



METHODES SPECTROPHOTOMETRIQUES ET CHROMATOGRAPHIQUES POUR LA DETERMINATION DE LA VITAMINE C♦

Ana-Maria Hossu*, Cristiana Radulescu, Ionica Ionita,
Elena Irina Moater

*Université „Valahia” Targoviste, Faculté des Sciences, Département de
Chimie, Rue Unirii 18-20, Targoviste, Roumanie*

*Correspondance : anahossu@yahoo.co.uk

Abstract: Vitamin C is an important biological molecule involved in many biological and biochemical processes as reducing agent, enzyme cofactor and nutritional factor.

Due to the widespread use of vitamin C, a large number of methods have been developed for quantifying vitamin C contents in natural and fortified food samples and pharmaceuticals: titrimetry, voltammetry, potentiometry, fluorometry, spectrophotometry, kinetic-based chemiluminescence, flow injection analyses (FIA) and chromatography. It is therefore essential to assess these methods.

Accordingly, this paper reviews spectrophotometric and chromatographic methods for the determination of vitamin C from food samples and pharmaceutical products.

Keywords: *vitamin C, ascorbic acid, pharmaceuticals, spectrophotometry, HPLC*

♦ Paper presented at **COFrRoCA 2006: Quatrième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée**, 28 June – 2 July, Clermont-Ferrand, France

INTRODUCTION

La détermination de vitamine C a gagné la signification augmentée dans plusieurs domaines de chimie analytique comme pharmaceutique, clinique et d'application d'aliments parce que le manque de cette vitamine détermine beaucoup de maladies : le scorbut, l'empoisonnement de prise de courant, la maladie de foie, les réactions allergiques, l'artériosclérose, etc.

D'autres symptômes de son manque ont été annoncés, mais ils ne sont pas bien définis. On croit que cela participe au métabolisme intermédiaire en plus de son rôle dans le système immunitaire, la biosynthèse et le métabolisme de certaines enceintes. Aussi, il a été identifié comme un éboueur radical dans vivo. En gardant en vue son importance, l'analyse de produits pharmaceutiques contenant cette vitamine suppose la signification.

Un grand nombre de méthodes a été annoncé pour la détermination d'acide ascorbique : titrimétrie, voltamétrie, potentiométrie, fluorométrie, spectrophotométrie, cinétique a basé la chemiluminescence, les analyses d'injection d'écoulement (FIA) et la chromatographie.

Il y a de nombreuses méthodes non-spectrophotométrique qui ont été reconsidérés par Arya [1] et leur nombre et sorte augmentent rapidement et les méthodes chromatographique, le même.

MÉTHODES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES

L'acide ascorbique a des spectres d'absorption UV caractéristiques et ses maximums sont selon pH : $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 695$ dans HCl 0,01N ($\lambda = 245$ nm) et $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 945$ dans le tampon phosphate, pH = 6,4 ($\lambda = 265$ nm) [2].

Les méthodes spectrophotométriques dans le domaine visible sont recommandées pour le dosage d'acide ascorbique des produits de multi vitamine à cause de leur spécificité de certains d'entre eux. Szepesy [3] recommande le dosage à 240-245 nm dans le médium neutre en présence du cyanure de potassium [10 µg/mL].

La majorité de méthodes spectrophotométriques est fondée sur leurs propriétés de réduction et d'oxydation ou capacité de s'accoupler avec les dérivés diazotize d'aniline. Beaucoup de méthodes spectrophotométriques basées sur la réduction de fer (III) au fer (II) avec l'acide ascorbique, suivi par complexion de fer réduit (II) avec de différents agents, comme 1,10-phenanthroline et 2,2'-dipyridyl, ont été annoncées.

D'autre part, l'acide ascorbique a plusieurs atomes de donateur capables de formation complexe en métal et attachant avec le zinc(II), le manganèse(II), le cadmium(II) et les métaux alcalins de terre.

Une méthode spectrophotométrique simple et extrêmement sensible pour la détermination d'acide ascorbique a été établie en utilisant le fer(III) et

p-carboxyphenylfluorone (PCPF) dans un médium surfactant micellaire cationique [4]. L'absorptivité molaire apparente de la méthode proposée, qui n'exige pas de procédure d'extraction, était $2,05 \times 10^6 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ à 655 nm. La procédure était successive appliquée aux essais d'acide ascorbique dans les préparations pharmaceutiques, les résultats analytiques étaient satisfaisants. Il a été suggéré que le complexe coloré produit était une mixture du complexe de fer(II)-PCPF (1:2) et le complexe DHAA-fer(III)-PCPF (1:2:2).

Des cuvettes disponibles, de plastique avec la couche de détecteur intégrée faite du Prussien bleu ont été utilisés pour la détermination spectrophotométrique de vitamine C dans les produits pharmaceutiques (Vitamine C, Cebion, Aspirine C, Upsarin C, Scorbolamid, Efferalgan C, Strepsils, Calcium C, Magnésium, Duovit, Supradyn, Biovital) et présentés dans tableau 1 [5]. Les ascorbates provoquent la décoloration de la couche en raison de sa réduction au Prussien blanc. La diminution d'absorbance du film mesuré à 720 nm est utilisée comme le signal analytique. L'épreuve est sélective pour la vitamine C et les résultats d'analyse de produits pharmaceutiques sont comparables avec ceux obtenus en utilisant la méthode du pharmacopée. Cette épreuve est extrêmement bon marché (le prix d'un film PB à enduit cuvette est plus bas que \$ 0,1) et simple dans la fabrication. La procédure analytique est simple et aucun agent supplémentaire n'est nécessaire pour la performance de l'épreuve.

Tableau 1. L'analyse de produits pharmaceutiques contenant la vitamine C

Produit pharmaceutique	Fournisseur	Enceintes principales	Contenu d'acide ascorbique [mg/tab]	
			Cuvette test	Iodo-métrie
Vitamine C	Polfa	Acide ascorbique	97±2	98±4
Cebion	Merck	Acide ascorbique	98±5	98±2
Aspirin C	Bayer	Acide acétylsalicylique	223±2	220±2
Upsarin C	Upsa	Acide acétylsalicylique	185±2	188±3
Scorbolamid	Polpharma	Salicylamide	137±2	139±2
Efferalgan C	Upsa	Paracetamol	193±2	195±4
Strepsils	Boots	Glucose, saveurs	96±5	96±4
Calcium C	Polfa	Calcium lactogluconate	173±2	176±2
Magnesium	Polfa	Magnésium ascorbate	483±9	482±5
Duovit	Krka	Vitamines	55±1	55±1
Supradyn	Roche	Vitamines, minérales	133± 4	135± 2
Biovital	Rhône-Poulenc	Vitamines, minérales	17±3	18±2

Une autre méthode spectrophotométrique a été proposée par Pandey [6]. L'acide ascorbique a été déterminé spectrophotométrique à 336 nm, via une diminution dans l'absorbance dans tetrachlorobenzoquinone (chloranil) $7 \times 10^{-4} \text{ M}$ dans l'eau et l'acétone 80 % (v/v) à la température de pièce.

La méthode proposée a été avec succès appliquée aux préparations pharmaceutiques. Des forts agents réduisant en incluant la plupart de thiols et de serine, glycine, alanine,

citrique, oxalique, les tartriques acides, le glucose, le saccharose et maltose ne se mêlent pas, même lorsque le présent jusqu'à un 10-15 molaire excès de vitamine C. Dorénavant la résolution de mélanges de vitamine C et de thiols est possible, en éliminant l'utilisation d'un agent masquant pour thiols dans d'autre méthode.

MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES

La plupart des vitamines présentées dans les préparations pharmaceutiques ou dans les produits naturels sont accompagnée par un certain nombre d'enceintes de près liées. Cela explique pourquoi les méthodes chromatographiques sont si souvent utilisées dans l'analyse de ces enceintes. CLHP convient presque idéalement pour ces enceintes à cause de sa simplicité, sélectivité et sensibilité [7-12].

L'acide ascorbique a été déterminé dans les préparations de multi vitamine, dans le plasma et dans les fruits sur Lichrosorb NH₂ avec une colonne de garde de Vydac RP avec le 0,0025 M KH₂PO₄-acétonitrile comme phase mobile (1:1) et avec la détection à 254 ou 210 nm [13].

Il y a un certain nombre de modifications de CLHP pour l'analyse d'acide ascorbique dans les préparations de multi vitamine [7-9, 14-17], dans une mixture avec l'acide D-isoascorbique [18-21] ou l'acide dehydroascorbique [20-26]. Le L-acide ascorbique et l'acide D-isoascorbique ont été séparés tant sur les changeurs d'anion [27, 28] et sur colonnes RP C-18 [29].

Les deux acides ont été aussi séparés sur Lichrosorb NH₂ avec une phase mobile de tampon phosphate et acétonitrile pH 4,4 - 4,7 et avec la détection à 268 nm [18]. Palmer [30] a développé une méthode pour la séparation de L-acide ascorbique et d'acide D-isoascorbique sur un changeur d'ion avec le tampon phosphate 1 mM comme phase mobile de pH 6 dans l'acétonitrile aqueux 20 % et avec la détection à 265 nm. Le processus de séparation était indépendant de pH dans la gamme de pH 3,0 - 7,0 [28].

L'acide ascorbique et son 2-sulfate ont été déterminés dans le plasma et l'urine sur Permaphase ODS avec la bromure de cetyltriméthylammonium utilisée comme un agent de paire d'ion et une détection à 254 nm [31]. Dans les conditions optimales, la limite de détection était 1 µg/mL de 2-sulfate.

La même analyse a été aussi exécutée sur la Bondapak AX Corasil avec le tampon phosphate comme la phase mobile. Le détecteur UV a été montré à 254 nm [32]. L'acide ascorbique et son 2-sulfate, le 2-phosphate, 2-O-méthylascorbique acide et 5-méthyl-3,4-dihydroxytétrone ont été séparés et déterminés sur une colonne ODS avec une phase mobile contenant diméthylhexylamine dans l'éthanol aqueux. Un détecteur électrochimique a été utilisé [33].

La vitamine C et flavin-adenin nucléotide a été analysée sur un Shodex OH Pak M-614 colonne en utilisant une phase mobile de 0,01 M KH₂PO₄ avec KH₂PO₄ (pH 5,0) et la détection à 254 nm.

La stabilité d'acide ascorbique a été augmentée en ajoutant $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Cette modification a été utilisée dans une étude des effets de lumière et de température sur la stabilité d'acide ascorbique [34].

La détection ampérométrique avec une limite de détection de 10 ng a été utilisée dans l'analyse de vitamine C dans le plasma et les leucocytes [35].

La sensibilité de la détermination de vitamine C dans les échantillons biologiques était obtenu en déplaçant la longueur d'onde du détecteur UV à 214 nm [25], en utilisant électrochimique [33, 35, 36] ou à détection de fluorescence [20, 22, 24, 26, 36 - 38] ou en réduisant l'acide déhydroascorbique à l'acide ascorbique avec dithiothreitol et en mesurant à 267 nm [39].

La détection électrochimique a été aussi utilisée dans l'analyse de préparations de multi vitamine et leur comportement est présente dans le tableau 2 [15].

Tableau 2. *Détection électrochimique de vitamine C*
Lichrosorb RP-18 colonne (250×4,6 mm i.d.), débit 1 mL/min, phase mobile acétonitrile – 0.05 M KH_2PO_4 , électrode de potentiel +1,4 V vs. Ag/AgCl [15]

Enceinte	Temps de rétention (min)	
	Méthode de détection	
	Electrochimique	UV a 254 nm
Biotine	8,92	8,89
Riboflavine	-	7,22
Niacinamide	-	2,52
Acide ascorbique	2,47	2,46
Hydrochlorure de thiamine	-	2,77

L'utilisation de chromatographie liquide de phase inversée, CLPI [38, 40 - 50] pour la détermination d'acide ascorbique avec la détection UV [38, 40, 41, 45 - 50] dans la gamme 220 - 260 nm a été annoncée par plusieurs chercheurs. Les échantillons de produits naturels divers comme les légumes, les fruits, les concentrés de jus, le thé, le lait, les préparations pharmaceutiques, les vitamines, l'urine, le sang, l'aquaculture et les aliments ont été analysés par cette technique en utilisant l'ammonium dihydrogenphosphate, l'acide pentane sulfonique 10 mM, l'eau : méthanol (5:95) ou l'acide métaphosphorique 1 % comme solvants.

L'acide ascorbique dans les tissus, les liquides biologiques et les aliments a été déterminé après le fait de réduire avec homocystéine à pH 7,0 - 7,2 depuis 30 minutes, mais la détection doit être réalisée au cours de 10 minutes de préparation de preuve [43]. En plus de la détection UV, d'autres méthodes comme électrochimique [51], en incluant ampérométrique [52 - 55], la détection a aussi été appliquée.

La phase inversée LC avec les colonnes comme Zorbax ODS [56] et les pré colonnes RP-18 [57] a été utilisée pour déterminer l'acide ascorbique dans les fruits différents. Le problème avec l'emballage de phase inversée est que l'acide ascorbique n'est pas sans

hésiter retenu et donc, exige l'adjonction d'un ion cationique appariant l'agent à la phase mobile. Pour ce but, plusieurs agents modifiants [55, 58 - 65] comme decylamine [58], tridecylamine [55], tridecylammonium formate [59, 60], le tetrabutylammonium phosphate [61], le gel de silice octadecasilyl-modifié [62] ou le chlorure de trioctylammonium [63] ont été utilisés.

Pourtant, le temps de rétention relatif d'acide ascorbique et d'autres composantes peut être changé par un choix convenable d'ion appariant l'agent, pH et la force ionique. Cystéine, reductones et ions réduits en fer et de zinc sont tolérés [61, 62], mais autres substances élue en même temps comme l'acide ascorbique qui sont aussi l'absorption d'UV reste non identifié [59, 60].

L'acide ascorbique dans les sodas et les jus de pomme [65], après que la séparation sur un C₁₈ a inversé la colonne de phase en utilisant hydrogenphosphate-dihydrogen le tampon phosphate (pH 6,5) comme un solvant élue, est mélangée avec [Ru(bpy)₃]²⁺ et déterminée par electrochemiluminescence. L'acide citrique et les aminoacides secondaires se mêlent de la détermination. Pourtant, l'interférence en raison de l'acide citrique peut être évitée par l'utilisation de tetrabutylammonium tetrafluoroborate comme un ion appariant l'agent. Bien que les méthodes LC soient assez sensibles pour mesurer de très petites quantités de la vitamine, la rapidité désirable de ces méthodes manque généralement. Pourtant, en les automatisant, on peut éviter le temps d'opérateur excessif.

La détermination de L-acide ascorbique par le liquide du gaz chromatographie (GLC) a été réalisée dans les échantillons d'aliments [66] après le fait de dissoudre dans pyridine, suivi par le traitement avec phenylborate à 50 °C pour 4 h. Les réponses linéaires sont obtenues dans le domaine de concentrations de 2 - 10 mg/mL. La mesure du contenu d'acide ascorbique de produits pharmaceutiques [67] par un gaz capillaire chromatographique, la méthode a été décrite, qui implique une colonne Stabilwax-DA et une ionisation de flamme. GLC de dérivés trimethylsilyl d'acide ascorbique a été utilisé pour sa détermination dans les tissus du cerveau [68] et dans quelques produits alimentaires [69].

Ces méthodes exigent aux précautions spéciales de prévenir des pertes d'acide ascorbique pendant la préparation de promotion pour trimethylsilylation. Depuis GLC après trimethyl-silyl derivatization a produit plusieurs pics des tissus et les aliments, la spécificité de ces méthodes exige l'évaluation par la masse spectrométrie.

CONCLUSIONS

Des nombreuses méthodes ont été annoncées pour la détermination de vitamine C dans les produits pharmaceutiques et plus doivent venir. Chaque méthode annoncée est montrée pour trouver l'application dans l'analyse d'un ou l'autre type d'échantillons. La mesure de vitamine C contenu dans le sang est de l'importance comme il reflète la

vitamine du corps C le statut et donc, exige des méthodes pour son analyse qui peut fournir des résultats précis et exacts sans sacrifier leur sensibilité et sélectivité.

Plus d'attention doit être dirigée vers la conclusion de la solution de la question fondamentale de que la vitamine de rôle C joue dans différentes organelles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Arya, S.P., Mahajan, M., Jain, P., *Analytica Chimica Acta*, **2000**, **417**, 1 –14.
2. Lawendel, J.S., *Nature (London)*, **1956**, **178**, 873.
3. Szepesy, A., *Acta pharm. hung.*, **1966**, **36**, 280.
4. Fujita, Y, Mori, I., Yamaguchi, T., Hoshino, M., Shigemura, Y., Shimano, M., *Anal. Sciences*, **2001**, **17**, 853.
5. Koncki, R., Lenarczuk, T., Glab, S., *Analytica Chimica Acta*, **1999**, **379**, 69-74.
6. Pandey, N.K., *Anal. Chem.*, **1982**, **54**, 793.
7. Pellerin, F., Dumitrescu, D., *Talanta*, **1980**, **27**, 243.
8. Thompson, J.N., *Trace Anal.*, **1982**, **2**, 1.
9. Wachob, G.O., *Liq. Chromatogr. HPLC Mag.*, **1983**, **1**, 110.
10. Zonta, F., Stancher, B., *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, **1983**, **60**, 65.
11. Roeck-Holtzhauer, Y., Montel, E., *Ann. Falsif. Expert. Chem. Toxicol.*, **1983**, **76**, 331.
12. Cannelle, T., Bichi, G., *Boll. Chim. Farm.*, **1983**, **122**, 205.
13. Rose, R.C., Nahrwold, D.L., *Anal. Biochem.*, **1981**, **114**, 140.
14. Woollard, D.C., *J. Chromatogr.*, **1984**, **301**, 470.
15. Kamata, K., et al., *J. Chromatogr.*, **1986**, **356**, 326.
16. Wills, B.B.H., et al., *J. Chromatogr. Sci.*, **1977**, **15**, 262.
17. Sood, S.P., et al., *Anal. Chem.*, **1976**, **48**, 796.
18. Bui Nguyen, M.H., *J. Chromatogr.*, **1980**, **196**, 163.
19. Finley, J.H., Duang, E., *J. Chromatogr.*, **1981**, **207**, 449.
20. Seki, T., et al., *J. Chromatogr.*, **1987**, **385**, 287.
21. Lloyd, L.L., et al., *Chromatographia*, **1987**, **24**, 371.
22. Veazey, R.L., *J. Chromatogr.*, **1980**, **200**, 153.
23. Farber, C.M., et al., *Anal. Biochem.*, **1983**, **134**, 355.
24. Speak, A.J., et al., *J. Chromatogr.*, **1984**, **305**, 53.
25. Wimalasiri, P., Willis, R.B.H., *J. Chromatogr.*, **1983**, **256**, 368.
26. Seki, T., et al., *J. Chromatogr.*, **1985**, **332**, 283.
27. Pachla, L.A., Kissinger, P.T., *Methods Enzymol.*, **1979**, **62**, 15.
28. Geigert J., et al., *J. Chromatogr.*, **1981**, **206**, 396.
29. Pachla, L.A., Kissinger, P.T., *Anal. Chem.*, **1976**, **48**, 364.
30. Palmer, J.K., *Anal. Letters*, **1975**, **8**, 215.
31. Akada, Y., et al., *J. Pharm. Soc. Japan*, **1979**, **99**, 687.
32. Mauro, D., et al., *J. Chromatogr.*, **1980**, **187**, 421.
33. Tsao, C.S., Young, M., *J. Chromatogr.*, **1985**, **330**, 408.
34. Seki, T., et al., *J. Pharm. Soc. Japan*, **1981**, **101**, 836.
35. Tsao, C.S., Salimi, S.L., *J. Chromatogr.*, **1981**, **224**, 477.
36. Wills, R.B.H., et al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1983**, **66**, 1377.

37. Vanderslice, J.T., Higgs, D.J., *J. Chromatogr. Sci.*, **1984**, **22**, 485.
38. Parviainen, M.T., et al., *J. Liq. Chromatogr.*, **1986**, **9**, 2185.
39. Ziegler, S.J., et al., *J. Chromatogr.*, **1987**, **391**, 419.
40. Li, L., Kang, J., Yang, D., Li, T., *Sepu*, **1986**, **4**, 334.
41. Brokken, K., *Chromatogram*, **1990**, **11**, 5.
42. Ren, Y., Huang, B., Yu, R., *Shipin Yu Fajiao Gongye*, **1993**, **2**, 12.
43. Behren, W.A., Madere, R., *Anal. Biochem.*, **1987**, **165**, 102.
44. Nyssonen, K., Pikkariainen, S., Parviainen, M.T., Heinonen, K., Mononen, I., *J. Liq. Chromatogr.*, **1988**, **11**, 1717.
45. Gennaro, M.C., Bertolo, P.L., *J. Liq. Chromatogr.*, **1990**, **13**, 1419.
46. Han, H., Chen, Y., Yeshibo, Z., *Yufangyixue Zazhi*, **1987**, **21**, 351.
47. Lloyd, L.L., Warner, F.P., Kennedy, J.F., White, C.A., *J. Chromatogr.*, **1988**, **437**, 447.
48. Racz, E., Parlagh-Huszar, K., Keckes, T., *Period. Polytech. Chem. Eng.*, **1991**, **35**, 23.
49. Uzcategui, A., *Edgar Politecnia*, **1985**, **10**, 221.
50. Tsushida, T., Fukazawa, M., *Chagyo Gijutsu Kenku*, **1980**, **58**, 29.
51. Hidioglou, N., Madere, R., Behrens, W.A., *J. Food Compos. Anal.*, **1998**, **11**, 89.
52. Behren, W.A., Madere, R., *J. Liq. Chromatogr.*, **1994**, **17**, 2445.
53. Kitada, Y., Tamase, K., Sasaki, M., Yamazoe, Y., *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **1989**, **36**, 592.
54. Kutnink, M.A., Omaye, S.T., *J. Food Sci.*, **1987**, **52**, 53.
55. Pachla, L.A., Kissinger, P.T., *Methods Enzymol.*, **1979**, **62**, 15.
56. Ding, H., Zhang, S., *Sepu*, **1993**, **11**, 174.
57. Rodriguez, M.A.R., Vazquez Oderiz, M.L., Lopez Hernandez, J. Simal Lozano, J., *J. Chromatogr. Sci.*, **1992**, **30**, 433.
58. Tsao, C.S., Salimi, S.L., *J. Chromatogr.*, **1982**, **245**, 345.
59. Augustin, J., Beck, C., Marousek, G.I., *J. Food Sci.*, **1981**, **46**, 312.
60. Sood, S.P., Sartori, L.E., Wittmer, D.P., Haney, W.G., *Anal. Chem.*, **1976**, **48**, 796.
61. Ruckermann, H., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1980**, **171**, 357.
62. Ruckermann, H., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1980**, **171**, 446.
63. Parolari, G., *Ind. Conserv.*, **1982**, **57**, 19.
64. Neils, H.J., et al., *J. Chromatogr. Sci.*, **1997**, **35**, 337.
65. Chen, X., Sato, M., *Anal. Sci.*, **1995**, **11**, 749.
66. T. Watanabe, S. Murota, *Kobe Joshi Daigaku Kiyo* 12 (1981) 87.
67. Gabrio, T., Plagge, S., Froehlich, L., *Zentralbl. Pharm. Pharmakother. Laboratoriumsdiagn*, **1991**, **130**, 77.
68. Allison, J.H., Stewart, M.A., *Anal. Biochem.*, **1971**, **43**, 401.
69. Schlack, J.E., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1974**, **57**, 1346.