



Dosage de la vitamine D dans le lait, par chromatographie liquide haute pression

L. Mouillet, F. M. Luquet, M. F. Gagnepain, Y. Sorgue

► To cite this version:

L. Mouillet, F. M. Luquet, M. F. Gagnepain, Y. Sorgue. Dosage de la vitamine D dans le lait, par chromatographie liquide haute pression. *Le Lait*, 1982, 62 (611_612), pp.44-54. hal-00928916

HAL Id: hal-00928916

<https://hal.science/hal-00928916>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Dosage de la vitamine D dans le lait, par chromatographie liquide haute pression**

par

L. MOUILLET*, F.M. LUQUET*, M.F. GAGNEPAIN*
et Y. SORGUE*

INTRODUCTION

La vitamine D est une vitamine liposoluble, formée par irradiation ultraviolette de provitamines D. Les deux représentants les plus importants sont l'ergocalciférol ou vitamine D₂ (synthétisée à partir d'un précurseur végétal) et le cholécalférol ou vitamine D₃ (synthétisée à partir d'un précurseur animal).

Chez les végétaux, la vitamine D est peu répandue : on trouve de petites quantités de vitamine D₂ dans les champignons. Dans le règne animal, on rencontre les formes D₂ et D₃ dans les huiles de foie de poissons. La vitamine D₃ est aussi présente dans les tissus adipeux, les œufs et les produits laitiers renfermant de la matière grasse.

La provitamine D₂ (ergostérol) se rencontre dans les levures et dans les champignons, ainsi que dans l'œuf de poule. La provitamine D₃ (7 déhydrocholestérol), importante pour l'homme et les mammifères supérieurs, est concentrée dans les tissus cutanés de toutes les espèces animales, c'est à ce niveau (croit-on) qu'elle se forme.

Les vitamines D₂ et D₃ se dégradent assez rapidement sous l'action de l'oxygène de la lumière et des acides. En solution huileuse, il se produit une isomérisation et un équilibre s'établit entre le calciférol et le précalférol.

L'Unité Internationale (U.I.) correspond à l'activité de 1 mg d'une préparation standard internationale de solution huileuse de vitamine D₃ ou à 0,025 µg de vitamine D₂ ou D₃ cristallisée.

* I.S.H.A., B.P. 138, rue du Chemin-Blanc, Champlan - 91163 Longjumeau cedex.
Directeur : F. M. LUQUET.

** Etude réalisée dans le cadre d'un contrat DGRST, n° 79 7 0062.

Sur le plan des fonctions physiologiques, la vitamine D améliore la résorption du calcium à travers la paroi intestinale et facilite l'incorporation à la fois du calcium et du phosphore dans le tissu osseux. La vitamine D influence en outre l'élimination des phosphates par les reins, en augmentant leur réabsorption.

Une carence en vitamine D entraîne donc des troubles de la calcification de la matrice osseuse et une augmentation de l'élimination urinaire des phosphates.

L'O.M.S. situe les besoins journaliers de l'enfant vers 400 à 500 Unités Internationales. Chez l'adulte la ration nécessaire peut être portée à 1 000 U.I. dans certains cas (femmes enceintes, travailleurs nocturnes).

En ce qui concerne la vitamine D dans le lait, les connaissances restent encore actuellement limitées, par manque de méthodes de dosages suffisamment rapides et précises. De plus, des enquêtes réalisées dans certains pays européens (Allemagne, Angleterre, France) ont permis de mettre en évidence quelques manifestations d'hypovitaminose D, en particulier dans les populations urbaines.

En France, la question d'un éventuel enrichissement du lait en vitamine D a été soulevée (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, Section de l'Hygiène Alimentaire et de la Nutrition, 25-9-1979). Afin de pouvoir étudier ce problème d'enrichissement (addition ou irradiation) il est nécessaire de connaître les teneurs réelles des laits français à la production. Une telle enquête nécessite l'emploi d'une méthode d'analyse qui soit rapide et qui permette de détecter avec précision des teneurs relativement faibles en vitamine D (D_2 et D_3).

I. GENERALITES SUR LES METHODES D'ANALYSE

Les méthodes de dosage de la vitamine D font appel soit à des techniques biologiques, soit à des méthodes physico-chimiques.

I.1. Dosages biologiques

On utilise le test prophylactique et curatif du rachitisme chez le rat. L'évaluation du degré de rachitisme pouvant s'effectuer en utilisant soit le « line-test » selon l'U.S.P. X V [16] soit l'examen radiologique de la calcification des os, soit le dosage gravimétrique des constituants minéraux osseux.

I.2. Dosages physico-chimiques

I.2.1. RÉACTIONS COLORÉES

Cette méthode a été décrite par EWING *et al.* [7] et par NIELD *et al.* [13]. Elle consiste à développer une coloration rose en mettant

en présence la vitamine D et le réactif de NIELD (chlorure d'antimoine dans le dichloréthane additionné de 2 p.100 de chlorure d'acétyle. Ce complexe coloré absorbe à 500 nm. Cette méthode doit comporter des étapes de purification sur colonne et sur couche mince afin d'éliminer certaines substances interférentes telles que la vitamine A et l'ensemble des caroténoïdes [13].

Cette méthode peut être appliquée à des échantillons dont la concentration est supérieure à 25 000 U.I./g [3, 11].

I.2.2. MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES

• *Chromatographie en phase gazeuse* : Cette technique a été proposée par différents auteurs [4, 5, 6, 9, 12]. Après saponification le résidu insaponifiable peut être purifié par passages successifs sur plusieurs colonnes (celite, alumines, etc.) ou par chromatographie en couche mince. L'éluat final est repris, silylé (bis triméthylsilylacétamide), puis injecté dans le chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Les vitamines D₂ et D₃ subissent une isomérisation thermique, d'où l'apparition pour chacun des deux composés de deux isomères : « Pyro » et « Iso-pyro ».

Le seuil de détection de la vitamine D reste relativement élevé (400 U.I./100 g d'échantillon). Compte tenu des teneurs naturelles en vitamine D présentes dans les produits alimentaires, il est nécessaire de mettre en œuvre des prises d'essai importantes, d'où les nombreuses difficultés que l'on rencontre à tous les stades de la préparation.

• *Chromatographie en phase liquide haute pression (C.L.H.P.)* : Le développement de cette technique chromatographique a permis, dès 1972, à WILLIAMS *et al.* [17] de décrire une méthode de dosage des vitamines liposolubles. D'autres auteurs [1, 2, 8, 10, 14, 15] ont également étudié cette nouvelle possibilité d'analyse. Les avantages de la C.L.H.P. sont pour l'essentiel :

- de pouvoir séparer les différents isomères de la vitamine D possédant ou non des activités biologiques ;

- de ne pas modifier la structure de la molécule, d'où une possibilité d'un contrôle supplémentaire à la sortie de la colonne ;

- de posséder un seuil de détection (absorption mesurée en U.V. à 254 nm) suffisamment bas, permettant de doser des quantités de vitamine D de l'ordre de l'U.I./100 g d'échantillon.

L'examen des différentes possibilités de dosages nous a conduit à ne retenir, pour l'analyse des laits, que la technique par C.L.H.P. En effet, seule cette méthode est compatible avec un degré de sensibilité suffisant et une relative rapidité d'exécution permettant une enquête sur le plan national, concernant la teneur des laits crus en vitamine D. Nous avons conservé certains principes analytiques décrits dans de récentes publications [2, 3], tout en introduisant

plusieurs modifications ayant pour but d'améliorer soit la précision, soit d'augmenter la rapidité de l'analyse.

II. METHODE DE DOSAGE DE LA VITAMINE D DANS LE LAIT PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION

II.1. Objet

La méthode décrite ci-après permet de doser la vitamine D₃ et D₂ dans le lait jusqu'à une valeur limite de 20 U.I./l.

II.2. Principe

Après saponification de l'échantillon, l'insaponifiable est d'abord extrait puis purifié, avant d'être analysé par C.L.H.P. : la détection s'effectuant en U.V. à 254 nm.

II.3. Produits et matériel

II.3.1. PRODUITS

II.3.1.1. Ethanol absolu pour analyse.

2. Acide ascorbique.
3. Solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à 50 p. 100.
4. Azote R.
5. Ether de pétrole (40° C/60° C).
6. Sulfate de sodium anhydre.
7. Alumine neutre d'activité I (Woelm type 02087) désactivée à 15 p. 100 d'eau, 2 h avant utilisation.
8. Ether de pétrole (60° C/80° C).
9. Mélange Ether éthylique/Ether de pétrole (60° C-80° C) : 70 : 30 (V/V).
10. Digitonine (glucoside de la digitogénine). Préparer une solution éthanolique à 0,16 p. 100 (P/V).
11. Méthanol absolu pour analyse.
12. Mélange éluant HPLC : Méthanol/eau : 99,5 : 0,5 (V/V).
13. Vitamine D₃ étalon.

II.3.2. MATÉRIEL :

II.3.2.1. Bain-marie à 90° C.

2. Evaporateur rotatif (température du bain-marie 60° C).

3. Colonne de verre pour chromatographie ($\varnothing$ int : 1 cm, longueur : 20 cm), munie d'un réservoir à solvant et d'un verre fritté à sa base. Introduire l'alumine (II.3.1.7.) jusqu'à remplir la colonne sur une hauteur de 10 cm, puis effectuer un lavage avec 50 ml d'éther de pétrole (II.3.).
4. Chromatograhe pour chromatographie liquide haute pression (Spectra-physics SP 8000) muni d'un détecteur par absorbance à 254 nm et d'un enregistreur.
5. Colonne HPLC en acier inox ($\varnothing$ int : 0,4 cm, longueur : 25 cm). Remplie d'une phase stationnaire : lichrosorb RP 18 μ , (Merck).
6. Système de filtration millipore (filtre : 0,45 μ m).
7. Centrifugeuse.
8. Agitateur d'ampoules à décanter (type : Agitelec).

II.4. Mode opératoire

II.4.1. SAPONIFICATION :

Introduire dans un ballon de 500 ml :
— 100 ml de lait ;



fig. 1

Chromatographie liquide SP 8 000 avec intégrateur.

- 150 ml d'éthanol ;
- 1 g d'acide ascorbique ;
- 60 ml de la solution de KOH (II.3.1.3.). Mettre au bain-marie (II.3.2.1) sous réfrigérant à reflux et sous atmosphère d'azote pendant 30 mn.

II.4.2 EXTRACTION DE L'INSAPONIFIABLE

Après refroidissement, entraîner quantitativement la liqueur de saponification dans une ampoule à décanter de 500 ml en utilisant environ 50 ml d'eau distillée. Ajouter environ 100 ml d'éther de pétrole (II.3.1.5.) et agiter (II.3.2.8.) pendant 2 min.

Recommencer deux fois l'extraction en utilisant à chaque fois environ 100 ml d'éther de pétrole. Réunir les extraits renfermant l'insaponifiable.

Laver la phase étherée avec de l'eau jusqu'à neutralité à la phénolphthaléine, et éliminer les traces d'eau en effectuant une filtration sur du sulfate de sodium (II.3.1.6.).

Éliminer complètement le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (II.3.2.2.).

II.4.3. PURIFICATION DE L'EXTRAIT INSAPONIFIABLE

• *Chromatographie sur alumine*

Reprendre le résidu avec 10 ml d'éther de pétrole (II.3.1.8.), l'introduire dans la colonne (II.3.2.3.). Rincer avec 50 ml d'éther de pétrole (II.3.1.8.), ce qui permet d'éliminer la plupart des caroténoïdes. Effectuer l'élution des vitamines liposolubles à l'aide de 70 ml du mélange Ether éthylique/Ether de pétrole (II.3.1.9.). Évaporer à sec l'éluat.

• *Précipitation d'une partie des stérols par la digitonine*

Les stérols forment avec la digitonine des composés d'addition équimoléculaires peu solubles dans l'éthanol. Cette propriété est utilisée pour éliminer une fraction importante des stérols, ce qui permet d'obtenir des chromatogrammes plus facilement exploitables. Reprendre le résidu sec avec 5 ml de la solution alcoolique de digitonine (II.3.1.10). Mettre au froid à -18°C pendant 15 min. Évaporer à sec et reprendre le résidu avec 5 à 10 ml de méthanol. Centrifuger 5 min à 3 000 tours min, et recueillir le surnageant. Laver le culot de centrifugation avec quelques ml d'éther de pétrole et effectuer une deuxième centrifugation. Éliminer le culot de centrifugation, réunir les phases étherées et évaporer à sec.

• *Filtration sur membrane millipore (II.3.2.6.)*

Reprendre le résidu sec avec environ 1 ml de méthanol. Filtrer sur membrane millipore en effectuant plusieurs rinçages en utilisant

des fractions de 1 ml de méthanol. Evaporer à sec et ajuster exactement à 1 ml avec du méthanol.

Remarques

1. Toutes les manipulations doivent être faites à l'abri de la lumière directe.

2. Une purification supplémentaire peut être réalisée par chromatographie sur Célite/Magnésie telle qu'elle a été décrite par ANTALICK J. P. *et al.* [3]. Toutefois dans le cas du lait, cette purification n'est pas nécessaire.

II.4.4. DOSAGE

L'analyse par CLHP de l'extrait purifié est réalisée dans les conditions suivantes :

- volume injecté : 50 μ l ;
- colonne à polarité de phase inversée (II.3.2.5.) ;
- phase mobile : mélange méthanol/eau (II.3.1.12.) débit : 1 ml/min ;
- détection U.V. à 254 nm.

Dans ces conditions, le profil chromatographique obtenu est semblable à celui représenté par la figure 2.

Effectuer sur 1 échantillon un ajout de vitamine D₃ avant saponification, ce qui permet à la fois d'identifier et de quantifier le pic de vitamine D₃.

Calculer la surface des pics, soit à l'aide d'un intégrateur, soit en effectuant le produit de la hauteur par la largeur à mi-hauteur. La teneur en vitamine D₃ (U.I./l) est donnée par la formule :

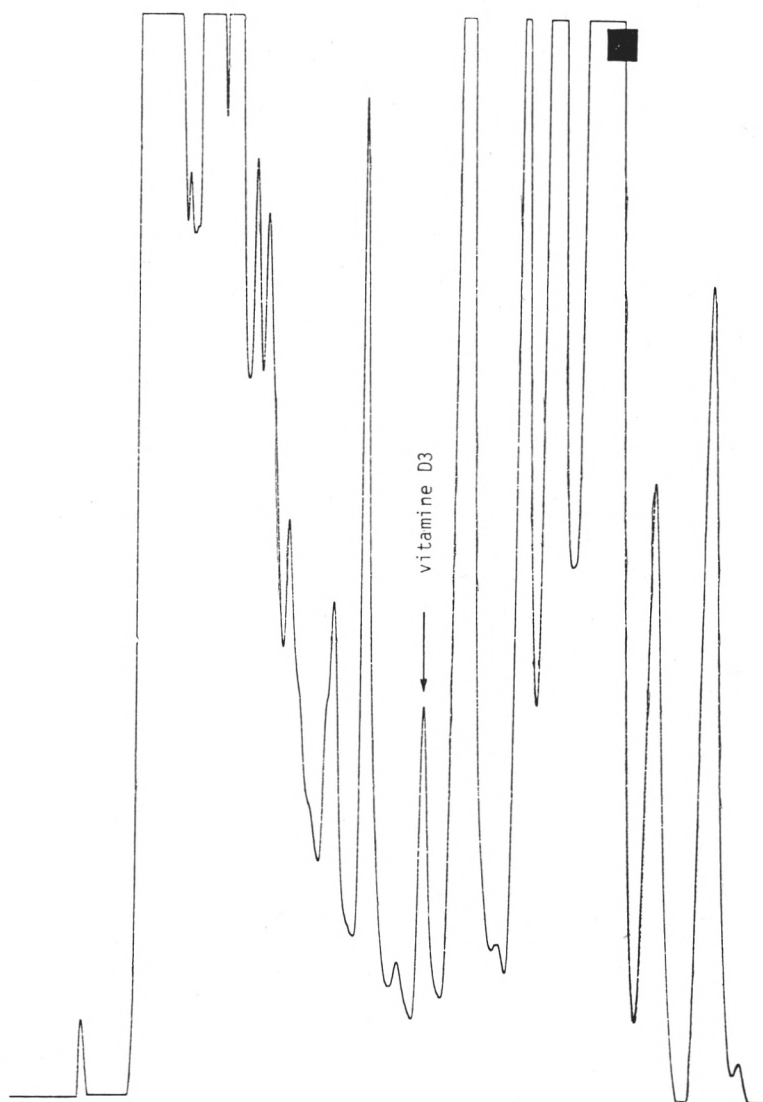
$$\text{U.I./l} = \frac{s}{(S - s)} \cdot A \cdot 10.$$

A = quantité de vitamine D₃ ajoutée (U.I.) dans 100 ml de lait.

s = surface du pic sans ajout.

S = surface du pic avec ajout.

Le calcul peut aussi être effectué à partir d'un étalonnage externe à condition de connaître le taux de perte en vitamine D₃ occasionné par les différentes étapes de l'extraction et de la purification. Dans les conditions opératoires décrites ci-dessus, nous avons établi que le taux de récupération de la vitamine D₃ est de l'ordre de 80 p. 100.

*fig. 2*

CLHP (profil chromatographique d'un lait cru
(conditions analytiques : Cf. II-44).

III. TENEURS EN VITAMINE D₃ DE QUELQUES LAITS FRANÇAIS

Des analyses ont été réalisées sur des échantillons de laits crus de mélange, provenant de différentes régions françaises. Les résultats indiqués représentent la moyenne de plusieurs déterminations, effectuées sur des échantillons différents qui, pour une même région, ont été prélevés le même jour. Tous les prélèvements ont eu lieu durant les mois de septembre et octobre 1980.

- Région Nord : 29 U.I./l (M.G. : 40,25 g/l).
- Région Normande :
 - a) 24 U.I./l (M.G. : 41,0 g/l).
 - b) 25 U.I./l (M.G. : 42,0 g/l).
 - c) 55 U.I./l (M.G. : 44,0 g/l).
- Région Bretagne : 36 U.I./l (M.G. : 41 g/l).
- Région Ile-de-France :
 - a) 40 U.I./l (M.G. : 39,0 g/l).
 - b) 34 U.I./l (M.G. : 38,5 g/l).
- Région Nord-Alpes : 25 U.I./l (M.G. : 40,5 g/l).
- Région Yonne :
 - a) 50 U.I./l (M.G. : 43,0 g/l).
 - b) 30 U.I./l (M.G. : 40,5 g/l).

CONCLUSION

La recherche et le dosage de la vitamine D₃ dans le lait nécessitent la mise en œuvre de techniques analytiques très sensibles. La chromatographie liquide haute pression permet d'être à la fois suffisamment sensible, reproductible et relativement rapide pour pouvoir être utilisée comme méthode de routine. La réalisation d'une pré-enquête sur la teneur en vitamine D de laits français a permis de constater que selon l'origine des échantillons, la vitamine D₃ est présente dans les laits crus, dans des limites variant de 25 à 50 U.I./l. Il serait intéressant de pouvoir affiner ces chiffres en étudiant notamment l'influence de certains paramètres zootechniques (races, alimentation, etc.) ainsi que l'évolution au cours de l'année. Enfin, l'étude de la vitamine D reste encore incomplète tant que l'on n'a pas à sa disposition une méthode de dosage suffisamment précise de l'ester sulfate de cholécalciférol et de l'hydro 25 cholécalciférol.

Remerciements

Nous remercions M. le professeur Raoul (professeur Faculté de Pharmacie, Paris), M. le professeur Pellerin (professeur Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry), Mlle Le Boulch (I.N.S.E.R.M.) qui, grâce à leurs conseils et leurs encouragements ont contribué à la réalisation de cette étude.

Résumé

Après saponification et extraction de l'insaponifiable, la vitamine D₃ est dosée dans le lait par chromatographie liquide haute pression. La technique proposée permet le dosage de la vitamine D jusqu'à une teneur limite de 20 U.I./l. Une pré-enquête réalisée en automne 1980 a montré que les teneurs en vitamine D₃ des différents laits français analysés varient de 25 à 50 U.I./l.

Summary

DETERMINATION OF VITAMIN D IN MILK BY HPLC

After saponification and extraction of unsaponifiable matter, vitamin D₃ is determined in milk by high pressure liquid chromatography. The technique we propose allows to proportion vitamin D up to a limited content of 20 U.I. a liter. Preliminary investigations realised during autumn 80 proved that vitamin D₃ contents, in various analysed french milks, differ from 25 to 50 U.I. a liter.

Reçu pour publication en juillet 1981.

Bibliographie

- [1] ALLEN (C.), RAY (Y. J.), NELSON DWYER and REAGER (J. C.) (1977). — High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Vitamine D₃ in Livestock Feed Supplements. *J.A.O.A.C.*, 60, (6), 1296-1301.
- [2] ANTALICK (J. P.) (1979). — Dosage des vitamines A, D, E par chromatographie liquide haute pression. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 72, (780), 571-575.
- [3] ANTALICK (J. L.), DEBRUYNE (H.) et FAUGÈRE (J. G.) (1977). — Le dosage de la vitamine D dans les aliments par chromatographie liquide, haute pression. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 70, (757), 497-502.
- [4] BELL (G.) and CHRISTIE (A. A.) (1973). — Gas liquid chromatographic determination of vitamine D in cod liver oil. *Analyst*, 98, 268-273.
- [5] BELLOMONTE (G.). — Gaz chromatographic determination of vitamine D in Premix. Commission Experts C.E.E. Cité par ANTALICK J. L. *et al.* [3].
- [6] BRENDL (R.) und JANECKE (H.) (1972). — Zur Bestimmung kleinster Mengen Vitamin D in biologischem Material. I: Gas-flüssig-chromatographie der vitamin D. *Z. Anal. Chem.*, 258, 114-117.

- [7] EWING (E. T.), KINGSLEY (G. V.), BROWN (R. A.) and EMMET (A. D.) (1943). — Determination of vitamins D in fish liver oil. *Ang. Eng. Chem. Anal.*, 15, 301.
 - [8] HOFSSASS (H.), GRANT (A.), ALICINO (N. J.) and GREENBAUM (S. B.) (1976). — High pressure liquid chromatographic détermination of vitamin D₃ in resins, oils, dry concentrates, and dry concentrates containing vitamin A. *J.A.O.A.C.*, 59, (2), 251-260.
 - [9] LE BOULCH (N.), GULAT-MARNAY (C.) et RAOUL (Y.) (1974). — Dérivés de la vitamine D₃ des laits de femme et de vache : ester sulfate de cholécalférol et hydroxy. 25 cholécalférol. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 44, (2), 167-179.
 - [10] MODEST OSADCA and MERCEDES ARANJO (1977). — High Pressure Liquid chromatographic separation and identification of vitamins D₂ and D₃ in the presence of fat soluble vitamins in dosage forms. *J.A.O.A.C.*, 60, (5), 993-997.
 - [11] MULDER (F. J.), DE VRIES (E. J.) and BORSJE (B.) (1971). — Analysis of fat soluble vitamins. *J.A.O.A.C.*, 54, (5), 1168-1164.
 - [12] NAIR (P. P.) and STELLA DE LEON (1967). — Current research on gas liquid chromatography of the vitamin D group. *Progr. Biochim. Pharmacol.*, 3, 498-505.
 - [13] NIELD (C. H.), RUSSEL (W. C.) and ZIMMERLI (A.) (1940). — A. Spectrophotometric determination of vitamins D₂ and D₃. *J. Biol. Chem.*, 136, 73.
 - [14] PELLERIN (F.) et DUMITRESCU (1979). — Dosage des vitamines lipo et hydro-solubles dans les préparations polyvitaminées par chromatographie liquide haute performance. *Talanta*, 27, 243-251.
 - [15] RUCKEMANN (H.) et RANFFT (K.) (1977). — Méthodes pour doser les vitamines au moyen de la chromatographie liquide haute performance. *Zeitschrift für Lebensmittel.*, 164, (4), 272-273.
 - [16] VITAMINE COMPENDIUM (1970). — HOFFMANN (F.) et LA ROCHE (A. G.), Basel, Schweiz.
 - [17] WILLIAMS (R. C.), SCHMIDT (J. A.) and HENRY (R. A.) (1972). — Quantitative Analysis of fat soluble vitamins by high speed liquid chromatography. *J. Chrom. Sci.*, 8, 494-501.
-