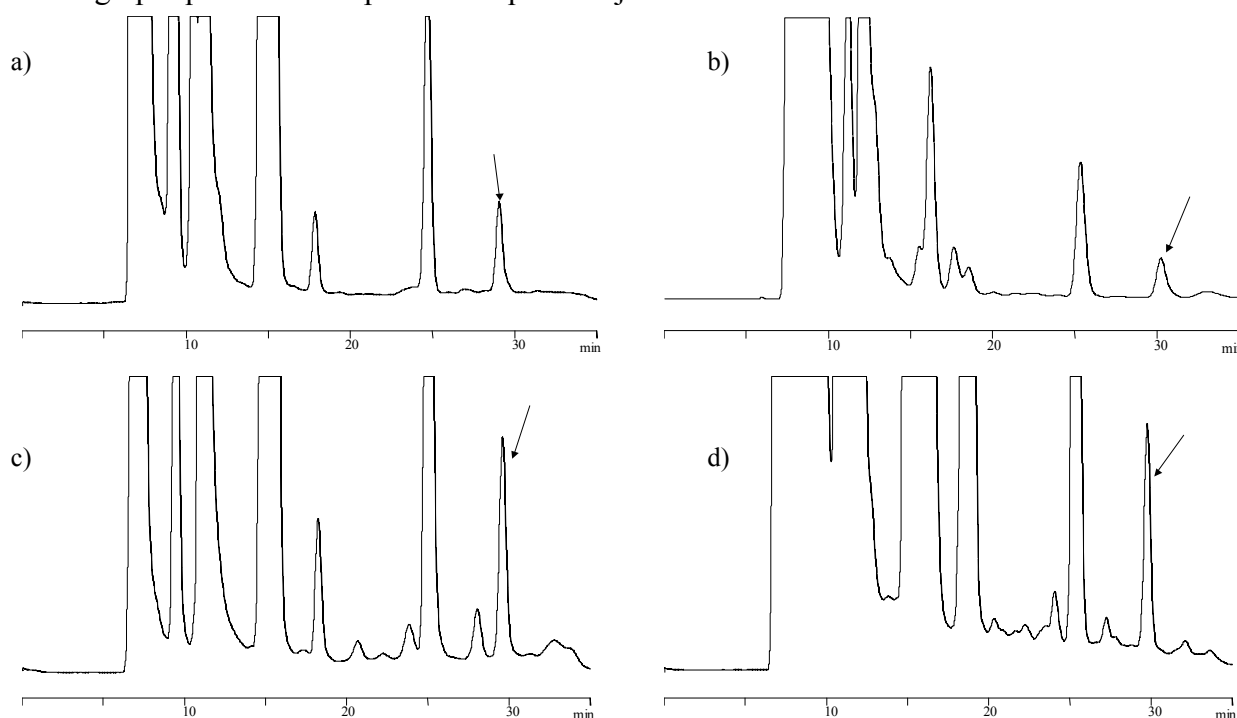


Figure 35. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de l'acide pantothénique libre et lié dans le CoA dans l'avocat (a), les lentilles (b), l'oeuf (c) et la levure (d).

Les différents résultats obtenus (teneurs en acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A, écart-type et taux de recouvrement) sont rassemblés dans le tableau IV. Les teneurs en acide pantothénique libre de ces divers aliments (voir tableau III, p. 43) sont rappelées dans ce tableau.

Tableau IV. Détermination des teneurs^a en acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A (exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d'acide pantothénique) dans différents aliments.

aliment	acide pantothénique libre (rappel)		acide pantothénique libre et lié dans le CoA		taux de recouvrement (%)
foie de porc	30,7	(0,1)	61	(3)	99
viande de poulet	10,2	(0,2)	10,1	(0,3)	100
saumon	11,2	(0,5)	11,1	(0,5)	93
œuf	17,8	(0,2)	20,2	(0,5)	96
lait en poudre	46,3	(0,7)	52,1	(0,4)	95
levure	24,1	(0,7)	72	(1)	99
avocat	8,2	(0,2)	5,9	(0,6)	68
carotte	3,45	(0,05)	1,8	(0,7)	1,5
épinards	0,80	(0,08)	2	(1)	15
haricots verts	1,8	(0,2)	2,2	(0,3)	51
lentilles	10,6	(0,4)	6	(4)	23
petits pois	2,0	(0,2)	0,6	(0,1)	61

^a moyenne de 3 déterminations (écart-type entre parenthèses)

Pour tous les aliments étudiés qui n'étaient pas d'origine végétale, les résultats ont été très satisfaisants : des teneurs en acide pantothénique libre et lié dans le CoA égales ou supérieures aux teneurs en acide pantothénique libre, des coefficients de variation compris entre 1,4 et 5,5 % (n=3) et des taux de recouvrement variant de 93 à 100 %. Les teneurs en vitamine B₅ trouvées sont de plus en assez bon accord avec celles indiquées par Souci *et al.* (1994) (voir tableau I, p.7).

Les résultats obtenus lors de l'analyse d'échantillons de fruits et légumes (zone grisée du tableau IV) sont par contre tout à fait aberrants : des teneurs en acide pantothénique libre et lié souvent inférieures à celles obtenues lors du dosage de l'acide pantothénique libre (-30% pour l'avocat et jusqu'à -70 % pour les petits pois), des coefficients de variation très importants (jusqu'à 72 % lors de l'analyse des lentilles) et des taux de recouvrement systématiquement inférieurs à 70 %.

3.3.2.1. Les origines des pertes en vitamine B₅ lors de l'application du protocole analytique proposé à des matrices végétales

Ces résultats anormaux pourraient s'expliquer par un développement microbien lors de l'incubation enzymatique et par une dégradation plus ou moins importante de l'acide pantothénique sous l'influence de ces microorganismes. Une telle dégradation a déjà été observée

par Lahély *et al.* (1999) lors de la mise au point d'une hydrolyse enzymatique destinée à transformer la NAD en nicotinamide lors du dosage de cette vitamine.

L'implication de la matrice alimentaire végétale dans les problèmes analytiques rencontrés et dans une possible contamination microbienne de celle-ci a pu être clairement établie en dosant l'acide pantothénique libre, donc sans ajout d'enzymes, mais en pratiquant (ou non) une incubation de 18 h à 37°C de l'échantillon alimentaire et, dans le cas où une incubation a été pratiquée, en effectuant préalablement (ou non) un autoclavage (Tableau V, cas 1, 2 et 3).

Tableau V. Influence du protocole d'extraction de la vitamine B₅ sur la teneur ^a en acide pantothénique (exprimées en µg.g⁻¹) dans un échantillon de petits pois.

	protocole d'extraction	teneur en acide pantothénique	
(1)	absence d'enzymes, pas d'incubation	2,0	(0,2)
(2)	absence d'enzymes, incubation à 37°C, 18h	1,0	(0,1)
(3)	autoclavage, absence d'enzymes, incubation à 37°C, 18h	2,3	(0,1)
(4)	présence d'enzymes, incubation à 37°C, 18h	0,6	(0,1)

^a moyenne de 3 déterminations (écart-type entre parenthèses)

Lorsque la matrice végétale a été incubée à 37°C pendant 18 h, sans enzymes (cas 2), les résultats obtenus ont toujours été aberrants [en particulier une teneur en acide pantothénique obtenue plus faible que la teneur trouvée dans la matrice non incubée (cas 1)], ce qui prouve que l'incubation de la matrice alimentaire, même en absence d'enzymes, est sans aucun doute largement responsable de la perte de vitamine B₅. Lorsque la matrice, incubée à 37°C pendant 18 h, a été précédemment autoclavée (cas 3), la teneur en acide pantothénique libre (2,3 µg.g⁻¹) n'a pas été significativement différente de celle trouvée sans incubation ni autoclavage (2,0 µg.g⁻¹, cas 1), ce qui semble donc bien prouver que des microorganismes présents dans la matrice et détruits par l'autoclavage à 121°C pendant 10 min étaient à l'origine des pertes en vitamine B₅ dans la matrice non autoclavée (cas 2).

Mais apparemment, l'incubation de la matrice végétale n'est pas la seule cause de la disparition de l'acide pantothénique. En effet lorsque la matrice a été incubée en présence d'enzymes, sans autoclavage préalable (Tableau V, cas 4), la teneur en acide pantothénique n'était plus que de 0,6 µg.g⁻¹, donc significativement inférieure à la teneur trouvée lorsque la matrice

avait été incubée sans enzymes (cas 2), ce qui laisse supposer que l'ajout de la phosphatase alcaline et de la pantéthéinase et vraisemblablement, par la même occasion, l'ajout de nombreux autres microorganismes intervient également dans cette disparition d'acide pantothénique.

Si le problème analytique posé par la matrice végétale peut apparemment se solutionner aisément en réalisant un autoclavage préalable de l'échantillon végétal, celui résultant de l'ajout des enzymes apparaît plus complexe à résoudre, la purification de la pantéthéinase par dialyse, plus poussée que celle usuellement pratiquée (passage sur échangeuse d'anions), n'ayant apporté aucune solution. Un abaissement de la température d'incubation lors du traitement enzymatique, afin d'essayer de réduire l'activité des impuretés enzymatiques apparemment responsables de ces difficultés analytiques, pourrait néanmoins constituer une solution élégante à l'ensemble des problèmes rencontrés (effets de la matrice et ajout d'enzymes), solution qui aurait en outre l'avantage de rendre inutile l'autoclavage préalable.

3.3.2.2. *L'influence de la température d'incubation sur la teneur en acide pantothénique libre et lié*

Lors de l'analyse de petits pois, il a été montré qu'une diminution de la température d'incubation (de 37°C à 15°C) pendant l'hydrolyse enzymatique entraînait une augmentation significative de la teneur en acide pantothénique et qu'une teneur maximale de 4,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ était obtenue pour une température d'incubation de 20°C (Figure 36). Par ailleurs, les effets délétères observés lors de l'incubation des enzymes à 37°C ont été très rapidement atténués par un abaissement de la température d'incubation et ont complètement disparu à 20°C.

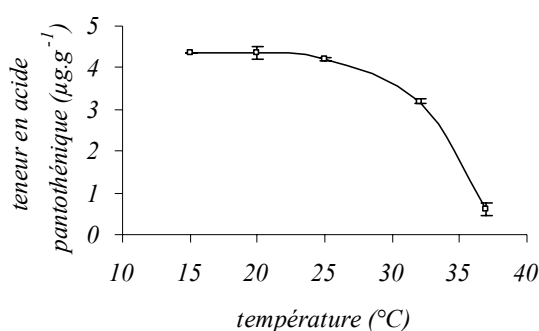


Figure 36. Teneurs en acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) dans un échantillon de petits pois (prise d'essai de 7 g) en fonction de la température d'incubation lors de l'hydrolyse enzymatique.

Il a de plus été vérifié, en étudiant les autres matrices végétales, qu'un abaissement de la température d'incubation de 37°C à 20°C conduisait également à l'obtention de résultats

satisfaisants (Tableau VI). Les teneurs en acide pantothénique libre et lié dans le CoA ont en effet été supérieures ou égales aux teneurs en acide pantothénique libre. Les coefficients de variation ainsi que les taux de recouvrement obtenus lors de l'incubation à 20°C étaient par ailleurs tout à fait acceptables.

Tableau VI. Comparaison des teneurs^a en acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) obtenues pour une incubation à 37°C ou à 20°C dans les matrices végétales.

aliment	incubation à 37°C			incubation à 20°C		
	teneur	écart-type	taux de recouvrement	teneur	écart-type	taux de recouvrement
avocat	5,9	0,3	68	8,4	0,2	92
carotte	1,8	0,7	1,5	3,6	0,2	112
épinards	2	1	15	1,10	0,09	102
haricots verts	2	3	51	2,0	0,2	109
lentilles	6	4	23	14,7	0,4	104
petits pois	0,6	0,1	61	4,4	0,2	105

^a moyenne de 3 déterminations

Une meilleure compréhension des problèmes analytiques occasionnés par l'utilisation du traitement enzymatique lors de l'analyse de matrices végétales n'a pu être obtenue (pourquoi, par exemple, l'ajout d'enzymes dans des matrices non végétales n'a jamais entraîné de difficultés analytiques lors d'une incubation à 37°C ?). Mais ces difficultés ont en définitive pu être facilement contournées par un abaissement de la température d'incubation des enzymes de 37°C à 20°C. Cette modification des conditions d'extraction enzymatique a cependant nécessité de procéder à une nouvelle optimisation des quantités d'enzymes à utiliser.

3.3.2.3. *L'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique pour une température d'incubation de 20°C*

Le passage de la température d'incubation de 37°C à 20°C lors de l'hydrolyse enzymatique devrait très probablement conduire à une diminution de l'activité du mélange phosphatase alcaline – pantéthénase.

En fait, lors de l'hydrolyse d'une solution étalon de CoA (305 μg dans 1 ml d'eau distillée) par la phosphatase alcaline (1 U) pendant 6 h, les aires des pics de pantéthine obtenus après incubation à 37°C ou à 20°C ont été identiques, ce qui indique sans ambiguïté que l'activité de la phosphatase alcaline vis-à-vis du CoA n'a pas diminué lors de l'abaissement de la température d'incubation. L'activité de solution de pantéthénase (0,25 ml) mesurée en utilisant comme substrat de la pantéthine étalon (100 μg) (voir § 3.3.1.2, p.46) a par contre diminué de moitié lors

de l'abaissement de la température d'incubation de 37°C à 20°C. Fort logiquement, le rendement d'hydrolyse du CoA (305 µg) en acide pantothénique par le mélange enzymatique (1U de phosphatase alcaline – 20 mU de pantéthénase) a effectivement diminué sensiblement de moitié : pour une incubation de 4 h, le rendement d'hydrolyse a été de 69 % à 37°C alors qu'il n'a été que de 36 % à 20°C.

Une nouvelle optimisation des quantités de phosphatase alcaline et de pantéthénase à utiliser a ensuite été réalisée en utilisant à nouveau le foie de porc comme substrat. Les résultats obtenus ont montré que pour une incubation à 20°C, il était nécessaire d'utiliser environ 2 fois plus de pantéthénase et autant de phosphatase alcaline que pour une incubation à 37°C pour atteindre une teneur maximale en acide pantothénique, c'est-à-dire 65 mU de pantéthénase et 4 U de phosphatase alcaline (Figure 37), valeurs tout à fait prévisibles si on se réfère aux résultats obtenus ci-dessus dans ce même paragraphe.

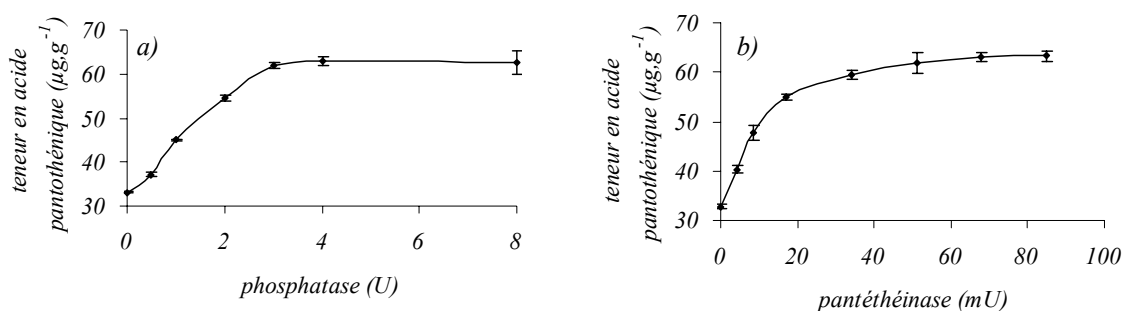


Figure 37. Teneurs en acide pantothénique libre et lié dans le CoA (µg.g⁻¹) dans un échantillon de foie de porc (prise d'essai de 1 g) en fonction de la quantité de phosphatase alcaline (a) ou de pantéthénase (b) utilisée lors d'une incubation à 20°C pendant 18h dans un tampon Tris (pH 8) en présence d'un excès de l'autre enzyme [200 mU de pantéthénase (a) ou 15 U de phosphatase (b)].

Par mesure de précaution cependant, il a finalement été décidé de recommander des quantités d'enzymes trois fois plus importantes dans le protocole final (12 U de phosphatase alcaline et 200 mU de pantéthénase lors d'une incubation à 20°C et pH 8 pendant 18 h) pour s'assurer d'une hydrolyse complète du CoA dans n'importe quel échantillon alimentaire.

3.3.3. Le dosage de l'acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A dans divers aliments

La méthode analytique finalement proposée [hydrolyse enzymatique (phosphatase alcaline et pantéthénase) avec incubation à 20°C pendant 18 h, purification sur cartouches échangeuses d'ions, CLHP et détection par fluorimétrie après dérivation] a permis d'obtenir un très bon

isolement chromatographique de l'acide pantothénique (Figures 38 et 39) et des résultats tout à fait satisfaisants pour toutes les matrices alimentaires testées (Tableau VII).

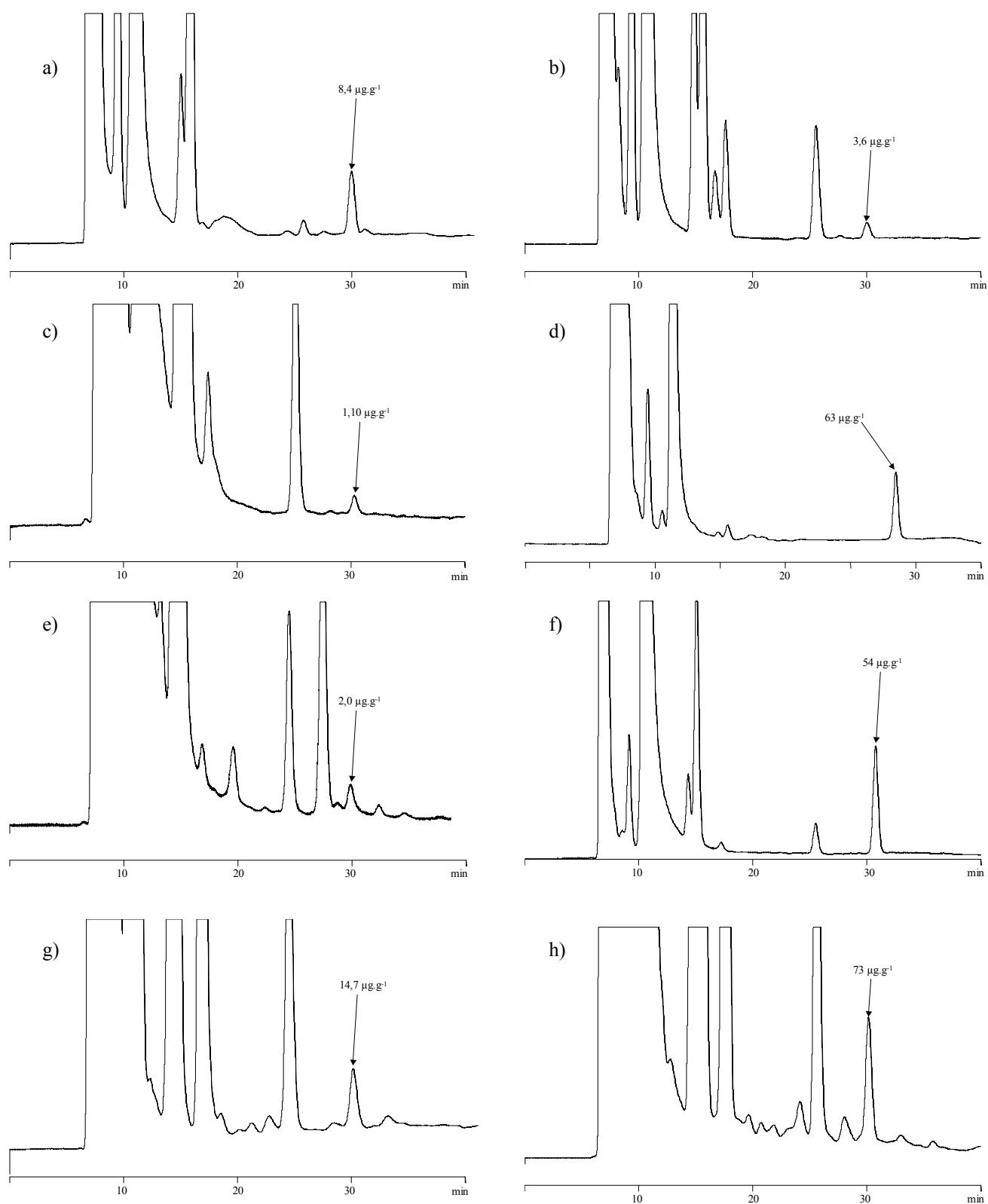


Figure 38. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de l'acide pantothénique libre et lié dans le CoA (incubation enzymatique à 20°C) dans l'avocat (a), la carotte (b), les épinards (c), le foie de porc (d), les haricots verts (e), le lait en poudre (f), les lentilles (g) et la levure (h).

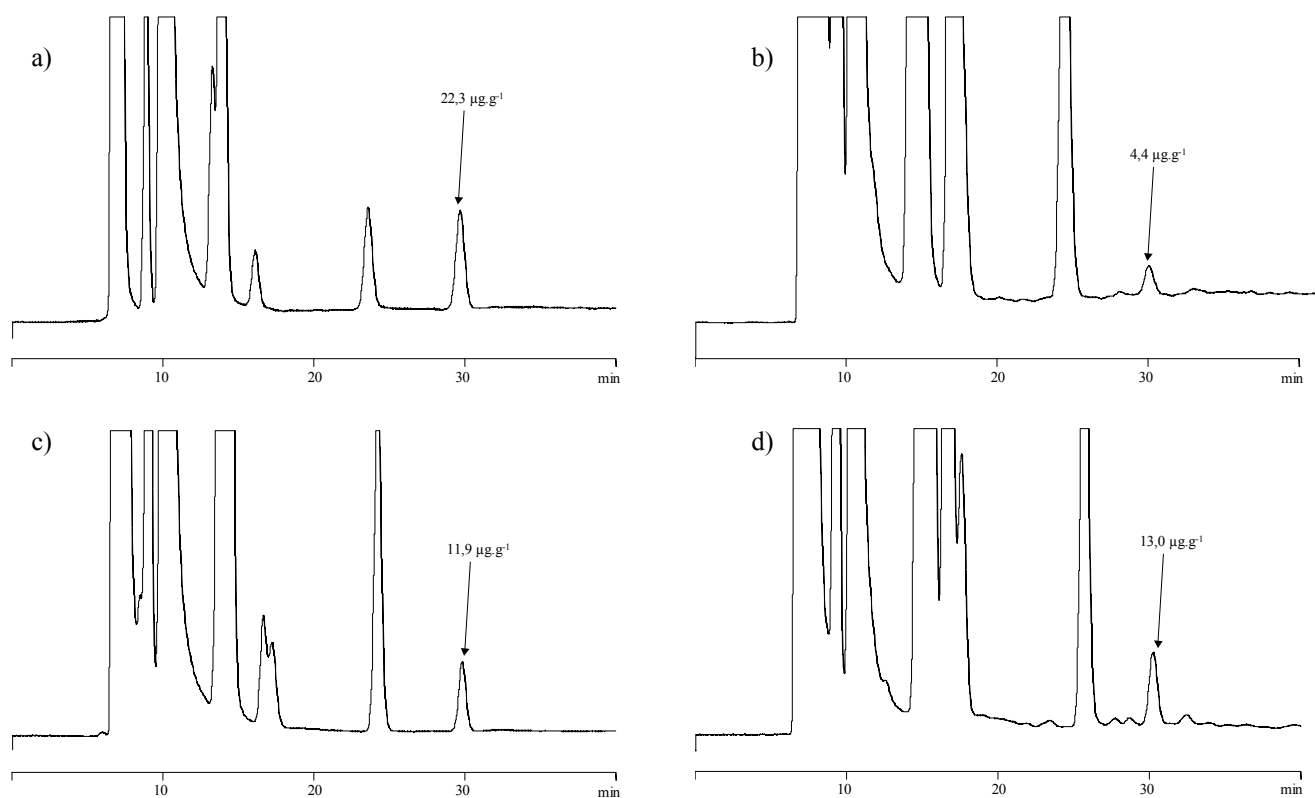


Figure 39. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de l'acide pantothénique libre et lié dans le CoA (incubation enzymatique à 20°C) dans l'œuf (a), les petits pois (b), le saumon (c) et la viande de poulet (d).

Tableau VII. Détermination des teneurs^a en acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A (hydrolyse enzymatique avec phosphatase alcaline et pantéthénase à pH 8 et à 20°C pendant 18 h) dans différents aliments.

aliment	teneur ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	écart-type ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	taux de recouvrement (%)
foie de porc	63	2	104
viande de poulet	13,0	0,1	103
saumon	11,9	0,4	100
œuf	22,3	0,5	104
lait en poudre	54	2	106
levure	73	3	108
avocat	8,4	0,2	92
carotte	3,6	0,2	112
épinards	1,10	0,09	102
haricots verts	2,0	0,2	109
lentilles	14,7	0,4	104
petits pois	4,4	0,2	105

^a moyenne de 3 déterminations

Dans les matrices non végétales, les teneurs en acide pantothénique obtenues en effectuant le traitement enzymatique à 20°C ont été voisines de celles obtenues lorsque ce traitement avait été effectué à 37°C (voir tableau IV, p.52), ce qui confirme la qualité de l'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique à 20°C. Dans les matrices végétales, ces teneurs ont toujours été supérieures ou égales aux teneurs en acide pantothénique libre. De plus, les taux de recouvrement de la méthode proposée ont toujours été proches de 100 % avec toutes les matrices alimentaires (végétales ou non) et les coefficients de variation compris entre 0,8 % (viande de poulet) et 10 % (haricots verts).

3.4. LA DETERMINATION DE LA VITAMINE B₅ TOTALE

Curieusement, alors que les publications de nutrition et de chimie analytique concernant le sujet de l'acide pantothénique mentionnent toujours le fait que dans les matrices alimentaires cette vitamine est également liée à l'acyl carrier protein (ACP), aucun travail n'a jusqu'à présent fourni de méthode de détermination prenant en compte la participation de l'ACP dans la teneur en acide pantothénique des aliments. Etant donnée la structure de l'ACP (Figure 40), la phosphatase alcaline et la pantéthénase pourraient parfaitement permettre la libération de l'acide pantothénique. Majerus *et al.* (1965) et Wyse *et al.* (1985) ont cependant constaté que ces deux enzymes ne le permettaient pas, vraisemblablement pour des raisons stériques.

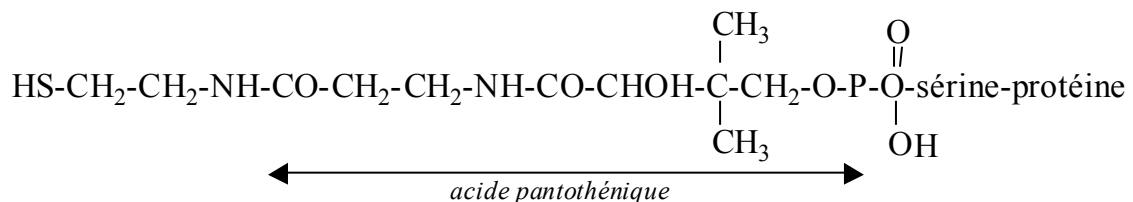


Figure 40. Structure chimique de l'ACP.

3.4.1. L'ajout d'une protéase dans le protocole d'extraction

Un traitement protéasique avant l'hydrolyse enzymatique avec le mélange phosphatase – pantéthénase pourrait être envisagé pour parvenir à hydrolyser la partie protéique de l'ACP et ainsi faciliter l'action ultérieure des deux autres enzymes. Apparemment un tel traitement n'a jamais été testé sur une matrice alimentaire. Seuls Majerus *et al.* (1965), dans le cadre d'une étude concernant l'identification du groupement prosthétique de l'ACP, ont montré que son hydrolyse par la pronase (tampon Tris pH 8, 45°C, 24h) conduisait, curieusement, à la formation de la pantoïl lactone alors que ce traitement aurait dû logiquement conduire à la 4'-

phosphopantéthéine. Ce résultat surprenant pourrait cependant s'expliquer par la présence d'impuretés phosphatasique et pantéthéinasiqye dans la pronase, puis par la conversion chimique de l'acide pantothénique libre (non volatil) formé en pantoyl lactone (volatile) lors du passage de l'échantillon dans l'injecteur du chromatographe en phase gazeuse.

3.4.1.1. *Le choix de la protéase*

La pronase, dont l'activité optimale se situe à pH 8, n'a pas été retenue pour cette étude, compte tenu des problèmes analytiques précédemment rencontrés avec les matrices végétales lors d'une incubation à 37°C à ce pH (voir § 3.3.2, p.52). Il a semblé plus judicieux d'utiliser des protéases actives en milieu acide. Ainsi deux protéases, la papaïne et la pepsine ont été testées. Dans les deux cas, le traitement protéasique a été réalisé en premier, puis après avoir remonté le pH à 8, la phosphatase alcaline et la pantéthéinase ont été ajoutées.

L'hydrolyse avec la papaïne a été réalisée en plaçant l'échantillon alimentaire dans 15 ml de tampon acétate 50 mM (pH 4,5). La solution a été mise au bain-marie à 100°C pendant 10 min en vue d'empêcher tout développement microbien et de détruire les éventuelles enzymes endogènes. Un ml d'une solution de papaïne [100 mg.ml^{-1}] a ensuite été ajouté, ainsi que 500 μl d'une solution de glutathion à 1 % pour empêcher l'oxydation des groupements soufrés de la protéine. Le mélange a été mis à incuber sous agitation à 37°C pendant 18 h. Le pH de la solution a ensuite été remonté à 8 par ajout d'hydroxyde de sodium 5 M afin de se placer dans les conditions optimales d'activité de la phosphatase alcaline et de la pantéthéinase. Ce traitement protéasique n'a pas été concluant. En effet de nombreux pics interférents dus à la présence d'impuretés dans l'enzyme sont apparus sur le chromatogramme (Figure 41-a).

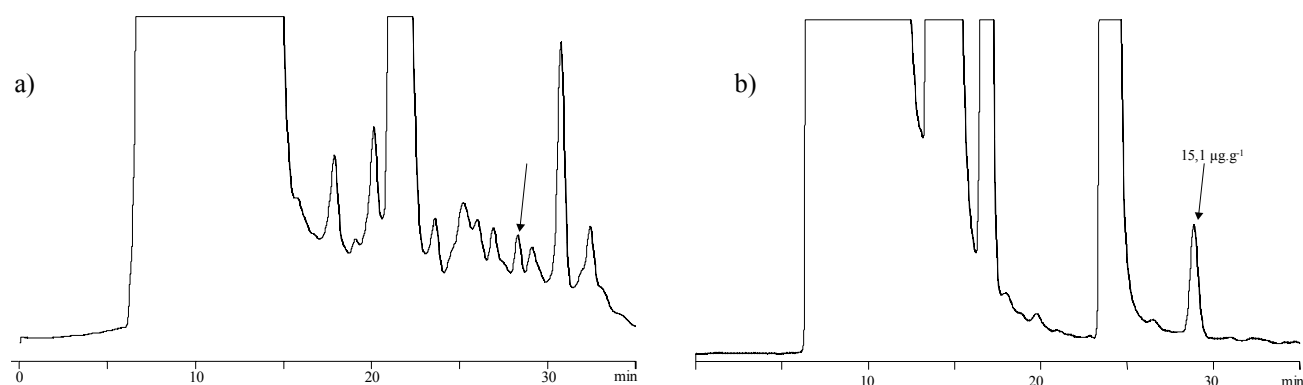


Figure 41. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B₅ totale dans la viande de poulet préalablement traitée avec la papaïne (a) ou la pepsine (b).

L'utilisation de la pepsine, par contre, n'a pas soulevé un tel problème. L'hydrolyse a été effectuée dans le même tampon acétate que précédemment (50 mM, pH 4,5). La solution a été incubée à 37°C pendant 18 h après ajout de 1 ml d'une solution de pepsine [50 mg.ml⁻¹]. Le pH choisi (4,5) ne correspond certes pas au pH optimal d'activité de la pepsine (qui est de 2), mais ce choix, justifié par les risques d'interactions moléculaires entre l'acide pantothénique et les constituants de la matrice alimentaire dans un milieu plus acide (voir § 3.2.2.2, p.37), n'a conduit qu'à une faible diminution (un peu moins de 20 %) de l'activité de cette enzyme. Les essais effectués sur un échantillon de viande de poulet (5 g) ont permis d'obtenir des chromatogrammes tout à fait corrects (Figure 41-b). Il restait néanmoins à optimiser les conditions d'hydrolyse par la pepsine pour voir si ce traitement avait une réelle utilité.

3.4.1.2. L'optimisation des conditions d'hydrolyse par la pepsine

La quantité de pepsine utilisée a été portée successivement de 0 à 100 mg pour le traitement d'un échantillon de 5 g de viande de poulet (matrice riche en protéines) préalablement chauffé à 100°C pendant 10 min (destruction des enzymes endogènes). La teneur en acide pantothénique retrouvée dans cette matrice a augmenté avec la quantité de pepsine ajoutée, jusqu'à une valeur de 50 mg, valeur à partir de laquelle la teneur en acide pantothénique a atteint un palier (Figure 42). La quantité optimale de pepsine pour une incubation à 37°C pendant 18 h et pour un échantillon de 5 g de viande de poulet est donc de 50 mg, soit environ 4500 U.

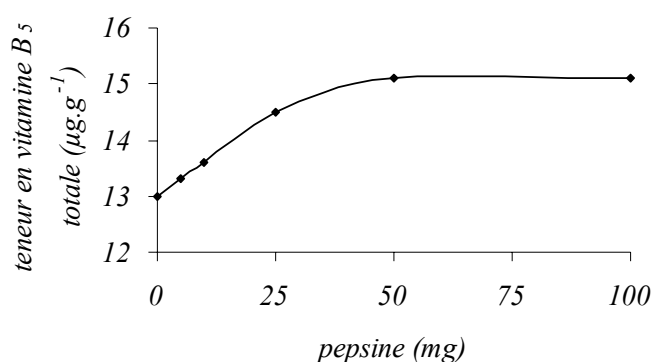


Figure 42. Teneur en vitamine B₅ totale (exprimée en µg d'acide pantothénique. g⁻¹) dans un échantillon de viande de poulet (prise d'essai de 5 g) en fonction de la quantité de pepsine utilisée lors d'une incubation à 37°C pendant 18 h.

Afin de réduire la durée totale de l'analyse, des essais d'hydrolyse protéasique ont été réalisés avec un temps d'incubation plus court (1, 2, 3 ou 6 h) et à une température d'incubation plus élevée (50°C). Lors de l'analyse d'un échantillon de foie de porc, il a été montré que la

teneur maximale en acide pantothénique dans cet aliment, obtenue après 18h d'incubation à 37°C, pouvait l'être aussi en 3h en portant la température d'incubation à 50°C (Figure 43). Des résultats analogues ont été obtenus lors de l'étude d'échantillons de viande de poulet, de levure et de lentilles. L'incubation à 37°C pendant 18 h a donc été remplacée par une incubation à 50°C pendant 3 h dans le protocole analytique.

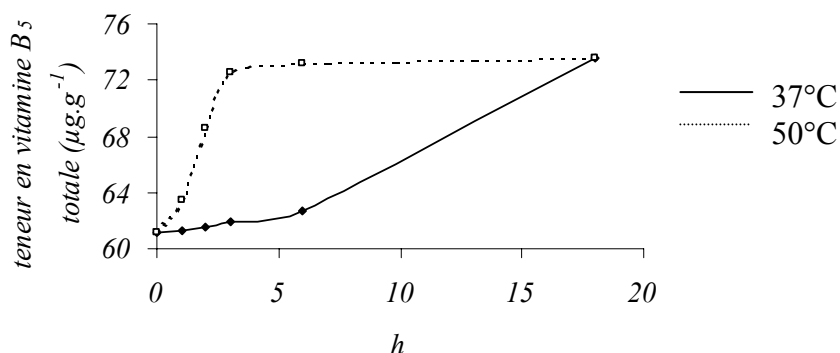


Figure 43. Teneur en vitamine B₅ totale (exprimée en µg d'acide pantothénique.g⁻¹) dans un échantillon de foie de porc (prise d'essai de 1 g) après traitement par la pepsine en fonction de la durée et de la température d'incubation.

Une optimisation de la quantité de pepsine à utiliser a ensuite été réalisée. Cette quantité a été portée successivement de 0 à 100 mg pour le traitement d'un échantillon de viande de poulet (5 g). La teneur maximale en acide pantothénique a été obtenue après traitement par 40 mg de pepsine (soit environ 3600 U) (Figure 44), soit une quantité de pepsine légèrement inférieure à celle nécessaire lors d'une incubation à 37°C pendant 18 h (50 mg).

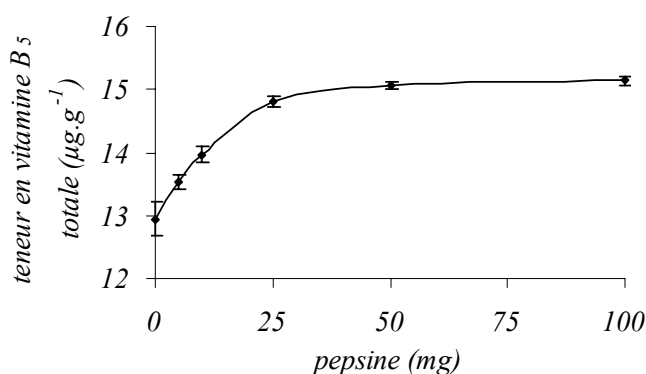


Figure 44. Teneur en vitamine B₅ totale (exprimée en µg d'acide pantothénique.g⁻¹) dans un échantillon de viande de poulet (prise d'essai de 5 g) en fonction de la quantité de pepsine utilisée lors d'une incubation à 50°C pendant 3 h.

Les conditions optimales pour l'hydrolyse des protéines ont donc été les suivantes : 40 mg de pepsine (soit 3600 U), une incubation à pH 4,5 (tampon acétate) et à 50°C pendant 3 h.

3.4.2. Un traitement amylasique est-il nécessaire ?

Comme il n'est pas possible d'écarter totalement l'existence d'interactions entre la vitamine B₅ et les polysaccharides dans les matrices alimentaires, l'éventuel effet d'un traitement par l' α -amylase sur ces interactions a été étudié. Gonthier *et al.* (1998 b) avaient également testé un tel traitement et n'avaient noté aucune différence significative entre les teneurs en acide pantothénique obtenues avec ou sans traitement amylasique, sans cependant faire suivre ce traitement amylasique d'une hydrolyse par la phosphatase alcaline et la pantéthénase. Ils avaient donc juste vérifié qu'il n'y avait pas d'acide pantothénique lié à des polysaccharides. Aucune étude par contre n'a porté sur d'éventuelles interactions entre le CoA et ces polymères.

Des essais de traitement amylasique ont donc été réalisés sur la levure, aliment très riche en amidon. Après un chauffage à 100°C pendant 10 min (destruction des microorganismes et des éventuelles enzymes endogènes), l'échantillon, mis en solution dans 15 ml de tampon acétate 50 mM (pH 4,5), a été incubé avec 1 ml d'une solution d' α -amylase [50 mg.ml⁻¹] à 37°C pendant 18 h. Après avoir remonté le pH à 8 avec de l'hydroxyde de sodium 5 M, la phosphatase et la pantéthénase ont été ajoutées (voir § 2.2.2, p.14).

La teneur en acide pantothénique obtenue par ce traitement amylase-phosphatase-pantéthénase a été de $68 \pm 5 \mu\text{g.g}^{-1}$. Lorsque l'extraction a été uniquement réalisée avec la phosphatase et la pantéthénase, la teneur trouvée a été de $71 \pm 3 \mu\text{g.g}^{-1}$. Ces deux teneurs n'étaient pas significativement différentes. L'ajout d'un traitement amylasique dans le protocole analytique de dosage de l'acide pantothénique n'a donc pas semblé nécessaire. C'était déjà l'avis de Gonthier *et al.* (1998 b).

3.4.3. Le dosage de la vitamine B₅ totale dans divers aliments

Les résultats obtenus avec le protocole finalement retenu [hydrolyse enzymatique par la pepsine (50°C, 3 h), puis par le mélange phosphatase alcaline-pantéthénase (20°C, 18 h), purification sur cartouches échangeuses d'ions, CLHP et fluorimétrie après dérivation post-colonne] ont été regroupés dans le tableau VIII.

Les taux de recouvrement de l'acide pantothénique sont restés compris entre 96 et 101 % et les coefficients de variation entre 1,6 et 7,7 %. L'application de ce protocole a toujours permis d'obtenir un très bon isolement chromatographique de l'acide pantothénique (Figures 45 et 46), quel que soit l'aliment analysé.

Tableau VIII. Détermination des teneurs^a en vitamine B₅ totale (en $\mu\text{g d'acide pantothénique.g}^{-1}$) dans différents aliments.

aliment	teneur	écart-type	taux de recouvrement (%)
foie de porc	73	2	101
viande de poulet	15,1	0,8	nd ^b
saumon	15,3	0,7	nd
œuf	23,0	0,5	nd
lait en poudre	57,1	0,9	99
levure	80	3	96
avocat	8,9	0,3	nd
carotte	3,9	0,3	nd
épinards	1,13	0,03	nd
haricots verts	2,5	0,2	nd
lentilles	17,7	0,3	101
petits pois	5,0	0,2	100

^a moyenne de 3 déterminations

^b non déterminé

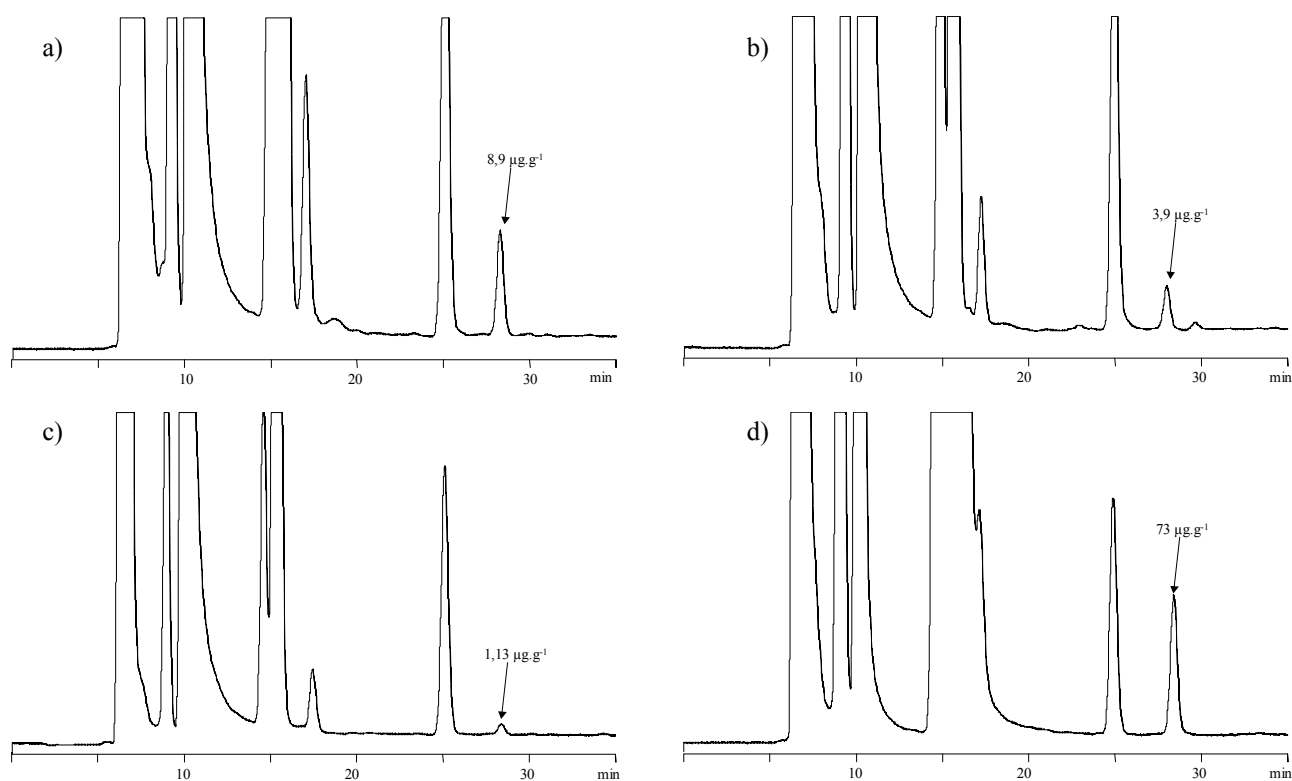


Figure 45. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B₅ totale dans l'avocat (a), la carotte (b), les épinards (c) et le foie de porc (d).

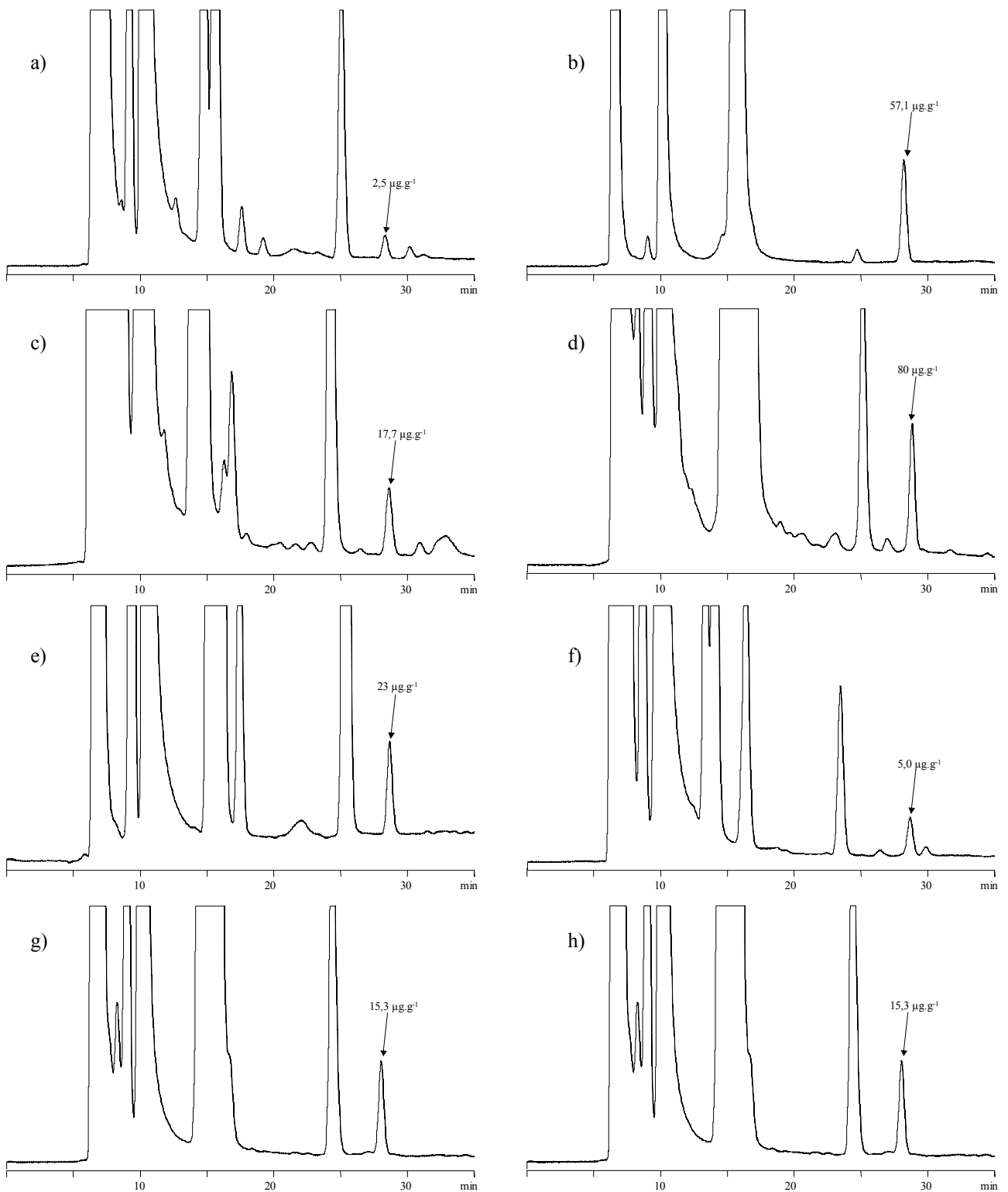


Figure 46. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B₅ totale dans les haricots verts (a), le lait en poudre (b), les lentilles (c), la levure (d), l'œuf (e), les petits pois (f), le saumon (g) et la viande de poulet (h).

Dans 8 sur 12 des matrices alimentaires analysées (foie de porc, viande de poulet, saumon, lait, levure, haricots verts, lentilles et petits pois), les teneurs en vitamine B₅ totale ont augmenté significativement par rapport aux teneurs en acide pantothénique libre et lié dans le CoA (voir

tableau VII, p.58). La plus faible augmentation (5 %) a été obtenue pour le lait en poudre, la plus forte (22 %) pour les haricots verts. Il n'est bien entendu pas possible d'attribuer avec certitude cette augmentation à la présence d'ACP dans ces huit matrices et à l'efficacité du traitement enzymatique envisagé pour convertir l'acide pantothénique lié dans l'ACP en acide pantothénique libre. Cette augmentation pourrait en effet aussi résulter d'une rupture d'hypothétiques liaisons entre des protéines de la matrice alimentaire et l'acide pantothénique. Il a néanmoins été démontré que la mise en oeuvre d'un traitement protéasique était essentielle au dosage de la vitamine B₅ totale dans la plupart des aliments analysés.

3.4.4. La comparaison des teneurs en acide pantothénique selon les différents protocoles d'extraction

L'ensemble des teneurs déterminées dans les différents aliments analysés (acide pantothénique libre, acide pantothénique libre et lié dans le CoA, vitamine B₅ totale) a été regroupé dans le tableau IX. Les teneurs fournies par Souci *et al.* (1994), déjà indiquées dans le tableau I (p.7), sont également rappelées dans ce tableau. La méthode d'analyse mise au point a par ailleurs permis d'estimer les proportions d'acide pantothénique libre, d'acide pantothénique lié dans le CoA et d'acide pantothénique lié à des protéines ou dans l'ACP (Tableau X).

Selon Brown *et al.* (1959) et Gonthier *et al.* (1998 b), l'acide pantothénique lié dans le CoA est la forme majoritaire dans le foie de porc et la levure. Pour d'autres matrices, telles que le saumon, l'avocat et les lentilles, Gonthier *et al.* (1998 b) ont trouvé peu ou pas du tout d'acide pantothénique lié dans le CoA. Ces résultats ont été confirmés par les analyses effectuées au cours de ce travail : le CoA est bien la forme majoritaire dans le foie de porc et la levure, mais également dans les petits pois. Dans les 9 autres matrices, la forme majoritaire est l'acide pantothénique libre. Il n'y a pas en effet de CoA dans l'avocat, les carottes, les haricots verts et le saumon. Dans les quatre autres matrices alimentaires non complémentées étudiées (oeuf, viande de poulet, épinards et lentilles), le pourcentage d'acide pantothénique issu du CoA est resté compris entre 20 et 30 %. Ces résultats semblent contredire l'affirmation de Ball (1998), non justifiée cependant, selon laquelle l'acide pantothénique serait majoritairement sous forme de CoA dans tous les aliments.

Tableau IX. Teneurs^a en acide pantothénique libre, en acide pantothénique libre et lié dans le CoA et en vitamine B₅ totale (exprimées en µg d'acide pantothénique par g) dans différents aliments.

aliment	acide pantothénique libre	acide pantothénique libre et lié dans le CoA	vitamine B ₅ totale	données extraites de Souci et al. (1994)
foie de porc	30,7 (0,1)	63 (2)	73 (2)	66 - 70
viande de poulet	10,2 (0,2)	13 (0,1)	15,1 (0,8)	8,2 - 12,4
saumon	11,2 ^b (0,5)	11,9 ^b (0,4)	15,3 (0,7)	10,2
œuf	17,8 (0,2)	22,3 ^c (0,5)	23,0 ^c (0,5)	11,0 - 18,0
lait en poudre	46,3 (0,7)	54 (2)	57,1 (0,9)	-
levure	24,1 (0,7)	73 (3)	80 (3)	9,4 - 189
avocat	8,2 ^d (0,2)	8,4 ^{d,e} (0,2)	8,9 ^e (0,3)	11,0
carotte	3,45 ^f (0,05)	3,6 ^{f,g} (0,2)	3,9 ^g (0,3)	2,0 - 10,0
épinards	0,80 (0,08)	1,10 ^h (0,09)	1,13 ^h (0,03)	1,9 - 3,1
haricots verts	1,8 ⁱ (0,2)	2,0 ⁱ (0,2)	2,5 (0,2)	2,0 - 8,0
lentilles	10,6 (0,4)	14,7 (0,4)	17,7 (0,3)	13,6 - 17,8
petits pois	2,0 (0,2)	4,4 (0,2)	5,0 (0,2)	6,5 - 8,2

^a moyenne de 3 déterminations (écart-type entre parenthèses)

^{b,e,...,i} moyennes non significativement différentes selon le test de comparaison des moyennes pour un intervalle de confiance de 95 % (voir p.19)

Tableau X. Pourcentage des différentes formes de la vitamine B₅ (acide pantothénique libre, acide pantothénique lié dans le CoA et acide pantothénique lié à des protéines) dans les différents aliments étudiés.

aliment	acide pantothénique libre	acide pantothénique lié dans le CoA	acide pantothénique lié dans l'ACP et aux protéines
foie de porc	42%	44%	14%
viande de poulet	68%	19%	13%
saumon	75%	non significatif	25%
œuf	79%	21%	non significatif
lait en poudre	82%	13%	5%
levure	30%	61%	9%
avocat	100%	non significatif	non significatif
carotte	100%	non significatif	non significatif
épinards	72%	28%	non significatif
haricots verts	78%	non significatif	22%
lentilles	60%	23%	17%
petits pois	40%	48%	12%

Dans le lait en poudre, produit complétement, une part non négligeable de l'acide pantothénique (environ 19 %) n'est pas sous forme libre ; elle est donc d'origine naturelle.

Aucune étude n'ayant jusqu'à présent été réalisée pour estimer la teneur d'acide pantothénique lié à des protéines ou dans l'ACP, les résultats trouvés ne peuvent pas être comparés à d'autres. Même si l'acide pantothénique lié à des protéines ou dans l'ACP est la forme minoritaire dans tous les aliments (pourcentage non significatif ou compris entre 5 et 22 %), cette teneur est toutefois non négligeable et devra donc être dosée pour quantifier la totalité de la vitamine B₅.

3.4.5. Les avantages de la méthode d'analyse chromatographique mise au point par rapport à ceux de la méthode microbiologique habituellement pratiquée

La sensibilité de la méthode microbiologique et celle de la méthode par chromatographie liquide proposée sont toutes les deux suffisamment élevées pour permettre le dosage de l'acide pantothénique dans les aliments. Les teneurs obtenues par les deux méthodes semblent par ailleurs être en assez bon accord. Les différences les plus importantes ont été observées pour le saumon (40 %) et les épinards (50 %) (voir tableau IX, p.67). Les analyses ont évidemment été réalisées sur des échantillons différents et Souci *et al.* (1994) n'ont donné qu'une valeur moyenne pour le saumon, sans indiquer de fourchette, ce qui peut expliquer les écarts observés. La répétabilité des

analyses est cependant bien meilleure avec la méthode CLHP, inférieure à 5 % dans la majorité des matrices alimentaires et inférieure à 10 % dans les matrices les plus pauvres en vitamine B₅. En utilisant la méthode microbiologique, il est habituel d'obtenir une répétabilité de l'ordre de 10 % - 15 %¹.

Sur le plan pratique, 48 h sont nécessaires pour appliquer l'ensemble du protocole chromatographique à 24 échantillons. Pour la méthode microbiologique, compte tenu de la longue préparation des échantillons (2 dilutions supplémentaires par rapport à la méthode CLHP et préparation de 5 tubes par échantillon pour le dosage) ainsi que de l'incubation de l'inoculum des échantillons pendant 24 h, 10 échantillons au maximum peuvent être analysés en 56 h. La méthode CLHP mise au point dans ce travail est donc nettement plus rapide que la méthode microbiologique.

Elle pourrait donc constituer une méthode de routine pour le dosage de la vitamine B₅ dans les aliments, en remplacement de la méthode de dosage microbiologique actuellement pratiquée.

¹ valeurs, non publiées, obtenues lors d'analyses interlaboratoires effectuées dans le cadre du programme de recherche ACTIA n° RA 01.08 intitulé « Dosage de vitamines du groupe B (B₅, B₁₂, carnitine, choline et inositol) dans les aliments par fluorimétrie après isolement chromatographique » et financé par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.

4. CONCLUSION

La méthode originale mise au point au cours de ce travail qui comporte une dérivation post-colonne de l'acide pantothénique en composé fluorescent, le 1-(carboxyéthyl)thio-2-(carboxyéthyl)isoindole constitue une approche tout à fait nouvelle du dosage de la vitamine B₅ dans l'aliment. Cette transformation a permis d'obtenir une détermination suffisamment sensible de l'acide pantothénique, isolé au préalable par chromatographie liquide, pour permettre son dosage dans n'importe quel aliment.

L'étape d'extraction proposée permet de plus de doser les différentes formes de la vitamine B₅ : acide pantothénique, CoA, formes liées à des protéines et/ou à l'ACP, ce qui est tout à fait nouveau. En absence de traitement enzymatique, cette méthode permet en effet d'obtenir la teneur en acide pantothénique libre. L'estimation de l'acide pantothénique lié dans le CoA peut être obtenue à la suite d'un traitement enzymatique par la phosphatase alcaline et la pantéthénase. Enfin, il a été montré au cours de ce travail qu'il était nécessaire, pour déterminer la totalité de la vitamine B₅, de procéder à un traitement préalable par la pepsine.

La méthode chromatographique ainsi élaborée – extraction enzymatique, purification sur cartouches échangeuses d'ions, isolement par CLHP en phase inverse, dérivation post-colonne de l'acide pantothénique en composé fluorescent et dosage par fluorimétrie – permet bien entendu un dosage global de la vitamine B₅ et peut constituer un protocole de routine pour le dosage de cette vitamine dans les aliments, en remplacement de la très ancienne et peu spécifique méthode microbiologique, encore couramment pratiquée jusqu'à aujourd'hui.

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANONYME (1997), **Pantothenic acid in vitamin preparations. Microbiological methods. Final action 1960.**, *AOAC Official Methods of Analysis*, Cunniff K. ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Gaithersburg.

BALL GFM (1998), **Pantothenic Acid**, p. 409-422, in *Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods*, Chapman & Hall ed., London.

BANNO K., HORIMOTO S. & MATSUOKA M. (1991), **Analytical studies on the chiral separation and simultaneous determination of pantothenic acid and hopantenic acid enantiomers in rat plasma by gas chromatography-mass fragmentography**, *J. Chromatogr.*, 564, 1-10.

BERGMANN F. (1952), **Colorimetric determination of amides as hydroxamic acids**, *Anal.Chem.*, 24, 1367-1369.

BLANCO M., COELLO J., ITURRIAGA H., MASPOCH S. & PAGES J. (1995), **FIA fluorimetric determination of calcium pantothenate. Validation and quantitation in multivitamin preparations**, *Anal. Lett.*, 28, 821-833.

BROWN G. (1959), **Assay and distribution of bound forms of pantothenic acid**, *J. Biol. Chem.*, 234, 379-382.

CROKAERT R. (1949), **Chemical determination of pantothenic acid**, *Bul. Soc. Chim. Biol.*, 31, 903-907.

DAVIDEK J., VELISEK J., CERNA J. & DAVIDEK T. (1985), **Gas chromatographic determination of pantothenic acid in foods**, *J. Micronutr. Anal.*, 1, 39-46.

DUPRÉ S., CHIARALUCE R., NARDINI M., CANNELLA C., RICCI G. & CAVALLINI D. (1984), **Continuous spectrophotometric assay of pantetheinase activity**, *Anal. Biochem.*, 142, 175-181.

DUPRÉ S., GRAZIANI M. T., ROSEI M. A., FABÍ A. & DEL GROSSO E. (1970), **The enzymatic breakdown of pantethine to pantothenic acid and cystamine**, *Eur. J. Biochem.*, 16, 571-578.

FISHER D. & SZULC M. (1997), **Reduction of pantethine in rabbit ocular lens homogenate**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 653-662.

GONTHIER A., BOULLANGER P., FAYOL V. & HARTMANN D. J. (1998 a), **Development of an ELISA for pantothenic acid (vitamin B₅) for application in the nutrition and biological fields**, *J. Immunoass.*, 19, 167-194.

GONTHIER A., FAYOL V., VIOLLET J. & HARTMANN D. J. (1998 b), **Determination of pantothenic acid in foods: influence of the extraction method**, *Food Chem.*, 63, 287-294.

HERRMANS-LOKKERBOL A., VAN DER HEIJDEN R. & VERPOORTE R. (1996), **Isocratic high-performance liquid chromatography of coenzyme A esters involved in the metabolism of 3S-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A. Detection of related enzyme activities in *Cantharanthus roseus* plant cell cultures**, *J. Chromatogr. A*, 752, 123-130.

KODAMA S., YAMAMOTO A. & MATSUNAGA A. (1998), **Direct chiral resolution of pantothenic acid using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in capillary electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, 811, 269-273.

LAHÉLY S. (1998), **Dosage de vitamines du groupe B (niacine, acide pantothénique, biotine et folates) dans les aliments après isolement chromatographique**, *Thèse, Université Louis Pasteur, Strasbourg*.

LAHÉLY S., BERGAENTZLE M. & HASSELMANN C. (1999), **Fluorimetric determination of niacin in foods by HPLC with post-column derivatization**, *Food Chem.*, 65, 129-133.

MAJERUS P.W., ALBERTS A.W. & VALEGOS P.R. (1965), **Acyl carrier protein. IV. The identification of 4'-phosphopantetheine as the prosthetic group of the acyl carrier protein**, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 53, 410-417.

MILLER J.C., 1993, **Comparison of the means of 2 samples**, p. 55-58, in *Statistics for analytical chemistry*, 3rd ed., E. Horwood Ltd., London.

MOLNAR-PERL I. (2001), **Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthalaldehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group containing additives**, *J. Chromatogr. A*, 913, 283-302.

MORRIS H., FINGLAS P., FAULKS R. & MORGAN M. (1988), **The development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of pantothenic acid and analogs. Part I. Production of antibodies and establishment of ELISA systems**, *J. Micronutr. Anal.*, 4, 33-45.

NOVELLI D., KAPLAN N. & LIPMANN F. (1949), **Liberation of pantothenic acid from coenzyme A**, *J. Biol. Chem.*, 177, 97-107.

NOVELLI D. & SCHMETZ F. (1951), **An improved method for the determination of pantothenic acid in tissues**, *J. Biol. Chem.*, 192, 181-185.

PROSSER A.R. & SHEPPARD A.J. (1971), **Gas-liquid chromatography (GLC) of trimethylsilyl derivatives of pantothenyl alcohol and pantothenates**, *J. Pharm. Sci.*, 60, 909-912.

ROMERA J.M., RAMIREZ M. & GIL A. (1996), **Determination of pantothenic acid in infant milk formulas by high performance liquid chromatography**, *J. Dairy Sci.*, 79, 523-526.

RYCHLIK M. (2000), **Quantification of free and bound pantothenic acid in foods and blood plasma by a stable isotope dilution assay**, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1175-1181.

RYCHLIK M. (2001), **Mass spectrometric studies of trimethylsilylpantothenic acid and related substances**, *J. Mass Spectrom.*, 36, 555-562.

- RYCHLIK M. (2003 a), **Pantothenic acid quantification by a stable isotope dilution assay based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, *Analyst*, 128, 832-837.
- RYCHLIK M. (2003 b), **Simultaneous analysis of folic acid and pantothenic acid in foods enriched with vitamins by stable isotope dilution assays**, *Anal. Chim. Acta*, 495, 133-141.
- RYCHLIK M. & FREISLEBEN A. (2002), **Quantification of pantothenic acid and folates by stable isotope dilution assays**, *J. Food Comp. Anal.*, 15, 399-409.
- SADECKA J., KARASOVA G. & POLONSKY J. (2003), **Determination of pantothenic acid in food by capillary isotachopheresis**, *Eur. Food Res. Technol.*, 216, 440-444.
- SCHREINER M., RAZZAZI E. & LUF W. (2003), **Determination of water-soluble vitamins in soft drinks and vitamin supplements using capillary electrophoresis**, *Nahrung / Food*, 47, 243-247.
- SKEGGS H. & WRIGHT L. (1944), **Use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid**, *J. Biol. Chem.*, 156, 21-26.
- SOUCI S.W., FACHMANN W. & KRAUT H. (1994), *Food Composition and Nutrition Tables*, 5th ed., CRC Press, Boca Raton and Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
- SZALKOWSKI C.R., MADER W.J. & FREDIANI H.A. (1951), **Chemical determination of calcium pantothenate**, *Cereal Chem.*, 20, 218-225.
- TANNER J., BARNETT S. & MOUNTFORD M. (1993), **Analysis of milk-based infant formula. Phase V. Vitamins A and E, folic acid, and pantothenic acid: Food and Drug Administration-Infant Formula Council: Collaborative study**, *J. AOAC Int.*, 76, 399-413.
- TESMER E., LEINERT J. & HOETZEL D. (1980), **Gas chromatographic determination of pantothenic acid in foods**, *Nahrung / Food*, 24, 697-704.
- WALSH J.H., WYSE B. & HANSEN G. (1979), **A comparison of microbiological and radioimmunoassay methods for the determination of pantothenic acid in foods**, *J. Food Biochem.*, 3, 175-189.
- WALSH J.H., WYSE B. & HANSEN G. (1981), **Pantothenic acid content of 75 processed and cooked foods**, *J. Am. Diet. Assoc.*, 78, 140-144.
- WOOLLARD D., INDYK H. & CHRISTIANSEN S. (2000), **The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC**, *Food Chem.*, 69, 201-208.
- WYSE B.W., SONG W.O., WALSH J.H. & HANSEN R.G. (1985), **Pantothenic acid**, p 399-416, in *Methods of Vitamin Assay*, Augustin J., Klein B.P., Becker D., Venugopal P.B. (eds). John Wiley & Sons, New York.

CHAPITRE 2

**Dosage de la vitamine B₁₂ dans les
aliments par couplage
chromatographie liquide - fluorimétrie
après transformation pré-colonne en
composé fluorescent**

1. INTRODUCTION

La vitamine B₁₂, ou cobalamine, peut exister naturellement sous forme d'hydroxocobalamine (ou aquocobalamine à pH < 8), de coenzyme B₁₂ et de méthylcobalamine. Ces différents composés sont présents dans les matrices alimentaires à l'état libre et/ou liés à des protéines. Dans les aliments complémentés, la vitamine B₁₂ est généralement ajoutée sous forme de cyanocobalamine. De structure complexe (Figure 47), cette vitamine possède en particulier un noyau corrine centré sur un atome de cobalt, un groupement chimique variable X lié à l'atome de cobalt et un nucléotide composé de phosphoribose et de 5,6-diméthylbenzimidazole.

Cette vitamine joue un rôle essentiel dans l'assimilation des acides aminés. Elle intervient également dans la synthèse de l'ADN, la formation des globules rouges et le fonctionnement du système nerveux. La vitamine B₁₂, stockée dans le foie, joue en effet un rôle important dans de nombreux processus enzymatiques. La méthylcobalamine est le coenzyme indispensable à la conversion de l'homocystéine en méthionine. C'est une réaction très importante car couplée à la transformation de l'acide 5-méthyltétrahydrofolique en acide tétrahydrofolique, composé qui participe ensuite à des réactions conduisant à la synthèse des acides nucléiques. Le coenzyme B₁₂ est le coenzyme qui permet la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA, molécule intervenant ensuite dans le cycle de Krebs (Ellenbogen, 1984, Scott, 1997).

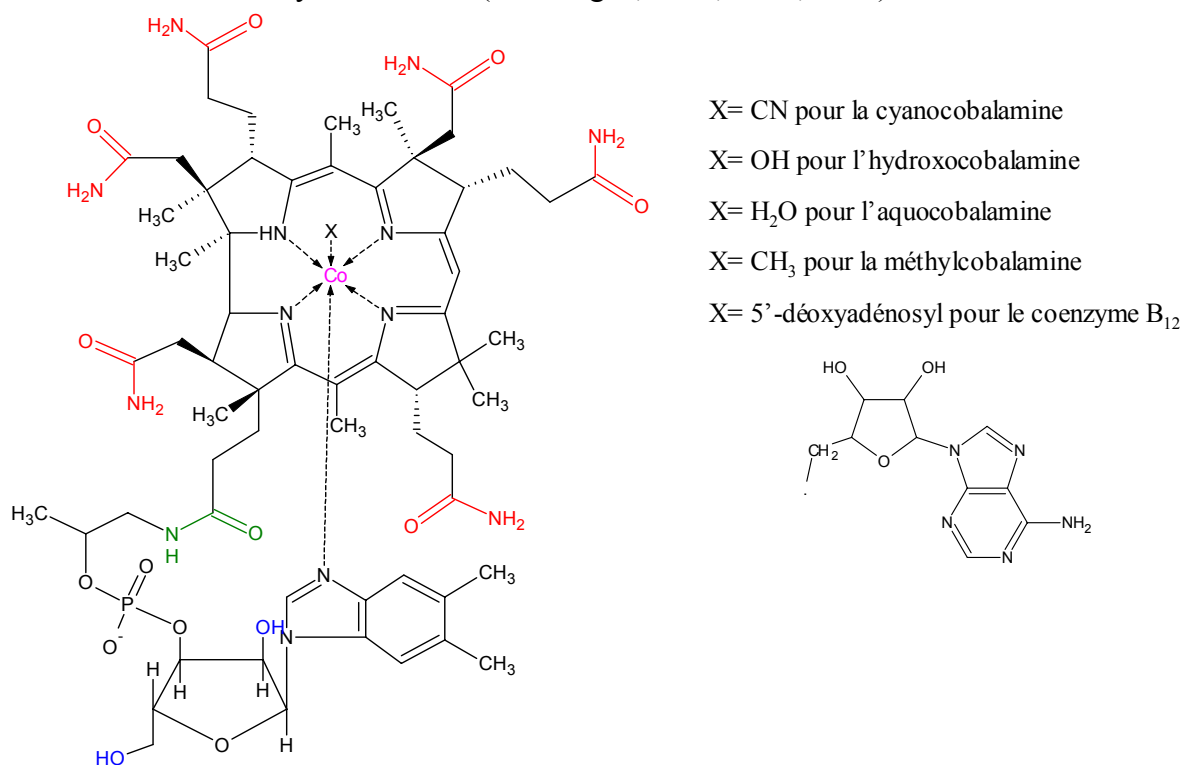


Figure 47. Structures chimiques des différentes cobalamines.

Une hypovitaminose entraîne des anomalies de la division cellulaire, tout particulièrement au niveau des cellules du sang avec risques d'anémie du fait de la difficulté de synthèse de l'ADN. Des troubles psychologiques et des inflammations de la peau et des muqueuses peuvent aussi se manifester. Il n'y aurait pas d'hypervitaminose. Pour un adulte, la prise recommandée est de 1 µg par jour.

La vitamine B₁₂ est présente exclusivement dans les viandes, les poissons et les produits laitiers. Les végétaux n'en contiennent donc pas. Les teneurs en vitamine B₁₂ sont très variables d'un aliment à l'autre : dans les aliments naturels, de 0,9 ng.g⁻¹ pour le yaourt à 650 ng.g⁻¹ pour le foie de porc (Tableau XI), dans les aliments complémentés, de 5 ng.g⁻¹ pour le lait vitaminé à 80 ng.g⁻¹ pour certaines préparations infantiles. Les teneurs en vitamine B₁₂ dans les aliments sont par ailleurs très nettement plus faibles que celles des autres vitamines du groupe B (Souci *et al.*, 1994). La détermination de la vitamine B₁₂ totale exige donc l'utilisation d'un mode de détection extrêmement sensible. Il existe de plus de nombreux composés analogues aux cobalamines qui ne sont pas métaboliquement actifs, mais qui peuvent interférer dans les dosages (Friedrich, 1975), ces molécules différant des cobalamines par la présence d'une base autre que le diméthylbenzimidazole. Le dosage de cette vitamine est donc complexe à mettre en oeuvre.

Tableau XI. Teneurs^a en vitamine B₁₂ de différents aliments (selon Souci *et al.*, 1994).

Aliment	Teneur (ng.g ⁻¹)
<i>Produits carnés</i>	
foie de bœuf	650,0
foie de porc	230-550
rognon de veau	140-400
gigot de mouton	30,0
filet de bœuf	20,0
lard	3,0-12,0
jambon	5,7-6,1
<i>Poissons, mollusques, crustacés</i>	
huître	146,0
maquereau	50,0-140
hareng	50,0-120
thon	37,0-48,0
saumon	28,9
crevette	7,3-17,1
cabillaud	4,5-12,8
<i>Produits laitiers</i>	
camembert (30% m.g.)	29,0-35,0
gruyère	20,0
œuf	8,4-31,3
fromage blanc maigre	7,5-10,0
lait entier	3,0-7,6
lait écrémé	3,0
yaourt	0,8-1,0

^a vraisemblablement obtenues par la méthode microbiologique (voir p.78)

Les protocoles d'extraction de la vitamine B₁₂ totale les plus couramment utilisés consistent en un autoclavage des échantillons en solution tamponnée [tampon acétate pH 4,5–4,8 (Watanabe *et al.*, 1998), tampon phosphate–citrate pH 4,5 (Indyk *et al.*, 2002) ou tampon phosphate–citrate pH 4,5 (Anon., 2000)]. Ces traitements ont pour objectifs de libérer les cobalamines liées aux protéines et de convertir les différentes formes de la vitamine en cyanocobalamine lorsque du cyanure de potassium a été ajouté (Watanabe *et al.*, 1998 ; Indyk *et al.*, 2002) ou en sulfitocobalamine en présence de métabisulfite de sodium (Anon., 2000). Une hydrolyse acide, dans le but de libérer l'atome de cobalt de la vitamine B₁₂, a également été préconisée par Song et Hou (2003). Les traitements enzymatiques restent peu pratiqués : utilisation de la papaïne par Shenoy et Ramasarma (1954) et de la pepsine contenue dans du jus gastrique par Kittang et Schjonsby (1987).

La détermination de la vitamine B₁₂ dans les aliments est le plus souvent réalisée par une méthode microbiologique utilisant *Lactobacillus leishmannii*, avec une détection turbidimétrique (Anon., 2000), la croissance de ce microorganisme étant proportionnelle à la quantité de vitamine B₁₂ présente dans le milieu de culture. Bien que cette méthode soit sensible et puisse s'appliquer directement aux échantillons alimentaires, elle est longue, fastidieuse et sa précision est relativement faible. La croissance du microorganisme peut de plus être stimulée non seulement par la vitamine B₁₂, mais aussi par des composés inactifs analogues aux cobalamines, ce qui rend ce dosage peu spécifique (Ball, 1998).

La dilution radioisotopique est une méthode simple et rapide, basée sur la très grande affinité de la vitamine B₁₂ pour une protéine appelée facteur intrinsèque (Smith, 1965). Cette méthode a été appliquée à différents aliments (Casey *et al.*, 1982 ; Muhammad *et al.*, 1993). Le principe est de mettre en compétition de la cyanocobalamine issue de l'échantillon et de la cyanocobalamine étalon radio-marquée. La dilution de la cyanocobalamine radioactive par les cobalamines non marquées permet de calculer la concentration de la vitamine B₁₂ extraite du milieu. Cette méthode est toutefois onéreuse et nécessite l'utilisation d'un facteur intrinsèque très pur. Une préparation de cette protéine insuffisamment purifiée peut en effet contenir, en plus du facteur intrinsèque, des protéines capables de fixer des composés analogues aux cobalamines, ce qui peut fausser le dosage (Ellenbogen, 1984).

Une méthode basée sur l'interaction d'un biocapteur avec l'analyte (protein binding assay) et associée à une détection par spectroscopie de résonance de plasmons de surface a été récemment mise au point pour le dosage de la vitamine B₁₂ dans des matrices alimentaires comme le lait et des produits carnés (Indyk *et al.*, 2002). Le biocapteur utilisé était le facteur non-intrinsèque,

également appelé protéine R. Même si la concentration minimale quantifiable dans l'aliment s'est avérée très bonne (2 ng.g^{-1}), cette méthode onéreuse dose malheureusement l'ensemble des cobalamines, que celles-ci soient actives ou inactives.

La méthode la plus fréquemment utilisée pour le dosage de la vitamine B₁₂ dans les matrices alimentaires complémentées (donc à teneurs vitaminiques élevées) fait appel à la chromatographie liquide haute performance (CLHP), celle-ci permettant la séparation des différentes cobalamines et de leurs analogues inactifs. Le mode de détection le plus couramment employé est la photométrie par absorption UV-visible à 360 nm (Adjalla *et al.*, 1994 ; Albala-Hurtado *et al.*, 1997). Il est cependant peu spécifique et généralement pas assez sensible pour quantifier la vitamine B₁₂ dans les aliments non complémentés. Des modes de détection plus spécifiques, basés sur le dosage de l'atome de cobalt [spectrométrie par absorption atomique (SAA) (Vinas *et al.*, 1996) ou spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES) (Morita *et al.*, 1980)], ont également été utilisés. Les concentrations minimales quantifiables (de l'ordre de $150 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) rendent cependant ces détecteurs tout à fait inappropriés pour le dosage de la vitamine B₁₂ dans les aliments. Des teneurs minimales quantifiables plus basses ont été obtenues en utilisant un spectromètre de masse (ICP-MS) couplé à un appareil d'électrophorèse capillaire (environ 1500 ng.g^{-1} , Baker et Miller-Ihli, 2000) ou de chromatographie liquide (600 ng.g^{-1} , Chassaigne et Lobinski, 1998). Elles seraient cependant tout juste suffisantes pour l'analyse de matrices non complémentées très riches en vitamine B₁₂ (échantillon de foie).

Un mode de détection plus sensible, par fluorimétrie par exemple, serait donc sans doute indispensable à mettre en oeuvre pour effectuer l'analyse de matrices alimentaires. Comme la vitamine B₁₂ n'est pas naturellement fluorescente, contrairement à ce qui a été indiqué par Li *et al.* (2000), il serait alors nécessaire de procéder à une transformation de la vitamine pour obtenir un composé fluorescent. Des dérivés fluorescents de la vitamine B₁₂ ont bien été synthétisés par Smeltzer *et al.* (2001), tout d'abord en faisant réagir un espaceur (chloropropylamine) sur l'atome de cobalt de la forme réduite de la vitamine B₁₂, puis en greffant un fluorophore (carboxynaphthofluorescéine) sur cet espaceur. Ces dérivés n'ont cependant encore jamais été utilisés pour le dosage de la vitamine B₁₂, vraisemblablement parce que leur synthèse est difficilement réalisable dans un échantillon alimentaire.

L'objectif de ce travail a été, dans un premier temps, de proposer, comme cela devrait s'avérer nécessaire, un mode de transformation pré-colonne de la vitamine B₁₂ en composé fluorescent. Pour cela, trois approches ont été successivement envisagées : le greffage direct d'un fluorophore sur la vitamine, la réduction de l'atome de cobalt et le greffage d'un fluorophore sur cet atome, une hydrolyse acide ou basique afin d'obtenir éventuellement un fragment fluorescent

de cette molécule. Dans un deuxième temps, les travaux réalisés ont eu pour but de concevoir une méthode complète, spécifique et sensible de dosage par CLHP / fluorimétrie de la vitamine B₁₂ libre et liée dans une grande variété d'aliments. Cette méthode devra donc nécessairement comporter une extraction enzymatique pour libérer les vitamines liés aux protéines, une éventuelle transformation des différentes formes de la vitamine B₁₂ en cyanocobalamine (dans l'hypothèse d'un greffage direct d'un fluorophore), très vraisemblablement une étape de purification de l'extrait alimentaire, une transformation pré-colonne du vitamine en composé fluorescent, et enfin une séparation et un dosage du composé obtenu par CLHP-fluorimétrie.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. LES COMPOSES CHIMIQUES

2.1.1. Les vitamines

La cyanocobalamine, l'hydroxocobalamine, la méthylcobalamine et le coenzyme B₁₂ ont été fournis par Sigma. Les solutions-mères (dans l'eau distillée) des différents vitamères ont été conservées à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation. Les solutions de coenzyme B₁₂ et de méthylcobalamine doivent être protégées de la lumière afin d'éviter leur conversion en hydroxocobalamine. Les solutions utilisées pour l'étalonnage ont été préparées à partir de solutions-mères de cyanocobalamine et d'hydroxocobalamine à environ 1 g.l⁻¹ et diluées avec de l'eau distillée.

2.1.2. Les enzymes

Les enzymes utilisées ont été la pepsine EC 3.4.23.1 (Sigma, P 7125) et la phosphatase alcaline EC 3.1.3.1 (Sigma, P6772) [poudre lyophilisée extraite de la muqueuse intestinale de veau].

2.1.3. Les autres composés chimiques

La liste des différents composés chimiques utilisés est la suivante : acétate de sodium anhydre (Riedel-de-Haën), acide acétique (Prolabo), acide bromhydrique (Aldrich), acide chlorhydrique (BDH), acide 3-mercaptopropionique (Sigma), acide orthophosphorique (Merck), affigel 10 (Biorad), 6-amino-1-hexanol (Aldrich), 1-amino-2-propanol (Aldrich), bromo-1-dodécanol (Aldrich), bromopropylamine (Aldrich), bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTA) (Aldrich), dihydrogénophosphate de sodium (Aldrich), dithioérythritol (Sigma), éthanolamine (Sigma), facteur intrinsèque (Sigma), 9-fluorénylméthylchloroformate (FMOC) (Sigma), hydrazine monohydratée (Sigma), hydrogénocarbonate de sodium (Sigma), hydroxyde de potassium (Merck), hydroxyde de sodium (BDH), hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAH) (Aldrich), iodométhane (Sigma), 2-mercaptoéthanol (Merck), monohydrogénophosphate de sodium (Sigma), ortho-phtaldialdéhyde (OPA) (Sigma), phénol (Merck), phtalimide de potassium

(Sigma), tétraborate disodique décahydraté (Merck) et Tris base (Sigma). Tous ces composés sont de la plus grande pureté disponible commercialement.

Les réactifs préparés à partir de ces composés chimiques ont été mis en solution dans l'eau distillée ultrapure (Milli-Qplus) aux concentrations indiquées dans le texte lors de leur usage. Les solutions d'OPA ont été préparées dans du méthanol, et celles de FMOC dans l'acétone.

La solution de *tampon acétate 50 mM (pH 4)* a été préparée en dissolvant 4,1 g d'acétate de sodium dans 1 L d'eau distillée après avoir ajusté le pH à 4 avec une solution d'acide acétique glacial.

La solution de *tampon phosphate 100 mM (pH 7)* a été préparée en dissolvant 0,69 g de dihydrogénophosphate de sodium et 0,71 g de monohydrogénophosphate de sodium dans 100 ml d'eau distillée.

La solution de *tampon Tris 300 mM (pH 8)* a été préparée en dissolvant 3,6 g de Tris base dans 100 ml d'eau distillée après avoir ajusté le pH à 8 avec une solution d'acide chlorhydrique 5 M.

Les solvants organiques utilisés ont été : l'acétonitrile (Riedel-de-Haën pour analyses), le dichlorométhane (Carlo Erba pour analyses, Val-de-Reuil, France), le méthanol (Prolabo pour CLHP), l'acétone (Prolabo), le diméthylformamide (DMF) (Fluka), l'acétate d'éthyle (Prolabo), le diéthyl éther (Merck) et l'éthanol (Carlo Erba).

La bromohexylamine a été obtenue selon le protocole proposé par Minin et Walton (2003). Un g d' amino-1-hexanol a été mélangé à 25 ml d'acide bromhydrique. Le mélange réactionnel a été chauffé à reflux pendant 6h. Le produit a ensuite été séché sous pression réduite. Ces auteurs ne préconisaient aucune purification particulière, mais il s'est avéré par la suite que ce produit contenait de nombreuses impuretés.

La bromododécylamine a été synthétisée à partir du bromododécanol, selon les protocoles de Niwa *et al.* (2002) et de Lee *et al.* (1995). Vingt-cinq ml de DMF ont été ajoutés à 1,25 g de bromo-1-dodécanol et à 1,20 g de phtalimide de potassium. Le mélange réactionnel a été chauffé à 60°C pendant 3h. Le précipité de KBr a été filtré sur verre fritté et lavé avec du diéthyl éther. Les phases organiques (diéthyl éther et DMF) ont été rassemblées et évaporées sous pression réduite (à l'aide d'une pompe à palettes) en chauffant à 40°C. Le solide blanc récupéré a été lavé 5 fois successivement avec environ 25 ml d'une solution de KOH 0,2 M. Il a ensuite été remis à sécher : 1,290 g de phtalimidododécanol a été obtenu. Trente mg de ce produit ont été mis de côté pour une analyse RMN. Le reste (1,260 g) a été mélangé à 40 ml d'éthanol et à 0,7 ml d'hydrazine monohydratée. Le mélange réactionnel a été chauffé à reflux (85°C) pendant 1h. Le précipité de

phtalhydrazide formé a été filtré et lavé à l'éthanol. Toutes les phases éthanoliques ont été rassemblées et séchées sous pression réduite (à l'aide d'une pompe à palettes) en chauffant à 40°C. Le solide blanc récupéré a été lavé 5 fois successivement avec environ 20 ml d'une solution de KOH 2 M, puis avec environ 20 ml d'eau distillée. Après séchage, 610 mg d'aminododécanol ont été obtenus. Dix ml d'acide bromhydrique ont été ensuite ajoutés. Le mélange réactionnel a été chauffé à reflux pendant une nuit. Après évaporation à sec et recristallisation dans l'acétate d'éthyle, un solide de couleur beige a été mis à sécher : 620 mg de bromododécylamine ont finalement été obtenus (rendement global de 60 %).

2.1.4. La préparation des échantillons alimentaires

Les aliments étudiés (foie de porc, œufs frais, filet de boeuf, saumon et maquereau frais, lait en poudre) ont été achetés localement. A l'exception du lait en poudre et des œufs frais, les aliments ont été conservés à l'état congelé jusqu'au moment de leur analyse. Les aliments solides ont été finement broyés avant de procéder à l'extraction. Les œufs entiers frais ont été battus dans un bécher juste avant leur analyse. Les prises d'essai utilisées [2 g pour le lait en poudre ; 5 g pour le foie de porc et le maquereau ; 7 g pour le saumon et le filet de bœuf ; 8 g pour l'œuf] ont été choisies en tenant compte de l'estimation de la teneur en vitamine B₁₂ dans ces aliments (voir tableau XI, p.76).

2.2. LES PROTOCOLES D'EXTRACTION

2.2.1. L'extraction de la vitamine B₁₂ libre

L'échantillon a été pesé dans un flacon de 100ml. Vingt-cinq ml d'eau distillée ont été ajoutés. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 5 min. Il a été ensuite transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml, ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée et centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. Le surnageant a été filtré sur membrane d'acétate de cellulose (0,45 µm) avant d'être purifié.

2.2.2. L'extraction enzymatique de la vitamine B₁₂ totale

L'échantillon a été pesé dans un flacon de 100 ml. Vingt-cinq ml de tampon acétate 50 mM (pH 4,0) et 2 ml d'une solution de pepsine [50 mg.ml⁻¹ (4500 U.ml⁻¹)] ont été ajoutés. Le mélange

a été mis à incuber à 37°C pendant 3 h. Le pH du mélange a ensuite été ajusté à 7 avec une solution d'hydroxyde de sodium 5 M. L'extrait a alors été transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml, ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée et centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. Le surnageant a été filtré sur membrane d'acétate de cellulose (0,45 µm) avant d'être purifié.

2.3. LA PURIFICATION DES EXTRAITS PAR PASSAGE SUR UNE COLONNE D'IMMUNOAFFINITE

Un certain volume de l'extrait obtenu précédemment (§ 2.2.1 ou 2.2.2) (0,5 ml pour le maquereau, 3 ml pour le lait en poudre et 1 ml pour le foie de porc, le filet de bœuf, le saumon et l'œuf) a été passé sur une colonne d'immunoaffinité, composée d'un gel sur lequel a été fixé un anticorps de la vitamine B₁₂ (R-Biopharm, Saint-Didier au Mont d'Or, France), préalablement conditionnée par passage de 5 ml d'eau distillée et de 5 ml de tampon phosphate 100 mM (pH 7). La colonne a ensuite été lavée avec 10 ml de tampon phosphate 100 mM (pH 7) et 5 ml d'eau distillée, puis séchée en lui faisant passer dessus 10 ml d'air à l'aide d'une seringue. La vitamine B₁₂ a ensuite été éluée avec 3 ml de méthanol. L'éluat a été évaporé à sec sous azote.

2.4. LA LIBERATION DU PHOSPHATE DE RIBAZOLE ET DU RIBAZOLE

Pour les essais effectués sur des solutions étalons, 500 µl de cyanocobalamine ou d'hydroxocobalamine à différentes concentrations (de 1,2 à 90 ng.ml⁻¹) a été ajouté à 500 µl d'une solution d'hydroxyde de sodium 5 M.

Pour l'analyse des matrices alimentaires, 500 µl d'eau et 500 µl d'une solution d'hydroxyde de sodium 5 M ont été ajoutés à l'extrait sec purifié obtenu précédemment (§ 2.3).

La solution ainsi obtenue (à partir des solutions étalons ou d'échantillons alimentaires) a été mise au bain-marie à 100°C pendant 15 min (obtention du phosphate de ribazole). Une fois le mélange refroidi, l'hydroxyde de sodium a été neutralisée par ajout de 500 µl d'une solution d'acide chlorhydrique 5 M. Du tampon Tris 300 mM (pH 8) (1,5 ml) contenant 7,5 unités de phosphatase alcaline a été ajouté. Le mélange, d'un volume final de 3 ml, a été mis à incuber 16 h à 37°C, afin d'hydrolyser le phosphate de ribazole en ribazole. Le mélange réactionnel ainsi obtenu a été filtré sur membrane d'acétate de cellulose (0,45 µm) avant d'être analysé par CLHP.

Les solutions étalons de ribazole doivent être préparées chaque jour et être utilisées dans les 24 h suivant leur préparation.

2.5. L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

2.5.1. L'appareillage

Le système CLHP utilisé était constitué d'un distributeur de solvants 9012 (Varian), d'un injecteur 9300 (Varian), d'un détecteur spectrophotométrique à barrette de diodes modèle 330 (Varian), d'un détecteur fluorimétrique modèle 363 (Varian) et d'un logiciel d'intégration Star chromatography. La colonne utilisée [Lichrospher 100 RP 18 e, 4 mm * 250 mm, granulométrie 5 µm (Merck)] avait pour phase stationnaire de l'octadécylsilane et était précédée d'une précolonne de même phase stationnaire (4 mm* 4 mm, granulométrie 5 µm, Merck).

Les longueurs d'onde du détecteur fluorimétrique ont été fixées à 250 nm pour l'excitation et à 312 nm pour l'émission.

2.5.2. Les conditions chromatographiques

La phase mobile utilisée a été un gradient eau-méthanol. L'éluant de départ était un mélange eau-méthanol [60/40 (v/v)]. La proportion de méthanol a ensuite été augmentée linéairement de 40 à 80 % en 20 min, la composition finale [20/80 (v/v)] étant maintenue pendant 10 min. La phase mobile a ensuite été ramenée immédiatement à sa composition initiale [60/40 (v/v)]. Le débit de la phase mobile a été de 1 ml.min⁻¹ et le volume d'injection de 100 µl.

2.6. L'EXPRESSION DES RESULTATS

Le dosage de la vitamine B₁₂ présente dans les aliments a été effectué par étalonnage externe. Des dilutions de la solution-mère de cyanocobalamine (1 g.l⁻¹) ont été réalisées dans de l'eau distillée, puis hydrolysées (hydroxyde de sodium, puis phosphatase alcaline) de façon à obtenir des solutions étalons de ribazole de concentrations comprises entre 0,15 et 15 ng.ml⁻¹ (en équivalent cyanocobalamine).

La concentration C en vitamine B₁₂ (exprimée en équivalent cyanocobalamine) présente dans l'aliment analysé (en ng.g⁻¹) est donnée par la formule (7) :

$$C = 150 \frac{X}{m.V} \quad (7)$$

dans laquelle X est la concentration de cyanocobalamine (exprimée en ng.ml^{-1}) dans la solution analysée, V le volume d'extrait déposé sur la colonne d'immunoaffinité (en ml) et m la masse de la prise d'essai (en g).

La détermination du taux de recouvrement de vitamine B₁₂ et l'analyse statistique des résultats ont été réalisées de la même façon que pour la vitamine B₅ (voir chapitre 1, § 2.5.1 et 2.5.2, p.18).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. LES LIMITES DU DOSAGE DE LA VITAMINE B₁₂ PAR CLHP/UV

La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par absorption UV ($\lambda=360$ nm) a été utilisée pour le dosage de la vitamine B₁₂ dans des produits complémentés, comme les laits infantiles (Albala-Hurtado *et al.*, 1997) ou les tablettes multivitaminées (Wongyai, 2000). Une préconcentration de l'échantillon sur des cartouches C₁₈ a permis à Iwase et Ono (1997) d'obtenir une bonne concentration minimale quantifiable (22 ng.g⁻¹). Cette méthode, avec une élimination précolonne des composés lipophiles, a été appliquée à différentes matrices alimentaires (huile, mayonnaise).

La forme très majoritaire de la vitamine B₁₂ dans ces aliments complémentés étant la cyanocobalamine, une élution isocratique [tampon phosphate pH 3 - acétonitrile 94 : 6 (v/v) ou tampon phosphate pH 3,6 - méthanol 85 :15 (v/v)] s'est avérée suffisante pour obtenir un bon isolement chromatographique. En fait, seuls Adjalla *et al.* (1994) se sont intéressés à la séparation chromatographique des différents vitamères de la vitamine B₁₂ dans du lait et du plasma. La phase mobile alors utilisée était un gradient tampon phosphate - acétonitrile.

3.1.1. La séparation des différentes cobalamines

Avant de procéder à la séparation chromatographique des différents vitamères, il a été procédé à des essais préliminaires sur la seule cyanocobalamine.

En effectuant une élution isocratique [tampon phosphate 33 mM (pH 3) - acétonitrile 90 :10 (v/v)] avec un débit de 1 ml.min⁻¹ (Iwase et Ono, 1997), il a été observé que le pic chromatographique de la cyanocobalamine était très étalé. En augmentant le pourcentage d'acétonitrile de 10 à 15 %, l'efficacité de la colonne a certes été légèrement augmentée, mais l'élution a alors été trop rapide (k' très faible) (Tableau XII).

Le but de ce travail étant de pouvoir doser la vitamine B₁₂ dans des matrices alimentaires complexes, la proposition d'une élution isocratique n'est donc pas apparue judicieuse.

Tableau XII. Evolution du temps de rétention de la cyanocobalamine et du nombre de plateaux théoriques de la colonne en fonction du pourcentage d'acétonitrile (ACN) dans la phase mobile à base de tampon phosphate 33 mM (pH 3).

conditions chromatographiques	t_R (min)	t_0 (min)	k'	w (min)	N
tampon phosphate-ACN 90:10 (1 ml.min ⁻¹)	15,25	2,80	4,45	5,7	100
tampon phosphate-ACN 87:13 (1 ml.min ⁻¹)	5,85	2,80	1,09	0,61	1 500
tampon phosphate-ACN 85:15 (1 ml.min ⁻¹)	4,33	2,80	0,55	0,41	1 800
gradient linéaire tampon phosphate-ACN (0,5 ml.min ⁻¹)	19,82	5,65	2,51	0,32	59 500
gradient linéaire tampon phosphate-ACN (1 ml.min ⁻¹)	11,16	2,40	3,65	0,22	40 400

t_R : temps de rétention (min)

t_0 : temps de rétention nulle (min)

$k'=(t_R-t_0)/t_0$: facteur de rétention

w : largeur du pic à la base (min)

$N=16 (t_R/w)^2$: nombre de plateaux théoriques

La mise en œuvre du gradient linéaire proposé par Adjalla *et al.* (1994), avec une variation du taux d'acétonitrile de 10 à 50 % en 35 min et un débit de 0,5 ml.min⁻¹, a donné de bien meilleurs résultats (Tableau XII). Une augmentation du débit à 1 ml.min⁻¹, la variation du taux d'acétonitrile de 10 à 50 % s'effectuant maintenant en 20 min, n'a entraîné qu'une très légère diminution de l'efficacité de la colonne.

Pour parvenir à séparer les 4 formes de la vitamine B₁₂ (cyanocobalamine, hydroxocobalamine, coenzyme B₁₂, méthylcobalamine), la phase mobile finalement retenue, inspirée de celle utilisée par Adjalla *et al.*, a été un gradient acétonitrile - tampon phosphate 33 mM (pH 3). L'éluant de départ était un mélange tampon phosphate - acétonitrile [90/10 (v/v)]. La proportion d'acétonitrile a ensuite été augmentée linéairement de 10 à 50 % en 20 min. La phase mobile a alors été ramenée immédiatement à sa composition initiale (tampon phosphate - acétonitrile [90/10 (v/v)]). L'augmentation du débit à 1 ml.min⁻¹ (le débit proposé par Adjalla *et al.* était de 0,5 ml.min⁻¹) a donc permis de diminuer la durée d'analyse, tout en gardant une très bonne efficacité de la colonne.

Un mélange étalon, préparé à l'abri de la lumière, a été composé de cyanocobalamine, d'hydroxocobalamine, de coenzyme B₁₂ et de méthylcobalamine. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 48, avec indication du spectre d'absorption UV-visible de chacun des vitamères isolés.

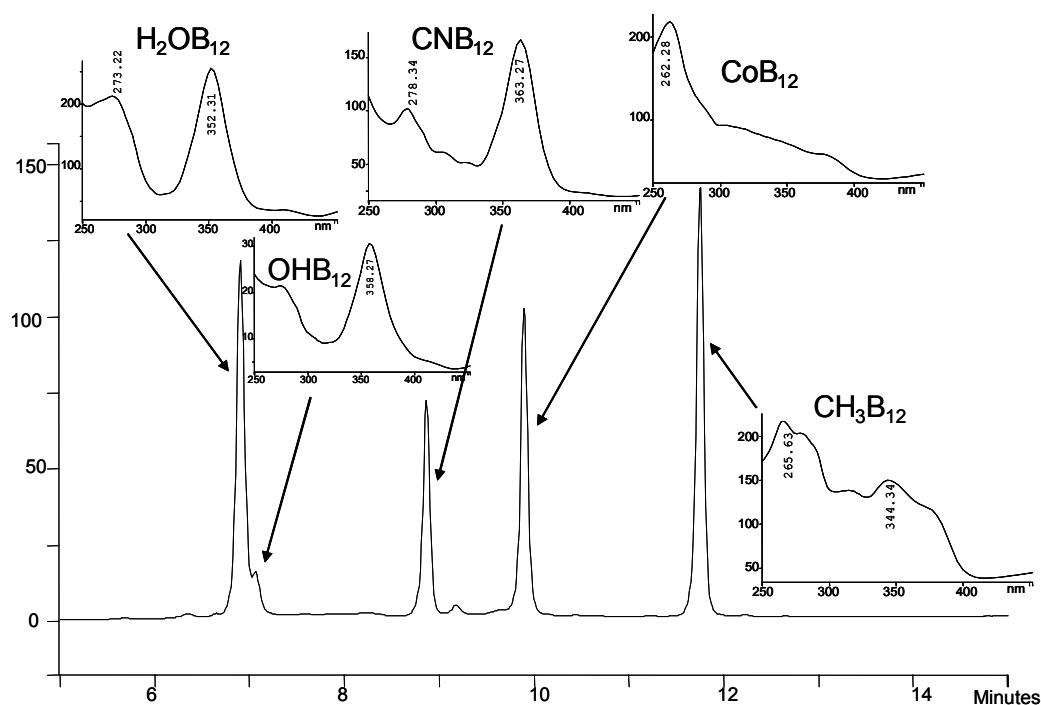


Figure 48. Chromatogramme d'une solution étalon des 4 formes de la vitamine B₁₂ ($\lambda=360$ nm) avec indication de leurs spectres d'absorption UV-visible [analyse de 2,25 μ g de OHB₁₂ (hydroxocobalamine), de 1,12 μ g de CNB₁₂ (cyanocobalamine), de 2,72 μ g de CoB₁₂ (coenzyme B₁₂) et de 2,28 μ g de CH₃B₁₂ (méthylcobalamine)].

Les 4 vitamères ont été séparés avec une très bonne résolution. L'hydroxocobalamine s'est cependant transformée presque intégralement en aquocobalamine au contact de la phase mobile (pH 3).

En fait, l'hydroxocobalamine est en équilibre avec l'aquocobalamine et cet équilibre acido-basique ($pK_a=8$) va se déplacer avec le pH de la solution. Le mélange analysé ne contenait initialement que de l'hydroxocobalamine, mais au contact du tampon phosphate (pH 3) de la phase mobile, l'hydroxocobalamine s'est très largement transformée en aquocobalamine. Pour obtenir uniquement de l'hydroxocobalamine, le pH de la phase mobile devrait être supérieur à 9, ce qui est impossible à réaliser car la colonne chromatographique utilisée ne supporte pas un tel pH. Il est beaucoup plus aisé de n'obtenir que de l'aquocobalamine en acidifiant la solution à analyser à un pH inférieur à 6 avant l'injection afin de convertir l'hydroxocobalamine en aquocobalamine avant injection et en ajustant le pH de la phase mobile à 3.

3.1.2. La limite de quantification et la spécificité du dispositif d'analyse

Un étalonnage a été effectué avec des solutions étalons de cyanocobalamine dont les concentrations variaient de 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ à 4,0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. La courbe d'étalonnage (évolution de l'aire du pic chromatographique en fonction de la concentration en cyanocobalamine), obtenue après régression linéaire des points expérimentaux, présentait une bonne linéarité (coefficient de régression de 0,99) (Figure 49).

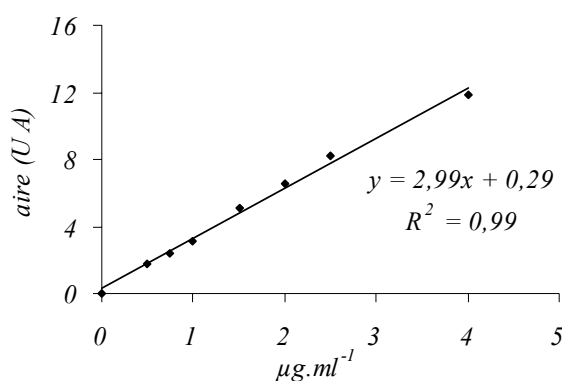


Figure 49. Courbe d'étalonnage pour le dosage de la cyanocobalamine (détection par photométrie à $\lambda=360$ nm).

La limite de quantification obtenue en utilisant un détecteur par absorption UV-visible ($\lambda=360$ nm) a été de 15 ng, soit, si on considère un volume d'injection de 20 μl et une prise d'essai de 5 g d'échantillon alimentaire préalablement diluée dans 50 ml, une teneur minimale quantifiable dans l'aliment de 7500 ng.g^{-1} . Il serait cependant possible d'augmenter le volume d'injection jusqu'à 100 μl sans saturer la colonne d'impuretés, ce qui permettrait d'abaisser la teneur minimale quantifiable dans l'aliment¹ à 1500 ng.g^{-1} . Cette limite est encore toutefois beaucoup trop élevée pour permettre le dosage de la vitamine B₁₂ dans l'un quelconque des aliments non supplémentés présentés dans le tableau XI (p.76). Comme, par ailleurs, la cyanocobalamine est le vitamère ayant le coefficient d'absorption le plus élevé, quelle que soit la longueur d'onde choisie ($\epsilon=27700$ $\text{mol}^{-1}.\text{l.cm}^{-1}$ à $\lambda=360$ nm), la limite de quantification obtenue en procédant au dosage d'une autre forme de la vitamine B₁₂ serait donc encore moins bonne que celle obtenue pour la cyanocobalamine. Le dosage de la vitamine B₁₂ par CLHP/UV, comme cela était prévisible, ne pourra donc *a priori* s'appliquer à aucun aliment non supplémenté.

¹ Dans toute la suite de cette étude, sauf indication particulière, les conditions retenues pour calculer la concentration minimale quantifiable dans une matrice alimentaire ont été les suivantes : un volume d'injection de 100 μl et une prise d'essai de 5 g d'échantillon diluée dans 50 ml d'eau distillée.

Des essais de dosage par CLHP/UV ($\lambda=360$ nm) ont néanmoins été réalisés sur des échantillons de foie de porc, mais aussi sur des gélules multivitaminées (Juvamine), très riches en vitamine B₁₂. Les teneurs attendues dans les gélules multivitaminées étaient de 3,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (exprimées en cyanocobalamine), mais seulement de 0,65 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (hydroxocobalamine, coenzyme B₁₂ et méthylcobalamine) dans le foie de porc.

Le volume d'échantillon analysé par chromatographie étant de 100 μl (et donc la concentration minimale quantifiable de 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), la teneur attendue dans le foie de porc était en dessous de la teneur minimale quantifiable. Aucune forme naturelle de la vitamine B₁₂ n'a effectivement pu être identifiée dans cet aliment, sans doute en raison d'une sensibilité insuffisante, mais cela n'a pu être prouvé du fait de la présence de très nombreux pics d'impuretés dans le chromatogramme.

Les gélules multivitaminées étaient quant à elles supposées avoir une teneur en cyanocobalamine légèrement supérieure à la teneur minimale quantifiable (avec un volume d'injection de 100 μl). Le pic de cyanocobalamine a effectivement pu être identifié dans le chromatogramme (Figure 50), après avoir effectué un ajout de cyanocobalamine dans l'échantillon. Une quantification a été réalisée, en dépit de la présence de pics interférents, mais le résultat n'a conduit qu'à l'obtention d'un ordre de grandeur de la teneur réelle des gélules : 2,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ au lieu des 3,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

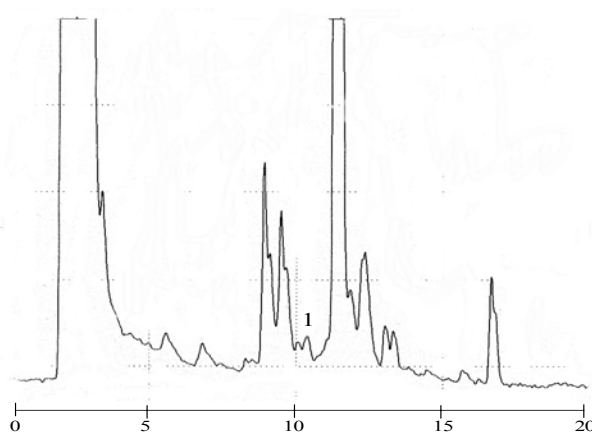


Figure 50. Chromatogramme de l'échantillon de gélules de Juvamine (1 : cyanocobalamine).

En plus de sa faible sensibilité, la détection par absorption UV n'apparaît donc pas assez sélective. La méthode par CLHP/UV ne semble donc pouvoir être utilisée, à la rigueur, que dans quelques cas particuliers (mélange multivitaminé simple), mais en aucun cas pour l'analyse d'échantillons alimentaires. Il apparaît donc indispensable de proposer un mode de détection plus sélectif et plus sensible, puisque l'objectif de l'étude est le dosage de la vitamine B₁₂ dans les aliments non supplémentés. Une purification préalable des échantillons alimentaires avant l'analyse chromatographique sera elle aussi, sans aucun doute, indispensable.

3.2. LE CHOIX D'UN MODE DE DETECTION PLUS SENSIBLE

La détection par spectrométrie de masse permet d'obtenir une meilleure concentration minimale quantifiable (600 ng.g^{-1} obtenu par Chassaing et Lobinski, 1998) que la détection par absorption UV-visible (1500 ng.g^{-1}), comme cela a déjà été précisé ci-dessus. La sensibilité de ce mode de détection reste cependant insuffisante puisque la teneur en vitamine B₁₂ est inférieure à 100 ng.g^{-1} dans la majorité des aliments.

Selon Li et Chen (2000), la cyanocobalamine serait une molécule fluorescente. Ces auteurs ont ainsi proposé une méthode de dosage de cette vitamine par CLHP/fluorimétrie dans des cachets multivitaminés et des milieux de fermentation ($\lambda_{\text{ex}}=275 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}}=305 \text{ nm}$). Le tracé du spectre d'absorption UV-visible de la cyanocobalamine (Figure 51) montre cependant, sans ambiguïté, que le composé fluorescent isolé par ces auteurs et utilisé pour le dosage de la vitamine B₁₂ ne peut être de la cyanocobalamine. Il a par ailleurs été vérifié, à l'aide d'une solution étalon de cyanocobalamine, que ce vitamère n'émettait effectivement aucune fluorescence, quelles que soient les longueurs d'onde d'excitation et d'émission choisies et que son temps de rétention chromatographique (détection par absorption UV) ne correspondait pas à celui indiqué par Li *et al.* (2000). En fait, il est fort probable que le produit fluorescent détecté par ces auteurs n'était qu'une impureté provenant du milieu de synthèse (par fermentation) utilisé pour la fabrication industrielle de la cyanocobalamine. Comme Li *et al.* n'ont analysé que la vitamine B₁₂ présente dans des milieux de fermentation ou des cachets multivitaminés dans lesquels de la cyanocobalamine de synthèse avait été ajoutée, ils ont vraisemblablement retrouvé à chaque fois cette impureté dont la concentration était nécessairement proportionnelle à celle de la cyanocobalamine.

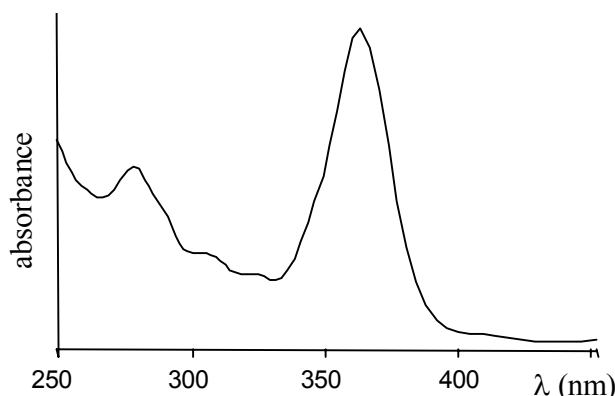


Figure 51. Spectre d'absorption UV-visible de la cyanocobalamine.

Pour recourir à une détection fluorimétrique, il est donc nécessaire de réaliser une modification de la structure chimique de cette vitamine. La solution tout d'abord envisagée et apparemment la plus simple, même si elle implique une séparation chromatographique des

différents vitamères ou leur transformation préalable en cyanocobalamine, parfaitement réalisable selon Adjalla *et al.* (1993), a été d'essayer de greffer, directement ou indirectement, un fluorophore sur l'une des fonctions organiques de la vitamine B₁₂ (voir figure 47, p.75). Divers essais ont été entrepris [greffage d'un fluorophore, le 9-fluorénylméthylchloroformate (Fmoc), sur les groupements alcools secondaires, transformation des groupements amides primaires en groupements aminés (par action du [I,I-bis(trifluoroacétoxy)iodo]benzène ou de l'hypobromite de sodium) ou acides carboxyliques (par hydrolyse acide douce) et dérivation ultérieure de ces groupements chimiques par un fluorophore]. Ils se sont tous soldés par des échecs, vraisemblablement en raison de la très faible réactivité dans la molécule de vitamine B₁₂ des groupements chimiques impliqués. Deux autres voies ont alors été prises en considération :

1) la réduction de l'atome de cobalt (III) en cobalt (I), provoquant ainsi le départ du ligand axial supérieur (Schrauzer et Deutsch, 1969 ; Dolphin, 1971) qui peut être remplacé par un autre ligand éventuellement fluorescent,

2) l'hydrolyse acide ou alcaline de la vitamine afin de libérer des fragments fluorescents de la molécule (phosphate de ribazole, ribazole) ou susceptible de réagir avec un fluorophore (aminopropanol). Comme il est tout à fait prévisible que ces molécules-fragments préexistent, éventuellement en concentrations élevées, dans un certain nombre d'échantillons alimentaires, il sera néanmoins nécessaire, si une telle solution est retenue, d'effectuer une extraction très sélective de la vitamine B₁₂ dans les aliments avant de procéder à sa destruction par hydrolyse en milieu acide ou basique concentré.

Tous les essais préliminaires de transformation ont été réalisés en utilisant la cyanocobalamine ou l'hydroxocobalamine comme substance étalon.

3.3. LA REDUCTION DE LA VITAMINE B₁₂ EN VITAMINE B_{12s} , PUIS LE GREFFAGE D'UN FLUOROPHORE SUR L'ATOME DE COBALT

Après réduction de la vitamine B₁₂ en vitamine B_{12s}, l'atome de cobalt, maintenant monovalent, est très réactif. La vitamine B_{12s} est par conséquent un excellent nucléophile, ce qui devrait rendre le greffage d'un fluorophore sur l'atome de cobalt plus facile que sur les groupements fonctionnels de la vitamine B₁₂ (éventuellement modifiés), nettement moins réactifs.

Un tel mécanisme réactionnel présente de plus l'avantage de permettre l'intercalation, si cela s'avérait nécessaire, d'un espaceur entre l'atome de cobalt et le fluorophore et ainsi de diminuer l'encombrement stérique induit par la structure chimique de la vitamine B₁₂.

Lors de la réduction de la vitamine B₁₂ en B_{12s}, le ligand axial supérieur est libéré. Tous les vitamères ayant la même forme réduite, leur transformation préalable en cyanocobalamine n'est donc pas nécessaire dans ce cas.

Pour cette étude, les conditions chromatographiques jusqu'à présent utilisées pour la séparation des vitamères (voir p.86) ont été légèrement modifiées. L'éluant de départ a été un mélange tampon phosphate (33 mM, pH 3) - acétonitrile [90/10 (v/v)], dont la composition a été maintenue pendant 2 min. La proportion d'acétonitrile a ensuite été augmentée linéairement de 10 à 70 % en 28 min. La phase mobile a été ensuite ramenée immédiatement à sa composition initiale (tampon phosphate - acétonitrile [90/10 (v/v)]).

3.3.1. La réduction de la vitamine B₁₂

Pour pouvoir remplacer le ligand axial supérieur de la vitamine par un ligand fluorophore, il a fallu préalablement déstabiliser le complexe de la vitamine. Le seul moyen pour y parvenir a été de réduire l'atome de cobalt trivalent en cobalt monovalent (forme B_{12s}). Cette forme réduite est alors un excellent nucléophile qui peut réagir immédiatement avec des molécules halogénées (Schrauzer et Deutsch, 1969 ; Dolphin, 1971).

Le protocole de réduction proposé, inspiré de celui décrit par Dolphin (1971), utilise le borohydrure de sodium comme réducteur. Un flacon de 5 ml a été rempli d'azote et fermé avec un septum. Un ml d'une solution de cyanocobalamine ou d'hydroxocobalamine à environ 1g.l⁻¹ (0,70 μmol) y a été introduit à l'aide d'une seringue. Une solution de NaBH₄ a été fraîchement préparée en ajoutant 100 mg de NaBH₄ à 5 ml d'eau. Trois ml de cette solution (1,6 mmol) ont été introduits dans le flacon.

L'avancement de la réaction de réduction a été suivi par spectrophotométrie d'absorption UV-visible à l'aide d'un spectrophotomètre Lambda Bio 40 (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Le spectre de la solution initiale de cyanocobalamine (de couleur rosée) est donné dans la figure 52 - a. Au bout de 5 min, le spectre du milieu réactionnel a présenté un maximum d'absorption à 315 nm (Figure 52-b), ce qui est caractéristique, selon Friedrich (1975), de la première forme réduite de la vitamine B₁₂ correspondant à un atome de cobalt divalent, la forme B_{12r}. A ce stade de la réaction, la solution est brune. Au bout de 30 min, le spectre obtenu a présenté deux maxima, à 384 nm et à 289 nm (Figure 52-c). Ces pics sont caractéristiques de la forme B_{12s} (Friedrich, 1975). La solution est alors de couleur gris vert et, en lumière artificielle, elle prend des reflets violets.

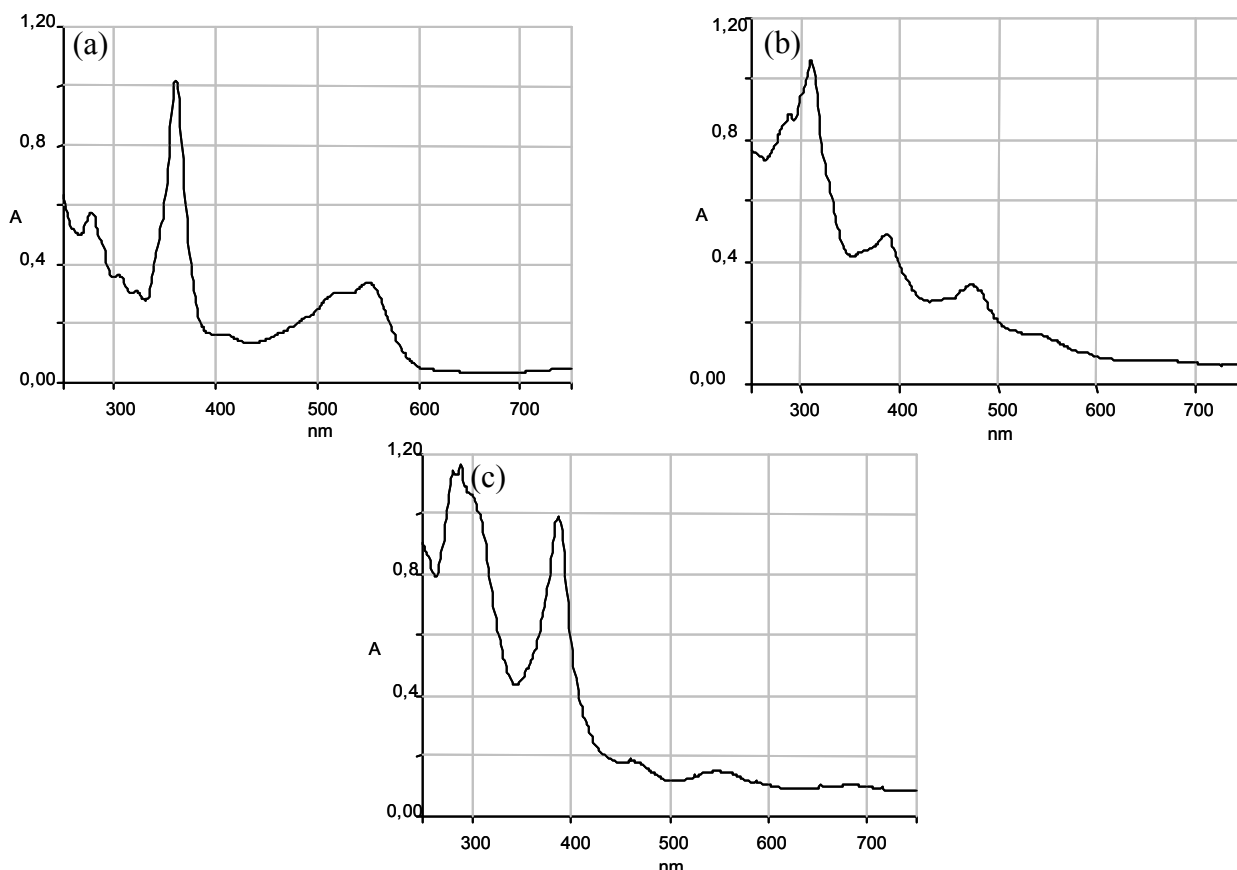


Figure 52. Spectres d'absorption UV-visible de la cyanocobalamine (Co(III)) (a), de la forme B_{12r} (Co(II)) (b) et de la forme B_{12s} (Co(I)) (c).

Bien entendu, il est indispensable de réaliser cette réaction en anaérobie car la vitamine B_{12s} peut se réoxyder facilement. Ainsi 5 h après avoir ouvert le flacon, toute la vitamine B_{12s} s'est réoxydée. Cette réaction, visible à l'œil nu, la solution passant du gris vert au rosé, a été quasiment immédiate après neutralisation de l'excès de borohydrure de sodium par de l'acide chlorhydrique (pH final de la solution à 4). La solution de vitamine B_{12s} réoxydée a été analysée par CLHP/UV (Figure 53). Deux pics, caractérisés par leur temps de rétention, ont été obtenus : l'un d'aquocobalamine (forme prévisible de réoxydation), l'autre de cyanocobalamine (en raison de la présence d'ions cyanures dans le milieu réactionnel). Après réduction de l'hydroxocobalamine en forme B_{12s} , la réoxydation ne donne évidemment qu'un mélange d'hydroxocobalamine et d'aquocobalamine.

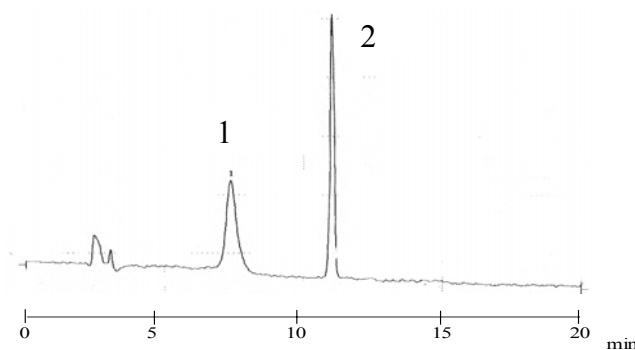


Figure 53. Chromatogramme d'une solution de cyanocobalamine réduite, puis réoxydée (1 : aquocobalamine, 2 : cyanocobalamine).

Le borohydrure de sodium permet donc effectivement de réduire la vitamine B₁₂ en forme B_{12s} et a été choisi comme agent réducteur dans la suite de cette étude.

3.3.2. Le greffage d'un substituant sur la forme B_{12s}

La vitamine B₁₂ réduite en forme B_{12s}, une molécule halogénée peut être greffée sur l'atome de cobalt. En raison de la très grande photolabilité de la liaison Co-C, toutes les réactions de greffage décrites dans ce paragraphe ont été effectuées en chambre noire avec lumière rouge.

Il a tout d'abord été tenté de reproduire la réaction de synthèse de la méthylcobalamine (par réaction de l'iodométhane avec la vitamine B_{12s}) décrite par Dolphin (1971), mais avec des concentrations de réactifs 100 fois plus faibles que celles utilisées par cet auteur.

Cinq cents µl de CH₃I (1500 µmol) ont été introduits dans le flacon contenant la solution de cyanocobalamine réduite par la solution de borohydrure de sodium en présence de 10 µg de nitrate de cobalt(II), sel dont l'utilité serait de catalyser la réduction de la vitamine B₁₂ en forme B_{12s}. La méthylcobalamine ainsi formée a été purifiée selon un protocole d'extraction au phénol préconisé par Dolphin (1971). La solution aqueuse a été extraite avec un volume équivalent (environ 5 ml) d'une solution de phénol 0,5 g.ml⁻¹ dans du dichlorométhane afin de séparer la méthylcobalamine des différents sels (nitrate de cobalt, borohydrure de sodium). La phase organique, contenant l'iodométhane et la méthylcobalamine, si celle-ci s'est formée, a été mise de côté et lavée deux fois à l'eau. La phase organique ainsi lavée a ensuite été diluée par ajout de dichlorométhane, jusqu'à dix fois son volume initial (environ 50 ml) abaissant ainsi la concentration de phénol à 0,05 g.ml⁻¹. La cobalamine, alors plus soluble dans l'eau que dans cette nouvelle phase organique, a été réextraite de la phase organique ainsi obtenue par de l'eau distillée (environ 5 ml) jusqu'à ce que la phase organique ne soit plus colorée (6 extractions). Les phases aqueuses ont été rassemblées et lavées trois fois avec du dichlorométhane, afin d'enlever les traces de phénol.

L'analyse par CLHP/UV de la solution obtenue en appliquant ce protocole a curieusement montré qu'il ne s'était formé que de l'hydroxocobalamine (Figure 54-a), sans doute par simple réoxydation de la vitamine B_{12s}. Vraisemblablement, le nitrate de cobalt a également catalysé la réduction de la méthylcobalamine. En effet, en absence de ce sel, il s'est bien formé de la méthylcobalamine, mais la présence de traces de phénol dans la solution analysée n'a pas permis d'obtenir un isolement chromatographique tout à fait satisfaisant de cette cobalamine (Figure 54-b). Trois lavages supplémentaires par le dichlorométhane n'ont pas permis d'éliminer ces traces de phénol. Il a donc été décidé de simplifier le protocole et de ne pas extraire l'iodométhane en excès. Bien entendu, la suppression de l'étape d'extraction de l'iodométhane par le phénol en

solution dans le dichlorométhane a eu pour conséquence la présence d'un excès d'iodométhane dans la solution aqueuse. Cette présence n'a cependant pas empêché un isolement chromatographique satisfaisant de la méthylcobalamine formée (Figure 54-c).

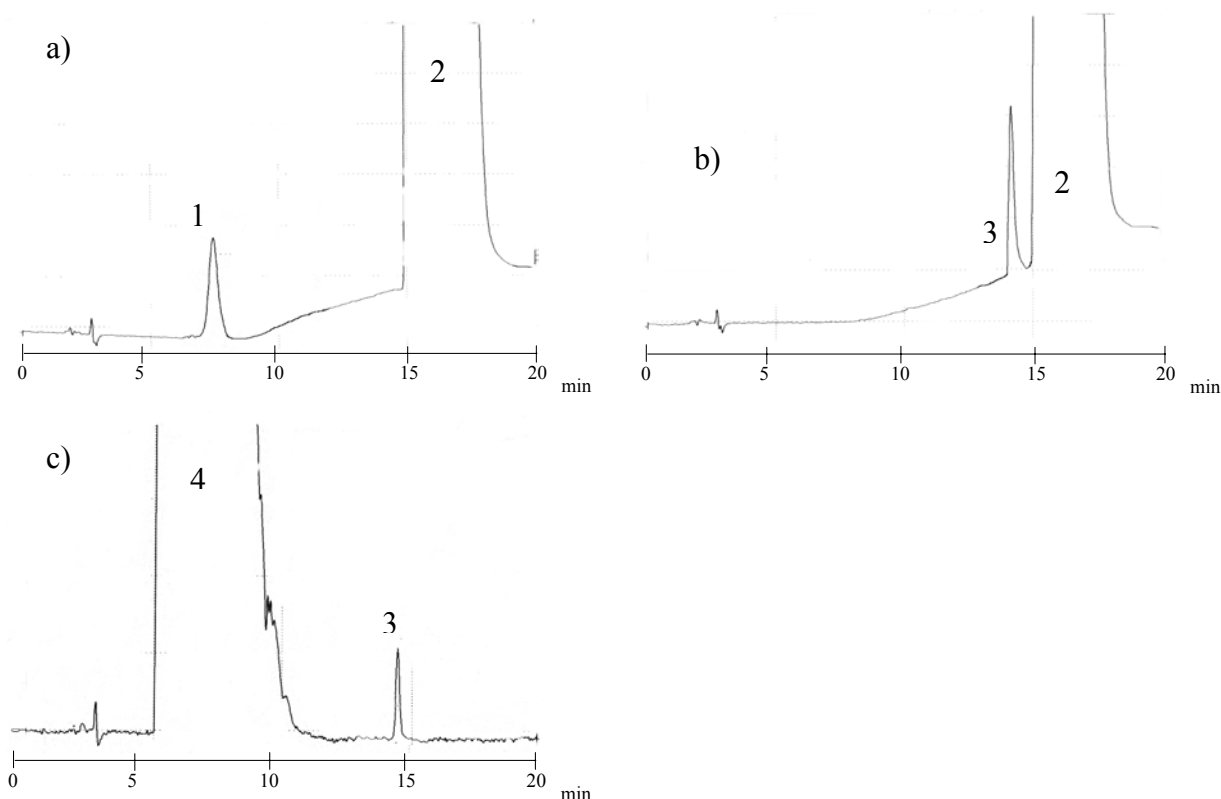


Figure 54. Analyse chromatographique du milieu réactionnel obtenu à l'issue de la synthèse de la méthylcobalamine à partir de la cyanocobalamine ($\lambda=268$ nm) en présence de nitrate de cobalt avec extraction de l'iodométhane par le mélange phénol-dichlorométhane (a), sans nitrate de cobalt mais avec extraction de l'iodométhane par le mélange phénol-dichlorométhane (b), sans nitrate de cobalt ni extraction de l'excès d'iodométhane (c) [1 : hydroxocobalamine ; 2 : phénol, 3 : méthylcobalamine, 4 : iodométhane].

Le protocole utilisé par la suite pour les synthèses d'alkylcobalamines a donc été simplifié par rapport à celui utilisé par Dolphin (1971). Après réduction de la vitamine B₁₂ en vitamine B_{12s}, la molécule à greffer a été simplement ajoutée au mélange réactionnel.

3.3.2.1. Les essais de greffage d'un fluorophore halogéné directement sur l'atome de cobalt (I)

Le 9-fluorénylméthylchloroformate (Fmoc) (Figure 55) possède un groupement chlorure d'acyle qui devrait lui permettre de réagir avec l'atome de cobalt (I) de la vitamine B_{12s}. Il a cependant été montré que la présence de borohydrure de sodium en excès dans le milieu réactionnel, indispensable à la stabilité de la forme B_{12s}, détruisait partiellement le Fmoc. Ce fluorophore devra donc nécessairement être mis en large excès par rapport à la vitamine B₁₂.

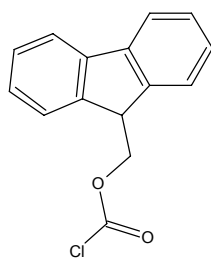


Figure 55. Structure du 9-fluorénylméthylchloroformate (FMOC).

En analysant par CLHP/ UV ($\lambda=360$ nm) le mélange de forme B_{12s} , formée par réduction de la cyanocobalamine ($0,7 \mu\text{mol}$), et de FMOC (3 ml d'une solution de FMOC 5mM dans l'acétone, soit $15 \mu\text{mol}$), deux pics chromatographiques ont été obtenus (Figure 56). La présence d'un excès de FMOC n'est pas visible sur le chromatogramme car ce composé n'absorbe pas à 360 nm. Le premier pic, caractérisé par son temps de rétention, correspondrait à de la cyanocobalamine, provenant vraisemblablement de l'oxydation de la vitamine B_{12s} et de la présence des ions cyanures dans le milieu réactionnel après réduction de la vitamine B_{12} . Le deuxième pic était un produit inconnu. Son temps de rétention (14,0 min) ne correspondait à aucun des temps de rétention obtenus pour les différents vitamères de la vitamine B_{12} , bien qu'il en soit proche. Ce pic n'était pas présent dans le blanc réactionnel (mélange de FMOC et de borohydrure de sodium) et sa hauteur a varié dans le même sens que la concentration en vitamine. Il se pourrait donc que ce deuxième pic corresponde au dérivé issu du greffage du FMOC sur la vitamine B_{12s} . Aucun pic chromatographique n'a cependant été détecté en pratiquant une détection par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=260$ nm, $\lambda_{\text{em}}=315$ nm). Fort vraisemblablement, dans l'hypothèse où ce dérivé se serait formé, la fluorescence du dérivé FMOC aura été inhibée à la suite du greffage, phénomène qui a déjà été observé par Jacobsen *et al.* (1979) lors de la synthèse de dérivés fluorescents de cobalamines (greffage sur la vitamine B_{12s} de divers fluorophores : la formycine, la 2-aminonébularine, la 2,6-diaminonébularine et le chlorure de dansylamidopropyle).

Cette inhibition pourrait résulter d'un enfouissement trop important du fluorophore au sein de la vitamine B_{12s} . Il a donc été proposé de modifier légèrement le mode de greffage et de greffer tout d'abord un espaceur sur l'atome de Co (I) de la vitamine B_{12s} , puis de greffer un fluorophore sur l'extrémité libre de l'espaceur.

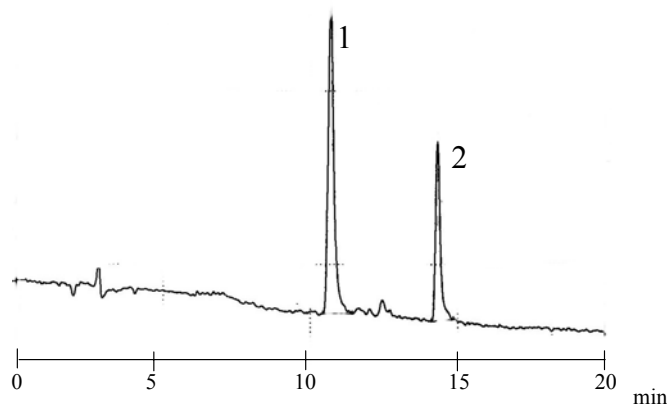


Figure 56. Analyse chromatographique avec détection UV ($\lambda=360$ nm) de la solution obtenue après réaction de la forme B_{12s} avec le FMOC [1 : cyanocobalamine, 2 : produit inconnu].

3.3.2.2. Les essais de greffage d'un espaceur, puis d'un fluorophore sur l'espaceur

L'espaceur choisi doit posséder un groupement halogéné à l'une de ses extrémités, afin de permettre son greffage sur l'atome de Co(I) de la vitamine B_{12s}, et une fonction amine à l'autre extrémité, qui devrait lui permettre de réagir avec le fluorophore choisi.

En opérant de cette façon, Smeltzer *et al.* (2001) ont réussi la synthèse de différents dérivés fluorescents de la vitamine B₁₂ en vue de leur utilisation dans le domaine de l'imagerie médicale (détection de cellules cancéreuses stockant plus de cobalamines que les cellules normales). Ils ont tout d'abord réalisé la synthèse de l'aminopropylcobalamine en milieu aqueux en utilisant comme espaceur la chloropropylamine. Une fois l'aminopropylcobalamine formée, purifiée et séchée, cette molécule a été remise en solution dans du diméthylformamide en présence d'un fluorophore (ces auteurs ont tout particulièrement travaillé avec la 5-(& 6-) carboxynaphtofluorescéine). Le mélange, laissé sous agitation pendant 1 à 2 h, a ensuite été analysé par CLHP semi-préparative. Les fractions contenant le dérivé fluorescent de la cobalamine ont été rassemblées. Après évaporation d'une partie du solvant, la solution a été purifiée par passage sur une cartouche Sep-pak C₁₈. Le dérivé élué a finalement été séché.

En fait, la quantité d'hydroxocobalamine utilisée au départ par Smeltzer *et al.* (2001) était très importante (200 mg), très supérieure aux quantités qu'il est possible de retrouver dans un échantillon alimentaire (3,5 μ g dans 5 g de foie de porc, pourtant l'aliment le plus riche en vitamine B₁₂). Ce protocole analytique a nécessairement dû être modifié pour l'adapter au traitement de très faibles quantités de vitamine B₁₂. Les étapes de purification et d'évaporation à sec, permettant d'obtenir l'aminopropylcobalamine sous forme de poudre, étaient en particulier impossibles à pratiquer sur environ 1 μ g de composé.

Le protocole suivant a donc été proposé : à 4 ml d'une solution de vitamine B_{12s} (0,75 nmol) a été ajouté 1 ml d'une solution aqueuse de chloropropylamine (5,4 nmol.ml⁻¹). Un ml d'une solution de 5-(& 6-) carboxynaphtofluorescéine à 2 nmol.ml⁻¹ (en solution dans du DMF) a été ajouté à 1 ml de ce mélange. La solution obtenue a été agitée pendant 75 min, puis analysée par CLHP/ UV ($\lambda=360$ nm) et fluorimétrie ($\lambda_{ex}=604$ nm, $\lambda_{em}=668$ nm). En fait aucun dérivé fluorescent n'a pu être obtenu. Seule la formation de l'aminopropylcobalamine a été mise en évidence (détection par absorption à $\lambda= 360$ nm). En dépit d'une agitation prolongée, le fluorophore n'a donc pas pu réagir avec la fonction amine de l'espaceur. L'ajout du DMF à l'eau étant exothermique, il est probable que cet échauffement ait fortement perturbé le déroulement prévu de la réaction. Smeltzer *et al.* (2001) n'avaient pas rencontré ce genre de problèmes car ils ajoutaient la solution du fluorophore directement sur l'aminopropylcobalamine en poudre. Au vu de ces résultats, il apparaît que seule l'utilisation de fluorophores solubles dans l'eau ou dans des solvants miscibles à l'eau sans échauffement, comme le méthanol ou l'acétone, doit être envisagée par la suite.

- Le greffage d'espaceurs bromés sur la forme B_{12s}

Le mécanisme de la réaction de greffage sur la vitamine B_{12s}, d'après Schrauzer et Deutsch (1969), est une substitution nucléophile de type S_{N2}. Ces auteurs ont par ailleurs étudié la cinétique de greffage de différentes molécules sur l'atome de Co (I) et ont logiquement trouvé que la réaction était plus rapide avec une molécule bromée qu'avec une molécule chlorée. Trois espaceurs bromés, la bromopropylamine, la bromohexylamine et la bromododécylamine, ont donc été étudiés. La bromopropylamine a été achetée dans le commerce, alors que les deux autres espaceurs ont été synthétisés dans le laboratoire (voir § 2.1.3, p.82-83).

Le protocole utilisé pour le greffage de ces composés bromés sur l'atome de Co(I) de la vitamine B_{12s} a été le suivant : 1 ml d'une solution de cyanocobalamine à 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (24 nmol) a été introduit dans un flacon rempli d'azote. Deux ml d'une solution de NaBH₄ (20 mg.ml⁻¹) ont été ensuite versés dans le flacon. Après 30 min, 250 nmol de bromopropylamine, de bromohexylamine ou de bromododécylamine ont été ajoutés dans le milieu réactionnel. La solution obtenue a été agitée pendant 2 min (manipulation effectuée en lumière rouge).

Le succès de ce greffage a pu être attesté par CLHP/ UV (Figure 57). Dans les trois cas, la totalité de la cyanocobalamine a disparu, ce qui prouve que la vitamine B₁₂ a été complètement réduite en vitamine B_{12s}. Dans les trois cas également, les chromatogrammes indiquent l'existence de deux pics : l'un d'hydroxocobalamine, caractérisé par son temps de rétention et son spectre

d'absorption, ce composé résultant soit d'une oxydation (partielle) de la vitamine B_{12s}, soit d'une possible dégradation du dérivé formé à la lumière, et un autre ne correspondant à aucun des vitamères de la vitamine B₁₂ et qui pourrait être une bromoalkylcobalamine. La hauteur de ce pic inconnu, qui n'apparaît pas en absence de bromoalkylamine, varie en fonction de la teneur initiale en cyanocobalamine. De plus, son temps de rétention augmente en passant de la bromopropylamine à la bromohexylamine, puis à la bromododécylamine, ce qui est tout à fait logique si on considère que la polarité du dérivé obtenu diminue. Enfin, les spectres d'absorption UV-visible obtenus pour ces trois produits, d'allures très voisines (Figure 57), ressemblent beaucoup aux spectres des dérivés synthétisés par Dolphin (1971) (hydroxyéthylcobalamine, vinylcobalamine, acétylcobalamine, carboxycobalamine) (Figure 58). Tous les spectres des dérivés cobalamines présentent en effet des maxima d'absorption vers 260 nm et vers 300-360 nm. Tout laisse donc supposer que les trois aminoalkylcobalamines se sont effectivement formées.

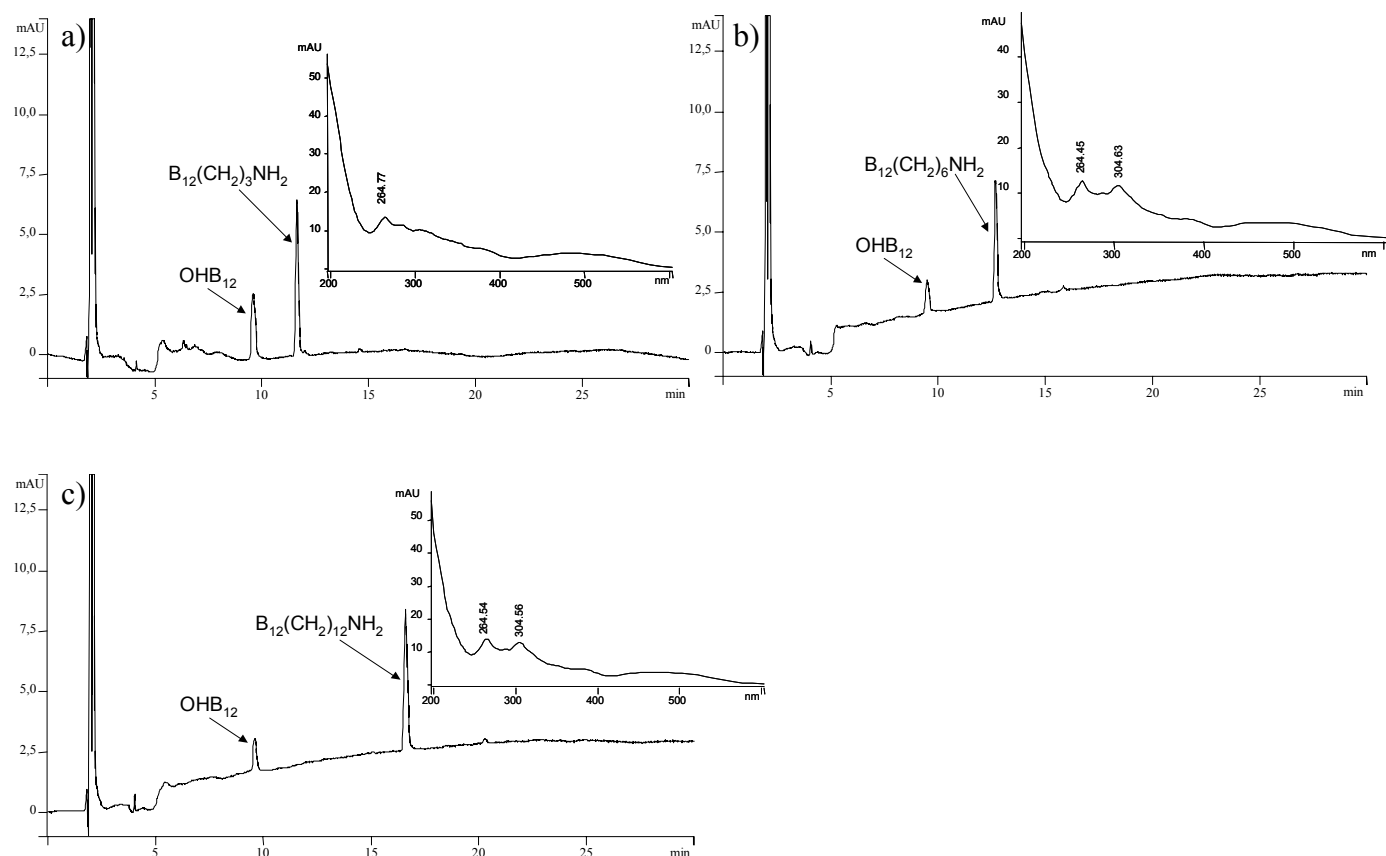


Figure 57. Analyse chromatographique avec détection photométrique ($\lambda=360$ nm) de la solution obtenue après réaction de la vitamine B_{12s} avec la bromopropylamine (a), la bromohexylamine (b) et la bromododécylamine (c) [concentration en vitamine B₁₂ de 2,65 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].

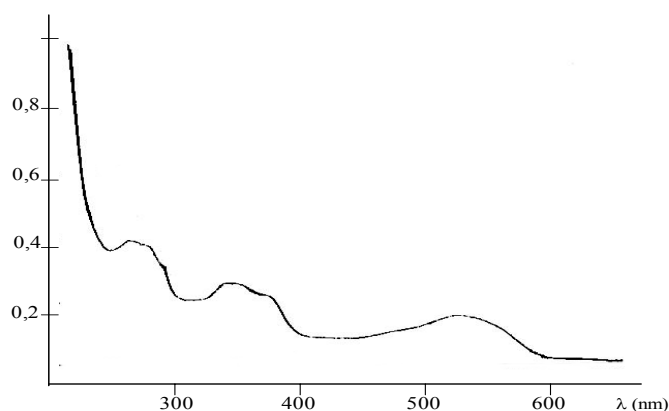


Figure 58. Spectre d'absorption UV-visible de la vinylcobalamine préparée par Dolphin (1971).

- Les essais de réaction de l'OPA sur les aminoalkylcobalamines

Une dérivation post-colonne de ces dérivés aminés par l'OPA en présence de MPA a ensuite été testée. En sortie de colonne, l'éluant, tout d'abord analysé par photométrie ($\lambda=360$ nm), a ensuite été traité par la solution de dérivation (hydroxyde de sodium 12,5 mM, OPA 80 μ M et MPA 140 μ M) acheminée par une pompe Beckmann modèle 110 A dans un réacteur en téflon PTFE de 5 m de longueur et 0,5 mm de diamètre interne (Bioblock) et analysé par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345$ nm, $\lambda_{\text{em}}=455$ nm).

En utilisant la bromopropylamine comme espaceur, le chromatogramme du blanc réactionnel comporte un très large pic saturé (Figure 59) correspondant à l'excès de bromopropylamine réagissant avec l'OPA. Lors de l'analyse de l'échantillon contenant initialement de la vitamine B₁₂, un nouveau pic, dont la hauteur a varié avec la concentration initiale en vitamine B₁₂, est apparu. Mais il était malheureusement de faible hauteur et situé dans la descente du pic saturé.

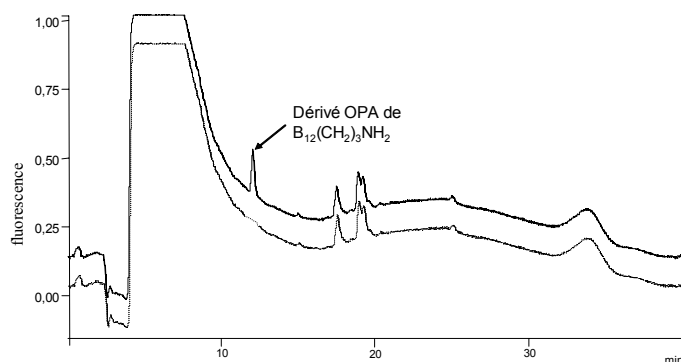


Figure 59. Analyse chromatographique avec détection par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345$ nm, $\lambda_{\text{em}}=455$ nm) du blanc réactionnel (- -) et de la solution obtenue après réaction de la vitamine B_{12s} avec la bromopropylamine (—) après réaction post-colonne avec l'OPA [concentration en vitamine B₁₂ de 2,65 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].

En utilisant la bromohexylamine, aucune preuve de la formation du dérivé fluorescent n'a pu être apportée en raison de la complexité des chromatogrammes obtenus (Figure 60), vraisemblablement imputable à des impuretés amenées par le réactif aminé, insuffisamment purifié lors de sa synthèse.

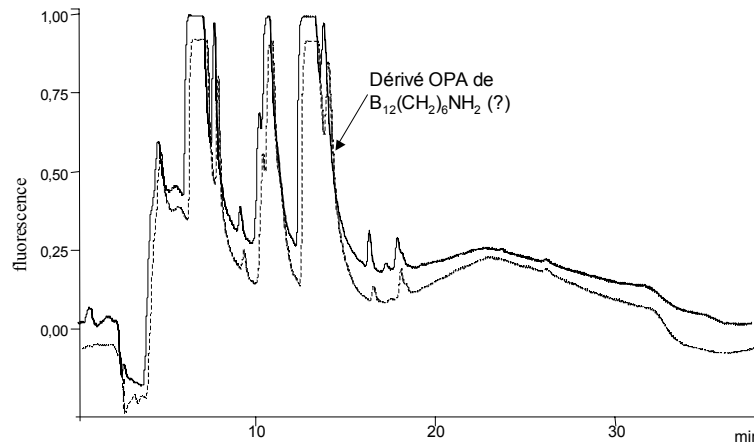


Figure 60. Analyse chromatographique avec détection par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=455 \text{ nm}$) du blanc réactionnel (- -) et de la solution obtenue après réaction de la vitamine B_{12s} avec la bromohexylamine (—) après réaction post-colonne avec l'OPA [concentration en vitamine B_{12} de $2,65 \mu\text{g.ml}^{-1}$].

La bromododécylamine a permis d'obtenir de meilleurs résultats. Un pic, non présent dans le blanc réactionnel et dont l'aire a augmenté linéairement avec la concentration de la cyanocobalamine, a en effet été correctement isolé (Figure 61). La limite de quantification, exprimée en équivalent cyanocobalamine, a été de 9 ng. C'est certes un résultat passable si l'on considère que la limite de quantification obtenue par photométrie était de 15 ng (voir p.89), mais du fait de la dilution provoquée par l'étape de greffage (d'un facteur 3,5), la teneur minimale quantifiable dans un aliment (3000 ng.g^{-1}) serait finalement supérieure à celle obtenue par photométrie UV (1500 ng.g^{-1}). Ce mode de greffage ne présente donc guère d'intérêt.

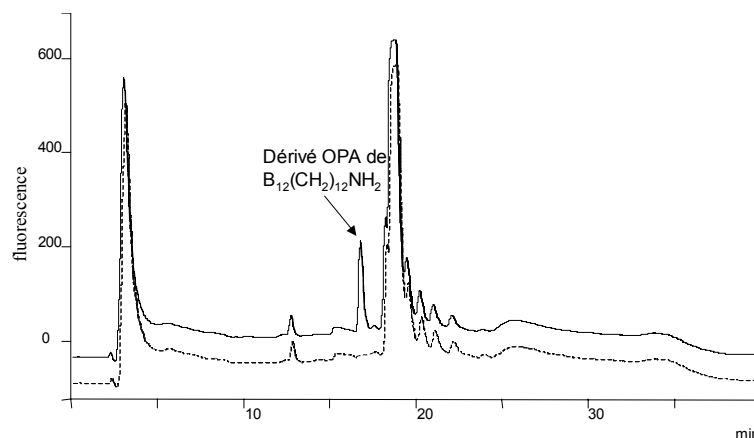


Figure 61. Analyse chromatographique avec détection par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=455 \text{ nm}$) du blanc réactionnel (- -) et de la solution obtenue après réaction de la vitamine B_{12s} avec la bromododécylamine (—) après réaction post-colonne avec l'OPA [concentration en vitamine B_{12} de $2,65 \mu\text{g.ml}^{-1}$].

- Les essais de réaction du 9-fluorénylméthylchloroformate (FMOC) sur les aminoalkylcobalamines

Après le greffage de l'espaceur, 20 μ l d'une solution acétonée de FMOC (100 nmol) ont été ajoutés au milieu réactionnel, toujours en chambre noire. Après avoir agité le mélange pendant 2 min, celui-ci a été analysé par chromatographie, les détecteurs photométrique et fluorimétrique étant disposés en série.

Lorsque la bromopropylamine a été utilisée comme espaceur, le chromatogramme obtenu après détection par absorption UV en absence de FMOC ne comportait qu'un seul pic correspondant vraisemblablement à la formation de l'aminopropylcobalamine puisque le spectre d'absorption UV obtenu pour ce produit et son temps de rétention correspondaient tout à fait au spectre UV et au temps de rétention obtenus lors des précédents essais de greffage d'espaceur (voir figure 57, p.100). En présence de FMOC, le chromatogramme obtenu après détection par absorption UV (Figure 62-a) ne comportait qu'un seul pic dont la hauteur augmentait linéairement avec la valeur de la concentration initiale en vitamine B₁₂. De plus, le temps de rétention du produit formé était différent de celui de l'aminopropylcobalamine (voir figure 57) ou de l'un des vitamères de la vitamine B₁₂ (voir figure 48, p.88). L'allure du spectre d'absorption de ce composé inconnu était en fait très voisine de celle des spectres des aminoalkylcobalamines (voir figure 57). Tout laisse donc supposer que ce pic chromatographique correspondait bien à celui du dérivé issu de la réaction de l'aminopropylcobalamine avec le FMOC. En procédant à une détection par fluorimétrie un pic ne figurant pas dans le blanc réactionnel et ayant un temps de rétention identique à celui du pic attribué au dérivé FMOC-aminopropylcobalamine avec une détection photométrique a effectivement été obtenu (Figure 62-b), confirmant ainsi l'hypothèse faite précédemment.

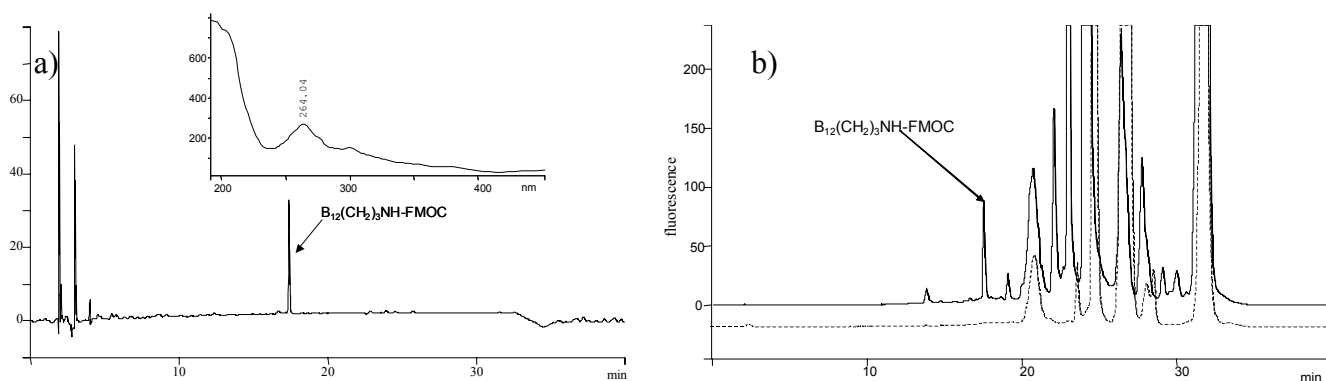


Figure 62. Analyse chromatographique avec détection par absorption UV ($\lambda=360$ nm) (a) et par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345$ nm, $\lambda_{\text{em}}=455$ nm) (b) de la solution obtenue après réaction de la vitamine B_{12s} avec la bromopropylamine et le FMOC [concentration en vitamine B₁₂ de 5,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].

La limite de quantification obtenue avec un tel mode de dérivation (exprimée en équivalent cyanocobalamine) ne serait cependant que de 15 ng, donc identique à celle obtenue avec une détection par photométrie UV. La teneur minimale quantifiable dans l'aliment serait donc de l'ordre de 6000 ng.g^{-1} , en considérant que la transformation pré-colonne a entraîné une dilution d'un facteur 4 de l'échantillon alimentaire. C'est donc une valeur toujours largement insuffisante pour permettre le dosage de la vitamine B₁₂ dans les aliments, complémentés ou non.

Lorsque l'espaceur est la bromohexylamine, un pic détecté à la fois par photométrie UV et par fluorimétrie (Figure 63) et qui n'apparaissait pas en absence de FMOc pourrait résulter de la formation du dérivé FMOc-aminohexylcobalamine. La hauteur de ce pic a augmenté avec la concentration initiale en vitamine B₁₂. Son temps de rétention a été par ailleurs différent de celui de l'aminohexylcobalamine (voir figure 57, p.100) et de ceux des différents vitamères de la vitamine B₁₂ (voir figure 48, p.88), et plus élevé que celui du dérivé FMOc-aminopropylcobalamine (voir figure 62, p.103), ce qui est tout à fait logique car la polarité du nouveau dérivé est plus faible.

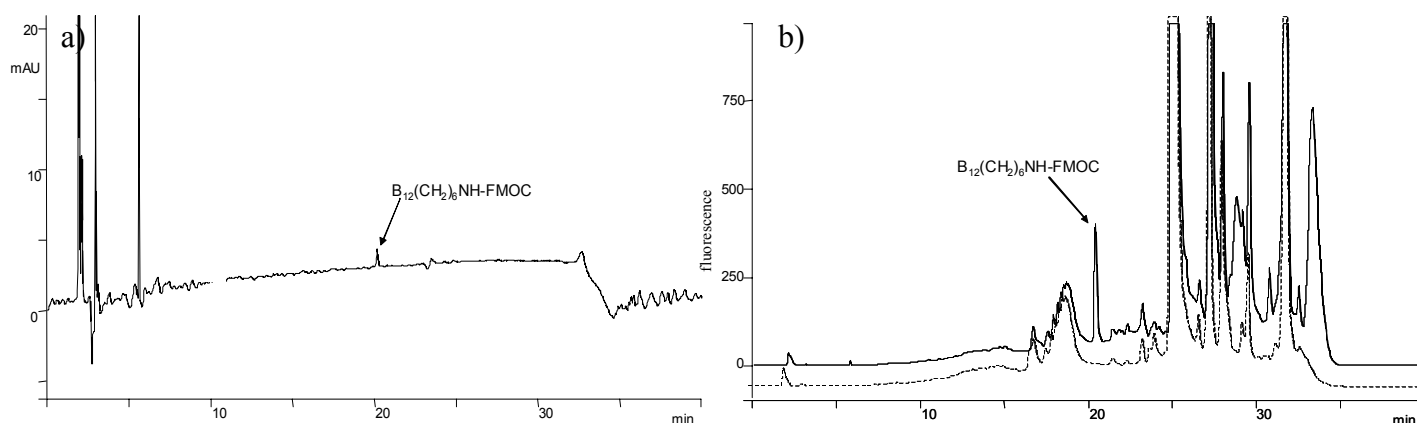


Figure 63. Analyse chromatographique avec détection par absorption UV ($\lambda=360 \text{ nm}$) (a) et par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=455 \text{ nm}$) (b) de la solution obtenue après réaction de la vitamine B_{12s} avec la bromohexylamine et le FMOc [concentration en vitamine B₁₂ de $5,2 \mu\text{g.ml}^{-1}$].

La limite de quantification obtenue avec cet espaceur (exprimée en équivalent cyanocobalamine) (7,5 ng) n'est cependant que 2 fois plus basse que celle obtenue en utilisant la bromopropylcobalamine.

En utilisant la bromododécylamine, donc en allongeant notablement la longueur du bras espaceur, aucun pic pouvant correspondre au dérivé FMOc-aminododécylcobalamine n'a été détecté par fluorimétrie. Par photométrie UV, seul le pic de l'aminododécylcobalamine, caractérisé par son temps de rétention (voir figure 57, p.100), a pu être détecté (Figure 64).

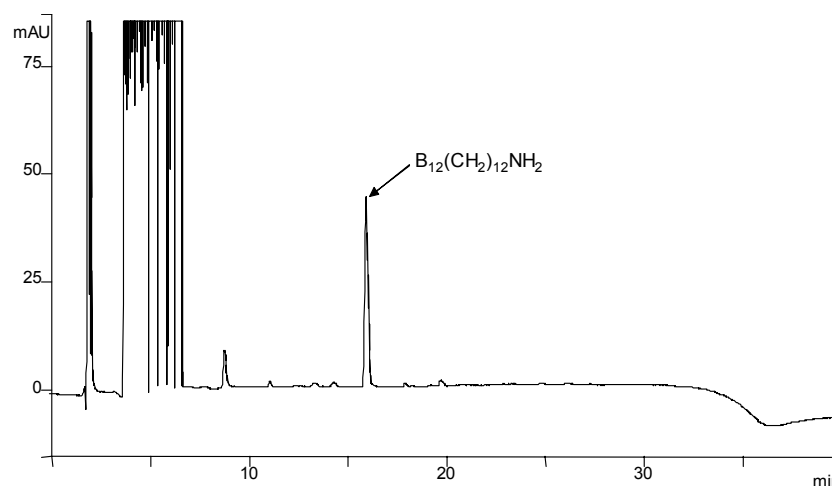


Figure 64. Analyse chromatographique avec détection par absorption UV ($\lambda=360$ nm) de la solution obtenue après réaction de la vitamine B_{12s} avec la bromododécylamine et le FMOc [concentration en vitamine B₁₂ de 10,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].

Le FMOc n'a donc pas réagi avec l'aminododécylcobalamine. Il est probable que l'absence de rigidité de l'espaceur et son recourbement vraisemblable au sein de la molécule n'a pas permis au FMOc de venir se fixer sur sa fonction amine libre.

-Conclusions

La limite de quantification la plus basse obtenue avec ce mode de dérivation (greffage d'un fluorophore sur un bras espaceur aminé fixé sur l'atome de cobalt de la vitamine B₁₂ réduite) (7,5 ng) est encore très insuffisante pour permettre le dosage de la vitamine B₁₂ dans les aliments . L'utilisation d'un espaceur long et rigide pourrait éventuellement conduire à une amélioration de cette limite de détection. Toutefois préparer une molécule rigide (par exemple en incorporant des triples liaisons ou des cycles aromatiques dans la chaîne alkyle) possédant à la fois un atome de brome en bout de chaîne et une fonction amine à l'autre extrémité serait sans aucun doute une tâche ardue. Par ailleurs, les conditions expérimentales très particulières utilisées lors de cette dérivation (manipulation sous atmosphère inerte, puis manipulation en chambre noire) rendraient de toute façon très problématique l'utilisation d'un tel protocole analytique de dosage de la vitamine B₁₂ en analyse de routine. Cette voie d'étude a donc été (momentanément ?) abandonnée.

3.4. LA LIBERATION DE MOLECULES FLUORESCENTES, OU SUSCEPTIBLES DE LE DEVENIR PAR DERIVATION, LORS D'UNE HYDROLYSE DE LA VITAMINE B₁₂ PAR UN ACIDE OU UNE BASE CONCENTRE(E)

Selon divers auteurs (Armitage *et al.*, 1953 ; Bonnett *et al.*, 1957 a, b), des conditions d'hydrolyse (acide ou basique) drastiques de la cyanocobalamine permettraient la libération du 1-amino-2-propanol, molécule non fluorescente, mais facile à dériver (avec l'OPA par exemple) en composé fluorescent, et du phosphate de ribazole (sous forme de deux isomères) naturellement fluorescent (Figure 65). Wagner et Folkers (1963) ont effectivement indiqué par la suite qu'il était possible par hydrolyse acide de la vitamine B₁₂ de libérer, non seulement du phosphate de ribazole (HCl 1 M à 100°C pendant 1 à 20 h), mais aussi, dans des conditions plus drastiques, du ribazole (HCl 6 M à 100°C pendant 8 h), ces composés chimiques (Figure 66) pouvant être particulièrement intéressants dans la mesure où ils sont naturellement fluorescents à l'état libre et pourraient donc être directement utilisés pour le dosage de la vitamine B₁₂.

Il ne faut cependant pas oublier (cela a déjà été mentionné p.93) que le 1-amino-2-propanol, le phosphate de ribazole et le ribazole peuvent exister naturellement dans les aliments. Dans ces conditions, ces molécules ne seront effectivement intéressantes comme marqueurs fluorescents de la vitamine B₁₂ que si elles n'altèrent pas la spécificité de l'analyse.

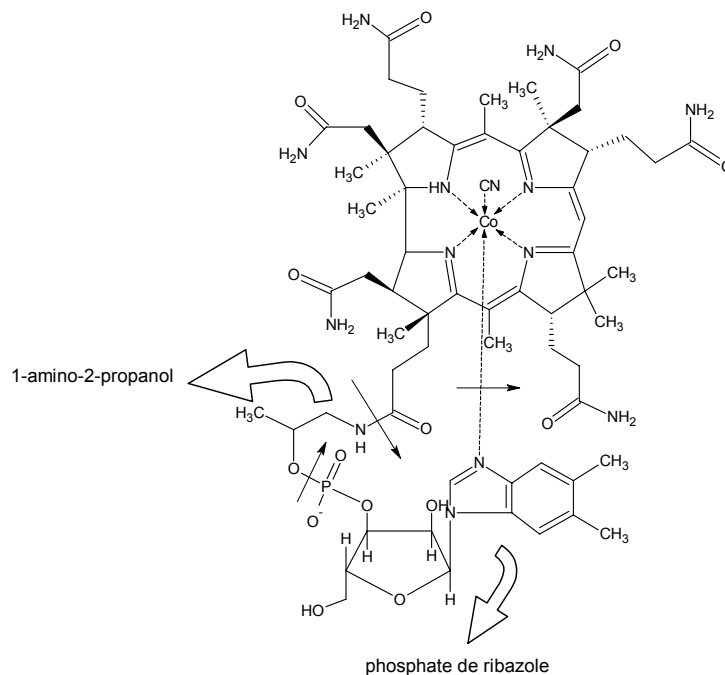


Figure 65. Effets possibles d'une hydrolyse acide ou basique sur la vitamine B₁₂.

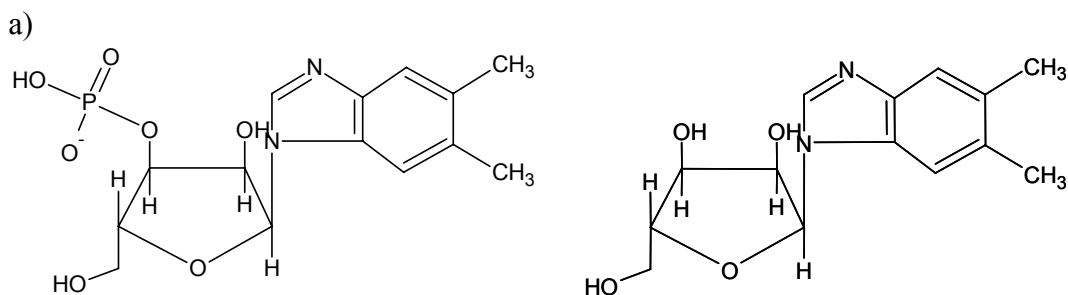


Figure 66. Structures chimiques du phosphate de ribazole (a) et du ribazole (b).

3.4.1. La libération de l'aminopropanol

3.4.1.1. Les essais préliminaires

D'après Armitage *et al.* (1953), une hydrolyse basique de la vitamine B₁₂ permettrait de libérer l'aminopropanol. La réalité de cette libération a été vérifiée de la façon suivante : le mélange réactionnel constitué d'un ml d'une solution de cyanocobalamine à 1 g.l⁻¹ et de 4 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M, chauffé à reflux pendant 1 h, a été analysé par CLHP/UV ($\lambda=360$ nm). Après une telle hydrolyse, l'aire du pic de cyanocobalamine n'a en fait jamais diminué. Par ailleurs, aucun signal de fluorescence n'a été obtenu après réaction avec le mélange OPA/ ME. De nombreux autres essais ont été réalisés en faisant varier les paramètres de l'hydrolyse alcaline (durée de chauffage augmentée jusqu'à 6 h avec variation de la concentration en hydroxyde de sodium dans le milieu réactionnel entre 0,08 et 2,0 M). Une diminution de l'aire du pic de la cyanocobalamine a bien été observée lors d'un chauffage à reflux pendant 1h (détection par photométrie à 360 nm) lorsque la concentration en hydroxyde de sodium dans le milieu réactionnel était de 0,08 M (37 %) et de 2,0 M (62 %). Une dérivation post-colonne par l'OPA/ME n'a cependant jamais permis de mettre en évidence l'apparition de composés fluorescents. Très vraisemblablement, une hydrolyse alcaline drastique a bien entraîné une destruction partielle de la cyanocobalamine, mais sans libération d'un composé aminé (comme par exemple l'aminopropanol), susceptible de réagir avec le mélange OPA/ME.

Une hydrolyse acide a par la suite été envisagée pour parvenir à libérer cette molécule. Des conditions d'hydrolyse particulièrement drastiques, recommandées par Armitage *et al.* (1953) (HCl 6 M à 150°C pendant 4 h) et appliquées à une solution de vitamine B₁₂, ont conduit à l'obtention d'un signal de fluorescence après traitement de la solution par le mélange OPA/ ME. Ces conditions n'étaient cependant pas optimales puisqu'en abaissant la température à 85°C et la concentration en HCl à 1,2 M, l'intensité de fluorescence du mélange a été nettement plus forte (Tableau XIII).

Tableau XIII. Intensité de fluorescence (unité arbitraire) obtenue après hydrolyse acide de la cyanocobalamine et traitement par le mélange OPA/ME.

cyanocobalamine ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	intensité de fluorescence	
	HCl 6M, 150°C, 4h	HCl 1,2M, 85°C, 4h
225	98	260
90	4	80

Ces essais s'étant révélés plutôt positifs, un isolement chromatographique du composé formé a été réalisé afin d'optimiser les conditions expérimentales.

3.4.1.2. L'optimisation des conditions d'hydrolyse acide

L'hydrolyse acide a bien entendu été pratiquée avant l'isolement chromatographique et une dérivation par l'OPA en présence de ME a été proposée en post-colonne. La phase mobile utilisée a été un gradient acétonitrile - tampon phosphate (33 mM, pH 7). Le pH du tampon phosphate a été modifié (7 au lieu de 3) par rapport à celui de la phase mobile utilisée précédemment (voir p.92) afin de ne pas protoner l'aminopropanol. L'éluant de départ était un mélange tampon phosphate - acétonitrile [90/10 (v/v)], dont la composition a été maintenue pendant 2 min. La proportion d'acétonitrile a ensuite été augmentée linéairement de 10 à 70 % en 28 min. La phase mobile a été ensuite ramenée immédiatement à sa composition initiale (tampon phosphate - acétonitrile [90/10 (v/v)]).

Les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse d'une solution d'aminopropanol à 4 nmol.ml⁻¹ et d'une solution de cyanocobalamine à 3 nmol.ml⁻¹ hydrolysée par HCl 1,2 M à 85°C pendant 4 h sont présentés dans la figure 67.

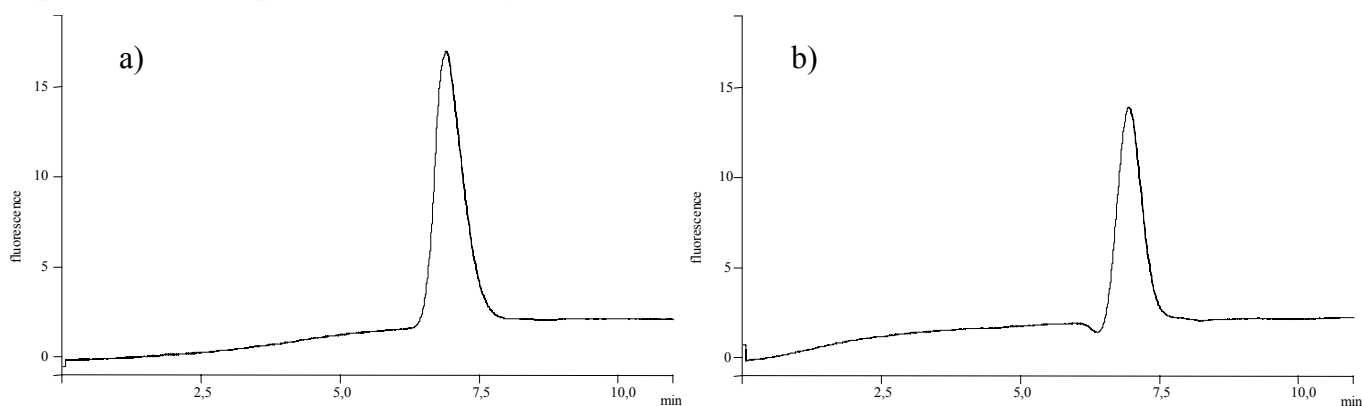


Figure 67. Analyse chromatographique avec détection par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345$ nm, $\lambda_{\text{em}}=455$ nm) après dérivation post-colonne par l'OPA d'une solution d'aminopropanol (à 4 nmol.ml⁻¹) (a) et d'une solution de cyanocobalamine (à 3 nmol.ml⁻¹) hydrolysée par HCl à 1,2 M à 85°C pendant 4 h (b).

En comparant les temps de rétention des composés isolés, il apparaît que l'hydrolyse acide conduit bien à la formation d'aminopropanol.

Différentes concentrations d'acide chlorhydrique ont été testées, entre 0,12 M et 12 M, le milieu réactionnel étant chauffé à 85°C pendant 4 h. L'aire du pic chromatographique correspondant à l'aminopropanol a été maximale pour une concentration en acide de 1,2 M (Figure 68). De part et d'autre de cette valeur, l'aire du pic chromatographique a diminué rapidement : baisse certaine du rendement d'hydrolyse pour des concentrations en HCl inférieures à 1,2 M, possibles réactions de l'aminopropanol avec d'autres composés chimiques en milieu plus acide. Lors de l'hydrolyse acide de la vitamine B₁₂, il peut en effet y avoir hydrolyse progressive des groupements amides en groupements acides carboxyliques (Armitage *et al.*, 1953), les composés formés pouvant alors réagir avec la fonction amine de l'aminopropanol.

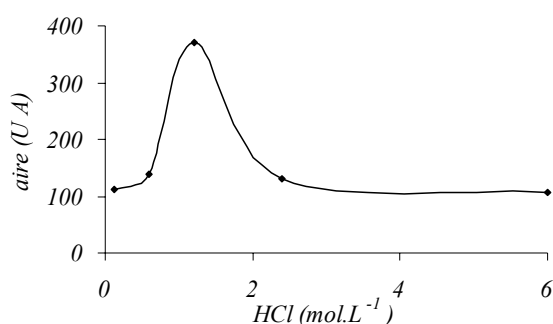


Figure 68. Effet de la concentration en acide chlorhydrique sur l'aire du pic chromatographique correspondant à l'aminopropanol (conditions : bain-marie à 85°C pendant 4 h, [CNB₁₂]=4 µg.ml⁻¹).

La concentration d'acide chlorhydrique étant fixée à 1,2 M et la température du bain-marie à 85°C, la durée de chauffage a ensuite été augmentée de 1 h à 6 h. L'aire du pic chromatographique de l'aminopropanol a d'abord augmenté avec la durée du chauffage, mais un palier a été observé entre 3 h et 5 h (Figure 69). Au-delà de 5 h, l'aire du pic chromatographique a diminué, probablement pour la même raison que précédemment. Une durée de chauffage de 4 h a donc finalement été choisie.

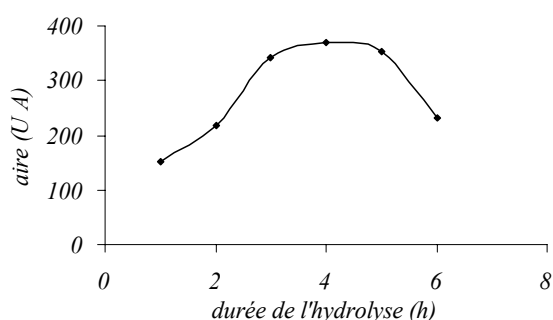


Figure 69. Effet de la durée de l'hydrolyse chlorhydrique sur l'aire du pic chromatographique correspondant à l'aminopropanol (conditions : bain-marie à 85°C, [HCl]=1,2 M, [CNB₁₂]=4 µg.ml⁻¹).

En faisant varier la température d'hydrolyse de 30°C à 150°C, la concentration en acide chlorhydrique étant de 1,2 M et la durée d'hydrolyse étant ramenée à 2h30 (afin de ne pas trop augmenter la durée de l'expérience), l'aire maximale du pic chromatographique (correspondant donc à un rendement d'hydrolyse maximale) a été obtenue dès la température de 95°C (Figure 70). Cette température d'hydrolyse a donc été retenue.

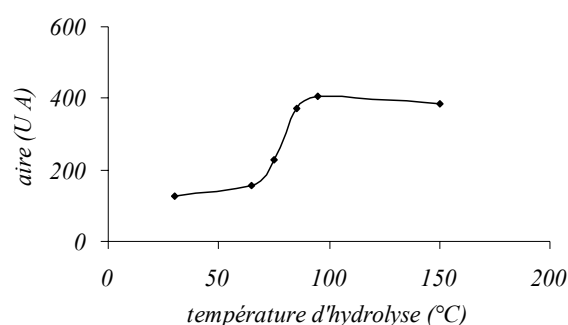


Figure 70. Effet de la température d'hydrolyse sur l'aire du pic chromatographique correspondant à l'aminopropanol (conditions : 2h30, [HCl]=1,2 M, [CNB₁₂]=4 µg.ml⁻¹).

Les conditions optimales étant ainsi bien définies ([HCl]=1,2 M, bain-marie à 95°C pendant 4 h), le rendement de libération d'aminopropanol a été d'environ 96 % en comparant les aires obtenues pour une solution d'aminopropanol et pour une solution de cyanocobalamine hydrolysée. Un étalonnage a par la suite été effectué avec des solutions étalons de cyanocobalamine dont les concentrations variaient de 125 ng.ml⁻¹ à 4 µg.ml⁻¹. La courbe d'étalonnage (aire du pic chromatographique en fonction de la concentration en cyanocobalamine), obtenue après régression linéaire des points expérimentaux, a présenté une bonne linéarité (coefficient de régression de 0,999) (Figure 71).

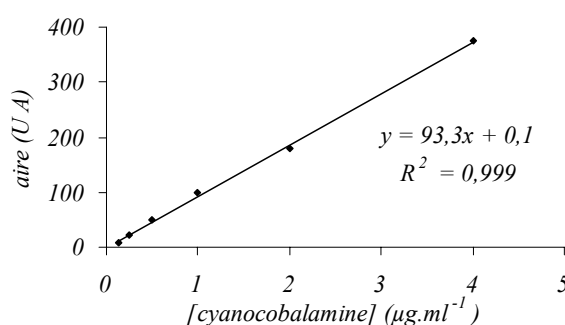


Figure 71. Courbe d'étalonnage de la cyanocobalamine

La limite de quantification atteinte avec ce dispositif expérimental, exprimée en équivalent aminopropanol, semble plutôt satisfaisante (2,1 ng) et traduit donc un rendement quantique de fluorescence acceptable du dérivé formé entre l'aminopropanol et l'OPA. Malheureusement, étant

donné la masse molaire très élevée de la cyanocobalamine (1355 g.mol^{-1}), cette limite de quantification, exprimée en équivalent cyanocobalamine (seule expression intéressante), est beaucoup moins satisfaisante ($37,5 \text{ ng}$), nettement plus élevée que celle obtenue avec une détection photométrique ($\lambda=360 \text{ nm}$) de la cyanocobalamine (sans aucune dérivation). Les travaux portant sur ce mode de détection de la vitamine B_{12} n'ont donc pas été poursuivis.

3.4.2. La libération du phosphate de ribazole

3.4.2.1. Les essais préliminaires

Des essais d'hydrolyse acide de la cyanocobalamine ont été réalisés selon le protocole suivant : un ml d'une solution de ce vitamère ($2 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$) a été traité par 3 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 1,5 M au bain-marie à 100°C pendant 5 min ; le pH de la solution a ensuite été ajusté entre 6 et 11 (zone de pH optimale pour apprécier la fluorescence du phosphate de ribazole selon Jacobsen *et al.*, 1979) avec une solution d'hydroxyde de sodium 5 M et le volume final du mélange réactionnel a été ajusté à 10 ml. Un signal de fluorescence a bien été obtenu. L'émission de fluorescence du mélange réactionnel a été maximale à 312 nm pour une excitation à 280 nm (longueur d'onde maximale d'absorption de la solution) (Figure 72). Une relation linéaire a par ailleurs été notée entre l'intensité de fluorescence du milieu réactionnel et la concentration en cyanocobalamine, pour des concentrations variant de $62,5 \text{ ng.ml}^{-1}$ à 250 ng.ml^{-1} (coefficient de régression de 0,998).

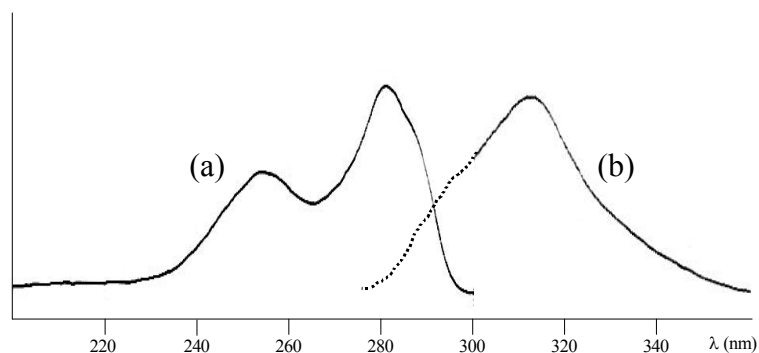


Figure 72. Spectres d'excitation (a) et d'émission (b) d'une solution de cyanocobalamine (10 ng.ml^{-1}) après hydrolyse acide (HCl 1,5 M, 100°C , 5 min).

Des résultats qualitativement identiques ont été obtenus en effectuant dans les mêmes conditions une hydrolyse avec 3 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 1,5 M.

3.4.2.2. L'optimisation des conditions d'hydrolyse chimique (avec isolement chromatographique ultérieur du phosphate de ribazole éventuellement formé)

Cette optimisation a été réalisée en cherchant à isoler le phosphate de ribazole éventuellement formé par chromatographie liquide. En fait, l'hydrolyse de la vitamine B₁₂ conduisant à la libération de deux isomères du phosphate de ribazole [les 2' et 3' phosphates de ribazole (Bonnett *et al.*, 1957 b)], il a donc été nécessaire de mettre au point des conditions chromatographiques adaptées à la séparation de ces deux isomères.

La phase mobile utilisée a été la même que celle choisie lors de l'analyse de l'aminopropanol (voir p.108), c'est-à-dire un gradient acétonitrile - tampon phosphate 33 mM (pH 7). La phase stationnaire était une phase inverse (octadécylsilane). Le débit a été de 1 ml.min⁻¹ et le volume d'injection de 100 µl.

Un ml de la solution de cyanocobalamine (0,5 µg.ml⁻¹) a tout d'abord été hydrolysé avec 1 ml d'une solution de HCl 5 M. Le mélange a été chauffé au bain-marie à 100°C pendant 5 min. Le volume final a été ajusté à 5 ml. Lors de l'analyse des solutions par CLHP / fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{em}}=312$ nm), deux pics très voisins (temps de rétention de 7,9 et 8,5 min) ont été obtenus (Figure 73). Ces pics, dont les aires variaient linéairement avec la concentration initiale en cyanocobalamine, n'étaient pas présents dans les blancs réactionnels testés (absence du réactif acide ou absence de vitamine B₁₂). De plus, une détection par UV-DAD a permis de montrer que les spectres UV de ces deux produits étaient superposables, ce qui est bien cohérent avec l'obtention de deux isomères, très vraisemblablement les 2' et 3' phosphates de ribazole. Cette hypothèse sera confirmée par l'obtention d'un pic unique (sans aucun doute de ribazole, temps de rétention de 12,5 min) après traitement phosphatasique de la solution de cyanocobalamine préalablement hydrolysée en milieu acide (voir figure 80, p.119).

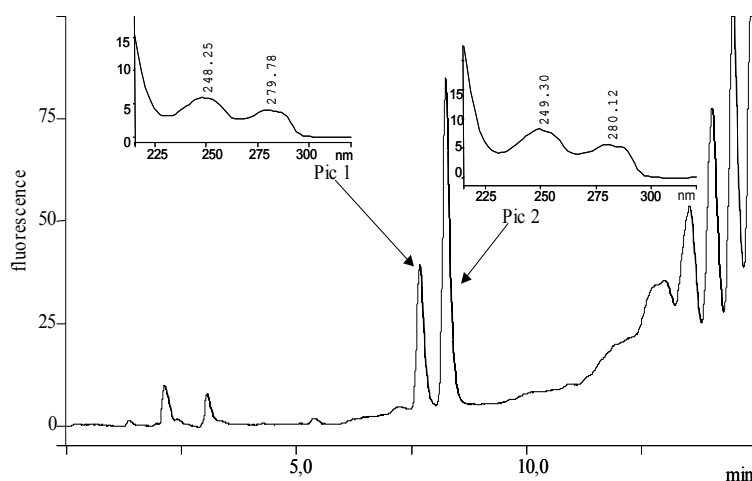


Figure 73. Analyse chromatographique d'une solution de cyanocobalamine (à 100 ng.ml⁻¹) après hydrolyse par HCl 5 M à 100°C pendant 5 min et indication des spectres d'absorption UV des composés chimiques isolés.

L'hydrolyse alcaline conduisant, tout comme l'hydrolyse acide, à la formation de phosphates de ribazole, une rapide étude comparative de l'efficacité de ces deux hydrolyses a été entreprise. Il a ainsi été constaté, que pour des concentrations identiques en réactifs (0,5 M) et pour des mêmes température et durée d'hydrolyse (bain-marie à 100°C pendant 5 min), le rendement de formation des deux isomères de phosphate de ribazole obtenu après l'hydrolyse basique était 3 fois plus important que celui obtenu après l'hydrolyse acide. Une hydrolyse acide de 15 min a en fait été nécessaire pour obtenir le même rendement de formation de phosphate de ribazole que celui d'une hydrolyse alcaline de 5 min. L'hydrolyse alcaline, qui semble donc plus efficace que l'hydrolyse chlorhydrique, a été retenue pour la suite de cette étude.

Différents essais d'hydrolyse basique pré-colonne ont été effectués afin d'optimiser les conditions de transformation de la cyanocobalamine en phosphate de ribazole. Les différents paramètres étudiés ont été la concentration en hydroxyde de sodium et la durée d'hydrolyse. L'appréciation du rendement de formation du phosphate de ribazole a été obtenue en effectuant la sommation des aires des pics correspondants aux deux isomères.

Lors d'une hydrolyse effectuée à 100°C pendant 5 min, le rendement de formation du phosphate de ribazole a augmenté linéairement avec la concentration en hydroxyde de sodium, puis a atteint un palier pour une concentration en hydroxyde de sodium de 5 M (Figure 74). Une telle concentration a donc été retenue.

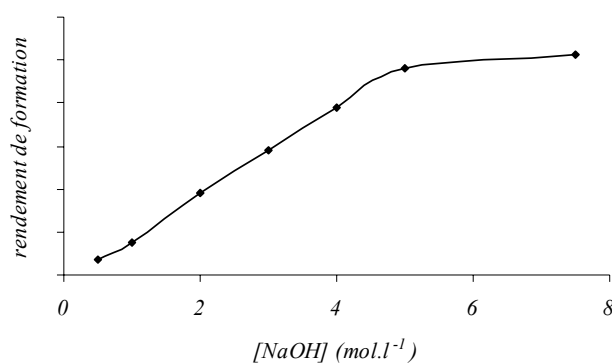


Figure 74. Variation du rendement de formation des deux isomères du phosphate de ribazole en fonction de la concentration en hydroxyde de sodium lors d'une hydrolyse de 5 min réalisée à 100°C.

Lors d'une hydrolyse effectuée à 100°C avec une solution d'hydroxyde de sodium 5 M, le rendement de formation du phosphate de ribazole a augmenté avec la durée d'hydrolyse, puis a atteint un palier pour une durée d'hydrolyse de 15 min (Figure 75-courbe a). Par ailleurs, le rendement de formation obtenu avec la solution d'hydroxyde de sodium 5 M a

été supérieur (de 10 %) à celui obtenu en effectuant l'hydrolyse avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,5 M, même en portant la durée de cette hydrolyse à 2 h (Figure 75-courbe b).

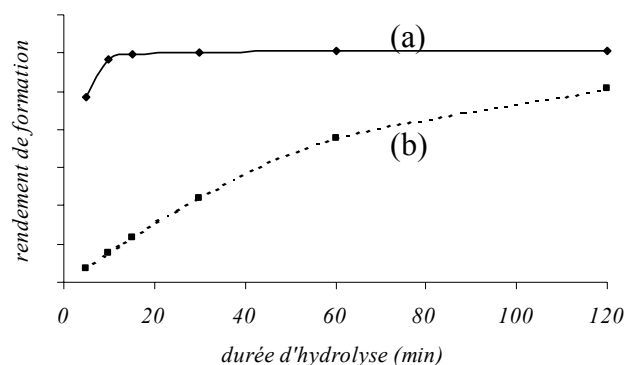


Figure 75. Variation du rendement de formation des deux isomères du phosphate de ribazole en fonction de la durée d'hydrolyse à 100°C pour une concentration en hydroxyde de sodium de 5 M (a) et de 0,5 M (b).

Les conditions d'hydrolyse alcaline finalement retenues ont donc été les suivantes : une concentration en hydroxyde de sodium de 5 M et une hydrolyse effectuée au bain-marie à 100°C pendant 15 min.

Dans de telles conditions, la limite de quantification du protocole proposé a été de 0,15 ng. La teneur minimale quantifiable dans l'aliment serait donc de l'ordre de 30 ng.g⁻¹, en prenant en compte le fait que l'hydrolyse alcaline introduit un facteur de dilution de l'extrait de 2, ce qui est *a priori* suffisant pour permettre le dosage de la vitamine B₁₂ dans les aliments non complémentés les plus riches en cette vitamine.

3.4.2.3. Les problèmes posés par la séparation chromatographique des deux isomères

Le choix du phosphate de ribazole comme marqueur fluorescent lors du dosage de la vitamine B₁₂ suppose que l'analyste est tout à fait en mesure de séparer et de doser les deux formes isomères de cette molécule. L'utilisation pour effectuer cette séparation chromatographique d'un gradient tampon phosphate (pH 7) - acétonitrile a malheureusement provoqué de nombreux dysfonctionnements de la chaîne chromatographique. Des surpressions dues à la formation de bouchons ont été régulièrement observées lors d'analyses répétées¹. Ces précipitations de sels étaient en fait directement liées à la présence d'une forte proportion d'acétonitrile (70 %) dans le tampon phosphate (pH 7) (habituellement la proportion d'acétonitrile ne dépasse pas 50 %). Ces précipitations étaient aussi responsables du relargage de nombreuses impuretés, gênant l'isolement et l'intégration des pics correspondants aux deux isomères du phosphate de ribazole. La résolution des deux isomères a également diminué (de 1,28 à 0,87) au

¹ Ce phénomène n'avait pas été observé lors de l'étude menée sur l'aminopropanol, alors que la phase mobile était identique, car le nombre d'analyses effectuées était resté faible (inférieur à 25).

fur et à mesure de l'utilisation de la colonne chromatographique avec le gradient tampon phosphate (pH 7) – acétonitrile (Figure 76). Une diminution de la concentration du tampon phosphate (de 33 mM à 10 mM) n'a pas permis de résoudre ces problèmes.

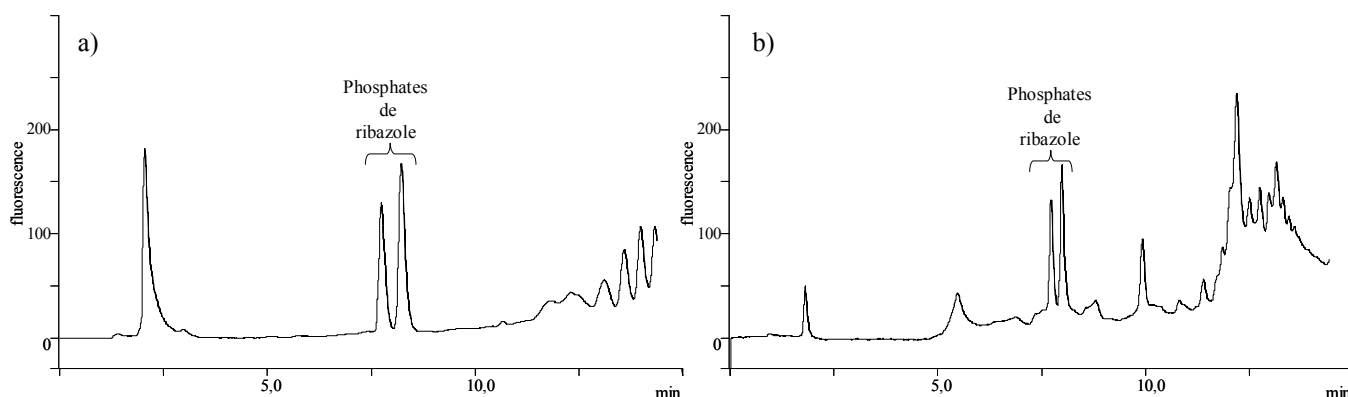


Figure 76. Analyse chromatographique [gradient tampon phosphate 33 mM (pH 7) - acétonitrile] d'une solution de cyanocobalamine à 100 ng.ml^{-1} après hydrolyse par NaOH 5 M à 100°C pendant 15 min avec une colonne chromatographique neuve (a) et avec cette même colonne usagée (après une cinquantaine d'analyses) (b).

La phase mobile précédente a tout d'abord été remplacée par un simple gradient eau - acétonitrile, la proportion d'acétonitrile variant de la même façon qu'auparavant lors de l'élution chromatographique. Les problèmes posés par la formation de bouchons ont ainsi disparu et la ligne de base du chromatogramme a été tout à fait satisfaisante. Toutefois les 2 isomères du phosphate de ribazole n'étaient plus séparés dans ces conditions chromatographiques (Figure 77). Le choix d'un gradient eau - acétonitrile associé à celui d'une phase stationnaire inverse n'est donc pas apparu très judicieux.

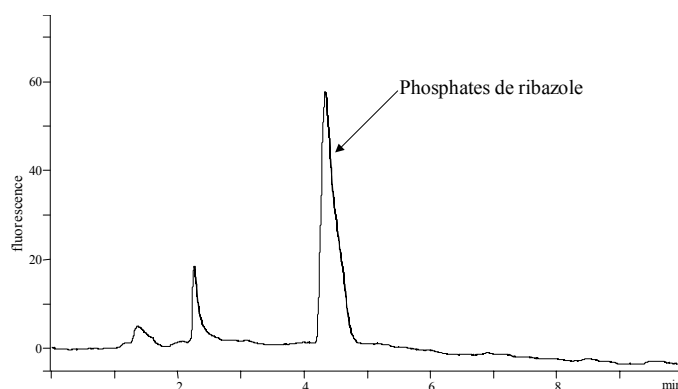


Figure 77. Analyse chromatographique [gradient eau - acétonitrile] d'une solution de cyanocobalamine (à 25 ng.ml^{-1}) après hydrolyse par NaOH 5 M à 100°C pendant 15 min.

Comme les deux isomères du phosphate de ribazole sont chargés négativement à pH 7, l'utilisation d'une chromatographie liquide par appariement d'ions a par la suite été envisagée. Des contre-ions positifs, comme le bromure de cetyltriméthylammonium (CTA) et l'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAH) ont été utilisés, soit en solution dans l'eau, soit dans un tampon

phosphate (pH 7). Un gradient eau - acétonitrile n'a jamais permis de séparer les deux isomères, quel que soit le contre-ion utilisé. L'utilisation du CTA avec le gradient tampon phosphate - acétonitrile s'est également révélée insatisfaisante. Seul un gradient tampon phosphate 33 mM (pH 7) - acétonitrile contenant du TBAH 0,5 mM a permis de séparer, partiellement, les deux isomères (le facteur de résolution n'a été que de 1,1) (Figure 78). Non seulement cette séparation s'est donc avérée peu satisfaisante, mais de nombreuses impuretés présentes dans le chromatogramme (signes avant-coureurs de la formation d'un bouchon ?) ont également empêché une intégration correcte des deux pics, en particulier lors du dosage de faibles concentrations en vitamine B₁₂. Le choix d'une chromatographie par appariement d'ions n'a donc pas été retenu.

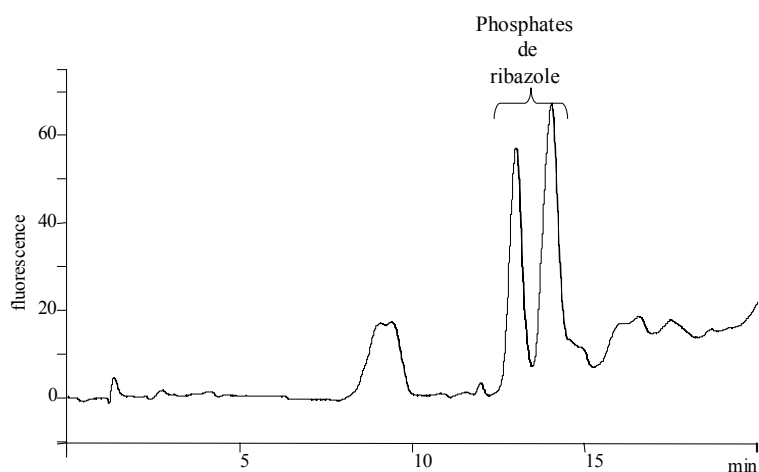


Figure 78. Analyse chromatographique [gradient tampon phosphate (TBAH) / acétonitrile] d'une solution de cyanocobalamine (à 100 ng.ml⁻¹) après hydrolyse par NaOH 5 M à 100°C pendant 15 min.

Il a par la suite été envisagé de faire l'hydrolyse alcaline en post-colonne, afin de n'obtenir qu'un seul pic pour les deux isomères du phosphate de ribazole, et d'utiliser une phase mobile tampon phosphate 33 mM (pH 3) / acétonitrile (voir p.94) afin d'éviter les risques de bouchons. L'utilisation d'un tampon phosphate (pH 3) présente par ailleurs l'avantage de pouvoir utiliser une concentration en hydroxyde de sodium dans le réacteur légèrement plus élevée lors de l'hydrolyse post-colonne que si on avait utilisé une phase mobile tamponnée à pH 7.

Avec le choix d'une hydrolyse alcaline post-colonne, les conditions expérimentales optimales retenues lors de l'hydrolyse pré-colonne (NaOH 5 M, 100°C, 15 min, voir p.114) ont nécessairement dû être modifiées. En effet, la durée d'hydrolyse ne pouvait dépasser 5 min (soit une longueur de réacteur de 40 m) sous peine de provoquer un élargissement trop important des pics chromatographiques. Le réacteur a été placé dans un four dont la température de consigne était de 99°C. Par ailleurs, une concentration en hydroxyde de sodium de 5 M ne pouvait être utilisée en raison de la résistance limitée de la tubulure PTFE du réacteur post-colonne à une telle concentration. Il était donc inévitable d'obtenir un rendement de formation du phosphate de

ribazole nettement plus faible avec une hydrolyse post-colonne qu'en pratiquant une hydrolyse pré-colonne.

Seuls la concentration en hydroxyde de sodium dans le réacteur et le débit pour la solution de dérivation ont été optimisés. La concentration optimale en hydroxyde de sodium dans le réacteur a été trouvée à 150 mM (essais réalisés avec des concentrations en hydroxyde de sodium dans le réacteur variant de 70 à 150 mM). Le débit le plus lent pour la solution de dérivation a bien entendu donné les meilleurs résultats (essais réalisés avec 0,3, 0,5 et 1 ml.min⁻¹). L'isolement chromatographique de la cyanocobalamine sous forme de phosphate de ribazole (pic unique) n'a pas posé de problèmes particuliers après avoir effectué une hydrolyse post-colonne à 99°C pendant 5 min avec une solution d'hydroxyde de sodium 150 mM (Figure 79). Mais la limite de quantification de la cyanocobalamine obtenue dans les conditions optimales d'hydrolyse compatibles avec la mise en œuvre d'un dispositif post-colonne (concentration en hydroxyde de sodium dans le réacteur de 150 mM, réacteur de 40 m placé dans un four à 99°C, un débit de la pompe de 0,3 ml.min⁻¹ pour la solution de dérivation) est restée, comme cela était prévu, bien plus élevée (5,1 ng) que celle obtenue avec une hydrolyse pré-colonne (0,15 ng). La teneur minimale quantifiable dans l'aliment serait donc de l'ordre de 500 ng.g⁻¹, ce qui n'autorise pas le dosage de la vitamine B₁₂ dans les aliments.

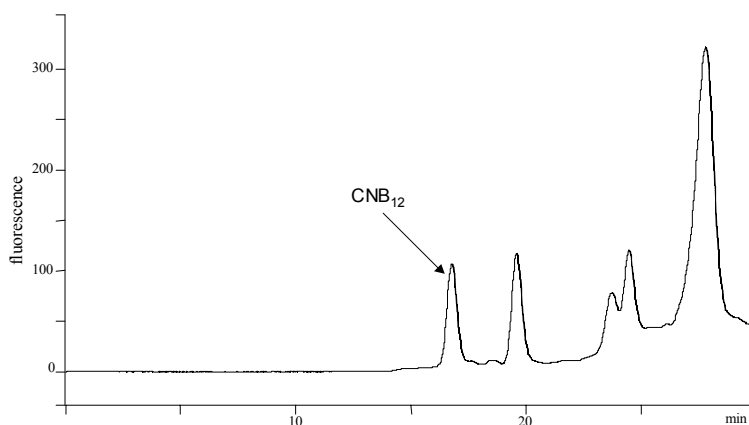


Figure 79. Analyse chromatographique d'une solution de cyanocobalamine (à 1,3 µg.ml⁻¹) avec hydrolyse alcaline post-colonne (concentration en hydroxyde de sodium dans le réacteur de 150 mM, réacteur de 40 m placé dans un four à 99°C, débit de 0,3 ml.min⁻¹ pour la solution de dérivation)

Pour pouvoir augmenter la sensibilité du dispositif d'hydrolyse post-colonne, il faudrait pouvoir augmenter la concentration en hydroxyde de sodium. Ceci impliquerait alors l'utilisation d'une tubulure en inox et d'une deuxième pompe fournissant de l'acide concentré afin de réajuster le pH de la phase mobile entre 6 et 11 à l'issue de l'hydrolyse alcaline (d'où une forte augmentation de la concentration en sels dans les tubulures). De telles conditions opératoires ne semblent guère envisageables techniquement.

3.4.2.4. Conclusions

Finalement, il a été jugé plus judicieux d'abandonner l'idée (à vrai dire pas très satisfaisante) de doser les deux isomères du phosphate de ribazole et d'utiliser ce composé comme marqueur fluorescent de la vitamine B₁₂, et de transformer, avant l'étape chromatographique, les isomères du phosphate de ribazole en ribazole, non pas en rendant plus drastiques les conditions d'hydrolyse alcaline précédemment retenues, mais en faisant suivre ce traitement par un traitement enzymatique à la phosphatase alcaline, et ainsi de n'avoir plus qu'un seul composé chimique à isoler et à doser par chromatographie liquide / fluorimétrie.

3.4.3. La libération du ribazole

Après avoir hydrolysé la vitamine B₁₂ en phosphate de ribazole, la solution obtenue a été traitée par une phosphatase alcaline afin de transformer le phosphate de ribazole en ribazole. Les conditions d'hydrolyse en phosphate de ribazole ont été optimisées dans le paragraphe précédent (hydrolyse par l'hydroxyde de sodium 5 M à 100°C pendant 15 min). Le pH du mélange réactionnel a ensuite été ajusté à 7 avec de l'acide chlorhydrique 5 M. La phosphatase contenue dans 1,5 ml de tampon Tris 300 mM (pH 8) a été ajoutée. Dans un premier temps (c'est-à-dire avant de disposer d'un protocole analytique complet permettant de réaliser l'optimisation de ce traitement enzymatique sur un échantillon alimentaire), le nombre d'unités de phosphatase alcaline utilisée a été fixé arbitrairement à 7,5 U, donc vraisemblablement en très large excès. La durée de l'incubation a été de 16 h à 37°C.

Les conditions chromatographiques choisies pour isoler le ribazole ainsi formé ont tout d'abord été celles utilisées précédemment pour l'analyse des isomères du phosphate de ribazole [gradient tampon phosphate 33 mM (pH 7) - acétonitrile, phase stationnaire octadécylsilane, détection fluorimétrique ($\lambda_{\text{ex}}=280$ nm et $\lambda_{\text{em}}=312$ nm), voir p.93]. La limite de quantification obtenue (0,075 ng) et l'isolement chromatographique (Figure 80) ont été tout à fait satisfaisants, mais pour les mêmes raisons que celles rencontrées précédemment (surpression dans le dispositif chromatographique en raison de la formation de bouchons), cette phase mobile a dû être abandonnée.

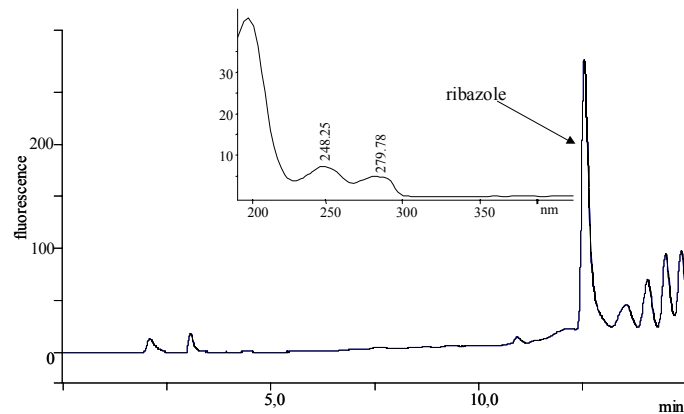


Figure 80. Analyse chromatographique d'une solution de cyanocobalamine (à 100 ng.ml⁻¹) après transformation pré-colonne du vitamère en ribazole [utilisation d'un gradient tampon phosphate (pH 7) - acétonitrile, λ_{ex} =280 nm, λ_{em} =312 nm].

Les conditions chromatographiques ont donc été modifiées (utilisation d'un gradient eau - acétonitrile), la phase stationnaire et les longueurs d'onde d'excitation et d'émission restant identiques. L'éluant de départ a été un mélange eau - acétonitrile [80/20 (v/v)]. La proportion d'acétonitrile a ensuite été augmentée linéairement de 20 à 40 % en 20 min, la composition finale [60/40 (v/v)] ayant été maintenue pendant 10 min. La phase mobile a ensuite été ramenée immédiatement à sa composition initiale [80/20 (v/v)]. Le débit de la phase mobile a été de 1 ml.min⁻¹ et le volume d'injection de 100 μ l.

L'isolement chromatographique du ribazole n'a pas posé de problèmes (Figure 81). Le pic chromatographique obtenu s'est par contre nettement élargi et a présenté une traînée, vraisemblablement en raison d'interactions entre le ribazole et les groupements silanols résiduels de la phase stationnaire, en dépit de l'utilisation d'une colonne de type « endcapped » (phénomène sans aucun doute amplifié par le remplacement du tampon phosphate par de l'eau), ce qui a eu pour effet d'augmenter d'un facteur quatre la limite de quantification de ce dispositif chromatographique par rapport à celle obtenue lors de l'utilisation d'un gradient tampon phosphate - acétonitrile et de le rendre inutilisable pour le dosage de la vitamine B₁₂ dans les aliments.

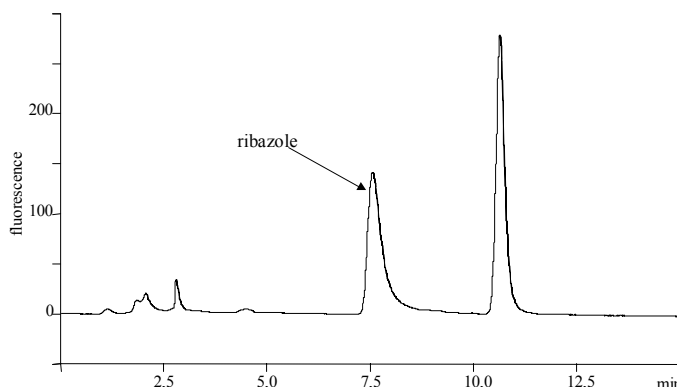


Figure 81. Analyse chromatographique d'une solution de cyanocobalamine (à 100 ng.ml⁻¹) après transformation pré-colonne du vitamère en ribazole [utilisation d'un gradient eau - acétonitrile, λ_{ex} =280 nm, λ_{em} =312 nm].

Pour tenter d'abaisser cette limite de quantification, deux voies ont été envisagées : augmenter la sensibilité du détecteur fluorimétrique et chercher à réduire la largeur du pic chromatographique.

Le spectre d'absorption UV du ribazole (Figure 82) présente en fait deux maxima d'absorption, l'un à 280 nm, l'autre proche de 250 nm. Le coefficient d'extinction molaire est plus élevé à 250 nm qu'à 280 nm, il est donc possible d'obtenir une émission de fluorescence un peu plus importante en excitant cette molécule à 250 nm plutôt qu'à 280 nm.

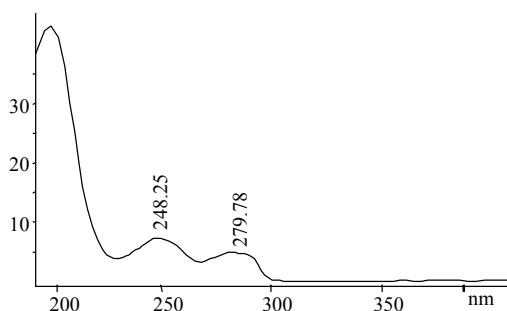


Figure 82. Spectre d'absorption UV du ribazole.

De plus, lorsque les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont proches (comme c'est le cas pour 280 et 312 nm), un artefact provenant de la phase mobile peut apparaître (Rouessac et Rouessac, 1998). Ce phénomène, appelé diffusion Raman, provient du transfert d'une partie de l'énergie de la radiation excitatrice aux molécules de solvant qui vont réémettre des photons. Pour des solvants tels que l'eau et l'acétonitrile, le pic correspondant à la diffusion Raman sera observé à environ 310 nm pour une excitation à 280 nm. Ainsi en se plaçant à ces longueurs d'onde d'excitation et d'émission et en utilisant l'amplification maximale du détecteur fluorimétrique, le signal de fluorescence sera saturé par l'émission de la phase mobile. En excitant à 250 nm par contre, le pic correspondant à la diffusion Raman se déplace aux environs de 270 nm. La détection de la fluorescence à 312 nm n'étant plus perturbée par le pic de diffusion Raman, il a été possible d'amplifier le signal de fluorescence au maximum (d'où la différence d'échelle dans les figures 86 et 88). La longueur d'onde d'excitation a donc finalement été fixée à 250 nm.

D'autres conditions chromatographiques ont ensuite été testées afin d'obtenir un pic chromatographique plus fin. Un gradient eau - méthanol a ainsi été choisi comme phase mobile en lieu et place du gradient eau - acétonitrile. L'éluant de départ était un mélange eau - méthanol [60/40 (v/v)]. La proportion de méthanol a ensuite été augmentée linéairement de 40 à 80 % en 20 min, la composition finale [20/80 (v/v)] ayant été maintenue pendant 10 min. La phase mobile a ensuite été ramenée immédiatement à sa composition initiale [60/40 (v/v)]. Le débit a été de 1 ml.min⁻¹ et le volume d'injection de 100 µl.

Cette phase mobile a permis d'obtenir un isolement chromatographique tout à fait correct du pic de ribazole (Figure 83). Par ailleurs, ce pic apparaît beaucoup plus fin que celui obtenu avec le gradient eau - acétonitrile. Il est probable qu'en utilisant le méthanol comme phase mobile les groupements silanols résiduels de la phase stationnaire aient interagi moins fortement avec les fonctions alcools du ribazole.

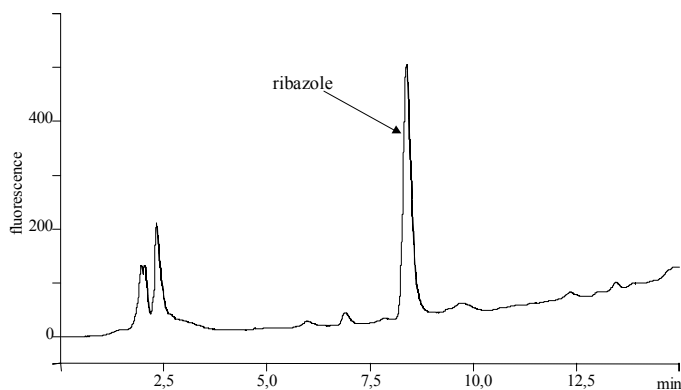


Figure 83. Analyse chromatographique d'une solution de cyanocobalamine (à 10 ng.ml⁻¹) avec transformation pré-colonne du vitamère en ribazole [utilisation d'un gradient eau - méthanol, λ_{ex} =250 nm, λ_{em} =312 nm]

Un étalonnage externe a été effectué dans ces conditions chromatographiques avec des solutions étalons de cyanocobalamine dont les concentrations variaient de 0,5 ng.ml⁻¹ à 15 ng.ml⁻¹. La courbe d'étalonnage (aire des pics en fonction de la concentration en cyanocobalamine), obtenue après régression linéaire des points expérimentaux, a présenté une bonne *linéarité* (coefficient de régression de 0,9998) (Figure 84).

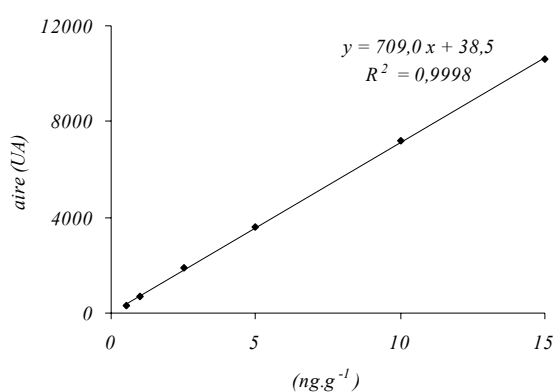


Figure 84. Courbe d'étalonnage pour le dosage de la cyanocobalamine (après transformation en ribazole).

La *répétabilité* mesurée en effectuant 6 analyses le même jour d'une solution étalon à 10 ng.ml⁻¹ de cyanocobalamine (hydrolysée en ribazole) a été de 2,3 %, ce qui est tout à fait satisfaisant. La répétabilité « day-to-day » obtenue en effectuant ces 6 analyses à 6 dates différentes a été de 2,0 %, ce qui est toujours excellent.

La limite de quantification a été de 0,045 ng. La teneur minimale quantifiable serait donc de l'ordre de 27 ng.g⁻¹, en considérant que le traitement pré-colonne mis en œuvre (hydrolyses alcaline et enzymatique) entraîne une dilution d'un facteur 6 de l'échantillon alimentaire. Cette teneur pourrait toutefois être encore abaissée à 17 ng.g⁻¹ en augmentant la prise d'essai jusqu'à 8 g.

En conclusion, le ribazole apparaît donc comme un marqueur fluorescent de la vitamine B₁₂ meilleur que le phosphate de ribazole¹. Le protocole analytique, tel qu'il est proposé (hydrolyse alcaline puis traitement par la phosphatase alcaline, CLHP avec élution à gradient et détection fluorimétrique) ne permet cependant de doser la vitamine B₁₂ que dans les aliments où sa teneur est relativement élevée (voir tableau XI, p.76). Par ailleurs il ne garantit nullement la spécificité du dosage. L'introduction d'une étape de purification de l'extrait à analyser avant la réalisation du traitement alcalin apparaît donc tout à fait indispensable, non seulement pour résoudre les problèmes d'interférences chromatographiques susceptibles de se poser lors de l'analyse d'échantillons alimentaires, mais surtout pour éliminer le phosphate de ribazole et le ribazole qui seraient naturellement présents dans ces échantillons. En effet, lors de la biosynthèse de la vitamine B₁₂, le ribazole réagit en fin de synthèse sur une cobinamide pour former les cobalamines (Renz, 1971 ; Maggio-Hall et Escalante-Semerena, 1999). Il est donc fort possible que le ribazole et le phosphate de ribazole existent à l'état libre dans des matrices alimentaires. L'utilisation d'un mode d'extraction en phase solide très spécifique présenterait par ailleurs l'avantage de permettre éventuellement une concentration intermédiaire de l'extrait analytique, et donc un abaissement de la teneur minimale de vitamine B₁₂ quantifiable dans l'échantillon analysé.

¹ Le diméthylbenzimidazole pourrait également constituer un marqueur fluorescent de la vitamine B₁₂. Sa formation à partir du ribazole (par élimination du ribose, voir figure 47, p.75) exigerait cependant, selon Wagner et Folkers (1963), des conditions d'hydrolyse très drastiques (HCl 6 M, 150°C pendant 20 h). Celles-ci sont difficiles à envisager dans le cadre d'un tel protocole analytique.

3.5. L'UTILISATION DU RIBAZOLE COMME MARQUEUR FLUORESCENT POUR LE DOSAGE DE LA VITAMINE B₁₂. AMELIORATION DE LA SPECIFICITE ET DE LA SENSIBILITE DU PROTOCOLE ANALYTIQUE

3.5.1. La mise en évidence d'une présence naturelle de phosphate de ribazole et de ribazole dans un échantillon alimentaire

Le foie de porc a été choisi comme matrice test car, hormis le fait que ce soit un aliment riche en vitamine B₁₂, il est le siège d'une très forte activité métabolique. Il est donc susceptible de contenir des quantités importantes de phosphate de ribazole et de ribazole.

Lors de l'analyse d'un échantillon de cet aliment préalablement hydrolysé en milieu alcalin, puis traité par la phosphatase alcaline, il n'a pas été possible d'isoler correctement le ribazole en raison de l'existence de nombreuses interférences chromatographiques (Figure 85). Il s'est donc avéré nécessaire, pour pouvoir répondre à la question posée, de proposer préalablement un protocole de purification de l'extrait.

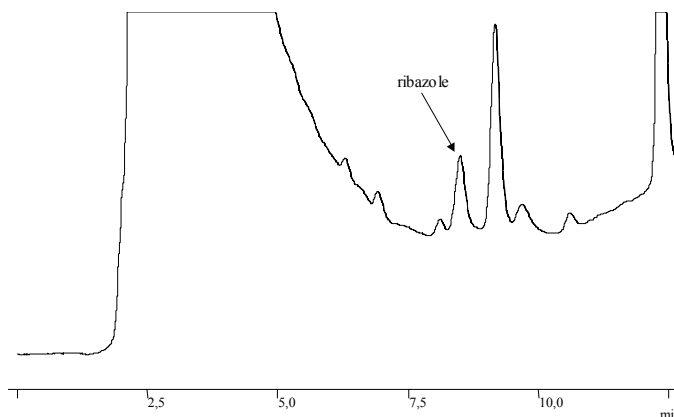


Figure 85. Analyse chromatographique d'un échantillon de foie de porc après hydrolyse alcaline (hydroxyde de sodium 5 M, 15 min, 100°C) et traitement par une phosphatase alcaline.

La vitamine B₁₂ étant sous forme neutre, quel que soit le pH de la solution, l'utilisation d'une extraction en phase solide sur cartouche C₁₈ a donc pu être envisagée pour purifier l'échantillon. Iwase et Ono (1997) et Lambert *et al.* (1992) avaient effectivement déjà eu recours à un tel mode de purification lors de l'analyse de préparations multivitaminées.

La validité de ce mode de purification a tout d'abord été testée à l'aide d'une solution étalon d'hydroxocobalamine. La cartouche C₁₈, préalablement conditionnée par passage de 5 ml de méthanol, puis de 5 ml d'eau, a été lavée avec 5 ml d'eau après dépôt de 4 ml d'une solution d'hydroxocobalamine à 25 ng.ml⁻¹. L'élution a été effectuée avec 2 fractions de 5 ml de méthanol.

Chaque fraction méthanolique a été évaporée à sec, puis l'hydroxocobalamine a été transformée en ribazole. La totalité de la vitamine B₁₂ déposée sur la cartouche a en fait pu être récupérée dans la première fraction d'élution.

Des essais de purification ont donc ensuite été réalisés sur l'extrait aqueux de foie de porc (prise d'essai de 5 g) préalablement centrifugé et filtré. Une fois l'extrait à purifier déposé (1 ml) sur la cartouche C₁₈, lavé avec 5 ml d'eau et élué avec 5 ml de méthanol, l'extrait méthanolique a été évaporé à sec, puis hydrolysé afin de libérer le ribazole. Le chromatogramme obtenu a été relativement satisfaisant (Figure 86). La teneur en vitamine B₁₂ obtenue (exprimée en équivalent cyanocobalamine) a été de 124 ng.g⁻¹, en admettant bien sûr que tout le ribazole dosé provenait de la vitamine B₁₂ contenue dans le foie de porc, ce qui n'est nullement certain.

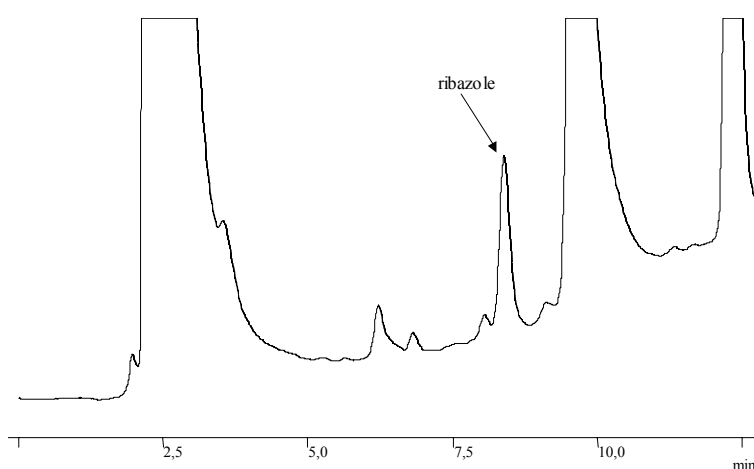


Figure 86. Analyse chromatographique d'un échantillon de foie de porc après purification par passage sur cartouche C₁₈ de l'extrait aqueux, hydrolyse alcaline (hydroxyde de sodium 5 M, 15 min, 100°C) et traitement par une phosphatase alcaline.

En analysant le même extrait de foie de porc purifié par passage sur cartouche C₁₈, mais sans procéder à une hydrolyse alcaline, ni à un traitement par la phosphatase (donc en laissant intacte la vitamine B₁₂), 17 ng.g⁻¹ de ribazole libre (en équivalent cyanocobalamine) ont effectivement été retrouvés¹. Une analyse de ce même aliment effectuée en omettant seulement l'hydrolyse alcaline a conduit à l'obtention d'une teneur en ribazole (exprimée en équivalent cyanocobalamine) de 98 ng.g⁻¹ (Figure 87). La teneur en phosphate de ribazole libre (exprimée en cyanocobalamine) était ainsi de 81 ng.g⁻¹ dans l'échantillon de foie de porc. La teneur réelle en vitamine B₁₂ dans cet échantillon (exprimée en équivalent cyanocobalamine) n'était donc que de 26 ng.g⁻¹ (et non de 124 ng.g⁻¹).

¹ Une telle concentration peut être mesurée par le protocole analytique proposé car la purification par extraction en phase solide sur cartouche C₁₈ permet de concentrer (facteur 2) l'échantillon analysé. La concentration minimale quantifiable de ce protocole est alors de 13,5 ng.g⁻¹ (et non plus de 27 ng.g⁻¹).

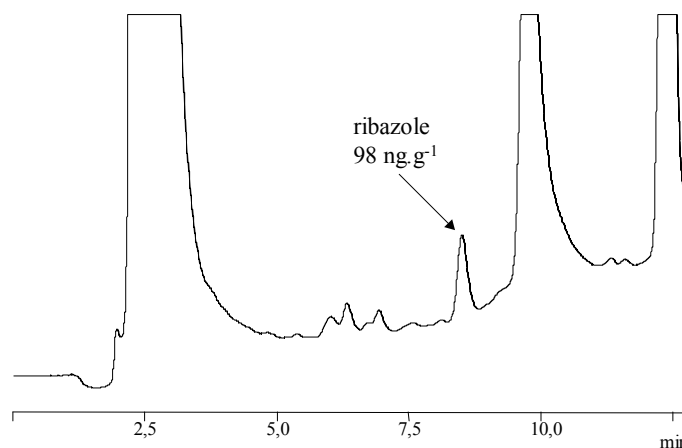


Figure 87. Analyse chromatographique d'un échantillon de foie de porc après purification par passage sur cartouche C₁₈ de l'extrait aqueux et traitement par une phosphatase alcaline.

La méthode de dosage de la vitamine B₁₂ proposée (purification par passage sur cartouche C₁₈, hydrolyse alcaline et traitement par la phosphatase alcaline, CLHP/ fluorimétrie) n'est donc pas spécifique puisque la présence de ribazole et de phosphate de ribazole libres a pu être constatée dans l'échantillon de foie de porc. Comme il n'était pas concevable, pour une question de temps, de procéder pour chaque échantillon alimentaire aux dosages successifs du ribazole libre, puis du phosphate de ribazole libre et enfin de la vitamine B₁₂ (comme cela a été fait pour l'échantillon de foie de porc), il a paru indispensable de chercher un mode de purification des échantillons alimentaires plus spécifique que l'extraction en phase solide envisagée dans ce paragraphe (cartouche C₁₈) et permettant si possible une concentration de l'extrait purifié (donc un abaissement de la concentration minimale quantifiable). Deux voies peuvent être envisagées : le choix d'une extraction en phase solide sur colonne d'affinité (présence du facteur intrinsèque fixé sur un gel) ou d'une extraction en phase solide sur colonne d'immunoaffinité (présence d'un anticorps fixé sur un gel).

3.5.2. Les essais de purification des extraits alimentaires par extraction en phase solide sur colonne d'affinité

Aucune colonne d'affinité avec le facteur intrinsèque n'existant commercialement, celle-ci a été préparée au laboratoire selon un protocole analogue à celui utilisé pour la préparation des colonnes de folate binding proteins (Ndaw *et al.*, 2001).

Cinq cents unités de facteur intrinsèque (I 6006, Sigma) ont été mis en solution dans 3 ml d'une solution d'hydrogencarbonate de sodium 100 mM (pH 8,3), puis mélangés à 4 ml de gel Affigel 10 (Biorad, Marnes-la-Coquette, France), préalablement lavés avec la même solution d'hydrogencarbonate de sodium. Le mélange a été mis sous agitation à 4°C pendant une nuit. Quatre cents µl d'une solution d'éthanolamine 1M (pH 8) ont ensuite été ajoutés afin de bloquer

les sites de fixation restés libres. Le mélange a été placé de nouveau à 4°C sous agitation pendant 1h. Le gel ainsi obtenu a été transféré dans 2 colonnes de verre (0,7 * 10 cm, 4 ml, C3669, Sigma). Les colonnes ont été lavées avec 10 ml de tampon acétate 200 mM (pH 4,8), puis 10 ml de tampon borate 100 mM (pH 8). Elles ont été conservées à 4°C avec du tampon borate 100 mM (pH 8) contenant 0,2 % (m/v) d'azide de sodium.

Pour les essais, 100 ng d'hydroxocobalamine, en solution dans 5 ml de tampon borate 100 mM (pH 8), ont été déposés sur une colonne. Celle-ci a été lavée avec 10 ml de tampon borate 25mM (pH 8). L'élution a ensuite été réalisée avec 5 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 20 mM contenant 0,3 g.ml⁻¹ de dithioérythritol. A 5 ml de chaque fraction récupérée a été ajouté 0,5 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 5 M (libération du phosphate de ribazole), puis 0,5 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 5 M et 2 ml d'une solution tamponnée de phosphatase (transformation du phosphate de ribazole en ribazole¹). En fait, la totalité de la vitamine a été éluée directement sans être retenue sur la colonne. Ce type de colonne n'a donc pas permis, dans les conditions opératoires choisies, d'extraire spécifiquement la vitamine B₁₂, contrairement à ce qui était attendu.

3.5.3. La purification des extraits alimentaires par passage sur colonne d'immunoaffinité

Des colonnes d'immunoaffinité B₁₂, fabriquées par R-Biopharm, ont été testées à l'aide de solutions étalons d'hydroxocobalamine. Ces colonnes, constituées d'un gel sur lequel est fixé un anticorps de la vitamine B₁₂, ont été préalablement conditionnées par passage de 5 ml d'eau, puis de 5 ml de tampon phosphate 100 mM (pH 7). Cent ng d'hydroxocobalamine, en solution dans 5 ml d'eau distillée, ont alors été déposés sur la colonne. Celle-ci a été lavée avec 10 ml de tampon phosphate 100 mM (pH 7), puis 5 ml d'eau distillée. Après avoir séché la colonne avec de l'air, l'élution a été effectuée en faisant passer 3 ml de méthanol.

Les résultats obtenus ont été très bons puisque la totalité de la vitamine déposée a effectivement été éluée par le méthanol. Des essais de purification ont ensuite été réalisés en utilisant une matrice simple (solution multivitaminée Juvamine). Le chromatogramme obtenu (Figure 88) a été très satisfaisant. Par ailleurs la teneur retrouvée (1,1 µg / gélule) était en bon accord avec la valeur annoncée par le fabricant (environ 1 µg / gélule).

¹ La transformation de l'hydroxocobalamine en ribazole est indispensable car les concentrations du vitamère à mesurer sont trop faibles pour pouvoir l'être directement par photométrie UV.

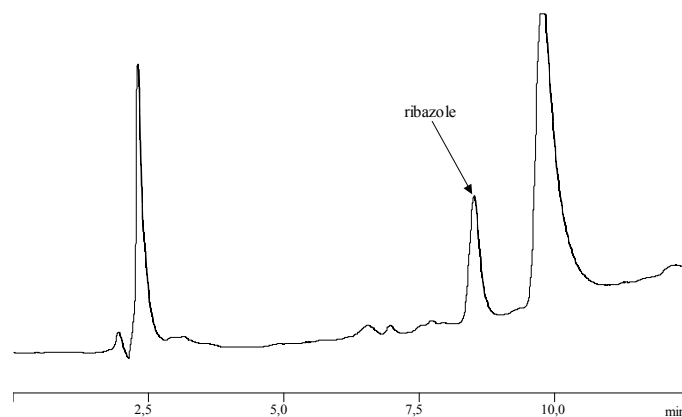


Figure 88. Analyse chromatographique d'une solution multivitaminée Juvamine après purification par passage sur colonne d'immunoaffinité de l'extrait aqueux, hydrolyse alcaline (hydroxyde de sodium 5 M, 15 min, 100°C) et traitement par une phosphatase alcaline.

Les résultats obtenus étant très encourageants, des essais ont été réalisés sur une matrice plus complexe, le foie de porc. Le chromatogramme obtenu (Figure 89-a) a permis une bonne intégration du pic correspondant au ribazole. La teneur en vitamine B₁₂ trouvée (25 ng.g⁻¹), plus faible que celle indiquée par Souci *et al.* (1994) (voir tableau XI, p.76), correspond cependant à la teneur trouvée précédemment (26 ng.g⁻¹) (voir § 3.5.1, p.124), obtenue après détermination des teneurs en ribazole et phosphate de ribazole libres contenus dans cet aliment, ce qui confirme l'excellente spécificité de la méthode de purification proposée. L'absence de ribazole retrouvé dans un échantillon de foie de porc purifié par passage sur colonne d'immunoaffinité (échantillon traité par la phosphatase, mais non hydrolysé en milieu alcalin) (Figure 89-b) confirme bien que le ribazole et le phosphate de ribazole libres n'ont pas été retenus sur la colonne d'immunoaffinité. Le taux de recouvrement de cyanocobalamine a par ailleurs été très satisfaisant (98 %).

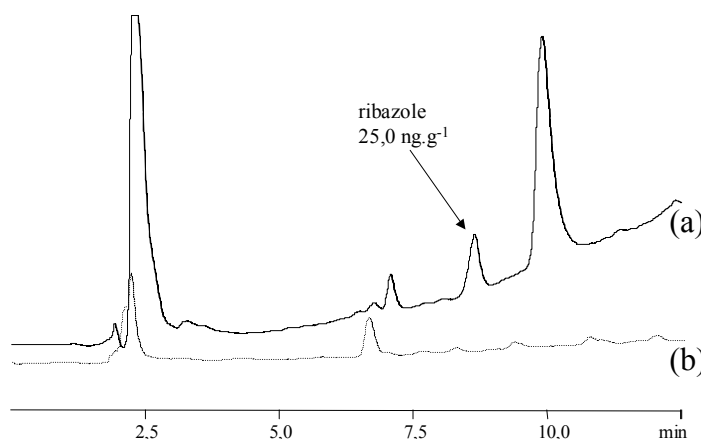


Figure 89. Analyse chromatographique d'un échantillon de foie de porc après purification par passage sur colonne d'immunoaffinité de l'extrait aqueux suivie (a) d'une hydrolyse alcaline (hydroxyde de sodium 5 M, 15 min, 100°C) et d'un traitement par une phosphatase alcaline ou (b) d'un simple traitement par la phosphatase.

L'utilisation d'une colonne d'immunoaffinité a ainsi permis d'obtenir une excellente purification des échantillons analysés (bon isolement chromatographique du ribazole et excellente spécificité). Cette étape de purification a aussi permis, et c'est extrêmement important de le noter,

de concentrer l'extrait alimentaire (évaporation à sec de la fraction méthanolique et reprise dans 0,5 ml d'eau distillée), d'un facteur 2, en cas de dépôt d'1 ml d'extrait sur la colonne, à 6 si 3 ml d'extrait sont déposés sur la colonne (cas de matrices contenant très peu de vitamine B₁₂). La teneur minimale quantifiable serait donc 6 fois plus faible que celle obtenue précédemment, sans effectuer de purification de l'échantillon sur colonne d'immunoaffinité (17 ng.g⁻¹, voir p.124). Elle serait donc de l'ordre de 3 ng.g⁻¹. Il apparaît donc maintenant tout à fait envisageable, avec un tel protocole, de procéder au dosage de la vitamine B₁₂ dans n'importe quel aliment non complémenté.

3.6. LE DOSAGE DE LA VITAMINE B₁₂ LIBRE DANS DIVERS ALIMENTS

Le protocole analytique proposé pour le dosage de la vitamine B₁₂ libre [mise en solution de la vitamine B₁₂ dans de l'eau distillée, purification de cette solution par passage sur une colonne d'immunoaffinité, transformation de la vitamine en ribazole par hydrolyse alcaline et traitement par la phosphatase, isolement par chromatographie liquide et détection fluorimétrique] a permis d'obtenir, avec toutes les matrices testées (viandes, poissons et produits laitiers), un isolement et un dosage corrects du ribazole¹ (Figures 90 et 91).

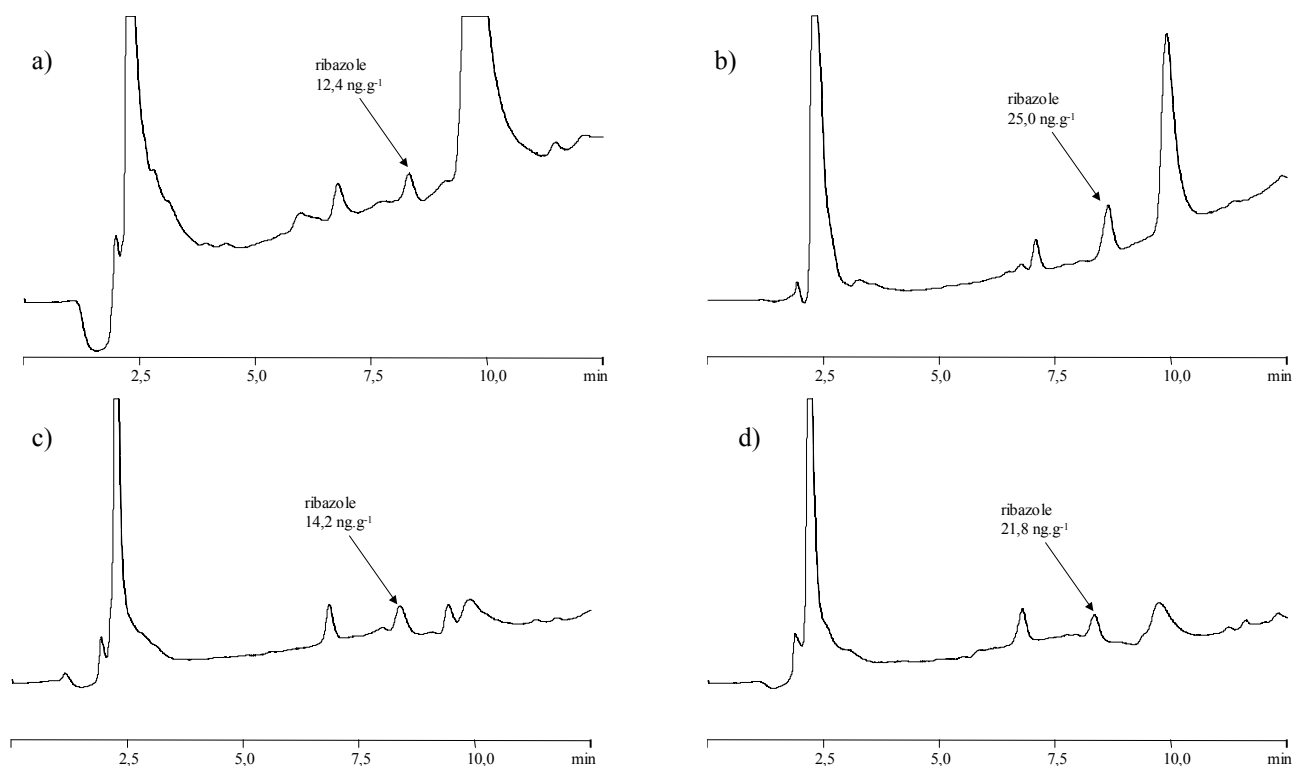


Figure 90. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B₁₂ libre dans le filet de boeuf (a), le foie de porc (b), le lait en poudre (c) et le maquereau (d).

¹ La quantité de phosphatase alcaline ajoutée aux échantillons alimentaires (7,5 U) permet effectivement de transformer la totalité du phosphate de ribazole en ribazole (voir 3.7.2, p.128).

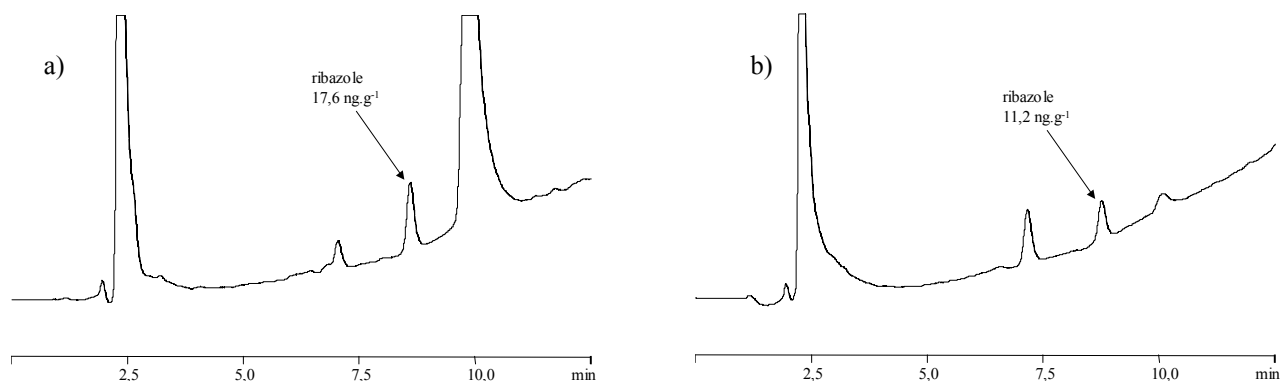


Figure 91. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B₁₂ libre dans l'œuf (a) et le saumon (b).

Les teneurs en vitamine B₁₂ libre et les taux de recouvrement obtenus sont présentés dans le tableau XIV.

Tableau XIV. Détermination des teneurs^a en vitamine B₁₂ libre (exprimées en équivalent cyanocobalamine) dans différents aliments.

aliment	teneur (ng.g ⁻¹)	écart-type (ng.g ⁻¹)	taux de recouvrement (%)
filet de bœuf	12,4	0,5	98
foie de porc	25,0	0,3	99
maquereau	21,8	0,7	100
saumon	11,2	0,3	98
lait en poudre	14,2	0,5	99
œuf	17,6	0,1	97

^a moyenne de 3 déterminations

Les taux de recouvrement de la vitamine B₁₂ ont été satisfaisants, de 97 à 100 %, ce qui atteste de la qualité du protocole proposé. Les coefficients de variation ont toujours été inférieurs à 5 %. Les teneurs des aliments sont comprises entre 11,2 et 25,0 ng.g⁻¹, l'aliment le plus riche en vitamine B₁₂ libre étant le foie de porc. Le lait en poudre, produit complétement dont la teneur annoncée est de 15 ng.g⁻¹, contient effectivement 14,2 ng.g⁻¹ de vitamine B₁₂ libre.

3.7. LA DÉTERMINATION DE LA VITAMINE B₁₂ TOTALE DANS LES ALIMENTS

La vitamine B₁₂ existe à l'état libre et/ou liée à des protéines dans les aliments. Les protocoles d'extraction pour le dosage de la vitamine B₁₂ totale habituellement proposés consistent (comme cela a déjà été indiqué précédemment, voir p.78) en un autoclavage des échantillons dans une solution tamponnée à pH 4,5 en présence de cyanure de potassium ou de métabisulfite de sodium [Watanabe *et al.*, 1998 ; Anon., 2000 ; Indyk *et al.*, 2002]. Ces conditions d'extraction sont cependant très éloignées des conditions physiologiques de la digestion et ne vont

peut-être pas refléter la réelle biodisponibilité de la vitamine B₁₂. Afin de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques, un traitement protéasique a été envisagé. La papaïne et la pepsine ont déjà été employées lors d'extraction enzymatique de la vitamine B₁₂ (Shenoy et Ramasarma, 1954 ; Kittang et Schjonsby, 1987). Le choix s'est naturellement porté sur la pepsine car cette enzyme intervient dans l'estomac lors de la digestion des protéines.

Une fois ce traitement enzymatique optimisé, il restera encore à optimiser le traitement de déphosphorylation du phosphate de ribazole en ribazole par la phosphatase alcaline pour disposer alors d'un protocole analytique complet permettant le dosage de la vitamine B₁₂ totale dans les aliments.

3.7.1. L'optimisation des conditions d'hydrolyse par la pepsine

L'hydrolyse a été effectuée dans un tampon acétate (50 mM, pH 4) sur une prise d'essai de 5 g de foie de porc précédemment chauffé à 100°C pendant 10 min afin de détruire les enzymes endogènes. La solution a été incubée à 37°C pendant 3 h après ajout de 1 ml d'une solution de pepsine [50 mg.ml⁻¹]. Le pH du mélange réactionnel a ensuite été ajusté à 7 avec une solution d'hydroxyde de sodium 5 M avant de procéder à la purification de l'extrait. Les essais effectués sur l'échantillon de foie de porc ont permis d'obtenir des chromatogrammes tout à fait corrects (Figure 92). Il restait néanmoins à optimiser les conditions d'hydrolyse par la pepsine et à voir si ce traitement avait une réelle utilité.

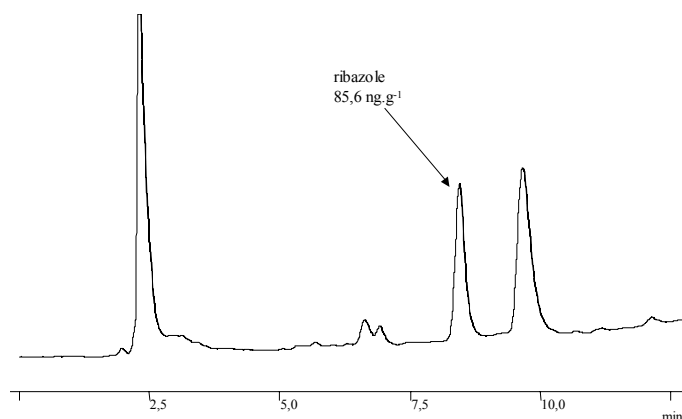


Figure 92. Analyse chromatographique d'un échantillon de foie de porc après traitement par la pepsine, purification par passage sur colonne d'immunoaffinité, hydrolyse alcaline et traitement par la phosphatase.

La quantité de pepsine utilisée a été portée successivement de 0 à 100 mg pour le traitement d'un échantillon de 5 g de foie de porc (matrice riche en protéines). La concentration en vitamine B₁₂ retrouvée dans cette matrice a augmenté avec la quantité de pepsine ajoutée, jusqu'à une valeur de 50 mg, valeur à partir de laquelle la concentration en vitamine B₁₂ a atteint un palier

(Figure 93). La quantité optimale de pepsine pour une incubation à 37°C pendant 3 h et pour un échantillon de 5 g de foie de porc était donc de 50 mg, soit environ 4500 U.

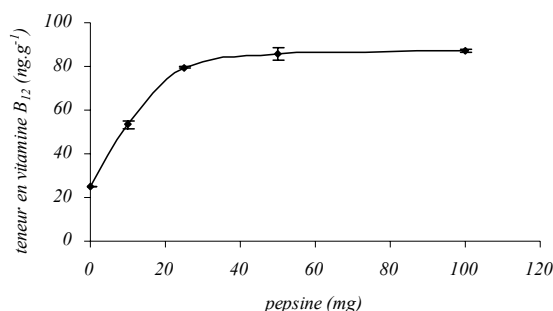


Figure 93. Teneur (en ng.g⁻¹) en vitamine B₁₂ totale (exprimée en équivalent cyanocobalamine) dans un échantillon de foie de porc (prise d'essai de 5 g) en fonction de la quantité de pepsine utilisée lors d'une incubation à 37°C pendant 3 h.

La teneur maximale en vitamine B₁₂ obtenue après traitement par la pepsine (85,6 ± 4,3 ng.g⁻¹) n'a pas été significativement différente de celle obtenue en autoclavant l'échantillon de foie de porc dans un tampon acétate 50 mM (pH 4,5) en présence de 100 mg de cyanure de potassium (84,6 ± 6,0 ng.g⁻¹). Les protocoles d'extraction habituellement utilisés apparaissent donc tout à fait efficaces dans ce cas pour libérer la totalité de la vitamine B₁₂, mais peuvent parfaitement être remplacés par un traitement par la pepsine.

Par mesure de précaution, il a finalement été décidé de recommander une quantité de pepsine deux fois plus importante (100 mg) dans le protocole final pour s'assurer d'une hydrolyse totale de la vitamine B₁₂ liée dans n'importe quel échantillon alimentaire.

3.7.2. L'optimisation des conditions d'hydrolyse du phosphate de ribazole en ribazole par la phosphatase alcaline

Tant que la méthode analytique en cours d'élaboration ne comportait pas d'étape d'extraction sélective de la vitamine B₁₂ (par passage sur colonne d'immunoaffinité), ni d'étape de libération des formes liées aux protéines, un très large excès de phosphatase alcaline a toujours été utilisé pour effectuer la transformation du phosphate de ribazole en ribazole. Disposant maintenant d'un protocole complet, une optimisation de la quantité de phosphatase alcaline a pu être effectuée, en utilisant comme aliment-test le foie de porc. Le nombre d'unités d'enzyme a été porté successivement de 0,25 à 7,5 U, l'incubation étant réalisée à 37°C pendant 16h. La teneur en vitamine B₁₂ a augmenté rapidement avec la quantité d'enzyme ajoutée, puis a atteint un palier

pour 2,5 U de phosphatase alcaline (Figure 94). Par mesure de précaution il a été décidé de tripler cette quantité (7,5 U) dans le protocole définitif ¹.

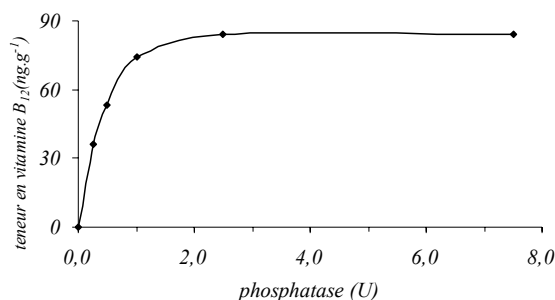


Figure 94. Teneur (en ng.g⁻¹) en vitamine B₁₂ totale (exprimée en équivalent cyanocobalamine) dans un échantillon de foie de porc (prise d'essai de 5 g) en fonction du nombre d'unités de phosphatase alcaline utilisée lors d'une incubation à 37°C pendant 16 h.

3.7.3. Les teneurs en vitamine B₁₂ totale de divers aliments

Les résultats obtenus avec le protocole finalement retenu [hydrolyse enzymatique par la pepsine (37°C, 3 h), purification de cette solution par passage sur une colonne d'immunoaffinité, transformation de la vitamine en ribazole par hydrolyse alcaline et traitement par la phosphatase, isolement par chromatographie liquide et détection fluorimétrique] sont donnés dans le tableau XV.

Tableau XV. Détermination des teneurs^a en vitamine B₁₂ totale (exprimées en équivalent cyanocobalamine) dans différents aliments.

aliment	teneur (ng.g ⁻¹)	écart-type (ng.g ⁻¹)	taux de recouvrement (%)
filet de bœuf	40	1	98
foie de porc	86	3	97
maquereau	140	5	95
saumon	26,3	0,5	100
lait en poudre	15,1	0,8	99
œuf	19,7	0,3	96

^a moyenne de 3 déterminations

Les taux de recouvrement de la vitamine B₁₂ ont été très satisfaisants, de même que les coefficients de variation (compris entre 1,7 et 5,4 %). L'application de ce protocole a toujours permis d'obtenir un très bon isolement chromatographique du ribazole (Figure 95), quel que soit l'aliment analysé.

¹ Cette quantité de phosphatase alcaline correspond donc à celle utilisée dans toutes les expériences réalisées précédemment.

Dans 5 sur 6 des matrices alimentaires analysées (filet de bœuf, foie de porc, maquereau, saumon et oeuf), les teneurs en vitamine B₁₂ totale ont augmenté significativement par rapport aux teneurs en vitamine B₁₂ libre (voir tableau XIV, p.129). Seule la teneur dans le lait en poudre n'a pas été modifiée par la mise en œuvre du traitement par la pepsine. La totalité de la vitamine B₁₂ présente dans cet aliment est donc sous forme libre, ce qui est parfaitement logique puisque cette matrice, contenant naturellement très peu de vitamine (environ 2 ng.g⁻¹ dans le lait liquide), a été complétée avec de la cyanocobalamine.

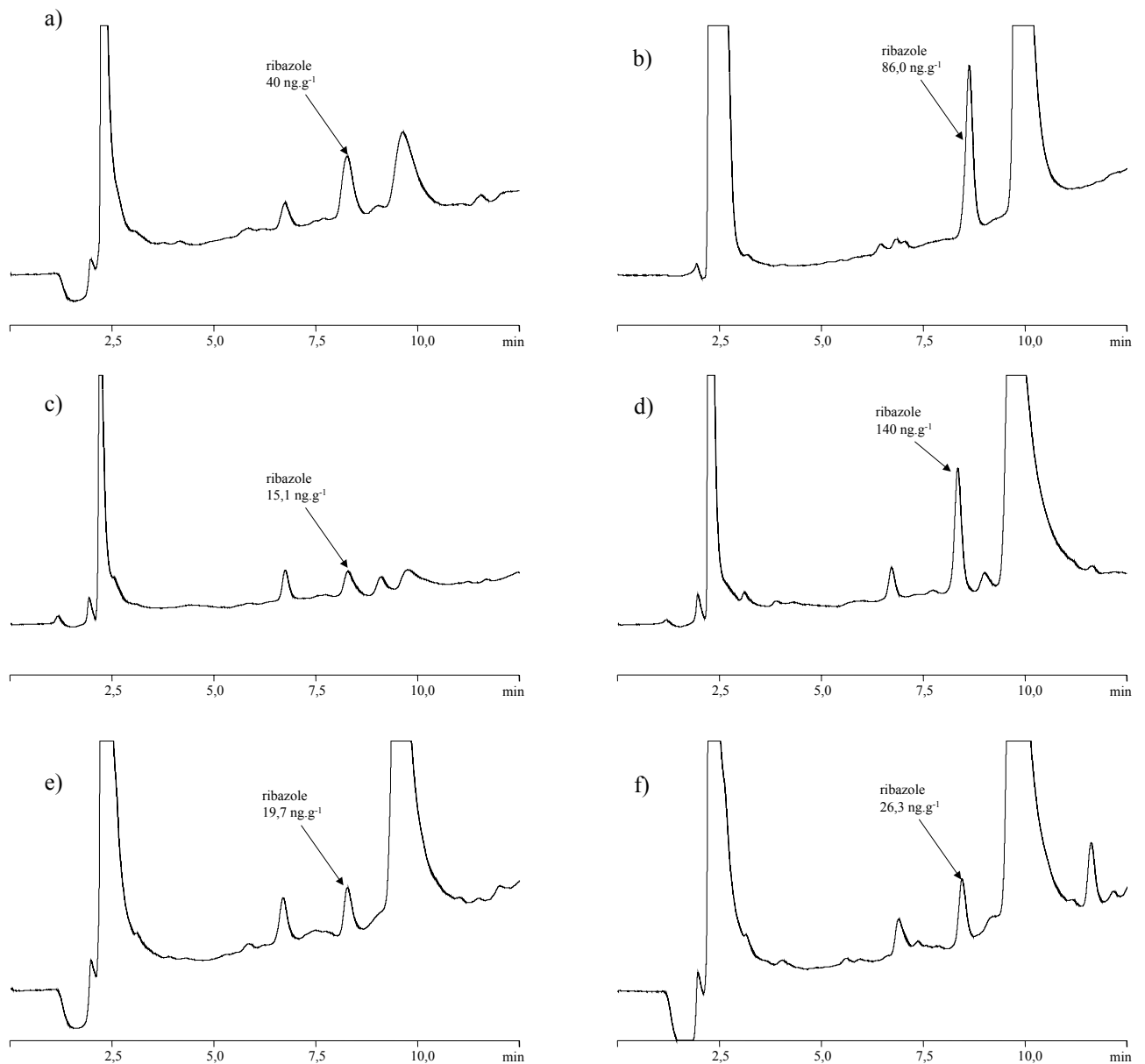


Figure 95. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B₁₂ totale dans le filet de boeuf (a), le foie de porc (b), le lait en poudre (c), le maquereau (d), l'œuf (e) et le saumon (f).

L'ensemble des teneurs déterminées dans les différents aliments analysés, ainsi que le pourcentage de vitamine B₁₂ libre sont indiqués dans le tableau XVI. Les teneurs fournies par Souci *et al.* (1994), déjà indiquées dans le tableau XI (p.76), sont également rappelées dans ce tableau.

Tableau XVI. Teneurs^a (ng.g⁻¹) en vitamine B₁₂ libre et en vitamine B₁₂ totale (exprimées en équivalent cyanocobalamine) dans différents aliments. Pourcentage de la vitamine B₁₂ libre.

aliment	vitamine B ₁₂ libre			vitamine B ₁₂ totale		<i>données extraites de Souci et al. (1994)</i>
filet de bœuf	12,4	(0,5)	31%	40	(1)	20,0
foie de porc	25,0	(0,3)	29%	86	(3)	230-550
maquereau	21,8	(0,7)	16%	140	(5)	50,0-140
saumon	11,2	(0,3)	43%	26,3	(0,5)	28,9
lait en poudre	14,1 ^b	(0,5)	100%	15,1 ^b	(0,8)	-
œuf	17,6	(0,1)	89%	19,7	(0,3)	8,4-31,3

^a moyenne de 3 déterminations (écart - type entre parenthèses)

^b moyennes non significativement différentes selon le test de comparaison des moyennes pour un intervalle de confiance de 95 % (voir chapitre 1, p.19)

Aucune étude n'ayant jusqu'à présent été réalisée pour estimer la teneur en vitamine B₁₂ libre, les résultats trouvés ne peuvent être comparés à d'autres. Le lait en poudre est un cas particulier car c'est un produit complétement contenant uniquement de la vitamine B₁₂ libre. Pour les autres matrices (le filet de bœuf, le foie de porc, le saumon et le maquereau), la vitamine B₁₂ liée aux protéines est majoritaire. Seul l'œuf contient majoritairement de la vitamine B₁₂ libre.

3.8. LES AVANTAGES DE LA METHODE D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE MISE AU POINT PAR RAPPORT A CEUX DE LA METHODE MICROBIOLOGIQUE HABITUELLEMENT PRATIQUEE

La concentration minimale quantifiable de la méthode microbiologique (1 ng.g⁻¹ dans l'aliment) est légèrement plus basse que celle de la méthode proposée à la suite de cette étude (3 ng.g⁻¹). Elles sont toutefois toutes les deux suffisamment basses pour permettre le dosage de la vitamine B₁₂ dans tous les aliments. Les teneurs obtenues par les deux méthodes semblent par ailleurs être en assez bon accord dans les différents aliments étudiés, sauf dans le foie de porc. Pour le saumon, le maquereau, l'œuf et le filet de bœuf, les teneurs trouvées lors de cette étude sont effectivement voisines des teneurs obtenues par la méthode microbiologique et répertoriées par Souci *et al.* (1994) (Tableau XVI). En ce qui concerne le foie de porc, le désaccord s'explique sans doute par le fait que cette matrice contient certainement une quantité importante de

cobalamines analogues inactives, dosées par la méthode microbiologique, et non par la méthode chromatographique proposée, ce qui pourrait alors expliquer les teneurs plus faibles en vitamine B₁₂ obtenues par application de cette nouvelle méthode.

La répétabilité des analyses réalisées par la méthode chromatographique (inférieure à 5 % dans toutes les matrices analysées) est bien meilleure que celle obtenue en utilisant la méthode microbiologique (habituellement de l'ordre de 10 % à 15 %).

Sur le plan pratique, 75 h sont nécessaires pour appliquer l'ensemble du protocole chromatographique à 24 échantillons. Pour la méthode microbiologique, compte tenu de la longue préparation des échantillons (2 dilutions supplémentaires par rapport à la méthode chromatographique et préparation de 5 tubes par échantillon pour le dosage) ainsi que de l'incubation de l'inoculum des échantillons pendant au minimum 48 h, 12 échantillons au maximum peuvent être analysés en 80 h. La méthode chromatographique proposée est donc nettement plus rapide que la méthode microbiologique.

La méthode chromatographique mise au point dans ce travail pourrait donc constituer une méthode de routine de dosage de la vitamine B₁₂ dans les aliments, en remplacement de la méthode de dosage microbiologique actuellement pratiquée.

4. CONCLUSION

Les méthodes chromatographiques proposées au cours de ces dernières années n'ont jamais permis un dosage satisfaisant de la vitamine B₁₂ dans les aliments en raison des très faibles teneurs en vitamine et du manque de sensibilité du mode de détection utilisé (absorption UV à 360 nm).

Les essais de greffage de molécules fluorophores sur les différentes fonctions organiques de la vitamine B₁₂ ou sur l'atome de cobalt de cette molécule (substitution du ligand axial par un ligand fluorophore) se sont toujours soldés par des échecs. Une hydrolyse alcaline (pré-colonne) de la vitamine B₁₂, immédiatement suivie d'un traitement par une phosphatase alcaline, a par contre eu pour conséquence la libération d'un marqueur fluorescent de la vitamine B₁₂, le ribazole. L'isolement chromatographique et le dosage fluorimétrique de cette molécule, associés à une purification préalable de la solution à analyser par extraction en phase solide sur colonne d'immunoaffinité, a ainsi permis de concevoir une méthode d'analyse originale, à la fois spécifique, précise (coefficients de variation compris, selon les aliments, entre 0,6 % et 5,4 %) et sensible (teneur minimale quantifiable de 3 ng.g⁻¹) de la vitamine B₁₂ libre présente dans un aliment. Un traitement protéasique par la pepsine, avant la mise en œuvre de l'hydrolyse alcaline, a par ailleurs permis de libérer la vitamine B₁₂ éventuellement liées aux protéines et d'obtenir de la sorte la teneur totale en vitamine B₁₂ de l'aliment étudié.

5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADJALLA C., BENHAYOUN S., NICOLAS J.-P., GUÉANT J.-L. & LAMBERT D. (1993), **Existence of vitamin B₁₂ analogs in biological samples : a reality**, *J. Nutr. Biochem.*, 4, 543-548.

ADJALLA C., LAMBERT D., BENHAYOUN S., BERTHELSEN J.G., NICOLAS J.-P., GUÉANT J.-L. & NEXO E. (1994), **Forms of cobalamin and vitamin B₁₂ analogs in maternal plasma, milk and cord plasma**, *J. Nutr. Biochem.*, 5, 406-410.

ALBALÀ-HURTADO S., VECIANA-NOGUÉS M.T., IZQUIENDO-PULIDO M. & MARINÉ-FONT A. (1997), **Determination of water soluble vitamins in infant milk by high performance liquid chromatography**, *J. Chromatogr. A*, 778, 247-253.

ANONYME (2000), **Cobalamin (vitamin B₁₂ activity) in milk-based infant formula. Turbidimetric method. Final action 1988.**, *AOAC Official Methods of Analysis*, Cunniff K. ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Gaithersburg.

ARMITAGE J., CANNON J., JOHNSON A., PARKER L., SMITH E., STAFFORD W. & TODD A. (1953), **Chemistry of the vitamin B₁₂ group. Part III. The course of hydrolytic degradations**, *J. Chem. Soc.*, 3849-3864.

BALL G.F.M. (1998), **Vitamin B₁₂**, p.497-516, in *Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods*, Chapman & Hall ed., London.

BAKER S. & MILLER-IHLI N. (2000), **Determination of cobalamins using capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry**, *Spectrochim. Acta Part B*, 55, 1823-1832.

BONNETT R., CANNON J., JOHNSON A. & TODD A. (1957 a), **Chemistry of the vitamin B₁₂ group. Part IV. The isolation of crystalline nucleotide-free degradation products**, *J. Chem. Soc.*, 1148-1158.

BONNETT R., BUCHANAN J., JOHNSON A. & TODD A. (1957 b), **Chemistry of the vitamin B₁₂ group. Part VI. The isomeric 5,6-dimethylbenzimidazole nucleotides produced by hydrolysis of vitamin B₁₂**, *J. Chem. Soc.*, 1168-1172.

CASEY P., SPECKMAN K., EBERT F. & HOBBS W. (1982), **Radioisotope dilution technique for determination of vitamin B₁₂ in foods**, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 65, 85-88.

CHASSAIGNE H. & LOBINSKI R. (1998), **Determination of cobalamins and cobinamides by microbore reversed-phase HPLC with spectrophotometric, ion-spray ionization MS and inductively coupled plasma MS detection**, *Anal. Chim. Acta*, 359, 227-235.

DOLPHIN D. (1971), **Preparation of the reduced forms of vitamin B₁₂ and of some analogs of the vitamin B₁₂ coenzyme containing a cobalt-carbon bond**, *Methods in Enzymology*, 18C, 34-52.

- ELLENBOGEN L. (1984), **Vitamin B₁₂**, p.497-548, in *Handbook of Vitamins*, L. Machlin Ed., Marcel Dekker Inc, New-York.
- FRIEDRICH W. (1975), **Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinnoide** in *Fermente, Hormone, Vitamine*, Vol III-2, A. Ammon und W. Dirscherl Eds., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- INDYK H., PERSSON B., CASELUNGHE M., MOBERG A., FILONZI E. & WOOLLARD D. (2002), **Determination of vitamin B₁₂ in milk products and selected foods by optical biosensor protein binding assay : method comparison**, *J. AOAC Int.*, 85, 72-81.
- IWASE H. & ONO I. (1997), **Determination of vitamin B₁₂ in foods by HPLC with visible detection after solid-phase extraction and membrane filtration for the precolumn separation of lipophilic species**, *J. Chromatogr. A.*, 771, 127-134.
- JACOBSEN D., HOLLAND R., MONTEJANO Y. & HUENNEKENS F. (1979), **Cryptofluorescent analogs of cobalamin coenzymes: synthesis and characterization**, *J. Inorg. Biochem.*, 10, 53-65.
- KITTANG E. & SCHJONSBY H. (1987), **Effect of gastric anacidity on the release of cobalamins from food and their subsequent binding to R-Protein**, *Scand. J. Gastroenterol.*, 22, 1031-1037.
- LAMBERT D., ADJALLA C., FELDEN F., BENHAYOUN S., NICOLAS J.P. & GUÉANT J.L. (1992), **Identification of vitamin B₁₂ and analogs by high performance capillary electrophoresis and comparison with high performance liquid chromatography**, *J. Chromatogr.*, 608, 311-315.
- LEE T.R., NIU J. & LAWRENCE D. (1995), **The extraordinary active site substrate specificity of pp60^{c-src}**, *J. Biol. Chem.*, 270, 5375-5380.
- LI H.B. & CHEN F. (2000), **Determination of vitamin B₁₂ in pharmaceutical preparations by a highly sensitive fluorimetric method**, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368, 836-838.
- LI H.B., CHEN F. & JIANG Y. (2000), **Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets and fermentation medium by high performance liquid chromatography with fluorescence detection**, *J. Chromatogr. A*, 891, 243-247.
- MAGGIO-HALL L. & ESCALANTE-SEMERENA J. (1999), **In vitro synthesis of the nucleotide loop of cobalamin by *Salmonella Typhimurium* enzymes**, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 11798-11803.
- MININ P.L. & WALTON J. (2003), **Radical ring closures of 4-isocyanato carbon-centered radicals**, *J. Org. Chem.*, 68, 2960-2963.
- MORITA M., UEHIRO T. & FUWA K. (1980), **Speciation and elemental analysis of mixtures by high performance liquid chromatography with inductively coupled argon plasma emission spectrometric detection**, *Anal. Chem.*, 52, 349-351.
- MUHAMMAD K., BRIGGS D. & JONES G. (1993), **Comparison of a competitive binding assay with *Lactobacillus leichmannii* A.T.C.C. 7830 assay for the determination of vitamin B₁₂ in foods**, *Food Chem.*, 48, 431-434.

- NDAW S., BERGAENTZLÉ M., AOUDE WERNER D., LAHÉLY S. & HASSELMANN C. (2001), **Determination of folates in foods by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates**, *J. Chromatogr. A*, 928, 77-90.
- NIWA M., MORIKAWA M., NABETA T. & HIGASHI N. (2002), **Preparation of anthryl group-tagged helical poly (γ -benzyl L-glutamate) self-assembled film on gold surface and its interaction with DNA**, *Macromolecules*, 35, 2769-2775.
- RENZ P. (1971), **Some intermediates in the biosynthesis of vitamin B₁₂**, *Methods in Enzymology*, 18C, 82-92.
- ROUESSAC F. & ROUESSAC A. (1998), **Fluorimétrie**, p.205-216, in *Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes*, 4th ed., DUNOD, Paris.
- SCHRAUZER G. & DEUTSCH E. (1969), **Reactions of cobalt(I) supernucleophiles. The alkylation of vitamin B₁₂s, cobaloxines (I) and related compounds**, *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 3341-3350.
- SCOTT J.M. (1997), **Bioavailability of vitamin B₁₂**, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51 Suppl 1, 549-553.
- SHENOY K.G. & RAMASARMA G.B. (1954), **Extraction procedure and determination of the vitamin B₁₂ content of some animal livers**, *Arch. Biochem. Biophysics*, 51, 371-378.
- SMELTZER C., CANNON M., PINSON P., MUNGER JR. J., WEST F. & GRISSOM C. (2001), **Synthesis and characterization of fluorescent cobalamin (Cobalafuor) derivatives for imaging**, *Org. Lett.*, 3, 799-801.
- SMITH E. (1965), **Chemistry of Vitamin B₁₂**, p.30-53, et **Assay of Vitamin B₁₂, analogues, and coenzyme B₁₂**, p.103-114, in *Vitamin B₁₂*, Methuen Ed., Wiley, New-York.
- SONG Z. & HOU S. (2003), **Sub-picogram determination of vitamin B₁₂ in pharmaceuticals and human serum using flow injection with chemiluminescence detection**, *Anal. Chim. Acta.*, 488, 71-79.
- SOUCI S.W., FACHMANN W. & KRAUT H. (1994), *Food Composition and Nutrition Tables*, 5th ed., CRC Press, Boca Raton and Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
- VINAS P., CAMPILLO N., LOPEZ GARCIA I. & HERNANDEZ CORDOBA M. (1996), **Speciation of vitamin B₁₂ analogues by liquid chromatography with flame atomic absorption spectrometric detection**, *Anal. Chim. Acta*, 318, 319-325.
- WAGNER A. & FOLKERS K. (1963), **Vitamin B₁₂**, p.103-113, in *Comprehensive Biochemistry*, Vol 11, Florkin and Stotz Eds., Amsterdam.
- WATANABE F., TAKENAKA S., ABE K., TAMURA Y. & NAKANO Y. (1998), **Comparison of a microbiological assay and a fully automated chemiluminescent system for the determination of vitamin B₁₂ in food**, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1433-1436.
- WONGYAI S. (2000), **Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets by multimode high performance liquid chromatography**, *J. Chromatogr. A*, 870, 217-220.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse s'est inscrit dans le cadre plus général d'une étude menée dans le laboratoire depuis 1993 et portant sur la mise au point de méthodes de dosage des vitamines du groupe B dans les aliments utilisant la chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par fluorimétrie. Le couplage CLHP-fluorimétrie permet en effet d'obtenir à la fois une excellente spécificité et une sensibilité généralement suffisante pour déterminer les teneurs en vitamines du groupe B présentes dans les aliments. Ces méthodes chromatographiques, au fur et à mesure de leur élaboration, ont visé à se substituer aux méthodes usuelles de dosage par microbiologie dont la spécificité et l'exactitude sont souvent contestables.

L'objectif particulier de ce travail était de mettre au point de tels protocoles analytiques pour le dosage des vitamines B₅ et B₁₂, objectif ambitieux car ces deux vitamines ne sont pas fluorescentes et les quelques méthodes chromatographiques publiées jusqu'à récemment pour leur dosage n'avaient toujours qu'un domaine d'application très limité (le plus souvent les aliments complémentés) en raison de la faible sensibilité du dispositif de détection utilisé.

L'objectif initial a pu être atteint à l'issue de ce travail puisque deux protocoles analytiques originaux, à la fois spécifiques et sensibles, permettent maintenant d'obtenir les teneurs en vitamine B₅ et B₁₂ dans n'importe quel aliment.

Ces protocoles ont toujours comporté un traitement enzymatique préalable de l'échantillon, traitement dont la maîtrise a permis de mesurer à la fois les teneurs en vitamines libres, liées et totales, et une étape de purification pré-chromatographique très sélective de l'extrait (passages successifs sur des cartouches échangeuses d'anions et de cations pour le dosage de l'acide pantothénique, extraction en phase solide sur colonne d'immunoaffinité pour le dosage de la vitamine B₁₂). La transformation de ces vitamines en composés fluorescents a été effectuée soit en post-colonne (hydrolyse alcaline de l'acide pantothénique, avec formation de β-alanine, réaction de cet acide aminé avec l'OPA en présence d'acide mercaptopropionique pour former le 1-(éthyl)thio-2-(carboxyéthyl)isoindole fluorescent), soit en pré-colonne (hydrolyse alcaline de la vitamine B₁₂, puis traitement par de la phosphatase alcaline afin d'obtenir du ribazole fluorescent), l'isolement chromatographique de l'acide pantothénique ou du ribazole étant obtenu par un dispositif d'élution à gradient.

La détection fluorimétrique mise en œuvre a permis d'atteindre dans les deux cas des concentrations minimales quantifiables dans les aliments tout à fait satisfaisantes (0,8 µg.g⁻¹ pour l'acide pantothénique, 3 ng.g⁻¹ pour la vitamine B₁₂). La précision et l'exactitude des méthodes proposées ont été par ailleurs remarquables. Selon les aliments étudiés, les coefficients de variation et les taux de recouvrement mesurés ont en effet varié respectivement de 0,5 à 7,8 % et

de 92 à 109 % pour le dosage de l'acide pantothénique, de 0,6 à 5,4 % et de 95 à 100 % pour le dosage de la vitamine B₁₂.

Les protocoles observés vont être prochainement soumis à des analyses interlaboratoires afin d'achever leur validation et pourront alors être proposés comme méthodes de référence au Comité Européen de Normalisation (CEN), comme cela a déjà été fait récemment pour les autres vitamines du groupe B. La présente étude achève ainsi dans le laboratoire un important et long travail de mise au point de méthodes chromatographiques de référence pour l'ensemble de ces vitamines.

Le développement rapide de l'utilisation de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) dans les laboratoires de recherche et de contrôle devrait cependant conduire à une réorientation de la recherche analytique dans le domaine des vitamines du groupe B. Alors que l'analyste a maintenant à sa disposition des méthodes chromatographiques de référence (par CLHP/ fluorimétrie), il serait sans doute judicieux de lui fournir aussi des protocoles analytiques utilisant la LC/MS, sans doute d'une moindre sensibilité mais qui lui permettraient peut-être de doser plusieurs vitamines simultanément. Pour qu'une telle analyse multivitaminique puisse cependant réellement constituer un gain de temps pour la réalisation d'analyses de routine, il serait cependant nécessaire de parvenir à proposer un mode de préparation unique des échantillons alimentaires, applicables à toutes les vitamines étudiées, car la partie « traitement des échantillons » dans les protocoles actuels (extraction, purification) est de loin la plus longue et la plus délicate. Il n'est cependant pas impossible que l'utilisation d'un détecteur par spectrométrie de masse autorise une simplification des traitements pré-chromatographiques (en particulier au niveau de la purification) et rende effectivement possible la conception d'un protocole d'analyse unique pour le dosage simultané de plusieurs vitamines du groupe B dans les aliments.

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

Vitamine B₅

ACP	acyl carrier protein
CoA	coenzyme A
ME	2-mercaptoéthanol
MPA	acide 3-mercaptopropionique
OPA	ortho-phthaldialdéhyde
PTFE	polytétrafluoroéthylène
TCEP	tris-(2-carboxyéthyl)-phosphine
TRIS	tris(hydroxyméthyl)aminométhane

Vitamine B₁₂

ACN	acétonitrile
CH ₃ B ₁₂	méthylcobalamine
CNB ₁₂	cyanocobalamine
CoB ₁₂	coenzyme B ₁₂
CTA	bromure d'hexadécyltriméthylammonium
DMF	diméthylformamide
Fmoc	9-fluorénylméthylchloroformate
OHB ₁₂	hydroxocobalamine
TBAH	hydroxyde de tétrabutylammonium

Divers

CLHP	chromatographie liquide haute performance
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FIA	analyse par injection de flux
SAA	spectrométrie par absorption atomique
ICP	plasma à couplage inductif
AES	spectrométrie d'émission atomique
MS	spectrométrie de masse

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Structures de l'acide pantothénique, du coenzyme A et de l'acyl carrier protein.	6
Figure 2.	Schéma du montage CLHP/fluorimétrie utilisé pour la dérivation post-colonne de la vitamine B ₅ avec une configuration à deux pompes.	16
Figure 3.	Schéma du montage CLHP/fluorimétrie utilisé pour la dérivation post-colonne de la vitamine B ₅ avec une configuration à une seule pompe.	17
Figure 4.	Réaction de transformation de l'acide pantothénique en composé fluorescent.	20
Figure 5.	Effet de la concentration en hydroxyde de sodium dans le réacteur R ₁ sur le rendement d'hydrolyse (a) et sur l'aire du pic chromatographique obtenu (b) [R ₁ (40 m, 85°C), R ₂ (3 m), ME 0,2 mM, OPA 0,2 mM].	23
Figure 6.	Effet de la température du four contenant le réacteur R ₁ sur le rendement d'hydrolyse (a) et sur l'aire du pic chromatographique obtenu (b) [R ₁ (40 m), NaOH 100 mM, R ₂ (3 m), ME 0,2 mM, OPA 0,2 mM].	24
Figure 7.	Effet de la concentration en 2-mercaptoéthanol dans le réacteur R ₂ sur l'aire du pic chromatographique obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur du pic chromatographique sur le bruit de fond (b) [R ₁ (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, R ₂ (3 m), OPA 0,2 mM].	25
Figure 8.	Effet de la concentration en MPA dans le réacteur R ₂ sur l'aire du pic chromatographique obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond (b) [R ₁ (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, R ₂ (3 m), OPA 0,2 mM].	25
Figure 9.	Chromatogrammes d'une solution étalon d'acide pantothénique à 1 µg.ml ⁻¹ obtenus en choisissant deux concentrations différentes en MPA [R ₁ (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, R ₂ (3 m), OPA 0,2 mM].	26
Figure 10.	Effet de la concentration en OPA dans le réacteur R ₂ sur l'aire du pic chromatographique obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond (b) [R ₁ (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, R ₂ (3 m), MPA 0,2 mM].	26
Figure 11.	Chromatogrammes d'une solution étalon d'acide pantothénique à 1 µg.ml ⁻¹ obtenus en choisissant deux concentrations différentes en OPA [R ₁ (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, R ₂ (3 m), MPA 0,2 mM].	27
Figure 12.	Effet de la longueur du réacteur R ₁ sur le rendement d'hydrolyse (a) et sur le rapport de la hauteur du pic chromatographique obtenu sur le bruit de fond (b) [R ₁ (99°C), NaOH 100 mM, R ₂ (3 m), MPA 0,2 mM, OPA 0,5 mM].	27
Figure 13.	Effet de la longueur du réacteur R ₂ sur l'aire du pic chromatographique obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur du pic sur le bruit de fond (b) [R ₁ (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, MPA 0,2 mM, OPA 0,5 mM].	28
Figure 14.	Chromatogrammes d'une solution étalon d'acide pantothénique à 1 µg.ml ⁻¹ obtenus pour deux longueurs différentes de réacteur R ₂ [R ₁ (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, MPA 0,2 mM, OPA 0,5 mM].	28
Figure 15.	Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acide pantothénique.	30
Figure 16.	Chromatogrammes d'une solution étalon d'acide pantothénique (1 µg.ml ⁻¹) obtenus avec les deux dispositifs de dérivation (voir conditions retenues pour le dispositif à une pompe p. 31 et pour le dispositif à deux pompes p.29).	31
Figure 17.	Effet de la concentration en OPA dans le réacteur sur l'aire du pic obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur de ce pic sur le bruit de fond (b) [R (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, MPA 0,2 mM].	32
Figure 18.	Effet de la concentration en MPA dans le réacteur sur l'aire du pic obtenu (a) et sur le rapport de la hauteur de ce pic sur le bruit de fond (b) [R (40 m, 99°C), NaOH 100 mM, OPA 0,5 mM].	33
Figure 19.	Chromatogrammes d'une solution d'acide pantothénique à 1 µg.ml ⁻¹ obtenus avec le dispositif à deux pompes (a) et avec le dispositif à une pompe (b) (1 : acide pantothénique).	33
Figure 20.	Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acide pantothénique.	34
Figure 21.	Isolement chromatographique de l'acide pantothénique contenu dans un échantillon de foie de porc avec une phase mobile en élution isocratique (méthanol / tampon phosphate (10/90 v/v)) (a) et un gradient de phase mobile (méthanol / tampon phosphate) (b).	35
Figure 22.	Isolement chromatographique de l'acide pantothénique contenu dans un échantillon d'avocat avec une phase mobile en élution isocratique (méthanol / tampon phosphate (10/90 v/v)) (a) et un gradient de phase mobile (méthanol / tampon phosphate) (b).	35
Figure 23.	Isolement chromatographique de l'acide pantothénique contenu dans des petits pois (a) et dans de la levure (b) en utilisant comme phase mobile un gradient méthanol -tampon phosphate.	36
Figure 24.	Isolement chromatographique de l'acide pantothénique contenu dans un échantillon de petits pois (a et b) et dans un échantillon de lait en poudre (c et d) : sans purification préalable des extraits (a et c), avec purification des extraits (abaissement du pH à 2, puis passage sur la cartouche échangeuse de cations) (b et d).	38
Figure 25.	Détermination des taux de recouvrement de l'acide pantothénique lors de l'analyse d'un échantillon d'avocat en fonction du protocole de purification choisi : (a) acidification de l'extrait à pH 2, puis passage sur une cartouche échangeuse de cations, (b) acidification de l'extrait à pH 2, (c) passage sur une cartouche échangeuse de cations (à pH 8), (d) absence de purification.	39

Figure 26. Influence du pH d'acidification sur le taux de recouvrement de l'acide pantothénique lors de l'analyse d'un extrait d'un échantillon d'avocat sans () et avec passage () sur une cartouche échangeuse de cations.	40
Figure 27. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de l'acide pantothénique libre dans l'avocat (a), la carotte (b), les épinards (c), le foie de porc (d), les haricots verts (e), le lait en poudre (f), les lentilles (g) et la levure (h).	42
Figure 28. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de l'acide pantothénique libre dans l'œuf (a), les petits pois (b), le saumon (c) et la viande de poulet (d).	43
Figure 29. Action de la phosphatase alcaline et de la pantéthéinase sur le coenzyme A.	44
Figure 30. Chromatogrammes de l'acide pantothénique (1) ($2,1 \cdot 10^{-5}$ M), de la pantéthéine (2) ($1,7 \cdot 10^{-5}$ M) et de la pantéthine (3) ($0,9 \cdot 10^{-5}$ M).	46
Figure 31. Chromatogrammes obtenus après action de la phosphatase alcaline sur du coenzyme A.	47
Figure 32. Chromatogrammes obtenus après action de la phosphatase alcaline et de la pantéthéinase sur du coenzyme A [(1) : acide pantothénique].	48
Figure 33. Optimisation des concentrations d'enzymes à utiliser pour hydrolyser 1 ml d'une solution étalon de CoA à $305 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Effet sur le rendement d'hydrolyse du nombre d'unités de phosphatase alcaline (a) et du nombre de milliunités de pantéthéinase (b).	49
Figure 34. Teneur en acide pantothénique (libre et lié dans le CoA) ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) dans un échantillon de foie de porc (prise d'essai de 1 g) en fonction de la quantité de phosphatase alcaline (a) ou de pantéthéinase (b) utilisée par échantillon lors d'une incubation à 37°C pendant 18h dans un tampon Tris (pH 8) en présence d'un excès de l'autre enzyme [100 mU de pantéthéinase (a) ou 15 U de phosphatase (b)].	50
Figure 35. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de l'acide pantothénique libre et lié dans le CoA dans l'avocat (a), les lentilles (b), l'œuf (c) et la levure (d).	51
Figure 36. Teneurs en acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) dans un échantillon de petits pois (prise d'essai de 7 g) en fonction de la température d'incubation lors de l'hydrolyse enzymatique.	54
Figure 37. Teneurs en acide pantothénique libre et lié dans le CoA ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) dans un échantillon de foie de porc (prise d'essai de 1 g) en fonction de la quantité de phosphatase alcaline (a) ou de pantéthéinase (b) utilisée lors d'une incubation à 20°C pendant 18h dans un tampon Tris (pH 8) en présence d'un excès de l'autre enzyme [200 mU de pantéthéinase (a) ou 15 U de phosphatase (b)].	56
Figure 38. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de l'acide pantothénique libre et lié dans le CoA (incubation enzymatique à 20°C) dans l'avocat (a), la carotte (b), les épinards (c), le foie de porc (d), les haricots verts (e), le lait en poudre (f), les lentilles (g) et la levure (h).	57
Figure 39. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de l'acide pantothénique libre et lié dans le CoA (incubation enzymatique à 20°C) dans l'œuf (a), les petits pois (b), le saumon (c) et la viande de poulet (d).	58
Figure 40. Structure chimique de l'ACP.	59
Figure 41. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B ₅ totale dans la viande de poulet préalablement traitée avec la papaïne (a) ou la pepsine (b).	60
Figure 42. Teneur en vitamine B ₅ totale (exprimée en μg d'acide pantothénique. g^{-1}) dans un échantillon de viande de poulet (prise d'essai de 5 g) en fonction de la quantité de pepsine utilisée lors d'une incubation à 37°C pendant 18 h.	61
Figure 43. Teneur en vitamine B ₅ totale (exprimée en μg d'acide pantothénique. g^{-1}) dans un échantillon de foie de porc (prise d'essai de 1 g) après traitement par la pepsine en fonction de la durée et de la température d'incubation.	62
Figure 44. Teneur en vitamine B ₅ totale (exprimée en μg d'acide pantothénique. g^{-1}) dans un échantillon de viande de poulet (prise d'essai de 5 g) en fonction de la quantité de pepsine utilisée lors d'une incubation à 50°C pendant 3 h.	62
Figure 45. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B ₅ totale dans l'avocat (a), la carotte (b), les épinards (c) et le foie de porc (d).	64
Figure 46. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B ₅ totale dans les haricots verts (a), le lait en poudre (b), les lentilles (c), la levure (d), l'œuf (e), les petits pois (f), le saumon (g) et la viande de poulet (h).	65
Figure 47. Structures chimiques des différentes cobalamines.	75
Figure 48. Chromatogramme d'une solution étalon des 4 formes de la vitamine B ₁₂ ($\lambda=360$ nm) avec indication de leurs spectres d'absorption UV-visible [analyse de $2,25 \mu\text{g}$ de OHB ₁₂ (hydroxocobalamine), de $1,12 \mu\text{g}$ de CNB ₁₂ (cyanocobalamine), de $2,72 \mu\text{g}$ de CoB ₁₂ (coenzyme B ₁₂) et de $2,28 \mu\text{g}$ de CH ₃ B ₁₂ (méthylcobalamine)].	88
Figure 49. Courbe d'étalonnage pour le dosage de la cyanocobalamine (détection par photométrie à $\lambda=360$ nm).	89
Figure 50. Chromatogramme de l'échantillon de gélules de Juvamine (1 : cyanocobalamine).	90
Figure 51. Spectre d'absorption UV-visible de la cyanocobalamine.	91

Figure 52. Spectres d'absorption UV-visible de la cyanocobalamine (Co(III)) (a), de la forme B _{12r} (Co(II)) (b) et de la forme B _{12s} (Co(I)) (c).....	94
Figure 53. Chromatogramme d'une solution de cyanocobalamine réduite, puis réoxydée (1 : aquocobalamine, 2 : cyanocobalamine).....	94
Figure 54. Analyse chromatographique du milieu réactionnel obtenu à l'issue de la synthèse de la méthylcobalamine à partir de la cyanocobalamine ($\lambda=268$ nm) en présence de nitrate de cobalt avec extraction de l'iodométhane par le mélange phénol-dichlorométhane (a), sans nitrate de cobalt mais avec extraction de l'iodométhane par le mélange phénol-dichlorométhane (b), sans nitrate de cobalt ni extraction de l'excès d'iodométhane (c) [1 : hydroxocobalamine ; 2 : phénol, 3 : méthylcobalamine, 4 : iodométhane].....	96
Figure 55. Structure du 9-fluorénylméthylchloroformate (FMOC).....	97
Figure 56. Analyse chromatographique avec détection UV ($\lambda=360$ nm) de la solution obtenue après réaction de la forme B _{12s} avec le FMOC [1 : cyanocobalamine, 2 : produit inconnu].....	98
Figure 57. Analyse chromatographique avec détection photométrique ($\lambda=360$ nm) de la solution obtenue après réaction de la vitamine B _{12s} avec la bromopropylamine (a), la bromohexylamine (b) et la bromododécylamine (c) [concentration en vitamine B ₁₂ de 2,65 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].....	100
Figure 58. Spectre d'absorption UV-visible de la vinylcobalamine préparée par Dolphin (1971).....	101
Figure 59. Analyse chromatographique avec détection par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345$ nm, $\lambda_{\text{em}}=455$ nm) du blanc réactionnel (- - -) et de la solution obtenue après réaction de la vitamine B _{12s} avec la bromopropylamine (—) après réaction post-colonne avec l'OPA [concentration en vitamine B ₁₂ de 2,65 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].....	101
Figure 60. Analyse chromatographique avec détection par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345$ nm, $\lambda_{\text{em}}=455$ nm) du blanc réactionnel (- - -) et de la solution obtenue après réaction de la vitamine B _{12s} avec la bromohexylamine (—) après réaction post-colonne avec l'OPA [concentration en vitamine B ₁₂ de 2,65 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].....	102
Figure 61. Analyse chromatographique avec détection par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345$ nm, $\lambda_{\text{em}}=455$ nm) du blanc réactionnel (- - -) et de la solution obtenue après réaction de la vitamine B _{12s} avec la bromododécylamine (—) après réaction post-colonne avec l'OPA [concentration en vitamine B ₁₂ de 2,65 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].....	102
Figure 62. Analyse chromatographique avec détection par absorption UV ($\lambda=360$ nm) (a) et par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345$ nm, $\lambda_{\text{em}}=455$ nm) (b) de la solution obtenue après réaction de la vitamine B _{12s} avec la bromopropylamine et le FMOC [concentration en vitamine B ₁₂ de 5,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].....	103
Figure 63. Analyse chromatographique avec détection par absorption UV ($\lambda=360$ nm) (a) et par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345$ nm, $\lambda_{\text{em}}=455$ nm) (b) de la solution obtenue après réaction de la vitamine B _{12s} avec la bromohexylamine et le FMOC [concentration en vitamine B ₁₂ de 5,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].....	104
Figure 64. Analyse chromatographique avec détection par absorption UV ($\lambda=360$ nm) de la solution obtenue après réaction de la vitamine B _{12s} avec la bromododécylamine et le FMOC [concentration en vitamine B ₁₂ de 10,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$].....	105
Figure 65. Effets possibles d'une hydrolyse acide ou basique sur la vitamine B ₁₂	106
Figure 66. Structures chimiques du phosphate de ribazole (a) et du ribazole (b).....	107
Figure 67. Analyse chromatographique avec détection par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}}=345$ nm, $\lambda_{\text{em}}=455$ nm) après dérivation post-colonne par l'OPA d'une solution d'aminopropanol (à 4 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$) (a) et d'une solution de cyanocobalamine (à 3 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$) hydrolysée par HCl à 1,2 M à 85°C pendant 4h (b).....	108
Figure 68. Effet de la concentration en acide chlorhydrique sur l'aire du pic chromatographique correspondant à l'aminopropanol (conditions : bain-marie à 85°C pendant 4 h, $[\text{CNB}_{12}]=4$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).....	109
Figure 69. Effet de la durée de l'hydrolyse chlorhydrique sur l'aire du pic chromatographique correspondant à l'aminopropanol (conditions : bain-marie à 85°C, $[\text{HCl}]=1,2$ M, $[\text{CNB}_{12}]=4$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).....	109
Figure 70. Effet de la température d'hydrolyse sur l'aire du pic chromatographique correspondant à l'aminopropanol (conditions : 2h30, $[\text{HCl}]=1,2$ M, $[\text{CNB}_{12}]=4$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).....	110
Figure 71. Courbe d'étalonnage de la cyanocobalamine.....	110
Figure 72. Spectres d'excitation (a) et d'émission (b) d'une solution de cyanocobalamine (10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) après hydrolyse acide (HCl 1,5 M, 100°C, 5 min).....	111
Figure 73. Analyse chromatographique d'une solution de cyanocobalamine (à 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) après hydrolyse par HCl 5 M à 100°C pendant 5 min et indication des spectres d'absorption UV des composés chimiques isolés.....	112
Figure 74. Variation du rendement de formation des deux isomères du phosphate de ribazole en fonction de la concentration en hydroxyde de sodium lors d'une hydrolyse de 5 min réalisée à 100°C.....	113
Figure 75. Variation du rendement de formation des deux isomères du phosphate de ribazole en fonction de la durée d'hydrolyse à 100°C pour une concentration en hydroxyde de sodium de 5 M (a) et de 0,5 M (b).....	114
Figure 76. Analyse chromatographique [gradient tampon phosphate 33 mM (pH 7) - acétonitrile] d'une solution de cyanocobalamine à 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ après hydrolyse par NaOH 5 M à 100°C pendant 15 min avec une colonne chromatographique neuve (a) et avec cette même colonne usagée (après une cinquantaine d'analyses) (b).....	115
Figure 77. Analyse chromatographique [gradient eau - acétonitrile] d'une solution de cyanocobalamine (à 25 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) après hydrolyse par NaOH 5 M à 100°C pendant 15 min.....	115
Figure 78. Analyse chromatographique [gradient tampon phosphate (TBAH) / acétonitrile] d'une solution de cyanocobalamine (à 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) après hydrolyse par NaOH 5 M à 100°C pendant 15 min.....	116

Figure 79. Analyse chromatographique d'une solution de cyanocobalamine (à 1,3 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) avec hydrolyse alcaline post-colonne (concentration en hydroxyde de sodium dans le réacteur de 150 mM, réacteur de 40 m placé dans un four à 99°C, débit de 0,3 ml.min^{-1} pour la solution de dérivation).....	117
Figure 80. Analyse chromatographique d'une solution de cyanocobalamine (à 100 ng.ml^{-1}) après transformation pré-colonne du vitamère en ribazole [utilisation d'un gradient tampon phosphate (pH 7) - acétonitrile, $\lambda_{\text{ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{em}}=312$ nm].....	119
Figure 81. Analyse chromatographique d'une solution de cyanocobalamine (à 100 ng.ml^{-1}) après transformation pré-colonne du vitamère en ribazole [utilisation d'un gradient eau - acétonitrile, $\lambda_{\text{ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{em}}=312$ nm].....	119
Figure 82. Spectre d'absorption UV du ribazole.....	120
Figure 83. Analyse chromatographique d'une solution de cyanocobalamine (à 10 ng.ml^{-1}) avec transformation pré-colonne du vitamère en ribazole [utilisation d'un gradient eau - méthanol, $\lambda_{\text{ex}}=250$ nm, $\lambda_{\text{em}}=312$ nm].....	121
Figure 84. Courbe d'étalonnage pour le dosage de la cyanocobalamine (après transformation en ribazole).....	121
Figure 85. Analyse chromatographique d'un échantillon de foie de porc après hydrolyse alcaline (hydroxyde de sodium 5 M, 15 min, 100°C) et traitement par une phosphatase alcaline.	123
Figure 86. Analyse chromatographique d'un échantillon de foie de porc après purification par passage sur cartouche C_{18} de l'extrait aqueux, hydrolyse alcaline (hydroxyde de sodium 5 M, 15 min, 100°C) et traitement par une phosphatase alcaline.	124
Figure 87. Analyse chromatographique d'un échantillon de foie de porc après purification par passage sur cartouche C_{18} de l'extrait aqueux et traitement par une phosphatase alcaline.	125
Figure 88. Analyse chromatographique d'une solution multivitaminée Juvamine après purification par passage sur colonne d'immunoaffinité de l'extrait aqueux, hydrolyse alcaline (hydroxyde de sodium 5 M, 15 min, 100°C) et traitement par une phosphatase alcaline.....	127
Figure 89. Analyse chromatographique d'un échantillon de foie de porc après purification par passage sur colonne d'immunoaffinité de l'extrait aqueux suivie (a) d'une hydrolyse alcaline (hydroxyde de sodium 5 M, 15 min, 100°C) et d'un traitement par une phosphatase alcaline ou (b) d'un simple traitement par la phosphatase.	127
Figure 90. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B_{12} libre dans le filet de boeuf (a), le foie de porc (b), le lait en poudre (c) et le maquereau (d).	128
Figure 91. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B_{12} libre dans l'œuf (a) et le saumon (b).	129
Figure 92. Analyse chromatographique d'un échantillon de foie de porc après traitement par la pepsine, purification par passage sur colonne d'immunoaffinité, hydrolyse alcaline et traitement par la phosphatase.....	130
Figure 93. Teneur (en ng.g^{-1}) en vitamine B_{12} totale (exprimée en équivalent cyanocobalamine) dans un échantillon de foie de porc (prise d'essai de 5 g) en fonction de la quantité de pepsine utilisée lors d'une incubation à 37°C pendant 3 h.....	131
Figure 94. Teneur (en ng.g^{-1}) en vitamine B_{12} totale (exprimée en équivalent cyanocobalamine) dans un échantillon de foie de porc (prise d'essai de 5 g) en fonction du nombre d'unités de phosphatase alcaline utilisée lors d'une incubation à 37°C pendant 16 h.	132
Figure 95. Chromatogrammes obtenus pour la détermination de la vitamine B_{12} totale dans le filet de boeuf (a), le foie de porc (b), le lait en poudre (c), le maquereau (d), l'œuf (e) et le saumon (f).	133

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Teneurs ^a en vitamine B ₅ de différents aliments (Souci <i>et al.</i> , 1994).....	7
Tableau II.	Valeurs des taux de recouvrement ^a obtenues lors de l'analyse.....	40
Tableau III.	Détermination des teneurs ^a en acide pantothénique libre dans différents aliments.....	43
Tableau IV.	Détermination des teneurs ^a en acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A.....	52
Tableau V.	Influence du protocole d'extraction de la vitamine B ₅ sur la teneur ^a en acide pantothénique (exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$) dans un échantillon de petits pois.....	53
Tableau VI.	Comparaison des teneurs ^a en acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A ($\mu\text{g.g}^{-1}$) obtenues pour une incubation à 37°C ou à 20°C dans les matrices végétales.....	55
Tableau VII.	Détermination des teneurs ^a en acide pantothénique libre et lié dans le coenzyme A (hydrolyse enzymatique avec phosphatase alcaline et pantéthénase à pH 8 et à 20°C pendant 18 h) dans différents aliments.....	58
Tableau VIII.	Détermination des teneurs ^a en vitamine B ₅ totale.....	64
Tableau IX.	Teneurs ^a en acide pantothénique libre, en acide pantothénique libre.....	67
Tableau X.	Pourcentage des différentes formes de la vitamine B ₅ (acide pantothénique libre, acide pantothénique lié dans le CoA et acide pantothénique lié à des protéines) dans les différents aliments étudiés.....	68
Tableau XI.	Teneurs ^a en vitamine B ₁₂ de différents aliments (selon Souci <i>et al.</i> , 1994).....	76
Tableau XII.	Evolution du temps de rétention de la cyanocobalamine et du nombre de plateaux théoriques de la colonne en fonction du pourcentage d'acétonitrile (ACN) dans la phase mobile à base de tampon phosphate 33 mM (pH 3).....	87
Tableau XIII.	Intensité de fluorescence (unité arbitraire) obtenue après hydrolyse acide.....	108
Tableau XIV.	Détermination des teneurs ^a en vitamine B ₁₂ libre.....	129
Tableau XV.	Détermination des teneurs ^a en vitamine B ₁₂ totale.....	132
Tableau XVI.	Teneurs ^a (ng.g^{-1}) en vitamine B ₁₂ libre et en vitamine B ₁₂ totale (exprimées en équivalent cyanocobalamine) dans différents aliments. Pourcentage de la vitamine B ₁₂ libre.....	134

RESUME

La méthode mise au point pour le dosage de l'acide pantothénique libre consiste en une purification des échantillons par passages successifs sur des cartouches échangeuses d'anions et de cations, puis en un isolement chromatographique en phase inverse suivi d'une dérivation post-colonne de l'acide pantothénique en isoindole fluorescent (réaction de la β -alanine, obtenue par hydrolyse alcaline à chaud de l'acide pantothénique, avec l'ortho-phthaldialdéhyde en présence d'acide mercaptopropionique). Une hydrolyse enzymatique (pepsine, puis pantéthéinase et phosphatase alcaline), effectuée avant l'étape de purification, permet de libérer l'acide pantothénique lié et ainsi d'obtenir la teneur en vitamine B₅ totale dans les aliments.

En ce qui concerne la vitamine B₁₂ libre, le protocole proposé comporte une purification très spécifique par passage sur colonne d'immunoaffinité, avec concentration de l'échantillon, puis une transformation de la vitamine en ribazole (hydrolyse alcaline à chaud, puis traitement par une phosphatase alcaline). Le ribazole obtenu est par la suite dosé par fluorimétrie après un isolement chromatographique en phase inverse. Un traitement par la pepsine permet de libérer les différentes formes de la vitamine B₁₂ liées à des protéines et ainsi de pouvoir estimer la teneur en vitamine B₁₂ totale dans les aliments.

Ces méthodes, sensibles et répétables, donnent de bons taux de recouvrement. Etant données leur faible limite de détection (0,65 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour la vitamine B₅ et 1 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ pour la vitamine B₁₂) et la bonne résolution des pics chromatographiques (respectivement d'acide pantothénique et de ribazole), elles devraient pouvoir très vraisemblablement être utilisées pour la détermination de ces vitamines dans n'importe quel échantillon alimentaire.

Mots clefs :

VITAMINE
CHROMATOGRAPHIE
DERIVATION
FLUORIMETRIE

BIODISPONIBILITE
HYDROLYSE
ALIMENTS
EXTRACTION

ABSTRACT

The developed method for the free pantothenic acid consists of a purification of the samples by successive passages through anion and cation exchange cartridges, then an isolation by reversed-phase chromatography followed by a post-column derivatization of pantothenic acid as a fluorescent isoindole (reaction of β -alanin, formed by hot alkaline hydrolysis of pantothenic acid, with ortho-phthaldialdehyde in the presence of mercaptopropionic acid). An extraction procedure in two steps, first treatment by pepsin (hydrolysis of forms bound to proteins), then treatment by alkaline phosphatase and pantetheinase (hydrolysis of coenzyme A), allows to release the total vitamin B₅ in the pantothenic acid form.

As for free vitamin B₁₂, the proposed protocol contains a very specific purification by passage through an immunoaffinity column, with concentration of the extract, then a transformation of the vitamin into ribazole (obtained by hot alkaline hydrolysis followed by a treatment by alkaline phosphatase). The fluorescent compound is then analysed by fluorimetry after a separation by reversed-phase chromatography. An enzymatic hydrolysis by pepsin allows to release the different forms of vitamin B₁₂ bound to proteins and thus to obtain an estimation of the total vitamin B₁₂ amount.

These sensitive and repetable methods give good recovery rates. Owing to their low detection limit (0,65 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for the vitamin B₅ and 1 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ for the vitamine B₁₂) and the good resolution of the peaks (respectively of pantothenic acid and of ribazole), they could most probably be applied to the determination of these vitamins in any foodstuff.

Keywords :

VITAMIN
CHROMATOGRAPHY
DERIVATIZATION
FLUORIMETRY

BIOAVAILABILITY
HYDROLYSIS
FOODS
EXTRACTION