

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Les produits d'oxydation du cholestérol dans les produits
laitiers : aspects analytiques et technologiques.

de Mme Christine Rose-Sallin

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

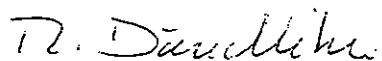
La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

Messieurs R. Tabacchi, J.-M. Neuhaus,
J.-O. Bosset (Liebefeld), R. Sieber (Liebefeld)
et Mme E. Prior (Lausanne)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 25 avril 1996

Le doyen:



R. Dändliker

A Pascal
A mes parents

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé d'avril 1993 à février 1996 pour l'essentiel à la station fédérale de recherches laitières (FAM, Liebefeld-Berne) avec un stage de 5 mois au Centre de Recherche Nestlé (CRN, Vers-chez-les-Blanc) sous la responsabilité du Docteur Jacques O. Bosset (FAM) et sous la direction du Professeur Raffaele Tabacchi (Institut de chimie organique, Université de Neuchâtel).

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au *Docteur Jacques O. Bosset* qui en tant qu'instigateur de ce projet de recherche a suivi entièrement ce travail. Ses précieux conseils tant dans le domaine analytique que rédactionnel, sa disponibilité à mon égard furent d'un soutien précieux.

Je remercie le *Professeur Raffaele Tabacchi* pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordée durant cette période. Sa présence notamment lors des « grands moments » où j'ai eu la possibilité de présenter mes résultats publiquement m'a soutenue et beaucoup touchée.

Je remercie également:

La FAM ainsi qu'un certain nombre de partenaires industriels, à savoir par ordre alphabétique le groupe français CANDIA ainsi que les maisons suisses CREMO, MIGROS et NESTLÉ pour leur intérêt à ce travail et leur soutien financier.

Mes collègues du groupe Métabolique - *Ernst Baumann, Ueli Bütikofer, Doris Fuchs, Roland Gauch, Misà Imhof* et *Dr Raoul Mariaca* - ainsi que - *Dr Raoul Daniel, Dr Marius Collomb* et *Monica Spahni* - de la section chimie de la FAM, pour m'avoir intégrée dans leur groupe et section. Leur collégialité et les enrichissants échanges que nous avons eu me furent d'un grand appui.

Le *Dr Robert Sieber* (FAM) pour sa recherche de littérature et sa gentillesse. Son aide m'a permis de mener à bien ces nombreuses publications.

Les *Dr Laurent Fay, Dr Anthony Huggett, Dr Albrecht Dieffenbacher* et *Sylviane Metairon* (CRN) pour m'avoir si aimablement intégrée dans leurs teams lors de mon stage au CRN ainsi que pour leur efficace collaboration.

Le *Dr Elizabeth Prior* (CRN) et le *Professeur Neuhaus* (Université de Neuchâtel) pour avoir accepté de juger mon travail.

Mes amis et ma famille, leur amitié, leur amour et leur compréhension durant ce travail de thèse furent d'un soutien inestimable.

Neuchâtel, le 23 février 1996



Table des matières

1. Introduction générale	3
2. Mécanismes d'oxydation du cholestérol: un article de synthèse	7
3. Partie expérimentale: Aspects analytiques	29
3.1 Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques RP-HPLC	29
3.2 Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. II. Possibilités et limites des techniques TLC	47
3.3 Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. III. Possibilités et limites des techniques GC-FID	63
3.4 Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [² H ₇]cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts	81
3.5 Validation d'une méthode d'analyse permettant le dosage en parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation dans les denrées alimentaires.	89
4. Applications à quelques produits laitiers: Aspects technologiques	111
5. Conclusion générale	131
6. Résumé	137

CHAPITRE 1

Introduction générale

Le cholestérol est une substance indispensable à notre organisme. Il est présent dans nos membranes cellulaires et assure leur stabilité, leur fluidité et leur fonction. Ce composé sert de précurseur aux biosynthèses hépatique des acides biliaires et endocrine des hormones stéroïdiennes. Dans l'opinion publique et parfois même dans les milieux médicaux, il a cependant « mauvaise presse » ayant été considéré, à tort semble-t-il, comme le principal responsable de l'apparition de l'athérosclérose. Son dépôt et son accumulation dans les parois vasculaires correspondraient en fait à un processus secondaire (1). Des études récentes ont en effet montré que le cholestérol ne peut léser l'endotélium vasculaire, donc initier l'athérosclérose. Cette première phase d'initiation n'est pas encore parfaitement élucidée, mais l'oxydation des lipides au sein des lipoprotéines de basse densité (LDL), c'est-à-dire celle des acides gras insaturés des phospholipides et du cholestérol qu'elles contiennent, semble y jouer un rôle important (2). Plusieurs études ont impliqué les produits d'oxydation du cholestérol (les « oxystérols »), en particulier le 25-hydroxycholestérol et le cholestanetriol, plutôt que leur précurseur, dans la formation de lésions athéromateuses (3,4). Lors d'études expérimentales, certains de ces composés ont également montré des activités biologiques indésirables (5) comme des effets inhibiteurs d'enzyme lors de la biosynthèse du cholestérol (6) ainsi que des effets mutagènes et cytotoxiques (7).

Les oxystérols sont générés par oxydation enzymatique, par autoxydation ou encore par exposition du cholestérol à la chaleur, à la lumière ou à une radiation (8). Leur analyse dans les denrées alimentaires a donc fait l'objet d'une attention toute particulière durant ces quinze dernières années. Ils ont été détectés dans divers aliments d'origine animale tels que produits laitiers, poudres d'oeuf, viandes et

poissons. Certains procédés de fabrication et certaines conditions de stockage favorisent leur formation (9).

Sur le plan analytique, de nombreuses méthodes de dosage des oxystérols dans les denrées alimentaires les plus diverses ont été développées. De grandes variations dans les valeurs reportées pour un même type de produit ainsi que le manque d'informations analytiques (taux de récupération, domaines de linéarité, limites de détection, répétabilité etc.) ont soulevé parfois de vives controverses (10). Le dosage de ces composés est en effet délicat. Il implique plusieurs étapes de purification durant lesquelles ces composés peuvent être soit détruits, soit formés par oxydation artefactuelle du cholestérol ainsi qu'une confirmation du dosage par spectrométrie de masse (MS).

Afin de pouvoir estimer les risques éventuels encourus par le consommateur, lors de l'ingestion d'oxystérols, voire si possible limiter ou prévenir ce risque - donc la formation de tels composés dans les denrées alimentaires - les toxicologues, les nutritionnistes et les industriels du secteur agro-alimentaire demandent des méthodes de dosage rigoureuses et fiables. L'objectif de cette thèse de doctorat est donc de répondre à cette attente et à l'intérêt plus général d'un pool d'industriels du secteur laitier.

Après la présente introduction générale en guise de chapitre 1, le chapitre 2 passe en revue, sous la forme d'un article de synthèse (11), les principaux mécanismes d'oxydation, en particulier le mécanisme d'autoxydation (processus majeur rencontré dans les denrées alimentaires) et plus brièvement les mécanismes enzymatiques. L'aspect analytique, décrit dans le chapitre 3, est la partie clé de ce travail. Plusieurs techniques d'analyse des oxystérols ont été testées et comparées avant d'adopter l'une d'elles pour des dosages de routine. Il s'agit successivement de techniques par chromatographie liquide/liquide à haute performance (HPLC) avec détection par absorption dans l'UV (12), par chromatographie sur couche mince (TLC) (13) et par chromatographie gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC-FID) (14) puis par MS (15). Cette dernière méthode d'analyse (GC-MS) en mode « selected ion monitoring » (SIM) a finalement été retenue pour ses indéniables avantages. Elle permet d'effectuer un contrôle de l'oxydation artefactuelle du cholestérol durant

toutes les étapes d'enrichissement de même que l'analyse parallèle du cholestérol sans étape supplémentaire de purification (16). Cette méthode a ensuite été validée, d'abord dans les laits en poudre, puis dans diverses autres denrées alimentaires telles que poudres de jaune d'oeuf, saindoux, fromages et beurre fondu. L'aspect technologique enfin, qui intéresse tout particulièrement les milieux industriels de l'agro-alimentaire, est traité dans le chapitre 4 (17), en reconsidérant les effets de certains procédés de fabrication, de conditions de stockage et de traitements thermiques à des fins culinaires de quelques produits laitiers frais du commerce susceptibles d'en oxyder le cholestérol. Une conclusion générale clôt la présente thèse en rappelant brièvement non seulement les avantages et inconvénients des diverses méthodes analytiques testées mais encore les principaux résultats de leur application aux divers produits laitiers du commerce considérés.

La partie bibliographique de cette thèse ainsi que la partie expérimentale, soit le développement, la comparaison et la validation des méthodes analytiques susmentionnées ainsi que leur application aux produits laitiers ont été conduites pour l'essentiel à la Station fédérale de recherches laitières (FAM) à Liebefeld-Berne. Le développement de la méthode GC-MS (chapitre 3.4) a été mené à bien lors d'un stage au Centre de Recherche de Nestlé (CRN) à Vers-chez-les-Blanc/Lausanne. Cette thèse a bénéficié du soutien de la FAM ainsi que d'un certain nombre de partenaires industriels, soit par ordre alphabétique le groupe français CANDIA ainsi que les maisons suisses CREMO, MIGROS et NESTLE sous la forme d'une bourse ou de demandes d'analyses.

Afin de pouvoir justifier l'avance des travaux au fil des ans, cette thèse a été structurée comme une suite de travaux indépendants qui ont fait ou feront encore l'objet de publications séparées. Il en résulte que chaque chapitre et sous-chapitre possèdent leur propre introduction, leur partie expérimentale, leurs résultats et discussion, leur conclusion, leur résumé et leur bibliographie. Une telle structure, assez particulière pour un mémoire de thèse, entraîne d'inévitables répétitions et redondances.

Références

1. *Addis, P. B. and Park, S.W.* Role of lipid oxidation products in atherosclerosis. In: *Taylor, S. L. and Scanlan, R. A.* (eds). Food toxicology, p.297-327. M. Dekker, New York, Basel (1989)
2. *Maziere, J. C., Salmon, S., Santus, R., Reyftann, J. P., Morfierre, P., Maziere, C., Candide, C., Goldstein, S., Dubertret, L. and Polonovski, J.*: L'oxydation des lipides des lipoprotéines de basse densité et ses conséquences sur la physiologie cellulaire. In : *Beck, J. P. and Crastes de Paulet, A.* (eds). Activités biologiques des oxystérols.p. 63-76. Colloque Inserm, Paris (1988)
3. *Imai, H., Werthessen, N. T., Taylor, B. and Lee, K. T.*: Angiotoxicity and arteriosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. *Arch. Pathol. Lab. Med*, **100**, 565-571 (1976)
4. *Taylor, B., Peng, S. K., Werthessen, N. T., Tham, P. and Lee, K. T.*: Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**, 40-57 (1979)
5. *Peng, S.-K. and Morin, R. J.* (Eds). Biological effects of cholesterol oxides, London: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor (1992)
6. *Kandutsch, A. A., Chen, H. W. and Heiniger, H. J.*: Biological activity of some oxygenated sterols. *Science* **201**, 498-501 (1978)
7. *Sevenian, A. and Peterson, A. R.* The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 1103-1110 (1986)
8. *Smith, L.L.*: Cholesterol autoxidation. Plenum Press, New York (1981)
9. *Addis, P.B. and Park, S.W.*: Cholesterol oxides content in foods. In: *Peng, S.-K. and Morin, R.J.*: Biological effects of cholesterol oxides, p.71-88. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London (1992)
10. *McCluskey, S. and Devery, R.*: Validation of chromatographic analysis of cholesterol oxides in dried foods. *Trends Food Sci. Technol.* **4**, 175-178 (1993)
11. *Rose-Sallin, C., Sieber, R., Bosset, J.O. et Tabacchi, R.*: Mécanismes d'oxydation du cholestérol: un article de synthèse. Accepté pour publication dans le J. français oléagineux, corps gras, lipides (OCL)
12. *Sallin, C., Baumann, E., Bütikofer, U., Sieber, R. et Bosset, J. O.*: Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques RP-HPLC. *Trav. chim. aliment. hyg.* **84**, 141-157 (1993)
13. *Rose-Sallin, C., Sieber, R., Bosset, J.O. et Tabacchi, R.*: Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques TLC. *Trav. chim. aliment. hyg.* **84**, 566-580 (1993)
14. *Rose-Sallin, C., Sieber, R., Bosset, J.O. et Tabacchi, R.*: Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques GC-FID. Rapport interne (FAM INFO no 290W/septembre 1994)
15. *Rose-Sallin, C., Huggett, A. C., Bosset, J. O., Tabacchi, R. and Fay, L. B.*: Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [²H₇]cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. *J. of Agric. Food Chem.* **43**, 935-941 (1995)
16. *Rose-Sallin, C., Sieber, R., Bosset, J. O. et Tabacchi, R.*: Validation d'une méthode d'analyse permettant le dosage en parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation dans les denrées alimentaires. *Trav. de chim. aliment. hyg.* Sous presse
17. *Rose-Sallin, C., Sieber, R., Bosset, J.O. et Tabacchi, R.*: Effets d'un stockage ou d'un traitement thermique sur la formation des oxystérols dans les produits laitiers. *Food Sci. Technol.* Sous presse

CHAPITRE 2

Mécanismes d'oxydation du cholestérol: un article de synthèse

Christine Rose-Sallin, Robert Sieber, Jacques Olivier Bosset

Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne

Raffaele Tabacchi

Institut de chimie, Université de Neuchâtel, Neuchâtel

Accepté pour publication dans le *Journal Français des Oléagineux, Corps Gras, Lipides (OCL)*

Introduction

En 1816, *Chevreul* [1] appela « cholestérine » (issu des mots grecs « chole » et « steros » qui signifient « bile » et « solide ») la substance extraite de calculs biliaires humains. Mais ce n'est qu'environ un siècle plus tard que la labilité du cholestérol fut mise en évidence. *Schultze et Winterstein* [2] ont rapporté que le cholestérol cristallin pouvait s'oxyder spontanément à l'air. *Lifschütz* [3,4] a découvert une méthode permettant d'identifier les produits d'oxydation du cholestérol (les oxystérols) par une réaction avec l'acide sulfurique qui produit une intense couleur bleue ou verte. Cette méthode de détection dite « test de couleurs de Lifschütz » a été utilisée par la suite en chromatographie sur couche mince (TLC) pour l'identification de ces oxystérols par vaporisation de la plaque à l'acide sulfurique. *Blix et Löwenhielm* [5] ont établi le rôle clé de l'oxygène moléculaire dans l'autoxydation du cholestérol. C'est entre 1930 et 1960 environ que s'est développée la chimie du cholestérol à proprement parler, notamment la découverte de structures apparentées entre les stérols, les sels biliaires, les hormones stéroïdes et les triterpénoïdes. Plusieurs oxystérols tels que le 7 α -hydroxycholestérol (cholest-5-ène-3 β ,7 α -diol) et le 7 β -hydroxycholestérol (cholest-

5-ène-3 β ,7 β -diol) ont en outre pu être isolés à partir de tissus animaux. *Bergström et Wintersteiner* [6-8] ont développé un système modèle permettant l'étude de l'oxydation du cholestérol. Leurs travaux ont abouti à l'identification des produits d'oxydation les plus courants et probablement les mieux connus comme le 7 α -hydroxycholestérol, le 7 β -hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol (3 β -hydroxycholest-5-ène-7-one). *Fieser et Fieser* [9] ont publié un travail de référence sur l'oxydation des stéroïdes, notamment un article de synthèse sur l'oxydation du cholestérol.

Par la suite, le développement de méthodes analytiques toujours plus performantes telles que la TLC, la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie liquide/liquide à haute performance (HPLC) ont permis de mieux connaître ce domaine. *Smith* [10] a publié un important ouvrage sur l'autoxydation du cholestérol. A ce jour plus de 60 oxystéroïdes ont été identifiés tant dans des milieux naturels comme le plasma sanguin, les extraits de tissu animaux et les denrées alimentaires que dans les systèmes modèles. Ils sont caractérisés par un ou plusieurs atomes d'oxygène sur la molécule de cholestérol en formant des alcools primaires, secondaires ou tertiaires, des hydroperoxydes, des aldéhydes, des cétones, des époxydes et des endoperoxydes. La figure 1 montre les positions où l'oxygène attaque le cholestérol [11]. Les composés prédominants sont ceux issus de l'oxydation du cycle B, la double liaison favorisant les attaques en position allylique et l'époxydation. Les produits formés sont le 7 α -hydroxycholestérol, le 7 β -hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol, le cholesta-3,5-diène-7-one et le 3 β ,5 α ,6 β -cholestanetriol [10]. Lorsque le cholestérol se trouve sous forme cristalline, son état d'agrégation est tel que l'empilement des molécules protège les cycles d'une éventuelle oxydation, laissant en revanche la chaîne aliphatique latérale exposée à l'oxydation [12]. Les carbones tertiaires situés en position 20 et 25 sont alors oxydés et forment ainsi le 20 α -hydroxycholestérol (cholest-5-ène-3 β ,20 α -diol) et le 25-hydroxycholestérol (cholest-5-ène-3 β ,25-diol) (figure 1).

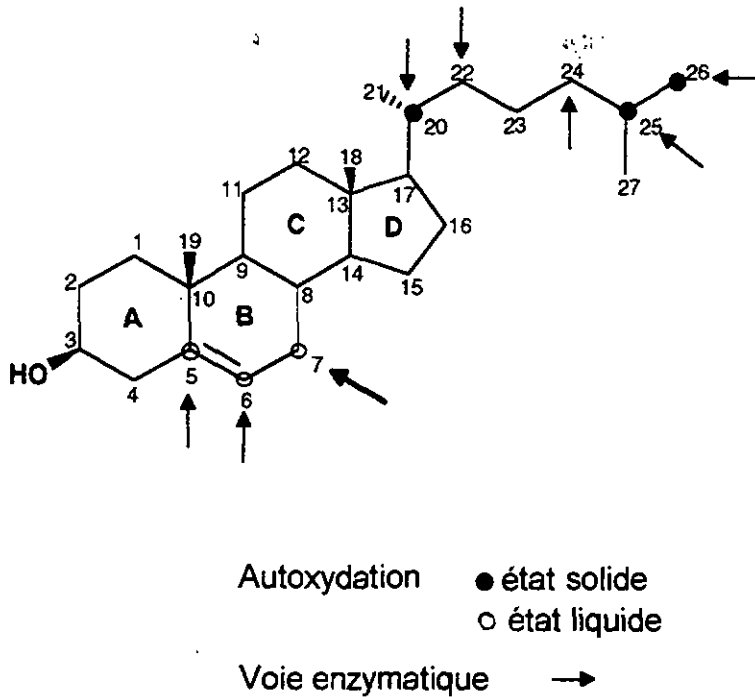


Figure 1. Positions d'attaque oxydative sur la molécule de cholestérol (Crastes de Paulet *et al.*, 1990).

L'importance biologique des oxystérols, leurs effets cytotoxiques et mutagènes ainsi que leur rôle probable dans l'initiation de l'athérosclérose, expliquent l'intérêt de l'étude de leur mécanisme de formation [13]. Cette étude *in vivo* est complexe à cause de la formation possible d'oxystérols durant les procédés d'extraction [14].

Le présent article passe en revue les principaux mécanismes de l'oxydation du cholestérol, en particulier le mécanisme d'autoxydation (processus majeur rencontré dans les denrées alimentaires) et plus brièvement les mécanismes enzymatiques. Il évoque également le rôle possible des autres composés lipidiques sur la formation des oxystérols. Le terme d'oxystérols désignera exclusivement les produits d'oxydation du cholestérol.

Mécanisme d'autoxydation des lipides

L'autoxydation des lipides est un processus radicalaire de réactions en chaîne comprenant 3 étapes: l'initiation, la propagation et la terminaison [15] (figure 2).

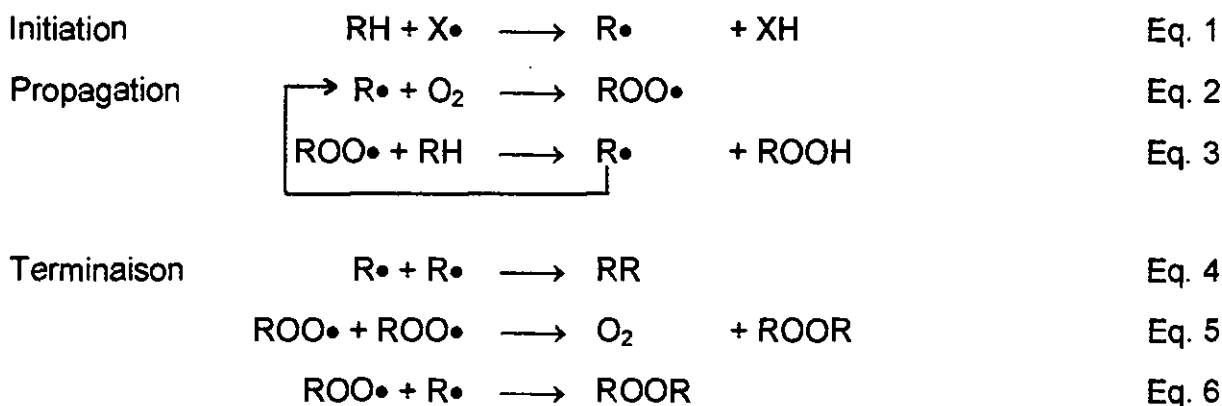


Figure 2. Une autoxydation suit un mécanisme radicalaire de réactions en chaîne.

Certains agents tels que les initiateurs impliqués dans la phase initiale de l'autoxydation sont encore assez mal connus. Le terme « autoxydation » implique théoriquement une initiation propre du substrat sans influence extérieure, mais il est évident que des agents externes interviennent. Un radical généré par photolyse ou irradiation à haute énergie, un radical obtenu par décomposition d'un hydroperoxyde ou un métal de transition peut déclencher l'abstraction d'un hydrogène pour former un radical alkyle [16].

Le processus d'initiation de l'autoxydation d'un lipide insaturé peut être subdivisé en 2 types de réactions; celles impliquant le substrat RH (lipide insaturé) et celles entraînant la décomposition du produit ROOH (hydroperoxyde). D'après Chan, le processus le plus probable d'initiation impliquerait la participation d'un ion métallique comme catalyseur de ces 2 types de réactions [16] (figure 3). La réaction avec RH (Eq. 7) est très importante en début de réaction, lorsque l'on n'a pas ou que très peu de ROOH. L'importance de cette réaction dépend de l'énergie de dissociation de R-H. Pour le linoléate de méthyle par exemple, ce processus (Eq. 7) a été estimé par Heaton et Uri [17] comme étant exothermique. Avec la formation de ROOH, les

réactions (Eq. 8 et 9) d'initiation de nouvelles chaînes de réactions prennent de l'importance. Le processus « d'autocatalyse » s'installe alors.

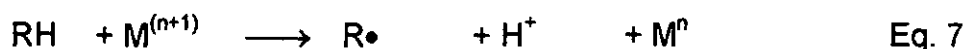


Figure 3. Processus d'initiation d'une autoxydation catalysée par un ion métallique.

Les réactions décrites par les Eq. 2 et 3 forment la base du processus de réactions en chaîne. Il y a formation de radicaux peroxydes, qui réagissent et forment à leur tour des hydroperoxydes et de nouveaux radicaux relançant ainsi les cycles de propagation. La première réaction d'oxygénation (Eq. 2) est extrêmement rapide, avec une énergie d'activation proche de zéro. La deuxième (Eq. 3) possède une énergie d'activation qui dépend de l'énergie de dissociation de la liaison R-H. La facilité d'abstraction d'un hydrogène du composé lipidique RH va déterminer en fait la vitesse de l'autoxydation, elle-même dépendante du degré d'insaturation des composés. Les cinétiques de l'oxydation des acides stéarique, oléique, linoléique et linoléique sont dans le même rapport que les nombres 1, 100, 1200 et 2500 [18].

Lorsque 2 radicaux se combinent et forment des composés stables, la chaîne de propagation s'arrête par ce qu'on appelle une réaction de terminaison (Eq 4-6). Ce type de réaction se produit en fait après une série de réactions intermédiaires telles que réarrangement intramoléculaire, élimination, addition ou déplacement [19]. Les produits stables finalement formés sont en général des aldéhydes, des alcools et des hydrocarbures.

Autoxydation du cholestérol

L'autoxydation du cholestérol suit un processus radicalaire de réactions en chaîne identique aux autres lipides insaturés [10]. La résonance paramagnétique électronique l'a mis en évidence en identifiant, lors d'une irradiation du cholestérol, le radical libre situé sur le carbone C7 (le radical 3 β -hydroxycholest-5-ène-7-yl), le

radical situé sur le carbone tertiaire C25 (le radical 3 β -hydroxycholest-5-ène-25-yl) et en présence d'oxygène des radicaux peroxydes [20].

Deux voies distinctes d'autoxydation apparaissent pour le cholestérol (figure 4) [21]: un processus majeur avec la formation d'un hydroperoxyde (Eq. 10) et un processus mineur avec une déhydrogénation de la fonction alcool du cholestérol (Eq. 11).

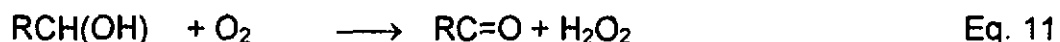


Figure 4. Deux processus d'autoxydation d'un stérol (Smith, 1980).

Le processus majeur correspond à la réaction du radical 3 β -hydroxycholest-5-ène-7-yl avec l'oxygène triplet (figure 5). Le radical C7 peroxy est formé puis, par l'abstraction d'un hydrogène (provenant par exemple du cholestérol), il est transformé en 7 α - et 7 β -hydroxyperoxycholestérol. Ces deux hydroperoxydes sont les premières substances que l'on a pu identifier lors de l'autoxydation du cholestérol. Elles sont formées simultanément, mais le 7 β -hydroperoxyde, quasi-équatorial, est prédominant, car plus stable thermodynamiquement [22]. Elles sont ensuite réduites en leurs alcools correspondants (les 7 α - et 7 β -hydroxycholestérol) et en 7-cétocholestérol [23]. Ce dernier composé peut être à son tour dégradé thermiquement en cholesta-3,5-diène-7-one [24].

Mécanismes d'oxydation du cholestérol

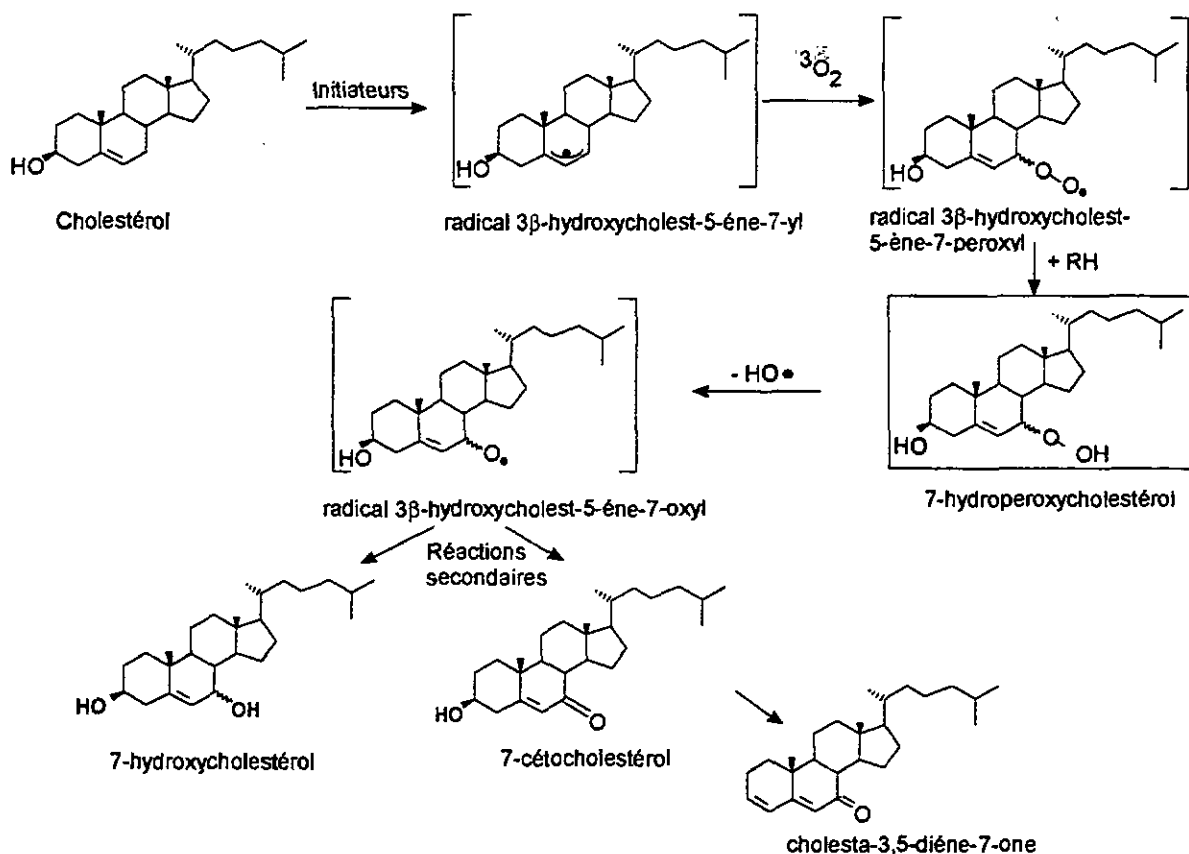


Figure 5. Autoxydation du cholestérol en position allylique.

La réaction du radical C25 (3 β -hydroxycholest-5-ène-25-yl) avec l'oxygène triplet forme selon le même mécanisme le radical 3 β -hydroxycholest-5-ène-25-peroxyl qui est ensuite transformé par l'abstraction d'un hydrogène en 25-hydroperoxycholesterol. Ce dernier composé se dégrade thermiquement en 25-hydroxycholesterol comme produit majeur. D'autres hydroperoxydes de la chaîne latérale tels que les 20 α - et 20 β -, 24 α - et 24 β -, 26 α - et 26 β -hydroperoxydes* ont été mis en évidence à partir de cholestérol vieux et fortement oxydé à l'air [23]. Ces composés ont en outre la particularité de se décomposer par une scission β d'une liaison carbone-carbone de la chaîne latérale et d'engendrer des substances volatiles en C₂-C₆ et des stérols en C₂₀-C₂₄. Au nombre des premiers cités, l'acétone et l'acide acétique en sont les substances dominantes [10].

* La molécule de cholestérol étant asymétrique, la position C₂₆ est un centre prochiral qui différencie stéréochimiquement les groupes méthyles C₂₆ et C₂₇. La nomenclature exacte des hydroperoxydes correspondants est par conséquent: le (25R)- et le (25S)-26-hydroperoxyde (oxydation en C₂₇ et C₂₆ respectivement) [25].

Comme processus d'autoxydation mineur, la fonction alcool du cholestérol peut être déhydrogénée selon un mécanisme qui impliquerait la formation initiale d'un radical en C3 suivie d'une réaction avec l'oxygène triplet pour former le radical 3-hydroxy-3-peroxyl. Ce dernier se transforme alors par élimination de peroxyde d'hydrogène en cholest-5-ène-3-one, un autre produit mineur de l'autoxydation du cholestérol. Cette cétone isomérise alors facilement pour former le cholest-4-ène-3-one, composé plus stable [26].

Les 5 α ,6 α - et 5 β ,6 β -époxycholestérols (5,6 α - et 5,6 β -époxy-5 α -cholestane-3 β -ol) ont aussi été identifiés dans du cholestérol vieux et oxydé à l'air, mais leur mécanisme de formation est plus complexe. Il semblerait en effet que les 5,6-époxydes ne soient pas seulement formés par la réaction du cholestérol avec $^3\text{O}_2$, mais surtout avec différentes espèces d'oxygène actifs telles que le peroxyde d'hydrogène, un stérol hydroperoxydé et l'ozone [27]. Les 5,6-époxydes présentent des degrés de stabilité différents suivant le milieu et le pH considérés [28,29]. Ils peuvent être à leur tour hydrolysés en 3 β ,5 α ,6 β -cholestanetriol, considéré comme particulièrement toxique.

Oxydation du cholestérol impliquant d'autres espèces d'oxygène actif

Les espèces d'oxygène actif impliquées dans l'initiation de l'autoxydation du cholestérol ou d'autres oxydations peuvent être monoatomique, diatomique ou triatomique. Elles incluent l'état fondamental de l'oxygène moléculaire (triplet: $^3\text{O}_2$), l'oxygène moléculaire électroniquement excité (singulet: $^1\text{O}_2$), le radical anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, le cation dioxygène O_2^+ , les peroxydes (H_2O_2 , HOO^{\cdot} , O_2^{2-}), le radical hydroxyle HO^{\cdot} et l'ozone O_3 . Le cation dioxygène O_2^+ est absent des systèmes biologiques. Le radical anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ ne semble pas réagir avec le cholestérol [30], mais dismute en générant du peroxyde d'hydrogène qui peut à son tour former le radical hydroxyle HO^{\cdot} , soit deux espèces oxydantes pour le cholestérol [23].

L'ozone

L'ozone, O_3 , est un oxydant très actif présent dans l'atmosphère. Il oxyde le cholestérol soit par Δ^5 -scission, c'est-à-dire par scission de la double liaison et formation d'ozonides ou de peroxyacétals selon le milieu réactionnel, soit par Δ^5 -époxydation [31,32]. Comme pour une autoxydation du cholestérol, ce deuxième mécanisme produit les 5α - et 5β -époxycholestérols, l'épimère β y étant prédominant. Cependant, seuls ces deux composés ont pu être mis en évidence dans les tissus animaux [23].

L'oxygène singulet

L'oxygène singulet, 1O_2 , peut être généré chimiquement, enzymatiquement, par décharge électrique ou par décomposition d'hydroperoxydes. Sa formation par voie photochimique est dominante, notamment dans des systèmes alimentaires contenant des photosensibilisateurs tels que la riboflavine, la chlorophylle ou l'hématoporphyrine [33,34].

L'oxygène singulet réagit avec la double liaison $\Delta_{5,6}$ du cholestérol selon un mécanisme concerté de type "ène" (cf. figure 6). Le 5α -hydroperoxycholestérol est le produit formé majoritairement par abstraction stéréospécifique de l'hydrogène en position 7α . Les 6α - et 6β -hydroperoxycholestérols sont les produits formés minoritairement par l'abstraction des l'hydrogènes axial 4β et équatorial 4α . Aucune épimérisation des 6-hydroperoxycholestérols n'a été observée lors d'expériences de contrôle [22]. Etant donné la spécificité de sa formation, le 5α -hydroperoxyde est considéré comme un marqueur de la présence d'oxygène singulet dans des systèmes contenant du cholestérol [10,35]. Il peut cependant subir un réarrangement allylique pour former l'isomère 7α -hydroperoxyde, rendant ainsi plus difficile l'interprétation d'un mécanisme de photooxydation ou d'autoxydation radicalaire [36]. Cette transformation évoque un réarrangement sigmatropique (1;3) avec le radical 5α -peroxyde et le radical 7α -peroxyde comme intermédiaires [37,38]. Ce réarrangement est très différent de l'épimérisation du 7α -hydroxycholestérol en 7β -hydroxycholestérol qui suggère plutôt une dissociation de l'oxygène du stérol [23].

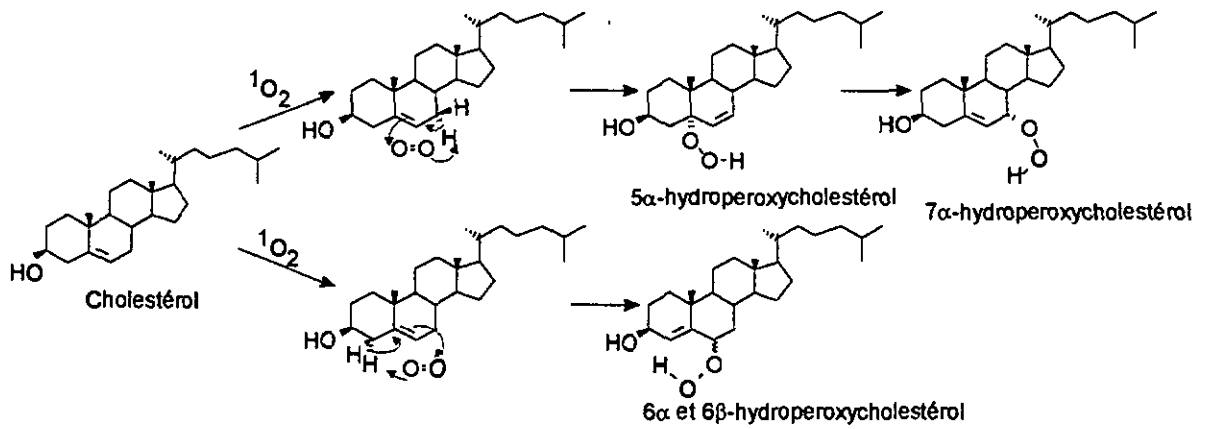


Figure 6. Oxydation du cholestérol par l'oxygène singlet (photooxydation).

Le peroxyde d'hydrogène

La réaction du peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , avec le cholestérol génère le mélange des 5,6-époxycholestérols épimères avec la forme 5 β ,6 β -époxyde prédominante. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas seulement actif en tant que tel dans l'oxydation du cholestérol, mais peut se dismuter et générer des oxygènes triplet et singlet et former des radicaux hydroxyles par homolyse de la liaison peroxyde (réaction catalysée par des ions métalliques). Ces espèces d'oxygène sont elles aussi oxydantes pour le cholestérol [39].

Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle HO^\bullet , peut se former soit par radiolyse de l'eau, soit par réaction du peroxyde d'hydrogène en présence d'un ion métallique (réaction d'Haber-Weiss). Les oxystérols formés par irradiation γ résulteraient d'un mécanisme impliquant le radical hydroxyle [40]. Dans des systèmes organiques ou aqueux, le radical hydroxyle oxyde le cholestérol pour former le 7-cétocholestérol, les 7 α - et 7 β -hydroxycholestérols par abstraction de l'hydrogène en position C7, ainsi que les 5,6-époxycholestérols et le 3 β ,5 α ,6 β -cholestane-triol par addition radicalaire. Tous ces composés ont été identifiés lors d'une radiolyse d'une dispersion aqueuse de cholestérol saturée en dioxyde d'azote. L'absence de formation d'hydroperoxydes semble prouver une attaque par le radical hydroxyle [41].

Les radicaux peroxy et alkoxy

L'étude de l'oxydation directe du cholestérol par des radicaux peroxy et alkoxy (ROO^\bullet , RO^\bullet) est d'un grand intérêt pour comprendre les mécanismes impliqués dans des oxydations biologiques catalysées par des ions métalliques, notamment les peroxydations lipidiques. Une série d'études modèles portant sur les réactions de l'acétate de cholestérol avec divers hydroperoxydes (tert-butylhydroperoxyde, hydroperoxydes de l'acide oléique et de l'acide linoléique) en présence de fer (III) chélaté, a montré la formation du 3 β -acétoxycholest-5-ène-7-one, des 3 β -acétoxycholest-5-ène-7-ols et des 3 β -acétoxy-5,6-époxycholestanes. Cette réaction semblerait être dominée par un processus radicalaire où les radicaux peroxy et alkoxy seraient les espèces attaquantes [42-44]. La stéréosélectivité β de l'époxydation observée serait en outre en accord avec celle rencontrée dans le système microsomal NADPH dépendant des lipides chez le rat [45].

Oxydations enzymatiques du cholestérol

Introduction

L'identification des oxystérols provenant des tissus ainsi que la connaissance de leur origine et de leurs fonctions physiologiques sont très complexes. Certains oxystérols ont une origine métabolique connue, mais pour d'autres, leur origine reste obscure. Des métabolismes endogènes, une peroxydation lipidique, une autoxydation, un apport par l'alimentation, une oxydation photochimique (par exemple une photooxydation du cholestérol de la peau exposée à la lumière et à l'air [46]) peuvent être sources d'oxystérols dans les systèmes vivants. Les oxystérols peuvent également être générés par des oxydants xénobiotiques (par exemple l'oxydation du cholestérol dans les poumons sous l'effet d'oxydants présents dans l'air inspiré [47,48]). Ils peuvent également être formés par autoxydation dans des échantillons biologiques postmortem. La formation artefactuelle d'oxystérols dans de tels échantillons peut en effet être une source d'erreur considérable [10]. L'analyse immédiate de 7-cétocholestérol dans du sang frais a indiqué par exemple une teneur de 24 ng/ml, alors que le même sang conservé 1 heure à température ambiante, sans ajout d'antioxydant, en contenait

déjà 63 ng/ml [49]. Il est par conséquent très difficile d'étudier les mécanismes impliqués *in vivo*.

Métabolisme endogène

Le cholestérol est un composé indispensable à notre organisme. Il est présent dans nos membranes cellulaires et a pour fonction d'assurer leur stabilité, leur fluidité et leur fonction. Le cholestérol sert de précurseur aux biosynthèses hépatique des acides biliaires et endocrine des hormones stéroïdiennes. Il est donc exposé *in vivo* à de nombreuses transformations. Une oxydation enzymatique par les oxydases à fonctions mixtes dépendantes du cytochrome P-450 a lieu par exemple lors de telles biosynthèses. Plusieurs oxystérols en sont dérivés, en particulier, le 7 α -, le 25- et le 26-hydroxycholestérol lors de la biosynthèse hépatique de l'acide biliaire. Le (24S)-cholest-5-ène,3 β ,24-diol qui semble être formé dans le tissu nerveux central jouerait aussi un rôle dans la biosynthèse des acides biliaires. Le 20 α - et le 22-hydroxycholestérol sont impliqués dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes [23].

Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique du cholestérol suit un mécanisme radicalaire semblable à celui d'une autoxydation, mais l'étape initiale de cette réaction est associée à un processus enzymatique comparable aux processus mis en évidence *in vitro*. Trois systèmes enzymatiques ont été étudiés *in vitro*: la lipoxygénase du soja, la peroxydase du raifort et le système microsomal NADPH dépendant des lipides chez le rat. Dans ces trois exemples, l'oxydation du cholestérol est couplée à l'oxygénation d'esters d'acides gras polyinsaturés par la lipoxygénase du soja, à la réduction du peroxyde d'hydrogène catalysée par la peroxydase du raifort et à l'oxydation du NADPH par le système microsomal NADPH dépendant des lipides dans le foie du rat. Des 7-hydroperoxydes épimères sont d'abord formés, puis transformés en 7 α -hydroxycholestérol, 7 β -hydroxycholestérol et 7-cétocholestérol [50]. On a observé une époxydation du cholestérol par l'intermédiaire d'une peroxydation lipidique de microsomes en présence d'un complexe Fe(III)-ADP et de NADPH. Les substances produites sont les 5 α ,6 α - et 5 β ,6 β -époxycholestérol [51-54].

La présence, dans du plasma ou du sérum humain frais, d'oxystérols non impliqués dans le métabolisme du cholestérol tels que le 7 β -hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol et le 5 β ,6 β -époxycholestérol [55-57] de même que celle des 7 β -hydroxycholestérol et 7-cétocholestérol sous la forme d'esters d'acides gras et d'un hydroperoxyde de cholestérol 3 β -linoléate rendent possible l'hypothèse d'une peroxydation lipidique du cholestérol *in vivo* [58].

Oxydation des esters du cholestérol

Dans les denrées alimentaires, le cholestérol est présent en majeure partie sous forme libre. Dans les oeufs ou les produits laitiers, le cholestérol estérifié ne représente qu'environ 10 à 15 % du cholestérol total [59,60]. Dans le poisson, cette proportion peut atteindre 35-38 % [61]. Dans le sang, le cholestérol, transporté par les lipoprotéines de basse et haute densité (LDL, HDL), est par contre estérifié à raison de 80% environ [62]. L'influence de la partie ester d'acides gras sur l'oxydation du cholestérol a donc été étudiée dans des études modèles.

Korahani et al. [63] ont étudié l'autoxydation des esters du cholestérol à l'état solide et en dispersion aqueuse. Des études de cinétique ont montré que la vitesse de l'oxydation de la partie cholestéryle, à l'état solide et en présence de peroxyde de benzoyle, augmente proportionnellement avec le degré d'insaturation des esters, mais qu'après plusieurs heures de réaction, la fraction cholestéryle oxydée devient plus importante pour les esters saturés que non saturés. Au début, l'effet accélérateur des esters insaturés est dû probablement d'une part à la formation de peroxydes initiateurs et d'autre part à une réaction intramoléculaire d'autoxydation entre l'ester insaturé et la partie cholestéryle. Après plusieurs heures de réaction, la chaîne acyle insaturée semble se rompre et ne plus accélérer l'autoxydation. On observe une grande différence entre l'oxydation du cholestérol (libre) à l'état solide et celle de sa forme estérifiée avec une chaîne stéarique ou oléique. Après 4 jours de réaction, seuls 3% du cholestérol libre sont oxydés contre 95% pour ses 2 esters. Dans une dispersion micellaire, cette différence est moins significative, le cholestérol libre s'oxydant aussi bien que le linoléate de cholestérol et même mieux que ses esters d'oléate et de stéarate. Dans un tel milieu, les chaînes stéarique et oléique

semblent au contraire protéger, par leur caractère apolaire, la partie cholestéryle d'une attaque par un oxydant.

D'autres études effectuées à 85°C dans des suspensions aqueuses aérées ont montré l'influence de l'insaturation des chaînes acyles sur l'autoxydation des esters de cholestérol [64,65]. Après 4 heures de réaction, 55% du cholestérol libre sont oxydés, l'oléate de cholestérol reste stable, alors que 20% d'arachidonate, 50% du linoléate et 75% du linoléate de cholestérol sont oxydés. La stabilité des esters de cholestérol semble donc augmenter avec l'insaturation de la chaîne acyle. Norcia et Mahadevan [65] expliquent cette stabilité par l'introduction d'atomes d'oxygène dans la chaîne acyle insaturée, qui change ainsi l'organisation et l'orientation des molécules d'un tel système colloïdal.

Influence des lipides sur l'oxydation du cholestérol non estérifié

L'influence des milieux lipidiques sur l'oxydation du cholestérol a été étudiée dans des systèmes modèles. La présence de triglycérides accélère l'oxydation du cholestérol à 130°C [66]. Pendant les 10 premières heures de réaction, la trioléine semble avoir un plus grand pouvoir accélérateur que la tristéarine, la graisse du lait ou la trilinoléine, en dépit de la plus grande instabilité de cette dernière face à l'oxydation en général. Lors d'études similaires, Osada *et al.* [67] ont observé que le cholestérol pur chauffé 24 heures à 100°C ne produit aucun oxystérol, alors qu'avec des graisses saturées telles que la tristéarine ou le suif de boeuf, on constate une faible oxydation. En présence d'huiles de sardine ou de carthame, la production d'oxystérols atteint son maximum (3 µg d'oxystérols / mg de cholestérol) après 6 heures, puis diminue, les oxystérols formés étant décomposés. Lorsque la matrice contient des huiles de soja, de lin ou de trioléine, une oxydation maximale est atteinte au bout de 12 heures (3,3 µg d'oxystérols / mg de cholestérol) pour diminuer par la suite.

Le stockage de cholestérol pur à l'air sec, à 25 °C pendant 104 jours, et de cholestérol en présence de triglycérides de poisson purifiés ou de trioléine a montré que seul le mélange contenant les triglycérides d'huile de poisson s'était oxydé [68]. Après 24 jours de stockage déjà, on a pu détecter du 7-cétocholestérol, du 7β-hydroxycholestérol et des 5,6-époxycholestérol épimères. Des études récentes ont

également mis en évidence la présence d'importantes quantités d'oxystérols dans divers poissons après séchage à l'air, fumage ou mise en conserve [67-69]. Cette oxydation du cholestérol peut s'expliquer par l'influence de certains acides gras polyinsaturés (PUFAs) abondants dans le poisson de mer. Certains PUFAs relativement instables comme les acides arachidonique (20:4,n-6), eicosapentaénoïque (20:5,n-3) et docosahexaénoïque (22:6,n-3) s'oxydent en effet rapidement. Les radicaux produits lors de l'oxydation de ces PUFAs agissent comme accélérateurs de l'oxydation du cholestérol [68]. L'abaissement du degré d'insaturation des triglycérides d'huile de poisson (par hydrogénation) accroît la période d'induction de l'oxydation du cholestérol. Mais après cette période, la vitesse d'accumulation des oxystérols est la même pour l'huile de poisson hydrogénée ou non hydrogénée. La susceptibilité du cholestérol à l'autoxydation semble donc rester inchangée, seule la période d'induction étant influencée [70].

Si l'influence des lipides et de leur degré d'insaturation sur l'oxydation du cholestérol a été clairement démontrée, elle est cependant parfois difficile à interpréter. Au nombre des explications avancées, on peut mentionner celle de l'influence des lipides sur le point de fusion du cholestérol, celui-ci pouvant s'oxyder plus rapidement à l'état liquide [66]. Une action antioxydante exercée par certains produits de décomposition, de même qu'une inhibition physique causée par certains composés formés (par ex. des polymères) agissant comme barrière et diminuant la mobilité des molécules réactives ou de leur combinaison avec l'oxygène ont également été suggérées [66].

Conséquences nutritionnelles de la formation des oxystérols

Comme l'a montré ce travail, de nombreux produits d'oxydation du cholestérol sont formés *in vivo* aussi bien par des réactions enzymatiques que non enzymatiques. Certaines réactions enzymatiques produisent des « oxystérols métabolites » qui ont des fonctions physiologiques, mais la formation des oxystérols en général par autoxydation et/ou peroxydation lipidique n'a toujours pas de finalité connue. On pourrait citer néanmoins le rôle physiologique des oxystérols, et en particulier celui du 26-hydroxycholestérol dans l'inhibition de la HMG-CoA réductase [71]. En raison des risques potentiels de tels composés pour l'organisme, il est important d'élucider et de

différencier ces mécanismes de formation ainsi que de déterminer la contribution exacte des oxystérols d'origine alimentaire. Des effets mutagènes et cytotoxiques ont été démontrés *in vitro* [13]. Plusieurs études ont également impliqué les oxystérols, en particulier le 25-hydroxycholestérol et le cholestanetriol, plutôt que leur précurseur, le cholestérol, dans la formation de lésions athéromateuses [72,73]. L'oxydation des lipides au sein des lipoprotéines de basse densité (LDL), c'est-à-dire l'oxydation des PUFAs des phospholipides et du cholestérol qu'elles contiennent, semble jouer un rôle important dans l'initiation de l'athérosclérose. Ces LDL modifiées oxydativement ont montré également des effets cytotoxiques où les oxystérols pourraient d'ailleurs être mis en cause. L'oxydation des lipides au sein des lipoprotéines est donc particulièrement étudiée de même que l'utilisation *in vivo* d'antioxydants tels que la vitamine E [74].

Dans les denrées alimentaires, les produits d'oxydation du cholestérol sont formés essentiellement par des réactions non enzymatiques induites par certains procédés de fabrication des aliments (par ex. le séchage de laits en poudre et de poudres d'oeuf), par leur stockage à l'air, par leur exposition à la lumière ou à une irradiation, ainsi que par leur utilisation domestique (chauffage important des graisses animales, friture, etc.). Dans ce domaine, les poudres d'oeuf semblent particulièrement sensibles à une oxydation du cholestérol, en raison de leur forte teneur en ce constituant et de la présence de fer et de graisses insaturées [75]. D'importantes quantités d'oxystérols ont été déterminées dans du suif fortement chauffé [76]. Certaines viandes (lyophilisées ou après friture), des poissons séchés ou fumés et des produits laitiers riches en corps gras (beurre, parmesan, poudre de lait, ghee) peuvent également contenir des quantités non négligeables d'oxystérols [67, 75].

Divers antioxydants connus pour leurs propriétés inhibitrices durant l'oxydation des acides gras insaturés ont également été testés pour ralentir l'oxydation du cholestérol. Dans une étude modèle, l'oléorésine du romarin, la quercétine, la myricétine et le butylhydroxyanisole (BHA) n'ont pas montré de propriétés antioxydantes. En revanche, les tocophérols (notamment sous formes γ et δ) se sont révélés plus efficaces, sans toutefois présenter des effets de synergie [77]. L'ajout de palmitate d'ascorbyle et de di- α -tocophérol dans du suif chauffé à 135°C a montré un

effet inhibiteur durant les 70 premières heures du traitement [78]. *Yan et White* [79] ont également étudié l'effet de divers antioxydants durant l'échauffement du saindoux. Le palmitate d'ascorbyle, le BHA de même qu'un mélange de tocophérols semblent également inhiber la formation des oxystérols durant le stockage de poudre de jaune d'oeuf [80].

A défaut de pouvoir intervenir de façon plus directe (par exemple par d'éventuels ajouts d'antioxydants naturels), une connaissance plus approfondie des conditions de formation des oxystérols dans les denrées alimentaires devrait donc permettre une meilleure prévention.

Remerciements

Le présent travail fait partie d'une thèse de doctorat actuellement en cours. Les auteurs tiennent à remercier l'Institut Candia (Centre de recherche international André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France), la maison Crema (Villars-sur-Glâne, Suisse) ainsi que la Fédération des coopératives Migros (Zurich, Suisse) pour leur soutien financier accordé sous la forme d'une bourse offerte au premier auteur. Les auteurs remercient également le Dr Elizabeth Prior et le Dr Pierre Lambelet du Centre de Recherche Nestlé (Vers-chez-les-Blanc, Suisse) ainsi que le Pr P. Renaud de l'Institut de chimie organique (Fribourg, Suisse) pour leur lecture critique du manuscrit.

Résumé

Le présent travail passe en revue les mécanismes d'oxydation du cholestérol. Il traite plus spécialement du mécanisme radicalaire de l'autoxydation de ce composé, et dans une moindre mesure des mécanismes enzymatiques. Le cholestérol, lipide insaturé, s'oxyde de la même manière qu'un acide gras insaturé. Il se forme d'abord des hydroperoxydes qui se dégradent en époxydes, en alcools primaires, secondaires ou tertiaires et en cétones. L'oxydation du cycle B du stéroïde est prédominante, favorisant l'attaque en position allylique ainsi que l'époxydation. Les principaux oxystérols formés sont le 7 α - et le 7 β -hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol, le cholesta-3,5-diène-7-one, le 3 β ,5 α ,6 β -cholestanetriol, le 5 α ,6 α - et le 5 β ,6 β -époxycholestérol. L'oxydation de la chaîne aliphatique en positions 20, 22, 24, 25 et 26 a également été observée. Les espèces d'oxygène actif réagissant avec le cholestérol y sont discutées ainsi que l'influence des lipides et plus spécialement celle de leur degré d'insaturation sur la cinétique d'oxydation.

Mots-clés : Cholestérol / oxydation / mécanisme / oxystérol / lipide

Summary

The mechanisms of cholesterol oxidation, including the major radical process of autoxidation and enzymatic mechanism are reviewed. Cholesterol, an unsaturated lipid, is oxidized in the same way as an unsaturated fatty acid: through the intermediate hydroperoxides, primary, secondary and tertiary alcohols, ketones and epoxides are produced. Oxidation of cholesterol at the allylic C7 site and epoxidation of the double bond are favoured. Principal cholesterol oxides are 7 α - and 7 β -hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, cholesta-3,5-diene-7-one, 3 β ,5 α ,6 β -cholestanetriol and 5 α ,6 α - and 5 β ,6 β -epoxicholesterol. Oxidation of the side chain at the C 20, 22, 24, 25 and 26 sites is also observed. The reactive oxygen species involved in the oxidation of cholesterol and the influence of other lipids on the kinetics of cholesterol oxide formation are presented.

Key-words : cholesterol, oxidation, mechanism, oxysterol, lipid

Bibliographie

1. CHEVREUL ME (1816). Sixième mémoire. Examen des graisses d'homme, de mouton, de boeuf, de jaguar et d'oie. *Ann Chim Phys*, 2 : 339.
2. SCHULTZE E, WINTERSTEIN E (1904). Über das Verhalten des Cholesterins gegen das Licht. *Physiol Chem*, 43 : 316.
3. LIFSCHÜTZ I (1907). Die Oxydationsprodukte des Cholesterins in den tierischen Organen. *Physiol Chem*, 53 : 140.
4. LIFSCHÜTZ I (1913). Quantitative Bestimmungen der Oxydationsprodukte des Cholesterins. *Biochem Z*, 48 : 373-409.
5. BLIX G, LÖWENHJELM G (1928). CLXV. On the oxidation of cholesterol by molecular oxygen. *Biochem J*, 22 : 1313-22.
6. BERGSTRÖM S, WINTERSTEINER O (1941). Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution. The nature of the products formed from cholesterol. *J Biol Chem*, 141 : 597-610.
7. BERGSTRÖM S, WINTERSTEINER O (1942). Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution II. Δ^6 -cholestenediol,-3(β),5, a rearrangement product of 7(β)-hydroxycholesterol. *J Biol Chem*, 143 : 503-7.
8. BERGSTRÖM S, WINTERSTEINER O (1942). Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution III. Quantitative studies on cholesterol. *J Biol Chem*, 145 : 309-26.
9. FIESER LF, FIESER M (1959). Steroids oxidation. Reinhold, New York, 189.
10. SMITH LL (1981). Cholesterol autoxidation. Plenum Press, New York.
11. CRASTES DE PAULET A, ASTRUC M E, BASCOUL J, DEFAY R (1990). Biological effects of oxysterols. In : Free radicals, lipoproteins and membrane lipids, A Crastes de Paulet, LD Blazy, R Paoletti eds. Plenum Press, New York : 291-300.

12. BECKWITH ALJ (1958). The oxidation of crystalline cholesterol. *Proc Chem Soc*, 154 : 194-5.
13. PENG SK, MORIN RJ (1992). Biological effects of cholesterol oxides. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London.
14. PARK PSW, ADDIS PB (1992). Methods of analysis of cholesterol oxides. In : *Biological effects of cholesterol oxides*, SK Peng, RJ Morin eds. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, 33-70.
15. RICHARDSON T, KORYCKA-DAHL M (1983). Lipid oxidation. In : *Developments in dairy chemistry. 2. Lipids*, PF Fox ed. Applied Science Publishers, Dublin : 241-363.
16. CHAN HWS (1987). The mechanism of autoxidation. In : *Autoxidation of unsaturated lipids*. Academic Press, London : 1-16.
17. HEATON FW, URI N (1961). The aerobic oxidation of unsaturated fatty acids and their esters: cobalt stearate-catalyzed oxidation of linoleic acid. *J Lipid Res*, 2 : 152-60.
18. DEMAN J (1976). In : *Principles of food chemistry*, AVI, CT, 60.
19. GARDNER HW (1987). Reactions of hydroperoxides-products of high molecular weight. In : *Autoxidation of unsaturated lipids*, HWS Chan ed. Academic Press, London : 51-93.
20. SEVILLA CL, BECKER D, SEVILLA MD (1986). An electron spin resonance investigation of radical intermediates in cholesterol and related compounds: relation to solid-state autoxidation. *J Phys Chem*, 90 : 2963-8.
21. SMITH LL (1980). The autoxidation of cholesterol. In : *Autoxidation in food and biological systems*, MG Simic, M Karel eds. Plenum Press, New York-London : 119-32.
22. TENG JI, KULIG MJ, SMITH LL, KAN G, VAN LIER JE (1973). *J Org Chem*, 38 : 119-23
23. SMITH LL (1992). The oxidation of cholesterol. In : *Biological effects of cholesterol oxides*, SK Peng, RJ Morin eds. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London : 7-31.
24. VAN LIER JE, SMITH LL (1968). Crystalline sterols obtained by gas chromatography. *J Chromatog*, 36 : 7-17
25. JAVITT, NB (1990). 26-hydroxycholesterol: synthesis, metabolism, and biologic activities. *J Lipid Res*, 31 : 1527-33
26. ANSARI GAS, SMITH LL (1978). Sterol metabolism. XLI. Cholesterol A-ring autoxidations. *Chem Phys Lipids*, 22 : 55-62.
27. GUMULKA J, PYREK J S, SMITH LL (1982). Interception of discrete oxygen species in aqueous media by cholesterol: formation of cholesterol epoxides and secosterols. *Lipids*, 17 : 197-203.
28. MAERKER G, BUNICK FJ (1986). Cholesterol oxides II. Measurement of the 5,6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions. *J Am Oil Chem Soc*, 63 : 771-7.
29. KIM SK, NAWAR WW (1993). Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids*, 28 : 917-22.
30. SMITH LL, KULIG MJ, TENG JI (1977). Sterol metabolism. XL. On the failure of superoxide radical anion to react with cholesterol. *Chem Phys Lipids*, 20 : 211-5.
31. GUMULKA J, SMITH LL (1983). Ozonization of cholesterol. *J Am Chem Soc*, 105 : 1972-9.
32. JAWORSKI K, SMITH LL (1988). Ozonization of cholesterol in nonparticipating solvents. *J Org Chem* 53 : 545-54.
33. BRADLEY DG, MIN DB (1992). Singlet oxygen oxidation of foods. *Fd Sci Nutr*, 31 : 211-36.
34. KORYCKA-DAHL M, RICHARDSON T (1980). Initiation of oxidative changes in food. *J Dairy Sci*, 63 : 1181-98.
35. KORYTOWSKI W, BACHOWSKI GI, GIROTTI AW (1992). Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: comparison of the 5 α - and 6 β -hydroperoxides as indicators of singlet oxygen intermediacy. *Photochem Photobiol*, 56 : 1-8.

36. GALARIS D, MIRA D, SEVENIAN A, CADENAS E, HOCHSTEIN P (1988). Co-oxidation of salicylate and cholesterol during the oxidation of metmyoglobin by H₂O₂. *Arch Biochem Biophys*, 262 : 221-31
37. LYTHGOE B, TRIPPETT S (1959). Allylic rearrangement of an ab-unsaturated hydroperoxide. *J Chem Soc*, 471-2.
38. RAMM P J, CASPI E (1969). The stereochemistry of tritium at carbon atoms 1, 7, and 15 in cholesterol derived from (3R, 2R)-(2-³H)-mevalonic acid. *J Biol Chem*, 244 : 6064-73.
39. SMITH LL, KULIG M J, MILLER D, ANSARI GAS (1978). Oxidation of cholesterol by dioxygen species. *J Am Chem Sci*, 100 : 6206-11.
40. CRASTES DE PAULET A, ASTRUC M E, BASCOUL J (1988). Les oxystérols: propriétés biologiques et problèmes nutritionnels. Dans : *Biologie des lipides chez l'homme*, L Douste-Blazy, F Mendy eds. CNRS-CNERNA, 154-173.
41. ANSARI GAS, SMITH LL (1979) The oxidation of cholesterol by hydroxyl radical. *Photochem Photobiol*, 30 : 147-50.
42. KIMURA M, MUTO T (1979). On the reaction of cholesteryl acetate with tert-butyl hydroperoxide in the presence of tris(acetylacetonato)iron(III). *Chem Pharm Bull*, 27 : 109-12.
43. KIMURA M, MUTO T (1981). Further studies on the oxy-functionalization of cholesteryl acetate with tert-butyl hydroperoxide in the presence of tris(acetylacetonato)iron(III). *Chem Pharm Bull*, 29 : 1862-69.
44. MUTO T, TANAKA J, MIURA T, KIMURA M (1982). Iron-catalyzed autoxidation of cholesterol in the presence of unsaturated long-chain fatty acid. *Chem Pharm Bull*, 30 : 3172-7.
45. ARINGER L, ENEROTH P (1973). Studies on the formation of C₇-oxygenated cholesterol and β -sitosterol metabolites in cell-free preparations of rat liver. *J Lipid Res*, 14, 553-72.
46. LO WB, BLACK HS (1972). Formation of cholesterol-derived photoproducts in human skin. *J Invest Dermatol*, 58 : 278-83.
47. SEVANIAN A, MEAD J F, STEIN RA (1979). Epoxides as products of lipid autoxidation in rat lungs. *Lipids*, 14 : 634-43.
48. SEVANIAN A, ELSAYED N, HACKER AD (1982). Effects of vitamin E deficiency and nitrogen dioxide exposure on lung lipid peroxidation: use of lipid epoxides and malonaldehyde as measures of peroxidation. *J Toxicol Environ Health*, 10 : 743-56.
49. BJÖRKHEM I (1986). Assay of unesterified 7-oxocholesterol in human serum by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 154 : 497-501.
50. TENG JI, SMITH LL (1976). Sterol metabolism. XXXVII. On oxidation of cholesterol by dioxygenases. *Bioorg Chem*, 5 : 99-119.
51. ARINGER L, ENEROTH P (1974). Formation and metabolism in vitro of 5,6-epoxides of cholesterol and β -sitosterol. *J Lipid Res*, 15 : 389-98.
52. WATABE T, KANAI M, ISOBE M, OZAWA N (1980). Cholesterol α - and β -epoxides as obligatory intermediates in the hepatic microsomal metabolism of cholesterol to cholestanetriol. *Biochim Biophys Acta*, 619 : 414-9.
53. WATABE T, KANAI M, ISOBE M, OZAWA N (1981). The hepatic microsomal biotransformation of Δ^5 -steroids to 5 α ,6 β -glycols via α - and β -epoxides. *Biochim Biophys Acta*, 619 : 414-9.
54. WATABE T, TSUBAKI A, ISOBE M, OZAWA N, HIRATSUKA A (1984) A mechanism for epoxidation of cholesterol by hepatic microsomal lipid hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta*, 795 : 60-6.
55. KOOPMAN BJ, VAN DER MOLEN JC, WOLTHERS B G, VANDERPAS IB (1987). Determination of some hydroxycholesterols in human serum samples. *J Chromatog*, 416 : 1-13.

56. BROOKS CJW, MCKENNA RM, COLE RM, MACLACHLAN WJ, LAWRIE TDV (1983). « Profile » analysis of oxygenated sterols in plasma and serum. *Biochem Soc Transact*, 11 : 700-1.
57. BREUER O, BJORKHEM I (1995). Use of an O-18 (2) inhalation technique and mass isotopomer distribution analysis to study oxygenation of cholesterol in rat- Evidence for in vivo formation of 7-oxo-, 7 beta-hydroxy-, 24-hydroxy-, and 24-hydroxycholesterol. *J Biol Chem*, 270 : 20278-84
58. SMITH LL, TENG JI, LIN YY, SEITZ PK, MCGEHEE M F (1981). Sterol metabolism. XLVII. Oxidized cholesterol esters in human tissues. *J Steroid Biochem*, 14 : 889-900.
59. STARON T (1980). L'oeuf dans l'alimentation humaine; contribution à l'étude de la composition de l'oeuf de poule. *Méd Nutr*, XVI : 309.
60. WOOD D L, BITMAN J (1986). Cholesteryl esters of cows'milk. *J Dairy Sci*, 69 : 2203-8.
61. DE KONING AJ, HEARSHAW KD, VAN DER MERWE G (1993). Free and esterified cholesterol in a number of South African fish oils and their corresponding meals. *Fat Sci Technol*, 95 : 27-31.
62. ASSMANN G (1982). Lipidstoffwechsel und Atherosklerose. Schattauer-Verlag, Stuttgart.
63. KORAHANI V, BASCOUL J, CRASTES DE PAULET A (1982). Autoxidation of cholesterol fatty acid esters in solid state and aqueous dispersion. *Lipids*, 17 : 703-8.
64. NORCIA LN, JANUSZ WF (1965). Autoxydation of cholesteryl linoleate in aqueous colloidal suspension. *J Am Oil Chem Soc*, 42 : 847-8.
65. NORCIA LN, MAHADEVAN V (1973). Effects of acyl chain hydroxyl groups and increasing unsaturation on the autoxidation of cholesteryl esters in aqueous colloidal suspension. *Lipids*, 8 : 17-20.
66. KIM SK, NAWAR WW (1991). Oxidative interactions of cholesterol with triacylglycerols. *J Am Oil Chem Soc*, 68 : 931-4.
67. OSADA K, KODAMA T, CUI L, YAMADA K, SUGANO M (1993). Levels and formation of oxidized cholesterols in processed marine foods. *J Agric Fd Chem*, 41 : 1893-8.
68. OHSHIMA T, LI N, KOIZUMI C (1993). Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. *J Am Oil Chem Soc*, 70 : 595-600.
69. CHAN HWS, CHEN JS, YEN GC (1994). Cholesterol oxidation products in small sun-dried fish. *Food Chem*, 50 : 167-170.
70. LI N, OHSHIMA T, SHOZEN KI, USHIO H, KOIZUMI C (1994). Effects of the degree of unsaturation of coexisting triacylglycerols on cholesterol oxidation. *J. Am Oil Chem Soc*, 71 : 623-7.
71. LUND E, BJORKHEM I (1995). Rôle of oxysterols in the regulation of cholesterol homeostasis: a critical evaluation. *Acc Chem Res*, 28 : 241-9
72. IMAI H, WERTHESEN NT, TAYLOR B, LEE KT (1976). Angiotoxicity and arteriosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. *Arch Pathol Lab Med*, 100 : 565-71.
73. TAYLOR B, PENG SK, WERTHESEN NT, THAM P, LEE KT (1979). Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *Am J Clin Nutr*, 32 : 40-57.
74. MAZIERE JC, SALMON S, SANTUS R, REYFTANN JP, MORLIERE P, MAZIERE C, CANDIDE C, GOLDSTEIN S, DUBERTRET L, POLONOVSKI J (1988). L'oxydation des lipides des lipoprotéines de basse densité et ses conséquences sur la physiologie cellulaire. In : *Activités biologiques des oxystérols*. JP Beck, A Crastes de Paulet eds. Colloque Inserm, Paris 166 : 63-76.
75. ADDIS PB, PARK PSW (1992). Cholesterol oxide content of foods. In : *Biological effects of cholesterol oxides*, SK Peng, RJ Morin eds. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London : 71-88.

76. BASCOUL J, DOMERGUE N, OLLE M, CRASTES DE PAULET A (1986). Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID. *Lipids*, 21 : 383-7.
77. RANKIN SA, PIKE OA (1993). Cholesterol autoxidation inhibition varies among several natural antioxidants in aqueous model system. *J Fd Sci*, 58 : 653-5.
78. PARK SW, ADDIS PB (1986). Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *J Fd Sci*, 51 : 1380-1.
79. YAN PS, WHITE PJ (1991). Linalyl acetate and methyl silicone effects on cholesterol and triglycende oxidation inheated lard. *J Am Oil Chem Soc*, 68 : 763-8.
80. HUBER KC, PIKE OA, HUBER CS (1995). Antioxidant inhibition of cholesterol oxidation in spray-dried food system during accelerated storage. *J Fd Sci*, 60 : 909-12,16.

CHAPITRE 3

Partie expérimentale: Aspects analytiques

3.1 Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques RP-HPLC

Christine Sallin, Ernst Baumann, Ulrich Bütikofer, Robert Sieber, Jacques Olivier Bosset

Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne

Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène, 84, 141-157 (1993)

Contribution to Oxidized Cholesterol Determination in Milk and Milk products.

I. Possibilities and Limits of RP-HPLC Techniques

Introduction

Importance des produits d'oxydation du cholestérol du point de vue diététique et nutritionnel

Le cholestérol est un alcool insaturé. Il peut donc facilement être oxydé par voie enzymatique ou par auto-oxydation sous l'effet de l'oxygène ambiant, de la lumière et de la chaleur. Il en résulte différents produits d'oxydation (fig. 1), couramment regroupés sous le terme générique d'«oxystérols», ainsi que d'autres dérivés oxydés (1, 2).

De tels composés se retrouvent aussi bien dans le plasma humain que dans divers produits agro-alimentaires, en particulier dans le lait et les produits laitiers ainsi que dans les oeufs et la viande (3, 4). L'incidence de la technologie (conditions de fabrication et de stockage, emballage) doit par conséquent être prise en ligne de compte pour prévenir ou du moins pour limiter dans toute la mesure du possible ces mécanismes de dégradation (auto-oxydation, photo-oxydation).

Les recherches entreprises au cours de ces 15 dernières années ont indiqué que ces oxystérols sont en fait beaucoup plus dangereux pour l'organisme que leur précurseur, le cholestérol. Ils pourraient même être à l'origine de certaines maladies telles que l'artériosclérose (5, 6) et le cancer (7) ou du moins favoriser leur développement. Des produits d'oxydation du cholestérol donnés à des lapins induisent par exemple une athérogénèse, alors que du cholestérol purifié n'a développé aucun athérome (8). Les oxystérols qui paraissent les plus athérogènes sont le 25-hydroxycholestérol et le cholestanetriol (9, 10). La teneur des aliments en produits d'oxydation du cholestérol est donc d'un grand intérêt. Afin d'être à même d'étu-

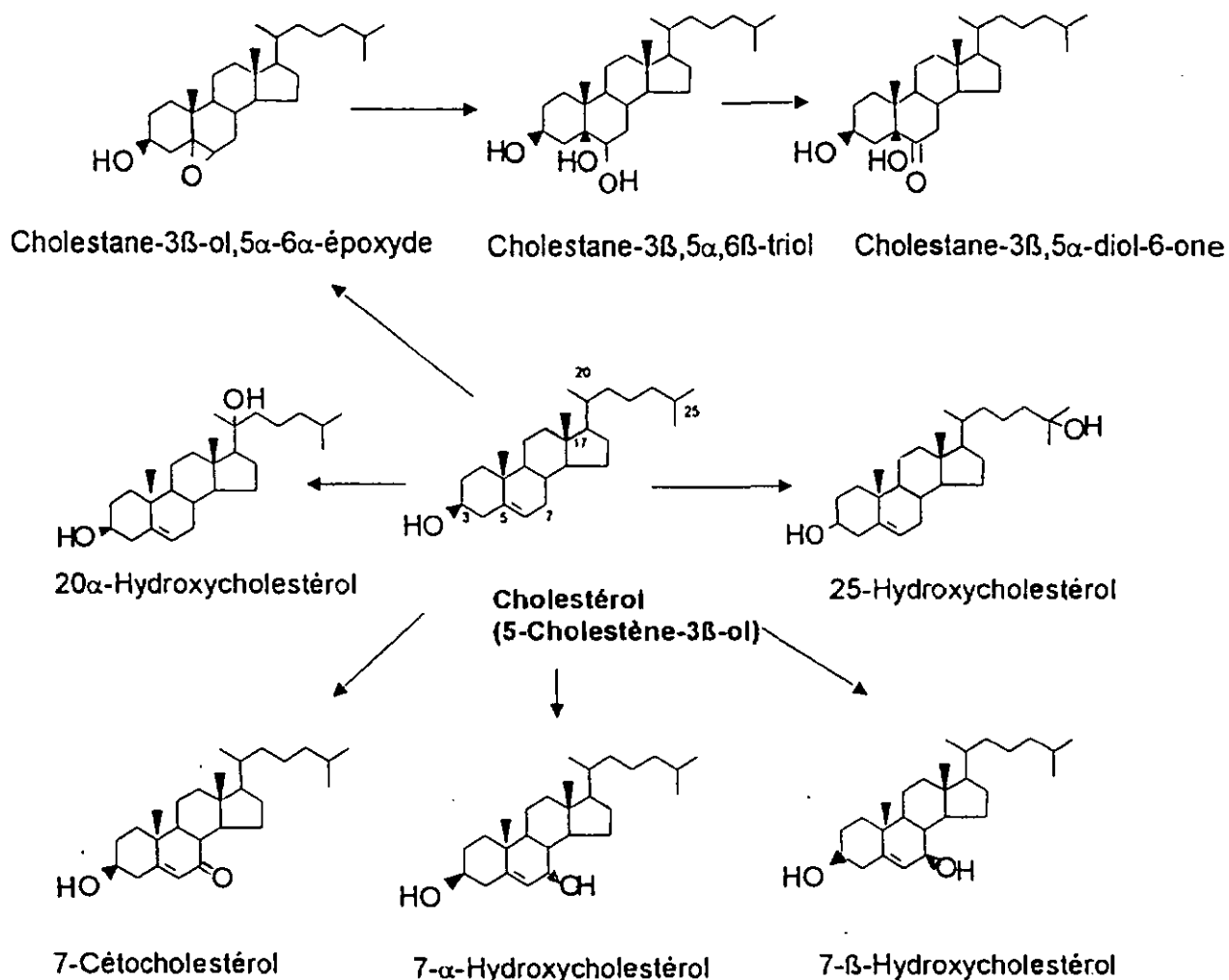


Fig. 1. Structure des produits d'oxydation du cholestérol

dier les conditions de formation de tels composés (influence d'oxydants et d'antioxydants, de la lumière, de la température; cinétique; mécanismes réactionnels etc.), il est nécessaire, dans une première étape, de tester, de comparer et, si nécessaire, d'améliorer les méthodes de dosage de ces substances.

Bref rappel des principales méthodes de dosage

Les oxystérols ne sont généralement présents qu'en traces dans les denrées alimentaires natives (11). On les trouve en revanche en quantités beaucoup plus importantes après traitements technologiques (échauffement, homogénéisation, etc.) et/ou après stockage. Ils requièrent des méthodes d'analyse à haute résolution et à basse limite de détection. Les meilleures méthodes actuellement utilisées sont la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie liquide/liquide à hautes performances (HPLC) (12, 13, 34). L'identification des fragments de stérol peut être effectuée par spectroscopie de masse. De telles analyses sont néanmoins compliquées en raison d'interférences et/ou d'artefacts dus à divers constituants des aliments, et requièrent de plus un appareillage relativement sophistiqué.

Des techniques d'analyse qualitative et semi-quantitative en couche mince (TLC) ont également été proposées (14, 15). Elles présentent l'avantage de ne nécessiter aucun équipement onéreux. Elles sont en outre relativement sensibles et faciles à maîtriser, d'où leur intérêt pour une analyse indicative préliminaire.

Quelle que soit la méthode d'analyse envisagée (TLC, HPLC ou GC), il est nécessaire d'isoler les oxystérols des corps gras présents dans l'échantillon. Cette étape est généralement effectuée en procédant à une saponification à chaud ou à froid des triglycérides et des phospholipides. A l'aide d'un solvant adéquat, on peut alors extraire le cholestérol oxydé sous la forme d'une fraction non saponifiée. Cette dernière est ensuite enrichie sur une précolonne ou par chromatographie sur couche mince. Durant toute cette phase de purification («clean-up»), aucun produit d'oxydation du cholestérol ne doit pouvoir se former ou se transformer en une autre substance. *Finocchiaro* (16) prévient toute auto-oxydation à l'aide de butylate d'hydroxytoluène (BHT) et de dilaurylthiodipropionate (TDP). Une autre technique consiste à extraire lesdits oxystérols sans saponification préalable en jouant sur les différences de polarité des solvants d'extraction. On évite ainsi tout risque de dénaturation du cholestérol et de ses produits d'oxydation (11).

Différentes méthodes ont été proposées pour doser les oxystérols. Le tableau 1 rappelle celles déjà utilisées pour le lait et les produits laitiers.

L'objectif de ce travail analytique en trois volets est de déterminer successivement les possibilités et limites des dosages par RP-HPLC, par TLC (partie II) et par GC (partie III) des oxystérols dans le lait et les produits laitiers.

Partie expérimentale

Réactifs

Les standards et les solvants utilisés comme éluants pour le dosage par RP-HPLC ainsi que pour la phase préparative d'extraction¹ sont indiqués dans les tableaux 2 et 3. Les standards purs sont dissous dans un mélange d'acétonitrile/éthanol dans le rapport volumique 80:20.

Choix des échantillons

Du beurre fondu (donc très pauvre en eau) provenant d'un commerce local a été utilisé pour les essais d'extraction et de dosage des oxystérols.

¹ Bien que précédant en fait la chromatographie, la phase préparative d'extraction des oxystérols sera traitée après l'optimisation des paramètres de ladite chromatographie.

Tableau 1. Résumé des méthodes utilisées pour la détermination des dérivés oxydés du cholestérol dans les produits laitiers

Produit	Préparation	Méthode d'analyse	Cholestérol oxydé	Limite de détection	Référence
Lait	Ex: Isopr, Hxn	TLC, GC	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10	inconnu	Cleveland et Harris 1987 (17)
Poudre de lait maigre, graisse de lait anhydre	Ex: Hxn	GC-MS	3, 7	inconnu	Flanagan et al., 1975 (18)
Poudre de lait, fromage, beurre	Ex: Isopr, Hxn	HPLC		0,3-1,3 mg/kg de produit	Bösinger, 1991 (19)
Poudre de lait, fromage, beurre	Ex: Hxn, Isopr Sc	TLC, GC-MS	9, 10	0,1 ppm ensemble des lipides	Nouroz-Zadeh et Appelqvist, 1988 (20), (21)
Fromage, beurre	Ex: CH ₂ Cl ₂	GC-MS	1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10	0,1 µg/g d'extrait	Fischer et al., 1985 (22)
Fromage rapé, huile de beurre	Ex: MeOH, CHCl ₃ Sc	TLC, HPLC	4, 5, 6, 8, 10	env. 3 µg/g d'huile	Pinocchiaro et al., 1984 (16)
Fromage, beurre		TLC, GC		inconnu	Peng et Taylor, 1982 (23)
Fromage, poudre de fromage, huile de beurre	Ex, Sf	GC-MS	1, 4, 5, 6, 8, 9, 10	1 mg/kg	Sander et al., 1988, 1989 (24), (25), (26)
Beurre	Ex: Hxn	TLC, MS	3	inconnu	Parks et Schwartz, 1966 (27)
Beurre		HPLC		inconnu	Csiky, 1982 (28)
Beurre		TLC 2 dimensions	4, 5, 10	inconnu	Luby et al., 1986 (29), (30)

Produit	Préparation	Méthode d'analyse	Cholestérol oxydé	Limite de détection	Référence
Beurre	Sc	TLC, GC-MS		inconnu	Pie et al., 1990 (31)
Ghee	Sf	TLC, GC	1, 2, 4, 5, 8, 10	1 mg/kg	Kumar et Singhal, 1992 (32)
Ghee	Sc	TLC	1, 2, 4, 5, 8, 9	inconnu	Jacobson, 1987 (33)

Abréviations: Ex = extraction des lipides, Sc = saponification à chaud, Sf = saponification à froid, Hxn = Hexane, Isopr = Isopropanol, CH₂Cl₂ = chlorure de méthylène, MeOH = méthanol, CHCl₃ = chloroforme, TLC = Thin Layer plate Chromatography, HPLC = High Performance Liquid Chromatography, GC = Gas Chromatography, MS = Mass Spectrometry

Légende du tableau 1:

nom fondamental

- | | |
|--|--|
| 1 = 25-Hydroxycholestérol | nom systématique |
| 2 = 20 α -Hydroxycholestérol | 5-Cholestène-3 β ,25-diol |
| 3 = 4-Cholestène-3-one | 5-Cholestène-3 β ,20 α -diol |
| 4 = 7 α -Hydroxycholestérol | 5-Cholestène-3 β ,7 α -diol |
| 5 = 7 β -Hydroxycholestérol | 5-Cholestène-3 β ,7 β -diol |
| 6 = 7-Cétocholestérol | 5-Cholestène-3 β -ol-7-one |
| 7 = Cholestane-3,5-diène-7-one | |
| 8 = Cholestane-3 β -ol,5 α ,6 α -époxyde | 5 α -Cholestane-5,6 α -époxy-3 β -ol |
| 9 = Cholestane-3 β -ol,5 β ,6 β -époxyde | 5 β -Cholestane-5,6 β -époxy-3 β -ol |
| 10 = Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol | 5 α -Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol |
| 11 = Cholestane-3 β ,5 α -diol,6-one | |
| 12 = Cholestane-3 β -ol,6-one | |
| 13 = Cholestane-3,6-dione | |
| Cholestérol | 5-Cholestène-3 β -ol |

Tableau 2. Standards utilisés

Composé	N° de l'article	Fournisseur
7-Cétocholestérol	A284122	Aldrich
25-Hydroxycholestérol	H1015	Sigma
20 α -Hydroxycholestérol	H6378	Sigma
7 β -Hydroxycholestérol	H6891	Sigma
7 α -Hydroxycholestérol	C6420	Steraloids
Cholestane-3 β , 5 α , diol-6-one	C4000	Steraloids
5,6-Epoxycholestérol	C2773	Sigma
Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol	C2523	Sigma
Cholestérol	2471	Merck

Tableau 3. Solvants utilisés

Solvant	Pureté	N° de l'article	Fournisseur
acétate d'éthyle	pro analysi	9623	Merck
n-hexane	pro analysi	4371	Merck
acétonitrile	HPLC	41731	Mächler
éthanol	lichrosolv.	11727	Merck
eau	Milli-Q		Millipore

Appareillage

Equipement de HPLC de base

Système Kontron modulaire (Kontron AG, CH-8010 Zürich) comportant une pompe à double piston (type 420), un passeur d'échantillons automatique (Autosampler type 360) à volume d'injection fixe de 20 μ l, un four pour la colonne de séparation (type 480), un détecteur UV-visible à 2 longueurs d'onde (type 430) ainsi qu'un système (PC/IBM compatible) permettant le pilotage des modules, la saisie des données brutes et leur traitement à l'aide d'un logiciel adéquat (type MT 450).

Colonnes testées pour la séparation chromatographique

- précolonne à phase inverse: - Nucléosil 120-5 C₁₈ 11 mm x 4 mm, 4 μ m, de Macherey-Nagel AG, CH-4702 Oensingen.
- colonne à phase inverse: - Hypersil ODS 4 mm x 250 mm, 5 μ m, de Hewlett Packard, Waldbronn BRD.

- μ Bondapak C₁₈ 4,6 mm x 150 mm, 10 μ m, de Waters, Milford MA, USA.
- Nucléosil 120-5 C₁₈ 4,6 mm x 250 mm, 5 μ m, de Macherey-Nagel AG, CH-4702 Oensingen.
En définitive, c'est cette colonne qui a été choisie.
- colonne à phase normale: - μ Porasil 3,9 mm x 300 mm, 10 μ m, de Waters, Milford MA, USA.

Cartouches testées pour l'extraction des graisses

- cartouches à phase inverse-SPE: - cartouche SPE C₁₈ (100 mg/ml), de J & W Scientific, Falsam CA, USA
 - cartouche SPE Cylobond II (γ -Cyclodextrine) chargée à raison de 200 mg/3 ml, de Astec, Whippany NJ, USA
- cartouche Extrelut 20 no 11738 de Merck, Darmstadt, BRD
- cartouche SPE avec aminophase, Bond Elut LRC (500 mg/2,8 ml) de Varian, Sunnyvale CA, USA. En définitive, c'est cette cartouche qui a été choisie.

Méthode de dosage optimisée

Conditions optimales de séparation chromatographique

Volume injecté:	20 μ l
Phase mobile:	acétonitrile:éthanol:eau = 80:20:20 (rapport volumique) en mode isocratique
Débit de la phase mobile:	1 ml/min
Température de la colonne:	35 °C
Longueurs d'onde de détection:	204, 207, 220, 242 nm (<i>choix définitif</i> , cf. texte)
Temps de réponse:	0,5 s

Extraction préparative

A 40 °C, dissoudre 2 g de beurre fondu dans 3 ml d'hexane. Charger cette solution sur la cartouche SPE avec aminophase conditionnée au préalable avec 3 ml d'hexane. Eluer d'abord les triglycérides et le cholestérol à l'aide de 8 ml du mélange hexane:acétate d'éthyle (9:1). Eluer ensuite les oxystérols avec 8 ml d'acétone. Récupérer cette phase et évaporer le solvant sous pression réduite au Rotavapor. Dissoudre le résidu sec dans 0,5 ml d'un mélange acétonitrile/éthanol dans le rapport 80:20. Cette solution est alors prête pour l'injection.

Résultats et discussion

Choix de la colonne de séparation

Plusieurs colonnes en phase inverse (RP) et en phase normale (NP) ont été testées. Le cholestérol (utilisé seul) a servi de standard pour une étude préliminaire. Le tableau 4 indique les temps de rétention et le nombre de plateaux théoriques calculé pour ces différentes colonnes. Bien que relativement grossiers, ces deux types de critères suffisent néanmoins pour estimer et prédire les performances de ces diverses colonnes lors de la séparation d'un mélange d'oxystérols.

Sur les 3 colonnes RP testées, la Bondapak a été immédiatement abandonnée, le pic du cholestérol présentant un temps de rétention beaucoup trop court et un fort «tailing». On peut en déduire un pouvoir séparateur insuffisant pour les oxystérols, substances nettement plus polaires à quelques rares exceptions près (19). En revanche, le temps de rétention et le nombre de plateaux théoriques obtenus pour le cholestérol avec la colonne Nucléosil étaient suffisants pour envisager une bonne séparation des oxystérols.

Les avantages d'une RP sur une NP, soit un temps d'équilibrage de la colonne plus court, une sensibilité moindre à l'humidité, une meilleure translucidité des éluants dans l'UV (on peut entre autre renoncer à l'emploi de l'isopropanol nécessité par la colonne de type NP (19), ainsi qu'une meilleure standardisation de la qualité des phases inverses ont fait opter pour la colonne Nucléosil C₁₈, aux performances légèrement supérieures à celles de la colonne Hypersil.

Tableau 4. Choix de la colonne de séparation

Colonne	Temps de rétention pour le cholestérol (min)	Nombre de plateaux théoriques	Eluant
Bondapak (RP)	4,5	petit (tailing)	ACN
Nucléosil (RP)	14,8	11400	ACN/EtOH 80:20
Hypersil (RP)	13,4	9400	ACN/EtOH 80:20
μPorasil (NP)	5,2	8500*	Hxn/Isopr 93:7

Abréviations: ACN = acétonitrile, EtOH = éthanol, Hxn = hexane, Isopr = isopropanol
RP = Reverse Phase, NP = Normal Phase

* Nombre de plateaux théoriques calculé sur le chromatogramme donné par Böisinger (19) pour le 25-hydroxycholestérol.

Choix de l'éluant

Une solution contenant les 6 oxystérols (7-cétocholestérol, 25-hydroxycholestérol, 20 α -hydroxycholestérol, 7 β -hydroxycholestérol, 7 α -hydroxycholestérol, cholestane-3 β , 5 α , diol-6-one) qui absorbent dans l'UV a été utilisée pour optimiser la composition de l'éluant.

De nombreux essais préliminaires ont été effectués, non rapportés ici dans le détail. On y constate que les mélanges acétonitrile/eau offrent des temps de rétention trop longs et causent de plus un important «tailing» des pics. Les mélanges acétonitrile/éthanol permettent de réduire ces temps de rétention (pour un rapport 80:20, on a un temps de rétention de 14 min pour le cholestérol), mais seuls 4 oxystérols sont séparés sur les 6 que contient la solution standard. L'introduction d'une composante aqueuse améliore la résolution. Le tableau 5 rapporte les résultats obtenus pour diverses compositions de ce mélange ternaire. L'optimum est atteint pour un mélange acétonitrile:éthanol:eau compris entre 80:20:15 et 80:20:20 en fonction de l'âge de la colonne utilisée. Ce mélange permet alors de séparer les 6 composants de la solution standard avec des temps de rétention admissibles en routine.

Tableau 5. Optimisation des éluants

Mélange	ACN (ml)	EtOH (ml)	H ₂ O (ml)	Nombre de pics résolus	Temps de rétention des pics (min)
binaire	80	20	–	4	5–6,5
ternaire	80	20	5	5	6,5–8,5
ternaire	80	20	10	5	8–12
ternaire	80	20	15	6	11–17

Abréviations: ACN = acétonitrile, EtOH = éthanol, H₂O = eau

Choix de la longueur d'onde

La plupart des oxystérols considérés ont leur maximum d'absorption situé en dessous de 200 nm, domaine correspondant pratiquement au «cut-off» des solvants utilisés comme éluant. Il est donc nécessaire de choisir une longueur d'onde supérieure située sur le flanc de leur pic d'absorption, aussi proche que possible de leur maximum. Les longueurs d'onde de 220, 207 et 204 nm ont été testées. La dernière longueur d'onde proposée représente un bon compromis entre le coefficient d'extinction des oxystérols à doser et celui de l'éluant (tableau 6). Seul le 7-cétocholestérol absorbe à une longueur d'onde supérieure dans l'UV. La figure 2 indique un maximum au voisinage de 242 nm.

Tableau 6. Limites de détection des oxystérols dans l'extrait organique à diverses longueurs d'onde

Composé	Limites de détection ($\mu\text{g/ml}$) à plusieurs longueurs d'onde ^{a)}			
	204 nm	207 nm	242 nm	204 nm ^{b)}
25-Hydroxycholestérol	1,0	7,0	–	0,3
20 α -Hydroxycholestérol	1,0	5,7	–	–
Cholestane-3 β , 5 α , diol-6-one	4,9	13,2	–	–
7 α -Hydroxycholestérol	1,3	5,2	–	1,3
7 β -Hydroxycholestérol	0,6	4,0	–	1,1
7-Cétocholestérol	–	5,7	0,2	0,9
Bruit de fond	0,2 mV	0,15 mV	0,07 mV	

a) calculées pour un rapport signal/bruit de fond = 3

b) résultats obtenu par Bösinger (19) avec une colonne NP

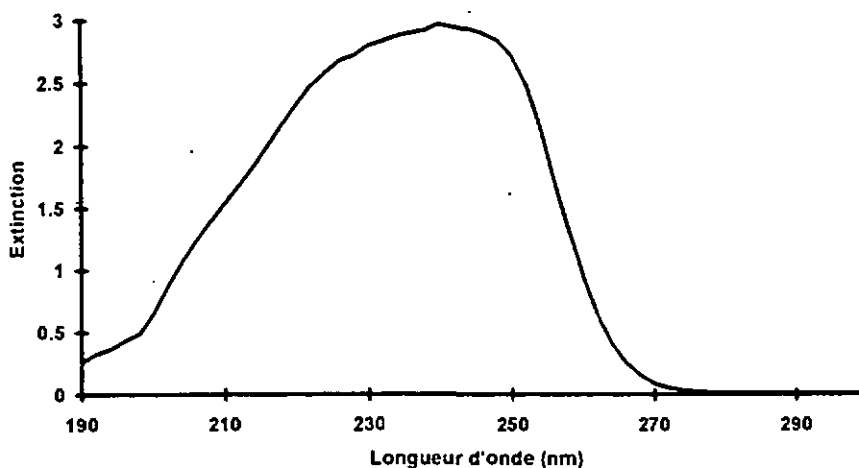


Fig. 2. Spectre d'absorption dans l'UV du 7-cétocholestérol

Légende: Solvant = hexane

Deux oxystérols (5,6-époxycholestérol, cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol) ne présentent pas de chromophore dans l'UV.

Un autre avantage, indirect, offert par la colonne RP choisie est de permettre l'emploi d'un mélange de solvants plus transparent à 204 nm que le mélange exigé par les colonnes de type NP (fig. 3) (19).

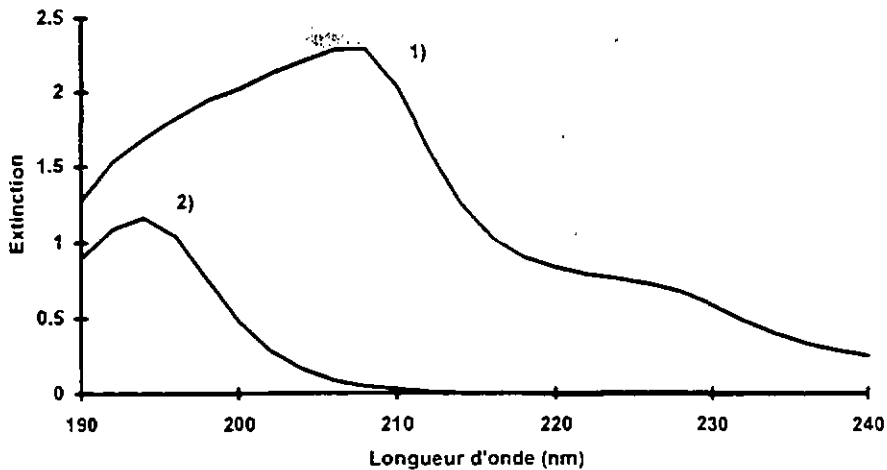


Fig. 3. Spectre d'absorption dans l'UV de 2 éluants

- 1) Mélange de hexane:isopropanol = 93:7, selon Böisinger (19)
- 2) Mélange de acétonitrile:éthanol:eau = 80:20:20, proposé

Limites de détection

Le tableau 6 donne encore les limites de détection calculées (seuil de détection = 3 x la largeur du bruit de fond) pour les 6 oxystérols considérés dans le cadre de ce travail. Ces limites sont comparables à celles calculées par Böisinger (19) avec le même critère. Elles sont comprises approximativement entre 0,6 et 1,3 µg/ml d'extrait organique, sauf pour le cholestane-3β, 5α, diol-6-one, dont la limite de détection n'est que de 5 µg/ml d'extrait organique.

Calibration et domaine de linéarité

La calibration et le domaine de linéarité obtenus pour les 6 oxystérols considérés ont été établis sur la base de 3 concentrations. Les valeurs obtenues sont indiquées dans le tableau 7.

Répétabilité

Le tableau 8 indique la répétabilité de déterminations à double des temps de rétention, des hauteurs et des surfaces des pics obtenus avec les 6 oxystérols considérés.

On constate une remarquable répétabilité des temps de rétention, avantage notoire des colonnes de type RP. Pour les 3 premiers pics, la répétabilité des hauteurs est nettement meilleure que celle des aires; pour les 3 derniers, on observe l'inverse, ce qui doit probablement s'expliquer par une résolution chromatographique inégale des pics correspondants. Dans le cas présent, on optera en pratique pour une évaluation des pics sur la base de leur hauteur plutôt que sur celle de leur aire.

Tableau 7. Droites de calibrage; absorption (mV) en fonction de la concentration (mg/ml)

Composé	Droite de calibrage $y = a x + b$			λ (nm)	Conc. max. testée (mg/ml)
	a	b	r^2		
7-Cétocholestérol	545,83	0,37	0,9999	242	0,198
25-Hydroxycholestérol	245,50	0,19	0,9999	204	0,202
20 α -Hydroxycholestérol	251,28	0,20	0,9998	204	0,150
7 β -Hydroxycholestérol	284,58	0,28	0,9998	204	0,158
7 α -Hydroxycholestérol	254,88	0,13	0,9999	204	0,178
Cholestane-3 β , 5 α , diol-6-one	73,71	0,09	0,9997	204	0,172

λ : longueur d'onde d'absorption

Tableau 8. Répétabilité calculée sur deux mesures (moyenne et coefficients de variation, cv)

Composé	λ (nm)	temps de rétention moyenne		Hauteur du pic moyenne		Aire du pic moyenne	
		(min)	cv (%)	(mV)	cv (%)	(mVx min)	cv (%)
25-Hydroxycholestérol	204	13,20	0,05	49,73	0,61	18,03	1,57
20 α -Hydroxycholestérol	204	13,56	0,05	37,84	0,48	11,21	4,16
Cholestane-3 β , 5 α , diol-6-one	204	17,58	0,08	12,74	0,72	5,85	2,05
7 α -Hydroxycholestérol	204	18,46	0,07	45,46	1,19	20,9	0,33
7 β -Hydroxycholestérol	204	19,25	0,15	45,17	0,79	21,31	0,20
7-Cétocholestérol	242	21,32	0,09	108,35	0,88	56,70	0,06

λ = longueur d'onde d'absorption

Application de la méthode au beurre (extraction)

La méthode de dosage ainsi optimisée a été testée avec du beurre fondu (fig. 4). On y constate la présence d'un nombre relativement important de constituants du lait susceptibles d'interférer avec le dosage des oxystérols. Ces derniers se présentent en outre sous la forme de pics très petits, ce qui indique qu'ils se situent peu au-dessus de leur limite de détection.

Des tests d'ajouts connus ont également été effectués, non reportés en détail. Ils montrent clairement que l'extraction proposée par Böisinger (19) – plus ménagante

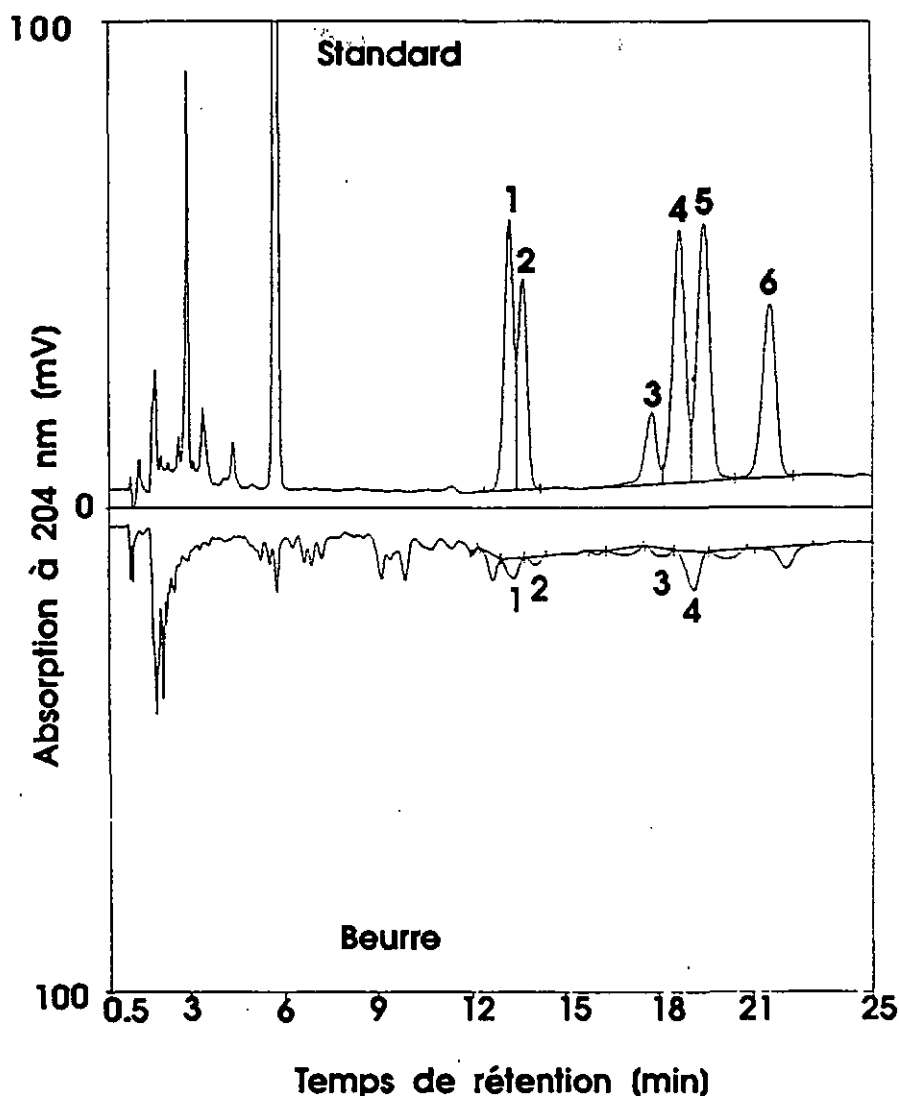


Fig. 4. Séparation par RP-HPLC de 6 oxystérols en solution pure (standard) et dans du beurre

- | | |
|---|------------------------------------|
| 1 = 25-Hydroxycholestérol | 4 = 7 α -Hydroxycholestérol |
| 2 = 20 α -Hydroxycholestérol | 5 = 7 β -Hydroxycholestérol |
| 3 = Cholestane-3 β , 5 α -diol-6-one | 6 = 7-Cétocholestérol |

qu'une saponification - n'est pourtant pas quantitative: les hauteurs comme les aires des pics des standards sont plus grandes en solution pure qu'après addition dans le beurre. La différence est donc due à un effet de la matrice (solubilité dans les triglycérides du beurre).

Conclusion

La méthode de séparation par RP-HPLC proposée dans le présent travail est supérieure à d'autres déjà proposées, notamment avec des phases normales. Elle

permet en effet de séparer correctement les 6 oxystérols qui absorbent dans l'UV. La répétabilité des temps de rétention et des hauteurs des pics obtenus est suffisante. Les limites de détection sont comparables à celles publiées par d'autres auteurs. Elles sont néanmoins insuffisantes pour la pratique, surtout en raison du taux d'extraction de certains des oxystérols recherchés.

Une amélioration des conditions d'extraction (répétabilité et taux de récupération) fera l'objet d'une étude plus approfondie dans le cadre de la partie III de ce travail en 3 volets. Il est en effet souhaitable de parvenir à abaisser d'une part les seuils de détection de ces oxystérols et d'autre part de disposer d'une technique analytique indépendante du chromophore disponible en UV. Sur les 8 stérols testés, seuls 6 absorbent en effet dans la bande de transmission de l'éluant. Les techniques de dosage par chromatographie gazeuse (GC-FID et GC-MS en mode SIM) après dérivatisation (par ex. une silylation) paraissent satisfaire à ces deux exigences. L'optimisation des conditions d'extraction sera donc effectuée une fois ce type de dosage maîtrisé.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier l'institut CANDIA (Centre de recherche international André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France) de son intérêt pour ce travail et de son soutien financier sous la forme d'une bourse offerte au premier auteur, stagiaire à la FAM.

Résumé

Le présent travail reprend la technique d'extraction sur cartouche SPE avec aminophase, proposée récemment par Böisinger, car plus ménagante que les techniques procédant par saponification. Il propose en revanche une nouvelle méthode de séparation des oxystérols sur phase inverse (RP-Nucléosil C₁₈), plus répétable (cv compris entre 0,5 et 1,2% pour les diverses substances testées) que sur phase normale (NP) et recourt à un éluant moins absorbant dans l'UV lointain. La composition de cet éluant (acétonitrile:éthanol:eau = 80:20:15 à 20) permet une résolution optimale de 6 des 8 composés considérés dans ce travail, 2 oxystérols n'absorbant pas aux longueurs d'onde choisies (242 nm pour le 7-cétocholestérol et 204 nm pour les autres composés). Les droites de calibrage montrent un domaine de linéarité s'étendant au moins jusqu'à 0,2 mg/ml d'extrait organique (e.o.). Les limites de détection sont comparables à celles indiquées par Böisinger, soit 5 µg/ml (e.o.) pour le cholestan-3β, 5α-diol-6-one et environ 1 µg/ml (e.o.) pour les autres composés. La présence de nombreux constituants interférant et/ou d'artéfacts des produits laitiers, notamment du beurre, incite à comparer les performances obtenues par RP-HPLC avec celles d'autres méthodes telles que GC-MSD, GC-FID et TLC avant de proposer une méthode destinée à la routine.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit greift die von Böisinger vor kurzem vorgeschlagene SPE-Patronenextraktion mit Aminophase auf, die schonender ist als die Verseifungsmethoden. Gleich-

zeitig wird eine neue Methode zur Trennung der Cholesterinoxide mit «reversed phase» HPLC vorgestellt (Nucleosil C₁₈). Diese hat eine bessere Wiederholbarkeit (VK für die Testsubstanzen 0,5–1,2%) als die Normalphasen-Chromatographie, und das verwendete Eluent absorbiert weniger stark im fernen UV-Bereich. Dank der Zusammensetzung des Eluenten (Acetonitril : Ethanol : Wasser = 80 : 20 : 15 bis 20) war die Auflösung von 6 der 8 berücksichtigten Komponenten optimal. 2 weitere Cholesterinoxide absorbierten nicht bei der gewählten Wellenlängen (242 nm für 7-Ketocholesterol und 204 nm für die andern Verbindungen). Die Kalibrierkurven sind bis 0,2 mg/ml des organischen Extraktes (o.E.) linear. Die Nachweisgrenzen sind mit denen der Methode von Bösingergleichbar, d. h. 5 µg/ml (o.E.) für Cholestan-3β, 5α-diol-6-on und ca. 1 µg/ml (o.E.) für die andern Verbindungen. Wegen der zahlreichen interferierenden Bestandteile und/oder Artefakte bei den Milchprodukten, vor allem bei Butter, sollten die Leistungen der RP-HPLC und anderer Methoden wie GC-MSD, GC-FID und Dünnschicht-Chromatographie (TLC) miteinander verglichen werden, bevor eine Routinemethode vorgeschlagen werden kann.

Summary

The present work refers to SPE cartridge extraction with aminophase as recently proposed by Bösingerg, which requires milder conditions than the saponification techniques. At the same time a new method for the separation of oxidized cholesterols by reversed phase chromatography (Nucleosil C₁₈) is presented; it has a better repeatability (cv 0,5 to 1,2% for the tested compounds) than normal phase chromatography and uses an eluant that absorbs less in the far UV. Due to the composition of this eluant (acetonitrile : ethanol : water = 80 : 20 : 15 to 20), it allows optimal resolution of 6 among the 8 compounds considered in this study. 2 other compounds did not absorb at the chosen wavelengths (242 nm for 7-ketocholesterol and 204 nm for the other compounds). The calibration curves are linear up to 0.2 mg/ml of organic extract (o.e.). The detection limits are comparable with those indicated by Bösingerg, i.e 5 µg/ml (o.e.) for cholestan-3β, 5α-diol-6-one and approx. 1 µg/ml (o.e.) for the other compounds. Because of the numerous interfering constituents and/or artefacts of milk and milk products, particularly butter, it is advisable to compare the performances of RP-HPLC and other methods such as GC-MSD, GC-FID and TLC before proposing a routine method.

Bibliographie

1. *Smith, L.L.*: Cholesterol autoxidation. Plenum Press, New York 1981.
2. *Smith, L.L.*: The oxidation of cholesterol. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p. 7–31. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.
3. *Sieber, R.*: Oxidiertes Nahrungscholesterin – eine Primärursache der Arteriosklerose? Ernährung 10, 547–556 (1986).
4. *Addis, P.B. and Park, P.S.W.*: Cholesterol oxide content of foods. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p. 71–88. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.
5. *Peng, S.-K., Sevastian, A. and Morin, R.J.*: Cytotoxicity of cholesterol oxides. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p. 147–166. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.

6. Peng, S.-K., Hu, B. and Morin, R.J.: Effects of cholesterol oxides on atherogenesis. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p.167-189. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.
7. Morin, R.J., Hu, B. and Peng, S.-K. and Sevastian, A.: Cholesterol oxidation and cancer. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p. 191-202. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.
8. Imai, H., Werthessen, N.T., Taylor, C.B. and Lee, K.T.: Angiotoxicity and arteriosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. Arch. Pathol. Lab. Med. 100, 565-571 (1976).
9. Addis, P.B.: Occurrence of lipid oxidation products in foods. Food Chem. Toxic. 24, 1021-1030 (1986).
10. Peng, S.K., Taylor, C.B., Tham, P., Werthessen, N.T. and Mikkelsen, B.: Effect of autoxidation products from cholesterol on aortic smooth muscle cells. Arch. Pathol. Lab. Med. 102, 57-61 (1978).
11. Park, P.S.W. and Addis, P.B.: Methods of analysis of cholesterol oxides. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds), Biological effects of cholesterol oxides, p. 33-70. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1991.
12. Fillion, L., Zee, J.A. and Gosselin, C.: Determination of a cholesterol oxide mixture by a single-run high-performance liquid chromatographic analysis using benzylation. J. Chromatogr. 547, 105-112 (1991).
13. Park, P.S.W. and Addis, P.B.: Capillary column gas-liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. Anal. Biochem. 149, 275-283 (1985).
14. Bascoul, J., Domérgue, N., Mourot, J., Debry, G. and Crastes de Poulet, A.: Intestinal absorption and fecal excretion of 5, 6alpha-epoxy-5alpha-cholesta-3beta-ol by the male Wistar rat. Lipids 21, 744-747 (1986).
15. Bican, P.: Communication personnelle (FAM, CH 3097-Liebefeld-Berne).
16. Finocchiaro, E.T., Lee, K. and Richardson, T.: Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butteroil. J. Am. Oil Chem. Soc. 61, 877-883 (1984).
17. Cleveland, M.Z. and Harris, N.D.: Oxidation of cholesterol in commercially processed cow's milk. J. Food Protect. 50, 867-871 (1987).
18. Flanagan, V.P., Ferretti, A., Schwartz, D.P. and Ruth, J.M.: Characterization of two steroidal ketones and two isoprenoid alcohols in dairy products. J. Lipid Res. 16, 97-101 (1975).
19. Bösiinger, S.K.: Zum Vorkommen von Cholesterinoxiden in Milchprodukten. Dissertation Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien 1991.
20. Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L.-A.: Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: milk powder products. J. Food Sci. 53, 74-79 (1988).
21. Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L.-A.: Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: butter and cheese. J. Am. Oil Chem. Soc. 65, 1635-1641 (1988).
22. Fischer, K.-H., Laskawy, G. und Grosch, W.: Quantitative Analyse von Autoxidationsprodukten des Cholesterols in tierischen Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 181, 14-19 (1985).
23. Peng, S.-K., Taylor, B.C., Mosbach, E.H., Huang, W.Y., Hill, J. and Mikkelsen, B.: Distribution of 25-hydroxycholesterol in plasma lipoproteins and its role in atherogenesis. Atherosclerosis 41, 395-402 (1982).

24. Sander, B.D., Smith, D.E. and Addis, P.B.: Effects of processing stage and storage conditions on cholesterol oxidation products in butter and Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 71, 3173–3178 (1988).
25. Sander, B.D., Addis, P.B., Park, S.W. and Smith, D.E.: Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. *J. Food Protect.* 52, 109–114 (1989).
26. Sander, B.D., Smith, D.E., Addis, P.B. and Park, S.W.: Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products. *J. Food Sci.* 54, 874–879 (1989).
27. Parks, O.W., Schwartz, D.P., Keeney, M. and Damico, J.N.: Isolation of Δ^7 -cholesten-3-one from butterfat. *Science* 210, 416–417 (1966).
28. Csiky, I.: Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by adsorption high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 241, 381–389 (1982).
29. Luby, J.M., Gray, J.I., Harte, B.R. and Ryan, T.C.: Photooxidation of cholesterol in butter. *J. Food Sci.* 51, 904–907 (1986).
30. Luby, J.M., Gray, J.I. and Harte, B.R.: Effects of packaging and light source on the oxidation stability of cholesterol in butter. *J. Food Sci.* 51, 908–911 (1986).
31. Pie, J.E., Spabis, K. and Seillan, C.: Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agr. Food Chem.* 38, 973–978 (1990).
32. Kumar, N. and Singhaal, O.P.: Effect of processing conditions on the oxidation of cholesterol in ghee. *J. Sci. Food Agr.* 58, 267–273 (1992).
33. Jacobson, M.S.: Cholesteroloxydes in Indian ghee: possible cause of unexplained high risk of atherosclerosis in Indian immigrant populations. *Lancet* 11, 656–658 (1987).
34. Coors, U.: Components in foods with a high fat content. In: Matissek, R. and Wittkowski, R. (eds), *High performance liquid chromatography in food control and research*, p. 171–182. B. Behr's Verlag, Hamburg 1992.

Christine Sallin
Dr. J.O. Bosset
Station fédérale de recherches laitières
CH-3097 Liebefeld-Berne

3.2 Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. II. Possibilités et limites des techniques TLC

Christine Sällin, Robert Sieber, Jacques Olivier Basset
Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne
Raffaele Tabacchi
Institut de chimie, Université de Neuchâtel, Neuchâtel

Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène, 84, 566-580 (1993)

Contribution to Oxidized Cholesterol Determination in Milk and Milk Products.

II. Possibilities and Limits of TLC Techniques

Introduction

La partie I de cette étude en quatre volets avait pour objectif de déterminer les possibilités et limites des techniques de RP-HPLC (1). Cette deuxième partie propose une étude semblable pour les méthodes chromatographiques en couche mince (TLC). Cette technique d'analyse qualitative et semi-quantitative présente en effet l'avantage d'être simple et rapide et de ne nécessiter aucun matériel onéreux, conditions à remplir pour être utilisable par tous les laboratoires de contrôle.

Comme l'indique la partie I (1), il est nécessaire dans une première étape d'isoler les oxystérols des corps gras présents dans l'échantillon. A cette fin, différents traitements sont possibles tels que saponification ou chromatographie sur colonne ou sur cartouche. Une simple saponification n'est souvent pas suffisante pour l'étape d'enrichissement en produits d'oxydation du cholestérol. La fraction insaponifiable peut ou doit être encore séparée sur couche mince (PTLC: preparative thin layer chromatography) (2-7). Les oxystérols récupérés par grattage de la plaque, sont alors suffisamment purs pour être analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC) ou par chromatographie liquide/liquide à hautes performances (HPLC).

Comme technique de préparation de l'échantillon, la chromatographie sur colonne ou sur cartouche est une méthode beaucoup plus ménagante (1, 3, 4) que la saponification. La TLC permet en outre l'étude de la polarité des différents

* En hommage à G. Steiger à l'occasion de son 60^e anniversaire et de son départ à la retraite.

constituants de la matière grasse. *Park* et *Addis* (8) ont pu ainsi étudier divers solvants de migration en vue d'un «clean-up» sur colonne de gel de silice. Ordonnés par polarité croissante, on trouve successivement le cholestérol estérifié, les triglycérides, le cholestérol, les acides gras, les produits d'oxydation du cholestérol et les phospholipides. Ces auteurs obtiennent une séparation optimale des triglycérides et des oxystérols avec le mélange hexane/acétate d'éthyle dans un rapport volumique 9:1.

Les produits d'oxydation du cycle A du cholestérol tels que les composés 3-cétoniques ont été relativement peu étudiés jusqu'à présent en raison de leur polarité inférieure au cholestérol, ce qui les rend difficilement séparables des lipides neutres. *Hwang* et *Maerker* (9) ont développé récemment une méthode d'analyse par GC très sensible pouvant détecter des oxystérols en trace dont plusieurs composés 3-cétoniques dans la viande à 10 ng/kg. L'étape d'enrichissement en oxystérols est néanmoins assez complexe et laborieuse, nécessitant – après l'extraction des lipides – 2 «clean-up» successifs sur cartouche de gel de silice et une PTLC avec séparation des oxystérols polaires des non polaires, avant de procéder à l'analyse GC proprement dite.

Comme méthode d'analyse quantitative, une chromatographie sur couche mince évaluée par planimétrie digitalisée, précédée d'une saponification et d'une PTLC, a permis d'analyser certains oxystérols avec une limite de détection d'env. 3 µg/g d'huile (2). *Basoul* et al. (10) proposent une méthode en TLC couplée à une détection FID qui est applicable en routine, mais avec une résolution trop faible pour permettre l'analyse d'une vaste palette d'oxystérols.

Ces divers travaux mettent en évidence l'importance de la TLC, souvent utilisée conjointement à une autre méthode analytique comme le montre le tableau 1. L'objectif de cette deuxième partie est double: tester d'abord les possibilités et limites des techniques de TLC pour l'analyse qualitative, éventuellement semiquantitative, des oxystérols dans le beurre fondu; disposer ensuite d'un outil simple et rapide pour tester le «clean-up» de l'échantillon qui fera l'objet de la partie IV. Entre-temps la partie III sera consacrée à une étude des possibilités et limites des techniques GC (GC-FID, GC-MS).

Partie expérimentale

Réactifs

Les standards disponibles, les révélateurs et les solvants utilisés comme phases mobiles pour l'analyse en TLC ainsi que pour l'étape préparative d'extraction sont indiqués dans les tableaux 2, 3 et 4. Les standards purs sont dissous dans l'acétone.

Tableau 1. Résumé des méthodes utilisées en TLC pour la détermination des produits d'oxydation du cholestérol

Référence: auteurs, année	Type de plaque: silica gel (fournisseur)	Solvant de migration utilisé (rapport volumique)	Standards étudiés (cf. lég.)	Révélateur utilisé	Echantillons analysés	Préparation de l'échantillon	Remarques/autres méthodes analytiques utilisées
<i>Ansari and Smith, 1979 (11)</i>	type HF254, 0,25 mm (Merck)	benzène/AcOEt (1:3 ou 3:1), heptane/AcOEt (4:1)		$\lambda = 254$ nm, ac. sulfurique à 50%	cholestérol stocké à l'air	clean-up sur gel de silice	analyse par HPLC
<i>Finocchiaro et al., 1984 (2)</i>	type Polygram Sil G, 0,25 mm (Brinkman Ins.)	3 x AcOEt/heptane (1:1) ou 2 x acétone/heptane (1:1)	4-6, 8, 9, 10	acide p-toluène sulfonique	fromage, beurre, fondu blanchi	extraction des lipides puis saponification à froid	PTLC couplée à une analyse par HPLC; dosage par TLC
<i>Park and Addis, 1985 (8)</i>	type H, 0,25 mm (Supelco)	divers solvants	1, 10, 15	ac. sulfochromique	potatoes, poulet frit, gâteaux, hamburger, boeuf (foie/cervelle)	extraction des lipides puis clean-up sur gel de silice	analyse par HPLC
<i>Luby et al., 1986 (12)</i>	type G (Fisher Inc.)	bidimens.: AcOEt/heptane (1:1) benzène/AcOEt (3:2)	4-8, 10	ac. sulfurique à 50%	beurre	extraction des lipides puis saponification	analyse par GC
<i>Maerker and Unruh, 1986 (3)</i>	type G, GH, 0,25 mm (Analtech)	heptane/AcOEt (1:1)		10% sulfate de cuivre + 8,5% ac. phosphorique	huile d'olive, huile d'arachide	saponification	TLC couplée à une analyse par GC
<i>Maerker and Bunick, 1986 (4)</i>	type G, GH, 0,25 mm (Analtech)	benzène/AcOEt/ac. acétique (60:40:1)	4, 5 (6 et 8)*, 10, 15, 19, 20	ac. sulfurique à 50%	dispersions aqueuses		TLC couplée à une analyse par GC
<i>Basoul et al., 1986 (10)</i>	type F254 (Merck)	inconnu	1, 2, 4, 5 (8 et 9)*, 15	ac. sulfurique à 50%	suif de boeuf	saponification à chaud	analyse par TLC-FID, GC
<i>Cleveland and Harris, 1987 (5)</i>	type SI-HPF, 0,2 mm (J.T. Baker Chemicals)	chlorure de méthylène (17 cm), AcOEt (5 cm)	1-8, 10, 15, 17	$\lambda = 266, 254$ nm, ac. sulfurique à 50%	laits	extraction des lipides	PTLC couplée à une analyse par GC

Référence: auteurs, année	Type de plaque: silica gel (fournisseur)	Solvant de migration utilisé (rapport volumique)	Standards étudiés (cf. lég.)	Révélateur utilisé	Echantillons analysés	Préparation de l'échantillon	Remarques/autres méthodes analytiques utilisées
Teng, 1990 (13)	type HF254, 0,25 mm (Merck)	diéthyléther ainsi que benzène/AcOEt (17:8) pour les peroxydes	1, 2, 4-6, 14, 15, 17-21		beurre âgé de 15 ans	crystallisations	dose aussi les peroxydes dérivés du cholestérol; analyse par HPLC
Nourooz-Zadeh, 1990 (14)	type 60, 0,25 mm (Merck)	toluène/méthanol (1:1) 5 cm, toluène 16 cm		ac. sulfurique à 50%	oeufs, poudre d'oeufs	extraction des lipides puis clean-up	analyse par GC, HPLC
Pie et al., 1990 (6) Pie et al., 1991 (7)	type 60, 0,25 mm (Merck)	hexane/éther (7:3), hexane/diéthyléther/AcOEt (5:5:5) (13)	4-6, 8-10, 14-16	rhodamine	beurre, oeufs en poudre, biscuits, gâteaux	saponification à 40 °C pour le beurre, extraction et saponification pour les autres échantillons	PTLC couplée à une analyse par GC
Kumar and Singhal, 1992 (15)	type G, 0,25 mm	heptane/AcOEt (1:1)	1, 2, 4-6, 8, 10, 15	ac. sulfurique à 50%	crème, beurre, gelée	saponification à froid et extraction	analyse par GC

Abréviations

GC = Gas Chromatography; HPLC = High Performance Liquid/Liquid Chromatography; TLC = Thin Layer Chromatography; PTLC = Preparative Thin Layer Chromatography; AcOEt = acétate d'éthyle

Légende

- 1 = 25-Hydroxycholestérol
 2 = 20 α -Hydroxycholestérol
 3 = 4-Cholestène-3-one
 4 = 7 α -Hydroxycholestérol
 5 = 7 β -Hydroxycholestérol
 6 = 7-Cétocholestérol
 7 = Cholestane-3,5-diène-7-one
 8 = Cholestane-3 β -ol, 5 α , 6 α -époxyde
 9 = Cholestane-3 β -ol, 5 β , 6 β -époxyde
 10 = Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol
 11 = Cholestane-3 β , 5 α -diol, 6-one
 12 = Cholestane-3 β -ol, 6-one
 13 = Cholestane-3,6-dione
 14 = 26-Hydroxycholestérol
 15 = Cholestérol
 16 = 19-Hydroxycholestérol
 17 = 24-Hydroxycholestérol
 18 = Cholest-6-ène-3 β , 5 α -diol
 19 = 7 β -Hydroperoxycholestérol
 20 = 7 α -Hydroperoxycholestérol
 21 = 5 α -Hydroperoxycholestérol

* taches non séparées

Aspects analytiques

Tableau 2. Stérols utilisés

Standard	N° de l'article	Fournisseur
7-Cétocholestérol	A284122	Aldrich
25-Hydroxycholestérol	H1015	Sigma
20 α -Hydroxycholestérol	H6378	Sigma
7 β -Hydroxycholestérol	H6891	Sigma
7 α -Hydroxycholestérol	C6420	Steraloids
Cholestane-3 β , 5 α , diol-6-one	C4000	Steraloids
Cholestane-3 β -ol, 5 α , 6 α -époxyde	C2773	Sigma
Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol	C2523	Sigma
Cholestérol	2471	Merck
4-Cholestène-3-one	C6250	Steraloids

Tableau 3. Révélateurs utilisés

Réactif	N° de l'article	Fournisseur
Acide sulfurique	84718	Fluka
Acide phosphomolybdique	814302	Macherey-Nagel
Iode	57650	Fluka

Tableau 4. Solvants utilisés

Solvant	Pureté	N° de l'article	Fournisseur
Acétate d'éthyle	pro analysi	9623	Merck
n-Hexane	pro analysi	4371	Merck
Toluène		8317	Merck
Acétone	pro analysi	299	Merck
Chlorure de méthylène	LiChrosolv	6044	Merck

Choix des échantillons

Du beurre fondu (donc très pauvre en eau) provenant d'un commerce local a été utilisé pour les essais d'extraction et d'analyse des oxystérols. Une portion de ce beurre a été porté à env. 180 °C pendant env. 15 min (beurre noisette) afin de l'enrichir artificiellement en oxystérols.

Un autre échantillon a été prélevé dans un beurre fondu stocké 2 ans en chambre froide (env. 7 °C).

Appareillage

Applicateur automatique Linomat IV (Camag, Muttenz, Suisse),
 Seringue Linomat 100 µl (Camag, Muttenz, Suisse),
 Lampe UV Cabinet II, $\lambda = 254$ nm et 366 nm (Camag, Muttenz, Suisse),
 Rotavapor (Büchi, Flawil, Suisse),
 Cartouche SPE avec aminophase Bond Elut LRC (500 mg/2,8 ml) (Varian, Sunnyvale CA, USA)
 Les plaques chromatographiques testées sont décrites dans le tableau 5.

Tableau 5. Plaques TLC utilisées

Type de plaque	Epaisseur (mm)	Dimension (cm)	N° de l'article	Fournisseur	Utilisation
NH ₂ F ₂₅₄ s	0,2	5 x 10	15647	Merck	Essais préliminaires
Polygram Sil G/UV254	0,25	4 x 8	805021	Macherey-Nagel	
RP-8 F ₂₅₄ s	0,25	5 x 10	15684	Merck	
Silgur-25		20 x 20	810013	Macherey-Nagel	
Gel de silice 60 F ₂₅₄	0,2	20 x 20	5554	Merck	Méthode proposée
Gel de silice 60 F ₂₅₄ pour HPTLC		20 x 20	5548	Merck	Méthode proposée

Méthode d'analyse optimisée

Extraction préparative (1)

A 40 °C, dissoudre 2 g de beurre fondu dans 3 ml d'hexane. Charger cette solution sur la cartouche SPE avec aminophase conditionnée au préalable avec 3 ml d'hexane. Eluer d'abord les triglycérides et le cholestérol à l'aide de 8 ml du mélange hexane:acétate d'éthyle (9:1). Eluer ensuite les oxystérols avec 8 ml d'acétone. Récupérer cette phase et évaporer le solvant sous pression réduite au Rotavapor. Dissoudre le résidu sec dans 500 µl d'acétone. La solution obtenue, appelée extrait de beurre, est prête pour l'application sur la plaque chromatographique.

Conditions d'analyse par TLC

Type de plaque: Feuille en aluminium pour HPTLC avec gel de silice 60 F₂₅₄ pour la séparation des oxystérols.

Solution standard:	Dissoudre 1 mg de chacun des 9 oxystérols à disposition et 1 mg de cholestérol (cf. le tableau 2) dans 10 ml d'acétone.
Application sur la plaque:	Appliquer 20 µl de la solution standard, resp. de l'extrait de beurre (réglage: 4 s/µl) sur une bande de 0,8 cm de large. Maintenir un flux constant d'azote lors de l'application pour sécher la tache.
Phases mobiles:	i) Chlorure de méthylène/toluène/acétone = 2:1:1 pour les standards. ii) Hexane/acétate d'éthyle = 9:1, puis, après séchage de la plaque, mélange i) pour l'extrait de beurre, sans changement de la direction de migration.
Saturation:	env. 2 h (avec un buvard).
Développement:	A température ambiante dans une chambre saturée pendant env. 1 h (chemin de migration: 17 cm).
Révélation:	Sous UV ($\lambda = 254$ nm) pour le 7-cétocholestérol et le 4-cholestène-3-one. Après application d'un spray d'acide sulfurique (500 g/kg) puis chauffage à 120 °C pendant 10 min pour les autres standards. Les taches colorées sont visibles en lumière blanche usuelle: Elles ressortent plus intensément à 366 nm.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus correspondent à 2 séries d'essais différents, soit:

- ceux destinés à optimiser la séparation d'un mélange de 10 standards purs, soit 9 oxystérols et le cholestérol non oxydé (cf. tableau 2);
- ceux destinés à tester la séparation sur couche mince des oxystérols et du cholestérol dans le beurre fondu sans/avec «clean-up» préliminaire sur cartouche.

Essais de séparation sur couche mince d'un mélange de 9 oxystérols et de cholestérol (standards purs)

Sur plaque de gel de silice avec indicateur de fluorescence (gel de silice 60 F₂₅₄ pour HPTLC) et en recourant au mélange de solvants chlorure de méthylène/acétone/toluène dans le rapport volumique 2:1:1, il a été possible de séparer le cholestérol ainsi que chacun des 9 oxystérols étudiés. Seuls le 7-cétocholestérol et le 4-cholestène-3-one sont visibles sous UV à 254 nm. Les autres composés peuvent être révélés à l'aide de l'acide phosphomolybdique ou de l'acide sulfurique. Le second révélateur cité présente un net avantage sur le premier: il permet de colorer de façon différenciée le cholestérol et ses divers produits d'oxydation, ce qui facilite donc grandement le travail d'identification. La figure 1 montre un exemple d'une

telle séparation sur couche mince avec indication des R_f et des couleurs correspondants dans la légende.

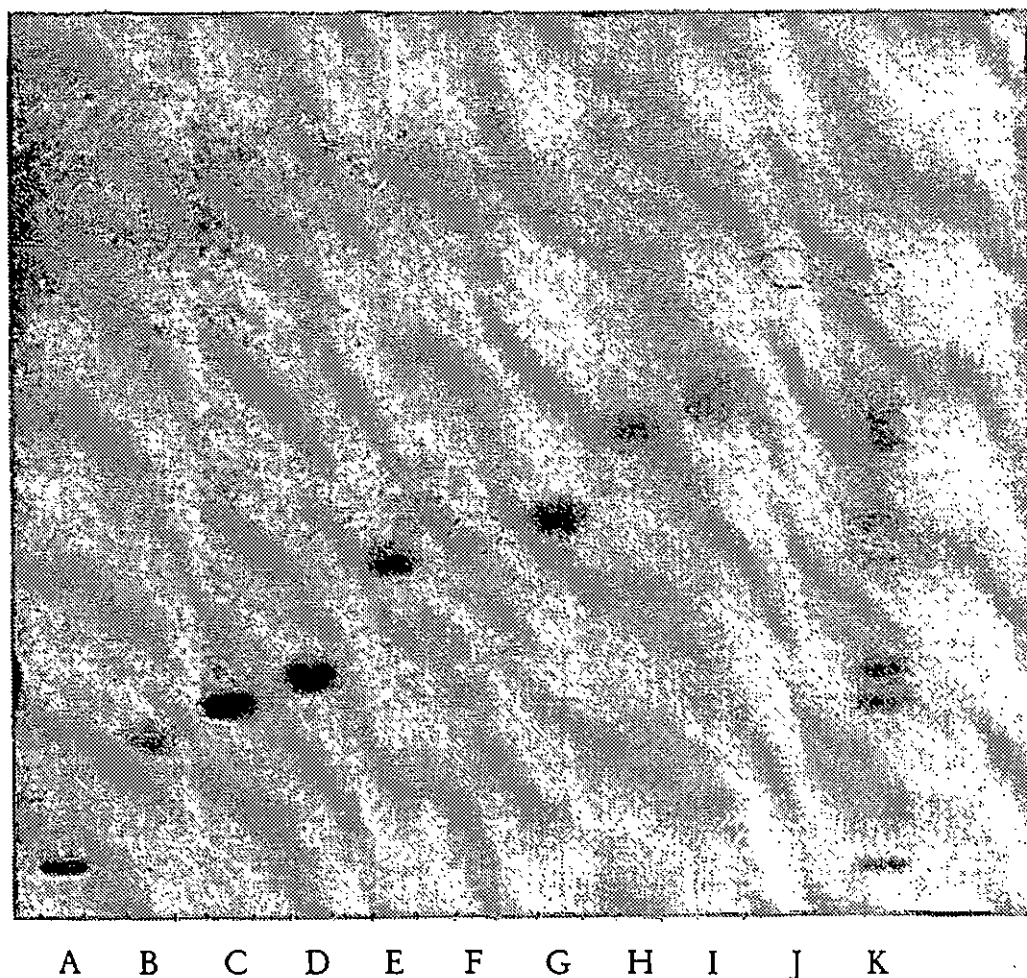


Fig. 1. Séparation du cholestérol et de ses produits d'oxydation par TLC

Légende:

Standard	R_f	Couleur après révélation	Couleur à 366 nm après révélation
A = Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol	0,05	jaune-brun	blanc-beige
B = Cholestane-3 β , 5 α , diol-6-one	0,20	jaune	bleu
C = 7 α -Hydroxycholestérol	0,23	bleu	brun
D = 7 β -Hydroxycholestérol	0,27	bleu	brun
E = Cholestane-3 β -ol, 5 α , 6 α -époxyde	0,39	brun-beige	blanc-beige
F = 7-Cétocholestérol	0,42	*	*
G = 25-Hydroxycholestérol	0,44	brun	beige
H = 20 α -Hydroxycholestérol	0,54	brun	vert
I = Cholestérol	0,58	mauve	rose-mauve
J = 4-Cholestène-3-one	0,72	*	bleu
K = Mélange des standards A à J			

* Tache visible à 254 nm avant la révélation à l'acide sulfurique.

Lors de la révélation à l'acide sulfurique, le temps de chauffage (10 min) et la température (120 °C) sont importants pour obtenir des couleurs bien différenciées. Une température trop élevée donne des taches uniformément brunes. L'intensité de la coloration des taches peut être augmentée par une exposition à la lumière UV à 366 nm. Ces paramètres permettent d'accroître la sensibilité de la détection. On peut atteindre ainsi des limites de détection de l'ordre de 0,1 µg avec des solutions standards (par application d'une tache ronde), soit des quantités environ 10 fois plus faibles que celles détectées par la méthode RP-HPLC décrite précédemment dans la partie I (1).

Analyse du beurre fondu

Lors d'essais préliminaires, plusieurs types de couches minces et de solvants de migration ont été testés pour l'analyse du beurre. Ces essais, non rapportés dans le détail, ont montré la nécessité d'effectuer un premier développement avec un mélange de solvants peu polaire tels que hexane/acétate d'éthyle dans le rapport volumique 9:1 (8) pour séparer le cholestérol et ses produits d'oxydation de la matière grasse (essentiellement des triglycérides). On peut alors séparer les divers oxystérols (les uns des autres) au moyen de la phase mobile proposée ci-dessus (chlorure de méthylène/acétone/toluène dans le rapport volumique 2:1:1).

L'analyse directe sans «clean-up» d'un beurre fondu frais enrichi en oxystérols par chauffage à 180 °C pendant 15 min n'a pas permis de les détecter, ceux-ci étant probablement présents en trop faibles concentrations (cf. fig. 2, colonne A). Une première phase d'enrichissement est donc indispensable sous la forme d'un «clean-up» sur cartouche. Du beurre fondu frais ainsi traité (c.-à-d. avec «clean-up» sur cartouche) n'a pas présenté non plus de trace d'oxystérols (fig. 2, colonne B), mais ce même beurre fondu frais chauffé à 180 °C pendant 15 min contient en revanche des quantités appréciables de 7-cétocholestérol, de 7 α -hydroxycholestérol ainsi que de 7 β -hydroxycholestérol (fig. 2, colonne C). Du beurre fondu stocké à l'air pendant 2 ans à 7 °C contient ces mêmes oxystérols, toutefois en quantités nettement inférieures, l'évaluation semi-quantitative étant effectuée sur la base de l'intensité et de la grosseur des taches obtenues (fig. 2, colonne D). Ce vieux beurre fondu porté à 180 °C pendant 15 min présente des teneurs encore plus importantes en ces 3 oxystérols (fig. 2, colonne E) que le beurre fondu frais chauffé dans les mêmes conditions.

La traînée brunâtre accompagnant la migration du beurre fondu stocké et/ou chauffé, est beaucoup plus intense que celle obtenue avec le beurre fondu frais non chauffé. Elle est certainement due à la lipolyse de la matière grasse qui résulte d'une longue conservation et/ou d'un chauffage intense. Ce bruit de fond gêne sensiblement la détection des oxystérols par couche mince puisqu'il élève les seuils de détection (les taches sont moins visibles et moins bien colorées).

Diverses méthodes d'analyse ont été mises en oeuvre pour tenter d'élucider l'origine de cette traînée brunâtre: la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie liquide/liquide à hautes performances avec détection par diffraction de lumière



Fig. 2. Analyse d'un beurre fondu sur couche mince

- Légende: 1^{er} développement avec hexane/acétate d'éthyle (9:1); séchage; 2^e développement avec chlorure de méthylène/acétone/toluène (2:1:1) dans le même axe de migration. Révélation à l'acide sulfurique.
- A = Beurre fondu chauffé 15 min à 180 °C;
 - B = Extrait de beurre fondu frais;
 - C = Extrait de beurre fondu frais chauffé 15 min à 180 °C;
 - D = Extrait de beurre fondu stocké 2 ans à 7 °C;
 - E = Extrait de beurre fondu stocké 2 ans à 7 °C et chauffé 15 min à 180 °C;
 - F = Standards

N.B.: Tous les chromatogrammes obtenus avec les extraits de beurre fondu montrent la présence de 2 taches bien résolues ($R_f = 0,17$ et $0,25$) dont l'origine demeure encore inconnue

(HPLC-LSD) (cf. partie IV). Toutes ces méthodes semblent indiquer que cette traînée brunâtre doit être attribuée aux mono- et diglycérides formés par l'hydrolyse des triglycérides du beurre fondu, éventuellement aussi à certains produits d'oxydation de la matière grasse. Le beurre frais contient d'ailleurs aussi 1 à 3% de glycérides partiels. A cause de ce bruit de fond il est indispensable d'observer la plaque à 366 nm après la révélation à l'acide sulfurique pour parvenir à distinguer les couleurs et éviter ainsi toute confusion avec d'autres substances ayant un R_f comparable. Une analyse (semi-)quantitative par intégration des pics à l'aide d'un densitomètre n'est donc pas envisageable dans de telles conditions. En conséquence, le «clean-up» proposé dans la partie I et utilisé pour ce travail devra donc être amélioré avant d'envisager la chromatographie sur couche mince comme méthode de routine. Ce développement méthodologique fera l'objet d'une étude particulière dans la partie IV.

A titre comparatif, le tableau 6 rapporte encore quelques résultats récemment publiés. On peut y remarquer l'importance de l'auto-oxydation du cholestérol par

suite d'un stockage prolongé ou d'une élévation de température. De nombreux oxystérols y sont mentionnés, dont les 3 cités ci-dessus. Les oxystérols détectés dans le beurre, notamment dans le beurre frais, varient d'un auteur à l'autre. Plusieurs facteurs peuvent l'expliquer:

- Les conditions de fabrication, d'emballage et d'entreposage du beurre ne sont pas les mêmes.
- Les méthodes d'analyse employées sont fort différentes.

Tableau 6. Oxystérols détectés (+) dans divers beurres

Type de beurre	Oxystérols									Auteurs, année
	α -ép	β -ép	7-one	7 α -OH	7 β -OH	4 β -OH	25-OH	20 α -OH	triol	
Frais Chauffé 10 min à 180 °C			+	+	+	+	+			Csiky, 1982 (16)
Salé Salé, 8 jours sous lumière fluorescente				+	+					Luby et al., 1986 (12)
Frais Sans sel 6 mois à -26 °C 6 mois à 4 °C	+				+					Sander et al., 1988, 1989 (17, 18)
Frais 4 mois à 4 °C Chauffé 10 min à 180 °C Beurre fondu	+	+	+	+	+			+		Nourooz- Zadeh et Appelqvist, 1988 (19)
Frais Chauffé 10 min à 180 °C 6 mois à -20 °C 6 mois à -20 °C et chauffé 10 min à 180 °C	+	+	+	+	+			+	+	Pie et al., 1990 (6)
Frais				+	+					Kumar et Singhal, 1992 (15)

Légende:

α -ép = cholestane-3 β -ol,5 α ,6 α -époxyde

7-one = 7-cétocholestérol

4 β -OH = 4 β -hydroxycholestérol

triol = cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol

β -ép = cholestane-3 β -ol,5 β ,6 β -époxyde

7 α -OH et 7 β -OH = 7 α - et 7 β -hydroxycholestérol

25-OH et 20 α -OH = 25-hydroxycholestérol et

20 α -hydroxycholestérol

En caractère gras et encadré, les 3 oxystérols trouvés lors de cette étude dans le beurre fondu stocké 2 ans et/ou chauffé 15 min à 180 °C

Conclusion

Le présent travail montre qu'il est possible de séparer par chromatographie sur couche mince les composants d'un mélange standard contenant le cholestérol et 9 de ses produits d'oxydation. En l'absence d'effets de matrice, les limites de détection obtenues se situent au voisinage de 0,1 µg.

L'analyse du beurre fondu nécessite toutefois un «clean-up» préliminaire comme phase d'enrichissement des oxystérols et d'élimination des triglycérides. Le «clean-up» repris de la partie I a permis de détecter 3 oxystérols dans du beurre fondu stoké 2 ans à 7 °C et/ou chauffé 15 min à 180 °C. Cette étape préparative permet en effet d'éliminer la majeure partie des triglycérides, mais pas la fraction polaire comprenant les mono- et les diglycérides (formation d'une traînée brunâtre sur tout le chemin d'élution), ce qui limite donc l'application de la méthode par TLC proposée à la seule analyse qualitative des oxystérols. Il ne permet pas non plus l'analyse d'oxystérols moins polaires que le cholestérol comme le 4-cholestène-3-one par exemple. Vu le travail de mise au point qu'il requiert encore, le «clean-up» des échantillons de beurre fondu fera l'objet d'une étude plus approfondie dans le quatrième volet de ce travail.

En résumé, une comparaison des deux premières techniques chromatographiques développées et testées jusqu'ici indique que:

- l'avantage principal de la méthode RP-HPLC testée (partie I) réside dans son caractère quantitatif. Cette méthode présente en revanche d'assez médiocres limites de détection et de nombreux artefacts et/ou interférences. En outre, elle n'est applicable qu'aux seuls composants qui présentent un chromophore aux longueurs d'onde de détection utilisées ($\lambda = 204$ et 242 nm);
- l'avantage principal de la méthode TLC testée (partie II) est sa simplicité et son faible coût de mise en oeuvre. La TLC permet en outre la détection univoque des oxystérols grâce à leur coloration spécifique (avant et après révélation à l'acide sulfurique et sous divers éclairages: 254 et 366 nm). Son défaut majeur actuel est un important bruit de fond (traînée brunâtre) en présence de mono- et diglycérides libérés par lipolyse des triglycérides. Cette limitation devra être revue après l'étude des possibilités et limites des techniques de purification des échantillons (partie IV).

Remerciements

Le présent travail fait partie d'une thèse de doctorat actuellement en cours. Les auteurs tiennent à remercier l'Institut *Candia* (Centre de recherche international André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France) ainsi que la Fédération des coopératives Migros (Zurich) de leur intérêt pour ce travail et pour leur soutien financier accordé sous la forme d'une bourse offerte au premier auteur, stagiaire à la FAM. Les auteurs remercient également le Dr A. *Dieffenbacher* de Nestlé, Vevey, ainsi que le Dr P. *Marchon* de Crema, Fribourg, pour leur lecture critique du manuscrit.

Résumé

Le présent travail étudie les possibilités et limites de l'application de la chromatographie en couche mince à l'analyse du cholestérol et de 9 de ses produits d'oxydation (oxystérols) dans des beurres fondus (frais, stocké et/ou chauffé). La technique de «clean-up» a été reprise de la partie I (méthode RP-HPLC), suivie d'une migration sur couche mince (gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence, pour HPTLC) avec d'abord un mélange d'hexane/acétate d'éthyle (9:1), puis dans la même direction avec le mélange chlorure de méthylène/acétone/toluène (2:1:1). La méthode proposée permet de séparer les 10 substances d'un mélange standard avec une limite de détection très basse (env. 0,1 µg) et avec une coloration très spécifique des taches (avant et après révélation à l'acide sulfurique; à 254 et 366 nm). Avec des beurres fondus partiellement lipolysés (stockage, chauffage) apparaît néanmoins une traînée brunâtre, due probablement aux mono- et diglycérides, éventuellement aux produits d'oxydation de la matière grasse, qui limite l'application de cette technique à une analyse qualitative. Trois oxystérols ont pu être ainsi être mis en évidence dans le beurre fondu chauffé, resp. stocké sur une longue période.

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit den Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Analyse von Cholesterin und 9 Oxidationsprodukten (Oxycholesterine) in eingesottener Butter (frisch, gelagert oder erhitzt). Es wurde das in Teil I (Methode RP-HPLC) beschriebene Reinigungsverfahren (Clean-up) verwendet, gefolgt von einer Trennung auf Dünnschichtplatten (Silikagel 60 mit einem Fluoreszenzindikator für die HPTLC), zuerst mit dem Fließmittel Hexan/Ethylacetat (9:1), dann mit dem Fließmittel Methylenchlorid/Aceton/Toluol (2:1:1). Die vorgeschlagene Methode erlaubt es, die erwähnten 10 Substanzen in einem Standardgemisch mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze (ungefähr 0,1 µg) und einer sehr spezifischen Färbung der Flecken (vor und nach dem Besprühen mit Schwefelsäure; bei 254 und 366 nm) zu trennen. Bei teilweise lipolysierten Butterproben wurde infolge der Lagerung und Erhitzung auf den Dünnschichtplatten ein bräunlicher Streifen festgestellt, bei dem es sich um Mono- und Diglyzeride handeln dürfte, eventuell um Oxidationsprodukte des Milchfettes, was eine quantitative Analyse erschwert. Drei Oxycholesterine konnten in erhitzten sowie in gelagerten Butterproben nachgewiesen werden.

Summary

The present work describes the possibilities and limits of the application of the thin layer chromatography to the analysis of cholesterol and of 9 of its oxidation products in butter oils (fresh, stored or/and heated). The clean-up technique described in part I (RP-HPLC method) is followed by a TLC analysis (plate silica gel 60 with a fluorescence indicator, for HPTLC). The development of the thin layer plate is performed in 2 steps. The first mobile phase is hexane/ethylacetate (9:1). The plate is dried and developed in the same direction with a second mobile phase: methylene chloride/acetone/toluene (2:1:1). This method allows the separation of 10 substances of a standard test mixture with very low detection limits (eg. 0.1 µg) and with specific coloring of spots (before and after revelation with sulfuric acid, detection at 254 and 366 nm). Nevertheless with partly lipolysed butter oils (storage, heat treatment) a brown

streak appears, probably due to mono- and diglycerides, eventually to oxidation products of milk fat, limiting this technique to a qualitative analysis. Three oxidized cholesterol have been detected in heated or stored butter oils.

Bibliographie

1. *Sallin, Christine, Baumann, E., Bütikofer, U., Sieber, R. et Bosset, J.O.*: Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. Partie I: Possibilités et limites des techniques RP-HPLC. *Trav. chim. aliment. hyg.* 84, 141–157 (1993).
2. *Finocchiaro, E.T., Lee, K. and Richardson, T.*: Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butteroil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 877–883 (1984).
3. *Maerker, G. and Unruh Jr., J.*: Cholesterol oxides I. Isolation and determination of some cholesterol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63, 767–771 (1986).
4. *Maerker, G. and Bunick, F.J.*: Cholesterol oxides II. Measurement of the 5,6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63, 771–777 (1986).
5. *Cleveland, M.Z. and Harris, N.D.*: Oxidation of cholesterol in commercially processed cow's milk. *J. Food Protect.* 50, 867–871 (1987).
6. *Pie, J.E., Spahis, K. and Seillan, C.*: Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agric. Food Chem.* 38, 973–978 (1990).
7. *Pie, J.E., Spahis, K. and Seillan, C.*: Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 39, 250–254 (1991).
8. *Park, S.W. and Addis, P.B.*: HPLC determination of C-7 oxidized cholesterol derivatives in foods. *J. Food Sci.* 50, 1437–1441 (1985).
9. *Hwang, K.T. and Maerker, G.*: Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 371–375 (1993).
10. *Bascoul, J., Domergue, N., Olle, M. and Crastes de Paulet, A.*: Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID. *Lipids*, 21, 383–387 (1986).
11. *Ansari, G.A.S. and Smith, L.L.*: High-performance liquid chromatography of cholesterol autoxidation products. *J. Chromatogr.* 175, 307–315 (1979).
12. *Luby, J.M., Gray, J.I., Harte, B.R. and Ryan, T.C.*: Photooxidation of cholesterol in butter. *J. Food Sci.* 51, 904–907 (1986).
13. *Teng, J.I.*: Oxysterol separation by HPLC in combination with thin layer chromatography. *Chromatogram* 8–10 (Nov.) (1990).
14. *Nourooz-Zadeh, J.*: Determination of the autoxidation products from free or total cholesterol: a new multistep enrichment methodology including the enzymatic release of esterified cholesterol. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1667–1673 (1990).
15. *Kumar, N. and Singhal, O.P.*: Effect of processing conditions on the oxidation of cholesterol in ghee. *J. Sci. Food Agric.* 58, 267–273 (1992).
16. *Csiky, I.*: Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by adsorption high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 241, 381–389 (1982).
17. *Sander, B.D., Smith, D.E. and Addis, P.B.*: Effects of processing stage and storage conditions on cholesterol oxidation products in butter and Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 71, 3173–3178 (1988).

18. *Sander, B.D., Addis, P.B., Park, S.W. and Smith, D.E.*: Quantification of oxidation products in a variety of foods. *J. Food Protect.* **52**, 109–114 (1989).
19. *Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L.A.*: Cholesterol oxides in Swedish food ingredients: butter and cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1635–1641 (1988).

Prof. Dr R. Tabacchi
Institut de chimie
Université de Neuchâtel
CH-2000 Neuchâtel

Christine Sallin
Dr R. Sieber
Dr J.O. Bosset
Station fédérale de recherches laitières
CH-3097 Liebefeld-Bern

3.3 Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. III. Possibilités et limites des techniques GC-FID

Christine Rose-Sallin, Robert Sieber, Jacques Olivier Bosset
Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne

Rapport interne (FAM INFO, n° 290 W/septembre 1994)

Contribution to Oxidized Cholesterol Determination in Milk and Milk Products.

II. Possibilities and Limits of GC-FID Techniques

Introduction

La partie I de cette étude en quatre volets avait pour objectif de déterminer les possibilités et limites et des techniques chromatographiques de type liquide/liquide à hautes performances (RP-HPLC)(1). La deuxième partie proposait une étude semblable pour les méthodes chromatographiques en couche mince (TLC)(2). Le présent travail étudie les possibilités et les limites du dosage des oxystérols par chromatographie en phase gazeuse suivie d'une détection par ionisation de flamme (GC-FID). La mise au point d'une méthode recourant à une détection par spectrométrie de masse (GC-MS) fera l'objet d'un travail séparé.

Depuis plus de 20 ans, on a recours à la GC pour l'analyse des produits d'oxydation du cholestérol, mais la résolution sur colonnes à remplissage s'est révélée insuffisante (3-5) en raison notamment de la similarité structurale de ces composés. Le développement de la "GC capillaire" a permis une meilleure séparation des principaux oxystérols (cf. tableau 1). Addis *et al.* (7-16) ont été parmi les premiers à étudier rigoureusement ces substances à l'aide de colonnes capillaires. Ils ont proposé l'utilisation de colonnes capillaires apolaires (phase stationnaire: 100%

méthylpolysiloxane) en dérivant préalablement les produits d'oxydation du cholestérol en triméthylsilyléthers (TMS) afin d'éviter leur dégradation thermique. Certains diols comme le 7 α -hydroxycholestérol, le 7 β -hydroxycholestérol et le 25-hydroxycholestérol sont en effet particulièrement thermolabiles et très polaires de surcroît. Maerker *et al.* (36-37) ont néanmoins récemment démontré qu'une injection "on-column" sur colonne capillaire de silice fondue permettait de doser des quantités très faibles d'oxystérols (de l'ordre de 10 ppb dans la viande) sans dégradation ni pertes apparentes. L'objet de cette troisième partie est de tester d'abord une méthode de dosage par chromatographie en phase gazeuse des produits d'oxydation du cholestérol selon deux modes d'injection différents ("split" et "on-column"), puis - comme alternative - une méthode recourant à une silylation donc plus longue mais plus ménagante quant à la thermolabilité des composés à analyser.

Aspects analytiques

Tableau 1: Résumé des méthodes GC capillaire utilisées pour l'analyse des produits d'oxydation du cholestérol.

Dérivatisation	Injection		Colonne capillaire (phase stationnaire; dimensions)	Température du four	Détection		Composés analysés	Produits analysés (matrice)	Remarques	Réf
	mode	temp.			détecteur	lim. dét. (µg/kg)				
Chlorhydrate de méthylhydroxylamine dans pyridine, 4 h à 60°C puis pyridine:HMDs:TMCS (1:1:1); 12 h à TA	ROS	350°C	OV-101 (25m x 0,25mm)	285°C	FID		1,2,3,4,5,8,8,10,14,18,17,24-34	cholestérol chauffé	doublé dérivation: les cétones dérivées en méthoxyimines puis les alcools en TMS	8
BSA:TMCS:TSIM (3:2:3) dans pyridine, 15 min à TA	split 100:1	270°C	DB-1 (15m x 0,25mm x 0,1µm)	180-250°C (3°C/min)	FID à 300°C MS		1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16	standards purs	comparaison entre colonne DB-1, DB-5 et DB-1701 avec/ sans silylation	7
Tri-sil (de Pierce chemical), 30 min à 60°C			100% méthylpolysiloxane (25m x 0,33mm x 0,35µm)	isotherme 280°C	FID à 310°C MS	200	4, 5, 6, 8	œuf	calcul du taux de récupération après eap.+extrac.	8, 9
			100% méthyl polysiloxane (25m x 0,2mm x 0,2µm)	isotherme 270°C isotherme 258°C	FID à 310°C MS	100	1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10	poudres de lait	étude de la silylation	10
			DB-5 (30m x 0,25mm x 1,0 µm)	isotherme 280°C	FID à 310°C MS	100	1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 16	œuf, beurre, biscuits	taux de récupération ≥ 100% !	22
pyridine:HMDs:TMCS (1:1:1) 2-3 h à TA		300°C	ULBON HR-1 (50m x 0,25mm x 0,25µm)	isotherme à 280°C	FID		1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 18, 17, 18	viandes		23
TMCS:HMDs:pyridine (1:3:9) à TA		300°C	100% méthylpolysiloxane (12m x 0,2mm x 0,33µm)	70-260°C	FID MS		1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 19	chauffage du cholestérol pur	analyse des oxystérols libres/ esterifiés	24
TMCS:HMDs (1:1) 1 h à 60°C	splitless + split	265°C	DB-1 (15m x 0,25mm x 0,1µm)	170-266°C	MS		1, 2, 5, 6, 8, 10, 19	œuf		25
pyridine:BSTFA (1:1) 1 h à TA	split 11:1	270°C	OV-1701 (30m x 0,30mm)	34-260°C	FID à 300°C MS		1, 4, 5, 6 ou 9, 10	poudres de lait		26
pyridine:HMDs:TCs (4:2:1) 20min à TA puis à 50°C sans dérivation	on-column	200°C	SE-30 SP-2100 (30m)	34-290°C 220-260°C (4°C/min)	FID à 330°C MS			beurres, fromages, œufs	analyse qualitative	27
								lait		28

DMF:BSTFA (1:1) 1 h et sans	on-column	Ultra-2 (25m x 0,2mm x 0,32mm) + pré-colonne (2m x 0,32mm)	100-300°C	FID à 325°C	1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 16, 20	standard/cholestérol dans une dispersion aqueuse	l'analyse sans silylation est préférée	29 30 31
sans dérivatisation	on-column	DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm)	100-300°C	FID à 325°C	4, 5, 6, 8, 9, 12, 18	liposomes	après γ -irradiation du cholestérol dans des liposomes	32
sans dérivatisation	on-column	Ultra-2 (25m x 0,2mm x 0,32µm)	100-300°C	FID à 325°C	(4, 5, 7, 10, 12, 16); 8, 8, 8	standards purs;		33
sans dérivatisation	on-column	DB-5 (30m x 0,32mm x 0,25µm)	100-300°C	MS FID selon (32)	4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 16, 21	liposomes		34
sans dérivatisation	on-column	DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm)	70-310°C	FID à 325°C	3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 22, 23	liposomes		35
sans dérivatisation	on-column	DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm)	100-310°C	FID à 325°C	3, 6, 8, 9, 22, 23	vieilles		36
sans dérivatisation	on-column	DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm)	70-275°C	FID à 325°C	4, 5, 6, 8, 9, 12, 14, 16	vieilles		37

Légende:
nom fondamental
nom systématique

- | | | | |
|----|--|----|---|
| 1 | 25-Hydroxycholestérol | 30 | 24(R)-24-Hydroxycholestérol |
| 2 | 20 α -Hydroxycholestérol | 31 | 24(G)-24-Hydroxycholestérol |
| 3 | 4-Cholesténe-3-one | 32 | 23(R)-23-Hydroxycholestérol |
| 4 | 7 α -Hydroxycholestérol | 33 | 22 α ,23 β -dihydroxycholestérol |
| 5 | 7 β -Hydroxycholestérol | 34 | 25(R)-26-Hydroxycholestérol |
| 6 | 7-Cécholestérol | | |
| 7 | Cholestane-3,5-diéne-7-one | | |
| 8 | Cholestane-3 β -ol-5 α ,6 α -époxyde | | |
| 9 | Cholestane-3 β -ol-5 β ,6 α -époxyde | | |
| 10 | Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol | | |
| 11 | Cholestane-3 β ,5 α -diol,8-one | | |
| 12 | 6-Cécholestanol | | |
| 13 | Cholestane-3,6-dione | | |
| 14 | 5 α -Cholestane | | |
| 15 | 4 β -Hydroxycholestérol | | |
| 16 | Cholestérol | | |
| 17 | 22(S)-Hydroxycholestérol | | |
| 18 | 22(R)-Hydroxycholestérol | | |
| 19 | 19-Hydroxycholestérol | | |
| 20 | 3-Cécholestanol | | |
| 21 | 7-Cécholestanol | | |
| 22 | Cholestane-4,6-diène-3-one | | |
| 23 | 4-Cholesténe-3,6-dione | | |
| 24 | | | |
| 25 | | | |
| 26 | desmostérol | | |
| 27 | | | |
| 28 | | | |
| 29 | | | |

Produits d'oxydation du cholestérol:
nom systématique

5-Cholesténe-3 β ,25-diol
 5-Cholesténe-3 β ,20 α -diol
 5-Cholesténe-3 β ,7 α -diol
 5-Cholesténe-3 β ,7 β -diol
 5-Cholesténe-3 β -ol-7-one
 5 α -Cholesténe-5,6 α -époxy-3 β -ol
 5 β -Cholesténe-5,6 β -époxy-3 β -ol
 5 α -Cholesténe-3 β ,5 α ,6 β -triol
 Cholestane-3 β -ol,6-one
 5-Cholesténe-3 β ,4 β -diol
 5-Cholesténe-3 β -ol
 5-Cholesténe-3 β -ol-7-one
 3 β -Hydroxycholest-5-ène-7-one
 5 α -Cholestane-3 β -ol
 3,5-Cholestadiène-7-one
 5,24-Cholestadiène-3 β -ol
 5 α -Cholestane-3-one
 5,7-Cholesténe-3 β -ol
 7-Cholesténe-3 β -ol

colonne capillaires
 DB-1; SE-30; SP-2100;
 OV-101; ULBON HR-1
 DB-5; Ultra-2
 DB-1701; OV-1701

réactifs
 HMDS
 TMCS
 BSTFA
 BSA
 T SIM
 OMF
 THF
 TCS

autres abréviations
 TA
 FID
 MS(D)

Abréviations:
 100% Méthylpolysiloxane
 5% Phényl-95% méthylpolysiloxane
 7% Cyanopropyl 7% phényl-
 88% méthylpolysiloxane

Hexaméthylsilazane
 Triméthylchlorosilane
 N-O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
 N-O-Bis(triméthylsilyl)acétamide
 Triméthylsilylimidazole
 Diméthylformamide
 Tétrahydrofurane
 Trichlorosilane

Température ambiante
 Détecteur à ionisation de flamme
 (Détecteur) à spectrométrie de masse

Partie expérimentale

Réactifs

Les standards purs sont dissous dans de l'acétone (qualité Lichrosolv de Merck)

Tableau 2. Stéroïdes utilisés

Standard	N° de l'article	Fournisseur
7-Cétocholestérol	A284122	Aldrich
25-Hydroxycholestérol	H1015	Sigma
20 α -Hydroxycholestérol	H6378	Sigma
7 β -Hydroxycholestérol	H6891	Sigma
7 α -Hydroxycholestérol	C6420	Steraloids
Cholestane-3 β ,5 α ,diol-6-one	C4000	Steraloids
Cholestane-3 β -ol,5 α ,6 α -époxyde	C2773	Sigma
Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	C2523	Sigma
Cholestérol	2471	Merck
4-Cholestène-3-one	C6250	Steraloids
5-Cholestène-3-one	C7050	Steraloids
5 α -Cholestane-3 β -ol-6-one	C4450	Steraloids
5 α -Cholestane-3 β -ol	C4350	Steraloids
7,(5 α)-Cholestène-3 β -ol	C7400	Steraloids
5 α -Cholestane	C3300	Steraloids
22-Cétocholestérol	K6125	Sigma

Réactifs pour la silylation: Sylon BTZ (BSA: TMCS: TSIM, 3:2:3) sous forme d'ampoules de 0,1ml de Supelco, n° 33151. La silylation s'effectue dans la pyridine anhydre (qualité pro analysi), de Merck, n° 7463.

Appareillage

Chromatographe en phase gazeuse: Hewlett Packard n° 5890 série II muni d'un détecteur à ionisation de flamme FID, d'un passeur d'échantillon automatique n° 7673 et de deux injecteurs, l'un opérant en mode "split/ splitless", l'autre en mode "on-column". Les données ont été saisies puis traitées par un ordinateur personnel équipé d'un programme informatique de type Chemstation 3365 série II de Hewlett Packard également. Les 2 colonnes capillaires testées étaient en silice fondue. La composition de leur phase stationnaire était la suivante: 5% phényl 95% diméthylpolysiloxane. La première colonne testée était de type BPX-5 (dimensions: 50m x 0,32mm x 0,5 μ m) de SGE supportant une température maximale (programme isotherme) de 360°C. La seconde colonne était de type DB-5 (dimensions: 30m x 0,25mm x 0,25 μ m) de J&W Scientific. Une précolonne de silice fondue désactivée (70 cm x 0,53 mm I.D.) a été ajoutée pour les injections en mode "on-column" pour ménager la colonne de séparation utilisée.

Modes opératoires

Silylation selon Park et Addis (7): Sécher sous azote 50 μ l d'une solution pure de standard à 5 g/l dans un micro-réipient. Ajouter 1 ml de pyridine anhydre puis 100 μ l de réactif de silylation Sylon BTZ et fermer hermétiquement le réipient. Agiter puis laisser reposer 30 min à température ambiante. La solution est alors prête pour l'injection.

Séparation chromatographique en phase gazeuse:

A) Injection en mode split:

A.1. Sans dérivation:

Colonne capillaire: BPX-5 (50m x 0,32mm x 0,5 μ m); injection en mode split (100:9); gaz porteur: helium; pression initiale (250°C): 1,6 bar; flux constant à 1,7 ml/min; injecteur à 280°C; programme de température: 1 min à 250°C, première rampe de 10°C/min jusqu'à 280°C, deuxième rampe de 8°C/min jusqu'à 340°C, température finale maintenue 20 min; détecteur (FID): 370°C.

A.2. Après dérivation (TMS):

Colonne capillaire: BPX-5 (50m x 0,32mm x 0,5 μ m); injection en mode split (100:9); gaz porteur: helium; pression initiale (280°C): 1,7 bar; flux constant à 1,7 ml/min; injecteur à 300°C; programme de température: isotherme à 280°C; détecteur (FID): 325°C.

B) Injection en mode "on-column" sans dérivation

Précolonne désactivée de 70 cm x 0,53 mm; colonne capillaire en silice fondue BPX-5 (50m x 0,32mm x 0,5 μ m); injection en mode "on-column"; gaz porteur: helium; pression initiale (50°C): 1,25 bar; flux constant à 2,7 ml/min; injecteur à 50°C; programme de température: 3 min à 50°C, première rampe de 30°C/min jusqu'à 285°C, deuxième rampe de 0,3°C/min jusqu'à 300°C, température finale maintenue 5 min; détecteur (FID) 325°C.

Résultats et discussion

A) *Injection en mode split*

A.1. Afin de tester la thermolabilité des oxystérols lors d'une analyse GC-FID, les standards purs ont d'abord été injectés en mode split. Ce système d'injection est en effet assez endommageant pour des composés aussi peu volatils que les oxystérols, car il nécessite une vaporisation à très haute température (250°C) dans la chambre d'injection. La dégradation thermique peut encore être aggravée du fait que l'aiguille de la seringue et la laine de verre dans l'injecteur peuvent agir comme catalyseurs. L'instabilité des standards purs a été évaluée sur la base du nombre de pics obtenus lors de l'injection de chacun d'eux séparément. Les oxystérols ne présentant qu'un seul pic lors d'analyse à double sont considérés comme stables. Les résultats sont présentés sous la forme de l'annexe A1.

Sur les 14 standards analysés, seuls 5 apparaissent stables selon ce critère et pourraient donc être quantifiés. Pour confirmer cette stabilité, il serait néanmoins souhaitable d'effectuer encore une analyse GC-MS dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus avec les 9 autres standards sont médiocres, ce mode d'injection décomposant même fortement le 7 α - et le 7 β -hydroxycholestérol,

comme l'ont d'ailleurs signalé Park et Addis (7). Le cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol ne sort même pas de la colonne. Il est probablement détruit dans l'injecteur, puisqu'un mode d'injection de type "on-column" plus ménageant permet de le chromatographier (cf. annexe B).

A.2. En dérivant les oxystérols en TMS, un programme isotherme à 280°C suffit pour analyser ces dérivés en GC-FID. Les résultats sont présentés sous la forme de l'annexe A2.

Sur les 15 standards dérivés puis analysés, 10 d'entre eux présentent un chromatogramme acceptable avec un seul pic par composé. Il s'agit des oxystérols possédant une ou des fonction(s) alcool(s). Les temps de rétention de ces dérivés sont naturellement très différents que ceux des standards purs. Pour les 5 autres standards qui présentent une fonction cétonique, on obtient plusieurs pics, dus vraisemblablement à une silylation partielle de leur fonction cétonique lors de leur énoisation, soit à une pyrolyse dans l'injecteur et/ou la colonne de séparation.

B) Injection en mode "on-column"

Les mêmes standards ont été à nouveau injectés séparément mais cette fois en mode "on-column" et sans dérivation afin de tester leur stabilité dans des conditions beaucoup plus ménageantes. Les résultats sont présentés sous la forme de l'annexe B.

En utilisant un programme de température allant jusqu'à 300°C, on peut encore analyser le cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol avec un temps de rétention de l'ordre de 60 min. Les autres oxystérols sortent plus tôt avec une bonne résolution (cf. chromatogramme du mélange des 16 standards dans l'annexe B. Font exceptions le 25 et le 7 β -hydroxycholestérol, non résolus, ainsi que le 20 α -hydroxycholestérol et le 7 α -hydroxycholestérol qui ne sont que partiellement résolus.

Une analyse des 16 standards injectés séparément montre que seuls 3

oxystérols sont instables dans ces conditions: le 7α - et le 7β -hydroxycholestérol ainsi que le 5-cholestane-3-one. En prenant comme critère d'évaluation les surfaces des divers pics obtenus, on constate qu'ils sont même assez fortement décomposés (de 20% à 50% environ). Le 5-cholestane-3-one ne semble pas être abondant dans les denrées alimentaires. En revanche, le 7α - et le 7β -hydroxycholestérol se forment aisément et en grande quantité dans les produits alimentaires riches en cholestérol, sous l'effet d'un chauffage ou/et d'un stockage prolongé (2). Il est par conséquent capital de pouvoir doser ces substances de façon répétable, sans décomposition et avec des seuils de détection très bas.

Ces résultats obtenus confirment le caractère ménageant de ce type d'injection comparé au mode "split", donc beaucoup plus approprié pour analyser de telles substances. Il présente en outre l'avantage d'atteindre des seuils de détection beaucoup plus faibles qu'en mode "split".

Conclusions

La présente étude permet de tirer déjà les conclusions suivantes:

- les techniques d'injection en mode *split*, sans dérivation préalable des oxystérols, n'entrent pas en ligne de compte pour une méthode de dosage en routine en raison de la décomposition de la plupart des composés (9 sur les 14 testés);
- les techniques d'injection en mode "on-column", sans dérivation, présentent de nombreux avantages (rapidité, simplicité), mais sont limités par la décomposition de plusieurs standards (7α - et 7β -hydroxycholestérol, 5-cholestane-3-one). Ce système d'injection pourtant ménageant, n'est donc pas suffisant sans dérivation.
- les techniques d'injection en mode *split* avec dérivation en TMS donnent en général de bons résultats à l'exception des cétones. Les TMS permettent une analyse chromatographique à plus basse température et donnent en outre des pics fins et de surface plus importante. Ils peuvent donc abaisser les limites de détection, améliorer la résolution et surtout prévenir toute décomposition thermique. Lors d'une analyse avec détection par spectrométrie de masse, ils évitent aussi la déshydratation de certaines fonctions alcools dans l'interface GC-MSD. Les désavantages sont un temps d'analyse plus long et l'influence de l'humidité

résiduelle sur la dérivation. La mauvaise dérivation des cétones qui ne réagissent avec le BTZ que sous forme énolique a nécessité une poursuite des travaux avec d'autres réactifs de dérivation TMS plus puissants, ou même une dérivation spécifique des fonctions cétoniques par exemple en méthyloximes (6). Ces travaux ont été réalisés à l'aide d'un GC-MS en collaboration avec Nestec (38).

Remerciements

Le présent travail fait partie d'une thèse de doctorat actuellement en cours. Les auteurs tiennent à remercier l'institut CANDIA (Centre de recherche international André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France), Cremo (Fribourg) ainsi que la Fédération des coopératives Migros (Zürich) de leur intérêt pour ce travail et pour leur soutien financier accordé sous la forme d'une bourse offerte au premier auteur, stagiaire à la FAM.

Résumé

Le présent travail compare les performances obtenues lors de l'analyse de 14 produits d'oxydation du cholestérol par chromatographie en phase gazeuse avec des colonnes capillaires de type diméthylpolysiloxane greffées à raison de 5% phényl (BPX-5, DB-5) et avec une détection par ionisation de flamme. Trois variantes ont été testées: une injection en mode "split" sans et avec dérivation (sous la forme d'un triméthyléther, TMS) et une injection en mode "on-column" sans dérivation. Effectuée sans dérivation des oxystérols, même avec un système d'injection " on-column" plus ménageant, l'analyse des 14 standards purs n'a pas permis d'éviter une pyrolyse de 3 d'entre eux (7α - et 7β -hydroxycholestérol, 5-cholestane-3-one). La dérivation en TMS à l'aide du réactif BTZ donne de meilleurs résultats, mais elle est inappropriée pour les oxystérols porteurs d'une fonction cétonique. Elle a donc nécessité une poursuite des travaux par GC-MS.

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der gaschromatographischen Analyse von 14 Oxidationsprodukten des Cholesterins auf Kapillarkolonnen des Types Dimethylpolysiloxan 5% Phenyl (BPX-5, DB-5) und mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors. Drei Varianten wurden getestet: "split"-Injektion mit und ohne Derivatisierung (unter der Form eines

Trimethylsilylethers, TMS) und "on-column"-Injektion ohne Derivatisierung. Die Analyse der 14 reinen Standards, die ohne Derivatisierung und der schonenderen "on-column"-Injektion durchgeführt wurde, konnte eine Pyrolyse von drei Oxysterolen (7α - und 7β -Hydroxycholesterin, 5-Cholestan-3-on) nicht verhindern. Die Derivatisierung in TMS mit Hilfe des Reagens BTZ ergibt zwar bessere Resultate, ist aber für Oxysterole mit einer Ketongruppe ungeeignet. Diese Arbeit erfordert eine Fortsetzung mit GC-MS.

Summary

The present work compares the performances obtained for the analysis of 14 cholesterol oxidation products by gas chromatography with 5% phenyl-dimethylpolysiloxane capillary column (BPX-5, DB-5) and with flame ionisation detector. Three alternative routes were tested: a split injection mode with and without derivatization (trimethylsilylether, TMS) and with an on-column injection mode without derivatization. 14 pure standards can not be analysed without derivatization of the oxysterols. A mild injection system (on-column) did not permit do be avoided pyrolysis of 3 of these (7α - and 7β -hydroxycholesterol, 5-cholestane-3-one). TMS derivatization with BTZ reagent gave the best results, but the ketone group of some oxysterols were not derivatized. This work should be continued by GC-MS.

Bibliographie

1. Sallin, C., Baumann, E., Bütikofer, U., Sieber, R. et Bosset, J.O.: Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques RP-HPLC. *Trav. chim. aliment. hyg.* **84**, 141-157 (1993).
2. Sallin, C., Sieber, R., Bosset, J.O. et Tabacchi, R.: Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. II. Possibilités et limites des techniques TLC. *Trav. chim. aliment. hyg.* **84**, 566-580 (1993).
3. Fioriti, J.A. and Sims, R.J.: Autoxidation products from cholesterol. *J.Am.Oil Chem. Soc.* **44**, 221-224 (1967).
4. Ryan, T.C., Gray, J.I. and Morton, I.D.: Oxidation of cholesterol in heated tallow. *J.Sci.Food Agr.* **32**, 305-308 (1981).
5. Tsai, L.S. and Hudson, C.A.: Cholesterol oxides in commercial dry egg products: quantitation. *J.Food Sci.* **50**, 229-231 (1985).
6. Korahani, V., Bascoul, J. and Crastes de Paulet, A.: Capillary column gas-liquid chromatographic analysis of cholesterol derivatives. Application to the autoxidation products of cholesterol. *J. Chromatog.* **211**, 392-397 (1981).
7. Park, W.S. and Addis, P.B.: Capillary column gas-liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. *Anal. Biochem.* **149**, 275-283 (1985).
8. Park, S.W. and Addis, P.B.: Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *J.Agric.Food Chem.* **34**, 653-659 (1986).
9. Park, W.S. and Addis, P.B.: Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *J.Food Sci.* **51**, 1380-1381 (1986).

10. *Park, S.W. and Addis, P.B.*: Cholesterol oxidation products in some muscle foods. *J.Food Sci.* **52**, 1500-1503 (1987).
11. *Park, P.S.W. and Addis, P.B.*: Derivatization of 5 α -cholestane-3 β ,5,6 β -triol into trimethylsilyl ether sterol for GC analysis. *J.Am.Oil Chem.Soc.* **66**, 1632-1634 (1989).
12. *Sander, B.D., Smith, D.E. and Addis, P.B.*: Effects of processing stage and storage conditions on cholesterol oxidation products in butter and Cheddar cheese. *J.Dairy Sci.* **71**, 3173- 3178 (1988).
13. *Sander, B.D., Smith, D.E., Addis, P.B. and Park, S.W.*: Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products. *J.Food Sci.* **54**, 874- 879 (1989).
14. *Sander, B.D., Addis, P.B., Park, S.W. and Smith, D.E.*: Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. *J.Food Protect.* **52**, 109-114 (1989).
15. *Zhang, W.B., Addis, P.B. and Krick, T.P.*: Quantification of 5 α -cholestane-3 β ,5,6 β -triol and other cholesterol oxidation products in fast food French fried potatoes.*J.Food Sci.* **56**, 716-718 (1991).
16. *Emanuel, H.A., Hassel, C.A., Addis, P.B., Bergmann, S.D. and Zavoral, J.H.*: Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *J.Food Sci.* **56**, (3), 843-847 (1991).
17. *Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L.-A.*: Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: fresh eggs and dehydrated egg products. *J.Food Sci.* **52**, 57-67 (1987).
18. *Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L.-A.*: Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: milk powder products. *J.Food Sci.* **53**, 74-79 (1988).
19. *Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L.-A.*: Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: butter and cheese. *J.Am.Oil Chem.Soc.* **65**, 1635-1641 (1988).
20. *Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L.-A.*: Cholesterol oxides in Swedish food and food ingredients: lard and bacon. *J.Am.Oil Chem.Soc.* **66**, 586-592 (1989).
21. *Nourooz-Zadeh, J.*: Determination of the autoxidation products from free or total cholesterol: a new multistep enrichment methodology including the enzymatic release of esterified cholesterol. *J.Agric.Food Chem.* **38**, 1667-1673 (1990).
22. *Pie, J.E., Spahis, K. and Seillan, C.*: Evaluation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. *J.Agric.Food Chem.* **38**, 973-978 (1990).
23. *Pie, J.E., Spahis, K. and Seillan, C.*: Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *J.Agric.Food Chem.* **39**, 250-254 (1991).
24. *Osada, K., Kodama, T., Yamada, K. and Sugano, M.*: Oxidation of cholesterol by heating. *J.Agr.Food Chem.* **41**, 1198-1202 (1993).
25. *Pizzoferrato, L., Nicoli, S. and Lintas, C.*: GC-MS characterization and quantification of sterols and cholesterol oxidation products. *Chromatographia* **35**, 269-274 (1993).
26. *Chan, S.H., Gray, J.I., Goumea, E.A., Harte, B.R., Kelly, P.M. and Buckley, D.J.*: Cholesterol oxidation in whole milk powders as influenced by processing and packaging. *Food Chem.* **47**, 321-328 (1993).
27. *Fischer, K.-H., Laskawy, G. and Grosch, W.*: Quantitative Analyse von Autoxidationsprodukten des Cholesterols in tierischen Lebensmitteln. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* **181**, 14-19 (1985).
28. *Cleveland, M.E.Z. and Harris, N.D.*: Oxidation of cholesterol in commercially processed cow's milk. *J. Food Protect.* **50**, 867-871(1987).
29. *Maerker, G. and Unruh, J.Jr.*: Cholesterol oxides I. Isolation and determination of some cholesterol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 767-771 (1986).
30. *Maerker, G. and Bunick, F.J.*: Cholesterol oxides II. Measurement of 5,6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 771-777 (1986).
31. *Maerker, G. and Zulak, I.M.*: Cholesterol oxides III. Autoxidation of cholesterol in sodium stearate and sodium linoleate dispersions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 1499-1503 (1989).

32. *Maerker, G. and Jones, K.C.*: Unusual product ratios resulting from the gamma-irradiation of cholesterol in liposomes. *Lipids* **26** (2), 139-144 (1991).
33. *Zubillaga, M.P. and Maerker, G.*: Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. *J.Food Sci.* **56**, 1194-1196 (1991).
34. *Maerker, G. and Jones, K.C.*: Gamma-irradiation of individual cholesterol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69** (5), 451-455 (1992).
35. *Maerker, G. and Jones, K.C.*: A-ring oxidation products from γ -irradiation of cholesterol in liposomes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70** (3), 255-259 (1993).
36. *Hwang, K.T. and Maerker, G.*: Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. *J.Am.Oil Chem.Soc.* **70**, 371-375 (1993).
37. *Hwang, K.T. and Maerker, G.*: Determination of 6-ketcholestanol in unirradiated and irradiated chicken meats. *J.Am.Oil Chem.Soc.* **70**, 789-792 (1993).
38. *Sallin, C., Huggett, A.C., Bosset, J.O., Tabacchi, R. and Fay, L.B.*: Quantification of cholesterol oxides in milk powders using [$^2\text{H}_7$]cholesterol to monitor the cholesterol autoxidation artefacts. *J.Agric. Food Chem.* **43** (4), 935-941 (1995)

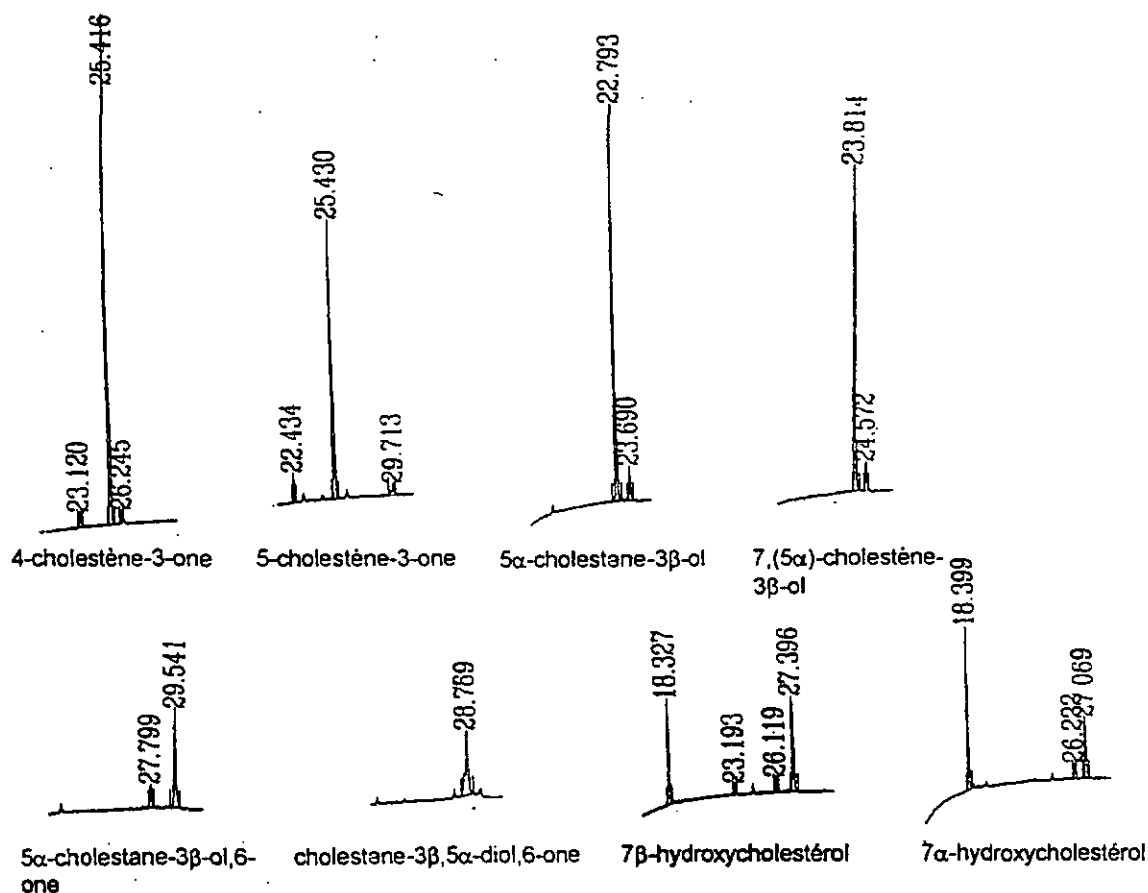
Annexes

A1. Séparation chromatographique des oxystérols par GC-FID en mode split, sans dérivation préalable.

Tableau regroupant les oxystérols stables (=1 pic) durant l'analyse:

Standards stables	Temps de rétention (min)
7-cétocholestérol	24,18
25-hydroxycholestérol	27,06
20 α -hydroxycholestérol	26,78
cholestane-3 β -ol,5 α 6 α -époxyde	25,96
cholestérol	22,50

Chromatogrammes des oxystérols instables durant l'analyse:



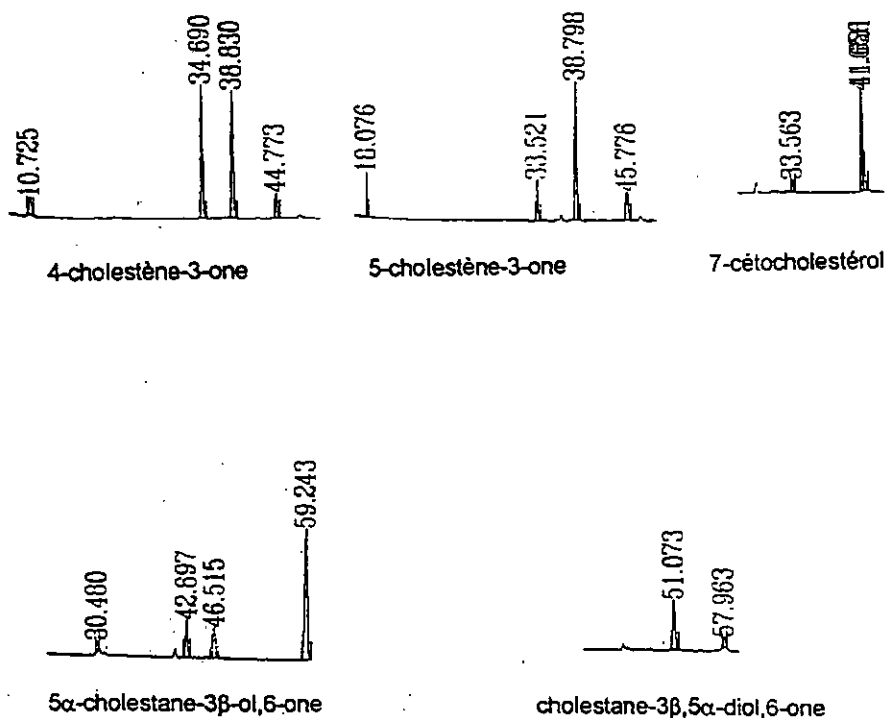
Le cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol ne sort pas de la colonne.

A2. Séparation chromatographique des oxystérols par GC-FID en mode split, après dérivation en triméthylsilyléthers.

Tableau regroupant les oxystérols stables (=1 pic) durant l'analyse:

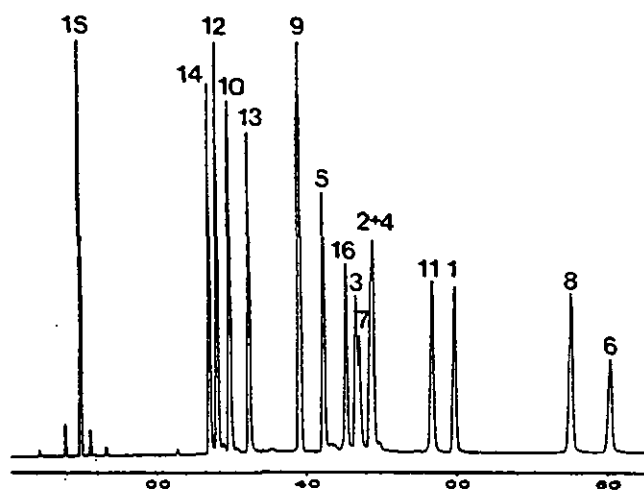
Dérivés stables	temps de rétention (min)
5 α -cholestane	20,34
cholestérol	33,60
25-hydroxycholestérol	56,79
7 β -hydroxycholestérol	38,92
cholestane-3 β -ol,5 α 6 α -époxyde	44,98
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	50,72
7 α -hydroxycholestérol	29,62
20 α -hydroxycholestérol	46,24
5 α -cholestane-3 β -ol	34,37
7,(5 α)-cholestène-3 β -ol	38,20

Chromatogrammes des dérivés instables lors de l'analyse (ou incomplètement dérivés):



B. Séparation chromatographique des oxystérols par GC-FID en mode on-column, sans dérivation préalable.

Chromatogramme d'un mélange de 16 oxystérols:



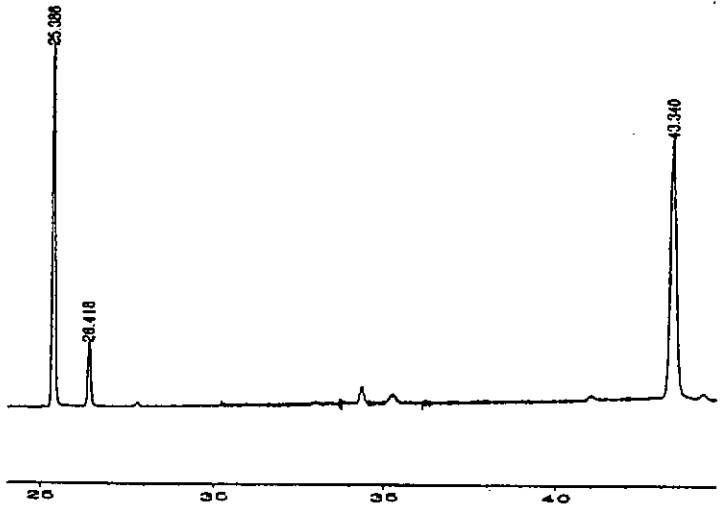
Légende du chromatogramme:

1	7-cétocholestérol	9	4-cholestène-3-one
2	25-hydroxycholestérol	10	5-cholestène-3-one
3	20 α -hydroxycholestérol	11	5 α -cholestane-3 β -ol,6-one
4	7 β -hydroxycholestérol	12	5 α -cholestane-3 β -ol
5	cholestane-3 β -ol,5 α 6 α -époxyde	13	7,(5 α)-cholestène-3 β -ol
6	cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	14	cholestérol
7	7 α -hydroxycholestérol	15	5 α -cholestane
8	cholestane-3 β ,5 α -diol,6-one	16	22-cétocholestérol

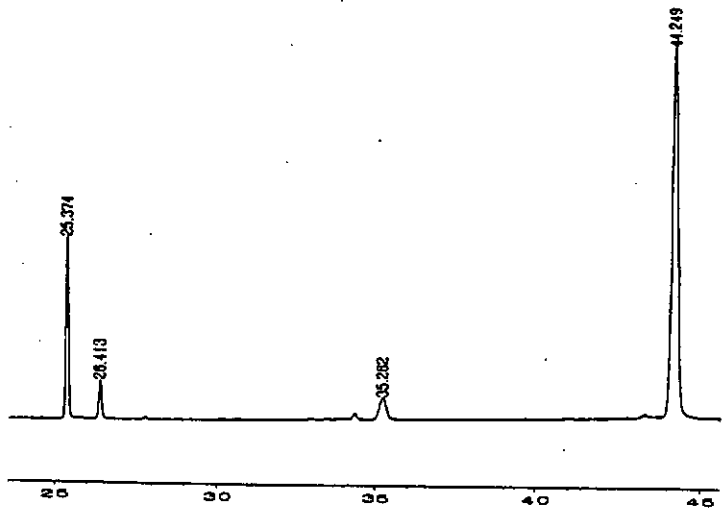
N.B.: L'identité des pics 4, 7, 10 a été établie sur la base des données de la littérature et sera ultérieurement confirmée par GC-MS.

Chromatogrammes des oxystérols instables durant l'analyse:

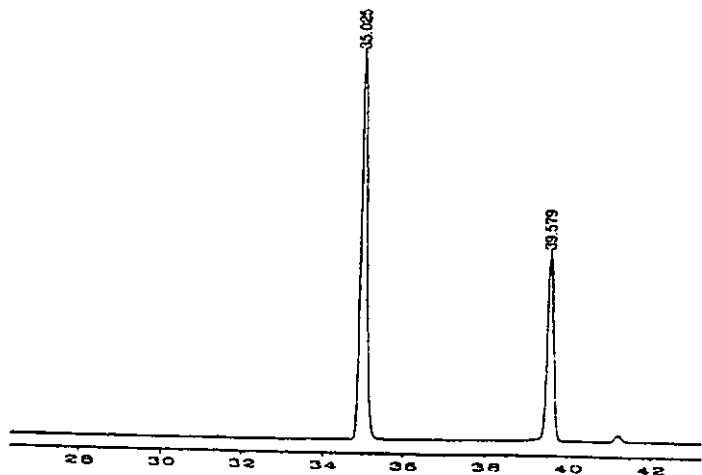
7 α -hydroxycholestérol



7 β -hydroxycholestérol



5-cholestène-3-one



3.4 Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [$^2\text{H}_7$]cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts

Christine Rose-Sallin, Jacques Olivier Bossat

Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne

Anthony C. Huggatt, Laurent B. Fay

Nestlé Research Centre, Vers-chez-les-Blanc

Raffaele Tabacchi

Institut de chimie, Université de Neuchâtel, Neuchâtel

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 935-941 (1995)

Cholesterol oxidation products (COPs) may produce adverse biological effects, and there is increasing concern regarding the potential health implications of these products in the diet. We have developed a GC/MS method allowing the quantification of COPs in commercially available milk powders and infant formulas. Since oxidation artifacts from cholesterol are essentially impossible to avoid, we have used a deuteriated cholesterol probe to precisely monitor the formation of cholesterol oxidative artifacts during all stages of sample analysis. This strategy allowed the determination of the artifact-free cholesterol oxide content of the samples. We found that freshly opened full cream powders which had been packed under inert gas contained only traces of COPs (<250 ng/g total). Infant formulas were also found to contain very low levels of COPs. Our values were considerably lower than those previously reported, especially for 7-ketocholesterol. This difference is at least in part explained by the correction of the oxidation artifacts applied to our samples. We conclude that the exposure to COPs from commercial milk powders and infant formulas, and consequently their potential health hazard, may have been previously overestimated.

Keywords: Milk powder; cholesterol; oxidation; artifacts; GC/MS

INTRODUCTION

Cholesterol, an unsaturated lipid, is readily susceptible to oxidation, leading to the formation of more than 30 different cholesterol oxidation products (COPs) (Smith, 1981). These products may be formed by enzymatic oxidation or autoxidation with ambient oxygen or by exposure to heat, light, or radiation (Smith, 1992). They have been detected in human plasma and in many foods of animal origin such as milk products, eggs, and meat. It has been reported that commonly used food processing and storage conditions enhance their formation (Addis and Park, 1992). For example, McCluskey and Devery (1993) recently reviewed the total levels of seven common COPs that have been reported for several cholesterol-rich foods following storage. Samples of freeze-dried chicken and beef contained 8–78 and 9–63 ppm of COPs, respectively, French fries 11–39 ppm, whole egg powder 29–211 ppm, cheddar cheese powder 6–57 ppm, canned baby foods 8–20 ppm, skim milk powder 19–61 ppm, and infant formula powders 42–86 ppm of total COPs.

There is growing interest and concern regarding the potential health implications of COPs in the diet. The effects in humans of chronic ingestion of normal dietary levels of these products are not known. However, there have been several studies performed either in animal models or in isolated cellular systems that have demonstrated the potential of these components to produce adverse effects. Several studies have implicated COPs, in particular 25-hydroxycholesterol and cholestanetriol

rather than their precursor cholesterol, as a cause of atherosclerotic lesions (Imai et al., 1976; Taylor et al., 1979). α -Epoxycholesterol has been reported to be mutagenic and cytotoxic in vitro (Sevenian and Peterson, 1984; 1986) and has been detected in UV-induced skin tumors in experimental animals (Black, 1980). COPs may also exert biological effects by their influence on cell membranes (Peng and Morin, 1987) and on cellular lipid metabolism (Erickson et al., 1978).

During the past decade numerous papers have been published concerning the determination of cholesterol oxides in food products. A wide variety of different methodologies have been used, and there have been large discrepancies in the results reported. This issue presently gives rise to controversy, and the precise quantification of the COPs remains a challenging task, especially in foods containing low levels of these compounds (McCluskey and Devery, 1993). Although HPLC with UV detection has been widely used to monitor COPs in food or biological samples (Ansari and Smith, 1979; Csiky, 1982; Sallin et al., 1993a), certain COPs, such as cholestanetriol, are not detectable with this technique. The utilization of capillary GC is the current method of choice for the separation and quantification of COPs and is a particularly powerful technique when combined with GC/MS for simultaneous confirmation of their identity (Park and Addis, 1985).

The critical step in the analysis of COPs is the cleanup procedure, which should be designed to minimize the generation of artifacts. The formation of COPs by autoxidation of cholesterol and their subsequent instability require a very mild analytical methodology. The presence of air, light, peroxides in solvents, or heat treatment during the cleanup procedure can promote their formation. The activity of some of adsorbing agents such as silica gel is another possible reason for

* Author to whom correspondence should be addressed.

† Federal Dairy Research Institute.

‡ Nestec Ltd.

§ Université de Neuchâtel.

artifact formation (Claude and Beaumont, 1966; Horvath, 1966) due to the interaction of cholesterol with silicic acid in the presence of air. Moreover, the pH of the media can influence the stability of several COPs (Kim and Nawar, 1993), in particular 7-ketocholesterol, which is very sensitive to hydrolysis in hot alkaline media (Bergström and Wintersteiner, 1941; Chicoye et al., 1968).

Validation of the analysis of COPs is crucial since any deviation from the procedure such as increases in temperature, light, and oxygen availability may lead to variations in artifact formation. Since oxidation artifacts are essentially impossible to avoid and reproducibly control, we have used a deuteriated cholesterol probe to precisely monitor the formation of cholesterol oxidative artifacts during all stages of sample analysis (Kudo et al., 1989; Wasilchuk et al., 1992). In this strategy, deuterium-labeled cholesterol is added to the samples in an amount equivalent to the endogenous cholesterol present, and thereafter individual COPs (deuterium-labeled and unlabeled) are extracted and quantified using GC/MS. The extent of oxidation occurring during the cleanup procedures can be easily determined from the deuteriated cholesterol oxides formed. Subtraction of labeled COPs from the unlabeled COPs then allows the determination of the artifact-free cholesterol oxide content of the samples. We have applied this strategy to the analysis of COPs in commercially available milk powders and infant formulas.

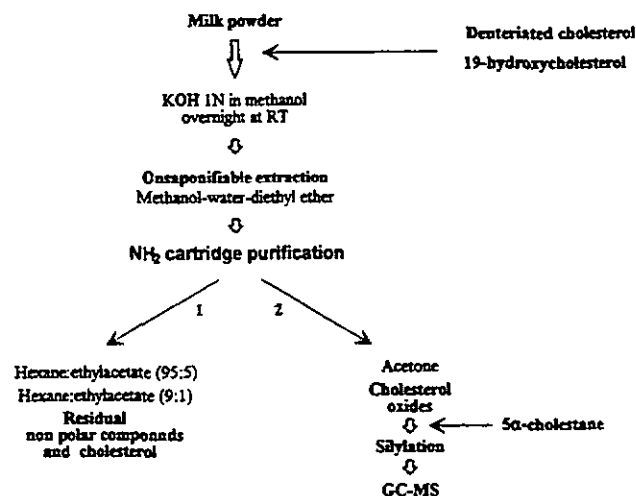
EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and Chemicals. 5-Cholesten-3 β -ol (cholesterol), 5 α -cholestane, 5 β -cholestan-3 α -ol (epicoprostanol), 5-cholestene-3 β ,19-diol (19-hydroxycholesterol), and α -epoxycholesterol were obtained from Sigma (St. Louis, MO). 7-Oxo-5-cholesten-3 β -ol (7-ketocholesterol) was purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI), and 5-cholestene-3 β ,25-diol (25-hydroxycholesterol), 5-cholestene-3 β ,7 α -diol (7 α -hydroxycholesterol), 5-cholestene-3 β ,7 β -diol (7 β -hydroxycholesterol), cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol, 5-cholestene-3 β ,20 α -diol (20 α -hydroxycholesterol) were from Steraloids Inc. (Wilton, NH). [25,26,26,26,27,27,27- 2 H $_7$]Cholesterol was obtained from Dr. Glaser AG (Basel, Switzerland). The silylating agents *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), trimethylchlorosilane (TMCS), *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), and *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) were from Fluka (Buchs, Switzerland). Pro analysis-grade solvents such as acetone, ethyl acetate, diethyl ether [deperoxidized with Molecular Sieve Deperox from Fluka according to the procedure of Burfield (1982)], methanol, pyridine, tetrahydrofuran, toluene, methylene chloride, and LiChrosolv-grade solvents such as *n*-hexane and water were purchased from Merck (Dietikon, Switzerland). Supelclean aminopropyl phase cartridges were from Supelco (Gland, Switzerland).

Samples. Four instant full cream powdered milks prepared using the same spray-drying conditions and obtained directly from the manufactures (samples A–D, 280 mg of fat/g of milk powder) and three infant formula powders purchased locally (samples E and F, 260 mg of fat/g of infant formula; sample G, 250 mg of fat/g of infant formula) were analyzed. All samples were vacuum-packed under an inert gas except for sample C, which contained 21% oxygen.

Quantification of Cholesterol in Milk Powders. One milligram of epicoprostanol (internal standard) in 10 mL of cyclohexane was added to 1 g of milk powder and 1 g of sea sand. Direct saponification of the milk powder was performed by adding 10 mL of ethanolic 1 N KOH and refluxing for 15 min at 80 °C. After the mixture cooled to room temperature, 10 mL of aqueous 1 N KOH was added, and the mixture was stirred for 15 min. The saponified mixture was then transferred into a glass tube sealed with a Teflon-coated cap and centrifuged at 2000 rpm for 15 min. A 100 mL aliquot of the

Scheme 1



organic phase containing cholesterol and epicoprostanol was withdrawn, derivatized to trimethylsilyl ethers, and analyzed by GC/FID (Dieffenbacher et al., 1994).

Extraction of COPs from Milk Powder. The extraction procedure is summarized in Scheme 1. Prior to saponification, [2 H $_7$]cholesterol (in an equimolar amount to the cholesterol present in the sample as previously determined) and 500 ng of 19-hydroxycholesterol (internal standard) were added to 1 g of milk powder in a glass tube sealed with a Teflon-coated cap. Direct saponification was performed according to the method of Park and Addis (1986a) by adding 10 mL of methanolic 1 N KOH to the milk powder and stirring the mixture overnight in the dark at room temperature. Thereafter, 10 mL of LiChrosolv-grade water was added, and the unsaponifiable fraction was extracted three times with 15 mL of deperoxidized diethyl ether. The pooled diethyl ether extracts were washed once with 20 mL of 0.5 N aqueous KOH and three times with 20 mL of aqueous 0.47 N Na $_2$ SO $_4$ and then dried with anhydrous Na $_2$ SO $_4$. The dried extract was evaporated to dryness, and the residue was redissolved in 1 mL of hexane/ethyl acetate (95:5 v/v) prior to application onto an aminopropyl phase cartridge (previously activated with 3 mL of hexane). The residual nonpolar compounds together with the cholesterol were eluted with 6 mL of hexane/ethyl acetate (95:5 v/v) and 10 mL of hexane/ethyl acetate (9:1 v/v). The COPs fraction was eluted with 10 mL of acetone and evaporated under a stream of nitrogen. The COPs were then converted to trimethylsilyl ethers by addition of 100 mL of BSTFA, 20 mL of dried pyridine, and 2 mL of TMCS. Silylation was performed overnight at room temperature. The extract was dried under a stream of nitrogen and redissolved in 100 mL of hexane/BSA (10:1 v/v).

Thin Layer Chromatography. A control of the fractions eluted from the aminopropyl phase cartridges was performed using TLC (Sallin et al., 1993b). Kieselgel F $_{254}$ plates 20 \times 20 cm, 0.2 mm thickness, from Merck (Dietikon, Switzerland), were developed with methylene chloride/toluene/acetone (2:1:1 v/v). The COPs were revealed by their UV absorption at 254 nm or by spraying with a 50% aqueous solution of H $_2$ SO $_4$ followed by heating for 10 min at 120 °C.

Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Full scan spectra were obtained using an HP-5988 mass spectrometer connected to an HP-5890 gas chromatograph equipped with an HP-7673 autosampler (Hewlett-Packard, Geneva, Switzerland). The quantification experiments were carried out using an HP-5890 gas chromatograph equipped with an HP-7673 autosampler, a Finnigan TSQ 700 mass spectrometer, and an ICIS II data system (Finnigan, Bremen, Germany). The GC/MS conditions were as follows: DB-1 J&W fused-silica capillary column (30 m \times 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 mm); carrier gas, helium at 69 kPa; splitless injection at 280 °C. The oven temperature program was as follows: 50 °C (1 min), increased at 30 °C/min to 200 °C and then at 5 °C/min to 300 °C (2 min); interface temperature, 280 °C. The mass

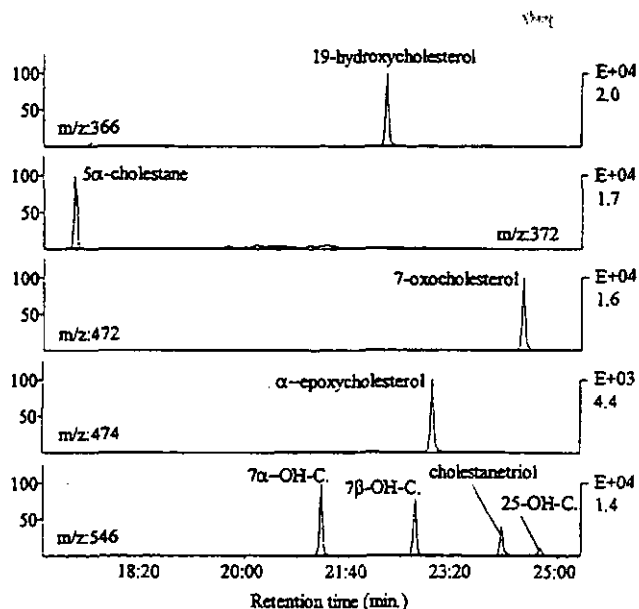


Figure 1. GC/MS traces of the standard cholesterol oxides. The compounds are chromatographed on an apolar capillary column and detected by selective ion monitoring mass spectrometry after electron impact ionization.

spectrometers were operated under electron ionization conditions with an electron energy of 70 eV and an ion source temperature of 180 °C. For quantification the ions of interest were acquired by selected ion monitoring at unit resolution.

Formation of COPs in Infant Formula Powders. The formation of COPs was examined in the three infant formula samples used under simulated normal household conditions. Samples E and G were packed in bags, while sample F was a canned product. On day 0 the packages were opened and the basal levels of COPs were analyzed as above. About 15–20 g of formula was removed each day using the spatulas provided, and the packets were subsequently closed and stored at room temperature. In the case of samples E and F, the tops of each bag were folded and closed with a clothes-peg. Further analyses of COPs content were performed at regular intervals over 3 weeks.

RESULTS AND DISCUSSION

GC/MS Analysis of Cholesterol Oxides. Overnight derivatization at room temperature allowed the quantitative silylation of the cholesterol oxides of interest without formation of byproducts. The trimethylsilyl derivatives obtained were well resolved on an apolar methylsilicone capillary column (Figure 1). Mass spectrometric detection of the compounds was achieved after electron impact ionization. The major ions obtained for each compound are summarized in Table 1. Each of these ions has been previously described (Park and Addis, 1992). All of the hydroxyl groups of the hydroxycholesterol isomers were silylated, and in the case of 7-ketocholesterol the keto group remained unchanged. The derivative of cholestanetriol was identified as the bis(trimethylsilyl) ether (Park and Addis, 1989). 20α-Hydroxycholesterol was not quantitatively silylated and produced two derivatives, which were identified as 3β,20α-bis[(trimethylsilyl)oxy]-cholest-5-ene (20α-hydroxycholesterol diTMS, first peak) and 3β-[(trimethylsilyl)oxy]-20α-hydroxy-cholest-5-ene (20α-hydroxycholesterol monoTMS, second peak). For this reason 20α-hydroxycholesterol was not quantified in milk powders. All of these identifications were confirmed using positive chemical ionization mass spectrometry with ammonia as reagent gas.

The quantification of the COPs in the samples was achieved by monitoring the molecular ion of each

compound except for cholestan-3β,5α,6β-triol and 19-hydroxycholesterol, for which the fragments $[M - H_2O]^+$ and $[M - (2 \times 90)]^+$, respectively, were acquired. The deuteriated cholesterol oxides were monitored at 7 mass units higher than for the corresponding unlabeled compounds except for 25-hydroxycholesterol, for which the shift was only 6 mass units ($[^2H_6]$ -25-hydroxycholesterol). The quantitation of the COPs using 19-hydroxycholesterol as internal standard (Pie et al., 1990) was linear over a range from 20 pg to 20 ng (pure compounds injected).

Purification of Cholesterol Oxides from Milk Powders. In milk powder, sterols constitute a minor part of the total lipid extract and cholesterol oxides are present mainly in the free form (Nourooz-Zadeh and Appelqvist, 1988). Triglycerides and phospholipids were removed from the lipids by a cold saponification applied directly to the milk powder. A lipid extraction was not performed prior to the saponification as this did not improve the purity of the final extract. The mild conditions employed for the saponification minimized artifact formation and the decomposition of the COPs, especially the 7-ketocholesterol (Park and Addis, 1986b). After diethyl ether extraction, the cholesterol oxides were purified using a solid phase aminopropyl extraction cartridge which allows the removal of cholesterol and nonpolar compounds (see Figure 2).

Determination of Cholesterol Oxide Artifacts in Milk Powders. Figure 3 presents a typical chromatogram obtained from a milk powder extract showing the simultaneous detection of cholesterol oxides and the corresponding deuteriated analogues. Each compound is quantified using the internal standard, and the amount of the endogenous COPs present in the milk sample is calculated by subtracting the amount of deuteriated COPs from the unlabeled compounds. The general formula for this calculation is

$$X = U - (LC_d/C_d)$$

where X is the amount of cholesterol oxide in the milk powder, U is the sample amount of the unlabeled cholesterol oxide, L is the sample amount of the deuteriated cholesterol oxide, C_u is the sample amount of endogenous unlabeled cholesterol, and C_d is the amount of deuteriated cholesterol added to the sample.

This calculation is based on the fact that no interferences were found between the deuteriated and the corresponding unlabeled oxides as presented in Figure 4, which shows the mass spectra of labeled and unlabeled 7-ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol.

Table 2 gives an average of the levels of cholesterol oxides formed artifactually in the milk powders analyzed following our method. It highlights the importance of the correction of the cholesterol autoxidation during the purification procedure. During our mild purification procedure about 2% of cholesterol is autoxidized. This value shows the necessity to take into account the cholesterol autoxidation artifacts for the accurate determination of the extent of the oxidation of cholesterol in food products (Walsilchuk et al., 1992). However, such a correction introduces a large source of variation in the final value of the cholesterol oxide level, especially when low amounts of COPs are measured (see also Table 4).

Validation of the Method. The recovery of the method was checked using a solution of pure cholesterol oxides and also using milk powders spiked with COPs. The results of the recoveries of the individual COPs

Table 1. Characteristic Ions in the Electron Impact Mass Spectra of the TMS Derivatives of the Cholesterol Oxides of Interest^a

cholesterol oxide	M ⁺	[M - CH ₃] ⁺	[M - 90] ⁺	other ions
5 α -cholestane	372 (29)	357 (25)		262 (8); 218 (55); 217 (100)
7 α -hydroxycholesterol	546 (4)	531 (2)	456 (100)	129 (7)
7 β -hydroxycholesterol	546 (4)	531 (2)	456 (100)	129 (6)
α -epoxycholesterol	474 (100)	459 (17)	384 (54)	446 (5); 369 (10); 366 (33)
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	564 (<1)	531 (11)		546 (47); 456 (67); 403 (100); 321 (47); 129 (59)
25-hydroxycholesterol	546 (2)		456 (3)	271 (7); 131 (100); 129 (14)
7-ketocholesterol	472 (100)	457 (12)	382 (22)	455 (11); 367 (43); 129 (82)
19-hydroxycholesterol		531 (<1)	456 (11)	366 (67); 353 (100)

^a 5 α -Cholestane and 19-hydroxycholesterol are, respectively, external and internal standards for the quantification.

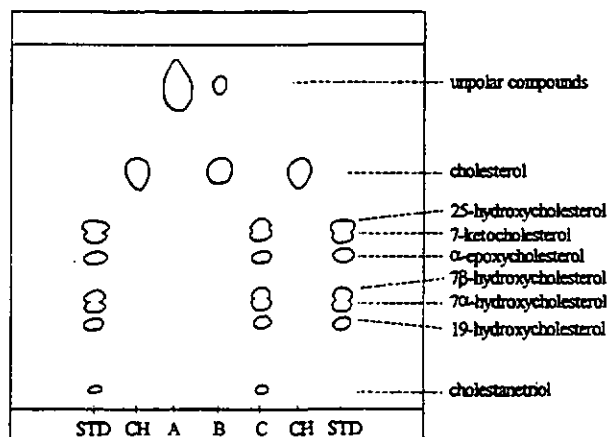


Figure 2. TLC separation of a milk powder extract purified with an amino phase extraction cartridge. (STD) standard solution of COPs; (CH) standard solution of cholesterol; (A) nonpolar fraction eluted with hexane/ethyl acetate (95:5 v/v); (B) cholesterol-containing nonpolar fraction eluted with hexane/ethyl acetate (9:1 v/v); (C) COPs eluted with acetone.

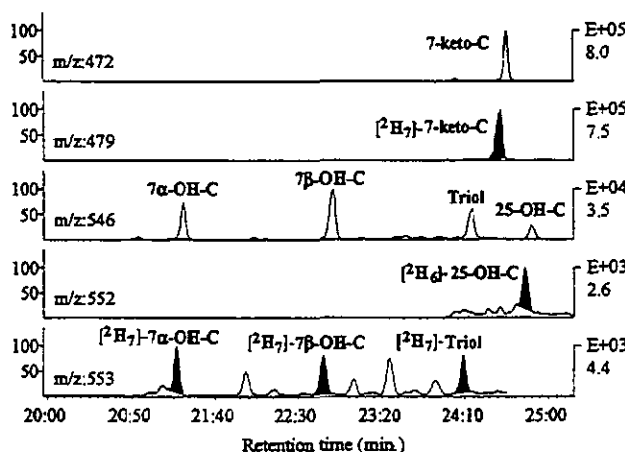


Figure 3. Typical GC/MS traces obtained from a milk powder extract. The COPs and their deuteriated analogs are simultaneously monitored and quantified using 19-hydroxycholesterol as internal standard.

following workup through the complete procedure are given in Table 3. The recoveries of the different COPs from a standard solution containing 500 ng of each ranged from 80 to 99%. 7-Ketocholesterol, which has been reported to be easily decomposed during cleanup (Van de Bovenkamp et al., 1988), is quantitatively purified using our mild sample preparation conditions. The recovery of spiked COPs from the milk powders was examined over the concentration range 200–1000 ng/g. At a concentration of 200 ng/g the compounds are difficult to quantitatively purify (recoveries from 52 to 88%). At concentrations of 500 and 1000 ng/g acceptable recoveries for each of the COPs investigated were obtained. α -Epoxycholesterol was not accurately puri-

fied using our method and therefore was not quantified in the milk powder samples.

The repeatability of the method is given in Table 4. These results were obtained after quantification of pure standards that were silylated and also following analysis of fresh and old abused milk powders containing low and relatively high levels, respectively, of cholesterol oxides. Large coefficients of variation were observed, particularly with the milk powder containing low amounts of cholesterol oxides. This may at least in part be due to decomposition of the compounds during the injection step, which was performed in splitless mode at an elevated temperature (Van de Bovenkamp et al., 1988). Another explanation could be found in the closeness of the level of COPs found in the milk powders with the limit of detection of the method (see Table 4).

Determination of Cholesterol Oxides in Milk Powders. The results (Table 5) demonstrate that the commercial milk powders and infant formulas analyzed contain very low levels of COPs. The major COPs found in these samples were 7 α -hydroxycholesterol and 7 β -hydroxycholesterol. Although 7-ketocholesterol was the major oxidized compound detected before artifact correction, essentially all of this was due to oxidation of cholesterol during sample cleanup (about 1.5 mg of 7-ketocholesterol/g of cholesterol).

The freshly opened full cream powders that had been packed under inert gas (samples A and B) contained only traces of COPs (<250 ng/g of powder), even after storage of the unopened cans for 1 year (sample B). However, the level of COPs was substantially greater in the full cream powder which had been opened 1 year previously (sample D) and also in the freshly opened can (sample C), which was not vacuum-packed under an inert gas. These values are comparable to the results obtained by Nourooz-Zadeh and Appelqvist (1988), who demonstrated that fresh milk powders produced by low or medium heat spray-drying contain very low amounts of COPs. These authors reported from undetectable amounts to 0.7 mg/g of total COPs in nine different milk powders. Moreover, their COP values obtained for milk stored in paper cans during 1 year (1.8–3.5 mg/g of milk powder) are also in good agreement with our results (samples C and D containing, respectively, 1.9 and 1.5 mg/g of milk powder).

Two of the freshly opened infant formulas (samples E and F) contained small amounts of COPs (<350 ng/g). In contrast, the third infant formula (sample G) tested contained about 1200 ng/g of total COPs. Since the cholesterol content of these infant formulas is low, the extent of cholesterol oxidation in sample G (0.52%) is higher than that occurring in all of the full cream milk powders tested when expressed as a percentage of total cholesterol content. Nevertheless, the levels of COPs measured in the infant formulas are considerably lower than the values previously reported by Sander et

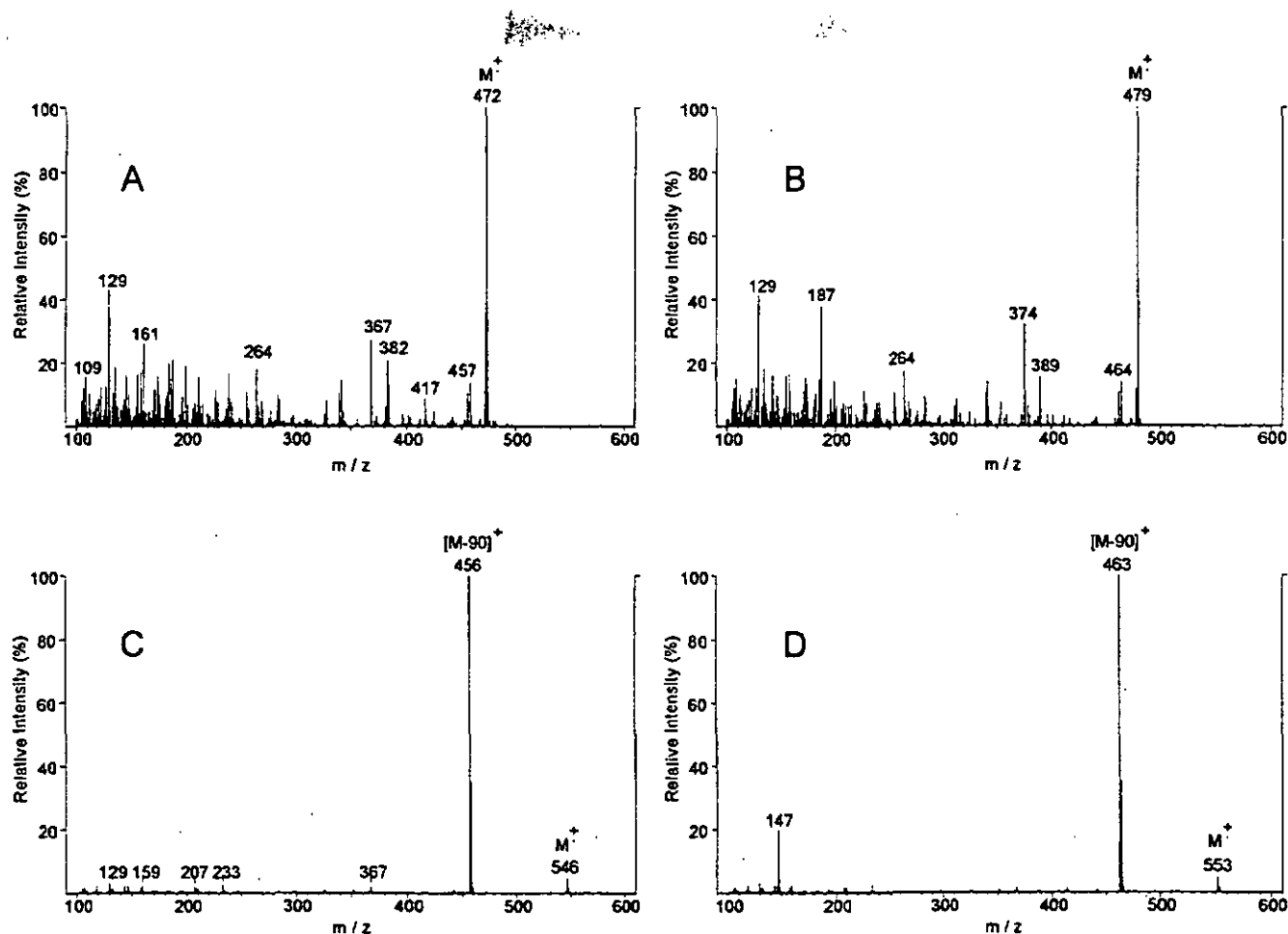


Figure 4. Mass spectra of the TMS derivatives of 7-ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol and their corresponding deuteriated analogues identified in the milk powders after the purification procedure: (A) electron impact (EI) mass spectrum of 7-ketocholesterol; (B) EI mass spectrum of [25,26,26,26,27,27,27- $^2\text{H}_7$]-7-ketocholesterol; (C) EI mass spectrum of 7 β -hydroxycholesterol; (D) EI mass spectrum of [25,26,26,26,27,27,27- $^2\text{H}_7$]-7 β -hydroxycholesterol.

Table 2. Determination of the Labeled Cholesterol Oxides Formed during the Purification Procedure^a

labeled cholesterol oxide	ng/g of milk powder
7 α -hydroxycholesterol	<10
7 β -hydroxycholesterol	80 \pm 30
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	10 \pm 5
7-ketocholesterol	1490 \pm 380
25-hydroxycholesterol	340 \pm 140
total COPs	1920

^a The results are the mean of 20 determinations and are expressed in ng/g of milk powder. The analyzed milk powder contains 1 mg of cholesterol/g of milk powder.

Table 3. Recovery of Cholesterol Oxides from a Mixture of Pure Compounds and from Milk Powders^a

COP	mean percentage recovery			
	standard compounds 500 ng each	added to milk powders		
		200 ng/g	500 ng/g	1000 ng/g
7 α -hydroxycholesterol	95	59	72	124
7 β -hydroxycholesterol	97	71	96	80
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	80	52	103	95
7-ketocholesterol	99	88	108	83
25-hydroxycholesterol	98	60	96	86

^a A mixture of pure compounds and three samples of milk powders spiked with 200, 500, and 1000 ng/g of milk powder for each cholesterol oxide were analyzed. The results are the mean of three determinations and are expressed as percentages.

al. (1989), especially for 7-ketocholesterol. This discrepancy could be at least in part explained by the correction of the oxidation artifacts applied to our samples. In addition, the COPs reported by these

Table 4. Repeatability of the Cholesterol Oxide Quantification from a Mixture of Pure Compounds and from Milk Powders^a

COP	coefficient of variation (%)			
	pure compounds		milk powders	
	100 pg each	50 ng each	fresh ^b	old ^c
7 α -hydroxycholesterol	11	4	26	6
7 β -hydroxycholesterol	13	3	27	7
cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	22	4	34	23
7-ketocholesterol	4	3	21	17
25-hydroxycholesterol	9	7	24	25

^a Pure compounds and two samples of milk powders were analyzed. The coefficients of variation were calculated from three determinations (interassay CVs) and are expressed as percentages.

^b Fresh milk powder containing a total amount of 1100 ng/g of cholesterol oxides before subtraction of the deuteriated oxides. ^c Old milk powder containing a total amount of 4100 ng/g of cholesterol oxides before subtraction of the deuteriated oxides.

authors could not be unambiguously identified and it is likely that the elevated levels are also due to cochromatographing components.

The formation of COPs in infant formulas used and stored in conditions simulating normal household use is summarized in Figure 5. The level of COPs increased during the daily utilization of the formulas. Although there was little cholesterol oxidation during the first 10 days of use, thereafter the level of total COPs increased, particularly in samples E and G. It should be noted that in normal household use infant formula powder is usually used up within about 10 days of opening the packet. The formation of COPs in these infant formulas

Table 5. Concentration of Cholesterol Oxides in Milk Powders and Infant Formulas Stored under Different Conditions^a

sample	storage time, opening date	cholesterol (mg/g of milk powder) and its oxides (ng/g of milk powder)					total COPs	total COPs/cholesterol (%)	
		cholesterol	7-keto	7 α -hydroxy	7 β -hydroxy	cholestanetriol			
full cream									
powder A	3 months old, freshly opened	0.94	<100 ^b	81 \pm 18	32 \pm 25	10 \pm 12	132 \pm 108	255	0.03
powder B	1 year old, freshly opened	0.79	<100	135 \pm 19	107 \pm 18	<10	<100	242	0.03
powder C	1 year old, freshly opened	0.73	<100	674 \pm 48	1158 \pm 49	63 \pm 12	<100	1895	0.26
powder D	1 year old, 1 year opened	0.89	<100	587 \pm 41	879 \pm 80	24 \pm 14	<100	1490	0.17
infant formula									
E	freshly opened	0.65	<100	214 \pm 56	130 \pm 41	<10	<100	344	0.05
F	1 year old, freshly opened	0.75	<100	94 \pm 6	61 \pm 4	<10	<100	155	0.02
G	freshly opened	0.24	296 \pm 47	317 \pm 12	628 \pm 38	<10	<100	1244	0.52

^a Each value represents the mean of three determinations and is expressed in ng/g of milk powder. The values for cholesterol are expressed in mg/g of milk powder. ^b Below the detection limit of the method, which is 100 ng/g of milk powder for 7-ketocholesterol, α -epoxycholesterol, and 25-hydroxycholesterol and 10 ng/g of milk powder for cholestanetriol and 7 α - and 7 β -hydroxycholesterol.

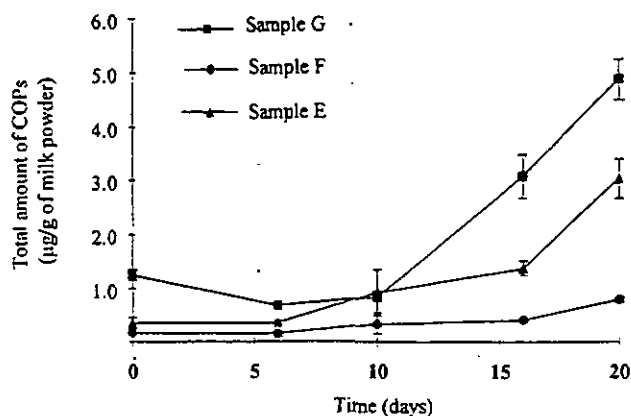


Figure 5. Formation of COPs in milk infant formulas used in conditions corresponding to those normally applied at home (room temperature and opened packages). The samples were opened (day 0), and then aliquots of powder were taken up and analyzed after 6, 10, 16, and 20 days. The results represent the total amount of COPs and are the mean of three determinations.

seems to be accelerated in comparison with the 1 year old milk powder (sample D opened for 1 year and containing 1490 ng/g of COPs). This may be related to the presence of unsaturated fats (Osada et al., 1993) and/or iron in the infant formula preparations. The reasons for the varying amounts of COPs formed in the different formulas cannot be determined from this very limited study. The major difference between samples E and F is that sample E, which was more sensitive to oxidation, is packed in aluminum foil bags, while sample F is packed in cans. These preliminary studies demonstrate the need for further investigations into the formation of COPs in infant formulas.

Conclusion. Previous reports of high levels (6–211 ppm) of COPs measured in different foodstuffs together with the observation that these oxidation products are likely to be absorbed from the gastrointestinal tract have led to concern regarding the potential health effects of cholesterol oxides (McCluskey and Devrey, 1993). However, COPs are also produced endogenously in the body through oxidation of cholesterol during normal metabolism and also as a result of oxidant stress (Smith and Johnson, 1989). The relative importance of dietary COPs versus endogenously formed COPs has not been established and requires further investigation so that the potential health impact of COPs in foodstuffs can be evaluated. Nevertheless, our results demonstrate that exposure to COPs from commercial milk powders and infant formulas is unlikely to represent an important source of COPs. Thus, the potential health hazard of COPs in milk powders and infant

formulas needs to be reassessed in light of the present data, since it is likely that the risk/exposure data may have been previously overestimated.

ACKNOWLEDGMENT

C.R.S. is the recipient of grants from the *Candia* Institute (Centre de Recherche International André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France), from the Fédération des Coopératives Migros (Zurich, Switzerland), and from Crema (Fribourg, Switzerland). We thank Drs. R. Sieber and A. Dieffenbacher for helpful discussions and S. Marti for technical assistance.

LITERATURE CITED

- Addis, P. B.; Park, P. S. W. Cholesterol oxide content of foods. In *Biological effects of cholesterol oxides*; Peng, S. K., Morin, J. R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1992, p 71–88.
- Ansari, G. A. S.; Smith, L. L. High-performance liquid chromatography of cholesterol autoxidation products. *J. Chromatogr.* 1979, **175**, 307–315.
- Bergström, S.; Wintersteiner, O. Autoxidation of colloidal aqueous solution. The nature of the products formed from cholesterol. *J. Biol. Chem.* 1941, **141**, 597–610.
- Black, H. S. Analysis and physiologic significance of cholesterol epoxide in animal tissues. *Lipids* 1980, **15**, 705–709.
- Burfield, D. R. Deperoxidation of ethers. A novel application of self-indicating molecular sieves. *J. Org. Chem.* 1982, **47**, 3821–3824.
- Chicoye, E.; Powrie, W. D.; Fennema, O. Isolation and characterization of cholesterol-5 β ,6 β -oxide from an aerated aqueous dispersion of cholesterol. *Lipids* 1968, **3**, 335–339.
- Claude, J. R.; Beaumont, J. L. In vitro transformations of cholesterol: their importance during chromatographic analyses. *J. Chromatogr.* 1966, **21**, 189–201.
- Csiky, I. Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by adsorption high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1982, **241**, 381–389.
- Dieffenbacher, A.; Golay, P. A.; Fay, L. B. Comments on the application of the official methods of the German Food Regulation Law for the determination of cholesterol in egg substitutes. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 1994, **90** (3), 74–77.
- Erickson, S. K.; Matsui, S. M.; Shrewsbury, M. A.; Cooper, A. D.; Gould, R. G. Effects of 25-hydroxycholesterol on rat hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in vivo, in perfused liver, and in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1978, **253**, 4159–4164.
- Horvath, C. Quantitative determination of cholesterol in autoxidation mixtures by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 1966, **22**, 52–59.
- Imai, H.; Werthessen, N. T.; Taylor, B.; Lee, K. T. Angiotoxicity and arteriosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. *Arch. Pathol. Med.* 1976, **100**, 565–572.
- Kim, S. K.; Nawar, W. W. Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids* 1993, **28**, 917–922.

- Kudo, K.; Emmons, G. T.; Casserly, E. W.; Via, D. P.; Smith, L. C.; Pyrek, J. St.; Schroepfer, G. J. Inhibitors of sterol synthesis. Chromatography of acetate derivatives of oxygenated sterols. *J. Lipid Res.* 1989, 30, 1097-1111.
- McCluskey, S.; Devery, R. Validation of chromatographic analysis of cholesterol oxides in dried foods. *Trends Food Sci. Technol.* 1993, 4, 175-178.
- Nourooz-Zadeh, J.; Appelqvist, L. A. Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: milk powder products. *J. Food Sci.* 1988, 53, 74-87.
- Osada, K.; Kodama, T.; Cui, L.; Yamada, K.; Sugano, M. Levels and formation of oxidized cholesterol in processed marine foods. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1893-1898.
- Park, P. S. W.; Addis, P. B. Capillary column gas-liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. *Anal. Biochem.* 1985, 149, 275-283.
- Park, P. S. W.; Addis, P. B. Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *J. Food Sci.* 1986a, 51, 1380-1381.
- Park, P. S. W.; Addis, P. B. Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *J. Agric. Food Chem.* 1986b, 34, 653-659.
- Park, P. S. W.; Addis, P. B. Derivatization of 5 α -cholestane-3 β ,5,6 β -triol into trimethylsilyl ether sterol for GC analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1989, 66, 1632-1634.
- Park, P. S. W.; Addis, P. B. Methods of analysis of cholesterol oxides. In *Biological effects of cholesterol oxides*; Peng, S. K., Morin, J. R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1992; pp 33-70.
- Peng, S. K.; Morin, R. J. Effects on membrane function by cholesterol oxidation derivatives in cultured aortic smooth muscle cells. *Artery* 1987, 14, 85-89.
- Pie, J. E.; Spahis, K.; Seillan, C. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 973-979.
- Sallin, C.; Baumann, E.; Bütikofer, U.; Sieber, R.; Bosset, J. O. Oxidized cholesterol determinations in milk and dairy products. Part 1. Possibilities and limitations of reversed-phase HPLC techniques. *Trav. Chim. Aliment. Hyg.* 1993a, 84, 141-157.
- Sallin, C.; Sieber, R.; Bosset, J. O.; Tabacchi, R. Oxidized cholesterol determination in milk and milk products. Part 2. Possibilities and limits of TLC. *Trav. Chim. Aliment. Hyg.* 1993b, 84, 566-580.
- Sander, B. D.; Addis, P. B.; Park, S. W.; Smith, D. E. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. *J. Food Prot.* 1989, 52, 109-114.
- Sevenian, A.; Peterson, A. R. Cholesterol epoxide is a direct-acting mutagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1984, 81, 4198-4202.
- Sevenian, A.; Peterson, A. R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxicol.* 1986, 24, 1103-1110.
- Smith, L. L. *Cholesterol Autoxidation*; Plenum Press: New York, 1981.
- Smith, L. L. The oxidation of cholesterol. In *Biological effects of cholesterol oxides*; Peng, S. K., Morin, J. R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1992; pp 7-31.
- Smith, L. L.; Johnson, B. H. Biological activities of oxysterols. *Free Radical Biol. Med.* 1989, 7, 285-332.
- Taylor, B.; Peng, S. K.; Werthessen, N. T.; Tham, P.; Lee, K. T. Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 1979, 32, 40-57.
- Van de Bovenkamp, P.; Kosmeijer-Schuil, T. G.; Katan, M. B. Quantification of oxysterols in Dutch foods: egg products and mixed diets. *Lipids* 1988, 23, 1079-1085.
- Wasilchuk, B. A.; Le Quesne, P. W.; Vouros, P. Monitoring cholesterol autoxidation processes using multideuterated cholesterol. *Anal. Chem.* 1992, 64, 1077-1087.

Received for review August 16, 1994. Revised manuscript received December 21, 1994. Accepted January 31, 1995.*

JF9404758

* Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, March 15, 1995.

3.5 Validation d'une méthode d'analyse permettant le dosage en parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation dans les denrées alimentaires.

Christine Rose-Sallin, Robert Sieber, Jacques Olivier Bosset

Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne

Raffaele Tabacchi

Institut de chimie, Université de Neuchâtel, Neuchâtel

Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène. Sous presse

Validation of Analytical Procedure for the Parallel Quantification of the Cholesterol and his Oxides in Food

Key words: Cholesterol oxidation product, Cholesterol, Analysis, Food, Gas chromatography-mass spectrometry

Introduction

Les produits d'oxydation du cholestérol (oxystérols) dans les denrées alimentaires sont d'un grand intérêt à cause de leurs implications potentielles dans le développement de l'athérosclérose et du cancer (1). Les oxystérols sont générés par oxydation enzymatique, autoxydation ou par exposition du cholestérol à la chaleur, à la lumière ou à une radiation (2, 3). Ils ont été détectés dans divers aliments d'origine animale tels que produits laitiers, poudres d'oeuf, viandes et poissons. Il a été rapporté que certains procédés de fabrication et certaines conditions de stockage favorisent leur formation (4 - 6).

L'analyse des oxystérols dans les denrées alimentaires a fait l'objet d'une attention toute particulière durant ces dix dernières années. Même si plusieurs méthodes ont déjà été proposées, certains aspects analytiques soulèvent encore de vives controverses. *McCluskey* et *Devery* (7) passent d'ailleurs en revue les problèmes liés

au dosage des oxystérols dans les denrées alimentaires et expliquent la nécessité de valider un tel dosage selon des paramètres rigoureux.

Une étape particulièrement critique de l'analyse des oxystérols est celle de leur purification. Leur isolation est fréquemment gênée par la présence de grandes quantités de cholestérol, de triglycérides, de phospholipides ou d'autres lipides. La similitude structurelle et chimique des divers oxystérols présents et la complexité de la fraction lipidique requièrent en outre une haute sélectivité. Une saponification préalable et/ou des techniques chromatographiques sont généralement nécessaires. Une analyse ou du moins une confirmation par spectrométrie de masse (MS) est également conseillée (8), car des monoglycérides ou des diglycérides ainsi que d'autres composés peuvent coéluer avec les oxystérols et gêner leur quantification ou entraîner une surestimation lorsqu'ils sont dosés par chromatographie gaz/liquide (GC) avec une détection par ionisation de flamme ou par chromatographie liquide/liquide (HPLC) avec une détection dans l'ultraviolet (9, 10).

Les diverses étapes de purification doivent être très douces, car la présence d'air, de lumière, de peroxydes dans les solvants, voire une élévation de la température peuvent être à l'origine de la formation d'oxystérols. En présence d'oxygène, l'activité de certains agents adsorbants tel que le gel de silice peut également être une cause de formation d'artefacts (11, 12). Le pH du milieu est aussi susceptible d'influencer la stabilité de certains oxystérols (13).

Un contrôle de la formation artefactuelle d'oxystérols durant les étapes de purification est toutefois possible en recourant à une analyse par MS avec du cholestérol marqué isotopiquement (14). Dans un précédent travail, une telle méthode a été développée et validée dans des laits en poudre (15). Après addition de cholestérol marqué par 7 atomes de deutérium en quantité équivalente au cholestérol endogène présent dans le lait en poudre, les oxystérols ont été purifiés par saponification douce, extraction de l'insaponifiable, extraction sur cartouche aminopropyle et quantifiés par GC-MS. La formation artefactuelle d'oxystérols peut ainsi être facilement déterminée - donc corrigée - par la quantité produite d'oxystérols marqués. Cette méthode offre en outre les avantages d'être sélective, spécifique et sensible (dosage par GC-MS en mode « selected ion monitoring ») et permet de traiter plusieurs échantillons en parallèle, ce qui facilite son application en routine. Elle est donc plus intéressante que d'autres

techniques très laborieuses recourant à des chromatographies sur colonnes ou à de l'HPLC préparative (16, 17).

Le présent travail a pour premier objectif d'étendre le champ d'application de cette méthode (15) à d'autres denrées alimentaires telles que différents fromages, beurre, saindoux et poudre d'oeuf. La validation de cette méthode dans le cadre de ces nouveaux produits alimentaires a été effectuée sur la base:

- d'un contrôle de la pureté des pics en mesurant 2 masses correspondant à 2 fragments sélectifs pour chaque oxystérol;
- d'une mesure des taux de récupération dans ces différentes matrices;
- de la détermination des domaines de linéarité;
- de la mesure des limites de détection et de quantification;
- de la vérification de la répétabilité du dosage des oxystérols.

Le second objectif de ce travail est le dosage en parallèle du cholestérol en utilisant le même procédé de purification, ce qui permet de calculer le taux d'oxydation du cholestérol dans l'aliment considéré sans étape supplémentaire de préparation de l'échantillon. L'analyse du cholestérol est validée selon les critères de répétabilité, d'exactitude sur la base d'une poudre d'oeuf certifiée comme matériel standard de référence et du taux de récupération dans les matrices étudiées. Cette double analyse a alors été appliquée aux divers aliments susmentionnés.

Partie expérimentale

Réactifs

Le 5-cholestène-3 β ,19-diol (19-hydroxycholestérol), le 5 β -cholestane-3 α -ol (épiscoprostanol), le cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol et le 5 α ,6 α -époxycholestérol proviennent de Sigma (St. Louis, MO, USA), le cholestène-3-ol-7-one (7-cétocholestérol) d'Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA), le 5-cholestène-3 β ,25-diol (25-hydroxycholestérol), le 5-cholestène-3 β ,7 β -diol (7 β -hydroxycholestérol) et le 5-cholestène-3 β ,7 α -diol (7 α -hydroxycholestérol) de Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA). Le cholestérol est livré par Merck (Dietikon, Suisse) et le [25,26,26,26,27,27,27-²H₇]cholestérol par Numelec S.A. (Genève, Suisse). Les agents silylants N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA),

triméthylchlorosilane (TMCS), N,O-bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA) proviennent de Fluka (Buchs, Suisse). Les solvants d'une pureté p.A. tels que l'éther éthylique (déperoxydé avec Molecular Sieve Deperox de Fluka), le méthanol, la pyridine ainsi que les solvants d'une pureté LiChrosolv tels que le n-hexane, l'acétone, l'acétate d'éthyle proviennent de chez Merck. Les cartouches SPE avec phase aminopropyle sont fournies par Supelco (Buchs, Suisse). L'eau utilisée est de qualité Milli-Q (Millipore Co.). La poudre d'oeuf entier, comme matériel de référence certifié (« Standard Reference Material » SRM 1845, NIST) pour l'analyse du cholestérol provient de Promochem (Wesel, Allemagne).

Echantillons

Les diverses denrées alimentaires (beurre fondu, fromage fondu, fromage à raclette et parmesan) proviennent du commerce. Le lait en poudre, le saindoux et la poudre de jaune d'oeuf, de qualités fraîche et oxydée, ont été mis à la disposition des laboratoires qui ont participé à un essai collaboratif sur le dosage des oxystérols (organisateur: Prof. L.-A. Appelqvist, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden)

Homogénéisation des échantillons de type pâteux

Découper les échantillons de fromage (20 à 30 g) en petits morceaux, les surgeler dans de l'azote liquide, puis les moulin dans un moulin de ménage (par ex. Moulinex) jusqu'à l'obtention d'une fine poudre.

Chauffer le saindoux 15 min à 45°C, puis l'homogénéiser en le brassant à l'aide d'une baguette de verre. Appliquer le même principe sans échauffement préalable pour le beurre fondu.

Procédé de purification et d'enrichissement

La figure 1 résume les étapes de purification utilisées.

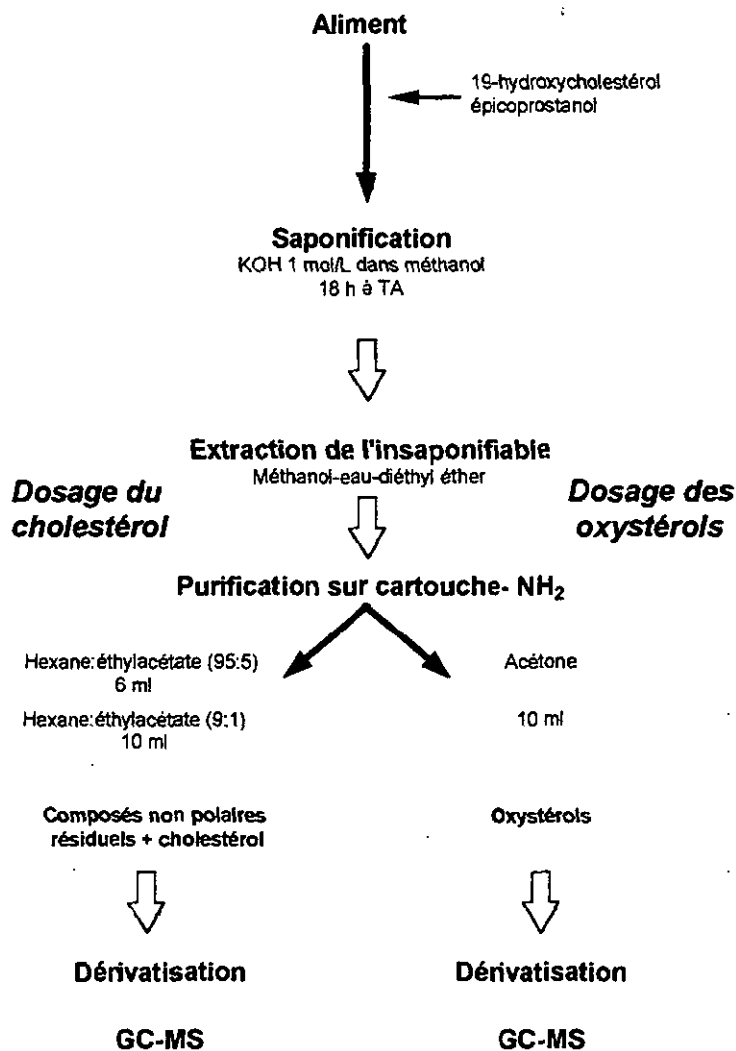


Figure 1. Schéma du procédé de purification du cholestérol et de ses produits d'oxydation permettant leur dosage en parallèle par GC-MS

Saponification à froid

Ajouter 1 μg de 19-hydroxycholestérol (standard interne pour l'analyse des oxystérols) et 1 mg d'épicooprostanol (standard interne pour l'analyse du cholestérol (18)) à 1 g de fromage réduit en poudre ou à 1 g de lait entier en poudre dans une éprouvette à col rodé. Fermer avec un bouchon en téflon. Pour les autres types d'échantillon analysés, adapter les prises d'épicooprostanol et d'échantillon aux teneurs en cholestérol et en graisse attendues ou estimées soit: 1 mg d'épicooprostanol pour 0,5 g de beurre fondu, 0,5 mg d'épicooprostanol pour 0,5 g de saindoux, 12 mg d'épicooprostanol pour 0,5 g de poudre d'oeuf. Saponifier alors l'échantillon par l'addition de 10 ml d'une solution méthanolique d'hydroxyde de

potassium (à 1 mol/l) et agiter le mélange à l'aide d'un mélangeur rotatif (19) pendant 18 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Extraction de l'insaponifiable

Refroidir l'éprouvette contenant l'échantillon saponifié dans un bain de glace. Ajouter 10 ml d'eau et extraire la fraction insaponifiable 3 fois avec 10 ml d'éther éthylique déperoxydé. Réunir les extraits d'éther éthylique puis les laver une fois avec 15 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0,5 mol/L puis trois fois avec 15 ml d'une solution de sulfate de sodium à 0,47 mol/L. Sécher ensuite ces extraits avec du sulfate de sodium anhydre. Évaporer l'éther à l'aide d'un évaporateur rotatif (à température ambiante et sous 100 mbar).

Extraction sur cartouche SPE avec phase aminopropyle

Dissoudre l'extrait obtenu précédemment dans 0,5 ml du mélange hexane:acétate d'éthyle (95:5, v/v) puis le charger sur une cartouche SPE avec phase aminopropyle préalablement conditionnée avec 3 ml d'hexane. Dans le cas de la poudre d'oeuf, l'extrait est dilué 5 fois, avant d'être appliqué sur la cartouche afin de prévenir une saturation par le cholestérol. Rincer le flacon avec 0,5 ml du même mélange. Dans une première fraction, éluer les composés non polaires résiduels, le cholestérol et l'épicoprostanol avec 6 ml du même mélange puis avec 10 ml d'hexane:acétate d'éthyle (9:1, v/v). Dans une deuxième fraction, éluer les oxystérols avec 10 ml d'acétone.

Silylation

Amener la première fraction contenant le cholestérol et l'épicoprostanol à un volume final de 20 ml avec de l'hexane. Évaporer et sécher une prise aliquote de cet extrait (contenant environ 10 µg d'épicoprostanol) sous flux d'azote et le silyler en ajoutant successivement 100 µl de BSTFA et 20 µl de TMCS, en chauffant le tout 30 min à 75°C. Sécher l'extrait sous flux d'azote, le redissoudre dans 5 ml du mélange hexane:BSA (10:1, v/v) et en injecter 1 µl.

Évaporer le solvant de la deuxième fraction et transformer les oxystérols immédiatement en triméthylsilyl éthers par additions successives de 200 µl de BSTFA, de 40 µl de pyridine sèche et de 4 µl de TMCS. La silylation dure une nuit à

température ambiante. Sécher l'extrait sous flux d'azote, le reprendre dans 200 µl du mélange hexane:BSA (10:1, v/v) et en injecter 1 µl.

Chromatographie en phase gazeuse- spectrométrie de masse

Appareillage

Le cholestérol et les oxystérols sont analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse HP-5890 équipé d'un passeur d'échantillon HP-7673, d'un détecteur à spectrométrie de masse HP-5970 et d'un système de pilotage des modules et d'acquisition de données de type ChemStation HP-G1034C (Hewlett-Packard, Genève, Suisse). Les conditions de travail sont les suivantes: colonne capillaire en silice fondue DB-1 (30 m x 0,32 mm I.D. x 0,25 µm d'épaisseur de film) de J&W; gaz porteur: hélium sous 0,7 bar; injection: on-column; programme de température du four: 60°C isotherme (1 min), première rampe de temp. de 30°C/min jusqu'à 200°C, deuxième rampe de temp. de 5°C/min jusqu'à 300°C puis 5 min isotherme à 300°C; interface de type « open-split »; température de l'interface: 280°C. Le cholestérol et les oxystérols sont identifiés par spectrométrie de masse en mode TIC (« total ion chromatography »), et quantifiés en mode SIM (« selected ion monitoring ») dans les conditions suivantes: ionisation électronique à 70 eV et 0,8 mA, calibrage par « autotuning ».

Vérification de l'absence d'autoxydation du cholestérol durant le clean-up (formation d'artefacts)

Purification du cholestérol

Le cholestérol commercial est garanti pur à plus de 99%, mais une faible oxydation de cette substance suffit pour fausser considérablement les résultats. Il faut par conséquent, le purifier en recourant à la même extraction sur cartouche SPE que celle déjà décrite. A cette fin, dissoudre environ 5 mg de cholestérol dans 0,5 ml du mélange hexane:acétate d'éthyle (95:5, v/v) puis les charger sur une cartouche SPE avec phase aminopropyle préalablement conditionnée avec 3 ml d'hexane. Rincer le

flacon avec une nouvelle portion de 0,5 ml du même mélange. Eluer enfin le cholestérol avec 6 ml du même mélange et 10 ml du mélange hexane:acétate d'éthyle (9:1, v/v) puis le sécher sous flux d'azote.

Procédure

Répéter le procédé complet de purification et d'analyse des oxystérols sur un échantillon après addition de cholestérol purifié (en quantité équimolaire au cholestérol naturellement présent dans l'échantillon). Le contrôle de la formation d'oxystérols artificiels est effectué par comparaison des quantités d'oxystérols déterminés dans l'échantillon avec et sans ajout de cholestérol.

Résultats et discussion

Analyse des oxystérols par GC-MS

La quantification des oxystérols est réalisée par la détection de chaque oxystérol en mode SIM à la masse correspondant à son ion moléculaire à l'exception du cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol et du 19-hydroxycholestérol (standard interne) qui sont analysés aux masses des fragments [M-H₂O]⁺ et [M-2x90]⁺ respectivement, en accord avec la méthode déjà publiée pour les laits en poudre (15) (tableau 1).

Oxystérol	Fragment considéré m/z	Limite de détection* (ng/ml)	Limite de quantification** (μ g/g d'échantillon)	Domaine de linéarité (ng/ml)	Nbr. de mesures n	Coeff. déterm. R ²
7 α -hydroxycholestérol	546	0,2	0,1; 0,2	0,2-19,1	21	0,9983
7 β -hydroxycholestérol	546	0,2	0,1; 0,2	0,2-20,5	21	0,9983
5 α ,6 α -époxycholestérol	474	0,1	0,1; 0,2	0,1-11,8	21	0,996
cholestanetriol	546	0,1	0,1; 0,2	0,1-11,0	21	0,9962
25-hydroxycholestérol	546	0,3	0,1; 0,2	0,3-10,5	18	0,9975
7-cétocholestérol	472	0,1	0,1; 0,2	0,1-20,9	24	0,9987

* La limite de détection est définie pour une concentration correspondant à un rapport signal/bruit de fond égal à 3

** La limite de quantification est estimée à 0,1 μ g/g de fromage et à 0,2 μ g/g de saindoux, de beurre ou de poudre d'oeuf

Tableau 1. Linéarité de la réponse des oxystérols, limites de détection et de quantification de la méthode

La linéarité de la réponse des divers oxystérols est reportée dans le tableau 1. Les coefficients de détermination (R^2) des droites de régression calculées sont égaux ou supérieurs à 0,9960 dans les domaines de concentration étudiés.

Les limites de quantification du dosage des oxystérols dans les aliments ont été estimées à 0,1 $\mu\text{g/g}$ de fromage et à 0,2 $\mu\text{g/g}$ de poudre d'oeuf, de beurre, ou de saindoux sur la base de la limite de détection, de la répétabilité de la méthode et de la formation d'artefacts (tableau 1).

Les limites de détection, déterminées par injection de 1 μl d'une solution contenant les standards purs, ont été calculées pour une concentration correspondant à un rapport signal / bruit de fond égal à 3. Elles se situent entre 0,1 et 0,3 ng/ml selon les oxystérols (tableau 1). Il faut rappeler que l'équipement analytique utilisé comporte un système « open-split » à l'interface GC-MS qui entraîne une dilution de l'analyte entrant dans le MS et diminue donc la sensibilité du système. Nous pourrions abaisser la limite de détection de certains composés en les analysant à la masse correspondant au fragment le plus abondant (par ex. à l'ion moléculaire après perte d'un triméthylsilanol (m/z 456), 25 fois plus abondant que l'ion moléculaire intact (m/z 546) du 7α - et 7β -hydroxycholestérol (15,17)). Un tel abaissement n'apporterait toutefois pas beaucoup d'informations supplémentaires en raison des effets de matrices, plus importants pour des masses plus petites, qui diminuent sensiblement la répétabilité des mesures au voisinage des limites de détection. Ces fragments ont été utilisés pour le contrôle de la pureté des pics lors du dosage des oxystérols. Le tableau 2 montre un rapport pratiquement constant des intensités des ions mesurés pour chaque oxystérol pour une solution standard, la poudre de jaune d'oeuf, le saindoux et le fromage fondu.

Aspects analytiques

Oxystérol	rapport des ions	Rapport d'intensité des ions mesurés dans plusieurs échantillons			
		solution standard nbr. de mesures = 5	poudre jaune d'oeuf nbr. de mesures = 8	saindoux nbr. de mesures = 8	fromage fondu nbr. de mesures = 5
7 α -hydroxycholestérol	546*/456	0,0196 \pm 0,0007	**	0,0185 \pm 0,0003	0,0200 \pm 0,0002
7 β -hydroxycholestérol	546*/457	0,0194 \pm 0,0005	0,0213 \pm 0,0014	0,0206 \pm 0,0010	0,0210 \pm 0,0004
5 α ,6 α -époxycholestérol	474*/384	0,9801 \pm 0,0333	1,0156 \pm 0,0500	0,9723 \pm 0,0266	0,9957 \pm 0,0091
cholestanestriol	546*/456	0,5508 \pm 0,0354	0,4581 \pm 0,0759	0,5879 \pm 0,1461	0,5365 \pm 0,0091
25-hydroxycholestérol	546*/456	0,4285 \pm 0,0268	0,3665 \pm 0,0431	0,4178 \pm 0,0279	0,4340 \pm 0,0078
7-cétocholestérol	472*/367	2,1026 \pm 0,0140	2,1604 \pm 0,0607	2,1091 \pm 0,0329	1,9794 \pm 0,0166

* Ion utilisé lors du dosage

** Le rapport n'a pas pu être calculé, car le pic à la masse 456 présentait un épaulement

Tableau 2. Contrôle de la pureté des pics des ions des oxystérols obtenus en mode "SIM" dans plusieurs échantillons

Validation de la méthode de dosage des oxystérols dans divers aliments

Le 5 α ,6 α -époxycholestérol n'avait pas pu être quantifié avec précision lors de la première validation de la méthode dans des laits en poudre, car des impuretés coéluèrent et gênaient l'intégration du pic (15). L'analyse de ce composé a cependant pu être effectuée dans ce travail avec des matrices aussi complexes qu'une poudre de jaune d'oeuf ou un lait en poudre (cf. ci-dessous).

Plusieurs ajouts d'une solution standard contenant les 6 oxystérols recherchés dans des échantillons pas ou faiblement oxydés de fromage fondu, de fromage à raclette, de parmesan, de saindoux et de poudre de jaune d'oeuf ont permis de déterminer le taux de récupération et le domaine de linéarité de la méthode ainsi que de vérifier son applicabilité à différentes matrices. Les éventuelles teneurs naturelles de ces échantillons en oxystérols (avant ajouts) seront indiquées plus loin au §: « Application de l'analyse parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation à divers aliments ». Les domaines de linéarité des ajouts, les coefficients de détermination des droites de régression correspondantes et les taux de récupération calculés pour chaque oxystérol sur la base de la pente des dites droites sont reportés dans les tableaux 3 et 4.

Aspects analytiques

Oxystérol	Domaine de linéarité (µg/g)	Nbr. de mesures n	Fromage fondu		Parmesan		Fromage à raclette	
			Coeff. déterm. R ²	Taux de récupération (%)	Coeff. déterm. R ²	Taux de récupération (%)	Coeff. déterm. R ²	Taux de récupération (%)
7α-hydroxycholestérol	0,0-5,3	6	0,9987	101	0,9983	102	0,9983	104
7β-hydroxycholestérol	0,0-4,9	6	0,9993	104	0,9983	100	0,9993	103
5α,6α-époxycholestérol	0,0-5,4	6	0,9997	97	0,9993	109	0,9993	103
cholestanetriol	0,0-2,2	6	0,9875	88	0,9946	83	0,9952	79
25-hydroxycholestérol	0,0-2,3	6	0,9996	103	0,9992	105	0,9997	104
7-cétocholestérol	0,0-7,3	6	0,9994	99	0,9991	95	0,9994	100

Tableau 3. Domaines de linéarité, coefficients de détermination et taux de récupération des oxystérols calculés par régressions linéaires sur la base d'ajouts connus dans divers fromages

Oxystérol	Saindoux				Poudre de jaune d'oeuf			
	Domaine de linéarité (µg/g)	Nbr. de mesures n	Coeff. déterm. R ²	Taux de récupération (%)	Domaine de linéarité (µg/g)	Nbr. de mesures n	Coeff. déterm. R ²	Taux de récupération (%)
7α-hydroxycholestérol	0,0-10,3	8	0,9994	96	0,0-18,0	7	0,9941	68
7β-hydroxycholestérol	0,0-10,6	8	0,9991	109	0,0-19,6	8	0,9983	85
5α,6α-époxycholestérol	0,0-11,2	8	0,9994	113	0,0-20,1	8	0,9960	88
cholestanetriol	0,0-7,8	8	0,9949	80	0,0-9,3	6	0,9998	60
25-hydroxycholestérol	0,0-6,1	8	0,9992	97	0,0-7,3	6	0,9995	77
7-cétocholestérol	0,0-14,1	8	0,9992	106	0,0-16,9	6	0,9996	88

Tableau 4. Domaines de linéarité, coefficients de détermination et taux de récupération des oxystérols calculés par régressions linéaires sur la base d'ajouts connus dans du saindoux et de la poudre de jaune d'œuf

Pour les 3 fromages étudiés (tableau 3), les coefficients de détermination, situés entre 0,9875 et 0,9952 pour le cholestanetriol et entre 0,9983 et 0,9997 pour les autres oxystérols, montrent la linéarité et la répétabilité du taux d'extraction dans le domaine de concentration considéré. Les taux de récupération varient de 79 à 109% pour tous les oxystérols testés. Le cholestanetriol est cependant le moins bien extrait (79-88%), en raison vraisemblablement de sa plus forte polarité. Cette récupération moindre paraît occasionnée par l'étape de saponification, comme le suggère une étude comparative des procédés de purification des oxystérols (20).

Pour le saindoux et la poudre de jaune d'œuf (tableau 4), nous observons également une bonne linéarité et répétabilité du taux d'extraction dans le domaine de concentration étudié, avec des coefficients de détermination compris entre 0,9941 et 0,9998. Les taux de récupération dans le saindoux, compris entre 80 et 113%, sont

du même ordre de grandeur que ceux mesurés dans les fromages. En revanche, des valeurs trouvées pour la poudre de jaune d'oeuf sont sensiblement plus faibles (entre 60 et 88%), ce qu'il faut probablement attribuer à la plus grande complexité de cette matrice, en raison notamment de sa forte teneur en phospholipides, en protéines et en cholestérol (la poudre de jaune d'oeuf contient 10 à 15 fois plus de cholestérol que les autres matrices étudiées).

Pie et al. (21) obtiennent des taux de récupération (situés entre 65% pour le cholestanetriol et 119% pour le 5 α ,6 α -époxycholestérol) comparables à ceux obtenus dans le présent travail lors de l'analyse d'un beurre avec le même standard interne. Certaines valeurs légèrement supérieures à 100%, notamment pour le 5 α ,6 α -époxycholestérol et le 7 β -hydroxycholestérol, peuvent s'expliquer par une correction un peu trop importante du 19-hydroxycholestérol. Dans cette étude, des essais préliminaires effectués avec d'autres standards internes tels que le 22-cétocholestérol et le 5 α -cholestane ont montré que ces composés étaient perdus durant l'étape de purification sur cartouche aminopropyle. Le 19-hydroxycholestérol semble donc le plus approprié. *Guardiola et al.* (20) arrivent à la même conclusion après avoir testé différents standards internes sur des cartouches en silice.

La répétabilité de la méthode est indiquée dans le tableau 5 pour le dosage des oxystérols dans un beurre fondu oxydé. Six analyses montrent des taux moyens d'oxystérols allant de 0,2 à 4,7 $\mu\text{g/g}$ de beurre fondu. Nous observons de faibles coefficients de variation compris entre 0,8 et 1,1% pour le 7 α - et le 7 β -hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol et le 5 α ,6 α -époxycholestérol. Nous avons mesuré des coefficients de variation un peu plus élevés, allant de 5,0 à 5,7% pour le cholestanetriol et le 25-hydroxycholestérol, oxystérols présents sous forme de traces proches de la limite de quantification. Nous avons constaté une meilleure répétabilité de cette méthode par rapport au travail précédent (15). L'absence d'artefacts, une meilleure maîtrise de la méthode de même qu'un changement de mode d'injection (analyse des oxystérols en mode « on-column » plus doux que le mode « splitless » à haute température (16)) peuvent expliquer cette amélioration.

Oxystérol	Teneur moyenne (µg/g)	Ecart-type (µg/g)	Coefficient de variation (%)
7α-hydroxycholestérol	2,41	0,02	0,83
7β-hydroxycholestérol	3,67	0,03	0,82
5α,6α-époxycholestérol	1,78	0,02	1,12
cholestanetriol	0,2	0,01	5,00
25-hydroxycholestérol	0,35	0,02	5,71
7-cétocholestérol	4,72	0,05	1,06

Les unités sont exprimées en µg/g d'échantillon avec une limite de quantification de 0,20 µg/g

Tableau 5. Répétabilité du dosage des oxystérols dans du beurre fondu (n = 6)

Formation d'artefacts durant l'analyse des oxystérols

Le procédé d'extraction et de purification complet a été testé avec du beurre fondu oxydé, après ajout de 2 mg de [²H₇]cholestérol par g d'échantillon. Ce cholestérol heptadeutééré a été purifié au préalable par une extraction sur cartouche. Six analyses n'ont montré la formation que de traces d'oxystérols deutérés. Le 7-cétocholestérol est le seul composé deutéré formé en traces effectivement quantifiables: 0,03 ± 0,01 µg/g (n = 6). Cette concentration est cependant en dessous de la limite de quantification estimée à 0,2 µg/g. Aucune correction n'a donc été appliquée au dosage des oxystérols, la formation d'artefacts durant le procédé de purification pouvant être considérée comme négligeable.

Du cholestérol non marqué, purifié selon la même méthode, a été utilisé pour contrôler la formation d'artefacts dans les autres échantillons. Le dosage en parallèle d'un échantillon avec et sans ajout de cholestérol a permis, de façon moins onéreuse, de vérifier une éventuelle oxydation du cholestérol durant les différentes étapes de purification et d'analyse. Cette stratégie n'a montré aucune formation artefactuelle d'oxystérols.

Lors de la validation de cette méthode dans les laits en poudre (15), des quantités plus importantes d'oxystérols marqués, notamment de 7-cétocholestérol et 25-hydroxycholestérol deutérés avaient été détectées et une correction pour en tenir

compte avait dû être appliquée. Une meilleure maîtrise de la méthode, notamment plus de précautions (bain de glace, absence de lumière, rapidité d'exécution, etc.) pour éviter toute oxydation durant les différentes étapes de l'analyse ont certainement contribué à une diminution de l'autoxydation du cholestérol durant la préparation de l'échantillon. Ces résultats montrent toutefois la nécessité d'effectuer des contrôles réguliers, surtout en cas de modifications éventuelles des conditions de travail. Cette stratégie, par un ajout d'une quantité précise de cholestérol à l'échantillon, permet également de contrôler le taux de récupération lors du dosage du cholestérol (cf. ci-dessous).

Validation de la méthode de dosage du cholestérol par GC-MS

Il existe plusieurs méthodes de dosage du cholestérol plus simples que celle proposée dans le présent travail (22). La présence d'une grande quantité de cette substance dans les denrées alimentaires d'origine animale ne demande pas en effet plusieurs étapes d'enrichissement successives. Il suffit d'effectuer une saponification rapide à chaud de l'échantillon, suivie d'une extraction de l'insaponifiable et d'une injection en GC couplée avec une détection par ionisation de flamme après silylation (22). Puisqu'une élimination du cholestérol est indispensable pour l'analyse des oxystérols (ces derniers sont présents en concentration env. 1000 fois plus faibles que le cholestérol originel), sa récupération quantitative permet son analyse sans étapes supplémentaires autres que la silylation et son injection.

La quantification du cholestérol a été effectuée à l'aide d'épicoprostanol comme standard interne, en mode SIM, aux masses correspondant à l'ion moléculaire pour le premier (m/z 458) et au fragment $[M-90]^+$ pour le deuxième (m/z 370).

L'exactitude du dosage du cholestérol a été vérifiée par l'analyse d'une poudre d'oeuf certifiée comme matériel standard de référence (tableau 6). Ce dosage a donné une valeur moyenne de $18,9 \pm 0,3$ mg/g ($n = 4$), valeur égale à la valeur certifiée ($19,0 \pm 0,2$ mg/g) si l'on considère l'incertitude analytique correspondante. Ces résultats confirment donc l'exactitude de la méthode. La précision, mesurée par le coefficient de variation (1,6%), est très proche de la valeur déclarée pour le produit certifié (1,1%). Le cholestérol, dont env. 10 à 15% sont présents dans l'oeuf sous forme

estérifiée, est donc totalement extrait par ce procédé. La saponification appliquée, très douce pour prévenir toute décomposition des oxystérols, semble donc efficace puisqu'elle permet également de libérer la fraction de cholestérol présent sous forme d'esters.

Teneur en cholestérol	Valeur moyenne (mg/g)	Ecart-type (mg/g)	Coefficient de variation (%)
déterminée*	18,9	0,3	1,6
valeur certifiée**	19,0	0,2	1,1

* Moyenne de 4 mesures

** Matériel standard de référence SRM 1845

Tableau 6. Exactitude du dosage du cholestérol dans une poudre d'oeuf

Les taux de récupération du cholestérol ajouté ont également été vérifiés dans diverses matrices (tableau 7). Des valeurs entre 99 et 114% montrent que l'extraction est complète et que le standard interne choisi est adéquat.

Denrée alimentaire	Ajout (mg/g)	Taux de récupération (%)	Nbr. de mesures n
saindoux	1	102	1
poudre de jaune d'oeuf	22	106	1
fromage à raclette	1	99	1
fromage fondu	1	104 ± 8	4
lait entier en poudre	1	103 ± 6	2
beurre fondu	3	114	1

Tableau 7. Taux de récupération du cholestérol ajouté à diverses denrées alimentaires

Application de l'analyse parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation à divers aliments

Les résultats des analyses du cholestérol et des oxystérols effectués dans un saindoux et une poudre de jaune d'oeuf frais et oxydés, dans un lait en poudre peu

oxydé, dans un fromage à raclette et un fromage fondu et dans un beurre fondu sont reportés dans le tableau 8. Aucuns oxystérols, à l'exception de faibles traces de 7-cétocholestérol ($< 0,10 \mu\text{g/g}$), ont été trouvés dans le fromage fondu. De faibles traces ($0,5$ et $0,1 \mu\text{g}$ d'oxystérols totaux par g d'échantillon) ont été détectées dans le lait entier en poudre et le fromage à raclette. Le beurre fondu chauffé et le saindoux (A) en contiennent un peu plus ($1,6$ et $1,3 \mu\text{g/g}$). La poudre de jaune d'oeuf fraîche en contient $5,3 \mu\text{g/g}$; son stockage en revanche en produit une quantité plus élevée ($31,8 \mu\text{g/g}$). D'importantes quantités d'oxystérols ont été trouvées dans le saindoux oxydé (échantillon B), en dehors même du domaine de linéarité étudié (cf. tableau 4). Pour cet échantillon, il a donc été nécessaire de répéter l'analyse sur une partie aliquote plus petite ($0,05 \text{ g}$). Nous constatons néanmoins une bonne répétabilité pour l'analyse à double des oxystérols de cet échantillon (écarts-types correspondant à un coefficient de variation $< 6\%$) comme d'ailleurs pour les autres matrices.

Cette méthode permet d'analyser parallèlement le cholestérol et ses produits d'oxydation dans le même échantillon, donc d'évaluer le degré d'oxydation du cholestérol. A une exception près, le tableau 8 indique qu'une très faible portion du cholestérol (env. 1%) est oxydée. Seul le saindoux B contient d'importantes quantités d'oxystérols représentant env. 30% du cholestérol oxydé. L'oxystérol formé majoritairement dans les échantillons analysés est le 7-cétocholestérol, suivi des 7α - et 7β -hydroxycholestérol en raison de leur position allylique sur le carbone 7 qui facilite l'oxydation (3). Les autres produits d'oxydation se forment moins facilement.

Dénrée alimentaire	Conditions de stockage / traitement de l'échantillon	Teneur en cholestérol (mg/g d'échantillon) et en oxystérols (µg/g d'échantillon) dans divers aliments										Fraction cholestérol oxydé (%)
		cholestérol	7α-hydroxy-cholestérol	7β-hydroxy-cholestérol	5α,6α-époxy-cholestérol	cholestane-triol	25-hydroxy-cholestérol	7-céto-cholestérol	oxystérols totaux			
saindoux A		0.92	0,24 ± 0,07	0,39 ± 0,04	0,21 ± 0,01	ND	ND	0,44 ± 0,29	1,28	0.14		
saindoux B		0.76	38,89 ± 2,16	39,58 ± 0,03	2,91 ± 0,01	21,64 ± 0,14	ND	127,81 ± 0,95	230,83	30.37		
p. de jaune d'oeuf A	après utilisation en friture	24.30	2,53 ± 0,28	0,92 ± 0,03	< 0,20	< 0,20	0,27 ± 0,04	1,57 ± 0,08	5,29	0.02		
p. de jaune d'oeuf B	stocké 3 ans	23.30	10,15 ± 1,47	12,80 ± 0,79	2,07 ± 0,07	0,60 ± 0,02	0,42 ± 0,02	5,73 ± 0,02	31,80	0.14		
lait entier en poudre	stocké 3 mois à -25°C	0.81	0,13 ± 0,01	0,18 ± 0,01	< 0,10	ND	ND	< 0,10	0,49	0.06		
fromage à raclette		0.85	< 0,10	< 0,10	ND	ND	ND	0,10 ± 0,01	0,10	0.01		
fromage fondu		n.d.	ND	ND	ND	ND	ND	< 0,10	< 0,10	-		
beurre fondu	chauffé 30 min à 170°C	1.99	0,26 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,20 ± 0,01	ND	< 0,20	0,82 ± 0,02	1,61	0.08		

n.d. = non déterminé

ND = non détecté

p. = poudre

La détermination des oxystérols est faite en double (n = 2); seules les moyennes ± écarts-types sont indiqués

Tableau 8. Application de la méthode d'analyse à diverses denrées alimentaires d'origine animale

Conclusion

La méthode proposée est parfaitement adaptée à l'analyse du cholestérol et de ses produits d'oxydation dans de nombreux produits alimentaires en recourant au même procédé de purification et sans extraction préalable des lipides. Il permet donc de calculer le taux d'oxydation (en %) du cholestérol originel. Cette méthode a été appliquée avec succès à des fromages de type parmesan, raclette et fondu, à du beurre, du saindoux, des laits en poudre et à des poudres de jaune d'oeuf. Une saponification directe de l'échantillon à température ambiante et à l'obscurité, suivie d'une extraction de l'insaponifiable puis d'une purification sur cartouche aminopropyle permet de séparer le cholestérol et ses oxydes et d'enrichir suffisamment ces derniers pour un dosage par GC-MS. La méthode se caractérise par une bonne répétabilité (coefficients de variation inférieurs à 6%) et des taux de récupération des oxystérols compris entre 79 et 113% dans les fromages et le saindoux, entre 60 et 88% dans une poudre d'oeuf. La détection en mode SIM permet, de par sa sélectivité et sa sensibilité, d'atteindre des limites de quantification pour les oxystérols de l'ordre de 0,1-0,2 µg/g d'échantillon suivant la prise d'échantillon. Cette méthode est également suffisamment douce pour prévenir la production artefactuelle d'oxystérols durant les diverses étapes de purification.

Remerciements

Le présent travail fait partie de la thèse de doctorat du premier auteur. Les auteurs tiennent à remercier *l'Institut Candia* (Centre de recherche international André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France), la maison *Crema* (Villars-sur-Glâne près Fribourg, Suisse) ainsi que *la Fédération des coopératives Migros* (Zurich, Suisse) pour leur soutien financier accordé sous la forme d'une bourse offerte au premier auteur. Les auteurs remercient également les Dr Laurent Fay du Centre de Recherche Nestlé (Vers-chez-les-Blanc, Suisse) et Dr Raoul Daniel pour leur lecture critique du manuscrit.

Résumé

Ce travail reprend une méthode de dosage des produits d'oxydation du cholestérol (7 α - et 7 β -hydroxycholestérol, 7-cétocholestérol, 5 α ,6 α -époxycholestérol et 25-hydroxycholestérol)

développée pour des laits en poudre et étend son application et sa validation à d'autres denrées alimentaires telles que poudre d'oeuf, fromages, beurre et saindoux. Le procédé comporte une saponification douce à température ambiante, une extraction sur cartouche aminopropyle et une analyse par chromatographie en phase gazeuse avec une détection par spectrométrie de masse. L'intérêt particulier de cette méthode est de permettre l'analyse parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation sans étape de purification supplémentaire. Une bonne répétabilité (coefficients de variation inférieures à 6%) et des taux de récupération des oxystérols entre 79 et 113% dans les fromages et le saindoux, entre 60 et 88% dans la poudre d'oeuf caractérisent cette méthode. La limite de quantification est de 0,1-0,2 µg/g d'échantillon pour le dosage des oxystérols. Le domaine de linéarité de la méthode a été vérifié pour chaque composé étudié. L'ajout de cholestérol marqué (heptadeutééré) et non marqué montre que l'oxydation du cholestérol durant toutes les étapes de purification est négligeable, donc que la méthode est pratiquement exempt d'artefacts. Le dosage du cholestérol a été vérifié à l'aide d'une poudre d'oeuf à teneur en cholestérol certifiée.

Zusammenfassung

Diese Arbeit nimmt eine Methode zur Bestimmung der Oxidationsprodukte des Cholesterins (7 α - und 7 β -Hydroxycholesterol, 7-Ketocholesterol, 5 α ,6 α -Epoxycholesterol und 25-Hydroxycholesterol) auf, die für Milchpulver entwickelt wurde. Deren Anwendung und Validierung wird auf andere Lebensmittel wie Eipulver, Käse, Butter und Schweineschmalz erweitert. Das Verfahren umfasst eine schonende Verseifung, eine Extraktion auf einer Aminopropyl-Säule und eine GC-MS-Analyse im "selected ion monitoring"-Modus. Dabei kann gleichzeitig in einer Probe auch das Cholesterin ohne zusätzliche Reinigungsstufen bestimmt werden. Eine gute Wiederholbarkeit (Variationskoeffizienten unterhalb von 6 %) und Wiederfindungsraten von 79 bis 113 % in Käsen und Schweineschmalz und von 60 bis 88 % in Eipulver zeichnen diese Methode aus. Für die Oxidationsprodukte des Cholesterins liegt die Nachweisgrenze zwischen 0,1 und 0,2 µg/g Probe. Die Linearität der Methode wurde für jede untersuchte Verbindung überprüft. Der Zusatz von mit Deuterium markiertem und nicht-markiertem Cholesterin zeigte, dass eine Cholesterinoxidation während der Aufarbeitung vernachlässigbar ist und somit keine Artefakte entstanden sind. Mit einem Eipulver, das einen zertifizierten Cholesteringehalt aufwies, wurde die Cholesterinbestimmung überprüft.

Summary

A method for the quantification of cholesterol oxidation products (7 α - and 7 β -hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, 5 α ,6 α -epoxycholesterol and 25-hydroxycholesterol) in milk powder was applied and validated in other foods like egg powders, cheeses, butter and lard. The procedure allows soft saponification at room temperature, purification with an aminopropyl solid phase extraction cartridge and analysis by gas chromatography mass spectrometry. This procedure is noteworthy as the simultaneous analysis of cholesterol and its oxides from the same sample using a single clean-up. Good repeatability (coefficient of variation below to 6%) and recovery of cholesterol oxides between 79 and 113% in cheeses and lard, between 60 and 88% in egg powder are observed. The limit of quantification is 0,1-0,2 $\mu\text{g/g}$ of sample for the cholesterol oxides. The linearity of the method has been verified for each compound considered. Autoxidation of cholesterol during the clean-up was controlled and found negligible with labelled and unlabelled cholesterol spiked to the sample. The quantification of cholesterol has been verified using a certified reference egg powder.

Bibliographie

1. Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds.): Biological effects of cholesterol oxides, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1992.
2. Smith, L.L.: Cholesterol autoxidation. Plenum Press, New York 1981.
3. Rose-Sallin, C., Sieber, R., Bosset, J.O. et Tabacchi, R.: Mécanismes d'oxydation du cholestérol: un article de synthèse. Accepté pour publication dans le J. OCL-Oléagineux, Corps Gras, Lipides.
4. Finocchiaro, E.T. and Richardson, T.: Sterol oxides in foodstuffs: a review. J. Food Protect. **46**, 917-925 (1983).
5. Addis, P.B. and Park, S.W.: Cholesterol oxides content in foods. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J.: Biological effects of cholesterol oxides, 71-88. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1992.
6. Osada, K., Kodama, T., Cui, L., Yamada, K. and Sugano, M.: Levels and formation of oxidized cholesterols in processed marine foods. J. Agric. Food Chem. **41**, 1893-1898 (1993).
7. McCluskey, S. and Devery, R.: Validation of chromatographic analysis of cholesterol oxides in dried foods. Trends Food Sci. Technol. **4**, 175-178 (1993).
8. Pizzoferrato, L., Nicoli, S. and Lintas, C.: GC-MS characterization and quantification of sterols and cholesterol oxidation products. Chromatographia **35**, 269-274 (1993).
9. Sallin, C., Baumann, E., Bütikofer, U., Sieber, R. et Bosset, J.O.: Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques RP-HPLC. Trav. chim. aliment. hyg. **84**, 141-157 (1993).
10. Caboni, M.F., Toschi, T.G., Lerker, G. and Capella, P.: Analytical problems of oxisterols determination in lipid-containing foods. Riv. It. Sost. Grasse **71**, 243-246 (1994).
11. Claude, J.R. and Beaumont, J.L.: In vitro transformations of cholesterol: their importance during chromatographic analyses. J. Chromatogr. **21**, 189-201 (1966).

12. *Horvath, C.*: Quantitative determination of cholesterol in autooxidation mixtures by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* **22**, 52-59 (1966).
13. *Kim, S.K. and Nawar, W.W.*: Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids* **28**, 917-922 (1993).
14. *Wasilchuk, B.A., Le Quesne, P.W. and Vouros, P.W.*: Monitoring cholesterol autoxidation processes using multideuteriated cholesterol. *Anal. Chem.* **64**, 1077-1087 (1992).
15. *Rose-Sallin, C., Huggett, A.C., Bosset, J.O., Tabacchi, R. and Fay, L.B.*: Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [²H₇]cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 935-941 (1995).
16. *Van de Bovenkamp, P., Kosmeijer-Schuil, T.G. and Katan, M.B.*: Quantification of oxysterols in Dutch foods: egg products and mixed diets. *Lipids* **23**, 1079-1085 (1988).
17. *Nielsen, J.H., Olsen, C.E., Duedahl, C. and Skibsted, H.*: Isolation of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. *J. Dairy Res.* **62**, 101-113 (1995).
18. *Dieffenbacher, A., Golay, P.A. und Fay, L.B.*: Einige Bemerkungen zur Anwendung der offiziellen Methoden des § 35 des Deutschen Lebensmittelgesetzes zur Bestimmung des Cholesteringehaltes in Eiersatzprodukten. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **90**, 74-77 (1994).
19. *Imhof, M., Knecht, P. und Bosset, J.O.*: Die Bestimmung der freien Fettsäuren in Milch und Rahm. IV. Standardisierung der Extraktion von freien Fettsäuren und Untersuchung der Probenstabilität. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **86**, 157-168 (1995).
20. *Guardiola, F., Codony, R., Rafecas, M. and Boatella, J.*: Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *J. Chromatogr. A* **705**, 289-304 (1995).
21. *Pie, J.E., Spahis, K. and Seilan, C.*: Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 973-979 (1990).
22. *Fenton, M.*: Chromatographic separation of cholesterol in foods. *J. Chromatogr.* **624**, 369-388 (1992).

Prof. Raffaele Tabacchi
Institut de chimie
Université de Neuchâtel
CH-2000 Neuchâtel

Christine Rose-Sallin
Dr Robert Sieber
Dr Jacques Olivier Bosset
Station fédérale de recherches laitières
CH-3097 Liebefeld-Berne

CHAPITRE 4

Applications à quelques produits laitiers: Aspects technologiques

Christine Rose-Sallin, Robert Sieber, Jacques Olivier Bosset

Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne

Raffaele Tabacchi

Institut de chimie, Université de Neuchâtel, Neuchâtel

Food Science & Technology. Sous presse

Introduction

Le cholestérol est un alcool insaturé qui est facilement oxydé par voie enzymatique, par autoxydation ou lors de son exposition à la chaleur, à la lumière ou à des radiations (1, 2). A ce jour, plus de 60 produits d'oxydation du cholestérol (oxystérols) ont été identifiés tant dans des milieux naturels comme le plasma sanguin, les extraits de tissu animaux et les denrées alimentaires que dans des systèmes modèles. Lors d'études expérimentales, certains de ces composés ont présenté des activités biologiques indésirables (3) comme des effets inhibiteurs d'enzyme lors de la biosynthèse du cholestérol (4), des effets mutagènes et cytotoxiques (5). Plusieurs études ont également impliqué les oxystérols, en particulier le 25-hydroxycholestérol et le cholestanetriol, plutôt que leur précurseur, le cholestérol, dans la formation de lésions athéromateuses (6, 7).

Ces quinze dernières années, la formation de ces composés dans les denrées alimentaires a suscité un intérêt particulier. Plusieurs articles de synthèse traitent de ce thème (8-11). Les aliments concernés se limitent à ceux d'origine animale, étant

donné que ce sont les seuls qui contiennent des quantités notables de cholestérol. Les principaux cités dans la littérature sont les produits laitiers et carnés, les poudres d'oeuf, les poissons et les huiles à frire. Les oxystérols dominants sont les 7α - et 7β -hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol, les $5\alpha,6\alpha$ - et le $5\beta,6\beta$ -époxycholestérol, le $3\beta,5\alpha,6\beta$ -cholestanetriol, le 25-hydroxycholestérol et le cholesta-4,6-diène-3-one (8).

Dans les denrées alimentaires, les oxystérols ont deux origines principales: une autoxydation et une oxydation induite par la chaleur, la lumière ou d'autres radiations (2). Certains procédés de fabrication, certaines conditions de préparation et de stockage (rencontrées parfois dans un cadre culinaire) favorisent leur formation (9). Des facteurs tels qu'une forte élévation de la température, une exposition prolongée à la lumière, un stockage au contact même de traces d'oxygène, la présence de radicaux libres, de métaux de transition catalyseurs, d'agents prooxydants ou l'absence relative d'antioxydants peuvent accélérer l'oxydation du cholestérol.

Des études modèles ont montré qu' en présence de triglycérides un traitement du cholestérol à température élevée peut générer de grandes quantités d'oxystérols (12). Dans un beurre chauffé 10 min dans une poêle de cuisine, la formation de ces derniers est croissante avec la température (150-190°C) (13). D'importantes teneurs d'oxystérols ont été détectées dans du suif fortement chauffé (14, 15). Des aliments frits dans des graisses animales, comme des pommes frites sont donc en mesure de contenir d'importantes quantités d'oxystérols (16).

Quant aux technologies mises en oeuvre, certains procédés de séchage par vaporisation directe (« direct spray drying ») peuvent affecter la stabilité du cholestérol dans des aliments déshydratés. Des teneurs élevées en oxystérols, notamment en 5,6-époxycholestérol épimères, ont été déterminées dans des poudres d'oeuf obtenues par chauffage direct (« direct gas fired ») alors que de faibles traces ont été trouvées dans des poudres traitées par chauffage indirect (« indirect stream heated ») (17, 18). Il semblerait que ce soit la présence d'oxydes d'azote (NO_x) et de radicaux libres générés durant le processus de combustion qui soit responsable de la formation de ces composés lors du séchage par vaporisation directe (« direct gas-fired spray-dryer ») des poudres d'oeuf (19, 20). L'effet prooxydant des NO_x a

également été démontré lors du séchage par chauffage direct d'un lait entier en poudre (21).

Le stockage peut aussi jouer un rôle clé dans la formation des oxystérols. Si les poudres d'oeuf et les viandes lyophilisées y sont particulièrement sensibles, en raison de leur forte teneur en fer et en graisses insaturées, les produits laitiers tels que beurres et fromages semblent cependant moins délicats (9, 22). A basse température (où les cinétiques sont plus lentes, mais où la solubilité de l'oxygène est meilleure), une longue période de stockage est nécessaire pour générer des oxystérols (23, 24). En revanche, une exposition à la lumière du jour ou fluorescente accélère l'oxydation (23, 25, 26).

Sur le plan analytique, de nombreuses méthodes de dosage des oxystérols dans les denrées alimentaires ont été développées ces dernières années. De très grandes variations dans les valeurs rapportées pour un même type de produit ainsi que le manque d'informations analytiques (taux de récupération, domaines de linéarité, limites de détection, etc.) sont parfois à l'origine de controverses. Le dosage de ces composés est en effet problématique. Il implique d'une part plusieurs étapes de purification, durant lesquelles ces composés peuvent être détruits ou/et formés par oxydation artefactuelle du cholestérol, et d'autre part une confirmation du dosage par spectrométrie de masse (MS). Une validation de la méthode selon des critères analytiques rigoureux s'impose donc (27). Dans une telle perspective, une méthode d'analyse des oxystérols par chromatographie en phase gazeuse (GC) avec une détection par MS en mode « selected ion monitoring » (SIM) a été récemment proposée (28). Elle permet d'effectuer un contrôle de l'oxydation artefactuelle du cholestérol durant les étapes d'enrichissement et l'analyse parallèle du cholestérol, sans étapes supplémentaires de purification (29). Cette méthode de dosage, validée d'abord dans les laits en poudre, a permis de démontrer la faible exposition des laits en poudre et des formules infantiles du commerce à la formation de tels produits d'oxydation (27). Elle a ensuite été validée et appliquée avec succès à d'autres denrées alimentaires telles que poudres de jaunes d'oeuf, saindoux, fromages et beurre fondu (28).

Cette double validation analytique de la méthode de dosage des oxystérols permet donc de reconsidérer dans le présent travail les effets de certains procédés de fabrication, de conditions de stockage et de traitements à des fins culinaires de quelques produits laitiers frais du commerce susceptibles d'oxyder le cholestérol.

Matériel et Méthodes

Echantillons

Les échantillons suivants, provenant d'un commerce local, ont été utilisés: un lait entier en poudre; 2 beurres fondus (beurres à rôtir anhydres), l'un en mousse (fouetté sous azote), l'autre durci; 6 fromages fondus conditionnés en tranches fines (A), en portions (B-E) et en pot de verre (F); 2 fromages à pâte mi-dure (l'un de table, l'autre à raclette) ainsi qu'un fromage à pâte dure (parmesan râpé).

A l'exception des échantillons destinés à une étude du stockage, les autres ont été analysés immédiatement à l'état frais.

Stockage des produits laitiers

Le beurre fondu en mousse a été stocké 30 mois dans un congélateur à l'abri de la lumière dans une barquette en PET (280 μm d'épaisseur, doublée d'une couche cartonnée à l'extérieur et comportant un opercule en feuille d'aluminium). Le parmesan râpé, conditionné en sachet hermétique transparent de 50 g (type d'emballage non communiqué par le fabricant), a été stocké 25 mois à - 24°C. Ce sachet a ensuite été ouvert pour le saturer en air, puis refermé avec un trombone pour éviter le dessèchement du produit. Il a alors été stocké, dans ces conditions, pendant 3 mois à 4°C, afin de simuler un stockage usuel dans un ménage.

Traitement thermique des fromages et du beurre fondu

Afin de déterminer les effets d'un traitement thermique sur l'oxydation du cholestérol du fromage en cours de fusion, des tranches de fromage à raclette de 4 mm d'épaisseur et de fromage fondu (A) de 2 mm d'épaisseur ont été chauffées dans un four à infrarouge (four à raclette). Pendant cette opération, la température a été mesurée avec un thermomètre de type PT 100.

Le beurre fondu, utilisé en cuisine comme « beurre à rôtir » a été chauffé dans un récipient en verre placé dans une étuve. Ce dispositif permet en effet un contrôle plus précis de la température que dans une poêle à frire et évite le contact avec une surface métallique mal définie.

Exposition de fromages à la lumière

Afin d'étudier les conditions de stockage dans un linéaire de distribution, 3 fromages ont été stockés dans leur emballage transparent d'origine à env. 6°C et exposés à la lumière de type « blanc froid » émise par 3 tubes fluorescents Philips 33* (5600 Lx). Ce type de lumière est particulièrement agressif en raison de son spectre d'émission riche en énergie, notamment dans le bleu-vert où se situe la 3^{ème} bande d'absorption de la riboflavine ($\lambda_{\max} = 444 \text{ nm}$), un puissant photosensibilisateur présent dans les produits laitiers (30). Vu la faible profondeur de pénétration de la lumière dans une telle matrice, la photooxydation du fromage de table emballé sous film transparent (film en PVC de 350 μm), a été étudiée en surface: une tranche de 3 mm d'épaisseur a été prélevée sur la face exposée à la lumière et homogénéisée pour l'analyse. Une tranche identique d'un second fromage de table entreposé à la même température mais à l'obscurité a été analysée comme référence. Pour le fromage fondu A, conditionné en tranches emballées individuellement sous film transparent†, deux tranches entières, exposée et non exposée à la lumière, ont été homogénéisées pour l'analyse. L'intérêt d'un tel échantillonnage est de permettre l'étude de l'influence du seul facteur « lumière », puisque l'on tient compte ainsi du facteur « oxygène » (diffusion, perméabilité de l'emballage) grâce à l'échantillon de référence gardé à l'obscurité. Le fromage fondu F, conditionné en bocal de verre transparent incolore, avec un couvercle en fer blanc, a été étudié selon les 3 zones a, b et c définies par la figure 1. La zone centrale b peut être considérée comme la référence puisqu'elle n'a pas reçu de lumière.

* Montés directement dans le réfrigérateur

† Emballage Resinex 225 de Borden, Apeldoore, Holland: film polyoléfinique de 35 μm comportant deux couches de PP et une de EVA(C)

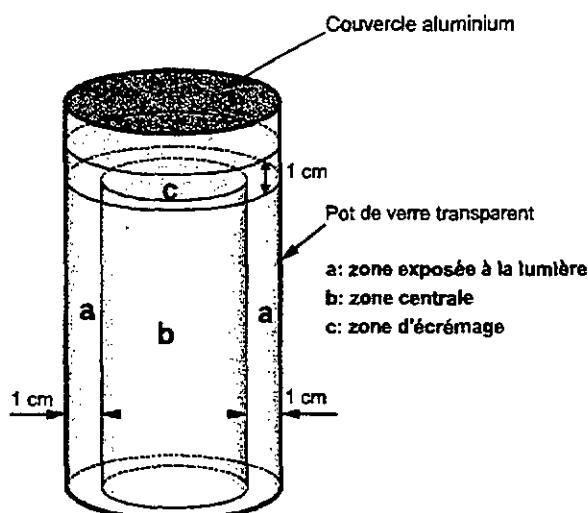


Figure 1. Zones de prélèvement des échantillons du fromage F conditionné dans un bocal en verre transparent et exposé à la lumière

Stockage du lait en poudre

Afin d'étudier l'effet de l'activité en eau et de la teneur en oxygène sur l'oxydation du cholestérol durant un stockage de lait en poudre, des conditions assez extrêmes ont été choisies. Un lait en poudre ayant une teneur en matière grasse de 280 g/kg a été conditionné, [sous 3 atmosphères contrôlées (azote, air et 660 mL/L d'oxygène) et avec des activités en eau différentes ($a_w = 0.05; 0.11; 0.22$ et 0.33)], dans des boîtes métalliques étanches et conservé pendant 1 année à 30°C

Analyse du cholestérol et de ses produits d'oxydation

Les dosages en parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation ont été effectués avec la méthode par GC-MS précédemment validée (28). Le procédé de purification comporte une saponification douce de l'échantillon, une extraction de l'insaponifiable et une extraction sur cartouche aminopropyle. Un tel mode opératoire permet un enrichissement suffisant des oxystérols et une séparation quantitative du cholestérol ce qui rend possible leur analyse successive par GC-MS en mode SIM. Un ajout de cholestérol purifié à un échantillon de chaque série d'analyses a en outre permis de confirmer l'absence de formation artefactuelle d'oxystérols durant les différentes étapes d'enrichissement.

Résultats et discussion

Produits laitiers analysés à l'état frais ou après stockage à basse température

Les résultats du dosage des oxystérols dans des produits laitiers analysés à l'état frais ou conservés à basse température sont reportés dans le tableau 1.

Produit	cholestérol (mg/g)	Stockage		Produits d'oxydation du cholestérol ($\mu\text{g/g}$ d'échantillon)						
		durée (mois)	temp. (°C)	7 α -OH	7 β -OH	7-céto	triol	25-OH	α -époxy	total
Fromages fondus										
A	0.69	Frais		< 0.10	< 0.10	0.10 \pm 0.00	N.D.	N.D.	N.D.	0.10
B	0.63	Frais		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C	0.59	Frais		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D (allégé)	0.19	Frais		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E	—	Frais		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fromages										
parmesan râpé	—	25	-24	N.D.	N.D.	< 0.10	N.D.	N.D.	N.D.	< 0.10
parmesan râpé (emballage ouvert)	—	3	+4	N.D.	N.D.	< 0.10	N.D.	N.D.	N.D.	< 0.10
à raclette	0.85	Frais		< 0.10	< 0.10	0.10 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.10
Beurre fondu										
durci	1.99	Frais		N.D.	N.D.	< 0.20	N.D.	< 0.20	N.D.	< 0.20
en mousse ¹	2.43	30	-24	< 0.20	< 0.20	0.28	< 0.20	< 0.20	N.D.	0.28

La détermination des oxystérols est faite en double ($n = 2$); les moyennes \pm écarts-types sont indiqués

¹ La détermination des oxystérols a été faite pour cet échantillon en simple ($n = 1$)

Abréviations: N.D. = non détecté; — = non analysé; 7 α -OH = 7 α -hydroxycholestérol;
7 β -OH = 7 β -hydroxycholestérol; 7-céto = 7-cétocholestérol; triol = 3 β ,5 α ,6 β -cholestanetriol;
25-OH = 25-hydroxycholestérol; α -époxy = 5 α ,6 α -époxycholestérol

Tableau 1. Teneur en oxystérols et en cholestérol dans des produits laitiers analysés à l'état frais ou après stockage à basse température

Sur les 5 fromages fondus et le fromage à raclette analysés frais, seuls les fromages fondu A et à raclette contenaient de faibles traces de 7-cétocholestérol, de 7 α - et 7 β -hydroxycholestérol, d'ailleurs à la limite de quantification ($\leq 0.10 \mu\text{g/g}$ de fromage). Dans le parmesan râpé conservé 25 mois à -24°C dans son emballage d'origine intact, des traces non quantifiables de 7-cétocholestérol ont été détectées. Le fait

d'ouvrir l'emballage du parmesan râpé (contact avec l'air) n'a pas généré d'oxystérols lors d'une conservation de cet échantillon 3 mois à 4°C.

Le beurre fondu en mousse, stocké 30 mois à -24°C dans une barquette en PET contenait 0.28 µg/g de 7-cétocholestérol ainsi que des traces non quantifiables (< 0.20 µg/g de beurre) des 7α- et 7β-hydroxycholestérol, de cholestanetriol et de 25-hydroxycholestérol. Le beurre fondu durci analysé à l'état frais ne contenait que des traces de 7-cétocholestérol et de 25-hydroxycholestérol, en dessous de la limite de quantification.

L'analyse parallèle du cholestérol dans ces échantillons a permis d'évaluer un taux d'oxydation ne dépassant pas environ 0.1‰. Les techniques de fabrication de ces fromages et de ces beurres fondus semblent donc suffisamment douces pour les protéger d'une oxydation du cholestérol. La basse température de stockage du parmesan râpé et du beurre fondu semble en outre offrir une protection efficace contre l'oxydation du cholestérol durant cette longue période. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Nourooz-Zadeh et Appelqvist (13) qui n'ont détecté que de faibles traces non quantifiables d'oxystérols dans des fromages fondus (« hard and soft melted cheeses ») stockés plusieurs mois à 4°C et dans des beurres fondus (emballage d'origine protégé par une feuille en aluminium). Ces auteurs ont en revanche déterminé une teneur totale en oxystérols comprise entre 0.2 et 0.7 µg/g d'échantillon dans des fromages râpés stockés plusieurs mois à température ambiante et entre 2.4 à 3.4 µg/g dans des beurres stockés 4 mois à 4°C.

Sander *et al.* (31) ont détecté des teneurs plus importantes en oxystérols pouvant atteindre 15 µg/g dans 13 produits laitiers frais du commerce; 8 d'entre eux contenaient surtout le 5α,6α-époxycholestérol. Sur 57 échantillons de fromages en poudre de type Cheddar, Bleu, Parmesan et Romano analysés, 16 contenaient de 3 à 57 µg/g d'oxystérols au total, avec à nouveau le 5α,6α-époxycholestérol comme composé majeur. Ces valeurs relativement élevées soulèvent cependant certaines questions: proviennent-elles d'une mauvaise qualité de départ des échantillons

* emballage non spécifié

examinés (échantillons non représentatifs du commerce) ou ont-elles une origine artefactuelle?

Fromages et beurre fondu après traitement thermique

Les teneurs en oxystérols mesurées dans le fromage à raclette et dans le fromage fondu A après fusion dans un four à raclette sont reportées dans le tableau 2.

Fromage (état)	Chauffage		Produits d'oxydation du cholestérol ($\mu\text{g/g}$ d'échantillon)						
	durée (min)	temp. max. (°C)	7 α -OH	7 β -OH	7-céto	triol	25-OH	α -époxy	total
A raclette									
(liquide)	1.5	70°C	< 0.10	< 0.10	0.15 \pm 0.00	N.D.	N.D.	N.D.	0.15
(en ébullition)	3.5	105°C	< 0.10	< 0.10	0.16 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.16
(séparation en 2 phases)	5.0	134°C	< 0.10	< 0.10	0.17 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.17
Fondu A									
(liquide)	1.0	64°C	< 0.10	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.20
(en ébullition)	3.0	98°C	0.10 \pm 0.00	0.12 \pm 0.00	0.12 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.34
(brunissement)	4.5	98°C	0.12 \pm 0.00	0.14 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.41

Abréviations: voir légende du tableau 1

La détermination des oxystérols est faite en double (n = 2); les moyennes \pm écarts-types sont indiqués

Tableau 2. Teneur en oxystérols d'un fromage à raclette et d'un fromage fondu chauffés dans un four à infrarouge

Dé faibles quantités d'oxystérols notamment de 7-cétocholestérol ont été détectées. Elle tendaient à croître avec le temps de chauffage, atteignant un total d'oxystérols de 0.41 $\mu\text{g/g}$ d'échantillon dans le fromage fondu A après 4.5 min de chauffage. Cette teneur ne correspondait toutefois qu'à une oxydation d'environ 0.6‰ du cholestérol. Ces résultats montrent qu'un traitement thermique même très intense (allant jusqu'au brunissement ou à une séparation du fromage en 2 phases) ne génère pratiquement aucun oxystérol. La teneur en eau de ces fromages semble exercer une action protectrice en limitant la température au voisinage de 100°C.

Le tableau 3 indique les teneurs en oxystérols mesurées dans le beurre fondu chauffé 30 min à 2 températures différentes.

Aspects technologiques

Chauffage		Produits d'oxydation du cholestérol ($\mu\text{g/g}$ d'échantillon)						
durée (min)	température ($^{\circ}\text{C}$)	7 α -OH	7 β -OH	7-céto	triol	25-OH	α -époxy	total
-	-	N.D.	N.D.	< 0,20	N.D.	< 0,20	N.D.	< 0,20
5	170-175	N.D.	N.D.	< 0,20	N.D.	< 0,20	N.D.	< 0,20
15	170-175	< 0,20	N.D.	< 0,20	N.D.	< 0,20	N.D.	< 0,20
30	170-175	0,26 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02	0,82 \pm 0,02	N.D.	< 0,20	0,20 \pm 0,01	1,61
5	205-210	N.D.	N.D.	< 0,20	N.D.	< 0,20	N.D.	< 0,20
10	205-210	< 0,20	< 0,20	0,26 \pm 0,00	N.D.	< 0,20	N.D.	0,26
30	205-210	3,87 \pm 0,03	6,49 \pm 0,03	5,68 \pm 0,05	N.D.	0,36 \pm 0,00	2,81 \pm 0,02	19,21

Abréviations: voir légende du tableau 1

La détermination des oxystérols est faite en double ($n = 2$); les moyennes \pm écarts-types sont indiqués

Tableau 3. Teneur en oxystérols d'un beurre fondu chauffé

Pendant les 15 premières min à 170-175 $^{\circ}\text{C}$, aucun oxystérol n'a été formé. Après 30 min de chauffage, de faibles quantités de 7-cétocholestérol, de 7 α - et 7 β -hydroxycholestérol et de 5 α ,6 α -époxycholestérol sont apparues, correspondant à une concentration totale d'oxystérols de 1,61 $\mu\text{g/g}$ d'échantillon. Après 10 min à 205-210 $^{\circ}\text{C}$, des traces de 7-cétocholestérol ont été mises en évidence. Après 30 min à cette température, 19 $\mu\text{g/g}$ d'oxystérols totaux ont été quantifiés. Le cholestanetriol était le seul composé à ne pas avoir été détecté. Cette oxydation ne représentait toutefois qu'une proportion minime du cholestérol total ($\leq 10\%$).

Dans un beurre chauffé 10 min à 180 $^{\circ}\text{C}$ dans un récipient en verre, Csiky (32) a mesuré 11,2 $\mu\text{g/g}$ de 7-cétocholestérol, 52,2 $\mu\text{g/g}$ de 7 α -hydroxycholestérol et 19,7 $\mu\text{g/g}$ de 7 β -hydroxycholestérol. Dans des conditions techniques identiques, Pie *et al.* (33) y ont également détecté ces 3 composés ainsi que les 5,6-époxycholestérol épimères, soit un total de 14,6 $\mu\text{g/g}$ d'oxystérols. Nourooz-Zadeh et Appelqvist (13) y ont par contre trouvé ces composés en quantités nettement inférieures: de 1 à 2,3 μg d'oxystérols au total par g de lipides (1 g de beurre = env. 0,86 g de lipides) lors d'un traitement thermique dans une poêle 10 min à 170 $^{\circ}\text{C}$, 180 $^{\circ}\text{C}$, 190 $^{\circ}\text{C}$ et 200 $^{\circ}\text{C}$ respectivement. Si les composés identifiés dans le présent travail sont qualitativement les mêmes que ceux rapportés par ces différents auteurs, les concentrations mesurées (cf. tableau 3) sont toutefois très inférieures. Une

comparaison de ces résultats est pourtant difficile. Si les paramètres de temps de chauffage et de température sont comparables, d'autres facteurs tels que le rapport de la surface au volume du produit exposé à l'oxygène, l'état de fraîcheur du beurre utilisé, sa teneur en ions métalliques (cuivre,...) voire le contact avec une surface donnée (poêle en fer, récipient en verre, etc.) peuvent en revanche grandement influencer les résultats. La méthode de dosage utilisée est également un facteur déterminant, qui pourrait même expliquer à elle seule, les différences de teneurs en oxystérols, en raison par exemple d'une origine artefactuelle de certains d'entre eux. Csiky (32) justifie d'ailleurs les limites de sa méthode de dosage (détection dans l'UV à 206 nm) pour des échantillons peu oxydés en raison d'interférences causées par des produits de dégradation.

Fromages exposés à la lumière

Le tableau 4 indique les teneurs en oxystérols de 3 fromages exposés ou non à une lumière fluorescente. La durée du test effectué à env. 6°C est inférieure à celle indiquée par le fabricant sur l'emballage pour consommation du fromage.

Fromage	Cholestérol		Produits d'oxydation du cholestérol ($\mu\text{g/g}$ d'échantillon)							
	(mg/g)	Stockage à 6°C durée éclaircissement (jours) (5600 lx)	7 α -OH	7 β -OH	7-céto	triol	25-OH	α -époxy	total	
De table	0.67	63 non	0.11 \pm 0.00	0.17 \pm 0.01	0.29 \pm 0.02	N.D.	N.D.	N.D.	0.57	
1	---	63 oui	0.36 \pm 0.03	0.47 \pm 0.05	1.12 \pm 0.05	N.D.	< 0.10	< 0.10	1.95	
Fondu A	0.69	63 non	21.99	23.93	20.19	0.18	0.55	2.41	69.25	
	---	63 oui	< 0.10	< 0.10	0.11 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.11	
Fondu F/b ²	0.87	113 non	22.95 \pm 0.27	23.14 \pm 0.09	27.30 \pm 0.39	0.24 \pm 0.04	1.50 \pm 0.16	3.15 \pm 0.06	78.28	
Fondu F/a ²	0.90	113 oui	N.D.	N.D.	< 0.10	N.D.	N.D.	N.D.	< 0.10	
Fondu F/c ²	1.37	113 non	< 0.10	< 0.10	0.14 \pm 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.14	

Abréviations: voir légende du tableau 1

La détermination des oxystérols est faite en double (n = 2); les moyennes \pm écarts-types sont indiqués

¹ Echantillon avec défaut d'emballage, partiellement desséché et moisi en surface après stockage; a été analysé en simple (n = 1)

² Cf. zones de prélèvement des échantillons (Fig. 1); a = zone photooxydée; b = référence à l'obscurité (milieu non translucide);

c = zone d'écrémage en surface

Tableau 4. Teneurs en oxystérols et en cholestérol de fromages stockés avec et sans exposition à la lumière (blanc froid)

Les fromages de table et fondu A, gardés comme référence à l'abri de la lumière, contenaient de faibles quantités de 7-cétocholestérol, de 7 α - et de 7 β -hydroxycholestérol. Leur exposition à la lumière pendant 63 jours a généré de plus importantes teneurs en ces 3 oxystérols, ainsi que, dans une moindre mesure, en 5 α ,6 α -époxycholestérol, en 25-hydroxycholestérol et en cholestanetriol. Au total 1.95 $\mu\text{g/g}$ d'oxystérols ont été trouvés dans le fromage de table, ce qui ne représente en fait que 3‰ du cholestérol. En revanche, dans un autre échantillon provenant du même lot mais présentant un défaut d'emballage (inétanchéité à l'oxygène démontrée par l'apparition de moisissures et par un certain dessèchement en surface), on a constaté une très forte teneur en oxystérols de 69.25 $\mu\text{g/g}$. Le fromage fondu A exposé à la lumière, contenait 78.28 $\mu\text{g/g}$ d'oxystérols contre seulement 0.11 $\mu\text{g/g}$ pour la référence (même produit conservé à l'obscurité). Ce type d'échantillon, conditionné en tranches fines emballées individuellement sous film transparent, semble donc très sensible à une photooxydation en raison certainement de son rapport surface exposée/volume exposé et compte tenu d'une certaine diffusion (probable mais inconnue des auteurs) de l'oxygène au travers de ce type d'emballage. Les teneurs élevées mesurées dans ces 2 fromages représentaient de 10 à 11% d'oxydation du cholestérol.

Quant au fromage fondu F emballé dans un pot en verre et stocké 113 jours à la lumière, il ne contenait en revanche pratiquement pas d'oxystérol. Aucune oxydation du cholestérol n'a été observée dans la zone exposée à la lumière (zone a). Seules de faibles traces de 7-cétocholestérol, de 7 α - et de 7 β -hydroxycholestérol ont pu être mises en évidence dans la zone d'écémage sous le couvercle (zone c), où de la matière grasse, par conséquent du cholestérol et des oxystérols ont migré. Bien que transparent, l'emballage de verre (pot étanche à l'oxygène) de ce produit semble donc offrir une bonne protection contre une (photo)oxydation du cholestérol de ce produit.

Sander *et al.* (23) ont signalé la formation de 7-cétocholestérol et de 5 α ,6 α -époxycholestérol durant les 3 premières semaines de stockage de poudres de fromage Cheddar dans des tubes en verre sellés exposés à une lumière fluorescente (1611 lx) avec au total 26 $\mu\text{g/g}$ d'oxystérols. Durant les 9 semaines suivantes

d'illumination, ces composés se sont cependant dégradés. Lors d'un stockage à 4°C avec exposition à une lumière fluorescente (520 lx), Nielsen *et al.* (26) ont observé que la concentration d'oxystérols dans un fromage jaune en tranches demeurait pratiquement constante pendant les 55 jours du test. Une quantité totale d'oxystérols de 30 µg/g de lipides a été cependant générée dans un fromage jaune râpé stocké 72 jours et de 238 µg/g (dont 215 µg/g du seul 7-cétocholestérol) dans un fromage Feta gardé 30 jours dans un emballage ouvert. Une forte augmentation de la teneur en 7-cétocholestérol a été constatée dans ces 2 fromages, ainsi qu'en 7α- et 7β-hydroxycholestérol dans le fromage jaune râpé et en 5,6-époxycholestérol épimères dans le fromage Feta. En dépit de l'intérêt évident de ces valeurs, une comparaison de celles-ci avec les teneurs en oxystérols mesurées dans le cadre du présent travail est exclue, les conditions expérimentales adoptées par les divers auteurs (température et durée de stockage, l'intensité et le type de lumière, produit laitier et type d'emballage considérés) étant fort diverses. Ces résultats confirment néanmoins la sensibilité du cholestérol des fromages à la photooxydation. L'étanchéité de l'emballage de l'aliment exposé à l'égard de l'oxygène semble aussi importante que sa translucidité (cf. tableau 4).

*Lait en poudre stocké sous diverses atmosphères
contrôlées avec diverses activités en eau*

Le tableau 5 montre l'influence de l'activité en eau et de la teneur en oxygène sur l'oxydation du cholestérol dans un lait entier en poudre stocké une année à 30°C.

Activité en eau	Oxystérols totaux (µg/g) ¹								
	azote			air (210 mL/L d'oxygène)			oxygène (660 mL/L)		
	\bar{x}	s_x	n	\bar{x}	s_x	n	\bar{x}	s_x	n
0.05	0.20	0.05	3	—	—	—	—	—	—
0.11	—	—	—	5.13	0.17	2	120.35	6.35	2
0.22	0.26	0.01	3	2.54	0.27	2	13.92	0.64	2
0.33	—	—	—	1.41	0.33	2	5.20	0.39	2

¹ Valeurs moyennes (\bar{x}) et écarts-types (s_x) de n déterminations

— = non analysé

Tableau 5. Teneur en oxystérols dans un lait en poudre stocké une année à 30° sous atmosphères contrôlées et avec différentes activités en eau

Lors d'un stockage sous atmosphère inerte (azote), seules des traces d'oxystérols ont été détectées dans un lait en poudre présentant une activité en eau normale ($a_w = 0.22$) ou relativement faible ($a_w = 0.05$). En revanche, on observe en présence d'oxygène une augmentation des plus marquées des valeurs en fonction d'une activité en eau décroissante. Un total de 120 $\mu\text{g/g}$ d'oxystérols a été déterminé dans les conditions les plus drastiques, soit dans le lait en poudre à faible activité en eau ($a_w = 0.11$) et en présence d'une atmosphère enrichie en oxygène (660 mL/L). Cette concentration correspond à env. 15% d'oxydation du cholestérol. Ces valeurs sont en accord avec la théorie formulée par Labuza qui indique un effet inhibiteur de la monocouche d'hydratation ($a_w = 0.2-0.3$) sur la vitesse d'oxydation lipidique, effet quasiment inexistant aux très basses activités en eau ($a_w < 0.2$) (34).

Comme un précédent travail l'a démontré (27), des laits en poudre du commerce stockés dans leur emballage d'origine (sous atmosphère inerte) ne sont que peu exposés à une oxydation du cholestérol.

Conclusion

La présente étude montre que les produits laitiers frais ou stockés dans de « bonnes » conditions (emballages étanches et présentant une faible perméabilité à l'oxygène, stockage à l'abri de la lumière et de l'air et peu sollicités thermiquement) ne sont pratiquement pas exposés à une oxydation de leur cholestérol. Une bonne qualité du produit de départ ainsi que les précautions prises pour empêcher toute oxydation lipidique en général semblent également efficaces pour prévenir l'oxydation du cholestérol. Les procédés de fabrication des fromages considérés dans cette étude ne génèrent pas d'oxystérols. De même leur traitement thermique, par exemple à l'aide d'un four à raclette, ne constitue pas un grand facteur de risque.

Un beurre fondu chauffé 30 min à 205-210°C (conditions extrêmes exceptionnelles en cuisine) contient en revanche une certaine quantité de ces composés. Un stockage prolongé de fromages emballés sous film translucide peut induire une oxydation, même marquée en cas d'exposition simultanée à une lumière de type « blanc froid ». De telles conditions sont néanmoins extrêmes: d'une part les tubes Philips 33 sont

particulièrement agressifs (on devrait leur préférer des tubes de type « blanc chaud » (30)) et d'autre part l'éclairement de 5600 lux est très intense. La durée du stockage retenue pour cette étude (de 2 à 4 mois environ) est probablement plus réaliste. La combinaison « lumière et oxygène » s'est avérée particulièrement critique (photooxydation) d'où l'intérêt d'emballages vraiment étanches à l'oxygène. Un lait en poudre stocké en présence d'oxygène (à l'air et sous atmosphère enrichie en oxygène), surtout s'il présente une faible activité en eau ($a_w < 0.22$), peut également être une source d'oxystérols. Les conditions relativement extrêmes choisies pour cette étude avaient comme objectifs d'évaluer le risque « maximum » de formation de tels composés dans le cadre de « tests accélérés ».

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier l'Institut Candia (Centre de recherche international André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France), la maison Cremo (Villars-sur-Glâne près Fribourg, Suisse ainsi que la Fédération des coopératives Migros (Zurich, Suisse) pour leur soutien financier accordé sous la forme d'une bourse offerte au premier auteur dans le cadre de sa thèse de doctorat.

Résumé

Le présent travail reconsidère les effets de certains procédés de fabrication, de conditions de stockage et de traitements à des fins culinaires de quelques produits laitiers à l'état frais du commerce susceptibles d'oxyder le cholestérol. Des fromages, des beurres fondus et un lait en poudre frais ou stockés à basse température à l'abri de la lumière et de l'oxygène ne contiennent pas ou que de faibles traces d'oxystérols. Faire fondre des fromages (raclettes) n'en génère pratiquement pas, mais porter un beurre fondu 30 min à 170-175°C ou plus de 10 min à 205-210°C en produit. Un stockage de fromages exposés à une lumière fluorescente (blanc froid) 2 à 4 mois à 6°C et d'un lait en poudre d'une activité en eau de 0.11 une année à 30°C en présence d'oxygène (660 mL/L) peut oxyder 10 à 15% du cholestérol. Ces résultats confirment la bonne stabilité du cholestérol dans les produits laitiers stockés et/ou traités dans des conditions « normales », les conditions extrêmes envisagées dans ce travail correspondant en fait à des tests accélérés.

Summary

Effects of some processing, storage conditions and cooking treatment on oxidation of cholesterol in commercial dairy products were investigated. No or only low traces of oxysterols were detected in fresh cheeses, butter oil and milk powder or after storage at low temperature by avoiding light and oxygen. Melting of cheeses (raclette) do not produce oxysterols, but heating butter oil 30 min at 170-175°C or more than 10 min at 205-210°C generated some oxysterols. Exposure of cheeses for 2-4 months at 6°C to fluorescent light (cool white) and storage of milk powder with an a_w -value of 0.11 in a oxygen containing atmosphere (660 mL/L) oxidized 10 to 15% of their cholesterol. Consequently the present work confirmed the good stability of cholesterol in dairy products under « normal » conditions of storage or heat treatment. The harsh conditions considered in this study correspond to those of accelerated tests.

Bibliographie

1. SMITH, L. L. *Cholesterol autoxidation*. New York: Plenum Press (1981)
2. ROSE-SALLIN, C., SIEBER, R., BOSSET, J. O. AND TABACCHI, R. Mécanismes d'oxydation du cholestérol: un article de synthèse. Accepté dans le *Journal français des oléagineux, corps gras et lipides*
3. PENG, S.-K. AND MORIN, R. J. (Eds). *Biological effects of cholesterol oxides*, London: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor (1992)
4. KANDUTSCH, A. A., CHEN, H. W. AND HEINIGER, H. J. Biological activity of some oxygenated sterols. *Science*, **201**, 498-501 (1978)
5. SEVENIAN, A. AND PETERSON, A. R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chemical Toxicology*, **24**, 1103-1110 (1986)
6. IMAI, H., WERTHESSEN, N. T., TAYLOR, B. AND LEE, K. T. Angiotoxicity and arteriosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, **100**, 565-571 (1976)
7. TAYLOR, B., PENG, S. K., WERTHESSEN, N. T., THAM, P. AND LEE, K. T. Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *American Journal of Clinical Nutrition*, **32**, 40-57 (1979)
8. FINOCCHIARO, E. T. AND RICHARDSON, T. Sterol oxides in foodstuffs: a review. *Journal of Food Protection*, **46**, 917-925 (1983)
9. ADDIS, P. B. AND PARK, S.W. Cholesterol oxides content in foods. In: PENG, S.-K. AND MORIN, R. J. (Eds) *Biological effects of cholesterol oxides*, London: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, pp. 71-88 (1992)
10. SIEBER, R. Oxidiertes Nahrungscholesterin - eine Primärursache der Arteriosklerose? Eine kritische Literaturübersicht. *Ernährung*, **10**, 547-556 (1986)
11. BOSINGER, S., LUF, W. AND BRANDL, E. Oxysterols: their occurrence and biological effects. *International Dairy Journal*, **3**, 1-33 (1993)
12. KIM, S. K. AND NAWAR, W. W. Oxidative interactions of cholesterol with triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **68**, 931-934 (1991)

13. NOUROOZ-ZADEH, J. AND APPELQVIST, L. A. Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: butter and cheese. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **65**, 1635-1641 (1988)
14. BASCOUL, J., DOMERGUE, N., OLLE, M. AND CRASTES DE PAULET, A. Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID. *Lipids*, **21**, 383-387 (1986)
15. PARK, S. W. AND ADDIS, P. B. Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**, 653-659 (1986)
16. ZHANG, W. B., ADDIS, P. B. AND KRICK, T. P. Quantification of 5 α -cholestane-3 β ,5,6 β -triol and other cholesterol oxidation products in fast food French fried potatoes. *Journal of Food Science*, **56**, 716-718 (1991)
17. TSAI, L. S. AND HUDSON, C. A. Cholesterol oxides in commercial dry egg products: quantitation. *Journal of Food Science*, **50**, 229-231 & 237 (1985)
18. MISSLER, S. R., WASILCHUK, B. A. AND MERRITT, C. JR. Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparations. *Journal of Food Science*, **50**, 595-598 & 646 (1985)
19. MORGAN, J. N. AND AMSTRONG, D. J. Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray-dried with direct heating. *Journal of Food Science*, **57**, 43-45 & 107 (1992)
20. LAI, S. M., GRAY, J. I., BUCKLEY, D. J. AND KELLY, P. M. Influence of free radicals and other factors on formation of cholesterol oxidation products in spray-dried whole egg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 1127-1131 (1995)
21. CHAN, S. H., GRAY, J. I., GOMAA, E. A., HARTE, B. R., KELLY, P. M. AND BUCKLEY, D. J. Cholesterol oxidation in whole milk powder as influenced by processing and packaging. *Food Chemistry*, **47**, 321-328 (1993)
22. NIELSEN, J. H., OLSEN, C. E., JENSEN, C. AND SKIBSTED, L. H. Cholesterol oxidation in butter and dairy spread during storage. *Journal of Dairy Research*, **63**, 159-167 (1996)
23. SANDER, B. D., SMITH, D. E., ADDIS, P. B. AND PARK, S. W. Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products. *Journal of Food Science*, **54**, 874-879 (1989)
24. NIELSEN, J. H., OLSEN, C. E., JENSEN, C. AND SKIBSTED, L. H. Cholesterol oxidation in butter and dairy spread during storage. *Journal of Dairy Research*, **63**, 159-167 (1996)
25. LUBY, J. M., GRAY, J. I. AND HARTE, B. R. Effects of packaging and light source on the oxidative stability of cholesterol in butter. *Journal of Food Science*, **51**, 908-911 (1986)
26. NIELSEN, J. H., OLSEN, C. E., DUEDAHL, C. AND SKIBSTED, L. H. Isolation and quantification of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. *Journal of Dairy Research*, **62**, 101-113 (1995)
27. McCLUSKEY, S. AND DEVERY, R. Validation of chromatographic analysis of cholesterol oxides in fried foods. *Trends in Food Science & Technology*, **4**, 175-178 (1993)
28. ROSE-SALLIN, C., HUGGETT, A. C., BOSSET, J. O., TABACCHI, R. AND FAY, L. B. Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [²H₇]cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 935-941 (1995)
29. ROSE-SALLIN, C., SIEBER, R., BOSSET, J. O. ET TABACCHI, R. Validation d'une méthode d'analyse permettant le dosage en parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation dans les denrées alimentaires. *Travaux de Chimie Alimentaire et d'Hygiène*. Sous presse (1996)
30. BOSSET, J. O., GALLMANN, P. U. ET SIEBER, R. Influence de la translucidité de l'emballage sur la conservation du lait et des produits laitiers. *Lait*, **73**, 3-49 (1993)
31. SANDER, B. D., ADDIS, P. B., PARK, S. W. AND SMITH, D. E. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. *Journal of Food Protection*, **52**, 109-114 (1989)
32. CSIKY, I. Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by adsorption high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **241**, 381-389 (1982)

33. PIE, J. E., SPAHIS, K. AND SEILLAN, C. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**, 973-979 (1990)
34. LABUZA, T. P. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technology*, **34** (4), 36-41&59 (1980)

CHAPITRE 5

Conclusion générale

La méthode de dosage des oxystérols par HPLC (cf. § 3.1) a permis d'isoler 6 oxystérols absorbant dans l'UV: le 25-hydroxycholestérol, le 20 α -hydroxycholestérol, le cholestane-3 β ,5 α -diol-6-one, le 7-cétocholestérol, les 7 α - et 7 β -hydroxycholestérol. On a constaté une bonne répétabilité des temps de rétention et des hauteurs des pics ainsi qu'une limite de détection située entre 0.2 et 1.3 μ g/ml (solution standard) lors de leur analyse à 204 nm (respectivement 242 nm pour le 7-cétocholestérol). En revanche, on n'a pas pu appliquer cette méthode au 5 α ,6 α -époxycholestérol et au cholestanetriol, composés particulièrement intéressants du point de vue toxicologique, mais dépourvus de chromophore dans l'UV. Lors de l'analyse d'un beurre fondu enrichi en oxystérols et purifié par extraction sur cartouche avec phase aminopropyle (SPE), de nombreux artefacts et/ou interférences sont apparus. En outre, les taux de récupération calculés étaient assez médiocres. Ces résultats ont ainsi montré les limites de cette technique et la nécessité d'améliorer le « clean-up ». Dans l'impossibilité d'abaisser le seuil de détection des oxystérols et de doser les composés non absorbants à ces longueurs d'onde, on a définitivement abandonné cette méthode.

La méthode par TLC (cf. § 3.2) a permis la séparation et la détection univoque de 9 oxystérols grâce à leur coloration spécifique (soit avant et après révélation à l'acide sulfurique et sous divers éclairages: 254 et 366 nm). Lors de son application à un beurre fondu oxydé, cette technique semi-quantitative a été cependant gênée par un important bruit de fond (traînée brunâtre) provenant des mono- et diglycérides et/ou de produits d'oxydation de la matière grasse. Elle a cependant été retenue comme

méthode qualitative pour l'étude du clean-up, en raison de sa simplicité et de son faible coût de mise en oeuvre.

La technique par GC (cf. § 3.3-3.5) est la plus performante pour séparer les oxystérols. Une (pré)dérivation de ces derniers en triméthylsilyléthers (TMS) a cependant été nécessaire pour augmenter leur volatilité et leur stabilité. Les 6 oxystérols formés en majeure partie dans les aliments et considérés comme les plus toxiques ont été retenus pour cette étude en raison d'une silylation complète de leurs fonctions alcooliques. Il s'agit du 25-hydroxycholestérol, du 7-cétocholestérol, du 5 α ,6 α -époxycholestérol, du cholestanetriol (présent sous forme di-TMS), des 7 α - et 7 β -hydroxycholestérol. Une détection par MS en mode SIM a permis de les analyser à des masses différentes (pics parfaitement résolus) et d'abaisser en outre leur limite de détection entre 0.1 et 0.3 ng/ml (solution standard).

La technique de purification et de concentration du cholestérol et de ses produits d'oxydation adoptée comporte plusieurs étapes, soit une saponification douce de l'échantillon, une extraction de l'insaponifiable et une extraction sur cartouche aminopropyle pour éliminer les autres composés de la matière grasse. Un tel clean-up permet en outre un enrichissement suffisant des oxystérols de même qu'une séparation quantitative du cholestérol ce qui rend possibles leurs dosages successifs. Il est donc aisé de déterminer le degré d'oxydation du cholestérol en recourant à un seul et même procédé de purification (cf. § 3.5).

Ce double dosage a ensuite été appliqué à des denrées alimentaires aussi diverses que des laits en poudre, des formules infantiles, des fromages, du beurre, du saindoux et des poudres d'oeuf. Un ajout de cholestérol (heptadeutééré et non deutéré) à ces échantillons a de plus permis d'effectuer un contrôle d'une éventuelle oxydation artefactuelle du cholestérol durant le clean-up. Il a montré qu'une bonne maîtrise de la méthode permettait de diminuer et de rendre négligeable cette formation artefactuelle. Les critères de validation usuels exigés actuellement pour l'accréditation d'une nouvelle méthode de dosage tels que répétabilité, domaines de linéarité (de la réponse et des ajouts), limites de détection et de quantification, taux de récupération ont été considérés.

Les avantages de cette méthode sont sa sensibilité, sa sélectivité, sa répétabilité, son caractère ménageant et son vaste domaine d'application. Cette méthode de dosage est néanmoins relativement complexe et laborieuse. Il faut env. 36 h pour effectuer le seul clean-up d'une série de 8 à 12 échantillons, sans compter le temps nécessaire à l'analyse proprement dite et à l'exploitation des résultats. Une simplification du dosage d'échantillons tels qu'un lait en poudre par GC-FID (calibration de l'appareil et exploitation des résultats plus rapide) n'a pas été possible en raison de trop importantes interférences dues à la matrice. En revanche, dans le cadre de l'accréditation (actuellement en cours à la FAM) de cette méthode, une première comparaison de cette technique de dosage des oxystérols (GC-MS en mode SIM) avec d'autres méthodes a pu être effectuée lors d'un premier essai interlaboratoire au niveau européen. Cet essai organisé par le Prof Appelqvist (Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala) au printemps 1995 avait pour objectif une harmonisation des méthodes analytiques. La grande diversité dans les résultats obtenus (au moins jusqu'à un facteur 100 pour certains oxystérols) n'a pu que confirmer le besoin impératif d'une méthode rigoureuse, fiable et reconnue internationalement. La bonne concordance des résultats obtenus par la FAM avec ceux d'un autre laboratoire ayant utilisé la même méthode de dosage atteste au moins la robustesse de la méthode développée dans le cadre de cette thèse de doctorat. Un deuxième essai collaboratif (en cours d'organisation), élaboré sur des bases plus solides devrait permettre d'apporter quelques solutions pratiques et de proposer une méthode de référence.

Quant à l'application de cette technique au dosage des oxystérols dans les produits laitiers (cf. § 3.4, 4), on a choisi les plus exposés à une oxydation tels que laits en poudre, formules infantiles, fromages (fondu, parmesan râpé, à raclette) et beurre fondu en fonction de leurs procédés de fabrication, de leurs conditions de stockage et de traitements à des fins culinaires. Les résultats de cette étude peuvent se résumer à ce qui suit:

- 1) Les produits laitiers à l'état frais ou stockés dans de « bonnes » conditions (basse température, à l'abri de l'oxygène et de la lumière) n'ont été que peu exposés à une oxydation de leur cholestérol.

- 2) Les laits en poudre et les formules infantiles conservés sous atmosphère inerte (emballage d'origine) ne contenaient pas ou que peu d'oxystérols.
- 3) Les procédés de fabrication des fromages considérés dans cette étude n'en ont pas généré. De même le traitement thermique de ces derniers à l'aide d'un four à infrarouge n'a pas présenté de risque particulier.
- 4) Un beurre fondu chauffé 30 min à 205-210°C (conditions exceptionnelles en cuisine) a généré en revanche une certaine quantité de ces composés.
- 5) Un stockage prolongé de fromages emballés sous film translucide non parfaitement étanche à l'oxygène a induit une forte oxydation en cas d'exposition à une lumière de type blanc froid.
- 6) Un lait en poudre stocké en présence d'oxygène (à l'air et sous atmosphère enrichie en oxygène), et surtout s'il présentait une activité en eau faible ($a_w < 0.22$) pouvait également être une source importante d'oxystérols.

Ces conditions assez extrêmes (cf. points 4 à 6) ont été choisies afin d'estimer le risque « maximum » de formation de tels composés dans le cadre de tests accélérés. Les teneurs maximales ainsi détectées représentaient une oxydation de 10 à 15% du cholestérol total. Les oxystérols détectés en majeure partie étaient le 7-cétocholestérol, le 7 α - et le 7 β -hydroxycholestérol. Ces résultats confirment la théorie sur les mécanismes d'oxydation du cholestérol (cf. § 2), plus particulièrement de l'autoxydation qui est favorisée en position allylique (carbone C7 du cholestérol) de la même manière qu'un acide gras insaturé. Un dosage en routine par ex. du seul 7-cétocholestérol dans ces aliments pourrait par conséquent être envisagé comme traceur de cette oxydation.

En définitive, on peut donc conclure que la stabilité oxydative du cholestérol dans les produits laitiers n'est que peu affectée par un stockage lorsque ce dernier est effectué dans de « bonnes » conditions ou par un traitement thermique à des fins culinaires si celui-ci est appliqué de façon usuelle et raisonnable. En outre, une bonne qualité du produit de départ ainsi que les précautions prises en général pour prévenir toute oxydation lipidique - notamment le recours à des emballages non perméables à l'oxygène - semblent suffisantes pour prévenir également l'oxydation du cholestérol. Les teneurs relativement basses détectées dans les produits laitiers ne laissent pas

entrevoir de dangers particuliers pour le consommateur. Certaines valeurs relativement élevées signalées par certains auteurs et par conséquent les risques qui pourraient leur être associés, pourraient donc avoir été surestimés.

CHAPITRE 6

Résumé

Le présent travail aborde successivement les mécanismes d'oxydation du cholestérol, le développement de méthodes de dosage des oxystérols et l'application de l'une d'elles (GC/MS) à diverses denrées alimentaires. L'aspect analytique est la partie clé de ce travail. Les techniques d'analyse des oxystérols par HPLC (détection dans l'UV), par TLC et par GC (détection par FID et MS) ont en effet été testées et comparées. La méthode par GC-MS en mode « SIM » a finalement été adoptée pour ses nombreux avantages: sélectivité, sensibilité, répétabilité, caractère ménageant, vaste domaine d'application et robustesse. Cette technique requière néanmoins un « clean-up » comportant plusieurs étapes telles que saponification douce de l'échantillon, extraction de l'insaponifiable et extraction sur cartouche aminopropyle. Une élimination des autres composés lipidiques et une séparation quantitative du cholestérol rendent ainsi possible le dosage successif de celui-ci et de ses produits d'oxydation. Ainsi peut-on déterminer le degré d'oxydation du cholestérol en recourant à un seul et même procédé de purification. Ce double dosage (cholestérol et produits d'oxydation) a ensuite été appliqué à des laits en poudre, des formules infantiles, des fromages, du beurre fondu, du saindoux et des poudres d'oeuf. Ce dosage a été validé selon les critères de répétabilité, de domaines de linéarité (de la réponse et des ajouts), de limites de détection et de quantification et de taux de récupération. Au nombre des produits laitiers étudiés, on a choisi plus particulièrement ceux pouvant présenter « un risque potentiel » à savoir i) ceux pouvant subir une photooxydation (stockage prolongé sous lumière intense de type blanc froid) tels que des fromages sous film transparent, ii) ceux exposés à une oxydation à l'air lors d'un entreposage prolongé (laits en poudre avec diverses activités en eau), iii) ceux exposés à une forte élévation de leur température en présence d'air comme des fromages à raclette et du beurre à rôtir. On peut conclure

de ce travail que, dans des conditions « normales » de fabrication, de stockage et de chauffage, aucun des produits étudiés ne semble présenter un risque pour le consommateur. Seules les conditions extrêmes de stockage où les facteurs « oxygène et lumière » ou « oxygène et faible activité en eau » étaient concomitants ont effectivement généré une importante quantité d'oxystérols (tests accélérés).

Summary

The present work successively tackles mechanisms of cholesterol oxidation, methods for quantification of oxysterols and application of one of there (GC/MS) in various foods. The analytical aspect is the central part of this work. Analysis of cholesterol oxides by HPLC (UV detection), TLC and GC (FID and MS detection) were tested and compared. The GC-MS method in « SIM » mode was finally chosen for its numerous advantages: selectivity, sensitivity, repeatability, mildness, vast range of applications and robustness. This technique requires a multi-step clean-up procedure: mild saponification of the sample, extraction of unsaponifiable and purification on an aminopropyl cartridge. Elimination of lipid compounds and quantitative separation of cholesterol permit the simultaneous analysis of cholesterol and its oxides. Degree of oxidation of cholesterol is also determined using a single clean-up. This double quantification was then applied to milk powders, infant formulas, cheeses, butter oil, lard and egg powders. Repeatability, ranges of linearity (of response and of spikes), limits of detection and of quantification and recovery rates were the criteria for validation. Dairy products presenting a potential hazard of cholesterol oxidation such as i) cheeses under transparent packages exposed to intense light (photo-oxidation) ii) samples exposed to long storage under oxygen (i.e. milk powder with different water activities) iii) raclette cheese or butter oil exposed to heat treatment, were investigated. The conclusion of this work is that, under correct conditions of processing, storage and heating, none of the products studied present a hazard for the consumer. An important amount of cholesterol oxides were only generated in dairy products exposed to harsh conditions of storage where the factors « oxygen and light » or « oxygen and low water activity » were concomitant (accelerated tests).

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Mechanismen der Oxidation des Cholesterins, die Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der oxidierten Cholesterine und die Anwendung einer davon (GC/MS) auf gewisse Lebensmittel. Der analytische Aspekt stellt den Hauptteil dieser Arbeit dar. Die Methoden zur Analyse der oxidierten Cholesterine mit Hilfe der HPLC (Nachweis im UV-Bereich), der TLC und GC (Nachweis durch FID und MS) wurden getestet und miteinander verglichen. Die GC-MS-Methode im "SIM"-Modus wurde schliesslich aufgrund seiner zahlreichen Vorteile wie Selektivität, Spezifität, Empfindlichkeit, Wiederholbarkeit, schonender Charakter, breiter Anwendungsbereich und Robustheit bevorzugt. Diese Technik erfordert zwar ein "clean-up", das mehrere Schritte wie schonende Verseifung der Proben, Extraktion des unverseifbaren Teiles und Reinigung auf einer Aminopropyl-Patrone umfasst. Eine Eliminierung anderer fetthaltiger Verbindungen und eine quantitative Trennung des Cholesterins machen eine gleichzeitige Bestimmung des Cholesterins und ihrer Oxidationsprodukte möglich. So kann der Oxidationsgrad des Cholesterins in einem einzigen Reinigungsschritt bestimmt werden. Diese doppelte Bestimmung (Cholesterin und Oxidationsprodukte) wurde sodann auf Milchpulver, Kindernährmittel, Käse, Bratbutter, Schweineschmalz und Eipulver angewendet. Dieses Verfahren wurde zudem nach den Kriterien der Wiederholbarkeit, der Linearität (mit Hilfe der Standard-Additions-Methode), der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, der Wiederfindungsraten und dem Auftreten von Artefakten validiert. Für die Untersuchung der verschiedenen Milchprodukte wurden speziell diejenigen ausgewählt, die ein "mögliches Risiko" darstellen. Es handelt sich dabei um solche, die einer Photooxidation (längere Lagerung unter intensiver Einwirkung von weiss-kaltem Licht) unterliegen wie Käse in einer transparenten Verpackung, um solche, die einer Oxidation durch Luft während einer längeren Lagerung ausgesetzt sind (Milchpulver mit unterschiedlichen Wasseraktivitäten) und um solche, die bei stark erhöhten Temperaturen in Gegenwart von Luft wie Raclette und Bratbutter verwendet werden. Aus dieser Arbeit kann geschlossen werden, dass unter "normalen" Bedingungen während der Herstellung, Lagerung und Erhitzung keines der untersuchten Produkte ein Risiko für den Konsumenten darstellt. Einzig bei

extremen Lagerungsbedingungen, bei denen die Faktoren "Sauerstoff und Licht" oder "Sauerstoff und niedrige Wasseraktivität" (beschleunigte Tests) zusammentreffen, haben sich bedeutende Mengen an oxidierten Cholesterinen gebildet.